



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101282981 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 26

(21) 申请号 200680037382. 9

(22) 申请日 2006. 08. 11

(30) 优先权数据

60/707, 145 2005. 08. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 04. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2006/004128 2006. 08. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02007/096703 EN 2007. 08. 30

(73) 专利权人 塔甘塔治疗公司

地址 加拿大魁北克省

(72) 发明人 Y·S·罗斯 S·奇布拉 T·康

A·拉费法 E·迪特里希

Y·拉方丹 R·雷迪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 刘冬 李连涛

(51) Int. Cl.

C07F 9/6561 (2006. 01)

A61K 31/5383 (2006. 01)

A61K 31/675 (2006. 01)

A61P 19/00 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

C07D 498/18 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5854227 A, 1998. 12. 29, 第 2 栏第 51-57 行, 第 60-67 行, 第 3 栏第 1 行至第 4 栏第 16 行, 第 8 栏第 11-16 行, 第 11 栏第 51 行.

US 5880111 A, 1999. 03. 09, 第 2 栏第 25 行至 30 行, 第 3 栏第 20 行至第 4 栏第 25 行, 第 8 栏第 66 行.

WO 2004/096285 A2, 2004. 11. 11, 第 4 页第 17 行, 第 5 页第 11 行, 第 8 页第 10-12 行, 摘要.

US 6333424 B1, 2001. 12. 25, 第 1 栏第 44 行至第 2 栏第 60 行, 第 3 栏第 19 至 31 行, 第 7 栏第 18 行.

US 6605609 B2, 2003. 08. 12, 摘要, 第 18 栏第 48 至 50 行.

Takehiko YAMANE et al.. Synthesis and Biological Activity of 3''-Hydroxy-5''-aminobenzoxazinorifamycin Derivatives. 《Chem. Pharm. Bull. 》. 1993, 第 41 卷 (第 1 期), 第 148-155 页.

审查员 陈曦

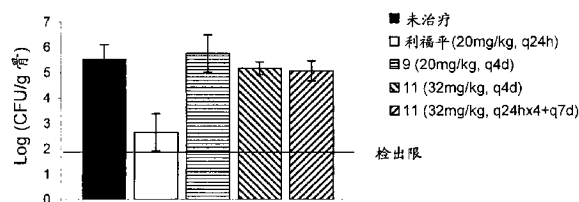
权利要求书 4 页 说明书 116 页 附图 4 页

(54) 发明名称

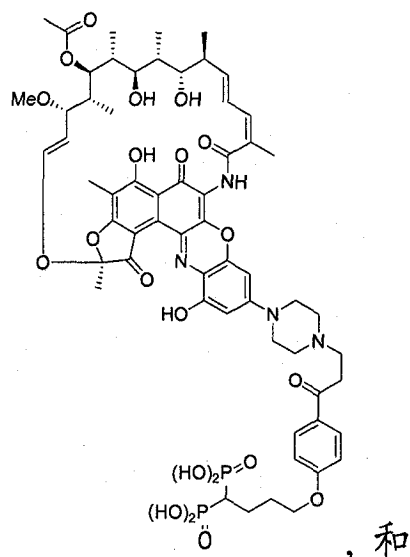
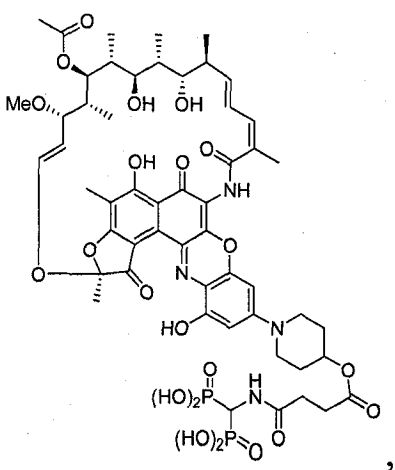
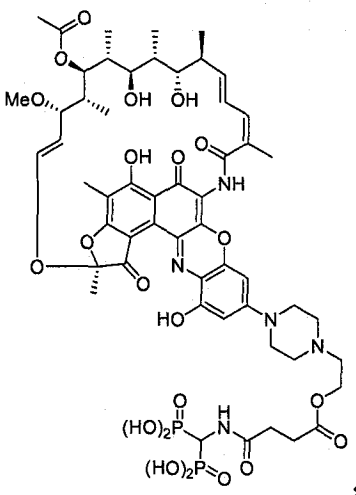
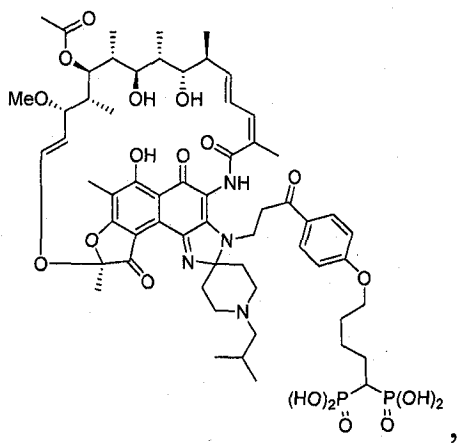
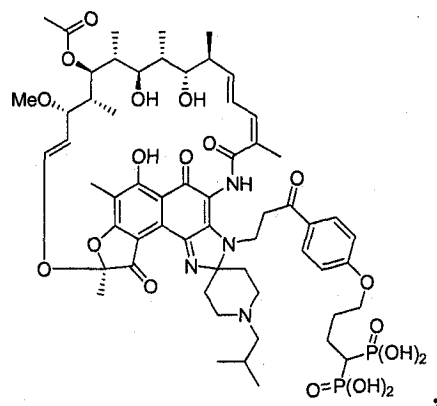
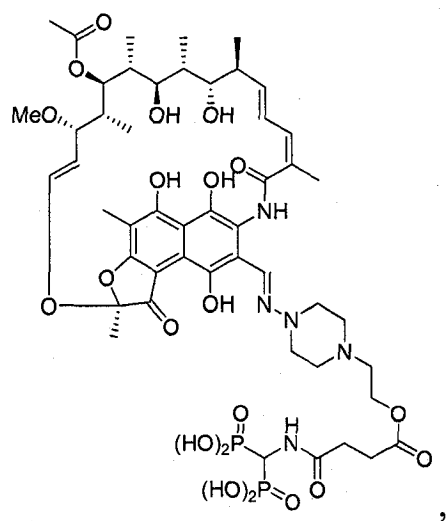
磷酸化利福霉素及其在预防和治疗骨和关节感染中的用途

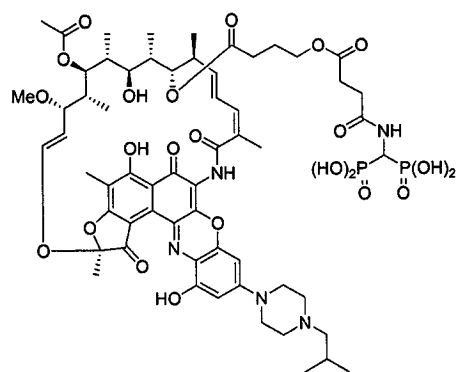
(57) 摘要

本发明涉及磷酸化利福霉素以及这类化合物的制备和使用方法。这些化合物可作为抗生素用于预防和/或治疗骨和关节感染,尤其是预防和/或治疗骨髓炎。

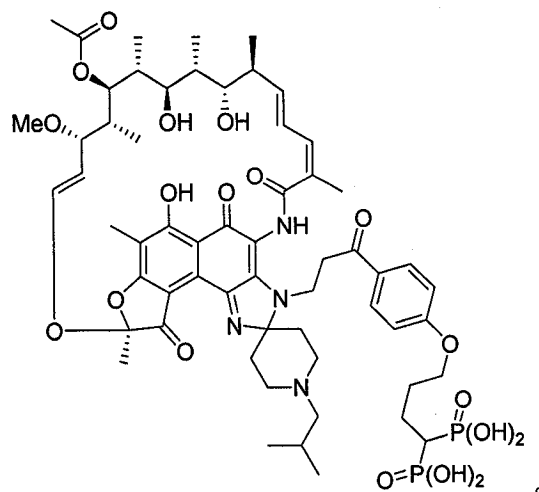


1. 一种由选自下列的结构式所表示的化合物：

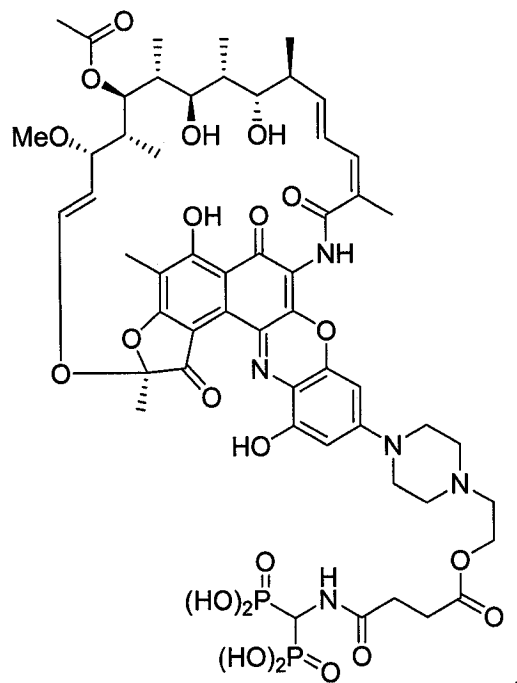




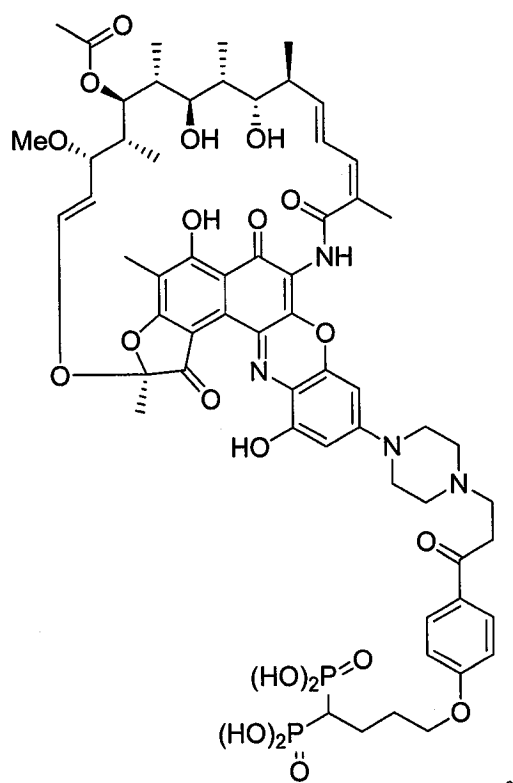
2. 一种由下式表示的化合物或其药学上可接受的盐：



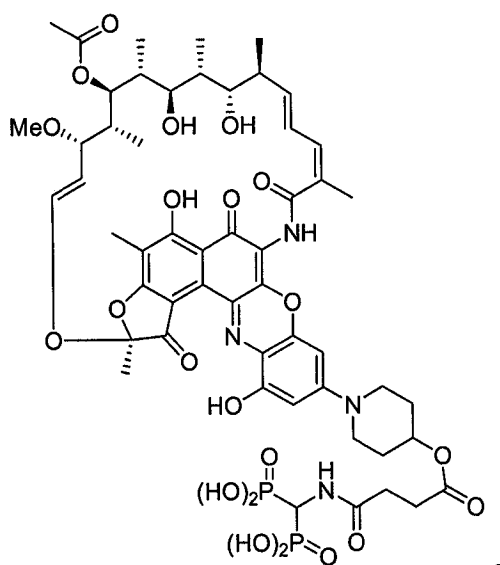
3. 一种由下式表示的化合物或其药学上可接受的盐：



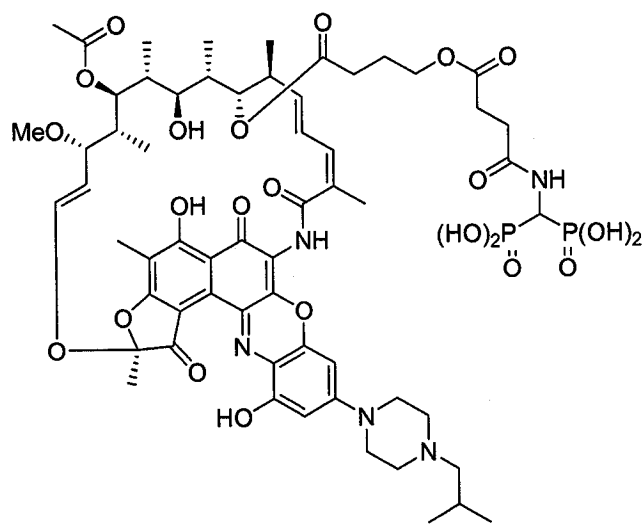
4. 一种由下式表示的化合物或其药学上可接受的盐：



5. 一种由下式表示的化合物或其药学上可接受的盐：



6. 一种由下式表示的化合物或其药学上可接受的盐：



7. 一种药物组合物,所述组合物包含权利要求 1-6 任一项中定义的化合物以及药学上可接受的载体或赋形剂。

8. 权利要求 7 的药物组合物在制备用于治疗患者的骨的细菌感染的药物中的用途。

9. 权利要求 7 的药物组合物在制备用于预防患者的骨的细菌感染的药物中的用途。

10. 权利要求 8 的用途,其中所述患者是人。

11. 权利要求 7 的药物组合物在制备用于在患者骨骼中蓄积利福霉素的药物中的用途。

磷酸化利福霉素及其在预防和治疗骨和关节感染中的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2005 年 8 月 11 日申请的美国临时申请号 60/707,145 的权益,所述文献通过引用全部结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] A) 发明领域

[0005] 本发明涉及磷酸化利福霉素。这些化合物可作为抗生素用于预防和 / 或治疗骨和关节感染,尤其是预防和 / 或治疗骨髓炎。

[0006] B) 现有技术的简要说明

[0007] 骨髓炎是多种微生物(主要是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*))引起的骨的炎症(Carek 等, *American Family Physician* (2001), 第 12 卷, 12:2413-2420)。这个痛苦而折磨人的疾病在儿童中更常见。在成人中,糖尿病和肾透析患者也易患该病。该病的急性形式可用抗生素来治疗,但是需要长期的每日治疗。然而,它可复发或转入慢性形式,需要反复住院治疗和强力治疗方案。

