(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107708689 A
(43)申请公布日 2018.02.16

(21)申请号 201680033925.3

(22)申请日 2016.04.22

(30)优先权数据
62/151,902 2015.04.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2016/050470 2016.04.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/168938 EN 2016.10.27

(71)申请人 帕维尔·迪布韦
地址 加拿大马尼托巴湖
申请人 埃莱娜·迪布韦 格兰特·皮尔斯

(72)发明人 帕维尔·迪布韦 埃莱娜·迪布韦
格兰特·皮尔斯

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
A61K 31/365(2006.01)
A61K 31/665(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
C07D 307/66(2006.01)
C07F 9/655(2006.01)

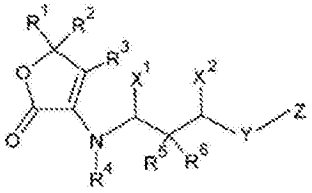
权利要求书7页 说明书20页 附图25页

(54)发明名称

用作抗生素的Korormicin衍生物

(57)摘要

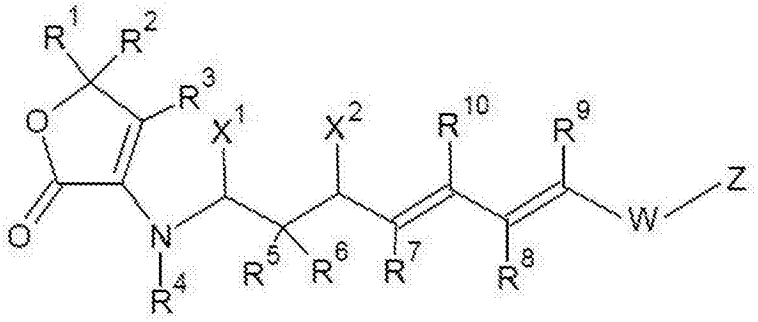
本申请描述了式(I)的抗生素化合物：



(I)或其盐或立体异构体；其中R^1至R^3、R^5和R^6独立地选自H、烷基、取代的烷基、卤素、OH、NH_2或SH；R^4为H、烷基或取代的烷基；X^1至X^2独立地选自O、S、NH、H、烷基、卤素、OH、SH或NH_2；Y为具有4个至20个碳原子的非环状烃链或具有4个或20个碳原子的取代的非环状烃链，条件是Y不包含氧原子；Z为CH_3或者任何中性或带正电荷的基团。还描述了这些抗生素化合物的药物开发的治疗用途和系统。

CN 107708689 A

1.式(III)的抗生素化合物：



III

或者其盐或立体异构体；

其中R^1至R^3和R^5至R^{10}独立地选自H、烷基、取代的烷基、卤素、OH、NH_2或SH；

R^4为H、烷基或取代的烷基；

X^1至X^2独立地选自O、S、NH、H、烷基、卤素、OH、SH或NH_2；

W为基本上由氢和碳原子组成的具有1个至15个碳原子的饱和非环状烃链；

Z为包含氮或磷原子的中性或带正电荷的有机基团。

2.如权利要求1所述的化合物，其中所述化合物调节细菌的Na^+-NQR活性。

3.如权利要求1或2所述的化合物，其中所述化合物抑制细菌生长。

4.如权利要求3所述的化合物，其中所述细菌为革兰氏阴性细菌。

5.如权利要求4所述的化合物，其中所述细菌为γ-变形菌或β-变形菌。

6.如权利要求5所述的化合物，其中所述细菌为来自选自以下的变形菌目的物种：肠杆菌目、Vibrionalle、巴斯德氏菌目、气单胞菌目、假单胞菌目和Neisserale。

7.如权利要求4所述的化合物，其中所述细菌为拟杆菌。

8.如权利要求4所述的化合物，其中所述细菌为衣原体。

9.如权利要求4所述的化合物，其中所述细菌选自沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)、Simkania negevensis Z、Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25、鼠衣原体(Chlamydia muridarum)Nigg'、齿垢密螺旋体(Treponema denticola)、恶臭密螺旋体(Treponema putida)、牙龈卟啉单胞菌(Porphyromonas gingivalis)、福赛斯坦纳菌(Tannerella forsythia)、伴放线放线杆菌(Actinobacillus actinomycetemcomitans)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)、脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseria meningitides)、淋病奈瑟氏菌(Neisseria gonorrhoeae)、肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumonia)和肺炎嗜衣原体(Chlamydophila pneumonia)。

10.如权利要求1至9中任一项所述的化合物，其中所述化合物为以对哺乳动物细胞无毒的量治疗有效的抗生素。

11.如权利要求1至10中任一项所述的化合物，其中所述化合物仅具有两个手性中心5S和3′R。

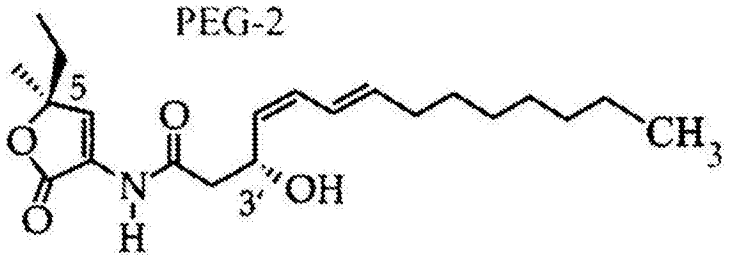
12.如权利要求1至11中任一项所述的化合物，其中R^4为H并且X^1至X^2独立地选自O或OH。

13.如权利要求1至12中任一项所述的化合物，其中Z为带中性电荷的有机基团。

14.如权利要求1至12中任一项所述的化合物，其中Z为带正电荷的有机基团。

15.如权利要求1至12中任一项所述的化合物，其中Z为三苯基膦基团、胍基团、氨基萘嵌间二氮杂苯基团或阿米洛利基团。

16.抗生素化合物,具有结构:



或者其盐或立体异构体。

17.药物组合物,包含有效量的权利要求1至16中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

18.有效量的权利要求1至16中任一项所述的化合物在治疗细菌性疾病中的用途。

19.如权利要求18所述的化合物的用途,其中所述细菌性疾病选自霍乱、急性胃肠炎、溃疡、胃肠感染、创伤感染、败血症、食源性腹泻、腹泻、胃肠炎、军团病、坏死性齿龈炎、成人牙周炎、牙周炎、青少年牙周炎、脑膜炎、淋病、肺炎、心内膜炎、耳炎、软下疳、肺部感染、皮肤感染、腹膜炎、损伤、副伤寒热、伤寒热、瘟疫、远东类猩红热、支气管炎、沙眼、阴道炎、青少年肺炎、急性细支气管炎、人胎死亡、腹膜感染、呼吸道感染、中耳感染、眼感染和中枢神经系统感染。

20.如权利要求18所述的化合物的用途,其中所述细菌性疾病由选自以下的细菌感染引起:霍乱弧菌(Vibrio cholera)、副溶血性弧菌(Vibrio parahaemolyticus)、创伤弧菌(Vibrio vulnificus)、胃肠炎弧菌(Vibrio gastroenteritis)、少女弧菌(Vibrio damsel)、河流弧菌(Vibrio fluvialis)、弗尼斯弧菌(Vibrio furnissii)、哈氏弧菌(Vibrio harveyi)、霍氏弧菌(Vibrio hollisae)、肋生弧菌(Vibrio costicola)、拟肽弧菌(Vibrio mimicus)、辛辛那提弧菌(Vibrio cincinnatiensis)、维氏气单胞菌(Aeromonas veronii)、豚鼠气单胞菌(Aeromonas caviae)、嗜肺军团菌、齿垢密螺旋体、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、伴放线放线杆菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、干燥奈瑟菌(Neisseria sicca)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenza)、杜克雷嗜血杆菌(Haemophilus ducreyi)、绿脓假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、类产碱假单胞菌(Pseudomonas pseudoalcaligenes)、非共生发光杆菌(Photorhabdus asymbiotica)、肠道沙门氏菌(Salmonella enterica)(副伤寒沙门氏菌(s.Paratyphi))、肠道沙门氏菌(伤寒沙门氏菌(s.Typhi))、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌(Yersinia pestis)、假结核耶尔森菌(Yersinia pseudotuberculosis)、肺炎嗜衣原体、沙眼衣原体、Simkania negevensis Z、嗜树丛瓦德氏菌(Waddlia chondrophila)、多杀性巴氏杆菌(Pasteurella multocida)、变形斑沙雷氏菌(Serratia proteamaculans)、脆弱拟杆菌(Bacteroides fragilis)和卡他莫拉菌(Moraxella catarrhalis)。

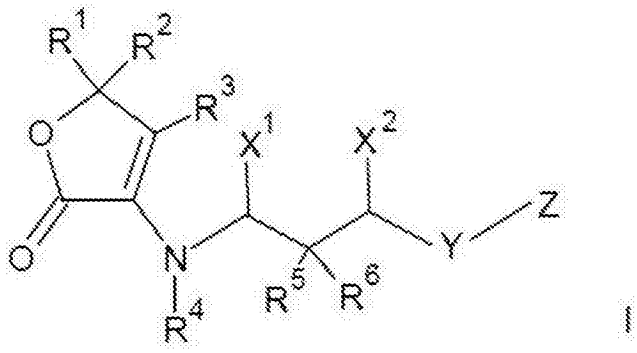
21.治疗细菌性疾病的方法,包括施用有效量的权利要求1至16中任一项所述的化合物。

22.如权利要求21所述的方法,其中所述细菌性疾病选自霍乱、急性胃肠炎、溃疡、胃肠感染、创伤感染、败血症、食源性腹泻、腹泻、胃肠炎、军团病、坏死性齿龈炎、成人牙周炎、牙周炎、青少年牙周炎、脑膜炎、淋病、肺炎、心内膜炎、耳炎、软下疳、肺部感染、皮肤感染、腹

膜炎、损伤、副伤寒热、伤寒热、瘟疫、远东类猩红热、支气管炎、沙眼、阴道炎、青少年肺炎、急性细支气管炎、人胎死亡、腹膜感染、呼吸道感染、中耳感染、眼感染和中枢神经系统感染。

23.如权利要求21所述的方法，其中所述细菌性疾病由选自以下的细菌感染引起：霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、胃肠炎弧菌、少女弧菌、河流弧菌、弗尼斯弧菌、哈氏弧菌、霍氏弧菌、肋生弧菌、拟肽弧菌、辛辛那提弧菌、维氏气单胞菌、豚鼠气单胞菌、嗜肺军团菌、齿垢密螺旋体、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、伴放线放线杆菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、干燥奈瑟菌、流感嗜血杆菌、杜克雷嗜血杆菌、绿脓假单胞菌、类产碱假单胞菌、非共生发光杆菌、肠道沙门氏菌(副伤寒沙门氏菌)、肠道沙门氏菌(伤寒沙门氏菌)、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、假结核耶尔森菌、肺炎嗜衣原体、沙眼衣原体、Simkania negevensis Z、嗜树丛瓦德氏菌、多杀性巴氏杆菌、变形斑沙雷氏菌、脆弱拟杆菌和卡他莫拉菌。

24.式(I)的抗生素化合物：



I

或者其盐或立体异构体；

其中R^1至R^3、R^5和R^6独立地选自H、烷基、取代的烷基、卤素、OH、NH_2或SH；

R^4为H、烷基或取代的烷基；

X^1至X^2独立地选自O、S、NH、H、烷基、卤素、OH、SH或NH_2；

Y为具有4个至20个碳原子的非环状烃链或具有4个或20个碳原子的取代的非环状烃链，条件是Y不包含氧原子；

Z为CH_3或者任何中性或带正电荷的基团。

25.如权利要求24所述的化合物，其中所述化合物调节细菌的Na^+-NQR活性。

26.如权利要求24或25所述的化合物，其中所述化合物抑制细菌生长。

27.如权利要求26所述的化合物，其中所述细菌为革兰氏阴性细菌。

28.如权利要求27所述的化合物，其中所述细菌为γ-变形菌或β-变形菌。

29.如权利要求28所述的化合物，其中所述细菌为来自选自以下的变形菌目的物种：肠杆菌目、Vibrionalle、巴斯德氏菌目、气单胞菌目、假单胞菌目和Neisserale。

30.如权利要求27所述的化合物，其中所述细菌为拟杆菌。

31.如权利要求27所述的化合物，其中所述细菌为衣原体。

32.如权利要求27所述的化合物，其中所述细菌选自沙眼衣原体、Simkania negevensis Z、Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25、鼠衣原体Nigg'、齿垢密螺旋体、恶臭密螺旋体、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、伴放线放线杆菌、嗜肺军团菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、肺炎克雷伯菌和肺炎嗜衣原体。

33.如权利要求24至32中任一项所述的化合物，其中所述化合物为以对哺乳动物细胞无毒的量治疗有效的抗生素。

34.如权利要求24至33中任一项所述的化合物，其中所述化合物仅具有两个手性中心5S和3′R。

35.如权利要求24至34中任一项所述的化合物，其中R^4为H并且X^1至X^2独立地选自O或OH。

36.如权利要求24至35中任一项所述的化合物，其中Z为带中性电荷的有机基团。

37.如权利要求24至35中任一项所述的化合物，其中Z为带正电荷的有机基团。

38.如权利要求24至35中任一项所述的化合物，其中Z为CH_3、三苯基膦基团、胍基团、氨基萘嵌间二氮杂苯基团或阿米洛利基团。

39.如权利要求24至35中任一项所述的化合物，其中Y包括至少一个碳碳双键并且主要由氢和碳原子组成。

40.药物组合物，包含有效量的权利要求24至39中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

41.有效量的权利要求24至39中任一项所述的化合物在治疗细菌性疾病中的用途。

42.如权利要求41所述的化合物的用途，其中所述细菌性疾病选自霍乱、急性胃肠炎、溃疡、胃肠感染、创伤感染、败血症、食源性腹泻、腹泻、胃肠炎、军团病、坏死性齿龈炎、成人牙周炎、牙周炎、青少年牙周炎、脑膜炎、淋病、肺炎、心内膜炎、耳炎、软下疳、肺部感染、皮肤感染、腹膜炎、损伤、副伤寒热、伤寒热、瘟疫、远东类猩红热、支气管炎、沙眼、阴道炎、青少年肺炎、急性细支气管炎、人胎死亡、腹膜感染、呼吸道感染、中耳感染、眼感染和中枢神经系统感染。

43.如权利要求41所述的化合物的用途，其中所述细菌性疾病由选自以下的细菌感染引起：霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、胃肠炎弧菌、少女弧菌、河流弧菌、弗尼斯弧菌、哈氏弧菌、霍氏弧菌、肋生弧菌、拟肽弧菌、辛辛那提弧菌、维氏气单胞菌、豚鼠气单胞菌、嗜肺军团菌、齿垢密螺旋体、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、伴放线放线杆菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、干燥奈瑟菌、流感嗜血杆菌、杜克雷嗜血杆菌、绿脓假单胞菌、类产碱假单胞菌、非共生发光杆菌、肠道沙门氏菌(副伤寒沙门氏菌)、肠道沙门氏菌(伤寒沙门氏菌)、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、假结核耶尔森菌、肺炎嗜衣原体、沙眼衣原体、Simkania negevensis Z、嗜树丛瓦德氏菌、多杀性巴氏杆菌、变形斑沙雷氏菌、脆弱拟杆菌和卡他莫拉菌。

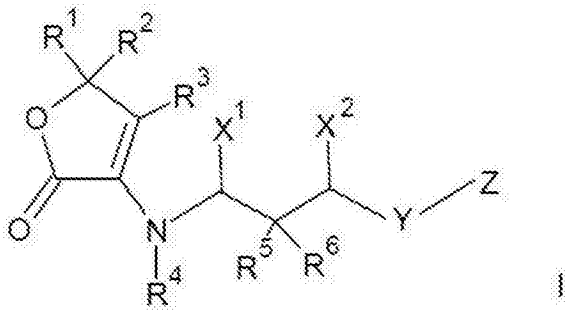
44.治疗细菌性疾病的方法，包括施用有效量的权利要求24至39中任一项所述的化合物。

45.如权利要求44所述的方法，其中所述细菌性疾病选自霍乱、急性胃肠炎、溃疡、胃肠感染、创伤感染、败血症、食源性腹泻、腹泻、胃肠炎、军团病、坏死性齿龈炎、成人牙周炎、牙周炎、青少年牙周炎、脑膜炎、淋病、肺炎、心内膜炎、耳炎、软下疳、肺部感染、皮肤感染、腹膜炎、损伤、副伤寒热、伤寒热、瘟疫、远东类猩红热、支气管炎、沙眼、阴道炎、青少年肺炎、急性细支气管炎、人胎死亡、腹膜感染、呼吸道感染、中耳感染、眼感染和中枢神经系统感染。

46.如权利要求44所述的方法，其中所述细菌性疾病由选自以下的细菌感染引起：霍乱

弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、胃肠炎弧菌、少女弧菌、河流弧菌、弗尼斯弧菌、哈氏弧菌、霍氏弧菌、肋生弧菌、拟肽弧菌、辛辛那提弧菌、维氏气单胞菌、豚鼠气单胞菌、嗜肺军团菌、齿垢密螺旋体、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、伴放线放线杆菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、干燥奈瑟菌、流感嗜血杆菌、杜克雷嗜血杆菌、绿脓假单胞菌、类产碱假单胞菌、非共生发光杆菌、肠道沙门氏菌(副伤寒沙门氏菌)、肠道沙门氏菌(伤寒沙门氏菌)、肺炎克雷伯菌、鼠疫耶尔森菌、假结核耶尔森菌、肺炎嗜衣原体、沙眼衣原体、Simkania negevensis Z、嗜树丛瓦德氏菌、多杀性巴氏杆菌、变形斑沙雷氏菌、脆弱拟杆菌和卡他莫拉菌。

47.式(I)的抗生素化合物：



(I)

或者其盐或立体异构体；

其中R^1至R^3、R^5和R^6独立地选自H、烷基、取代的烷基、卤素、OH、NH_2或SH；

R^4为H、烷基或取代的烷基；

X^1至X^2独立地选自O、S、NH、H、烷基、卤素、OH、SH或NH_2；

Y为仅由氢和碳原子组成的具有2个至20个碳原子的非环状烃链；

Z为CH_3或者任何中性或带正电荷的基团。

48.如权利要求47所述的化合物，其中所述化合物调节细菌的Na^+-NQR活性。

49.如权利要求47或48所述的化合物，其中所述化合物抑制细菌生长。

50.如权利要求49所述的化合物，其中所述细菌为革兰氏阴性细菌。

51.如权利要求50所述的化合物，其中所述细菌为γ-变形菌或β-变形菌。

52.如权利要求51所述的化合物，其中所述细菌为来自选自以下的变形菌目的物种：肠杆菌目、Vibrionalle、巴斯德氏菌目、气单胞菌目、假单胞菌目和Neisserale。

53.如权利要求50所述的化合物，其中所述细菌为拟杆菌。

54.如权利要求50所述的化合物，其中所述细菌为衣原体。

55.如权利要求50所述的化合物，其中所述细菌选自沙眼衣原体、Simkania negevensis Z、Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25、鼠衣原体Nigg'、齿垢密螺旋体、恶臭密螺旋体、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、伴放线放线杆菌、嗜肺军团菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、肺炎克雷伯菌和肺炎嗜衣原体。

56.如权利要求47至55中任一项所述的化合物，其中所述化合物为以对哺乳动物细胞无毒的量治疗有效的抗生素。

57.如权利要求56所述的化合物，其中所述化合物为以对人细胞无毒的量治疗有效的抗生素。

58.如权利要求47至57中任一项所述的化合物，其中R^4为H并且X^1至X^2独立地选自O或OH。

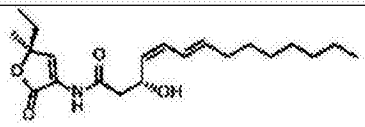
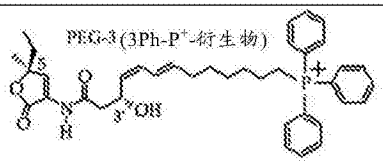
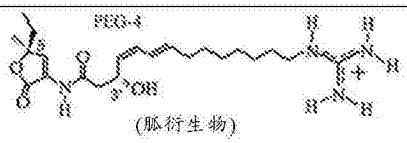
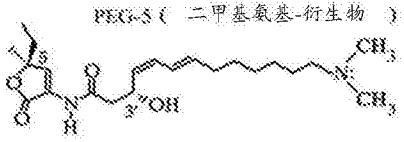
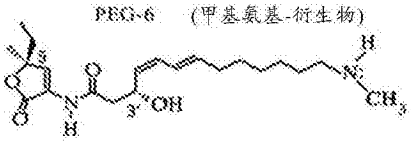
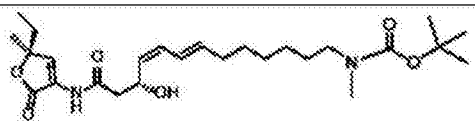
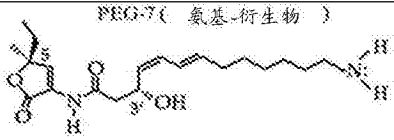
59.如权利要求47至58中任一项所述的化合物，其中Z为带中性电荷的有机基团。

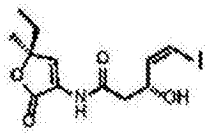
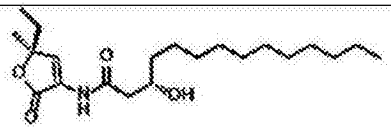
60.如权利要求47至58中任一项所述的化合物，其中Z为带正电荷的有机基团。

61.如权利要求47至58中任一项所述的化合物，其中Z为CH_3、三苯基膦基团、胍基团、氨基萘嵌间二氮杂苯基团、阿米洛利基团或卤素。

62.如权利要求24至58中任一项所述的化合物，其中Y包括至少一个碳碳双键。

63.如权利要求24至58中任一项所述的化合物，选自：

PEG-2	
PEG-3	
PEG-4	
PEG-5	
PEG-6	
PEG-6(Boc)	
PEG-7	

PEG-10	
PEG-11	
PEG-14	

64.用于抗生素开发的方法,包括:

产生权利要求1至16、24至39和47至63中任一项所述的化合物或者其盐、立体异构体或前药;

