



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105820176 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201610177023.9

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2012.05.16

C07D 501/42(2006.01)

(30)优先权数据

C07D 501/46(2006.01)

2011901872 2011.05.16 AU

C07D 503/18(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61K 31/546(2006.01)

201280035092.6 2012.05.16

A61K 31/545(2006.01)

(71)申请人 新南创新私人有限公司

A61K 31/424(2006.01)

地址 澳大利亚新南威尔士州

A61P 31/04(2006.01)

申请人 卧龙岗大学

(72)发明人 N·巴朗德 B·G·卡达克

M·J·凯尔索 S·谢尔博格

S·莱斯

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陈文青

权利要求书11页 说明书39页 附图7页

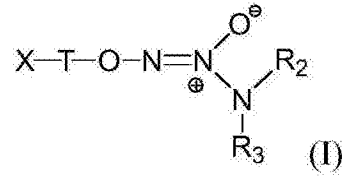
(54)发明名称

对一氧化氮释放和生物膜发展的调节

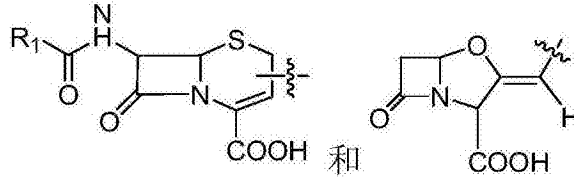
(57)摘要

本发明一般涉及用于调节生物膜形成微生物附近的一氧化氮释放的方法和化合物,从而调节微生物的程序性细胞死亡并因此促进生物膜中的微生物分散并/或抑制生物膜形成或发展。更具体地是,本发明涉及化合物的应用从而对一氧化氮释放提供空间和时间控制。

1. 一种式I化合物或其盐：

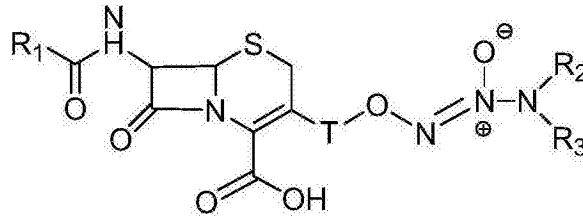


其中T是化学键或接头，R₂和R₃是有机残基，X选自下组：



其中R₁是有机残基。

2. 如权利要求1所述的化合物，其特征在于，所述化合物具有以下结构：



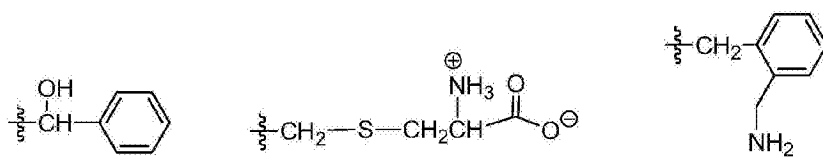
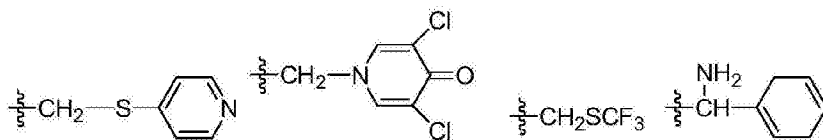
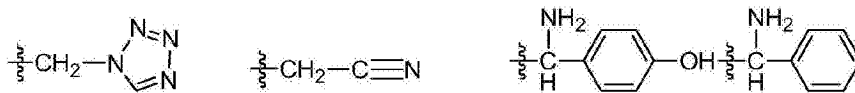
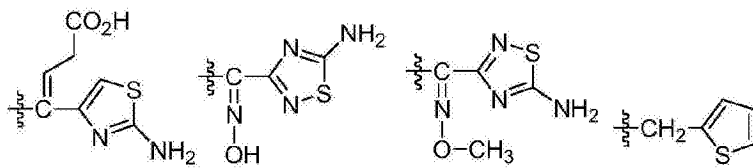
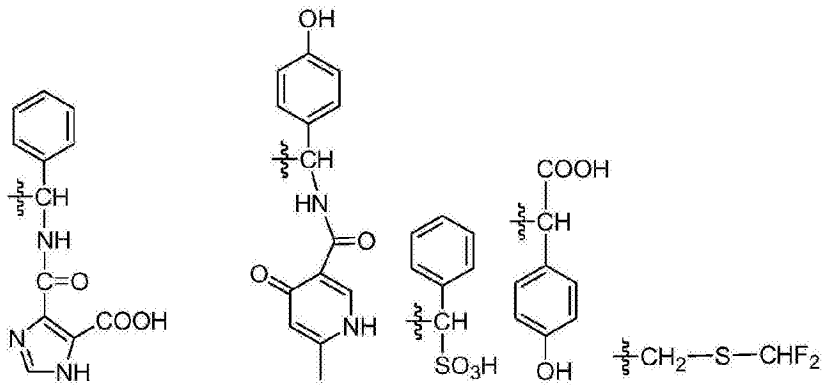
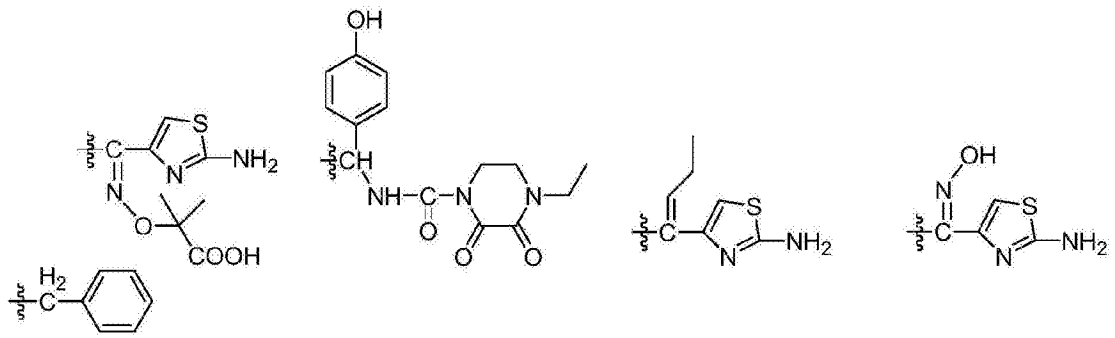
其中R₁、R₂、R₃和T如上定义，包括其盐。

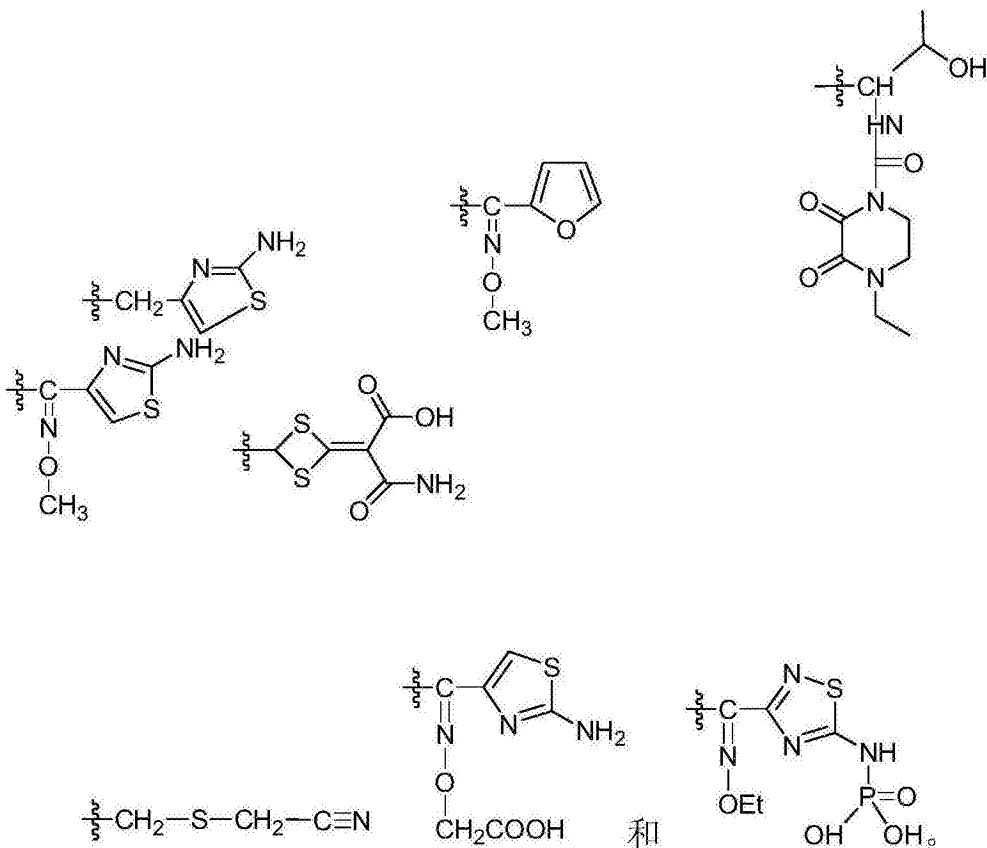
3. 如权利要求1或2所述的化合物，其特征在于，T是接头，所述接头是具有1~6个碳原子的二价烃。

4. 如权利要求3所述的化合物，其特征在于，T是CH₂。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的化合物，其特征在于，R₁可以是取代基，所述取代基相当于结合于头孢菌素抗生素7-NHC(O)-基团的取代基。

6. 如权利要求1~5中任一项所述的化合物，其特征在于，R₁选自下组：





7. 如权利要求1~4中任一项所述的化合物,其特征在于,R₁是Y-芳基或Y-杂芳基,其中Y是具有1~4个碳原子的二价烃。

8. 如权利要求7所述的化合物,其特征在于,所述芳基选自下组:苯基、联苯基、萘基、蒽基和菲基,且所述杂芳基是1~4个碳原子被氮和/或硫原子替代的5或6元环。

9. 如权利要求7或8所述的化合物,其特征在于,所述杂芳基选自下组:噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基和吡咯基。

10. 如权利要求7所述的化合物,其特征在于,R₁选自下组:-CH₂-苯基、-CH₂-噻吩基和-CH₂-四唑基。

11. 如权利要求1~10中任一项所述的化合物,其特征在于,R₂和R₃独立地选自:氢、C₃-C₇环烷基、C₃-C₇环烯基、(CH₂)_pOC(O)PhOC(O)C₁-C₆烷基、(CH₂)_pOC(O)A_{Ph}C₁-C₆烷基、支链或直链C₁-C₂₀烷基、支链或直链C₂-C₂₀烯基、支链或直链C₂-C₂₀炔基,其中烷基、烯基或炔基链可任选地被一个或多个选自O、S、NH、NH₂⁺的基团/杂原子打断,其中烷基、烯基或炔基可任选地被一个或多个选自下组的取代基取代:卤素、氰基、COOH、(CH₂)_pC(O)OC₁-C₆烷基、C(O)OC₁-C₆烯基、SO₃H、SO₂卤、SO₂NH₂、NH₂、NH₃⁺、OH、SH、OC₁-C₆烷基、OC₂-C₆烯基、OC₂-C₆炔基、芳基和杂芳基,或替代性地R₂和R₃与其所结合的氮原子一起形成4、5、6、7或8元环,所述环可任选地含有1、2、3、4、5或6个额外的氮原子,并可以是饱和的、不饱和的或部分不饱和的,其中4、5、6、7或8元环可任选地被一个或多个选自下组的取代基取代:-C(O)C₁-C₃亚烷基-萘基-OC₁-C₆烷基、-C(O)C₁-C₃亚烷基-Ph-C(O)-Ph、-C(O)CH₂O(CH₂)_pOCH₃、-C(O)OPhNO₂、-C(O)OPhNH₂、-C(O)O(CH₂)_p卤素₃、-C(O)O(CH₂)_pCH₃、C₁-C₆-烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、-C(O)C₁-C₆亚烷基COOC₁-C₆烷基、-C(O)C₁-C₃亚烷基PhC₁-C₆烷基、-C(O)O-吡咯烷基-2,5-二酮、-C(O)C₁-C₃亚烷基PhC₁-C₆烷基、-C(O)(CH₂)_pOC₁-C₆烷基、-C(O)O(CH₂)_p卤素、-C(O)O(CH₂)_pPh、-(CH₂)_pSH、-

SO₂萘基、-NC₁-C₆烷基、-C(O)ONC₁-C₆烷基、-(CH₂)_pOH、-C(O)PhOAc、-C(O)(CH₂)_pNHC(O)C₁-C₆烷基、-C(O)NH₂、-C(O)M、-C(O)NR₄R₅、-(CH₂)_pCH(OH)CHOH、卤素、氰基、-COOH、-C(O)O(CH₂)_pPh、-C(O)OC₁-C₆烷基、-C(O)OC₂-C₆烯基、-C(O)OC₂-C₆炔基、-C(O)SC₁-C₆烷基、-C(O)SC₂-C₆烯基、-C(O)SC₂-C₆炔基、-C(O)C₁-C₆烷基、SO₃H、SO₂卤素、SO₂苯基、SO₂NH₂、SO₂NR₄R₅、SO₂PhNHCOC₁-C₆烷基、NH₂、OH、SH、OC₁-C₆烷基、OC₂-C₆烯基、OC₂-C₆炔基、芳基和杂芳基,其中A是具有1~4个碳原子的二价烃基,p是0~4之间的数值,R₄和R₅独立地代表C₁-C₆烷基,且M是吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、苯基或三嗪基。

12. 如权利要求1~10中任一项所述的化合物,其特征在于,R₂和R₃独立地选自:氢、C₅-C₇环烷基、(CH₂)_pOC(O)PhOC(O)C₁-C₆烷基、(CH₂)_pOC(O)APhC₁-C₆烷基、支链或直链C₁-C₁₀烷基、支链或直链C₂-C₁₀烯基、支链或直链C₂-C₁₀炔基,其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~3个选自O、S、NH和NH₂⁺的基团/杂原子打断,其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~6个选自下组的取代基取代:卤素、苯基、乙氧基、甲氧基、丙氧基、COOH、(CH₂)_pCOOC₁-C₄烷基、NH₂、NH₃⁺、OH和SH,其中A是具有1或2个碳原子的二价烃基,p是0、1或2。

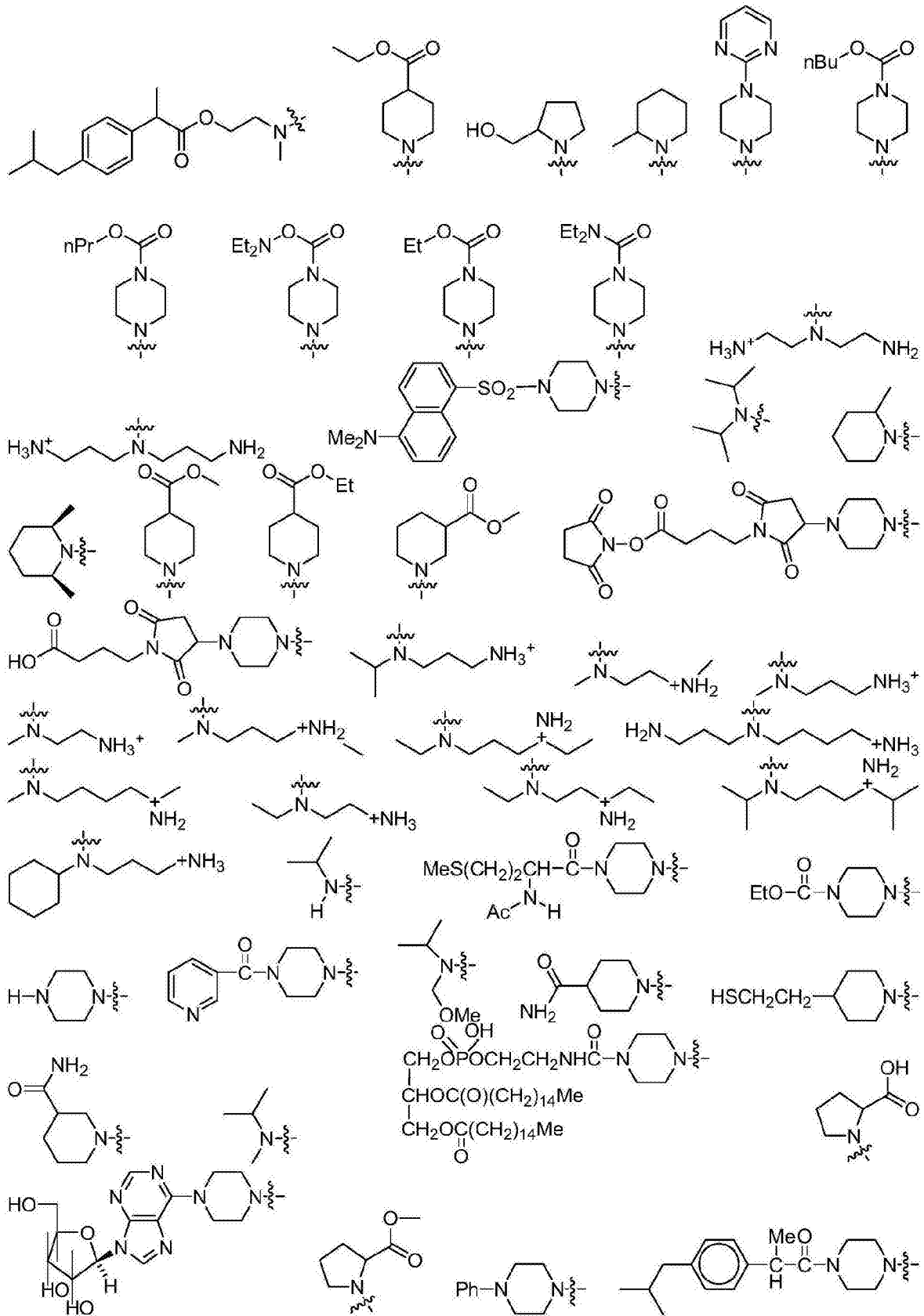
13. 如权利要求1~10中任一项所述的化合物,其特征在于,R₂和R₃独立地选自:氢、C₅-C₇环烷基、支链或直链C₁-C₁₀烷基、支链或直链C₂-C₁₀烯基、支链或直链C₂-C₁₀炔基,其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~3个选自O、NH和NH₂⁺的基团打断,其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~4个选自下组的取代基取代:卤素、苯基、甲氧基、COOH、CH₂COOC₁-C₄烷基、NH₂和NH₃⁺。

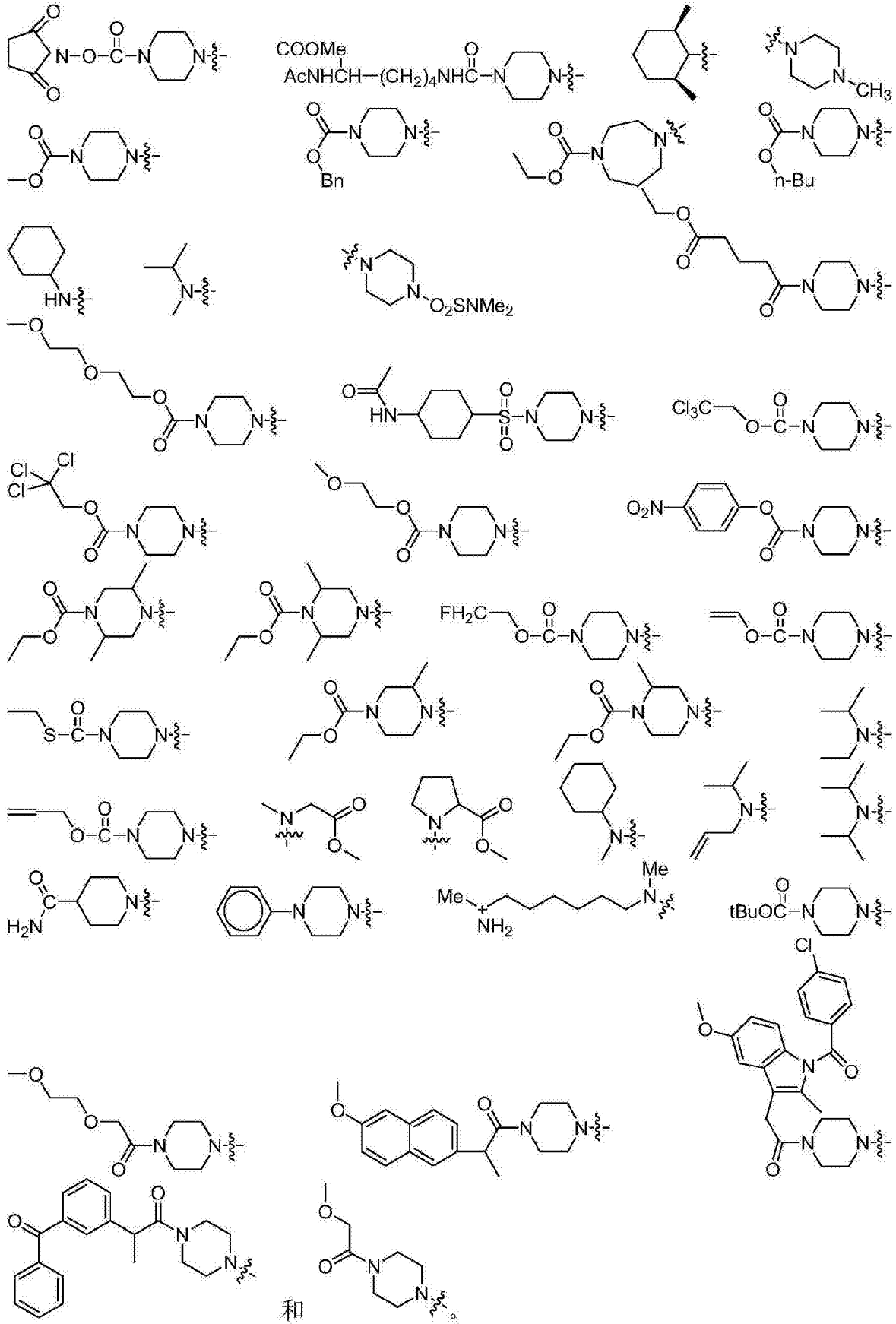
14. 如权利要求1~10中任一项所述的化合物,其特征在于,R₂和R₃独立地选自:氢、环己基、支链或直链C₁-C₁₀烷基或支链或直链C₂-C₁₀烯基,其中烷基或烯基链可任选地被1或2个选自NH和NH₂⁺的基团打断,其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~3个选自下组的取代基取代:苯基、甲氧基、COOH、NH₂和NH₃⁺。

15. 如权利要求1~10中任一项所述的化合物,其特征在于,R₂和R₃与其所结合的氮原子一起形成4、5、6、或7元环,所述环可任选地含有1、2、3、4或5个额外的氮原子,并可以是饱和的、不饱和的或部分不饱和的,其中4、5、6或7元环可任选地被一个或多个选自下组的取代基取代:SO₂NMe₂、SO₃H、SO₂卤素、SO₂NH₂、-C(O)O(CH₂)_pPh、-C(O)Me、-C(O)吡啶基、-(CH₂)_pOH、-C(O)NH₂、-COOH、-C(O)NMe₂、-C(O)NEt₂、苯基、萘基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡咯烷基、咪唑基、C₁-C₆-烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、-C(O)OC₁-C₆烷基、-C(O)OC₂-C₆烯基、-C(O)OC₂-C₆炔基、-C(O)O(CH₂)_pPh、-(CH₂)_pSH、卤素、SO₂PhNHCOC₁-C₆烷基、NH₂、SH、OC₁-C₆烷基,其中p为0~2的数值。

16. 如权利要求1~10中任一项所述的化合物,其特征在于,R₂和R₃与其所结合的氮原子一起形成5、6、或7元环,所述环可任选地含有1、2或3个额外的氮原子,并可以是饱和的、不饱和的或部分不饱和的,其中5、6或7元环可任选地被1~4个选自下组的取代基取代:SO₂NMe₂、SO₂NH₂、-COO(CH₂)_pPh-C(O)Me、-C(O)吡啶基、-(CH₂)_pOH、-C(O)NH₂、-COOH、-C(O)NMe₂、-C(O)NEt₂、苯基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡咯烷基、咪唑基、C₁-C₆-烷基、C₂-C₆烯基、C₂-C₆炔基、-C(O)OC₁-C₆烷基、-C(O)OC₂-C₆烯基、-C(O)OC₂-C₆炔基、-C(O)O(CH₂)_pPh、-(CH₂)_pSH、卤素、NH₂、SH、OC₁-C₆烷基,其中p为0~2的数值。

17. 如权利要求1~10中任一项所述的化合物,其特征在于,R₂和R₃与其所结合的氮原子一起形成饱和的5、6、或7元环,所述环可任选地含有1、2或3个额外的氮原子,其中5、6或7元



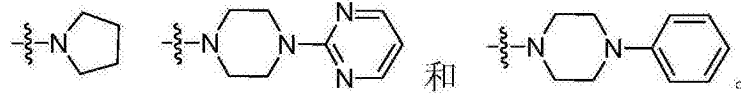


19. 如权利要求1~10中任一项所述的化合物,其特征在于,R₂和R₃独立地选自C₁-C₁₀烷基,或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成5或6元环,所述环可任选地含有1至3个额

