



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107922334 B

(45) 授权公告日 2021.11.23

(21) 申请号 201680039597.8

(22) 申请日 2016.04.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107922334 A

(43) 申请公布日 2018.04.17

(30) 优先权数据
62/154,792 2015.04.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/030233 2016.04.29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/176634 EN 2016.11.03

(73) 专利权人 科罗拉多大学董事会
地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 P·巴尔布尔 汪翔

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 黄琳娟

(51) Int.Cl.
C07D 209/56 (2006.01)

(56) 对比文件
US 3155587 A, 1964.11.03
WO 2008112280 A1, 2008.09.18
US 2013210803 A1, 2013.08.15
WO 2014165548 A2, 2014.10.09
TANDON CHANDNI ET AL. Antibacterial
compounds in different species of Datura:
A review.《Advanced Synthesis &
Catalysis》.2014,第8卷(第21期),第2090-2098
页.

审查员 李冰

权利要求书4页 说明书27页

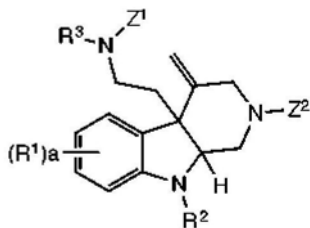
(54) 发明名称

多环吲哚啉和假吲哚啉化合物

(57) 摘要

本发明涉及吲哚啉和假吲哚啉生物碱化合物。特别是,本发明的吲哚啉和假吲哚啉生物碱化合物具有抗菌活性与/或能够使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌重新对 β -内酰胺抗生素敏感。本发明还涉及制备所述化合物的方法及所述化合物的用途。

1. 一种式A化合物:



A

式中:

a是0、1或2;

每个R¹独立地是卤素;

每个R²、R³和Z¹独立地是氢、烷基或氮保护基团,

条件是Z¹或R³中至多仅一个是氮保护基团;

Z²是氢、烷基、氮保护基团、杂烷基或羰基;

所述羰基选自以下基团: -C(=O)R^a、-C(=O)[CH₂]₂CCH、-C(=O)CH₂NH-tBoc、-C(=O)CH₂NH₂、-C(=O)[CH₂]₅NHC(=O)[CH₂]₂-Y¹、-C(=O)[CH₂]₃-Y²、-C(=O)[CH₂]₂CO₂H、-C(=O)CF₃、-C(=O)Y³、和-C(=O)NHY⁴, R^a是烷基或卤代烷基, Y¹是5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ⁴,5λ⁴-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f[1,3,2]二氮杂硼-3-基, Y²是(3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基, Y³是(杂环烷基)烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基, Y⁴是烷基、杂环烷基或(杂环烷基)烷基;

所述烷基的碳原子数为1-20;

所述杂烷基的碳原子数和杂原子数的总和为1-20;

所述氮保护基团为氨基或胺类保护基团,所述氨基或胺类保护基团选自酰基、苄基、烷氧羰基、三甲基硅烷基、2-三甲基硅烷基-乙烷磺酰基、三苯甲基、烯丙氧基羰基、9-苄基甲氧基羰基、硝基-二甲氧苄氧基羰基和磺酰基;

卤代烷基的碳原子数为1-20;

杂环烷基是包含3至12个环原子的非芳烃单环或双环烷基,在该非芳烃单环或双环烷基中,其中1个或2个环原子是选自N、O或S(O)_n的杂原子,其它环原子是C,其中n是0至2的整数;

(杂环烷基)烷基是式-R^cR^b,其中R^b是如上定义的杂环烷基,R^c是亚烷基,亚烷基指的是包含1至20个碳原子的饱和线性二价烃基部分或包含3至20个碳原子的饱和支链二价烃基部分;

芳基是具有6至15个环原子的一价单环、双环或三环芳烃部分;

杂芳基是包含5至12个环原子的一价单环或双环芳基,其中所述环原子含有1、2或3个选自N、O或S的环杂原子,其它环原子是C;

所述酰基是式-C(O)R',其中R'是如上定义的烷基、卤代烷基或芳基;

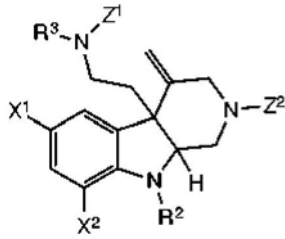
所述烷氧羰基选自苄氧基羰基或叔丁氧基羰基;

所述磺酰基是式-S(O)₂R^y,其中R^y是如上定义的烷基、卤代烷基或芳基。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中a是1或2。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个 R^1 独立地选自Cl、Br和F。

4. 根据权利要求1所述的化合物,具有下述结构:



其中 R^2 、 R^3 、 Z^1 和 Z^2 如权利要求1所定义;及

每个 X^1 和 X^2 独立地选自氢、Cl、Br和F,条件是 X^1 和 X^2 中至少有一个不是氢。

5. 根据权利要求4所述的化合物,其中 X^2 是F。

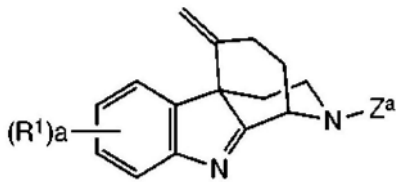
6. 根据权利要求4所述的化合物,其中 X^1 是Cl。

7. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^a 是甲基、乙基、庚基、三氟甲基。

8. 根据权利要求1所述的化合物,其中 Y^3 选自(四氢-2H-吡喃-4-基)甲基和(吗啉基)甲基。

9. 根据权利要求1所述的化合物,其中 Y^4 选自甲基、四氢-2H-吡喃-4-基和(四氢呋喃-2-基)甲基。

10. 一种式B化合物



式中:a是0、1或2;

每个 R^1 独立地是卤素或烷基;

Z^a 是氢、氮保护基团、杂烷基、式-C(=O) Y^a 或式-SO₂ Y^b ,其中 Y^a 是卤代烷基、烷基、(杂环烷基)烷基、杂烷基、杂环烷基或杂芳基, Y^b 是杂芳基;

所述烷基的碳原子数为1-20;

所述杂烷基的碳原子数和杂原子数的总和为1-20;

卤代烷基的碳原子数为1-20;

杂环烷基是包含3至12个环原子的非芳烃单环或双环烷基,在该非芳烃单环或双环烷基中,其中1个或2个环原子是选自N、O或S(O)_n的杂原子,其它环原子是C,其中n是0至2的整数;

(杂环烷基)烷基是式-R^aR^b部分,其中R^b是如上定义的杂环烷基,R^a是亚烷基,亚烷基指的是包含1至20个碳原子的饱和线性二价烃基部分或包含3至20个碳原子的饱和支链二价烃基部分;

杂芳基是包含5至12个环原子的一价单环或双环芳基,其中所述环原子含有1、2或3个选自N、O或S的环杂原子,其它环原子是C;

所述氮保护基团为氨基或胺类保护基团,所述氨基或胺类保护基团包括酰基、苄基、烷氧羰基、三甲基硅烷基、2-三甲基硅烷基-乙烷磺酰基、三苯甲基、烯丙氧基羰基、9-苄基甲氧基羰基、硝基-二甲氧苄氧基羰基、磺酰基;

所述酰基是式-C(O)R',其中R'是如上定义的烷基、卤代烷基或芳基;

所述烷氧羰基选自苄氧基羰基或叔丁氧基羰基;

所述磺酰基是式-S(O)₂R^y,其中R^y是如上定义的烷基、卤代烷基或芳基;

所述芳基是具有6至15个环原子的一价单环、双环或三环芳烃部分。

11. 根据权利要求10所述的化合物,其中a是0或1。

12. 根据权利要求10所述的化合物,其中R¹是卤素。

13. 根据权利要求10所述的化合物,其中Z^a选自氢、Cbz和COCF₃。

14. 根据权利要求10所述的化合物,其中Y^a选自(四氢-2H-吡喃-4-基)甲基、式-CH₂NHC(=O)OtBu、(吗啉基)甲基、吡啶-3-基。

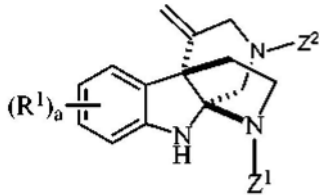
15. 一种包含权利要求1-14中任一项所述化合物的抗生素组合物。

16. 根据权利要求15所述的抗生素组合物,进一步包括β-内酰胺抗生素。

17. 根据权利要求16所述的抗生素组合物,进一步包括β-内酰胺酶抑制剂或其它耐药调节剂或它们的组合。

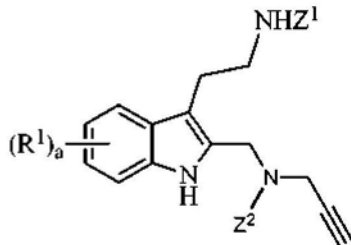
18. 权利要求1-14中的任一种化合物在制备用于治疗受试者细菌感染的药物的用途。

19. 一种用于制备下式的稠合-氮杂吡啶化合物的方法:



IA

所述方法包括在足够制备所述式IA的稠合-氮杂吡啶化合物的条件下,采用金催化剂接触下式的取代吡啶化合物,



式中:

a是1或2;

每个R¹独立地是卤素;

每个和Z¹和Z²独立地是氢、烷基或氮保护基团;

所述烷基的碳原子数为1-20;

所述氮保护基团为氨基或胺类保护基团,所述氨基或胺类保护基团包括酰基、苄基、烷氧羰基、三甲基硅烷基、2-三甲基硅烷基-乙烷磺酰基、三苯甲基、烯丙氧基羰基、9-苄基甲氧基羰基、硝基-二甲氧苄氧基羰基、磺酰基;

所述酰基是式-C(O)R',其中R'是如上定义的烷基、卤代烷基或芳基;

所述烷氧羰基选自苄氧基羰基或叔丁氧基羰基;

所述磺酰基是式-S(O)₂R^y,其中R^y是如上定义的烷基、卤代烷基或芳基;

所述卤代烷基的碳原子数为1-20;

所述芳基是具有6至15个环原子的一价单环、双环或三环芳烃部分。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述金催化剂是含Au(I)的有机金属络合物。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述金催化剂是 $\text{Ph}_3\text{PAuNTf}_2$ 。

22. 权利要求1-14中的任一种化合物在制备用于治疗受试者的MRSA感染的药物的用途。

23. 权利要求1-14中的任一种化合物和 β -内酰胺在制备用于治疗受试者的MRSA感染的药物的用途。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中 β -内酰胺包括阿莫西林、克拉维酸、头孢唑啉、美罗培南或它们的组合。

多环吡啶啉和假吡啶啉化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求了2015年4月30日申请的美国临时申请号62/154,792的优先权权益,该申请通过引用全文纳入本申请中。

技术领域

[0003] 本发明涉及含氮多环吡啶啉和假吡啶啉化合物。特别是,本发明的化合物具有抗菌活性和/或能够使耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌重新对 β -内酰胺抗生素敏感。本发明还涉及制备所述化合物的方法及所述化合物的用途。

背景技术

[0004] 传统的耐抗生素细菌的出现已经成为世界上重大的健康威胁。目前,新抗生素的开发远远滞后于这些细菌的出现。抗生素是使用最广泛和最重要的药物之一。遗憾的是,它们的广泛使用已经导致其病原菌目标发展为抗药性。多重耐药菌的出现已经成为全球公众健康的威胁。多重耐药微生物引发的严重感染常常导致相当高的患者死亡率和模式。

[0005] 据报道,死于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染的人员比死于HIV/AIDS、帕金森病和凶杀的总人数都高。金黄色葡萄球菌是最常见的革兰氏阳性菌病原体,能够引发皮肤感染、呼吸疾病和食物中毒。人们认为,MRSA中存在两种主要的耐药机制。人们认为,其中一种耐药机制是编码青霉素结合蛋白2a(PBP2a)的mecA基因的存在。已经表明,PBP2a与 β -内酰胺抗生素(如甲氧西林)的亲和力较低,从而在 β -内酰胺抗生素存在时,允许足够多的肽聚糖交联。第二种耐药机制是blaZ基因的存在。BlaZ基因编码使 β -内酰胺抗生素化学失活的 β -内酰胺酶。

[0006] 制药业一直在开发与PBP2a的亲和力更高及与 β -内酰胺酶的活性更低的 β -内酰胺抗生素的结构类似物。直到最近,这一策略才与耐MRSA新菌株的出现保持同步。但是,无法开发足够多的类似物来对抗目前和将来出现的耐药菌。

[0007] 最近,耐药调节剂(resistance-modifying agents)(RMA)与抗生素的联用拓展了传统的可用抗生素的有用性。不受到任何理论的限制,人们认为,RMA靶向非-必需耐药赋予基因(resistance conferring genes),从而进一步延长了目前临床用抗生素的生命周期,。由于目前使用的抗生素已经针对毒性和大规模生产进行了优化,因此,RMA尤其有用。例如,克拉维酸是来源于棒状链霉菌的丝氨酸依赖性 β -内酰胺酶抑制剂。它与阿莫西林联用恢复了阿莫西林对抗产 β -内酰胺酶细菌的疗效,这种组合已经成为美国最常用的处方抗生素之一。

[0008] 随着克拉维酸的发现,人们尝试努力寻找其它天然来源的RMA,如透膜剂和外排泵抑制剂。目前,已经临床证明有用的唯一一种RMA是 β -内酰胺酶抑制剂。

[0009] 最近有许多报道表明,来自各种不同的物种的植物提取物能够加强 β -内酰胺酶抗生素的活性。但是,一直很难寻找到活性化合物。这是由于植物提取物化学性质复杂、缺乏标准化、很难获取和供应及天然产品固有的处理缓慢且成本较高。只有几种具有RMA活性的

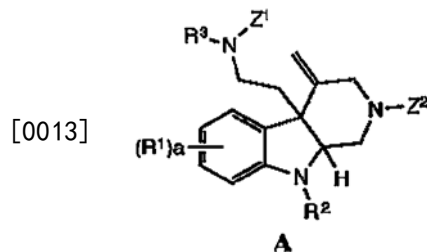
植物天然产品已经得到表征,如表没食子儿茶素没食子酸酯(即EGCG,一种来源于绿茶的黄酮类化合物)及利血平(即来源于印度药用植物根部的多环吲哚生物碱)。

[0010] 因此,人们持续且迫切地需要能够延长用于治疗耐药菌的抗生素有效性的RMA。

发明内容

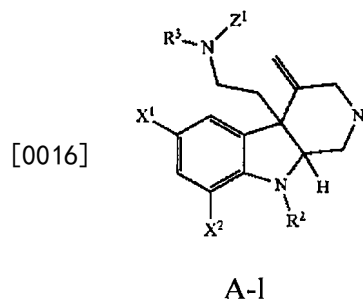
[0011] 本发明的一些方面提供一种耐药调节剂(“RMA”)。不受到任何理论的限制,人们认为,RMA靶向非必需耐药赋予基因,并恢复细菌的抗生素敏感性。RMA最显著的一个优点是它们能够延长已知的抗生素的市场生命周期,这些已知的抗生素已经对大规模生产进行了优化且具有研究良好的毒性特征。本发明的一个具体方面是提供一种氮杂吲哚啉生物碱化合物(“氮杂吲哚啉化合物”),选择性使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌重新对 β -内酰胺抗生素,如苯唑西林、阿莫西林/克拉维酸、美罗培南和头孢唑啉敏感。本发明的氮杂吲哚啉化合物可与 β -内酰胺抗生素联合使用,治疗耐抗生素细菌感染。此外,本发明的一些氮杂吲哚啉化合物本身是有效的抗生素。