测定所述化合物抑制细菌生长的功效。

65.如权利要求64所述的方法,还包括测定所述化合物对细菌的Na^+-NQR活性的调节。

66.如权利要求64或65所述的方法,还包括测定所述化合物对于动物细胞的毒性。

67.如权利要求66所述的方法,其中所述动物细胞为哺乳动物细胞。

68.如权利要求67所述的方法,其中所述哺乳动物细胞为人细胞。

69.用于抗生素开发的系统,包括:

权利要求1至16、24至39和47至63中任一项所述的合成化合物或者其盐、立体异构体或前药;

用于测定所述化合物抑制细菌生长的功效的分析法。

70.如权利要求69所述的系统,还包括用于测定所述化合物调节细菌的Na^+-NQR活性的分析法。

71.如权利要求69或70所述的系统,还包括用于测定所述化合物对于动物细胞的毒性的分析法。

72.如权利要求71所述的系统,其中所述动物细胞为哺乳动物细胞。

73.如权利要求72所述的系统,其中所述哺乳动物细胞为人细胞。

用作抗生素的Korormicin衍生物

发明领域

[0001] 本发明涉及抗生素化合物及其治疗用途。

背景技术

[0002] 关于治疗和控制细菌感染的全球性危机已被充分认识。医疗关注包括缺少足够多的抗生素来处理世界上出现的新感染以及已经在适应细菌中观察到的对常规抗生素治疗的抗性。但还未产生处理这种情况的新的抗生素。在20世纪80年代中期,FDA批准了16种新的抗生素。在2008年9月,这已经减少到仅一种(美国感染病协会(Infectious Diseases Society of America))。在相同的近似时间周期内,对抗生素的抗性的发生率已经从约5%升高至30%-60%。这已经引起世界卫生组织在2009年作出声明"抗菌素耐药性的快速发展是对人类健康的三大威胁之一"。

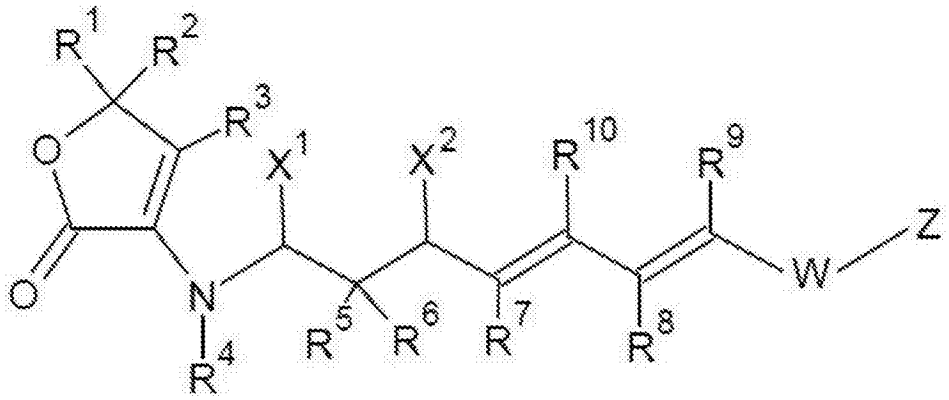
[0003] 鉴定新药以处理这种危机的部分问题为,业界自身已经耗尽了控制细菌的靶标。在过去常规使用和现今对于所有细菌常见的靶标包括原核核糖体、作用于DNA和RNA的酶以及细胞壁的合成等。事实上,尚未鉴定出新的机制性靶标。

[0004] 细菌中的Na^+-转位NADH:泛醌氧化还原酶(Na^+-NQR)已经表明作为控制细菌复制和存活的机制。迄今为止,已经报道了Na^+-NQR的三种抑制剂:变性的Ag^+离子、(3R,4Z,6E)-N-[(5S)-5-乙基-5-甲基-2-氧代-2,5-二氢-3-呋喃基]-3-羟基-8-[(2S,3R)-3-辛基-2-环氧乙烷基]-4,6-辛二烯酰胺(korormicin)和2-正庚基-4-羟基喹啉N-氧化物(HQNO)。Ag^+离子具有明显的递送问题并且还是非特异性的。Korormicin和HQNO已经示出通过Na^+-NQR以互相排斥的方式抑制钠依赖性泛醌还原并且已经表明拥有抗微生物活性(例如,如在2007年4月18日公开的日本专利3905604B2、2000年12月5日公开的日本专利申请公开2000336088和2001年1月16日公开的日本专利申请公开2001010908所论述的)。然而,这些化合物中没有一种被开发作为针对动物,例如哺乳动物或更具体地人的有效抗生素治疗。

[0005] 因此,对于可选的抗生素化合物存在持续需求。

[0006] 发明概述

[0007] 在一个方面,提供了式(III)的抗生素化合物:

[0008] 

III

[0009] 或其盐或立体异构体;

[0010] 其中R^1至R^3和R^5至R^{10}独立地选自H、烷基、取代的烷基、卤素、OH、NH_2或SH;

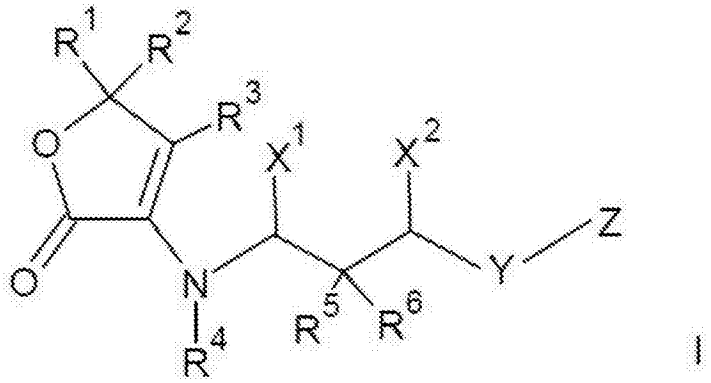
[0011] R^4为H、烷基或取代的烷基；

[0012] X^1至X^2独立地选自O、S、NH、H、烷基、卤素、OH、SH或NH_2；

[0013] W为基本上由氢和碳原子组成的具有1个至15个碳原子的饱和非环状烃链；

[0014] Z为CH_3或者任何中性或带正电荷的基团。

[0015] 在另一方面，提供了式(I)的抗生素化合物：

[0016] 

I

[0017] 或其盐或立体异构体；

[0018] 其中R^1至R^3、R^5和R^6独立地选自H、烷基、取代的烷基、卤素、OH、NH_2或SH；

[0019] R^4为H、烷基或取代的烷基；

[0020] X^1至X^2独立地选自O、S、NH、H、烷基、卤素、OH、SH或NH_2；

[0021] Y为具有2个至20个碳原子的非环状烃链或具有2个至20个碳原子的取代的非环状烃链，条件是Y不包含氧原子；

[0022] Z为CH_3或者任何中性或带正电荷的基团。

附图说明

[0023] 图1示出用于评估korormicin对感染沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)的人细胞的作用的实验设计。

[0024] 图2示出用于评估PEG-2对感染沙眼衣原体的人细胞的作用的实验设计。

[0025] 图3示出用于滴定图2所示的P5PEG-2处理的实验设计。

[0026] 图4示出korormicin与PEG-2的结构对齐比较。

[0027] 图5示出korormicin对感染沙眼衣原体的海拉细胞的作用。

[0028] 图6示出在用korormicin进行5次连续处理后，侵入的沙眼衣原体下降。

[0029] 图7示出korormicin对于原代血管平滑肌细胞的毒性作用。

[0030] 图8示出PEG-2对于原代血管平滑肌细胞不存在毒性作用。

[0031] 图9示出PEG-2对感染沙眼衣原体的海拉细胞的作用。

[0032] 图10示出图9所示的作用的定量。

[0033] 图11示出在用PEG-2进行5次连续处理后，侵入的沙眼衣原体下降。

[0034] 图12示出沙眼衣原体感染的海拉细胞的PEG-2处理(10μM)作为传代数的函数。

[0035] 图13示出沙眼衣原体感染的海拉细胞的PEG-2处理(15μM)作为传代数的函数。

[0036] 图14示出在感染沙眼衣原体的海拉细胞中PEG-2相对于korormicin的功效的比较。

[0037] 图15示出用于海拉细胞毒性和抗衣原体功效测试的高丝氨酸内酯的化学结构。

[0038] 图16示出PEG-2对初始沙眼衣原体诱导的细胞质酸化的作用。

[0039] 图17示出在感染后的各个时间点(0小时、2小时和24小时),PEG-2对沙眼衣原体诱导的细胞质酸化的作用。

[0040] 图18示出由沙眼衣原体感染高葡萄糖培养基中的HEK293细胞培养物引起的细胞质pH(A)和Na^+含量(B)的变化。

[0041] 图19示出PEG-2以剂量依赖性方式起作用以降低衣原体感染期间的内含物数目,在第2次、第3次、第4次和第5次连续处理后对内含物数目进行计数。

[0042] 图20示出PEG-2S是高度选择性的抗-Na^+-NQR试剂,因为在任何测试浓度添加的PEG-2S下,在液体培养基中属于良性肠道微生物区系的三种Na^+-NQR-阴性物种的生长得率不受影响。

[0043] 图21示出直接在亚细菌霍乱弧菌囊泡中测量的PEG-2S对Na^+-NQR的抑制:(A)dNADH的PEG-2S敏感性氧化不存在于Na^+-NQR缺陷的膜中(迹线(a)),而含Na^+-NQR的膜以PEG-2S敏感方式使dNADH氧化(迹线(b));以及(B)作为[PEG-2S]的函数绘制的归一化Na^+-NQR活性(100%对应于抑制剂不存在时的活性)用于计算PEG-2S抑制的IC_{50}。

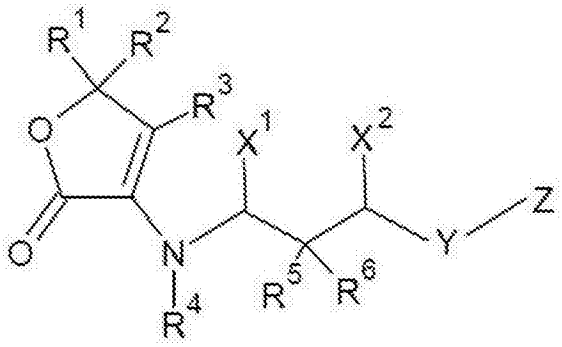
[0044] 图22示出PEG-2S破坏HEK293细胞培养物中的衣原体感染:用1μM和2.5μM PEG-2S的处理防止被沙眼衣原体感染的HEK293细胞中的细胞质pH(A)和[Na^+](B)的变化(图为8次独立实验的平均值,并示出标准差,$P<0.003$)。

[0045] 图23示出PEG-2的衍生物的化学结构的实例。

[0046] 图24示出PEG-2的衍生物对沙眼衣原体感染的海拉细胞提供有效处理。

具体实施方式

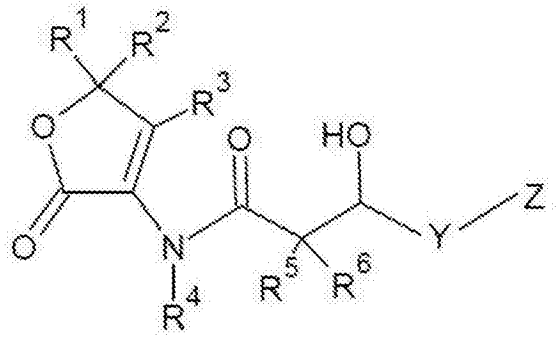
[0047] 本文所述的化合物、制剂、组合物、治疗方法以及药物发现的方法和系统涉及式I、II、III或IV,其中式I涵盖式II、III或IV,以及式III涵盖式IV:



I

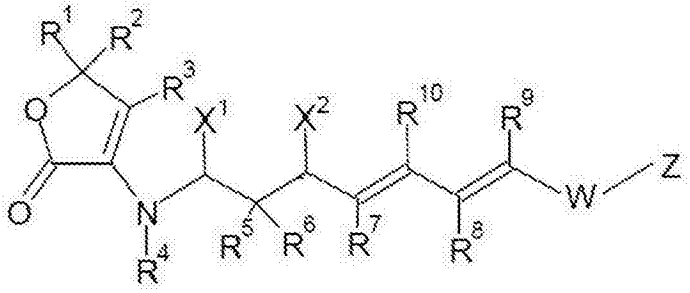
或

[0048]



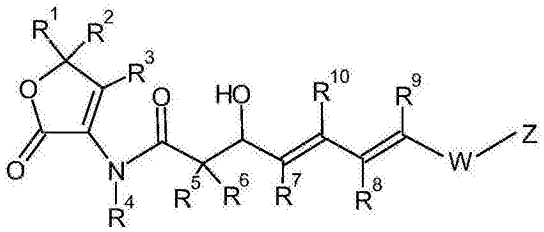
II

或



III

或



IV

[0049] 其中R^1至R^3和R^5至R^{10}独立地选自H、烷基、取代的烷基、卤素、OH、NH_2或SH；

[0050] R^4为H、烷基或取代的烷基；

[0051] X^1至X^2独立地选自O、S、NH、H、烷基、卤素、OH、SH或NH_2；

[0052] Y为具有2个至20个碳原子的非环状烃链或具有2个至20个碳原子的取代的非环状烃链；

[0053] W为具有1个至15个碳原子的非环状烃链或具有1个至15个碳原子的取代的非环状烃链；

[0054] Z为CH_3或者任何中性或带正电荷的基团。

[0055] 式I、II、III和IV共同具有与非环状侧链N-连接的呋喃酮环。正如从式I、II、III和IV中显而易见的，呋喃酮环和N-连接的侧链均可以适应各种取代基。

[0056] 在某些实施方案中，可以进一步限定式I、II、III或IV的组成。在一个实例中，R^1至R^{10}独立地选自H或C1至C5烷基或C1至C5取代的烷基。在另一实例中，R^1至R^{10}独立地选自H或C1至C4烷基或C1至C4取代的烷基。在另一实例中，R^1至R^{10}独立地选自H或C1至C3烷基或C1至C3取代的烷基。在另一实例中，R^1至R^{10}独立地选自H或C1至C2烷基或C1至C2取代的烷基。在另一实例中，R^4为H。在另一实例中，R^1至R^3独立地选自H或C1至C2烷基，R^5至R^{10}独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^4为H。

[0057] 在另一实例中，X^1至X^2独立地选自O、S、H、C1-C3烷基、卤素、OH、SH。在另一实例中，X^1至X^2独立地选自O、S、H、卤素、OH、SH。在另一实例中，X^1至X^2独立地选自H、O、S、OH或SH。在另一实例中，X^1至X^2独立地选自H、O或OH。在另一实例中，X^1为O并且X^2为OH。在另一实例中，X^1为O并且X^2为H。

[0058] 在另一实例中，Y为具有4个至20个碳原子的非环状烃链或具有4个至20个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，Y为具有2个至14个碳原子的非环状烃链或具有2个至14个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，Y为具有2个至12个碳原子的非环状烃链或具有2个至12个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，Y为具有2个至10个碳原子的非环状烃链或具有2个至10个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，Y为具有2个至8个碳原子的非环状烃链或具有2个至8个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，Y不包括环氧基团。在另一实例中，Y不包括溴基团。在另一实例中，Y不包括氧原子。在另一实例中，Y包括至少一个碳碳双键。在另一实例中，Y基本上由氢和碳原子组成，涵盖不会实质上改变毒性和明确不包括任何环氧基团的变型。在另一实例中，Y仅由氢和碳原子组成。

[0059] 在另一实例中，W为具有1个至12个碳原子的非环状烃链或具有1个至12个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，W为具有1个至10个碳原子的非环状烃链或具有1个至10个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，W为具有1个至8个碳原子的非环状烃链或具有1个至8个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，W为具有1个至6个碳原子的非环状烃链或具有1个至6个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，W为具有1个至4个碳原子的非环状烃链或具有1个至4个碳原子的取代的非环状烃链。在另一实例中，W不包括环氧基团。在另一实例中，W不包括溴基团。在另一实例中，W不包括氧原子。在另一实例中，W基本上由氢和碳原子组成并且是饱和的，涵盖不会实质上改变毒性和明确不包括任何环氧基团的变型。在另一实例中，W仅由氢和碳原子组成。

[0060] 在另一实例中，Z不包括环氧基团。在另一实例中，Z不包括溴基团。在另一实例中，Z不包括氧原子。在另一实例中，Z为CH_3或有机基团。在另一实例中，Z为包含氮原子的有机基团。在另一实例中，Z为包含磷原子的有机基团。在另一实例中，Z为CH_3或带正电荷的有机基团。在另一实例中，Z为卤素。在另一实例中，Z为CH_3、三苯基膦(3PhP)基团、胍基团、氨基萘嵌间二氮杂苯基团、阿米洛利(amiloride)基团或卤素。在另一实例中，化合物的分子量小于2000道尔顿。在另一实例中，化合物的分子量小于1000道尔顿。

[0061] 在另一实例中，式I、II、III或IV的化合物将具有至少两个手性中心，例如图4所示的5S和3′R手性中心。在另一实例中，式I、II、III或IV的化合物将仅具有两个手性中心，例如图4所示的5S和3′R手性中心。

[0062] 在另一实例中，提供式I、II、III或IV的化合物，其中R^1至R^3独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^5至R^{10}独立地选自H或C1至C5烷基；R^4为H；X^1至X^2独立地选自O、S、H、烷基、卤素、OH、SH；Y为具有2个至20个碳原子的非环状烃链或具有2个至20个碳原子的取代的非环状烃链；W为具有1个至15个碳原子的非环状烃链或具有1个至15个碳原子的取代的非环状烃链；Z为包含氮原子的中性或带正电荷的基团，任选地，氮原子与Y或W的碳原子形成共价键。

[0063] 在另一实例中，提供式I、II、III或IV的化合物，其中R^1至R^3独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^5至R^{10}独立地选自H或CH_3；R^4为H；X^1至X^2独立地选自O、S、H、OH或SH；Y为具有2个至12个碳原子的非环状烃链或具有2个至12个碳原子的取代的非环状烃链；W为具有1个至8个碳原子的非环状烃链或具有1个至8个碳原子的取代的非环状烃链；Z为包含氮原子的中性或带正电荷的基团，任选地，氮原子与Y或W的碳原子形成共价键。

[0064] 在另一实例中，提供式I、II、III或IV的化合物，其中R^1至R^3独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^5至R^{10}独立地选自H或C1至C5烷基；R^4为H；X^1至X^2独立地选自O、S、H、烷基、卤素、OH、SH；Y为具有2个至20个碳原子的非环状烃链或具有2个至20个碳原子的取代的非环状烃链；W为具有1个至15个碳原子的非环状烃链或具有1个至15个碳原子的取代的非环状烃链；Z为包含磷原子的中性或带正电荷的基团，任选地，磷原子与Y或W的碳原子形成共价键。

[0065] 在另一实例中，提供式I、II、III或IV的化合物，其中R^1至R^3独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^5至R^{10}独立地选自H或CH_3；R^4为H；X^1至X^2独立地选自O、S、H、OH或SH；Y为具有2个至12个碳原子的非环状烃链或具有2个至12个碳原子的取代的非环状烃链；W为具有1个至8个碳原子的非环状烃链或具有1个至8个碳原子的取代的非环状烃链；Z为包含磷原子的中性或带正电荷的基团，任选地，磷原子与Y或W的碳原子形成共价键。

[0066] 在另一实例中，提供式I、II、III或IV的化合物，其中R^1至R^3独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^5至R^{10}独立地选自H或C1至C5烷基；R^4为H；X^1至X^2独立地选自O、S、H、烷基、卤素、OH、SH；Y为具有2个至20个碳原子的非环状烃链或具有2个至20个碳原子的取代的非环状烃链；W为具有1个至15个碳原子的非环状烃链或具有1个至15个碳原子的取代的非环状烃链；Z为卤素。

[0067] 在另一实例中，提供式I、II、III或IV的化合物，其中R^1至R^3独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^5至R^{10}独立地选自H或CH_3；R^4为H；X^1至X^2独立地选自O、S、H、OH或SH；Y为具有2个至12个碳原子的非环状烃链或具有2个至12个碳原子的取代的非环状烃链；W为具有1个至8个碳原子的非环状烃链或具有1个至8个碳原子的取代的非环状烃链；Z为卤素。

[0068] 在另一实例中，提供式I、II、III或IV的化合物，其中R^1至R^3独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^5至R^{10}独立地选自H或C1至C5烷基；R^4为H；X^1至X^2独立地选自O、S、H、烷基、卤素、OH、SH；Y为具有2个至20个碳原子的非环状烃链或具有2个至20个碳原子的取代的非环状烃链；W为具有1个至15个碳原子的非环状烃链或具有1个至15个碳原子的取代的非环状烃链；Z为CH_3。

[0069] 在另一实例中，提供式I、II、III或IV的化合物，其中R^1至R^3独立地选自H或C1至C3烷基，并且R^5至R^{10}独立地选自H或CH_3；R^4为H；X^1至X^2独立地选自O、S、H、OH或SH；Y为具有2个至12个碳原子的非环状烃链或具有2个至12个碳原子的取代的非环状烃链；W为具有1个至8个碳原子的非环状烃链或具有1个至8个碳原子的取代的非环状烃链；Z为CH_3。

[0070] 本文所述的化合物可以用于治疗人或非人动物的对象或患者。考虑了哺乳动物的

治疗，包括例如人、灵长类、啮齿类、狗、猫、牛、猪、马或羊。考虑了治疗的禽类包括，例如，鸡或火鸡。

[0071] “治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指治疗、防止和预防，并且特别指对于患者施用药物或实施医疗程序以用于预防(防止)或在患者受到折磨的情况下治疗虚弱或疾病。

[0072] “治疗剂”是指对宿主能够具有期望的生物效应的试剂。抗生素试剂是治疗剂的实例，所述治疗剂在来源上通常已知是化学制品(与生物制品相反)通常具有分子量小于2000道尔顿的小分子结构。

[0073] 术语“治疗有效量”是指当施用于需要此类治疗的对象时，足以实现治疗的试剂、调节剂、药物或其它分子的量。治疗有效量将根据治疗的对象和疾病状况、对象的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式等而变化，其可以由本领域普通技术人员容易地确定。

[0074] 当用于提及功能性质或生物活性或过程时(例如酶活性或受体结合)，术语“调节”是指上调(例如，激活或刺激)、下调(例如，抑制或阻抑)或以其它方式改变此类性质、活性或过程的特性的能力。

