

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 91118704

※ 申請日期： 97.5.21

※IPC 分類：~~C07D~~ A61K^{31/4196}(2006.01),
C07D 249/08 (2006.01),
A61P^{31/04} (2006.01),
A61P^{11/00} (2006.01),

一、發明名稱：(中文/英文)

使用化合物I來預防或治療生物膜的形成

USE OF COMPOUND I TO PREVENT OR TREAT BIOFILM FORMATION

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商諾華公司

NOVARTIS AG

代表人：(中文/英文)

1. 美樂蒂 K 戴斯

DICE, MELODI K.

2. 艾莉莎 A 哈賓

HARBIN, ALISAA.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士巴塞爾市利曲街35號

LICHTSTRASSE 35, 4056 BASEL, SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

大衛 雷德

REID, DAVID

國 籍：(中文/英文)

英國 U.K.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年05月22日；07108650.8
- 2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於式4-[3,5-雙-(2-羥苯基)-[1,2,4]-三唑-1-基]苯甲酸之化合物(式I化合物)抑制或破壞在患有致命遺傳病症囊腫性纖維化之個體的肺中所遭遇之環境條件種類下細菌綠膿桿菌形成生物膜之用途。

【先前技術】

囊腫性纖維化為最常見縮短壽命、兒童期發作之遺傳疾病之一。在美國，發病率為1000個中1例。在澳大利亞之維多利亞，發病率為3600個中1例。在意大利北部，發病率為4300個中1例。其在歐洲人及德系猶太人(Ashkenazi Jews)中最為常見；歐洲血統每二十二個人中便有一個攜帶一種囊腫性纖維化(CF)基因，使得其為他們中最常見之遺傳疾病。

囊腫性纖維化，縮寫為CF，亦稱為膠稠性黏液病(mucoviscidosis)，為影響整個身體、引起進行性失能及早期死亡之遺傳疾病。以前稱為胰腺囊腫性纖維化，此實體已日益地被簡稱為"囊腫性纖維化"。CF係由叫做囊腫性纖維化跨膜傳導調節因子(CFTR)之基因發生突變所引發。此基因之產物有助於產生汗液、消化液及黏液。儘管大多數無CF之人具有CFTR基因之兩個工作複本(working copies)，但僅需要一個以預防囊腫性纖維化。當兩個基因均不正常工作時發生CF。因此，將CF視為體染色體隱性疾病(autosomal recessive disease)。名稱囊腫性纖維化係

指特徵'纖維化'(組織結癥)及胰腺中囊腫形成，在20世紀30年代首次識別。呼吸困難及胰腺中酵素產生不足為最常見之症狀。稠黏液產生以及低免疫系統導致頻繁肺感染，其藉由經口及靜脈內抗生素及其他藥物來治療，但並不總能被治癒。

具有囊腫性纖維化之個體的肺自早年就被細菌拓殖且感染。此等經常在具有CF之個體中傳播之細菌在改變之黏液中旺盛生長，而黏液在肺之小氣管中聚集。此黏液促使形成細菌微環境，例如生物膜，其使免疫細胞及抗生素難以穿透。肺藉由逐步重塑下呼吸道(例如支氣管擴張)來回應黏稠分泌及慢性感染所引起的重複損害，從而使得感染更難以得到消除。隨時間流逝，在具有CF之個體中細菌類型及其個體特徵均改變。最初，諸如金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及流行性感冒嗜血桿菌(*Hemophilus influenzae*)之常見細菌拓殖及感染肺。然而最終，綠膿桿菌及有時洋蔥伯克霍爾德菌(*Burkholderia cepacia*)佔優勢。一旦在肺中，此等細菌即適應於環境且對通常所用之抗生素產生抗性。綠膿桿菌(*Pseudomonas*)可產生允許形成大菌落之特定特徵，此等菌株稱為"類黏蛋白(mucoïd)"綠膿桿菌且很少見於不具有囊腫性纖維化之人中。

生物膜為具有不同結構之微生物的聚集體。生物膜像一個微小的城市，其中各自僅為1微米或2微米長之微生物細胞形成可達數百微米高之塔。各塔之間的"街道"事實上為流體填充之通道，其引入營養素、氧及活生物膜群落之其

他必需品。

生物膜形成於導管線及隱形眼睛之表面上。其生長於節律器、心瓣膜置換件、人造關節及其他外科手術植入物上。疾病控制中心(CDC)估計65%以上院內(醫院獲得性)感染係由生物膜所引發。

生長於生物膜中之細菌對抗生素具有高度抗性，比非生長於生物膜中之相同細菌之抗性大至多1,000倍。標準抗生素療法經常為無用的且唯一幫助可能為移除受污染之植入物。

綠膿桿菌為具有單極運動性之革蘭氏(Gram)陰性需氧桿狀細菌。機會性人類病原體綠膿桿菌亦為植物之機會性病原體。

綠膿桿菌對許多抗生素具有天然抗性且在失敗治療之後尤其經由孔蛋白(porin)改質可證明額外抗性。可能通常應根據實驗敏感性而非憑經驗選擇抗生素來指導治療。若憑經驗起動抗生素，則應盡每份努力以獲得培養物且當培養結果可得時應評述所用抗生素之選擇。

具有抵抗綠膿桿菌之活性的抗生素包括胺基糖苷，例如建它黴素(gentamicin)、阿米卡星(amikacin)、妥布黴素(tobramycin)；喹諾酮，例如環丙沙星(ciprofloxacin)及左氧氟沙星(levofloxacin)；頭孢菌素，例如頭孢他啶(ceftazidime)、頭孢吡肟(cefepime)、頭孢匹羅(cefpirome)；脲基盤尼西林(ureidopenicilline)，諸如哌拉西林(piperacillin)、替卡西林(ticarcillin)；碳青黴烯類(carbapenem)，諸如美羅培

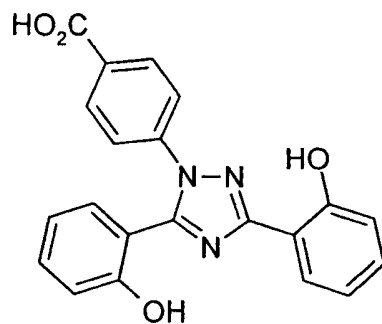
南 (meropenem)、亞胺培南 (imipenem)；多黏菌素 (polymyxin)，諸如多黏菌素B、黏菌素 (colistin)；及單環 β -內醯胺類 (monobactams)，諸如胺曲南 (aztreonam)。

