

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/05



[12] 发明专利说明书

A61K 31/54 A61K 31/535

A61K 31/495 A61K 31/42

[21] ZL 专利号 99805218.3

[45] 授权公告日 2004 年 10 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1170584C

[22] 申请日 1999.5.13 [21] 申请号 99805218.3

[30] 优先权

[32] 1998.5.18 [33] US [31] 09/081,164

[86] 国际申请 PCT/US1999/007038 1999.5.13

[87] 国际公布 WO1999/059616 英 1999.11.25

[85] 进入国家阶段日期 2000.10.19

[71] 专利权人 法玛西雅厄普约翰美国公司

地址 美国密执安州

[72] 发明人 M·J·博安农

审查员 陈 敏

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 杨宏军

权利要求书 4 页 说明书 8 页

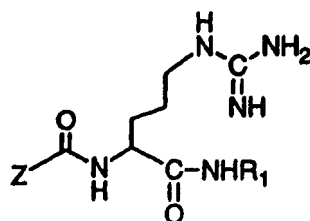
[54] 发明名称 利用精氨酸衍生物增强噁唑烷酮抗
菌剂的活性

[57] 摘要

本发明提供利用一种精氨酸衍生物增强噁唑烷酮抗菌剂的抗革兰氏阴性生物感染的功效的方法和组合物。

ISSN 1008-4274

1、噁唑烷酮抗菌剂和式 A 的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗哺乳动物革兰氏阴性生物感染的药物中的用途，



A

其中

R_1 是

a) 芳基，可选地被 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基、卤素或 $-NH_2$ 取代，或

b) $-(CH_2)_i$ -芳基，其中的芳基被 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基、卤素或 $-NH_2$ 取代，或

c) 噻吩基、呋喃基、吡啶基、苯并呋喃基或苯并噻吩基；

Z 是 R_2 或 $-CHWR_2$ ；

R_2 是

a) 芳基，可选地被一个或两个 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基、卤素、 $-NH_2$ 、 C_{1-4} 烷基氨基、 C_{1-4} 二烷基氨基或 $-NHOH$ 取代，或

b) C_{1-4} 烷基，可选地被氟原子取代，或

c) C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基，或

d) 卤素，或

e) 噻吩基、呋喃基或吡啶基；

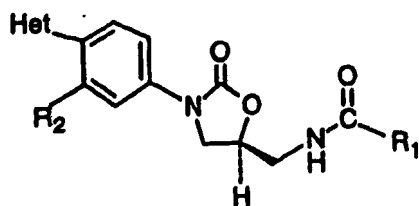
W 是 H、 $-NH_2$ 、 C_{1-4} 烷基氨基、 C_{1-4} 二烷基氨基、卤素、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基或氮杂环；

芳基是苯基或萘基；

氮杂环是 n-吗啉基、n-哌嗪基、n-吡咯烷基、n-咪唑基、n-吡咯基、n-吡唑基、n-三唑基或 n-四唑基；

i 是 0、1 或 2。

2、权利要求1的用途，其中该噁唑烷酮抗菌剂是结构为B的化合物



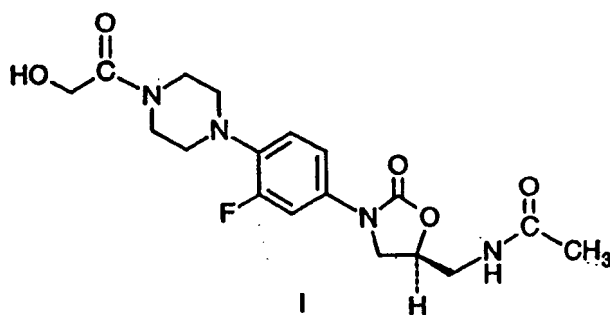
B

其中 R_1 是甲基、乙基、环丙基或二氯甲基；

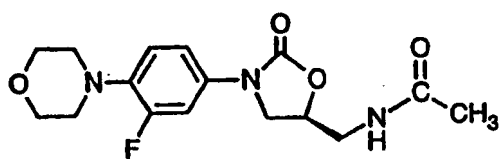
R_2 是氢或氟；

Het 是一个 6 元饱和杂环部分，具有一至两个选自硫、氮和氧原子的原子。

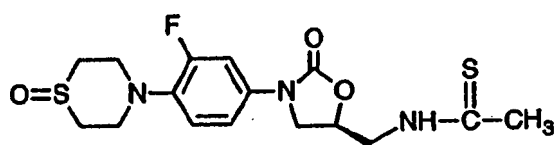
3、权利要求2的用途，其中该噁唑烷酮抗菌剂是结构为 I、II、III、IV 或 V 的化合物