[0075] 调节剂包括，例如多肽、核酸、大分子、复杂分子、小分子、化合物、物质或类似物(天然存在或非天然存在的)，或者由能够引起调节的诸如细菌、植物、真菌或动物细胞或组织的生物材料制成的提取物。

[0076] 可以通过测定中的内含物来评估调节剂作为功能性质、生物活性或过程或其组合的抑制剂或活化剂(直接或间接)的潜在活性(例如，激动剂、部分拮抗剂、部分激动剂、反向激动剂、拮抗剂、抗微生物剂、微生物感染或增殖的抑制剂等)。在此类测定中，可以同时筛选许多调节剂。调节剂的活性可以是已知的、未知的或部分已知的。

[0077] 本领域技术人员通过常规测试易于确定抗生素化合物施用的剂量范围。剂量不应大到引起不利的副作用，例如不需要的交叉反应、过敏反应等。通常，剂量将随患者的年龄、病况、性别和疾病程度而变化并且可以通过本领域技术人员来确定。可以在任何禁忌症的情况下通过个人医师调整剂量。

[0078] 无论经口服、鼻、阴道、直肠、眼外、肌内、皮内、皮下或静脉内施用等，剂量、剂量方案和施用途径可以变化。

[0079] 本文所述的抗生素化合物可以在治疗上与药学上可接受的载体组合使用。药学上可接受的是指那些成分、组合物及其剂量在合理医学判断的范围内，在没有过多毒性、刺激、变态反应或其它问题或并发症的情况下，适合用于与人类和动物的组织接触，与合理的益处/风险比相称。药学上可接受的载体对于本领域技术人员是已知的。这些最常见的是用于向人施用组合物的标准载体，包括溶液，例如无菌水、盐水和生理pH的缓冲溶液。

[0080] 药学上可接受的载体包括液体载体、固体载体或两者。液体载体包括但不限于水、盐水、生理可接受的缓冲剂、水性悬浮液、油乳液、油包水乳液、水包油包水乳液、位点特异性乳液、长效乳液、粘性乳液、微乳液和纳米乳液。水性载体的实例包括水、盐水和生理可接受的缓冲剂。非水性载体的实例包括矿物油或中性油，包括但不限于甘油二酯、甘油三酯、磷脂、脂质、油以及它们的混合物。固体载体为生物载体、化学载体或两者，并且包括例如颗粒、微粒、纳米颗粒、微球、纳米球、微型泵、细菌细胞壁提取物以及允许组合物持续释放的生物可降解或生物不可降解的天然聚合物或合成聚合物。

[0081] 可以将意图用于药物递送的分子配制在药物组合物中。除了选择的分子以外，药物组合物还可以包含可接受的载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等。药物组合物还可以包含一种或多种具有生物活性的活性成分，例如抗微生物剂、消炎剂、麻醉剂、过敏减轻剂、疼痛减轻剂等。

[0082] 可以根据期望局部治疗还是系统治疗以及待治疗的区域以多种方法施用组合物。施用可以是局部的(包括眼睛、阴道、直肠、鼻内)、口服、通过吸入或非肠道的，例如通过静脉滴注、皮下、腹膜内或肌内注射。可以根据本领域技术人员使用的标准程序来施用组合物。

[0083] 对于本文所述的任何特定化合物，可能需要鉴定有效剂量或量以及对制剂的施用时间的任何可能影响。这可以通过常规实验使用一个或多个动物组(例如使用至少5只动物/组)或者在人试验中(若适当)来完成。可以通过施用化合物和通过测量与所关注的疾病或病况有关的一种或多种指数评估施用效果，以及将治疗后这些指数的值与治疗前的相同指数的值进行比较，来评估任何化合物和方法的治疗或预防的效果。

[0084] 在给定患者中将产生最有效治疗的精确的施用时间和任何特定化合物的量可以取决于特定化合物的活性、药代动力学和生物利用度，患者的生理状况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定剂量的反应性和药物类型)，施用途径等。

[0085] 在治疗对象时，可以通过在24小时期间在预定的时间测量一种或多种相关指数来监测对象的健康。可以根据此类监测结果使治疗(包括补充剂、量、施用时间和制剂)最优化。可以定期再评估对象以通过测量相同的参数确定改善程度，第一次此类再评估通常发生在开始治疗的四周末，并且在治疗期间每四周至八周发生随后的再评估，然后，此后每三个月发生再评估。治疗可以持续数月或甚至数年，对于人，最少两周是典型的治疗长度。根据这些再评估，可以进行施用试剂的量和可能的施用时间的调整。

[0086] 可以以小于化合物的最佳剂量的较小剂量开始治疗。此后，可以小增量增加剂量直至获得最佳治疗效果。

[0087] 本文所述的若干化合物或可选的其它抗生素试剂的组合使用可以降低任何单个组分的所需剂量，这是因为不同组分的作用的开始和持续时间可以是互补的。在此类组合治疗中，不同的活性剂可以一起或单独递送，并且在一天内同时或不同的时间递送。

[0088] 可以通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中确定主题化合物的毒性和治疗功效，例如，用于确定LD50和ED50。表现出大的治疗指数的组合物是有利的。尽管可以使用表现出毒性副作用的化合物，但是应小心设计剂量范围、制剂或使化合物靶向期望位点以降低副作用的递送系统。

[0089] 可以将从细胞培养物测定和非人动物研究中获得的数据用于制定用于人的剂量范围。本文的任何补充剂或可选地任何组分的剂量可以位于循环浓度的范围内，所述循环浓度包括具有很少的或没有毒性的ED50。剂量可以根据所采用的剂型和利用的施用途径在该范围内变化。对于本文所述的试剂，可以最初从细胞培养物测定中估算治疗有效剂量。可以在动物模型中制定实现包括如在细胞培养物中确定的IC50(即，实现对症状的半数最大抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围的剂量。可以将此类信息用于更加精确地确定用于人的剂量。例如，可以通过高效液相色谱来测量血浆水平。

[0090] 本文所述的化合物可以用于抗生素治疗人或非人动物的对象或患者。抗生素治疗

可以用于抑制各种细菌的生长和调节细菌感染。不希望受理论束缚，抗生素治疗可以包括与Na^+-转位NADH:泛醌氧化还原酶(Na^+-NQR)蛋白或肽的相互作用和/或可以包括调节Na^+-NQR活性。

[0091] 不希望受理论束缚，本申请的发明人已经开发了用于解释Na^+循环和钠动力泵如何可以在细菌感染过程中起作用的模型。具体地，模型表明，靶向细菌中的Na^+-转位NADH:泛醌氧化还原酶(Na^+-NQR)作为控制细菌复制和存活的机制。Na^+-NQR为不同寻常的呼吸酶，其通过醌利用NADH氧化的能量作为初级钠泵发挥功能，以从细胞质中排出Na^+离子。因此，产生可以直接用于代谢作用的钠动力，所述代谢作用包括氨基酸的输入和多耐药性泵的操作。重要的是，Na^+-NQR存在于许多病原菌中，但是其不存在于人细胞的线粒体中以及不存在于属于正常胃肠微生物区系的物种中。因此，这种酶的特异性靶向可以在人细胞中和胃肠微生物区系中产生比通常的处方抗生素更少的非特异性副作用。

[0092] 细菌代谢中的Na^+-NQR的机制途径和参与可以出现在若干步骤中。侵入细菌对任何可用的细胞内ATP的消耗导致Na^+泵慢化，这可以使从受感染的细胞中去除Na^+减速。由入侵细菌刺激的糖酵解可以通过引起细胞质的酸化来间接增强Na^+过载，这最终激活Na^+/H^+交换蛋白(NHE1)以将更多的Na^+输入细胞中，以交换细胞内H^+的去除。当细胞内的ATP和葡萄糖的库耗尽时，病原菌可以转变成氨基酸分解代谢，这有效增加细胞质的pH。由于Na^+泵的活性受到抑制，细胞内Na^+离子的浓度保持升高。Na^+-NQR为不同寻常的呼吸酶，其通过醌利用NADH的氧化能量用作初级钠泵发挥功能，以从细胞质中排出Na^+离子。因此，产生可以直接用于代谢作用的钠动力，所述代谢作用包括氨基酸的输入和多耐药性泵的操作。在这些条件下，病原菌依靠Na^+-NQR供给摄取氨基酸的能量，这可以经由包括Na^+-氨基酸同向转运在内的若干途径发生。因此，在这些条件下，Na^+-NQR的抑制应导致不能提供能量来支持氨基酸摄取以恢复正常的离子平衡。

[0093] Na^+-NQR是需氧性病原体中的主要呼吸Na^+泵。系统发生分析示出，可能是由于侵入病原体在定殖的大型有机体的不利微环境中难以维持足够高的质子动力(PMF)，完整Na^+-循环的变型以及仅有的初级Na^+泵在病原菌中过度出现。Na^+-NQR的广泛分布及其在毒性特性的调控中的意义使得这种酶成为用于开发新型抗生素的吸引人的候选物，尤其是最近在Na^+-NQR结构的研究中期待已久的突破之后(Steuber等人，Structure of the V.cholerae Na^+-pumping NADH:quinone oxidoreductase.Nature.2014;516:62-67)。

[0094] Na^+-NQR存在于许多病原菌中。因此，其影响广泛病原菌的进程的可能性是大的。可能地，任何含Na^+-NQR的病原菌可以对靶向Na^+-NQR的药物是敏感的。含有Na^+-NQR的许多物种以及与这些细菌相关的疾病的不完全和示例性列表示于表1中。

[0095] 表1.含Na^+-NQR的细菌和与这些感染有关的疾病。

[0096]

有机体	革兰氏(Gram)	引起的疾病
霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)	(-)	(霍乱)
副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)	(-)	(急性胃肠炎)
创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)	(-)	(溃疡，GE 感染)
胃肠炎弧菌(*Vibrio gastroenteritis*)	(-)	(急性胃肠炎)
海鱼弧菌(*Vibrio damsela*)	(-)	(创伤感染，败血症)
河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)	(-)	(食源性腹泻)
弗尼斯弧菌(*Vibrio furnissii*)	(-)	(食源性腹泻)
哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)	(-)	(食源性腹泻)
霍氏弧菌(*Vibrio hollisae*)	(-)	(食源性腹泻)
肋生弧菌(*Vibrio costicola*)	(-)	(食源性腹泻)
拟肽弧菌(*Vibrio mimicus*)	(-)	(食源性腹泻)
辛辛那提弧菌(*Vibrio cincinnatiensis*)	(-)	(食源性腹泻)
维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)	(-)	(创伤感染，腹泻)
豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)	(-)	(胃肠炎)
嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)	(-)	(军团病)
齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)	(-)	(坏死性龈炎)
牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)	(-)	(成人牙周炎)

[0097]

福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)	(-)	(牙周炎)
伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)	(-)	(青少年牙周炎)
脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitides*)	(-)	(脑膜炎)
淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)	(-)	(淋病)
干燥奈瑟菌(*Neisseria sicca*)	(-)	(肺炎，心内膜炎)
流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)	(-)	(肺炎支原体，耳炎)
杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)	(-)	(软下疳)
绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)	(-)	(肺和皮肤感染)
类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)	(-)	(腹膜炎)
非共生发光杆菌(*Photorhabdus asymbiotica*)	(-)	(损伤)
肠道沙门氏菌(*Salmonella enteric*) (副伤寒沙门氏菌)	(-)	(副伤寒热)
肠道沙门氏菌(*Salmonella enteric*) (伤寒沙门氏菌)	(-)	(伤寒热)
肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumonia*)	(-)	(肺炎)
鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)	(-)	(瘟疫)
假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)	(-)	(远东类猩红热)
肺炎嗜衣原体(*Chlamydophila pneumonia*)	(-)	(支气管炎，肺炎)
沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)	(-)	(沙眼，阴道炎)
Simkania negevensis Z	(-)	(青少年肺炎和急性细支气管炎)
嗜树丛瓦德氏菌(*Waddlia chondrophila*)	(-)	(人胎死亡)
多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)	(-)	(损伤)
变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)	(-)	(肺炎)
脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)	(-)	(腹膜感染)
卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)	(-)	(呼吸道感染、中耳感染、眼睛感染、CNS感染)

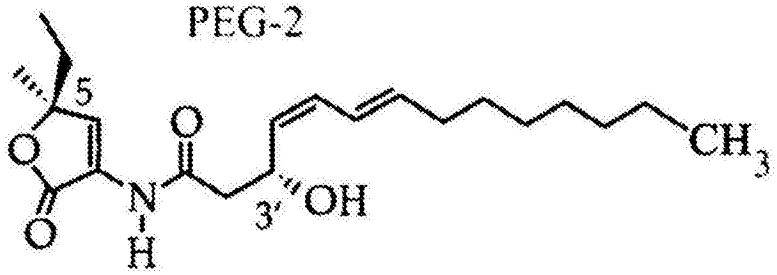
[0098] 含Na^+-NQR的病原体的示例性实例发现在β-变形菌门和γ-变形菌门(肠杆菌目、Vibrionalle、巴斯德氏菌目、气单胞菌目、假单胞菌目、Neisserale)、拟杆菌和衣原体(衣原体可以通过水平基因转移已经接受了Na^+-NQR)中。

[0099] 革兰氏阳性梭状芽孢杆菌(艰难梭状芽胞杆菌(Clostridium difficile)和其它病原性梭状芽孢杆菌，例如产气荚膜梭菌(C.perfringens)(坏疽，食物中毒)、破伤风梭菌(C.tetani)(破伤风)、肉毒梭菌(C.botulinum))，具有原始形式的被称为RFN的Na^+-NQR酶。RFN含有亚基RfnD，其与NqrB(被korormicin靶向)同源，但是来自NqrB的Gly140-Gly141对

不保存在RfnD中。

[0100] 为了示例性目的，如以式I、II、III或IV的化合物为特征的具有呋喃酮环和N-连接的取代烃链的化合物，已经通过化学合成并且在第一组实验性实例中测试了其抗生素活性。所述化合物被称为PEG-2并且其化学结构为：

[0101] PEG-2



[0102] 在沙眼衣原体感染的海拉细胞的模型测定中进行PEG-2抗生素活性的证明。还将PEG-2活性与korormicin和各种高丝氨酸内酯比较。这第一组实验性实例仅出于示例目的，并不意图是限制性描述。

[0103] 按照以下进行沙眼衣原体(C.trachomatis)的增殖和处理。沙眼衣原体在海拉细胞中增殖。在环己酰胺(cyclohexamide)处理的海拉细胞中测定沙眼衣原体的滴度，并且所用的浓度表示为内含物形成单位(IFU)/mL。

[0104] 将PEG-2溶于DMSO(原液浓度50mM)中。在用PEG-2处理期间，制备随后的稀释液并且总是将相应量的DMSO添加至对照中。

[0105] 按照以下进行细胞毒性测定。将海拉细胞、HEK293细胞和原代VSM细胞以5×10^3个细胞/孔接种在96孔板中，并且用含有1％胎牛血清的DMEM中的Korormicin、PEG-2或高丝氨酸内酯孵育。在48小时后，根据活细胞中存在的细胞质酶活性，通过酶比色测定确定活细胞的数目。

[0106] 按照以下确定感染水平的评估。将海拉细胞以3×10^4个细胞/孔接种在24孔板的玻璃盖玻片上，用沙眼衣原体接种，然后用抗生素(或其它目标化合物)处理。在48小时后，将感染的细胞用100％甲醇固定，然后与抗衣原体单克隆抗体一起孵育。通过用FITC缀合的第二抗体和DAPI作为复染色进行染色使包涵体可视化。通过荧光显微镜检查样品。计算每100个细胞的内含物的数目。

[0107] 按照以下进行Korormicin(图1所示的方案)和PEG-2(图2所示的方案)的抗衣原体活性的评估。用沙眼衣原体感染细胞，并且用选择的不同浓度的抗生素进行处理。在48h后，收集沙眼衣原体(P1)，并将其用于感染新鲜细胞。随后收集沙眼衣原体用于获得P2、P3、P4和P5的沙眼衣原体原液。在用PEG-2处理后，用于感染细胞的沙眼衣原体的稀释必须最小化，以便使内含物可视化(参见图2所示的方案)。将Korormicin处理的最后一代收集的沙眼衣原体(P5)和用PEG-2处理的所有收集的沙眼衣原体传代用于建立经处理的衣原体的感染性(图3所示的方案)。

[0108] 图4示出了korormicin结构与PEG-2结构的比较。PEG-2是环氧基团被去除的korormicin衍生物的分子。

[0109] 在1997年，Yoshikawa等人(2007年4月18日公开的日本专利3905604B2)从海洋细菌假交替单胞菌F-420中分离korormicin，并且证明了korormicin对革兰氏阴性海洋弧菌生长的抑制活性。Korormicin是目前可以用来抑制Na^+-NQR的最好的、最具有特异性的抑制

剂。Korormicin是由Na^+-NQR引起的醌还原的特定的、非常有效的抑制剂，具有82pM的抑制剂常数(而HQNO具有300nM的Ki)。HQNO和korormicin在Na^+-NQR复合物中具有共同的结合位点(互相排斥的抑制剂)。这表明了可能的可及性问题，因为仅痕量的添加的抗生素实际上达到其靶标(Na^+-NQR)。此外，koromicin还从未开发用于动物，更特别地为哺乳动物并且甚至更特别地为人。因此，第一实验性目标为确定korormicin对动物细胞(例如人细胞)的细胞内感染的功效。第二实验性目标为设计koromicin的替代物，并且在动物细胞(例如人细胞)的细胞内感染的情况下比较毒性和/或功效结果。

[0110] 图5和图6示出korormicin对真核细胞(更特别地，人细胞)的沙眼衣原体感染是有效的。然而，korormicin在细胞培养物模型中的这些浓度比在单独的Na^+-NQR(Ki为约80pM)的制剂中的浓度高约10,000倍(微摩尔范围)。因此，这些结果看起来确认了假定的可及性问题。此外，图7示出在korormicin示出抗生素作用的相同浓度处的korormicin对原代细胞是有毒的。Korormicin对于动物细胞(更特别地，人细胞)的毒性问题是先前未认识到的新发现，并且还并未记载在现有公开文献中。这些数据明确表明天然korormicin对于作为用于人的治疗的抗生素是无用的。

[0111] 图8示出PEG-2对于真核细胞(更特别地，人细胞)是无毒的。此外，海拉细胞系和HEK293细胞系以及原代血管平滑肌细胞的检查已经发现在PEG-2浓度高达50μM(未示出)时无毒性作用。

[0112] 图9至图13示出PEG-2作为针对真核细胞(更特别地，人细胞)的沙眼衣原体感染的抗生素是有效的。此外，图14示出PEG-2作为抗衣原体试剂比天然korormicin几乎更有效1,000倍。因此，PEG-2改善了korormicin对于人细胞的微生物感染的抗生素治疗的毒性和功效。此外，PEG-2代表用于其它药物设计的优异平台。

[0113] 还研究了高丝氨酸内酯可以在真核生物中作为抗生素发挥功能的可能性。代表性高丝氨酸内酯示出在图15中。表2提供的结果示出测试的高丝氨酸内酯或者对于人细胞是高毒性的(N-3-氧代-十二烷酰基-L-高丝氨酸内酯)或者作为抗衣原体试剂是无效的(其余三种高丝氨酸内酯)。这些结果表明PEG-2的呋喃酮环对于PEG-2抗生素活性的功效可能是重要的贡献者。

[0114] 表2.高丝氨酸内酯对海拉细胞活力和抗沙眼衣原体功效的作用。

[0115]

		PEG-2 对海拉细胞系的细胞毒性(浓度 μM)				PEG-2 抗衣原体的作用(浓度 μM)			
名称	式	12.5	25	50	100	12.5	25	50	100
N-癸酰基-L-高丝氨酸内酯	$C_{14}H_{25}NO_3$	无	无	无	无	无	无	无	无
N-丁酰基-L-高丝氨酸内酯	$C_8H_{13}NO_3$	无	无	无	无	无	无	无	无
N-3-氧代-十二烷酰基-L-高丝	$C_{16}H_{27}NO_4$	有	有	有	有	n/a	n/a	n/a	n/a

[0116]

氨酸内酯									
N-己酰基-L-高丝氨酸内酯	$C_{10}H_{17}NO_3$	无	无	无	无	无	无	无	无

[0117] 还通过监测用PEG-2处理的感染细胞的细胞内酸化来研究PEG-2的作用机制。如果PEG-2通过抑制Na^+-NQR和钠动力起作用，则预期其对感染细胞内的细胞内Na^+和H^+浓度具有作用。用沙眼衣原体感染海拉细胞，并且用荧光指示剂染料监测细胞内酸化。

[0118] 培养中的真核细胞的沙眼衣原体感染在感染开始时使宿主细胞的细胞质酸化。如图16和图17所示，PEG-2可以使初始沙眼衣原体诱导的酸化延迟至少2小时并且减弱之后的酸化。

[0119] 对细胞内H^+的这两种作用与针对病原菌感染鉴定的能量代谢提出的作用和通过抑制Na^+-NQR活性的PEG-2的分子作用机制一致。

[0120] PEG分子的其它合成，包括PEG-2的立体异构体，已经在第二组实验性实例中实现并且进行实验性测试以表明抗生素活性。在该第二组实验性实例中，PEG-2是以上第一组实验性实例中所述的非立体定向的呋喃酮抗生素，而PEG-2S是相应的立体定向的呋喃酮抗生素。以下第二组实验性实例仅出于示例目的，并不意图是限制性描述。

[0121] 自生细菌的生长的测定。按照以下测定合成Na^+-NQR抑制剂(PEG-2)对大肠杆菌(E.coli)、乳酸乳球菌(L.lactis)和粪肠球菌(E.faecalis)生长的作用。起子培养物(starter culture)在标准胰酶大豆肉汤(TSB,Difco)中过夜需氧生长，并且以0.05的初始OD600用于接种在96深孔板(Whatman)中的200μl TSB培养基中。将获得的培养物补充0.5μM、1.0μM、2.0μM、5.0μM、10.0μM、20.0μM和50.0μM PEG-2(或在“零”对照中，纯的DMSO)并且在37℃和强有力的通气下生长24h。在6h、18h和24h时，通过在Bio-Rad iMark酶标仪上扫描所述板，将生长测量为OD600。对于在18h和24h采集的样品，使用等份的细菌培养物制备与预热的生长培养基的连续稀释液。实验重复至少三次。

