

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-510717

(P2014-510717A)

(43) 公表日 平成26年5月1日(2014.5.1)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A 61 K 31/40</b> (2006.01)	A 61 K 31/40	Z N A 4 B 0 5 0
<b>C 12 N 9/22</b> (2006.01)	C 12 N 9/22	4 B 0 6 3
<b>C 12 N 9/99</b> (2006.01)	C 12 N 9/99	4 C 0 6 9
<b>C 12 Q 1/44</b> (2006.01)	C 12 Q 1/44	4 C 0 8 6
<b>C 12 Q 1/68</b> (2006.01)	C 12 Q 1/68	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-551321 (P2013-551321)	(71) 出願人 507245021 ユニバーシティ オブ ロチェスター アメリカ合衆国 ニューヨーク 14644 2, ロチェスター, エルムウッド ア ベニュー 601, ボックス オーティ ーティー
(86) (22) 出願日	平成24年1月26日 (2012.1.26)	(71) 出願人 508221224 ボード オブ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ネブラスカ アメリカ合衆国, ネブラスカ州 6858 3-0745, リンカーン, ホールドレッジ ストリート 3835, ヴァーナー ホール
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月6日 (2013.9.6)	
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/022662	
(87) 國際公開番号	W02012/103295	
(87) 國際公開日	平成24年8月2日 (2012.8.2)	
(31) 優先権主張番号	61/436,342	
(32) 優先日	平成23年1月26日 (2011.1.26)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小分子R N a s e 阻害剤および使用方法

## (57) 【要約】

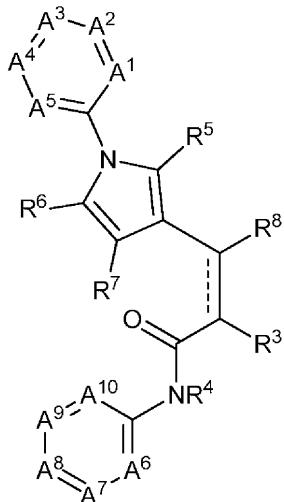
細菌リボヌクレアーゼ（例えば、R n p A）の小分子阻害剤、ならびにそれらの合成および使用のための方法が本明細書で記載される。該化合物を使用する方法には、微生物感染の治療および予防ならびに細菌リボヌクレアーゼの阻害が含まれる。また、微生物感染の治療または予防のための化合物を特定する方法も本明細書で記載される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象の微生物感染を治療または予防する方法であって、有効量の下記構造

## 【化1】



10

20

のRNase阻害剤、またはその薬学的に許容可能な塩もしくはプロドラッグを対象に投与する段階を含む、方法：

式中、

## 【化2】

-----

は、単結合または二重結合であり；

A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、およびA<sup>5</sup>は、NまたはCR<sup>1</sup>からそれぞれ独立に選択され；

A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、およびA<sup>10</sup>は、NまたはCR<sup>2</sup>からそれぞれ独立に選択され；

各R<sup>1</sup>、各R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシル、置換もしくは未置換アリールオキシル、または置換もしくは未置換カルボキシルから独立に選択され；かつ

R<sup>4</sup>は、水素、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、または置換もしくは未置換ヘテロアルキルであり、

R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、任意選択で、結合して置換もしくは未置換アリールまたは置換もしくは未置換ヘテロアリールを形成してもよい。

30

## 【請求項2】

前記微生物感染が細菌感染である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

前記細菌感染がグラム陽性細菌感染である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

前記細菌感染がブドウ球菌感染である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項5】

前記細菌感染が黄色ブドウ球菌感染である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項6】

40

50

前記黄色ブドウ球菌感染が薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染である、請求項 5 に記載の方法。  
。

**【請求項 7】**

前記黄色ブドウ球菌感染がバイオフィルム関連黄色ブドウ球菌感染である、請求項 5 に記載の方法。

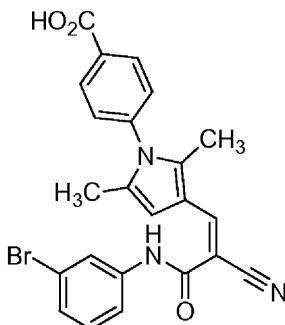
**【請求項 8】**

前記 R N a s e 阻害剤が R n p A 阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記 R N a s e 阻害剤が

**【化 3】**



10

である、請求項 1 に記載の方法。

20

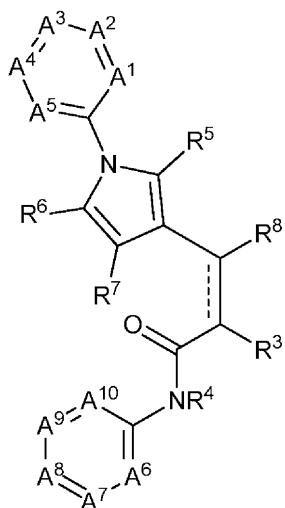
**【請求項 10】**

抗菌化合物である第 2 の化合物を投与する段階をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

細菌リボヌクレアーゼを阻害する方法であって、細菌リボヌクレアーゼを有効量の下記構造

**【化 4】**



30

40

の R N a s e 阻害剤またはその薬学的に許容可能な塩もしくはプロドラッグと接触させる段階を含む、方法：

式中、

**【化 5】**

-----

は、単結合または二重結合であり；

A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、および A<sup>5</sup> は、N または C R<sup>1</sup> からそれぞれ独立に選択され；

50

$A^6$ 、 $A^7$ 、 $A^8$ 、 $A^9$ 、および $A^{10}$ は、NまたはCR<sup>2</sup>からそれぞれ独立に選択され；

各R<sup>1</sup>、各R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシル、置換もしくは未置換アリールオキシル、または置換もしくは未置換カルボキシルから独立に選択され；かつ

R<sup>4</sup>は、水素、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、または置換もしくは未置換ヘテロアルキニルであり、

R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、任意選択で、結合して置換もしくは未置換アリールまたは置換もしくは未置換ヘテロアリールを形成してもよい。

【請求項12】

前記細菌リボヌクレアーゼが黄色ブドウ球菌RNase Pである、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記細菌リボヌクレアーゼが黄色ブドウ球菌RNase PがRnpAである、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記接触させる段階がインビボで行われる、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

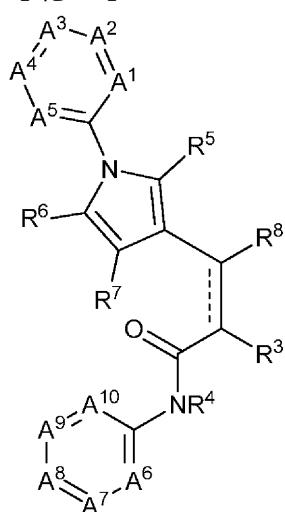
【請求項15】

前記接触させる段階がインビトロで行われる、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

下記構造

【化6】



の化合物またはその薬学的に許容可能な塩もしくはプロドラッグ：

式中、

【化7】

=====

は、単結合または二重結合であり；

$A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 、および $A^5$ は、NまたはCR<sup>1</sup>からそれぞれ独立に選

10

20

30

40

50

択され；

$A^6$ 、 $A^7$ 、 $A^8$ 、 $A^9$ 、および $A^{10}$ は、NまたはCR<sup>2</sup>からそれぞれ独立に選択され；

各R<sup>1</sup>、各R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシル、置換もしくは未置換アリールオキシル、または置換もしくは未置換カルボキシルから独立に選択され；かつ

R<sup>4</sup>は、水素、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、または置換もしくは未置換ヘテロアルキルであり、

R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、任意選択で、結合して置換もしくは未置換アリールまたは置換もしくは未置換ヘテロアリールを形成してもよく；かつ

#### 【化7】

---

が二重結合であり、 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^4$ 、 $A^5$ 、 $A^6$ 、 $A^7$ 、 $A^8$ 、および $A^{10}$ がCHであり、 $A^3$ が-CCO<sub>2</sub>Hであり、R<sup>4</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>がそれぞれ水素であり、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>がメチルであり、かつR<sup>3</sup>がシアノである場合、A<sup>9</sup>は、-CBrではない。

#### 【請求項17】

請求項16に記載の化合物の1つまたは複数および薬学的に許容可能なキャリアを含む、組成物。

#### 【請求項18】

微生物感染の治療または予防のための化合物を特定する方法であって、

a) RNA、RnpA、および蛍光染料を混合して混合物を形成する工程；

b) 該混合物を化合物と接触させる工程；ならびに

c) 蛍光を使って、細胞におけるRnpA媒介全細菌RNA分解をモニタリングする工程であって、対照に比べて減少した蛍光がRNA分解を示す、工程

を含み、

対照に比べて、RnpA媒介全細菌RNA分解を減らす化合物が、該微生物感染の治療または予防のための化合物として特定される、方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

優先権主張出願への相互参照

本出願は、2011年1月26日出願の米国特許仮出願第61/436,342号の優先権を主張する。この特許は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0002】

技術分野

本明細書で開示される内容は、一般的には、細菌リボヌクレアーゼ(RNase)の小分子阻害剤およびそれらの調製方法に関する。また、本明細書記載の内容は、一般的には、微生物感染の治療および予防のための本明細書記載の小分子阻害剤の使用方法に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)感染は、高い罹患率および死亡率を伴う場合が多い(Shorr et al., Crit Care Med, 34: 2588 - 2595 (2006) (非特許文献1)、を参照)。実際、報告に

よれば、米国では、2005年、その生物体がHIV/AIDSより多くの死亡の原因であったと推定されている(Bancroft, E.A., Jama, 298:1803-1804(2007)(非特許文献2); Kleevens et al., Jama, 298:1763-1771(2007)(非特許文献3)、参照)。パンコマイシン耐性、メチシリン耐性、多剤耐性、および強毒性株の出現が、新規抗生物質の必要性をさらに高めた(Appelbaum, P.C., Int J Antimicrob Agents, 30:398-408(2007)(非特許文献4); Zetola et al., Lancet Infect Dis, 5:275-286(2005)(非特許文献5)を参照)。細菌RNAの処理および分解は、抗菌剤発見に活用可能な必須細胞プロセスである。

10

## 【0004】

細菌RNA分解に関する理解の多くは、大腸菌(*Escherichia coli*)の調査から得られており、バルクmRNAの崩壊は、ホロ酵素複合体(RNAデグラドソーム)により触媒されると考えられている。この複合体は、少なくとも4つのサブユニット:RNase E(rne)、RNAヘリカーゼ(rhlB)、エノラーゼ(enol)、およびPNPase(pnpA)から構成される(Carpousis, A.J., Ann Rev Microbiol, 61:71-87(2007)(非特許文献6)、を参照)。RNase Eは、必要不可欠なリボヌクレアーゼであり、デグラドソーム複合体の主要成分である。それは、RNAデグラドソームの他のメンバーの構築のための足場として機能し、基質分解の間の初期のエンドリボヌクレアーゼを使ったイベントを触媒する(Mackie, G.A., Nature, 395:720-723(1998)(非特許文献7); Vanzo et al., Genes Dev, 12:2770-2781(1998)(非特許文献8)を参照)。その本性に基づいて、RNase Eは、抗生物質薬剤発見の適切な標的であると考えられる。しかし、黄色ブドウ球菌、等の多くのグラム陽性菌は、RNase Eアミノ酸オーソログを欠いている(Condon, C., Microbiol Mol Biol Rev, 67:157-174(2003)(非特許文献9)、を参照)。結果として、それらの分解成分およびmRNA崩壊機序の理解はあまり進んでいない。

20

## 【0005】

最近の調査では、少なくとも2つのリボヌクレアーゼ:RNase J1およびRNase Yが、枯草菌、およびおそらく他のグラム陽性菌内のバルクmRNA分解に関与するであろうことが示唆されている。枯草菌リボヌクレアーゼ、J1は、5'エキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼ活性を有する二官能性リボヌクレアーゼであり、mRNA分解をインビトロで媒介する(Even et al., Nucleic Acids Res, 33:2141-2152(2005)(非特許文献10); Matthy et al., Cell, 129:681-692(2007)(非特許文献11)、を参照)。この酵素はまた、エノラーゼ(大腸菌RNAデグラドソームの成分)と相互作用することも見出されており、RNase J1枯渴枯草菌株は、mRNA崩壊の中等度の減少を示し、これが大腸菌RNase Eと機能的に等価である可能性があることを示唆している(非特許文献10; Commichau et al., Mol Cell Proteomics, 8:1350-1360(2009)(非特許文献12); Mader et al., Mol Microbiol, 70:183-196(2008)(非特許文献13)、を参照)。しかし、mRNA代謝回転は、RNase J1減少細胞中でも起こり、5'強力ヘアピン構造を含むRNA種が、酵素により効率的に分解されず、別の因子が枯草菌細胞のRNA分解に関与している可能性があることを示唆している(Yao et al., Rna, 15:2331-2339(2009)(非特許文献14)、を参照)。リボヌクレアーゼYは、最近特定されたエンドヌクレアーゼであり、表面上は、RNase J1に呼応して働き、バルクRNA崩壊を媒介できる。RNase Yは、高次二次構造を有するmRNA分子を切断でき、細胞内メッセンジャーRNA代謝回転に全体的影響を与える(Shahabadian et al., Embryo, 28:3523-

30

40

50

3533(2009)(非特許文献15)、を参照)。RNase J1およびRNase Yの両方とも、不可欠な酵素であり、その観点から、抗菌剤発見のための標的と見なすことができる(Kobayashi et al.、Proc Natl Acad Sci USA、100:4678-4683(2003)(非特許文献16)、を参照)。しかし、RNase J1、RNase Y、および/または以前に特徴付けられていないリボヌクレアーゼが、どのようにして、黄色ブドウ球菌内のmRNA崩壊を調節するかは、まだ明らかになっていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Shorr et al.、Crit Care Med、34:2588-2595(2006)

【非特許文献2】Bancroft、E.A.、Jama、298:1803-1804(2007)

【非特許文献3】Kleevens et al.、Jama、298:1763-1771(2007)

【非特許文献4】Appelbaum、P.C.、Int J Antimicrob Agents、30:398-408(2007)

【非特許文献5】Zetola et al.、Lancet Infect Dis、5:275-286(2005)

【非特許文献6】Car poussis、A.J.、Annu Rev Microbiol、61:71-87(2007)

【非特許文献7】Mackie、G.A.、Nature、395:720-723(1998)

【非特許文献8】Vanzo et al.、Genes Dev、12:2770-2781(1998)

【非特許文献9】Condron、C.、Microbiol Mol Biol Rev、67:157-174(2003)

【非特許文献10】Even et al.、Nucleic Acids Res、33:2141-2152(2005)

【非特許文献11】Mathy et al.、Cell、129:681-692(2007)

【非特許文献12】Comlichau et al.、Mol Cell Proteomics、8:1350-1360(2009)

【非特許文献13】Mader et al.、Mol Microbiol、70:183-196(2008)

【非特許文献14】Yao et al.、Rna、15:2331-2339(2009)

【非特許文献15】Shahbadian et al.、Embo J、28:3523-3533(2009)

【非特許文献16】Kobayashi et al.、Proc Natl Acad Sci USA、100:4678-4683(2003)

【発明の概要】

【0007】

例示され、幅広く記載されている開示材料、化合物、組成物、キット、および方法の目的の通りに、開示内容は、主組成物、前記組成物を製造する方法、および前記組成物を使う方法に関する。さらに具体的には、細菌リボヌクレアーゼ(RNase)の阻害剤として使用される化合物および組成物が本明細書で提供される。RNase阻害剤の1つの種類には、下記構造

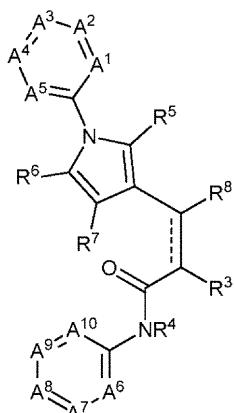
10

20

30

40

## 【化1】



10

の化合物、ならびにその薬学的に許容可能な塩およびプロドラッグが含まれる。これらの化合物において、

## 【化2】

20

は、単結合または二重結合であり；A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、およびA<sup>5</sup>は、NまたはCR<sup>1</sup>からそれぞれ独立に選択され；A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、およびA<sup>10</sup>は、NまたはCR<sup>2</sup>からそれぞれ独立に選択され；各R<sup>1</sup>、各R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシリル、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシリル、置換もしくは未置換アリールオキシリル、または置換もしくは未置換カルボキシリルから独立に選択され；かつR<sup>4</sup>は、水素、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、または置換もしくは未置換ヘテロアルキルである。R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、任意選択で、結合して置換もしくは未置換アリールまたは置換もしくは未置換ヘテロアリールを形成してもよい。この種類の化合物で、

30

## 【化3】

が二重結合であり、A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>4</sup>、A<sup>5</sup>、A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、およびA<sup>10</sup>がCHであり、A<sup>3</sup>が-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Hであり、R<sup>4</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>が、それぞれ水素であり、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>がメチルであり、かつR<sup>3</sup>がシアノである場合、A<sup>9</sup>は-CBrではない。

## 【0008】

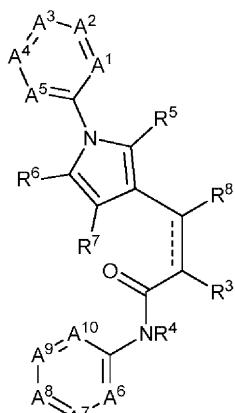
また、本明細書で提供されるのは、上述の化合物の1つまたは複数および薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物である。

## 【0009】

40

さらに、本明細書で提供されるのは、対象の微生物感染を治療または予防する方法である。一部の実施形態では、方法は、有効量の下記構造

## 【化4】



10

の RNase 阻害剤またはその薬学的に許容可能な塩もしくはプロドラッグを対象に投与する段階を含む。これらの化合物において、

## 【化5】

-----

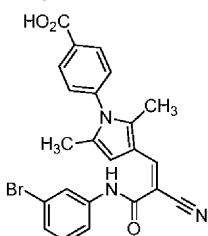
は、単結合または二重結合であり；A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、およびA<sup>5</sup>は、NまたはC R<sup>1</sup>からそれぞれ独立に選択され；A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、およびA<sup>10</sup>は、NまたはC R<sup>2</sup>からそれぞれ独立に選択され；各R<sup>1</sup>、各R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシル、置換もしくは未置換アリールオキシル、または置換もしくは未置換カルボキシルから独立に選択され；かつR<sup>4</sup>は、水素、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、または置換もしくは未置換ヘテロアルキニルである。R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、任意選択で、結合して置換もしくは未置換アリールまたは置換もしくは未置換ヘテロアリールを形成してもよい。一部の例では、RNase 阻害剤は、