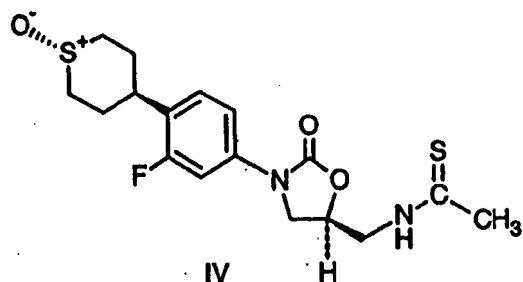
I



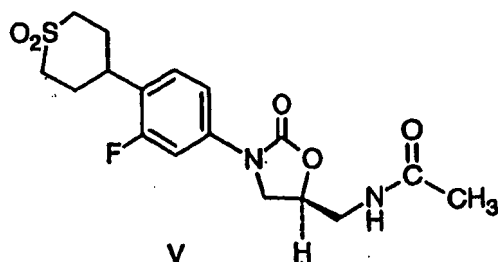
II



III

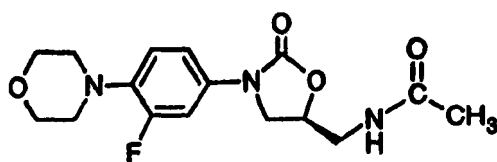


IV



V

4、权利要求2的用途，其中该噁唑烷酮抗菌剂是结构 II 的化合物



II

5、权利要求 1 的用途，其中该式 A 的化合物是 L-苯丙氨酰-L-精氨酸-β-萘酰胺。

6、权利要求 1 的用途，其中噁唑烷酮抗菌剂和式 A 化合物的比例为 10:0.01。

7、权利要求 1 的用途，其中噁唑烷酮抗菌剂和式 A 化合物的比例为 1:1。

8、权利要求 1 的用途，其中该噁唑烷酮抗菌剂的有效量是 0.1 至 100mg/kg 体重/天。

9、权利要求 1 的用途，其中该噁唑烷酮抗菌剂的有效量是 3 至 50mg/kg 体重/天。

10、权利要求 1 的用途，其中该式 A 化合物的量是 0.01 至 100mg/kg 体重/天。

11、权利要求 1 的用途，其中该式 A 化合物的量是 0.3 至 50mg/kg 体重/天。

12、权利要求 1 的用途，其中该噁唑烷酮抗菌剂和式 A 化合物是同时给药的。

13、权利要求 1 的用途，其中该式 A 化合物是在该噁唑烷酮抗菌剂给药前一至四小时给药的。

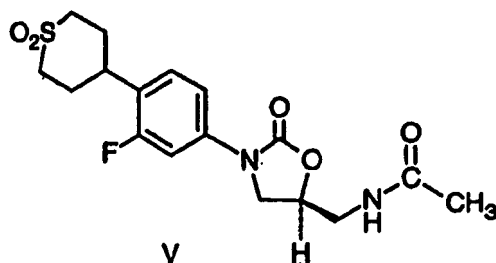
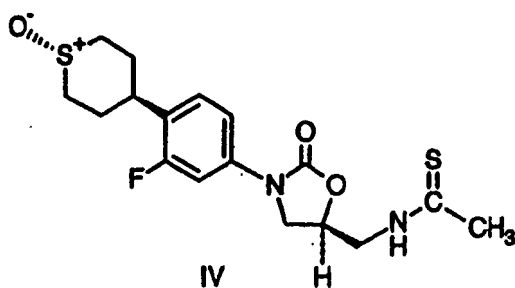
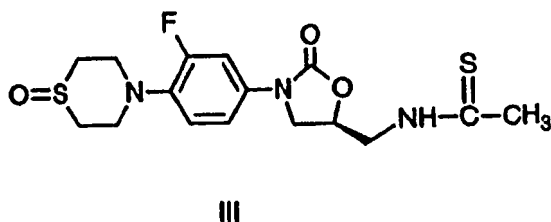
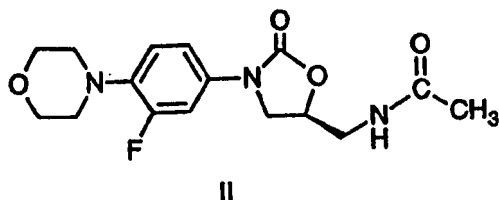
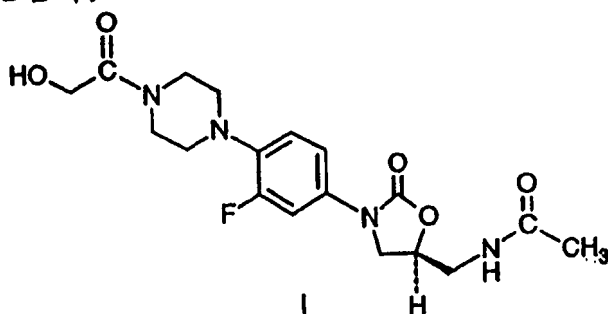
14、权利要求 1 的用途，其中该有效量的噁唑烷酮抗菌剂和式 A 化合物是口服、肠胃外、透皮或局部给药的。

15、权利要求 1 的用途，其中该革兰氏阴性生物是需氧的革兰氏阴性生物。

16、权利要求 15 的用途，其中该需氧的革兰氏阴性生物是大肠埃希氏杆菌、流感嗜血菌、粘膜莫拉氏菌、铜绿假单胞菌或肺炎克雷伯氏菌。

17、用于治疗哺乳动物革兰氏阴性生物感染的组合物，包含如权利要求 2 中所定义的式 B 的噁唑烷酮抗菌剂、如权利要求 1 中所定义的式 A 的化合物或其药学上可接受盐，和药学上可接受的载体。