[0122] 根据抗微生物敏感性测试的执行标准(Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing)(用于厌氧细菌的抗微生物敏感性测试的方法；执行标准-第八版；第32卷，第5期，2012)通过点滴法在预还原的BAK板上进行PEG-2S对艰难梭状芽胞杆菌(C.difficile ATCC 700057)的评估。

[0123] 抗生素的抗衣原体特性的评估。为了确定MIC50(抑制50％衣原体内含物形成的抗生素的最小浓度)，在衣原体接种前，使海拉细胞在24孔板或96孔板中生长过夜。将原生小体应用于在小体积的SPG(0.22M蔗糖、8.6mM Na_2HPO_4、3.8mM KH_2PO_4、5mM谷氨酸，0.2μm过滤的，pH 7.4)中的细胞，在孵育2小时后，去除未附着的原生小体，并在环己酰亚胺(1.0μg/ml)存在下，用含5％胎牛血清(FBS,Invitrogen)的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM,Invitrogen)中的不同浓度的抗生素处理感染的细胞。在42h后，通过免疫细胞化学使内含物可视化。

[0124] 为了制止Korormicin(方案1)和PEG-2(方案2)的杀衣原体作用，用沙眼衣原体感染海拉细胞，并且用不同浓度的抗生素处理。在48h后，收集沙眼衣原体(P1)，并将其用于感染新鲜细胞。随后收集沙眼衣原体用于获得P2、P3、P4和P5的沙眼衣原体原液。在用PEG-2处理后，用于感染细胞的沙眼衣原体的稀释必须最小化，以便使内含物可视化(参见图2所示

的方案)。将Korormicin处理的最后一代收集的沙眼衣原体(P5)和用PEG-2处理的所有收集的沙眼衣原体传代用于建立经处理的衣原体的感染性。在处理2代的感染后,计算Korormicin、PEG-2和PEG-2S的最小杀衣原体浓度(MCC2),并且反映抑制超过90%的感染。在所有实验中,通过免疫细胞化学使内含物可视化。

[0125] 免疫细胞化学。将细胞接种在24孔板的玻璃盖玻片上(2×10^4至4×10^4个细胞/孔)或接种在玻璃底的96孔板上,并且在过夜后,接种沙眼衣原体。在42小时后,用90%丙酮(或100%甲醇,在96孔板的情况下)固定感染的细胞,然后与抗衣原体抗体(Thermo Fisher Scientific)孵育。将Alexa Fluor 488-缀合的抗兔IgG(Molecular Probes)用作第二抗体。将DAPI染色溶液(300nM)添加至盖玻片以鉴定细胞核。使用荧光倒置显微镜(TE-2000s;Nikon)使包涵体可视化。使用Adobe Stock Photos CS3.Ink软件对细胞和内含物计数。

[0126] 细胞增殖测定。将细胞以5×10^3个细胞/孔接种在96孔板中,并且与含有1%胎牛血清(FBS;Invitrogen Corp.)的DMEM中的沙眼衣原体一起孵育。在48小时后,根据活细胞中存在的细胞质酶活性,通过酶比色测定(CellTiter 96细胞增殖测定;Promega Corporation,Madison,WI)确定活细胞的数目(Cory等人,Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture.Cancer Commun.1991;3:207-212)。使用酶标仪测量500nm处组织培养基中的甲臜产物的吸光度。

[0127] 从霍乱弧菌细胞中制备亚细菌膜囊泡。如先前所述(Dibrov等人,Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag^+in vibrio cholerae.Antimicrob Agents Chemotherapy.2002;46:2668-2670),在一些改变的情况下,制备来自霍乱弧菌菌株的膜囊泡。通过离心收获对数中期细胞,洗涤一次,并且再悬浮于含有100mM KCl、50mM NaCl、5mM MgSO4、20mM HEPES-Tris并且pH 8.0的缓冲液A中。通过弗氏压碎器(Aminco)的通道以16,000psi使细胞破裂。通过低速离心去除未破裂的细胞和细胞碎片,并且在以180,000g使上清液离心90min后收集囊泡。将膜沉淀以20mg蛋白质/mL至30mg蛋白质/mL悬浮在缓冲液A中,在液氮中急速冷冻并且在-80℃下储存直至使用。通过Bio-Rad清洁剂相容的蛋白质测定试剂盒确定亚细菌囊泡中的蛋白质含量。

[0128] 亚细菌囊泡中的Na^+-NQR活性测定。霍乱弧菌的膜含有两种能够使NADH氧化的酶:Na^+-NQR和NDH-2(二型非偶联的NADH:泛醌氧化还原酶),但是仅有Na^+-NQR能够使dNADH(脱氨基-NADH或烟酰胺次黄嘌呤二核苷酸)氧化。当氧化dNADH($\varepsilon_{340}=6.22mM^{-1}cm^{-1}$)时,在25℃下测量亚细菌霍乱弧菌囊泡中$Na^+$-NQR的活性,然后使用Shimadzu RF-1501分光荧光计在440nm(激发光$\lambda=340nm$)测量其荧光变化。在补充有15μM Na^+-dNADH的缓冲液A中在持续搅拌下进行测定。通过添加囊泡(等份的50μg蛋白质)引发反应。校准测定确认在440nm处的荧光(作为实验缓冲液中[dNADH]的函数)在多至20μM添加的dNADH(未示出)时仍为线性。

[0129] 细胞培养物中细胞内pH和钠的测量。将pHrodo™ Green AM和CoroNa Green钠指示剂(均来自Molecular Probes,Invitrogen)用于测量细胞内pH(pH_i)和细胞内的钠(Na^+_i)浓度。将HEK293细胞接种在24孔板上,并且在具有5%FBS的DMEM中孵育过夜后,用沙眼衣原体感染。在与沙眼衣原体一起孵育2小时后,将细胞用不同浓度的PEG-2S处理,并且根据厂商的方案在不同的时间点进行pH_i和Na^+_i测量。在所有评估中,在实验前进行校准曲线。使用荧光倒置显微镜(TE-2000s Nikon)获得图像,使用NIS元素成像软件(Nikon,Mississauga,ON)对平均强度定量,以及使用NIS元素成像软件(Nikon,Mississauga,ON)对平均强度定

量。

[0130] 统计分析。数据表示为平均值±SEM,除非另外说明。使用Student-Newman-Keuls方法通过单向方差分析来评估处理组之间的差异。P≤0.05的概率被认为是统计学上显著的。

[0131] 衣原体入侵扰乱感染细胞的离子平衡。由沙眼衣原体感染HEK293细胞培养物引起的细胞质的pH和Na^+含量的变化示于图18中。未感染的对照的内部pH在观察过程中未变化(在2h和6h时间点时约7.75的值与在零时(未示出)该谱系的未感染细胞的pH相同),而在感染的细胞中,感染细胞质的pH在2h下降至约6.6并且6h达到约6.4(图18A)。假定被衣原体感染的细胞中的细胞质显著酸化,这是因为在开始感染时,这种寄生物快速消耗两种优选的能量底物(ATP和葡萄糖)。

[0132] 还假定由衣原体网状体(RB)的代谢活性引起的细胞质的相对酸化和宿主ATP库的消耗会(i)减缓通过Na^+/K^+ATP酶的Na^+输出,以及(ii)刺激通过存在宿主细胞膜中的Na^+/H^+反向转运蛋白的Na^+摄取,因此导致细胞内的钠升高。图18B呈现的未感染的和感染的HEK293细胞中的内部Na^+的平行测量,的确示出衣原体感染的细胞(黑色条)中的细胞质Na^+逐渐增加,但是在相对于观察到的酸化延迟的对照未感染细胞(空白条)中未增加。

[0133] 衣原体Na^+-NQR的抑制剂(korormicin)阻抑RB的增殖,但对于哺乳动物细胞是有毒的。类似于衣原体属的其它成员,沙眼衣原体编码Na^+-依赖性协同转运蛋白,用于积累许多重要底物,包括氨基酸和二羧酸酯。因此,维持跨膜钠梯度成为沙眼衣原体增殖的先决条件。由于Na^+-NQR是这种细菌中的主要的初级Na^+泵,因此它的抑制可能具有强的抗衣原体作用。已知Korormicin(最初从海洋细菌假交替单胞菌中分离的抗生素)是Na^+-NQR抑制剂和对海洋细菌有效但对陆地微生物无效的杀菌剂(Yoshikawa等人,Korormicin,a novel antibiotic specifically active against marine gram-negative bacteria,produced by a marine bacterium.J Antibiot.1997;50:949-953)。Korormicin吸引人的特征为(i)其高的效率(在单独的酶的制剂中,$K_i \approx 8 \times 10^{-11}$M)和(ii)特异性,因为其明显对$Na^+$-依赖性NADH氧化还原酶无作用。

[0134] 通过检查korormicin对细胞培养物模型中的沙眼衣原体生长的作用,在以上第一组实验性实例中评估korormicin用于靶向衣原体Na^+-NQR的潜在抗生素。已经发现,当以10μM至20μM的浓度添加时,korormicin对沙眼衣原体是有效的(图5和图6)。荧光显微镜图像明确表明了用korormicin处理的细胞培养物中的活的沙眼衣原体细胞的数目减少(图5)。在用korormicin进行五次连续处理后,感染性的急剧下降在10μM添加的抗生素下是明显的;在20μM时,衣原体内含物的数目低于对照的2%(图6)。Korormicin的计算的MIC_{50}(在第一次处理后)接近于3.00mM。该浓度超过了对于单独的Na^+-NQR测量的有效抑制浓度约六个数量级。考虑到korormicin分子的重要疏水性(图4)和许多膜屏障,此类显著差异似乎不是完全出人意料的,所述膜屏障可能可以在korormicin到达其原位靶标时将其清除。也可以认为,抗生素可以在一定程度上通过哺乳动物和/或衣原体细胞代谢。

[0135] 不幸的是,korormicin对哺乳动物细胞也具有明显的细胞毒性作用(图7)。将血管平滑肌细胞(VSMC)的原代培养物的增殖用作对可能的毒性损害的细胞应答的敏感性实验模型。如图7所示,细胞甚至对添加的纳摩尔浓度的抗生素是敏感的;浓度为5μM至15μM的korormicin使细胞滴度降低约10%。因此,尽管用korormicin的实验确认了Na^+-NQR在代

谢，以及因此，沙眼衣原体的增殖和感染性中的重要作用，但由于其在感染的细胞培养物模型中的毒性作用和低效率，这种抑制剂不能用作抗衣原体治疗，其可以被认为是感染的组织的合理的第1近似物。

[0136] 合成Na^+-NQR抑制剂(PEG-2)的设计。Korormicin和另一Na^+-NQR抑制剂(HQNO)能结合Na^+-NQR复合物的整合膜亚基NqrB，其含有跨膜Na^+转位途径。HQNO和korormicin是互相排斥的抑制剂，并且它们在NqrB上的结合位点虽然不相同，但可能重叠。koromicin的化学结构示出在图4中。Korormicin分子中的四个单独的手性中心允许八个可能的立体异构体，但是仅其中之一，(5S,3′R,9′S,10′R)异构体(图4所示)为天然抗生素。

[0137] HQNO和korormicin的作用模式表明类醌“头部”可以是负责结合NqrB的活性结构模块，并且极性基团的几何结构可以确定给定抑制剂的效能。两种结构也具有延长的脂肪族“尾部”，其对于跨越膜屏障和抑制剂与其靶标的对接(它们可能与来自脂质双层内的NqrB结合)可能是重要的。在koromicin中，共轭二烯(4′C-7′C)，随后在9′C-10′C的环氧基团可以起将korormicin的生物活性“头部”与混乱的“尾部”分离的刚性“间隔子”的作用。在9′C-10′C的环氧基团被鉴定为korormicin毒性的可能来源。已知其与氨基、羟基和羧基以及无机酸反应。已经报道了迟发性环氧皮炎和即刻性环氧皮炎。某些环氧化合物具有致突变可能性(即，它们可能是致癌的)。

[0138] 考虑所有这些结构考虑因素，无毒的Na^+-NQR抑制剂的设计采取以下方法：(i)为了消除天然korormicin的细胞毒性作用，将作为可能的毒性来源的天然korormicin的环氧基团从结构中去除。(ii)此外，将korormicin的脂肪族“尾部”缩短至7个碳原子，以可能减弱分子的整体疏水性，并且因此降低其有效的抗衣原体浓度。这种方法产生了化合物PEG-2(图4)，其已经示出为有效的Na+-NQR抑制剂并且可以用作进一步开发Na+-NQR抑制剂的结构平台。

[0139] PEG-2的药理学特性。由于在分子中存在两个手性中心，可能有PEG-2的四个立体异构体(参见图4)。将在Enamine Ltd(Kiev,Ukraine)进行的非立体定向合成过程中获得的PEG-2制剂用于以上所述的第一组实验性实例中。根据厂商的报告，这种对映体混合物含有不超过10％的图4所示假设的活性异构体。

[0140] 荧光显微镜确认，用PEG-2进行的单一处理对感染沙眼衣原体的海拉细胞具有强烈作用。与对照未处理的细胞培养物相比(图9，左图)，在PEG-2存在时形成的衣原体内含物是中空的(图9，右图)。它们也明显更小(图10)。因此，PEG-2保留抗衣原体活性。与korormicin直接比较示出，PEG-2的对映体混合物被认为更有效(图14)：在用15μMPEG-2进行5次连续处理后，内含物的数目为对照的0.01％，而在相同浓度的天然korormicin时，其为4.8％。因此，在这种感染模型中，给定批次的PEG-2的抗衣原体作用超过korormicin的抗衣原体作用至少2个数量级。PEG-2以剂量依赖性方式起作用。如图19所示，尽管用15μM PEG-2的对映体混合物的第一次处理导致感染性降低约5倍(如在下一代中衣原体内含物的数目所测量)，但是在5次连续处理后，可检测的内含物的数目降低了10,000倍。PEG-2S作为抗衣原体试剂甚至比PEG-2更有效(表3)：PEG-2S的MIC50为0.7μM，而PEG-2的MIC50为10μM。在两次连续处理后，这种趋势仍持续：PEG-2S的$MIC50_2$为0.25μM，而PEG-2的$MIC50_2$为4μM(表3)。

[0141] 表3.天然抗生素Korormicin和合成Na^+-NQR抑制剂PEG-2的杀衣原体特性。

[0142]

	Korormicin	PEG-2[a]	PEG-2S[e]
MIC50$_1$[b]	18 μM (8.28 μg/ml)	10 μM (3.63 μg/ml)	0.7 μM (0.25 μg/ml)
MIC50$_2$[c]	10 μM (4.6 μg/ml)	4 μM (1.45 μg/ml)	0.25 μM (0.09 μg/ml)
MCC2[d]	ND	15 μM (5.45 μg/ml)	1.0 μM (0.36 μg/ml)
a－对映体混合物，PEG-2，含有不超过10%的生物活性的立体异构体PEG-2S(根据厂商的报告)；b－处理后的最小抑制浓度；c－第二次处理后的最小抑制浓度；d－添加抗生素的最小杀衣原体浓度；e－纯立体异构体			

[0143] PEG-2是无毒且高选择性的抗菌剂。PEG-2以及PEG-2S对哺乳动物细胞提供低的细胞毒性的益处：与天然korormicin相比，高达20μM添加的PEG-2时，未检测到PEG-2对原代细胞培养物(VSMC)的毒性作用(图8;与图7相比)。因此，在9′C-10′C的koromicin环氧化物(参见图4)明显是koromicin的细胞毒性的主要原因。

[0144] 天然korormicin的最吸引人的特征之一为其作为抑制剂的高选择性。其专门抑制Na^+-NQR，并且这种酶在哺乳动物细胞以及大多数良性细菌微生物区系和自由生活的物种中不具有同源物。在这方面，Na^+-NQR的精确靶向性或选择性的抑制剂将是这样的“清洁抗生素”，其没有不需要的副作用，并且具有经由多种环境物种中的突变体选择引起抗药性不受控制的扩散和接着的横向基因转移(如目前使用常规抗生素发生的)的最小可能性。

[0145] 如图20所示，以1.0μM至50μM的浓度添加的PEG-2S不影响良性胃肠道微生物区系、大肠杆菌(上图)、粪肠球菌(中图)和乳酸乳球菌(下图)的Na^+-NQR-阴性代表的生长。通过标准纸片法进行病原性艰难梭状芽胞杆菌的生长对于PEG-2S的敏感性试验(其通常用于测试korormicin的抗微生物作用)，产生相同的结果：PEG-2S在测试浓度(0.5μM至50μM)时不影响艰难梭状芽胞杆菌ATCC 700057的生长(数据未示出)。需要注意，革兰氏阳性艰难梭状芽胞杆菌具有原始形式的Na^+-NQR，RNF。保存在所有已知的Na^+-NQR酶的NqrB亚基中并与korormicin的结合有关的Gly140残基不存在于RNF的同源性亚基中。因此，可以推断PEG-2和PEG-2S支持抑制作用的高选择性，其为korormicin的特征。

[0146] 由PEG-2S抑制Na^+-NQR的直接测量。可以在许多实验装置中测量Na^+-NQR的活性。在本工作的上下文中，尤其吸引人的模型是在亚细菌膜囊泡中Na^+-NQR-介导的NADH氧化的记录。这种方法可以直接实时监测Na^+-NQR活性，并且可以用在生理学相关背景(放置在其天然膜中，并且将取自NADH的电子供应给呼吸链)下操作的酶测试Na^+-NQR抑制剂，而无来自细胞质代谢的另外渗透性屏障和影响。

[0147] 来自危险的人病原体霍乱弧菌的Na^+-NQR是最广泛研究的代表性种类。因此，选择这种酶以测试PEG-2的抑制特性。对于在亚细菌囊泡中的这些实验，使用由Canam Bioresearch Inc(Winnipeg,Canada)的立体定向合成产生的PEG-2的纯化的活性立体异构体PEG-2S(结构示于图4中)。

[0148] 除了Na^+-NQR以外，霍乱弧菌的膜含有另一NADH氧化酶，非偶联的NDH-2(二型非偶联的NADH:泛醌氧化还原酶)。尽管Na^+-NQR以类似的速率氧化NADH及其类似物dNADH，但是NDH-2不能使用dNADH作为底物。因此，膜囊泡的dNADH氧化酶活性可以用于选择性地监测Na

$^{+}$-NQR。实际上，通过染色体nqrA-F缺失消除功能的Na^{+}-NQR导致分离自突变体霍乱弧菌菌株的膜囊泡不能氧化dNADH(图21A，迹线(a))。相比之下，分离自同基因的Na^{+}-NQR阳性菌株的囊泡确实以PEG-2S敏感方式氧化dNADH(图21A，迹线(b))。在这种实验模型中用PEG-2S滴定Na^{+}-NQR活性产生1.76nM的MIC_{50}(图21B)。为了比较，在相同的实验模型中测量的HQNO的IC_{50}为130nM。

[0149] PEG-2S破坏细胞培养物模型中的衣原体感染。直接监测感染有沙眼衣原体的HEK293细胞的细胞质pH确认了衣原体感染的初始阶段期间快速且深度酸化的预期(基于图18A所示的结果)(图22A，黑色三角形)。尽管在未感染的细胞(空白三角形)中感染的第一个约5h期间，pH的细微瞬时变化在统计学上不显著，但是添加1.0μM PEG-2S(空白正方形)在感染的第一个5小时内中断衣原体引起的酸化，导致内部pH几乎完全缓和在约7.6。在2.5μM时，PEG-2S完全防止衣原体诱导的酸化(图22A，黑色圆圈)。需要注意，在感染的HEK293细胞中观察到的细胞质的酸化持续长时间(长达24小时)。这可能是由于所用的实验培养基中的高葡萄糖含量引起的。

[0150] 宿主细胞质的初始酸化应激活固有的Na^{+}/H^{+}交换机制，导致细胞内的[Na^{+}]升高。如图22A所示，在感染约5h后，感染细胞的内部pH实际上从7.75的稳态水平下降至6.5(图22A，黑色三角形)。显而易见的，这种惊人的酸化激活在HEK293细胞的质膜中运行的NHE-型Na^{+}/H^{+}交换蛋白，因为细胞质的[Na^{+}]的显著升高是显而易见的(图22B，黑色三角形)。正如基于图18所示的结果所预期的，相对于酸化，钠的积累是延迟的(比较图18A和图18B；图22A和图22B，黑色三角形)。此外，细胞内的钠积累对于低μM浓度的PEG-2S是敏感的(图22B，空白正方形和黑色圆圈)。

[0151] 总之，图18A、图18B和图22A、图22B概述的数据支持关于通过入侵衣原体操纵感染的细胞的离子平衡的理念，并且证明了衣原体的Na^{+}-NQR对于感染过程的重要性。

[0152] 这些数据支持PEG-2和PEG-2S用作抗生素以及用作进一步设计药物衍生物用于替代性抗生素的平台。与PEG-2比对的若干示例性前瞻性药物设计(包括PEG-3和PEG-4)提供在图23中。

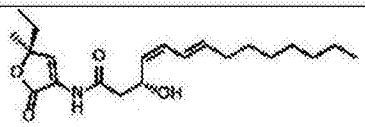
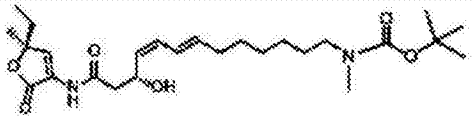
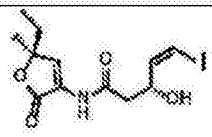
[0153] 如从图23中显而易见的，PEG-3和PEG-4在分子的脂肪族模块的远端均具有“屏蔽的”正电荷。预期的是，与PEG-2相比，PEG-3是(a)更可溶的，并且(b)能够逆其浓度梯度在衣原体细胞质中积累。胍衍生物PEG-4将与PEG-3共有这些益处特征。此外，其可以潜在地抑制(非常温和地)感染细胞中的NHE-1反向转运蛋白，因此降低细胞内[Na^{+}]以及可能起进一步阻止衣原体感染的发展的作用。

[0154] 其它药物衍生物由PEG-2平台设计和合成并且已经测试了溶解性和抗生素活性。在第一组和第二组实验性实例中使用以上所述的细胞培养物实验性模型的衣原体感染来评估抗生素活性。图24所示的荧光显微镜结果表明，用各个衍生物的处理减小了衣原体感染的细胞中的内含物尺寸。