[0012] 在一个具体实施例中,本发明的化合物具有下述结构式:



[0014] 式中a是1或2;每个 R^1 独立地是卤素;每个 R^2 、 R^3 和 Z^1 独立地是氢、烷基或氮保护基团; Z^2 是氢、烷基、氮保护基团或式 $-C(=O)-R^4$ 的一部分,其中 R^4 是生物素、烷基、卤代烷基、亚烷基(炔基)(alkylene(alkynyl))、 NR^5Ar^1 (其中 R^5 是氢或烷基, Ar^1 是任选取代的芳基),其中条件是 Z^1 和 R^3 中至多只有一个是氮保护基团。

[0015] 在一些实施例中,式A的化合物中的a是2。在其它实施例中,式A的化合物中的每个 R^1 独立地选自氢、Cl、Br和F。但在一个具体实施例中,本发明的化合物具有如下结构式:



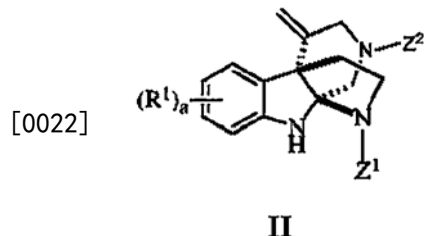
[0017] 式中 R^2 、 R^3 、 Z^1 和 Z^2 如此处定义,每个 X^1 和 X^2 独立地选自氢、Cl、Br和F,条件是 X^1 和 X^2 中至少有一个不是氢。在一些情况下,式A1的化合物中的 X^2 是F。

[0018] 本发明的另一个方面提供一种包含本文所描述的化合物的抗生素组合物。在一些实施例中,所述抗生素组合物进一步包括 β -内酰胺抗生素。 β -内酰胺抗生素的实例包括阿莫西林、克拉维酸、头孢唑啉、美罗培南以及本领域技术人员熟悉的其它常用 β -内酰胺抗生素。在其它实施例中,所述抗生素组合物还可以包括 β -内酰胺抑制剂或其它耐药调节剂或它们的组合。

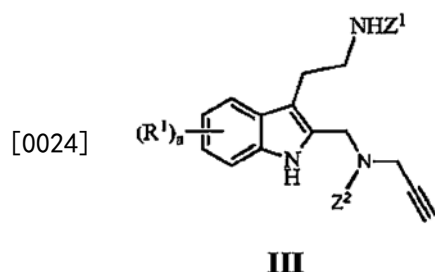
[0019] 本发明的另一个方面提供一种用于治疗受试者细菌感染的方法,包括向需要治疗的受试者施用治疗有效剂量的 β -内酰胺抗生素和本文所述的化合物。

[0020] 本发明的另一个方面提供一种制备本文所述的氮杂吲哚化合物的方法。所述方法包括制备中间体化合物II,和将中间体化合物II转化为本发明的氮杂吲哚化合物。

[0021] 在本发明的一个具体方面,提供一种用于制备式II稠合-氮杂吲哚化合物的方法:



[0023] 在足够制备式II稠合-氮杂吲哚化合物的条件下,采用金催化剂接触式III的取代吲哚化合物。

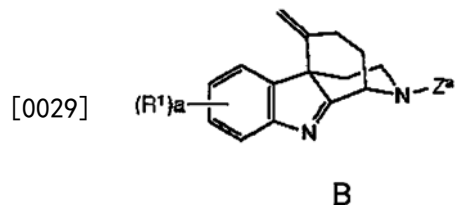


[0025] 其中a是1或2;每个 R^1 独立地是卤素;每个 Z^1 和 Z^2 独立地是氢、烷基或氮保护基团。在一些实施例中,金催化剂是含Au(I)的有机金属络合物。在一个具体实施例中,金催化剂是 $Ph_3PAuNTf_2$ 。

[0026] 本发明的另一个方面提供一种用于治疗受试者的MRSA感染的方法,包括向MRSA感染的受试者施用治疗有效剂量的 β -内酰胺和本文所述的氮杂吲哚化合物。在一些实施例中, β -内酰胺包括阿莫西林、克拉维酸、头孢唑啉、美罗培南或它们的组合。

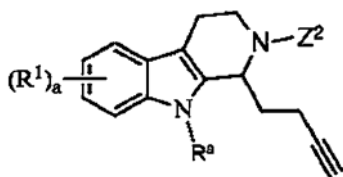
[0027] 应该理解的是,式II的化合物可以通过还原连接有两个氮原子的碳转化为式A或式A-1的化合物。

[0028] 本发明的另一个方面提供一种式B化合物:



[0030] 式中a是0、1或2;每个 R^1 独立地是卤素、烷基或烷氧化物(alkoxide); Z^2 是氢或氮保护基团。在一些实施例中,a是0或1。在这些实施例中,在一些情况下,a是1。在其它实施例中, R^1 是氢或烷氧基(alkoxy)。适合 R^1 的一些烷氧基实例包括但不限于甲氧基、叔-丁氧基、乙氧基、丙氧基、异-丁氧基、异丙氧基等。在其它实施例中, Z^2 选自氢、 $-COAr^1$ 、Ns、 SO_2Ar^1 、Ts、Cbz和 $COCF_3$,其中 Ar^1 是任选取代的苯基。在一些情况下, Ar^1 是卤-代苯基。适合 Ar^1 的任选取代的苯基的实例包括但不限于苯基、对-氯苯基、对-氟苯基等。

[0031] 在足够制备式B的化合物的条件下,可以采用金催化剂接触式IB的化合物来制备式B的化合物:



[0032]

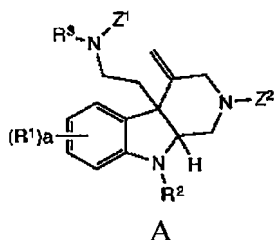
IB

[0033] 其中a、R¹和Z²的定义如式B的化合物所定义的。R^a是氮保护基团。在一些情况下,氮保护基团R^a是三烷基硅烷基(trialkylsilyl)。适合R^a的三烷基硅烷基的实例包括但不限于三甲基硅烷基、叔丁基二甲基硅烷基、三异丙基硅烷基等以及其它硅烷基,在这些硅烷基中,与硅原子相连的两个或多个烷基可以任选地构成环烷基。

[0034] 虽然本文公开了本发明化合物的一些具体取代基,但是,应该指出的是,本文所述的各种基团组合构成其它实施例。因此,各种化合物都包括在本发明之中。

具体实施方式

[0035] 本发明的一些方面提供一种能够使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌重新对β-内酰胺抗生素敏感的氮杂吡啶生物碱化合物(即氮杂吡啶或简称“吡啶”化合物)。在一个具体实施例中,所述氮杂吡啶化合物是式A的化合物:

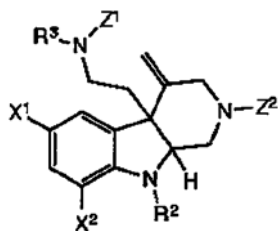


[0036]

A

[0037] 式中a是0、1或2;每个R¹独立地是卤素;每个R²、R³和Z¹独立地是氢、烷基或氮保护基团,条件是Z¹或R³中至多只有一个是氮保护基团;Z²是氢、烷基、氮保护基团或羰基。在一些实施例中,a是1或2。在其它实施例中,R¹独立地选自氢、Cl、Br和F。

[0038] 在一个具体实施例中,式A的化合物更具体地具有下式结构式:



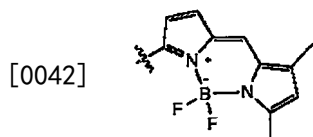
[0039]

A-1

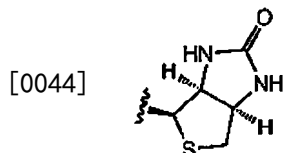
[0040] 式中R²、R³、Z¹和Z²如本文所定义,每个X¹和X²独立地选自氢、Cl、Br和F,条件是X¹和X²中至少有一个不是氢。在一些情况下,X²是F。在其它情况下,X¹是Cl。

[0041] 再次参考式A的化合物,在一些实施例中,Z²选自下述基团:-C(=O)R^a、-C(=O)[CH₂]₂CCH₃、-C(=O)CH₂NH-tBoc、-C(=O)CH₂NH₂、-C(=O)[CH₂]₅NHC(=O)[CH₂]₂-Y¹、-C(=O)[CH₂]₃-Y²、-C(=O)[CH₂]₂CO₂H、-C(=O)CF₃、-C(=O)Y³、-tBoc、-SO₂-Ar¹、-C(=O)NHY⁴,及式-C

(=NR^x)-NR^yR^z的胍衍生物,其中每个R^x、R^y和R^z独立地是H、烷基、环烷基、杂环烷基、(杂环烷基)烷基、(环烷基)烷基和杂烷基,R^a是烷基或卤代烷基,Ar¹是芳基或杂芳基,Y¹是下式的一部分

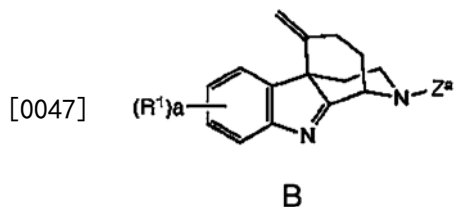


[0043] (即,(5,5-二氟-7,9-二甲基-5H-4λ⁴,5λ⁴-二吡咯并[1,2-c:2',1'-f[1,3,2]二氮杂硼-3-基)),Y²是下式的一部分



[0045] (即((3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基),Y³是环烷基、(杂环烷基)烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基,Y⁴是烷基、杂环烷基或(杂环烷基)烷基。在一些特别情况下,R^a是甲基、乙基、庚基、三氟甲基。在其它情况下,Ar¹选自4-氯苯基、1-甲基-1H-咪唑-4-基和6-氯吡啶-3-基。在其它情况下,Y³选自4,4-二氟环己基、4-氯苯基、(四氢-2H-吡喃-4-基)甲基、1-(2,2,2-三氟乙酰)哌啶-4-基、1-(2,2,2-三氟乙酰)氮杂啶-3-基、6-氯吡啶-3-基和(吗啉基)甲基。在其它情况下,Y⁴选自甲基、四氢-2H-吡喃-4-基和(四氢呋喃-2-基)甲基。在一些实施例中,每个R^x、R^y和R^z独立地是H、烷基、环烷基、杂环烷基、(杂环烷基)烷基或(环烷基)烷基。在其它实施例中,每个R^x、R^y和R^z独立地是H或烷基。在一个具体实施例中,R^x、R^y和R^z是H。

[0046] 本发明的另一个方面提供一种式B的化合物:



[0048] 式中a是0、1或2;每个R¹独立地是卤素、烷基或烷氧化物;Z^a是氢、氮保护基团、式-C(=O)Y^a的一部分或式-SO₂Y^b的一部分,其中Y^a是卤代烷基、烷基、(杂环烷基)烷基、杂烷基、杂环烷基或杂芳基,Y^b是杂芳基。

[0049] 关于式B的化合物,在一些实施例中,a是0或1。在其它实施例中,R¹是卤素或烷氧化物。在其它实施例中,Z^a选自氢、-COAr¹、Ns、SO₂Ar¹、Ts、Cbz和COCF₃,其中Ar¹是任选取代的苯基。在其它实施例中,Y^a选自(四氢-2H-吡喃-4-基)甲基、式-CH₂NHC(=O)OtBu的一部分、1-甲基哌啶-4-基、(吗啉基)甲基、吡啶-3-基、6-氯-吡啶-3-基、4-甲基哌嗪-1-基、2-甲基恶唑-4-基。在其它实施例中,Y^b是1-甲基-1H-咪唑-4-基。

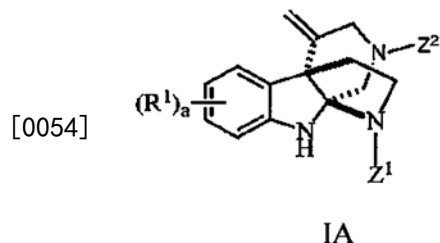
[0050] 应该理解的是,本文所述的各种基团的组合可以构成其它优选实施例。因此,式A和式B的各种化合物都包括在本发明之内。

[0051] 本发明的另一个方面是提供一种包含本发明所描述的一种或多种化合物的抗生素组合物。在一些实施例中,所述抗生素组合物进一步包括β-内酰胺抗生素。β-内酰胺抗生素的实例包括β-内酰胺,β-内酰胺包括阿莫西林、克拉维酸、头孢唑啉、美罗培南及它们的

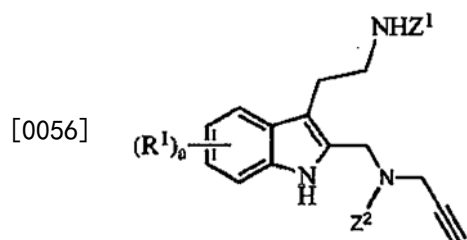
组合。在其它实施例中,所述抗生素组合物进一步包括 β -内酰胺酶抑制剂或其它耐药调节剂或它们的组合。

[0052] 本发明的化合物用于治疗受试者的细菌感染。在一些实施例中,本发明的化合物用于治疗耐药菌株引起的细菌感染。在其它实施例中,本发明的化合物用于治疗MRSA感染。

[0053] 本发明的另一个方面提供一种用于制备式IA的稠合-氮杂吡啶化合物的方法:



[0055] 所述方法包括在足够制备式IA的稠合-氮杂吡啶化合物的条件下,采用金催化剂接触下式的取代吡啶化合物,



[0057] 其中a是1或2;每个R¹独立地是卤素;每个Z¹和Z²独立地是氢、烷基或氮保护基团。在一些实施例中,金催化剂是含Au(I)的有机金属络合物。在一个具体实施例中,金催化剂是Ph₃PAuNTf₂。

[0058] 词语“卤化(halide)”、“卤素(halogen)”和“卤代(halo)”在本文可交换地使用,指的是氟、氯、溴或碘。

[0059] 词语“烷基”指的是包含1至20个,一般是1至15个,通常是1至10个碳原子的饱和线性一价烃基部分或包含3至20个,一般是3至15个,通常是3至10个碳原子的饱和支链一价烃基。烷基实例包括但不限于甲基、乙基、正-丙基、2-丙基、叔丁基、戊基、异-戊基、己基等。

[0060] “亚烷基(alkylene)”指的是包含1至20个,一般是1至15个,通常是1至10个碳原子的饱和线性二价烃基部分或包含3至20个,一般是3至15个,通常是3至10个碳原子的饱和支链二价烃基部分。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基、亚乙基(ethylene)、亚丙基(propylene)、亚丁基(butylene)、亚戊基(pentylene)等。

