

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-237710

(P2014-237710A)

(43) 公開日 平成26年12月18日(2014.12.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7056 (2006.01)	A 6 1 K 31/7056	4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	

審査請求 有 請求項の数 29 O L (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願2014-167991 (P2014-167991)
 (22) 出願日 平成26年8月20日 (2014. 8. 20)
 (62) 分割の表示 特願2011-533399 (P2011-533399)
 の分割
 原出願日 平成21年10月24日 (2009.10.24)
 (31) 優先権主張番号 61/108,137
 (32) 優先日 平成20年10月24日 (2008.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/108,110
 (32) 優先日 平成20年10月24日 (2008.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/108,168
 (32) 優先日 平成20年10月24日 (2008.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511100970
 センブラ ファーマシューティカルズ、イ
 ンコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2
 7 5 1 7, チャペル ヒル, スイート 1
 0 0, 6 3 4 0 クアドラングル ドライ
 ブ
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (72) 発明者 フェルナンデス、プラブハバシ、ビー。
 アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2
 7 5 1 4, チャペル ヒル, 2 0 3 オ
 ルド フランクリン ロード ドライブ
 Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA13 MA01 MA04
 NA14 ZB35

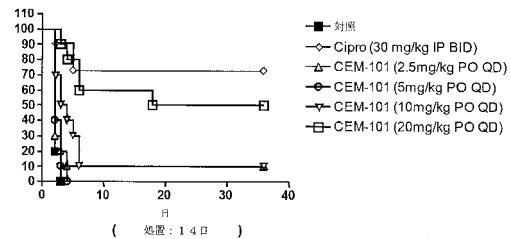
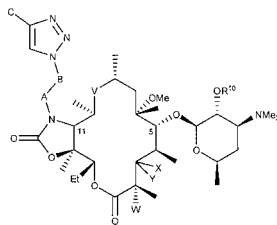
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トリアゾール含有マクロライドを用いた生体防御

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生体防御病原体により引き起こされる急性曝露
 および疾患の治療法の提供。

【解決手段】 式 I で表わされるマクロライド。



(R 1 0 は H 又はアシル ; X は H ; かつ Y は O R 7 ; R
 7 は単糖又は二糖等 ; X 及び Y は、付加された炭素と一
 緒になってカルバモイルを形成 ; V は C (O) 等 ; W は
 、 H 、 F 等 ; A は、 C H 2 、 C (O) などであり ; B は
 (C H 2) n であり、ここで、 n は 0 ~ 1 0 の整数である
 か、または B は不飽和炭素鎖であり ; かつ C は、水素
 、ヒドロキシなどである。)

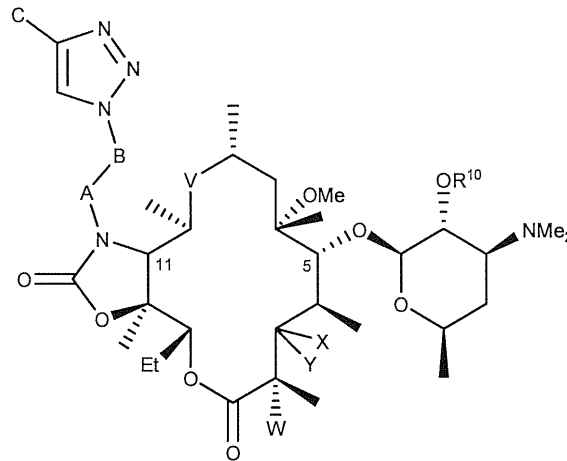
【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一部は炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される生物によって引き起こされる疾患を治療するための医薬品の製造における治療有効量の化合物であって、前記化合物が、式

【化 1】



10

および薬学的に許容されるその塩であり、ここで、

20

R_{10} は水素またはアシルであり；

X は H であり；かつ Y は OR_7 であり；ここで、 R_7 は単糖または二糖、アルキル、アリール、ヘテロアリール、アシル、または $C(O)NR_8R_9$ であり、ここで、 R_8 および R_9 は、各々独立に、水素、ヒドロキシ、アルキル、アラルキル、アルキルアリール、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルコキシ、ジメチルアミノアルキル、アシル、スルホニル、ウレイド、およびカルバモイルからなる群から選択されるか；または X および Y は、付加された炭素と一緒になってカルバモイルを形成し；

V は、 $C(O)$ 、 $C(=NR_{11})$ 、 $CH(NR_{12}, R_{13})$ 、または $N(R_{14})CH_2$ であり、ここで、 $N(R_{14})$ は、式 1 および 2 の化合物の $C-10$ 炭素に付加されており；ここで、 R_{11} はヒドロキシまたはアルコキシであり、 R_{12} および R_{13} は、各々独立に、水素、ヒドロキシ、アキル、アラルキル、アルキルアリール、アルコキシ、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ジメチルアミノアルキル、アシル、スルホニル、ウレイド、およびカルバモイルからなる群から選択され； R_{14} は、水素、ヒドロキシ、アルキル、アラルキル、アルキルアリール、アルコキシ、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ジメチルアミノアルキル、アシル、スルホニル、ウレイド、またはカルバモイルであり；

30

W は、 H 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、または OH であり；

A は、 CH_2 、 $C(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $C(O)NH$ 、 $S(O)_2$ 、 $S(O)_2NH$ 、 $C(O)NHS(O)_2$ であり；

B は $(CH_2)_n$ であり、ここで、 n は $0 \sim 10$ の整数であるか、または B は炭素数 $2 \sim 10$ の不飽和炭素鎖であり；かつ

40

C は、水素、ヒドロキシ、アルキル、アラルキル、arylalkyl、アルキルアリール、アルコキシ、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アミノアリール、アルキルアミノアリール、アシル、アシルオキシ、スルホニル、ウレイド、またはカルバモイルである、化合物の使用。

【請求項 2】

R_7 がアミノ糖またはハ口糖である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

R_7 が 4 - ニトロ - フェニルアセチルまたは 2 - ピリジルアセチルである、請求項 1 に記載の使用。

50

- 【請求項 4】
B がアルケニレンである、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 5】
V が - C (O) - である、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 6】
W が H または F である、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 7】
X および Y が付加された炭素と一緒にカルバモイルを形成する、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 8】 10
W が F である、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 9】
X および Y が付加された炭素と一緒にカルバモイルを形成し；かつ W が F である、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 10】
A が CH_2 であり、B が $(CH_2)_n$ であり、かつ n が 2 ~ 4 の整数である、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 11】
C がアリールまたはヘテロアリールである、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 12】 20
C が 3 - アミノフェニルまたは 3 - ピリジニルである、請求項 10 または 11 に記載の使用。
- 【請求項 13】
 R_{10} が水素である、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 14】
 R_7 がアミノ糖またはハ口糖である、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 15】
 R_7 が 4 - ニトロ - フェニルアセチルまたは 2 - ピリジルアセチルである、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 16】 30
請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の化合物、および 1 以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、もしくは賦形剤、またはその組合せを含む薬学的組成物。
- 【請求項 17】
炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される 1 以上の生物に曝露された患者の急性曝露治療のための方法であって、前記患者に請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の化合物、またはその薬学的組成物を投与し、ここで、前記薬学的組成物は、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の化合物、および 1 以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、もしくは賦形剤、またはその組合せを含む、工程を含む方法。
- 【請求項 18】 40
少なくとも一部は炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される 1 以上の生物によって引き起こされる疾患を有する患者を治療するための方法であって、前記患者に請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の化合物、またはその薬学的組成物を投与し、ここで、前記薬学的組成物は、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の化合物、および 1 以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、もしくは賦形剤、またはその組合せを含む、工程を含む方法。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) 項の下で、2008 年 10 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 61/108,110 号、2008 年 10 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 61/108,112 号、2008 年 10 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 61/108,134 号、2008 年 10 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 61/108,137 号、2008 年 10 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 61/108,168 号、および 2009 年 3 月 20 日に出願された米国仮特許出願第 61/162,109 号に対する恩典を主張するものであり、これらの各々の開示全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本明細書に記載の発明は、生体防御病原体によって引き起こされる急性曝露および疾患の治療に関する。特に、本明細書に記載の発明は、マクロライドおよびケトライド抗生物質を用いた、生体防御病原体によって引き起こされる急性曝露および疾患の治療に関する。

10

【背景技術】

【0003】

大量感染を引き起こすエアロゾル化した微生物が戦場で使用されるかまたはこのような微生物によって国内テロ攻撃を受けるという恐れられているシナリオが存在し続けている。遺伝子操作または自然発生による最近の治療に対する耐性の可能性が加わることを考慮すると、新しい有効な抗生物質を同定することは、このような攻撃に対抗するために極めて重要である。生物テロや生物兵器と戦うための治療道具として、幅広い吸入病原体に対する有効な治療剤が必要となる。驚くべきことに、トリアゾール含有マクロライドおよびケトライドが、生物兵器および/または生物テロによる潜在的な脅威をもたらす様々な生物に対して高い活性を示すことが発見された。

20

【0004】

一実施形態では、1 以上の生物テロ病原菌および/または生物兵器病原菌から生じる疾患を治療するための化合物、組成物、方法、および医薬品が本明細書に記載されている。例示的な病原菌としては、炭疽菌 (BA)、ペスト菌 (YP)、野兔病菌 (FT)、鼻疽菌 (BM)、および類鼻疽菌 (BP) が挙げられる。別の実施形態では、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌から選択される 1 以上の生物テロ病原菌および/または生物兵器病原菌から生じる疾患を治療するための化合物、組成物、方法、および医薬品が本明細書に記載されている。驚くべきことに、本明細書に記載のトリアゾール含有化合物が野兔病菌に対して活性が高いことが本明細書で発見されている。別の実施形態では、本化合物、組成物、方法、および医薬品は、1 以上の生物テロ病原菌および/または生物兵器病原菌の曝露または吸入後の、医学的対策などの、曝露後予防手段として有用である。別の実施形態では、本化合物、組成物、方法、および医薬品は、肺炎、ペスト、野兔病、類鼻疽などを含むが、これらに限定されない、1 以上の生物テロ病原菌および/または生物兵器病原菌の曝露または吸入によって引き起こされる疾患を治療するのに有用である。

30

【発明の概要】

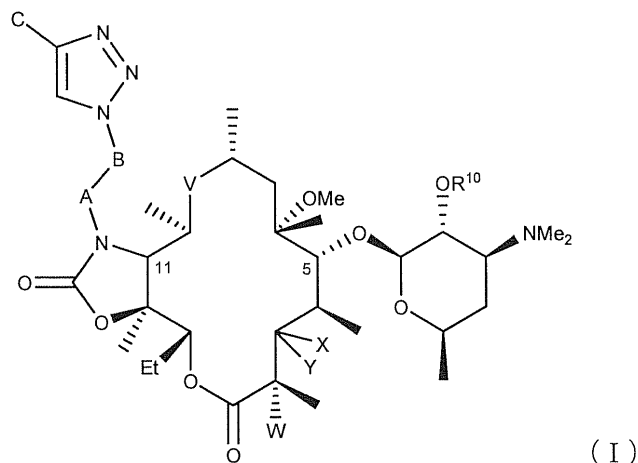
【課題を解決するための手段】

【0005】

例示的な一実施形態では、薬学的に許容されるその塩、水和物、溶媒和物、エステル、およびプロドラッグを含む、式 (I) の化合物が本明細書に記載される。

40

【化 1】



10

20

30

40

【0006】

一態様では、 R_{10} は水素またはアシルである。別の態様では、 X は H であり；かつ Y は OR_7 であり；ここで、 R_7 は単糖または二糖、アルキル、アリール、ヘテロアリール、アシル、または $C(O)NR_8R_9$ であり、ここで、 R_8 および R_9 は、各々独立に、水素、ヒドロキシ、アルキル、アラルキル、アルキルアリール、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アルコキシ、ジメチルアミノアルキル、アシル、スルホニル、ウレイド、およびカルバモイルからなる群から選択されるか；または X および Y は、付加された炭素と一緒にカルバモイルを形成する。

【0007】

別の態様では、 V は、 $C(O)$ 、 $C(=NR_{11})$ 、 $CH(NR_{12}, R_{13})$ 、または $N(R_{14})CH_2$ であり、ここで、 $N(R_{14})$ は、式1および2の化合物の $C-10$ 炭素に付加されており；ここで、 R_{11} はヒドロキシまたはアルコキシであり、 R_{12} および R_{13} は、各々独立に、水素、ヒドロキシ、アルキル、アラルキル、アルキルアリール、アルコキシ、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ジメチルアミノアルキル、アシル、スルホニル、ウレイド、およびカルバモイルからなる群から選択され； R_{14} は、水素、ヒドロキシ、アルキル、アラルキル、アルキルアリール、アルコキシ、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ジメチルアミノアルキル、アシル、スルホニル、ウレイド、またはカルバモイルである。

【0008】

別の態様では、 W は、 H 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、または OH である。

【0009】

別の態様では、 A は、 CH_2 、 $C(O)$ 、 $C(O)O$ 、 $C(O)NH$ 、 $S(O)_2$ 、 $S(O)_2NH$ 、 $C(O)NHS(O)_2$ である。別の態様では、 B は $(CH_2)_n$ であり、ここで、 n は $0 \sim 10$ の整数であるか、または B は炭素数 $2 \sim 10$ の不飽和炭素鎖である。別の態様では、 C は、水素、ヒドロキシ、アルキル、アラルキル、アルキルアリール、アルコキシ、ヘテロアルキル、アリール、ヘテロアリール、アミノアリール、アルキルアミノアリール、アシル、アシルオキシ、スルホニル、ウレイド、またはカルバモイルである。

【0010】

別の実施形態では、治療有効量の1以上の式(I)の化合物、または様々なその亜属を含む組成物が本明細書に記載される。薬学的組成物は、追加の薬学的に許容される担体、希釈剤、および/または賦形剤を含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】疾患の動物モデルにおける予備的なインビボ研究は、これらの病原体に対する防御も示す。

50

【図2】CEM-101最小阻害濃度分布を棒グラフの形で示す。

【図3】pH調整済みブロス中でのMIC測定に基づく、CEM-101、TEL、AZI、およびCLRに対する黄色ブドウ球菌ATCC 25923およびL・モノサイトゲネスEGDの比較感受性。

【図4】ブロス中（左のパネル；pH7.4）またはTHP-1マクロファージによる貪食後（右のパネル）の黄色ブドウ球菌（ATCC 25923）に対するCEM-101およびAZIの短期的な時間-殺菌効果。両方の薬物を、0.7mg/リットル（上のパネル）または4mg/リットル（下のパネル）のいずれかの細胞外濃度で使用した。CEM-101およびAZIのMICは、それぞれ、0.06および0.5mg/リットルであった。値は全て、3回の独立した実験の平均±標準偏差（SD）である（見えない場合、SD棒は記号よりも小さい）。

10

【図5】ブロス中（左のパネル）およびTHP-1マクロファージによる貪食後（右のパネル）の黄色ブドウ球菌（ATCC 25923）に対するCEM-101、TEL、CLR、およびAZIの濃度-効果関係。縦軸は、最初の種菌と比べた24時間での（ブロス）1ml当たりまたは細胞タンパク質1mg（THP-1マクロファージ）当たりのCFUの変化（log CFU）を示す。横軸は、以下のように抗生物質の濃度を示す：（i）上のパネル、ブロス中（左）または培養培地中（右）の重量濃度（mg/リットルで示す）および（ii）下のパネル、pH7.4のブロス中で測定したときのMICの倍数。値は全て、3回の独立した実験の平均±標準偏差（SD）である（見えない場合、SD棒は記号よりも小さい）。曲線当てはめパラメータの大域解析（一元配置分散分析）に基づく統計解析；ブロス中のCEM-101とAZIにのみ有意差がある（P=0.04）。関連する薬理的記述子の数値およびその差の統計解析を表1に示す。

20

【図6】食細胞内のL・モノサイトゲネス（EGD株、左のパネル）およびN・ニューモフィラ（ATCC 33153株、右のパネル）に対するCEM-101およびAZIの濃度-効果関係。縦軸は、最初の貪食後種菌と比べた24時間（L・モノサイトゲネス）または48時間（N・ニューモフィラ）での細胞タンパク質1mg当たりのCFUの変化（log CFU）を示す。横軸は、以下のように抗生物質の濃度を示す：（i）上のパネル、重量濃度（mg/リットルで示す）；（ii）下のパネル、pH7.4のブロス中で測定したときのMICの倍数。値は全て、3回の独立した実験の平均±標準偏差（SD）である（見えない場合、SD棒は記号よりも小さい）。

30

【図7】37℃でのTHP-1細胞におけるCEM-101と比較子の蓄積（薬物は全て、10mg/リットルの細胞外濃度である）。（A）蓄積の反応速度論（AZI）；Cc、細胞内濃度；Ce、細胞外濃度）；（B）蓄積に対するCEM-101（黒塗りの記号および実線）およびAZI（白抜きの記号および点線）の培養培地のpHの影響（30分）；（C）AZIおよびCEM-101の細胞蓄積に対するモネンシン（50μM；2時間のインキュベーション）、ベラパミル（150μM；24時間のインキュベーション）、またはゲムフィプロジル（250μM；24時間のインキュベーション）の影響。値は全て、3回の独立した測定の平均±標準偏差（SD）である（見えない場合、SD棒は記号よりも小さい）。

【図8】細胞内活性：他の抗ブドウ球菌剤を用いた比較研究。THP-1マクロファージ中の細胞内黄色ブドウ球菌（ATCC 25923株）に対する抗生物質の比較用量-静菌応答。棒は、MIC（mg/Lで示す）または細胞外静菌用量を表す。

40

【図9】時間0~24時間のDlog CFUの用量応答曲線と対数用量で表した、AZI、CLR、およびTELと比べたCEM-101の細胞内活性。

【発明を実施するための形態】

【0012】

一実施形態では、細胞内で活性のある化合物が本明細書に記載されている。トリアゾール含有マクロライドの細胞内蓄積および細胞内活性は、Pgpまたは多剤耐性タンパク質（MRP）阻害剤による影響を受けないことも本明細書で発見された。したがって、本明細書に記載の化合物は、P-糖タンパク質（原形質または透過性糖タンパク質、Pgp）

50

の基質ではないまたは悪い基質であると考えられている。Pgpは、いくつかの生物による特定の抗生物質に対する耐性をもたらす排出機構であることが理解されており、この機構は、例えば、AZIおよびERYについて、両方の抗生物質がP-糖タンパク質の基質となっているマクロファージにおいて報告されている。したがって、本明細書に記載の化合物が細胞内に蓄積することが分かったのは驚くべきことである。細胞内蓄積に加えて、本明細書に記載のトリアゾール含有マクロライドおよびケトライド化合物が高い細胞内活性を有することが発見されたことは驚くべきことである。本明細書に記載の化合物が、限定されるものではないが、膿瘍をはじめとする、細菌感染で見られるpHなどの、より低いpHで、マクロライドに典型的なタンパク質結合よりも低いタンパク質結合を有することが本明細書で分かったことも驚くべきことである。他のマクロライドやケトライドをはじめとする抗菌剤で通常観察される細胞内活性の欠如は、高いタンパク質結合による、および/または膿瘍に存在するような、細胞内コンパートメントの比較的より低いpHによる可能性があることが理解される。

10

20

30

40

50

【0013】

しかしながら、能動的な排出によって除去されない場合でも、リソソームコンパートメントのpHが低いために、マクロファージにおける、他のマクロライドやケトライドをはじめとする他の抗菌剤の濃度は、疾患を治療するのに有効でない可能性がある。例えば、(炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および/または鼻疽菌の1つまたは複数とその細胞内段階でとどまる)ファゴリソソームに広がる酸性環境は、AZI、CLRおよびTELなどの抗生物質の活性を障害し得る。本明細書に記載の化合物が低いpHでその抗菌活性を保持することが分かったのは予想外のことである。本明細書に記載の化合物の細胞内活性は、標的生物における耐性の迅速かつ完全な根絶、およびおそらくはまた、予防にわたっての、重要な決定因子であり得ることが理解される。

【0014】

効果的な抗微生物療法がないために、細菌が細胞内で生存することになり、これが、細菌のまん延、致命的な治療不全、および慢性的な再発性感染症の確立の主因となっている。これらの状況は、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌をはじめとする、生体防御生物によって引き起こされる感染の過程で観察される。

【0015】

抗生物質の細胞内蓄積は、細菌に対する有効な活性を示すものであると報告されているが、多くの一連のよく使用される抗生物質の薬力学的評価から、細胞内バイオアベイラビリティや感染コンパートメントにおける活性の調節などの他のパラメータも重要であることが明らかになっている。本明細書に記載のトリアゾール含有マクロライドが、TEL、AZI、およびCLRなどの、既知のマクロライドやケトライドと比べて、驚くべきほどの異なる挙動を示すために、本明細書に記載の観察は、これに関してマクロライドで行なわれたこれまでの観察を確認し、敷衍するものである。