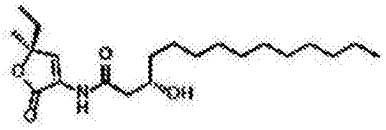
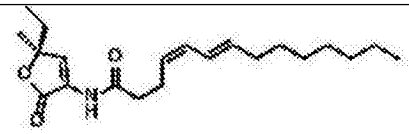
[0155] 表4示出了测试的概述结果，包括PEG-2S以提供参考值。与PEG-2S相比，衍生物PEG-6(Boc)、PEG-10、PEG-11、PEG-14均示出改善的溶解性，并且PEG-6(Boc)和PEG-10在DMSO中提供特别高的溶解性。表4中示出的所有衍生物还显示出抗生素活性，对于抗衣原体功效，具有相当的IC50。

[0156] 表4.靶向衣原体Na^{+}-NQR的PEG系列的抗生素

[0157]

名称	结构	IC_{50}(*Chl*), μM[a]	溶解性[b]
PEG-2S		0.70	+/-
PEG-6(Boc)		0.96	+++
PEG-10		0.67	+++

[0158]

PEG-11		0.63	+
PEG-14		1.20	+

a –在细胞培养物实验模型中沙眼衣原体增殖的半数最大抑制所需的浓度。

b – 通过合格的观察者评估在 DMSO 中的溶解性。"+/-" – 在超过 25 mM 的浓度时不可溶; "+" –在室温 20 min 后在 50 mM 下完全溶解; "++" – 在室温 5 min 后在 50 mM 下溶解; "+++" – 优选在 DMSO 中是可溶的(在 50 mM 下立即溶解)

[0159] 本文提供的结果支持若干新发现。例如,所述结果支持通过Na^+-NQR抑制进行抗细菌攻击的新方法,并且提供通过Na^+-NQR抑制进行抗生素处理动物细胞的细菌感染的新证明。应该认识到,式I、II、III或IV涵盖的PEG-2和相关化合物的效用不受关于Na^+-NQR抑制的理论或机制的限制。

[0160] 新发现的另一实例为,可以通过从korormicin的化学结构中去除环氧基团而产生PEG-2来显著降低真核生物毒性来改善先前发现的天然抗生素korormicin。这种通过去除环氧基团而显著降低药物毒性是新颖的并且未被先前的文献所公认。新发现的另一实例为,与koromicin相比,PEG-2作为抗衣原体试剂提供改善的功效。这种增加的功效是新颖的并且未被先前的文献所公认。新发现的另一实例为,支持性数据表明导致有效分子抑制各种病原性细菌中的Na^+-NQR的PEG-2的其它药物设计修饰的潜在和合理预测。

[0161] 本文所述的实施方案意图用于说明的目的,而没有任何意图丧失一般性。考虑了本发明的其它变型、修改及其组合,并且将被本领域技术人员所公知。因此,先前的详细描述并不意图限制所要求保护主题的范围、实用性或构型。

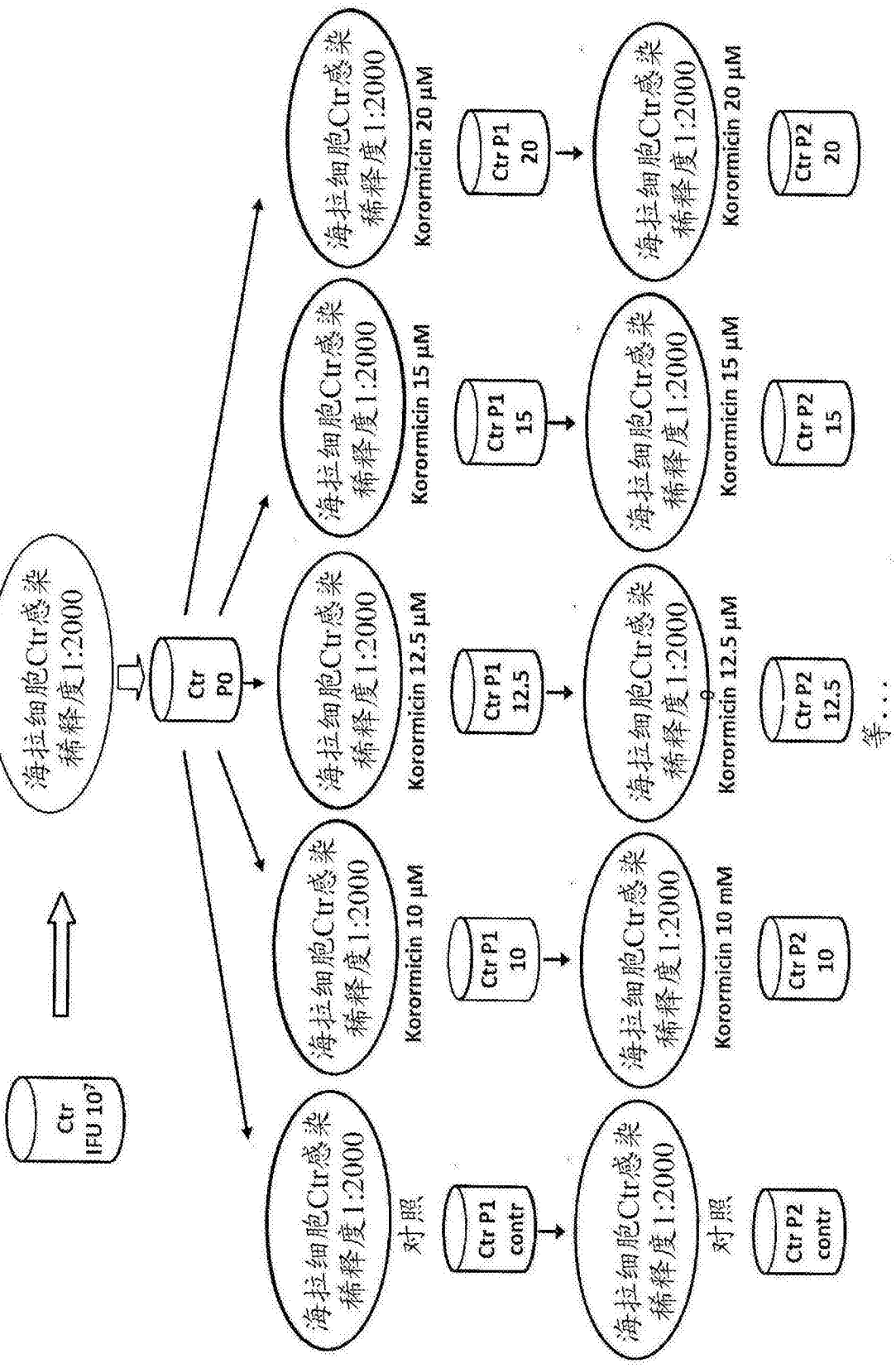

Ctr
IFU 10⁷
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:2000
Ctr
P0
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:2000
对照
Korormicin 10 μM
Korormicin 12.5 μM
Korormicin 15 μM
Korormicin 20 μM
Ctr P1
contr
Ctr P1
10
Ctr P1
12.5
Ctr P1
15
Ctr P1
20
Korormicin 10 mM
Ctr P2
contr
Ctr P2
10
Ctr P2
12.5
Ctr P2
15
Ctr P2
20
等...

图1

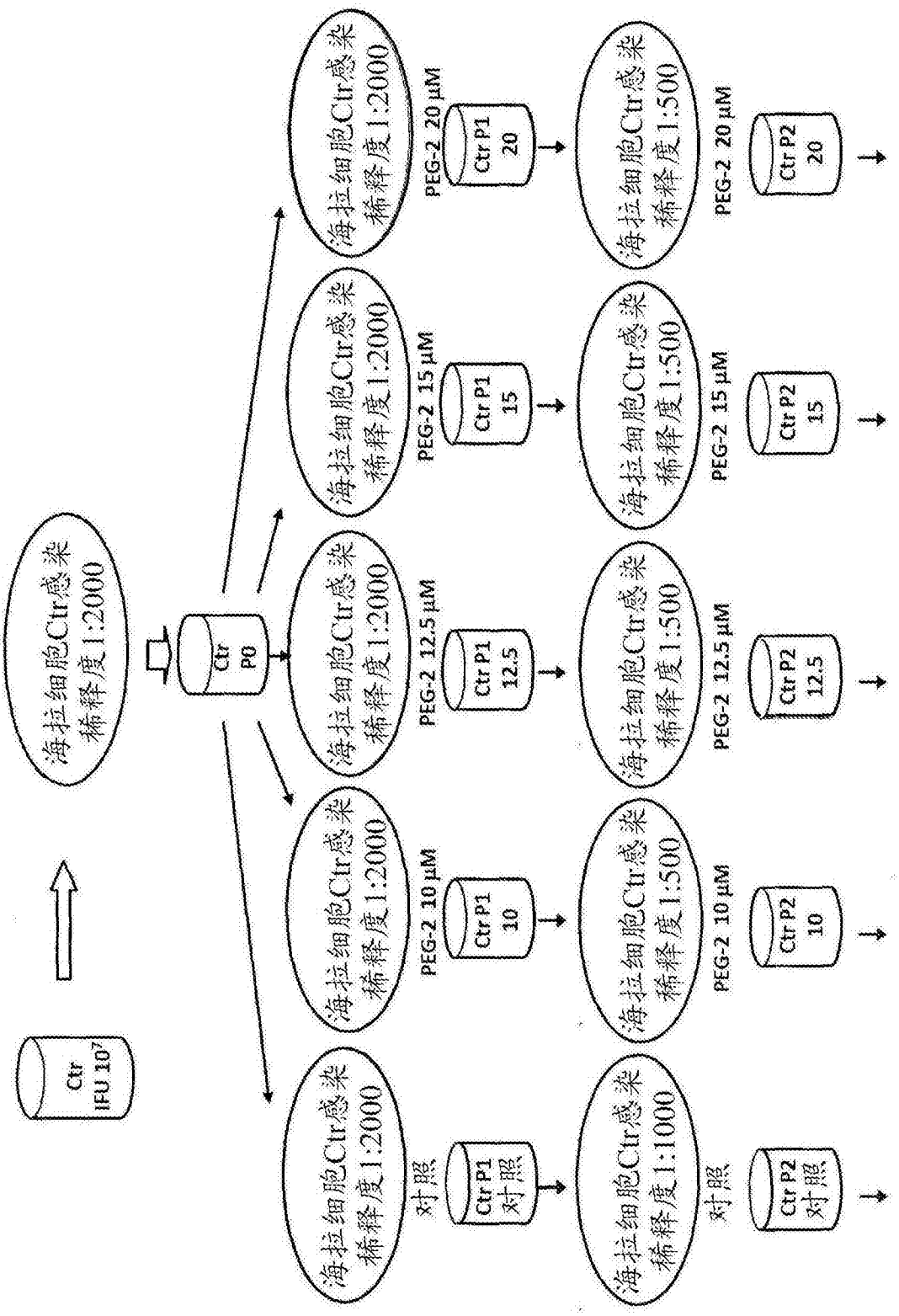

Ctr
IFU 10^7
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:2000
Ctr
P0
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:2000
对照
Ctr P1
对照
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:1000
对照
Ctr P2
对照
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:2000
PEG-2 10 μM
Ctr P1
10
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:500
PEG-2 10 μM
Ctr P2
10
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:2000
PEG-2 12.5 μM
Ctr P1
12.5
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:500
PEG-2 12.5 μM
Ctr P2
12.5
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:2000
PEG-2 15 μM
Ctr P1
15
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:500
PEG-2 15 μM
Ctr P2
15
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:2000
PEG-2 20 μM
Ctr P1
20
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:500
PEG-2 20 μM
Ctr P2
20

图2

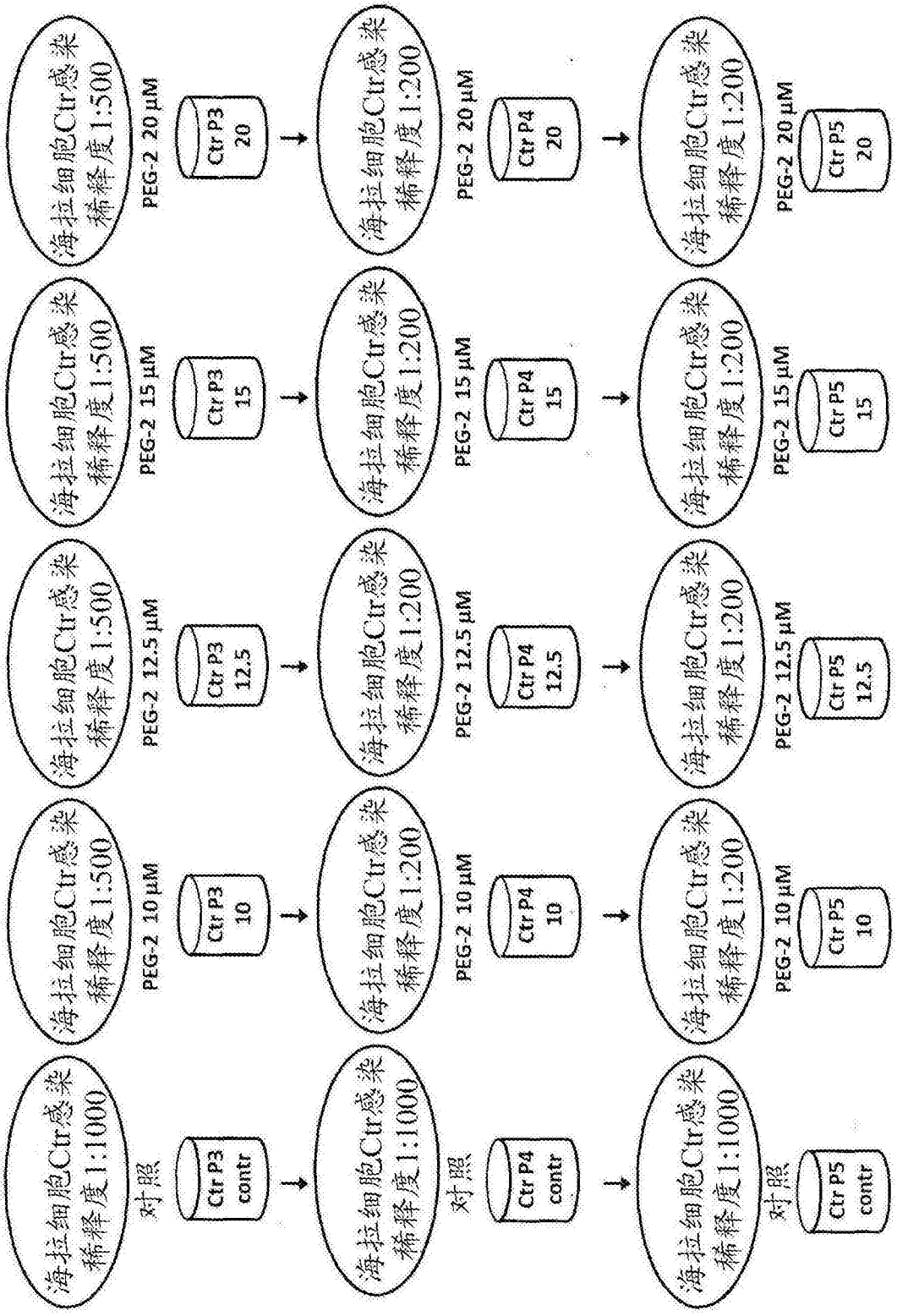

海拉细胞Ctr感染
稀释度1:1000
对照
Ctr P3
contr
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:500
PEG-2 10 μM
Ctr P3
10
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:500
PEG-2 12.5 μM
Ctr P3
12.5
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:500
PEG-2 15 μM
Ctr P3
15
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:500
PEG-2 20 μM
Ctr P3
20
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:1000
对照
Ctr P4
contr
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:200
PEG-2 10 μM
Ctr P4
10
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:200
PEG-2 12.5 μM
Ctr P4
12.5
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:200
PEG-2 15 μM
Ctr P4
15
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:200
PEG-2 20 μM
Ctr P4
20
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:1000
对照
Ctr P5
contr
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:200
PEG-2 10 μM
Ctr P5
10
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:200
PEG-2 12.5 μM
Ctr P5
12.5
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:200
PEG-2 15 μM
Ctr P5
15
海拉细胞Ctr感染
稀释度1:200
PEG-2 20 μM
Ctr P5
20

图2(续)

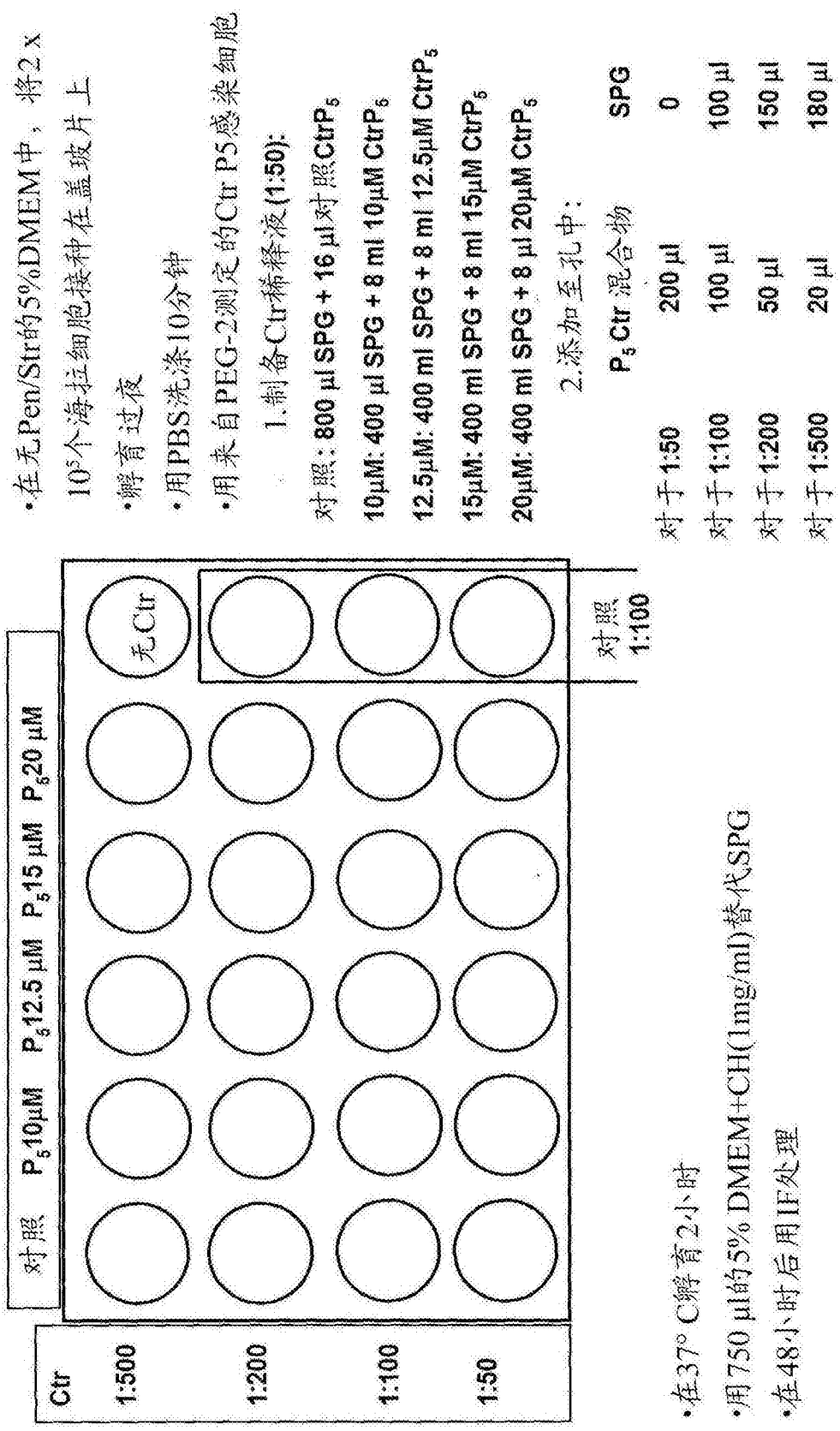
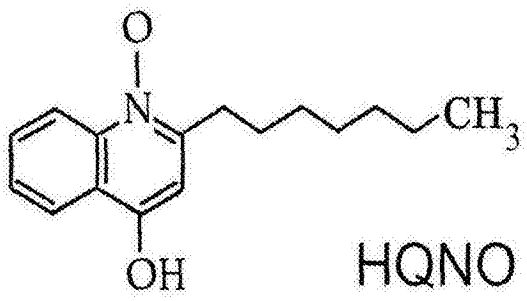
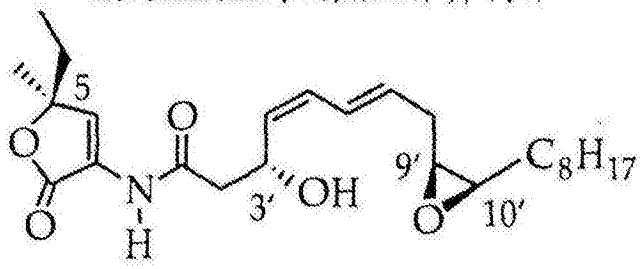

•在无Pen/Str的5%DMEM中，将2 x 10⁵个海拉细胞接种在盖玻片上
•孵育过夜
•用PBS洗涤10分钟
•用来自PEG-2测定的Ctr P5感染细胞
1.制备Ctr稀释液(1:50):
对照：800 µl SPG + 16 µl对照CtrP5
10µM: 400 µl SPG + 8 ml 10µM CtrP6
12.5µM: 400 ml SPG + 8 ml 12.5µM CtrP5
15µM: 400 ml SPG + 8 ml 15µM CtrP6
20µM: 400 ml SPG + 8 µl 20µM CtrP6
2.添加至孔中：
P5 Ctr 混合物 SPG
对于1:50 200 µl 0
对于1:100 100 µl 100 µl
对于1:200 50 µl 150 µl
对于1:500 20 µl 180 µl
Ctr
1:500
1:200
1:100
1:50
对照 P5 10µM P5 12.5 µM P5 15 µM P5 20 µM
无Ctr
对照 1:100
•在37° C孵育2小时
•用750 µl的5% DMEM+CH(1mg/ml)替代SPG
•在48小时后用IF处理