[0061] “卤代烷基”指的是其中一个或多个氢原子被相同或不同卤素原子取代的烷基。卤代烷基的实例包括但不限于-CH₂Cl、-CF₃、-CH₂CF₃、-CH₂CCl₃等。

[0062] “芳基”指的是具有6至15个环原子的一价单环、双环或三环芳烃部分,如苯基、萘基等。芳基可以被一个或多个,一般是1-3个,通常是1个或2个取代基取代。芳基取代基的实例包括但不限于杂芳基所述的取代基。

[0063] “杂芳基”指的是包含5至12个环原子的一价单环或双环芳基,其中所述环原子含有1、2或3个选自N、O或S的环杂原子,其它环原子是C。杂芳环可以被一个或多个取代基,一般是1个或多个,通常是1至4个,更通常是1个或2个取代基取代。合适的取代基包括烷基、卤烷基、杂烷基、杂环基、卤素、硝基、氰基、羧基、酰基、-(亚烷基)_n-COOR(其中n是0或1,R是

氢、烷基,任选取代的苯烷基,或任选取代的杂芳烷基),或-(亚烷基)_n-CONRaRb(其中n是0或1,Ra和Rb彼此独立,是氢、烷基、环烷基、环烷基烷基、羟烷基、芳基,或Ra和Rb和氮原子一起连接构成杂环基环)。更具体地说,术语杂芳基包括但不限于吡啶基、咪唑基、苯硫基、噻唑基、异噻唑基、三唑基、咪唑基、异恶唑基、吡咯基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、苯并咪唑基、异苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并三唑基、吡啶基、异吡啶基、苯并恶唑基、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、苯并异恶唑基(benzisoxazolyl)、苯并苯硫基(benzothiophenyl)、二苯并咪唑和苯并二氮杂卓-2-酮-5-基(benzodiazepin-2-one-5-yl)等。

[0064] “杂环烷基”指的是包含3至12个环原子的非芳烃单环或双环烷基,在该非芳烃单环或双环烷基中,其中一个或多个,一般是1个或2个环原子是选自N、O或S(O)_n(其中n是0至2的整数)的杂原子,其它环原子是C,其中1个或2个C原子可以任选是羰基。杂环烷基环可以任选地被一个或多个,通常是1个、2个或3个取代基独立取代。当杂环烷基中存在2个或多个取代基时,每个取代基都是独立选择的。杂环烷基的取代基实例包括但不限于烷基、卤代烷基、杂烷基、卤素、硝基、氰基、任选取代的苯基、任选取代的杂芳基、任选取代的苯烷基、任选取代的杂芳烷基、酰基、-(亚烷基)_n-COOR(其中n是0或1,R是氢、烷基、任选取代的苯基、任选取代的苯烷基,或任选取代的杂芳烷基),或-(亚烷基)_n-CONR^aR^b(其中n是0或1,R^a和R^b彼此独立,是氢、烷基、环烷基、环烷基烷基、羟烷基、芳基,或R和R'和氮原子一起连接构成杂环基环)。更具体地说,术语杂环包括但不限于四氢吡喃基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、硫代吗啉-1-氧化物、硫代吗啉-1,1-二氧化物等。

[0065] “(杂环烷基)烷基”指的是式-R^aR^b部分,其中R^b是杂环烷基,R^a是本文所定义的亚烷基。

[0066] “炔基”指的是包含至少一个碳-碳三键的2至10个碳原子的线性一价烃基或3至10个碳原子的支链一价烃基,例如,乙炔基、丙炔基等。

[0067] “杂烷基”指的是包含碳、氢和一个或多个取代碳原子的杂原子,或任选一个或多个独立选自=O、-OR^a、-C(O)R^a、-NR^bR^c、-C(O)NR^bR^c和-S(O)_nR^d(其中n是0至2的整数)的含杂原子取代基的支链或非支链环状或非环状饱和的烷基部分。R^a是氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基或酰基。R^a是氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基或酰基。R^c是氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、芳基、芳烷基、酰基、烷基磺酰基、羧酰胺基或单-或二-烷基氨基甲酰基。任选地,R^b和R^c可以与各自连接的氮一起构成四元-、五元-、六元-或七-元杂环(例如,吡咯烷基、哌啶基或吗啉基环)。R^d是氢(条件是n是0)、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、酰基、氨基、单取代氨基、双取代氨基或羟烷基。杂烷基的代表性实例包括但不限于2-甲氧基乙基、苄氧基甲基、苯硫-2-基硫代甲基、2-羟乙基、2,3-二羟丙基和式-C(=NR^a)-NR^bR^c的胍衍生物,其中每个R^a、R^b和R^c独立地是H、烷基、环烷基、杂环烷基、(杂环烷基)烷基、(环烷基)烷基和杂烷基。

[0068] “酰基”指的是式-C(O)R'的部分,其中R'是烷基、卤代烷基、芳基或芳烷基。“磺酰基”指的是式-S(O)₂R^y的部分,其中R^y是烷基、卤代烷基,任选取代的芳基,任选取代的芳烷基或(环烷基)烷基。“离去基团”具有传统上与合成有机化学有关的含义,即能够被亲核试

剂取代的原子或基团,包括卤素(如氯、溴和碘)、烷烃磺酰基氧基(alkanesulfonyloxy)、芳烃磺酰基氧基(arenesulfonyloxy)、烷基羰氧基(如乙酰氧基)、芳基羰氧基、甲磺酰基氧基、甲苯磺酰基氧基(tosyloxy)、三氟甲烷磺酰基氧基(trifluoromethanesulfonyloxy)、芳氧基(如2,4-二硝基苯氧基)、甲氧基、N,0-二甲基羟氨基等。

[0069] “药学上可以接受的赋形剂”指的是通常安全、无毒,生物学上或其它方面都符合要求的药物组合物配制用赋形剂,包括在兽药和人类药物应用方面都可以接受的赋形剂。

[0070] 化合物的“药学上可以接受的盐”指的是药学上可以接受,并且具有母体化合物所希望的药理活性的盐。这种盐包括:(1)酸加成盐,无机酸,如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等形成的盐;或有机酸,如乙酸、丙酸、己酸、环戊基丙酸(cyclopentanepropionic acid)、羟基乙酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、丁二酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苄氧基)苯甲酸、肉桂酸、苦杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷-二磺酸、2-羟乙烷磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基二环[2.2.2]-辛-2-烯-1-羧酸、葡庚糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸(tertiary butylacetic acid)、十二烷基硫酸、葡糖酸、谷氨酸、羟萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、己二烯二酸等形成的盐;或(2)当母体化合物中的酸性质子被金属离子,如碱金属离子、碱土金属离子,或铝离子取代;或与有机碱,如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲葡糖胺等配位形成的盐。

[0071] 术语“前体-药物(pro-drug)”和“前体药物(prodrug)”在本可互换地使用,指的是药在有机体内需要自发或酶作用下生物转化而释放出活性药物的母体药物分子的理学上基本失活的衍生物。前体药物是本发明化合物的变体或衍生物,拥有在代谢条件下可以断裂的基团。当在生理条件下发生溶解分解或发生酶降解时,前体药物成为在体内具有药学活性的本发明化合物。根据在体内释放出活性药物所需的生物转化步骤的数量,及前体-类型形式中存在的官能团的数量,本发明的前体药物化合物可以称为单、双、三前体药物化合物等。前体药物形式通常在哺乳动物有机体内的溶解性、组织相容性或缓释方面具有优势(参见Bundgard, Design of Prodrugs, pp.7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985 and Silverman, The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, pp.352-401, Academic Press, San Diego, Calif, 1992)。本领域熟知的前体药物包括本领域技术人员熟悉的酸衍生物,例如,母体酸与合适的醇反应制备的酯,或母体酸化合物与胺反应制备的酰胺,或碱性基团反应形成酰化碱性衍生物,但并不限于这些。

[0072] “保护基团”指的是当与分子中的反应基团连接时,掩盖、降低或避免这种反应性的除烷基外的部分。保护基团的实例参见T.W.Greene and P.G.M.Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York, 1999, and Harrison and Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, Vols.1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996), 其通过引用而全文并入本发明中。代表性氨基或胺类保护基团包括甲酰基、酰基(如乙酰基、三氟乙酰基和苯甲酰基)、苄基、烷氧羰基(如苄氧羰基(CBZ)、叔丁氧羰基(Boc)、三甲基硅烷基(TMS)、2-三甲基硅烷基-乙烷磺酰基(SES)、三苯甲基和取代三苯甲基、烯丙氧羰基(allyloxycarbonyl)、9-苄基甲氧羰基(FMOC)、硝基-二甲氧苄氧羰基(NVOC)(nitro-veratryloxycarbonyl)、磺酰基等。

[0073] “治疗有效剂量”指的是当给予哺乳动物用于治疗疾病时,足够有效治疗哺乳动物疾病的化合物用量。“治疗有效剂量”将根据化合物、疾病及其严重程度、哺乳动物的年龄、

体重等而变化。疾病的“处理 (treating)”或“治疗 (treatment)”包括：(1) 预防疾病，即让可能受疾病攻击或倾向于患病但未存在或出现疾病症状的哺乳动物不出现该疾病的临床症状；(2) 抑制疾病，即抑制或减少疾病或其临床症状的发展；或 (3) 减轻疾病，即使疾病或其临床症状消退。

[0074] 当描述化学反应时，术语“处理 (treating)”、“接触 (contacting)”和“反应 (reacting)”在本文可交换地使用，指的是在合适的条件下加入或混合两种或多种试剂，制备所示与/或所需产品。应该理解的是，制备所示与/或所需产品的反应并不一定是由初步加入的两种试剂组合直接得到的，即可能存在混合物中产生的一种或多种中间体，这些中间体最终导致形成所示与/或所需产品。如本发明中所使用的，谈到一个变量时，术语“上文定义”和“此处定义”通过引用包括该变量的广义解释及任何狭义解释，如果有的话。

[0075] 组合物

[0076] 本发明的另一个方面提供一种包含本发明的化合物的抗生素组合物，所述抗生素组合物能够使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌重新对所述 β -内酰胺抗生素敏感。在一些实施例中，所述抗生素组合物进一步包括 β -内酰胺抗生素。合适的 β -内酰胺抗生素是本领域技术人员所熟知的， β -内酰胺抗生素的实例见Merck Index, 15th Ed., Edited by Maryadele J O'Neil, Royal Society of Chemistry, 2013, and Physicians' Desk Reference (i.e., "PDR") 67th Ed., 2013。这两份文献通过引用而全文并入本文。在一些实施例中，所述抗生素组合物包含本文所描述的吲哚啉与/或假吲哚生物碱化合物。

[0077] 本发明的化合物可以向患者或受试者施用，达到期望的生理效应。一般来说，患者是动物，一般是哺乳动物，通常是人。该化合物以适应于所选定的给药途径的各种形式施用，例如，口服或肠胃外给药。在这方面，肠胃外服用包括通过下述途径施用：静脉内；肌肉内；皮下；眼内；滑膜内；上皮，包括经皮、经眼、舌下和口腔；局部，包括通过喷射和喷雾经眼动脉 (ophthalmic)、皮、眼 (ocular)、直肠和鼻腔吸入；腹膜内；及直肠施用。

[0078] 活性化合物可以口服，例如，采用惰性稀释剂或可吸收食用的载体口服；或可以包在硬质或软质外壳明胶胶囊内，或可以压成片剂，或可以直接与饮食的食物结合。对于口服治疗给药，活性化合物可以包含赋形剂，并以可摄入的片剂、口腔片、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆、薄片等形式使用。所述组合物和制剂可以包含至少0.1%的活性化合物。当然，所述组合物和制剂的百分含量可以变化，一般是剂型重量的大约1至大约10%。在这种治疗有用组合物中的活性化合物的含量是获得合适剂量所需的含量。制备本发明的典型组合物或制剂，使得口服剂型包含大约1至大约1000mg活性化合物。

[0079] 片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也包含下述成分；粘结剂，如黄芪胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂，如磷酸二钙；崩解剂，如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等；润滑剂，如硬脂酸镁；甜味剂，如蔗糖、乳糖或糖精，或香味剂，如薄荷、冬青油或樱桃香精。当剂型是胶囊时，除上述类型材料外，还可以包含液体载体。其它各种材料可以以包衣的形式存在，或可以改变剂型的物理形式。例如，片剂、丸剂或胶囊可以用虫胶、糖或它们两者包衣。糖浆或酞剂可以包含活性化合物、作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的木精 (methyl) 和对羟基苯甲酸丙酯、染料和香味剂樱桃或甜橙香精等。当然，在制备任何剂型中使用的任何材料应是药学上纯净的，且在其用量基本无毒。此外，活性化合物可以包含在缓释制剂和配方中。除上文提到的常用剂型之外，本发明的化合物还可以采用能够按要求速率释放活性成分 (异戊烯化抑

制剂)从而所需的时间段内维持恒定的药理活性的控释手段与/或给药装置进行施用。此种剂型在预定时间内向体内提供一定量的药,从而在比传统非受控配方更长的时间内将药物含量维持在治疗范围内。可适用于施用本发明活性成分的控释药物组合物和给药装置的实例在美国专利号.:3,847,770;3,916,899;3,536,809;3,598,123;3,630,200;4,008,719;4,687,610;4,769,027;5,674,533;5,059,595;5,591,767;5,120,548;5,073,543;5,639,476;5,354,566和5,733,566中进行了描述,这些专利的公开内容通过引用而并入本发明中。

[0080] 本发明方法中使用的药物组合物可采用任何配药方法制备,但是,所有方法都包括将活性成分与载体结合,构成一种或多种必要成分的成分。一般说来,所述组合物通过将活性成分与液体载体,或磨碎的固体载体或这两种载体均匀且密切地混合,然后,如果必要的话,使产品成形为所需的形状而制备。

[0081] 例如,片剂可以通过压缩或模塑,任选地与一种或多种助剂一起制备。压缩片剂可以通过将自由流动形式,如粉末或颗粒形式的活性成分,任选地与粘结剂、润滑剂、惰性稀释剂、表面活性剂或分散剂一起混合,在合适的设备中进行压制而制备。模塑片剂可采用惰性液体稀释剂润湿粉末化合物的混合物,在合适的机器中通过模塑制备。

[0082] 所述活性化合物还可以肠胃外施用。作为游离碱或药学上可接受的盐的活性化合物溶液可以在适当地与表面活性剂(如羟丙基纤维素)混合的水中制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及它们的混合物中制备和在油中制备。在正常贮存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

[0083] 适合注射使用的药物形式包括用于临时配制无菌可注射溶液或分散体的无菌水溶液或分散体和无菌粉末。在所有情况下,剂型必须无菌,并且必须有一定的流动性,容易注射。它在生产和贮存条件下稳定,必须防止微生物,如细菌和真菌的污染作用。载体可以是分散介质溶剂,包含,例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适混合物和植物油。可以采用,例如,包衣(如卵磷脂)、在分散时保持要求的粒径及使用表面活性剂来保持合适的流动性。可以采用各种抗菌剂和抗真菌剂,例如,对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒等来防止微生物作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,如糖、氯化钠等。通过加入延迟吸收的试剂,如单硬脂酸铝和明胶,可以延长可注射组合物的吸收。