[0008] 利福霉素是一类半合成的抗菌安莎霉素类,其中多个成员目前都用于临床或正在进行临床评价(Burman 等, *Clin. Pharmacokinet.* (2001), 40:327-341)。利福霉素靶向细菌 DNA 依赖型 RNA 聚合酶,其亲和力比同等真核酶要大 2-4 个数量级(Floss 和 Yu, *Chem Rev.* (2005), 105:621-632)。利福霉素的作用是通过结合 RNA 聚合酶全酶 β 亚基上的确定位点,其结果是干扰和抑制 RNA 合成的起始期。这些抑制剂的通用结构性骨架都具有很确定的位置,使得可以调节它们的药代动力学和药效学特性而基本上不改变它们的结合模式。这使得该类群中涵盖各种已经充分研究的化合物,包括利福平(US 3,342,810)、利福喷汀(US 4,002,752)、利福定(US 4,353,826)、利福布汀(US 4,219,478)、利福拉齐(US 4,983,602)和利福昔明(US 4,341,785)。目前,也已知道多种 25-脱乙酰类似物是引人注目的抗菌药(美国专利申请 2005/043298)。利福霉素对革兰氏阳性病原菌特别有效,而对革兰氏阴性菌效果略差,而且仅在高剂量时或当细胞色素 P3A 抑制剂存在时通常才会表现出副作用。它们对处于休眠状态的细菌的独特能力(这出于它们对短期爆发性 RNA 合成的需要,甚至在不生长的情况下),使它们成为用于慢性感染的主要候选者,通常联用以避免相当高频率的耐药性。为此,利福平,通常与其他抗菌药联用,对治疗骨和关节感染具有良好结果(Darley 和 McGowan, *J. Antimicrob. Chemother.* (2004) 53,928-935;Widmer 等, *Clin. Infect. Dis.* (1992) 14,1251-1253)。

[0009] 二膦酸盐类是良好表征的骨亲合剂(bone-seeking agent)。认为这些化合物因其与形成骨组织的羟基磷灰石中的 Ca^{2+} 离子结合而对骨骼具有高亲和力(Hirabayashi 和 Fujisaki, *Clin. Pharmacokinet.* (2003) 42(15):1319-1330)。因此,已经制备了多种不同类型的二膦酸酯缀合的化合物,用于将药物选择性靶向骨,包括蛋白质(Uludag 等, *Biotechnol. Prog.* (2000) 16:1115-1118)、维生素(US 6,214,812、US2003/0129194 和 WO 02/083150)、酪氨酸激酶抑制剂(WO 01/44258 和 WO 01/44259)、激素(US 5,183,815 和 US 2004/0116673)和骨扫描剂(US4,810,486)。这些和其它二膦酸(酯)衍生物已经作为治

疗药用于骨病,例如关节炎(US 4,746,654)、骨质疏松症(US 5,428,181和US6,420,384)、高钙血症(US 4,973,576)和骨癌(US 6,548,042)。

[0010] 也已经研究了靶向递送抗生素的若干策略(US 5,900,410,US2002/0142994;US 2004/0033969,US 2005/026864)。对于靶向骨骼递送的抗生素,一些人已经提出使用二磷酸化抗生素。然而,事实上这类化合物中只合成了少数,包括四环素类、 β -内酰胺类和氟喹诺酮类(US 5,854,227;US 5,880,111;DE 195 32 235;Pieper和Keppler,Phosphorus,Sulfur和Silicon(2001)170:5-14;和Herczegh等,J. Med. Chem(2002)45:2338-41)。此外,这些化合物都尚未用于体内给药,也没有显示出任何靶向骨骼的活性。

[0011] 尽管过去几年有些进展,但是骨特异性递送仍然受到骨骼的独特解剖学特性的限制。尽管二磷酸(酯)修饰是一个有希望的方法,但是并不一定会成功,因为几十年的进展证明,在化合物-化合物的基础上需要设计和优化治疗性优化的二磷酸(酯)衍生物(Hirabasashi和Fujisaki,Clin Pharmacokinet(2003),42(15):1319-1330)。

[0012] 鉴于以上观点,需要更好的可给予的药物,用于预防和治疗骨和关节感染。更具体地讲,需要能同时将时间控制(或缓释)和空间控制(或靶向)的药物递送给骨骼的高活性利福霉素磷酸化衍生物。

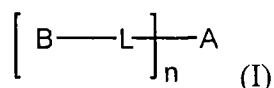
[0013] 本发明正好满足这些需求以及其它需求,根据以下说明书,这些需求对于本领域技术人员来说将会是显而易见的。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及对结合骨骼具有亲和力的抗微生物化合物。更具体地讲,本发明涉及磷酸化利福霉素。这些化合物可作为抗生素用于预防和/或治疗骨和关节感染,尤其是预防和/或治疗骨髓炎。

[0016] 在一个实施方案中,本发明的化合物以下式(I)或其药学上可接受的盐或前体药物为代表:

[0017]



[0018] 其中:

[0019] B为磷酸化基团(phosphonated group);

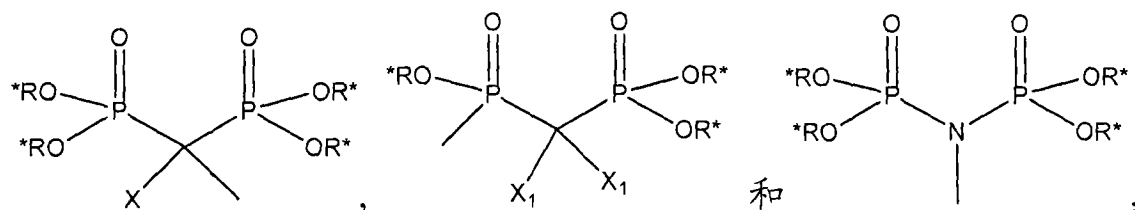
[0020] L为将B与A偶合的可裂解连接基(cleavable linker);

[0021] n为1、2、3、4、5、6或7,优选1、2或3;和

[0022] A为利福霉素。

[0023] 在一个优选的实施方案中,B为对骨组织具有高亲和力的磷酸化基团。优选B为二磷酸酯基团。更优选B为选自以下的二磷酸酯基团:

[0024]



[0025] 其中:

[0026] 各 R^* 独立选自 H、低级烷基、环烷基、芳基和杂芳基, 前提条件是至少两个 R^* 为 H;

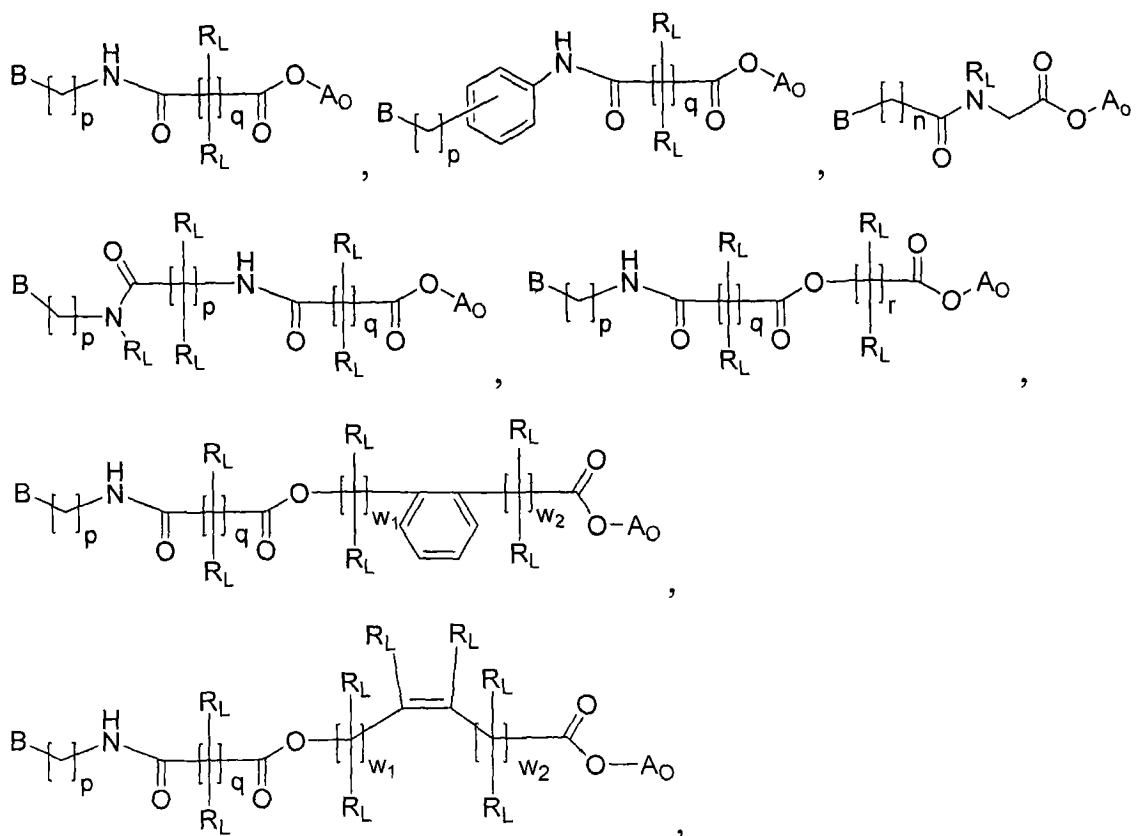
[0027] X 为 H、OH、 NH_2 或卤素基团; 和

[0028] X_1 都为 H, 或各自独立选自 H、OH、 NH_2 和卤素基团。

[0029] 在另一个优选的实施方案中, L 为将 B 与 A 共价而可逆地耦合的可裂解连接基。

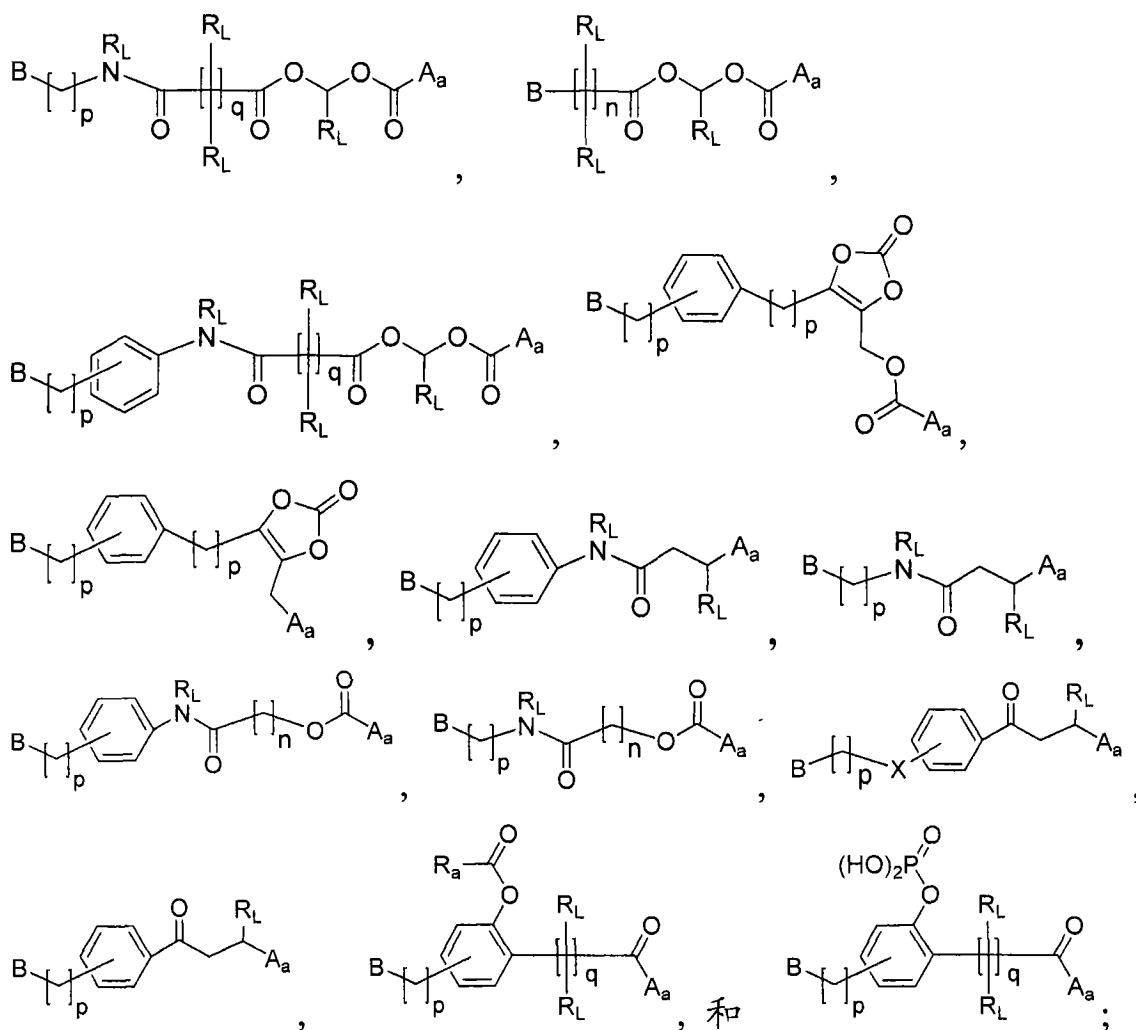
[0030] 优选 L 通过 A 上的一个或多个羟基、A 上的一个或多个氮原子或者通过 A 上的一个或多个羟基和一个或多个氮原子, 将 B 与 A 耦合。当 L 通过 A 上的羟基将 B 与 A 耦合时, 优选 L 为下列连接基团之一:

[0031]



[0032]





[0044] 其中：

[0045] n 为 ≤ 10 的整数，优选 1、2、3 或 4，更优选 1 或 2；

[0046] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数，优选 0、1、2、3 或 4，更优选 0 或 1；

[0047] q 为 2 或 3；

[0048] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基，优选 H；

[0049] R_a 为 C_xH_y，其中 x 为 0 至 20 的整数，y 为 1 至 2x+1 的整数；

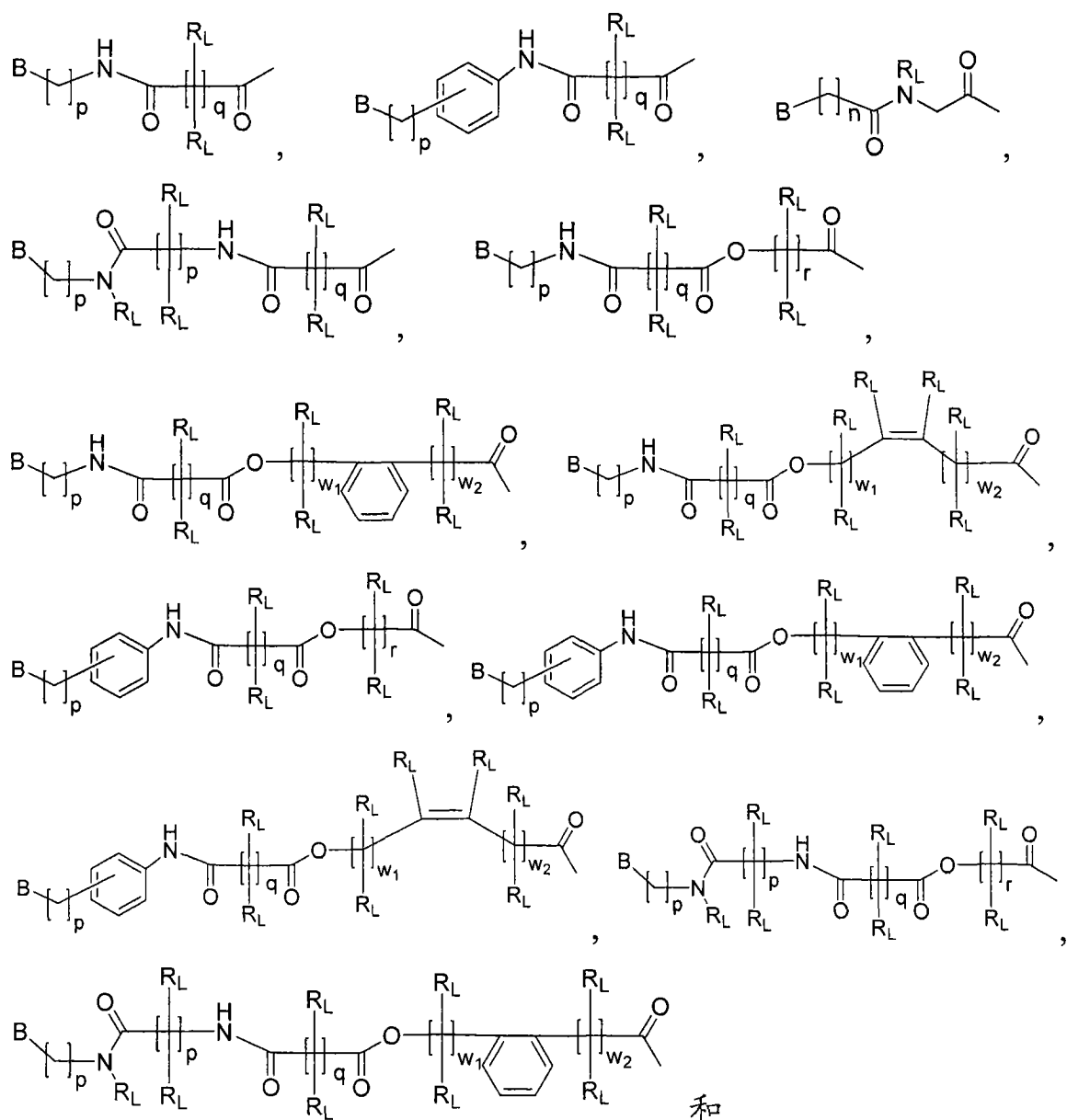
[0050] X 为 CH₂、-CONR_L-、-CO-O-CH₂- 或 -CO-O-；