图3



HQNO

korormicin的天然立体异构体



(5S,3′R,9′S,10′R)-1

PEG-2

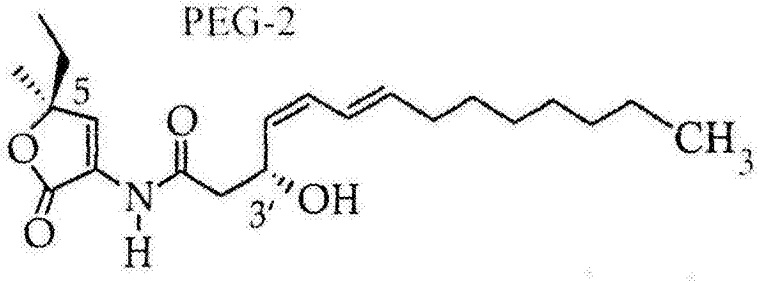


图4

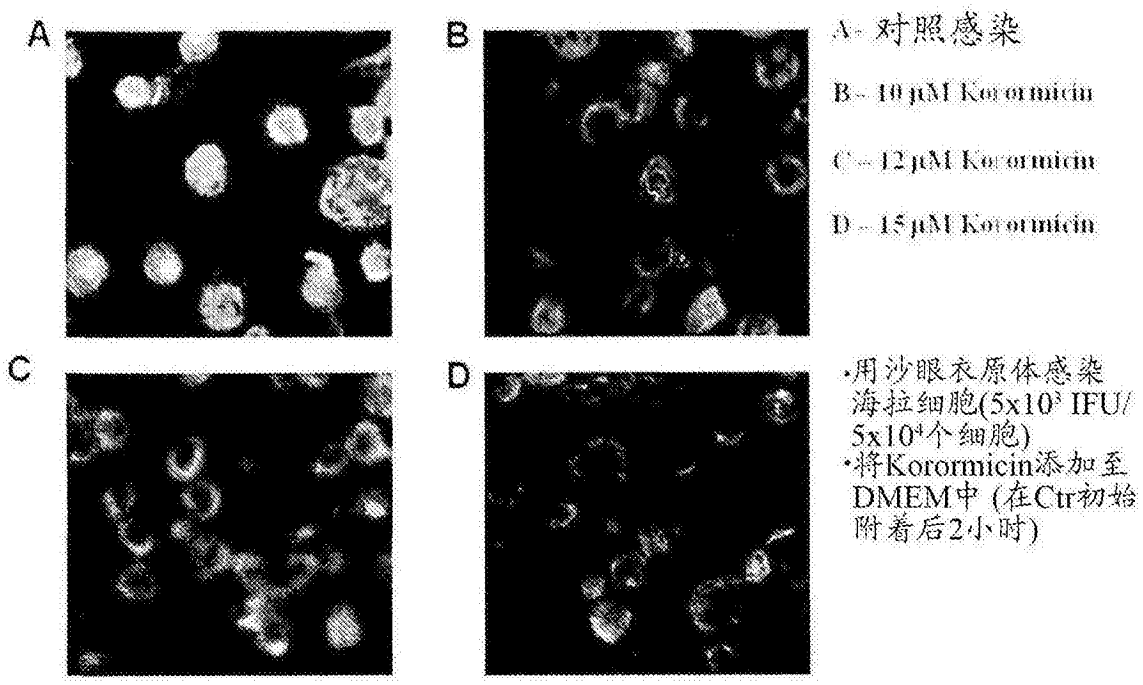

Korormicin对沙眼衣原体的作用
A
B
C
D
A- 对照感染
B – 10 μM Korormicin
C – 12 μM Korormicin
D – 15 μM Korormicin
•用沙眼衣原体感染海拉细胞(5x10³ IFU/5x10⁴个细胞)
•将Korormicin添加至DMEM中 (在Ctr初始附着后2小时)

图5

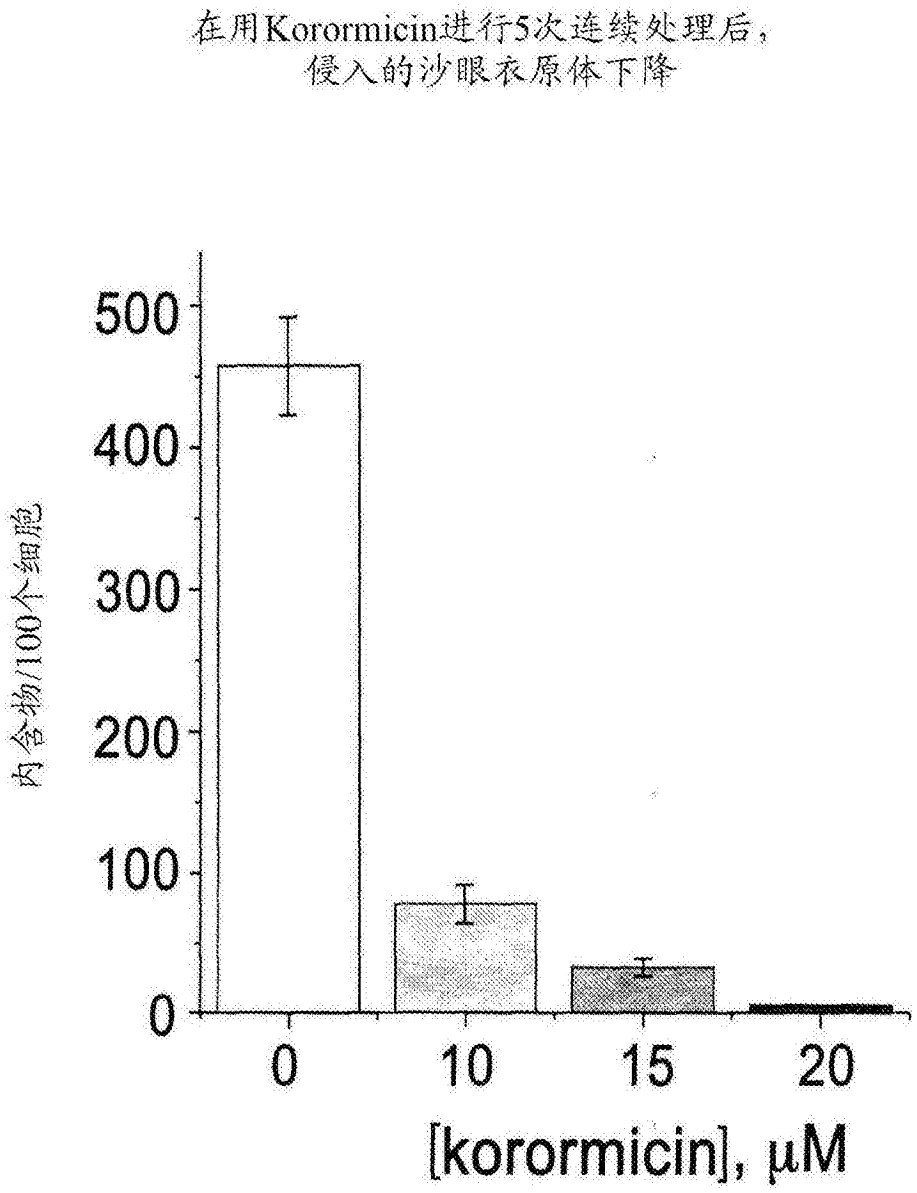

在用Korormicin进行5次连续处理后，
侵入的沙眼衣原体下降
500
400
300
200
100
0
内含物/100个细胞
0
10
15
20
[korormicin], μM

图6

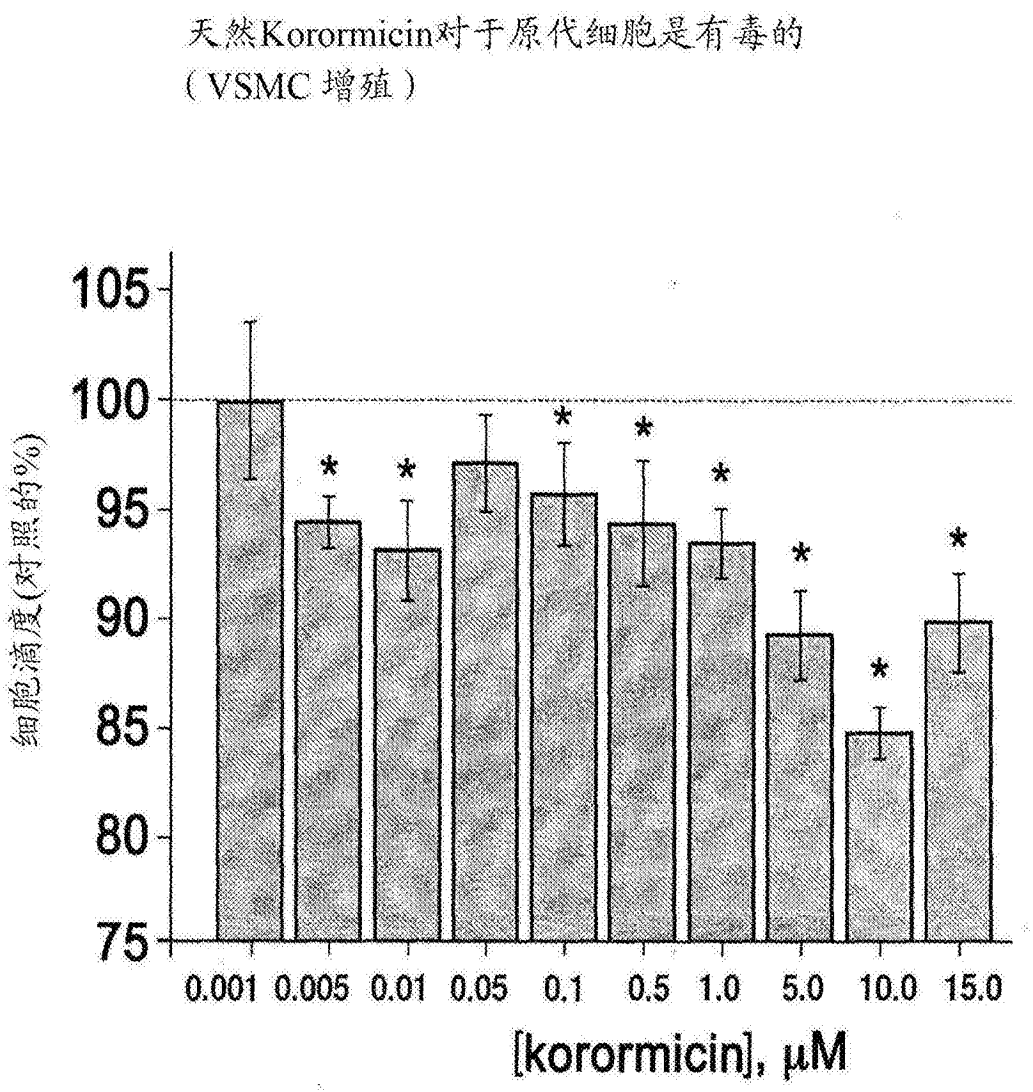

天然Korormicin对于原代细胞是有毒的
（VSMC 增殖）
细胞滴度(对照的%)
105
100
95
90
85
80
75
0.001
0.005
0.01
0.05
0.1
0.5
1.0
5.0
10.0
15.0
[korormicin], μM

图7

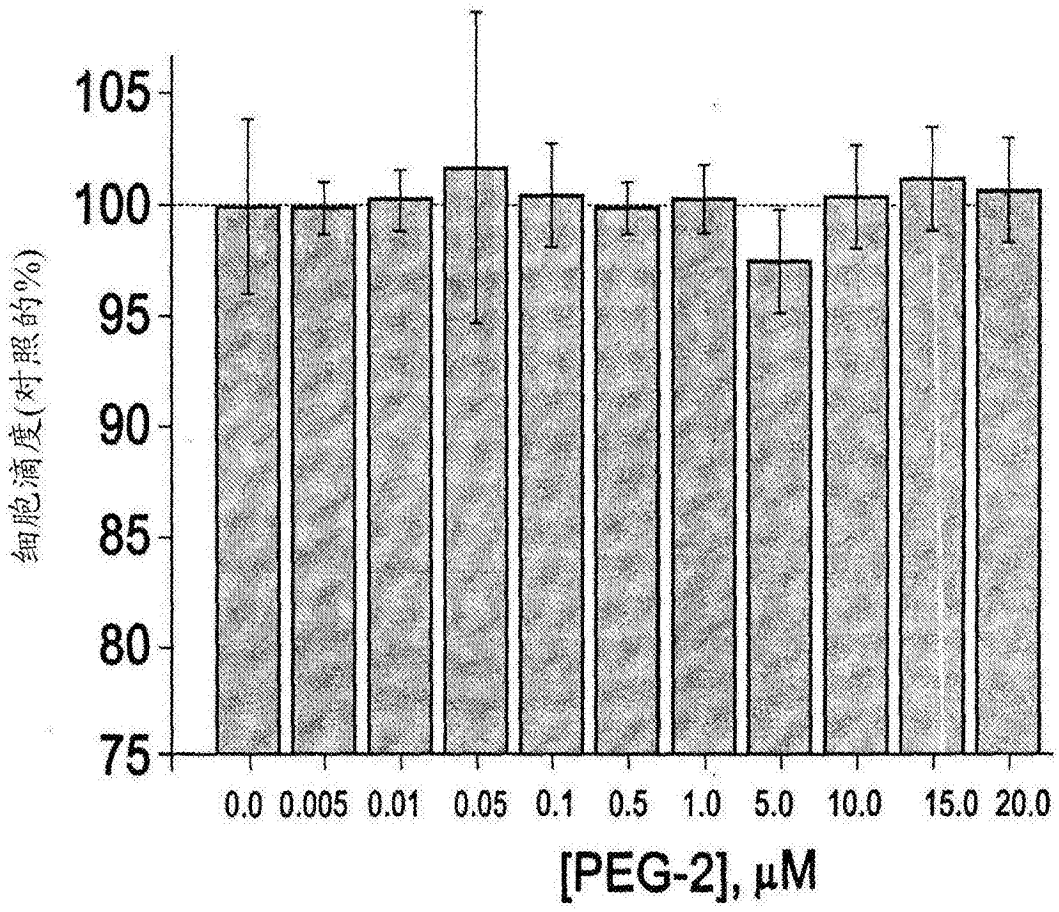
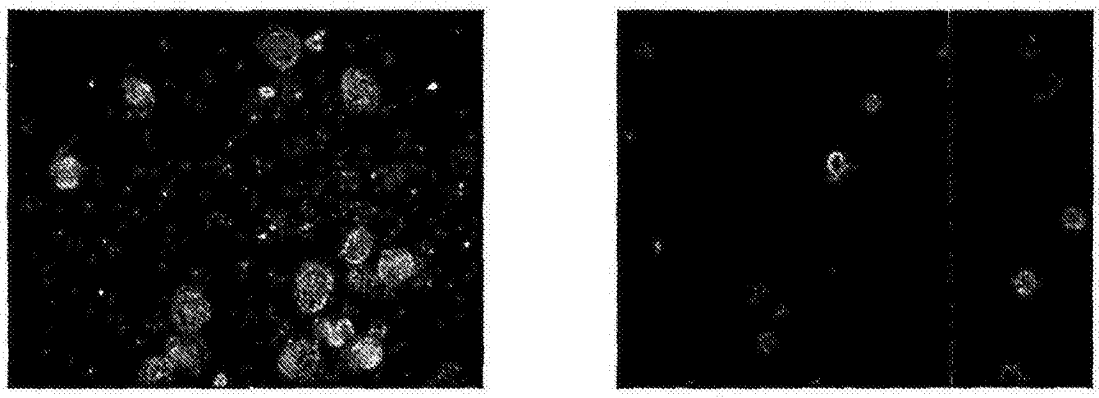

PEG-2对于原代VSM细胞是无毒的
细胞滴度(对照的%)
105
100
95
90
85
80
75
0.0
0.005
0.01
0.05
0.1
0.5
1.0
5.0
10.0
15.0
20.0
[PEG-2], μM

图8

在单次施用PEG-2后，沙眼衣原体内含物是小且中空的



•用沙眼衣原体感染海拉细胞(10^3 IFU/10^5个细胞)
•将PEG-2 添加至DMEM中 (在Ctr初始附着后2小时)

图9

在用PEG-2单次处理后，沙眼衣原体内含物变得明显更小

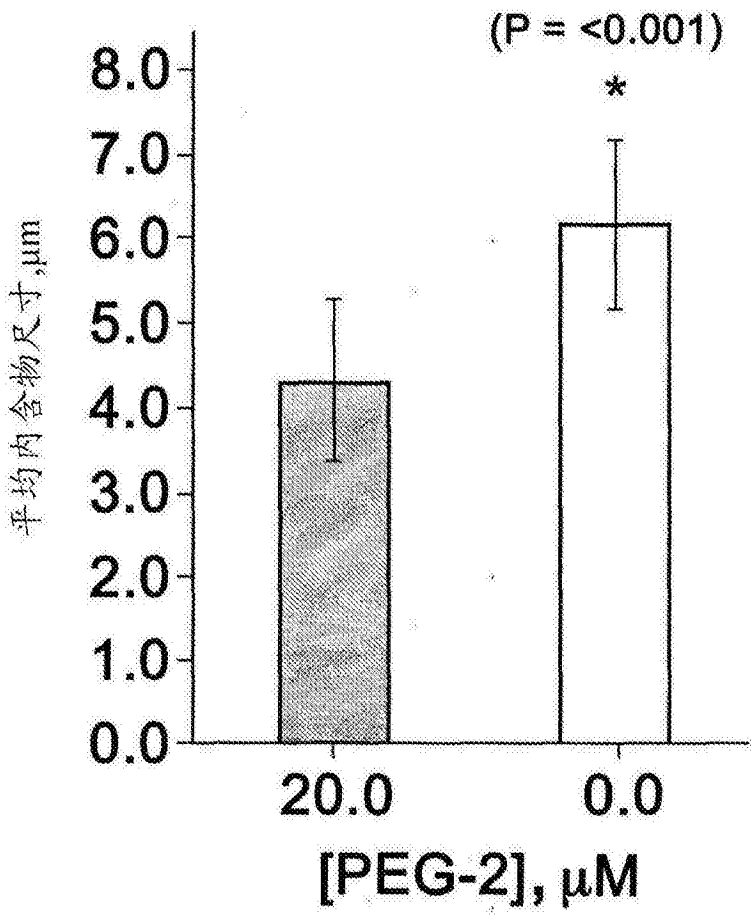


图10

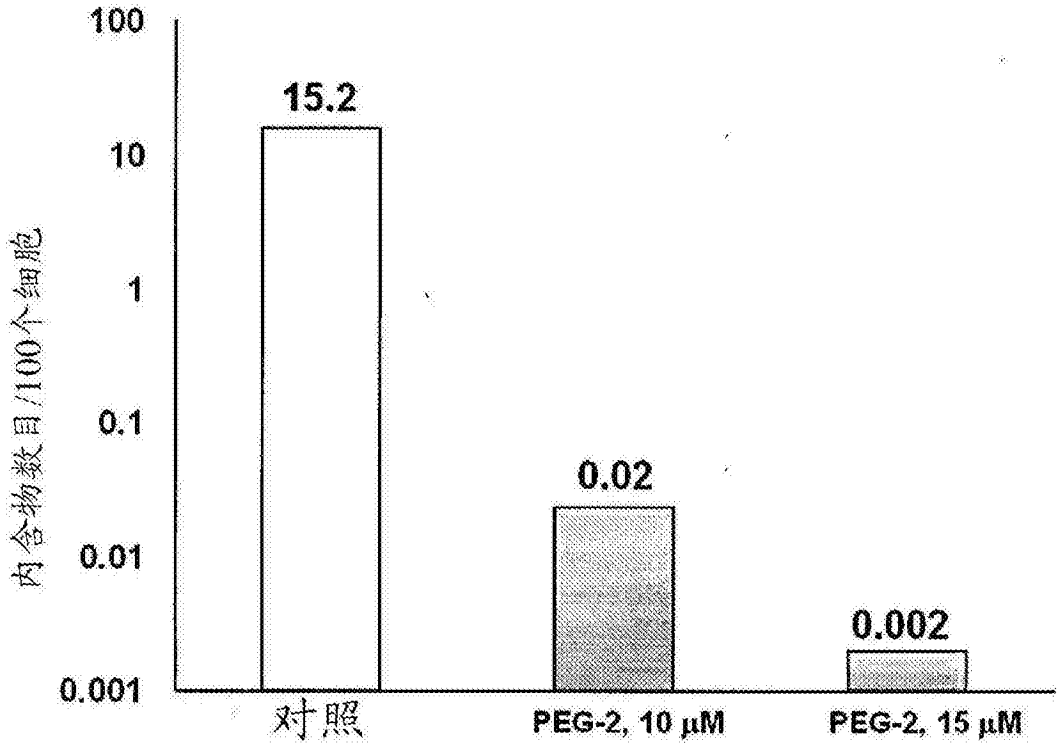

在用PEG-2进行5次连续处理后，侵入的沙眼衣原体下降
内含物数目/100个细胞
100
10
1
0.1
0.01
0.001
15.2
0.02
0.002
对照
PEG-2, 10 μM
PEG-2, 15 μM