【0016】

驚くべきことに、トリアゾール含有マクロライドは、AZIをはじめとする比較子よりもかなり大きい程度に蓄積し、かつより大きな効力(低い E_{50} 値および C_{50} 値)を一貫して表す一方で、比較子と同様の最大効力(E_{max})を示すことが見出されている。理論に束縛されるものではないが、これは、CEM-101に導入された構造的修飾がもたらす改善が、その作用様式の変化にではなく、薬物動態特性や(感染コンパートメントに広がる物理化学的条件に対するその低下した感受性をはじめとする)内活性の調節に関連することを示すと考えられている。したがって、トリアゾール含有マクロライドは、本質的に静菌的なマクロライド特性を示すが、細胞内環境において比較子よりも良好におよび比較子よりもかなり低い細胞外濃度でこの特性を表す。

【0017】

理論に束縛されるものではないが、CEM-101などのトリアゾール含有マクロライドの細胞蓄積は、全てのマクロライドに対して想定される弱い有機塩基のプロトン捕捉という一般的な機構によってもたらされると考えられているが、それは、蓄積が、AZIと

同じように、酸性 pH またはプロトンイオノフォアの特効薬に曝露することによってほぼ完全に抑制されるからである。酸性の膜結合コンパートメントにおける弱塩基の拡散 / 分離の一般的モデルに基づき、蓄積は、イオン化可能な基の数および非イオン化形態の薬物とイオン化形態の薬物の膜透過性係数の比によって決定される。CEM - 101 は、2つのイオン化可能な官能基を有するが、アミノフェニルtriaゾールの pKa を計算すると 4 未満となり、この分子は、中性 pH およびリソソームの pH (約 5) でさえも、(CLR や TEL と同様に) 主としてモノカチオン性であることが示唆される。対照的に、AZI は、pKa が 6 よりも大きい 2 つのイオン化可能な官能基を有しており、それゆえに、細胞内でジカチオン性である。しかしながら、CEM - 101 は、2 位にフルオロ置換基を有しており、このために、CLR または TEL よりも親油性になっているはずである。理論に束縛されるものではないが、CLR または TEL と比べた非イオン化形態の CEM - 101 とイオン化形態の CEM - 101 の透過定数の比は、弱い有機塩基の細胞蓄積のレベルを決定するために、イオン化可能な官能基の数と同じくらい重要であり得ると考えられている。理論に束縛されるものではないが、CEM - 101 のより大きい細胞蓄積は、1 つには、アジスロマイシンおよび他のマクロライドまたはケトライド系抗生物質とは対照的に、(本発明者らの培養条件下で THP - 1 マクロファージにより発現される) Pgp 介在性の排出に対して感受性がないことが原因であり得ると考えられている。

10

20

30

40

50

【0018】

多くの既知のマクロライドは大量分布することが観察されており、これは、酸性コンパートメント、すなわち、リソソームおよび関連する空胞における拡散 / 分離によって真核生物細胞内に蓄積するその能力に関連すると考えられている。結果として、既知のマクロライドは、これらのコンパートメントに局在する感染の治療のための候補と考えられてきた。したがって、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌などの典型的な細胞内病原体によって引き起こされる感染症を治療するのに好適であると仮定することが可能である。しかしながら、黄色ブドウ球菌または L. モノサイトゲネスなどの通性細胞内病原体を用いた細胞内活性と細胞外活性の直接的な定量的比較により、既知のマクロライドは、特に、その大きい細胞内蓄積を考慮すると、その抗菌能の最低限の部分しか細胞内で発現していないことが示唆される。ファゴリソソームおよび関連する空胞で複製する生物に対するこの最低限に抑えられた抗菌能は、既知のマクロライドの活性を低下させることが知られている酸性 pH に関連すると考えられている。別の要因は、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌などのいくつかの生物が、他の細胞内コンパートメントで実際に複製し得ることである。さらに、AZI などの特定のマクロライドは、マクロファージからの能動的な排出を受け、これがさらに、準最適な細胞内活性の一因となっている。

【0019】

対照的に、本明細書に記載の triaゾール含有化合物の細胞蓄積や細胞内活性は、抗生物質の細胞内薬力学の研究のために開発されたモデルを用いると、ケトライドをはじめとする既知のマクロライドよりも大幅に改善されている。したがって、本明細書に記載の化合物は、その MIC の最大効力を維持しており、かつ TEL、AZI、および CLR と比べて、例えば、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌の細胞内形態に対するより大きい効力を示す。理論に束縛されるものではないが、本明細書に記載の triaゾール含有化合物のこの改善された細胞内効力は、低い pH での保持された活性、および幅広い細胞内コンパートメントに分布する能力と相まって、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌に対するより高い内活性の組合せから生じると考えられている。

【0020】

別の実施形態では、triaゾール含有マクロライドおよびケトライド化合物は、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌に対する細胞内活性などの、細胞内活性を有する。真核生物細胞内でのこれらの生物の生存は、感染の持続にとって極めて重要である。ルーチンの感受性試験は、通常、細胞外細菌のみに対して決定されるものであり、それゆえ、細胞内生物に対する効力を予測するときに誤解を招く恐れがあることが理解される。

【0021】

別の実施形態では、本明細書に記載の化合物、方法、および医薬品は、治療有効量の本明細書に記載の1以上の化合物を含み、ここで、治療有効量は、細胞内抗菌活性を示すのに有効な量である。

【0022】

別の実施形態では、殺菌性の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、本明細書に記載の化合物、方法、および医薬品は、治療有効量の本明細書に記載の1以上の化合物を含み、ここで、治療有効量は、インピボでの殺菌活性をはじめとする、殺菌活性を示すのに有効な量である。マクロライドは、通常、静菌性であることが報告されている。静菌化合物は、細菌を死滅させるのではなく、その代わりに、例えば、細菌を死滅させずに細菌の増殖や生殖を阻害する。死滅させるのは、殺菌剤によって達成される。身体から微生物を除去するためには、静菌剤が免疫系とともに作用しなければならないことが理解される。静菌性抗生物質は、細菌タンパク質産生、DNA複製、または他の細菌細胞代謝の局面を妨害することによるものなどの、いくつかのメカニズムを介して細菌の増殖を制限し得る。対照的に、殺菌性抗生物質は細菌を死滅させ、静菌性抗生物質は、その増殖または生殖を遅くするに過ぎない。細胞壁前駆体を破壊すること、30sリボソームサブユニットに不可逆的に結合すること、翻訳忠実度を低下させ、不正確なタンパク質合成をもたらすことを含む、いくつかの殺菌機構が報告されており、これらの殺菌機構は、mRNAとリボソームタンパク質の複合体の早過ぎる分離により、タンパク質合成を阻害する。最終的な結果は、細菌細胞死である。

10

【0023】

別の実施形態では、本明細書に記載の化合物、組成物、方法、および医薬品は、治療有効量の本明細書に記載の1以上の化合物を含み、ここで、治療有効量は、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌の1つまたは複数に対する殺菌活性を示すのに有効な量である。理論に束縛されるものではないが、静菌剤を用いてこのような疾患を治療するのは、2つの点でうまくいかない可能性があると考えられている。第1に、免疫系が必要なレベルでこの疾患を治す手助けをするようには介入しない可能性があるため、この疾患の進行を静菌剤で止めるだけでは不十分である可能性がある。例えば、いくつかの細菌生物は、細胞内コンパートメントに存在するので、免疫系によって死滅させられない。したがって、治療コースが終わるとすぐに、疾患の急速な再発が起こり得る。第2に、細菌集団の一部が排除される可能性が高いので、残りの集団が、耐性発生について選択される可能性がある。細胞内で活性がある薬剤、および/または細胞内で活性がありかつ殺菌性である薬剤は、このような疾患を治療するのに有効であると本明細書で考えられている。例示的な一実施形態では、標的とされる細菌のMICの20倍の細胞内濃度を達成する本明細書に記載の化合物。全てではないにせよ、ほとんどのマクロライド系抗生物質は、インピトロで殺菌性であるが、インピボでは静菌性でしかないことが報告されている。例えば、本明細書に記載されるように、化合物の最後の投与の間の時間を延長したとき、汚染微生物数(bio load)の減少レベルは、本明細書に記載のトリアゾール含有化合物では変わらず、殺菌応答を示した。対照的に、TELおよびCLR投与群は、時間間隔を延長したときに、汚染微生物数の増加を示した。したがって、これらの後者2つのマクロライド/ケトライド剤は、より古典的な静菌応答を示した。

20

30

40

【0024】

CEM-101は、曝露後の炭疽菌症状に対して現在承認されている抗生物質(シプロフロキサシン、MIC₉₀ 0.031 µg/ml)または提案されている抗生物質(セスロマイシン、MIC₉₀ 0.063 µg/ml)のインピトロ活性と比べて遜色がない炭疽菌に対する強力なインピトロ活性を有することも分かった。

【0025】

図1に示すように、エアロゾル化した炭疽菌に対する用量依存的活性(生存パーセント)は、14日間の経口投与の間ずっと観察される。特に重要なのは、ここで示される防御用量(例えば、2.5~20.00 mg/kg)が、齧歯類モデルでCEM-101の高い血清レベルと組織レベルも提供するという事実であり、このレベルは、ヒトの治療にお

50

いて安全な投与レジメンを用いて達成可能なレベルである。蓄積したGLP毒性データに基づくと、CEM-101を、吸入炭疽に曝露した後の管理に推奨されるようなより長い期間（例えば、30～60日）にわたって投与することが可能になるはずである（Drusano, et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nov, 2008, p3973-3979, Vol 52, No 11）。これらの遅延型の予防レジメンは、休眠孢子が発芽した後の栄養細胞を根絶するために必要となり、この休眠孢子は、臨床症状を発症する前に、曝露した対象の肺組織に様々な期間および潜在的には延長した期間、存在することが知られている（Inglesby, et al., *JAMA* 2002; 287(17) 2236-2252）。さらに、曝露後または30～60日の予防レジメンの中断後の孢子の潜伏期間に対する不安を考慮すると、この生体防御シナリオでは、経口製剤による急性治療が、選択された、症状のある対象において必要となり得る。

10

【0026】

細胞モデルでは、CEM-101は、細胞内に存在する生物に対して他の抗菌剤よりも有意に活性が大きい。これは、多剤耐性細菌をはじめとする耐性細菌に対して活性がある。インビトロでのCEM-101に対する細菌耐性の証拠が観察されている。理論に束縛されるものではないが、生存能力と病原性を低下させる複数の突然変異を有することになるので、耐性になる例には、生存上の強みがない可能性が高いと考えられている。

【0027】

細胞内寄生が、ここで懸念されている生物学的脅威を与える病原菌による疾患の病態生理学の基礎になるので、抗微生物効力を伴って、組織に蓄積するおよび高い細胞内濃度を達成するCEM-101の能力は、薬理学的特性である。図6は、CEM-101によるレジオネラ・ニューモフィラ（リソソームコンパートメント）やリステリア・モノサイトゲネス（細胞質）のマクロファージ取込みと細胞内死滅が、試験した他のマクロライド系薬剤によるものよりもさらに活発であることを示す（Lemaire, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3734-3743, 2009）。血漿で達成される濃度よりも20～200倍高い細胞内濃度は、細胞への速やかな取込みと排出ポンプP-糖タンパク質の回避によって促進され、したがって、細胞内病原体の複製の効果的な根絶を可能にしている。CEM-101は、アジスロマイシンやセスロマイシンとは異なり、P-糖タンパク質の基質ではない。

20

30

【0028】

齧歯類および非ヒト霊長類における毒性研究でCEM-101が反復投与されたいくつかのインビボプロトコルによって、最大血漿レベルよりも約17～100倍高いCEM-101の組織レベルが示されている。組織中に蓄積したCEM-101および濃度は、肝臓、脾臓、肺、および唾液腺で最も高かった。この関係性は、放射性CEM-101を用いた齧歯類ADME研究で確認された。100mg/kgで経口投与された場合、約13:1の肺組織対血漿の放射能比がオスとメスの動物で観察された。20mg/kgでIV投与した後、このデータはより変動しやすくなり、オスの場合17.6、メスの場合6.2の肺/血漿比が観察された。CmaxおよびAUCの範囲は、用量範囲の全体にわたって0.022μg/mLおよび0.04μg·h/mLから1.96μg/mLおよび28.60μg·h/mLであった。50mgから1600mgの用量範囲全体にわたって、平均CEM-101 t_{max}は1.5時間から6.0時間に増加し、平均終末相半減期は、2.2時間から7.9時間に増加した。

40

【0029】

別の例示的な実施形態では、XおよびYが付加された炭素と一緒にC(O)基を形成する、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、XはHであり、YはOR⁷であり、ここで、R⁷は、クラジノシルなどの、単糖ラジカルである。別の実施形態では、Wがフルオロである、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、AおよびBと一緒に、限定されるものではないが、プロピレン、ブチレン、およびペンチレンをはじめとするアルキレン基を形成する、式(I)の化

50

合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、AおよびBが一緒になってブチレンを形成する、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、AおよびBが一緒になってペンチレンを形成する、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、AおよびBが一緒になってブチレンを形成し、Cが2-ピリジニルまたはアミノフェニル、例えば、3-アミノフェニルである、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、AおよびBが一緒になって、プロピレン、ブチレン、またはペンチレンを形成し、Cがアミノフェニル、例えば、3-アミノフェニルである、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、AおよびBが一緒になってペンチレンを形成し、Cが3-ピリジニルまたはベンゾトリアゾールである、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、Cが任意に置換されたアリールまたはヘテロアリール基である、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、Vがカルバモイル基である、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、R¹⁰が水素である、式(I)の化合物が本明細書に記載されている。別の実施形態では、XはHであり、YはOR⁷であり、ここで、R⁷は、クラジノシルなどの、単糖ラジカルであり、Cは3-ピリジニルまたはベンゾトリアゾリルである。

10

20

30

40

50

【0030】

別の実施形態では、Cは、フェニル、ハロフェニル、ハロアルキルフェニル、アミノフェニルなどの任意に置換されたフェニル、2-ピリジニルや3-ピリジニルなどの任意に置換されたピリジニル、任意に置換されたベンゾトリアゾールなどである。

【0031】

別の実施形態では、AおよびBは一緒になってブチレンまたはペンチレンを形成し、XおよびYは付加された炭素と一緒にC(O)基を形成する。

【0032】

別の実施形態では、VがC(O)である、前述の実施形態のいずれかに記載の化合物が記載されている。別の実施形態では、WがHまたはFである、前述の実施形態のいずれかに記載の化合物が記載されている。別の実施形態では、AがCH₂であり、Bが(CH₂)_nであり、nが2~4の整数である、前述の実施形態のいずれかに記載の化合物が記載されている。別の実施形態では、Cがアリールまたはヘテロアリールである、前述の実施形態のいずれかに記載の化合物が記載されている。別の実施形態では、Cが3-アミノフェニルまたは3-ピリジニルである、前述の実施形態のいずれかに記載の化合物が記載されている。別の実施形態では、R₁₀が水素である、前述の実施形態のいずれかに記載の化合物が記載されている。別の実施形態では、AおよびBが一緒になってブチレンまたはペンチレンを形成し、XおよびYが付加された炭素と一緒にC(O)基を形成する、前述の実施形態のいずれかに記載の化合物が記載されている。別の実施形態では、AおよびBが一緒になってブチレンまたはペンチレンを形成し、XおよびYが付加された炭素と一緒にC(O)基を形成し、WがFである、前述の実施形態のいずれかに記載の化合物が記載されている。

【0033】

別の実施形態では、抗菌組成物が本明細書に記載されており、ここで、この組成物は、有効量の明細書に記載の1以上の化合物、および薬学的に許容されるそのための担体、賦形剤、もしくは希釈剤、またはその組合せを含む。

【0034】

本明細書で使用されるとき、「組成物」という用語は、通常、指定された量の指定された成分を含む任意の産物、および直接的または間接的に、指定された量の指定された成分の組合せから得られる任意の産物を指す。例として、組成物は、1以上の担体、希釈剤、および/または賦形剤を含み得る。本明細書に記載の化合物は、1以上のそのための担体、希釈剤、および/または賦形剤を含む、本明細書に記載の方法のための従来の投薬形態として、治療有効量で製剤化し得る。このような製剤組成物は、本明細書に記載の方法のための幅広い種類の従来の経路により、当該技術分野で認識される製品を利用して、幅広

い種類の投薬形式で投与し得る。一般には、Remington's Pharmaceutical Sciences (第16版、1980)を参照されたい。本明細書に記載の組成物を、本明細書に記載の単離された化合物または本明細書に記載の化合物の塩、溶液、水和物、溶媒和物、およびその他の形態から調製し得ることが理解されるべきである。これらの組成物を、本明細書に記載の化合物の様々なアモルファス、非アモルファス、部分結晶、結晶、および/またはその他の形態学的形態から調製し得ることも理解されるべきである。

【0035】

本明細書で使用される「治療有効量」という用語は、研究者、獣医、医師または他の臨床医が求めている組織システム、動物またはヒトにおける生物学的または医学的応答を誘発する活性化合物または医薬品の量を指し、この生物学的または医学的応答には、治療される疾患または障害の症状の緩和が含まれる。一態様では、治療有効量とは、任意の医学的処置に適用できる妥当なベネフィット・リスク比で疾患または疾患の症状を治療または緩和し得る量のことである。しかしながら、本明細書に記載の化合物および組成物の合計日用量は、健全な医学的判断の範囲内において担当医によって決められ得ることが理解されるべきである。任意の特定の患者に対する特定の治療有効用量レベルは、治療される障害およびその障害の重症度；使用される特定化合物の活性；使用される特定組成物；患者の年齢、体重、全体的な健康、性別および食事；投与の時間、投与の経路、および使用される特定化合物の排泄速度；治療の持続期間；使用される特定化合物と組み合わせるまたは同時に使用される薬物；ならびに医学の分野でよく知られている同様の因子をはじめとする種々の因子によって決まるであろう。

10

20

【0036】

一実施形態では、本明細書に記載の化合物は、約1～約10mg/kg患者体重、約2～約8mg/kg患者体重、または約4～約6mg/kg患者体重の用量でヒトに経口投与される。別の実施形態では、成人ヒトの日用量は、約100～約1,000mgであり、これは、1日1回、1日2回、1日3回などで投与し得る。別の実施形態では、成人ヒトの日用量は、約400～約600mgであり、これは、1日1回、1日2回、1日3回などで投与し得る。このような用量を、1日1回、1日2回、または1日3回投与し得る。例示的な経口単位投薬量は、50、100、200、および400mg（単回または分割）である。理論に束縛されるものではないが、このような例示的投薬量は、例えば、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌の1つまたは複数に関して、本明細書に記載の化合物の殺菌活性を認めるのに十分であり得る、約1μg/mLの血漿レベルを達成するのに十分であると考えられている。本明細書に記載されるように、CEM-101をはじめとする本明細書に記載の化合物は、肺組織などの組織で高濃度に達することが理解される。理論に束縛されるものではないが、CEM-101をはじめとする本明細書に記載の化合物は、マクロライド耐性株、例えば、限定されるものではないが、炭疽菌、ペスト菌、野兔病菌、および鼻疽菌（これらの耐性株を含む）をはじめとする株のMICの少なくとも10倍となる組織レベルを達成し得ると本明細書で考えられている。

30

【0037】

本明細書に記載の化合物は、本明細書に記載の通りに、または米国特許出願公開第2006/0100164号およびPCT国際公開WO2009/055557号に従って調製することができ、これらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0038】

簡潔に述べると、トリアゾール含有ケトライドの合成は、クラリスロマイシン(2)からの12-アシル-イミダゾール中間体4(スキームI)の既知の2工程調製から開始される。中間体4は、対応する3-、4-または5-炭素結合アミノアルコールとの反応によって、11,12-環状カルバメート5a-cに変換される。5a-cを塩化トシルで処理すると、トシレート6a-cが得られる。このトシル基をNaN₃と置き換えると、対応するアジド化合物7a-cが得られる。クラジノース糖7a-cの8a-8cへの切断は、MeOH中のHClによる処理によって達成される。8a-cの3-ヒドロキシ基

50

のスワン酸化により、対応する保護ケトライド 9 a - c が得られ、その後、これらをメタノールで脱保護すると、それぞれ、所要のアジドケトライド 10 a - c が得られる。これらのアジド化合物を、ヨウ化銅の存在下、トルエン中 60 で末端置換アルキンと反応させると、対応する 4 - 置換 - [1 , 2 , 3] - トリアゾール 11 a - 18 a、11 b - 18 b、および 11 c - 18 c が位置選択的に得られた。

【 0039】

中間体 10 a - c のアジドは、置換アセチレンとの付加環化反応によって 4 - 置換 - [1 , 2 , 3] - トリアゾールに変換される。トリアゾール環は、スキーム I I の経路 A に示すように、1 , 4 - 位置異性体と 1 , 5 - 位置異性体の混合物を生じさせるアジドとアルキンのヒュスゲン 1 + 3 付加環化反応によって形成してもよい。あるいは、スキーム I I の経路 B に示すように、反応液への Cu I 触媒の添加を用いて、1 , 4 - 位置異性体を選択的にまたは排他的に生成させる R o s t o v t s e v ら⁸の方法に従ってもよい。