細菌綠膿桿菌為人類疾病中之多用途及有疑問病原體。其在呼吸道中引起社區性及院內肺炎(後者係與支氣管擴張患者之高死亡率相關)且為患有遺傳病症囊腫性纖維化(縮寫為CF)之患者中的主要病原體。其亦在灼傷及缺血傷口中引起感染且常常污染醫學裝置。因為生物體可接受生物膜存在，所以許多綠膿桿菌感染對習知療法亦即抗生素具有抗性。舉例而言，在CF中，綠膿桿菌在肺黏液中生長為外多醣 (exopolysaccharide) 嵌埋小菌落。在此等條件下，藉由諸如由生物膜之緩慢擴散造成之局部降低氧張力之因素，對抗生素之抗性得以增強。此等因素一起使得慢性生物膜相關感染中之綠膿桿菌幾乎不可能得到治療。

因此需要新穎策略以治療慢性綠膿桿菌感染且消除例如CF患者中之生物膜，例如綠膿桿菌生物膜。

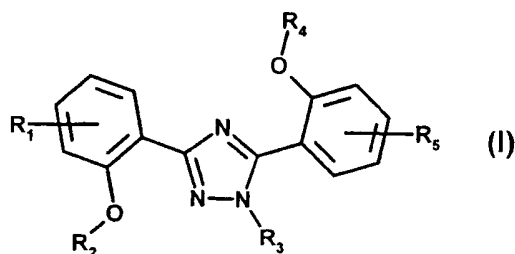
式I化合物，例如化合物I可用以例如在囊腫性纖維化患者中消除生物膜，例如綠膿桿菌之生物膜形成，及/或例如在CF患者中治療綠膿桿菌之生物膜形成。

在美國專利第6,465,504 B1號中揭示呈游離酸形式、其鹽及其結晶形式之如下所述式I化合物，及化合物I，亦即具有下式之4-[3,5-雙-(2-羥苯基)-[1,2,4]-三唑-1-基]苯甲酸。



【發明內容】

本發明因此在一態樣中係關於通式 I 之鐵螯合劑的用途，



其中

R_1 與 R_5 同時或彼此獨立地為氫、鹵素、羥基、低碳烷基、鹵-低碳烷基、低碳烷氧基、鹵-低碳烷氧基、羧基、胺甲醯基、N-低碳烷基胺甲醯基、N,N-二低碳烷基胺甲醯基或脞；

R_2 與 R_4 同時或彼此獨立地為氫、未經取代或經取代之低碳烷醯基或芳醯基，或在生理條件下可移除之基團，例如保護基團；

R_3 為氫、低碳烷基、羥基-低碳烷基、鹵-低碳烷基、羧基-低碳烷基、低碳烷氧基羧基-低碳烷基、 $R_6R_7N-C(O)$ -低碳烷基、未經取代或經取代之芳基或芳基-低碳烷基或未

經取代或經取代之雜芳基或雜芳烷基；

R_6 與 R_7 同時或彼此獨立地為氫、低碳烷基、羥基-低碳烷基、烷氧基-低碳烷基、羥基烷氧基-低碳烷基、胺基-低碳烷基、N-低碳烷基胺基-低碳烷基、N,N-二低碳烷基胺基-低碳烷基、N-(羥基-低碳烷基)胺基-低碳烷基、N,N-二(羥基-低碳烷基)胺基-低碳烷基，或連同其鍵結之氮原子一起形成氮雜脂環；或其醫藥學上可接受之鹽；其用於治療綠膿桿菌之生物膜。

本發明較佳係關於上述用途，其包含至少一種式(I)化合物，其中

R_1 與 R_5 同時或彼此獨立地為氫、鹵素、羥基、低碳烷基、鹵-低碳烷基、低碳烷氧基或鹵-低碳烷氧基； R_2 與 R_4 同時或彼此獨立地為氫或在生理條件下可移除之基團； R_3 為低碳烷基、羥基-低碳烷基、羧基-低碳烷基、低碳烷氧基羧基-低碳烷基、 $R_6R_7N-C(O)$ -低碳烷基、經取代芳基、芳基-低碳烷基、經取代之N-低碳烷基胺基、N,N-二低碳烷基胺基或N-吡咯啉基(pyrrolidino)，或未經取代或經取代之雜芳基或雜芳烷基； R_6 與 R_7 同時或彼此獨立地為氫、低碳烷基、羥基-低碳烷基、烷氧基-低碳烷基、羥基烷氧基-低碳烷基、胺基-低碳烷基、N-低碳烷基胺基-低碳烷基、N,N-二低碳烷基胺基-低碳烷基、N-(羥基-低碳烷基)胺基-低碳烷基、N,N-二(羥基-低碳烷基)胺基-低碳烷基，或連同其鍵結之氮一起形成氮雜脂環；及其鹽；及至少一種醫藥學上可接受之載劑，及其製備方法。

較佳在上述用途中，較佳之式I化合物為4-[3,5-雙(2-羥苯基)-[1,2,4]三唑-1-基]苯甲酸或醫藥學上可接受之鹽。

可如(例如)美國專利第6,596,750 B2號或US 6,465,504 B1或EP 0914118中所述來製備式I化合物。

鹵素為(例如)氯、溴或氟，但亦可為碘。

字首"低碳"表示具有不多於7個且詳言之不多於4個碳原子之基團。

烷基為直鏈或支鏈。例如低碳烷基本身或作為例如低碳烷氧基、低碳烷基胺、低碳烷醯基、低碳烷基胺基羰基之其他基團的成份時，其可未經取代或經(例如)鹵素、羥基、低碳烷氧基、三氟甲基、環低碳烷基、氮雜脂環基或苯基所取代，其較佳未經取代或經羥基取代。

低碳烷基例如為正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、新戊基、正己基或正庚基，較佳為甲基、乙基及正丙基。鹵-低碳烷基為經鹵素，較佳氯或氟，詳言之經至多三個氯或氟原子取代之低碳烷基。

低碳烷氧基例如為正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、異丁氧基、第二丁氧基、第三丁氧基、正戊氧基、異戊氧基，較佳為甲氧基及乙氧基。鹵-低碳烷氧基為經鹵素，較佳氯或氟，詳言之經至多三個氯或氟原子取代之低碳烷氧基。

胺甲醯基為基團 $H_2N-C(O)-$ ，N-低碳烷基胺甲醯基為低碳烷基 $-HN-C(O)-$ 且N,N-二低碳烷基胺甲醯基為二低碳烷

基 -N-C(O)-。

低碳烷醯基為HC(O)-及低碳烷基-C(O)-，且例如為乙醯基、丙醯基、丁醯基或三甲基乙醯基。

低碳烷氧基羰基表示基團低碳烷基-O-C(O)-，且例如為正丙氧羰基、異丙氧羰基、正丁氧羰基、異丁氧羰基、第二丁氧羰基、第三丁氧羰基、正戊氧羰基、異戊氧羰基，較佳為甲氧羰基及乙氧羰基。