[0051] B 代表膦酸化基团；和

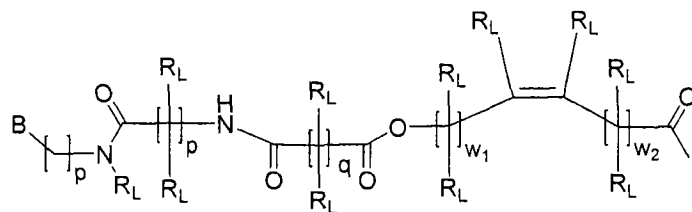
[0052] A_a 代表 A 上的氮原子。

[0053] 在又一个优选的实施方案中，B-L- 中的至少一个与利福霉素 A 上的羟基官能团偶合。优选当 B-L- 与羟基官能团偶合时，B-L- 为下列基团之一：

[0054]



[0055]

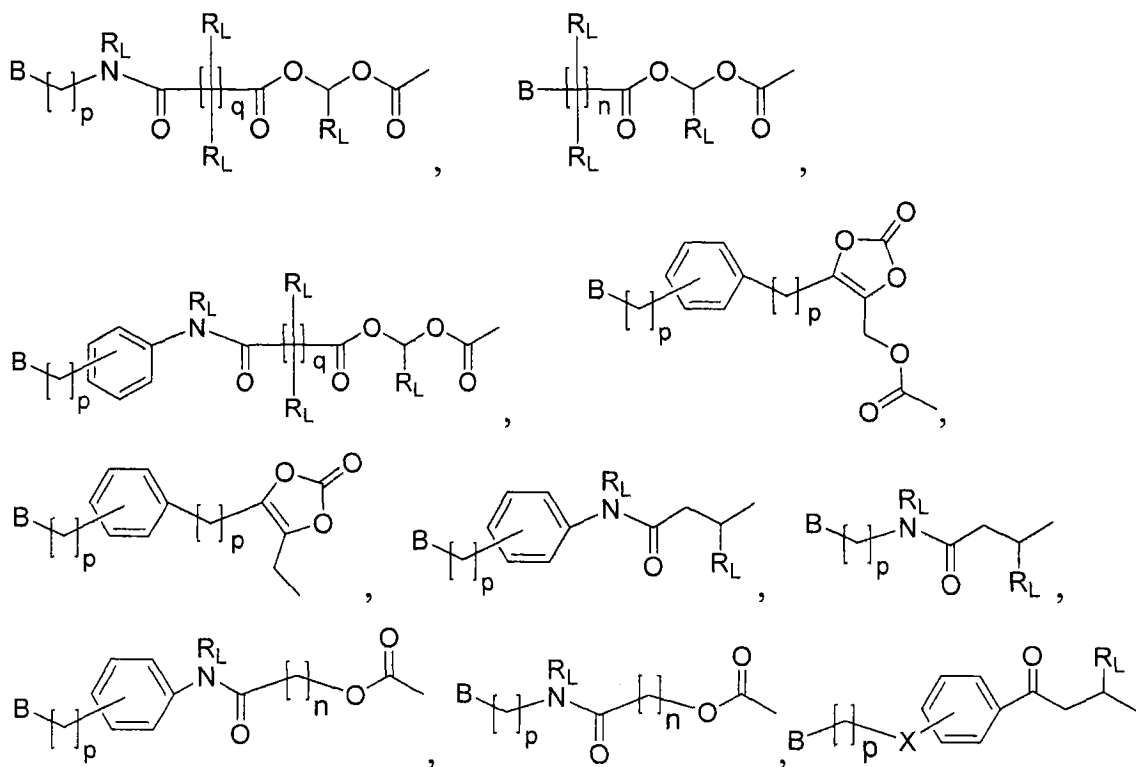


[0056] 其中：

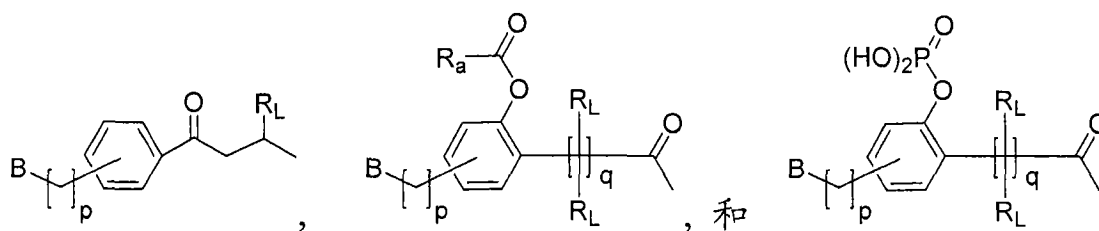
[0057] B 代表磷酸化基团；[0058] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数, 优选 0、1、2、3 或 4, 更优选 0 或 1；[0059] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基, 优选 H；[0060] q 为 2 或 3；[0061] n 为 ≤ 10 的整数, 优选 1、2、3 或 4, 更优选 1 或 2；[0062] r 为 1、2、3、4 或 5；和[0063] w_1 和 w_2 各自为 ≥ 0 的整数, 致使其总和 ($w_1 + w_2$) 为 1、2 或 3。

[0064] 在又一个优选的实施方案中, B-L- 中的至少一个与利福霉素 A 上的氮原子偶合。优选当 B-L- 与氮原子偶合时, B-L- 为下列基团之一:

[0065]



[0066]



[0067] 其中:

[0068] B 代表所述磷酸化基团;

[0069] n 为 ≤ 10 的整数, 优选 1、2、3 或 4, 更优选 1 或 2;

[0070] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数, 优选 0、1、2、3 或 4, 更优选 0 或 1;

[0071] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基, 优选 H;

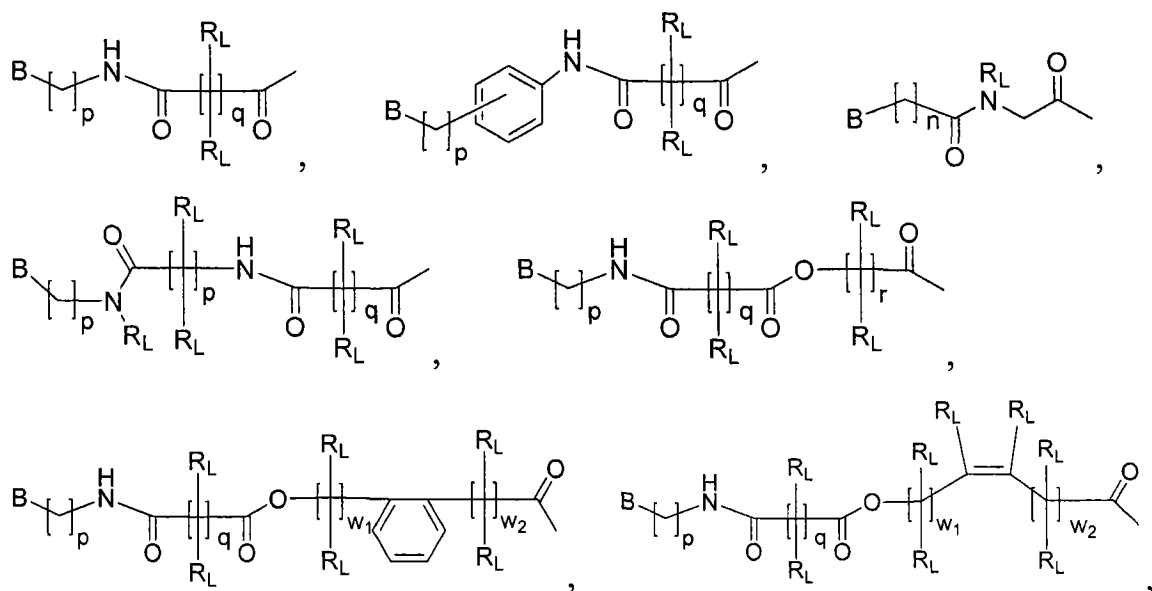
[0072] q 为 2 或 3;

[0073] X 为 CH_2 、 $-\text{CONR}_L-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CO}-\text{O}-$; 和

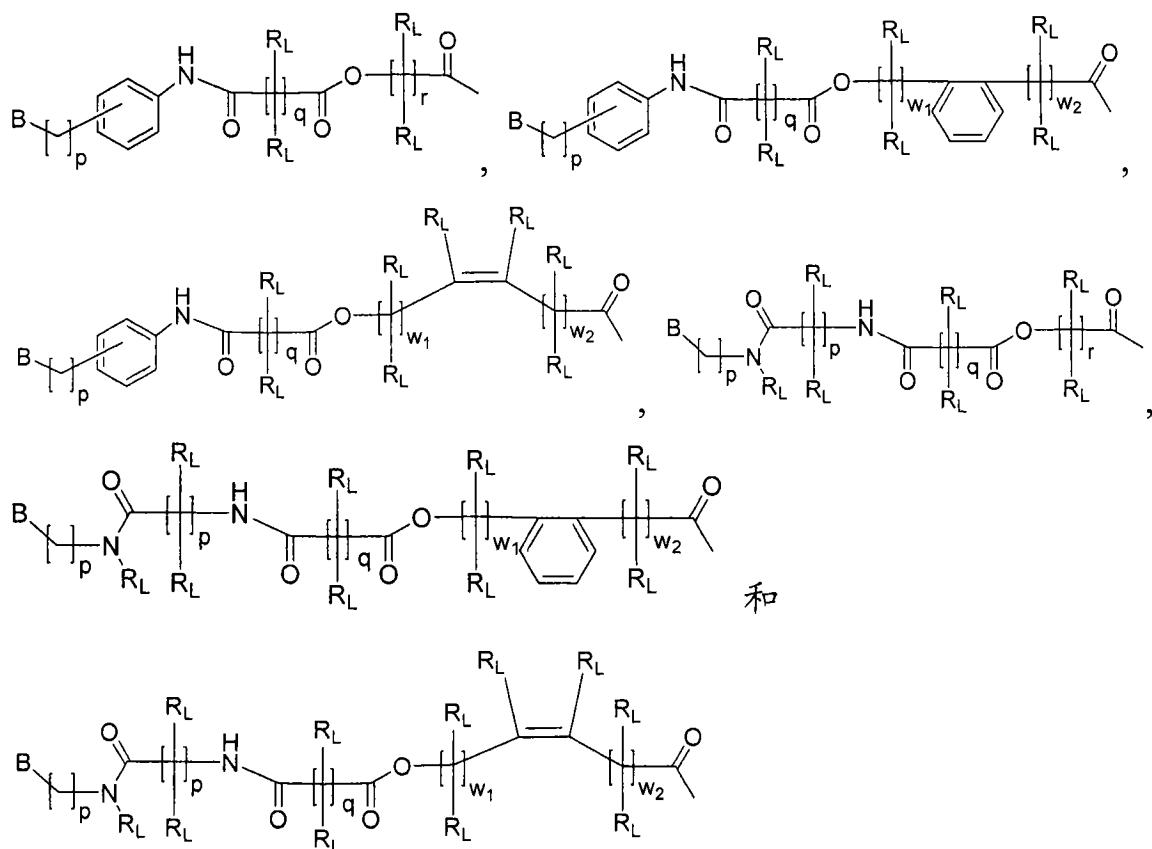
[0074] R_a 为 C_xH_y , 其中 x 为 0 至 20 的整数, y 为 1 至 $2x+1$ 的整数。

[0075] 在一个额外优选的实施方案中, n 为 2 至 7 的整数、B-L- 中的至少一个与利福霉素 A 上的羟基官能团偶合, 而 B-L- 中的至少一个与利福霉素 A 上的氮原子偶合。优选当 B-L- 与羟基官能团偶合时, B-L- 为下列基团之一:

[0076]



[0077]



[0078] 其中：

[0079] B 代表膦酸化基团；

[0080] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数，优选 0、1、2、3 或 4，更优选 0 或 1；

[0081] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基，优选 H；

[0082] q 为 2 或 3；

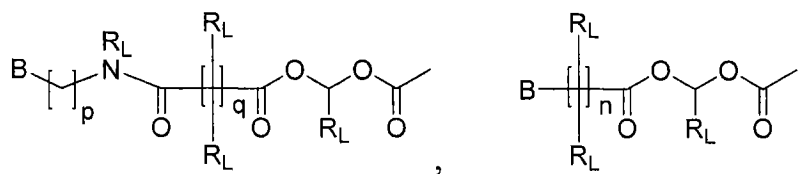
[0083] n 为 ≤ 10 的整数，优选 1、2、3 或 4，更优选 1 或 2；