10

【 0040】

トリアゾール環側鎖もクラリスロマイシン環系に組み入れられる。一実施形態では、ブチルアルキル側鎖が選択される。ケトライドシリーズの多くのブチル側鎖類似体により、インビトロの M I C 結果に基づく抗菌活性が改善されていることが理解される。中間体 7 b は、スキーム I I I に示すように、銅が触媒する末端置換アセチレンとの環化によって、4 - 置換 - [1 , 2 , 3] - トリアゾールに直接的に変換される。19 a - e のアセテート保護基をメタノール中の L i O H で除去すると、対応する 4 - 置換 - [1 , 2 , 3] - トリアゾール 20 a - e が得られる。

20

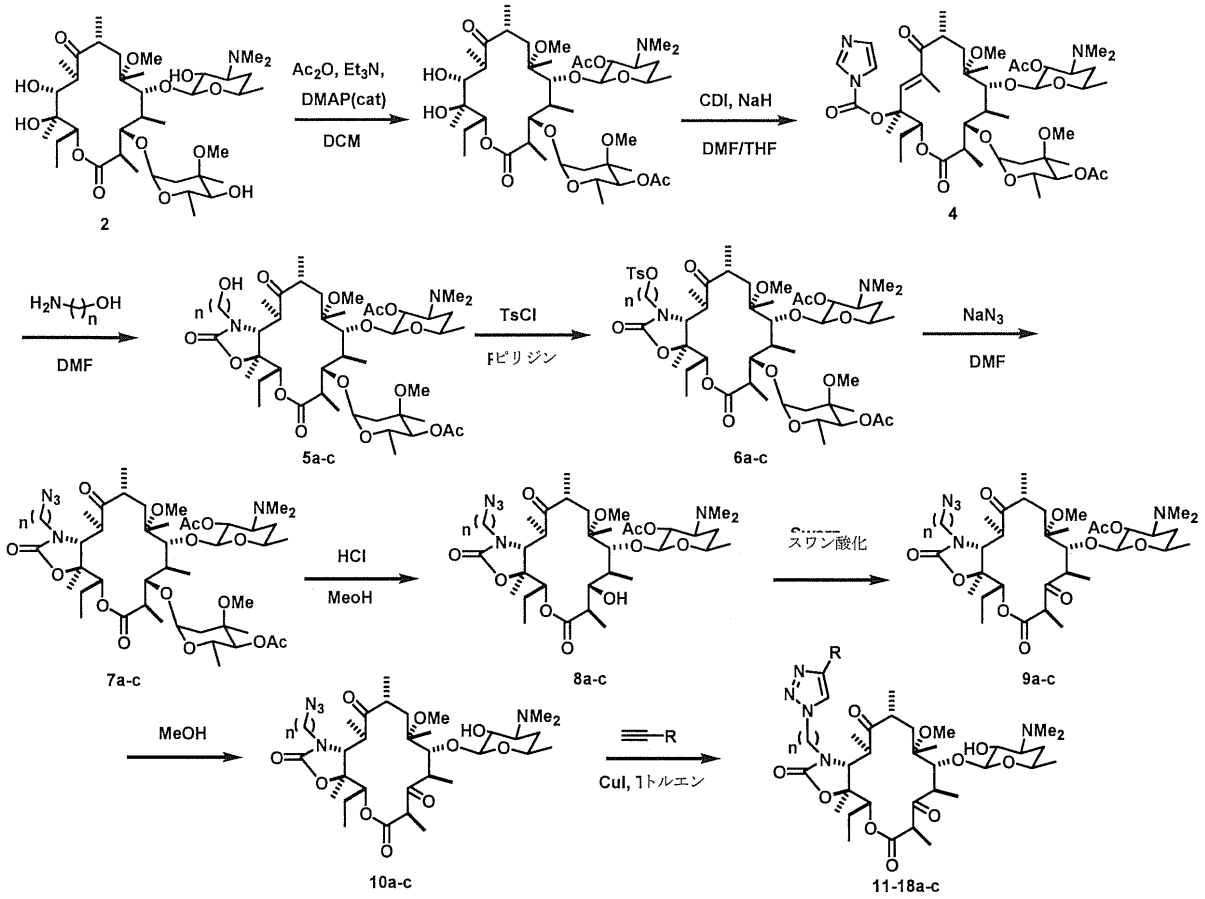
【 0041】

2 位水素とフッ素との置換は、S e l e c t f l u o r (登録商標)を用いた 9 b の求電子フッ素化 (スキーム I V) によって達成される。中間体 22 のアジド基は、標準的な条件によって、一連の 4 - 置換 - [1 , 2 , 3] - トリアゾール 23 a - b に変換される。

【 0042】

スキーム I

【化2】

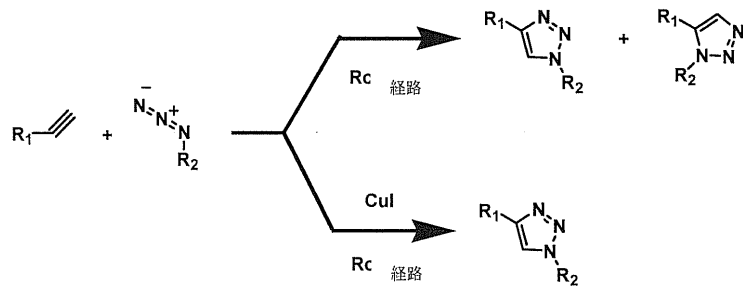


10

20

スキーム I I

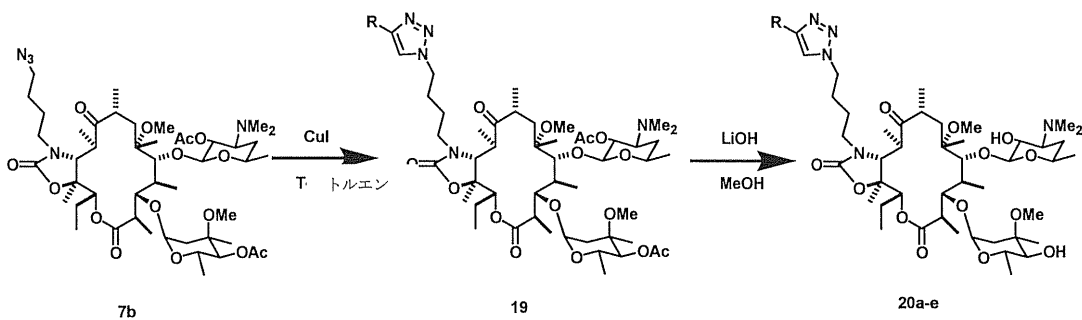
【化3】



30

スキーム I I I

【化4】

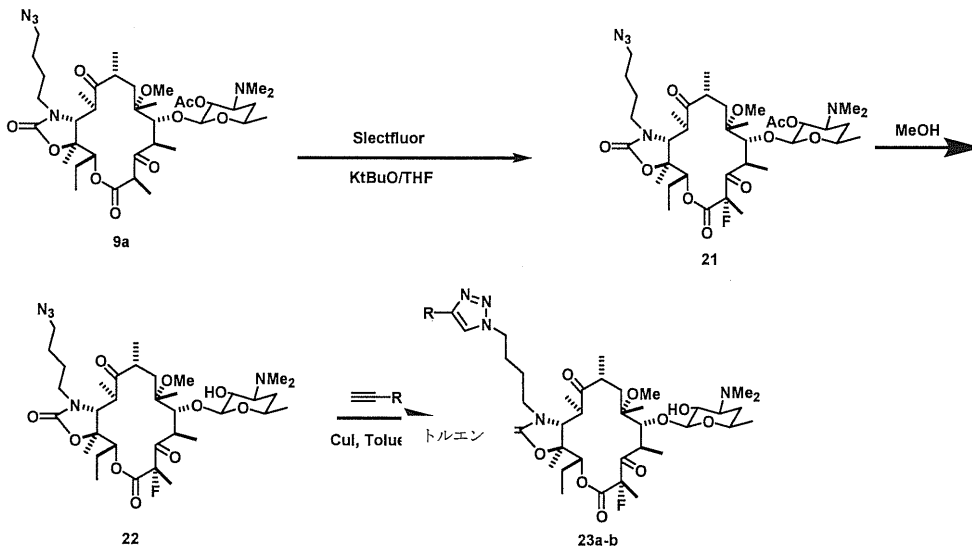


40

50

スキーム I V

【化 5】

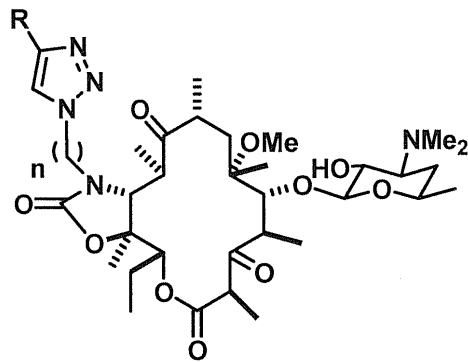


10

【 0 0 4 3 】


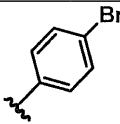
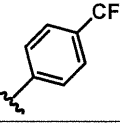
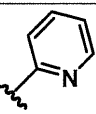
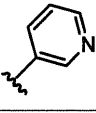
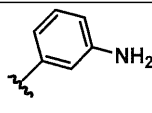
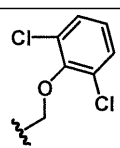
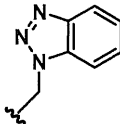
別の実施形態では、以下の化合物が記載されている。

【化 6】



30

【表 1】

最小阻害濃度 ($\mu\text{g/mL}$) ^a								
項目	R	n	黄色ブドウ球菌		肺炎レン球菌			インフルエンザ菌
			29213 Ery-S	96:11480 Ery-R (MLSb)	49619 Ery-S	163 Ery-R (MefA)	303 Ery-R (ermB)	49247 Ery-S
TEL			≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	4
AZI			≤ 0.125	> 64	≤ 0.125	> 64	> 64	2
11a		3	1	1	≤ 0.125	≤ 0.125	> 64	> 64
11b		4	≤ 0.125	0.25	≤ 0.125	≤ 0.125	2	8
11c		5	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	0.25	16
12a		3	0.25	0.5	≤ 0.125	≤ 0.125	8	64
12b		4	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	8	8
12c		5	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	1	16
13a		3	1	2	≤ 0.125	≤ 0.125	16	> 64
13b		4	0.25	0.25	≤ 0.125	≤ 0.125	8	8
13c		5	0.5	1	≤ 0.125	0.5	2	64
14a		3	2	2	≤ 0.125	0.5	> 64	> 64
14b		4	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	4
14c		5	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	0.25	64
15a		3	2	2	≤ 0.125	1	> 64	> 64
15b		4	≤ 0.125	4	≤ 0.125	2	64	64
15c		5	≤ 0.125	0.25	≤ 0.125	0.25	4	16
16a		3	0.5	nt	≤ 0.125	≤ 0.125	> 64	16
16b		4	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	2
16c		5	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	0.25	8
17a		3	1	1	≤ 0.125	≤ 0.125	> 64	> 64
17b		4	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.12	≤ 0.12	1	16
17c		5	0.25	0.5	≤ 0.125	≤ 0.125	2	32
18a		3	1	2	≤ 0.125	0.5	> 64	> 64
18b		4	1	2	≤ 0.125	4	64	32
18c		5	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.125	64	8

10

20

30

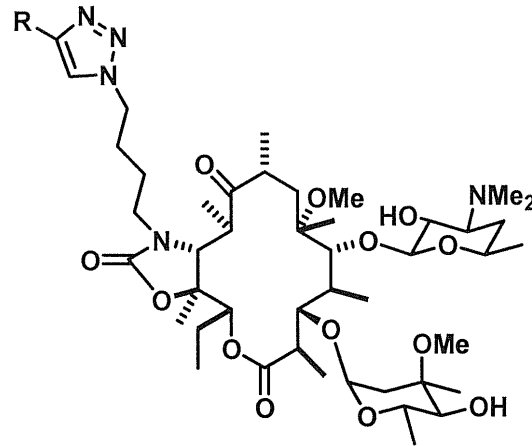
40

^a 米国臨床検査標準委員会。Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 第6版; Approved standard: NCCLS文書M7 - A6, 2003。

【0044】

別の実施形態では、以下の化合物が記載されている。

【化7】



10

【表2】

項目	R	黄色ブドウ球菌		肺炎レンサ球菌			インフルエンザ菌
		25923 Ery-S	RN220	49619 Ery-S	163 Ery-R (MefA)	303 Ery-R (ermB)	49247 Ery-S
TEL		≤0.25	2	≤0.125	≤0.125	≤0.125	4
20a		0.25	8	≤0.0625	0.125	2	NT
20b		0.25	8	≤0.0625	≤0.06	1	NT
20c		1	8	≤0.0625	0.5	2	NT
20d		1	8	≤0.0625	0.5	2	NT
20e		≤0.25	8	≤0.0625	0.5	2	NT

20

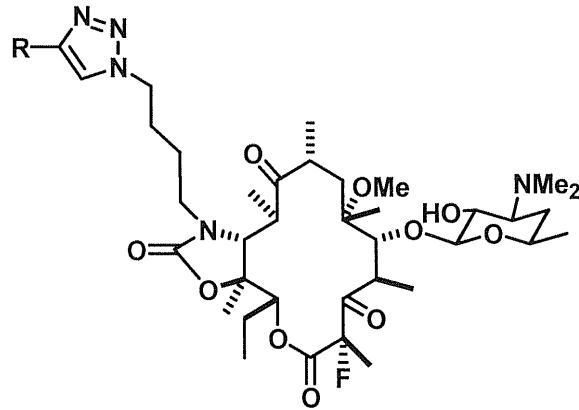
30

40

【0045】

別の実施形態では、以下の化合物が記載されている。

【化 8】



10

【表 3】

項目	R	黄色ブドウ球菌		肺炎レンサ球菌			インフルエンザ菌
		29213 Ery-S	96:11480 EryR (MLSb)	49619 Ery-S	163 Ery-R (MefA)	303 Ery-R (ermB)	49247 Ery-S
TEL		≤0.125	≤0.125	≤0.125	≤0.125	≤0.125	4
AZI		ND	≤0.125	>64	≤0.125	>64	>64
23a		≤0.125	≤0.125	≤0.125	≤0.125	≤0.125	2
23b (CEM-101)		≤0.06	≤0.125	≤0.125	≤0.125	≤0.125	2

20

30

【0046】

前述の実施形態の各々では、1次スクリーニングパネルは、関連する黄色ブドウ球菌、化膿レンサ球菌、肺炎レンサ球菌（アジスロマイシンおよびテリスロマイシンに耐性のある株を含む）からなるものであった。全ての病原体に対するMICを、NCCLS指針の通り、プロス微量希釈法を用いて決定した。本明細書に記載の化合物、例えば、CEM-101は、それぞれテリスロマイシンの1 μg/mLおよび8 μg/mLと比べて、肺炎レンサ球菌（3773）に対して0.125 μg/mL以下および化膿レンサ球菌（1850）に対して0.5 μg/mLというMICを有する極めて強力なものであることが分かった。3-O-クラジノースを含有するCEM-101の類似体である、CEM-103（20c）は、活性が低いことが分かった。非ヘテロ芳香族置換トリアゾール含有ケトライドは活性が低かった。

40

【0047】

ケトライドを、黄色ブドウ球菌（29213（Ery-S）と96:11480（Ery-R））、肺炎レンサ球菌（49619（Ery-S）と163および303（Ery-R））ならびにインフルエンザ菌（49247（Ery-S））のエリスロマイシン感受性株（Ery-S）およびエリスロマイシン耐性株（Ery-R）に対して試験した（表1～3）。プロス微量希釈法を用いて、臨床検査標準協会（CLSI）の通り、全ての病原体に対する最小阻害濃度（MIC）を決定した。

【0048】

アルキル側鎖の鎖長は活性に影響を及ぼした（表1）。例えば、3-炭素結合フェニル

50

置換トリアゾール 11 a は、被験濃度では、Ery - S および Ery - R の黄色ブドウ球菌に対する活性が低く、Ery - R の肺炎レンサ球菌 303 (ermB) に対しては不活性であったのに対し、対応する 4 - および 5 - 炭素結合フェニル置換トリアゾール 11 b および 11 c は、これらの生物に対してより活性があった。同様の傾向は、2 - ピリジル置換トリアゾール 14 a - c、3 - アミノ - フェニル置換トリアゾール 16 a - c、および 2, 5 - ジクロロフェノキシ置換トリアゾール 17 a - c で観察された。

【0049】

4 - 炭素結合 2 - ピリジル置換トリアゾール 14 b および 3 - アミノ - フェニル置換トリアゾール 16 b は、肺炎レンサ球菌 303 に対して最も高い効力を有し、MIC 値は両方ともテリスロマイシンと同程度 ($0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$) であった。4 - 炭素結合 3 - ピリジル置換トリアゾール 15 b を含有するケトライドは、この株に対する活性が低かった (MIC $64 \mu\text{g}/\text{mL}$)。このシリーズにおいて、抗菌活性は、炭素リンカーを 5 原子伸長させることにより改善され、例えば、化合物 15 c の肺炎レンサ球菌 303 に対する MIC は、 $64 \mu\text{g}/\text{mL}$ から $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ に改善された。同様の効果は、黄色ブドウ球菌に対してベンゾトリアゾール含有ケトライド 18 c でも観察されたが、18 c は、肺炎レンサ球菌 303 に対しては依然として不活性であった。リンカーの長さと同置換トリアゾールの芳香族置換の性質の均衡が、マクロライド耐性の肺炎レンサ球菌および黄色ブドウ球菌に対する全体的な活性に影響を及ぼし得ることが理解される。

【0050】

リンカーの長さと同置換トリアゾールの相関はインフルエンザ菌 (49247) でも観察されたが、この場合、最も強力なケトライドシリーズは、4 - 炭素鎖 (11 b - 14 b、16 b、17 b) または 5 - 炭素鎖 (15 c、18 c) のいずれかを介して結合した置換トリアゾールを有していた。興味深いことに、インフルエンザ菌に対する最も強力な芳香族シリーズは、それぞれ、16、2、および $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ という MIC を有する、3 -、4 - または 5 - 炭素リンカー (16 a、16 b、16 c) を有する 3 - アミノ - フェニルであった。

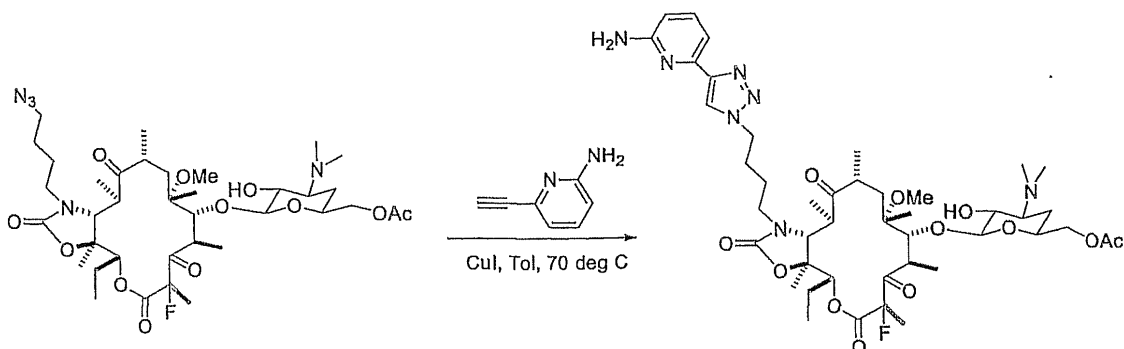
【0051】

3 位にクラジノースを含有するマクロライドは全て、Ery - S の肺炎レンサ球菌 (49619) に対する活性が高かった (表 2)。しかしながら、これらの類似体は、Ery - R 株に対してはテリスロマイシンよりも強力ではなかった。MIC は、対応するケトライドよりも、2 - ピリジル、2 - アミノフェニルまたは 2, 6 - ジクロロフェニルトリアゾール置換基を有するクラジノース含有類似体で有意に高かった (20 a、20 c、および 20 d 対 14 b、16 b、および 17 b)。反対に、抗菌活性は、類似体 20 b (3 - ピリジル) および 20 e (ベンゾトリアゾール) においてケトをクラジノース基と置き換えることによって、ケトライド類似体 15 b (3 - ピリジル) および 18 b (ベンゾトリアゾール) で再度確立された。MIC は、それぞれ、15 b および 18 b の $64 \mu\text{g}/\text{mL}$ から 20 b および 20 e の $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ および $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ に改善された。同様の活性傾向は、Ery - R の肺炎レンサ球菌 163 (MefA) でも観察された。