20

30

30

## 【化6】



40

である。

## 【0010】

一部の実施形態では、微生物感染は、細菌感染である。細菌感染は、例えば、グラム陽性細菌感染であってもよい。任意選択で、細菌感染は、例えば、黄色ブドウ球菌感染、等のブドウ球菌感染である。黄色ブドウ球菌感染は、薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染またはバイオフィルム関連黄色ブドウ球菌感染であってもよい。一部の例では、RNase 阻害剤は、RnPA 阻害剤である。任意選択で、方法は、第2の化合物を対象に投与する段階をさらに含み、この場合、第2の化合物は、抗菌化合物である。

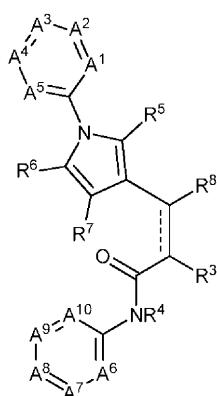
## 【0011】

また、本明細書で提供されるのは、細菌リボヌクレアーゼを阻害する方法であり、細菌リボヌクレアーゼに、有効量のRNase 阻害剤を接触させる段階を含む。一部の実施形

50

態では、RNase阻害剤は、下記構造

【化7】



10

の化合物またはその薬学的に許容可能な塩もしくはプロドラッグである。これらの化合物において、

【化8】

は、単結合または二重結合であり；A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、およびA<sup>5</sup>は、NまたはC  
R<sup>1</sup>からそれぞれ独立に選択され；A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、およびA<sup>10</sup>は、Nまたは  
C R<sup>2</sup>からそれぞれ独立に選択され；各R<sup>1</sup>、各R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、および  
R<sup>8</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、  
置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換  
アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置  
換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換  
ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシル、置換もしくは未置換アリールオキシ  
ル、または置換もしくは未置換カルボキシルから独立に選択され；かつR<sup>4</sup>は、水素、置  
換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アル  
ケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、または  
置換もしくは未置換ヘテロアルキルである。R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、任意選択で、結合して  
置換もしくは未置換アリールまたは置換もしくは未置換ヘテロアリールを形成してもよい  
。

20

30

40

【0012】

任意選択で、細菌リボヌクレアーゼは黄色ブドウ球菌RNase P（例えば、RnpA）の、タンパク質成分であってもよい。接触させる段階は、例えば、インビボまたはインビトロで行われてもよい。

【0013】

本明細書でさらに提供されるのは、微生物感染の治療または予防のための化合物を特定する方法である。方法は、RNA、RnpA、および蛍光染料を混合して混合物を形成する工程；該混合物を化合物と接触させる工程；ならびに蛍光を使って、細胞におけるRnpA媒介全細菌RNA分解をモニタリングする工程を含み、ここで、対照に比べて減少した蛍光が、RNA分解を示す。この方法では、対照に比べて、RnpA媒介全細菌RNA分解を減らす化合物が、微生物感染の治療または予防のための化合物として特定される。

50

【0014】

追加の利点は、以下で説明され、その記載により明らかとなろう。あるいは、以下に記載の態様の実施により理解されよう。下記の利点は、特に、添付の特許請求の範囲で示される要素および組み合わせの手段により実現され、達成されるであろう。前出の一般的説明および以下の詳細説明の両方は、代表としての例示のみの目的であり、限定するものではないことは理解されよう。

【図面の簡単な説明】

## 【0015】

【図1】対数期および／または定常期増殖（X-軸）の間の、2.5、5、15、30分以下、または30分を超える半減期を有する検出可能なmRNA種の割合（Y-軸）を示すグラフである。

【図2】黄色ブドウ球菌RnPAがrRNAおよびmRNA消化を触媒することを示す。パネルAは、精製された組換え黄色ブドウ球菌RnPAのSDS-PAGEであり；示されているのは、分子マーカー（レーンM）、2.5μgおよび25μg溶出産物（それぞれレーン1および2）である。パネルBは、1X反応緩衝液（2mM NaCl、2mM

MgCl<sub>2</sub>、50mMトリス塩酸、pH 6.0）中の50pmolの各推定上のリボヌクレアーゼ（示されている）の非存在（-）または存在（+）下における60分インキュベーション後の1μgの全黄色ブドウ球菌RNAのゲル移動を示す。パネルCは、1X反応緩衝液中の示した量のRnPAタンパク質の非存在（0 pmol）または存在下で60分のインキュベーション後に、インビトロで転写された0.5pmol spa mRNAの移動を示す。分子量マーカー（M）が示されている。パネルDは、50pmol RnPAまたはRNase J1の非存在（-）もしくは存在（+）下で、および非存在（血清単独）または1、2.5、5、10、もしくは20μg RnPAポリクローナル抗体の存在下の、2μgのインビトロ転写spa mRNAの逆転写媒介PCR産物を示す。パネルEは、転写後0分（X-軸）および10分（Y-軸）停止時のGeneChip上で測定された全mRNA種に対する測定値のプロットを示す。灰色点線は、各試料に対する感度の下限値を示す。

【図3】パネルAは、代表的な選別操作の結果を示す。パネルBは、20pmol RnPAの非存在（-）または存在（+）下の分子量マーカー、spa mRNAのゲル移動、およびRNPA1000の濃度を増加させた場合のRnPA媒介spa mRNA分解を示すアガロースゲルベースアッセイである。パネルCは、RnPA阻害分子RNPA1000の構造を示す。

【図4】パネルAは、化合物溶媒（DMSO；陰性対照）、マイトイシンC（陽性対照）、および表示量のRNPA1000に曝されたHePG2細胞のMTT細胞傷害性アッセイ結果を示す。パネルBは、処理なし（中実菱形；陰性対照）、バンコマイシン処理（中実正方形；1mg/kg；陽性対照）、またはRNPA1000処理；64mg/kg（中空丸）；128mg/kg（中空正方形）、256mg/kg（中空三角形）後の、毎日（X-軸）の生存動物の平均パーセント（Y-軸）を示す。パネルCは、抗菌処理なし（未処理；UT）、またはRNPA1000のMICの5、10、もしくは20倍への暴露の1、2、または3日後の、カテーテル関連黄色ブドウ球菌の数を示す。ボックスは、25と75パーセントの間の区間を規定する。上方に伸びるバーは、75パーセントよりも1.5倍高い値で規定される境界を示し、一方、下向きに伸びるバーは、25パーセントより1.5倍低い値により規定される境界を示す。中実円は、これら2つの極値を外れる個別の値を示す。

【図5】転写後0および5分の停止時のGeneChip検出全転写物レベルのプロットを示す。灰色点線は、各試料に対する感度の下限値を示す。パネルAは、DMSO処置細胞のmRNAレベルの比較（左パネル）、およびRnPA阻害剤の阻害濃度以下の濃度で刺激された細胞のmRNAレベルの比較（右パネル）を示す。パネルBは、2.5μMのCdCl<sub>2</sub>の存在下で増殖させた場合の、黄色ブドウ球菌RN4220 pRNPA-A.S.（RnPA枯渇細胞；上段パネル）、RN4220 pRNPA（RnPA過剰発現細胞；中段パネル）およびRN4220 pCN51（ベクター；下段パネル）に対する表示濃度のRNPA1000（最上部）のインビトロ抗菌効果を示すマイクロタイヤープレートアッセイである。全株は、2回評価した。矢印はMIC値を示す。

【図6】パネルAは、10μMのCdCl<sub>2</sub>の存在下で増殖させた場合の、ベクター（pCN51；菱形）、rnpAセンスRNA（pRNPA-S；三角形）およびrnpAアンチセンスRNA（pRNPA-A.S.；正方形）含有黄色ブドウ球菌株RN4220の増殖特性（光学密度；Y-軸）のプロットを示す。パネルBは、2.5μMのCdCl<sub>10</sub>

10

20

30

40

50

<sub>2</sub> の存在下で増殖させた黄色ブドウ球菌株 R N 4 2 2 0 p C N 5 1 (ベクター)、R N 4 2 2 0 p R N P A (過剰発現体)、および R N 4 2 2 0 p R N P A - A . S . (R n p A 枯渇) 細胞のウェスタンプロッティング結果を示す。

【図 7】黄色ブドウ球菌時間 - 殺菌アッセイ結果を示す。パネル A は、M I C の 0 . 2 5 、 0 . 5 、 1 、 2 、 または 4 倍の R N P A 1 0 0 0 で処理した黄色ブドウ球菌株 U A M S - 1 細胞の中間対数期を示す。プロットは、試験各薬剤濃度に対し R N P A 1 0 0 0 添加後 0 、 2 、 4 、 8 、 および 24 時間の平均 c f u / m l (n = 3) である。標準偏差も示した。パネル B は、中間対数期細胞のオキサシリン処理 (M I C の 0 . 2 5 、 0 . 5 、 2 、 または 4 倍 ; n = 3) 後 2 、 4 、 8 、 および 24 時間の平均 c f u / m l を示す。パネル C は、中間対数期細胞が、M I C の 0 . 5 倍の R N P A 1 0 0 0 、オキサシリン、または両方 (R N P A 1 0 0 0 とオキサシリン) で処理されたことを示す。処理後 2 、 4 、 8 、 および 24 時間 (n = 3) の中間対数期の平均 c f u / m l を示す。標準偏差も示した。

【図 8】デフォルトパラメータの G r a m A l i g n を使った、R n p A アミノ酸配列の整列化を示す表である。保存アミノ酸は、ボックスで囲っている。黄色ブドウ球菌の配列は、配列番号 1 ; 表皮ブドウ球菌 (S . e p i d e r m i d i s ) は配列番号 2 ; 肺炎球菌 (S . p n e u m o n i a ) は配列番号 3 ; 化膿性連鎖球菌 (S . p y o g e n e s ) は配列番号 4 ; フエカリス菌 (E . f a e c a l i s ) は配列番号 5 ; 大腸菌は配列番号 6 ; およびアシネットバクター・バウマンニ (A . b a u m a n n i i ) は配列番号 7 である。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0 0 1 6】

###### 発明の詳細な説明

本明細書で提供されるのは、リボヌクレアーゼ (R N a s e ) 活性関連細菌性 R n p A の小分子阻害剤、それらの調製方法、および微生物感染の治療および予防における使用方法である。小分子阻害剤は、r R N A および m R N A の消化を触媒する不可欠のタンパク質、R n p A 、を含む黄色ブドウ球菌、等の微生物感染治療の新規機序を開拓する。この機序は、今まで、既知でなく、または開発されていなかった。この活性の開拓にあたり、高スループットで二次的な選別アッセイを採用し、R n p A 媒介 R N A 分解の小分子阻害剤の特定を行った。これらの薬剤は、細胞性 m R N A 分解を制限し、いくつかの微生物に対する抗菌活性を示した。これらの微生物には、米国中に出回っている主なメチシリノ耐性黄色ブドウ球菌 (M R S A ) 系統、バンコマイシン中程度感受性黄色ブドウ球菌 (V I S A ) 、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (V R S A ) および高 R n p A アミノ酸保存の他のグラム陽性細菌病原体が含まれる (Mc D o u g a l e t a l . 、 J C l i n M i c r o b i o l 、 4 1 : 5 1 1 3 - 5 1 2 0 (2 0 0 3 ) 、を参照)。本明細書で提供されるように、R n p A 阻害剤は、全身性マウス感染モデルでの疾患を制限し、バイオフィルム関連黄色ブドウ球菌に対し抗菌活性がある。まとめると、これらの知見は、R n p A が黄色ブドウ球菌の R N A 分解で重要な役割を果たすことを示し、高スループット選別を使って m R N A 代謝回転阻害剤を特定できることを立証し、R N A 異化反応に基づく抗菌療法の原理に対する証明を与える。

##### 【0 0 1 7】

本明細書記載の材料、化合物、組成物、製品、および方法は、開示内容およびその中の実施例の下記の特定の態様の詳細説明を参照することにより、容易に理解されよう。

##### 【0 0 1 8】

本材料、化合物、組成物、キット、および方法が開示および記載される前に、以下に記載の態様は、当然変わってもよいので、特定の合成方法または特定の試薬に限定されることは理解されよう。また、本明細書で使用される用語は、特定の態様のみの説明の目的のためであり、限定する意図はないことも理解されよう。

##### 【0 0 1 9】

また、この明細書の全体を通して、種々の出版物が引用される。これらの出版物の開示

10

20

30

40

50

は、その全体が、開示内容が関係する最先端技術をより完全に説明するために、参照によって本出願に組み込まれる。開示された文献は、また、文中で考察されるその文献の内容のために、個別に、具体的に参照によって本明細書に組み込まれる。

#### 【0020】

##### 一般的定義

本明細書および添付の特許請求の範囲では、多くの用語に言及されるが、これらは、下記の意味を持つものとする：

#### 【0021】

本明細書の説明および添付の特許請求の範囲の全体にわたり、単語「含む (comprise)」および単語の他の形、例えば、「含む (comprising)」および「含む (comprises)」は、限定されないが、含む (including) を意味し、例えば、他の添加物、成分、整数、または工程、を排除する意図はない。10

#### 【0022】

この説明および添付の特許請求の範囲で使われるよう、単数形「1つの」、「ある」、および「その」は、文意が明確に別義を示さない限り、複数の対象を含む。従って、例えば、「組成物 (a composition)」への言及は、2つ以上のこのような組成物の混合物を含み、「化合物 (the compound)」への言及は、2つ以上のこのような組成物の混合物を含む、等。

#### 【0023】

「任意選択の (Optional)」または「任意選択で (optionally)」20は、その後に続くイベントまたは状況が起こっても起らなくてもよく、また、その説明がイベントまたは状況が起こる場合、および起こらない場合を含むことを意味する。

#### 【0024】

本明細書では、範囲は、「約」1つの特定の値から、および／または「約」別の特定の値までのように表現できる。このような範囲が表される場合、別の態様は、1つの特定の値から、および／またはもう一つの特定の値まで含む。同様に、値が近似値として、先行詞「約」によって表される場合は、特定の値は、別の態様を形成すると理解されるであろう。それぞれの範囲の終点は、他方の終点に関連して、および、他方の終点とは無関係に、意味があることもさらに理解されよう。本明細書でいくつかの値が開示され、それぞれの値は、また、本明細書では、値それ自体に加えて、「約」その特定の値としても開示されることも理解されよう。例えば、値「10」が開示される場合、「約10」もまた開示される。値が開示されると、「以下の (less than or equal to)」値、「以上の値 (greater than or equal to the value)」、および値の間の可能な範囲もまた、当業者には適切に理解されるように、開示されることも理解されよう。例えば、値「10」が開示される場合、「10以下」ならびに「10以上」もまた、開示される。出願全体を通じ、データがいくつかの異なるフォーマットで提供され、このデータが終点および始点ならびにデータポイントの任意の組み合わせの範囲を表すことも理解されよう。例えば、特定のデータポイント「10」および特定のデータポイント「15」が開示される場合、10と15より大きい、以上、未満、以下およびこれらに等しい、ならびに10および15の間、が開示されていると見なされることが理解されよう。また、2つの特定のユニットの間のそれぞれのユニットも開示されていると理解されよう。例えば、10と15が開示される場合、11、12、13、および14も開示される。3040

#### 【0025】

本明細書で使われる「対象」は、個体を意味する。従って、「対象」は、家畜化動物（例えば、ネコ、イヌ、等）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、等）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、等）、および鳥類、を含むことができる。対象は、また、哺乳動物、例えば、靈長類またはヒトを含むことができる。

#### 【0026】

「減らす (reduce)」またはこの語の他の形、例えば、「減少 (reduction)

50

g )」または「減少 (reduction)」は、イベントまたは特性（例えば、細菌感染）を低下させることを意味する。典型的な例では、いくつかの標準的または予測値に対するものであり、換言すれば、相対的であるが、必ずしもいつも参照される標準的な値または比較する値が必要ではないことは理解されよう。例えば、「細菌感染を減らす」は、標準または対照に比べて細菌感染の蔓延を減らすことを意味する。

#### 【0027】

「防ぐ (prevent)」またはこの語の他の形、例えば、「予防 (preventing)」または「予防 (prevention)」は、特定のイベントまたは特性を停止させ、特定のイベントまたは特性の発生または進行を固定または遅らせること、または特定のイベントまたは特性が発生する機会を最小化することを意味する。例えば、減らす (reduce) より絶対的であるので、典型的な例では、防ぐ (prevent) は、対照に対する比較を必要としない。本明細書で使用されるように、減らすことはできるが防止できないものもあれば、減らすことができ、さらに防止も可能なものもある。同様に、あるものは防止できるが減らすことができないが、あるものは防止され、さらに減らすこととも可能である。減らすまたは防ぐが使用される場合は、特に別義が指定されない限り、もう一方の語の使用も明示的に開示されることは理解されよう。

10

#### 【0028】

「治療 (treat)」またはこの語の他の形、例えば、「治療された (treated)」または「治療 (treatment)」は、特定の特性またはイベント（例えば、細菌感染）を減らす、防ぐ、抑制する、または取り除くために、組成物を投与すること、またはある方法を実行することを意味する。用語「制御する (control)」は、用語「治療 (treat)」と同義に使用される。

20

#### 【0029】

「抗菌」は、任意の濃度で微生物の増殖を治療または制御する（例えば、減らす、防ぐ、抑制する、または除く）能力を意味する。同様に、用語「抗菌性」は、任意の濃度で細胞性細菌増殖を治療または制御する能力を意味する。

30

#### 【0030】

本明細書の全体を通して、識別子「第1の」および「第2の」は、開示内容の種々の要素および工程を区別するのを助けるためのみの目的で使用されることは理解されよう。識別子「第1の」および「第2の」が、これらの用語で修飾される要素または工程に対し、特定の順番、量、優先度、または重要性を意味することは、まったく意図されていない。

30

#### 【0031】

##### 化学上の定義

本明細書で使用される用語「置換」は、全ての許容される有機化合物の置換基を含むことが意図されている。広範な態様では、許容可能な置換基には、非環式および環式、分岐および非分岐、炭素環式およびヘテロ環式、ならびに芳香族および非芳香族有機化合物置換基が含まれる。置換基の例には、例えば、下記に記載のものが含まれる。許容可能な置換基は、適切な有機化合物の、1つまたは複数の置換基であっても、同じでまたは異なる置換基であってもよい。本開示の目的のためには、窒素、等のヘテロ原子は、水素置換基および／または本明細書記載のヘテロ原子の原子価に適合するいずれかの許容可能な有機化合物置換基を持つことができる。本開示は、どのような形であれ、許容可能な有機化合物置換基を制限する意図はない。また、用語「置換」または「で置換」は、このような置換は、置換原子および置換基の許容された原子価に一致し、また、置換は、安定な化合物を生じ、例えば、化合物は、例えば、転移、環化、離脱、等により自然に変換を受けないという暗黙の条件を含む。

40

#### 【0032】

「Z<sup>1</sup>」、「Z<sup>2</sup>」、「Z<sup>3</sup>」、および「Z<sup>4</sup>」は、本明細書で一般的記号として種々の特定の置換基を表すために使用される。これらの記号は、任意の置換基でよく、本明細書で開示のものに限定されない。また、それらが、1つの例で特定の置換基であると定義される場合は、それらは、別の例では、いくつかの他の置換基として定義できる。