18、权利要求 17 的组合物，其中该噁唑烷酮抗菌剂是结构 I、II、III、IV 或 V 的化合物



19、权利要求 17 的组合物，其中该式 A 的化合物是 L-苯丙氨酰-L-精氨酸-β-萘酰胺。

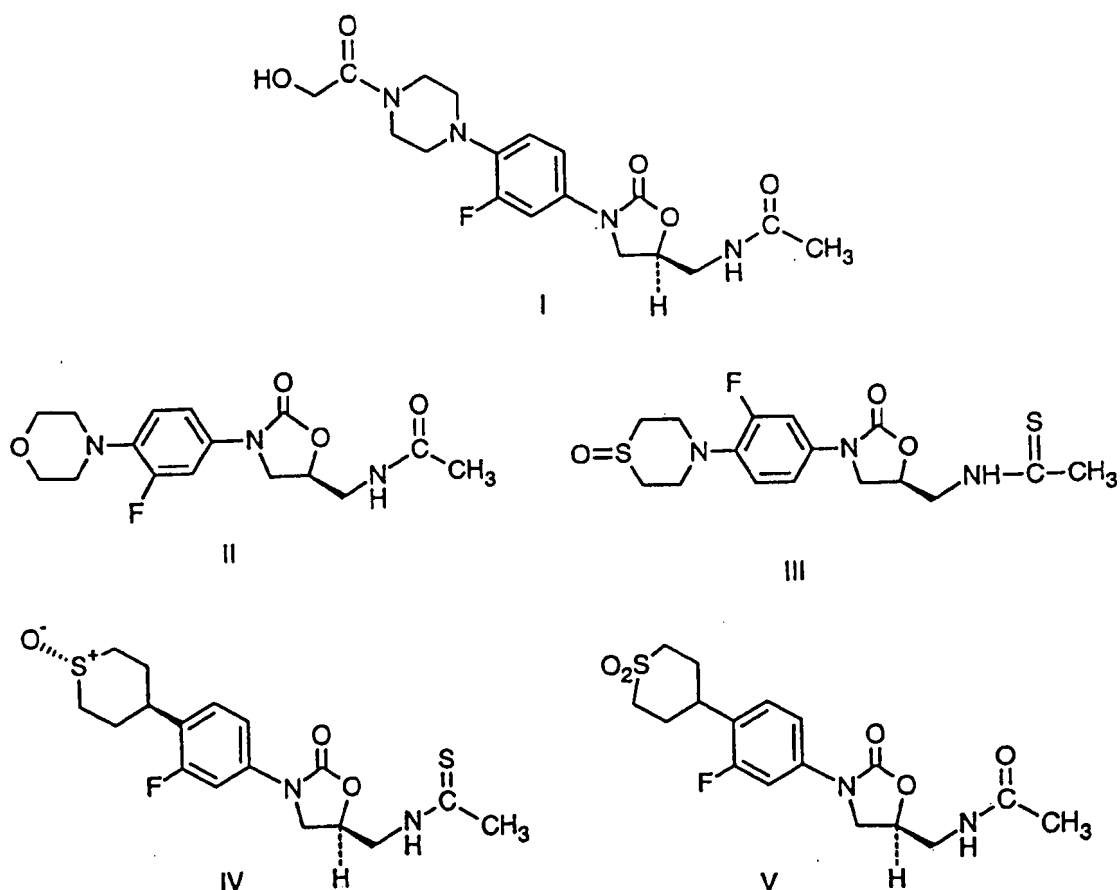
利用精氨酸衍生物增强噁唑烷酮抗菌剂的活性

发明领域

本发明涉及利用一种精氨酸衍生物增强噁唑烷酮抗菌剂的抗革兰氏阴性生物功效的方法和组合物。

发明背景

噁唑烷酮抗菌剂是一类新颖的合成抗微生物剂，具有强有力的抗多种人和动物病原体的活性，包括革兰氏阳性需氧菌，例如多耐受性葡萄球菌和链球菌，厌氧生物，例如拟杆菌和梭状芽胞杆菌类，和耐酸性生物，例如结核分枝杆菌和鸟分枝杆菌。特别是已经发现结构 I-V 的噁唑烷酮化合物是尤其有效的。



不过，某些噁唑烷酮在有用的浓度下，抗需氧的革兰氏阴性生物

的活性一般较差,例如大肠埃希氏杆菌、流感嗜血菌、粘膜炎莫拉氏菌、铜绿假单胞菌或肺炎克雷伯氏菌。因此,这些噁唑烷酮抗菌剂的单独使用仅限于由革兰氏阳性菌引起的感染状态。因此,本发明的目的之一是提供用于增强噁唑烷酮抑菌谱的方法。我们现已发现,当噁唑烷酮抗菌剂与一种精氨酸衍生物给药时,产生显著的抗革兰氏阴性生物的协同作用。噁唑烷酮抗菌剂完全有效地抗需氧革兰氏阴性生物的有效量大大低于噁唑烷酮不与这些精氨酸衍生物一起给药时所需的量。