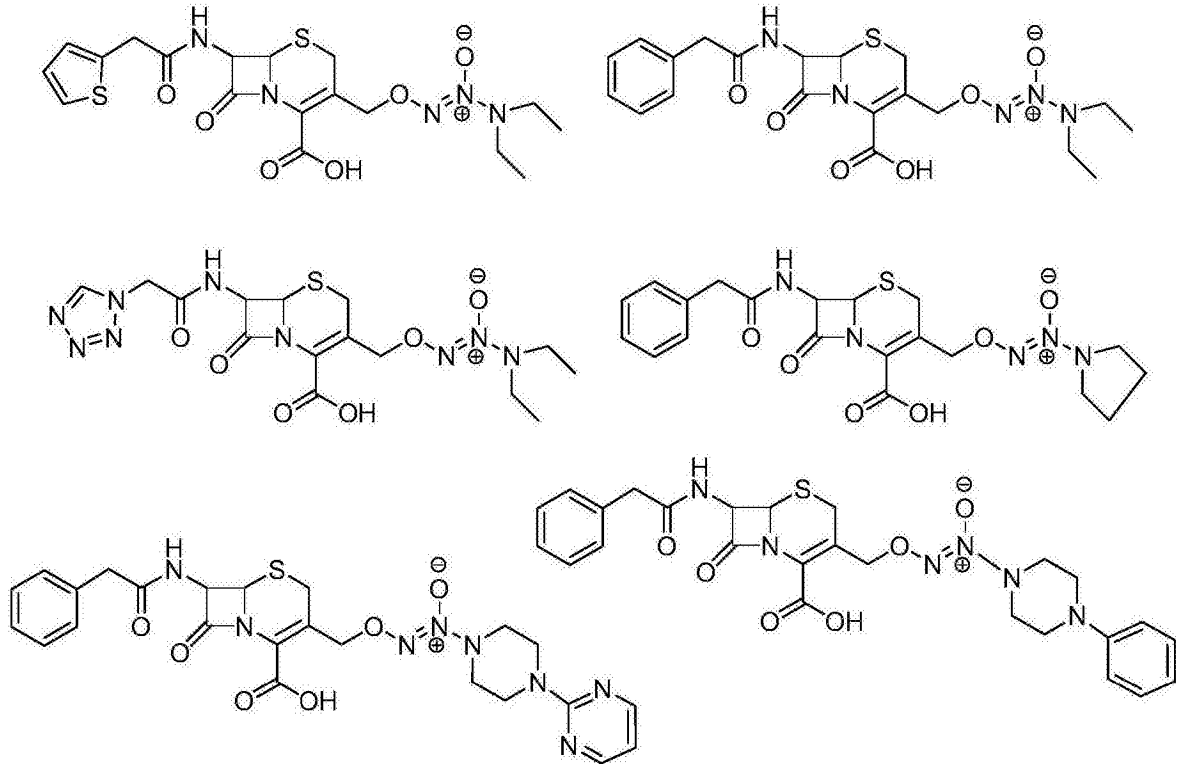
外的氮原子,并可任选地被芳基或杂芳基基团取代。

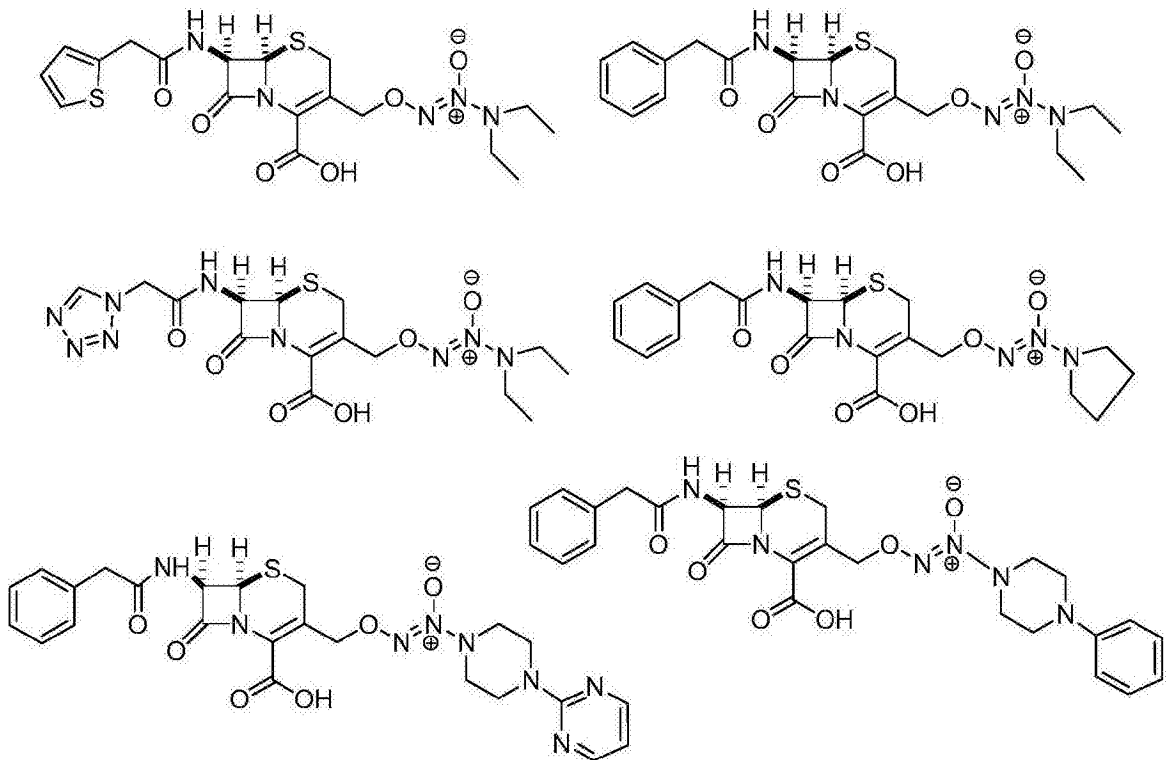
20. 如权利要求19所述的化合物,其特征在于, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1-C_6 烷基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成5或6元环,所述环可任选地含有1个额外的氮原子并可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基和苯基。

21. 如权利要求20所述的化合物,其特征在于, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1-C_6 烷基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成选自下组的结构:



22. 一种如权利要求1或2所述的具有选自下组结构的化合物:





包括其盐。

23. 如权利要求1~22中任一项所述的化合物,其特征在于,所述化合物还包含通过R₂和/或R₃取代基结合的抗生素化合物。

24. 如权利要求23所述的化合物,其特征在于,所述抗生素是环丙沙星或N-去甲基左氧氟沙星。

25. 一种促进微生物从生物膜中分散或抑制生物膜形成和/或发展的组合物,所述组合物包含如权利要求1~24中任一项所述的化合物。

26. 如权利要求25所述的组合物,其特征在于,所述组合物还可包含一种或多种额外的抗生素或抗微生物剂。

27. 如权利要求25或26所述的组合物,其特征在于,所述组合物诱导生物膜中微生物的分化事件,所述分化导致分散。

28. 如权利要求26或27所述的组合物,其特征在于,所述组合物防止微生物中分化事件的诱导,所述分化导致生物膜形成。

29. 如权利要求25~28中任一项所述的组合物,其特征在于,所述组合物提高生物膜形成微生物对抗微生物剂或抗生素的敏感度。

30. 一种促进微生物从生物膜中分散的方法,所述方法包括让所述生物膜接触有效量的如权利要求1~24中任一项所述的化合物或如权利要求25~29中任一项所述的组合物。

31. 一种抑制生物膜形成和/或发展的方法,所述方法包括让生物膜形成微生物接触有效量的如权利要求1~24中任一项所述的化合物或如权利要求25~29中任一项所述的组合物。

32. 如权利要求31所述的方法,其特征在于,所述化合物或组合物被易于形成生物膜的表面或界面包被、浸渍或接触。

33. 如权利要求32所述的方法,其特征在于,所述表面是可植入的医疗装置、假体或医

疗或外科手术设备的表面。

34. 如权利要求30~33中任一项所述的方法,其特征在于,所述生物膜形成微生物表达 β -内酰胺酶或转肽酶。

35. 如权利要求34所述的方法,其特征在于,所述生物膜形成微生物表达 β -内酰胺酶。

36. 如权利要求35所述的方法,其特征在于,所述 β -内酰胺酶是青霉素酶。

37. 如权利要求35或36所述的方法,其特征在于,在接触所述化合物或组合物之前,可将生物膜或生物膜形成微生物接触 β -内酰胺抗生素,或与 β -内酰胺抗生素协同接触。

38. 如权利要求37所述的方法,其特征在于,所述 β -内酰胺抗生素诱导所述生物膜形成微生物中产生胞外 β -内酰胺酶。

39. 如权利要求37或38所述的方法,其特征在于,所述 β -内酰胺抗生素是亚胺培南。

40. 如权利要求30~39中任一项所述的方法,其特征在于,所述生物膜形成于对象的身体表面、对象的内部或外部,通过向所述对象给予所述化合物或组合物使所述生物膜或生物膜形成微生物接触所述化合物或组合物。

41. 如权利要求30~40中任一项所述的方法,其特征在于,促进微生物从生物膜中分散或防止生物膜形成包括诱导生物膜中微生物的分化事件,所述分化事件导致分散,或包括防止微生物中分化事件的诱导,所述分化事件导致生物膜形成。

42. 如权利要求30~40中任一项所述的方法,其特征在于,促进微生物从生物膜中分散或防止生物膜形成包括提高微生物对抗微生物剂的敏感性。

43. 如权利要求30~42中任一项所述的方法,其特征在于,使生物膜或生物膜形成微生物接触有效量的所述化合物或组合物,以至一氧化氮供体浓度或释放出的并从而与生物膜或微生物接触的一氧化氮浓度对于其中发现所述生物膜或微生物的环境或对象而言是非毒性的。

44. 如权利要求43所述的方法,其特征在于,一氧化氮浓度是纳摩尔、微摩尔或毫摩尔级别。

45. 如权利要求44所述的方法,其特征在于,所述一氧化氮浓度为约1nM~约500 μ M。

46. 如权利要求30~45中任一项所述的方法,其特征在于,所述生物膜是单一类型的生物膜。

47. 如权利要求30~45中任一项所述的方法,其特征在于,所述生物膜是多个种类的生物膜。

48. 如权利要求30~47中任一项所述的方法,其特征在于,生物膜中的微生物或能形成生物膜的微生物包括选自以下的一个或多个种类:假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、*Pseudoalieromonas*属、葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)、肺炎链球菌属(*Streptococcus* spp.)、志贺氏菌属(*Shigella* spp.)、结核分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.)、粪肠球菌属(*Enterococcus* spp.)、大肠杆菌属(*Escherichia* spp.)、沙门菌属(*Salmonella* spp.)、嗜肺军团菌属(*Legionella* spp.)、流感嗜血杆菌属(*Haemophilus* spp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、长脱硫弧菌属(*Desulfovibrio* spp.)、斯瓦尼菌属(*Shewanella* spp.)、地杆菌属(*Geobacter* spp.)、克雷伯菌属(*Klebsiella* spp.)、变形杆菌属(*Proteus* spp.)、气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)、节杆菌属(*Arthrobacter* spp.)、微球菌属(*Micrococcus* spp.)、伯霍尔德杆菌属(*Burkholderia* spp.)、沙雷菌属(*Serratia*

spp.)、紫单胞菌属(*Porphyromonas* spp.)、梭杆菌属(*Fusobacterium* spp.)和弧菌属(*Vibrio* spp.)。

49. 如权利要求48所述的方法,其特征在于,所述微生物选自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、或霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)。

50. 如权利要求30~49中任一项所述的方法,其特征在于,所述生物膜在对象身体上或体内,并与患者所患的疾病或失调有关。

51. 如权利要求50所述的方法,其特征在于,所述疾病或失调选自囊性纤维化,细菌性心内膜炎、中耳炎、军团病、结核病或肾结石。

52. 一种治疗或预防对象中与生物膜相关的感染、疾病或失调的方法,所述感染由能形成生物膜的微生物引起,所述方法包括给予所述对象有效量的如权利要求1~24中任一项所述的化合物或如权利要求25~29中任一项所述的组合物。

53. 如权利要求1~24中任一项所述的化合物在制造用于促进分散生物膜中微生物或抑制生物膜形成或发展的组合物中的应用。

54. 如权利要求1~24中任一项所述的化合物在制造用于治疗或预防对象中与生物膜相关的感染、疾病或失调的药物中的应用,其中所述感染由能形成生物膜的微生物引起。

对一氧化氮释放和生物膜发展的调节

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为PCT/AU2012/000542,国际申请日为2012年5月16日,进入中国国家阶段的申请号为201280035092.6的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明一般涉及用于调节生物膜形成微生物附近的一氧化氮释放的方法和化合物,从而调节微生物的程序性细胞死亡并因此促进生物膜中的微生物分散并/或抑制生物膜形成或发展。更具体地是,本发明涉及化合物的应用从而对一氧化氮释放提供空间和时间控制。

[0003] 发明背景

[0004] 生物膜是三维微生物生长形式,其包含微生物群落及其产生的胞外基质。生物膜在自然中无所不在,形成于有水或合适流体的地方的任何表面和界面上,或悬浮存在,例如以絮状物或颗粒物存在。

[0005] 生物膜是许多疾病的病原剂,并与许多人类慢性感染有关,其形成于体内的各种表面,例如呼吸道和肺部表面(与囊性纤维化和军团病(Legionnaire's disease)相关)、耳部表面(与中耳炎相关)、心脏和心脏瓣膜表面(与细菌性心内膜炎相关)。生物膜为微生物定居提供更多的保护,例如相比浮游生物细胞明显提高对抗生素的抗性以及对吞噬作用的抵抗,这使生物膜难以根除,也为生物膜的严重性和高水平的持久性以及生物膜产生感染有关的发病率提供了解释。在囊性纤维化的情况中,例如,呼吸感染的主要病因是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),囊性纤维化患者肺部表面的铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)生物膜产生更高层次的抗生素抗性和对宿主免疫防御的抵抗。所以慢性肺部感染以及由此产生的囊性纤维化患者的发病和死亡的主要元凶是与生物膜有关的铜绿假单胞菌。

[0006] 生物膜也很容易形成于医疗器械例如导管和套管,以及可植入的医疗器械,包括支架和隐形眼镜。事实上许多长期插管患者受到生物膜形成细菌引起的感染,更普遍地是生物膜引起一定范围的医疗感染,使健康系统增加了巨大的成本。

[0007] 从公共健康角度来看,生物膜是水系统中病原体的重要纳垢点,所述水系统例如饮用水、水槽、管子、空调管。生物膜也引起严重的工业损害,例如,引起流体加工中的污损和腐蚀,所述流体加工例如水分布和处理系统、纸浆和纸张制造系统、热交换系统和冷却塔,并加剧油在生产线和储器中的酸化。

[0008] 生物膜基本上是多细胞微生物群落,该群落的形成和发展依赖于各种成员有机体的多细胞特性,例如细胞与细胞间的信号转导。细菌通过胞外信号转导系统例如群体感应评估细胞密度,当信号转导分子达到足够浓度时开始改变基因表达和表型。这与不同的基因表达有关,导致例如毒力因子和/或防御机制的诱导,并与细胞分化有关,使得生物膜相关细胞相比浮游生物细胞变得更为高度分化。

[0009] 随着生物膜中的细胞分化和生物膜的成熟,代谢率降低,防御机制的细胞表达和抗微生物剂穿过生物膜的能力降低,使抗微生物抗性提高并使生物膜非常难以根除。现有

的生物膜控制策略代表性地专注生物膜发展的早期阶段而且涉及毒性抗微生物剂的使用。然而,该类毒剂存在下游问题,例如在工业使用时存在向环境释放的问题。明确需要用于生物膜控制的改进策略。

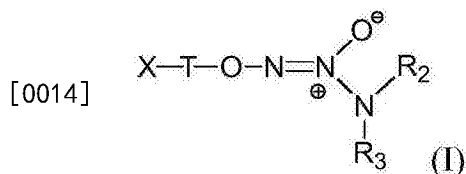
[0010] 铜绿假单胞菌以及其它模型生物膜形成细菌、口腔生物膜混合种类、废水处理加工中的颗粒状生物膜混合种类的研究表明,程序性细胞死亡诱导细胞从生物膜中脱离和分散(参见,例如,Hope等,2002和Webb等,2003)并且是生物膜发展的一般特征。本发明的发明人之前已发现生物膜中的程序性细胞死亡与生物膜形成有机体中的反应性氧和氮类(RONS)的积聚有关,可使用非毒性的低浓度一氧化氮产生物或供体诱导程序性细胞死亡并使生物膜中的细胞分散成浮游生物细胞(参见共同待审查的WO 2006/125262,其全部内容通过引用纳入本文)。

[0011] 利用该发现可提供新技术的展望,通过让生物膜接触一氧化氮来诱导细胞分散从而去除大量环境和设施,包括医疗、工业和生物处理中的生物膜。然而在一些设施中,特别是在人类健康和医疗应用中,一氧化氮的不受控制和大范围释放会关联产生不可接受的副作用和毒性水平。改进方案中一氧化氮供体的稳定性也带来了挑战。因此,需要开发一种有效机制在空间和/或时间方面对一氧化氮的释放进行调节,使得这种释放可定域在生物膜附近从而使其它位置的副作用和毒性最小化。

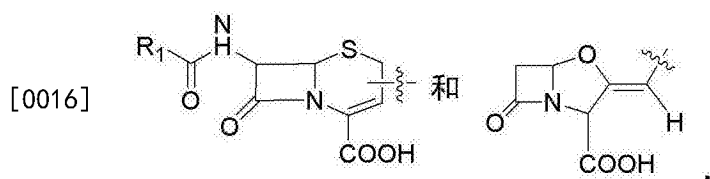
[0012] 本文现在提供用于调节一氧化氮在时间上和空间上的释放的化合物、方法和组合物,从而提供新型机制来促进细胞从生物膜中分散和调节生物膜发展。

发明内容

[0013] 本发明在第一方面提供了式(I)的化合物,或其盐:

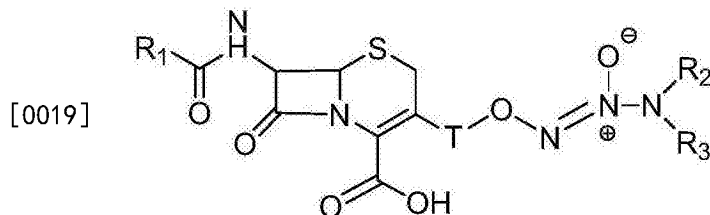


[0015] 其中T是化学键或接头,R₂和R₃是有机残基,X选自下组:



[0017] 其中R₁是有机残基。

[0018] 在一个实施方式中,式(I)的化合物具有以下结构:



[0020] 其中R₁、R₂、R₃和T如上定义。

[0021] T可以是具有1至6个碳原子的二价烃类接头,例如-CH₂-、-CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-、-

CH(CH₃)CH₂-或-CH₂CH₂CH₂CH₂-。在一个实施方式中,T是CH₂。

[0022] R₁可以是取代基,该取代基相当于结合于头孢菌素抗生素7-NHC(O)-基团的取代基。

[0023] 在一个实施方式中,R₁是Y-芳基或Y-杂芳基,Y是具有1至4个碳原子的二价烃类。芳基基团可选自:苯基、联苯基、萘基、蒽基和菲基,而杂芳基可以是1至4个碳原子被氮和/或硫原子取代的5或6元环。

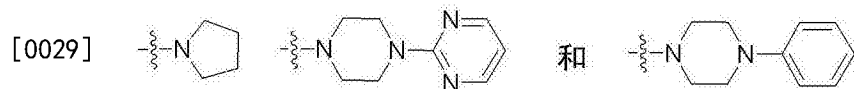
[0024] 杂芳基基团可选自:噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基和吡咯基。

[0025] 在一个实施方式中,R₁选自下组:-CH₂-苯基、-CH₂-噻吩基和-CH₂-四唑基。

[0026] R₂和R₃可独立地选自下组:C₁-C₁₀烷基,或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成5或6元环,所述环可任选地含有1至3个额外的氮原子,并可任选地被芳基或杂芳基基团取代。

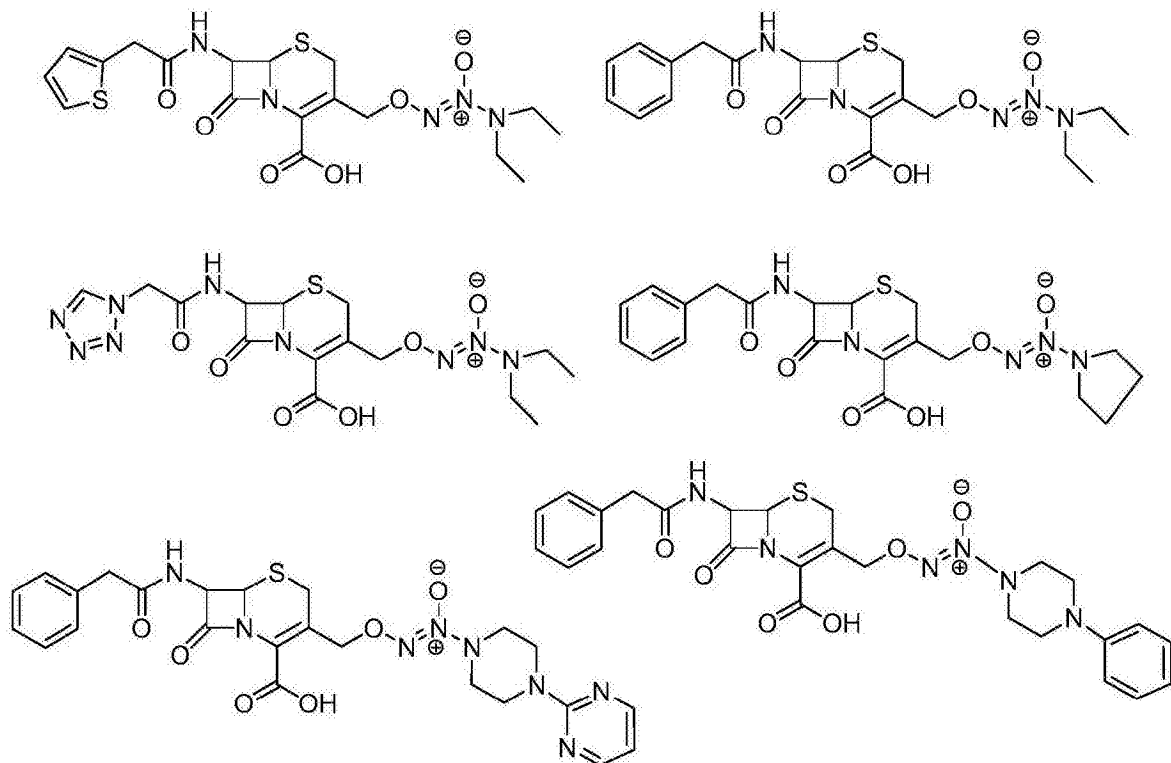
[0027] 在另一个实施方式中,R₂和R₃独立地选自C₁-C₆烷基,或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环可任选地含有1个额外的氮原子并可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基和苯基。

[0028] 在另一个实施方式中,R₂和R₃独立地选自C₁-C₆烷基,或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成选自下组的结构:

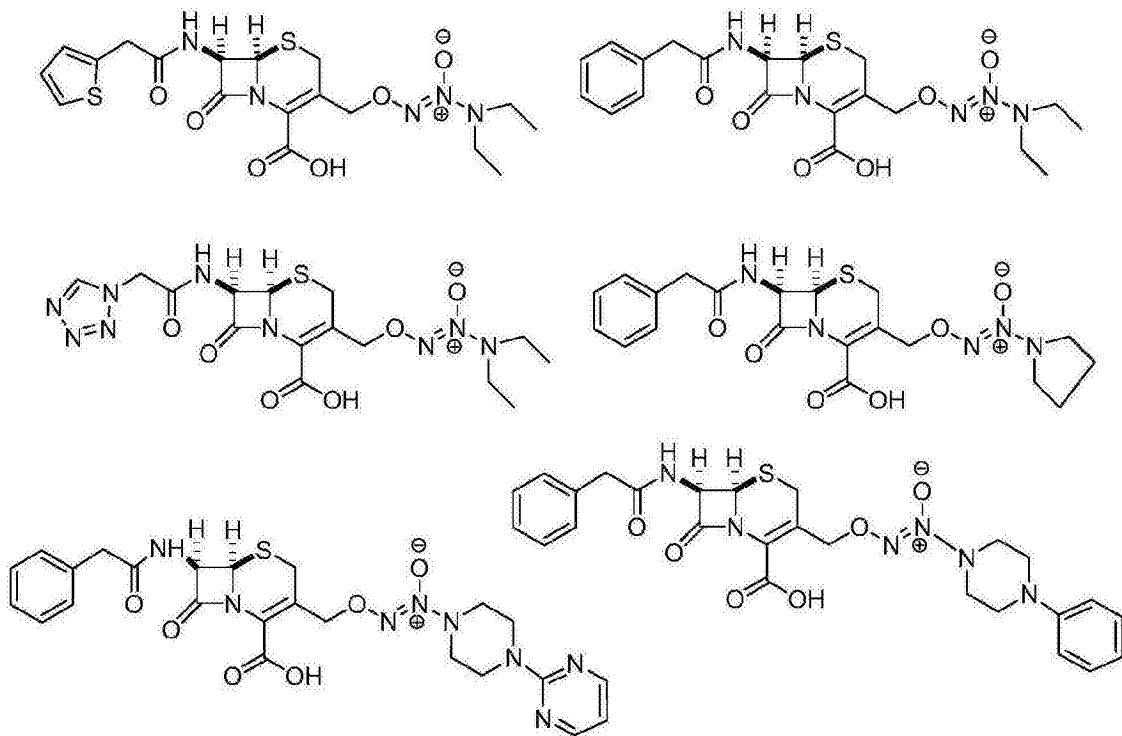


[0030] 在一个实施方式中,式(I)的化合物具有选自下组的结构:

[0031]



[0032]



[0033] 式(I)的化合物还可包含通过R₂和/或R₃取代基结合的抗生素化合物。所述抗生素可以是,例如,环丙沙星或N-去甲基左氧氟沙星。

[0034] 本发明的第二方面提供一种促进微生物从生物膜中分散或抑制生物膜形成和/或发展的组合物,所述组合物包含根据第一方面所述的化合物。

[0035] 该组合物还可包含一种或多种额外的抗生素或抗微生物剂。在示例性实施方式中,一种或多种抗生素可选自头孢他啶、妥布霉素和环丙沙星。

[0036] 本发明的第三方面提供一种促进微生物从生物膜中分散的方法,该方法包括让生物膜接触有效量的第一方面所述化合物或第二方面所述组合物。

[0037] 本发明的第四方面提供一种抑制生物膜形成和/或发展的方法,该方法包括让生物膜形成微生物接触有效量的第一方面所述化合物或第二方面所述组合物。

[0038] 根据第四方面,化合物或包含该化合物的组合物可用易于生物膜形成的表面或界面包被、浸渍或接触。在一个实施方式中,该表面可以是可植入的医疗装置、假体或医疗或外科手术设备的表面。

[0039] 根据第三和第四方面的方法,含生物膜的或形成生物膜的微生物代表性地表达β-内酰胺酶或转肽酶。该β-内酰胺酶可染色体或染色体外编码,且表达可以是组成型或诱导型。在具体实施方式中,β-内酰胺酶是青霉素酶。可将生物膜或生物膜形成微生物在接触所述化合物或组合物之前接触β-内酰胺抗生素或与其协同接触β-内酰胺抗生素。β-内酰胺抗生素可诱导所述生物膜形成微生物中产生胞外β-内酰胺酶。β-内酰胺抗生素可以亚抑制、抑菌或杀菌浓度提供。在具体实施方式中,β-内酰胺抗生素是亚胺培南。