50

## 【0033】

本明細書で使われる用語「脂肪族」は、非芳香族炭化水素基を意味し、分岐および非分岐、アルキル、アルケニル、またはアルキニル基を含む。

## 【0034】

本明細書で使われる用語「アルキル」は、1～24炭素原子の分岐または非分岐飽和炭化水素基、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、エイコシル、テトラコシル、等である。アルキル基は、また、置換されても未置換であってもよい。アルキル基は、限定されないが、下記に記載されるように、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルデヒド、アミノ、カルボン酸、エステル、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ケトン、ニトロ、シリル、スルフォオキソ、スルホニル、スルホン、スルフォキシド、またはチオール、を含む1つまたは複数の基で置換できる。  
10

## 【0035】

明細書全体を通して、「アルキル」は、一般的に、未置換アルキル基および置換アルキル基の両方を指すのに使われるが、本明細書では、置換アルキル基は、また、具体的に、アルキル基上の特定の置換基を特定することを意味する。例えば、用語「ハロゲン化アルキル」は、1つまたは複数のハロゲン化物、例えば、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素で置換されるアルキル基を具体的に指す。用語「アルコキシアルキル」は、以降で記載する1つまたは複数のアルコキシ基で置換されるアルキル基を具体的に指す。用語「アルキルアミノ」は、以降で記載する1つまたは複数のアミノ基で置換されるアルキル基を具体的に指す、等。「アルキル」が、1つの例で使われ、特定の用語、例えば、「アルキルアルコール」が別の例で使われる場合、用語「アルキル」が、特定の用語、例えば、「アルキルアルコール」、等もまた指さないことを暗示するようには意図されていない。  
20

## 【0036】

この手法は、本明細書記載の他の基にも使用される。すなわち、「シクロアルキル」等の用語は、未置換および置換シクロアルキル成分の両方を意味するが、置換成分は、さらに、本明細書で具体的に特定でき、例えば、特定の置換シクロアルキルは、例えば、「アルキルシクロアルキル」と呼ぶことができる。同様に、置換アルコキシは、具体的に、例えば、「ハロゲン化アルコキシ」と、また、特定の置換アルケニルは、例えば、「アルケニルアルコール」と呼ぶことができる、等。繰り返すが、一般用語、例えば、「シクロアルキル」および特定の用語、例えば、「アルキルシクロアルキル」を使う手法は、一般用語が、特定の用語もまた含まないことを暗示するようには意図されていない。  
30

## 【0037】

本明細書で使われる用語「アルコキシ」は、単一の、末端エーテル結合を介して結合したアルキル基であり、すなわち、「アルコキシ」基は、-OZ<sup>1</sup>として定義できる。ここでZ<sup>1</sup>は、上で定義のアルキルである。

## 【0038】

本明細書で使われる用語「アルケニル」は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む構造式を有する2～24炭素原子の炭化水素基である。非対称の構造、例えば、(Z<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>)C=C(Z<sup>3</sup>Z<sup>4</sup>)は、EおよびZ異性体の両方を含むことが意図されている。これは、非対称のアルケンが存在する本明細書の構造式で推定できるか、または明示的に結合記号C=Cにより示されうる。アルケニル基は、限定されないが、以降で記載のように、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルデヒド、アミノ、カルボン酸、エステル、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ケトン、ニトロ、シリル、スルフォオキソ、スルホニル、スルホン、スルフォキシド、またはチオール、を含む1つまたは複数の基で置換できる。  
40

## 【0039】

本明細書で使われる用語「アルキニル」は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含  
50

む構造式を有する 2 ~ 24 炭素原子の炭化水素基である。アルキニル基は、以降で記載のように、限定されないが、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルデヒド、アミノ、カルボン酸、エステル、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ケトン、ニトロ、シリル、スルフォオキソ、スルホニル、スルホン、スルフォキシド、またはチオール、を含む 1 つまたは複数の基で置換できる。

#### 【 0040 】

本明細書で使われる用語「アリール」は、限定されないが、ベンゼン、ナフタレン、フェニル、ビフェニル、フェノキシベンゼン、等のいずれかの炭素ベース芳香族基を含む基である。用語「ヘテロアリール」は、芳香族基の環中に組み込まれた少なくとも 1 つのヘテロ原子を有する芳香族基を含む基として定義される。ヘテロ原子の例には限定されないが、窒素、酸素、硫黄、およびリンが含まれる。用語「アリール」に包含される用語「非ヘテロアリール」は、ヘテロ原子を含まない芳香族基を含む基であると定義される。アリールまたはヘテロアリール基は、置換されていても未置換であってもよい。アリールまたはヘテロアリール基は、限定されないが、本明細書記載の、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルデヒド、アミノ、カルボン酸、エステル、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ケトン、ニトロ、シリル、スルフォオキソ、スルホニル、スルホン、スルフォキシド、またはチオール、を含む 1 つまたは複数の基で置換できる。用語「ビアリール」は、アリール基の特定のタイプで、アリール定義に含まれる。ビアリールは、ナフタレンの場合のように、縮合環構造を介して一緒に結合された、またはビフェニルの場合のように、1 つまたは複数の炭素 - 炭素結合を介して結合された 2 つのアリール基を意味する。

10

20

30

40

#### 【 0041 】

本明細書で使われる用語「シクロアルキル」は、少なくとも 3 つの炭素原子からなる非芳香族炭素ベース環である。シクロアルキル基の例には、限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシリル、等が含まれる。用語「ヘテロシクロアルキル」は、環の少なくとも 1 つの炭素原子が、ヘテロ原子、例えば、限定されないが、窒素、酸素、硫黄、またはリンで置換されている上記で定義のシクロアルキル基である。シクロアルキル基およびヘテロシクロアルキル基は、置換されていても未置換でもよい。シクロアルキル基およびヘテロシクロアルキル基は、限定されないが、本明細書記載のアルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルデヒド、アミノ、カルボン酸、エステル、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ケトン、ニトロ、シリル、スルフォオキソ、スルホニル、スルホン、スルフォキシド、またはチオールを含む 1 つまたは複数の基で置換できる。

#### 【 0042 】

本明細書で使われる用語「シクロアルケニル」は、少なくとも 3 つの炭素原子からなる非芳香族炭素ベース環であり、少なくとも 1 つの二重結合、すなわち、 $C = C$  を含む。シクロアルケニル基の例には、限定されないが、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニル、等が含まれる。用語「ヘテロシクロアルケニル」は、上記で定義のシクロアルケニル基の 1 つのタイプであり、環の少なくとも 1 つの炭素原子がヘテロ原子、例えば、限定されないが、窒素、酸素、硫黄、またはリンで置換される場合の、用語「シクロアルケニル」の意味に包含される。シクロアルケニル基およびヘテロシクロアルケニル基は、置換されていても未置換であってもよい。シクロアルケニル基およびヘテロシクロアルケニル基は、限定されないが、本明細書記載のアルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アルデヒド、アミノ、カルボン酸、エステル、エーテル、ハロゲン化物、ヒドロキシ、ケトン、ニトロ、シリル、スルフォオキソ、スルホニル、スルホン、スルフォキシド、またはチオール、を含む 1 つまたは複数の基で置換できる。

#### 【 0043 】

用語「環式基」は、本明細書では、アリール基、非アリール基（すなわち、シクロアル

50

キル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、およびヘテロシクロアルケニル基)、または両方を指すために使用される。環式基は、置換されていても未置換でもよい1つまたは複数の環系を有する。環式基は、1つまたは複数のアリール基、1つまたは複数の非アリール基、または1つまたは複数のアリール基と1つまたは複数の非アリール基を含むことができる。

## 【0044】

本明細書で使われる用語「アルデヒド」は、式：-C(=O)Hで表される。この明細書全体を通して、「C(=O)」または「CO」は、C=Oの略式表記である。

## 【0045】

本明細書で使われる用語「アミン」または「アミノ」は、式：-NZ<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>で表され、Z<sup>1</sup>およびZ<sup>2</sup>は、それぞれ、本明細書記載の置換基、例えば、上述の水素、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、またはヘテロシクロアルケニル基であってよい。

## 【0046】

本明細書で使われる用語「カルボン酸」は、式：-C(=O)OHで表される。本明細書で使われる「カルボキシラート」または「カルボキシル」基は、式：-C(=O)O-で表される。

## 【0047】

本明細書で使われる用語「エステル」は、式：-OC(=O)Z<sup>1</sup>または-C(=O)OZ<sup>1</sup>で表され、Z<sup>1</sup>は、上述のアルキル、ハロゲン化アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、またはヘテロシクロアルケニル基であってよい。

## 【0048】

本明細書で使われる用語「エーテル」は、式：A<sup>1</sup>OA<sup>2</sup>で表され、A<sup>1</sup>およびA<sup>2</sup>は、独立に、上述のアルキル、ハロゲン化アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、またはヘテロシクロアルケニル基であってよい。

## 【0049】

本明細書で使われる用語「ケトン」は、式：Z<sup>1</sup>C(=O)Z<sup>2</sup>で表され、Z<sup>1</sup>およびZ<sup>2</sup>は、独立に、上述のアルキル、ハロゲン化アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、またはヘテロシクロアルケニル基であってよい。

## 【0050】

本明細書で使われる用語「ハロゲン化物」または「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素、およびヨウ素を意味する。

## 【0051】

本明細書で使われる用語「ヒドロキシル」は、式：-OHで表される。

## 【0052】

本明細書で使われる用語「ニトロ」は、式：-NO<sub>2</sub>で表される。

## 【0053】

本明細書で使われる用語「シリル」は、式：-SiZ<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>Z<sup>3</sup>で表され、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、およびZ<sup>3</sup>は、独立に、上述の水素、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、またはヘテロシクロアルケニル基であってよい。

## 【0054】

用語「スルホニル」は、本明細書では、式：-S(O)<sub>2</sub>Z<sup>1</sup>で表されるスルフォオキソ基を意味し、Z<sup>1</sup>は、上述の水素、アルキル、ハロゲン化アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヘテロシクロアルキル、またはヘテロシクロアルケニル基であってよい。

10

20

30

40

50

## 【0055】

本明細書で使われる用語「スルホニルアミノ」または「スルホンアミド」は、式：-S(O)<sub>2</sub>NH-で表される。

## 【0056】

本明細書で使われる用語「チオール」は、式：-SHで表される。

## 【0057】

本明細書で使われる用語「チオ」は、式：-S-で表される。

## 【0058】

本明細書で使われる「R<sup>1</sup>」、「R<sup>2</sup>」、「R<sup>3</sup>」、「R<sup>n</sup>」、等（nはある整数）は、独立に、上に挙げた1つまたは複数の基を持つことができる。例えば、R<sup>1</sup>が直鎖アルキル基の場合、アルキル基の1つの水素原子は、任意選択で、ヒドロキシル基、アルコキシ基、アミン基、アルキル基、ハロゲン化物、等で置換できる。選択された基に応じて、第1の基は、第2の基中に組み込むことができ、または、代わりに、第1の基は、第2の基にぶら下げる（すなわち、結合しても）よい。例えば、語句「アミノ基を含むアルキル基」で、アミノ基は、アルキル基の骨格内に組み込むことができる。あるいは、アミノ基は、アルキル基の骨格に結合できる。選択された基の性質が、第1の基が第2の基に埋め込まれるか、または結合するかを決定するであろう。

10

## 【0059】

そうでないとの記述がない限り、化学結合が楔または点線としてではなく、実線のみとして示された式は、それぞれ、可能な異性体、例えば、それぞれ、鏡像異性体、ジアステレオマー、およびメソ化合物、ならびに異性体の混合物、例えば、ラセミまたはスケールミック混合物が意図されている。

20

## 【0060】

以降で、開示物質、化合物、組成物、製品、および方法の特定の態様に対し詳細な言及がなされ、それらの例が、付随する実施例中で説明される。

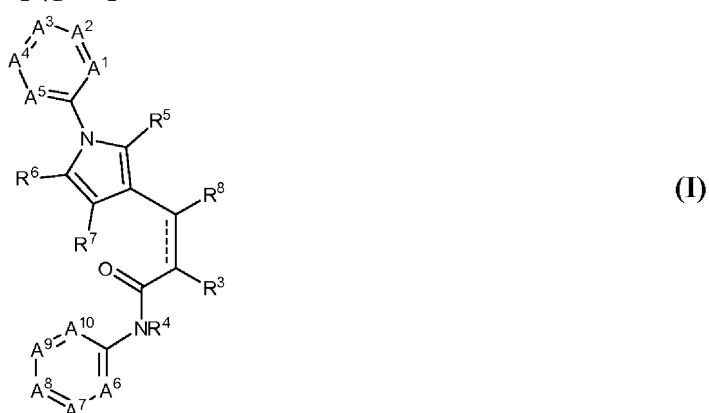
30

## 【0061】

## 化合物

本明細書記載の細菌リボヌクレアーゼ（RNase）の小分子阻害剤は、式I：

## 【化9】



40

で表される化合物ならびにその薬学的に許容可能な塩およびプロドラッグを含む。

## 【0062】

式Iで、

## 【化10】

は、単結合または二重結合である。

## 【0063】

また、式Iで、A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、およびA<sup>5</sup>は、NまたはCR<sup>1</sup>からそれぞれ独立に選択される。各R<sup>1</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、置換も

50

しくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシリル、置換もしくは未置換アリールオキシリル、または置換もしくは未置換カルボキシリル、から独立に選択できる。任意選択で、1つまたは複数のA<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、およびA<sup>5</sup>がCHであってもよい。一部の実施形態では、A<sup>3</sup>は、-CCO<sub>2</sub>Hである。

## 【0064】

さらに、式Iで、A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、およびA<sup>10</sup>は、NまたはCR<sup>2</sup>からそれぞれ独立に選択される。各R<sup>2</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシリル、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシリル、置換もしくは未置換アリールオキシリル、または置換もしくは未置換カルボキシリル、から独立に選択できる。任意選択で、1つまたは複数のA<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、およびA<sup>10</sup>がCHであってもよい。一部の実施形態では、A<sup>9</sup>はCB<sub>r</sub>である。一部の実施形態では、A<sup>8</sup>はCB<sub>r</sub>である。

10

## 【0065】

また、式Iで、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシリル、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシリル、置換もしくは未置換アリールオキシリル、または置換もしくは未置換カルボキシリル、から独立に選択される。任意選択で、R<sup>3</sup>は、シアノであってもよい。一部の実施形態では、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>は、メチルである。

20

## 【0066】

さらに、式Iで、R<sup>4</sup>は、水素、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、または置換もしくは未置換ヘテロアルキルである。

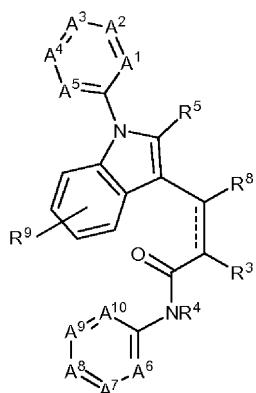
30

## 【0067】

式Iで、隣接R基、例えば、R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>を結合させて、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換シクロアルキル、置換もしくは未置換シクロアルケニル、置換もしくは未置換シクロアルキニル、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキル、置換もしくは未置換ヘテロシクロアルケニル、または置換もしくは未置換ヘテロシクロアルキニルを形成できる。例えば、R<sup>6</sup>は、置換または未置換エチレン基であってよく、R<sup>7</sup>は、置換または未置換プロピレン基であってよく、これらが結合して置換または未置換フェニルを形成する。これらの例では、R<sup>6</sup>とR<sup>7</sup>が結合して、構造I-A、すなわち、インドール実施形態：

40

## 【化11】



構造 I-A

を形成する。

## 【0068】

任意選択で、構造 I - A 中のインドールのフェニル環を、R<sup>9</sup> で置換してもよい。構造 I - A で、R<sup>9</sup> は、水素、ハロゲン、ヒドロキシリ、シアノ、ニトロ、置換もしくは未置換アミノ、置換もしくは未置換アルキル、置換もしくは未置換ヘテロアルキル、置換もしくは未置換アルケニル、置換もしくは未置換ヘテロアルケニル、置換もしくは未置換アルキニル、置換もしくは未置換ヘテロアルキニル、置換もしくは未置換アリール、置換もしくは未置換ヘテロアリール、置換もしくは未置換アルコキシリ、置換もしくは未置換アリールオキシリ、または置換もしくは未置換カルボキシリ、から選択される。

10

20

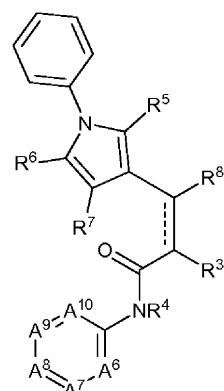
30

40

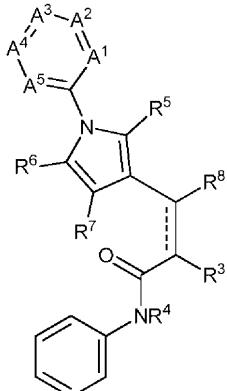
## 【0069】

式 I の一部の例では、各 A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、および A<sup>5</sup> は CH で、構造 I - B を形成する。式 I の別の例では、各 A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、および A<sup>10</sup> は CH で、構造 I - C を形成する。式 I のさらに別の例では、各 A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>3</sup>、A<sup>4</sup>、A<sup>5</sup>、A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、A<sup>9</sup>、および A<sup>10</sup> は CH で、構造 I - D を形成する。

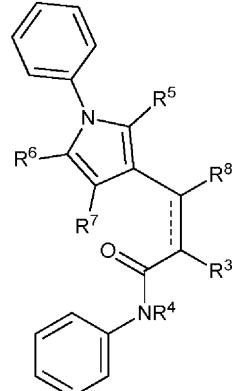
## 【化12】



構造 I-B



構造 I-C

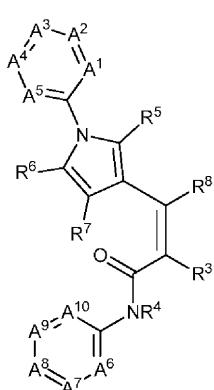


構造 I-D

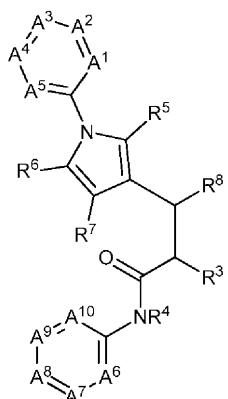
## 【0070】

任意選択で、式 I の化合物は、エノンを含み、構造 I - E の化合物となる。一部の実施形態では、エノンが還元され、構造 I - F の化合物を形成する。

## 【化13】



構造 I-E

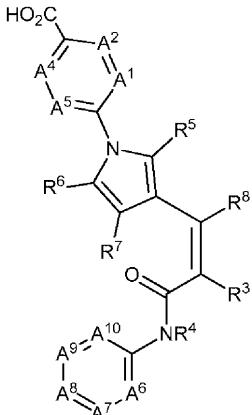


構造 I-F

## 【0071】

一部の実施形態では、式I中のA<sup>3</sup>は、構造I-G：

## 【化14】



構造 I-G

に示されるように-COO<sub>2</sub>Hである。

20

30

## 【0072】

式Iの一部の例では、

## 【化15】

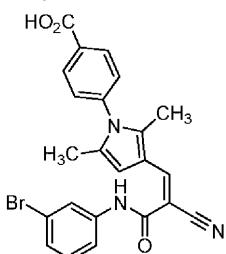
が二重結合であり、A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、A<sup>4</sup>、A<sup>5</sup>、A<sup>6</sup>、A<sup>7</sup>、A<sup>8</sup>、およびA<sup>10</sup>が、CHであり、A<sup>3</sup>が-COO<sub>2</sub>Hであり、R<sup>4</sup>、R<sup>7</sup>、およびR<sup>8</sup>が、それぞれ水素であり、R<sup>5</sup>およびR<sup>6</sup>がメチルであり、かつR<sup>3</sup>がシアノである場合、A<sup>9</sup>は-CBrではない。