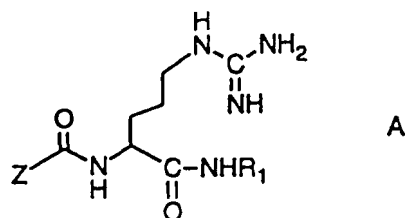
信息的公开

国际专利公报 WO 96/33285 公开了用于筛选微生物外向通量泵抑制剂的方法,包括输出抗生素的那些。该筛选方法是当细菌细胞与外向通量泵抑制剂接触时,以一种化合物的细胞内浓度为基础的,例如抗生素或染料。另外,该发明提供了药物组合物,含有这样的外向通量泵抑制剂,包括某些精氨酸衍生物,还提供了用于治疗微生物感染和增强某些抗微生物剂的抗微生物活性的方法。

由 Pharmacia and Upjohn, Inc. 提出的第 36 次 ICAAC 摘要公开了大肠埃希氏杆菌中 AcrAB 抗生素外向通量泵的突变带来对噁唑烷酮抗菌剂的敏感性。

发明概述

本发明提出一种用于治疗哺乳动物革兰氏阴性生物感染的方法和组合物,包括给以有效量的噁唑烷酮抗菌剂和一种式 A 的精氨酸衍生物或药学上可接受的盐,



其中

R₁ 是

a) 芳基, 可选地被 C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₁₋₄ 烷硫基、卤素或 -NH₂