图11

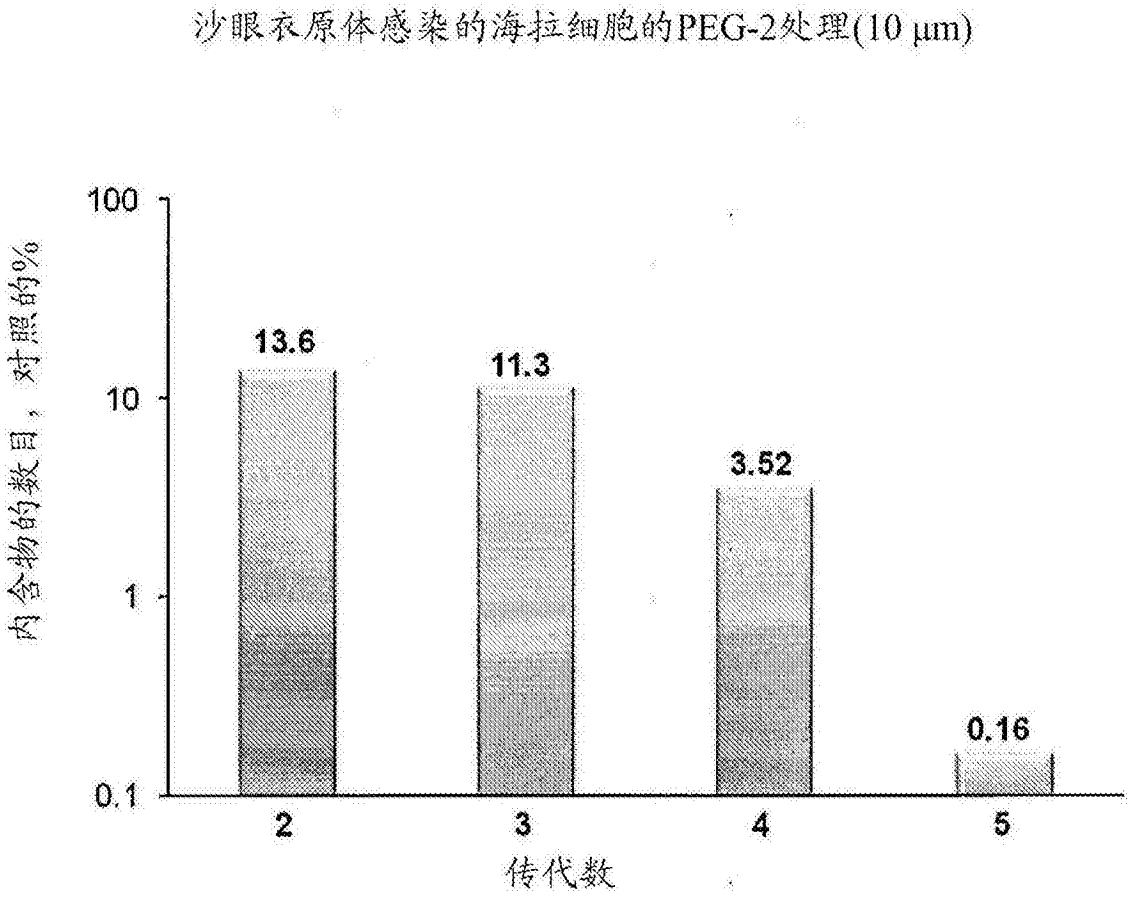

沙眼衣原体感染的海拉细胞的PEG-2处理(10 μm)
内含物的数目，对照的%
100
10
1
0.1
13.6
11.3
3.52
0.16
2
3
4
5
传代数

图12

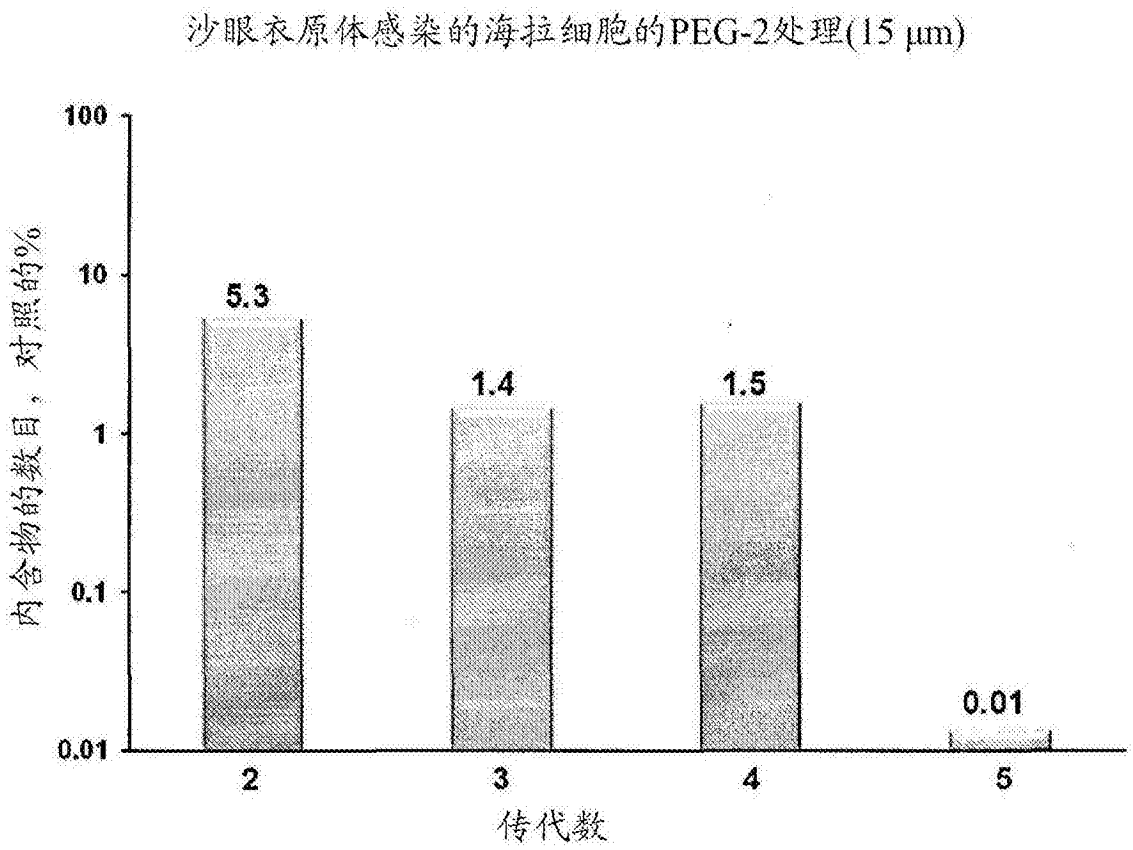

沙眼衣原体感染的海拉细胞的PEG-2处理(15 μm)
内含物的数目，对照的%
100
10
1
0.1
0.01
5.3
1.4
1.5
0.01
2
3
4
5
传代数

图13

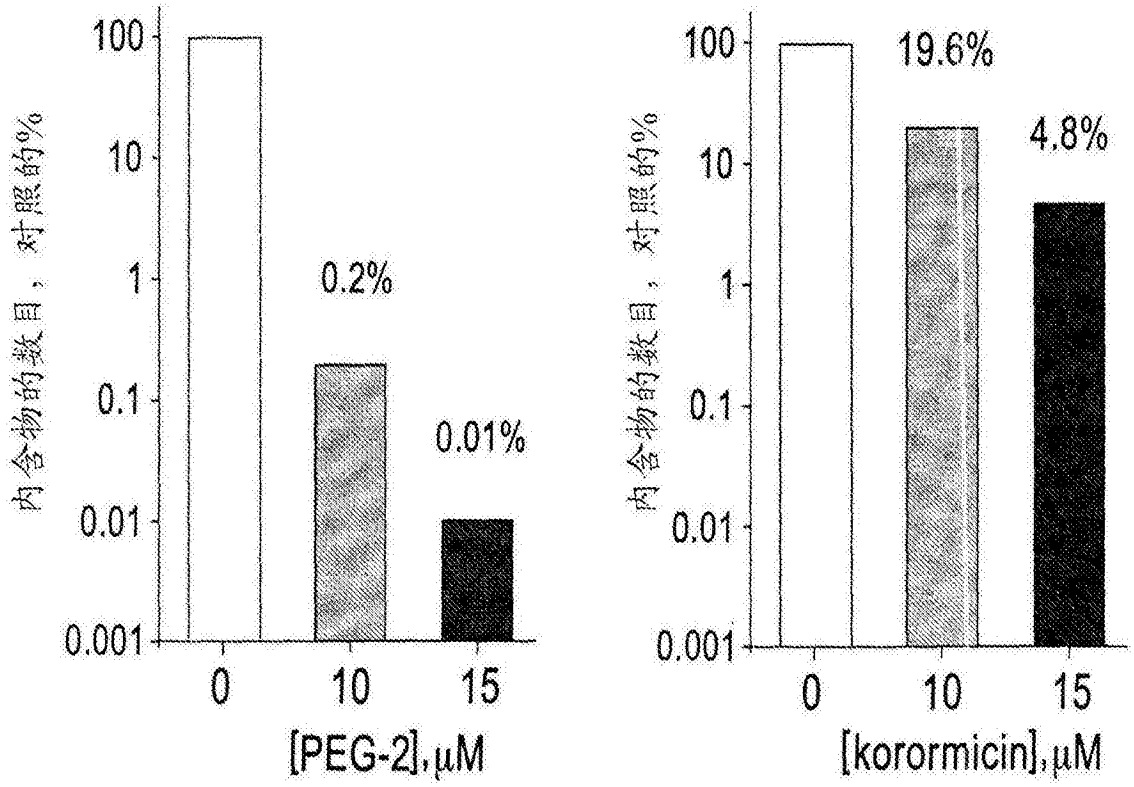
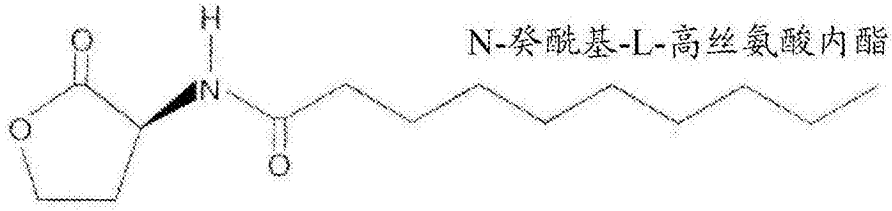
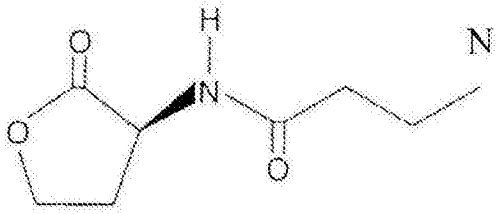

内含物的数目，对照的%
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.2%
0.01%
0
10
15
[PEG-2],μM
19.6%
4.8%
[korormicin],μM

图14







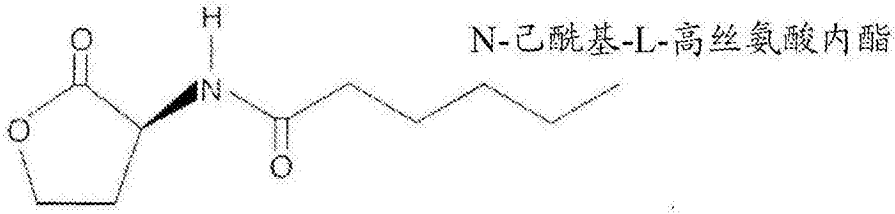


图15

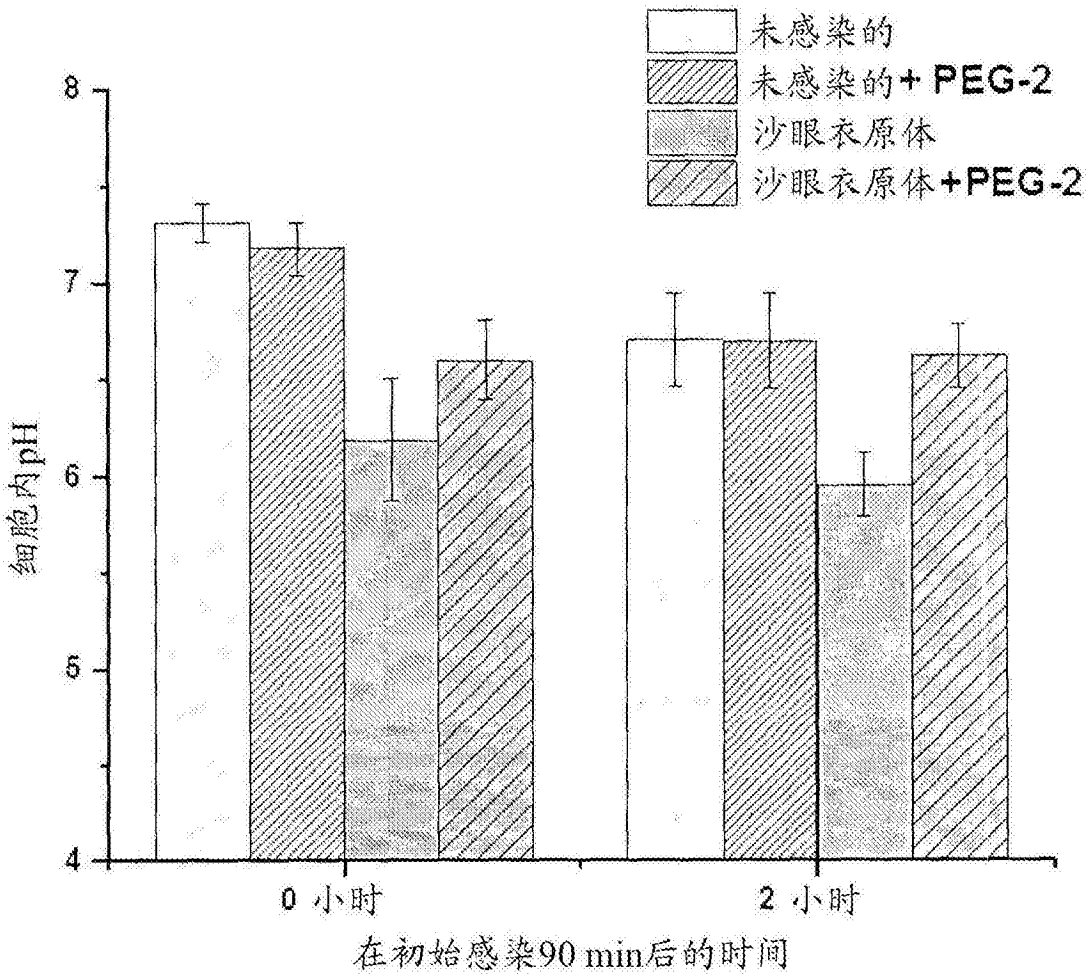

PEG-2 [15 μM]防止初始衣原体诱导的细胞质的酸化
未感染的
未感染的+ PEG-2
沙眼衣原体
沙眼衣原体+PEG-2
细胞内pH
8
7
6
5
4
0 小时
2 小时
在初始感染90 min后的时间

图16

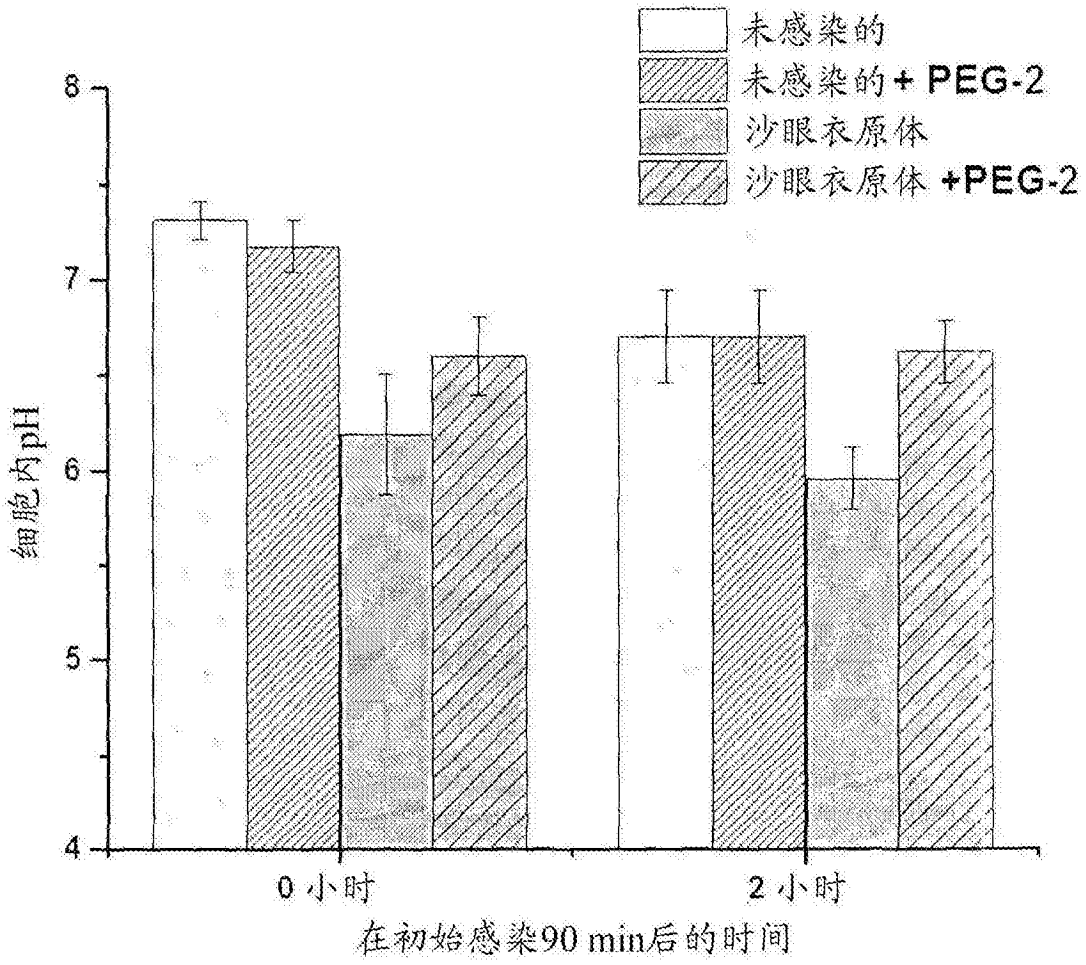

在感染24小时后
PEG-2 [15 μM]仍然抑制酸化
未感染的
未感染的+ PEG-2
沙眼衣原体
沙眼衣原体 +PEG-2
细胞内pH
8
7
6
5
4
0 小时
2 小时
在初始感染90 min后的时间

图17

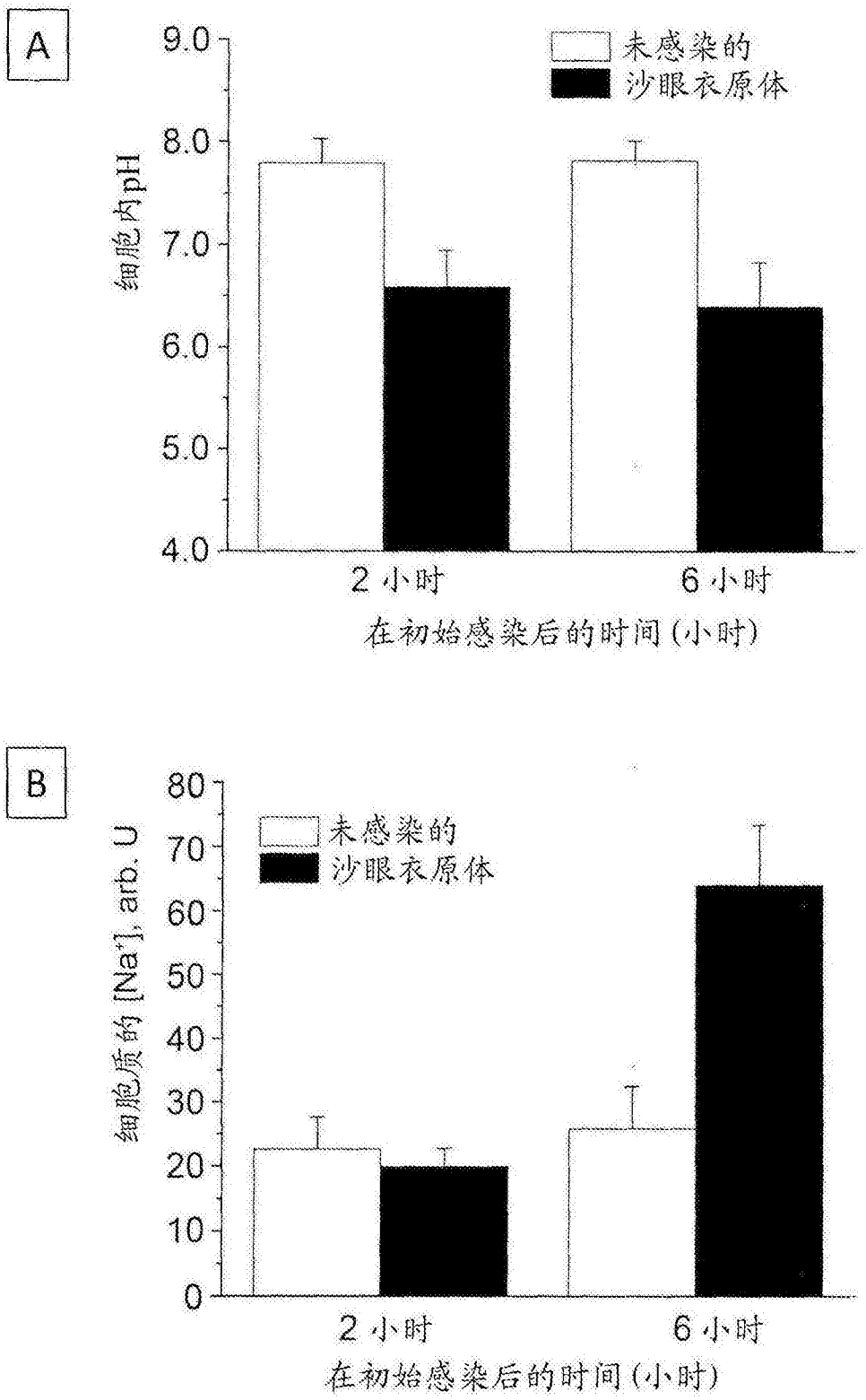

A
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
细胞内pH
未感染的
沙眼衣原体
2 小时
6 小时
在初始感染后的时间(小时)
B
80
70
60
50
40
30
20
10
0
细胞质的 [Na+], arb. U
未感染的
沙眼衣原体
2 小时
6 小时
在初始感染后的时间(小时)