## 【0073】

式Iの特定の例は、化合物RNPA-1000

40

## 【化16】



RNPA-1000

である。

50

10

## 【0074】

## 医薬組成物

本明細書記載の化合物またはその誘導体は、医薬組成物として提供できる。目的とする投与モードに応じて、医薬組成物は、好ましくは、正確な投与量の一回投与に適する単位剤形の固体、半固体または液体剤形、例えば、錠剤、坐剤、ピル、カプセル剤、粉剤、液剤、または懸濁剤の形態であってよい。組成物は、薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせて、治療有効量の本明細書記載の化合物またはその誘導体を含み、さらに、他の薬剤、医薬品、キャリア、または希釈剤を含んでもよい。薬学的に許容可能とは、生物学的でなく、その他の理由で望ましくないものでもない材料を意味し、これは、容認できない生物学的影響、または医薬組成物中に含まれるほかの成分との有害な相互作用を生じることなく、選択化合物と一緒に個体に投与できる。

## 【0075】

本明細書で使用される用語のキャリアは、賦形剤、希釈剤、フィラー、塩、緩衝液、安定剤、溶解剤、脂質、安定剤、または当技術分野で製剤での使用によく知られた他の物質のいずれかを包含する。組成物中の使用のためのキャリアの選択は、組成物の目的の投与経路に依存する。これらの物質を含む薬学的に許容可能なキャリアおよび製剤の調製は、例えば、レミントンの薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 21st Edition, ed. University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia Pa., 2005、に記載されている。生理学的に受容可能なキャリアの例には、下記が含まれる：緩衝液、例えば、リン酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、および他の有機酸を含む緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性高分子、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン；单糖類、二糖類、およびブドウ糖、マンノース、またはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート化剤、例えば、EDTA；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；および/または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN (登録商標) (ICI, Inc.; Bridgewater, New Jersey)、ポリエチレングリコール (PEG)、およびPLURONICS (登録商標) (BASF; Floryham Park, NJ)。

## 【0076】

非経口の注射用に適する本明細書記載の化合物またはその誘導体を含む組成物は、生理学的に受容可能な無菌の水性または非水性溶液、分散液、懸濁液または乳剤、および無菌の注射可能溶液または分散液中の再構成用の無菌粉末を含むことができる。適切な水性および非水性キャリア、希釈剤、溶剤またはビークルの例には、水、エタノール、ポリオール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン、等）、それらの適切な混合物、植物油（例えば、オリーブ油）および注射可能有機エステル、例えば、エチルオレアート、が含まれる。適切な流動度は、例えば、レシチン等のコーティングの使用により、分散液の場合には必要粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、維持できる。

## 【0077】

これらの組成物は、また、アジュバント、例えば、保存剤、湿润剤、乳化剤、および懸濁剤を含むことができる。微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、等により推進できる。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウム、等もまた、含めることができる。注射可能剤型の持続的吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン等の使用により実現できる。

## 【0078】

本明細書記載の化合物またはその誘導体の経口投与用固形剤形には、カプセル剤、錠剤

10

20

30

40

50

、ピル、粉剤、および粒剤が含まれる。固形剤形では、本明細書記載の化合物またはその誘導体が、不活性の通常の賦形剤（またはキャリア）、例えば、ナトリウムクエン酸塩もしくはジリン酸カルシウムまたは（a）充填剤もしくは增量剤、例えば、デンプン、ラクトース、ショ糖、ブドウ糖、マンニトール、およびケイ酸、（b）結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ショ糖、およびアラビアゴム、（c）軟糀剤、例えば、グリセリン、（d）崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定の複合ケイ酸塩、および炭酸ナトリウム、（e）溶解遅延剤、例えば、パラフィン、（f）吸収促進剤、例えば、4級アンモニウム化合物、（g）湿潤剤、例えば、セチルアルコール、およびグリセリンモノステアラート、（h）吸着剤、例えば、カオリンおよびベントナイト、ならびに（i）潤滑剤、例えば、滑石、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固形ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、またはこれらの混合物、の内の少なくとも1つと混合される。カプセル剤、錠剤、およびピルの場合には、剤形は、また、緩衝剤を含むことができる。

10

## 【0079】

類似のタイプの固形組成物は、また、ラクトースまたは乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコール、等の賦形剤を使って、軟および硬ゼラチンカプセル剤中のフィラーとして使用可能である。

## 【0080】

錠剤、糖衣錠、カプセル剤、ピル、および粒剤、等の固形剤形は、腸溶コーティングおよび当技術分野で既知のもの、等のコーティングおよびシェルを使って調製できる。これらは、乳白剤を含んでもよく、また、腸管のある部位で、遅延方式で、活性化合物または複数活性化合物を放出する組成物であってもよい。使用できる包埋組成物の例は、高分子物質および蠍である。活性化合物は、また、適切であれば1つまたは複数の上記賦形剤と一緒に、マイクロカプセル剤形に入れてもよい。

20

## 【0081】

本明細書記載の化合物またはその誘導体の経口投与用液体剤形には、薬学的に許容可能な乳剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、およびエリキシル剤が含まれる。活性化合物の他に、液体剤形は、当技術分野で通常使われる不活性希釀剤、例えば、水または他の溶剤、可溶化剤、および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチル炭酸塩、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、オイル、特に、綿実油、ピーナツオイル、トウモロコシ胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、ゴマ油、グリセリン、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、またはこれらの混合物、等を含んでもよい。

30

## 【0082】

また、このような不活性希釀剤に加えて、組成物は、追加の薬剤、例えば、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、甘味料、調味料、または賦香剤を含んでもよい。

## 【0083】

活性化合物の他に、懸濁剤は、追加の薬剤、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエスティル、結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天およびトラガント、またはこれらの物質の混合物、等を含んでもよい。

40

## 【0084】

本明細書記載の化合物またはその誘導体の直腸投与用組成物は、任意選択の坐剤で、これは、化合物を、適切な非刺激性賦形剤またはキャリア、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコールまたは坐剤ろうと混合することにより調製できる。これらの賦形剤またはキャリアは、常温で固体であるが、体温では液体であり、従って、直腸または腔腔中で溶解し、活性成分を放出する。

## 【0085】

50

本明細書記載の化合物またはその誘導体の局所投与用剤形には、軟膏、粉剤、噴霧剤、および吸入剤が含まれる。本明細書記載の化合物またはその誘導体は無菌条件下で、生理学的に受容可能なキャリアおよび、必要に応じ、いずれかの防腐剤、緩衝剤、または噴霧剤と混合される。眼製剤、軟膏、粉剤、および溶液剤は、また、組成物の範囲内にあることが意図されている。

#### 【0086】

組成物は、1つまたは複数の本明細書記載の化合物および薬学的に許容可能なキャリアを含むことができる。本明細書で使われる用語の薬学的に許容可能な塩は、本明細書記載の化合物またはその誘導体の、健全な医学判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応等なしに、対象の組織と接触させる使用に適し、合理的な便益／リスク比に見合った、目的の使用に有効な塩、ならびに、可能であれば、本明細書記載の化合物の双性イオン型、を意味する。用語の塩は、本明細書記載の化合物の相対的に非毒性の、無機および有機酸付加塩を意味する。これらの塩は、化合物の単離および精製の間にインサイチューで、または遊離塩基型の精製化合物を適切な有機または無機酸と別々に反応させ、それにより生成した塩を単離することにより、調製することができる。代表的塩には、下記が含まれる：臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、シウ酸塩、吉草酸塩、オレアート、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、ホウ酸塩、ベンゾアート、乳酸塩、リン酸塩、トシリ酸塩、クエン酸塩、マレイン酸エステル、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチラートメシラート、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、メタンスルホン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩、等。これらは、アルカリおよびアルカリ土類金属に属するカチオン、例えば、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、等、ならびに限定されないが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミン、等を含む非毒性アンモニウム、4級アンモニウム、およびアミンカチオン、を含むことができる（S. M. Barge et al., J. Pharm. Sci. (1977) 66, 1, を参照。この文献は、参照により少なくとも本明細書で教示された組成物に関して、その全体が、本明細書に組み込まれる）。

#### 【0087】

本明細書記載の化合物および組成物またはその薬学的に許容可能な塩の対象への投与は、本明細書記載のように、治療有効量の本明細書記載の化合物および組成物またはその薬学的に許容可能な塩を使って、障害を治療するのに効果的な期間、実施できる。

#### 【0088】

本明細書記載の化合物および組成物または本明細書記載のその薬学的に許容可能な塩の有効量は、当業者によって決定でき、たとえば哺乳動物に対する例示的投与量が1日当たり約0.5～約200mg/kg体重の活性化合物であり、これは、単回用量または個別分割量の形で、例えば、1～4回/日投与できる。あるいは、投与量は、1日当たり約0.5～約150mg/kg体重の活性化合物、1日当たり約0.5～約100mg/kg体重の活性化合物、1日当たり約0.5～約75mg/kg体重の活性化合物、1日当たり約0.5～約50mg/kg体重の活性化合物、1日当たり約0.5～約25mg/kg体重の活性化合物、1日当たり約1～約20mg/kg体重の活性化合物、1日当たり約1～約10mg/kg体重の活性化合物、1日当たり約20mg/kg体重の活性化合物、1日当たり約10mg/kg体重の活性化合物、または1日当たり約5mg/kg体重の活性化合物、であってもよい。方法中で化合物の量の記載に使われる場合、有効量の表現は、所望の薬理学的效果または他の効果を達成する化合物の量、例えば、細菌酵素抑制をもたらす量を意味する。

#### 【0089】

当業者なら、特定の用量レベルおよびいずれかの特定の対象に対する投与頻度は、変化してもよく、これらは、採用される特定の化合物の活性、その化合物の代謝安定性および作用の長さ、種、年齢、体重、総体的な健康、性別および対象の食事、投与モードおよび時間、排出速度、薬剤の組み合わせ、および特定の状態の重症度、等の種々の因子に依存

10

20

30

40

50

することは理解できよう。

### 【0090】

#### 化合物の作製方法

本明細書記載の化合物は、有機合成の当業者に既知の種々の方法、または当業者により認められているその変形法を使って調製できる。本明細書記載の化合物は、容易に入手可能な出発物質から調製できる。最適反応条件は、特定の反応物または使用される溶剤により変化してもよいが、この条件は、当業者により決定されうる。

### 【0091】

式Iの変形には、追加、除去、または各化合物で記載されるような種々の成分の移動が含まれる。同様に、分子中に1つまたは複数のキラル中心が存在する場合、分子のキラリティーを変えることができる。さらに、化合物合成では、種々の化学基の保護および脱保護を含むことができる。保護および脱保護の使用、および適切な保護基の選択は、当業者により決定できる。保護基の化学については、例えば、Wu ts and Greene、有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)、4th Ed.、Wiley & Sons、2006、で見つけることができる。この文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

### 【0092】

開示化合物および組成物の調製に使用される出発物質および試薬は、市販品供給業者、例えば、Aldrich Chemical Co.、(Milwaukee、WI)、Acros Organics(Morris Plains、NJ)、Fisher Scientific(Pittsburgh、PA)、Sigma(St. Louis、MO)、Pfizer(New York、NY)、GlaxoSmith Kline(Raleigh、NC)、Merck(Whitehouse Station、NJ)、Johnson & Johnson(New Brunswick、NJ)、Avantis(Bridgewater、NJ)、AstraZeneca(Wilmington、DE)、Novartis(Basel、Switzerland)、Wyeth(Madison、NJ)、Bristol-Myers-Squibb(New York、NY)、Roche(Basel、Switzerland)、Lilly(Indianapolis、IN)、Abbott(Abbott Park、IL)、Scherling Plough(Kenilworth、NJ)、もしくはBoehringer Ingelheim(Ingelheim、Germany)から入手可能であるか、または、文献、例えば、フィーザー・アンド・フィーザーの有機合成試薬(Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis)、Volumes 1-17(John Wiley and Sons、1991)；Roddの炭素化合物の科学(Rodd's Chemistry of Carbon Compounds)、Volumes 1-5 and Supplements(Elsevier Science Publishers、1989)；有機反応(Organic Reactions)、Volumes 1-40(John Wiley and Sons、1991)；Marchの最新有機化学(March's Advanced Organic Chemistry)、(John Wiley and Sons、4th Edition)；およびLarockの総合有機変換(Comprehensive Organic Transformations)(VCH Publishers Inc.、1989)、で説明されている方法に従って当業者に既知の方法により調製される。他の物質、例えば、本明細書で開示の医薬品キャリアは、市販品供給業者から入手可能である。

### 【0093】

本明細書記載の化合物を生成する反応は、溶剤中で行うことができ、これらの溶剤は、有機合成の当業者により選択されうる。溶剤は、反応が行われる条件、すなわち、温度および圧力下で、出発物質(反応物)、中間体、または生成物と実質的に非反応性である。反応は、1つの溶媒中、または2つ以上の溶媒の混合物中で行うことができる。生成物ま

10

20

30

40

50

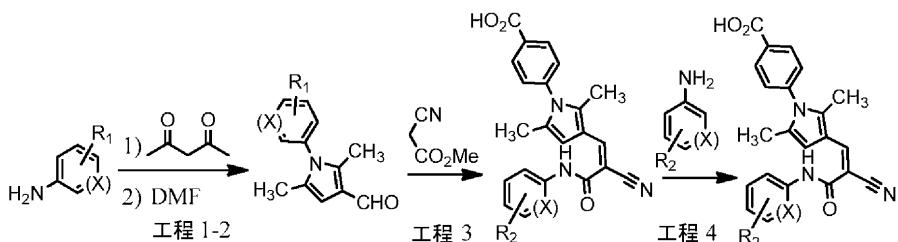
たは中間体形成は、当技術分野で既知のいずれかの適切な方法に従ってモニタリングできる。例えば、生成物形成は、分光学的手段、例えば、核磁気共鳴分光法（例えば、<sup>1</sup>Hまたは<sup>13</sup>C）、赤外分光法、分光光度法〔（例えば、UV-可視）、もしくは質量分析法により、またはクロマトグラフィー、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）または薄層クロマトグラフィーによりモニタリングできる。

#### 【0094】

種々の多様な基を有するRNAP1000の類似体が、スキーム1に示す反応工程を含むいくつかの既知の合成スキームを使って調製できる（Jendral et al.、J. Med. Chem.、33(1)：61-70(1990)）。工程1に示す縮合は、マイクロ波技術を使って加速できる（He et al.、J. Org. Chem.、71：1150-1157(2011)）。スキーム1に示すR<sup>1</sup>位置へのプロモ等の脱離基の組込みは、遷移金属触媒化学、例えば、鈴木およびBuchwald縮合を介したさらなるホモロゲ化を可能とする。工程3で示されるKnoevenagel反応から、立体異性体の混合物が予測される可能性があるが、該異性体はクロマトグラフィーにより分離可能であり、対応する（Z）および（E）異性体は、別々に最終目的化合物に変換でき、これにより多様性セットを拡大する。

#### 【化17】

スキーム1:

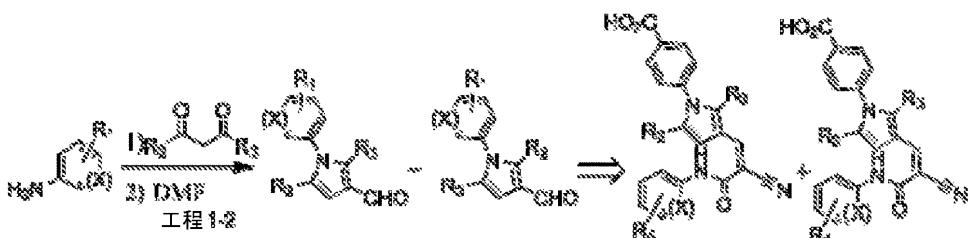


#### 【0095】

さらなる多様性は、一般スキーム中の試薬を変えることにより得ることができる。プロパン-2,5-ジオンの相同ジオンによる置換は、ピロールコアに隣接する追加の結合相互作用の探査を可能とする（スキーム2）。Vilsmeier-Haackホルミル化により、位置異性体の混合物を得ることができ、これは、クロマトグラフィーにより分離でき（Manetti et al.、ChemMedChem、1(9)：973-989(2006)）、別々に最終目的化合物に変換できる。インドール類似体は、類似のスキームを使って既知のインドール-3カルボアルデヒドから調製できる（Khan et al.、Journal of Heterocyclic Chemistry、16(5)：997-999(1979)）。

#### 【化18】

スキーム2:



#### 【0096】

ニトリルの役割は、マロノニトリルを、アミノ基転移に対し抵抗性の保護マロン酸ジエステル、例えば、スキーム3に示すt-ブチルエステルで置換することにより調査できる。脱保護により、中間体の酸が得られ、これは、分子のその領域周辺のSARを調査するためにさらに精錬できる。最終的に、Knoevenagel反応から得た付加物の二重結合の還元（例えば、スキーム3、工程3）により、エノン成分を有する類似体、および

10

20

30

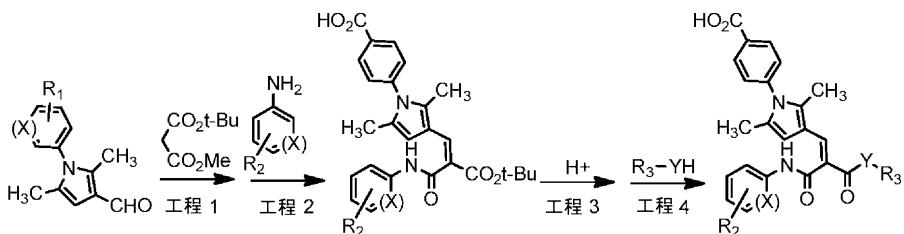
40

50

これを有しない類似体が得られる。ラセミ混合物は、キラルHPLC、およびその後の分離により試験可能である。

【化19】

スキーム3:



10

【0097】

活性アッセイ

本明細書で提供されるのは、微生物感染の治療または予防のための化合物を特定する方法である。方法は、本明細書記載の化合物または組成物を調製し、RNase P等の細菌リボヌクレアーゼに対する化合物または組成物の阻害活性をアッセイする段階を含む。RNase Pは、tRNA前駆体の5'末端の成熟を触媒する広範に分布する酵素である(Frank et al.、Annu Rev Biochem、67:153-180(1998); Kazantsev et al.、Nat Rev Microbiol、4:729-740(2006); Walker et al.、Crit Rev Biochem Mol Biol、41:77-102(2006)、を参照)。この酵素は、単一のリボザイムRNA分子および少なくとも1つのタンパク質成分を含むリボ核タンパク質複合体であるという事実により、ユニークである。細菌内で、リボザイム(rnpB)およびタンパク質(rnpA)成分の両方が細胞生存にとって必須である;rnpBは、tRNAのインピトロ処理を媒介するが、一方、rnpAの機能は、明確に確立されていない(Gossringer et al.、J Bacteriol、188:6816-6823(2006); Schedl et al.、Proc Natl Acad Sci USA、70:2091-2095(1973); Waugh et al.、J Bacteriol、172:6316-6322(1990)、を参照)。ドメイン探索(Letunic et al.、Nucleic Acids Res、34:D257-D260(2006); Schultz et al.、Proc Natl Acad Sci USA、95:5857-5864(1998)、を参照)により、黄色ブドウ球菌RnpA残基40~111は、リボヌクレアーゼ様モチーフに最もよく一致することが明らかになった。さらに、いくつかのRNA結合部位は、この領域内に包埋されている(Spitzfaden et al.、J Mol Biol、295:105-115(2000)、を参照)。大腸菌および枯草菌RNase Pは、特定の二重鎖RNAテンプレート、例えば、ガイドRNAおよび4.5s RNAを消化することが明らかになっている(Lundblad et al.、Proc Natl Acad Sci USA、105:2354-2357(2008)、を参照)。これらのテンプレートの切断は、必ずRnpAを必要とする(Liu et al.、Cell、77:1093-1100(1994); Marvin et al.、J Cell Biochem、108:1244-1251(2009)、を参照)。本明細書で提供されるように、RNase P媒介RNA消化は、rnpB、RnpA、または両方に依存する可能性がある。従って、RnpAは、黄色ブドウ球菌RNA分解を調節する。

【0098】

RNA分解は、細菌リボヌクレアーゼの阻害に適した、従って、微生物感染の治療または予防に適した化合物を特定するために使用できる。一部の実施形態では、蛍光ベースアッセイを使用して、化合物を特定できる。この方法は、RNA、RnpA、および蛍光染料を混合して混合物を形成する工程、該混合物を化合物と接触させる工程、ならびに、蛍

20

30

30

40

40

50

光を使って、細胞におけるR n p A媒介全細菌RNA分解をモニタリングする工程を含むことができる。対照に比べて減少した蛍光は、RNA分解を示す。本明細書で使われる蛍光の減少とは、対照に比べて、少なくとも約1%の蛍光の減少を意味する。例えば、蛍光の減少は、対照に比べて、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%の蛍光の減少であってもよい。対照に比べて、R n p A媒介全細菌RNA分解を減らす化合物は、微生物感染の治療または予防のための化合物として特定できる。本明細書記載の方法で使用するための適切な蛍光染料には、Quant-iT Ribogreen(登録商標)(Invitrogen; Carlsbad, CA)が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0099】

一部の例では、化合物は、Clinical and Laboratory Standards InstituteのMIC微量液体希釈法(broth microdilution)プロトコル(The Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI、以前のNCCLS)、7<sup>th</sup> ed.、January 2006、26(2)、M7-A7中の、好気的成長細菌用の希釈抗菌感受性試験法(Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically);承認標準、を参照されたい;また、The Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI、以前のNCCLS)、January 2008、28(1)、M100-S18中の、抗菌感受性試験実施基準(Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing);Eighteenth Informational Supplement、も参照されたい)により指定されているMueller Hinton(MH)プロス抗アッセイを使ってさらにアッセイできる。

## 【0100】

本明細書で提供される化合物および組成物の細菌RNaseの阻害剤としての活性は、標準的アッセイ、例えば、HPLCアッセイで測定できる。化合物は、細菌RNase酵素アッセイを使って細菌RNaseの阻害剤として試験できる。細菌RNase阻害剤として特定される化合物は、微生物感染の治療または予防に有用である。このアッセイを使って決定された化合物および組成物の活性は、IC<sub>50</sub>として報告できる。本明細書で使われるIC<sub>50</sub>は、このような応答を測定するアッセイにおける最大応答の50%抑制を実現する特定の試験化合物の量、濃度、または投与量を意味する。

## 【0101】

ある態様では、開示化合物および組成物は、実際に合成する必要はなく、その代わりに、いざれかの分子モデリング技術に対する標的として使って、細菌RNaseとの相互作用を予測し、特徴付けることができる。これは、構造的情報およびコンピュータモデリングにより実現される。コンピュータモデリング技術は、選択分子の3次元原子構造の可視化および酵素と相互作用する新規化合物の合理的な設計を可能とする。典型的な例では、酵素の3次元構築は、選択分子のX線結晶学分析またはNMR画像処理由来のデータに依存する。このデータは、細菌RNase用に入手可能である。分子動力学には、力場データ(例えば、Merck分子力場)が必要である。コンピュータグラフィックスシステムは、新規化合物がどのように酵素に連結するかの予測を可能とし、化合物の構造の実験操作により結合特異性を完成させる。一方または両方で小さな変化が生ずる場合に起こる相互作用を予測するには、分子力学ソフトウェアおよび、通常、分子設計プログラムとユーザーの間のユーザーフレンドリーな、メニュー形式のインターフェースを備えた計算能力

の高いコンピュータが必要である。

#### 【0102】

分子モデリングシステムの例は、CHARMMおよびQUANTAプログラム（Polygen Corporation、Waltham、MA）である。CHARMMは、エネルギー最小化および分子動力学関数を実行する。QUANTAは、分子構造の構築、グラフィックモデリングおよび解析を実行する。QUANTAは、分子の相互作用のインタラクティブな構築、修正、可視化、および解析を可能とする。コンピュータ上で、所望の方法で細菌RNaseと相互作用する化合物が特定されるとすぐ、本明細書で開示のように、実際の化合物を合成し、アッセイできる。

#### 【0103】

##### 使用方法

本明細書で提供されるのは、対象の微生物感染を治療する、予防する、または制限する方法である。この方法は、有効量の1つまたは複数の本明細書記載の化合物または組成物、またはその薬学的に許容可能な塩を対象に投与する段階を含む。本明細書記載の化合物および組成物またはその薬学的に許容可能な塩は、ヒト、例えば、小児および高齢者集団、および動物、例えば、獣医学分野での微生物感染および癌の治療に有用である。微生物感染には、例えば、細菌および真菌感染が含まれる。細菌感染には、桿菌、球菌、スピロヘータ、およびビブリオ属細菌が原因の感染が含まれる。一部の例では、微生物感染は、細菌感染（例えば、グラム陽性細菌感染）である。一部の例では、細菌感染は、例えば、黄色ブドウ球菌等のブドウ球菌感染である。本明細書記載の化合物および組成物は、薬剤耐性黄色ブドウ球菌感染およびバイオフィルム関連黄色ブドウ球菌感染を含む種々の黄色ブドウ球菌感染の治療に有用である。一部の実施形態では、黄色ブドウ球菌感染は、メトシリン耐性黄色ブドウ球菌（黄色ブドウ球菌MRSA）感染である。他の実施形態では、黄色ブドウ球菌感染は、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌である。任意選択で、黄色ブドウ球菌感染は、多剤耐性である。一部の例では、本明細書記載の化合物および組成物を使って、バチルス感染（例えば、炭疽菌およびセレウス菌感染）、連鎖球菌感染（例えば、肺炎球菌および化膿性連鎖球菌感染）、および腸球菌感染（例えば、フェカリス菌およびバンコマイシン耐性腸球菌感染）を治療できる。

#### 【0104】

本明細書記載の治療または予防方法は、1つまたは複数の追加の薬剤（例えば、抗菌剤）を使った治療をさらに含むことができる。1つまたは複数の追加の薬剤ならびに本明細書記載の化合物および組成物またはその薬学的に許容可能な塩は、同時投与、ならびに数日間の間隔までの時間的に間をおいた順番を含む、どのような順番でも投与できる。方法は、また、1つまたは複数の追加の薬剤、および／または化合物および本明細書記載の組成物またはその薬学的に許容可能な塩の単回よりも多い投与を含んでもよい。1つまたは複数の追加の薬剤および本明細書記載の化合物および組成物またはその薬学的に許容可能な塩は、1つまたは複数の追加の薬剤を含む医薬組成物として組み合わせてもよい。例えば、本明細書記載の化合物または組成物またはその薬学的に許容可能な塩を、例えば、下記の追加の抗菌剤と組み合わせて、医薬組成物とすることができます：アセダブソン；アセトスルホンナトリウム；アラメシン；アレキシジン；アムジノシリント；アムジノシリントピボキシル；アミシクリン；アミフロキサシン；アミフロキサシンメシレート；アミカシン；アミカシン硫酸塩；アミノサリチル酸；アミノサリチル酸ナトリウム；アモキシシリン；アンホマイシン；アンピシリン；アンピシリンナトリウム；アパルシリントナトリウム；アラマイシン；アスパルトシン；アストロマイシン硫酸塩；アビラマイシン；アボパルシン；アジスロマイシン；アズロシリント；アズロシリントナトリウム；バカンビシリント塩酸塩；バシトラシン；バシトラシンメチレンジサリチル酸；バシトラシン亜鉛；バンベルマイシン；ベンゾイルパスカルシウム；ベリスロマイシン；ベタマイシン硫酸塩；ビアペネム；ビニラマイシン；ビフェナミン塩酸塩；ビスピリチオンマグスルフェクス；ブチカシ

10

20

30

40

50

ン；ブチロシン硫酸塩；カブレオマイシン硫酸塩；カルバドクス；カルベニシリンニナトリウム；カルベニシリンインダニルナトリウム；カルベニシリンフェニルナトリウム；カルベニシリンカリウム；カルモナムナトリウム；セファクロル；セファドロキシリ；セファマンドール；セファマンドールナファート；セファマンドールナトリウム；セファパロール；セファトリジン；セファザフルナトリウム；セファゾリン；セファゾリンナトリウム；セフペラゾン；セフジニル；セフェピム；セフェピム塩酸塩；セフェテコール；セフィキシム；セフメノキシム塩酸塩；セフメタゾール；セフメタゾールナトリウム；セフォニシドーナトリウム；セフォニシドナトリウム；セフォペラゾンナトリウム；セフォラニド；セフォタキシムナトリウム；セフォテタン；セフォテタンニナトリウム；セフォチアム塩酸塩；セフォキシチン；セフォキシチンナトリウム；セフピミゾールナトリウム；セフピラミド；セフピラミドナトリウム；セフピロム硫酸塩；セフポドキシムプロキセチル；セフプロジル；セフロキサジン；セフスロジンナトリウム；セフタジジム；セフチブテン；セフチゾキシムナトリウム；セフトリアキソンナトリウム；セフロキシム；セフロキシムアキセチル；セセフロキシムピボキセチル；セフロキシムナトリウム；セファセトリルナトリウム；セファレキシン；セファレキシン塩酸塩；セファログリシン；セファロリジン；セファロチンナトリウム；セファピリンナトリウム；セフラジン；セトサイクリン塩酸塩；セトフェニコール；クロラムフェニコール；クロラムフェニコールパルミチン酸塩；クロラムフェニコールパントテナート複合体；クロラムフェニコールナトリウムスクシナート；クロルヘキシジンホスファニル酸塩；クロロキシレノール；クロルテトラサイクリン重硫酸塩；塩酸クロルテトラサイクリン；シノキサシン；シプロフロキサシン；塩酸シプロフロキサシン；シロレマイシン；クラリストマイシン；クリナフロキサシン塩酸塩；クリンダマイシン；クリンダマイシン塩酸塩；塩酸パルミチン酸クリンダマイシン；クリンダマイシンリン酸塩；クロファジミン；クロキサシリソベンザチン；クロキサシリソナトリウム；クロキシキン；メタンスルホン酸コリスチンナトリウム；コリスチン硫酸塩；クーママイシン；クーママイシンナトリウム；シクラシリソ；サイクロセリン；ダルホブリスチン；ダブソン；ダブトマイシン；デメクロサイクリン；デメクロサイクリン塩酸塩；デメサイクリン；デノフンギン；ジアベリジン；ジクロキサシリソ；ジクロキサシリソナトリウム；ジヒドロストレプトマイシン硫酸塩；ジピリチオニン；ジリストマイシン；ドキシサイクリン；ドキシサイクリンカルシウム；ドキシサイクリンフォスファテックス；ドキシサイクリン塩酸塩；ドロキサシンナトリウム；エノキサシン；エピシリソ；エピテトラサイクリン塩酸塩；エリスロマイシン；エリスロマイシンアシストラート；エリスロマイシンエストラート；エリスロマイシンエチルコハク酸塩；エリスロマイシングルセプター；エリスロマイシンラクトビオン酸塩；エリスロマイシンプロピオン酸塩；エリスロマイシンステアリン酸塩；エタンブトール塩酸塩；エチオナミド；フレロキサシン；フロキサシリソ；フルダラニン；フルメキン；ホスホマイシン；ホスホマイシントロメタミン；フモキシシリソ；塩化フランギリウム；フランギリウム酒石酸塩；フシジン酸ナトリウム；フシジン酸；ゲンタマイシン硫酸塩；グロキシモナム；グラミシジン；ハロプロジン；ヘタシリソ；ヘタシリソカリウム；ヘキセジン；イバフロキサシン；イミペネム；イソコナゾール；イセパマイシン；イソニアジド；ジョサマイシン；カナマイシン硫酸塩；キタサマイシン；レボフラルタドン；レボプロビルシリソナトリウム；レキシスロマイシン；リンコマイシン；リンコマイシン塩酸塩；ロメフロキサシン；塩酸ロメフロキサシン；ロメフロキサシンメシレート；ロラカルベフ；マフェニド；メクロサイクリン；メクロサイクリンスルホサリチル酸塩；メガロマイシンカリウムリン酸塩；メキドクス；メロペネム；メタサイクリン；塩酸メタサイクリン；メテナミン；ヒブル酸メテナミン；メテナミンマンデル酸塩；メチシリソナトリウム；メチオブリム；メトロニダゾール塩酸塩；メトロニダゾールリン酸塩；メズロシリソ；メズロシリソナトリウム；ミノサイクリン；ミノサイクリン塩酸塩；ミリンカマイシン塩酸塩；モネンシン；モネンシンナトリウム；ナフシリソナトリウム；ナリジキシ酸ナトリウム；ナリジクス酸；ナタマイシン；ネプラマイシン；ネオマイシンパルミチン酸塩；ネオマイシン硫酸塩；ネオマイシンウンデシレン酸塩；ネチルマイシン硫酸塩；ニュートラマイシン；ニフイラデン (n  
10  
20  
30  
40  
50

if u i r a d e n e ) ; ニフラルデゾン ; ニフラテル ; ニフラトロン ; ニフルダジル ; ニフリミド ; ニフィウピリノール ( n i f i u p i r i n o l ) ; ニフラキナゾール ; ニフルチアゾール ; ニトロサイクリン ; ニトロフラントイン ; ニトロミド ; ノルフロキサシン ; ノボビオシンナトリウム ; オフロキサシン ; オネットプリム ( o n n e t o p r i m ) ; オキサシリント ; オキサシリントナトリウム ; オキシモナム ; オキシモナムナトリウム ; オキソリン酸 ; オキシテトラサイクリン ; オキシテトラサイクリンカルシウム ; オキシテトラサイクリン塩酸塩 ; パルジマイシン ; パラクロロフェノール ; パウロマイシン ; ペフロキサシン ; ペフロキサシンメシレート ; ペナメシリント ; ペニシリント G ベンザチン ; ペニシリント G カリウム ; ペニシリント G プロカイン ; ペニシリント G ナトリウム ; ペニシリント V ; ペニシリント V ベンザチン ; ペニシリント V ヒドラバミン ; ペニシリント V カリウム ; ペンチジドンナトリウム ; フェニルアミノサリチル酸塩 ; ピペラシリントナトリウム ; ピルベニシリントナトリウム ; ピリジシリントナトリウム ; ピルリマイシン塩酸塩 ; ピバンピシリント塩酸塩 ; ピバンピシリントパモエート ; ピバンピシリントプロベナート ; ポリミキシン B 硫酸塩 ; ポルフィロマイシン ; プロピカシン ; ピラジナミド ; ピリチオン亜鉛 ; キンデカミン酢酸塩 ; キヌプリスチン ; ラセフェニコール ; ラモプラニン ; レイニーマイシン ; レロマイシン ( r e l o m y c i n ) ; レブロマイシン ; リファブチン ; リファメタン ; リファメキシル ; リファミド ; リファンピン ; リファベンチン ; リファキシミン ; ロリテトラサイクリン ; 硝酸ロリテトラサイクリン ; ロサラマイシン ; ロサラマイシン酪酸塩 ; ロサラマイシンプロピオン酸塩 ; ロサラマイシンナトリウムリン酸塩 ; ロサラマイシンステアリン酸塩 ; ロソキサシン ; ロキサルソン ; ロキシリトロマイシン ; サンサイクリン ; サンフェトリネムナトリウム ; サルモキシシリント ; サルピシリント ; スコパフンギン ; シソマイシン ; シソマイシン硫酸塩 ; スバルフロキサシン ; スペクチノマイシン塩酸塩 ; スピラマイシン ; スタリマイシン ( s t a l l i m y c i n ) 塩酸塩 ; ステフィマイシン ; ストレプトマイシン硫酸塩 ; ストレプトニコジド ( s t r e p t o n i c o z i d ) ; スルファベンズ ; スルファベンズアミド ; スルファセタミド ; スルファセタミドナトリウム ; スルファシチン ; スルファジアジン ; スルファジアジンナトリウム ; スルファドキシン ; スルファレン ; スルファメラジン ; スルファメーテル ; スルファメタジン ; スルファメチゾール ; スルファメトキサゾール ; スルファモノメトキシン ; スルファモキソール ; スルファニル酸亜鉛 ; スルファニトラン ; スルファサラジン ; スルファソミゾール ; スルファチアゾール ; スルファザメト ; スルフィソキサゾール ; スルフィソキサゾールアセチル ; スルフィソキサゾールジオラミン ; スルホミキシン ; スロペネム ; スルタミシリント ; サンシリントナトリウム ; タランピシリント塩酸塩 ; テイコプラニン ; テマフロキサシン塩酸塩 ; テモシリント ; テトラサイクリン ; テトラサイクリン塩酸塩 ; テトラサイクリンリン酸塩複合体 ; テトロキソプリム ; チアンフェニコール ; チフェンシリントカリウム ; チカルシリントクレシルナトリウム ; チカルシリントナトリウム ; チカルシリントナトリウム ; チクラトン ; 塩化チオドニウム ; トプラマイシン ; トプラマイシン硫酸塩 ; トスフロキサシン ; トリメトプリム ; トリメトプリム硫酸塩 ; トリスルファピリミジン ; トロレアンドマイシン ; トロスペクトマイシン硫酸塩 ; チロスリシン ; バンコマイシン ; バンコマイシン塩酸塩 ; ヴァージニアマイシン ; またはゾルバマイシン。