[0084] 将所需数量的活性化合物及上面列举的各种其它成分(根据需要)加到合适的溶剂中,然后进行过滤杀菌,制备无菌可注射液。通常,将各种无菌活性成分加入到包含碱性分散介质和上面所列的其它所需成分的无菌溶媒中,制备分散体。采用无菌粉末制备无菌可注射液时,优选的制备方法是前面无菌过滤得到的溶液进行真空干燥和冷冻干燥,得到活性成分加任何其它所需成分的粉末。

[0085] 本发明的化合物可以单独向哺乳动物施用或与上述药学上可接受的载体组合施用,其比例由化合物的溶解性和化学性质、选择的施用途径和标准药学实践决定。

[0086] 医生很容易确定本发明治疗剂用于预防或治疗的最合适剂量,剂量将根据施用剂型和选择的具体化合物而变化,此外,还将根据治疗的具体患者的情况而变化。医生通常希望一开始采用小剂量进行治疗,少量递增,直到达到这种环境下的最佳效果。治疗剂量通常是大约0.1至大约1000mg/天,优选是大约10至大约100mg/天,或大约0.1至大约50mg/Kg体

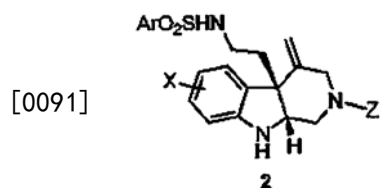
重每天,优选大约0.1至大约20mg/Kg体重每天,并且可以按照几种不同剂型施用。口服可能需要更高剂量,大约是2倍至大约4倍。

[0087] 熟悉本领域的技术人员在审查下述实例后,本发明的其它目的、优点和新特点将变得显而易见。这些实例并非用于限定本发明。在这些实例中,建设性转化为实践的方法以一般现在时描述,而已经在实验室中开展的方法以一般过去时描述。

[0088] 实例

[0089] 本文采用的各种实验方法与2014年4月1日申请的共同受让PCT专利申请号PCT/US14/32585类似,此申请通过引用而全文并入本发明中。

[0090] 实例1:多环吲哚啉化合物: 本发明人已经发现,与六元环上的氮被碳原子取代的碳类似物相比,式2化合物的 $c\text{LogD}_{7.4}$ 明显更低,从而增加了它的生物利用性。三环吲哚啉核心结构可以转化为哌啶-稠合吲哚啉或氮杂-三环吲哚啉(ATI)。



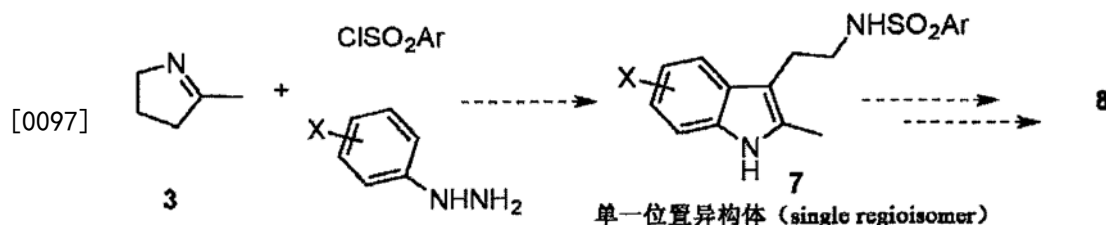
[0092] (例如,Ar=4-氯苯基、4-硝基苯基、4-氯-2-硝基苯基、4-甲基苯基等,Z是Ar、磺酸甲酯、三氟乙酸酯、 $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 等)。ATI的c-环氮处(即“Z”)可以进一步改性,进一步降低 $c\text{LogD}_{7.4}$ 。此外,ATI在许多生物活性吲哚生物碱天然产品(例如西萝芙木碱和蛇根碱)中很常见。这些发现引导本发明人采用ATI RMA、抗生素或两者开展研究。

[0093] ATI的合成利用金-或铂-催化下图所示炔丙基胺-共轭色胺衍生物8环化,形成氮杂-四环吲哚啉9,其可以进一步开环还原得到所需的ATI 2。

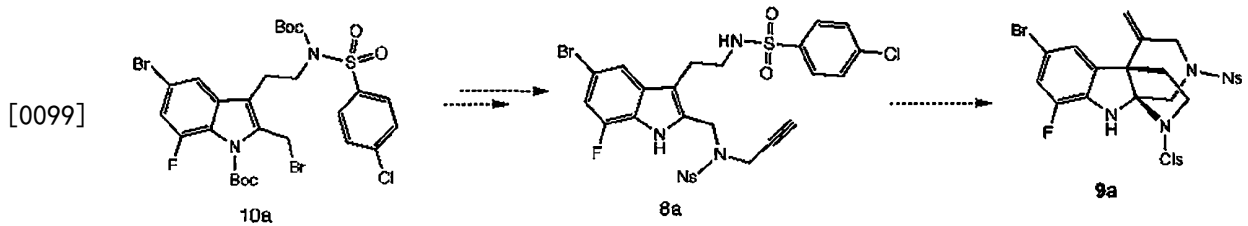


[0095] 这些ATI可以进一步改性,引入可以改善药代动力学和物理性能但并不损害抗-MRSA活性的官能团。化合物2的合成至少部分以本发明人发现的高效金-(或铂)催化串联环化为基础。

[0096] 化合物8可以通过,例如,采用亚胺3,通过一锅三组分反应(one-pot, three-component reaction)制备,得到下面所示2-甲基色胺衍生物7。



[0098] 保护两个氮基团(例如,使用Boc-保护基团)之后,通过化合物7a其中X是5-溴-7-氟,Ar是4-氯苯基)中甲基的选择性溴化(,例如,通过自由基溴化,得到溴化物10a。

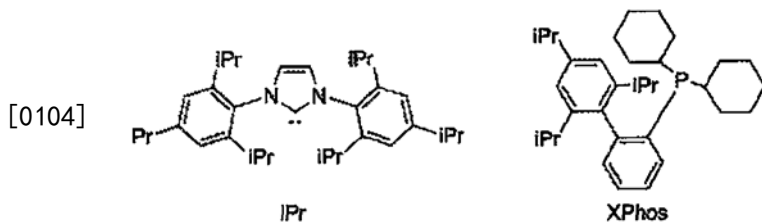


[0100] 然后,采用炔丙基胺,使化合物10a烷基化。采用三氟乙酸(TFA)去除两个Boc基团的保护作用,然后采用4-硝基苯磺酰基(Ns)保护仲胺氮,得到环化前体8a。采用这种合成策略,可以合成许多具有各种不同取代基的环化前体,且收率良好。

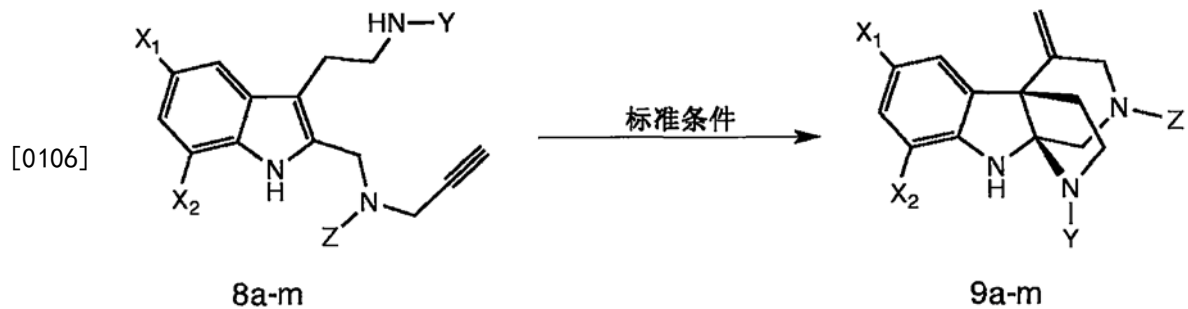
[0101] 采用环化前体8a,采用表1-1所示的各种催化剂和反应条件,开展串联环化反应,以生产所需要的四环吡啶啉化合物9a。

[0102] 表1-1:串联环化反应的条件和收率。

序号	催化剂 (5 mol%)	溶剂	T [°C]	收率 [%]
1	Ph ₃ PAuNTf ₂	甲苯	60	22
2	Ph ₃ PAuNTf ₂	甲苯	90	43
3	PtCl ₂	甲苯	90	<10
4	PtCl ₄	甲苯	90	0
5	H ₂ PtCl ₆ ·6H ₂ O	甲苯	90	<10
6	IPrAuCl	甲苯	90	0
7	IPrAuCl/AgSbF ₆	甲苯	90	11
8	XPhosAuNTf ₂	甲苯	90	61
9	XPhosAuNTf ₂	1,4-二恶烷	90	97



[0105] 采用类似的合成方法制备其它环化前体,以产生化合物8b-m,化合物8b-m环化为表1-2所示的相应化合物9a-m。

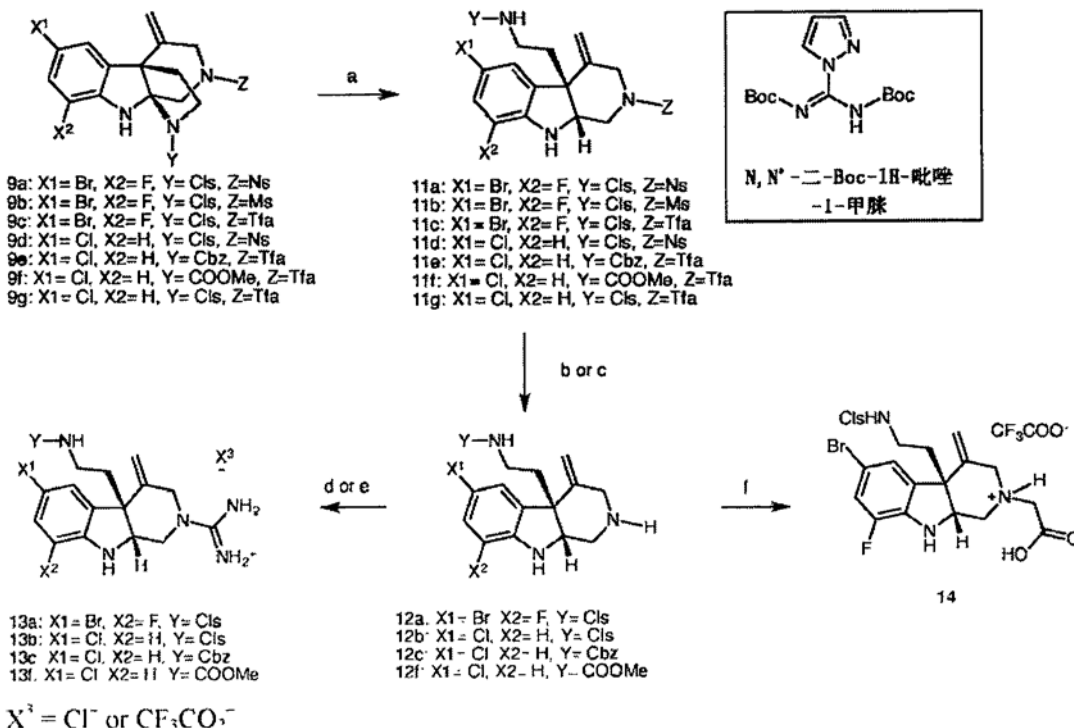


[0107] 表1-2

序号	8	X ¹	X ²	Y	Z	收率 [%] ^[b]
1	8a	Br	F	Cl _s	N _s	97
2	8b	Br	F	Cl _s	Tfa	72
3	8c	Br	F	Cl _s	Ms	90
4	8d	Br	F	Cl _s	CN _s	91 ^[c]
5	8e	Br	F	Cl _s	Ts	96
[0108] 6	8f	Br	F	Cl _s	Cbz	71
7	8g	Br	H	Cl _s	N _s	92 ^[d]
8	8h	Cl	H	Cbz	N _s	96 ^[e]
9	8i	Cl	Cl	Cbz	N _s	95 ^[e]
10	8j	F	H	Cbz	N _s	91 ^[e]
11	8k	Cl	H	Cbz	Tfa	90 ^[f]
12	8l	Cl	H	Cl _s	Tfa	89 ^[e]
13	8m	Cl	H	COOMe	Tfa	91 ^[f]

[0109] ^[a]标准反应条件(除非另外声明,5mol% XPhosAuNTf₂,1,4-二恶烷,90℃,12小时。^[b]基于底物(substrate)完全转化的分离收率。^[c]采用10mol%催化剂。^[d]2小时反应时间。^[e]2小时反应时间,60℃。^[f]30分钟反应时间,60℃。^[g]Cl_s,4-氯-苯磺酰基;N_s,4-硝基-苯磺酰基;Tfa,三氟乙酰基;Ms,甲烷磺酰基;CN_s,4-氯-2-硝基-苯磺酰基;Ts,4-甲基-苯磺酰基;Cbz,苄氧基羰基。

[0110] 为了探索具有独特物理性能的ATI,利用还原性开环条件,将环化产品9a-c转化为ATI,得到11a-c,如方案1-1所示。



[0112] 方案1-1 ATI的合成。试剂和条件:(a) TFA, NaCNBH₃, THF/MeOH, 0℃; (b) PhSH, K₂CO₃, CH₃CN, 60℃; (c) K₂CO₃, MeOH, THF, H₂O; (d) i. 1.5, CH₂Cl₂, 23℃; ii. TFA, CH₂Cl₂, 0℃; (e) i. N,N'-二-Boc-1H-吡唑-1-甲脒(N,N'-Di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamidine), CH₂Cl₂, 23℃; ii. 浓HCl, THF, 0℃ (f) i. 溴乙酸叔丁酯, Et₃N, CH₂Cl₂, 0℃; ii. TFA, CH₂Cl₂, 0℃。Tfa, 三

氟乙酰胺;TFA,三氟乙酸;Cl_s,4-氯-苯磺酰基。

[0113] 为了合成clogD_{7.4}值更低的其它ATI,脱除11a的Ns基团,得到仲胺12。然后,采用市场上购买的胍基化试剂15,使仲胺官能化为阳离子胍基13,然后采用三氟乙酸去保护。还通过采用溴乙酸叔丁酯处理12,然后,采用三氟乙酸去保护,合成了两性离子类似物14。

[0114] 不受任何理论限制,我们认为,向ATI核心引入离子化基团将:1)降低不相干的哺乳动物的毒性,2)改善代谢稳定性与/或3)改善RMA在MRSA中的活性。除控制在哺乳细胞中的分布之外,增加ATI的电荷还会降低全身药物代谢。