[0040] 在第三和第四方面的具体实施方式中,生物膜可以是对象的身体表面、对象的内部或外部,可通过向对象给予化合物或组合物使生物膜或生物膜形成微生物接触化合物或组合物。给予可经任何合适途径,这取决于生物膜或生物膜形成微生物的特性和位置。

[0041] 促进生物膜分散或防止生物膜形成的方法可包括诱导生物膜中微生物的分化事

件,其可导致分散,或可包括防止微生物中分化事件的诱导,其可导致生物膜形成。或者,或另外,所述方法可包括提高微生物对抗微生物剂的敏感性。

[0042] 根据上述方面和实施方式,生物膜可以是与表面结合的或悬浮的。悬浮的生物膜可以是絮状或颗粒形式。

[0043] 代表性地根据上述方面和实施方式,使生物膜或生物膜形成微生物接触有效量的本文所述的化合物或组合物,使得一氧化氮供体或释放并从而与生物膜或微生物接触的一氧化氮的浓度对于其中发现生物膜或微生物的环境或对象而言是非毒性的。例如,一氧化氮浓度可以是纳摩尔、微摩尔或毫摩尔级别。一氧化氮浓度可以是,例如,约1nM至约500 μ M。

[0044] 生物膜中存在的微生物可以是单一种类或多个种类。生物膜中的微生物或能形成生物膜的微生物可包括选自例如以下种类的一个或多个种类:假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、*Pseudoaeromonas*属、葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)、

[0045] 肺炎链球菌属(*Streptococcus* spp.)、志贺氏菌属(*Shigella* spp.)、结核分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.)、粪肠球菌属(*Enterococcus* spp.)、大肠杆菌属(*Escherichia* spp.)、沙门菌属(*Salmonella* spp.)、嗜肺军团菌属(*Legionella* spp.)、流感嗜血杆菌属(*Haemophilus* spp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、长脱硫弧菌属(*Desulfovibrio* spp.)、斯瓦尼菌属(*Shewanella* spp.)、地杆菌属(*Geobacter* spp.)、克雷伯菌属(*Klebsiella* spp.)、变形杆菌属(*Proteus* spp.)、气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)、节杆菌属(*Arthrobacter* spp.)、微球菌属(*Micrococcus* spp.)、伯霍尔德杆菌属(*Burkholderia* spp.)、沙雷菌属(*Serratia* spp.)、紫单胞菌属(*Porphyromonas* spp.)、梭杆菌属(*Fusobacterium* spp.)和弧菌属(*Vibrio* spp.)。在具体的实施方式中,微生物可以是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、新洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cenocepacia*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、或霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)。

[0046] 在具体实施方式中,生物膜在对象身体上或体内,并可能与患者所患的疾病或失调有关。疾病或失调可以是,例如,囊性纤维化,细菌性心内膜炎、中耳炎、军团病、结核病或肾结石。

[0047] 因此,本发明第五方面提供治疗或预防对象中的与生物膜相关的感染、疾病或失调的方法,所述对象中的感染由能形成生物膜的微生物引起,所述方法包括给予对象有效量的第一方面所述化合物或第二方面所述组合物。

[0048] 本发明还提供第一方面所述化合物在制造用于促进生物膜中的微生物分散或抑制生物膜形成或发展的组合物中的应用。

[0049] 本发明还提供第一方面所述化合物在制造用于治疗或预防对象中生物膜相关感染、疾病或失调的药物中的应用,其中所述感染由能形成生物膜的微生物引起。

[0050] 附图简要说明

[0051] 参考以下附图通过非限制性实施例阐述本发明的实施方式。

[0052] 图1. 头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓游离酸(化合物14~19)中释放的一氧化氮的电流测定。箭头表示向含有pH 7.0的10mL Tris缓冲液的反应瓶中加入以下组分:(a)10 μ L的

100mM头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓,(b)10 μ l 1U/ μ l青霉素酶,(c)20 μ l 1U/ μ l青霉素酶,(d)80 μ L的10mM自由基清除剂PTIO。

[0053] 图2.化合物15中释放的一氧化氮的电流测定。(a)不同pH值时青霉素酶存在下的一氧化氮释放。箭头表示向含有pH 9.0(粗线)、7.0(虚线)或5.0(点线)的10mL Tris缓冲液的反应瓶中加入以下组分:(i)10 μ L的150mM化合物15,(ii)5 μ L的0.1U/ μ L青霉素酶,(iii)10 μ L的0.1U/ μ L青霉素酶,(iv)80 μ L的10mM自由基清除剂PTIO。(b)表达 β -内酰胺酶的铜绿假单胞菌(粗线)或表达非 β -内酰胺酶的大肠杆菌(点线)细胞提取物存在下的一氧化氮释放。箭头表示向含有pH 7.0的10mL Tris缓冲液的反应瓶中加入以下组分:(i)10 μ L的150mM化合物15,(ii)100 μ L细胞提取物,(iii)200 μ L细胞提取物,(iv)PTIO。在青霉素酶(1U/mL)或不释放一氧化氮的代表性头孢菌素先锋霉素I(150 μ M)的存在下,无论是单独存在或来自先锋霉素I/青霉素酶混合物(数据未显示),都无法测得一氧化氮。该数据是至少3个独立实验的代表。(c)在铜绿假单胞菌培养物上清液的存在下释放一氧化氮,铜绿假单胞菌培养物在没有抗生素存在的情况下生长5小时,然后用0.5 μ g/ml胞外诱导 β -内酰胺酶的亚胺培南(粗线)或100 μ g/ml氨苄青霉素(点线)处理1小时。箭头表示向含有pH 7.0的10mL Tris缓冲液的反应瓶中加入以下组分:(i)10 μ L的150mM化合物15,(ii)500 μ L上清液,(iii)500 μ L上清液,(iv)PTIO。向含有经亚胺培南处理的细胞上清液的瓶子中添加500 μ l的100 μ g/ml氨苄青霉素没有抑制化合物15释放一氧化氮。(数据未显示)。

[0054] 图3.化合物21在铜绿假单胞菌NSGFP报告株中诱导一氧化氮依赖性遗传应答。使在或不在亚抑制性氨苄青霉素(50 μ g/mL)存在下生长的NSGFP细胞接触自发性一氧化氮供体硝普钠(150 μ M)、化合物21(150 μ M)、化合物21(150 μ M)和青霉素酶(0.2U/mL)、不释放一氧化氮的代表性头孢菌素先锋霉素I(150 μ M)或青霉素酶(0.2U/mL),或不处理。

[0055] 图4.化合物21(图中称为“DEA-CP”)诱导铜绿假单胞菌生物膜的快速分散。预建立生物膜与化合物21接触10分钟可诱导生物膜生物量下降(深灰色条柱)同时浮游生物生物量上升(淡灰色条柱)。误差条柱代表标准差;n=6。

[0056] 图5.化合物21(图中称为“DEA-CP”)以剂量依赖性方式诱导铜绿假单胞菌生物膜快速分散(A)。生长24小时的铜绿假单胞菌CF分离物菌株生物膜在与化合物21接触10分钟后(淡灰色条柱)相对于未经处理的生物膜(深灰色条柱)也发生分散(B)。误差条柱代表标准差;n=2。

[0057] 图6.铜绿假单胞菌生物膜通过化合物21(a)和23(b)发生剂量依赖性分散。铜绿假单胞菌生物膜在震荡、37 $^{\circ}$ C条件下的微孔板中生长并用亚胺培南(0.5 μ g/mL)预处理1小时,之后与各浓度化合物接触15分钟。通过结晶紫染色定量分析剩余的生物膜质量。

[0058] 图7.与 β -内酰胺酶反应后,化合物21在铜绿假单胞菌生物膜中诱导快速分散应答。(A)通过结晶紫染色定量分析生物膜。(B)结晶紫染色生物膜的图片。(C)通过测定上清液OD₆₀₀来定量分析浮游生物细胞。误差条柱代表标准差(n=2)。在这些实验中,增加的浮游生物OD读数相当于生物膜结晶紫染色的减少量,表明发生了生物膜分散。

[0059] 图8.化合物21诱导以下各种细菌生物膜快速分散(处理后10分钟):革兰氏阴性细菌:(A)大肠杆菌,(B)霍乱弧菌,(C)粘质沙雷菌;革兰氏阳性细菌:(D)金黄色葡萄球菌。

[0060] 图9.化合物21诱导生长在连续流条件下的玻璃微发酵罐中的铜绿假单胞菌PA01生物膜分散。生长24小时后,生物膜流出物的OD₆₀₀测定显示在添加化合物21后所释放的细

胞明显增加,而从未处理的生物膜中释放的细胞量保持不变。箭头表示添加化合物。数据为2次独立实验的代表。

[0061] 图10. 头孢噻吩、DEA和化合物21(图中也称为“DEA-CP”)在野生型铜绿假单胞菌中对浮游生物生长的抑制。该图仅显示4mM和16mM浓度的数据;对于3种化合物,更低的浓度都没有作用,更高的浓度都完全抑制生长。误差条柱代表标准差;n=2。

[0062] 图11. 化合物21(图中称为“DEA-CP”)和抗生素对铜绿假单胞菌和浮游生物细胞存活率的组合处理效果。在化合物21存在和不存在的情况下,使生长在微孔板孔中的预建立生物膜接触头孢他啶或不处理。处理1小时(A,B)或2小时(C,D)后,收集上清液,对浮游生物CFU计数(B,D);在缓冲液中重悬生物膜细菌并对生物膜CFU计数(A,C)。误差条柱代表标准差;n=2。

[0063] 详细描述

[0064] 在本发明中,“一个”和“一种”表示一个(种)或多个(种)(即至少一个(种))该冠词的语法对象。例如,“一种(个)要素”表示一种(个)要素或者多种(个)要素。

[0065] 在本说明书的内容中,术语“约”理解为这样一种数字范围,本领域技术人员会认为其为实现相同功能或结果的内容中列举的值等同。

[0066] 除非上下文另有要求,否则,应理解在本说明书和所附权利要求书中的词语“包括”和其变体如“包含”和“具有”含有包括所指的整数或步骤或者多个整数或步骤的组的意思,但并不表示排除任何其他整数或步骤或者多个整数或步骤的组。

[0067] 本文所用术语“抗微生物剂”指单独使用或与其它试剂例如抗生素联用时能杀灭或抑制一种或多种微生物生长的任何试剂。

[0068] 本文所用术语“生物膜”指任何三维、被基质包封的微生物群落,该群落展现多细胞特性。因此,本文所用的术语“生物膜”包括与表面结合的生物膜以及悬浮的生物膜,例如絮状物或颗粒物。生物膜可包括单一微生物种类或可以是混合种类的复合物,并且可包括细菌、真菌、藻类、寄生虫或其它微生物。

[0069] 术语“生物膜形成微生物”指能形成生物膜(无论是单一类型或混合类型生物膜)的任何微生物。

[0070] 本文所用术语“分散”,在其涉及生物膜和组成生物膜的微生物时指细胞的脱离和分离过程以及转变回浮游生物表型或分散细胞的行为。

[0071] 本文所用术语“有效量”包括在其含义内非毒性但足够提供所需效果的剂量。所需的确切量随对象不同而不同,这取决于多个因素例如待处理的微生物种类、待处理的生物膜程度、严重性和/或年龄、生物膜是与表面结合的还是悬浮的、待给予的具体试剂和给予方式等。因此,无法限定精确的“有效量”。然而,对于任何给定的情况,本领域普通技术人员可以只利用常规实验就能确定合适的“有效量”。

[0072] 本文所用术语“接触”通常指使发生接触。直接接触通常指向待处理的微生物或生物膜给予试剂或者使微生物或生物膜与试剂自身发生接触。间接接触通常指向微生物或生物膜给予活性剂前体或者能单独产生活性剂或能与其它化合物或分子反应而产生活性剂的化合物或分子,或者使微生物或生物膜与所述物质发生接触。因此,可使微生物或生物膜直接或间接接触本文所述的化合物或组合物。另外,可使微生物或生物膜直接或间接接触化合物所释放的一氧化氮。本公开内容全文中,使生物膜或微生物间接“接触”本文所述化

合物或组合物还包括向体内或身体上存在生物膜或微生物的对象给予化合物或组合物。因此,本发明中的术语“接触”,“给予”和“递送”及其变体在一些内容中可互换使用。

[0073] 术语“抑制”及其变体,例如本文在涉及生物膜时所用的“抑制性”和“抑制了”,指完全或部分抑制生物膜形成和/或发展,还包括在该范围内逆转生物膜发展与生物膜形成和/或发展有关的过程。另外,抑制可以是永久性的或暂时的。抑制可以达到足以产生所需效果的程度(量级上和/或空间上)和/或持续足以产生所需效果的时间。抑制可以是预防、滞后、降低或阻碍生物膜形成或发展。该抑制可以是对特性量级上和/或时间上或空间上的抑制。另外,该抑制可以是直接或间接的。通过间接抑制指试剂会影响分子表达或活性从而调节生物膜形成或发展。

[0074] 本文所用术语“程序性细胞死亡”指在生物膜中发生于指定阶段并引起具有特定表型的细胞亚群发生自溶、细胞分化和发展的发生事件。

[0075] 相似地,本发明内容中的促进微生物从生物膜中分散所用的术语“促进”及其变体例如“促进性”和“促进了”也指完全或部分促进分散,可以是永久性的或暂时的,促进分散至足以产生所需效果的程度(量级上和/或空间上)和/或持续足以产生所需效果的时间。该促进可以是直接或间接的。

[0076] 本文所用术语“表面”包括生物表面和非生物表面。生物表面通常包括生物体内部(如器官、组织、细胞、骨和膜)和外部(如皮肤、毛发、表皮附器、种子、植物叶子)表面。生物表面还包括其它天然表面例如木头或纤维。非生物表面可以是任何组合物的任何人工表面,所述组合物支持生物膜的建立和发展。该类表面可存在于工业工厂和设备中,并包括医疗和外科设备以及可植入和不可植入的医疗装置。另外,为了本发明目的,表面可以是多孔的(如膜)或无孔的,可以是刚性的或柔性的。

[0077] 本文所用术语“处理”、“治疗”、“防止”和“预防”指以任何方式治疗病症或症状、预防病症或疾病建立、或以任何方式预防、妨碍、延缓或逆转病症或疾病或其它非期望症状的进展中的任何或所有应用。因此术语“治疗”和“预防”等视为其最广义内容。例如,治疗不一定指患者接受治疗直至完全恢复。

[0078] 本说明书的内容中,所用术语“C₁-C₂₀烷基”包括含有1~20个碳原子的直链和支链单价饱和烃基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基等。

[0079] 本说明书的内容中,所用术语“C₁-C₁₀烷基”包括含有1~10个碳原子的直链和支链单价饱和烃基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基等。

[0080] 本说明书的内容中,所用术语“C₁-C₆烷基”包括含有1~6个碳原子的直链和支链单价饱和烃基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基等。

[0081] 本说明书的内容中,所用术语“C₂-C₂₀烯基”包括含有2~20个碳原子和至少一个碳碳双键的直链和支链单价烃基,例如乙烯基、丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、十一碳烯基等。

[0082] 本说明书的内容中,所用术语“C₂-C₁₀烯基”包括含有2~10个碳原子和至少一个碳碳双键的直链和支链单价烃基,例如乙烯基、丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、丁烯基、戊烯基等。

[0083] 本说明书的内容中,所用术语“C₂-C₆烯基”包括含有2~6个碳原子和至少一个碳碳

双键的直链和支链单价烃基,例如乙烯基、丙烯基、2-甲基-2-丙烯基等。

[0084] 本说明书的内容中,所用术语“C₂-C₂₀炔基”包括含有2~20个碳原子和至少一个碳碳三键的直链和支链单价烃基,例如乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、十一碳炔基等。

[0085] 本说明书的内容中,所用术语“C₂-C₁₀炔基”包括含有2~10个碳原子和至少一个碳碳三键的直链和支链单价烃基,例如乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基等。

[0086] 本说明书的内容中,所用术语“C₂-C₆炔基”包括含有2~6个碳原子和至少一个碳碳三键的直链和支链单价烃基,例如乙炔基、丙炔基、丁炔基等。

[0087] 本说明书的内容中,所用术语“芳基”包括含有6~30个碳原子的单价芳族基,例如苯基、联苯基、萘基、蒽基、菲基等。

[0088] 本说明书的内容中,所用术语“杂芳基”包括具有4~25个原子的单价芳族基团,其中1~6、或1~5、或1~4、或1~3、或一个或两个原子是选自氮、氧和硫的杂原子,例如咪唑基、噻唑基、噻啉基、异噻啉基、吡啶基、异吡啶基、苯并吡啶基、苯并噁唑基、苯并咪唑基、吡唑基、四唑基、噁唑基、噁二唑基、异噁唑基、噻二唑基、噻啉基、吡喃基、异噻啉基、噻唑基、噻吩基、咪唑基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基、异噻啉基、吡啶基、三唑基、苯并噻吩基、吡咯基、苯并噻唑基、噻啉基、萘啶基、蝶啶基、吡唑基、氮七环基、吡啶基、苯并异噻啉基、苯并噁唑基、苯并异噻啉基、苯并咪唑基、嘌呤基、苯并咪唑基、三嗪基等。

[0089] 本说明书的内容中,术语“卤”和“卤素”可互换使用并可包括氟、氯、溴和碘。

[0090] 本说明书的内容中,所用术语“C₃-C₇环烷基”包括具有3~7个碳原子的环状烷基,例如环丁基、环己基等。

[0091] 本说明书的内容中,所用术语“C₅-C₇环烷基”包括具有5~7个碳原子的环状烷基,例如环戊基等。

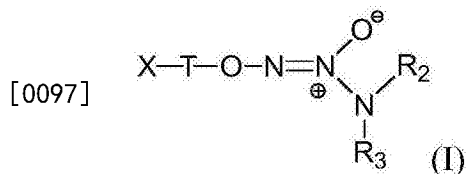
[0092] 本说明书的内容中,所用术语“C₃-C₇环烯基”包括具有3~7个碳原子和至少一个碳碳双键的环状烃基,例如环丙烯基、环戊烯基、环己烯基等。

[0093] 本说明书的内容中,所用术语“C₁-C₃亚烷基”包括具有1~3个碳原子的二价烃基,例如亚甲基和亚乙基等。

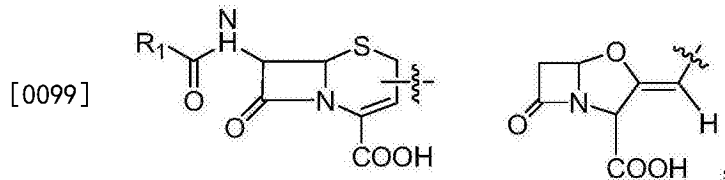
[0094] β-内酰胺酶是细菌在防御β-内酰胺抗生素时产生的酶。许多生物膜形成微生物例如铜绿假单胞菌能产生β-内酰胺酶并在生物膜形成期间在生物膜内产生大量该类酶,从而促使β-内酰胺抗生素在根除生物膜时失效。如本文所述和所例证的那样,本发明人现已发现,将β-内酰胺抗生素或β-内酰胺抗生素中含β-内酰胺环的核心或抗微生物剂与一氧化氮供体偶联,可使有效浓度的一氧化氮实现靶向递送并且在接触生物膜和生物膜形成微生物后对一氧化氮释放进行空间和时间控制,从而促进微生物从生物膜中分散。如本文所示例,本发明的偶联化合物在溶液中稳定并使一氧化氮有效作用于生物膜中的微生物,经证实仅仅以微摩尔级别的浓度接触10分钟后就诱导了铜绿假单胞菌生物膜快速分散。

[0095] 因此,本发明提供偶联化合物、包含该偶联化合物的组合物及其应用,其中该偶联物包含与一氧化氮供体化合物络合的β-内酰胺抗生素或含有β-内酰胺环的抗微生物剂或其衍生物。这类偶联物在溶液中稳定,作为一氧化氮前药能向所需位点递送非毒性的低浓度一氧化氮从而促进微生物从生物膜中分散并抑制生物膜的形成和/或发展。

[0096] 本发明在一方面提供了式(I)的化合物,或其盐:

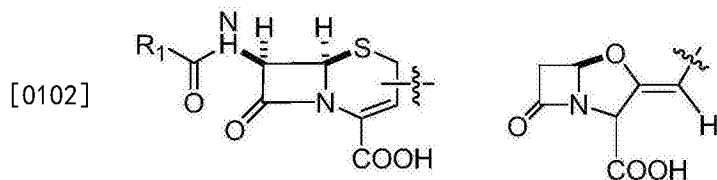


[0098] 其中T是化学键或接头, R₂和R₃是有机残基, X选自下组:



[0100] 其中R₁是有机残基。

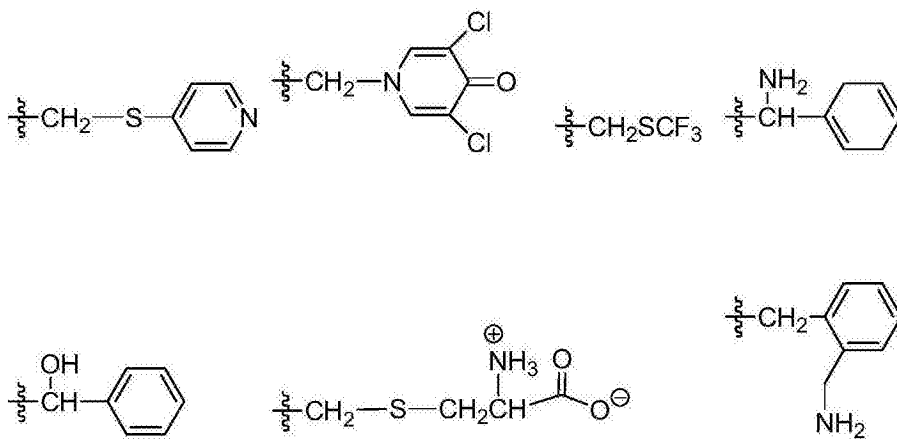
[0101] 式(I)的化合物可具有一个或多个手性中心。本发明包括所有对映异构体和非对映异构体, 以及其任何比例的混合物。本发明还延伸到经分离的对映异构体或对映异构体对。在本发明的实施方式中, X选自下组:



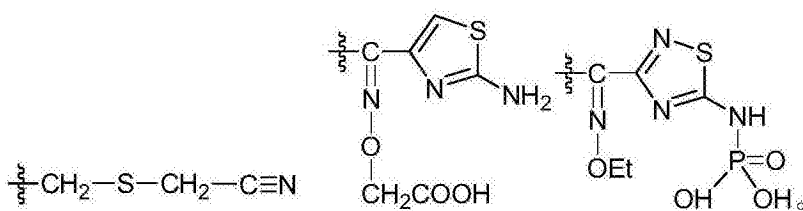
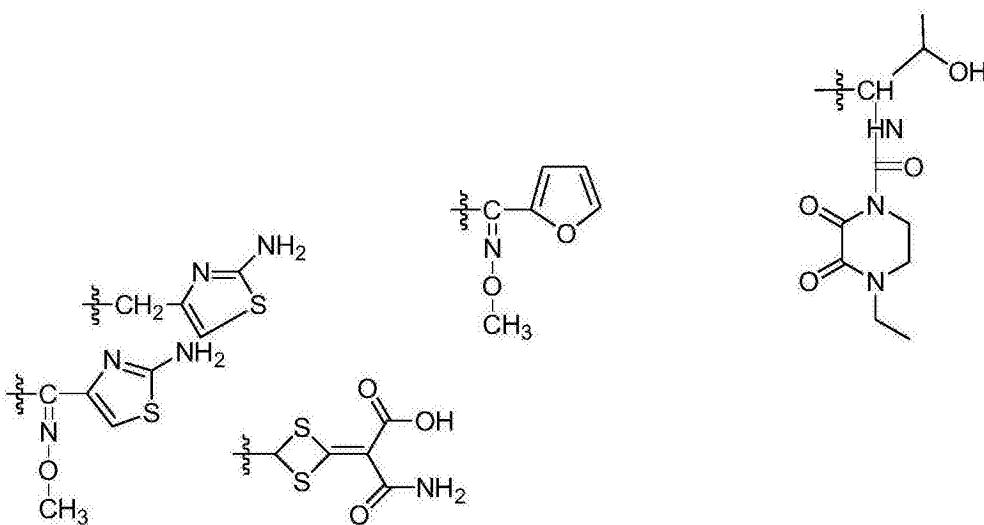
[0103] 在该式(I)的化合物的范围内还可以是盐, 包括药学上可接受的盐。式(I)的化合物的盐可由本领域技术人员已知的常规方法制备。例如, 碱加成盐可通过式(I)的化合物与合适的碱反应来制备。这类盐的示例包括碱金属盐, 例如锂、钾和钠, 以及碱土金属盐, 例如钙、镁和钡。另外的碱式盐包括但不限于, 铵、铜、铁、锰和锌盐。酸加成盐可通过式(I)的化合物与有机或无机酸反应来制备。该类盐的示例包括HCl、HBr和HI盐, 其它矿物酸盐例如硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等, 烷基和单芳基磺酸盐例如乙磺酸盐、甲苯磺酸盐和苯磺酸盐, 以及其它有机酸盐, 例如乙酸盐、三氟乙酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐等。式(I)的化合物也可通过与诸如(C₁-C₄)烷基卤化物反应来季铵化, 所述(C₁-C₄)烷基卤化物例如甲基、乙基、异丙基和丁基卤化物。

[0104] T可以是具有1~20个碳原子的二价接头。在一个实施方式中, T是具有1~20个碳原子、1~15个碳原子、或1~10个碳原子的二价烃类接头。在另一实施方式中, T选自下组: -CH₂-、-CH₂CH₂-、-CH(CH₃)CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-和-CH₂CH₂CH₂CH₂-。