## 【0105】

本明細書でさらに提供されるのは、細菌リボヌクレアーゼ、例えば、黄色ブドウ球菌 R Nase P のタンパク質成分を阻害する方法である。一部の実施形態では、細菌リボヌクレアーゼは、R np A である。方法は、細菌リボヌクレアーゼを有効量の本明細書記載の1つまたは複数の化合物または組成物と接触させる段階を含む。このような量は、インビボまたはインビトロで、組成物の化合物または活性成分の治療に有効な濃度を実現するのに十分な量である。

## 【0106】

本明細書記載の方法および化合物は、予防および治療処理の両方に有用である。本明細書で使われる用語の治療 ( t r e a t i n g ) または治療 ( t r e a t m e n t ) は、予防；発症の開始の遅延；発症後の徵候または症状の悪化の減少、根絶、または遅延；およ

10

20

30

40

50

び再発の防止を含む。予防のための使用では、治療有効量の本明細書記載の化合物および組成物またはその薬学的に許容可能な塩が、発症の前に（例えば、細菌感染の明らかな徴候の前に）、早期発症の間に（例えば、細菌感染の初期徴候および症状時に）、または細菌感染の炎症反応または発生が確定した後で、対象に投与される。予防投与は、感染症状の顕在化の前の数日から数年の間、行うことができる。予防投与は、例えば、黄色ブドウ球菌に曝された対象の予防処置に使用できる。治療処置は、細菌感染が診断された後で、治療有効量の本明細書記載の化合物および組成物またはその薬学的に許容可能な塩を対象に投与する段階を含む。

#### 【0107】

キット

10

また、本明細書で提供されるのは、対象の炎症または癌を治療または予防するためのキットである。キットには、いずれかの明細書記載の化合物または組成物を含むことができる。例えば、キットは、式Iの化合物を含むことができる。キットは、1つまたは複数の抗菌剤（例えば、オキサシリン）をさらに含むことができる。キットは、本明細書記載のいずれかの化合物または組成物の経口製剤を含むことができる。さらに、キットは、キットを使用するための使用法（例えば、対象を治療するための説明書）を含むことができる。

#### 【0108】

以下の実施例は、本明細書記載の方法および化合物の特定の態様をさらに例示することを意図しており、添付の特許請求の範囲を限定する意図はない。

20

#### 【実施例】

#### 【0109】

黄色ブドウ球菌RNA分解因子は、経験的に特定され、また、下記に示すように、有望な抗菌剤開発標的であることが明らかになった。これを行うために、黄色ブドウ球菌が感染を起こす能力は（その多くが研究室培養条件では細胞密度依存的に調節されている）広範なレパートリーの病原因子の一時的発現に部分的に起因しているという事実を利用した（Novick, R. P., Mol Microbiol, 48: 1429 - 1449 (2003)、を参照）。次いで、黄色ブドウ球菌病原因子発現における増殖期調節による変化が、mRNA分解のレベルで発生するか否か、およびこのプロセスに関与するタンパク質が生物体のRNA分解機構のメンバーを含みうるか否かを判定する調査を行った。そのため、GeneChipsを使って、明確に特徴付けられた黄色ブドウ球菌病原因子の、対数期および定常期増殖の間の、mRNA崩壊速度を比較した。

30

#### 【0110】

結果は、多くの黄色ブドウ球菌病原因子転写物のmRNA代謝回転特性は、2つの増殖期の間で異なることを示した。さらに、対数期および定常期細胞の全体的mRNA崩壊特性が、劇的に異なることが明らかになった；884種の黄色ブドウ球菌mRNAは、定常期増殖の間、安定化された。発現がmRNA崩壊と相關する遺伝子の中にリボヌクレアーゼPのタンパク質成分であるRnpAが含まれており、これが、バルクmRNA代謝回転における何らかの役割を果たしている可能性があることが示唆される。その可能性と一致して、組換え黄色ブドウ球菌RnpAがインビトロでリボヌクレアーゼ活性を示し、RnpA枯渇細胞がmRNA分解の減少を示すことが実証された。RnpAは、哺乳類タンパク質とのアミノ酸保存性が低い必須黄色ブドウ球菌酵素であるため、それは、抗菌剤発見のための適切な標的である。このため、高スループットおよび二次選別アッセイを使って、RnpA媒介RNA分解の小分子阻害剤を特定した。これらの薬剤の1つは、黄色ブドウ球菌mRNA代謝回転を阻害することを示し、高いRnpA保存を伴って、MRSA、VISA、およびVRSA、ならびに他のグラム陽性病原体に対する抗菌活性を示し、かつ、マウス感染急性致死モデルにおける病原性は僅かであった。まとめると、これらの結果は、RnpAが、今まで特性が明らかにされていない黄色ブドウ球菌RNA分解機構のメンバーであることを示し、抗菌剤発見の標的としてのその有用性を確実なものとする。

40

#### 【0111】

50

### 実施例 1：黄色ブドウ球菌代謝回転の増殖期依存変化

半減期の測定のために、黄色ブドウ球菌株 UAMS - 1、RN4220 (pCN51；  
CdcL<sub>2</sub> 誘導性プロモーターを含むプラスミド)、RN4220 (pRNPA；完全長  
rnpA mRNA を産生できる pCN51)、または RN4220 (pRNPA-A.  
S.；rnpA アンチセンス RNA を産生できる pCN51) を中間対数期または定常期  
まで増殖させ、リファンピン (200 µg / ml) の添加により転写を停止させた。株 U  
AMS - 1 に対し、転写停止後 0、2.5、5、15 および 30 分で一定量を回収した。  
試薬を保存するため、RN4220 誘導体に対しては、転写停止後 0 および 10 分に、一  
定量を回収した。平板培養の徹底により培養物は、リファンピン耐性を発生しなかった。  
4 回評価した RN4220 pRNPA-A.S. 細胞以外は、各株および / または増殖期  
を 2 回評価した。RNA を各一定分量から単離し、標識し、黄色ブドウ球菌 Gene Chip  
(Affymetrix; Santa Clara, CA) にハイブリダイズし、2  
回測定値を平均して、以前記載のように、全 mRNA 種の mRNA 半減期を測定した (A  
nderson et al., J Bacteriol, 188: 6739 - 6756  
(2006); Roberts et al., J Bacteriol, 188: 25  
93 - 2603 (2006)、を参照)。RNPA1000 暴露細胞の mRNA 代謝回転  
特性を測定するために、対数期黄色ブドウ球菌を、0.5 X MIC の RnpA 阻害剤  
または等容量の化合物溶媒 (DMSO) で 30 分間処理した。次に、転写物合成を停止し、  
転写停止後 0 および 5 分に mRNA 種の転写物力価を測定した (Anderson et  
al., J Bacteriol, 188: 6739 - 6756 (2006); Roberts et al., J Bacteriol, 188: 2593 - 2603 (20  
06)、を参照)。

#### 【0112】

結果は、多くの (41%) 病原因子転写物の mRNA 代謝回転特性は、2つの増殖期の  
間で異なることを示し、mRNA 代謝回転の調節された変化がそれらの発現に影響を与える  
ことができる事を示唆した。さらに、該生物体が、定常期特異的な少なくとも 5 つの  
小さな安定 RNA (SSR)、すなわち仮定クラスの調節性ノンコーディング RNA 分子  
を産生したことが観察された (Anderson et al., J Bacteriol, 188: 6739 - 6756 (2006); Roberts et al., J Bacteriol, 188: 2593 - 2603 (2006)、を参照)。さらに、対数期  
および定常期細胞の全体 mRNA 代謝回転特性は、かなり異なっていた。以前の測定値  
と一致して、大部分 (90%) の対数期転写物は、急速に分解し (5 分以下の半減期)、  
9% は、中間的安定性を示し (5 分を超える、30 分以下の半減期)、また 1% は、安定で  
ある (30 分以上の半減期) ことが明らかになった (Anderson et al., J Bacteriol, 188: 6739 - 6756 (2006); Roberts et al., J Bacteriol, 188: 2593 - 2603 (2006)、を  
参照)。しかし、定常期増殖の間に、76%、21%、および 3% の mRNA 種が、それ  
ぞれ、短期、中間的、および安定な半減期を示す (図 1)。RNase J1 も RNase Y も、  
増殖期依存形式での異なった発現は認められなかった。定常期増殖の間に抑制  
された 367 遺伝子中に、リボヌクレアーゼ P のタンパク質成分をコードする rnpA  
が含まれていた。

#### 【0113】

実施例 2：黄色ブドウ球菌 RnpA は、リボヌクレアーゼ活性を示し、細胞性 mRNA 分  
解に影響する

#### タンパク質精製

それぞれの推定上の黄色ブドウ球菌リボヌクレアーゼの予測読み枠を、PCR 増幅し、  
プラスミド pET-30Ek/LIC (Novagen; Madison WI) の連結  
反応非依存性クローニング部位に挿入した。シーケンシングにより、これは、プラスミド  
のイソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導性プロモーターの  
制御下で、ヘキサヒスチジンタグを各タンパク質の N 末端に融合したことが確認された。

10

20

30

30

40

50

形質転換の後で、各タンパク質は、IPTGの存在下で増殖（4時間）させた大腸菌BL21(DE3)細胞から、Ni<sup>+</sup><sup>2</sup>親和性クロマトグラフィーにより精製された。さらに具体的には、10gの細胞ペレットを、コンプリート、ミニ、EDTAフリー・プロテアーゼ阻害剤錠剤(Roche; Branford, CT)および20mMイミダゾールを含む50mlの緩衝液A(300mM NaCl、50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 7.4)中に懸濁した。15,000psiでEmulsifex-C3マイクロフルイダイザー(Avestin Inc.; Ottawa, Canada)を7回通すことにより細胞を破碎した。12,000×gで30分間の遠心分離により細胞壊死組織片を取り除き、上清液をAKTA-FPLC高速液体クロマトグラフィーシステム(GE Healthcare Bio-Sciences; Pittsburgh, PA)の5mL Ni-NTA FF-粗製アフィニティカラム(GE Healthcare Bio-Sciences; Piscataway, NJ)に装填した。タンパク質は、緩衝液A中の線形イミダゾール勾配(80mM~500mM)で単一ピークとして溶出した。各タンパク質の存在を、Coomassie染色SDS-PAGEおよびマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)分析分光法(Wistar Institute; Philadelphia, PA)により評価した。

#### 【0114】

##### プラスミド

プラスミドpRNPAsおよびpRNPA-A.S.は、黄色ブドウ球菌シャトルベクターpCN51の誘導性CdCl<sub>2</sub>の制御下の、それぞれセンスおよびアンチセンス配向の予測Shine-Delgarno配列を含む推定上のrnpA転写ユニットを含む(Charpentier et al., Appl Environ Microbiol, 70:6076-6085 (2004)、を参照)。簡単に説明すると、それぞれ、5'末端EcoRIおよびKpnI制限酵素部位(下線部)を含むプライマー5'GAATTCTCAAATAAAAAACGATAAAATAAGCGAGTGATGTTA(順方向)(配列番号8)および5'GGTACCTTACTTAATCTTTATTAAAAACTTTGGCAA(逆方向)(配列番号9)、または制限酵素配列が逆転されたプライマーを使って、rnpA読み枠および34nt上流配列を黄色ブドウ球菌株UAMS-1からPCR增幅した。得られたPCR産物をpCR II-TOPOベクターに連結し、増殖用に大腸菌INV-F'細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)中に形質転換した。その後、プラスミドDNAをQIAprep Spin Mini prepキット(Qiagen, Valencia, CA)を使って精製した後、EcoRIおよびKpnIで消化し、プラスミド挿入断片を遊離させ、これを、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を使ってゲル精製して、EcoRIおよびKpnI消化pCN51に連結した。DNAシーケンシングにより、プラスミドpRNPAsおよびpRNPA-A.Sの健全性を確認した。

#### 【0115】

##### ウェスタンプロッティング

アフィニティー精製したPolyQuikウサギ黄色ブドウ球菌RnpAポリクローナル抗体を、Invitrogen(Carlsbad, CA)において生成した。2.5μM CdCl<sub>2</sub>(RNA発現誘導用)および10μg/mlエリスロマイシン(プラスミド維持用)を補充したTSB培地中で30分間増殖後、全細菌タンパク質を、プラスミドベクター(pCN51)、RnpA過剰発現プラスミド(pRNPA-S)またはRnpAアンチセンスRNAプラスミド(pRNPA-A.S.)を含むRN4220細胞から単離した。結果的なタンパク質濃度を、従来のBradfordアッセイにより測定し、2.0μgの各タンパク質試料または精製された黄色ブドウ球菌RnpAを10%SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ポリビニリデンフッ化物膜(Millipore, Billerica, MA)に移した。膜を10%ミルクでブロッキングし、洗浄後、ウサギRnpA抗体(1:1000希釈)と共にインキュベートし、洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート抗ウサギ抗体(1:1000希釈; GE Health

10

20

30

40

50

h care )と共にインキュベートし、Amersham ECLウェスタンプロットティングシステム (GE Health care)を使って、メーカーの推奨に従い、処理した。

### 【0116】

#### 結果

組換え黄色ブドウ球菌RnpAは、rRNAおよびブドウ球菌性タンパク質A(spa)mRNA、ならびに試験した3つの他のmRNA種の消化を触媒することが明らかになった(図2Bおよび2C)。他の推定上のRNase IIIを含む黄色ブドウ球菌リボヌクレアーゼ、RNase HII、RNase HIPII、RNase Y、RNase J1、およびBNは、これらのアッセイ条件の間、等価のRNA分解活性を示さなかった(図2B)。SDS-PAGEおよびマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)分析により、観察されたリボヌクレアーゼ活性は、黄色ブドウ球菌RnpAの存在に関連していることが確認された(図2A)。図2Aで、約17.2kDaのバンド(実線矢印；バンド2)は、タンデム型質量分析(Wistar Institute; Philadelphia, PA)により、黄色ブドウ球菌RnpAであると確認され、一方、少量の混入物の上位データ(点線矢印)は、大腸菌50Sリボソームタンパク質L3(バンド1)またはアミノ酸11~107(バンド3および4)または12~107(バンド5)に対応する黄色ブドウ球菌RnpAポリペプチド断片であると判定された。にもかかわらず、上述のリボヌクレアーゼアッセイで使用された約1000倍過剰(25μg)なRnpA精製産物のSDS-PAGE評価は、タンパク質調製物内の微量の4つの追加のポリペプチドを示し、RnpA産物と一緒に大腸菌リボヌクレアーゼの混入が存在する可能性が提起された。MALDI分析は、これらのタンパク質の素性が、大腸菌リボソームタンパク質L3、および3つの黄色ブドウ球菌RnpA断片(これは、成熟選択的翻訳産物とは対照的に、タンパク質調製の間の完全長RnpAのタンパク質分解を反映していると思われる)であることを示した。大腸菌リボヌクレアーゼは検出されず、タンパク質調製物のリボ核酸分解活性の原因は、黄色ブドウ球菌RnpAである可能性があることを唆している。さらに、逆転写酵素媒介PCRは、大腸菌rnpBが、調製物中に検出できなかったことを示し、RnpAリボヌクレアーゼ活性は、黄色ブドウ球菌RnpAおよび大腸菌rnpB RNAを含むキメラRNase P分子の形成に起因するものではないことを確認した。実際、インビトロ合成大腸菌rnpBは、標準的および高Mg<sup>+</sup>反応条件の両方で、黄色ブドウ球菌RNA分解(単独)を触媒もせず、RnpA媒介RNA消化活性に影響もしなかった。

### 【0117】

黄色ブドウ球菌RNase J1は、ここで使用した反応条件下で低リボ核酸分解活性を示したが、その後の調査で、それは異なる条件下では強力なリボヌクレアーゼであることが示され(Even et al., Nucleic Acids Res, 33: 2141-2152 (2005)、を参照)、黄色ブドウ球菌RnpAの推定上のインビトロリボヌクレアーゼ活性をさらに評価するための対照としての使用が可能であった。さらに具体的には、RnpA媒介spa mRNA分解が、アフィニティー精製ウサギポリクローナル黄色ブドウ球菌RnpA抗体の添加により阻害できるか否かを評価した。最初の調査では、抗体は、RnpAのおよびRNase J1のリボ核酸分解活性を制限することは示されなかった。しかし、免疫グロブリン混合物内の抗体のサブセットのみが、酵素の活性に影響を与えるRnpAエピトープを認識できるということを予測して、該抗体がRnpA媒介転写物分解に対しどのような効果を及ぼすか(もしあれば)をモニタリングするためのより感度の高い手段としてspa消化産物の逆転写PCR增幅を使った。結果から、抗体添加は、実際に、完全長spa mRNAのRnpA媒介分解を弱く阻害するが、RNase J1活性に対しては効果を示さないことがわかった(図2D)。等量の免疫前の血清は、RnpA活性に効果を与えたなかった。まとめると、これらのデータは、黄色ブドウ球菌RnpAの今まで認識されていなかった機能とはRNA消化の機能であることを示唆している。

10

20

30

40

50

## 【0118】

必須の細菌RNA代謝回転タンパク質の小分子阻害剤は、細菌増殖を妨害し、新規クラスの抗菌剤であることが期待される。この点について、黄色ブドウ球菌RnpAは、必須酵素であることが報告され(Chaudhuri et al.、BMC Genomics、10:291(2009); Ji et al.、Science、293:2266-2269(2001)、参照)、従って、化学療法開発の標的と見なすことができる。実際、-34~+353rnpA mRNA翻訳開始部位に相補的であると予測されるアンチセンスRNA分子の誘導が(プラスミドpCN51の塩化カドミウム誘導性プロモーターの制御下で(Charpentier et al.、Appl Environ Microbiol、70:6076-6085(2004)、参照)、10μM誘導因子の存在下の黄色ブドウ球菌増殖を制限した。逆に、対応するセンス鎖RNA分子、または誘導因子の非存在下で、アンチセンスプラスミド株を発現している細胞では、増殖欠陥は観察されなかった(図6)。これらの結果は、黄色ブドウ球菌RnpAが、必須タンパク質であることを示す。さらに、このrnpAアンチセンスRNA系を使って、RnpAが黄色ブドウ球菌の細胞性mRNA代謝回転に影響を与えるか否かを評価した。このため、RNA分解特性を、2.5μM CdCl<sub>2</sub>の存在下で増殖の間に、プラスミドベクターのみを保有する細胞、または、rnpA mRNAもしくはrnpAアンチセンスRNAプラスミド由来コピーを含む細胞について測定した。図6に示すように、それぞれrnpA mRNAまたはrnpAアンチセンス発現株内で増加したまたは減少したRnpA産生を可能とするがアンチセンスRNA産生株の細菌増殖を制限しない最適濃度を、経験的に、2.5μMの塩化カドミウム濃度に決定した。結果的に、RNA代謝回転分析は、低減したRnpAレベルが、多くのmRNA種の安定化に相關することを示し、酵素が、バルク細胞性RNA分解に寄与することを示唆した。さらに具体的には、RnpA高発現およびベクター含有細胞中で產生された全対数期転写物のそれぞれ、88%および87%が、10分未満の半減期を示すことが明らかになった。RnpA過剰発現が細胞性RNA分解を加速しなかったという知見は、そのタンパク質のRNA分解活性が、野性型レベルのまま残っているコファクターに依存するか、またはタンパク質が、RNA代謝回転を有效地に増加させる濃度に達しなかったことを示す可能性がある。それにも関わらず、RnpA欠損細胞中で產生された転写物の63%が、10分未満の半減期を示し、そのタンパク質が黄色ブドウ球菌mRNA代謝回転に寄与していることを示唆する(図5A)。