取代,

b) $-(CH_2)_i$ -芳基, 其中的芳基被被 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基、卤素或 $-NH_2$ 取代,

c) 噻吩基、呋喃基、吡啶基、苯并呋喃基或苯并噻吩基;

Z 是 R_2 或 $-CHWR_2$;

R_2 是

a) 芳基, 可选地被一个或两个 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基、卤、 $-NH_2$ 、 C_{1-4} 烷基氨基、 C_{1-4} 二烷基氨基或 $-NHOH$ 取代,

b) C_{1-4} 烷基, 可选地被氟原子取代,

c) C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 烷硫基,

d) 卤素,

e) 噻吩基、呋喃基或吡啶基;

W 是 H、 $-NH_2$ 、 C_{1-4} 烷基氨基、 C_{1-4} 二烷基氨基、卤素、羟基、 C_{1-4} 烷氧基、烷硫基或氮杂环;

芳基是苯基或萘基;

氮杂环是正吗啉基、正哌嗪基、正吡咯烷基、正咪唑基、正吡咯基、正吡唑基、正三唑基或正四唑基;

i 是 0、1 或 2。

发明的详细说明

本发明教导, 当噁唑烷酮抗菌剂与一种精氨酸衍生物给药时, 噁唑烷酮有效地抗需氧的革兰氏阴性生物, 例如大肠埃希氏杆菌、流感嗜血菌、粘膜炎莫拉氏菌、铜绿假单胞菌或肺炎克雷伯氏菌, 以及革兰氏阳性需氧菌, 例如多耐受性葡萄球菌和链球菌, 厌氧生物, 例如拟杆菌和梭状芽胞杆菌类, 和耐酸性生物, 例如结核分枝杆菌和鸟分枝杆菌。噁唑烷酮抗菌剂完全有效地抗需氧革兰氏阴性生物的有效量大大低于噁唑烷酮不与这些精氨酸衍生物一起给药时所需的量。

出于本发明的目的, 术语 " C_{1-4} 烷基" 指具有一至四个碳原子的烷基, 例如甲基、乙基、丙基、丁基和它们的异构形式。

术语 " C_{1-4} 烷氧基" 指与一个羟基氧原子连接的具有一至四个碳原

子的烷基，例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基和它们的异构形式。

术语“C₁₋₄ 烷硫基”指与一个硫原子连接的具有一至四个碳原子的烷基和它们的异构形式。

术语“C₁₋₄ 烷基氨基”指与一个氨基部分连接的具有一至四个碳原子的烷基，例如甲氨基、乙氨基、正丙氨基、正丁氨基和它们的异构形式。

术语“C₁₋₄ 二烷基氨基”指与一个氨基部分连接的具有一至四个碳原子的两个烷基，例如二甲氨基、甲乙氨基、二乙氨基、二丙氨基、甲基丙氨基、乙基丙氨基、二丁氨基和它们的异构形式。

术语“卤素”指氟、氯、溴或碘，优选为氟、氯或溴。

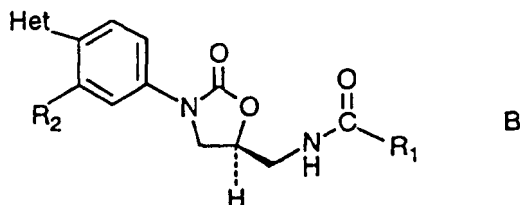
术语“芳基”指苯基或萘基。

术语“氮杂环”指正吗啉基、正哌嗪基、正吡咯烷基、正咪唑基、正吡咯基、正吡唑基、正三唑基或正四唑基。

术语“药学上可接受的盐”指可用于将本发明化合物给药的盐，包括氢氯酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、磷酸盐、乙酸盐、丙酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、2-羟基乙磺酸盐、富马酸盐等。这些盐可以是水合的形式。

术语“哺乳动物”指人或兽医意义上的动物。

噁唑烷酮抗菌剂指式 B 化合物



其中 R₁ 是甲基、乙基、环丙基或二氯甲基；R₂ 是氢或氟；Het 是一个 6 元饱和杂环部分，具有一至两个选自硫、氮和氧原子的原子。可选地，杂环的氮原子可以被适当的基团取代，例如羟基乙酰基，硫原子可以是被氧化的。另外，式 Y 化合物包括所有可能的立体异构体和几何形式。优选地，噁唑烷酮抗菌剂是如上所述的式 I-V 化合物。