图18

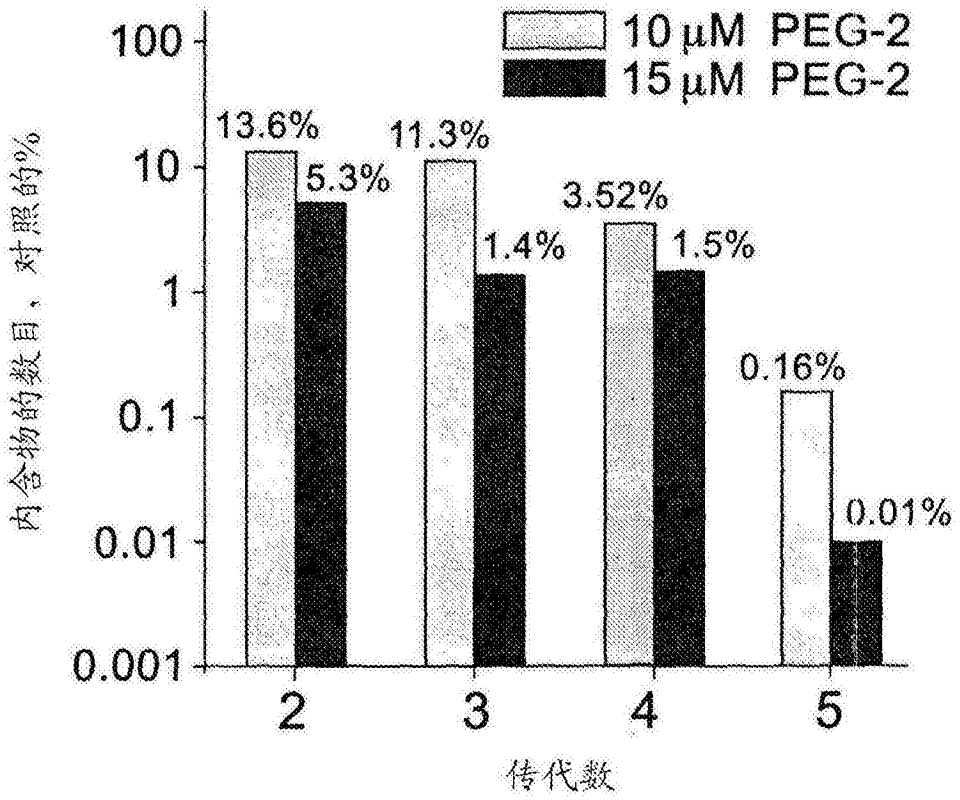

10 μM PEG-2
15 μM PEG-2
内含物的数目，对照的%
100
10
1
0.1
0.01
0.001
13.6%
5.3%
11.3%
1.4%
3.52%
1.5%
0.16%
0.01%
2
3
4
5
传代数

图19

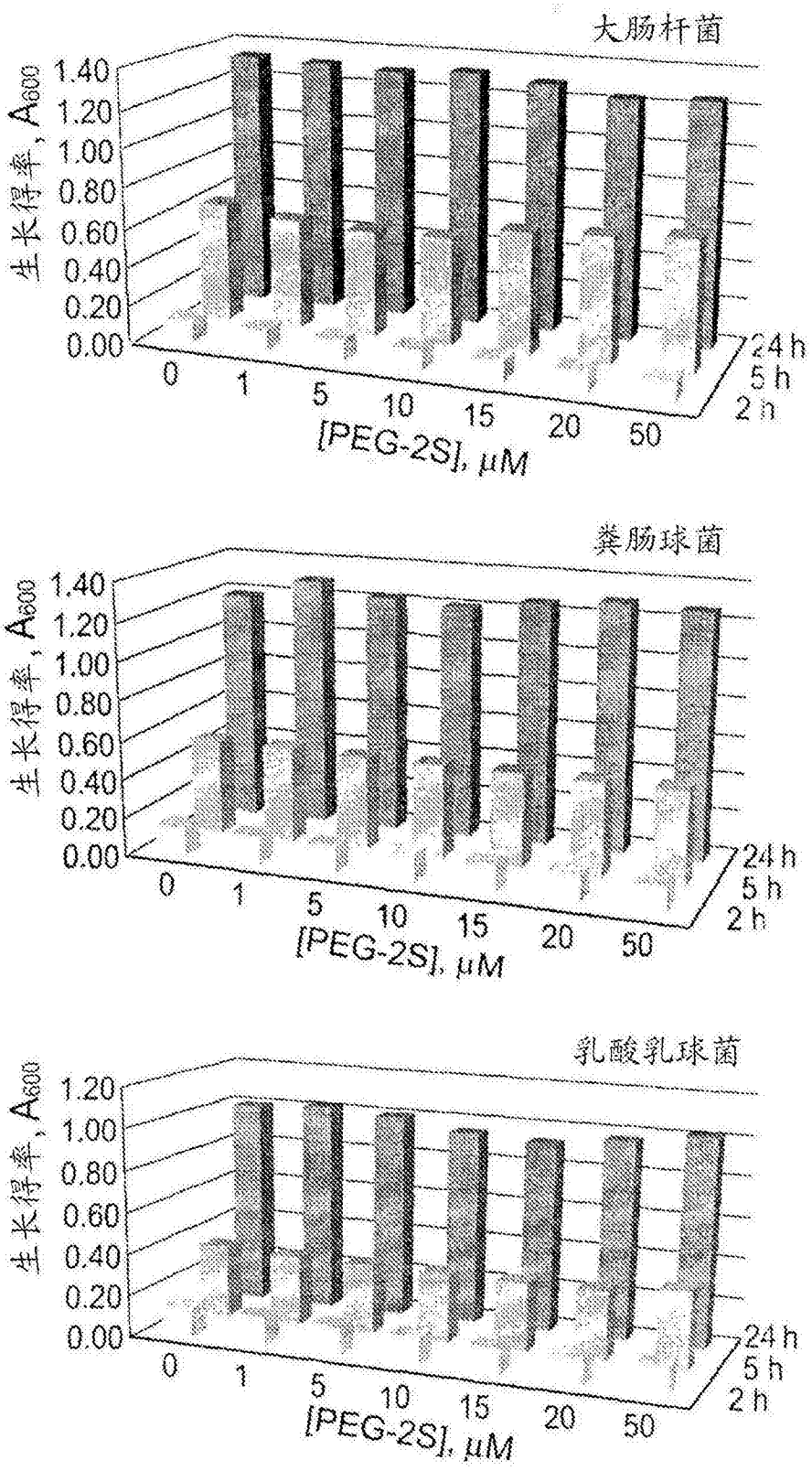

大肠杆菌
生长得率, A_{600}
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0
1
5
10
15
20
50
[PEG-2S], μM
24 h
5 h
2 h
粪肠球菌
生长得率, A_{600}
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0
1
5
10
15
20
50
[PEG-2S], μM
24 h
5 h
2 h
乳酸乳球菌
生长得率, A_{600}
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0
1
5
10
15
20
50
[PEG-2S], μM
24 h
5 h
2 h

图20

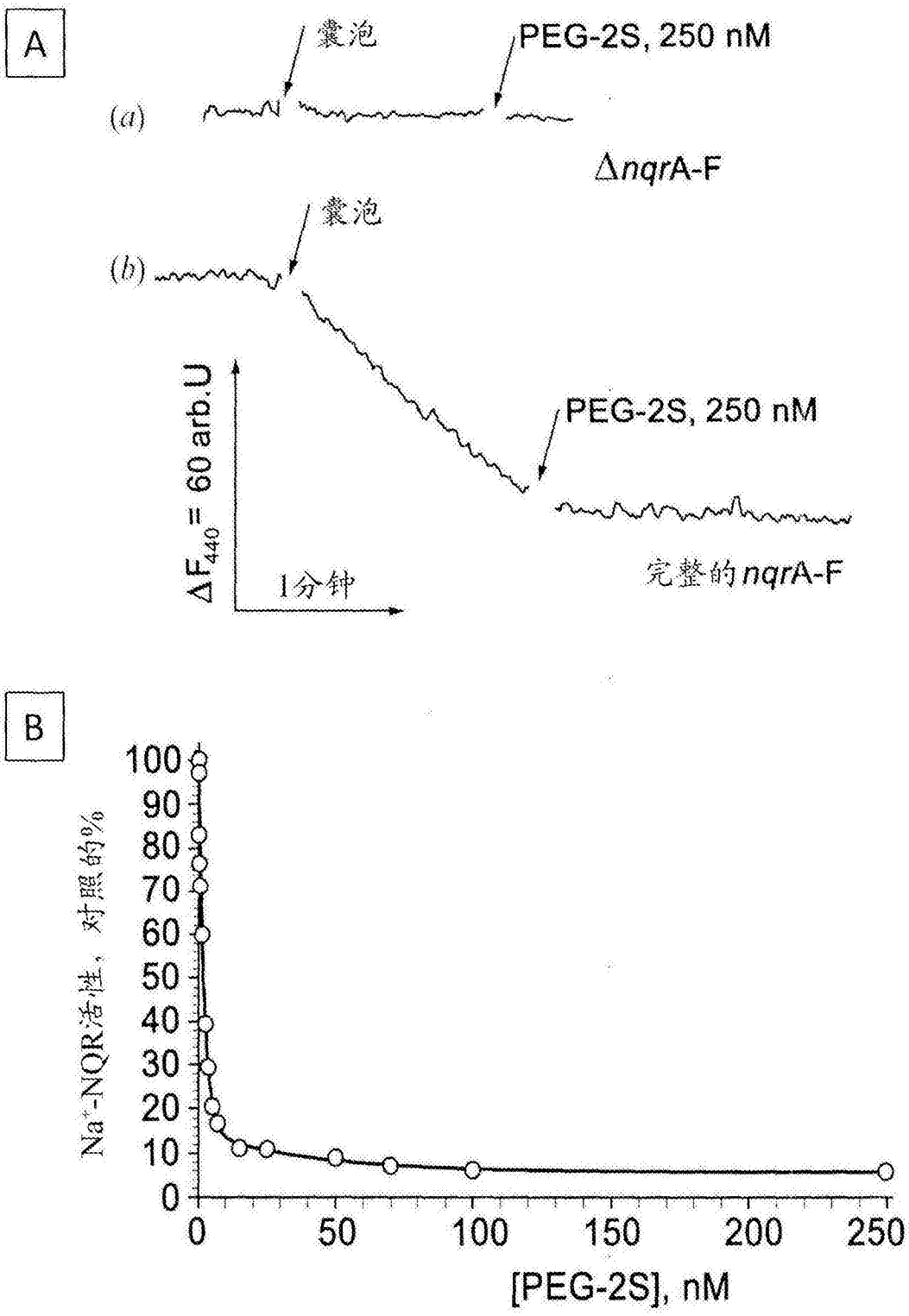

A
囊泡
PEG-2S, 250 nM
(a)
ΔnqrA-F
囊泡
(b)
PEG-2S, 250 nM
ΔF440 = 60 arb.U
1分钟
完整的nqrA-F
B
Na+-NQR活性，对照的%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
250
[PEG-2S], nM

图21

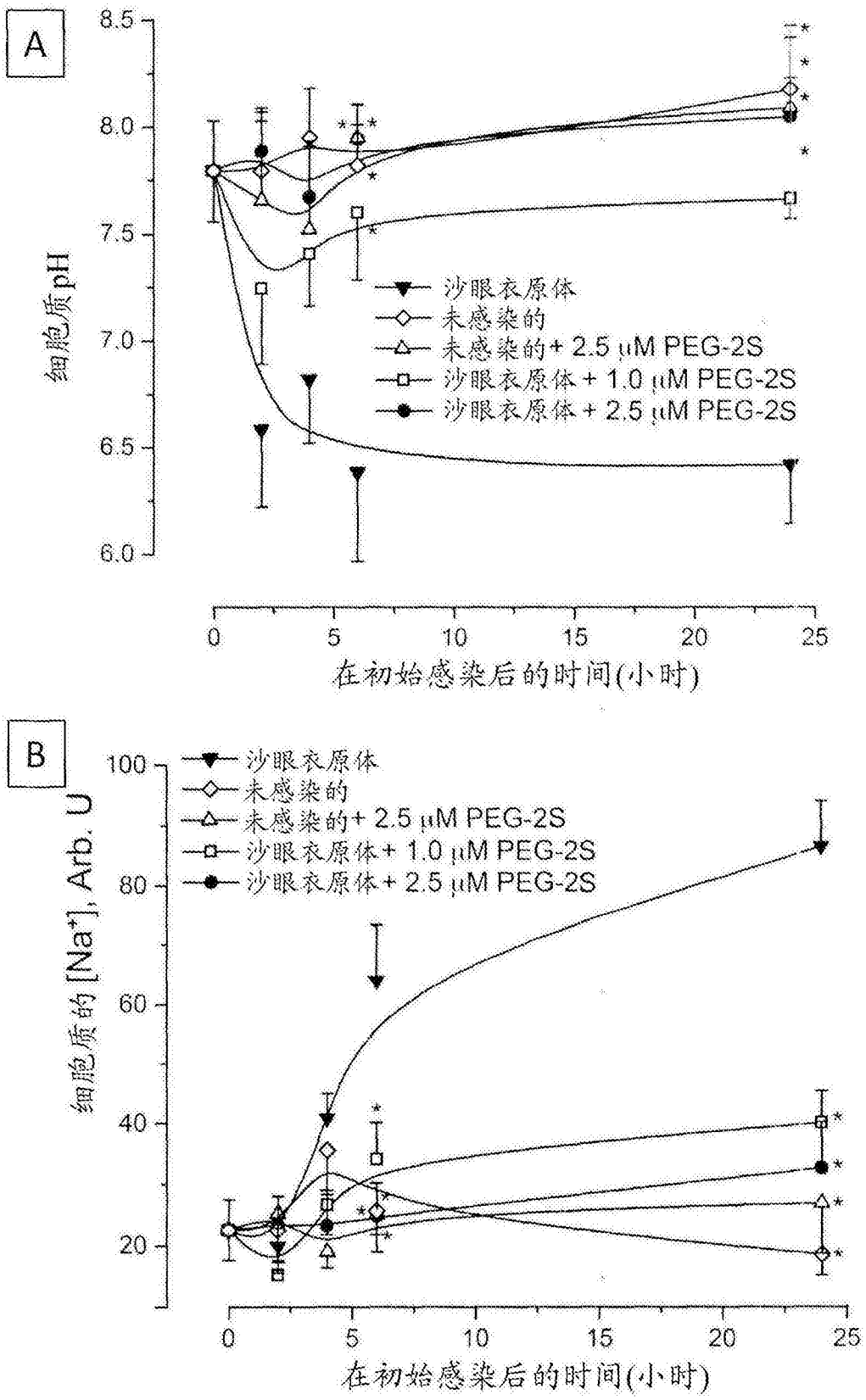

A
细胞质pH
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
沙眼衣原体
未感染的
未感染的+ 2.5 μM PEG-2S
沙眼衣原体+ 1.0 μM PEG-2S
沙眼衣原体+ 2.5 μM PEG-2S
0
5
10
15
20
25
在初始感染后的时间(小时)
B
细胞质的[Na+], Arb. U
100
80
60
40
20
沙眼衣原体
未感染的
未感染的+ 2.5 μM PEG-2S
沙眼衣原体+ 1.0 μM PEG-2S
沙眼衣原体+ 2.5 μM PEG-2S
0
5
10
15
20
25
在初始感染后的时间(小时)

图22

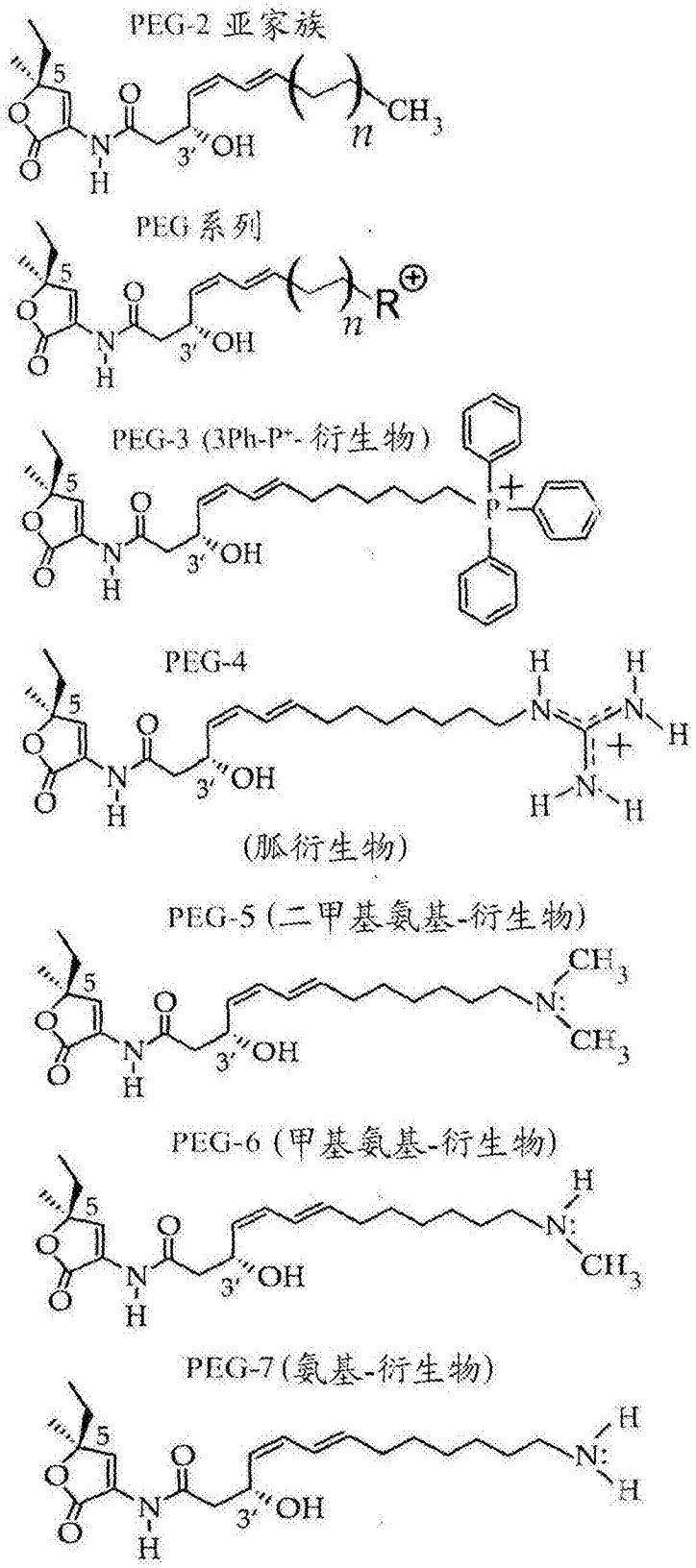

PEG-2 亚家族
PEG 系列
PEG-3 (3Ph-P+- 衍生物)
PEG-4
(胍衍生物)
PEG-5 (二甲基氨基-衍生物)
PEG-6 (甲基氨基-衍生物)
PEG-7(氨基-衍生物)

图23

用PEG-2衍生物进行处理降低感染细胞中的沙眼衣原体内含物的尺寸

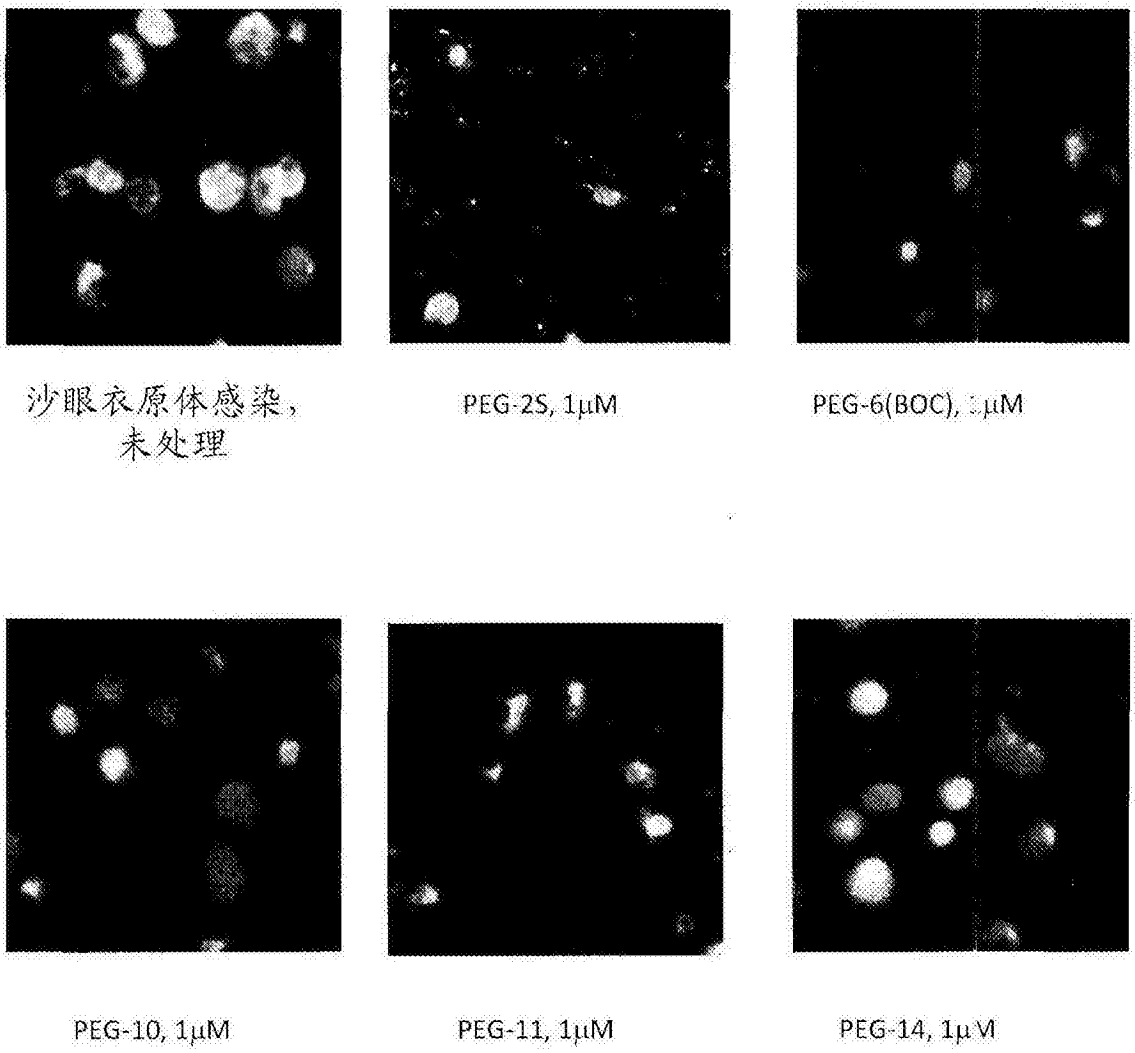


图24