【0052】

化合物例

【化 9】



10

20

30

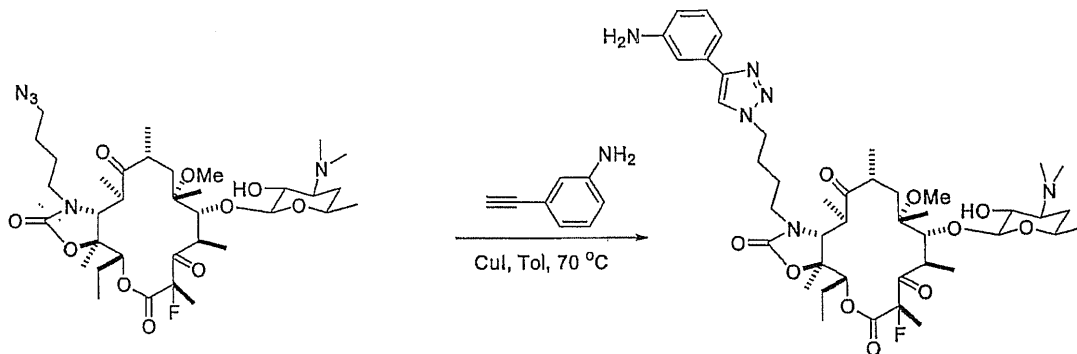
40

50

11-N-(4-アジド-ブチル)-6-O-メチル-5-(3-ジメチルアミン-4-デオキシ-6-O-アセチル-glu-コピラノシル)-2-フルオロ-3-オキソ-エリスロノライドA、11,12-カルバメート(15mg、0.019mmol)、6-エチニル-ピリジン-2-イルアミン(4.7mg、0.4mmol)、CuI(1mg、0.005mmol)、およびトルエン(0.2mL)の混合物を70に加熱した。16時間後、この混合物を濃縮し、そのままシリカゲルクロマトグラフィー(9:1、クロロホルム:メタノール+1%水酸化アンモニウム)に供すると、14mgの所望の化合物が得られた。MS: C₄₄H₆₆FN₇O₁₂、計算値M⁺=903.5、実測値: M+H⁺=904.5。

【0053】

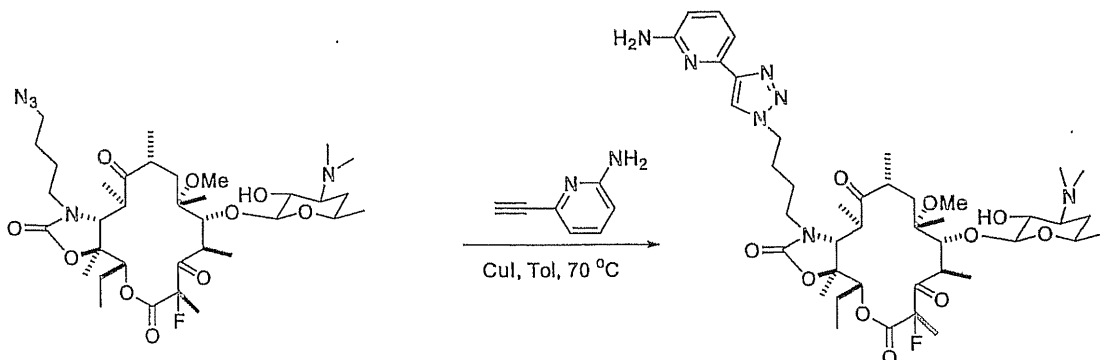
【化10】



11-N-4-(3-アミノフェニル)-[1,2,3]トリアゾール-1-イル]-ブチル}-5-デソサニル-3-オキソ-2-フルオロ-エリスロノライドA、11,12-環状カルバメート(CEM-101)。11-N-(4-アジド-ブチル)-6-O-メチル-5-デソサニル-3-オキソ-2-フルオロ-エリスロノライドA、11,12-カルバメート(17mg、0.023mmol)、3-エチニル-フェニルアミン(5.4mg、0.046mmol)、CuI(1mg、0.005mmol)、およびトルエン(0.2mL)の混合物を70に加熱した。16時間後、この混合物を濃縮し、そのままシリカゲルクロマトグラフィー(9:1、クロロホルム:メタノール+1%水酸化アンモニウム)に供すると、17mgの所望の化合物が得られた。MS C₄₃H₆₅FN₆O₁₀、計算値M⁺=844.47、実測値: M+H⁺=845.5。

【0054】

【化11】



11-N-{4-[4-(6-アミノ-ピリジン-2-イル)-[1,2,3]トリアゾール-1-イル]-ブチル}-5-デソサニル-3-オキソ-2-フルオロ-エリスロノライドA、11,12-環状カルバメート。11-N-(4-アジド-ブチル)-6

10

20

30

40

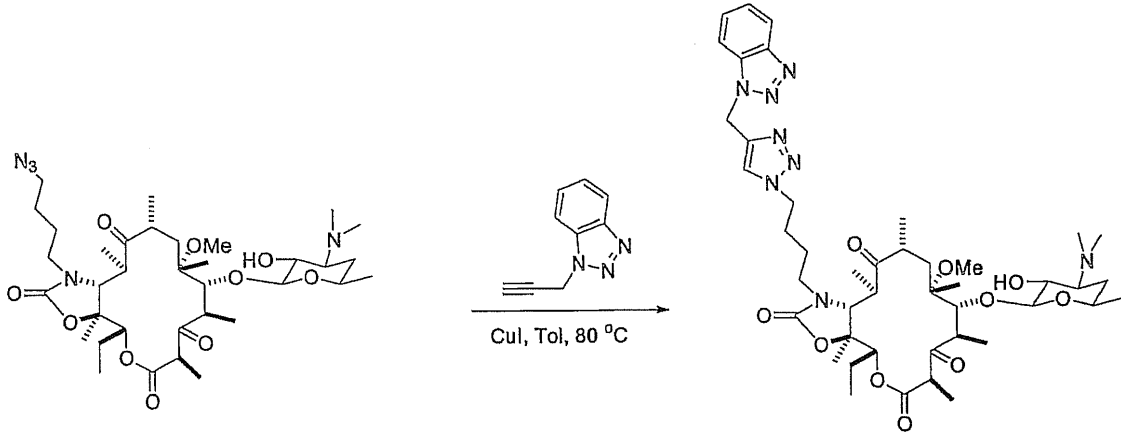
50

- O - メチル - 5 - デソサミニル - 3 - オキソ - 2 - フルオロ - エリスロノライド A、11, 12 - カルバメート (15 mg、0.02 mmol)、6 - エチニル - ピリジン - 2 - イルアミン (4.7 mg、0.4 mmol)、CuI (1 mg、0.005 mmol)、およびトルエン (0.2 mL) の混合物を 70 に加熱した。16 時間後、この混合物を濃縮し、そのままシリカゲルクロマトグラフィー (9 : 1、クロロホルム : メタノール + 1% 水酸化アンモニウム) に供すると、14 mg の所望の化合物 OP 1357 が得られた。MS : C₄₂H₆₄FN₇O₁₀、計算値 M⁺ = 845.5、実測値 : M + H⁺ = 846.5。

【0055】

【化12】

10



20

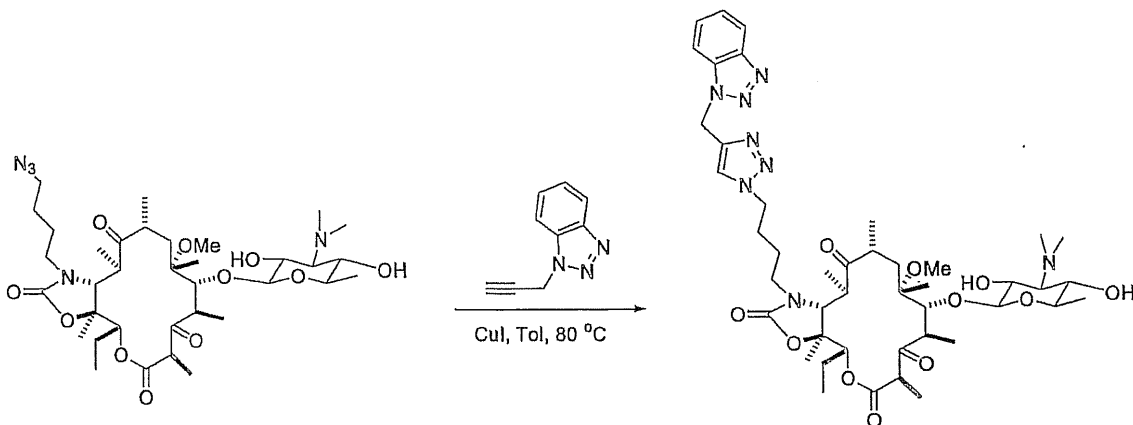
11 - N - [4 - (4 - ベンゾトリアゾール - 1 - イルメチル - [1, 2, 3] トリアゾール - 1 - イル) - ブチル] - 6 - O - メチル - 5 - O - デソサミニル - 3 - オキソ - エリスロノライド A、11, 12 - カルバメート。11 - N - (4 - アジド - ブチル) - 6 - O - メチル - 5 - O - デソサミニル - 3 - オキソ - エリスロノライド A、11, 12 - カルバメート (3 mg、0.0039 mmol)、1 - プロブ - 2 - イニル - 1H - ベンゾトリアゾール (3 mg、0.4 mmol)、CuI (1 mg、0.005 mmol)、およびトルエン (0.2 mL) の混合物を 80 に加熱した。16 時間後、この混合物を濃縮し、そのままシリカゲルクロマトグラフィー (9 : 1、クロロホルム : メタノール + 1% 水酸化アンモニウム) に供すると、3 mg の所望の化合物が得られた。MS : C₄₄H₆₆N₈O₁₀、計算値 M⁺ = 866.5、実測値 : M + H⁺ = 867.5。

30

【0056】

【化13】

40



11 - N - [4 - (4 - ベンゾトリアゾール - 1 - イルメチル - [1, 2, 3] トリアゾール - 1 - イル) - ブチル] - 6 - O - メチル - 5 - ミカミノシル - 3 - オキソ - エリスロノライド A、11, 12 - カルバメート。11 - N - (4 - アジド - ブチル) - 6 - O - メチル - 5 - ミカミノシル - 3 - オキソ - エリスロノライド A、11, 12 - カルバ

50

メート (3 mg、0.004 mmol)、1-プロブ-2-イニル-1H-ベンゾトリアゾール (3 mg、0.4 mmol)、CuI (1 mg、0.005 mmol)、およびトルエン (0.2 mL) の混合物を 80 に加熱した。16 時間後、この混合物を濃縮し、そのままシリカゲルクロマトグラフィー (9:1、クロロホルム:メタノール+1% 水酸化アンモニウム) に供すると、3 mg の所望の化合物が得られた。MS: C₄₄H₆₆N₈O₁₁、計算値 M⁺ = 882.5、実測値: M + H⁺ = 883.5。

【0057】

方法例

実施例。致死性的エアロゾル投与に対する CEM-101 の効力を評価する、カニクイザルでの致死的な吸入による炭疽菌投与に対する CEM-101 の極めて重要な効力。約 2.5 ~ 5.0 kg、約 2 ~ 5 歳の投薬を受けていないカニクイザル 42 匹 (オス 21 匹、メス 21 匹) (Covance から入手可能) を試験する (40 匹を研究し、2 匹を予備とする)。サルを結核について試験して陰性であることを確認し、また、受容前の 30 日以内にプレスクリーニングして、サル免疫不全ウイルス (SIV)、サル T リンパ球向性ウイルス-1 (STLV-1)、およびオナガザルヘルペスウイルス 1 (ヘルペス B ウイルス) について血清反応陰性であることと、PCR によりサルレトロウイルス (SRV1 および SRV2) について陰性であることを確認する。表 7 を参照されたい。

【表 4】

表 7: 提案される研究デザイン

群 ID	サル/群	抗生物質またはビヒクル	用量 (mg/kg)	投与レジメン	1 回目の投与までの時間 (hrs PC)	治療期間 (日)
1	10	CEM-101	5	QD	24	14
2	10	CEM-101	10	QD	24	14
3	10	CEM-101	15	QD	24	14
4	10	滅菌注射用水	2 mL/kg	QD	24	14

【0058】

研究 - 7 日目と 0 日目に動物の体重を量る。研究で死ぬかまたは安楽死させるサルについては、解剖前に体重を量る。疾患が進行する間に動物の体重が減少しているように見える場合には、さらに体重を量ることがある。全てのサルの臨床的観察は、投与前期間中 1 日 2 回行なう。血液試料を、表 8 で指定される日に、大腿動脈もしくは大腿静脈、伏在静脈、または他の適当な静脈から採取する。投与当日に回収される血液試料は、投与前に回収される。埋め込み (約 - 7 日) から 28 日目まで 1 日 2 回、埋め込み型のプログラム可能な温度トランスポンダーチップ (例えば、IPTT-300 BMDs, Seaford, DE) を介して体温をモニタリングする。

【表 5】

表 8：採血スケジュール

時点	菌血 (培養)	CBC/ CRP	臨床化学	抗生物質レベル測定	凝固アッセイ
-7 日	X	X	X		X
0 日 (投与前)		X	X	X	
投与 24 時間後 (処置前)	X	X	X		X
投与 28 時間後 (処置約 4 時間後)				X	
投与 48 時間後	X	X	X	X	X
投与 72 時間後	X	X	X		X
投与 96 時間後	X	X	X		X
7 日 (処置約 4 時間後)	X	X	X	X	X
8 日				X	
14 日 (処置約 4 時間後)	X	X	X	X	X
15 日				X	
21 日	X	X	X		X
28 日	X	X	X		X
30 日	X				
32 日	X				
終点	X	CRP			

P T = 処置後、P C = 投与後

【 0 0 5 9 】

投与の約 5 ~ 10 日前にサルを B L (バイオハザード実験室レベル 3) に移して、馴化する時間を与える。投与前に、各々の投与日群中のサルを投与順について無作為化する。0 日目に、サルにテラゾール (1 ~ 6 mg / kg、I M) で麻酔をかけて、衝突ネブライザーでエアロゾル化され、頭部のみの吸入曝露チャンパーを通じて送達される投与病原菌をターゲティングするために、プラスチックグラフィーチャンパーおよびクラス I I I のキャビネットシステムに入れる。

【 0 0 6 0 】

投与物質のエアロゾル濃度は、コロニー形成単位 (c f u) を決定して定量化する。流出液をインライン式的全ガラス製インピンジャーによって動物曝露口から直接回収する。インピンジャー試料の連続希釈液をプレーティングし、計数する。

【 0 0 6 1 】

投与後、サルを 1 日 2 回、最低 28 日間、B L - 3 条件下で、生存および病気の臨床的兆候について観察する。生き残った動物は、3 回連続して血液培養が陰性であることを示した後、28 日目以降に、B L - 3 から取り出してもよい。

【 0 0 6 2 】

表 8 に示した時点からの血液試料を培養して、細菌の有無を決定する。血液学的評価 (C B C) も行なう。処理後の各々の全血液試料から回収した残りの血漿に対して C R P 解析を行なう。血漿を分離することができる場合は、E D T A チューブに回収した末端血液試料に対しても C R P 解析を行なう。凝固アッセイには、プロトロンビン時間 (P T)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (a P T T)、フィブリノゲン、および D - ダイマーが含まれる。

【 0 0 6 3 】

10

20

30

40

50

統計解析：フィッシャーの直接確率検定を用いて、各抗生物質処置群と対照群の生存率を比較する。これらのデータに対して死亡までの時間解析を行ない、生存期間モデルに基づいて異なる群についての防御に違いがあるかどうかを決定する。カプラン-マイヤーの生存確率推定値をプロットする。ログランク検定またはウィルコクソン検定またはコックス比例ハザード回帰を用いて、これらの群間に有意差があるかどうかを決定し、もしあるならば、どの群が有意に異なるかを決定する。菌血培養データを各時点で別々に解析する。95パーセント信頼区間を有する要約統計量を各群および各時点について作成する。フィッシャーの直接確率検定を用いて、群間の菌血培養データに有意差があるかどうかを決定する。血液検査、臨床化学、凝固、温度、抗生物質のピーク値とトラフ値について、95パーセント信頼区間を有する要約統計量を各群について作成する。分散分析（ANOVA）モデルを各時点の各パラメータに当てはめて、処置群間に有意差があるかどうかを決定することができる。生存が期待される対照動物はほとんどなく、処置動物のベースライン値をこれらの比較において使用してもよく、各動物はそれ自身の対照としての役割を果たす。温度、臨床化学、および血液検査パラメータの変化の平均値をゼロと比較して、健康状態のいかなる変化も評価する。

10

【0064】

NHPにおける致死的な吸入による野兔病菌、ペスト菌、および鼻疽菌投与に対するCEM-101の効力ならびにNHPにおける致死的な吸入による炭疽菌投与に対するCEM-101の予備的効力を下記の方法を用いて決定する。

20

【0065】

実施例。ウサギ薬物動態および認容性研究

【表6】

表1. 群

処置群	製品	性別当たりの動物の数 (合計)	用量レベル (mg/kg)
1	CEM-101	5 (10)	5
2	CEM-101	5 (10)	10
3	CEM-101	5 (10)	15
4	対照	5 (10)	NA

30

【表 7】

表 2. 採血スケジュール

時点	抗生物質レ ベル	臨床化学	臨床血液検 査
-7 日	X	X	X
-3 日	X	X	X
*1 時間	X	X	X
*2 時間	X	X	X
*4 時間	X	X	X
*6 時間	X	X	X
*12 時間	X	X	X
*18 時間	X	X	X
*24 時間	X	X	X
*48	X	X	X
*72	X	X	X
*96	X	X	X
*10 日	X	X	X
*20 日	X	X	X
*30 日	X	X	X

*処置後に回収された採血

【 0 0 6 6 】

CEM-101 の投与前および投与中の指示された時点の処置ウサギおよび対照ウサギから回収した血液試料から CEM-101 の血液レベルを決定する。

【 0 0 6 7 】

実施例。非ヒト霊長類における薬物動態 (PK)。PK データを 3 つの段階で回収する。8 匹のサル (オス 4 匹、メス 4 匹) が各段階で参加する (表 3)。各段階の後で、次の段階を開始する前に、最低 7 日間の洗い出し期間を設ける。

【表 8】

表 3. 研究デザイン

段階	段階当 たりの 数	CEM-101 用 量 (mg/kg)	血液回収
1	8	5	1 日目: 0 ^a 、1、2、4、6、8、12、18、24、48 時間、96 時間
2	8	10	1 日目: 0 ^a 、1、2、4、6、8、12、18、24、48 時間、96 時間
3	8	15	1 日目: 0 ^a 、1、2、4、6、8、12、18、24、48 時間、96 時間

【 0 0 6 8 】

実施例。大量動物曝露システムにおける鼻疽菌投与物質および送達の特徴解析。鼻疽菌株を分離用に適当な増殖培地 (例えば、4% グリセロールを含む溶原 (LB) 寒天またはアッシュダウン培地) にストリークする。(形態学的に異なるコロニーが鼻疽菌にはよくあることを考慮して) コロニーの純度と形態を確認した後、全てのコロニーを取り除き、適当な細菌保存培地に懸濁し、-70 以下で凍結させる。単一の単離コロニーではなく、コロニーの集団を調製する (単一のコロニー型を単離することにより、病原性特性が変化した変異体が間違っ て選択される可能性があることが理解される)。回収したコロニーはマスター細胞バンクを構成する。マスター細胞バンクからストリークすることによってこの手順を繰り返し、ワーキング細胞バンクを調製する。

【0069】

マスター細胞バンクおよびワーキング細胞バンクを調製するときに寒天培地上で調製される全ての培養物をコロニーの形態および純度について調べる。肉眼的な形態検査には、コロニーの形状、サイズ、隆起、縁、色、外観、密度、および粘稠度についての記載が含まれる。細胞バンクに汚染物が含まれることが明らかになった場合、マスターまたは細胞バンクから再度得られる。

【0070】

マスター細胞バンクおよびワーキング細胞バンクからの培養物質をグラム染色する。グラム染色の結果および肉眼的な細胞形態を観察し、公開文献中のこれまで結果と比較する。ワーキング細胞バンク物質を用いてプロス培養液に植菌し、フラスコを様々な時間インキュベートして、培養物の光学密度を測定する。複数のプロス培養物を調製する。各培養物を標的光学密度まで増殖させ、その後、スプレッドプレート計数により培養物のCFU/mLの数を決定する。複数の培養物の結果を1つの培養物密度について平均化することにより、CFU/mLの数の比を決定する。リアルタイム定量PCR(+/- PCR)を行ない、核酸レベルで、各ワーキング細胞バンクが本当に、提供された鼻疽菌株であることを決定する。全ての株のマスター細胞バンクおよびワーキング細胞バンクにおける細菌の濃度は、スプレッドプレート計数、または同等の技術により決定される。

10

【0071】

新鮮な鼻疽菌懸濁液はストック試料から調製する。新鮮なバッチは、エアロゾル試験が行なわれる日ごとに調製する。エアロゾル化用の出発(ネブライザー)鼻疽菌溶液を、0.01%(wt/vol)ゼラチンと9.7%トレハロース(wt/vol)とを含有する滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(BSGT)に希釈し、約8mLを各試験用にネブライザーに入れる。cfuカウントのためにプレーティングするまで、0.01%(wt/vol)ゼラチンを含む滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(BSG)と0.01%消泡剤A、約20mLで満たされたガラス製インピンジャー(例えば、モデル7541 Ace Glass, Inc.)を用いて、エアロゾル試料を曝露チャンバーから回収する。エアロゾルの粒径分布を曝露システムからサンプリングし、エアロダイナミックパーティクルサイザーを用いて測定する。