[0084] r 为 1、2、3、4 或 5；和

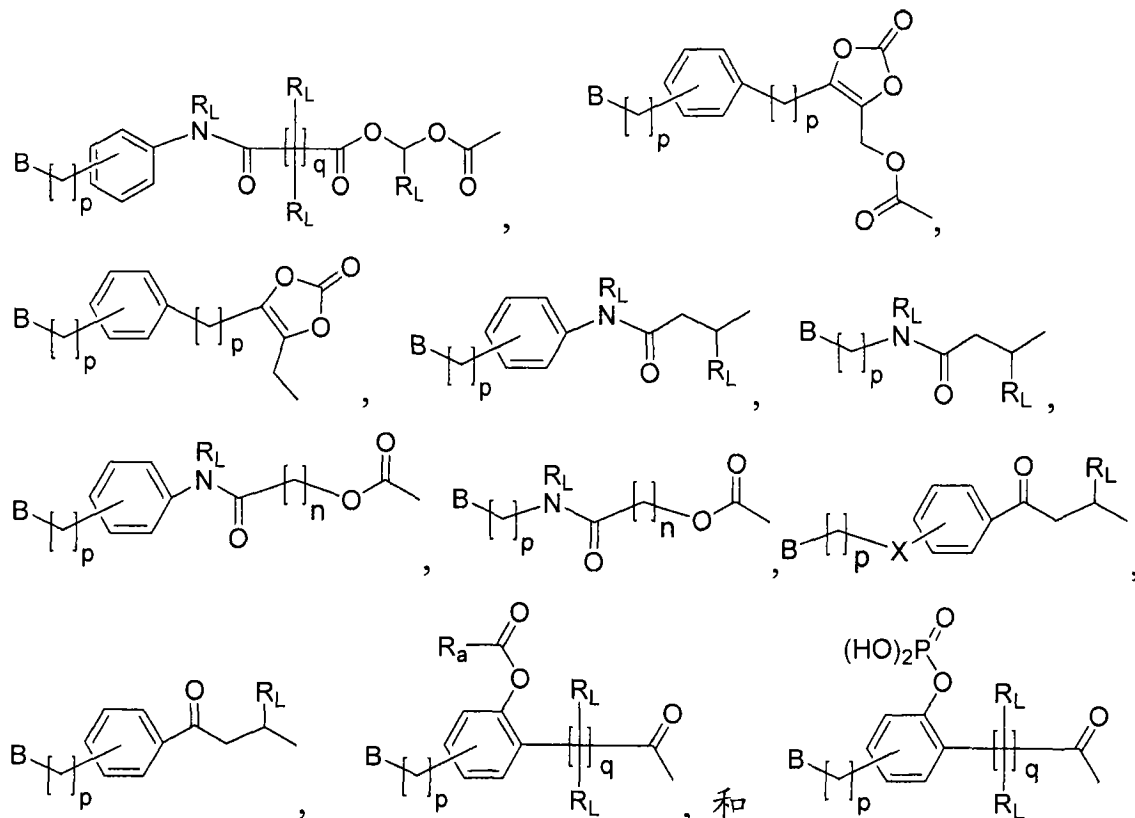
[0085] w₁ 和 w₂ 各自为 ≥ 0 的整数，致使其总和 (w₁+w₂) 为 1、2 或 3。

[0086] 优选当 B-L- 与氮原子偶合时, B-L- 为下列基团之一:

[0087]



[0088]



[0089] 其中:

[0090] B 代表所述磷酸化基团;

[0091] n 为 ≤ 10 的整数, 优选 1、2、3 或 4, 更优选 1 或 2;

[0092] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数, 优选 0、1、2、3 或 4, 更优选 0 或 1;

[0093] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基, 优选 H;

[0094] q 为 2 或 3;

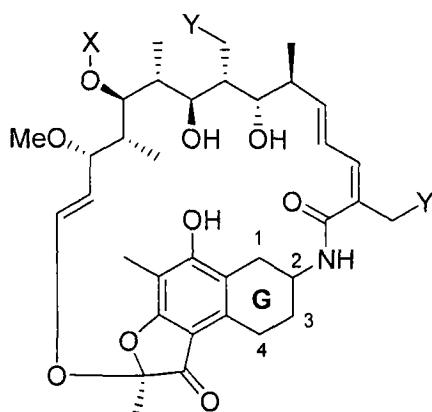
[0095] X 为 CH_2 、 $-\text{CONR}_L-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CO}-\text{O}-$; 和

[0096] R_a 为 C_xH_y , 其中 x 为 0 至 20 的整数和 y 为 1 至 $2x+1$ 的整数。

[0097] 在又一个优选的实施方案中, n 为 1、2 或 3。

[0098] 优选利福霉素 A 具有下式 A1 所表示的结构:

[0099]

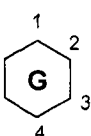


A1

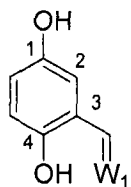
[0100] 其中：

[0101] X 为 H- 或 R_1CO- ，其中 R_1 为 1-6 个碳原子的取代或未取代的烷基链；

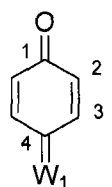
[0102] 各 Y 独立选自 H- 和 $RO-$ ，其中 R 为 H-、 R_1- 或 R_1CO- ，其中 R_1 如上定义；

[0103]  选自下式 A2-A10：

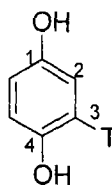
[0104]



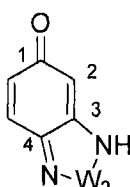
A2



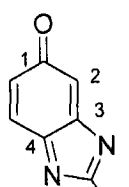
A3



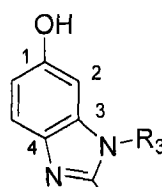
A4



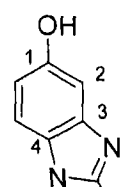
A5



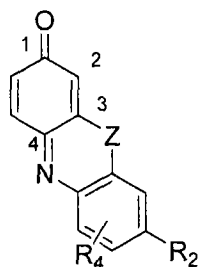
A6



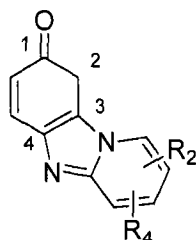
A7



A8



A9



A10

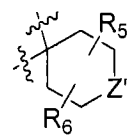
[0105] 其中：

[0106] R_2 为 H-、1-10 个碳原子的取代或未取代的烷基链、或者二烷基氨基，优选所述二烷基氨基为取代哌啶、取代吗啉或取代哌嗪；

[0107] R_3 为 H- 或 1-7 个碳原子的取代或未取代的烷基链；

[0108] R_4 为羟基、巯基或者 1-3 个碳原子的取代或未取代的烷基链；

[0109] W_1 为氧或 $-NR_2$ ，其中 R_2 如上定义；

[0110] W_2 为取代或未取代的亚甲基，包括： 其中 R_5 和 R_6 独立地为 H- 或 1-5 个碳原子的取代或未取代的烷基链， Z' 为氧原子、硫原子、取代亚甲基、羰基、 $-NR_1$ 或 $-N(O)$

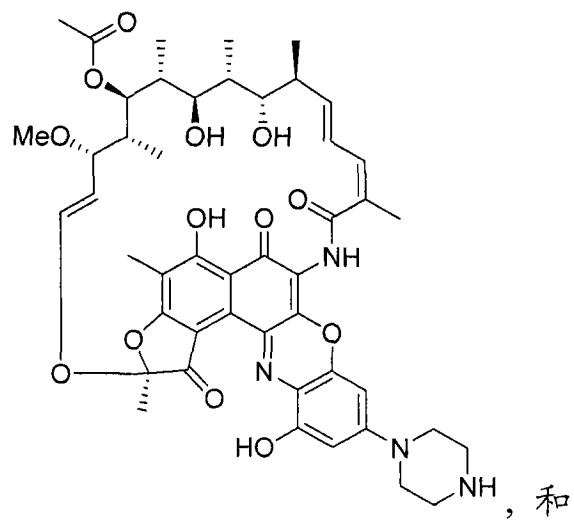
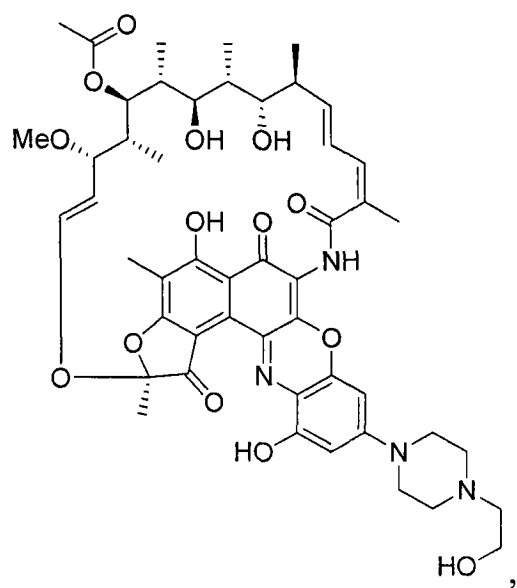
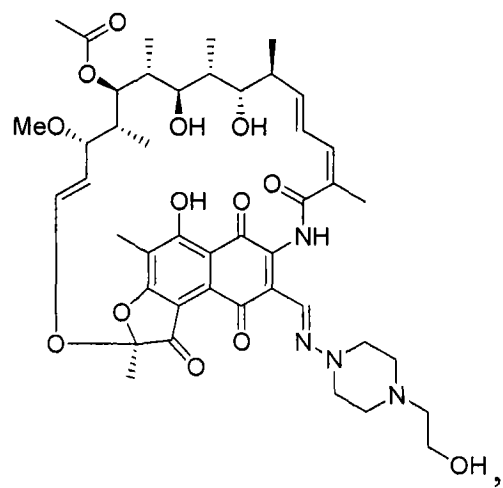
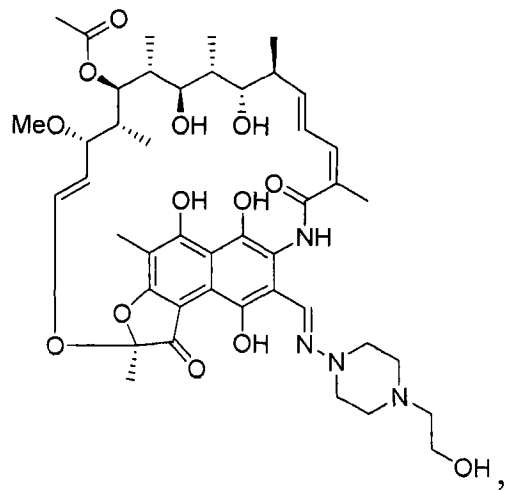
R_1 , 其中 R_1 如上定义 ;

[0111] T 为卤素或 R_2 , 其中 R_2 如上定义 ; 和

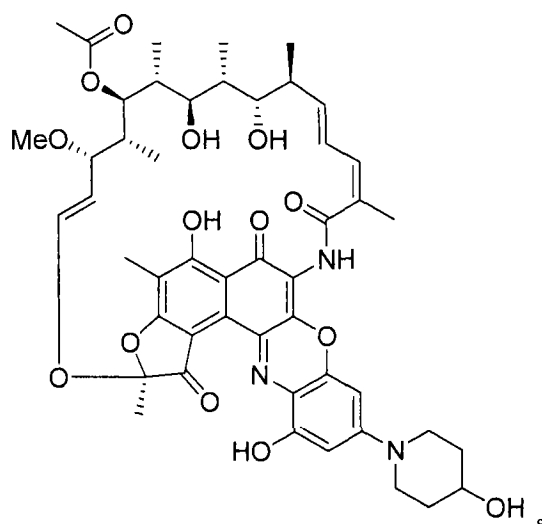
[0112] Z 为 O、S 或 NR_3 , 其中 R_3 如上定义。

[0113] 更优选利福霉素 A 具有下列结构式之一所表示的结构或其抗微生物衍生物 :

[0114]



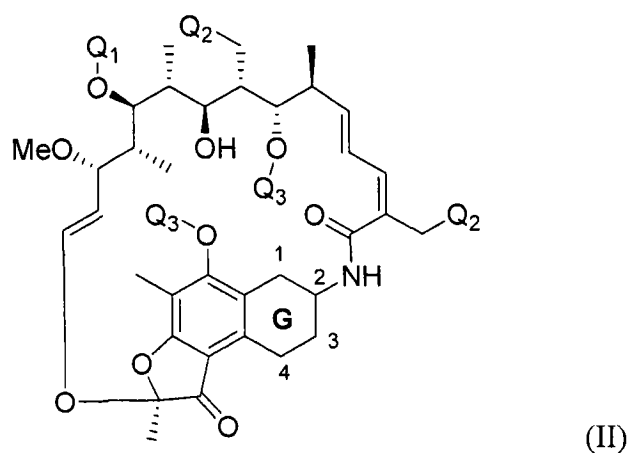
[0115]



[0116] 还优选利福霉素 A 是利福平、利福喷汀、利福布汀、利福拉齐、利福昔明、利福定或这些化合物之一的抗微生物衍生物。

[0117] 在另一个实施方案中,本发明的化合物以下式 (II) 或其药学上可接受的盐或前体药物为代表:

[0118]

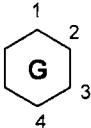


[0119] 其中:

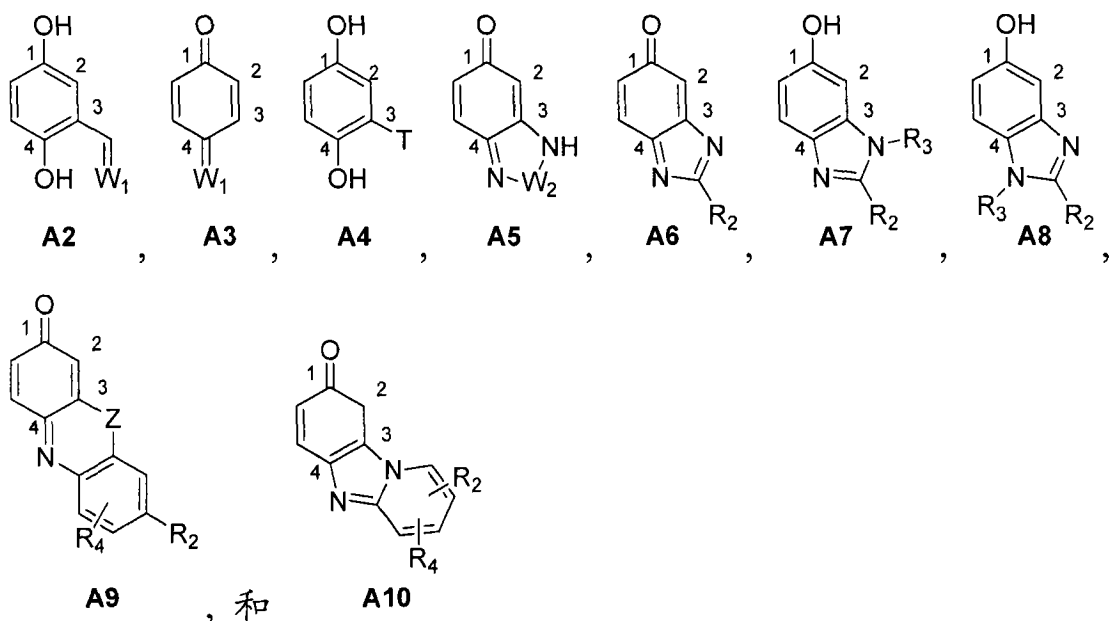
[0120] Q_1 为 H-、 R_1CO- 或 L_1- , 其中 R_1 为 1-6 个碳原子的取代或未取代的烷基链;

[0121] 各 Q_2 独立选自 H-、 $RO-$ 和 L_2O- , 其中 R 为 H-、 R_1- 或 R_1CO- , 其中 R_1 如上定义;

[0122] 各 Q_3 独立选自 H- 和 L_3- ;

[0123]  选自下式 A2-A10:

[0124]