[0115] ATI 11-14的clogD值范围较宽,并对它们对头孢唑啉(即第一代头孢菌素)和阿莫西林/克拉维酸(即沃格孟汀,阿莫西林/克拉维酸)(Augmentin, amox/clav)的最小重新敏化浓度(MRC)进行了评估,以及对它们在多重耐药MRSA菌株ATCC BAA-44中的最低抑制浓度(MIC)进行了评估。结果在表1-3中给出。通过测定任何MRC和MIC值较佳的化合物在人宫颈癌(HeLa)细胞中的半数生长抑制浓度(GI₅₀),开展它们对哺乳动物的潜在毒性评估。

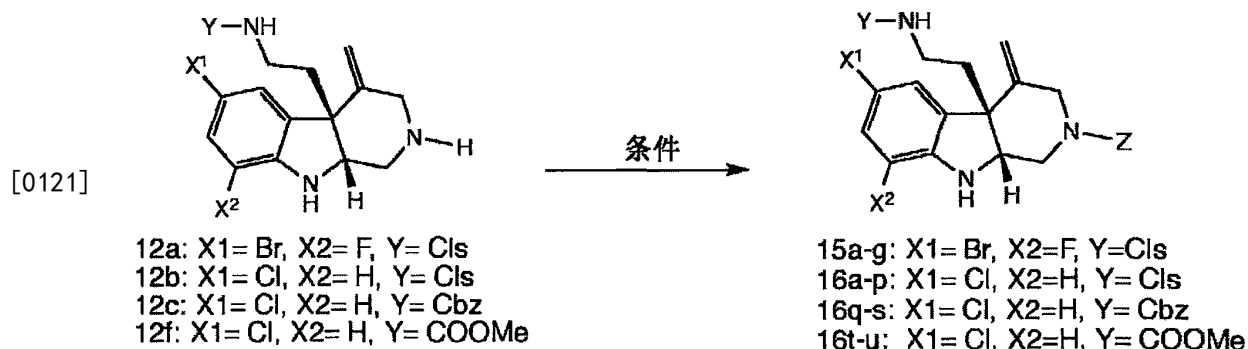
[0116] 表1-3 Of1和ATI的生物活性对比

序号	clogD _{7.4}	MRC Cef ^[a]	MRC阿莫西林/克拉维酸 ^[a]	MIC ^[a]	GI ₅₀ ^[a, b]
Ns-ATI 11a	4.5	>32	>32	>32	NT
Ms-ATI 11b	4.1	>32	>32	>32	NT
[0117] TFA-ATI 11c	2.5	4	4	>32	19
NH-ATI 12	2.0	4	4	8	6.7
Guan-ATI 13	0.74	2	2	8	40
Gly-ATI 14	0.54	>32	>32	>32	NT

[0118] ^[a]所有MIC、MRC和GI₅₀值的单位都是ug mL⁻¹; ^[b]测定HeLa细胞。Cef-头孢唑啉;阿莫西林(amox)/克拉维酸(clav)-阿莫西林/克拉维酸;NT-未测试。

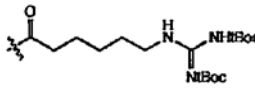
[0119] 化合物11c增强了β-内酰胺在BAA-44中的活性,没有可观察到的抗菌活性。极性更强的类似物,胺12本身显示具有有效的抗菌活性。胍类似物13不仅显示出改善的β-内酰胺-增强活性(头孢唑啉和阿莫西林/克拉维酸的MRC=2ug mL⁻¹)和中等抗菌活性(MIC=8ug mL⁻¹),而且对哺乳动物的毒性更低,在HeLa细胞中的GI₅₀是40ug mL⁻¹。在生理条件下,化合物14是两性离子化合物,具有甚至更低的clogD值。13在各种MRSA菌株,如社区获得性MRSA菌株NRS-100和NRS-384,及耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)菌株NR-46414中的进一步评估也得出了类似的结果(MRC=2ug mL⁻¹)。

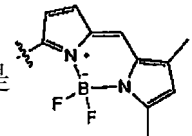
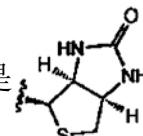
[0120] 采用磺酰氯、酰基氯、氯甲酸酯和琥珀酰亚胺酯(succinimidyl esters)处理ATI 12,得到ATI类似物15a-g,16a-u(方案1-2)。



[0122] 15a (Z= -C(=O)CH₃); 15b (Z= -C(=O)(CH₂)₂CCH₃); 15c (Z= -C(=O)CH₂NHC(=O)OtBu); 15d (Z= -C(=O)CH₂NH₃⁺ · ⁻OC(=O)CF₃); 15e (Z= -C(=O)(CH₂)₅NHC(=O)-

CH₂CH₂Y¹); 15f (Z = -C(=O) (CH₂)₃Y²); 15g (Z = -C(=O) (CH₂)₂CO₂H); 16a (Z = -C(=O) CF₃); 16b (Z = -C(=O) CH₃); 16c (Z = -C(=O) CH₂CH₃); 16d (Z = -C(=O) (CH₂)₂CCH₃); 16e (Z = -C(=O) (CH₂)₆CH₃); 16f (Z = -C(=O) (4,4-二氟环己基)); 16g (Z = -C(=O) CH₂ ((四氢-2H-吡喃-4-基)); 16h (Z = -C(=O) (1-(2,2,2-三氟乙酰)哌啶-4-基)); 16i (Z = -C(=O) (1-(2,2,2-三氟乙酰)氮杂啶-3-基)); 16j (Z = -C(=O) (4-氯苯基));

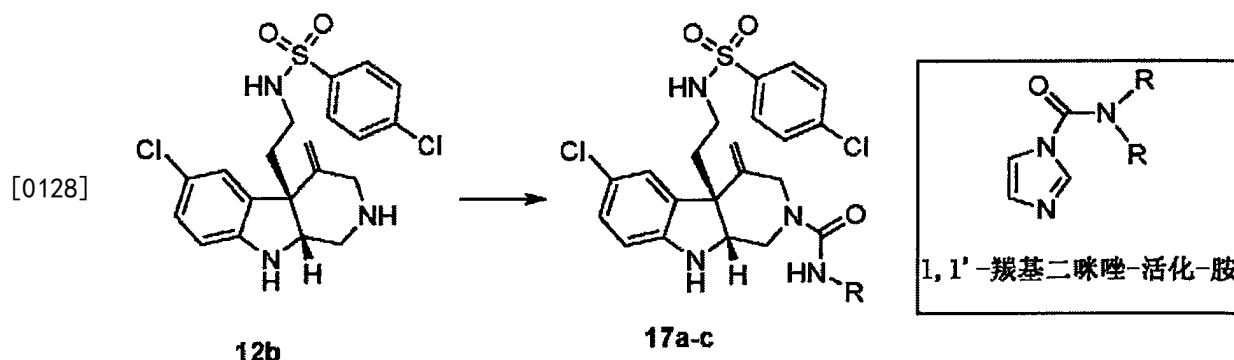
[0123] 16k  16l (Z = -SO₂ (1-甲基-1H-咪唑-4-基)); 16m (Z = -SO₂ (4-氯苯基)); 16n (Z = -SO₂ (6-氯吡啶-3-基)); 16o (Z = -C(=O) ((吗啉基)甲基)); 16p (Z = -C(=O) (6-氯吡啶-3-基)); 16q (Z = -C(=O) (CH₂)₂CCH₃); 16r (Z = -C(=O) (1-(2,2,2-三氟乙酰)哌啶-4-基)); 16s (Z = -C(=O) (1-(2,2,2-三氟乙酰)氮杂啶-3-基)); 16t (Z = -C(=O) Ot-Bu); 16u (Z = -C(=O) (1-(2,2,2-三氟乙酰)哌啶-4-基)); 和 16v (Z = -SO₂ (4-氯苯基)),

[0124] 其中Y¹是 ; Y²是 ;

[0125] 试剂和条件: (a) 琥珀酰亚胺酯、TEA、DCM; (b) TFA:DCM (1:1)。

[0126] 方案1-2 酰基-ATI的合成。

[0127] 可以采用1,1'-羰基二咪唑-活化-胺处理,将仲胺12b官能化为不同的取代脲。方案1-3。



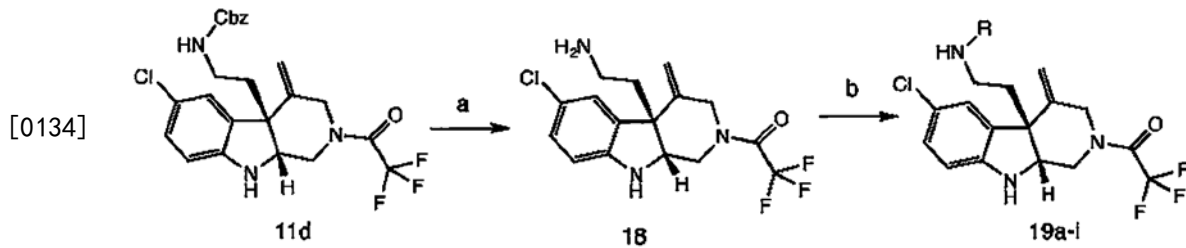
[0129] 17a (R = 四氢-2H-吡喃-4-基);

[0130] 17b (R = (四氢呋喃-2-基)甲基); 和

[0131] 17c (R = 甲基)

[0132] 方案1-3 脲-ATI的合成

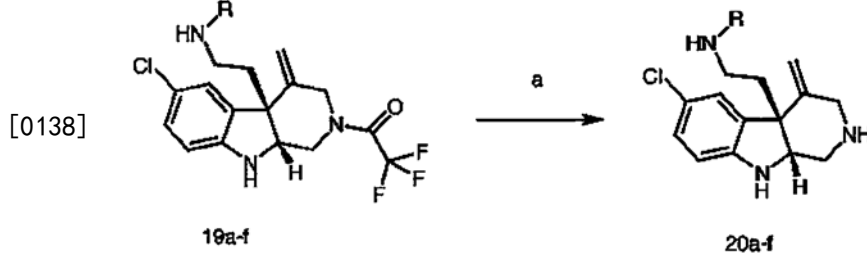
[0133] 脱除Cbz保护基团,接着采用磺酰氯、酰基氯、氯甲酸酯、异氰酸酯和1,1'-羰基二咪唑-活化-胺处理,从11d制备侧链具有不同取代基的三氟乙酰胺类似物,以分别得到磺胺、酰胺、氨基甲酸酯和脲方案1-4。



[0135] 19a (R = -SO₂ (6-氯吡啶-3-基)); 19b (R = -SO₂ (2,4-二氯苯基)); 19c (R = -SO₂ (4-氟苯基)); 19d (R = -SO₂ (4-氰苯基)); 19e (R = -C(=O) (4-氯苯基)); 19f (R = -C(=O)NH (4-氯苯基)); 19g (R = -C(=O)NH (四氢-2H-吡喃-4-基)); 19h (R = -C(=O)NH ((四氢呋喃-2-基)甲基)); 19i (R = -C(=O) (1-甲基哌啶-4-基))。

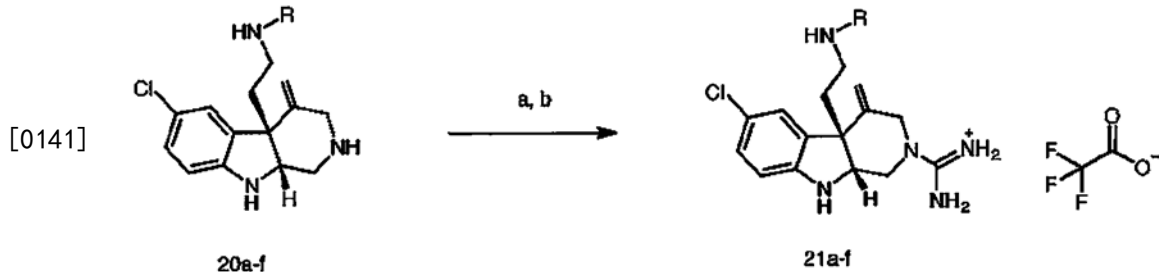
[0136] 方案1-4 TFA-ATI类似物的合成。试剂和条件:a) BF₃-乙醚络合物、二甲基硫醚、DCM, 0°C; b) 磺酰氯和TEA、酰基氯和TEA、氯甲酸酯和TEA、异氰酸酯或1,1'-羰基二咪唑-活化-胺、DCM。

[0137] 将三氟乙酰胺类似物19a-f去保护,得到仲胺类似物20a-f。方案1-5。



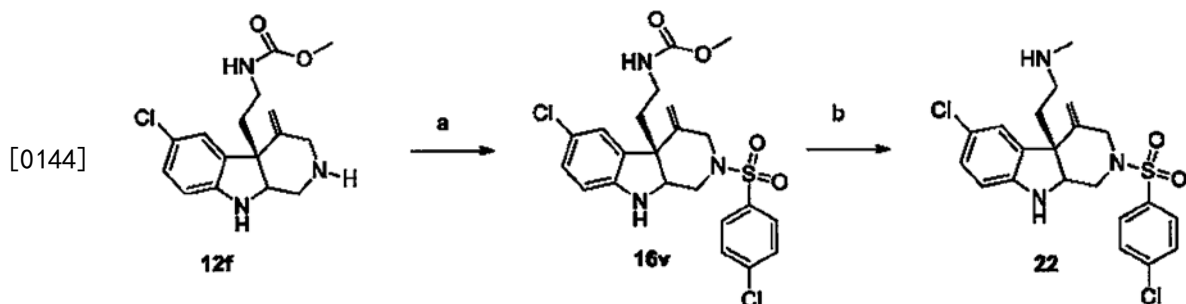
[0139] 方案1-5. NH-ATI的合成。试剂和条件:a) K₂CO₃、MeOH/H₂O (10:1)。

[0140] 采用N,N-二-Boc-1H-吡唑-1-甲脒处理仲胺20a-f,然后采用三氟乙酸去保护,得到胍类似物21a-f。方案1-6。



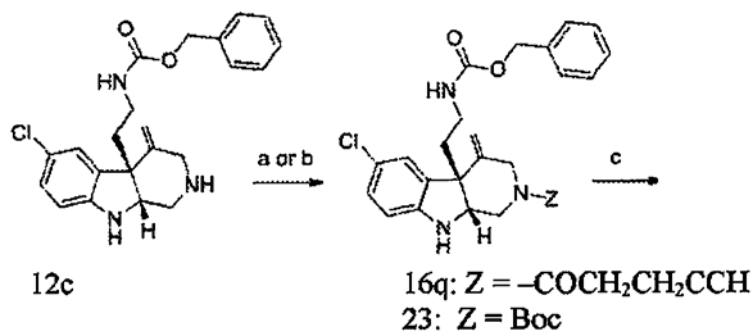
[0142] 方案1-6. 胍-ATI (Guan-ATI) 的合成。试剂和条件:a) N,N-二-Boc-1H-吡唑-1-甲脒, DCM; b) TFA:DCM (1:1)。