## 【0119】

## 実施例3：RnpA媒介RNA分解の小分子阻害剤の特定

上記結果は、黄色ブドウ球菌RnpAが、インビトロでリボヌクレアーゼ活性を示し、細胞性RNA分解に寄与する必須酵素であることを示す。さらに、このタンパク質は、グラム陽性細菌全体にわたりよく保存されているが、哺乳類タンパク質に対するアミノ酸保存性に欠け、このことにより新規抗生物質薬剤開発のための魅力的な標的となっている。そのために、蛍光ベース高スループットアッセイを使って、29,066市販化合物(ActiProbe-25Kおよび天然物ライブラリー；Timtec；Newark、DE)に対し、RnpA媒介RNA分解の小分子阻害剤の選別を行った(図3A)。

## 【0120】

具体的には、ActiProbe-25Kおよび天然物ライブラリー(合計29,940化合物；Timtec Inc.；Newark、DE)のメンバーに対し、黄色ブドウ球菌RnpA媒介全細菌RNA分解の小分子阻害剤を選別した。全ての反応(50μl)を96ウエル形式で行い、1X反応緩衝液(2mM NaCl、2mM MgCl<sub>2</sub>、50mMトリス塩酸、pH 6.0)中の20pmol RnpA、200ng黄色ブドウ球菌全RNA、および約5μMの各化合物を含めた。混合物を37℃で20分間インキュベートし、この時点で、Quant-iT Ribogreen(登録商標)(100μl；Invitrogen)を加えて、残っているRNA基質の量を定量した。パーセント酵素抑制を残余基質/開始基質\*100として計算した。阻害用量設定アッセイとして、20pmol RnpA単独(陽性対照)と共に、または漸増量(0、25、50、100μM)で測定した。

10

20

30

40

50

0 0 、 1 2 5 、 1 5 0 、 2 0 0 、 2 5 0 、 および 5 0 0  $\mu\text{M}$  ) の R N P 1 0 0 0 の存在下で、 1 p m o l の s p a m R N A を 3 7 で 1 時間インキュベートした。この後、 2 0  $\mu\text{l}$  の各反応混合物を、 1 . 2 % ホルムアルデヒド含有アガロースゲルの電気泳動に供し、 臭化エチジウム染色により可視化した。

## 【 0 1 2 1 】

全体で 1 4 個の分子が、 酵素の R N A 代謝回転活性を 5 0 % 以上阻害した。ゲルベース二次アッセイにより、 これらの分子の内、 5 つが本物の R n p A 媒介 R N A 分解阻害剤であることを確認した ( 図 3 B ) 。 これらの化合物の内の 1 つである R N P A 1 0 0 0 ( 図 3 C ; I C<sub>50</sub> = 1 0 0 ~ 1 2 5  $\mu\text{M}$  ) は、 どの試験濃度 ( 0 ~ 7 5 0  $\mu\text{M}$  ) でも、 市販の大腸菌 R N a s e H I 、 R N a s e A 、 R N a s e I または社内精製黄色ブドウ球菌 R N a s e J 1 の活性に影響を与えたが、 穏やかに大腸菌 R N a s e I I I 活性を阻害した ( I C<sub>50</sub> = 5 0 0 ~ 7 5 0  $\mu\text{M}$  ; データは示さず ) 。 これらおよび他のデータ ( 下記参照 ) により、 R N P A 1 0 0 0 は黄色ブドウ球菌 R n p A に対し特異性を有する可能性があることが示唆されるが、 本発明者らは、 全ての小分子と同様に、 この薬剤が他の黄色ブドウ球菌酵素にも影響を与える可能性を排除することはできない。 R n p A 阻害剤が抗菌剤として潜在性を示すか否かを評価するために、 一連の実験を行い、 R N P A 1 0 0 0 が黄色ブドウ球菌増殖を阻害し、 全身性感染モデルで黄色ブドウ球菌発病を制限できるか否かを評価した。

## 【 0 1 2 2 】

## 実施例 4 : 抗菌感受性試験

R N 4 2 2 0 誘導体を除いて、 R N P A 1 0 0 0 の細菌に対するインビトロ活性を、 C l i n i c a l a n d L a b o r a t o r y S t a n d a r d s I n s t i t u t e ( C L S I ) ガイドラインに従い、 陽イオン調節 M u e l l e r - H i n t o n プロスまたは 5 % 溶解ウマ血液を補充した M H プロス ( 連鎖球菌属の試験用 ) を使って、 プロス微量希釈法により測定した。 R N P A 1 0 0 0 の系列希釈 ( 0 、 4 、 8 、 1 6 、 3 2 、 6 4 、 および 1 2 8  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) を含むマイクロタイタープレートに、 1 0<sup>5</sup> コロニー形成ユニット ( C F U ) / mL を播種し、 3 7 で 1 8 時間、 インキュベートした。 各単離物に対する M I C を、 裸眼で検出される生物体の増殖の完全阻害を示す R N P A 1 0 0 0 の最小濃度として定義した。 マイクロタイターウエルが、 最初に増殖を完全阻害しなかった最小濃度 ( 1 6  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) から増殖を完全阻害した濃度 ( 3 2  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) までの範囲の R N P A 1 0 0 0 の濃度の 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の漸増を含むこと以外は同じ条件で、 上述の手続きに従った繰り返し試験を行うことによって、 各黄色ブドウ球菌株に対する M I C をさらにリファインした。 各黄色ブドウ球菌株に対する M I C 値を繰り返し測定値 ( n = 5 ) の中央値スコアとして決定した。 M I C 以上の R N P A 1 0 0 0 濃度を含むウエルを、 最小殺菌量測定用に播種した。 可能な場合は、 V R S A 株を有する実験を層流フード中で行い、 生じうる設備混入を最小限にした。 プラスミドベクター ( p C N 5 1 ) 、 R n p A 過剰產生プラスミド ( p R N P A - S ) または R n p A 過少產生プラスミド ( p R N P A - A . S . ) を含む R N 4 2 2 0 細胞に対し、 R N P A 1 0 0 0 のインビトロ抗菌活性測定を、 2 . 5  $\mu\text{M}$  C d C 1<sub>2</sub> および 0 、 1 、 2 、 4 、 8 、 1 6 、 3 2 、 6 4 、 または 1 2 8  $\mu\text{g} / \text{mL}$  R N P A 1 0 0 0 を補充したトリプチックソイプロス培地中で細胞増殖させたこと以外は、 上述の微量希釈法により行った。 また、 時間 - 殺菌アッセイを行い、 黄色ブドウ球菌株 U A M S - 1 に対する R N P A 1 0 0 0 の抗菌特性を、 その株の M I C の 0 . 2 5 、 0 . 5 、 2 、 および 4 倍量の非存在および存在下で、 オキサシリン ( 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) 、 リファンピシン ( 0 . 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) 、 バンコマイシン ( 2  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) 、 またはダプトマイシン ( 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ) に対し、 モニタリングした。 R N P A 1 0 0 0 および / または市販抗生物質の示した量を中間対数期 ( 2 X 1 0<sup>8</sup> c f u / mL ) 黄色ブドウ球菌株 U A M S - 1 細胞に添加し、 3 7 でインキュベートした。 抗菌剤暴露後 0 、 2 、 4 、 8 、 および 2 4 時間で一定量を取り出し、 系列希釈し、 得られた c f u / mL を数えるために播種した。 全ての時間 - 殺菌アッセイを少なくとも 3 回繰り返した。 結果を表 1 に示す。

10

20

30

40

50

【0123】

【表1】

生物体(表現型)	株 <sup>b</sup>	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <sup>b,c</sup>	生物体(表現型)	株 <sup>d</sup>	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <sup>c,d</sup>
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA100	26	肺炎球菌(MDR)	単離物 4	32
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA200	32	肺炎球菌(MDR)	単離物 5	16
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA300	23			
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA400	23	化膿性連鎖球菌	単離物 1	8
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA500	23	サンギス菌( <i>S. sanguis</i> )	単離物 1	16
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA600	32	ストレプトコッカス・ボビス( <i>S. bovis</i> )	ATCC49147	32
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA700	32			
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA800	23	フェカリス菌	単離物 1	64
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA900	32	フェカリス菌	単離物 2	64
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA1000	29	フェカリス菌	単離物 3	64
黄色ブドウ球菌(MRSA)	USA1100	32	フェカリス菌	単離物 4	64
黄色ブドウ球菌(MSSA)	UAMS-1	26	フェカリス菌	単離物 5	64
黄色ブドウ球菌(VISA)	VISA-NRS1	32	フェシウム菌( <i>E. faecium</i> )	単離物 1	64
黄色ブドウ球菌(VISA)	VISA-NRS3	16	フェシウム菌	単離物 2	64
黄色ブドウ球菌(VISA)	単離物 3	16	フェシウム菌	単離物 3	64
黄色ブドウ球菌(VISA)	単離物 4	32	フェシウム菌	単離物 4	64
黄色ブドウ球菌(VISA)	単離物 5	16	フェシウム菌	単離物 5	64
			フェシウム菌	単離物 5+	32
				レセルビン	
黄色ブドウ球菌(VRSA)	VRSA-VRS1	16			
黄色ブドウ球菌(VRSA)	VRSA-VRS10	32			
表皮ブドウ球菌	単離物 1	16	フェシウム菌(VRE)	単離物 1	64
表皮ブドウ球菌	単離物 2	8	フェシウム菌(VRE)	単離物 2	64
表皮ブドウ球菌	単離物 3	8	フェシウム菌(VRE)	単離物 3	32
表皮ブドウ球菌	単離物 4	8	フェシウム菌(VRE)	単離物 4	64
表皮ブドウ球菌	単離物 5	8	フェシウム菌(VRE)	単離物 5	32
ストレプトコッカス・アガラクチア ( <i>S. agalactiae</i> )	単離物 1	16	セレウス菌( <i>B. cereus</i> )	単離物 1	8
ストレプトコッカス・アガラクチア	単離物 2	32			
ストレプトコッカス・アガラクチア	単離物 3	32	大腸菌	単離物 1	> 64
ストレプトコッカス・アガラクチア	単離物 4	32	大腸菌	単離物 2	> 64
			大腸菌	単離物 3	> 64
			大腸菌	単離物 4	> 64
			大腸菌	単離物 5	> 64
肺炎球菌	単離物 1	16	アシネトバクター・パウマンニ	単離物 1	> 64
肺炎球菌	単離物 2	16	アシネトバクター・パウマンニ	単離物 2	> 64
肺炎球菌	単離物 3	16	アシネトバクター・パウマンニ	単離物 3	> 64
肺炎球菌	単離物 4	32	アシネトバクター・パウマンニ	単離物 4	> 64
肺炎球菌	単離物 5	16	アシネトバクター・パウマンニ	単離物 5	> 64
肺炎球菌(MDR)	単離物 1	32	アシネトバクター・パウマンニ	単離物 5	> 64
肺炎球菌(MDR)	単離物 2	32	アシネトバクター・パウマンニ	単離物 5+	> 64
肺炎球菌(MDR)	単離物 3	16	アシネトバクター・パウマンニ	レセルビン	

<sup>a</sup> 生物体および関連抗生物質耐性表現型が提供される(括弧中) ; メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA) ; バンコマイシン中程度感受性黄色ブドウ球菌(VISA) ; バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA) ; 多剤耐性肺炎球菌(MDR) ; バンコマイシン耐性フェシウム菌(VRE)。

<sup>b</sup> 黄色ブドウ球菌およびストレプトコッカス・ボビスを除いて、全ての株は、臨床血液単離物であった；USA型(U.S.MRSA系列)は、米国疾病予防管理センターから入手；黄色ブドウ球菌株UAMS-1は、臨床骨髄炎単離物；単離物NRS1、NRS3、VRS1およびVRS10は、黄色ブドウ球菌(NARSA)抗菌剤耐性ネットワーク(Network of Animalicicrobial Resistance in Staphylococcus aureus(NARSA))から入手；ストレプトコッカス・ボビス株ATCC49147は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)から入手。

<sup>c</sup> 各黄色ブドウ球菌単離物は、5回試験した；他の生物体は、2回試験した。

<sup>d</sup> 最小阻止濃度(MIC)は、Clinical and Laboratory Standards institute(CLSI)の抗菌薬感受性試験のガイドラインに従って測定した。黄色ブドウ球菌MRSA単離物は、後でより正確に測定した。

## 【0124】

表1に示すように、RNPA1000は、特徴が十分明らかにされた2つの遺伝子型の異なる黄色ブドウ球菌単離物のUAMS-1(臨床的骨髄炎単離物; MIC 26  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )およびUSA300-0114[米国市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染(MRSA)の主要原因; MIC 23  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]、ならびに米国中に蔓延している代表的な他の主要MRSA系統(McDougall et al., J Clin Microbiol, 41: 5113-5120(2003)、参照)、に対し中等度の抗菌活性を示した。同様に、RNPA1000は、バンコマイシン中程度感受性黄色ブドウ球菌(VISA)およびバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)に対しても、抗菌活

10

20

30

40

50

性を示した。時間 - 殺菌アッセイは、R N P A 1 0 0 0 が静菌剤として作用し（図7、パネルA）、パンコマイシン、ダプトマイシン、またはリファンピシン、等の他の抗ブドウ球菌薬剤の抗菌活性には影響を与えないが（データは示さず）、オキサシリンの効力を少々増加させる（図7、パネルBおよびC）ことを示した。R n p A 阻害剤は、また、表皮ブドウ球菌、抗生物質感受性および多剤耐性の肺炎球菌、化膿性連鎖球菌、ストレプトコッカス・アガラクチア、およびセレウス菌に対し抗菌活性を示した。R N P A 1 0 0 0 は、また、フェカリス菌、フェシウム菌およびパンコマイシン耐性フェシウム菌（V R E）に対し少しの活性を示したが、大腸菌またはアシнетバクター・バウマンニの増殖に影響を与えたかった（表1）。後者は予測されていたが、これは、大腸菌とアシнетバクター・バウマンニのR n p A が、黄色ブドウ球菌R n p A に対して、限定されたアミノ酸同一性（それぞれ、24%と26%）を有している（図8）ことが理由である。さらに、本発明者らのアッセイ条件では、精製されたアシнетバクター・バウマンニR n p A は、リボ核酸分解活性を示さなかった（データは示さず）。R N P A 1 0 0 0 に対する腸球菌の感受性は、エフラックスピンブ阻害薬レセルビンの存在下、M I C 64 μ g / m l から32 μ g / m l まで高まり、腸球菌が、R n p A 阻害剤に対し本質的に感受性があることを示唆している。逆に、エフラック阻害薬は、アシнетバクター・バウマンニR N P A 1 0 0 0 感受性に対し効果を及ぼさなかった（表1）。まとめると、これらの結果は、細菌のR N P A 1 0 0 0 感受性は、黄色ブドウ球菌R n p A に対するアミノ酸類似性および酵素のRNA分解活性に相関することを示す。

## 【0125】

黄色ブドウ球菌のR N P A 1 0 0 0 に対する感受性が、細胞性R n p A の抑制に起因するか否かを評価するために、阻害濃度以下のR n p A 阻害剤（0.5 X M I C ）に暴露された黄色ブドウ球菌のm RNA代謝回転特性を直接測定した。処理の30分後、モック処理された細胞に比較して、R N P A 1 0 0 0 は、黄色ブドウ球菌細胞のm RNA分解速度を低減させた（図5A）。従って、R n p A 阻害化合物は、おそらく、酵素の細胞機能を制限することにより、細胞性m RNA分解を低減させるとと思われる。R N P A 1 0 0 0 処理細胞のm RNA代謝回転特性は、R n p A 枯渇細胞に似ており（図2E）、薬剤が酵素に影響を与えることができるることを示唆する。R N P A 1 0 0 0 の抗菌効果が、R n p A の細胞阻害により媒介されるか否かをより直接決定するために、黄色ブドウ球菌R n p A 過剰産生および過少産生細胞のR N P A 1 0 0 0 感受性を評価した。黄色ブドウ球菌含有ベクター、またはC d C 1<sub>2</sub>誘導性プロモーター制御下の野性型r n p A m RNAもしくはr n p A アンチセンスRNAのプラスミドコピーを、2.5 μ Mの誘導因子および漸増濃度のR N P A 1 0 0 0 の存在下、増殖させた。上述のように、この濃度の塩化カドミウムは、R n p A タンパク質の発現の緩やかな変化（R n p A 過剰産生または過少産生）を誘導するが、十分に緩やかなので、細胞増殖は影響を受けない。図5Bに示すように、ベクター含有細胞およびR n p A 過剰産生細胞の両方は、32 μ g m l<sup>-1</sup>のM I C を示し、他方、R n p A 過少産生細胞のM I C は、8 μ g m l<sup>-1</sup>であった。後者は、黄色ブドウ球菌のR N P A 1 0 0 0 感受性が、細胞性R n p A レベルに相関し、薬剤の抗菌作用様式は、一部は、R n p A 依存性であることを示す。

## 【0126】

## 実施例5：細胞傷害性アッセイ

次に、効果的細菌M I C 値（10～50 μ g / m l ）に対応するR n p A 阻害剤濃度が、ヒトの細胞傷害を誘導するか否かを評価した。H e p G 2ヒト肝細胞（10<sup>5</sup> 細胞）を、マイクロタイタープレートの個別ウエルに播種し、5%二酸化炭素下、10%胎仔ウシ血清を補充したダルベッコ変法イーグル培地中で、37℃で16時間、インキュベートした。細胞をマイトイマイシンC（5 μ g / m l ; 陽性対照）または、0、25、もしくは50 μ g / m l R N P A 1 0 0 0 に、24もしくは48時間、暴露した。メーカーの推奨（アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関；M a n a s s a s 、V A ）に従い、代謝的に活性な細胞内でのテトラゾリウム塩（M T T ）の添加、および続けて還元後、分光測定（570 nm ）により細胞生存率を測定した。