芳基本身(例如芳基)或作為例如芳基-低碳烷基或芳醯基之其他基團的成份例如為苯基或萘基，其經取代或未經取代。芳基較佳為未經取代或經一或多個、詳言之之一或兩個取代基所取代之苯基，該等取代基例如為低碳烷基、低碳烷氧基、羥基、硝基、鹵素、三氟甲基、羧基、低碳烷氧基羰基、胺基、N-低碳烷基胺基、N,N-二低碳烷基胺基、胺基羰基、低碳烷基胺基羰基、二低碳烷基胺基羰基、雜環烷基、雜芳基或氫基。芳基主要為未經取代之苯基或萘基，或經低碳烷基、低碳烷氧基、羥基、鹵素、羧基、低碳烷氧基羰基、N,N-二低碳烷基胺基或雜環烷基羰基取代之苯基。

芳醯基為基團芳基-C(O)-且例如為苄醯基、甲苯甲醯基、萘甲醯基或對甲氧苄醯基。

芳基-低碳烷基例如為苄基、對氯苄基、鄰氯苄基、苯基乙基、對甲苯基甲基、對二甲基胺基苄基、對二乙基胺基苄基、對氫基苄基、對吡咯啉基苄基。

雜環烷基表示具有3至8個、詳言之具有5至不多於7個環

原子之環烷基，環原子中至少一個為雜原子；氧、氮及硫為較佳。氮雜脂環基為具有3至8個、詳言之5至7個環原子之飽和環烷基，環原子中至少一者為氮原子。氮雜脂環基亦可含有其他環雜原子，例如氧、氮或硫；其例如為哌啶基、哌嗪基、嗎啉基或吡咯啶基。氮雜脂環基可未經取代或經鹵素或低碳烷基取代。如已知將經由環氮原子鍵結之氮雜脂環基(其為較佳)指定為N-哌啶基(piperidino)、N-哌嗪基(piperazino)、N-嗎啉基(morpholino)、N-吡咯啶基(pyrrolidino)等。

雜芳基本身(例如雜芳基)或作為例如雜芳基-低碳烷基之其他取代基的成份為具有3至不多於7個、詳言之5至不多於7個環原子之芳族基，環原子中至少一者為雜原子，例如吡咯基、咪唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、噻唑基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡嗪基、噁嗪基、噻嗪基、哌喃基或嘧啶基。雜芳基可經取代或未經取代。未經取代或經一或多個、詳言之1或兩個取代基所取代之雜芳基為較佳，取代基例如為低碳烷基、鹵素、三氟甲基、羧基或低碳烷氧基羰基。

雜芳基-低碳烷基表示若烷基鏈含有兩個或兩個以上碳原子，則氮原子中至少一者(較佳在末端C原子上)係經雜芳基置換之低碳烷基。

正低碳烷基胺基例如為正丙胺基、正丁胺基、異丙胺基、異丁胺基、羥基乙胺基，較佳為甲胺基及乙胺基。在N,N-二低碳烷基胺基中，烷基取代基可相同或不同。因此

N,N-二低碳烷基胺基例如為N,N-二甲胺基、N,N-二乙胺基、N,N-甲基乙基胺基、N-甲基-N-嗎啉基乙胺基、N-甲基-N-羥基乙胺基或N-甲基-N-苄基胺基。

例如在McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, London, New York (1973)中及在Methoden der organischen Chemie [Methods of organic chemistry], Houben-Weyl, 第4版, 第1571卷, Georg Thieme, Stuttgart (1974)以及在Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley, New York (1981)中描述保護基團、其引入及移除。保護基團之特徵在於其可易於移除, 亦即無不當副反應例如以溶劑分解、還原、光分解方式或者在生理條件下發生。羥基可例如以易於分裂酯或醚基團, 較佳烷醯基或芳基烷醯基酯基或環雜烷基、芳烷基或烷氧基烷基醚基團以及矽烷基酯或矽烷基醚基團, 詳言之以乙醯基或苄醯基酯或四氫吡喃基、苄基或甲氧基甲基醚之形式存在。

式(I)化合物之鹽為醫藥學上可接受之鹽, 尤其與鹼形成之鹽, 諸如適當鹼金屬或鹼土金屬鹽, 例如鈉、鉀或鎂鹽, 醫藥學上可接受之過渡金屬鹽, 諸如鋅鹽, 或與有機胺形成之鹽, 諸如環胺, 諸如單、二或三低碳烷基胺, 諸如羥基-低碳烷基胺, 例如單、二或三羥基-低碳烷基胺、羥基-低碳烷基-低碳烷基胺或聚羥基-低碳烷基胺鹽。環胺例如為嗎啉、硫代嗎啉、吡啶或吡咯啶。合適單低碳烷基胺例如為乙胺及第三丁胺; 二低碳烷基胺例如為二乙胺及

二異丙胺；且三低碳烷基胺例如為三甲胺及三乙胺。適當羥基-低碳烷基胺例如為單、二及三乙醇胺；羥基-低碳烷基-低碳烷基胺例如為N,N-二甲胺基乙醇及N,N-二乙胺基乙醇；合適聚羥基-低碳烷基胺例如為葡糖胺。在其他情況下，亦可能形成酸加成鹽，例如用強無機酸，諸如磺酸，例如硫酸、磷酸或氫鹵酸，用強有機羧酸，諸如低碳烷羧酸，例如乙酸，諸如飽和或不飽和二羧酸，例如丙二酸、順丁烯二酸或反丁烯二酸，或諸如羥基羧酸，例如酒石酸或檸檬酸，或用磺酸，諸如低碳烷烴磺酸或經取代或未經取代之苯磺酸，例如甲烷磺酸或對甲苯磺酸。具有例如羧基之酸性基及例如胺基之鹼性基的式(I)化合物亦可以內鹽之形式，亦即兩性離子形式存在，或分子之一部分可以內鹽形式存在，而另一部分以正鹽形式存在。

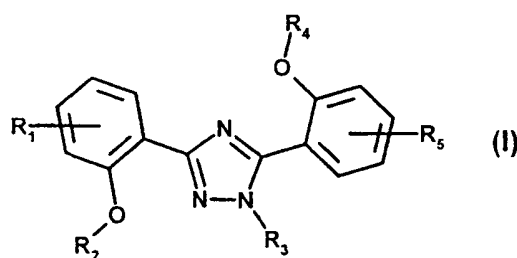
化合物(包括其鹽)亦可呈水合物或溶劑合物之形式，或其結晶可包括(例如)用於結晶之溶劑。

視起始物質及工作程序之選擇而定，式I化合物及其鹽可以例如立體異構體或互變異構體之可能異構體之一或其混合物的形式存在。在此上下文中，可得之純異構體例如為純對映異構體、純非對映異構體或純互變異構體。相應地，可存在之異構體混合物例如為外消旋體或非對映異構體混合物。以常用方式，例如基於成份之物理化學差異，以已知方式藉由分步結晶、蒸餾及/或層析法，可將呈游離形式或鹽形式之式I化合物的異構體混合物分成數個組份。有利的為分離更具活性之異構體。