[0105] R₁可以是取代基, 该取代基相当于结合于头孢菌素抗生素7-NHC(O)-基团的取代基。例如, R₁可以是取代基, 该取代基相当于结合于以下头孢菌素抗生素7-NHC(O)-基团的取代基: 头孢马替林、头孢苯乙酰(cephaloram)、头孢唑林、头孢赛曲、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢来星、头孢洛宁、头孢菌素 II、先锋霉素 I、头孢匹林、头孢曲嗪、头孢西酮、头孢氮氟、头孢拉定、头孢沙定(cefroxidine)、头孢替唑、头孢克洛(cefachlor)、头孢孟多、头孢米诺、头孢尼西、头孢雷特、头孢替安、头孢丙烯、头孢拉宗、头孢呋辛、头孢唑南、头霉素、头孢替坦、头孢美唑、氟氧头孢、头孢克肟、头孢曲松、头孢吡啶、头孢哌酮、头孢卡品、头孢达肟、头孢地尼、头孢托兰(cefditoran)、头孢他美、头孢甲肟、头孢地嗪(cefodizime)、头孢噻肟、头孢咪唑、头孢匹胺(cefpirimide)、头孢泊肟、头孢磺啶、头孢特仑、头孢布烯、头孢噻林、头孢唑肟、拉氧头孢、头孢吡肟(cefepine)、头孢唑兰(cefazopram)、头孢匹罗、头孢



[0108]



[0109] 上述各组相当于与上述特定头孢菌素抗生素的7-NHC(O)-基团结合的取代基。

[0110] 在另一个实施方式中, R₁是通式-Y-芳基, 其中Y是具有1至6个碳原子的二价烃类。在一个实施方式中, Y是具有1~4个碳原子的直链或支链烃, 芳基是苯基或萘基。

[0111] 在另一个实施方式中, R₁是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~4个碳原子的二价烃, 芳基和杂芳基可被任选取代。

[0112] 在另一个实施方式中, R₁是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~4个碳原子的二价烃, 芳基选自: 苯基、联苯基、萘基、蒽基和菲基, 杂芳基可以是5或6元环, 其中1~4个碳原子被氮和/或硫原子取代, 其中芳基和杂芳基可任选地被一个或多个选自以下的取代基取代: C₁₋₆烷基、卤代、氨基、羟基、甲氧基、和乙氧基。

[0113] 在另一个实施方式中, R_1 是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~4个碳原子的二价烃, 芳基选自: 苯基、联苯基、萘基、蒽基和菲基, 且杂芳基是1至4个碳原子被氮和/或硫原子取代的5或6元环。

[0114] 在另一个实施方式中, R_1 是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~3个碳原子的二价烃, 芳基选自: 苯基、联苯基和萘基, 且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基、噁唑基、异噁唑基和吡咯基。

[0115] 在另一个实施方式中, R_1 是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1或2个碳原子的二价烃, 芳基选自: 苯基、联苯基和萘基, 且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基、噁唑基、异噁唑基和吡咯基。

[0116] 在另一个实施方式中, R_1 是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是 $-\text{CH}_2-$, 芳基选自: 苯基、联苯基和萘基, 且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基、噁唑基、异噁唑基和吡咯基。

[0117] 在一个实施方式中, R_1 选自下组: $-\text{CH}_2-$ 苯基、 $-\text{CH}_2-$ 噻吩基和 $-\text{CH}_2-$ 四唑基。

[0118] R_2 和 R_3 可独立地选自: 氢、 C_3 - C_7 环烷基、 C_3 - C_7 环烯基、 $(\text{CH}_2)_p\text{OC}(\text{O})\text{PhOC}(\text{O})\text{C}_1$ - C_6 烷基、 $(\text{CH}_2)_p\text{OC}(\text{O})\text{APhC}_1$ - C_6 烷基、支链或直链 C_1 - C_{20} 烷基、支链或直链 C_2 - C_{20} 烯基、支链或直链 C_2 - C_{20} 炔基, 其中烷基、烯基或炔基链可任选地被一个或多个选自O、S、NH、 NH_2^+ 的基团/杂原子打断, 其中烷基、烯基或炔基可任选地被一个或多个选自下组的取代基取代: 卤素、氰基、 COOH 、 $(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{O})\text{OC}_1$ - C_6 烷基、 $\text{C}(\text{O})\text{OC}_1$ - C_6 烯基、 SO_3H 、 SO_2 卤、 SO_2NH_2 、 NH_2 、 NH_3^+ 、OH、SH、 OC_1 - C_6 烷基、 OC_2 - C_6 烯基、 OC_2 - C_6 炔基、芳基和杂芳基, 或替代性地 R_2 和 R_3 与其所结合的氮原子一起形成4、5、6、7或8元环, 所述环可任选地含有1、2、3、4、5或6个额外的氮原子, 并可以是饱和的、不饱和的或部分不饱和的, 其中4、5、6、7或8元环可任选地被一个或多个选自下组的取代基取代: $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1$ - C_3 亚烷基-萘基- OC_1 - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1$ - C_3 亚烷基- $\text{Ph}-\text{C}(\text{O})-\text{Ph}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OCH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OPhNO}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OPhNH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{C}$ 卤素₃、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{O})_p\text{CH}_3$ 、 C_1 - C_6 -烷基、 C_2 - C_6 烯基、 C_2 - C_6 炔基、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1$ - C_6 亚烷基 COOC_1 - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1$ - C_3 亚烷基 PhC_1 - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ -吡咯烷基-2,5-二酮、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1$ - C_3 亚烷基 PhC_1 - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OC}_1$ - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p$ 卤素、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{Ph}$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_2$ 萘基- NC_1 - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{ONC}_1$ - C_6 烷基、 $-(\text{CH}_2)_p\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{PhOAc}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NHC}(\text{O})\text{C}_1$ - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{M}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$ 、 $-(\text{CH}_2)_p\text{CH}(\text{OH})\text{CHOH}$ 、卤素、氰基、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{Ph}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1$ - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_2$ - C_6 烯基、 $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_2$ - C_6 炔基、 $-\text{C}(\text{O})\text{SC}_1$ - C_6 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{SC}_2$ - C_6 烯基、 $-\text{C}(\text{O})\text{SC}_2$ - C_6 炔基、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1$ - C_6 烷基、 SO_3H 、 SO_2 卤素、 SO_2 苯基、 SO_2NH_2 、 $\text{SO}_2\text{NR}_4\text{R}_5$ 、 $\text{SO}_2\text{PhNHCOC}_1$ - C_6 烷基、 NH_2 、OH、SH、 OC_1 - C_6 烷基、 OC_2 - C_6 烯基、 OC_2 - C_6 炔基、芳基和杂芳基, 其中A是具有1~4个碳原子的二价烃基, p是0~4之间的数值, R_4 和 R_5 独立地代表 C_1 - C_6 烷基, 且M是吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、苯基或三嗪基。

[0119] 在另一个实施方式中, R_2 和 R_3 可独立地选自: 氢、 C_5 - C_7 环烷基、 $(\text{CH}_2)_p\text{OC}(\text{O})\text{PhOC}(\text{O})\text{C}_1$ - C_6 烷基、 $(\text{CH}_2)_p\text{OC}(\text{O})\text{APhC}_1$ - C_6 烷基、支链或直链 C_1 - C_{10} 烷基、支链或直链 C_2 - C_{10} 烯基、支链或直链 C_2 - C_{10} 炔基, 其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~3个选自O、S、NH和 NH_2^+ 的基团/杂原子打断, 其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~6个选自下组的取代基取代: 卤素、苯基、乙氧基、甲氧基、丙氧基、 COOH 、 $(\text{CH}_2)_p\text{COOC}_1$ - C_4 烷基、 NH_2 、 NH_3^+ 、OH和SH, 其中A是具有1或2个碳原子的二价烃基, p是0、1或2。

[0120] 在另一个实施方式中, R_2 和 R_3 可独立地选自: 氢、 C_5 - C_7 环烷基、支链或直链 C_1 - C_{10} 烷基、支链或直链 C_2 - C_{10} 烯基、支链或直链 C_2 - C_{10} 炔基, 其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~

3个选自O、S、NH和NH₂⁺的基团打断,其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~4个选自下组的取代基取代:卤素、苯基、甲氧基、COOH、CH₂COOC₁₋₄烷基、NH₂和NH₃⁺。

[0121] 在另一个实施方式中,R₂和R₃可独立地选自:氢、环己基、支链或直链C₁₋₁₀烷基或支链或直链C₂₋₁₀烯基,其中烷基或烯基链可任选地被1或2个选自NH和NH₂⁺的基团打断,其中烷基、烯基或炔基链可任选地被1~3个选自下组的取代基取代:苯基、甲氧基、COOH、NH₂和NH₃⁺。

[0122] 在另一个实施方式中,R₂和R₃与其所结合的氮原子一起形成4、5、6、或7元环,所述环可任选地含有1、2、3、4或5个额外的氮原子,并可以是饱和的、不饱和的或部分不饱和的,其中4、5、6或7元环可任选地被一个或多个选自下组的取代基取代:SO₂NMe₂、SO₃H、SO₂卤素、SO₂NH₂、-C(O)O(CH₂)_pPh、-C(O)Me、-C(O)吡啶基、-(CH₂)_pOH、-C(O)NH₂、-COOH、-C(O)NMe₂、-C(O)NEt₂、苯基、萘基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡咯烷基、咪唑基、C₁₋₆-烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、-C(O)OC₁₋₆烷基、-C(O)OC₂₋₆烯基、-C(O)OC₂₋₆炔基、-C(O)O(CH₂)_pPh、-(CH₂)_pSH、卤素、SO₂PhNHCOC₁₋₆烷基、NH₂、SH、OC₁₋₆烷基,其中p为0~2的数值,

[0123] 在另一个实施方式中,R₂和R₃与其所结合的氮原子一起形成5、6、或7元环,所述环可任选地含有1、2或3个额外的氮原子,并可以是饱和的、不饱和的或部分不饱和的,其中5、6或7元环可任选地被1~4个选自下组的取代基取代:SO₂NMe₂、SO₂NH₂、-COO(CH₂)_pPh-C(O)Me、-C(O)吡啶基、-(CH₂)_pOH、-C(O)NH₂、-COOH、-C(O)NMe₂、-C(O)NEt₂、苯基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡咯烷基、咪唑基、C₁₋₆-烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、-C(O)OC₁₋₆烷基、-C(O)OC₂₋₆烯基、-C(O)OC₂₋₆炔基、-C(O)O(CH₂)_pPh、-(CH₂)_pSH、卤素、NH₂、SH、OC₁₋₆烷基,其中p为0~2的数值,

[0124] 在另一个实施方式中,R₂和R₃与其所结合的氮原子一起形成饱和的5、6、或7元环,所述环可任选地含有1、2或3个额外的氮原子,其中5、6或7元环可任选地被1~3个选自下组的取代基取代:SO₂NMe₂、SO₂NH₂、-C(O)Me、-C(O)吡啶基、-(CH₂)_pOH、-C(O)NH₂、-COOH、-C(O)NMe₂、-C(O)NEt₂、苯基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡咯烷基、咪唑基、C₁₋₆-烷基、C₂₋₆烯基、-C(O)OC₁₋₆烷基、-C(O)OC₂₋₆烯基、卤素、NH₂、SH、OC₁₋₆烷基,其中p为0~2的数值,

[0125] 在另一个实施方式中,R₂和R₃独立地选自C₁₋₁₀烷基,或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成5或6元环,所述环可任选地含有1至3个额外的氮原子,并可任选地被芳基或杂芳基基团取代。

[0126] 在另一个实施方式中,R₂和R₃独立地选自C₁₋₁₀烷基,或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成5或6元饱和环,所述环可任选地含有1至3个额外的氮原子,并可任选地被芳基或杂芳基基团取代。

[0127] 在另一个实施方式中,R₂和R₃独立地选自C₁₋₆烷基,或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环可任选地含有1或2个额外的氮原子并可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基、萘基、苯基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、咪唑基、四唑基和吡咯基。

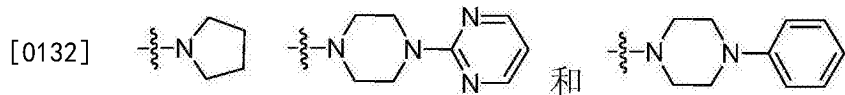
[0128] 在另一个实施方式中,R₂和R₃独立地选自C₁₋₆烷基,或替代性地R₂和R₃与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环任选地含有1个额外的氮原子并任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基、萘基、苯基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、咪唑基、四唑基和吡咯基。

[0129] 在另一个实施方式中,R₂和R₃独立地选自C₁₋₆烷基,或替代性地R₂和R₃与其所结合

的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环任选地含有1个额外的氮原子并任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基、苯基、吡嗪基和三嗪基。

[0130] 在另一个实施方式中, R_2 和 R_3 独立地选自甲基、乙基或丙基,或替代性地 R_2 和 R_3 与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环任选地含有1个额外的氮原子,并且在所述1个额外的氮原子上可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基、苯基、吡嗪基和三嗪基。

[0131] 在另一个实施方式中, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1 - C_6 烷基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成选自下组的结构:

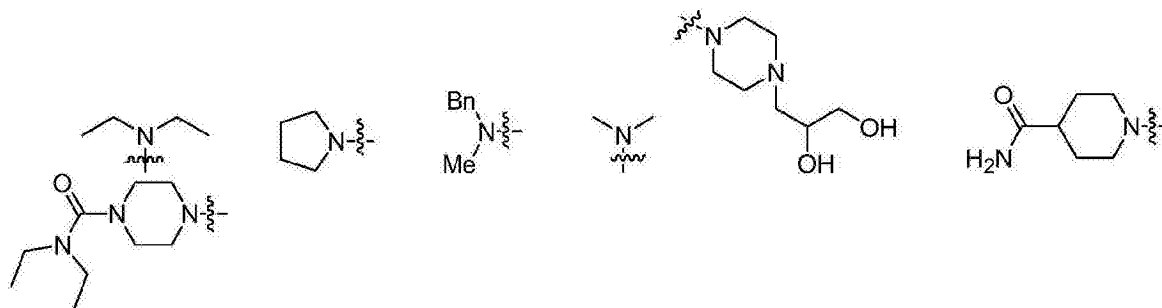


[0133] 在另一个实施方式中, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1 - C_6 烷基。

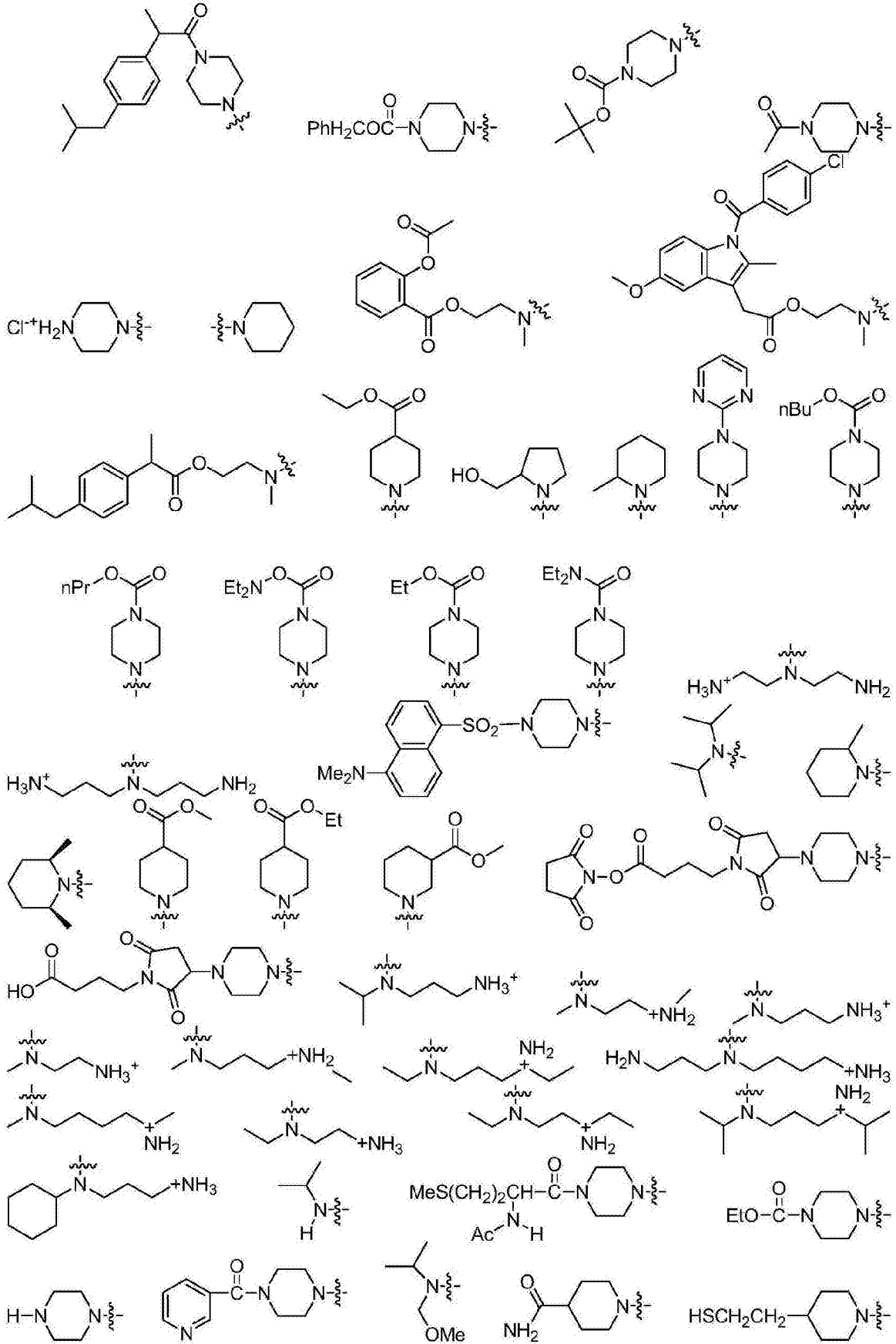
[0134] 在另一个实施方式中, R_2 和 R_3 独立地选自下组:甲基、乙基、丙基和异丙基。

[0135] 在具体的实施方式中, R_2 和 R_3 与其所结合的氮一起形成以下结构:

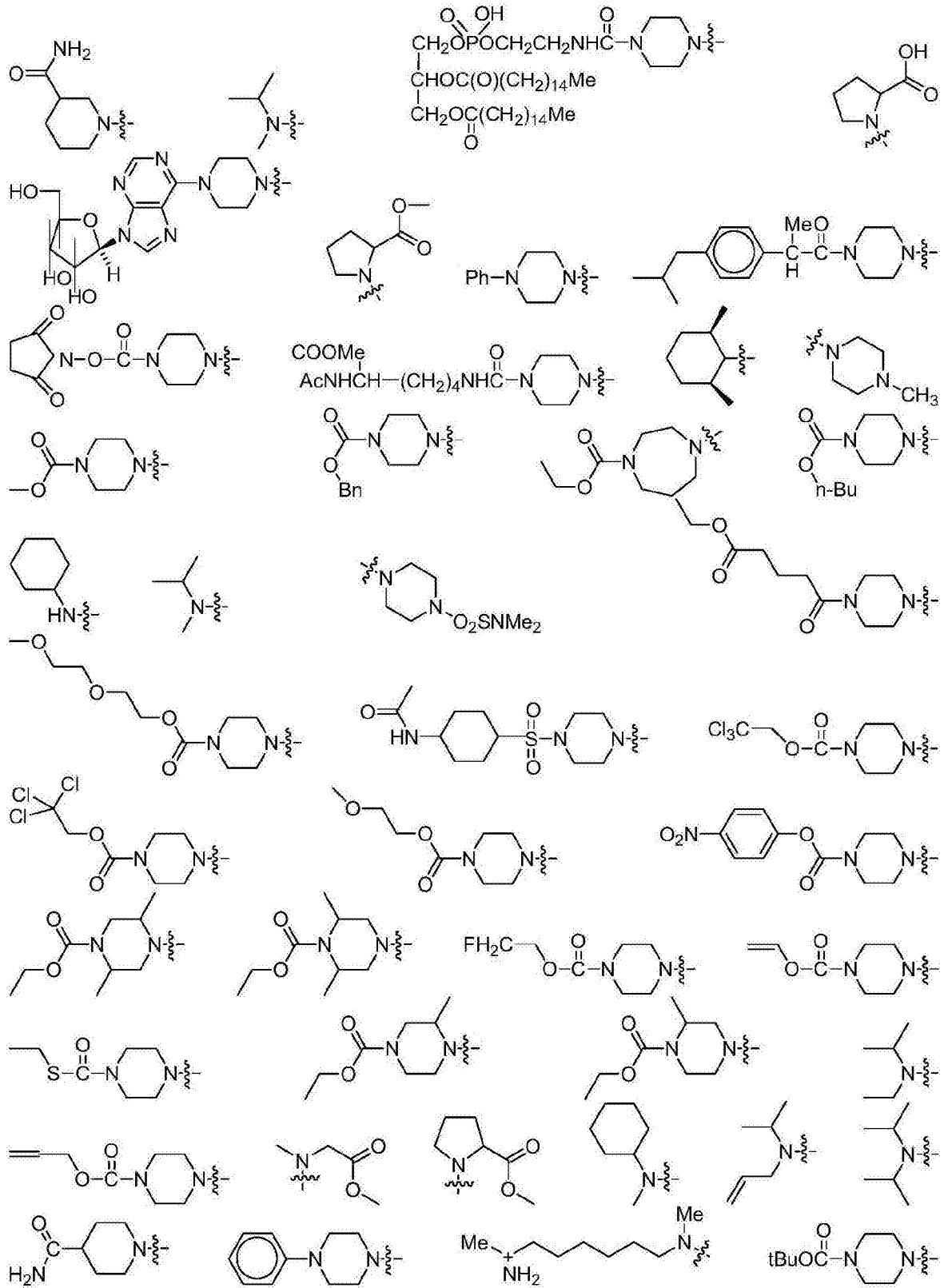
[0136]



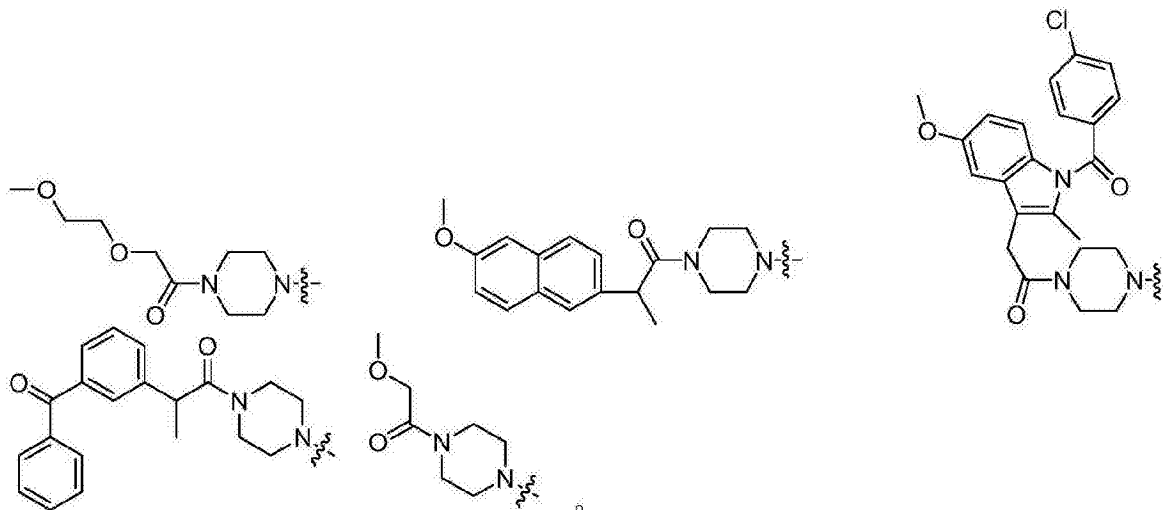
[0137]



[0138]



[0139]



[0140] 在另一个实施方式中, T是CH₂, R₁是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~4个碳原子的二价烃, 芳基和杂芳基任选地被1~3个选自下组的取代基取代: C₁-C₆烷基、卤素、氨基和OC₁-C₆烷基, 且R₂和R₃独立地选自C₁-C₁₀烷基, 或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成5或6元环, 所述环可任选地含有1至3个额外的氮原子, 并可任选地被芳基或杂芳基基团取代。

[0141] 在另一个实施方式中, T是CH₂, R₁是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~4个碳原子的二价烃且芳基和杂芳基任选地被取代, R₂和R₃独立地选自C₁-C₁₀烷基, 或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成5或6元环, 所述环可任选地含有1至3个额外的氮原子, 并可任选地被芳基或杂芳基基团取代。

[0142] 在另一个实施方式中, T是CH₂, R₁是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~4个碳原子的二价烃, 芳基选自: 苯基、联苯基、萘基、蒽基和菲基, 杂芳基可以是5或6元环, 其中1~4个碳原子被氮和/或硫原子取代, 其中芳基和杂芳基可任选地被一个或多个选自以下的取代基取代: C₁-C₆烷基、卤素、氨基、羟基、甲氧基和乙氧基, 且R₂和R₃独立地选自C₁-C₁₀烷基, 或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成5或6元饱和环, 所述环可任选地含有1至3个额外的氮原子, 并可任选地被芳基或杂芳基基团取代。

[0143] 在另一个实施方式中, T是CH₂, R₁是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~4个碳原子的二价烃, 芳基选自: 苯基、联苯基、萘基、蒽基和菲基, 且杂芳基是1至4个碳原子被氮和/或硫原子取代的5或6元环, R₂和R₃独立地选自C₁-C₆烷基, 或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环, 所述环可任选地含有1或2个额外的氮原子并可任选地被选自下组的取代基取代: 嘧啶基、萘基、苯基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、咪唑基、四唑基和吡咯基。

[0144] 在另一个实施方式中, T是CH₂, R₁是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1~3个碳原子的二价烃, 芳基选自: 苯基、联苯基和萘基, 且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基、噻唑基、异噻唑基和吡咯基, R₂和R₃独立地选自C₁-C₆烷基, 或替代性地R₂和R₃可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环, 所述环可任选地含有1个额外的氮原子并可任选地被选自下组的取代基取代: 嘧啶基、萘基、苯基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、咪唑基、四唑基和吡咯基。

[0145] 在另一个实施方式中, T是CH₂, R₁是Y-芳基或Y-杂芳基, 其中Y是具有1或2个碳原子的二价烃, 芳基选自: 苯基、联苯基和萘基, 且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基、

噻唑基、异噻唑基和吡咯基, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1 - C_6 烷基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环可任选地含有1个额外的氮原子并可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基、苯基、吡嗪基和三嗪基。