10

20

30

40

50

## 【0127】

MTT細胞増殖アッセイ測定により、24時間のRnPA阻害剤暴露は、試験したいずれの濃度でも、ヒトHepG2細胞毒性を引き起こさなかったことが示された（データは示さず）。しかし、長期RNP1000暴露（48時間）は、25μg/mlの濃度で緩やかな細胞傷害性を誘発し、この値は、大部分のMRSA系統の最小阻害濃度に匹敵し（図4A）、さらに高い濃度は、毒性増加を示した（データは示さず）。

## 【0128】

実施例6：バイオフィルム関連細菌に対するRnPA阻害剤の抗菌性有効性

黄色ブドウ球菌の細菌病原体としての成功は、移植された医用装置表面でのバイオフィルム形成能力に部分的に起因しており、おそらく、これが二次宿主部位への細菌転移のための病巣を提供するのである。バイオフィルム関連感染の治療における複雑な問題の1つは、バイオフィルム産生細菌は、抗生素質治療に対し本質的に抵抗性である事である。例えば、1つの最近のインビトロ調査では、本来各抗生素質に対し感受性であった株を使ったにもかかわらず、5X MICのダプトマイシン、リネゾリド、またはバンコマイシンは、24時間処理後にバイオフィルム関連細菌を210g未満に減らすことができず、3日間にわたり20X MICを投与した場合でも、これらの抗生素質のいずれも、バイオフィルム関連黄色ブドウ球菌を除去できなかつことを示した（Weiss et al.、Antimicrob Agents Chemother、53:2475-2482(2009)、参照）。転写プロファイリング調査により、生理学的にユニークであるにもかかわらず、バイオフィルム関連黄色ブドウ球菌は、プランクトン様の定常期細胞に似ていることを示した（Beenken et al.、J Bacteriol、186:4665-4684(2004)、参照）。実際、定常期細菌と同様に、rnpA発現は、対数期細胞に比べて、黄色ブドウ球菌バイオフィルム関連細菌およびバイオフィルム離脱細菌において、それぞれ、4.3および6.2倍減少した（Dunman and Horwitz、未発表）。低レベルのRnPAは、バイオフィルム関連細菌内に存在する可能性があるので、より少ないRnPA阻害分子で、タンパク質の機能、従って、抗菌活性を妨害するのに充分である可能性がある。従って、バイオフィルム関連黄色ブドウ球菌は、RNPA1000等のRnPA阻害剤に対しかなりの感受性を示す可能性がある。

## 【0129】

これを確定するために、Antimicrob Agents Chemother、53:2475-2482(2009)に記載のように、インビトロバイオフィルムアッセイを行った。簡単に述べれば、14ゲージのフッ素化エチレンプロピレンIntrocan Safety Catheters(B.Braun、Bethlehem、PA)の1cmの断片をヒト血漿でコートし、2mlのバイオフィルム培地および0.05の最終OD<sub>600nm</sub>の黄色ブドウ球菌株UAMS-1を含む12ウェルマイクロタイヤープレートの個別ウェル中に置いた。37℃で一晩インキュベーション後、カテーテルを取り出し、磷酸塩緩衝食塩水(PBS)で洗浄し、黄色ブドウ球菌に対するMICの0、5、10、または20倍のRNPA1000を含む新しいバイオフィルム培地に移した。各用量(n=3)に暴露されたカテーテルを、毎日置換された培地と一緒に、3日間にわたり毎日回収した。各回収時点後に、カテーテルをPBSで洗浄し、付着細菌を超音波処理および平板培養により数えた。対数変換細菌計算データの分散分析(ANOVA)を使って、RNPA1000暴露の効果を評価した。

## 【0130】

図4Cに示すように、バイオフィルム関連黄色ブドウ球菌の5X MICのRNPA1000による24時間処理により、細菌負荷量の310gの減少が生じ、短期暴露の間、この薬剤は、より強力とはいわないまでも、ダプトマイシン、バンコマイシン、またはリネゾリドと同等であることを示唆している。さらに、細菌の除去は実現されなかったものの、暴露時間を延ばすかまたはRNPA1000濃度を増やすことにより、抗菌活性が高められた。最大RNPA1000抗菌効力(バイオフィルム関連細菌が510g減少)は

10

20

30

40

50

、同じモデルと条件で評価した市販の抗生物質の活性（610g減少のダブトマイシン、510g減少のリネゾリド；410g減少のバンコマイシン）と遜色無かった（Weiss et al.、Antimicrob Agents Chemother、53：2475-2482（2009）、参照）。まとめると、これらの結果は、RnPAが、黄色ブドウ球菌バイオフィルム維持において重要な生物学的役割を果たしていること、および対応する阻害剤は、バイオフィルム関連感染の治療に幅広い治療的有用性を有する可能性があることを示唆している。

#### 【0131】

##### 実施例7：急性致死感染モデル

RNPA1000は、短期HepG2暴露で無毒性であり、長期HepG2暴露でほんのわずかな毒性であったために、RnPA阻害分子が全身性マウス感染モデルに有効であるか否かを評価するための適切なツールとして使用可能である。雌5～6週齢のCD-1マウスに、野生型黄色ブドウ球菌株Smithを腹腔内の注射（0.5ml）により投与し、 $4.55 \times 10^5$ コロニー形成単位/動物の最終的接種（10-100LD<sub>50</sub>sに等価）が得られ、接種後24時間以内に非処理対照動物（N=5）の死亡を生じた。RNPA1000をDMSOおよびPEG400の1：1混合物中に可溶化し；バンコマイシンを水で調製した。動物（5匹/用量群）に、感染の30分後、皮下注射（0.2ml）により、それぞれ16、64、および256mg/kgまたは0.25、1、4、および16mg/kgの、RNPA1000またはバンコマイシンを投与した。全調査期間（5日）にわたり、未処置、単一用量のバンコマイシンを受けた、またはRnPA阻害剤を受けた動物のパーセント生存を毎日記録した。結果を表2および図4Bに示す。

#### 【0132】

##### 【表2】

用量(mg/kg)	%生存		
	RNPA1000	バンコマイシン	RNPA1000(単独)
0	0	0	100(2)
0.25	-	0	-
1	-	100	-
4	-	100	-
16	20; 20(2)	100	100(2)
64	40; 20(2)	-	100(2)
256	60; 40; 60(3)	-	100(2)

#### 【0133】

パーセント生存は、腹腔内の黄色ブドウ球菌注射およびRNPA1000投与の5日後の生存動物を意味する。括弧内の数字は、実験の繰り返し回数を示す。非処理対照マウスの各メンバーは、細菌接種24時間以内に死亡した（0mg/kg）。バンコマイシンは、陽性対照として使った。

#### 【0134】

図4Bに示すように、RNPA1000の皮下注射は、CD-1マウスの腹腔内へ注射（ $4.55 \times 10^5$ cfu/動物）した野生型黄色ブドウ球菌の致死の効果を制限した。この細菌接種（10-100LD<sub>50</sub>sに等価）は、非処理対照動物の24時間以内の100%死亡を生じたが、RNPA1000は、用量依存性方式で保護を提供した。最大RnPA阻害剤用量（256mg/kg）の投与は、再現性よく、50%生存を生じ、一方、128mg/kgおよび64mg/kgは、全調査期間にわたり、それぞれ30%および20%の生存を生じた（図4B；表2）。特に、化合物（単独）の投与計画は、いずれの試験濃度でも動物生存に影響を与えたなかった（32mg/kg、64mg/kg、128mg/kg、256mg/kg；表2）。まとめると、これらの結果は、RNPA1000は、64～256mg/kgの中程度の有効量（ED<sub>50</sub>）で、黄色ブドウ球菌感染の急性致死モデル中の細菌の病原性を制限することを示唆している。従って、RNPA1000が、より強力な誘導体の医薬化学に基づく生成用のプラットフォームと見なすこと

10

20

30

40

50

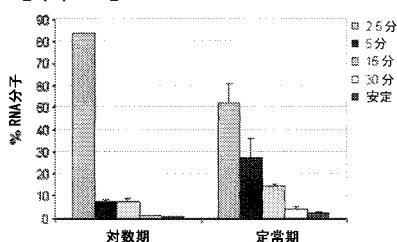
ができるよう。これらの結果は、また、RnpA阻害薬剤が全身性マウス感染モデルに有効であるというコンセプト、およびRNPA1000が、感染プロセスに対するRnpAの寄与に関する研究のツールであるというコンセプトに証拠を提供する。

### 【0135】

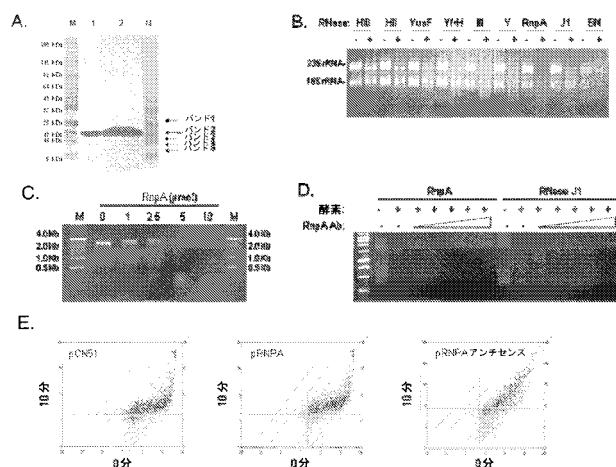
添付の特許請求の範囲の化合物および方法は、本明細書記載の特定の化合物および方法により範囲を限定されることはなく、これらは、添付の特許請求の範囲の少數の態様の例示として意図されており、また、機能的に等価ないずれの化合物および方法も、本開示の範囲内にある。示されたおよび本明細書記載のものに加えて、化合物および方法の種々の改変も、添付の特許請求の範囲内に入ることが意図されている。さらに、ある代表的な化合物、方法、およびこれらの化合物の態様および方法のみが、具体的に記載されているが、他の化合物および方法ならびに化合物および方法の種々の特徴の組み合わせも、たとえ、具体的に説明されていなくても、添付の特許請求の範囲内に入ることが意図されている。従って、工程、要素、成分、または構成部分の組み合わせは、本明細書で明示的に述べることができるが、たとえ明示的に述べられていなくても、他の全ての工程、要素、成分、または構成部分の組み合わせも、含まれる。

10

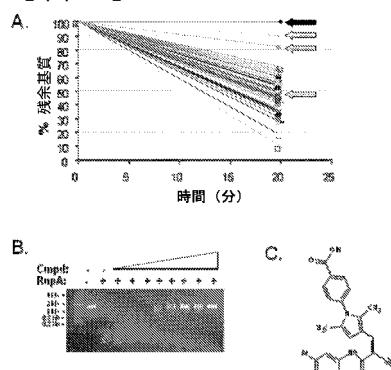
【図1】



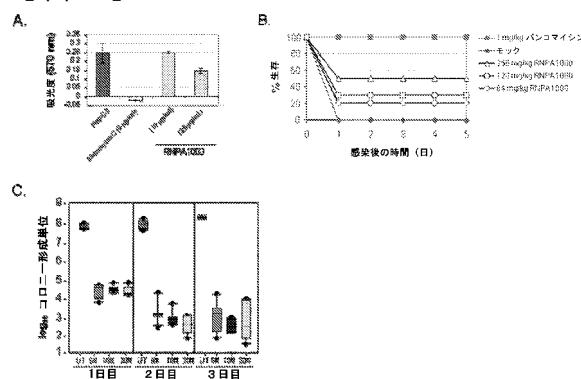
【図2】



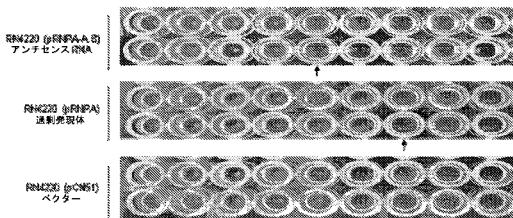
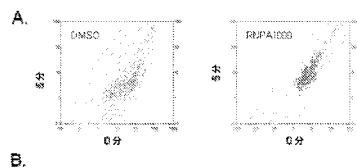
【図3】



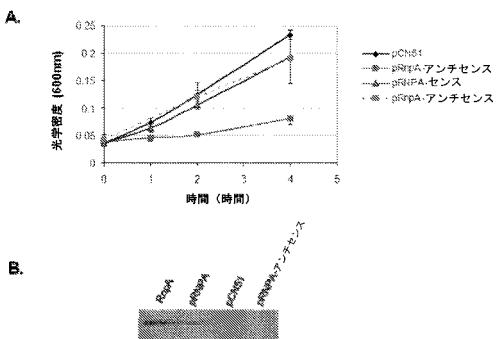
【図4】



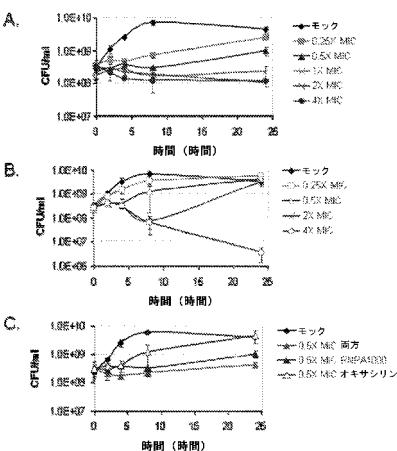
【図5】



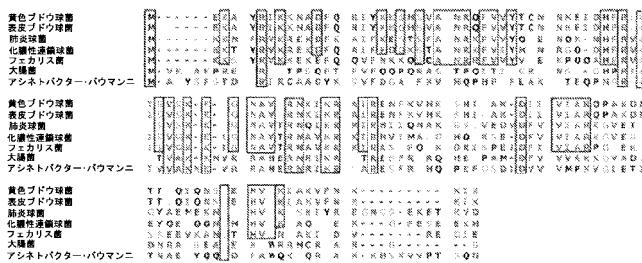
【図6】



【図7】



【図8】



## 【配列表】

2014510717000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成25年9月27日(2013.9.27)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

## 【配列表】

2014510717000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/22662
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 31/497; C07D 403/00 (2012.01) USPC - 514/253.01 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 31/497; C07D 403/00 (2012.01) USPC: 514/253.01		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8): C07D 403/00 (2012.01) USPC: 544/364		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST, PGPB, USPT, EPAB, JPAB, SureChem, PubChem, Dialog RNase inhibitor, bacterial ribonuclease inhibitor, drug resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , biofilm-associated <i>Staphylococcus aureus</i> infection, RnpA inhibitor, <i>Staphylococcus aureus</i> RNase P is RnpA, pyrrole		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0180889.A1 (SUTO et al.) 16 September 2004 (16.09.2004) para [0178], Table 1	16-17
Y		..... 1-10
Y	US 2003/0134904 A1 (GIORDANO et al.) 17 July 2003 (17.07.2003) para [0008]-[0012], [0087], [0162]-[0163], [0165]	1-10
Y	US 6,936,432 B2 (GOPALAN et al.) 30 August 2005 (30.08.2005) col 1, ln 58 to col 2, ln 8	1-10
Y	US 2002/0123077 A1 (OTTOOLE et al.) 5 September 2002 (05.09.2002) para [0106]	7, 10/7
Y	PubChem CID 1268985 <a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1268985&amp;loc=ec_rcs">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1268985&amp;loc=ec_rcs</a> . Retrieved 16 April 2012 Create Date: 2005-07-10	9, 10/9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  2 July 2012 (02.07.2012)	Date of mailing of the international search report  17 JUL 2012	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/22662
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li>      <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</li>      <li>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 14-15 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>		
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>Group I: claims 1-10 and 16-17 drawn to a method of treating or preventing a microbial infection in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of an RNase inhibitor of the structure represented in Claim 1.</p> <p>Group II: claims 11-13 and 16-17 drawn to a method of inhibiting a bacterial ribonuclease comprising contacting the bacterial ribonuclease with an effective amount of an RNase inhibitor of the structure represented in Claim 11.</p> <p>- Please see extra sheet for continuation -</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li>      <li>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-10, 16-17</li> </ol>		
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 12/22662
--

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Group III: claim18, drawn to a method of identifying a compound for treating or preventing a microbial infection, comprising the steps of:  
a) combining RNA, RnpA, and a fluorescent dye to form a mixture;  
b) contacting the mixture with the compound; and  
c) monitoring RnpA-mediated total bacterial RNA degradation in the cell using fluorescence, wherein decreased fluorescence, as compared to a control, indicates RNA degradation,  
wherein a compound that decreases the RnpA-mediated total bacterial RNA degradation, as compared to a control, is identified as the compound for treating or preventing the microbial infection.

The inventions listed as Groups I through III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group I-II do not include the inventive concept of a method of identifying a compound for treating or preventing a microbial infection, as required by Group III.

The inventions of Group I and III do not include the inventive concept of a method of inhibiting a bacterial ribonuclease, as required by Group II.

The Inventions of Groups I-III share the technical feature of an RNase inhibitor. The Inventions of Groups II-III share the technical feature of a bacterial ribonuclease inhibitor. The Inventions of Groups I and III share the technical feature of preventing the microbial infection. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2005/0187409 A1 to Powers et al. (hereinafter 'Powers'). Powers discloses a method of treating or preventing a microbial infection in a subject, comprising administering to the subject an effective amount of a bacterial RNase inhibitor (para [0006], [0008] and [0088]-[0089]). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition, the inventions of Groups I and II share the technical feature of the specific formula recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because CID 1268985 (retrieved from <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1268985> on 17 April 2012) (Create Date 2005-07-10) teaches the compound represented in Claim 9. As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I-III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 D 207/337 (2006.01)	C 0 7 D 207/337	C S P
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

- (71) 出願人 513188055  
 テンプル ユニバーシティ - オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイアー エデュケーション  
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 フィラデルフィア ノース ブロード ストリート 180  
 1 ブロード アンド モントゴメリ アベニュー
- (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志
- (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫
- (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝
- (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊
- (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一
- (74) 代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光
- (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一
- (74) 代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦
- (74) 代理人 100130845  
 弁理士 渡邊 伸一
- (74) 代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人
- (74) 代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘
- (74) 代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥
- (72) 発明者 ダンマン ポール エム.  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ピッツフォード ウエスト ブルームフィールド ロード 6  
 95
- (72) 発明者 オルソン パトリック ディー.  
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス マクファーソン アベニュー 4228 #312
- (72) 発明者 チルダース ウェイン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ニュー ホーブ ヒルサイド レーン 4

F ターム(参考) 4B050 CC00 DD02 KK11 LL03

4B063 QA18 QQ34 QQ52 QR14 QR35 QR66 QS02 QX02

4C069 AC05 AC06 BA01 BB03 BB08 BB48 BB52 BB56

4C086 AA01 AA02 AA03 BC05 MA01 MA04 NA14 ZB35 ZC20