本领域有多篇参考文献公开了各种噁唑烷酮衍生物及其制备方法。上述噁唑烷酮抗菌剂可以按照美国专利 5652238 与 5688792、国际专利公报 WO 93/23384、WO 97/09328 与 WO 98/54161 中所述操作加以制备，它们引用在此作为参考文献。

式 A 的精氨酸衍生物是已知的，易于获得或者可以通过本领域技术人员已知的合成化学方法加以制备。优选地，式 A 的精氨酸衍生物是 L-苯丙氨酰-L-精氨酸- β -萘酰胺。

本发明的药物组合物包含噁唑烷酮抗菌剂和式 A 的精氨酸衍生物，以及一种或多种固体或液体药学上可接受的载体和可选的药学上可接受的佐剂和赋形剂。固体形式的组合物包括粉末、片剂、可分散颗粒、胶囊和栓剂。固体载体可以是至少一种这样的物质，它也可以充当稀释剂、矫味剂、增溶剂、润滑剂、悬浮剂、粘合剂、片剂崩解剂和包封剂。惰性固体载体包括碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、纤维素材料、低熔点蜡、可可脂等。液体形式的组合物包括溶液、悬浮液和乳液。例如，可以提供的有本发明化合物溶解在水、水-丙二醇和水-聚乙二醇系统中的溶液，可选地含有常规的着色剂、矫味剂、稳定剂和增稠剂。

药物组合物是利用常规工艺提供的。优选地，组合物是含有有效量的噁唑烷酮抗菌剂、即式 B 化合物的单位剂量形式。

药物组合物及其单位剂量形式中噁唑烷酮抗菌剂的量可以是不同的，或者可以根据特定的用药方法、特定化合物的效力、所治疗的状态和所需浓度加以广泛调整。一般来说，噁唑烷酮抗菌剂的量将在 0.5% 至 90% 的范围内，以全体组合物的重量计。

在用于治疗已经诊断为需氧革兰氏阴性生物感染的人和其他动物的细菌感染的治疗用途中，噁唑烷酮抗菌剂和精氨酸衍生物或本发明的药物组合物将通过口服、肠胃外、透皮和/或局部给药，给药剂量可达到并保持活性组分在接受治疗的哺乳动物中的浓度、也就是量、或血液水平将是抗菌有效的。优选的给药方式是口服。一般来说，这种抗菌有效量的活性噁唑烷酮抗菌剂的剂量将在约 0.1 至约 100mg/kg 正

常体重的范围内,更优选为约 3.0 至约 50mg/kg 体重/天。不言而喻的是,剂量可以因患者的需要、所治疗细菌感染的严重性和所使用的特定化合物而异。也不言而喻的是,为了快速达到所需血液水平,最初的给药剂量可以超过上述上限,或者最初的剂量可以小于最优值,每日剂量可以在治疗过程中根据具体情况逐渐增加。如果需要的话,每日剂量也可以分为多剂给药,例如每天二至四次。

式 A 精氨酸衍生物的用量随着特定精氨酸衍生物的活性增加和所治疗生物的吸收作用而改变。应当使用足量的精氨酸衍生物,以使所治疗的哺乳动物中需氧革兰氏阴性生物对药理学上可接受水平的噁唑烷酮抗菌剂敏感。足量的特定精氨酸衍生物可以如下简单地加以确定:试验噁唑烷酮抗菌剂的最小抑制浓度(MIC),比较单用抗菌剂的 MIC 与结合使用抗菌剂与精氨酸衍生物的 MIC。一般来说,精氨酸衍生物与噁唑烷酮抗菌剂的给药摩尔比可以是约 0.01 至 10,优选为约 0.1 至 1.0。因此,用于增强哺乳动物中噁唑烷酮抗菌剂抗需氧革兰氏阴性生物的功效的精氨酸衍生物的每日剂量可以从约 0.01 至 100mg/kg 正常体重,优选为约 0.3 至 50mg/kg 体重。精氨酸衍生物可以在噁唑烷酮抗菌剂给药前一至四小时给药,或者与噁唑烷酮抗菌剂同时给药。