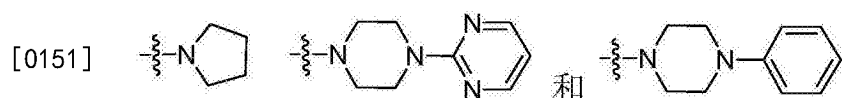
[0146] 在另一个实施方式中, T 是 CH_2 , R_1 是 Y -芳基或 Y -杂芳基,其中 Y 是 $-CH_2-$,芳基选自:苯基、联苯基和萘基,且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基、噻唑基、异噻唑基和吡咯基, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1 - C_6 烷基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环可任选地含有1个额外的氮原子并可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基、苯基、吡嗪基和三嗪基。

[0147] 在另一个实施方式中, T 是 CH_2 , R_1 是 Y -芳基或 Y -杂芳基,其中 Y 是 $-CH_2-$,芳基选自:苯基、联苯基和萘基,且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基、噻唑基、异噻唑基和吡咯基, R_2 和 R_3 独立地选自甲基、乙基和丙基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环可任选地含有1个额外的氮原子并可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基、萘基、苯基、吡嗪基和三嗪基。

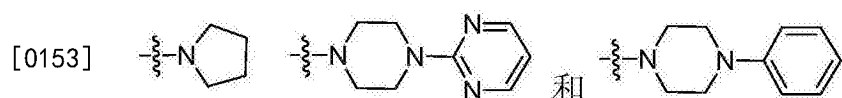
[0148] 在另一个实施方式中, T 是 CH_2 , R_1 是 Y -芳基或 Y -杂芳基,其中 Y 是 $-CH_2-$,芳基选自:苯基、联苯基和萘基,且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基、三唑基和吡咯基, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1 - C_6 烷基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环可任选地含有1个额外的氮原子,且在所述1个额外的氮原子上可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基、苯基、吡嗪基和三嗪基。

[0149] 在另一个实施方式中, T 是 CH_2 , R_1 是 Y -芳基或 Y -杂芳基,其中 Y 是 $-CH_2-$,芳基选自:苯基和萘基,且杂芳基选自噻吩基、四唑基、咪唑基和三唑基, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1 - C_6 烷基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成饱和的5或6元环,所述环可任选地含有1个额外的氮原子,且在所述1个额外的氮原子上可任选地被选自下组的取代基取代:嘧啶基和苯基。

[0150] 在一个实施方式中, T 是 CH_2 , R_1 选自下组: $-CH_2$ -苯基、 $-CH_2$ -噻吩基和 $-CH_2$ -四唑基, R_2 和 R_3 独立地选自 C_1 - C_6 烷基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成选自下组的结构:



[0152] 在另一个实施方式中, T 是 CH_2 , R_1 选自下组: $-CH_2$ -苯基、 $-CH_2$ -噻吩基和 $-CH_2$ -四唑基, R_2 和 R_3 独立地选自甲基、乙基和丙基,或替代性地 R_2 和 R_3 可与其所结合的氮一起形成选自下组的结构:

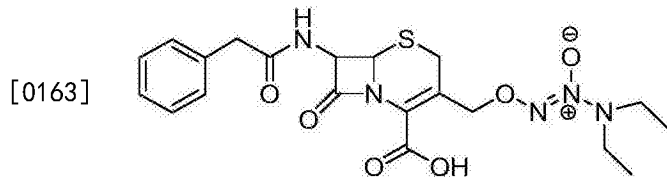


[0154] 式(I)的化合物具有以下结构:

间可达到约3~20小时。因此根据所需应用从式(I)的化合物中释放一氧化氮的合适速率可通过选择合适的R₂和R₃取代基得到。因此,本领域技术人员可认识到,R₂和R₃可根据所需释放时间在广泛的有机残基中选择。

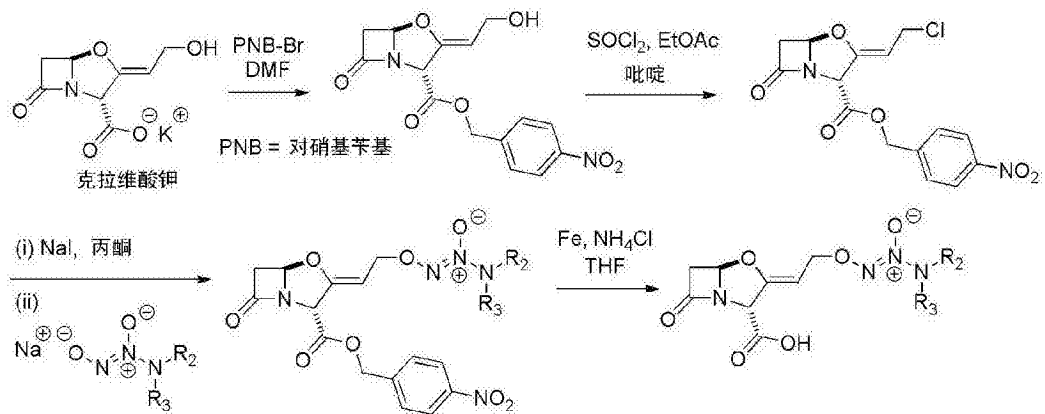
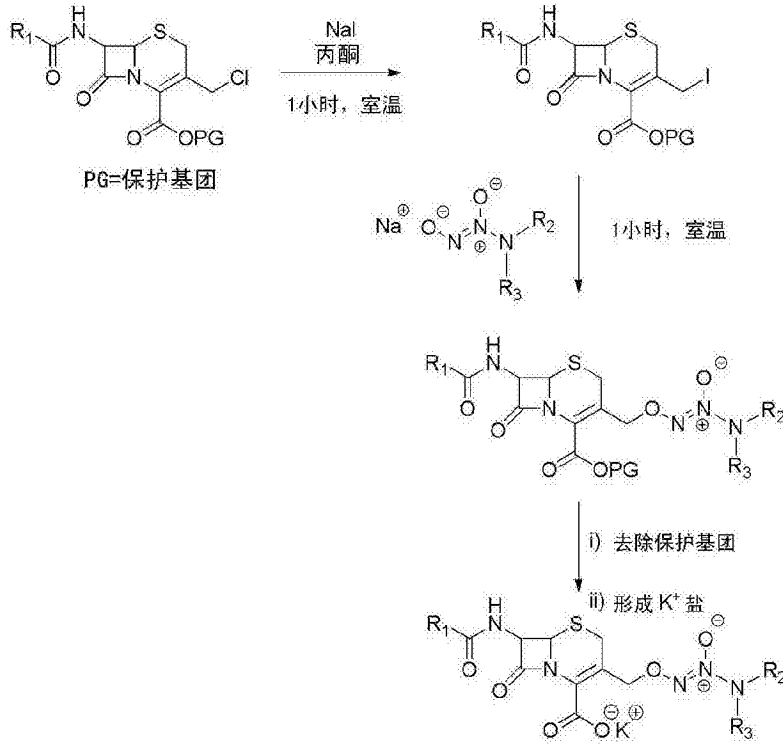
[0161] 因为β-内酰胺环与二醇二氮烯鎓相隔较远,取代基R₁在β-内酰胺酶和式(I)化合物的反应和随后的一氧化氮的清除中发挥最小作用。因此,本领域技术人员可认识到,R₁不受限于本文所限定的特定取代基,而是可以代表任何有机残基。

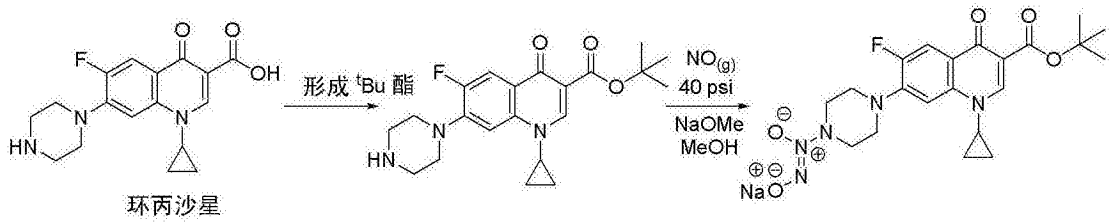
[0162] 在具体实施方式中,本发明的化合物包含与二醇二氮烯鎓相连的头孢菌素核心或核。在更具体的实施方式中,头孢菌素是头孢苯乙酰(cephaloram)。本发明所提供的式(I)化合物的一个示例具有以下结构。可考虑游离羧酸和羧酸盐(例如K⁺盐)。



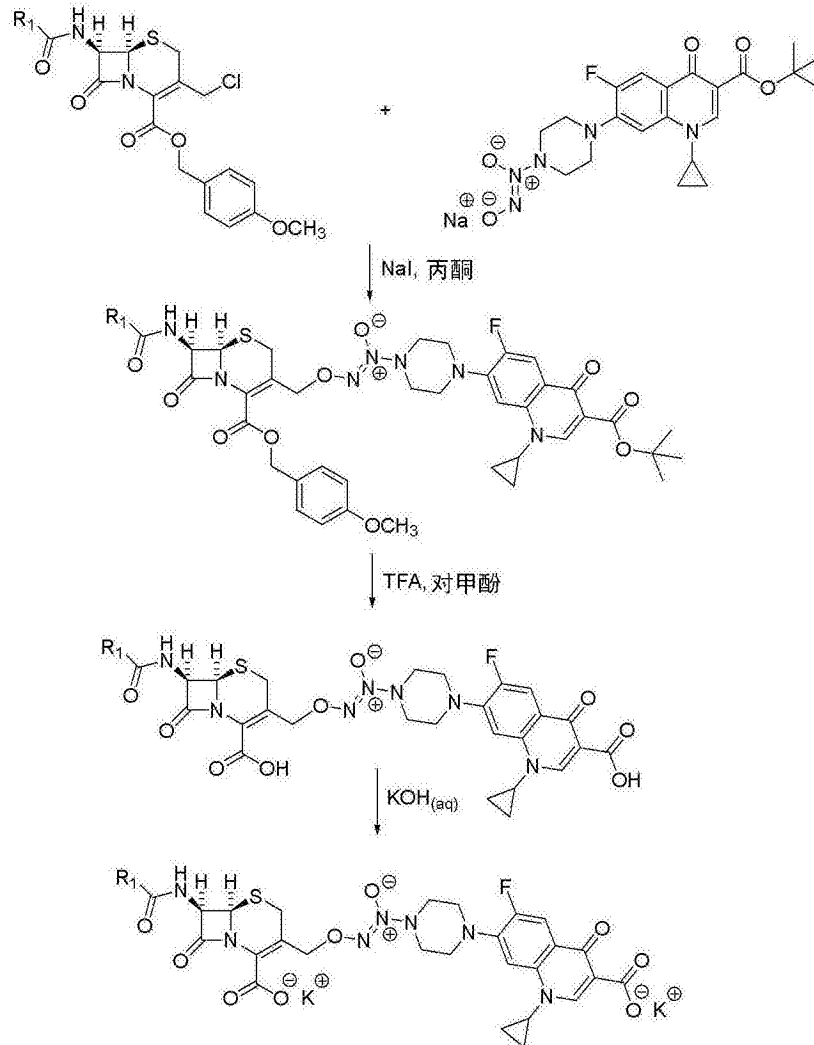
[0164] 在其它实施方式中,R₂和/或R₃取代基还可包括抗生素,该抗生素与一氧化氮一起从式(I)化合物中释放。一氧化氮和抗生素的相伴释放可协同作用从而更有效地杀灭生物膜微生物;一氧化氮诱导并促进微生物从生物膜中分散,而抗生素用来分散细胞。本领域技术人员应理解,可根据各种因素例如生物膜形成微生物的性质、生物膜程度和生物膜所处的环境来选择合适的抗生素,从而将任何合适的抗生素与本文所述化合物的R₂和/或R₃取代基相连。抗生素可以是包含NH基团的抗生素从而促进形成抗生素二醇二氮烯鎓偶联。在一个实施方式中,抗生素是环丙沙星或相关抗生素例如N-去甲基左氧氟沙星。

[0165] 本发明所述化合物可通过将-O-N=N⁺(O⁻)-N(R₂)(R₃)部分通过接头或直接键与X偶联来制备。在一个实施方式中,式(I)的示例性化合物可根据方案2来制备。





[0169]



[0170] 方案3:制备包含额外抗生素(例如环丙沙星)的式(I)化合物。

[0171] 虽然该方法中所示抗生素为环丙沙星,但本领域技术人员应理解该方法适用于可转化为二醇二氮烯鎓衍生物的其他抗生素。

[0172] 通常,根据本文所述实施方式中的待处理生物膜包括表达或可经诱导表达酶,例如 β -内酰胺酶或转肽酶的微生物。对 β -内酰胺酶表达的诱导可通过用合适的 β -内酰胺抗生素预处理微生物或生物膜,或通过给予式(I)化合物同时给予合适的 β -内酰胺抗生素来实现。 β -内酰胺抗生素可诱导所述生物膜形成微生物中产生胞外 β -内酰胺酶。 β -内酰胺抗生素可以以任何合适浓度给予,合适浓度可以是亚抑制、抑菌或杀菌浓度。 β -内酰胺酶是一种能识别并切割 β -内酰胺环的酶。因此需要用于诱导 β -内酰胺酶表达的合适 β -内酰胺抗生素可根据式(I)化合物所要递送至的微生物而变化。本领域技术人员能容易地确定待使用的合适 β -内酰胺抗生素。

[0173] 因此,本发明所述化合物、组合物和方法能在空间上和时间上控制一氧化氮释放,从而促进一氧化氮产生剂或释放剂向所需位点的靶向递送或给予,所需位点包括生物膜或可能形成生物膜的位点,并能使一氧化氮在具体应用中以合适动力学释放。

[0174] 本领域技术人员应理解本发明实施方式可适用于单一种类或混合种类的生物膜。本发明涉及的细菌种类可以是能形成生物膜或对其形成作出贡献和产生或能经诱导产生 β -内酰胺酶的任何种类。种类可包括但不限于假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.),例如铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*),假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)属,例如*P.tunicata*,葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.),例如金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*),链球菌属(*Streptococcus* spp.),大肠杆菌属(*Escherichia* spp.),例如大肠杆菌(*E.coli*),志贺氏菌属(*Shigella* spp.),结核分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.),粪肠球菌属(*Enterococcus* spp.),沙门菌属(*Salmonella* spp.)嗜肺军团菌属(*Legionella* spp.),流感嗜血杆菌属(*Haemophilus* spp.),芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.),长脱硫弧菌属(*Desulfovibrio* spp.),瓦尼菌属(*Shewanella* spp.),地杆菌属(*Geobacter* spp.),克雷伯菌属(*Klebsiella* spp.),.例如肺炎克雷伯菌(*K.pneumoniae*),变形杆菌属(*Proteus* spp.),例如奇异变形杆菌(*P.mirabilis*),沙雷菌属(*Serratia* spp.),例如粘质沙雷菌(*S.marcescens*),紫单胞菌属(*Porphyromonas* spp.),梭杆菌属(*Fusobacterium* spp.),变形杆菌属(*Proteus* spp.),气单胞菌属(*Aeromonas* spp.),节杆菌属(*Arthrobacter* spp.),微球菌属(*Micrococcus* spp.)和伯霍尔德杆菌属(*Burkholderia* spp.)。或者本领域技术人员应理解,本发明一些应用中的待处理生物膜混合群落中的具体种类特性是未确定的,且对于本发明应用而言不是很关键。

[0175] 根据本发明所述实施方式,式(I)化合物通常以一定的量使用,以至有非毒性的低浓度一氧化氮在生物膜或生物膜形成微生物附近释放。该浓度可以是纳摩尔、微摩尔或毫摩尔级别。在具体实施方式中,浓度可以是约1nM~约100mM、约10nM~约50mM、约25nM~约50mM、约50nM~约25mM、约100nM~约10mM、约200nM~约1mM、约500nM~500 μ M、约500nM~100 μ M,或约1 μ M~约50 μ M。达到所需效果的最合适浓度取决于一些因素并可由本领域技术人员通过常规实验测定。这些因素包括但不限于,用于一氧化氮释放的具体化合物,给予化合物的手段或途径,生物膜的特性、结构和年龄,待处理微生物的种类等。

[0176] 本发明所述化合物、组合物和方法可与至少一种额外的抗生素或抗微生物剂联用。如上文所述,本发明所述化合物可结合与R₂和/或R₃取代基相连的抗生素。或者,或另外,本发明化合物可与一种或多种抗生素或抗微生物剂同时或分期联合给予或递送。对于分期施予,可将抗生素或抗微生物剂配制成与本发明所述化合物相同的组合物。仅举例而言,合适的抗生素包括但不限于 β -内酰胺类、单青霉烯类、羧青霉烯类、氨基甙类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类(lincosamides)、四环素类、链阳菌素类、糖肽类、利福霉素(rifamycins)、磺酰胺类、氯霉素类、萘啶酸、含吡咯的化合物和肽抗生素。示例性抗生素包括头孢他啶和四环素。合适的抗微生物剂包括但不限于去污剂、表面活性剂、诱导氧化应激的试剂、细菌素和抗微生物酶、肽和噬菌体。抗微生物酶包括但不限于脂肪酶、链霉菌蛋白酶、裂合酶(如藻酸盐裂合酶)和各种其它蛋白水解酶和核酶。抗生素和抗微生物剂可以是天然或合成的。可根据具体情况选择用于本发明具体应用的所用抗生素或抗微生物剂,本领域技术人员应理解本发明的范围不受限于具体抗微生物剂的特性或性质。

[0177] 本发明所公开的化合物、组合物和方法可在广泛的环境和情况中找到应用。以下简述了一些一般应用范围。但本领域技术人员很容易理解,存在生物膜发展问题的任何环境或情况或者需要抑制微生物生长的任何环境或情况都可能适合。

[0178] 本发明所述化合物、组合物和方法可具体适用于治疗、预防和持续处理感染疾病和与生物膜和生物膜形成微生物相关、以此为特征或由此引起的疾病和失调。例如,与生物膜形成相关的多种细菌感染可通过本发明所述方法和组合物治疗,例如囊性纤维化、中耳炎、细菌性心内膜炎、肾结石、军团病、尿道感染、肺感染、牙菌斑、龋齿和与外科手术过程或烧伤相关的感染。因此,本发明的组合物可配制成药物组合物或形成(例如)外科敷料、漱口水、牙膏或盐溶液的组分。

[0179] 本发明的化合物和组合物可作为防腐剂包含在药物、化妆品、皮肤病学、或局部递送组合物中从而抑制或预防不希望的微生物的生长和/或集群。因此本发明组合物可有助于防腐,并因此延长其所加入的任何类型的药物、化妆品、皮肤病学或局部递送组合物的保质期。所公开的化合物或组合物可在其生产期间或生产后方便地包含在任何固体或液体药物、化妆品、皮肤病学或局部递送组合物中。术语“化妆品组合物”应理解为表示置于接触任何动物身体外部的组合物,包括口腔粘膜、牙齿、毛发和指甲,其出于以下目的,例如:保护、加香、清洁、保养(即湿润或剥离)、美化、改变身体的外观或气味。化妆品组合物的示例包括但不限于:护甲产品,化妆品,用于施加在嘴唇的产品,面膜和面部擦洗剂,毛发染色剂、染料和漂白剂,用于卷曲、拉直和固定毛发的产品,清洁产品例如洗剂、粉剂和洗发水,调理产品例如洗剂、霜剂、油,美发产品例如洗剂和光泽剂,用于护理牙齿和口腔的产品包括牙膏、漱口水、舌头清洁剂、牙科漂白剂/增白剂和假牙清洁剂,香水,花露水(toilet water),古龙水,女性卫生用品,除臭剂,止汗剂,清洁剂例如香皂、除臭皂、收敛剂和皮肤洗剂,修面产品例如霜剂、泡沫和洗剂,盆浴和淋浴制品例如盐、泡沫、油、凝胶等,脱毛剂,浴后用粉剂,卫生粉,保湿产品例如霜剂、洗剂、凝胶和泡沫,日光浴产品(不含SPF或SPF<4),抗皱产品(不含SPF)和抗衰老产品(不含SPF)。

[0180] 本发明所述化合物、组合物和方法也可用于包被医疗装置,包括医疗和外科手术设备和可植入医疗装置,包括但不限于静脉导管,引流管(如导尿管),支架,起搏器,隐形眼镜,助听器,经皮葡萄糖传感器,透析设备,输药泵相关的递送套管,假肢例如人工关节、心脏、心脏瓣膜或其它器官,医疗固定装置(如棒、螺丝、销钉、板等)。另外,本发明实施方式适用于伤口恢复,例如,可将包含其的化合物和组合物浸渍或包被在缝合线和伤口敷料(如绷带)上。

[0181] 本发明的化合物、组合物和方法还适用于一定范围的工业和家用应用,包括但不限于供水库和进料管,排水管(家用或工业规格),处理设备如冷却塔、水处理装置、乳制品处理装置、食品处理装置、化学生产装置、药物或生物药物生产装置、输油管和炼油设备,以及纸浆和纸张制造设备。其它适用的环境和设备包括例如海运抗污漆或涂层(例如用于处理船体),水产养殖设备,渔网或其它水中的结构。

[0182] 本发明所述组合物可以是任何合适的形式。通常该形式取决于何种形式最适合于应用或递送至所需位点,因此根据不同医疗、工业和家用应用而变化。例如,可将组合物配制用于体内给予,例如以液体、悬液、鼻腔喷雾、眼药水、粉剂、片剂、胶囊、霜剂、糊剂、凝胶或洗剂形式。对于工业和家用应用,可将组合物配制成漆、蜡、其它涂层、乳液、溶液、凝胶、

悬液、珠粒、粉剂、颗粒、团剂、薄片或喷雾。本领域技术人员也能意识到合适的制剂取决于具体应用和建议的递送途径。用于体内应用的合适给予途径包括例如口服、鼻腔、胃肠外(例如,静脉内、局部、动脉内、肌内、眼内)、经皮和皮下给予。

[0183] 本发明组合物通常还包括载体、稀释剂或赋形剂。合适的载体、稀释剂或赋形剂是本领域技术人员熟知的。所述稀释剂、佐剂和赋形剂必须是“可接受的”,这意味着它与该组合物的其它成分相容,并且在药物组合物的情况中,其对接受者无害。载体可以是液体或固体。在液体载体的情况中,液体可以是水性或非水性溶剂。

[0184] 除了本发明化合物本身所提供的一氧化氮的控释以外,可希望进一步水平的控释并可以通过向组合物中配制化合物来赋予。对于药物应用,本技术领域已知许多合适的控释系统。例如,可采用储库和基质装置形式的聚合物胶体颗粒或微胶囊(微颗粒、微球体或纳米颗粒),或者可将所述试剂包含在含有亲水性和/或可滤取的添加物(例如第二聚合物、表面活性剂或增塑剂等)的聚合物中,从而得到多孔装置或得到其中的药物释放可通过渗透性进行“控制”的装置(储库和基质装置)。也可使用较大的笼状分子例如C₆₀勃克明斯特富勒烯(“巴基球”)或者高支化(星型爆炸式(starburst))枝状聚合物。

[0185] 一般对于抗污和其它工业应用,例如漆或其它表面涂层形式的组合物采用能在时间上和/或空间上控释活性剂的载体。本领域技术人员已知实现控释生物活性剂的多种方法,可包括例如用合适的聚合物或基于聚合物的产品包封活性剂。聚合物可以是有机或无机聚合物,例如聚烯烃、聚醚、聚酯、聚酰胺、聚氨酯或多肽。本领域技术人员已知用于提供控释的合适聚合物,例如美国专利6,610,282所述的那些,其通过引用纳入本文。

[0186] 物质的释放速率通常由聚合物本身性质以及环境因素(例如pH、温度等)决定。控释系统能缓慢递送物质并连续递送长达数年。本领域技术人员应理解许多控释系统适用于本发明所述试剂的递送。仅举例来说,释放可以是扩散控制、化学控制或溶剂活化的。

[0187] 在扩散控制系统中,被聚合物基质包裹的试剂的扩散是总释放速率的速率决定性因素。一类扩散控制系统采用储库装置,其中所述试剂形成被惰性扩散阻挡层包围的核心。这些系统包括膜、胶囊、微胶囊、脂质体和中空纤维。或者该装置可以是整体型装置,其中活性剂分散于或溶于惰性聚合物。通过聚合物基质的扩散是速率限制性步骤,释放率部分由所选择的聚合物及其对扩散和待释放试剂的分配系数造成的影响所决定。

[0188] 在典型的化学控制系统中,聚合物随时间降解并以与逐渐侵蚀成比例的量释放试剂。利用生物消蚀性或吊链(pendant chain),可实现化学控制。在生物消蚀性系统中,试剂理想上以与整体式扩散系统相同方式均匀分布在聚合物中。随着包围试剂的聚合物发生侵蚀,试剂逸出。在吊链系统中,试剂共价结合于聚合物,通过由水或酶引起的键断裂而释放。

[0189] 在典型的溶剂活化控制系统中,活化剂溶于或分散于聚合基质中并且不能扩散穿过该基质。渗透压用作释放试剂的驱动力。在一类溶剂控制系统中,随着环境流体(如水)穿透基质,聚合物(如水凝胶)溶胀并且其玻璃化转变温度降低到低于环境(宿主)温度。因此,溶胀的聚合物是橡胶样状态并使内含的药物扩散穿过密封剂。

[0190] 可基于本领域技术人员已知的不同合成方法用几种常用方法来完成生物活性剂与聚合物的化学结合,所述常用方法包括:在预先形成的聚合物上进行的反应;在天然存在的聚合物上进行的反应;含活性成分的乙烯基单体的聚合;和阶梯状生长聚合。当生物活性剂与聚合物化学结合时,该化学结合必需通过化学反应,通常为酶、水解、热或光化学反应

切割。多种化学和物理变量会影响键裂率并会影响化学结合物质随后从聚合物中的释放，这些变量包括不稳定骨架的特性、间隔基团的长度、分子量、亲水性、相邻基团作用、环境因素和物理形式和尺寸。

[0191] 在抗污应用中，本技术领域已知自行抛光抗污涂层。该涂层通常是基于甲基丙烯酸三丁基锡(tributyltin methacrylate)、甲基丙烯酸甲酯和膜软化单体如丙烯酸2-乙基己基酯(2-ethylhexyl acrylate)的聚合物。有机锡聚合物通常用作漆粘结剂。这类漆也可含有毒性添加剂例如氧化亚铜或三烷基有机锡化合物。另外，也可存在常用的漆添加剂例如颜料和触变剂。在通常为碱性的海水中，聚合有机锡粘结剂逐渐水解，三丁基锡以活性防污剂的形式释放。所形成的水解聚合物是水溶性或水溶胀性的，容易被接触漆的新鲜表面的流动海水侵蚀而离开表面。