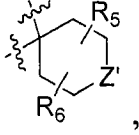
[0125] 其中

[0126] R_2 为 H-、1-10 个碳原子的取代或未取代的烷基链、或者二烷基氨基, 优选所述二烷基氨基为取代哌啶、取代吗啉或取代哌嗪, 其中如果 R_2 为 1-10 个碳原子的取代烷基链、取代哌啶、取代吗啉或取代哌嗪, 则该取代基为选自 L_4O- 、 L_5S- 和 L_6NR_7- 中的一个成员, 其中 R_7 为 1-7 个碳原子的取代或未取代的烷基链;

[0127] R_3 为 H-、1-7 个碳原子的取代或未取代的烷基链、或 L_7- ;

[0128] R_4 为羟基、巯基或 1-3 个碳原子的取代或未取代的烷基链、 L_8O- 或 L_9S- ;

[0129] W_1 为氧或 $-NR_2$, 其中 R_2 如上定义;

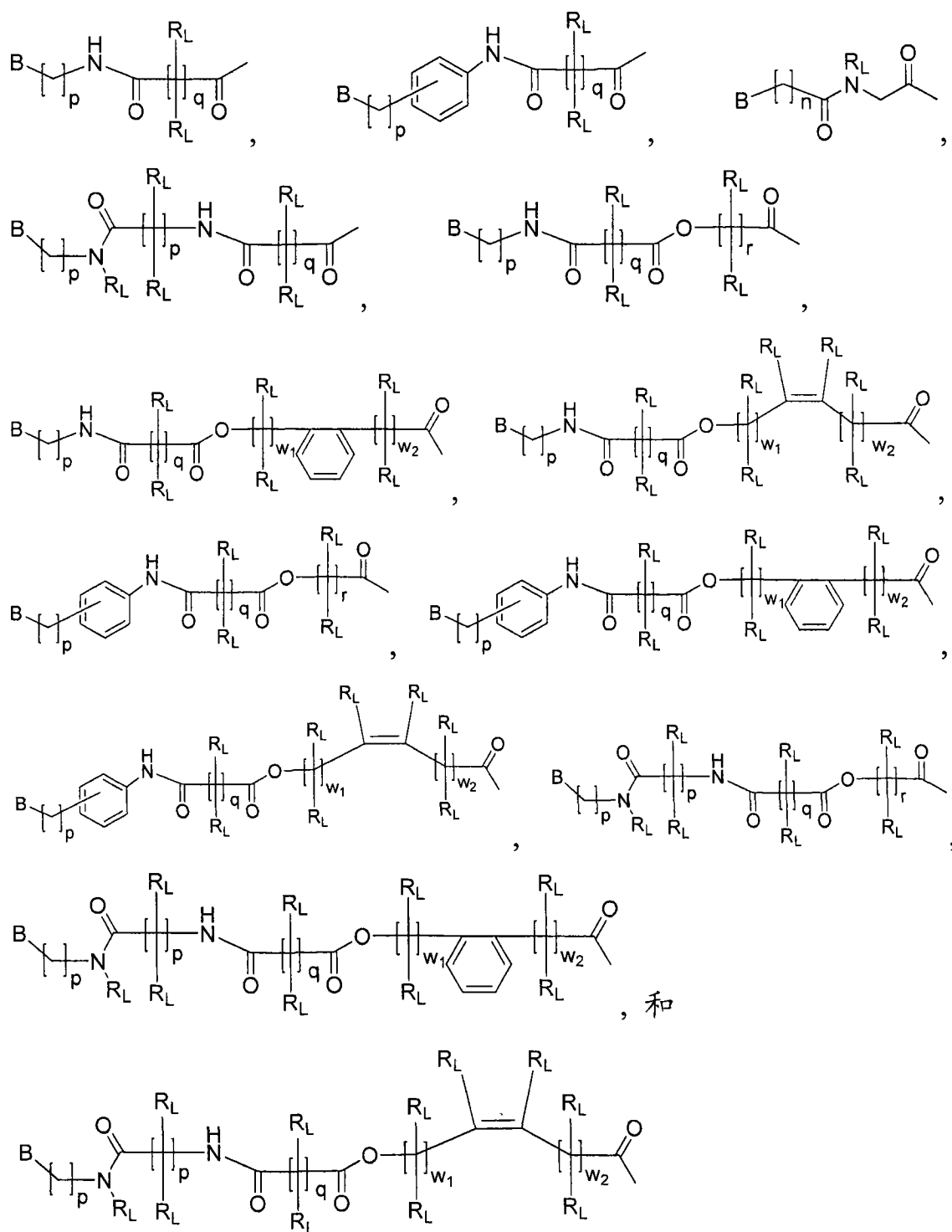
[0130] W_2 为取代或未取代的亚甲基, 包括  其中 R_5 和 R_6 独立地为 H- 或 1-5 个碳原子的取代或未取代的烷基链, 而 Z' 为氧原子、硫原子、取代亚甲基、羰基、 $-NR_1$ 或 $-N(O)R_1$, 其中 R_1 如上定义;

[0131] T 为卤素或 R_2 , 其中 R_2 如上定义;

[0132] Z 为 O、S 或 NR_3 , 其中 R_3 如上定义;

[0133] L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 L_8 和 L_9 各自为选自以下的可裂解连接基团:

[0134]



[0135] 其中：

[0136] n 为 ≤ 10 的整数, 优选 1、2、3 或 4, 更优选 1 或 2；

[0137] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数, 优选 0、1、2、3 或 4, 更优选 0 或 1；

[0138] q 为 2 或 3；

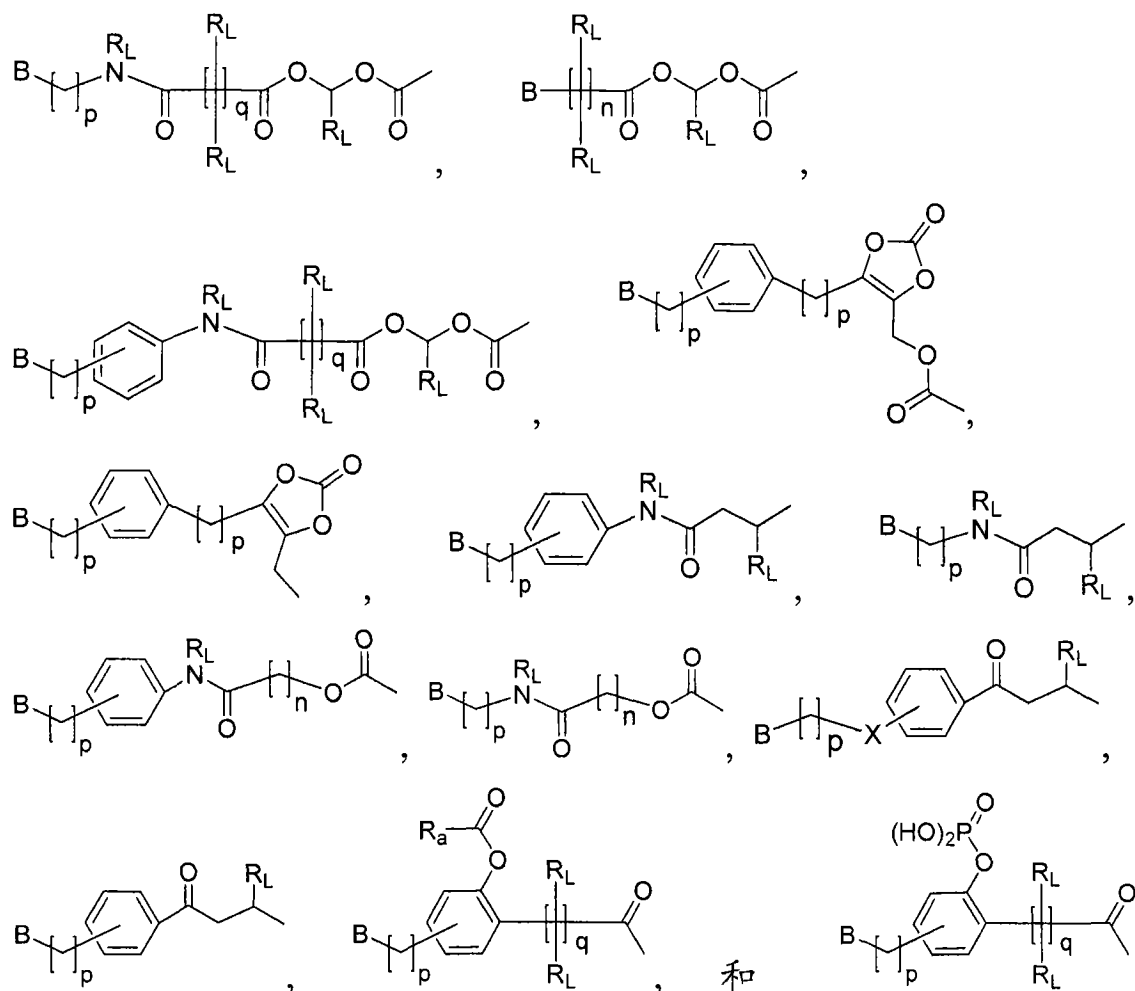
[0139] r 为 1、2、3、4 或 5；

[0140] w_1 和 w_2 为 ≥ 0 的整数, 致使其总和 $(w_1 + w_2)$ 为 1、2 或 3；

[0141] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基, 优选 H；

[0142] L_6 和 L_7 各自为独立选自以下的可裂解连接基团：

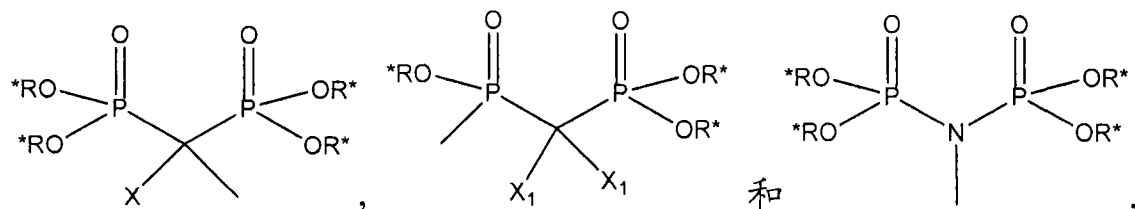
[0143]



[0144] 其中：

[0145] n 为 ≤ 10 的整数, 优选 1、2、3 或 4, 更优选 1 或 2；[0146] 各 p 独立地为 0 或为 ≤ 10 的整数, 优选 0、1、2、3 或 4, 更优选 0 或 1；[0147] q 为 2 或 3；[0148] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基, 优选 H；[0149] R_a 为 C_xH_y , 其中 x 为 0 至 20 的整数, y 为 1 至 $2x+1$ 的整数；和[0150] X 为 CH_2 、 $-CONR_L-$ 、 $-CO-O-CH_2-$ 或 $-CO-O-$ ；[0151] B 为选自以下的磷酸化基团：

[0152]



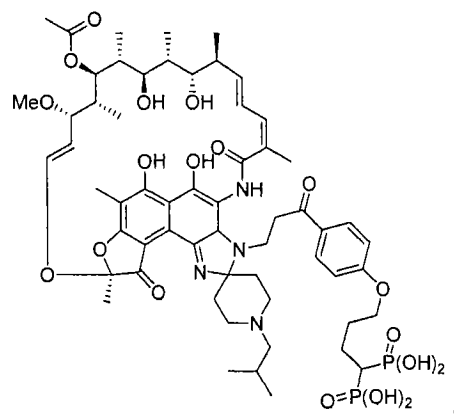
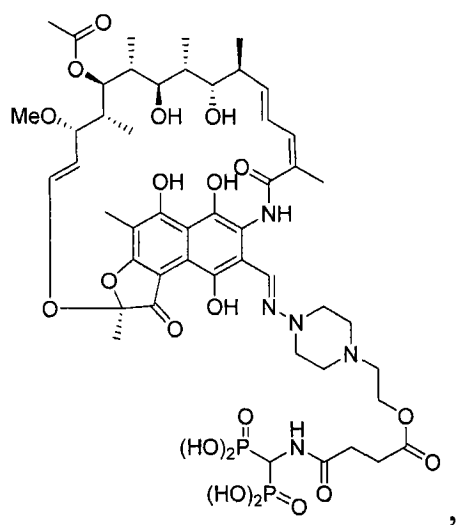
[0153] 其中：

[0154] 各 R^* 独立选自 H、低级烷基、环烷基、芳基和杂芳基, 前提条件是至少两个 R^* 为 H；[0155] X 为 H、OH、 NH_2 或卤素基团；[0156] 各 X_1 独立选自 H、OH、 NH_2 和卤素基团；前提条件是 L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 L_6 、 L_7 、 L_8 和 L_9

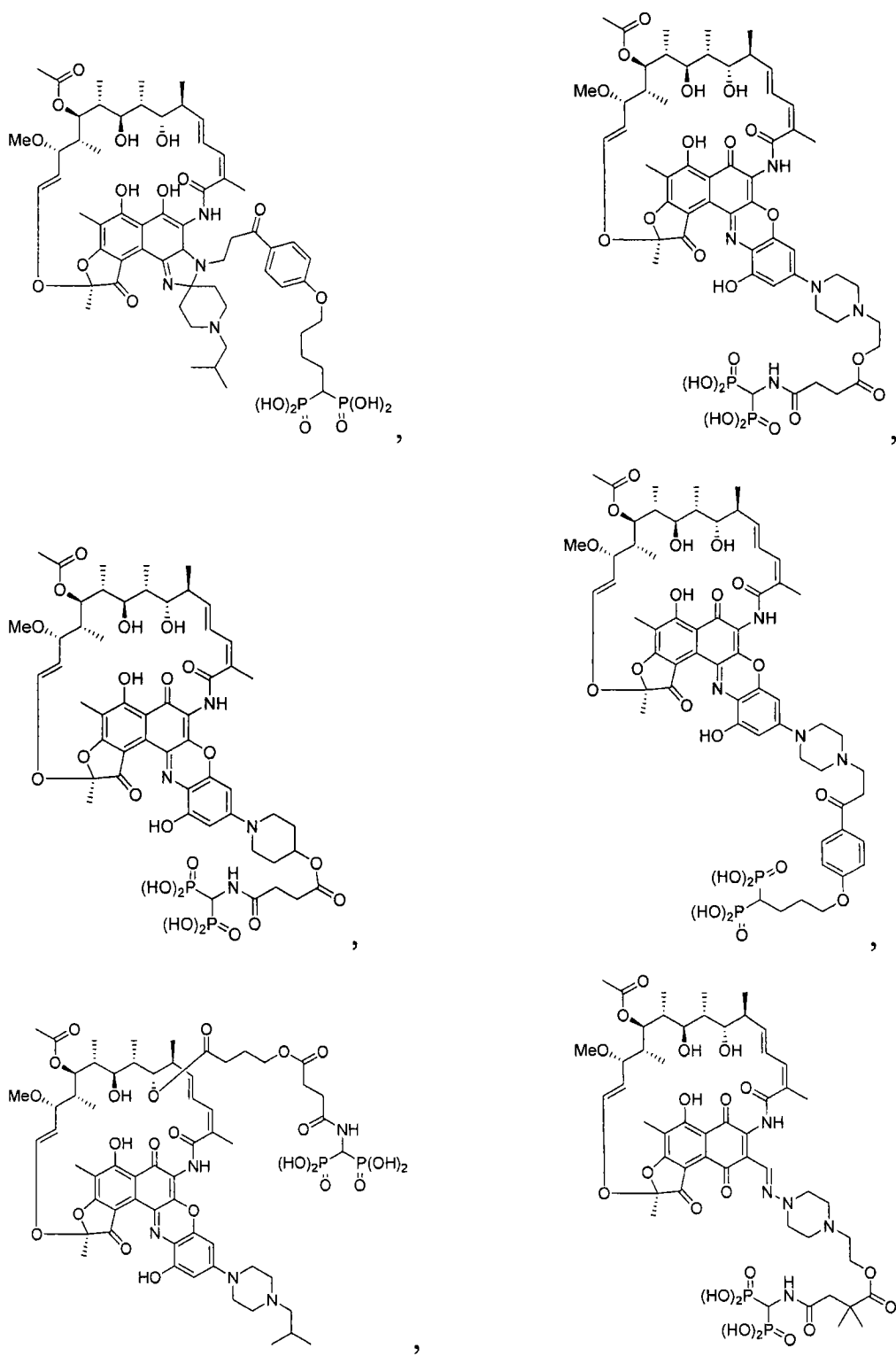
中至少存在一个。

[0157] 在又一个优选的实施方案中,本发明的化合物的结构选自下列结构,并且可为这些化合物的药学上可接受的盐和前体药物:

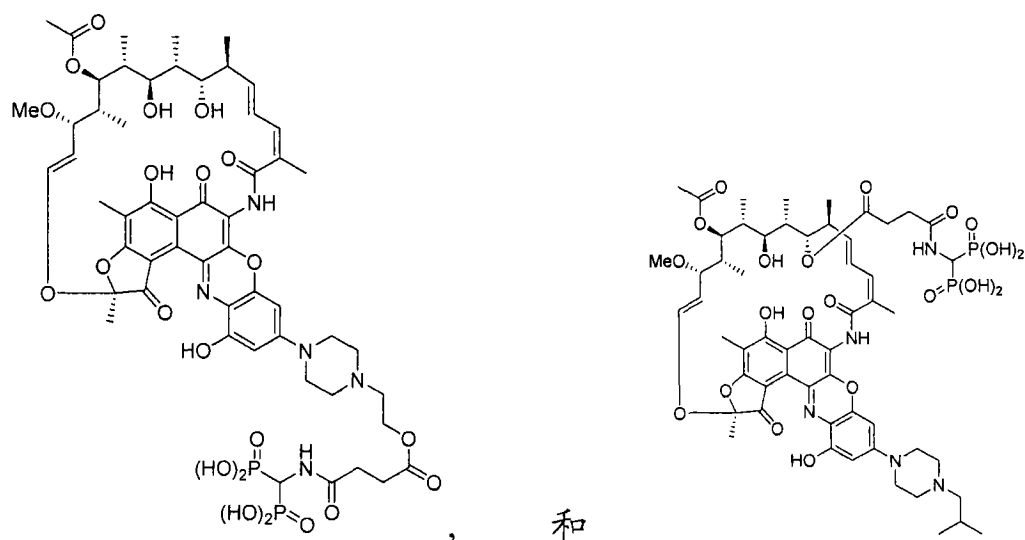
[0158]



[0159]

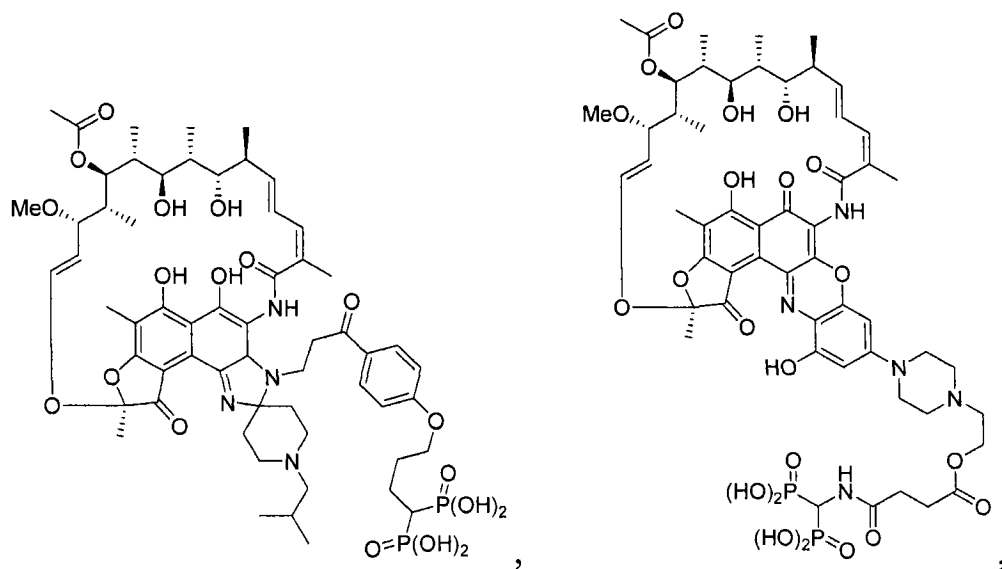


[0160]

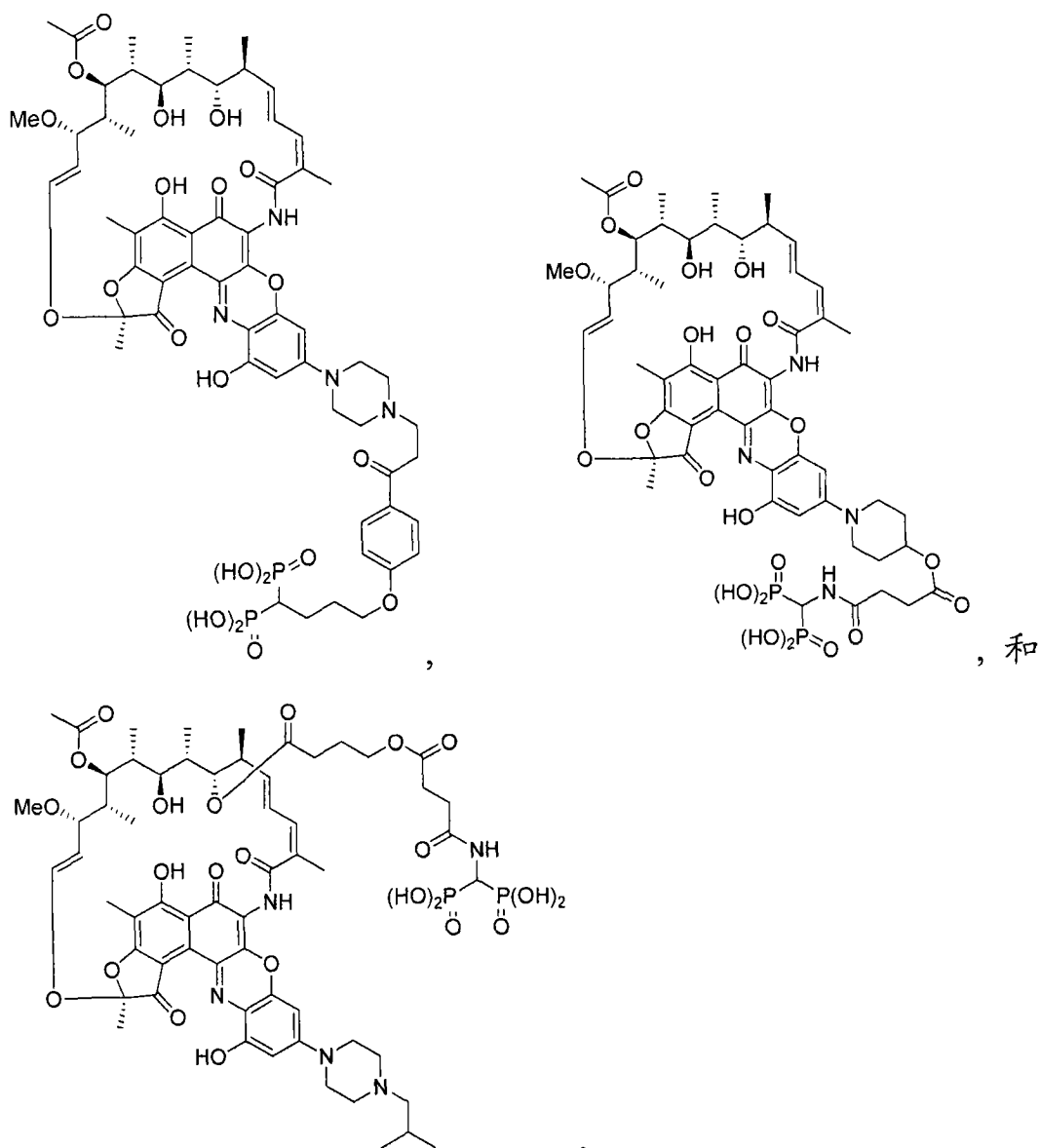


[0161] 本发明特别优选的化合物的结构选自下列结构,并且可为这些化合物的药学上可接受的盐和前体药物:

[0162]



[0163]



[0164] 本发明的另一方面公开了药物组合物,所述组合物包含一种或多种本文所定义的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0165] 本发明也涵盖治疗患者的细菌感染的方法,所述方法包括给予患有细菌感染或其它需要所述治疗的疾病的患者药用有效量的一种或多种本文所定义的化合物或本文所定义的药物组合物。患者可以是动物,优选哺乳动物,更优选人。

[0166] 本发明还涵盖预防患者的细菌感染的方法,所述方法包括给予患者预防有效量的一种或多种本文所定义的化合物或本文所定义的药物组合物。可在侵入性治疗之前、期间或之后,将一种或多种化合物或药物组合物的预防有效量给予患者。患者可以是动物,优选哺乳动物,更优选人。

[0167] 本发明也涵盖治疗患者的细菌感染的方法,所述方法包括给予患有细菌感染或其它需要所述治疗的疾病的患者药用有效量的一种或多种本文所定义的化合物或本文所定义的药物组合物,以及同时给予第二治疗药。优选第二治疗药是抗生素。更优选第二治疗药是选自以下的抗生素:四环素、四环素衍生的抗菌药物、甘氨酸环素、甘氨酸环素衍生的抗菌药物、米诺环素、米诺环素衍生的抗菌药物、噁唑烷酮类抗菌药物、氨

基糖苷类抗菌药物、喹诺酮类抗菌药物、万古霉素、万古霉素衍生的抗菌药物、替考拉宁、替考拉宁衍生的抗菌药物、伊瑞霉素、伊瑞霉素衍生的抗菌药物、氯伊瑞霉素(chloroeremomycin)、氯伊瑞霉素衍生的抗菌药物、达托霉素和达托霉素衍生的抗菌药物。

[0168] 本发明也提供在患者骨骼中蓄积利福霉素的方法,所述方法包括给予患者一种或多种本文所定义的化合物或本文所定义的药物组合物。这类在患者骨骼中蓄积利福霉素的方法也可用于延长利福霉素在患者骨骼中的存在时间。在各种情况下,患者可以是动物,优选哺乳动物,更优选人。

[0169] 在本发明的又一方面提供制备磷酸化利福霉素、优选本文所定义的式(I)和/或式(II)的磷酸化利福霉素的方法。

[0170] 本发明的优势在于提供对骨骼具有更高结合亲和力的抗微生物化合物。本发明也提供用于未满足医学需要的预防和治疗骨和关节感染的方法。

[0171] 根据以下优选实施方案的非限制性描述并参考附图,本发明的额外目的、优势和特征将会更加显而易见,这些描述和附图都是示例性的,不得视为对本发明范围的限制。

[0172] 附图简述

[0173] 图1是柱状图,显示20mg/kg利福霉素衍生物9和小而没有统计学显著性效果(相对于未治疗对照)的32mg/kg其母体二磷酸化前体药物11在感染后每4天使用一次或连续使用4天、再每周使用一次共4周时,对骨感染中细菌滴度的影响。

[0174] 图2是柱状图,显示20mg/kg利福布汀和小但具有统计学显著性效果(相对于未治疗对照)的33.4mg/kg其母体二磷酸化前体药物36在感染后每4天使用一次共4周时,对骨感染中细菌滴度的影响。

[0175] 图3是柱状图,显示20mg/kg苯并噁嗪并利福霉素56和小但具有统计学显著性效果(相对于未治疗对照和苯并噁嗪并利福霉素56)的26mg/kg其母体二磷酸化前体药物62在感染后连续使用4天、再每4天使用一次共4周时,对骨感染中细菌滴度的影响。

[0176] 图4是柱状图,显示20mg/kg苯并噁嗪并利福霉素69和小但具有统计学显著性效果(相对于未治疗对照和苯并噁嗪并利福霉素69)的28mg/kg其母体二磷酸化前体药物71在感染后连续使用4天、再每4天使用一次共4周时,对骨感染中细菌滴度的影响。

[0177] 图5是柱状图,显示20mg/kg利福拉齐和小但具有统计学显著性效果(相对于未治疗对照和利福拉齐)的27.6mg/kg其母体二磷酸化前体药物81在感染后连续使用4天、再每4天使用一次共4周时,对骨感染中细菌滴度的影响。

[0178] 图6是柱状图,显示20mg/kg利福平、利福布汀和利福霉素衍生物9在感染后每天使用一次共4周时,对骨感染中细菌滴度的影响。

[0179] 图7是曲线图,显示当静脉内推注32mg/Kg化合物11后1小时至14天,大鼠胫骨、股骨和颞骨内化合物11的浓度。

[0180] 图8是曲线图,显示当静脉内推注15.5mg/Kg化合物36后1/2小时至14天,大鼠胫骨内化合物36的浓度。

[0181] 图9是曲线图,显示当静脉内推注26mg/Kg化合物62后1天至7天,大鼠胫骨内化合物62的浓度。

[0182] 发明详述

[0183] A) 发明总论

[0184] 本发明公开了磷酸化利福霉素,尤其是上下文所定义的式(I)和式(II)中定义的磷酸化化合物。这些化合物是能有效针对多种人类和兽医病原菌的有用的抗微生物药。磷酸化基团通过可裂解连接基与利福霉素可逆地偶合。

[0185] 已经合成了磷酸化利福霉素,并已证明对骨材料具有增加的亲和力。在体内,这些磷酸化化合物蓄积在骨骼内,其数量大于非磷酸化等同物的数量。通过给予本发明的磷酸化利福霉素,可延长骨骼中利福霉素的存在时间。另外,已经知道在感染前至少3天给动物注射本发明的磷酸化利福霉素,具有针对骨感染的显著体内保护性。因此,本发明的化合物对预防和/或治疗骨和关节相关感染和骨相关疾病(例如骨髓炎)来说特别有用。

[0186] B) 定义

[0187] 为了更清楚明白地理解本发明(包括本文对特定术语给出的范围),提供以下一般性定义:

[0188] 术语“烷基”是指具有指定碳原子数或者如果没有指定数量则具有1-12个(优选1-6个)碳原子的饱和脂族基团,包括直链、支链、环状基团及其组合。烷基的实例包括但不限于例如以下基团:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、新戊基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环丁基甲基、环丁基乙基、环戊基甲基、环戊基乙基和金刚烷基。环状烷基(例如环烷基或杂环烷基)可由一个环(包括但不限于例如环庚基)或多个稠环(包括但不限于例如金刚烷基或降冰片基(norbornyl))组成。