20

【0072】

生きた鼻疽菌のエアロゾル濃度(すなわち、CFU)およびエアロゾル生成の再現性を定量するために、一連のエアロゾル曝露システム-特徴解析試験を行なう。表4は、エアロゾルシステムの再現性の試験に使用可能な試験マトリクスを示す。特徴解析試験を繰り返して、各々の日に3日間の4つの異なる標的エアロゾル濃度を作成する。各々の標的エアロゾル濃度の作成を各々の日に3回繰り返す。エアロゾル試料を回収し、スプレッドプレート技術でCFUについて計数する。さらに、各試験中の温度、相対湿度、およびエアロゾル粒径を少なくとも1つの時点の間、モニタリングする。

30

【表9】

表4. エアロゾル特徴解析試験

試験番号	標的エアロゾル濃度(CFU/L 空気)	標的エアロゾル濃度当たりの試験反復回数
試験1	A	3
試験2	B	3
試験3	C	3
試験4	D	3

40

【0073】

完全な試験マトリクス(表1~4)を連続しない3日間、繰り返す。

【0074】

エアロゾル特徴解析試験については、統計的ANOVAモデルをエアロゾルシステムについての試験データに当てはめる。これらのデータは4つのエアロゾル濃度からなり、こ

50

これらの濃度は、各々の日に3回試験され、実験全体が3つの異なる日に繰り返される。測定されたシステム出力（例えば、噴霧係数）に再現性がある（すなわち、別の日と比較してある日に統計的に有意な差がない）かどうかについて、統計的仮説を試験する。ネガティブな結果（すなわち、統計的に有意でないこと）により、再現性ありとの結論が下される。実際の差の同定に対する試験の最小感度を決定するために、出力分析も行なう。

【0075】

実施例。鼻疽菌の作製、送達、および回収のためのマウスエアロゾルシステムの開発。生きた鼻疽菌のエアロゾル濃度（すなわち、CFU）および曝露システムの再現性を定量するために、一連のエアロゾル曝露システム - 特徴解析試験を行なう。表4は、エアロゾルシステムの再現性の試験に使用される、提案される暫定試験マトリクスを示す。特徴解析試験を繰り返して、各々の日に3日間の4つの異なる標的エアロゾル濃度を作成する。各々の標的エアロゾル濃度の作成を各々の日に3回繰り返す。上記のようにエアロゾル試料を回収し、スプレッドプレート技術でコロニー形成単位（cfu）について計数する。

10

【0076】

エアロゾル特徴解析検定については、統計的ANOVAモデルをエアロゾルシステムについての検定データに当てはめる。上記のように、これらのデータは4つのエアロゾル濃度からなり、これらの濃度は、各々の日に3回試験され、実験全体が3つの異なる日に繰り返される。測定されたシステム出力（例えば、噴霧係数）に再現性がある（すなわち、別の日と比較してある日に統計的に有意な差がない）かどうかについて、統計的仮説を検定する。ネガティブな結果（すなわち、統計的に有意でないこと）により、再現性ありとの結論が下される。実際の差の同定に対する試験の最小感度を決定するために、出力分析も行なう。

20

【0077】

実施例。マウスにおける鼻疽菌の吸入半致死量（LD₅₀）の決定。鼻疽菌の吸入LD₅₀の決定を段階的に行なう。この研究の各段階は、28日にまで及ぶ投与後期間からなっている。動物に投与する日を研究0日目と表す。第I段階は5つの群、第II段階は4つの群からなり、第III段階および第IV段階は各々3つの群からなる。前の段階の死亡結果に基づいて、新しい標的曝露用量を決定する。この段階的アプローチにより、吸入LD₅₀値の信頼を高めることが可能になる。

30

【表10】

表6. マウスにおけるLD₅₀を決定するための段階的アプローチ

段階	段階当たりの群	マウス総数
I	4匹からなる5つの群	20匹
II	8匹からなる4つの群	32匹
III	8匹からなる3つの群	24匹
IV	8匹からなる3つの群	24匹

40

【0078】

（各段階の）研究0日目に、吸入経路を介してマウスに鼻疽菌を投与する。鼻のみのエアロゾル曝露システム（例えば、CH Technologies Tower）を用いて、所望のエアロゾル用量をマウスに送達する。マウスエアロゾル投与試験に用いられるCH Technologies Towerシステムは、インピンジャー試料、エアロゾル粒径分析器、温度および湿度モニタリング、ならびにエアロゾルフローを制御および/またはモニタリングするためのマスフローメーター（MFM）およびマスフローコント

50

ローラー (MFC) を伴って、一度に最大 30 匹のマウスに曝露させることができる。簡潔に述べると、強制空気が高性能微粒子空気 (HEPA) フィルターを通過してシステムに侵入し、連続する気流 (連続空気) と、(エアロゾル生成時に) 衝突ネブライザーに流入するかまたは (エアロゾル生成とエアロゾル生成の間に) それを迂回するかのいずれかの気流とに分かれる。MFC は、これらの気流の各々についての流量を調節する。曝露塔に送達する前に、このネブライザーで作られる鼻疽菌エアロゾルを連続空気と混合する。これらの用量を送達するのに必要とされるエアロゾル曝露パラメータは、上記の提案されたマウスエアロゾルシステム特徴解析研究からの結果に基づく。

【0079】

鼻疽菌のエアロゾル濃度は、コロニー形成単位 (cfu) を決定して定量化する。流出液をインライン式的全ガラス製インピンジャーによって動物曝露口から直接回収する。インピンジャー試料の連続希釈液をプレーティングし、カウントする。

10

【0080】

マウスを 1 日 2 回、合計 29 日間 (研究 0 日目から研究 28 日目までを含む) 観察して、疾患の臨床的兆候の発症および生存性を決定する。

【0081】

マウスにおける LD_{50} (吸入半致死用量) 決定のために、実験を段階的に行なう (Feder, 1992)。最大尤度法を用いて、プロビット用量 - 応答モデルをマウスの用量 - 致死データに当てはめて (Finney, 1971 および Feder, 1991)。プロビット用量 - 応答モデルの推定パラメータを用いて、 LD_{50} を計算する。フィーラー法 (Finney, 1971) または他の適切な方法を用いて、 LD_{50} についての 95% 信頼区間を計算する。

20

【0082】

各々の臨床的兆候の発症までの時間を、動物の死亡、安楽死、または臨床的観察期間の最後まで記録する。各々の臨床的兆候を示す動物と各々の兆候の発症までの時間の割合を決定する。死亡は観察された時点で記録する。用量を説明変数として、コックスの比例ハザードモデルを、発症までの時間と死亡までの時間のデータに当てはめる。より重篤な兆候があまり重篤でない兆候を隠す場合があるので、この解析のために兆候を分類してもよい。兆候までの平均期間と死亡までの平均期間を LD_{50} で算出する。

30

【0083】

実施例。カニクイザルにおける吸入鼻疽菌疾患の自然史 / LD_{50} 決定。カニクイザルにおける鼻疽菌の致死用量 (LD_{50}) の決定および吸入類鼻疽の自然史の特徴解析を、選択された器官における臨床的観察、血液検査、臨床化学、テレメトリーパラメータ、凝固アッセイ、菌血、および細菌数をはじめとする、疾患の臨床的兆候をモニタリングすることにより決定する。

【0084】

約 2.5 ~ 5.0 kg (約 2 ~ 5 歳) の投薬を受けていないカニクイザル (サル、NHP) 22 匹 (オス 11 匹、メス 11 匹) を入手する (Covance から入手可能)。NHP のうち 2 匹は、第 I 段階、第 II 段階、および第 III 段階で必要になった場合に、交代要員としての役割を果たす。サルを結核について試験して陰性であることを確認し、また、受容前の 30 日以内にプレスクリーニングして、サル免疫不全ウイルス (SIV)、サル T リンパ球向性ウイルス - 1 (STLV-1)、およびオナガザルヘルペスウイルス 1 (ヘルペス B ウイルス) について血清反応陰性であることと、PCR によりサルレトロウイルス (SRV1 および SRV2) について陰性であることとを確認する。サルは、研究に供される前に最低 5 週間検疫を受ける。研究に供される前に、全てのサルに、テレメトリートランスミッター (例えば、Data Sciences International, DSI から購入される、品目 D70-PCTP) を手術で埋め込む。

40

【0085】

10 群のサルを、4 段階かけてエアロゾルにより送達される様々な用量の鼻疽菌に曝露させる (表 7 参照)。前の段階の死亡データに基づいて、次の段階のために新しい標的曝

50

露用量を決定する。この段階的アプローチにより、吸入LD₅₀推定値の信頼を高めることが可能になる。最初の3つの段階を用いて、NHPにおける鼻疽菌のLD₅₀を決定する。最後の段階では、残りの4匹のNHPに、最初の3つの段階からの結果に基づいて大半の動物において致死的であると考えられる高度の曝露を施す（すなわち、LD₉₀前後の曝露用量を標的にする）。第I段階、第II段階、または第III段階で使用しない場合、第IV段階で交代要員のNHPにこのような曝露を施す。第IV段階で収集される情報は、最初の3つの段階で収集される自然史情報を裏付け、効力研究で使用し得るものと同等の上昇した用量を投与した動物における疾患進行への理解を高める。第IV段階から得られる結果は、LD₉₀推定の精度も高め得る。

【表11】

10

表7. カニクイザルにおけるLD₅₀を決定するための段階的アプローチ

段階	群	CFU用量	NHPの数
I	1	10,000	2
	2	100,000	2
	3	1,000,000	2
	4	10,000,000	2
II	5	TBD	2
	6	TBD	2
III	7	TBD	2
	8	TBD	2
IV*	9	TBD	2
	10	TBD	2

20

*第I段階、第II段階、または第III段階で交代要員として使用されない場合、この段階で2匹の追加のNHPを含める。

【0086】

検疫期間中と研究 - 7日目および0日目に、動物の体重を量る。研究で死ぬかまたは安楽死させるサルについては、解剖前に体重を量る。疾患が進行する間に動物の体重が減少しているように見える場合には、さらに体重を量ることがある。全てのサルの臨床的観察は、曝露前期間中1日2回行なう。エアロゾル曝露後、サルを1日3回、曝露後28日間、生存および病気の臨床的兆候、すなわち、瀕死、呼吸困難、食欲、活動性（横臥、衰弱、または無反応）、発作、および（観察者により記載される）他の臨床的観察についてモニタリングする。

30

【0087】

表8に指定されている日に、血液試料を大腿動脈もしくは大腿静脈、伏在静脈、または他の適当な静脈から採取する。曝露当日に回収される血液試料は、曝露前に回収される。

【0088】

遠隔操作：体温；ECG；活動性；ならびに心血管機能（心拍数、収縮期/拡張期圧、脈圧、平均圧、および呼吸圧）に関するベースラインデータおよび投与後データを、研究期間中15分ごとに少なくとも30秒間回収する。ベースラインデータを投与前に少なくとも10日間回収する。特別な操作およびデータ収集の詳細は、SOP BBRC.VI-087、SOP BBRC.VI-093、およびSOP BBRC.VI-096に含まれている。

40

【表 1 2】

表 8. 自然史に関する採血スケジュール

時点	菌血	CBC/CRP	臨床化学	凝固アッセイ	QPCR
-7 日	X	X	X	X	X
0 日		X	X	X	
投与 1 日後	X	X	X	X	X
投与 2 日後	X	X	X	X	X
投与 3 日後	X	X	X	X	X
投与 4 日後	X	X	X	X	X
投与 5 日後	X	X	X	X	X
投与 6 日後	X	X	X	X	X
投与 7 日後	X	X	X	X	X
投与 14 日後	X	X	X	X	X
投与 21 日後	X	X	X	X	X
投与 28 日後	X	X	X	X	X
終点	X	CRP のみ			X

10

【0089】

曝露の約 14 日前にサルを BL-3 に移して、馴化する時間を与える。0 日目に、サルにテラゾール (1 ~ 6 mg / kg、IM) で麻酔をかけ、プラスチックチャンパーおよびクラス III キャビネットシステムに入れ、衝突ネブライザーでエアロゾル化されて頭部のみ吸入曝露チャンパーを通じて送達される標的用量の鼻疽菌に曝露させる。鼻疽菌のエアロゾル濃度は、CFU を決定して定量化する。流出液をインライン式の全ガラス製インピンジャーによって動物曝露口から直接回収する。インピンジャー試料の連続希釈液をプレーティングし、計数する。

20

【0090】

曝露期間後 28 日生き残ったサルを安楽死させ、以下に記載するように調べる。生き残ったサルは慢性的な感染症を発症する可能性があるため、全ての動物を安楽死させなければならない。さらに、後の効力研究における動物の組織中の細菌量の定量化により、解析のための二次エンドポイントが提供され得る (すなわち、処置によって死亡数がそれほど低下しない場合、細菌量が顕著に低下する可能性がある)。

30

【0091】

表 8 に示した時点からの血液試料を培養して、鼻疽菌の有無を決定する。さらに、これらの時点の各々で、約 100 μ l の全血液を回収し、この全血液から DNA を単離して、QPCR 解析を行なう。

【0092】

血液学的評価 (CBC) が実施され、これらには、限定されるものではないが、以下のパラメータが含まれる。

【表 1 3】

白血球数 (WBC)	平均赤血球容積 (MCV)
示差白血球 (% および絶対) 数	平均赤血球ヘモグロビン (MCH)
好中球 : リンパ球比 (N/L 比)	平均赤血球ヘモグロビン濃度
ヘモグロビン (HGB)	赤血球分布幅 (RDW)
ヘマトクリット (HCT)	血小板数 (PLT)
赤血球数 (RBC)	平均血小板容積 (MPV)

40

【0093】

臨床化学評価が実施され、これらには、限定されるものではないが、以下のパラメータが含まれる。

【表 1 4】

アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	アルブミン/グロブリン (A/G)
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	比
アルカリホスファターゼ (ALP)	血中尿素窒素 (BUN)
γ-グルタリルトランスフェラーゼ (GGT)	クレアチニン
乳酸脱水素酵素 (LDH)	BUN/クレアチニン比
ソルビトール脱水素酵素 (SDH)	グルコース
総ビリルビン	ナトリウム
総タンパク質	カリウム
アルブミン	塩化物
グロブリン	カルシウム
	リン

10

【0094】

凝固因子の解析のための血液試料を、クエン酸ナトリウムを含有するチューブ中に回収する。処理後の各々の全血液試料から回収した残りの血漿に対してC反応性タンパク質 (CRP) 解析を行なう。血漿を分離することができる場合は、EDTAチューブに回収した末端血液試料に対してもCRP解析を行なう。

【0095】

死ぬかまたは安楽死させる全てのサルに対して肉眼的解剖を行なう。限定されるものではないが、肺、脾臓、および肝臓を含む標的組織の部分をホモジナイズし、DNAを単離し、qPCRを行なって、これらの器官における細菌量を決定する。限定されるものではないが、脳、肺、腎臓、肝臓、脾臓、縦隔リンパ節および気管支リンパ節を含む標的組織ならびに全ての肉眼的病変の切片を10%中性緩衝ホルマリンに保存する。研究28日目に安楽死させる生き残りを含む全ての動物に対して組織病理学的検査を行なう。

20

【0096】

最大尤度法を用いて、プロビット用量 - 応答モデルをサルの用量 - 致死データに当てはめて (Finney, 1971 および Feder, 1991)。プロビット用量 - 応答モデルの推定パラメータを用いて、LD₅₀ および LD₉₀ を計算する。フィーラー法 (Finney, 1971) または他の適切な方法を用いて、LD₅₀ および LD₉₀ についての95%信頼区間を計算する。

30

【0097】

各々の臨床的兆候の発症までの時間を、動物の死亡、安楽死、または臨床的観察期間の最後まで記録する。各々の臨床的兆候を示す動物と各々の兆候の発症までの時間の比率を決定する。用量を説明変数として、コックスの比例ハザードモデルを、発症までの時間と死亡までの時間のデータに当てはめる。より重篤な兆候があまり重篤でない兆候を隠す場合があるので、この解析のために兆候を分類してもよい。病気の兆候までの平均期間と死亡までの平均期間をLD₅₀ 用量で算出する。

【0098】

血液検査、臨床化学、凝固およびqPCRの結果の統計的解析：これらのパラメータを、各々のデータ回収時点での平均投与前レベルからの変化を計算することにより、同じ動物のベースラインと比べて評価する。必要であれば、血液検査および臨床化学のデータをまず対数変換して、より正規分布する応答を作成する。この場合、最終的な結果を累乘法によりそのもとの単位に戻す。これらのデータに対して要約統計量を提供する。各々の時点で、全ての動物についてのベースラインからの平均変化をt-検定を用いて評価し、パラメータ変化が、無変化と統計学的に有意に異なるかどうかを明らかにする。テレメトリーパラメータの各々については、投与直前に回収したデータを各動物について平均化し、ベースライン平均を得る。次に、投与後期間におけるテレメトリーの結果を、ベースライン平均を差し引くことにより各動物に対して調整する。移動平均または他の適当な方法により、さらなるデータ平滑化を利用してもよい。ベースラインで調整および平滑化したデ

40

50

ータ測定値ならびに各々のテレメトリーパラメータの調整値の累積合計の時間的傾向を全ての動物についてプロットする。

【0099】

テレメトリーデータを用いて疾患の発症について特定の基準を確立する。統計的検定は、疾患基準が集団のある程度の割合に見られる具体的な時点を評価するおよび/または疾患の一定の平均発現前後の時間間隔を示すものと決定される。実行可能でかつ関連性があると判断される場合、死亡までの時間、血液検査、細菌検査、および臨床的観察に関する追加のデータをこの解析に組み入れて、治療を開始する最適なタイミングを決定することもできる。

【0100】

実施例。BALB/cマウスにおける致死的な吸入による野兔病菌、ペスト菌、および鼻疽菌投与に対するCEM-101の効力。

【表15】

表9 研究デザイン

群	CEM-101 用量 (mg/kg)	マウスの数	処置期間(日)
1	50	20	14
2	100	20	14
3	150	20	14
4	200	20	14
5	対照	20	14

【0101】

110匹のBALB/cマウスをこの処理において使用した(100匹を研究に使用し、10匹を予備とする)。0日目に、マウスを鼻のみのエアロゾル曝露システムに入れ、衝突ネブライザーでエアロゾル化された病原菌に曝露させる。病原菌のエアロゾル濃度は、コロニー形成単位(cfu)を決定して定量化する。流出液をインライン式の全ガラス製インピンジャーによって曝露口から直接回収する。インピンジャー試料の連続希釈液をプレーティングし、計数する。

【0102】

投与後、生存と病気の臨床的兆候とについて、マウスを1日2回、28日間観察する。肺、脾臓および末梢血における細菌量を、死んでいるのが見つかったかまたは安楽死させた全てのマウスから定量的PCRにより決定する。28日の投与後観察期間を生き残った全ての動物に麻酔をかけて、末端血液試料を回収し、その後すぐに安楽死させる。安楽死の後、細菌量解析のために、肺と脾臓の標本も回収する。

【0103】

フィッシャーの直接確率検定を用いて、各抗生物質処置群と対照群の生存率を比較する。これらのデータに対して死亡までの時間解析を行ない、生存期間モデルに基づいて異なる群についての防御に違いがあるかどうかを決定する。

【0104】

ウサギにおける致死的な吸入による炭疽菌投与に対するCEM-101の予備的効力および重要な効力(下記の一般的なウサギ効力研究の概要を参照されたい)。

【0105】

上記の方法を用いて、エアロゾル化した炭疽菌によるウサギの吸入投与に対するCEM-101の効力

10

20

30

40

【表 16】

表 12. ウサギの曝露後効力研究 (炭疽菌に用いる)

群	CEM-101 用量 (mg/kg)	動物の数	処置期間 (日)	血液検査/臨床化学/菌血解析 (投与 の日に対して)
1	5	10	14	-7、1、2、3、4、7、14、21、28
2	10	10	14	-7、1、2、3、4、7、14、21、28
3	15	10	14	-7、1、2、3、4、7、14、21、28
4	対照	10	14	-7、1、2、3、4、7、14、21、28

【0106】

10

投与後 18 ~ 24 日の間、動物を処置する。全ての動物を投与後 28 日間モニタリングする。CEM-101 のピークレベルおよびトラフレベルのための採血を最初の、真ん中のおよび最後の抗生物質処置の後に回収する。

【0107】

実施例。臨床検査標準協会 (CLSI、正式には NCCLS) に従って 96 ウェル中で微量希釈法により MIC を決定した (1)。抗生物質を 50 μ l のカチオン調整したミュラー - ヒントンブロス (CAMHB) 中で連続 2 倍希釈した。野兎病菌の測定のために、CAMHB に 2% アイソピタルエックス (Becton Dickinson) を補充した。抗生物質範囲は、植菌後の 100 μ l の最終ウェル体積に基づく 16 ~ 0.008 μ g/ml であった。

20

【0108】

18 ~ 24 時間 (炭疽菌、鼻疽菌もしくは類鼻疽菌) または 48 時間 (ペスト菌、野兎病菌) のヒツジ血液 (SBA) またはチョコレート寒天プレート (CLSI による) からのコロニーを懸濁することにより、種菌を調製した。懸濁した培養物を、 10^6 CFU/ml の細菌細胞密度になるように CAMHB で希釈した。96 ウェルプレートの各ウェルに、最終的な種菌が約 5×10^4 CFU/ウェルとなるように、この希釈液 50 μ l を添加した。プレートを 35 でインキュベートした。プレートを 600 nm (SpectroMax M2, Molecular Devices) で読み取ることにより、24 時間および 48 時間で MIC を目視決定した。