[0192] 本领域技术人员应理解上述递送系统和方法仅作为可适用于本发明的方法和系统的示例。可使用任何其它适合载体和递送系统实现本发明所述实施方式所述试剂的所需应用方法。

[0193] 药学上可接受稀释剂示例是软水或蒸馏水；盐水；基于植物的油例如花生油、红花油、橄榄油、棉籽油、玉米油、芝麻油、花生油或椰子油；硅油，包括聚硅氧烷，例如甲基聚硅氧烷、苯基聚硅氧烷和甲基苯基聚硅氧烷；挥发性硅酮；矿物油例如液体石蜡、软石蜡或角鲨烷；纤维素衍生物例如甲基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠或羟丙基甲基纤维素；更低级的烷醇，例如乙醇或异丙醇；更低级的芳烷醇；更低级的聚亚烷基二醇或更低级的亚烷基二醇，例如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇、丙二醇、1,3-丁二醇或甘油；脂肪酯例如棕榈酸异丙酯、肉豆蔻酸异丙酯或油酸乙酯；聚乙烯吡咯烷酮；琼脂；角叉菜胶；黄耆胶或阿拉伯树胶，和石油膏。通常，载体或各种载体形成组合物按重量计1~99.9%。

[0194] 对于药物应用，组合物可配制用于任何途径的递送，所述途径例如口服、局部、腔内、膀胱内、肌内、动脉内、静脉内或皮下。

[0195] 本领域技术人员会理解，除了特定说明以外，可以对本文所述的各方面和各实施方式进行变化和修改。应理解本公开内容涵盖所有这些变化和修改。本发明还包括说明书中单独或共同提到或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物，以及所述步骤或特征中任意两种或更多种的任意和全部组合。

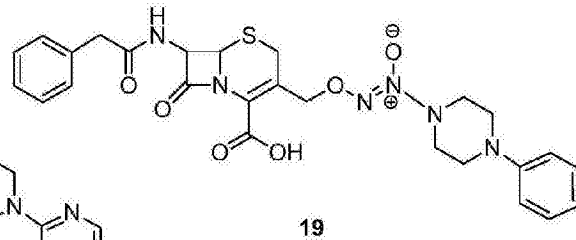
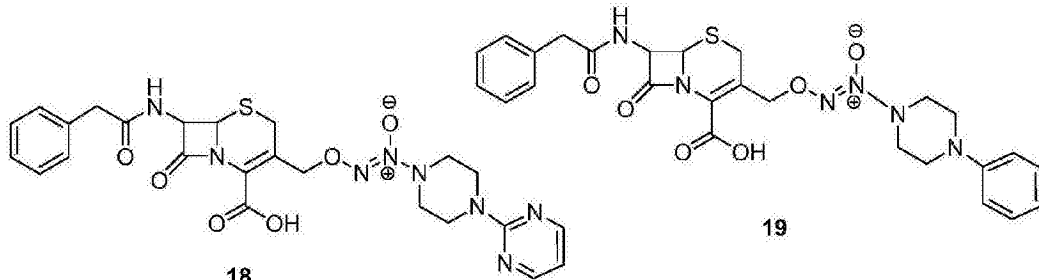
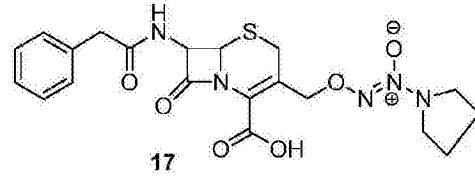
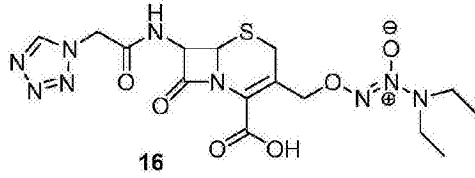
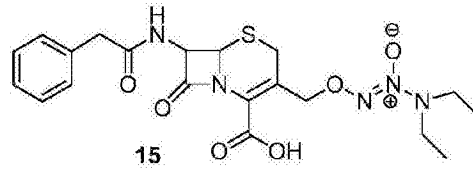
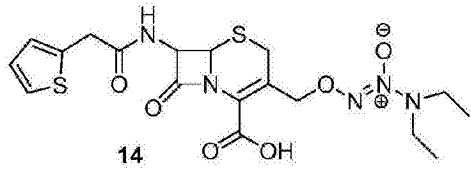
[0196] 任何参考文献的引用都不应解释为承认这些参考文献构成本申请的“现有技术”。另外，在说明书中对任何在先出版物(或由此得到的资料)或任何已知事物的参考不作为并且不应被看作承认或认可或者以任何形式暗示在先出版物(或由此得到的资料)或任何已知事物形成本说明书涉及的领域中的公知普通常识的一部分。

[0197] 下面参照以下非限制性实施例进一步描述本发明。

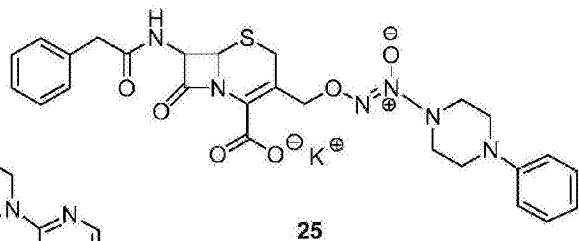
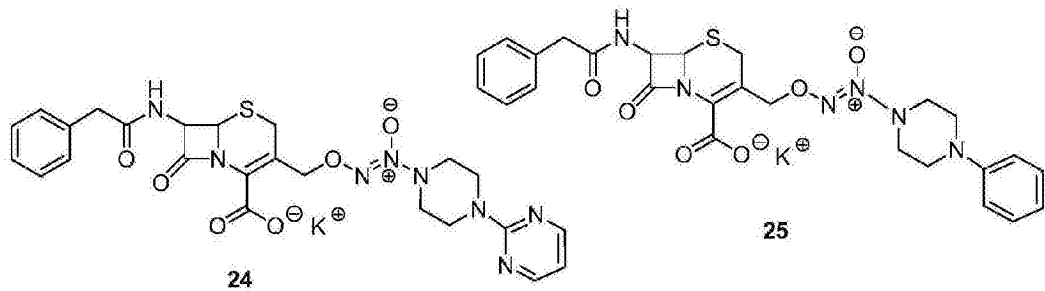
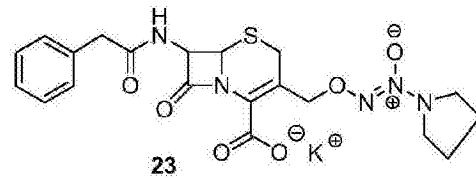
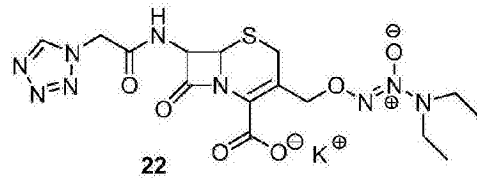
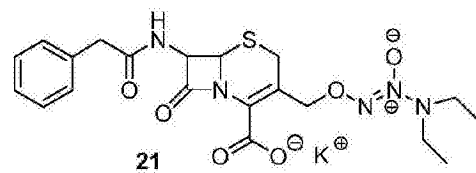
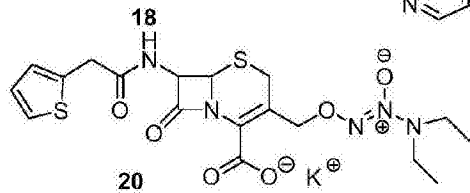
实施例

[0198] 实施例1:化合物的合成

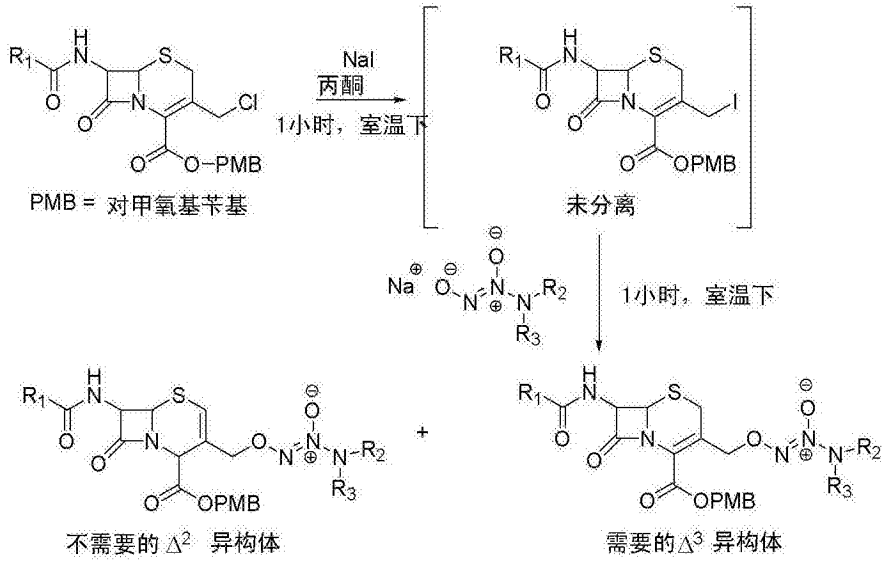
[0199] 合成以下代表性式(I)化合物:



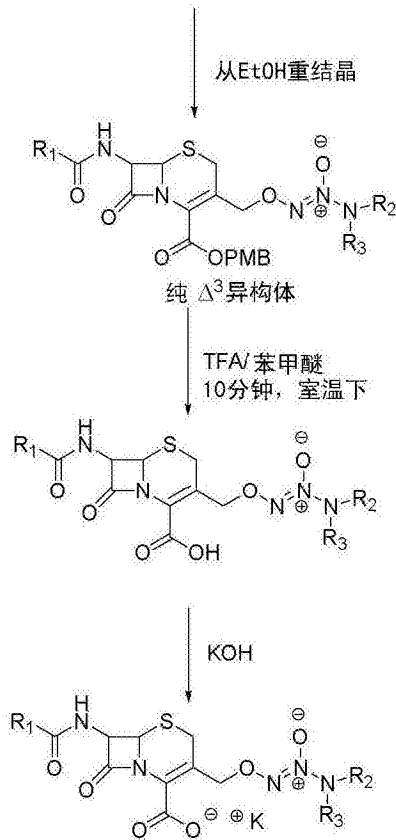
[0200]



[0201] 根据方案4合成化合物：



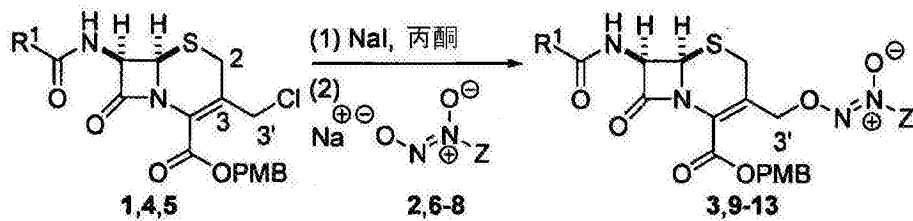
[0202]



[0203] 方案4: 制备代表性式(I)化合物的总体方法。

[0204] 如下图所示, 合成化合物14~25的第一步涉及通过将合适官能化的PMB保护的头孢菌素1,4和5与合适官能化的二醇二氮烯鎓2和6~8反应从而制备头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓3和9~13。

[0205]



	起始材料, R ¹	二氮烯鎇二醇钠 Z	产物	产率% ^a
		2 NEt ₂	3	85
		2 NEt ₂	9	75 ^b
[0206]		2 NEt ₂	10	14 ^c
		6	11	66
		7	12	39
		8	13	80

[0207] ^a纯 Δ 2-异构体的分离产率, ^b Δ 3-异构体通常以约5%的产率分离,

[0208] ^c分离出42%的纯 Δ 3-异构体。

[0209] 用以下方法制备化合物3。

[0210] 在N₂存在下向悬浮于无水丙酮(25mL)的PMB保护的头孢菌素酯1(3.00g, 6.08mmol)中加入碘化钠(0.912g, 6.08mmol), 在黑暗室温下对该混合物搅拌1小时。然后一次性加入(Z)-1-(N,N-二乙基氨基)二氮烯鎇-1-鎇-1,2-二醇钠2(0.944g, 6.08mmol)并且在室温下再对混合物搅拌1.5小时(TLC分析; Pet Spirit:EtOAc 7:3)。减压去除溶剂, 用CH₂Cl₂(75mL)稀释残留物并用10%硫代硫酸钠水溶液(2x 40mL)和水(1x 40mL)洗涤。有机馏分用无水MgSO₄干燥并真空浓缩。粗产物用硅胶柱层析纯化(Pet. spirit:EtOAc, 7:3)并从EtOH或MeOH重结晶得到浅黄色粉末状的3(3.04g, 85%)。¹H NMR(500MHz, CDCl₃): δ 7.32(d, 2H, J=8.5Hz), 7.26(d, 1H, J=5Hz), 7.00-6.96(m, 2H), 6.89(d, 2H, J=8.5Hz), 6.34(d, 1H, J=9Hz), 5.81(dd, 1H, J=10, 4.5Hz), 5.34和4.99(ABq, 2H, J=14.5Hz), 5.18(s, 2H), 4.90(d, 1H, J=5Hz), 3.84(s, 2H), 3.80(s, 3H), 3.52和3.44(ABq, 2H, J=18.5Hz), 3.11(q, 4H, J=7.5Hz), 1.05(t, 6H, J=7.5Hz)。¹³C NMR(500MHz, CDCl₃): δ 169.8, 164.4, 161.2, 159.9, 134.6, 130.6, 127.8, 127.5, 126.6, 126.4, 126.0, 125.4, 113.9, 71.9, 68.1, 59.2, 57.4, 55.2, 48.3, 37.1, 25.9 11.5。FTIR(cm⁻¹, 纯的): 3275, 1754, 1706, 1648, 1517, 1362, 1248, 1177, 1096, 1027, 822。M.P 166°C。[α]_D(c=1.0, CHCl₃) = +39.0。ESI-HRMS(m/z) 对于588.1592计算[M-H]⁻C₂₆H₃₀N₅O₇S₂⁻, 实测值588.1550。

[0211] 通过选择合适官能化PMB保护的头孢菌素和二醇二氮烯鎇用相同方法制备化合物9~13。化合物9~13的谱图数据示于下文。

[0212] 化合物9

[0213] ¹H NMR(500MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.24(m, 7H), 6.88(d, 2H, J=9Hz), 6.08(d, 1H, J=10Hz), 5.81(dd, 1H, J=10, 4.5Hz), 5.33和4.98(ABq, 2H, J=14Hz), 5.17(s, 2H), 4.88(d, 1H, J=5Hz), 3.79(s, 3H), 3.67和3.62(ABq, 2H, J=9Hz), 3.44和3.42(ABq, 2H, J=18Hz),

3.10(q, 4H, J=7Hz), 1.05(m, 6H, J=7Hz). ^{13}C NMR(500MHz, CDCl_3): 171.1, 164.6, 161.2, 159.9, 133.6, 130.7, 129.4, 129.2, 127.8, 126.7, 126.4, 125.5, 114.0, 72.0, 68.1, 59.2, 57.5, 55.2, 48.4, 43.3, 26.0, 11.5. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3284, 1778, 1726, 1660, 1519, 1352, 1228, 1187, 1030, 982, 818, 716, 699, 679. M.P 126–128°C, $[\alpha]_{\text{D}}(c=1.0, \text{CH}_2\text{Cl}_2)=+76.9$, ESI-HRMS(m/z)对于584.2179计算 $[\text{M}+\text{H}]^+\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$, 实测值584.2205.

[0214] 化合物10

[0215] ^1H NMR(500MHz, CD_3OCD_3): δ 8.90(s, 1H), 8.26(d, 1H, J=6Hz), 7.30(d, 2H, J=8.5Hz), 6.86(d, 2H, J=8.5Hz), 5.78(q, 1H, J=5Hz), 5.32和5.27(ABq, 2H, J=16.5Hz), 5.18(s, 2H), 5.17和5.02(ABq, 2H, J=13Hz), 4.95(d, 1H, J=5Hz), 3.78(s, 3H), 3.56和3.51(ABq, 2H, J=19Hz), 3.14(q, 4H, J=7Hz), 1.05(t, 6H, J=7Hz). ^{13}C NMR(125MHz, CD_3OD): δ 166.3, 164.4, 161.5, 160.2, 144.5, 130.0, 126.8, 126.6, 126.3, 114.2, 72.1, 68.5, 59.7, 57.5, 55.5, 50.1, 48.4, 26.5, 11.7. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3290, 3137, 2973, 2902, 1771, 1702, 1662, 1556, 1378, 1233, 1170, 1094, 1049, 801. M.P 171°C, $[\alpha]_{\text{D}}(c=1.0, \text{丙酮})=-51.9$, ESI-HRMS(m/z)对于574.1838计算 $[\text{M}-\text{H}]^-\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_9\text{O}_7\text{S}^-$, 实测值574.1830.

[0216] 化合物11

[0217] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3): δ 7.36(m, 2H), 7.32(d, 2H, J=8.5Hz), 7.26(m, 3H), 6.88(d, 1H, J=8.5Hz), 6.05(d, 1H, J=9Hz), 5.82和5.80(dd, 1H, J=4.5, 5Hz), 5.21–5.15(m, 3H), 4.91(d, 1H, J=4.4Hz), 4.87(d, 1H, J=13.5Hz), 3.80(s, 3H), 3.68和3.62(ABq, 2H, J=16Hz), 3.52和3.43(ABq, 2H, J=18.5Hz), 3.46(t, 4H, J=7Hz), 1.91(t, 4H, J=7Hz). ^{13}C NMR(125MHz, CDCl_3): 171.0, 164.7, 161.3, 159.9, 133.5, 130.6, 129.4, 129.2, 127.8, 126.8, 126.7, 125.3, 114.0, 71.4, 68.0, 59.1, 57.4, 55.2, 50.7, 43.3, 26.1, 22.8. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3265, 2965, 2162, 2030, 1756, 1714, 1652, 1612, 1536, 1486, 1446, 1392, 1266, 1244, 1217, 1180, 1013, 986. M.P 157°C. $[\alpha]_{\text{D}}(c=1.0, \text{MeOH})=+20.6$. ESI-HRMS(m/z)对于580.1871计算 $[\text{M}-\text{H}]^-\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}^-$, 实测值580.1895.

[0218] 化合物12

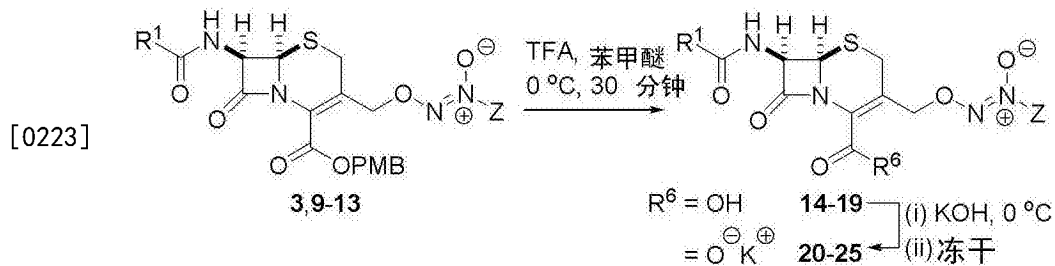
[0219] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3): δ 8.33(d, 2H, J=4.5Hz), 7.39–7.26(m, 5H), 7.32(d, 2H, J=7.5Hz), 6.88(d, 2H, J=7.5Hz), 6.56(t, 1H, J=2Hz), 6.18(d, 1H, J=9Hz), 5.82(q, 1H, J=5Hz), 5.24和4.95(ABq, 2H, J=13.5Hz), 5.18(d, 2H, J=2.5Hz), 4.91(d, 1H, J=4.5Hz), 3.98(t, 4H, J=4.5Hz), 3.78(s, 3H), 3.66和3.61(ABq, 2H, J=16Hz), 3.53和3.40(ABq, 2H, J=18.5Hz), 3.41(t, 4H, J=4.5Hz). ^{13}C NMR(500MHz, CDCl_3): δ 171.0, 164.7, 161.3, 159.9, 157.8, 133.6, 130.7, 129.4, 129.2, 127.7, 126.6, 125.8, 125.7, 113.9, 110.7, 71.8, 68.1, 59.2, 57.4, 55.2, 50.9, 43.3, 42.3, 26.1. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3286, 3137, 2976, 2908, 2904, 1772, 1702, 1662, 1557, 1411, 1377, 1232, 1049. $[\alpha]_{\text{D}}(c=1.0, \text{MeOH})=+39.5$. ESI-HRMS(m/z)对于675.2344计算 $[\text{M}+\text{H}]^+\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}^+$, 实测值675.2373. M.P 136°C.

[0220] 化合物13

[0221] ^1H NMR(500MHz, CDCl_3): δ 7.36–7.24(m, 6H), 6.93–6.91(m, 2H), 6.88(d, 2H, J=9Hz), 6.16(m, 1H), 5.81(q, 1H, J=5Hz), 5.24(d, 1H, J=2.5Hz), 5.21(s, 2H), 5.17和4.96(ABq, 2H, J=12Hz), 4.91(d, 2H, J=2.5Hz), 3.78(s, 3H), 3.67和3.58(ABq, 2H, J=16Hz), 3.53和3.40(ABq, 2H, J=18.5Hz), 3.51(m, 4H), 3.29(m, 4H). ^{13}C NMR(125MHz, CDCl_3): δ

171.3, 164.9, 161.5, 160.2, 150.4, 133.8, 130.9, 129.6, 129.5, 129.4, 127.9, 126.9, 126.0, 121.0, 116.8, 114.2, 72.0, 68.4, 59.4, 57.7, 55.4, 51.1, 48.4, 43.5, 26.1. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3389, 3286, 3197, 3030, 2897, 1756, 1647, 1607, 1546, 1492, 1448, 1384, 1351, 1224, 1004. $[\alpha]_D^{25}$ ($c=1.0$, MeOH) = +54.3, ESI-HRMS(m/z) 对于 673.2439 计算 $[M+H]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}^+$, 实测值 673.2409. M.P 106°C .

[0222] 然后用纯三氟乙酸对PMB保护的头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓(3和9~13)去保护以得到游离羧酸。



酯	R ¹	Z	R ⁶ = OH 产率 %	R ⁶ = O ⁻ K ⁺ 产率 %
3		NEt ₂	14, 36	20, 99
9		NEt ₂	15, 80	21, 99
[0224] 10		NEt ₂	16, 81	22
11			17, 83	23, 98
12			18, 93	24, 94
13			19, 67	25

[0225] 用以下方法制备化合物14。

[0226] 将PMB保护的头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓3(1.00g, 1.69mmol)和无水苯甲醚(0.55g, 5.09mmol)与三氟乙酸(4.0mL)在0°C下搅拌30分钟,然后将混合物缓慢倒在碎冰(约100g)上。一旦熔化,该水性混合物用CH₂Cl₂(3x 70mL)萃取,并用无水MgSO₄干燥混合的有机萃取物,并减压浓缩。残留物用硅胶柱层析纯化(EtOAc:MeOH:H₂O, 85:15:0.5)从而提供浅黄色粉末状的头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓游离酸14(0.285g, 36%)。¹H NMR(500MHz, CD₃OD): δ 7.26(s, 1H, J=1Hz), 6.96-6.92(m, 2H), 5.73(d, 1H, J=5, Hz), 5.29和5.07(ABq, 2H, J=12.9Hz), 5.05(d, 1H, J=4.8Hz), 3.83和3.79(ABq, 2H, J=15Hz), 3.62和3.53(ABq, 2H, J=18Hz), 3.16(q, 4H, J=7.0Hz), 1.04(t, 6H, J=7.0Hz)。¹³C NMR(500MHz, CD₃OD): δ 173.3, 166.1, 164.5, 137.4, 130.2, 128.4, 127.7, 126.9, 125.8, 73.0, 60.8, 59.0, 49.0, 37.1, 27.1, 11.7. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3275, 2156, 1754, 1661, 1656, 1522, 1320, 1235, 1065,

995.M.P 87°C, $[\alpha]_D(c=1.0, \text{MeOH}) = +84.4$, ESI-HRMS(m/z) 对于 468.1017 计算 $[\text{M-H}]^-$ $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2^-$, 实测值 468.0996.

[0227] 用相同方法制备化合物 15~19。化合物 15~19 的谱图数据示于下文。

[0228] 化合物 15

[0229] ^1H NMR(500MHz, CD_3OD): δ 7.35-7.26(m, 5H), 5.75(d, 1H, $J=4.8$, Hz), 5.36 和 5.07 (ABq, 2H, $J=12.9$ Hz), 5.05(d, 1H, $J=4.8$ Hz), 5.03(m, 1H), 3.68-3.45(m, 4H), 3.19(q, 4H, $J=7.0$ Hz), 1.07(t, 6H, $J=7.0$ Hz). ^{13}C NMR(500MHz, CD_3OD): δ 175.4, 167.3, 166.6, 137.2, 132.1, 131.0, 130.4, 128.8, 123.0, 74.6, 61.5, 59.8, 50.1, 44.0, 27.7, 12.6. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3287, 1780, 1663, 1505, 1337, 1223, 998, 618.M.P 84-86°C, $[\alpha]_D(c=1.0, \text{CH}_2\text{Cl}_2) = +19.4$, ESI-HRMS(m/z) 对于 462.1453 计算 ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$) $[\text{M-H}]^-$, 实测值 462.1465.

[0230] 化合物 16

[0231] ^1H NMR(300MHz, CD_3OCD_3): δ 9.40(d, 1H, $J=6$ Hz), 9.11(s, 1H), 5.72(d, 2H, $J=8$ Hz), 5.29(s, 2H), 5.22 和 4.99(ABq, 2H, $J=22$ Hz), 5.01(s, 1H), 3.52 和 3.49(ABq, 2H, $J=19$ Hz), 3.10(q, 4H, $J=7$ Hz), 0.95(t, 6H, $J=7$ Hz). ^{13}C NMR(125MHz, CD_3OD): δ 167.4, 165.8, 164.4, 146.0, 128.1, 127.5, 72.9, 60.6, 58.7, 50.3, 49.3, 27.1, 11.7. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3282, 3136, 2975, 2875, 1773, 1703, 1662, 1559, 1414, 1227, 1170, 1026, 800.M.P 156°C. $[\alpha]_D(c=1.0, \text{MeOH}) = +117.3$, ESI-HRMS(m/z) 对于 454.1263 计算 $[\text{M-H}]^- \text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_9\text{O}_6\text{S}^-$, 实测值 454.1266.