因此，本發明之一態樣為治療哺乳動物中生物膜形成之治療方法。該方法利用上述鐵螯合劑類，該鐵螯合劑類先前已製備且經證實適用於治療在人類或動物體內引起過量鐵或由其引發之疾病，例如，如在US 6,596,750中所提及。

較佳之式I化合物為式(I)4-[3,5-雙(2-羥苯基)-[1,2,4]三唑-1-基]苯甲酸之化合物I或醫藥學上可接受之鹽。例如在國際專利申請案WO 2004/035026中揭示包含化合物I之藥物製劑。可根據製造商說明書來投予化合物I。

本發明係關於式I化合物之用途，



其中

R_1 與 R_5 同時或彼此獨立地為氫、鹵素、羥基、低碳烷基、鹵-低碳烷基、低碳烷氧基、鹵-低碳烷氧基、羧基、胺甲醯基、N-低碳烷基胺甲醯基、N,N-二低碳烷基胺甲醯基或脞；

R_2 與 R_4 同時或彼此獨立地為氫、未經取代或經取代之低碳烷醯基或芳醯基，或在生理條件下可移除之基團；

R_3 為氫、低碳烷基、羥基-低碳烷基、鹵-低碳烷基、羧基-低碳烷基、低碳烷氧基羧基-低碳烷基、 $R_6R_7N-C(O)$ -低

碳烷基、未經取代或經取代之芳基或芳基-低碳烷基或未經取代或經取代之雜芳基或雜芳烷基；

R_6 與 R_7 同時或彼此獨立地為氫、低碳烷基、羥基-低碳烷基、烷氧基低碳烷基、羥基烷氧基-低碳烷基、胺基-低碳烷基、N-低碳烷基胺基-低碳烷基、N,N-二低碳烷基胺基-低碳烷基、N-(羥基-低碳烷基)胺基-低碳烷基、N,N-二(羥基-低碳烷基)胺基-低碳烷基，或連同其鍵結之氮原子一起形成氮雜脂環，較佳為化合物I或其醫藥學上可接受之鹽；

且其中字首"低碳"表示具有不多於7個碳原子之基團；例如4-[3,5-雙(2-羥苯基)-[1,2,4]三唑-1-基]苯甲酸；或者與選自由以下各物組成之群的抗生素組合：胺基糖苷，例如建它黴素、阿米卡星、妥布黴素；喹諾酮，例如環丙沙星及左氧氟沙星；頭孢菌素，例如頭孢他啶、頭孢吡肟、頭孢匹羅；脲基盤尼西林，諸如哌拉西林、替卡西林；碳青黴烯類，諸如美羅培南、亞胺培南；多黏菌素，諸如多黏菌素B、黏菌素；及單環 β -內醯胺類，諸如胺曲南；例如呈固定組合之形式；

其用於以下方面：

- (1) 製備治療慢性綠膿桿菌感染之藥物、
- (2) 製備治療生物膜形成之藥物、
- (3) 製備治療綠膿桿菌之生物膜形成的藥物、
- (4) 製備治療囊腫性纖維化患者之綠膿桿菌生物膜形成的藥物、

- (5) 製備預防綠膿桿菌生物膜形成之藥物、
- (6) 製備預防囊腫性纖維化患者之綠膿桿菌生物膜形成的藥物、
- (7) 減少或消除綠膿桿菌生物膜、
- (8) 削弱(例如)綠膿桿菌之生物膜形成、
- (9) 破壞(例如)綠膿桿菌之已建立生物膜。

本發明係關於減少及/或移除例如導管之醫學裝置上生物膜形成的方法，其中將化合物I施用於該醫學裝置上。

在另一實施例中，本發明係關於式I化合物與對綠膿桿菌具有活性之抗生素的組合。本發明係關於該組合，其中抗生素係選自由以下各物組成之群：胺基糖苷，例如建它黴素、阿米卡星、妥布黴素；喹諾酮，例如環丙沙星及左氧氟沙星；頭孢菌素，例如頭孢他啶、頭孢吡肟、頭孢匹羅；脲基盤尼西林，諸如哌拉西林、替卡西林；碳青黴烯類，諸如美羅培南、亞胺培南；多黏菌素，諸如多黏菌素B、黏菌素；及單環 β -內醯胺類，諸如胺曲南。抗生素較佳為建它黴素或妥布黴素。

本發明係關於包含(a)如上所述之式I化合物，較佳4-[3,5-雙(2-羥苯基)-[1,2,4]三唑-1-基]苯甲酸，或醫藥學上可接受之鹽及(b)選自由胺基糖苷、喹諾酮、頭孢菌素、脲基盤尼西林、碳青黴烯類、多黏菌素及單環 β -內醯胺類組成之群的抗生素之組合。

在如上文所提及或定義之包含投予此兩個組份之治療溫血動物之方法、供同時、分開或連續使用之包含此兩個組

份之醫藥組合物、該組合於延遲病程或治療之用途或如上文(1)至(7)下所揭示之用途或用於製造可達成此等目的之製劑上之用途，或包含此組份(a)與(b)組合之商品中，組份(a)與(b)之任何組合在下文中均稱為"本發明之組合"，亦即以使此術語係指此等實施例中每一者，此等實施例因此適當時可改用此術語。

同時投予可(例如)以具有兩種或兩種以上活性成份之一固定組合之形式，或藉由同時投予兩種或兩種以上獨立調配之活性成份來進行。連續使用，例如投予，較佳意謂在一個時點投予組合之一或多個組份，而其他組份在不同時點投予，亦即以長期交錯方式來進行，較佳使得組合顯示比獨立投予之單一化合物具有更大之效率，例如尤其顯示協同作用。獨立使用，例如投予，較佳意謂在不同時點彼此獨立地投予組合之組份，較佳意謂投予組份(a)及(b)使得兩個化合物之可量測血液含量不以重疊方式(例如同時)存在。

【實施方式】

實例 1：

材料及方法：

對綠膿桿菌生長之作用

有或無例如在周圍血液中所達之濃度下的化合物I，在有氧(aerobic)及無氧(anaerobic)條件下，不添加鐵、添加10 μM 、30 μM 及50 μM 鐵之情況下生長。通常見於CF唾液中之鐵中值濃度為30 μM 。使用標準方法來測定對細菌生