【0109】

30

種菌の調製と抗生物質の微量希釈は、CLSI 法に従って行なった。各細菌種の遺伝的および地理的多様性を表す 30 の株について、35 で 18 または 42 時間インキュベートした後、96 ウェルプレート中で微量希釈法により、各薬剤の MIC を決定した。

【0110】

抗生物質ストックの品質管理は、黄色ブドウ球菌 ATCC 29213 および大腸菌 ATCC 25922 を用いて確立した。

【表 17】

	# 株	範囲 ug/ml	MIC50 ug/ml	MIC90 ug/ml
炭疽菌	30	<0.008 - 0.015	<0.008	<0.008
ペスト菌	30	0.25 - 2	1	2
野兎病菌	30	<0.08 - 4	0.03	2
鼻疽菌	30	0.25 - 2	1	1
類鼻疽菌	30	16	16	16

40

50

【0111】

抗生物質感受性試験により、類鼻疽菌を例外として、この研究における全ての細菌種が、治療的に達成可能なCEM-101範囲にあることが示された。類鼻疽菌は、マクロライドに対して活性のある証明済みの多剤排出機構を有しており(2)、CEM-101耐性を示すデータは一貫性がある。野兔病菌の分布は、この種の2つの異なる次亜種の「A」と「B」の重複を反映している。B株は、より高いMICに分布しているが、A株は、下端に分布している。A株はより病原性が高く、より大きなBW/BT脅威をもたらすので、その感受性がより大きいことは幸運なこととなる。

【0112】

これらの細菌性病原菌の多くは感染時に細胞内にあるので、多くのマクロライドが細胞内に選択的に蓄積するという観察された能力は、エアロゾル化されたBW/BT病原菌に曝露された個体での効力を増強する可能性がある。種々の潜在的BW/BT細菌性病原菌に対する証明済みの幅広い活性は、経口バイオアベイラビリティとともに、CEM-101を曝露や感染後の治療の魅力ある候補にしている。これらの病原菌についての動物感染モデルにおけるCEM-101の効力を評価すべきである。

【0113】

実施例。ヒトTHP-1マクロファージを用いた。蓄積を微生物学的アッセイで測定した。用量応答法(AAC 2006; 50:841-51)を用いて、貪食された黄色ブドウ球菌(ATCC 25923; MIC: CEM-101, 0.125 mg/L; AZI, 0.5 mg/L)に対して細胞内活性を決定した。ベラパミル(100 μM)およびゲムフィブロジル(250 μM)を、それぞれ、P-糖タンパク質およびMRPの阻害剤として用いた(AAC, 2007; 51:2748-57)。

【0114】

排出輸送体阻害剤とともにおよび排出輸送体阻害剤なしで、24時間インキュベートした後の蓄積および活性を以下の表に示す。表中、Cc/Ceは、見かけの細胞濃度対細胞外濃度比であり、E_{max}は、(用量-効果応答実験の非線形回帰[シグモイド]から計算された)貪食後種菌と比べた細胞内cfuの最大減少である。

【表18】

条件	AZI			CEM-101		
	Cc/Ce ¹ (24h)	細胞内活性 (24時間でのΔlog cfu)		Cc/Ce ¹ (24h)	細胞内活性 (24時間でのΔlog cfu)	
		静菌用量 (mg/L)	E _{max} ²		静菌用量 (mg/L)	E _{max} ²
対照	127.7±23.5	約7.0	0.10±0.09	268.1±7.1	約0.02	-0.85±0.23 ^(b)
ヘパ ハミ ル	216.37±46.6 ^(a)	約0.2	-0.37±0.15	290.2±12.9	約0.03	-0.59±0.22 ^(b)
ゲム フィ プロ ジル	129.12±2.69	約3.8	-0.12±0.20	308.2±47.8	約0.03	-0.73±0.20 ^(b)

(^a) 対照とゲムフィブロジルの両方と比べて統計的に有意である; (^b) 統計的に有意でない。

【0115】

実施例。抗生物質の細胞内活性。食細胞内の黄色ブドウ球菌株ATCC 25923に対する抗生物質活性の決定を行なった。食細胞内の黄色ブドウ球菌(ATCC 25923株[MIC: CEM-101, 0.125 mg/L; AZI, 0.5 mg/L])に対す

る C E M - 1 0 1 および A Z I の細胞内活性の調節における能動的排出の影響を評価するために、完全な用量 - 応答研究を行なった。抗生物質を、(i) その相対的な静菌濃度 (C s)、および (i i) その相対的な最大効力 (E) について、24 時間で比べた。ベラパミルは A Z I の細胞内活性を増加させるが (ゲムフィブロジルは増加させない)、どちらの阻害剤も C E M - 1 0 1 の活性に対してそれほど効果がなく、C E M - 1 0 1 は、A Z I とは対照的に、対応する真核生物輸送体の基質ではないことが示唆される。

【 0 1 1 6 】

実施例。抗生物質の細胞蓄積。マクロライドの細胞内含有量を、黄色ブドウ球菌 A T C C 2 5 9 2 3 を試験生物として用いて、微生物学的アッセイにより、T H P - 1 マクロファージで測定した。細胞タンパク質を、フォーリン - チオカルト / ビウレット法を用いて並行してアッセイした。総細胞タンパク質含有量を参照してマクロライドの細胞関連含有量を表し、(培養細胞に対して一般に用いられる) 5 μ L / m g 細胞タンパク質という変換係数を用いて、見かけの濃度に変換した。

10

【 0 1 1 7 】

T H P - 1 細胞における A Z I の細胞蓄積と比べた C E M - 1 0 1 の細胞蓄積をまず測定した (図 7 (パネル A))。24 時間で、両方の抗生物質は細胞内に大量に濃縮されたが、C E M - 1 0 1 の方がより大きい値 (C c / C e) であった。第 2 段階で、C E M - 1 0 1 が P g p または M R P 排出輸送体の基質であるかどうかを調べた (図 7 (パネル B))。P g p 阻害剤 (ベラパミル) または M R P 阻害剤 (ゲムフィブロジル) を用いると、ベラパミルによって、A Z I の細胞蓄積は有意に増加するが、C E M - 1 0 1 の細胞蓄積の有意な変動は観察されない。

20

【 0 1 1 8 】

C E M - 1 0 1 の取込みは経時的に線形であり、24 時間以内に約 375 倍の蓄積レベルに達した (A Z I、160 倍、C L R、30 倍、T E L、21 倍)。蓄積は、酸性 p H またはプロトンイオノフォアのモネンシンの添加により抑制されたが、ベラパミルまたはゲムフィブロジル (それぞれ、P g p および M R P の選択的阻害剤) によって改変されなかった。パネル B は、これらの実験が酸性 p H で行なわれたときに、C E M - 1 0 1 と A Z I の両方の蓄積が低下し、p H を 7 から 6 にしたときに、この変化がほぼ完全に起こったことを示している。パネル C は、多くの弱い有機塩基の細胞蓄積を減少させることが知られているモネンシンも、C E M - 1 0 1 と A Z I の両方の蓄積をほぼ完全に抑制したことを示している。対照的に、P - 糖タンパク質排出輸送体 (P g p、別名 M D R 1) の阻害剤であるベラパミルは、C E M - 1 0 1 の蓄積に影響を及ぼすことなく、A Z I の蓄積を増加させ、その一方、多剤耐性タンパク質 (M R P) および他の有機アニオン輸送体の阻害剤であるゲムフィブロジルは、どちらの化合物にも影響を及ぼさなかった。ベラパミルもゲムフィブロジルも T E L または C L R の蓄積に影響を及ぼさなかった (データは示さない)。10 m g / L の C E M - 1 0 1 とともに 1 時間インキュベートし、その後、薬物を含まない培地に移した細胞からの C E M - 1 0 1 の排出を調べた。排出は二峰性に進行し、細胞関連薬物の半分は約 10 分以内に放出され、次いで、数時間のより緩徐な放出期があった (データは示さない)。

30

【 0 1 1 9 】

実施例。マクロライドは真核生物細胞に蓄積し、細胞内感染の治療に有利であると考えられる。ケトライドは、エリスロマイシン耐性生物に対する活性がある。細胞内形態の黄色ブドウ球菌 (S . a .)、リステリア・モノサイトゲネス (L . m .)、およびレジオネラ・ニューモフィラ (L . p .) に対する C E M - 1 0 1 の細胞蓄積および細胞内活性を、A Z I、C L R、および T E L と比べて、以下の表に示す。

40

【表 19】

	MIC ^a	Cs ^b	E _{max} ^c
		CEM-101	
S. a.	0.06	0.022	-0.86
L. m.	0.004	0.11	-0.66
L. p.	0.004	0.018	-1.03
		AZI	
S. a.	0.5	>50	0.04
L. m.	1	11.6	-0.81
L. p.	0.016	2.90	-0.83
		CLR	
S. a.	0.5	0.84	-0.18
L. m.			
L. p.	0.007	0.12	-0.71
		TEL	
S. a.	0.25	0.63	-0.29
L. m.			
L. p.	0.007	0.06	-0.63

^a mg/L; ^b 24時間での静菌濃度 (mg/L); ^c 食後種菌と比べた24時間での $\Delta \log_{10} \text{CFU}$

10

20

【0120】

実施例。抗生物質のMICおよび細胞外活性を中性pHと酸性pHの両方のMHB中で決定した。THP-1マクロファージによって貪食される黄色ブドウ球菌(ATCC 25923)に対する細胞内活性を以前に記載された通りに決定した(AAC, 2006, 50:841-851)。結果を0時間と比べた効力の変化として表した。

【表 2 0】

条件	CEM-101	AZI	CLR	TEL
MIC(mg/L)				
(i) pH7.4	0.125	0.5	0.5	0.5
(ii) pH5.5	1~2	256	16	8
細胞外活性(24時間) : 時間0時間からのΔ				
log cfu				
(i) フォス				
pH7.4				
Emax ¹	-1.4±0.1	-1.2±0.6	-1.4±0.2	-1.0±0.4
静菌用量 ²	約0.06	約3.63	約1.41	約0.28
R ²	0.964	0.860	0.965	0.868

(ii) フォス				
pH5.5				
Emax ¹	-1.6±0.4	+2.1±0.1	-1.5±0.8	-1.4±0.9
静菌用量 ²	約1.48	/	約10.47	約9.33
R ²	0.915	/	0.911	0.879
細胞内活性(24時間) : 時間0時間からのΔ				
log cfu				
Emax ¹	-0.8±0.2	0.10±0.0	-0.1±0.1	-0.4±0.2
静菌用量 ²	約0.02	約7.8	約0.98	約0.23
R ²	0.906	0.980	0.974	0.935
THP-1				
Emax ¹	-0.8±0.2	0.1±0.1	-0.1±0.1	-0.4±0.1
静菌用量 ²	約0.02	約10	約0.98	約0.28

10

20

1 - プロス（細胞外）または感染マクロファージ（細胞内）で行なわれた最初の貪食後細菌と比べた（用量 - 効果応答の非線形回帰 [シグモイド] から計算された）細胞内 cfu の最大減少。2 - 見かけの静菌効果をもたらす細胞外濃度（mg/L で示した Cs）。用量 - 効果研究から得られた比較薬理的記述子（Emax および静菌濃度 [Cs]）。ミューラー - ヒントンプロスでの用量 - 応答研究。黄色ブドウ球菌 ATCC 25923 に対しておよび pH 7.4 のプロス中で、CEM-101 は、AZI、CLR および TEL よりも体系的に活性が高く、pH 5.5 では、AZI、CLR および TEL はその効力の有意な減少を示すが、CEM-101 はあまり変化を示さない。

30

【0121】

AZI、CLR および TEL と比べて、CEM-101 活性は、プロスの酸性 pH による影響をあまり受けず、細胞内の黄色ブドウ球菌に対するより大きい効力（より少ない静菌用量）およびより大きい最大効力（Emax）を示した。

【0122】

実施例。細胞株。マクロファージ様活性を示すヒト骨髄単球性細胞株である THP-1 細胞（ATCC TIB-202; American Tissue Culture Collection, Manassas, VA）を用いて、実験を行なった（例えば、Barcia-Macay et al., Antimicrob. Agents Chemother. 50: 841-851 (2006) を参照されたい）。細胞関連マクロライドのアッセイおよび見かけの細胞濃度対細胞外濃度比の計算。マクロライドを、黄色ブドウ球菌 ATCC 25923 を試験生物として用いて、微生物学的方法によりアッセイした。細胞タンパク質を、フォーリン - チオカルト / ビウレット法を用いて並行してアッセイした。総細胞タンパク質含有量を参照してマクロライドの細胞関連含有量を表し、多くの培養細胞に見られる平均値である 5 μL / mg 細胞タンパク質という変換係数を用いて、見かけの濃度に変換した。

40

【0123】

50

細菌株、感受性試験、およびブロスを用いた24時間の用量-応答曲線研究。黄色ブドウ球菌 ATCC 25923 (メチシリン (methicillin) [メチシリン (meticillin)] 感受性)、L.モノサイトゲネス株 EGD、およびL.ニューモフィラ株 ATCC 33153 を本研究で用いた。MICの決定は、24時間インキュベーションした後のミュラー-ヒントンブロス (黄色ブドウ球菌用) およびトリプティックソイブロス (L.モノサイトゲネス用)、または48時間インキュベーションした後の-ケトグルタル酸緩衝酵母抽出物ブロス (N.ニューモフィラ用) において行なわれた。黄色ブドウ球菌の研究については、無細胞培地中での24時間の濃度-応答実験をミュラー-ヒントンブロスにおいて行なった。

【0124】

細胞感染および抗生物質の細胞内活性の評価。黄色ブドウ球菌およびL.モノサイトゲネスについては従来の方法を用いてまたはL.ニューモフィラについては、少し改変して (i) マクロファージ当たり感染多重度10の細菌および (ii) 貪食されていない細菌を排除するための30~45分間のゲンタマイシン (50 mg / リットル) を用いて、THP-1細胞の感染および抗生物質細胞内活性の評価を行なった。

【0125】

統計解析。Graph Pad Prismバージョン4.03およびGraph Pad Instatバージョン3.06 (Graph Pad Software, San Diego, CA) を用いて、曲線当てはめ統計解析を行なった。

【0126】

実施例。黄色ブドウ球菌 ATCC 25923、リステリア・モノサイトゲネス EGD、およびレジオネラ・ニューモフィラ ATCC 33153 に対する感受性。CEM-101は、従来感受性試験で、3つの選択された生物 (黄色ブドウ球菌、0.06および0.5 mg / リットル; L.モノサイトゲネス、0.004および1 mg / リットル; ならびにL.ニューモフィラ、0.004および0.016 mg / リットル) に対してAZIよりも低いMICを示した。黄色ブドウ球菌およびL.モノサイトゲネスに対するCEM-101、TEL、AZI、およびCLRのMICを、5.5~7.4の範囲のpH値に調整したブロス中で測定した。抗生物質が、考察される2つの生物に対して細胞外環境でまたは細胞内で曝露され得る値を網羅するように、この範囲が選択された。図3に示すように、4つの薬物は全て、pHが7.4から5.5に減少したときに両方の生物に対する効力の著明な減少を示し、AZIは最も著しい活性の喪失を示した。CEM-101は、最も高い活性を保持し、調べた全てのpH範囲において一貫して最小のMICを示し、値 (mg / リットル) は、黄色ブドウ球菌 (ATCC 25923) については0.06 (pH 7.4) ~ 0.5 (pH 5.5)、およびL.モノサイトゲネス (EGD) については0.0039 (pH 7.4) ~ 0.25 (pH 5.5) であった。N.ニューモフィラ (データは示さない) については、ブロスのpHが7.4から6.5に減少したときに、CEM-101のMICは0.005から0.01に増加し、AZIのMICは約0.01から0.25 mg / リットルに増加した (増殖しないので、より低いpH値では決定することができなかった)。

【0127】

実施例。細胞外および食細胞内の黄色ブドウ球菌に対する時間および濃度効果。0.7および4 mg / リットルという2つの単一固定濃度を用いて、ブロス中およびTHP-1マクロファージによる貪食後に、黄色ブドウ球菌 (ATCC 25923) に対するAZIの短期間 (6時間) の時間-殺菌曲線と比べた、CEM-101についての短期間 (6時間) の時間-殺菌曲線を得た。より低い濃度は、AZIおよびCEM-101の血清濃度と関連があるように選択され、より高い濃度は、対象となる生物に対するAZIのMICを上回るように選択された。図5に示す結果は、これらの条件下では、CEM-101のみが、ブロス中およびTHP-1マクロファージ中、0.7 mg / リットルの濃度で、CFUを有意に減少させることができたことを示している。ブロス中、4 mg / リットルの濃度で、AZIは、最終的にはCEM-101と同じ抗菌効果を達成したが、速度は

10

20

30

40

50

遅かった（1時間と比べて5時間）。THP-1マクロファージでは、AZIについて、一貫性のある活性は4mg/リットルの濃度ですら検出されなかったが、CEM-101は、0.7mg/リットルの濃度で見られる大きさと類似した、約1.5log10 CFUの低下をやはり達成した。CEM-101を用いた全ての状況において、CFUの最大減少は1時間以内に得られ、その後も維持された。

【0128】

次に、本発明者らは、CEM-101活性の関連する薬理的記述子（CLR、AZIおよびTEL活性と比べた相対効力[50%有効濃度{EC50}]、見かけの静菌濃度[Cs]、および相対最大効力[Emax]を得るために、固定された時点（24時間）で濃度-応答実験を行なった（さらなる詳細は、Barcia-Macay et al., Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against Staphylococcus aureus in a model of THP-1 macrophages Antimicrob. Agents Chemother. 50:841-851 (2006)に記載されている）。データを、(i)重量濃度(mg/リットル)および(ii)MICの倍数(pH7.4のプロス中で決定される)の関数として図4に示す。対応する薬理的記述子の数値を表に示す。

10

【表21】

関連する回帰パラメータ^a（信頼区間[CI]を含む）、および図4に示す用量-応答曲線の統計解析。

20

抗生物質	E _{max} [♦] (CI)	プロス [†]		Cs [∞]	R ²
		mg/L	EC ₅₀ [∞] (CI)		
CEM-101	-1.37	mg/L	0.03	0.06	0.973
	(-1.67~-1.08)		(0.02~0.06)		
	a;A		a;A		
		×MIC	0.48	0.88	
			(0.26~0.91)		
			a;A		
TEL	-1.00	mg/L	0.12	0.29	0.892
	(-1.78~-0.22)		(0.03~0.52)		
	a;A		b;A		
		×MIC	0.46	0.96	
			(0.11~2.06)		
			a;A		
AZI	-1.23	mg/L	1.78	3.4	0.872
	(-2.55~0.083)		(0.45~7.02)		
	a;A		c;A		
		×MIC	3.55	6.87	
			(0.90~14.0)		
			b;A		
CLR	-1.41	mg/L	0.80	1.32	0.956
	(-1.95~-0.87)		(0.41~1.56)		
	a;A		c;A		
		×MIC	1.59	2.65	
			(0.81~3.1)		
			a, b;A		

30

40

【表 2 2】

抗生物質	THP-1 マクロファージ ⁺⁺				
	E_{max}^{\diamond} (CI)		EC_{50}^{\diamond} (CI)	C_5^{00}	R^2 (CI)
CEM-1 01	-0.86	mg/L	0.0068	0.022	0.927
	(-1.36~-0.37)		(0.0023~0.020)		
	a;B		a;B		
		×MIC	0.11	0.35	
			(0.037~0.32)		
TEL	-0.29	mg/L	0.024	0.63	0.954
	(-0.70~0.12)		(0.007~0.088)		
	b;B		b;B		
		×MIC	0.097	1.04	
			0.027~0.35		
AZI	0.04	mg/L	0.11	>50	0.983
	(-0.23~0.32)		(0.05~0.22)		
	b;B		c;B		
		×MIC	0.22	>100	
			0.11~0.45		
CLR	-0.18	mg/L	0.046	0.84	0.974
	(-0.52~0.16)		(0.018~0.12)		
	b;B		b, c;B		
		×MIC	0.093	1.68	
			0.035~0.25		
		a;B			

10

20

^a 図 6 に示す全てのデータ点（抗生物質の細胞外濃度が 0.01 倍の MIC よりも低いときは抗生物質なしの試料からのデータ）を用いた（5）

⁺ もとの種菌 [時間 = 0 時間] : $0.97 \pm 0.24 \times 10^6$ CFU/mL ($n = 3$)

⁺⁺ もとの（食後）種菌 [時間 = 0 時間] : $2.74 \pm 0.55 \times 10^6$ CFU/mg タンパク質 ($n = 3$)

抗生物質濃度 = に関して外挿されたときの、対応するもとの種菌からの時間 = 24 時間の時点での CFU 減少 (\log_{10} 単位で示す) ; 5 未満のカウントを生じる試料は、検出レベル未満とみなされた。