[0232] 化合物 17

[0233] ^1H NMR(500MHz, CD_3OD): δ 7.30-7.22(m, 5H), 5.72(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 5.23 和 4.97 (ABq, 2H, $J=22.5$ Hz), 5.07(d, 1H, $J=8$ Hz), 3.64-3.50(m, 4H), 3.50(t, 4H, $J=7$ Hz), 1.93(t, 4H, $J=7$ Hz). ^{13}C NMR(125MHz, CDCl_3): 174.5, 166.2, 164.5, 136.4, 130.4, 129.5, 127.9, 127.6, 72.5, 60.7, 59.1, 51.5, 43.1, 27.2, 23.7. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3296, 1756, 1729, 1642, 1530, 1469, 1429, 1388, 1318, 1141, 1028, 944. $[\alpha]_D(c=1.0, \text{MeOH}) = 122.8$, ESI-HRMS(m/z) 对于 484.1261 计算 $[\text{M}+\text{Na}]^+ \text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{NaO}_6\text{S}^+$, 实测值 484.1281.M.P 146°C.

[0234] 化合物 18

[0235] ^1H NMR(300MHz, CD_3OCD_3): δ 8.37(s, 2H), 7.34-7.23(m, 5H), 6.65(s, 1H), 5.84(s, 1H), 5.24 和 4.97(ABq, 2H, $J=7.8$ Hz), 5.14(s, 1H), 3.97(s, 4H), 3.69-3.41(m, 4H), 3.46(s, 4H). ^{13}C NMR(75MHz, CDCl_3): 172.1, 166.4, 164.0, 163.0, 159.5, 137.5, 130.9, 129.9, 128.0, 126.7, 111.9, 72.8, 61.5, 58.2, 52.0, 43.3, 42.3, 26.1. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3286, 3137, 2976, 2908, 2904, 1772, 1702, 1662, 1557, 1411, 1232, 1049. $[\alpha]_D(c=1.0, \text{MeOH}) = +36.6$, ESI-HRMS(m/z) 对于 555.1769 计算 $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}^+$, 实测值 555.1799.M.P 116°C.

[0236] 化合物 19

[0237] ^1H NMR(500MHz, CD_3COCD_3): δ 8.05(d, 1H, $J=8.5$ Hz), 7.36-7.23(m, 8H), 7.02(d, 2H, $J=7.5$ Hz), 6.84(t, 1H, $J=7.5$), 5.85(q, 1H, $J=5$ Hz), 5.25 和 5.01(ABq, 2H, $J=13.5$ Hz), 5.14(d, 1H, $J=4.5$ Hz), 3.70 和 3.58(m, 4H), 3.55(m, 4H), 3.35(m, 4H). ^{13}C NMR(500MHz, CD_3COCD_3): 171.6, 165.8, 163.1, 151.5, 136.5, 130.0, 129.8, 129.1, 127.4, 125.9, 120.7, 117.2, 72.2, 60.3, 58.5, 51.6, 48.7, 42.9, 26.7. FTIR(cm^{-1} , 纯的): 3397, 3286, 3197, 3028, 2897, 1755, 1647, 1607, 1548, 1492, 1448, 1383, 1351, 1225, 1004, 985. $[\alpha]_D(c=1.0,$

MeOH) = +57.7. ESI-HRMS(m/z) 对于 553.1864 计算 $[M+H]^+C_{26}H_{29}N_6O_6S^+$, 实测值 553.1847. M.P 96°C.

[0238] 然后将化合物 14、15、17 和 18 转化为其钾盐。用以下方法制备化合物 20。

[0239] 在 0°C 下将头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓游离酸 14 (0.20g, 0.42mmol) 悬浮于 H₂O (1.0ml), 然后向其中加入用冰冷却的 KOH 水溶液 (100μL H₂O 中含 0.023g, 0.42mmol)。快速形成浅黄色溶液并在 0°C 下再继续搅拌 20 分钟。水溶液用 CH₂Cl₂ (2x 2mL) 清洗然后冷冻和冻干, 从而提供浅黄色粉末状的头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓羧酸钾盐 20 (0.21g, 99%)。¹H NMR (300MHz, D₂O): δ 7.21 (d, 1H, J = 10Hz), 6.89-6.88 (s, 2H), 5.49 (d, 1H, J = 4.5, Hz), 5.08 和 4.85 (ABq, 2H, J = 12.6Hz), 4.96 (d, 1H, J = 4.8Hz), 3.81 和 3.74 (ABq, 2H, J = 15Hz), 3.46 和 3.25 (ABq, 2H, J = 18Hz), 2.96 (q, 4H, J = 7.0Hz), 0.85 (t, 6H, J = 7.0Hz)。¹³C NMR (125MHz, D₂O): δ 174.4, 168.3, 164.7, 135.8, 132.9, 127.6, 127.5, 125.9, 115.4, 73.9, 59.4, 57.7, 49.0, 36.2, 25.5, 10.7. FTIR (cm⁻¹, 纯的): 3395, 3326, 3210, 2883, 2816, 1600, 1369, 1233, 1034. $[\alpha]_D(c=1.0, MeOH) = +90.9$, ESI-HRMS(m/z) 对于 508.0721 计算 $[M+H]^+C_{18}H_{23}N_5O_6S_2K^+$, 实测值 508.0742.

[0240] 用相同方法制备化合物 21、23 和 24。化合物 21、23 和 24 的谱图数据示于下文。

[0241] 化合物 21

[0242] ¹H NMR (500MHz, CD₃OD): δ 7.30-7.20 (m, 5H), 5.65 (d, 1H, J = 4.8, Hz), 5.35 和 4.85 (ABq, 2H, J = 12.0Hz), 4.98 (d, 1H, J = 4.8, Hz), 3.60 和 3.55 (ABq, 2H, J = 14Hz), 3.57 和 3.37 (ABq, 2H, J = 18Hz), 3.15 (q, 4H, J = 7.0Hz), 1.04 (t, 6H, J = 7.0Hz)。¹³C NMR (500MHz, CD₃OD): δ 174.6, 168.7, 165.3, 136.5, 134.5, 130.2, 129.6, 128.0, 116.9, 74.7, 60.4, 58.9, 49.4, 43.1, 26.8, 11.8. IR (cm⁻¹, 纯的): 3395, 1765, 1609, 1495, 1345, 1248, 997, 679. M.P 35-37°C. $[\alpha]_D(c=1.0, CH_2Cl_2) = +19.0$, ESI-HRMS(m/z) 对于 502.1157 计算 C₂₀H₂₅KN₅O₆S [M+H]⁺, 实测值 502.1163.

[0243] 化合物 23

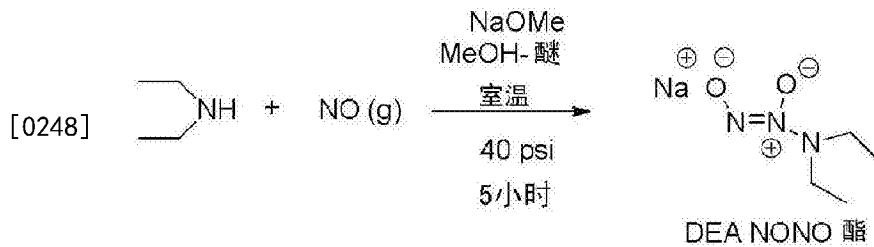
[0244] ¹H NMR (500MHz, D₂O): δ 7.35-7.2 (m, 5H), 5.53 (d, 1H, J = 4Hz), 5.05 和 4.72 (ABq, 2H, J = 12Hz), 4.99 (d, 1H, J = 4Hz), 3.62-3.58 (m, 2H), 3.50 和 3.30 (ABq, 2H, J = 13Hz), 3.4 (m, 4H), 1.82 (m, 4H)。¹³C NMR (125MHz, D₂O): δ 175.5, 168.4, 164.9, 135.0, 132.3, 129.3, 129.1, 127.9, 116.5, 72.9, 59.2, 58.0, 51.6, 42.3, 25.8, 22.5. FTIR (cm⁻¹, 纯的): 3399, 3283, 3194, 2976, 2980, 2897, 1758, 1648, 1609, 1542, 1492, 1451, 1386, 1351, 1224, 1001. $[\alpha]_D(c=1.0, MeOH) = -390.3$. ESI-HRMS(m/z) 对于 500.1001 计算 $[M+H]^+C_{20}H_{23}KN_5O_6S^+$, 实测值 500.1015.

[0245] 化合物 24

[0246] ¹H NMR (300MHz, CD₃OD): δ 8.33 (s, 2H), 7.39-7.26 (m, 5H), 7.32 (d, 1H, J = 7.5Hz), 6.56 (t, 1H, J = 2Hz), 5.63 (d, 1H, J = 5Hz), 5.24 和 4.95 (ABq, 2H, J = 13.5Hz), 5.18 (d, 2H, J = 2.5Hz), 4.91 (d, 1H, J = 4.5Hz), 3.98 (m, 4H, J = 4.5Hz), 3.66 和 3.61 (ABq, 2H, J = 16Hz), 3.53 和 3.40 (ABq, 2H, J = 18.5Hz), 3.41 (t, 4H, J = 4.5Hz)。¹³C NMR (125MHz, CD₃OD): 171.0, 164.7, 161.3, 159.9, 157.8, 133.6, 130.7, 129.4, 129.2, 127.7, 126.6, 125.8, 125.7, 113.9, 110.7, 71.8, 68.1, 59.2, 57.4, 55.2, 50.9, 43.3, 42.3, 26.1. FTIR (cm⁻¹, 纯的): 3394, 3282, 3190, 3034, 2980, 2894, 1756, 1645, 1609, 1543, 1492, 1448, 1352, 1224, 994. $[\alpha]_D(c=$

1.0, MeOH) = -190.6, ESI-HRMS(m/z) 对于 593.1328 计算 $[M+H]^+C_{24}H_{26}KN_8O_6S^+$, 实测值 593.1366.

[0247] 可根据文献中的方法制备二醇二氮烯鎓2和6~8。例如,如下文制备化合物2。



[0249] (参考文献:K.R.A.Abdellatif等/Bioorg.Med.Chem.15(2007)6796-6801).

[0250] 在25 °C下向NaOMe(0.1mol, 24mL溶于MeOH的25%w/v溶液)和二乙醚(300mL)溶液中搅拌加入二乙胺(7.3g, 0.1mol)。用干燥氩气对该混合物吹扫5分钟,然后在一氧化氮气氛下,在25°C和搅拌条件下对该反应加压(40psi内压)5小时。过滤分离析出的白色细粉状产物,将其悬浮于二乙醚(100mL)并搅拌15分钟。过滤悬浮液,在25°C、减压下干燥收集的固体直至达到恒重。生成白色细粉状 O^2- -钠1-(N,N-二乙基氨基)二氮烯-1-鎓-1,2-二醇盐(DEA NONO酯)(4.0g, 26%)。将产物储存于棕色瓶中,保持-20°C、氩气气氛下,使用时不需要进一步纯化。¹H NMR(D₂O) δ1.12(t, J=7.3Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂), 2.93[q, J=7.3Hz, 4H, N(CH₂CH₃)₂]. m.p. 200-202°C.

[0251] 实施例2:体外和通过铜绿假单胞菌提取物从化合物14~19中释放一氧化氮

[0252] 通过Apollo 4000分析仪(世界精密仪器公司(World Precision Instrument))用一氧化氮特异性探针ISO-NOP检测从化合物14~19中释放的一氧化氮。根据生产商说明书将用SNAP溶液新鲜校准过的一氧化氮探针浸在含pH 7.0的Tris缓冲液的小瓶中,并在室温下连续搅拌。在监控一氧化氮水平同时相继加入各种试剂。

[0253] 图1显示,在水性缓冲液(pH 7)中接触市售β-内酰胺酶(青霉素酶,西格马奥德里奇公司(Sigma Aldrich))时,所有头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓游离酸14~19都释放出低μM浓度的一氧化氮。当加入酶但不存在头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓时没有检测到一氧化氮释放(数据未显示)。相似地,用单一头孢菌素(与头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓的β-内酰胺抗生素骨架紧密相关)替代头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓时,在青霉素酶存在和不存在的情况下都没有观察到一氧化氮释放(数据未显示)。

[0254] 用产生β-内酰胺酶的铜绿假单胞菌提取物进一步研究通过切割化合物15释放一氧化氮。在亚抑制浓度的氨苄青霉素(50μg/ml)的存在下培养铜绿假单胞菌细胞从而诱导β-内酰胺酶活性。然后用CellLytic试剂(西格马公司)裂解产生β-内酰胺酶的铜绿假单胞菌细胞,将细胞提取物加入10ml化合物15溶液中,同时用一氧化氮电极监控一氧化氮的产生。图2a显示,化合物15经青霉素酶引发所释放的一氧化氮在pH 5和7时略有变化,而在pH 9时,一氧化氮释放显著降低。图2b显示,化合物15在用表达β-内酰胺酶的铜绿假单胞菌细胞提取物处理后释放一氧化氮,在用不表达β-内酰胺酶的大肠杆菌细胞处理后化合物15释放更少但仍可检测的一氧化氮。这说明,也可诱导不表达β-内酰胺酶的生物膜形成微生物通过引发头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎓来分散从而释放一氧化氮,可能通过与转肽酶(杀菌头孢菌素抗生素的首要靶标)反应来进行。

[0255] 若将生物膜细菌靶定隐藏的胞外β-内酰胺酶,则可预计头孢菌素-3'-二醇二氮烯

鎊能更好地释放一氧化氮,但与此相反的是,对 β -内酰胺酶的表达更通常位于细胞周围的空间,在生物膜中会使酶不能接近化合物。图2c显示,可用 β -内酰胺抗生素亚胺培南进行预处理从而诱导铜绿假单胞菌表达引发化合物15释放一氧化氮的胞外 β -内酰胺酶。在所有 β -内酰胺抗生素中胞外 β -内酰胺酶的诱导明显不同,如图2c所证明,氨苄青霉素没有诱导表达。因此,亚胺培南预处理产生胞外 β -内酰胺酶表达,随后引起头孢菌素-3'-二醇二氮烯鎊释放更多的一氧化氮。

[0256] 实施例3:在铜绿假单胞菌细胞中诱导化合物21释放一氧化氮

[0257] 要在完整的铜绿假单胞菌细胞中研究一氧化氮释放,使用铜绿假单胞菌NSGFP报告株(Barraud等,2009)。该菌株含有基因报告构建体,该构建体在表达可诱导一氧化氮的nirS基因时表达绿色荧光蛋白(GFP)。铜绿假单胞菌NSGFP细胞在存在或不存在亚抑制浓度(50 μ g/ml)的氨苄青霉素的情况下生长从而诱导 β -内酰胺酶活性。在测定NSGFP细胞的GFP荧光前,用化合物21、已知一氧化氮供体硝普钠(SNP)、头孢噻吩(西格玛公司目录号#C4520)或青霉素酶孵育3ml细菌培养物的等分样2小时。

[0258] 如图3所示,经过或未经 β -内酰胺酶活性预活化的铜绿假单胞菌中,单一的化合物21(150 μ M)诱导的GFP应答大于SNP引发的应答。另外,当通过亚抑制浓度氨苄青霉素处理诱导了铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶活性时,化合物21切割和细菌的一氧化氮可利用度得到提高。所提高的应答相当于将化合物21与青霉素酶共同给予在不存在氨苄青霉素的情况下生长的细胞时所观察到的情况。NSGFP报告实验中,由单一的青霉素酶或头孢噻吩组成的对照处理没有影响GFP荧光。

[0259] 实施例4:化合物21中的一氧化氮释放诱导生物膜分散

[0260] 生物膜分散实验中使用铜绿假单胞菌PAO1野生型ATCC和MA67株、铜绿假单胞菌FRD1(一种类粘蛋白、囊性纤维化(CF)分离物(Ohman和Chakrabarty,1981))、临床株铜绿假单胞菌18A(其从塔斯马尼亚的慢性感染个体的CF唾液样品中分离(Kirov等,2007))。生物膜在M9极限培养基(含48mM Na₂HPO₄、22mM KH₂PO₄、9mM NaCl、19mM NH₄Cl、pH 7.2、2mM MgSO₄、20mM葡萄糖和100 μ M CaCl₂),24孔板批次培养物中在37 $^{\circ}$ C、200rpm震荡下生长。在对PAO1野生型生物膜孵育6小时后或对FRD1和18A生物膜孵育24小时后,向每平板每孔中加以低于1分钟的处理,在37 $^{\circ}$ C、200rpm震荡下对平板再孵育10分钟。通过直接测定上清液OD_{600nm}定量分析浮游生物量,余下的生物膜生物量通过结晶紫染色法定量分析(O'Toole和Kolter,1998)。

[0261] 如图4所示,化合物21(称为“DEA-CP”)可强效诱导预建立的铜绿假单胞菌生物膜分散。接触10分钟后,通过CV染色所测定的生物膜生物量降低55%,而通过测定上清液OD_{600nm}所测得的浮游生物量相对于未经处理的对照同时上升了20%(P<0.01,单向ANOVA和徒吉(Tukey)多重比较测试)。相反,单一的头孢噻吩不诱导显著的分散事件。

[0262] 然后用一定范围浓度的化合物21测试对铜绿假单胞菌PAO1野生型生物膜的作用。如图5所示,化合物21(称为“DEA-CP”)以剂量依赖性方式在10-100 μ M的范围内诱导分散(图5A)。还测试化合物21对生长24小时的铜绿假单胞菌CF分离株FRD1和18A生物膜的作用。与100 μ M化合物21接触10分钟后,分别诱导30%和35%的FRD1和18A生物膜分散,其通过CV染色测定(图5B)。

[0263] 进一步评价化合物21及其类似物(化合物23)对预建立的铜绿假单胞菌生物膜的

分散(使用菌株MA67,该菌株相比用于上述实验的菌株形成更好的生物膜),其显示为剂量依赖性(参见图6)。

[0264] 化合物21的其它实验证实,通过用亚胺培南预处理生物膜诱导胞外 β -内酰胺酶表达后,提高了铜绿假单胞菌中的生物膜分散作用。在这些实验中,预建立的铜绿假单胞菌生物膜在37°C、震荡下在微孔板中生长,并用10 μ M和100 μ M的化合物21在存在和不存在青霉素酶(0.1U/mL)的情况下处理15分钟或不处理。用0.5 μ g/mL亚胺培南预处理预建立的铜绿假单胞菌1小时从而诱导胞外 β -内酰胺酶释放,然后与10 μ M和100 μ M的化合物21接触15分钟。

[0265] 随后发明人研究了化合物21对其它革兰氏阴性细菌种类(大肠杆菌、霍乱弧菌和粘质沙雷氏菌)和革兰氏阳性种类金黄色葡萄球菌的生物膜的诱导分散能力。如图8所示,化合物21诱导这些种类生物膜快速分散(处理后10分钟)。

[0266] 进一步用连续流生物膜培养物实验研究化合物21的生物膜分散特性。将铜绿假单胞菌PA01生物膜建立在玻璃微发酵罐中,该微发酵罐中含有新鲜M9极限培养基连续流。在含有新鲜培养基的容器上安装进口,含有或不含化合物21(100 μ M),并测定所摄取的流出液的OD₆₀₀。添加化合物21后观察到所释放的细胞快速并显著增加,而从未经处理的生物膜所释放的细胞量保持不变(图9)。

[0267] 实施例5:化合物21的最小抑制浓度

[0268] 使铜绿假单胞菌PA01野生型细胞在96孔板中在M9极限培养基中在37°C、静态条件下、存在一定范围浓度的化合物21二乙胺二醇二氮烯鎓(DEA;用于合成化合物21的一氧化氮供体)和/或抗生素头孢噻吩、头孢他啶和四环素的条件下生长。通过在不同时间点直接测定上清液OD₆₀₀来定量分析浮游生物生长。抗生素处理的最小抑制浓度(MIC)根据生长20小时后产生35%或更低OD_{600nm}的抗生素浓度来限定。对于生物膜存活率实验,如上文所述(参见实施例4),使铜绿假单胞菌生物膜在24孔微孔板中生长7小时,之后以所示最终浓度加以化合物21和抗生素处理并在正常培养条件下再培养1或2小时。在每个时间点采集浮游生物细菌,在无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)中连续稀释并铺展在LB琼脂平板上。用PBS对生物膜温和冲洗1次,用无菌棉拭子从壁上和底部孔表面(总表面积=4.4cm²)重悬。再将细菌聚集物在浴槽式声波处理器中破坏10分钟。然后连续稀释生物膜细菌并铺展在LB琼脂平板上。在37°C下孵育1天后测定菌落形成单位(CFU)。

[0269] 发现MIC为4mM的单一化合物21相对于头孢噻吩或DEA能更有效地抑制铜绿假单胞菌浮游生物生长,发现头孢噻吩和DEA的MIC为16mM(图10—将化合物21称为“DEA-CP”)。化合物21的生长抑制作用好像是由于一氧化氮的毒性水平,并且表明其相比DEA增加的毒性是一氧化氮在细菌中靶向释放的结果。

[0270] 实施例6:涉及化合物21和抗生素的组合处理

[0271] 为评价化合物21和抗生素对生物膜存活率和分散细胞的影响,用化合物21和头孢他啶对生长在微孔板上的生物膜进行组合处理(如上述实施例5所示),测定生物膜CFU和浮游生物CFU。结果证实,用100 μ M单一化合物21处理1小时后,随着生物膜CFU从1.9 \times 10⁸CFU/孔降低至1.3 \times 10⁸CFU/孔,浮游生物CFU从4.8 \times 10⁸CFU/孔上升至11 \times 10⁸CFU/孔(参见图11A和11B),这与上文所得到的OD和CV测量一致(参见实施例4;图4)。另外,相比用单一头孢他啶处理的生物膜和浮游生物细菌,10 μ M头孢他啶在化合物21存在条件下孵育1小时时对生物膜和浮游生物细菌的效用得到提高(参见图8A和8B)。相对于在不存在化合物21的条件

下处理的生物膜,在化合物21存在条件下处理2小时后,头孢他啶对生物膜细菌的效用提高了2.3倍(图11C)。

[0272] 发明人还发现化合物21增强了临床上使用的抗生素妥布霉素和环丙沙星的抗生物膜功效(表1)。在震荡、37°C条件下在微孔板中生长的预建立的铜绿假单胞菌生物膜经亚抑制亚胺培南(10 μ g/mL)预处理1小时从而诱导胞外 β -内酰胺酶的释放。然后在存在或不存在化合物21的条件下加入妥布霉素或环丙沙星,或者不处理生物膜(对照)。在重悬前再对生物膜细菌孵育1小时,并计数cfu。数值代表cfu相比对照生物膜以对数倍数减少并且是两个独立实验的平均值(\pm SEM)。仅用抗生素处理或用抗生素和化合物21联合处理后,上清液中的细菌被完全根除(低于检测极限;10cfu/mL)。

[0273] 表1

抗生素	化合物 21 (μ M)	生物膜 cfu 的对数减少量
妥布霉素	0	2.15 \pm 0.16
80 μ g/mL/170 μ M	10	3.92 \pm 0.06
	100	3.58 \pm 0.15
环丙沙星	0	3.54 \pm 0.09
5 μ g/mL/15 μ M	10	5.06 \pm 0.02
	100	4.90 \pm 0.13

[0275] 用化合物21与四环素组合处理浮游生物铜绿假单胞菌时,6 μ M四环素的抑制效果提高45%,25 μ M四环素的抑制效果提高60%(数据未显示)。

[0276] 参考文献

[0277] Barraud N等,(2009)Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity,decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal(《一氧化氮在铜绿假单胞菌生物膜中的信号转导介导磷酸二酯酶活性、降低环二鸟苷酸水平并增强分散》).*J.Bacteriol.*191(23):7333-7342.

[0278] Hope等,2002,Determining the spatial distribution of viable and non viable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling (《通过存活率曲线测定可存活和不可存活细菌在水合微生态牙斑菌中的空间分布》),*J.Appl.Microbiol.*,1993:448-455.

[0279] Kirov SM等,(2007)Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis(《从囊性纤维化患者中分离的类粘蛋白铜绿假单胞菌中的生物膜分化和分散》).*Microbiology* 153 (Pt10):3264-3274.

[0280] Ohman DE&Chakrabarty AM(1981)Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a

Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolate(《用于在铜绿假单胞菌囊肿性纤维化分离物中产生金黄色葡萄球菌藻酸盐的染色体决定子遗传图谱》).*Infect.Immun.*33(1):142-148.

[0281] O'Toole GA&Kolter R(1998)Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365proceeds via multiple,convergent signalling pathways:a genetic analysis(《荧光假单胞菌WCS365通过多重会聚信号转导通路开始形成生物膜:遗传分析》).*Mol.Microbiol.*28(3):449-461.

[0282] Webb等,2003,Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development(《铜绿假单胞菌生物膜发展中的细胞死亡》),*J.Bact.*,185:4585-4592.