長之作用，該標準方法包括接種等分試樣，例如500 μL 在含丁二酸鹽之最小量培養基中約 10^6 個細菌於硼矽酸鹽玻璃管(例如 12×75 mm)中，接著在例如 37°C 、於有氧及無氧條件下培育。各實驗係以一式三份之方式進行且每隔一定間隔(例如0、4、8、12、16、20及24小時)移除各硼矽酸鹽玻璃管，且將培養物在570 nm下之光學密度用作生長水平之指示。使用Anaerogen™(Oxoid)系統產生無氧培養條件。對於無氧實驗，建立平行培養物以便培養物不短暫暴露於氧，亦即七個平行培養物以允許在需要時間點取樣。

對綠膿桿菌運動性之作用

如Singh等人，Nature 2002, 417(6888): 552-5所述，例如在額外鐵存在下監測綠膿桿菌之運動性。增大且不協調之運動性係與綠膿桿菌不能活體內聚集且起始生物膜形成有關。在瓊脂中，例如不添加鐵或添加30 μM 鐵且接著在有或無化合物I之情況下，使用既定方法來進行運動性測試(例如遊動 (swimming)、群集 (swarming) 及抽動 (twitching))。

對綠膿桿菌生物膜之作用

出於此目的，使用兩個與生物膜形成之早期階段相關之短期生物膜模型：硼矽酸鹽玻璃管及蓋玻片方法。

在兩個模型中，均在有或無化合物I、在有氧或無氧條件下及在有或無添加鐵(亦即0、10、30及50 μM 鐵)之情況下研究生物膜生長。根據標準方法來觀察化合物I之抗生物膜作用，該等標準方法亦即為光學密度、共焦成像軟

體，例如 COMSTAT 程式，從而允許在 3 維透視圖中分析生物膜結構。在蓋玻片實驗中成像系統及 BacLight 活/死染色 (Molecular Probes) 之使用允許觀察對兩個細菌小菌落及生物膜結構之作用。

對綠膿桿菌抗生素抗性之作用

在有氧及無氧條件下在不存在添加鐵或存在 30 μM 鐵時、在有或無化合物 I 之情況下，例如且/或在具有變化濃度之化合物 (I) 之情況下，測定胺基糖苷建它黴素及妥布黴素之最小抑制濃度 (MIC)。

對綠膿桿菌產生毒力因子之作用

缺鐵 (iron starvation) 可誘導產生若干毒力因子。如下所述測定在存在或不存在化合物 I 之情況下化合物 I 誘導細菌毒力因子產生之潛力。

利用同時投予之化合物 I 及抗生素來研究對削弱自 CF 個體之唾液分離之臨床綠膿桿菌菌株引起之生物膜形成之影響、對破壞已建立生物膜之影響、長期流動池生物膜模型之使用。

結果：

1. 化合物 I 對生長及生物膜產生之作用

在短期硼矽酸鹽玻璃管生物膜模型中再評估化合物 I 對浮游生物生長及生物膜產生之作用。在此模型中，生物膜生長於玻璃表面上，且隨後將其染色及溶解。溶液之光學密度 (OD: 570 nm) 相應於生物膜產生水平。

使用此模型，在補充丁二酸鹽 (MMS) + 10 μM FeCl_3 之最

小量培養基中(有氧及無氧氣氛)培育(24 h, 37°C)之後測定細菌生長及生物膜水平。化合物I在MMS培養基(pH 7.0)中之低溶解度意謂有必要在0-100 μM 之低螯合劑濃度下進行初始實驗。在此等低濃度下，化合物I並不削弱有氧或無氧生長或生物膜產生(圖1)。

將化合物I溶解於界面活性劑PEG 400中，且接著將其稀釋於MMS培養基中以達成至多6695 μM 化合物I之濃度。在獨立實驗中，證實單獨界面活性劑並不影響生長或生物膜水平(數據未顯示)。較高濃度之化合物I在無氧條件下能夠顯著削弱綠膿桿菌生長及生物膜水平($P < 0.05$)，但在有氧條件下不能。藉由直接降低培養基中之鐵含量來研究化合物I是否削弱無氧生物膜產生，或其是否藉由鐵無關機制而起作用。測試在1339 μM 濃度下之化合物I以查看當培養基中鐵濃度增大時其是否繼續削弱無氧生物膜產生。當鐵含量增大時，化合物I有效性降低，表明其主作用係經由鐵螯合介導且此生物膜抑制可藉由高鐵含量(其大概使化合物I之結合能力飽和)來克服。

2. 化合物I增強綠膿桿菌對抗生素之敏感性。

針對綠膿桿菌測試兩種抗生素(通常用以治療CF個體之抗生素，妥布黴素及黏菌素)之平均抑制濃度(MIC)。此在MMS+10 μM FeCl_3 中，有或無化合物I(1339 μM)之情況下在有氧及無氧氣氛下進行(圖4)。化合物I之存在並不改變MIC。

3. 化合物I影響毒力因子之產生

迄今為止所考查之毒力因子為磷脂酶C及外毒素A(ETA)。在a)單獨MMS培養基、b)補充 $10\ \mu\text{M}\ \text{FeCl}_3$ 之MMS培養基及最終c)補充 $10\ \mu\text{M}\ \text{FeCl}_3$ 及化合物I($1339\ \mu\text{M}$)之MMS培養基中培育之後，考查此等因子在無氧條件下之產生。在補充鐵存在下，與見於無鐵之相同培養基中之彼等者相比，存在增大含量之兩個毒力因子。當添加化合物I時此增大取消，表明化合物I可干擾綠膿桿菌引起之鐵相關毒力因子產生(圖5)。

證明在CF肺中所遭遇之環境條件種類(亦即低氧張力及可用鐵)下化合物I針對綠膿桿菌之治療潛力。

1. 在無氧條件下化合物I顯著削弱綠膿桿菌生長及生物膜產生。此似乎與降低綠膿桿菌可用之鐵含量的化合物I直接有關。

2. 當對浮游生物體測試時，化合物I不改變抗生素妥布黴素及黏菌素之MIC。

3. 化合物I不刺激磷脂酶C或ETA產生，而相反地，其減少此等細菌毒力因子在鐵存在下之產生。

【圖式簡單說明】

圖1 化合物I對綠膿桿菌生長及生物膜形成之作用

評估不同濃度之化合物I對有氧及無氧(A)生長及(B)生物膜水平之作用。所用培養基為補充 $0\ \mu\text{M}$ 或 $10\ \mu\text{M}\ \text{FeCl}_3$ 之MMS，如所指示(37°C ， $24\ \text{h}$)。所示值表示每實驗3隻管之一代表性實驗之平均值 $\pm\text{SD}$ 。

圖2 高濃度化合物I對綠膿桿菌生長及生物膜形成之作用

評估不同濃度之化合物I對有氧及無氧(A)生長及(B)生物膜水平之作用。所用培養基為補充 $10\ \mu\text{M}\ \text{FeCl}_3$ 之MMS(37°C , 24 h)。所示值表示每實驗3隻管之兩個實驗之平均值 $\pm\text{SD}$ 。*表示與當無螯合劑存在時所見水平相比顯著較差之水平($P<0.05$)。