[0143] 将与侧链氮相连的官能团转化为ATI的哌啶氮。例如,将4-氯-苯-磺酰胺转化为ATI的哌啶环,得到22。方案1-7。

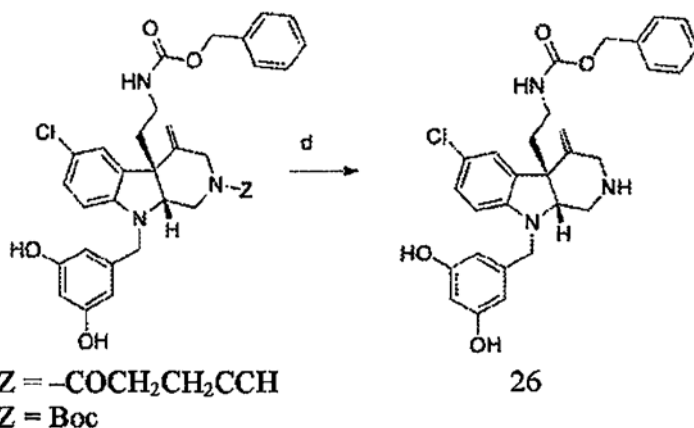


[0145] 方案1-7侧链-哌啶官能团转化为NH-ATI。试剂和条件:a) 4-氯-苯-磺酰氯, TEA, DCM; b) 氢化铝锂, 回流, THF, 6小时。

[0146] ATI的吡啶氮可以采用苯甲醛通过还原胺化改性。方案1-8。



[0147]



[0148] 方案1-8N-苄基ATI的制备。试剂和条件:a) 琥珀酰亚胺酯, DCM, 0°C; b) Boc_2O , DCM, 0°C; c) 3,5-二羟基苯甲醛, NaCNBH_3 , AcOH, MeOH, 0°C; d) TFA:DCM (1:1), 0°C。

[0149] 对各种化合物的理化特性进行了评价。我们发现, 化合物ATI 13的物理性能得到了巨大改善。例如, ATI 13的饱和浓度是 587ug mL^{-1} , 差不多是其在MRSA中的MRC的300倍。对13的体内药代动力学(PK)特性进行了评估。经腹膜内(IP)注射向小鼠施用单剂(30mg kg^{-1}) 13, 表明其耐受性非常好, 仅出现很少的临床现象, 13表现出很有前景的体内PK性质。

[0150] 13的半衰期($T_{1/2}$)是2.5小时, 30分钟后迅速达到最高浓度(C_{max}) 8.0ug mL^{-1} 。至24小时处最后数据点的曲线下面积(AUC)是 18.2hr ug mL^{-1} , 与推到无限计算的AUC相符。因此, 与高极性 β -内酰胺抗生素类似, 预期13具有较低的一般膜渗透性。为了测试这一点, 采用MDCK细胞开展渗透性评价。13的渗透性与低渗透性标志物甘露醇相当(即13的渗透性是 $2.11\text{E}-06 \pm 3.53\text{E}-07\text{cm s}^{-1}$, 甘露醇的渗透性是 $1.51\text{E}-06 \pm 2.67\text{E}-07\text{cm s}^{-1}$)。为了比较, 在此试验中测定了高渗透性标志物美托洛尔(metoprolol)的渗透性, 是 $5.35\text{E}-05 \pm 6.05\text{E}-06\text{cm s}^{-1}$ 。尽管体外渗透性较低, 但IP给药的体内PK研究表明, 13在MRSA中的血浆浓度能够达到大约4xMRC。总之, ATI 13具有较高的水中溶解性、低哺乳动物膜渗透性和良好的体内PK特性。

[0151] 一般方法: 除非另外声明, 试剂均从市场上购买, 并且不经进一步提纯即使用。二氯甲烷(DCM)购自飞世尔化工公司(Fisher Chemical), 并在使用前在氮气保护下采用 CaH_2 精馏。甲苯(Tol)购自西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich)公司, 并在使用前在氮气保护下采用 CaH_2 精馏。三乙胺(TEA)和甲醇(MeOH)购自飞世尔化工公司。无水四氯化碳(CCU)、乙腈(ACN)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和1,4-二恶烷(二恶烷)购自西格玛-奥德里奇公司(Sigma-

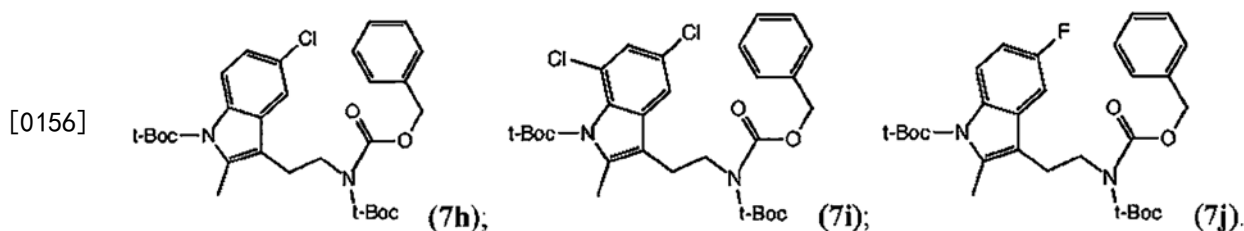
Aldrich)。乙酸乙酯 (EtOAc) 购自马克龙精细化工 (Macron Fine Chemicals) 公司。氯仿 (CHCl_3) 和己烷 (Hex) 购自EMD化工公司。EtOAc、Hex、MeOH、 CHCl_3 和TEA作为薄层色谱 (TLC) 和快速柱色谱的淋洗溶剂。

[0152] 环化前体 (8a-j) 的制备: 一般方法A (吡啶合成反应): 在 0°C 下, 向4-二甲基氨基吡啶 (DMAP) (3.67g, 30mmol) 的无水DMF (25mL) 溶液中加入4-氯-苯磺酰氯 (6.33g, 30mmol)。加入2-甲基-1-吡咯啉 (2.08g, 25mmol) 的无水DMF (25mL) 溶液, 在同一温度下搅拌反应1小时。在 0°C 下, 向反应中加入甲磺酸 (4.87mL, 75mmol)。然后, 在 23°C 搅拌反应2小时。加入4-溴-2-氟-苯胂盐酸盐 (9.06g, 35.7mmol), 并在 23°C 下搅拌1小时。然后, 将反应加热到 85°C , 在密封管中反应12小时。然后, 将反应冷却到室温, 并真空浓缩。将所得残渣溶于乙酸乙酯中, 并用 NaHCO_3 饱和水溶液洗涤, 然后用盐水洗涤。将结合的有机层在无水 Na_2SO_4 上干燥, 过滤, 真空浓缩, 得到粗产品。粗产品用70:30 Hex:EtOAc洗脱, 采用硅胶柱色谱提纯, 得到白色固体状的N, (2-(5-溴-7-氟-2-甲基-1H-吡啶-3-基) 乙基) 4-氯苯磺酰胺 (S1)。

[0153] 采用这种方法, 还制备了下述化合物: N-(2-(5-溴-2-甲基-1H-吡啶-3-基) 乙基) 4-氯苯磺酰胺 (S2); 苄基 (2-(5-氯-2-甲基-1H-吡啶-3-基) 乙基) 氨基甲酸酯 (S3); 苄基 (2-(5,7-二氯-2-甲基-1H-吡啶-3-基) 乙基) 氨基甲酸酯 (S4); 苄基 (2-(5-氟-2-甲基-1H-吡啶-3-基) 乙基) 氨基甲酸酯 (S5)。

[0154] 一般方法B (N,N'-diBoc保护): 向S1 (2.75g, 6.16mmol, 12.3mL, 0.50M DCM溶液) 溶液中加入DMAP (1.50g, 12.3mmol)、TEA (1.71mL, 12.3mmol) 和二碳酸二叔丁酯 (Boc_2O) (3.36g, 15.4mmol)。在室温搅拌反应48小时, 然后, 用水和盐水洗涤。然后, 在 Na_2SO_4 上干燥有机层, 真空浓缩, 得到粗产品。粗产品用90:10 Hex:EtOAc洗脱, 采用硅胶柱色谱法提纯, 得到黄色的叔-丁基5-溴-3-(2-((N-(叔-丁氧基羰基)-4-氯苯基) 亚磺酰氨基) 乙基)-7-氟-2-甲基-1H-吡啶-1-羧酸盐 (7a)。

[0155] 采用这种方法还制备了下述化合物: 叔-丁基5-溴-3-(2-((N-(叔-丁氧基羰基)-4-氯苯基) 亚磺酰氨基) 乙基)-2-甲基-1H-吡啶-1-羧酸盐 (7g);



[0157] 一般方法C (7a的溴化): 向7a (1.00g, 1.54mmol, 6.2mL, 0.25M CCl_4 溶液) 溶液中加入N-溴琥珀酰亚胺 (NBS) (0.276g, 1.54mmol) 和过氧化苯甲酰 (BPO) (0.050g, 0.155mmol), 然后加热到 85°C 反应1小时。通过硅藻土过滤粗反应物, 脱除不溶材料, 然后, 真空浓缩, 得到叔-丁基5-溴-2-(溴甲基)-3-(2-((N-(叔-丁氧基羰基)-4-氯苯基) 亚磺酰氨基) 乙基)-7-氟-1H-吡啶-1-羧酸盐 (10a), 该产品在下一步中直接使用, 不需要进一步提纯。

[0158] 一般方法D (炔丙基胺的烷基化): 在10分钟内, 在 -10°C 下, 向炔丙基胺 (0.986mL, 15.4mmol, 10M CAN溶液) 中逐滴加入粗10a (1.12g, 1.54mmol, 7.7mL, 0.20M CAN溶液) 溶液。吡啶加入结束后, 在冰浴中搅拌反应1小时。用EtOAc将反应物稀释20倍, 并用饱和碳酸氢盐溶液洗涤, 然后用盐水洗涤。然后, 在无水 Na_2SO_4 上干燥有机层, 过滤, 真空浓缩, 得到粗产品。粗产品用50:48:2 Hex:EtOAc:TEA洗脱, 采用硅胶柱色谱法提纯, 得到呈透明油状的叔

丁基5-溴-3-(2-((N-(叔-丁氧基羰基)-4-氯苯基)亚磺酰氨基)乙基)-7-氟-2-((丙-2-炔-1-基氨基)甲基)-1H-吡啶-1-羧酸盐(S6)。

[0159] 类似地,采用一般方法C和D,分别从化合物7(g)-7(j)制备相应的S7-S10化合物。

[0160] 一般方法E(Boc去保护):将化合物S6(0.293g,0.419mmol)溶于10mL 1:1 TFA:DCM中,然后在0℃搅拌2小时。然后,将溶剂真空浓缩,得到残渣。用EtOAc稀释残渣,然后用NaHCO₃饱和水溶液洗涤。然后,用EtOAc萃取水溶液3次,用盐水洗涤结合的有机层,并在无水Na₂SO₄上干燥,过滤,真空浓缩,得到N-(2-(5-溴-7-氟-2-((丙-2-炔-1-基氨基)甲基)-1H-吡啶-3-基)乙基)-4-氯苯磺酰胺(S11),该产品未经进一步提纯用于下一步。

[0161] 一般方法F(炔丙基胺的保护):在0℃下,向S11(0.209g,0.419mmol,1.7mL,0.25MDCM溶液)溶液中加入TEA(0.175mL,1.26mmol)、4-硝基-苯磺酰氯(NsCl)(0.098g,0.440mmol),加热到室温。搅拌反应2小时。将反应浓缩,然后用EtOAc稀释,并用饱和NaHCO₃水溶液洗涤。有机层用水、盐水洗涤,然后分离,并在无水Na₂SO₄上干燥。过滤脱除固体,然后真空脱除溶剂,得到粗产品。粗产品用70:30 Hex:EtOAc洗脱,采用硅胶柱色谱法提纯,得到呈米色固体状的N-(5-溴-3-(2-((4-氯苯基)亚磺酰氨基)乙基)-7-氟-1H-吡啶-2-基)甲基)-4-硝基-N-(丙-2-炔-1-基)苯磺酰胺(8a)。

[0162] 替代方法F'(丙炔基胺的保护):在0℃下,向S11(0.050g,0.100mmol,0.400mL,0.25M DCM溶液)溶液中加入TFAOSu(0.021g,0.100mmol),并加热到室温。搅拌反应2小时。然后加入NaHCO₃饱和水溶液将反应淬灭,然后用EtOAc稀释。有机层用水,然后用盐水洗涤。然后,将有机层在无水Na₂SO₄上干燥。过滤脱除固体,然后真空脱除溶剂,得到粗产品。粗产品用70:30 Hex:EtOAc洗脱,采用硅胶柱色谱法提纯,得到呈透明油状的N-(5-溴-3-(2-((4-氯苯基)亚磺酰氨基)乙基)-7-氟-1H-吡啶-2-基)甲基)-2,2,2-三氟-N-(丙-2-炔-1-基)乙酰胺(8b)。

[0163] 采用合适的丙炔基胺化合物和合适的保护基团,采用一般方法E和F制备下述化合物:N-(2-(5-溴-7-氟-2-((N-(丙-2-炔-1-基)甲基亚磺酰氨基)甲基)-1H-吡啶-3-基)乙基)-4-氯苯磺酰胺(8c);N-(5-溴-3-(2-((4-氯苯基)亚磺酰氨基)乙基)-7-氟-1H-吡啶-2-基)甲基)-4-氯-2-硝基-N-(丙-2-炔-1-基)苯磺酰胺(8d);N-(5-溴-3-(2-((4-氯苯基)亚磺酰氨基)乙基)-7-氟-1H-吡啶-2-基)甲基)-4-甲基-N-(丙-2-炔-1-基)苯磺酰胺(8e);苄基((5-溴-3-(2-((4-氯苯基)亚磺酰氨基)乙基)-7-氟-1H-吡啶-2-基)甲基)(丙-2-炔-1-基)氨基甲酸酯(8f);N-(5-溴-3-(2-((4-氯苯基)亚磺酰氨基)乙基)-1H-吡啶-2-基)甲基)-4-硝基-N-(丙-2-炔-1-基)苯磺酰胺(8g);苄基(2-(5-氟-2-(((4-硝基-N-(丙-2-炔-1-基)苯基)亚磺酰氨基)甲基)-1H-吡啶-3-基)乙基)氨基甲酸酯(8h);苄基(2-(5,7-二氯-2-(((4-硝基-N-(丙-2-炔-1-基)苯基)亚磺酰氨基)甲基)-1H-吡啶-3-基)乙基)氨基甲酸酯(8i);苄基(2-(5-氟-2-(((4-硝基-N-(丙-2-炔-1-基)苯基)亚磺酰氨基)甲基)-1H-吡啶-3-基)乙基)氨基甲酸酯(8j)。

[0164] 一般方法G(金-催化串联环化):在密封管内将化合物8a(40.0mg,0.058mmol)溶于无水1,4-二恶烷(1.0mL)中。以固体形式加入5mol%催化剂XPhosAuNTf₂(2.8mg,2.9umol),在氩气氛围下将反应加热到90℃,保持12小时。然后,采用硅藻土将反应混合物真空浓缩。将得到的自由流动的粉末直接用于硅胶柱色谱,采用80:20己烷:乙酸乙酯洗脱,得到呈透明油状的四环吡啶啉9a:(6-溴-10-((4-氯苯基)磺酰)-8-氟-4-亚甲基-2-((4-硝基苯)磺