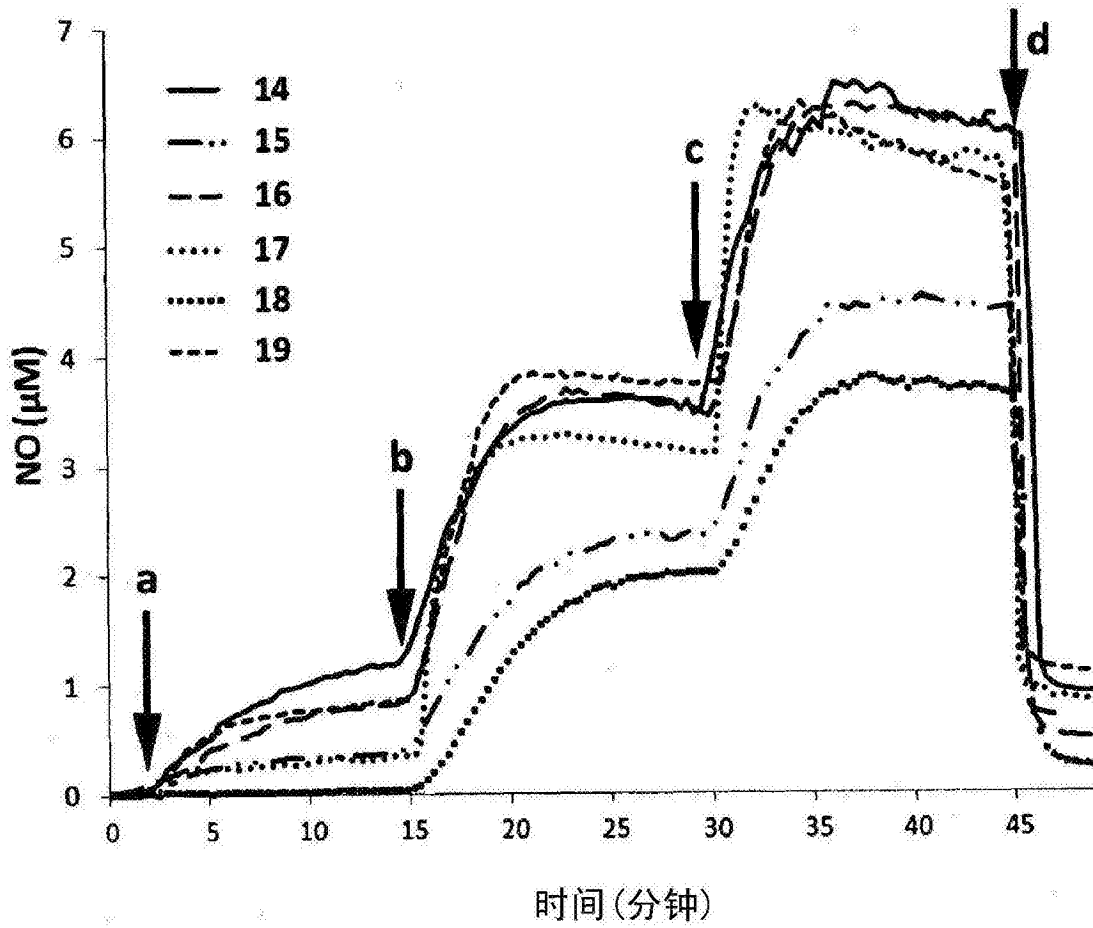


图1

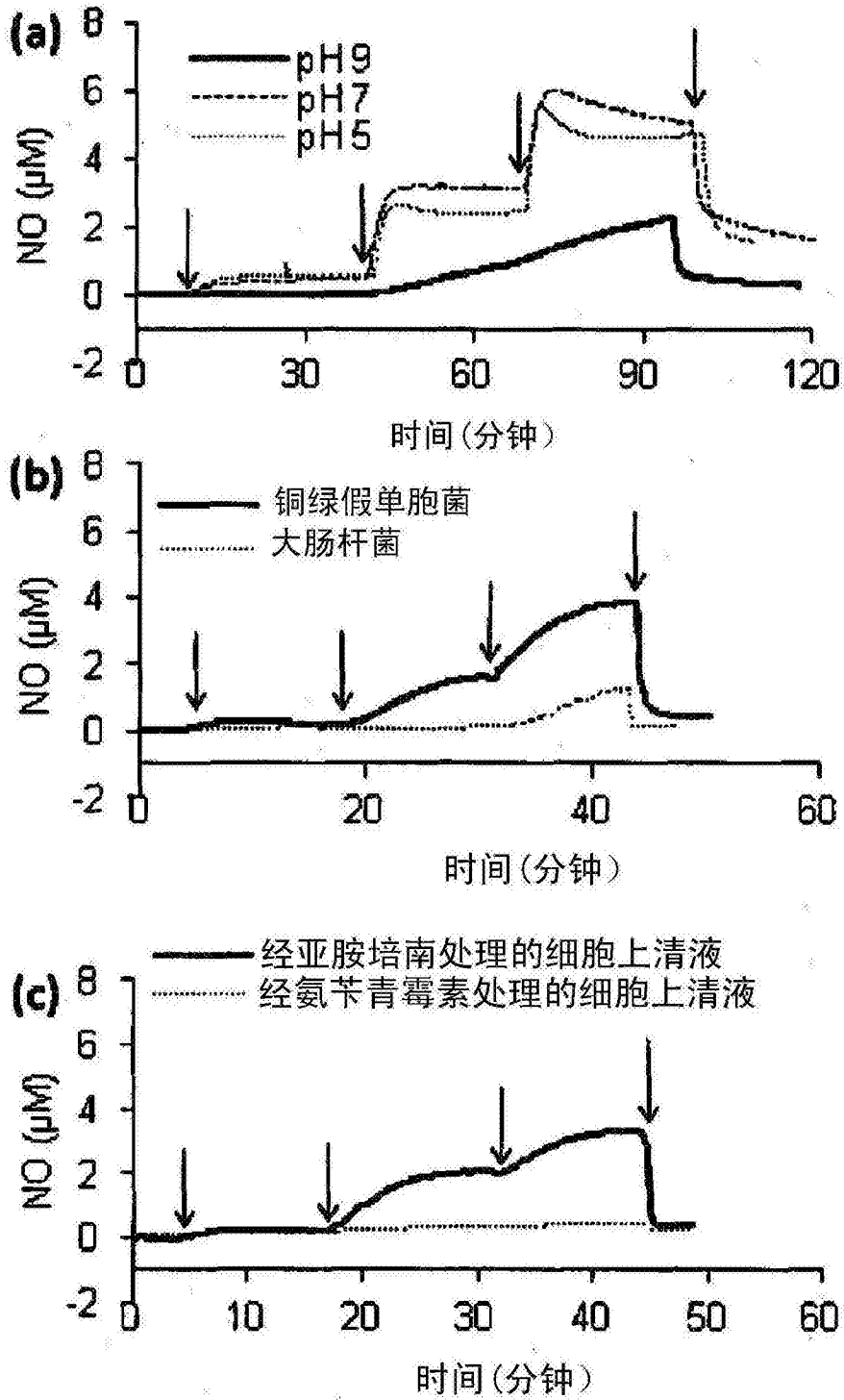


图2

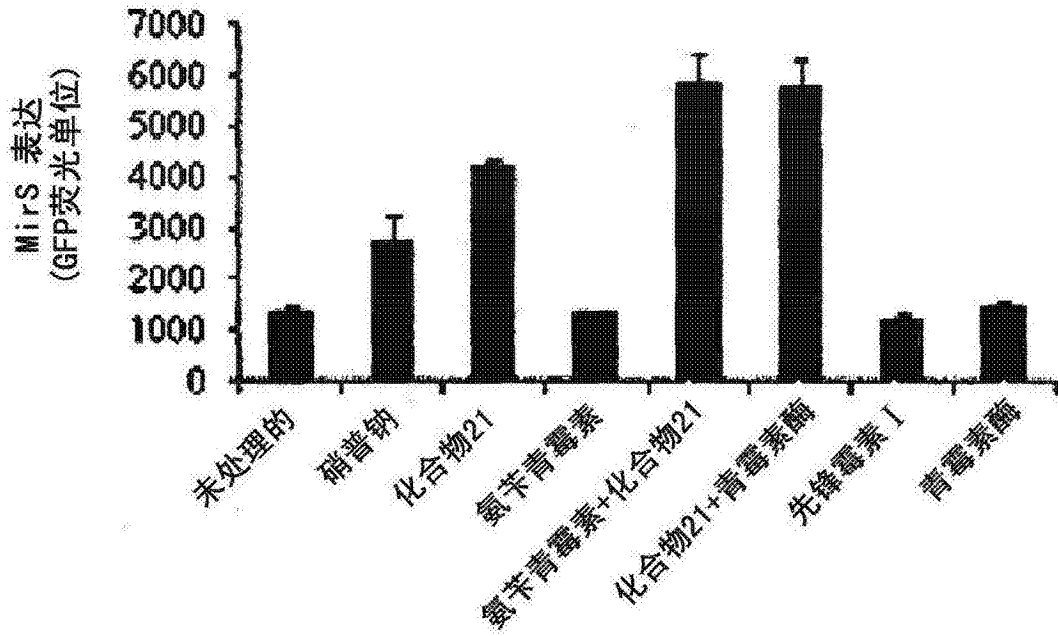


图3

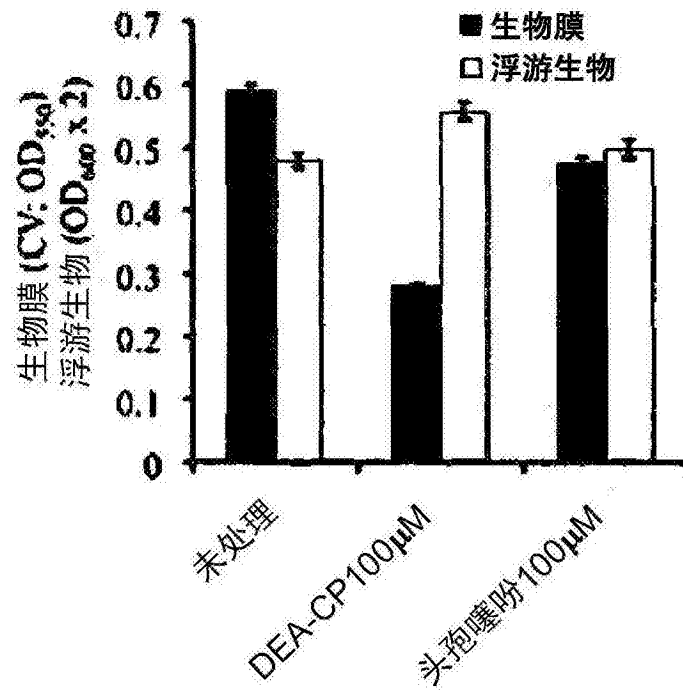


图4

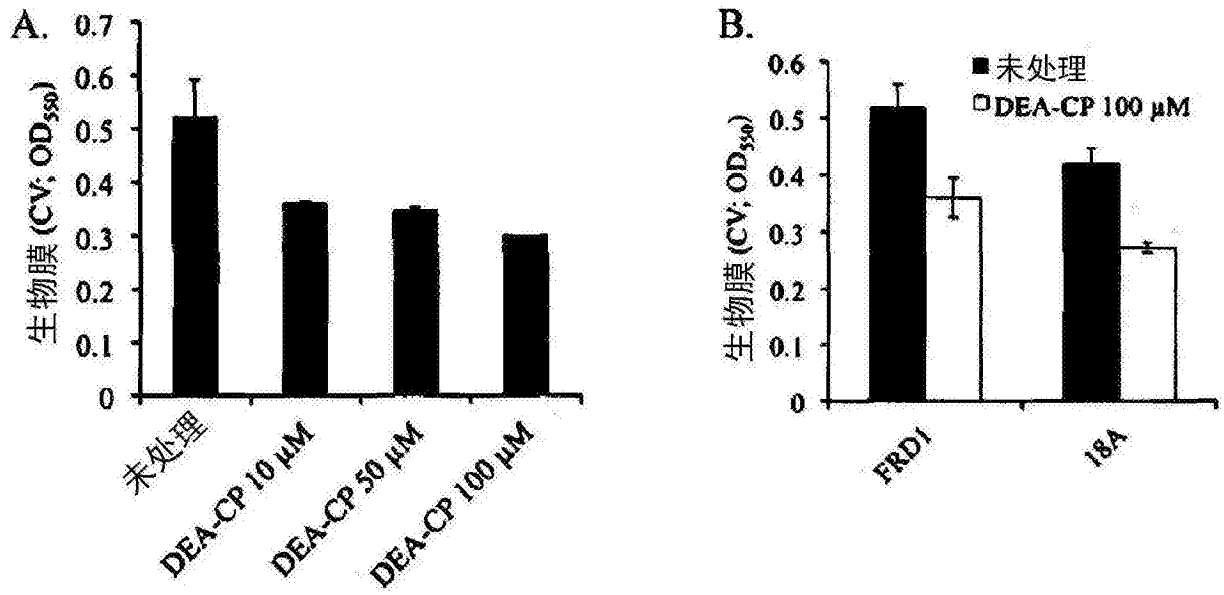


图5

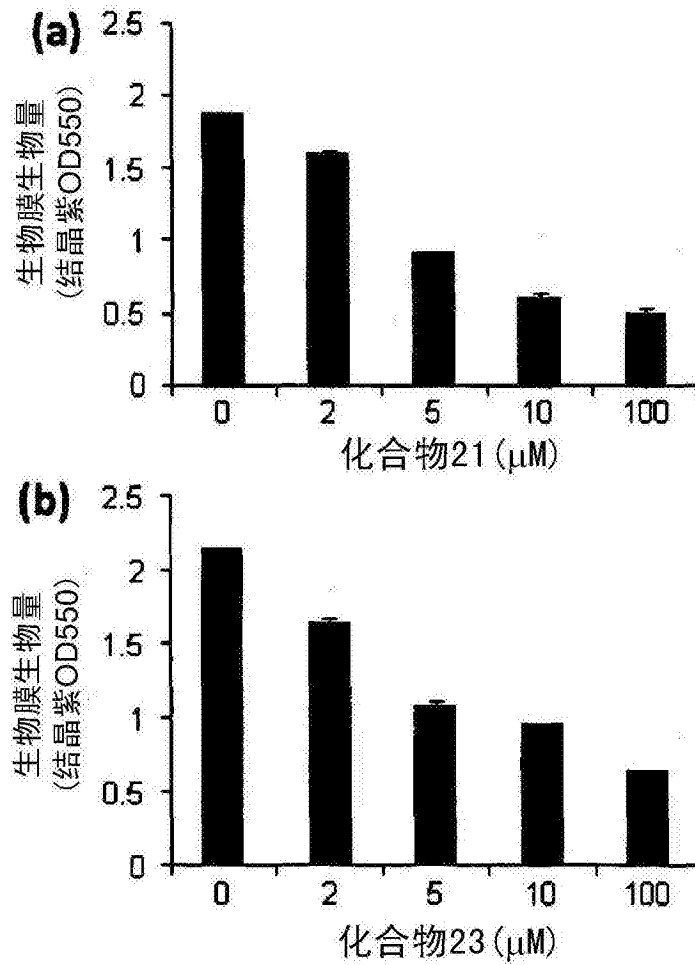


图6

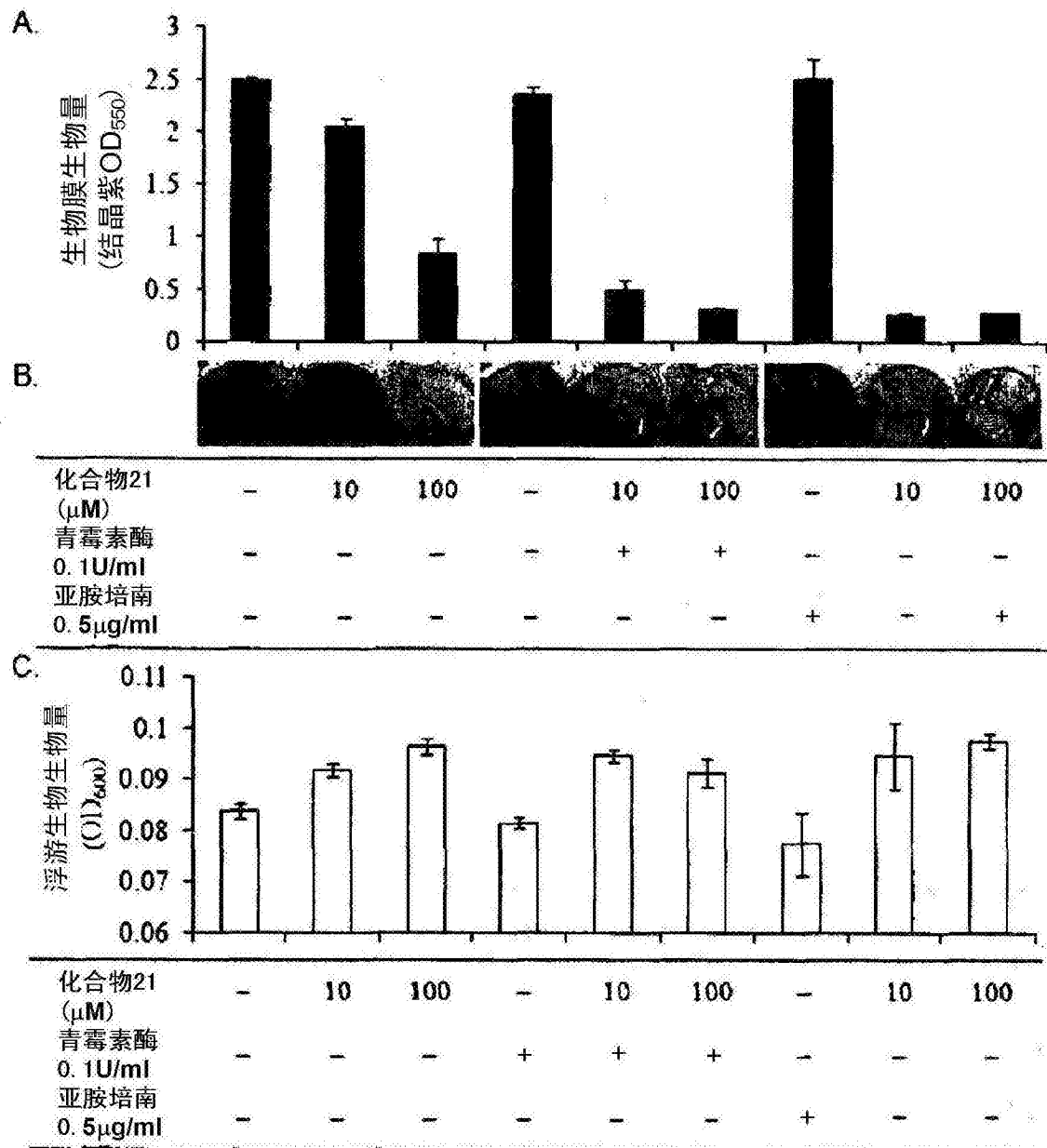


图7

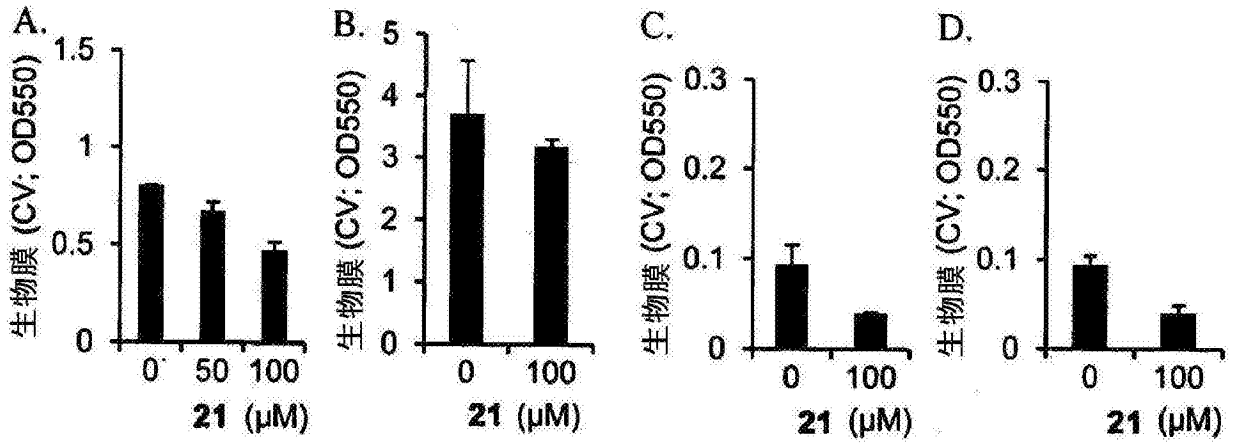


图8

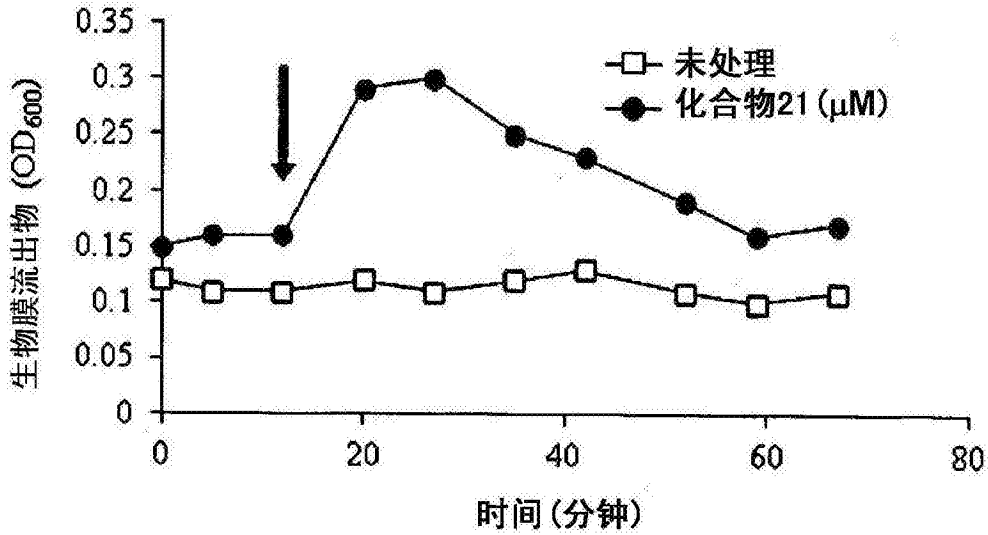


图9

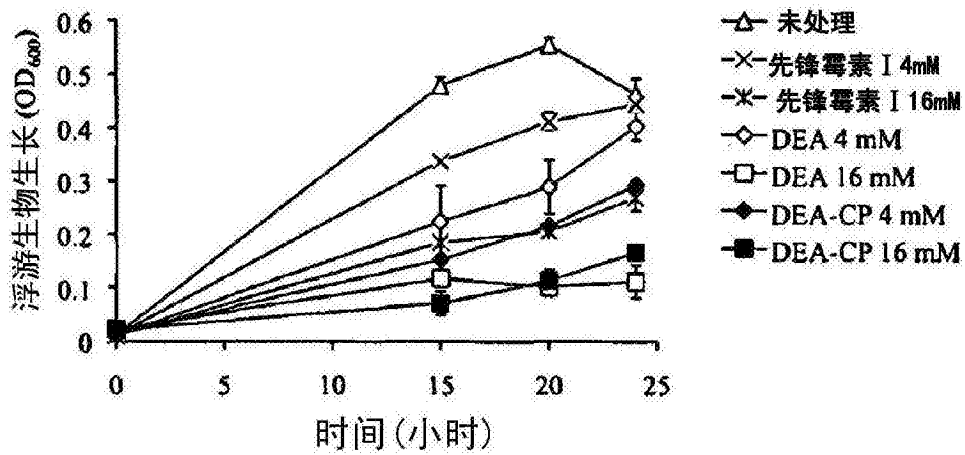
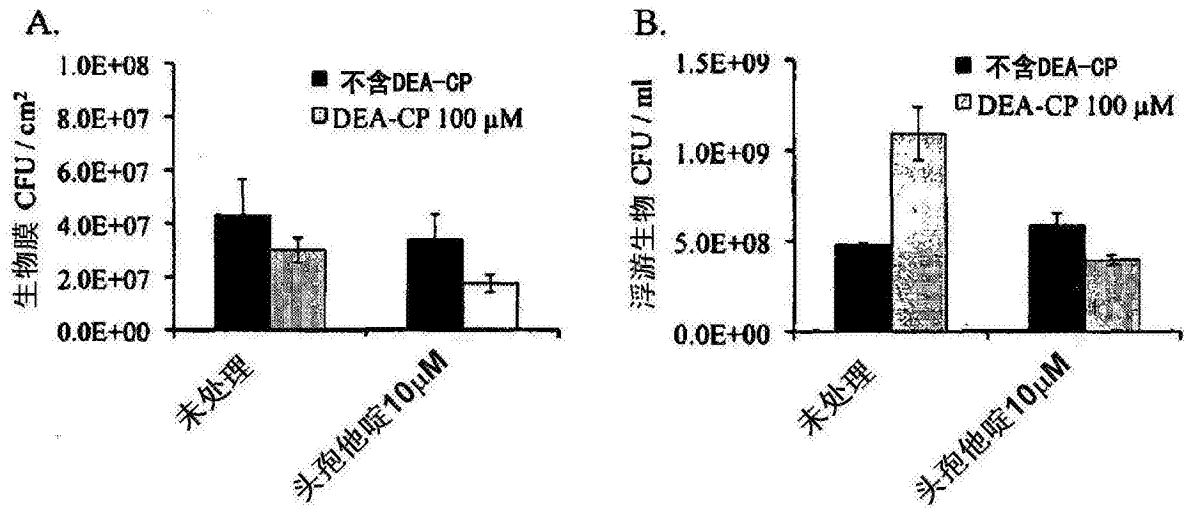


图10

1小时组合处理



2小时组合处理

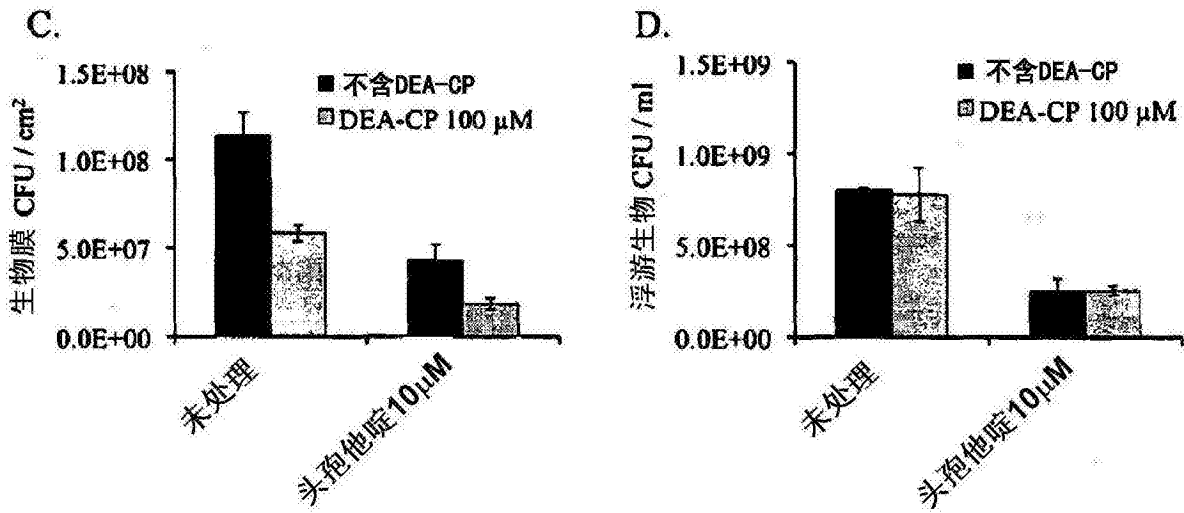


图11