圖3 化合物I對在不同鐵含量中無氧生物膜產生之作用

在無化合物I(黑色柱)及有化合物I, $1339\ \mu\text{M}$ (灰色柱)之情況下化合物I($1339\ \mu\text{M}$)對在不同鐵濃度中生物膜產生之作用。所示值表示每實驗3隻管之一代表性實驗之平均值 $\pm\text{SD}$ 。*表示與在相同鐵含量下無化合物I之生物膜相比顯著較差之水平($P<0.05$)。

圖4 化合物I對抵抗綠膿桿菌菌株PAO1之(A)黏菌素及(B)妥布黴素之MIC的作用

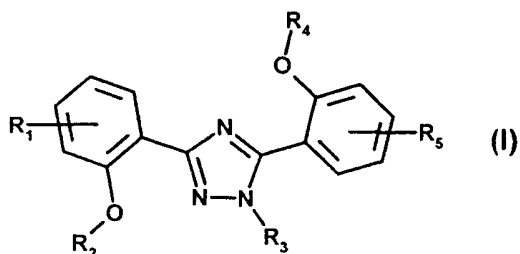
在補充化合物I($1339\ \mu\text{M}$)(實線)及無化合物I(虛線)之MMS+ $10\ \mu\text{M}\ \text{FeCl}_3$ 中測定MIC。所示值表示以一式兩份之方式測試各條件之代表性實驗之平均值 $\pm\text{SD}$ 。

圖5 化合物I對磷脂酶及外毒素A產生之作用

在無氧條件下(24 h)以如所示之鐵及化合物I($1339\ \mu\text{M}$)補充物(鐵+ICL)培育培養物。所示值表示磷脂酶脂肪酶產生水平(實驗1)及外毒素A產生之平均水平 $\pm\text{SD}$ (實驗1, 以一式兩份之方式測試各條件)。

五、中文發明摘要：

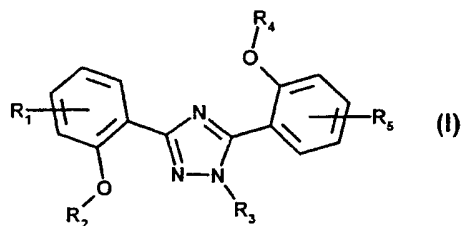
本發明係關於一種以式I化合物



較佳為4-[3,5-雙(2-羥苯基)-[1,2,4]三唑-1-基]苯甲酸或其醫藥學上可接受之鹽，於製備適用於治療例如囊腫性纖維化患者之(例如綠膿桿菌(*P. aeruginosa*))生物膜形成之藥物上的用途。

六、英文發明摘要：

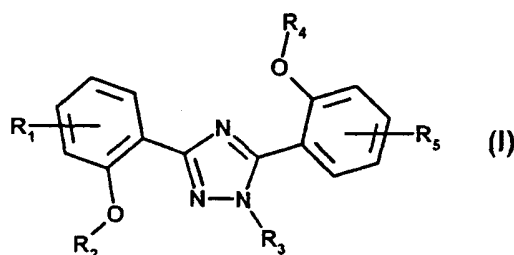
The present invention relates to the use of a Compound of formula I



, preferably 4-[3,5-bis(2-hydroxyphenyl)-[1,2,4]triazol-1-yl]benzoic acid or a pharmaceutically acceptable salt thereof for the preparation of a medicament for use in the treatment of biofilm formation, e.g. of *P. aeruginosa*, e.g. in cystic fibrosis patients.

十、申請專利範圍：

1. 一種式I化合物之用途，



其中

R_1 與 R_5 同時或彼此獨立地為氫、鹵素、羥基、低碳烷基、鹵低碳烷基、低碳烷氧基、鹵-低碳烷氧基、羧基、胺甲醯基、N-低碳烷基胺甲醯基、N,N-二低碳烷基胺甲醯基或脞；

R_2 與 R_4 同時或彼此獨立地為氫、未經取代或經取代之低碳烷醯基或芳醯基，或在生理條件下可移除之基團；

R_3 為氫、低碳烷基、羥基-低碳烷基、鹵-低碳烷基、羧基-低碳烷基、低碳烷氧基羧基-低碳烷基、 R_6R_7N -C(O)-低碳烷基、未經取代或經取代之芳基或芳基-低碳烷基或未經取代或經取代之雜芳基或雜芳烷基；

R_6 與 R_7 同時或彼此獨立地為氫、低碳烷基、羥基-低碳烷基、烷氧基低碳烷基、羥基烷氧基-低碳烷基、胺基-低碳烷基、N-低碳烷基胺基-低碳烷基、N,N-二低碳烷基胺基-低碳烷基、N-(羥基-低碳烷基)胺基-低碳烷基、N,N-二(羥基-低碳烷基)胺基-低碳烷基，或連同其鍵結之氮原子一起形成氮雜脂環；

且其中字首"低碳"表示具有不多於7個碳原子之基團；

其用於製備治療生物膜形成之藥物。

2. 如請求項1之用途，其中該式I化合物為4-[3,5-雙(2-羥苯基)-[1,2,4]三唑-1-基]苯甲酸或醫藥學上可接受之鹽。
3. 如請求項1或2之用途，其中該生物膜為綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)之生物膜。
4. 如請求項3之用途，其中該綠膿桿菌生物膜係在囊腫性纖維化患者中。
5. 一種組合，其包含(a)4-[3,5-雙(2-羥苯基)-[1,2,4]三唑-1-基]苯甲酸或醫藥學上可接受之鹽及(b)選自由胺基糖苷、喹諾酮(quinolone)、頭孢菌素(cephalosporin)、脲基盤尼西林(ureidopenicilline)、碳青黴烯類(carbapenem)、多黏菌素(polymyxin)及單環 β -內醯胺類(monobactam)組成之群的抗生素。
6. 如請求項5之組合，其中(a)為4-[3,5-雙(2-羥苯基)-[1,2,4]三唑-1-基]苯甲酸或醫藥學上可接受之鹽且(b)係選自由以下各物組成之群：建它黴素(gentamicin)、阿米卡星(amikacin)、妥布黴素(tobramycin)、環丙沙星(ciprofloxacin)、左氧氟沙星(levofloxacin)、頭孢他啶(ceftazidime)、頭孢吡肟(cefepime)、頭孢匹羅(cefpirome)、哌拉西林(piperacillin)、替卡西林(ticarcillin)、美羅培南(meropenem)、亞胺培南(imipenem)、多黏菌素B(polymyxin B)、黏菌素(colistin)及胺曲南(aztreonam)。
7. 一種如請求項5或6之組合之用途，其用於如請求項1、2、3或4之用途。