酰)-1,2,3,4-四氢-9H-9a,4a-(环亚胺基桥亚乙基)吡啶并[3,4-b]吡啶)。

[0165] 类似地,采用化合物8b-8j,采用一般方法G,分别制备相应的四环吡啶啉化合物9b-9j。

[0166] 一般方法H(还原开环反应):制备TFA(1.0mmol,0.114g,0.077mL)的THF(1.0mL)溶液;在0℃下,将2当量TFA的该溶液(0.117mmol,0.117mL,1.0M THF溶液)加入到的9a(0.040g,0.058mmol,0.10M)的10:1 THF:MeOH(0.580mL)混合物溶液中。将反应加热到室温,并搅拌1小时。反应采用甲醇浓缩3次,然后溶于乙酸乙酯中,有机层用NaHCO₃饱和水溶液洗涤。结合有机层在无水Na₂SO₄上干燥,过滤,真空浓缩,得到粗产品。粗产品用60:40己烷:乙酸乙酯洗脱,采用硅胶柱色谱提纯,得到呈黄色油状的N-(2-((4aS,9aR)-6-溴-8-氟-4-亚甲基-2-((4-硝基苯)磺酰)-1,2,3,4,9,9a-六氢-4aH-吡啶并[3,4-b]吡啶-4a-基)乙基)-4-氯苯磺酰胺(11a)。

[0167] 分别采用化合物9b和9c,采用一般方法H制备下述化合物:N-(2-((4aS,9aR)-6-溴-8-氟-4-亚甲基-2-(甲基磺酰)-1,2,3,4,9,9a-六氢-4aH-吡啶并[3,4-b]吡啶-4a-基)乙基)-4-氯苯磺酰胺(11b);和N-(2-((4aS,9aR)-6-溴-8-氟-4-亚甲基-2-(2,2,2-三氟乙酰)-1,2,3,4,9,9a-六氢-4aH-吡啶并[3,4-b]吡啶-4a-基)乙基)-4-氯苯磺酰胺(11c)。

[0168] 选择性去保护:向11a(0.057g,0.083mmol,0.080M)的无水CAN溶液中加入苯硫酚(0.045mL,0.50mmol)和K₂CO₃(0.057g,0.50mmol)。将反应在氩气条件下回流3小时。将反应冷却到室温,真空脱除溶剂,得到残渣,将残渣溶于甲醇中,然后,浓缩到硅藻土上,得到自由流动的固体,将这种固体负载到平衡硅胶色谱柱上,并采用90:8:2的DCM:MeOH:TEA洗脱,得到呈透明油状的N-(2-((4aS,9aR)-6-溴-8-氟-4-亚甲基-1,2,3,4,9,9a-六氢-4aH-吡啶并[3,4-b]吡啶-4a-基)乙基)-4-氯苯磺酰胺(12)。

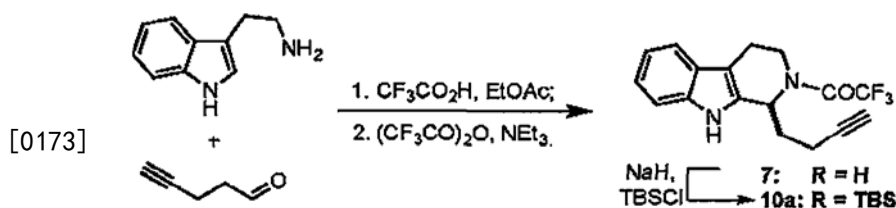
[0169] 制备胍衍生物:制备化合物12(0.011g,0.022mmol,0.070M)的DCM(0.314mL)溶液,并冷却到0℃。向此溶液中加入N,N-二-Boc-1H-吡啶-1-甲脒(0.024mmol,7.5mg),将反应加热到室温,在氩气条件下搅拌12小时。用DCM将粗反应物稀释到1mL,用2.0N NaOH,然后用盐水洗涤。将有机层用Na₂SO₄干燥,真空浓缩,得到透明残渣,用70:30己烷:乙酸乙酯洗脱,采用柱色谱法提纯,得到diBoc-胍ATI,直接用于下一步。在0℃下,将DiBoc-胍ATI溶于氩气保护的1mL 1:1 DCM:TFA中,搅拌反应4小时。然后,真空浓缩反应物,得到呈白色固体状的(4aS,9aR)-6-溴-4a-(2-((4-氯苯)亚磺酰氨基)乙基)-8-氟-4-亚甲基-1,3,4,4a,9,9a-六氢-2H-吡啶并[3,4-b]吡啶-2-甲脒(13)的三氟乙酸盐。

[0170] 制备2-((4aS,9aR)-6-溴-4a-(2-((4-氯苯)亚磺酰氨基)乙基)-8-氟-4-亚甲基-1,3,4,4a,9,9a-六氢-2H-吡啶并[3,4-b]吡啶-2-基)乙酸的三氟乙酸盐(14)。制备化合物12(0.024g,0.048mmol,0.070M)的DCM(0.686mL)溶液,并在氩气条件下冷却到0℃。制备溴乙酸叔丁酯(1.0mmol,0.195g,0.148mL)的DCM(1mL)溶液。然后,将1当量(0.048mL,0.048mmol,1.0M DCM溶液)的此溶液和TEA(0.020mL,0.144mmol)逐滴加入到0℃的12的溶液中。然后,将反应在室温搅拌3小时。将有机层用DCM稀释,并用2.0N NaOH洗涤,然后用盐水洗涤。有机层在Na₂SO₄上干燥,然后,真空浓缩,得到残渣,残渣用50:48:2 Hex:EtOAc:TEA洗脱,采用柱色谱法提纯,得到化合物14的叔丁酯,在下一步中直接使用。将化合物14的叔丁酯溶于1.0mL DCM:TFA 1:1,并冷却到0℃,然后在氩气条件下搅拌2小时。然后,将反应物真空浓缩,得到呈黄色油状的化合物14的三氟乙酸盐黄色残渣(2步38%收率,0.012g,

0.018mmol)。

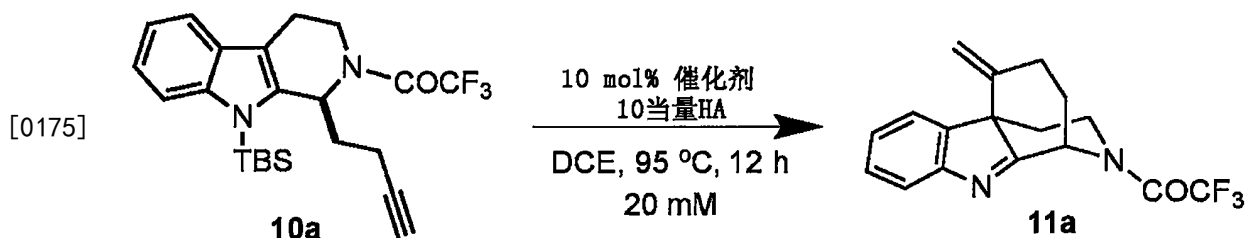
[0171] **实例2:多环假吲哚化合物:**桥连多环假吲哚是天然吲哚生物碱中的主要结构单元。这些多环假吲哚中的许多多环假吲哚都有一个常见的四环核心,并具有消炎和抗感染活性。但是,已经证明,很难构建桥连假吲哚构架(例如,灯台树次碱(scholarisine H)、阿枯米灵、10,11-dimethoxynareline、劲直胺(strictamine)、鸭脚树叶碱和白雀定(quebrachidine)中的存在的那些)。该实例采用金-催化脱硅烷基环化反应,提供了简单的桥连四环假吲哚的合成方法。环化产品的抗菌筛选还表明,本发明的化合物还选择性抑制MRSA的耐 β -内酰胺性。

[0172] 采用吲哚7,通过采用NaH和叔丁基二甲基氯硅烷(TBS)连续处理制备硅烷基化环化前体10a(方案2-1)。



方案 2-1

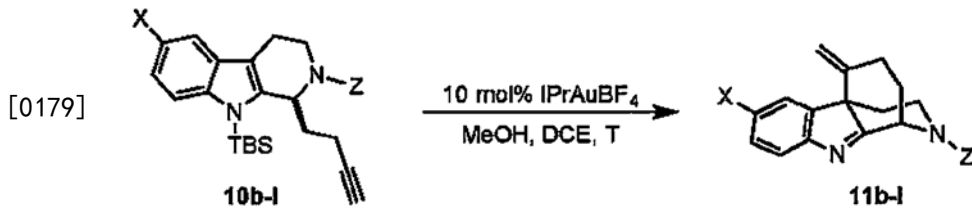
[0174] 采用存在的底物10a,可采用各种催化剂和反应条件开展环化(表2-1)。正如所示,采用MeOH作为硅烷基脱除剂和质子源,IPrAuBF₄-催化10a脱硅烷基环化,得到所需产品,且收率良好。



[0176] 表2-1反应条件

序号	催化剂	HA	消耗量 [%] ^[a]	收率 [%] ^[a]
1	AuCl ₃	MeOH	51	6
2	Ph ₃ PAuNTf ₂	MeOH	100	0
3	PtCl ₂	MeOH	37	0
4	IMesAuBF ₄	MeOH	52	27
[0177] 5	IPrAuBF ₄	MeOH	82	67(66) ^[b]
6	IPrAuOTf	MeOH	100	0
7	IPrAuSbF ₆	MeOH	43	7
8	IPrAuBF ₄	i-PrOH	64	20
9	IPrAuBF ₄	H ₂ O	63	27
10	IPrAuBF ₄	^p NO ₂ PhOH	60	22

[0178] [a]测定¹H NMR之前,加入1当量4-(二甲氨基)吡啶作为内标。根据¹H NMR积分,计算10a的消耗量和收率,[b]括号中的数字是分离收率(80%brsm)。



[0180] 表2-2:

序号	10	X	Z	MeOH (eq.)	T (°C)	收率 [%]
1	10b	H	COPh ^p Cl	20	90	66
2	10c	H	Ns	20	70	86
3	10d	H	SO ₂ Ph ^p Cl	10	55	64
4 ^[a]	10e	H	Ts	15	85	65
5	10f	H	Cbz	20	100	53 ^[b]
6 ^[c]	10g	MeO	COCF ₃	20	95	66
7 ^[a]	10h	MeO	Ns	5	55	78
8 ^[d]	10i	Cl	COCF ₃	20	105	44
9 ^[e]	10j	Cl	Ns	5	70	66
10 ^[e]	10k	Cl	SO ₂ Ph ^p F	15	105	51
11	10l	H	COCF ₃		95	

[0182] [a] 50mM. [b] 78%收率brsm. [c] 15mol% IPrAuBF₄, 100mM. [d] 20mol% IPrAuBF₄, 100mM. [e] 15mol% IPrAuBF₄, 50mM.

[0183] 表2-2示出了采用这种反应制备的代表性四环假吲哚化合物。制备了外消旋形式的色胺氮(例如,酰胺、氨基甲酸酯和磺酰胺)与/或吲哚的5-位(例如,MeO、H和Cl)上带各种官能团的基质。所有基质都被转化为四环假吲哚。各种官能团都适合胺氮。

[0184] 然后,在系列细菌全细胞分析中对四环假吲哚化合物进行评估。化合物11b增强了甲氧西林在多重耐药MRSA菌株ATCC BAA-44中的活性。为了对11b和甲氧西林的协同程度进行评估,开展了棋盘最小抑菌浓度(MIC)研究。经测定,这两种化合物在BAA-44中的部分抑菌浓度指数(FICI)是0.039 (<0.5),表明两者之间存在强烈的协同效应。

[0185] 表2-3 11b在MRSA BAA-44中的活性增强情况。

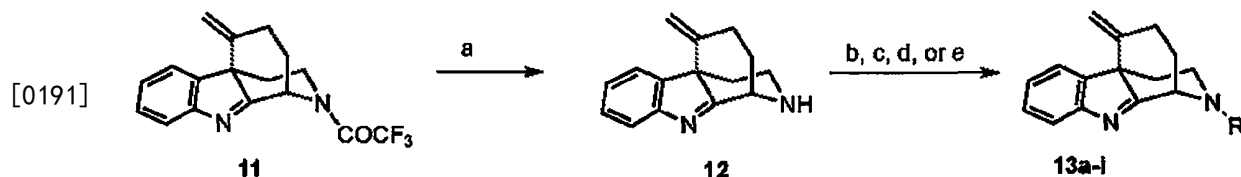
抗生素	MIC (μg/mL)	MIC (+11b) ^[a] (μg/mL)	增强倍数
甲氧西林	128	8	16
苯唑西林	32	1	32
阿莫西林/克拉维酸	16	2	8
头孢唑啉	128	4	32
美罗培南	4	1	4

[0187] [a] 在10uM 11b存在下测定MIC值。

[0188] 分别在包含11b和没有11b的条件下测定各种抗生素的MIC。除甲氧西林外,BAA-44还对范围广泛的各种抗生素有抗性,如四环素、红霉素和达托霉素。如表2-3所示,化合物11b增强所有试验的β-内酰胺的活性,如苯唑西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢唑啉和美罗培南。并不受限于任何理论,我们认为,本发明的化合物11b和其它化合物是β-内酰胺的选择性增强剂。

[0189] 还评估了11b的最小重新敏化浓度(MRC),以使各种MRSA菌株重新对 β -内酰胺抗生素、阿莫西林/克拉维酸和头孢唑啉敏感。除BAA-44之外,还对其它CA-MRSA菌株(NRS-100(亦称为COL)和NRS-384(最普遍CA-MRSA类型USA 300的代表性菌株),及VRSA菌株NR-46414和NR-46421进行了评估。我们发现,在所有测试菌株中,11b的MRC是在0.25-2 μ g/mL范围内。此外,11b本身显示出较低的抗菌活性,其在所有测试菌株中的MIC是32-64 μ g/mL,并且对哺乳动物的毒性较低,在人宫颈癌(HeLa)细胞中的半数生长抑制浓度(GI50)是41 μ g/mL。

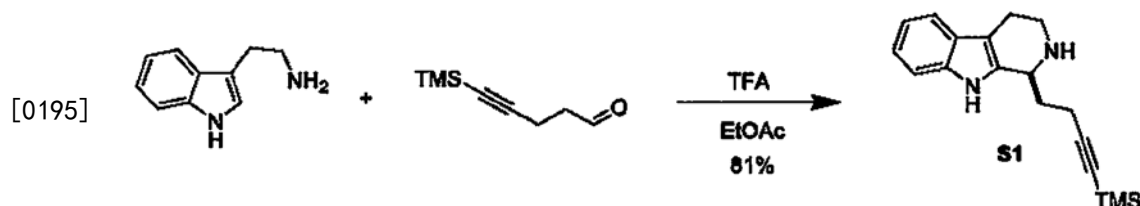
[0190] 化合物111用于制备各种类似物。在碱性条件下将111的三氟乙酰胺脱除,得到仲胺12。这种中间体进一步采用卤代烷、酰基氯、磺酰氯或EDC介导的羧酸偶联进行官能化(方案2-2)。