[0189] 术语“烷基芳基”是指连接有1、2或3个芳基的、具有指定碳原子数的烷基。

[0190] 术语“N-烷基氨基羰基”是指 $-C(O)NHR$ 基团,其中R为烷基。

[0191] 术语“N,N-二烷基氨基羰基”是指 $-C(O)NR_aR_b$ 基团,其中 R_a 和 R_b 各自独立地为烷基。

[0192] 术语“烷硫基”是指 $-SR$ 基团,其中R为烷基。

[0193] 本文所用的术语“烃氧基”是指与氧原子连接并且具有指定碳原子数或者如果没有指定数量则具有1-12个(优选1-6个)碳原子的烷基、烯基或炔基。烃氧基的实例包括但不限于例如以下基团:甲氧基、乙氧基、叔丁氧基和烯丙氧基。术语“烷氧基羰基”是指 $-C(O)OR$ 基团,其中R为烷基。术语“烷基磺酰基”是指 $-SO_2R$ 基团,其中R为烷基。

[0194] 术语“亚烷基”是指具有指定碳原子数或者如果没有指定数量则具有1-12个(优选1-6个)碳原子的饱和二价脂族基团,包括直链、支链、环状基团及其组合,例如亚甲基、亚乙基、2,2-二甲基亚乙基、亚丙基、2-甲基-亚丙基、亚丁基、亚戊基、环戊基亚甲基等。

[0195] 术语“取代烷基”是指被一个或多个取代基(优选1-3个取代基)取代的以上定义的烷基,其中取代基优选选自卤素、烷基、芳基、烷氧基、酰氧基、氨基、一烷基氨基、二烷基氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苯基、苄基、氰基、硝基、硫代烷氧基、醛基(carboxaldehyde)、烷氧羰基(carboalkoxy)和胺基甲酰基(carboxamide),或者在必要时为了本发明的目的可以被保护基适当封闭的官能团。苯基可任选被1-3个取代基取代,其中取代基优选选自卤素、烷基、芳基、烷氧基、酰氧基、氨基、一烷基氨基、二烷基氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苄基、氰基、硝基、硫代烷氧基、醛基、烷氧羰基和胺基甲酰基。取代烷基的实例包括但不限于 $-CF_3$ 、 $-CF_2CF_3$ 、羟甲基、1-或2-羟乙基、甲氧基甲基、1-或2-乙氧基乙基、羧基甲基、1-或2-羧基乙基、甲氧基羰基甲基、1-或2-甲氧基羰基乙基、苄基、吡啶

基甲基、噻吩基甲基、咪唑基甲基、二甲基氨基乙基等。

[0196] 术语“取代亚烷基”是指被一个或多个取代基（优选 1-3 个取代基）取代的以上定义的亚烷基，其中取代基优选选自卤素、烷基、芳基、烷氧基、酰氧基、氨基、一烷基氨基、二烷基氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苯基、苄基、氰基、硝基、硫代烷氧基、醛基、烷氧羰基和胺基甲酰基，或者在必要时为了本发明的目的可以被保护基适当封闭的官能团。苯基可任选被 1-3 个取代基取代，其中取代基优选选自卤素、烷基、芳基、烷氧基、酰氧基、氨基、一烷基氨基、二烷基氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苄基、氰基、硝基、硫代烷氧基、醛基、烷氧羰基和胺基甲酰基。取代烷基的实例包括但不限于 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$ 、羟基亚甲基、1- 或 2- 羟基亚乙基、甲氧基亚甲基、1- 或 2- 乙氧基亚乙基、羧基亚甲基、1- 或 2- 羧基亚乙基等。

[0197] 术语“烯基”是指具有指定碳原子数或者如果没有指定数量则具有 1-12 个（优选 1-6 个）碳原子的不饱和脂族基团，包括直链、支链、环状基团及其组合，其中含有至少一个双键 ($-\text{C}=\text{C}-$)。烯基的实例包括但不限于烯丙基、乙烯基、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 环戊烯基和 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 环己烯基，其中乙基可以任何有效碳价位与环戊烯基、环己烯基部分连接。

[0198] 术语“亚烯基”是指具有指定碳原子数或者如果没有指定数量则具有 1-12 个（优选 1-6 个）碳原子的不饱和二价脂族基团，包括直链、支链、环状基团及其组合，其中含有至少一个双键 ($-\text{C}=\text{C}-$)。亚烯基的实例包括但不限于 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{环戊烯基})-$ 等。

[0199] 术语“炔基”是指具有指定碳原子数或者如果没有指定数量则具有 1-12 个（优选 1-6 个）碳原子的不饱和脂族基团，包括直链、支链、环状基团及其组合，其中含有至少一个三键 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$)。炔基的实例包括但不限于乙炔基、2- 丁炔基等。

[0200] 术语“亚炔基”是指具有指定碳原子数或者如果没有指定数量则具有 1-12 个（优选 1-6 个）碳原子的不饱和二价脂族基团，包括直链、支链、环状基团及其组合，其中含有至少一个三键 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$)。亚炔基的实例包括但不限于 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ 等。

[0201] 术语“取代烯基”或“取代炔基”是指被一个或多个取代基取代的 上文定义的烯基和炔基，其中取代基优选选自卤素、烷基、芳基、烷氧基、酰氧基、氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苯基、苄基、氰基、硝基、硫代烷氧基、醛基、烷氧羰基和胺基甲酰基，或者在必要时为了本发明的目的可以被保护基适当封闭的官能团。取代烯基和取代炔基的实例包括但不限于 $-\text{CH}=\text{CF}_2$ 、甲氧基乙烯基、甲氧基丙烯基、溴丙炔基等。

[0202] 术语“取代亚烯基”或“取代亚炔基”是指被一个或多个取代基取代的上文定义的亚烯基和亚炔基，其中取代基优选选自卤素、烷基、芳基、烷氧基、酰氧基、氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苯基、苄基、氰基、硝基、硫代烷氧基、醛基、烷氧羰基和胺基甲酰基，或者在必要时为了本发明的目的可以被保护基适当封闭的官能团。

[0203] 术语“芳基”或“Ar”是指具有单环（包括但不限于例如苯基）或多个稠环（包括但不限于例如萘基或蒽基）的 6-14 个碳原子的芳族碳环基团，并且包括未取代芳基和取代芳基。取代芳基是被一个或多个取代基（优选 1-3 个取代基）取代的芳基，其中取代基优选选自烷基、芳基、烯基、炔基、卤素、烷氧基、酰氧基、氨基、一烷基氨基、二烷基氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苯基、芳氧基、苄基、氰基、硝基、硫代烷氧基、醛基、烷氧羰基和胺基甲酰基，或者在必要时为了本发明的目的可以被保护基适当封闭的官能团。代表性的实例包

括但不限于萘基、苯基、氯苯基、碘苯基、甲氧基苯基、羧基苯基等。术语“芳氧基”是指在一个环碳上与氧原子连接的芳基。烷氧基的实例包括但不限于例如苯氧基、2-、3- 或 4- 甲基苯氧基等。术语“芳硫基”是指 $-SR_c$ 基团, 其中 R_c 为芳基。术语“杂芳硫基”是指 $-SR_d$ 基团, 其中 R_d 为杂芳基。

[0204] 术语“亚芳基”是指由如上所述的芳基(包括取代芳基)衍生而来的二价基团, 其实例为 1,2- 亚苯基、1,3- 亚苯基、1,4- 亚苯基、1,2- 亚萘基等。

[0205] 术语“氨基”是指 $-NH_2$ 基团。

[0206] 术语“N- 烷基氨基”和“N, N- 二烷基氨基”分别是指 $-NHR$ 和 $-NRR'$ 基团, 其中 R 和 R' 独立代表本文所定义的烷基。代表性实例包括但不限于 N, N- 二甲基氨基、N- 乙基-N- 甲基氨基、N, N- 二(1- 甲基乙基) 氨基、N- 环己基-N- 甲基氨基、N- 环己基-N- 乙基氨基、N- 环己基-N- 丙基氨基、N- 环己基甲基-N- 甲基氨基、N- 环己基甲基-N- 乙基氨基等。

[0207] 术语“硫代烷氧基”是指 $-SR$ 基团, 其中 R 为上文所定义的烷基, 例如甲硫基、乙硫基、丙硫基、丁硫基等。

[0208] 术语“酰基”是指 $-C(O)R$ 基团, 其中 R 为氢、卤素、烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、N- 烷基氨基、N, N- 二烷基氨基、N- 芳基氨基、硫代烷氧基、硫代芳氧基或取代烷基, 其中烷基、芳基、杂芳基和取代烷基如本文中定义。

[0209] 术语“硫代酰基”是指 $-C(S)R$ 基团, 其中 R 为氢、卤素、烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、N- 烷基氨基、N, N- 二烷基氨基、N- 芳基氨基、硫代烷氧基、硫代芳氧基或取代烷基, 其中烷基、芳基、杂芳基和取代烷基如本文中定义。

[0210] 术语“磺酰基”是指 $-SO_2R$ 基团, 其中 R 为氢、卤素、烷基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、N- 烷基氨基、N, N- 二烷基氨基、N- 芳基氨基、硫代烷氧基、硫代芳氧基或取代烷基, 其中烷基、芳基、杂芳基和取代烷基如本文中定义。

[0211] 术语“酰氧基”是指 $-OC(=O)R$ 基团, 其中 R 为氢、烷基、芳基、杂芳基或取代烷基, 其中烷基、芳基、杂芳基和取代烷基如本文中定义。代表性实例包括但不限于甲酰氧基、乙酰氧基、环己基羰基氧基、环己基甲基羰基氧基、苯甲酰基氧基、苄基羰基氧基等。

[0212] 术语“杂烷基”、“杂烯基”和“杂炔基”分别是指具有指定碳原子数或者如果没有指定数量则具有 1-12 个(优选 1-6 个)碳原子的上文所定义的烷基、烯基和炔基, 其中含有一个或多个杂原子, 优选 1-3 个杂原子, 作为基团中的主链、支链或环状链的组成部分。杂原子独立选自 $-NR-$ 、 $-NRR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-O-$ 、 $-SR-$ 、 $-S(O)R-$ 、 $-S(O)_2R-$ 、 $-OR-PR-$ 、 $-PRR-$ 、 $-P(O)R-$ 和 $-P(O)RR-$; (其中各 R 为氢、烷基或芳基) 优选 $-NR$, 其中 R 为氢或烷基和 / 或 O 。杂烷基、杂烯基和杂炔基可在杂原子(如果化合价合适的话)或碳原子上与分子的其余部分连接。杂烷基的实例包括但不限于例如 $-O-CH_3$ 、 $-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-S-CH_2-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH(CH_3)-S-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_3$ 、1- 乙基-6- 丙基哌啶-1- 基、2- 乙基噻吩基、哌嗪-1- 基、吡咯烷-1- 基、哌啶-1- 基、吗啉代等。杂烯基的实例包括但不限于例如 $-CH=CH-CH_2-N(CH_3)_2$ 等。

[0213] 术语“杂芳基”或“HetAr”是指芳族单价单环、双环或三环基团, 在其环内含有 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18 个环原子, 包括 1、2、3、4 或 5 个杂原子, 优选 1-3 个杂原子, 包括但不限于例如 N、O、P 或 S 等杂原子。代表性实例包括但不限于单环(例

如咪唑基、吡唑基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡啶基、噻吩基等)或多个稠环(例如吲哚基、喹啉基、喹唑啉基、苯并咪唑基、吲哚基、苯并噻吩基等)。

[0214] 杂烷基、杂烯基、杂炔基和杂芳基可以是未取代的,或者被一个或多个取代基(优选1-3个取代基)取代,其中取代基优选选自烷基、烯基、炔基、苄基、卤素、烷氧基、酰氧基、氨基、一烷基氨基、二烷基氨基、羟基、巯基、羧基、苄氧基、苯基、芳氧基、氰基、硝基、硫代烷氧基、醛基、烷氧羰基和胺基甲酰基,或者在必要时为了本发明的目的可以被保护基适当封闭的官能团。这类取代杂烷基的实例包括但不限于哌嗪、吡咯烷、吗啉或哌啶(在其氮或碳原子上被苯基或苄基取代,并且在其碳或氮原子上以有效化合价与分子的其余部分相连接)、 $\text{-NH-S(=O)}_2\text{-}$ 苯基、 -NH--(C=O)O- 烷基、 -NH-C(=O)O- 烷基-芳基等。基团中的杂原子和碳原子可以被取代。杂原子也可以呈氧化形式。

[0215] 术语“亚杂芳基”是指由如上所述的杂芳基(包括取代杂芳基)衍生而来的二价基团,其实例为2,6-亚吡啶基、2,4-亚吡啶基、1,2-亚喹啉基、1,8-亚喹啉基、1,4-亚苯并呋喃基、2,5-亚吡啶基、2,5-亚吲哚基等。

[0216] 术语“亚杂烷基”、“亚杂烯基”和“亚杂炔基”是指由如上定义的杂烷基、杂烯基和杂炔基(包括取代杂烷基、杂烯基和杂炔基)衍生而来的二价基团。

[0217] 术语“醛基(carboxaldehyde)”是指 -CHO 。

[0218] 术语“烷氧羰基(carboalkoxy)”是指 -C(=O)OR ,其中R为如上定义的烷基,包括例如甲氧羰基、乙氧羰基等。

[0219] 术语“胺基甲酰基(carboxamide)”是指 -C(=O)NHR 或 -C(=O)NRR' ,其中R和R'独立地为氢、芳基或烷基(如上定义)。代表性实例包括例如氨基羰基、N-甲基氨基羰基、N,N-二甲基氨基羰基等。

[0220] 术语“羧基”是指 -C(=O)OH 基团。

[0221] 术语“氨基甲酰基(carbamoyl)”是指 -C(=O)NH_2 基团。

[0222] 本文所用的术语“卤素”是指Cl、Br、F或I取代基,优选氟或氯。

[0223] 术语“羟基”是指 -OH 基团。

[0224] “异构体”:具有相同的分子式(即元素组成)、但其原子键合或其原子空间排列性质或次序不同的化合物称为“异构体”。原子间连接相同、但原子空间排列不同的异构体称为“立体异构体”。彼此并非镜像关系的立体异构体称为“非对映体”,彼此是不能重叠的镜像关系的立体异构体则称为“对映体”。当化合物具有不对称中心时,例如键合4个不同的基团,就可能有一对对映体。对映体的特性在于其不对称中心的绝对构型,按照Cahn、Ingold和Prelog的R-和S-序列法则来描述,或按照分子旋转偏振光平面的方式来描述,称为右旋或左旋(即分别为(+)-异构体或(-)-异构体)。手性化合物可以各对映体或其混合物形式存在。含有比例相等的对映体的混合物称为“外消旋混合物”。