(傾斜因子 1 を用いて) ヒル方程式から得られる、初期値 (E_0) と最大値 (E_{max}) の中間にまで種菌を低下させる濃度 (mg/L または ×MIC で示す) ;

グラフ内挿法によって決定される、細菌増殖が見られないようになる濃度 (mg/L または ×MIC で示す) (CFU の数は、もとの種菌と同じである) ; 統計解析。抗生物質間の違いの解析 (対応する行の列ごとに ; 全ての薬物の各パラメータ間の複数の比較についてのチューキー検定による一元配置 ANOVA) : 様々な小文字を伴う数字は、互いに有意に異なる ($p < 0.05$)。プロスと THP-1 マクロファージの違いの解析 (対応する列の行ごとに ; 対応のない両側 t 検定) : 様々な小文字を伴う数字は、互いに有意に異なる ($p < 0.05$)。

【0129】

シグモイド形の各最適関数 (ヒル方程式) で示されるように、プロスと THP-1 マクロファージの両方における活性は濃度依存的に発生した。プロス中では、CEM-101 の相対効力 ($E_{max} - 1.37 \log_{10}$) は、他の薬物の相対効力 (E_{max} 値

30

40

50

- 1.00 ~ - 1.41 log₁₀)と同様であった。THP-1マクロファージ中では、CEM-101の相対効力は、プロス中での相対効力 ($E_{max} - 0.86 \log_{10}$) と比べて有意に減少したが、他の薬物の相対効力と同じ程度には減少せず、本質的には静菌的にしかなかった (E_{max} 値 0.04 ~ - 0.29 log₁₀)。重量ベースでは、CEM-101は、プロスとTHP-1マクロファージの両方における3つ全ての比較子薬物よりも高い相対効力 (低い E_{50} 値) および低い静菌濃度 (低い C_s 値) を有していた。データを、等効力濃度の関数 (MICの倍数) として解析すると、これらの EC_{50} 値の差が低下し、MICが、このような状況での主な駆動パラメータであったことを示している。プロス中では、MICの倍数として解析したときでさえも、CEM-101およびCLRは、依然としてTELおよびAZIよりも有意に低い E_{50} を示した。

10

【0130】

実施例。食細胞内L・モノサイトゲネスおよびN・ニューモフィラに対する活性。濃度-効果関係および対応する関連する薬理的記述子に関する情報を得るために、黄色ブドウ球菌に対するアプローチと同じアプローチを用いて、貪食されたL・モノサイトゲネスおよびL・ニューモフィラに対するCEM-101およびAZIの活性を評価した。図6に示すように、ヒル方程式と適合する関係性が全ての場合に見られたが、L・ニューモフィラの増殖が限られていることで、関数の当てはめがややより不明確になった。このデータを重量濃度に対してプロットすると、CEM-101が、L・モノサイトゲネスとN・ニューモフィラの両方についてAZIよりも高い相対効力 (低い EC_{50}) を有するよう

に見えた。L・ニューモフィラについてのデータをMICの倍数に対してプロットすると、この差は低下したが、それでも有意なままであり、MICが、この生物に対する細胞内活性の唯一ではないが、重要な駆動因子であることを示した。反対に、データをMICの倍数として表したとき、L・モノサイトゲネスについて、応答の差は見られなかった。関連する薬理的記述子の数値とその差の総計解析とを表に示す。

20

【表23】

関連する回帰パラメータ^a (信頼区間 [CI] を含む)、および図6に示す用量-応答曲線の統計解析。

抗生物質	E_{max}^{Δ} (CI)	L.モノサイトゲネスEGD ⁺		$C_s^{\Delta\Delta}$	R^2
		mg/L	EC_{50}^{Δ} (CI)		
CEM-101	-0.66	mg/L	0.020	0.11	0.934
	(-1.28~-0.037)		(0.005~0.073)		
	a		A		
		×MIC	5.00	0.88	
			(1.36~18.5)		
			A		
AZI	-0.81	mg/L	2.66	11.6	0.953
	(-2.11~0.48)		(0.91~7.73)		
	a		B		
		×MIC	2.66	11.6	
			(0.81~3.1)		
			A		

30

40

【表 2 4】

抗生物質	L. ニューモフィラ ATCC 33153 ⁺⁺				
	E_{max}^{\diamond} (CI)		EC_{50}^{\diamond} (CI)	$C_s^{\diamond\diamond}$	R^2
	-1.03	mg/L	0.052	0.018	0.920
CEM-101	(-1.34~-0.72)		(0.012~0.23)		
	a		A		
		×MIC	13.1	4.56	
			(3.02~57.0)		
			A		
AZI	-0.83	mg/L	2.86	2.90	0.903
	(-2.00~0.34)		(0.17~48.6)		
	a		B		
		×MIC	179.0	181	
			(10.5~3038)		
			B		

10

20

30

40

^a 図 6 に示す全てのデータ点（抗生物質の細胞外濃度が 0.01 倍の MIC よりも低いときは抗生物質なしの試料からのデータ）を用いた（5）。⁺ もとの（食後）種菌 [時間 = 0 時間 ; CFU / mg タンパク質] : L. モノサイトゲネス、 $1.67 \pm 0.22 \times 10^6$ (n=3) ; L. ニューモフィラ、 $0.94 \pm 0.60 \times 10^6$ 。抗生物質濃度に関して外挿されたときの、対応するもとの種菌からの時間 = 24 時間（L. モノサイトゲネス）または 48 時間（N. ニューモフィラ）の時点での CFU 減少（log₁₀ 単位で示す）；5 未満のカウントを生じる試料は、検出レベル未満とみなされた。（傾斜因子 1 を用いて）ヒル方程式から得られる、初期値（E₀）と最大値（E_{max}）の中間にまで種菌を低下させる濃度（mg / L または ×MIC で示す）。グラフ内挿法によって決定される、細菌増殖が見られないようになる濃度（mg / L または ×MIC で示す）（CFU の数は、もとの種菌と同じである）。統計解析：2 つの抗生物質間の違いの解析（対応する行の列ごとに；対応のない両側 t 検定）：様々な小文字を伴う数字は、互いに有意に異なる（p < 0.05）。

【0131】

実施例。食細胞内の黄色ブドウ球菌 ATCC 25923 に対する感染 THP-1 マクロファージにおける用量 - 応答研究。CEM-101 は、AZI、CLR および TEL よりも強力である（C_s が低い）。さらに、CEM-101 は、細胞内種菌（E_{max} 約 1 log）を低下させることができる。これは、AZI、CLR および TEL のいずれでも観察されない。

【表 2 5】

細胞内の CEM-101 取込み (i i) : 細胞型の役割

細胞	THP-1 (ヒトマクロファージ)	J774 (マウスマクロファージ)	MDCK (腎上皮細胞)	MDR1 排出輸送体を 過剰発現する MDCK
5 時間での C _c /C _e	約 50~150	約 60	約 45	約 30

【0132】

実施例。細胞内黄色ブドウ球菌 ATCC 25923（THP-1 マクロファージ）に対する CEM-101 と比較子（AZI、CLR および TEL）の用量 - 応答研究例。図 9 および表を参照されたい。

【表 2 6】

	CEM-101	AZI	CLR	TEL
Emax	-0.80±0.11	0.04±0.11	-0.18±0.13	-0.29±0.16
Cs (mg/L)	約 0.01	>50	約 0.86	約 0.27

【0133】

実施例。細胞内活性：他の抗ブドウ球菌剤を用いた比較研究。THP-1マクロファージにおける細胞内黄色ブドウ球菌(ATCC 25923株)に対する抗生物質の比較用量-静菌応答を測定した。図8を参照されたい。棒は、MIC(mg/Lで示す)または細胞外静菌用量を表す。

10

【0134】

方法。マウス腹腔マクロファージに生きたライ菌を感染させ、薬物を添加し、33で3日間インキュベートした。3日後、マクロファージを溶解させて、細胞内のライ菌を放出させ、次に、このライ菌を、放射性呼吸測定および生死判別染色によって生存についてアッセイした。CEM-101は、細胞内ライ菌の生存に対する効力を示す。

【0135】

無胸腺nu/nuマウス足蹠における連続的継代により維持された、ライ菌のタイ-53分離株を全ての実験に用いた。純培養試験のために、新しく採取した生きたライ菌を、様々な濃度の薬物(CEM-101、CLRおよびリファンピシン)とともに33で7日間培地中でインキュベートした。このインキュベーションの最後に、薬物処理したライ菌を、放射性呼吸測定にかけて、パルミテートの酸化に基づく生存を評価し、生死判別色素による染色を施して、膜損傷の程度を評価した。細胞内試験のために、Swissマウス由来の腹腔マクロファージに新しく採取した生きたライ菌を20:1のMOIで12時間感染させた。感染の最後に、細胞外細菌を洗浄し、薬物を様々な濃度で添加し、33で3日間インキュベートした。3日間の最後に、細胞を溶解させて、放射性呼吸測定および生死判別染色のための細胞内ライ菌を得た。

20

【0136】

対照と比べたとき、0.15µg/mLのCEM-101は、純培養と細胞内培養の両方においてライ菌の生存を有意に(P<0.001)低下させることができた。CEM-101による阻害は、同一条件下、同一濃度で、CLRで得られる阻害と有意には異ならなかった。

30

【0137】

実施例。肺炎レンサ球菌、溶血性レンサ球菌およびピリダンス群レンサ球菌、ブドウ球菌種、および腸球菌に対するCEM-101の高い効力は、標準的な臨床検査標準協会(CLSI)法を用いて行なわれた初期のスクリーニング研究に記載されている。MLS B-ケトライド類を含み得る耐性のメカニズムと発生が急速に増加しつつあるので、野生型(WT)と表現型/遺伝子型が規定された耐性生物サブセットとを試験したときのCEM-101の殺菌活性(MBCおよび死滅曲線)を5つの選択された種類の抗微生物剤とともに評価した。CEM-101、TEL、およびCLRのMBC決定では、40(6つの種の群)についてCLSI法を用いた。KCでは、8つの株(6つの種の群)を用いた。PAEを、1時間または2時間の曝露の間、4倍濃度で試験した(5株); TEL対照。

40

【0138】

MBCおよび死滅曲線研究：合計40株(10の肺炎レンサ球菌、10の黄色ブドウ球菌、ならびに各々5つの溶血性レンサ球菌、ピリダンス群レンサ球菌、コアグラゼ陰性ブドウ球菌[CONS]および腸球菌)についてMICを試験し、次いで、CLSI法を用いてMBCを決定した(MICおよびMBC範囲、0.008~16µg/mL)。最初の種菌の99.9%以上を死滅させる被験薬剤の最低濃度をMBC終点と定義した(

50

表 2 および 3)。8 つの選択された株に対する時間殺菌活性を、Moody & Knapp, NCCLS M21-A3 および M26-A に記載の方法に従って、CEM-101、TEL、CLR、および AZI について行なった。これらの化合物を 2 倍、4 倍、8 倍の MIC で試験し、コロニーカウントを T0、T2、T4、T8 および T24 で行なった。

【0139】

CEM-101 は、BSA、SA および コアグラゼ陰性ブドウ球菌についての低い MBC/MIC 比 (4) ; および TEL よりも 2 倍大きい効力を示した。SA、腸球菌およびいくつかのマクロライド/CLN 耐性 (R) 株は、より高い比を有していた。KC の結果は、TEL と比べて CEM-101 についてのより速やかでかつより大きい殺菌活性 (濃度依存的) を示した。CEM-101 は、TEL よりも大きい速度および程度でいくつかのグラム陽性種に対する殺菌活性を示した。

【表 27】

CEM-101、TEL、CLRおよびAZIのMBC/MIC比による分離株の分布

生物/抗微生物剤 (試験した数)	以下の MBC/MIC 値を有する株の数					
	1	2	4	8	16	≥32
肺炎レンサ球菌 (10)						
CEM-101	3	5	0	0	0	2
テリスロマイシン	2	6 ^a	0	0	0	2
クラリスロマイシ	2	3	1	0	0	- ^b
アジスロマイシン	2	4	0	0	0	- ^b
β 溶血性レンサ球菌 (5)						
CEM-101	0	1	2	0	0	2
テリスロマイシン	0	1	1	1	0	2
クラリスロマイシ	0	0	1	1	0	2 ^b
アジスロマイシン	0	0	0	0	2	2 ^b
ビリダンス群レンサ球菌 (5)						
CEM-101	3	0	1	0	0	1
テリスロマイシン	2	1	1	0	0	1
クラリスロマイシ	0	0	1	0	0	3 ^b
アジスロマイシン	0	0	0	0	1	3 ^b
黄色ブドウ球菌 (10)						
CEM-101	1	0	0	0	1	8
テリスロマイシン	0	0	0	0	0	10
クラリスロマイシ	0	0	0	0	0	6 ^b
アジスロマイシン	0	0	0	0	0	6 ^b
コアグラゼ陰性ブドウ球菌 (5)						
CEM-101	1	1	0	3	0	0
テリスロマイシン	0	0	0	0	2	3
クラリスロマイシ	0	0	0	0	0	4 ^b
アジスロマイシン	0	0	0	0	0	4 ^b
腸球菌種 (5)						
CEM-101	0	0	0	0	0	5
テリスロマイシン	0	0	0	0	0	5
クラリスロマイシ	0	0	0	0	0	2 ^b
アジスロマイシン	0	0	0	0	0	2 ^b

a. 0.008 μg/ml 以下の MIC と 0.015 μg/ml の MBC を有する 6 つの分離株を含む(オフスケール比較)。

b. 耐性レベルの MIC 結果を示す分離株に対しては MBC を評価しなかった。

【0140】

CEM-101 は、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、肺炎レンサ球菌、化膿レンサ球菌(8倍のMICでのみ)およびビリダンス群レンサ球菌のマクロライド感受性株、ならびにマクロライド耐性化膿レンサ球菌に対する速やかな殺菌活性(3 log₁₀ CFU/ml の低下)を示した。CEM-101 は、TEL またはマクロライドの CLR および AZI と比べたとき、CFU/ml のより大きい低下とより速やかな死滅とをもたらした。

10

20

30

40

【表 28】

時間殺菌曲線結果のまとめ。

生物	抗微生物剤	抗微生物活性	
黄色ブドウ球菌 (ATCC 29213)	CEM-101	2倍、4倍、8倍で殺菌性	
	テリスロマイシン	8倍のみで殺菌性	
	クラリスロマイシン	8倍のみで殺菌性	
	アジスロマイシン	8倍のみで殺菌性	
表皮ブドウ球菌 (095-2777A)	CEM-101	2倍、4倍、8倍で殺菌性	10
	テリスロマイシン	静菌性	
	クラリスロマイシン	静菌性	
	アジスロマイシン	静菌性	
E. フェカリス (ATCC 29212)	CEM-101	静菌性	
	テリスロマイシン	静菌性	
	クラリスロマイシン	静菌性	
	アジスロマイシン	静菌性	
肺炎レンサ球菌 (ATCC 49619)	CEM-101	2倍、4倍、8倍で殺菌性	20
	テリスロマイシン	2倍、4倍、8倍で殺菌性	
	クラリスロマイシン	2倍、4倍、8倍で殺菌性(緩徐な殺菌)	
	アジスロマイシン	2倍、4倍、8倍で殺菌性(緩徐な殺菌)	
肺炎レンサ球菌 (075-241B)	CEM-101	静菌性	
	テリスロマイシン	静菌性	
化膿レンサ球菌 (117-1612A)	CEM-101	8倍でのみ殺菌性	
	テリスロマイシン	8倍でのみ殺菌性(緩徐な殺菌)	
	クラリスロマイシン	8倍でのみ殺菌性(緩徐な殺菌)	
	アジスロマイシン	8倍でのみ殺菌性(緩徐な殺菌)	
化膿レンサ球菌 (088-11708A)	CEM-101	2倍、4倍、8倍で殺菌性	30
	テリスロマイシン	2倍、4倍、8倍で殺菌性(緩徐な殺菌)	
S. ミティス (112-1885A)	CEM-101	2倍、4倍、8倍で殺菌性	
	テリスロマイシン	2倍、4倍、8倍で殺菌性	
	クラリスロマイシン	8倍でのみ殺菌性(緩徐な殺菌)	
	アジスロマイシン	4倍および8倍で殺菌性(緩徐な殺菌)	

【0141】

CEM-101は、マクロライド感受性レンサ球菌、CONSおよびマクロライド耐性CLN感受性肺炎レンサ球菌に対して試験したとき、殺菌活性を示した。CEM-101のMBC/MIC比は、黄色ブドウ球菌については高くなることがあるが、いくつかの株は、感受性のある濃度範囲内にとどまるMBC結果を示した。

40

【0142】

実施例。クラミジアに対する活性。CEM-101、TEL、AZI、CLR、およびドキシサイクリンを粉末として準備し、製造元の指示に従って可溶化した。アッセイを実施するたびに、薬物懸濁液を新たに作製した。

【0143】

肺炎クラミジア：試験した肺炎クラミジアの分離株には、標準株(TW 183)、米国起源の肺炎を有する子供および成人由来の9つの分離株(AR39、T2023、T2043、W6805、CWL 029、CM-1)、日本起源の肺炎を有する子供由来の1つの分離株(J-21)、および米国起源のヒト免疫不全ウイルス感染症と肺炎を有す

50

る患者の気管支肺胞洗浄標本由来の2つ(BAL15およびBAL16)が含まれていた。

【0144】

C.トラコマチス:ATCC(E-BOUR、F-IC-CAL3、C-HAR32、J-UW-36、L2434、D-UW-57kx、B-HAR-36)からの標準的な分離株および最近の臨床分離株(N18(子宮頸部)、N19(子宮頸部)、7015(幼児の目))を含む、10のトラコーマ病原体分離株。

【0145】

インビトロ感受性試験:肺炎クラミジアおよびC.トラコマチスの感受性試験は、96ウェルマイクロタイタープレート中で増殖させたHEp-2細胞を用いて細胞培養で行なった。各ウェルに、10³~10⁴IFU/mlになるよう希釈した試験株0.1mlを植菌し、1,700xgで1時間遠心分離し、35℃で1時間インキュベートした。ウェルを吸引し、1ml当たり1μgのシクロヘキサミドと連続2倍希釈した試験薬とを含有する培地0.2mlを重層した。

10

【0146】

2つ1組のプレートに植菌した。35℃で48~72時間インキュベートした後、培養物を固定し、リポ多糖属抗原に対するフルオレセインコンジュゲート抗体(Pathfinder, Kallestad Diagnostics, Chaska, Minn)で含有について染色した。最小阻害濃度(MIC)は、含有が見られなかった最小の抗生物質濃度である。抗生物質を含有する培地を吸引し、リン酸緩衝生理食塩水でウェルを2回洗淨し、抗生物質を含まない培地を添加することにより、最小殺菌濃度(MBC)を決定した。培養物を-70℃で凍結させ、解凍させ、新しい細胞に感染させ、72時間インキュベートした後、上記のように固定および染色した。MBCは、感染後に含有を生じない最小の抗生物質濃度である。試験は全て3回1組で実施した。

20

【表29】

10の肺炎クラミジア分離株に対するCEM-101および他の抗生物質の活性

薬物	MIC (μg/ml)			MBC (μg/ml)	
	範囲	50%	90%	範囲	90%
CEM 101	0.25-1.0	0.25	0.25	0.25-1.0	0.25
テリスロマイシン	0.015-0.25	0.06	0.06	0.015-0.25	0.06
アジスロマイシン	0.015-0.125	0.125	0.125	0.015-0.125	0.125
クラリスロマイシン	0.015-0.125	0.06	0.06	0.015-0.125	0.06
ドキシサイクリン	0.015-0.06	0.06	0.06	0.015-0.06	0.06

30

【表30】

10のC.トラコマチス分離株に対するCEM-101および他の抗生物質の活性

薬物	MIC (μg/ml)			MBC (μg/ml)	
	範囲	50%	90%	範囲	90%
CEM 101	0.125-0.5	0.25	0.25	0.125-0.5	0.25
テリスロマイシン	0.015-0.25	0.06	0.06	0.015-0.25	0.06
アジスロマイシン	0.015-0.125	0.125	0.125	0.015-0.125	0.125
クラリスロマイシン	0.015-0.125	0.06	0.06	0.015-0.125	0.06
ドキシサイクリン	0.015-0.06	0.06	0.06	0.015-0.06	0.06