[0192] 13a (R = -COCH₂ (四氢-2H-吡喃-4-基)); 13b (R = -COCH₂NH-tBoc); 13c (R = -CO (1-甲基哌啶-4-基)); 13d (R = -COCH₂ (吗啉代)); 13e (R = -CO (吡啶-3-基)); 13f (R = -CO (6-氯吡啶-3-基)); 13g (R = -COCH₂ (4-甲基哌嗪-1-基)); 13h (R = -CO (2-甲基恶唑-4-基)); 13i (R = (1-甲基-1H-咪唑-4-基)磺酰)。

[0193] 方案2-2试剂和条件:a) K₂CO₃, THF:H₂O (10:1); b) 酰基氯, TEA, DCM; c) RCOOH, 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺, TEA, DCM; d) RSO₂Cl, TEA, DCM; e) RCH₂Br, TEA, DCM。

[0194] 一般方法A(皮克特-施彭格勒(Pictet-Spengler)反应)



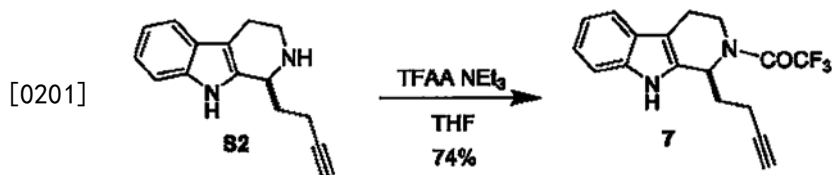
[0196] 在0℃下,向色胺(2.00g, 12.5mmol)的干燥EtOAc(25.0mL)溶液中加入乙醛(0.960g, 6.24mmol),然后缓慢加入TFA(1.49mL, 25.0mmol)。另外一部分乙醛(2.89g, 18.7mmol)通过注射泵在3小时内加入。将所得混合物在25℃搅拌12小时,然后冷却到0℃。将此溶液采用2M NaOH(13.0mL)碱化。采用DCM(50mL × 3)萃取水层。将结合的有机相在Na₂SO₄上干燥,并过滤和浓缩。采用快速色谱法(20:1DCM/MeOH)提纯,得到呈黄色油状的纯产品(3.00g, 81%)。

[0197] 采用这种方法还制备了下述化合物:6-甲氧基-1-[4-(三甲基硅烷基)丁-3-炔-1-基]-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-b]吲哚(S4);6-氯-1-(4-(三甲基硅烷基)丁-3-炔基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(S7)。

[0198] 一般方法B(脱硅烷基化反应(desilylative reaction)):在0℃,向底物S1(3.00g, 10.1mmol)的THF(33.0mL)溶液中加入1M TBAF(12.0mL, 12.0mmol)。将反应溶液加热到25℃并在25℃搅拌1小时,然后用水(15mL)淬灭反应。水层采用EtOAc(40mL × 3)萃取,并在Na₂SO₄上干燥,倒出和浓缩。采用快速色谱法(20:1 DCM/MeOH)提纯,得到呈黄色固体状的纯产品S2(脱硅烷基S1)(2.27g, 100%)。

[0199] 采用这种方法还制备了下述化合物:1-(丁-3-炔-1-基)-6-氯-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶(S8)。

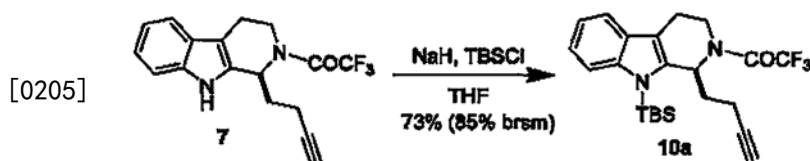
[0200] 一般方法C(仲胺的保护):



[0202] 将化合物S2(0.138g,0.460mmol)溶于THF(4.50mL)中,并将所得反应溶液冷却到-78℃。加入Et₃N(0.390mL,2.77mmol)和TFAA(0.190mL,1.38mmol)。在-78℃搅拌2小时,用EtOAc(50mL)稀释反应溶液,加热到25℃,然后用饱和NH₄Cl(5mL)和盐水(5mL)洗涤,在Na₂SO₄上干燥,过滤,并浓缩。采用快速色谱法(10:1己烷/EtOAc)提纯,得到呈白色固体状的纯产品7(0.110g,74%)。

[0203] 采用这种方法还制备了下述化合物:1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-2-(4-氯苯甲酰)-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶(10b);1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-2-(4-硝基苯磺酰基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-6]吡啶(10c);1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-2-(4-氯苯磺酰基)-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶(10d);1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-2-[(4-甲基苯基)磺酰基]-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶(10e);苄基1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶-2-羧酸盐(10f);1-(丁-3-炔-1-基)-6-甲氧基-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶(S5);1-[1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-6-甲氧基-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-b]吡啶-2-yl]-2,2,2-三氟乙-1-酮(10g);1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-6-甲氧基-2-[(4-硝基苯)磺酰基]-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-b]吡啶(10h);1-[1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-6-氯-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-b]吡啶-2-yl]-2,2,2-三氟乙-1-酮(10i);1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-6-氯-2-[(4-硝基苯)磺酰基]-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶(10j);1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-6-氯-2-[(4-氟苯)磺酰基]-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-b]吡啶(10k)。

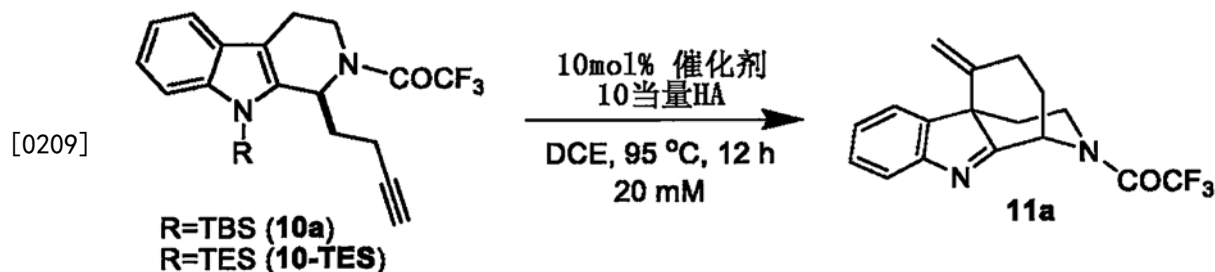
[0204] 一般方法D(Nⁱⁿ-硅烷基连接):



[0206] 在0℃,向NaH(2.32g,58.1mmol,60%矿物油溶液)的THF(240mL)溶液中缓慢加入底物(15.5g,48.4mmol)的THF(60.0mL)溶液。将反应混合物在25℃搅拌30分钟,然后冷却到0℃。缓慢加入TBSCl(8.75g,58.1mmol)的THF(60.0mL)溶液。将反应混合物加热到25℃并在25℃搅拌12小时,然后用水(50mL)淬灭反应。水层用EtOAc(150mLx3)萃取,用盐水(50mL)洗涤,在Na₂SO₄上干燥,过滤并浓缩。采用快速色谱法(50:1,然后10:1己烷/EtOAc)提纯,得到呈白色固体状的硅烷基化产品(15.3g,73%收率,初始材料回收率85%)和呈黄色固体状的未反应初始材料(2.16g,14%)。

[0207] 采用这种方法还制备了下述化合物:1-(1-(丁-3-炔基)-9-(三乙基硅烷基)-3,4-二氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)-2,2,2-三氟乙酮(10-TES);1-(丁-3-炔基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-6]吡啶(S3);1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-6-甲氧基-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶(S6);1-(丁-3-炔-1-基)-9-(叔-丁基二甲硅烷基)-6-氯-1H,2H,3H,4H,9H-吡啶并[3,4-6]吡啶(S9)。

[0208] 一般方法E:



[0210] 向含有IPrAuCl (4mg, 6.9 μ mol) 和DCE (0.15mL) 的20mL密封管中加入AgBF₄ (1mg, 6.9 μ mol) 的甲苯 (0.3mL) 溶液。将所得混合物搅拌5分钟。向制备的催化剂溶液中加入炔基吡啶10a (30mg, 69 μ mol) 的DCE (3mL) 溶液, 然后加入甲醇 (28 μ L, 0.69mmol)。将反应溶液在95 $^\circ$ C搅拌12小时, 然后冷却到25 $^\circ$ C。将溶液通过短硅胶柱过滤, 并浓缩。采用快速色谱法 (50:1, 然后7:1己烷/EtOAc) 提纯, 得到呈白色固体状的未反应初始材料10a (5.4mg, 18%) 和呈白色固体状的纯产品11a (14.5mg, 66%)。

[0211] 采用这种方法还制备了下述化合物:11-[(4-氯苯基)羰基]-14-亚甲基-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯(11b);14-亚甲基-11-[(4-硝基苯)磺酰基]-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯(11c);1-[(4-氯苯)磺酰基]-14-亚甲基-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯(11d);11-[(4-甲苯)磺酰基]-14-亚甲基-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯(11e);苄基14-亚甲基-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯-11-羧酸盐(11f);2,2,2-三氟-1-{4-甲氧基-14-亚甲基-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯-11-基}乙-1-酮(11g);4-甲氧基-14-亚甲基-11-[(4-硝基苯)磺酰基]-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯(11h);1-{4-氯-14-亚甲基-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯-11-基}-2,2,2-三氟乙-1-酮(11i);4-氯-14-亚甲基-1-1-[(4-硝基苯)磺酰基]-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯(11j);4-氯-11-[(4-氟苯)磺酰基]-14-亚甲基-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2(7),3,5,8-四烯(11k)。

[0212] 14-亚甲基-8,11-二氮杂四环[8.3.3.0^{1,9}.0^{2,7}]十六-2.4.6.8-四烯(S10)的合成:向化合物11a (40mg, 0.13mmol) 的MeOH/H₂O (1.2mL, 1:1) 溶液中加入K₂CO₃ (80mg, 0.58mmol)。在25 $^\circ$ C搅拌12小时, 将溶剂蒸发, 加入水。水层用氯仿 (10mL \times 3) 萃取, 结合的有机相在Na₂SO₄上干燥, 倒出, 并浓缩。采用快速色谱法 (12:1 DCM/MeOH) 提纯, 得到呈黄色油状的去保护产品 (27mg, 96%)。

[0213] 生物分析:菌株ATCC BAA-44是Daniel Feldheim实验室赠送的。菌株NRS100、NRS384、NR-46414和NR-46421来源于BEI资源 (BEI Resources) (beiresources.org)。HeLa细胞购自ATCC (atcc.org)。

[0214] 采用美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 手册中详细说明书的微量肉汤稀释法测定抗菌化合物和11b的最小抑菌浓度 (MIC)。所有抗菌化合物均购自西格玛-奥德里奇公司。所有MIC实验的生长培养基是通过VWR从HIMEDIA (目录号:95039-356) 购买的Mueller Hinton肉汤 (MHB)。将细菌日培养液 (OD_{600} 0.15-0.4) 稀释到 OD_{600} 0.002, 配制培养液。加到96孔微孔板 (美国的Scientific CytoOne 96-孔TC板, 目录号:CC7682-7596) 中时, 进一步稀释2倍, 最终培养液浓度是 OD_{600} 0.001。在测定结果之前, 所有孔板都在37°C、摇动条件下培养18小时。

[0215] 在10 μ M 11b的存在下, 利用MRSA菌株ATCC BAA-44测定各种抗菌化合物的MIC值。实验按照类似前文描述的CLSI MIC测定方法开展; 但是, 在准备和培养之前, 在MHB中补加20 μ M 11b。采用BAA-44培养之后, 11b的最终浓度是10 μ M。

[0216] 根据CLSI手册, 测定金黄色葡萄球菌被视为敏感的抗生素MIC值。在MHB中补加浓度大于CLSI敏感MIC值两倍的抗菌剂。在96孔微孔板中, 在补充抗生素的培养基中开展11b两倍连续稀释。在测定结果之前, 采用稀释到 OD_{600} 0.002的MRSA进行培养, 在37°C、摇动条件下培养18小时。未观察到生长的抗生素补充培养基中11b的浓度被认为是最小重新敏化浓度 (MRC)。对阿莫西林/克拉维酸来说, 初始浓度是8/4 μ g/mL; 对于头孢唑啉, 初始浓度是16 μ g/mL。将含培养基的50 μ L抗生素加入到96-孔板的每个孔内, 并在最顶行添加100 μ L。在每个孔板的最顶行添加1.28 μ L 5mg/mL的11b, 使每个孔板最顶行中11b的浓度是64 μ g/mL, 沿列向下进行2-倍连续稀释。一旦孔板准备好, 将MRSA日培养液稀释到 OD_{600} 0.002, 向每个孔内加入50 μ L。所加入MRSA的最终浓度是 OD_{600} 0.001, 阿莫西林/克拉维酸的最终浓度是4/2 μ g/mL, 头孢唑啉的最终浓度是8 μ g/mL, 试验11b的最高浓度是32 μ g/mL。将孔板在37°C、摇动条件下培养一个晚上。MRC值以抗生素存在下经过一晚上未观察到生长的11b浓度表示。

[0217] 为了评价11b在哺乳动物细胞中的细胞毒性, 采用CellTiter-Glo发光法细胞活力检测试剂盒 (Promega) 进行细胞活力分析。将人宫颈腺癌HeLa细胞种植在白色细胞培养液处理的96-孔板 (康宁 (Corning): 3917) 上, 孔板内包含补充有10%胎牛血清 (FCS)、1%青霉素/链霉素的杜尔贝科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM), 种植密度是20,000个细胞/孔。每个孔的培养基体积是100 μ L。将细胞在37°C的5% CO_2 /95%空气中培养16个小时。移除每个孔的培养基, 采用99 μ L加热的新鲜培养基替代。然后, 向每个孔内加入1.0 μ L 11b的DMSO溶液, 最终浓度是1.56-200 μ g/mL。每个浓缩液平行测定两次。在37°C再培养24小时, 将孔板在室温平衡30分钟。向每个孔内加入100 μ L CellTiter-Glo试剂 (Promega), 在定轨摇床上混合2分钟。将孔板在室温再培养10分钟, 稳定发光信号。每个样品的发光采用多功能盘式酶标仪 (Envision Multilabel Plate Reader) (Perkin Elmer) 记录。

[0218] 本发明前述讨论旨在进行阐释和说明。这些讨论并非旨在将本发明限定为本文公开的各种形式。虽然本发明的说明包括对一个或多个实施例和某些变化和改动的说明, 但是, 其它变化和改动也在本发明的范围之内, 例如, 本领域技术人员在理解本发明公开之后熟悉和了解的其它变化和改动。本发明旨在获得包含许可程度内的替代实施例的权利, 包括要求的替代、互换与/或相当结构、功能、范围或步骤, 不管这些替代、互换与/或相当结构、功能、范围或步骤是否在本文公开, 也并不需要公开提出任何可申请专利的主题物质。

本文公开的所有参考文献通过引用而全文并入本发明中。