十一、圖式：

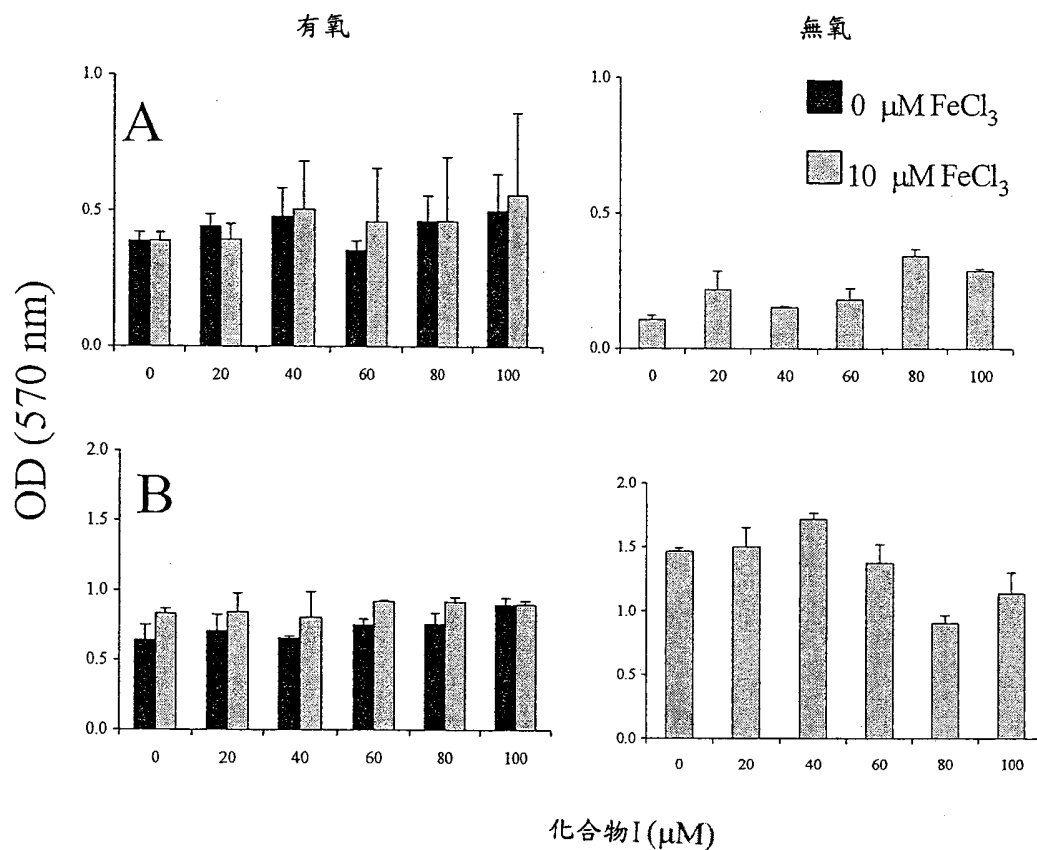


圖 1

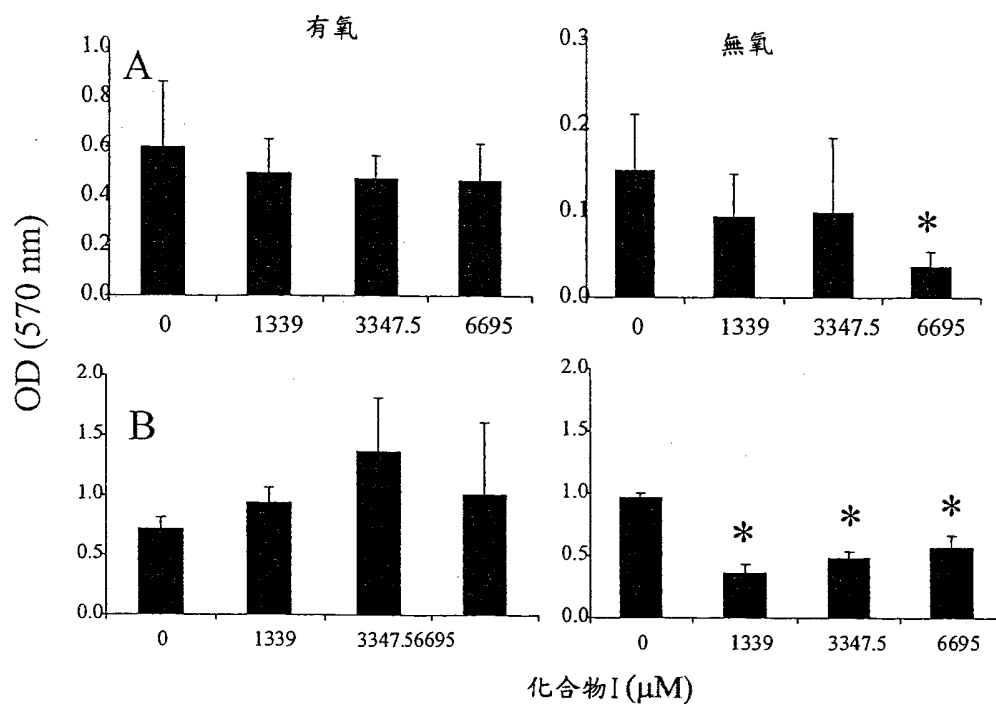


圖 2

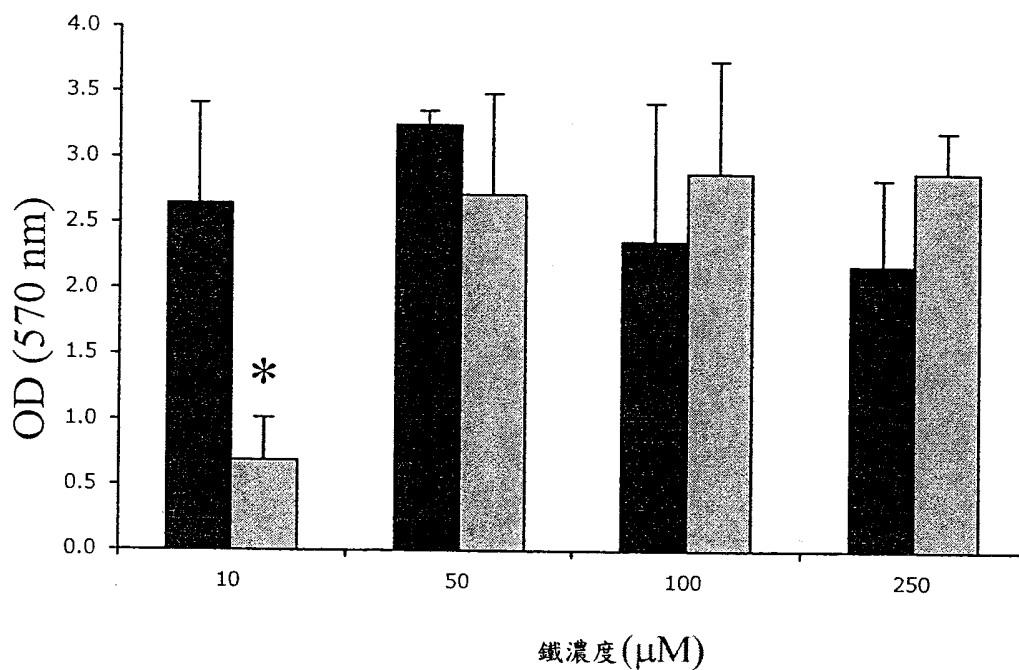


圖 3