生物学试验

噁唑烷酮抗菌剂当与式 A 精氨酸衍生物结合时抗需氧革兰氏阴性生物的活性加强作用使用两种测定工艺:

a)常规的棋盘法,和

b)用于定量大肠埃希氏杆菌中放射性标记的噁唑烷酮抗菌剂的硅油离心法。

I. 利用棋盘法测定分级抑制浓度(FIC)指数。

“棋盘”法是评定抗微生物组合的最常用的体外工艺(Lorian, V., editor. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Third Edition, p. 432, Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland 21202, USA)。在微量稀释法中,棋盘模式是在微量滴定盘的小孔内形成的,小孔内含有多份供试试剂的 2-倍稀释液。供试稀释液所跨越的浓度范围在用于供试生物的

每种供试试剂的最小抑制浓度(MIC)之上和之下。在每种试验比例下的反应(生长或没有生长)用于计算分级抑制浓度(FIC)指数。当两种药物一起使用所得到的结果等于分别使用两种药物所得到的结果之和时(FIC指数=1.0),把药物-药物相互作用定义为加和作用。当两种药物的结果显著小于加和性反应时(FIC指数>1.0),把相互作用描述为拮抗作用。当两种药物组合的结果显著大于加和性反应时(FIC指数<0.50),把相互作用描述为协同作用。

II. 定量放射性标记的式 I 噁唑烷酮抗菌剂

用式 A 精氨酸衍生物预处理细菌细胞后大肠埃希氏杆菌中的蓄积作用

放射性标记的式 I 噁唑烷酮抗菌剂在大肠埃希氏杆菌中的蓄积作用的测量按照 Thanassi, D.G., G.S.B. Suh, H. Nikaido 《细菌学杂志》1995, p. 177, (4): 998-1007 所述操作进行。简单地说,使细胞在 37℃ LB/0.2%葡萄糖中生长至对数中期(OD_{530} 0.5-0.7),用离心法收获,洗涤两次,再次在 50mM 磷酸钾 pH 7.0、1mM $MgSO_4$ 和 0.2%葡萄糖中悬浮至 OD_{530} 为 8.0。在加入精氨酸衍生物之前,将 1.0ml 等分试样的细胞悬浮液在 37℃ 下预培养 10 分钟。使用羰基氰间氯苯腈(CCCP)作为阳性对照。加入精氨酸衍生物、L-苯丙氨酰-L-精氨酰- β -萘酰胺后,将细胞培养 30 分钟,然后加入放射性标记的式 I 噁唑烷酮抗菌剂,至最终浓度为 25TM。然后再将细胞培养 15 分钟。取出 50TI 等分试样,在 300TI 硅油垫(70% 550 号流体和 30% 510 号流体的硅油, Dow Corning Corp. Midland, MI)上分层。将试管在 22℃、12000rpm 下离心 3 分钟,然后浸入液 N_2 进行冷冻。除去含有细胞颗粒的每支试管顶端,放置在闪烁小瓶内。融化后,将细胞颗粒悬浮在 200TI 蒸馏水中,加入 4ml 闪烁流体。将样本充分混合,在液体闪烁计数器中计数。为了校正所标记的药物与细胞表面的非特异性粘着,用自始至终仅加入载体和放射性标记的式 I 噁唑烷酮抗菌剂进行培养的细胞做对照实验。

III. 结果

单用式 I 噁唑烷酮抗菌剂证明抗菌活性非常差，抑制大肠埃希氏杆菌 31700 需要 256mg/ml 的浓度。单用 L-苯丙氨酸-L-精氨酸- β -萘酰胺也证明抗菌活性非常差，直到高达 256mg/ml 的浓度也没有生长抑制作用。不过，当在“棋盘”模式中将这两种试剂组合使用时，戏剧性地证明式 I 噁唑烷酮抗菌剂的活性被 L-苯丙氨酸-L-精氨酸- β -萘酰胺加强了。例如，在 16mg/ml L-苯丙氨酸-L-精氨酸- β -萘酰胺的存在下，式 I 噁唑烷酮抗菌剂对细菌生长的抑制浓度是 16mg/ml。FIC 指数的计算值为 0.23，显然说明具有协同性相互作用。