40

【0147】

この研究の結果は、CEM-101が、他のマクロライドおよびケトライドと同程度のC.トラコマチスおよび肺炎クラミジアに対するインビトロ活性を有することを示した。

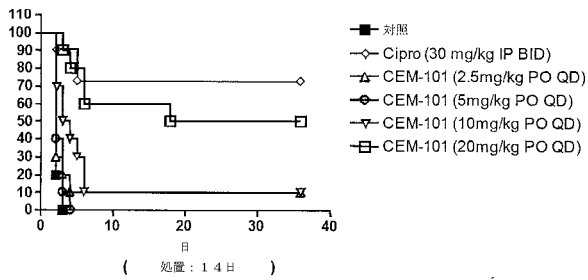
【0148】

実施例。組織分布。CEM-101は、組織によく吸収され、分布した。ラットでは、

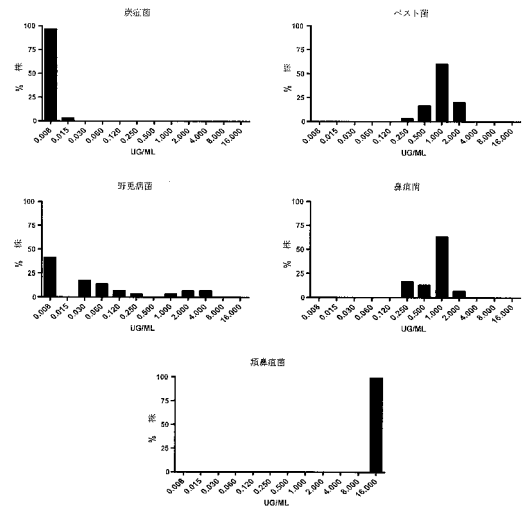
50

250 mg / kg / dで、CEM - 101の平均の肺濃度および肝臓濃度は、血漿中よりも17倍および15倍高かった。肺濃度および肝臓濃度は、サルでは、200 mg / kg / d用量で、血漿濃度よりも503倍および711倍高かった。心臓におけるCEM - 101濃度は、肺または肝臓で見られるレベルよりも有意に低く、ラットおよびサルでの血漿濃度よりも、それぞれ、5倍および54倍高いレベルであった。

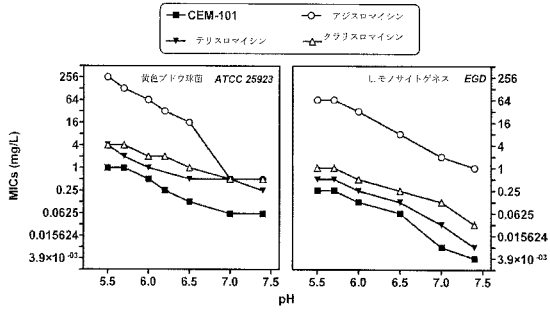
【 図 1 】



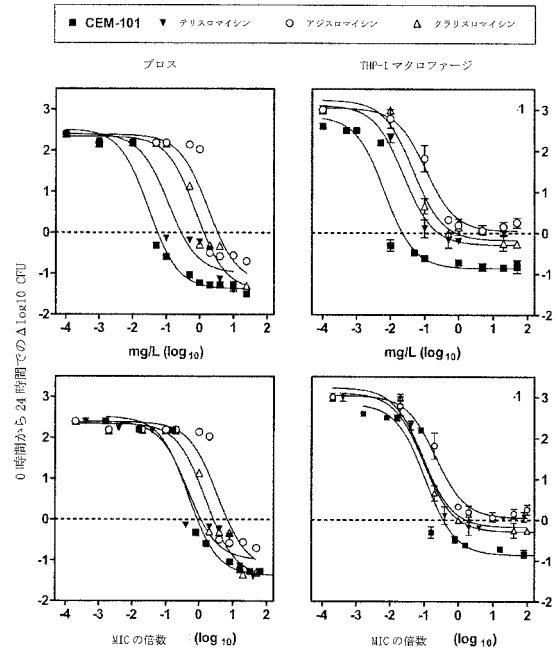
【 図 2 】



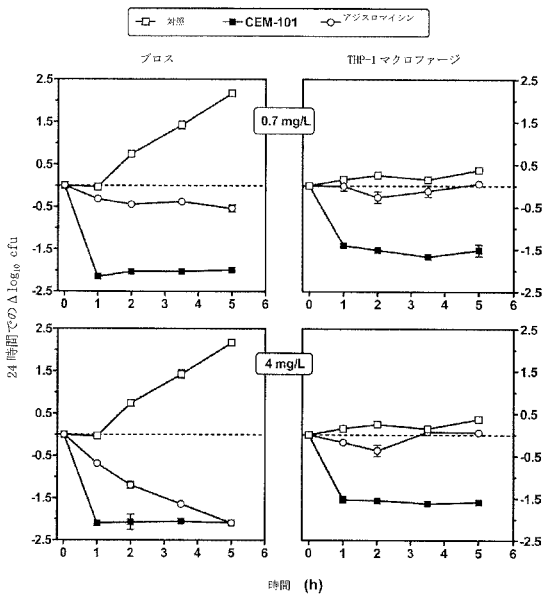
【 図 3 】



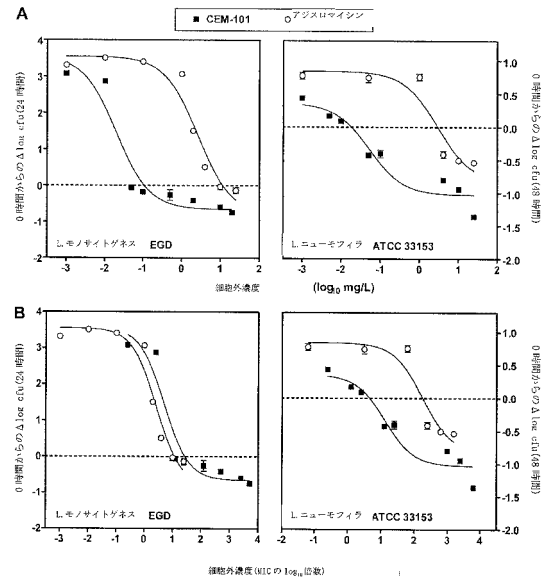
【 図 4 】



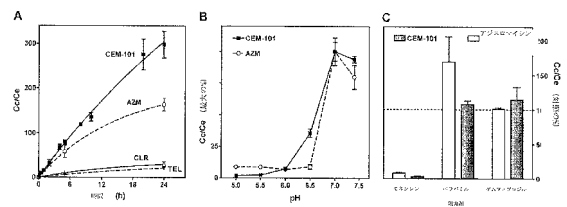
【 図 5 】



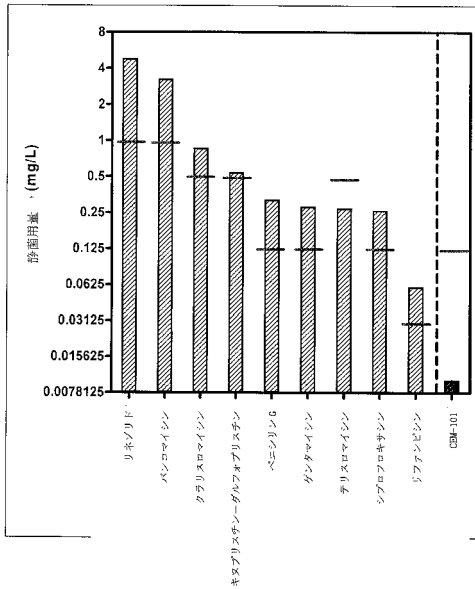
【 図 6 】



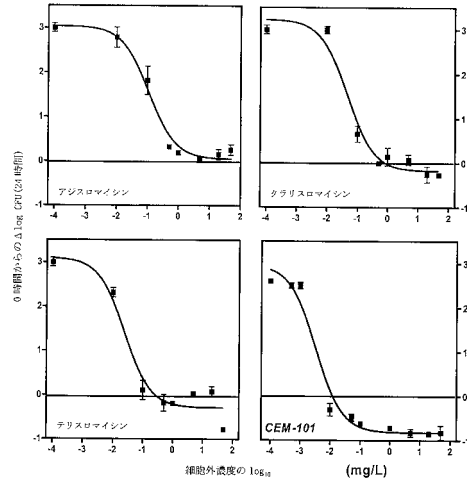
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年9月19日 (2014.9.19)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

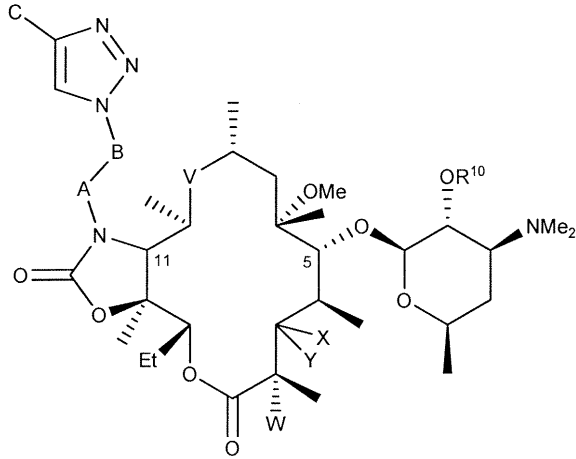
【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

肺炎型野兔病、レジオネラ症、類鼻疽、吸入炭疽、新型肺炎、およびそれらの組合せからなる群から選択される肺炎を治療するための医薬組成物であって、前記組成物は (a) 治療有効量の以下の 1 以上の化合物または薬学的に許容される塩を含み、ここで

【化 1】



R¹⁰ は水素またはアシルであり、

X は H であり、Y は OR⁷ であって R⁷ はクラジノシル基であり、または X および Y は共に付加された炭素と一緒になってカルボニル基を形成し、

V は、C(O) であり、

W は H または F であり、

A は、CH₂、C(O)、C(O)O、C(O)NH、S(O)₂、S(O)₂NH、C(O)NHS(O)₂ であり；

B は、n が 0 ~ 10 の整数である (CH₂)_n であるか、または B は、炭素数 2 ~ 10 の不飽和炭素鎖であり；かつ

C は、水素、ヒドロキシ、アルキル、アラルキル、アルキルアリール、アルコキシ、ヘテロアルキル、任意に置換されたアリール、任意に置換されたヘテロアリール、アミノアリール、アルキルアミノアリール、アシル、アシルオキシ、スルホニル、ウレイド、またはカルバモイルであり、さらに、

(b) 任意に薬学的に許容される 1 以上の担体、希釈液、およびそれらの賦形剤、およびそれらの組合せを含む医薬組成物。

【請求項 2】

R⁷ はクラジノシル基である請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

W が H である請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

W が F である請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

X および Y は共に付加された炭素と一緒になってカルボニル基を形成する請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

R¹⁰ が水素である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

A が CH₂ である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

B が (CH₂)_n であり、n が 1 ~ 5 の整数である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

n が 2 ~ 4 の整数である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

n が 3 である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

A および B は一緒にプロピレン、ブチレンまたはペンチレンを形成する請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 2】

A および B は一緒にブチレンを形成する請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

C が任意にアリールに置換しまたは任意にヘテロアリールに置換している請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

C が任意にフェニルに置換している請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

C がフェニル、ハロフェニル、ハロアルキルフェニル、またはアミノフェニルである請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

C が 3-アミノフェニルである請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

C が任意にベンゾトリアゾールに置換している請求項 1 3 に記載の組成物。

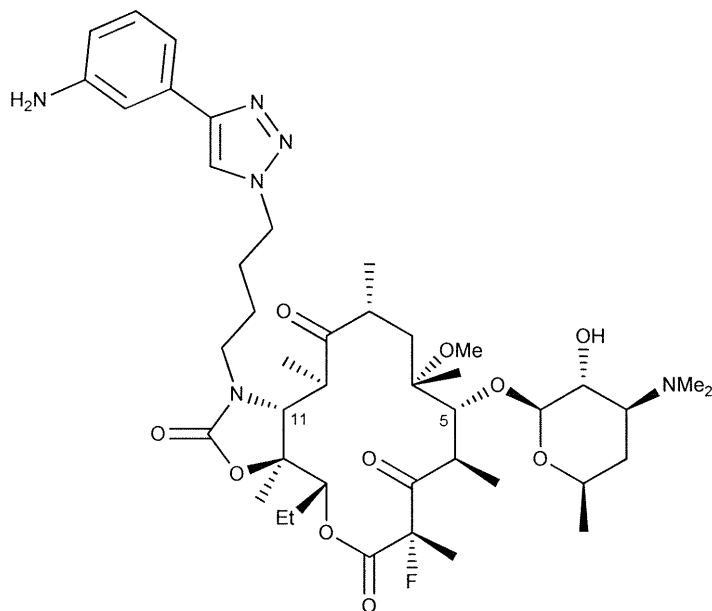
【請求項 1 8】

C がベンゾトリアゾールメチルである請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記化合物が以下の式である請求項 1 の組成物またはその薬学的に許容される塩。

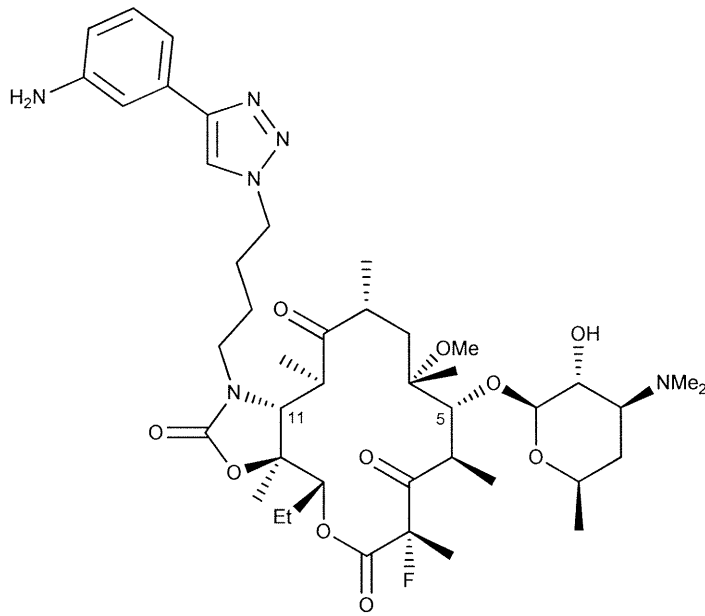
【化 2】



【請求項 2 0】

前記化合物が以下の式である請求項 1 の組成物。

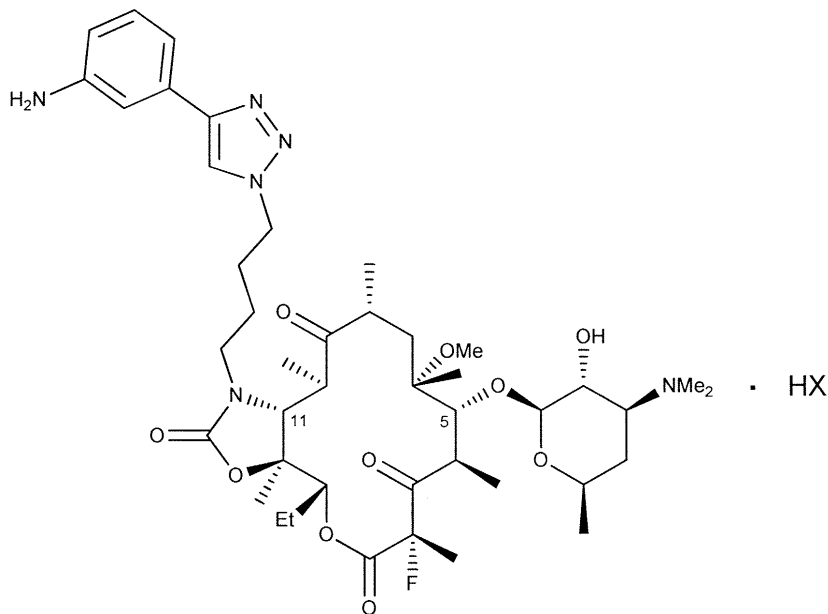
【化 3】



【請求項 2 1】

前記化合物が以下の式であり、H X が薬学的に許容される塩形成酸である請求項 1 の組成物。

【化 4】



【請求項 2 2】

H X が塩酸、酒石酸、およびそれらの組合せからなる群から選択される請求項 2 1 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

急性被曝治療用の請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 4】

被曝前予防治療用の請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

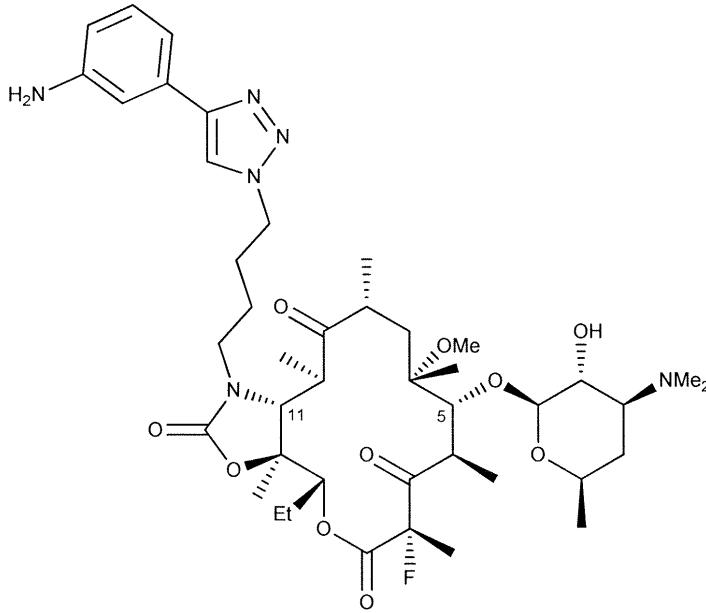
【請求項 2 5】

肺炎型野兔病、レジオネラ症、類鼻疽、吸入炭疽、新型肺炎、およびそれらの組合せからなる群から選択される肺炎の治療用医薬の製造における、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項の治療有効量組成物の使用。

【請求項 2 6】

200 mg ~ 400 mg の以下の式の化合物またはそれらの薬学的に許容される塩の単回または分割の単位服用量または単位剤形。

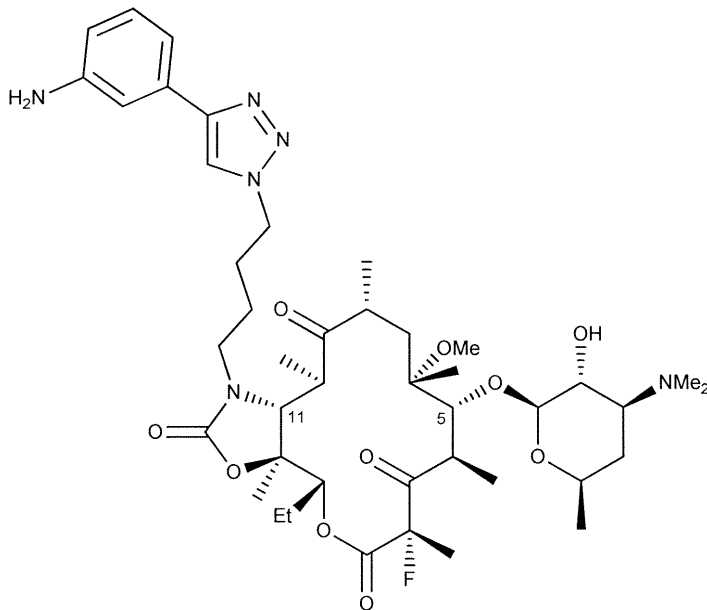
【化 5】



【請求項 2 7】

前記化合物が以下の式である請求項 2 6 に記載の単位服用量または単位剤形。

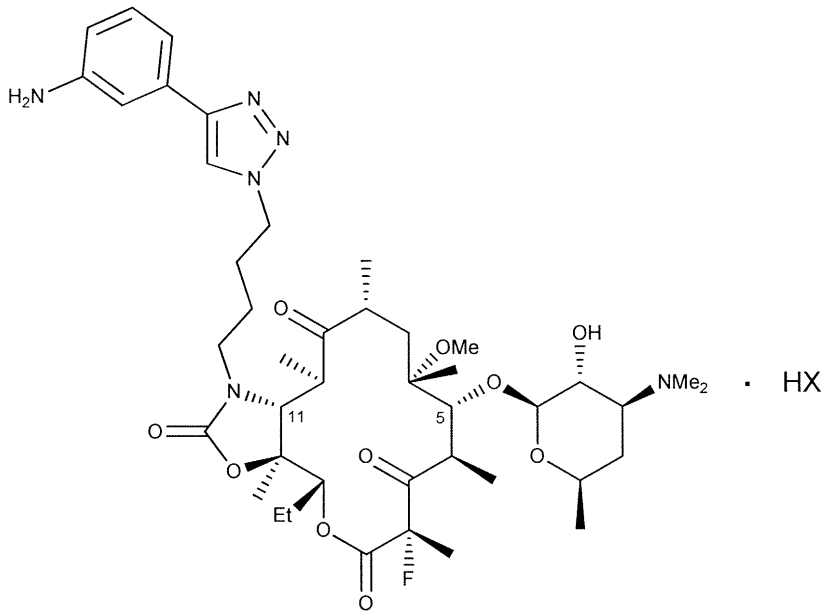
【化 6】



【請求項 2 8】

前記化合物が以下の式であり、HX が薬学的に許容される塩形成酸である請求項 2 6 に記載の単位服用量または単位剤形。

【化 7】



【請求項 29】

H X が塩酸、酒石酸、およびそれらの組合せからなる群から選択される請求項 28 に記載の単位服用量または単位剤形。

—

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/162,109
(32)優先日 平成21年3月20日(2009.3.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/108,112
(32)優先日 平成20年10月24日(2008.10.24)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/108,134
(32)優先日 平成20年10月24日(2008.10.24)
(33)優先権主張国 米国(US)