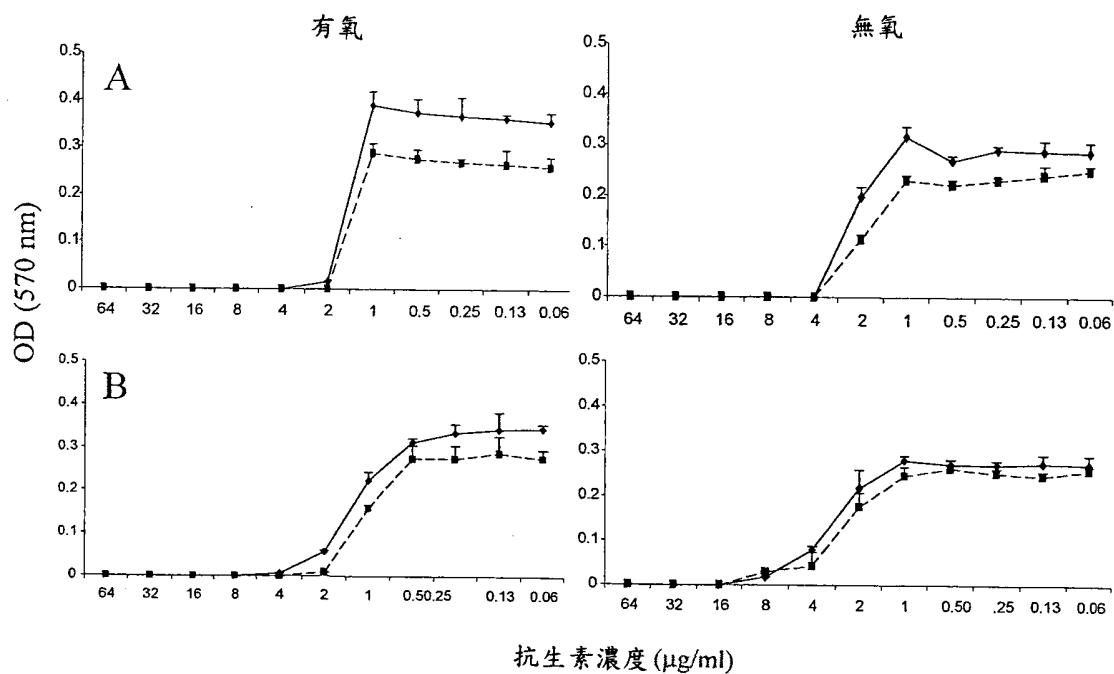


圖 4

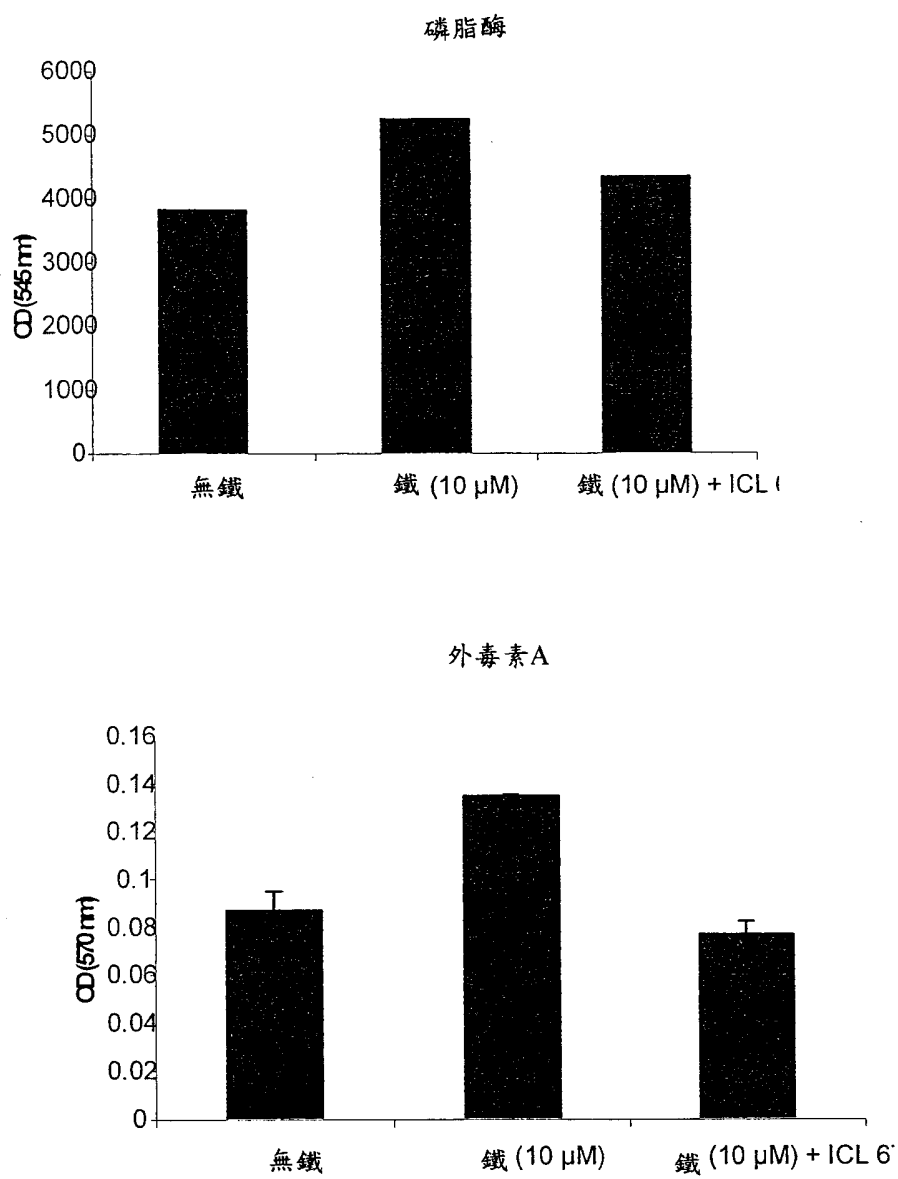


圖 5

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