[0225] 本发明的化合物可具有一个或多个不对称中心。因此这类化合物可以制备成单一(R)-立体异构体或(S)-立体异构体或其混合物。例如,实施例部分所描述的化合物9、11和21中编号为20、22和24的碳原子可各自连接氢原子、甲基和两个不同亚甲基,因此这些碳原子就是不对称中心。化合物9、11和21可以立体异构体形式存在。除非另有说明,否则在本说明书和权利要求书中对具体化合物的描述或命名都同时包括各对映体及其混合物、外消旋物或其别的形式。描述也包括所有可能的非对映体及其混合物。立

体化学结构测定方法和立体异构体分离方法都是本领域众所周知的（参见“Advanced Organic Chemistry”，第4版，第4章，J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992）。

[0226] “旋光纯”：正如本领域普通技术人员所知，旋光纯的化合物是对映体纯的化合物。本文所用的术语“旋光纯”是指包含至少足够量的单一对映体，以得到具有所需药理学活性的化合物。优选的“旋光纯”是指这样的化合物：单一异构体占至少90%（80%对映体过量）、优选至少95%（90%对映体过量）、更优选至少97.5%（95%对映体过量）和最优选至少99%（98%对映体过量）。优选的本发明化合物是旋光纯的。

[0227] “保护基”是指表现出以下特性的化学基团：1) 以良好收率与所需官能团选择性反应，得到受保护的底物，该底物对需要保护的计划反应具有稳定性；2) 从被保护底物上选择性脱去所述保护基，以得到所需官能团；和3) 通过与所述计划反应中产生或存在的其它官能团相容的试剂，以良好收率脱去所述保护基。合适保护基的实例可参见Greene等(1991)Protective Groups in Organic Sythesis, 第2版 (JohnWiley & Sons, Inc., New York)。优选的氨基保护基包括但不限于苄氧基羰基(CBz)、叔丁氧羰基(Boc)、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、9-苄基甲基-氧基羰基(Fmoc)或合适的光不稳定性保护基例如6-硝基藜芦基氧基羰基(Nvoc)、硝基胡椒基、苊基甲氧基羰基、硝基苄基、二甲基二甲氧基偶苯酰基、5-溴-7-硝基二氢吡啶基等。优选的羟基保护基包括乙酰基(Ac)、苯甲酰基(Bz)、苄基(Bn)、四氢吡喃基(THP)、TBDMS、光不稳定性保护基（例如硝基藜芦基氧基甲基醚(Nvom)）、Mom(甲氧基甲基醚)和Mem(甲氧基乙氧基甲基醚)。特别优选的保护基包括NPEOC(4-硝基苄乙氧基羰基)和NPEOM(4-硝基苄乙氧基-甲氧基羰基)。

[0228] “前体药物”：是指可经过加工以释放活性药物分子的化合物。本发明的式(I)和式(II)化合物就是前体药物，因为可以切除连接基L以释放利福霉素。具体地讲，本发明的前体药物包括在体内释放活性母体药物（即本文所定义的式A1化合物）的化合物，当将这样的前体药物给予患者时。

[0229] “前体药物”也包括在前体药物加工过程中经过两次或更多次事件的复杂前体药物化合物(complex prodrug compound)。按照该实施方案，复杂的前体药物经过加工后可释放出式(I)或式(II)前体药物，再经裂解以释放所需利福霉素。

[0230] 可通过修饰磷酸化利福霉素中存在的羟基和氨基等官能团，来制备本发明复杂前体药物化合物。复杂前体药物的实例包括但不限于磷酸化利福霉素羟基官能团的酯（例如乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物）和氨基甲酸酯（例如N,N-二甲基氨基羰基）。

[0231] “药学上可接受的前体药物”是指磷酸化利福霉素前体药物，例如式(I)和/或式(II)化合物的前体药物，所述药物可以配制在给予患者（例如哺乳动物，优选人）的制剂中。例如，前体药物可以配制在包含药学上可接受的载体或赋形剂的制剂中。

[0232] “药学上可接受的活性代谢物”是指通过本文所定义的式(I)或式(II)化合物的体内代谢而产生的药理学上的活性产物。

[0233] “药学上可接受的溶剂合物”是指保留式I和/或式II化合物的生物活性组分的生物学效力和特性的溶剂合物。药学上可接受的溶剂合物的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0234] “药学上可接受的载体或赋形剂”是指可用于配制可给予患者的本发明化合物的任何化合物、溶液、物质或材料。具体地讲，本发明的载体和赋形剂是可用于制备通常安全

无毒、且没有生物学或其它不良特性、并具有良好药理学特性的载体和赋形剂,其包括兽用和人类药用可接受的载体和赋形剂。合适的药学上可接受的载体和赋形剂是本领域众所周知的,可由本领域技术人员根据临床情况来确定。技术人员将会知道稀释剂包括在术语载体和赋形剂的范围之内。合适的载体和赋形剂的实例包括盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇,尤其是:(1) Dulbecco 氏磷酸缓冲盐水, pH 约为 7.4, 含有约 1mg/ml ~ 25mg/ml 人血清白蛋白, (2) 0.9% 盐水 (0.9% w/v NaCl), (3) 5% (w/v) 葡萄糖, 和 (4) 水。

[0235] “药学上可接受的盐”是指磷酸化利福霉素的盐,例如式 (I) 和 / 或式 (II) 化合物的盐,可以配制在可给予患者(例如哺乳动物,优选人)的制剂中。例如,盐可以配制在包含药学上可接受的载体或赋形剂的制剂中。

[0236] “盐”:本发明的磷酸化利福霉素可以呈盐形式。本发明磷酸化利福霉素的盐是指保留或改善本文所定义的母体化合物的游离酸和碱的生物学效力和特性的盐,或者利用分子上固有的带电荷官能团的盐,而没有生物学或其它不良特性。这类盐包括以下:

[0237] (1) 酸加成盐,与例如以下无机酸形成的盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等;或与例如以下有机酸形成的盐:乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基硫酸、葡糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸(hydroxynaphthoic acid)、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等;

[0238] (2) 当母体化合物中存在的酸性质子或者被金属离子(例如碱金属离子、碱土金属离子或铝离子)置换;或者与有机碱(例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、三羟甲基氨基甲烷、N-甲基葡糖胺等)配位时,所形成的盐;或

[0239] (3) 当分子上存在带电荷的官能团或存在合适的平衡离子(例如四烷基(芳基)铵官能团和碱金属离子、四烷基(芳基)磷官能团和碱土金属离子、咪唑鎓(imidazolium)官能团和碱金属离子等)时,所形成的盐。

[0240] 本文所述的术语“骨”或“骨组织”是指致密的半刚性多孔钙化结缔组织,其构成大多数脊椎动物骨骼的主要部分。也包括牙齿、骨-关节组织和动脉粥样硬化血管壁上常见的钙化。

[0241] 本文所述的术语“利福霉素”是指经鉴定为利福霉素本身的化合物以及具有技术人员已知的抗微生物活性的所有利福霉素类化合物的衍生化合物。这些衍生化合物在本文中有不同的描述,即“利福霉素衍生的抗微生物分子”、“利福霉素衍生的分子”、“利福霉素衍生的抗细菌药物”和“利福霉素衍生物”。这类相关术语具有相同含义,都是指作为众所周知的“利福霉素”类的组成部分的抗微生物药,正如本文中详述的那样。这类衍生化合物是具有抗微生物(例如抗菌)活性的利福霉素的化学类似物。技术人员将会知道这些衍生物在结构上与利福霉素相似,但也包括在传统上并未定义为利福霉素的那些化合物。利福霉素衍生物包括但不限于本发明的式 (IA) 化合物。具体实例包括利福平 (US 3,342,810)、利福喷汀 (US 4,002,752)、利福定 (US 4,353,826)、利福布汀 (US 4,219,478)、利福拉齐 (US 4,983,602) 和利福昔明 (US 4,341,785)。

[0242] 术语“磷酸化基团(phosphonated group)”是指对人体无毒的、具有至少一个磷原子与至少 3 个氧原子键合、并且对骨组织具有如下文所述的可测量亲和力的任何化合物。

[0243] 术语“抗菌”包括抑制、终止或逆转细菌生长的化合物,抑制、终止或逆转细菌酶活性或生化途径的化合物,杀伤细菌的化合物和阻碍或延迟细菌感染的发展的化合物。

[0244] 术语“治疗”是指因减少任何细菌(例如革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌)的生长、复制和/或繁殖而至少缓解患者(包括哺乳动物,例如人)的细菌感染相关的疾病状态,包括治疗、治愈、抑制、减轻、改善和/或缓解全部或部分疾病状况。

[0245] 术语“预防”是指至少降低了患者(例如哺乳动物,优选人)的细菌感染相关疾病状态发展的可能性。术语“预防”也指阻碍或阻断患者(例如哺乳动物,优选人)的细菌感染相关疾病状态的发展。具体地讲,该术语涉及对患者的治疗以降低细菌感染的可能性(“预防”)或防止细菌感染的发生,例如在涉及骨修复或置换的手术期间或术后发生的细菌感染。该术语也包括在发现哺乳动物对疾病症状易感但尚未诊断出患病的时候降低细菌感染的可能性(“预防”)或防止细菌感染。例如,可通过在这样的感染发生之前,给予式(I)和/或式(II)化合物或其药学上可接受的前体药物、盐、活性代谢物或溶剂合物,从而降低患者细菌感染的可能性(“预防”)或防止细菌感染。

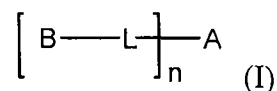
[0246] 术语“患者”是指动物,例如鸟类或哺乳动物,包括人以及兽医或农业上具有重要意义的动物,例如狗、猫、马、绵羊、山羊和牛。

[0247] C) 本发明的化合物

[0248] 正如以下实施例部分所述,本发明人已经制备了对骨组织具有很高结合亲和力的磷酸化利福霉素。

[0249] 在一个实施方案中,本发明的化合物以下式(I)或其药学上可接受的盐或前体药物为代表;

[0250]



[0251] 其中:

[0252] B 为磷酸化基团;

[0253] L 为用于将 B 与 A 偶合的可裂解连接基;

[0254] n 为 1、2、3、4、5、6 或 7,优选 1、2 或 3;和

[0255] A 为利福霉素。

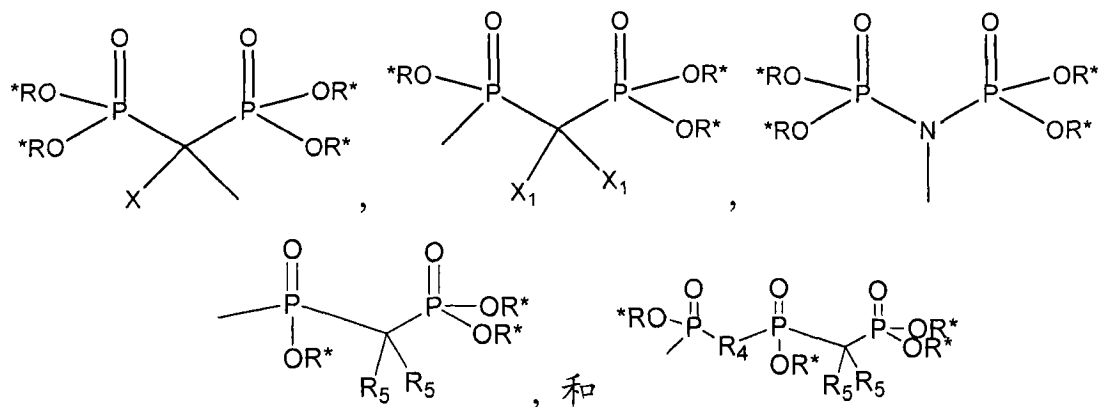
[0256] 如上所述,本发明的本质在于存在着可通过可裂解连接基与利福霉素可逆地偶合的磷酸化基团,用于增加亲和力、结合、蓄积和/或延长利福霉素在骨骼中的保留时间的目的,同时又允许其通过可裂解连接基的裂解而从骨骼中逐渐释放或释放化合物。

[0257] 磷酸酯基团

[0258] 所有因其结合由羟基磷灰石构成的骨组织中存在的 Ca^{2+} 离子的能力而对骨骼具有高亲和力的无毒磷酸化基团都适合本发明。磷酸化基团的合适实例可参见 WO 04/026315(Ilex Oncology Research)、US6,214,812(MBC Research)、US 5,359,060(Pfizer)、US 5,854,227 和 US6,333,424(Elizanor Pharm.)、US 6,548,042(Arstad 和 Skattelbol) 和 W02004/089925(Semaphore Pharmaceuticals)。

[0259] 适于本发明的二磷酸酯基团和三磷酸酯基团的实例包括但不限于具有下列结构式的基团:

[0260]



[0261] 其中：

[0262] 各 R^* 独立选自 H、低级烷基、环烷基、芳基和杂芳基，前提条件是至少 2 个、优选 3 个 R^* 为 H；

[0263] R_4 为 CH_2 、O、S 或 NH；

[0264] 各 R_5 独立选自 H、 R_6 、 OR_6 、 NR_6 和 SR_6 ，其中 R_6 为 H、低级烷基、环烷基、芳基、杂芳基或 NH_2 ；

[0265] X 为 H、OH、 NH_2 或卤素基团；和

[0266] X_1 都为 H，或各自独立选自 H、OH、 NH_2 和卤素基团。

[0267] 尽管一磷酸酯基团、二磷酸酯基团、三磷酸酯基团或四磷酸酯基团都可使用，但优选二磷酸酯基团。更优选二磷酸酯基团是二磷酸酯基团 $-\text{CH}(\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2)_2$ 。如下实施例 3 所示，具有这样的二磷酸酯基团的利福霉素对骨粉具有极强的结合亲和力。当然，本领域技术人员也可选择和合成其它类型的磷酸酯基团。例如，磷酸酯基团可以是酯酶激活的二磷酸酯基团 (Vepsäläinen J., Current Medicinal Chemistry, 9, 1201-1208, 2002) 或可以是其任何其它合适前体药物。这些和其它合适的磷酸化基团全都包括在本发明中。

[0268] 利福霉素

[0269] 利福霉素是一类众所周知的半合成抗微生物药。利福平 (US 3, 342, 810)、利福喷汀 (US 4, 002, 752)、利福布汀 (US 4, 219, 478) 和利福拉齐 (US 4, 983, 602) 都是这类化合物中最为人们所熟知的。这些药物在经济上和临床上都已证明是非常成功的药物。本发明并不限于具体的利福霉素，而是涵盖具有合适抗微生物活性的利福霉素衍生的抗微生物分子，包括但不限于利福定 (US 4, 353, 826) 和利福昔明 (US 4, 341, 785)，以及其它利福霉素衍生物和杂合物 (hybrids)、例如以下文献中描述的那些：美国专利申请 2003/0105086、2005/0043298、2005/0143374、2005/0203076、2005/0203085、2005/0209210、2005/0256096、2005/0261262、2005/0277633、2006/0019985 和 2006/0019986，或者以下文献中描述的那些：国际专利申请公布号 W003/045319、W003/051299、W004/034961 和 W005/062882。本领域技术人员将会容易地制备本发明的利福霉素衍生的抗微生物分子。必要时，技术人员可参考本领域现有的大量文献，包括上文所列出的 US 专利、PCT 专利申请和科学出版物，所述文献都通过引用结合到本文中。

[0270] 根据一个实施方案，用于本发明的利福霉素选自以下通式 (A1) 所示的化合物：

[0271]



34

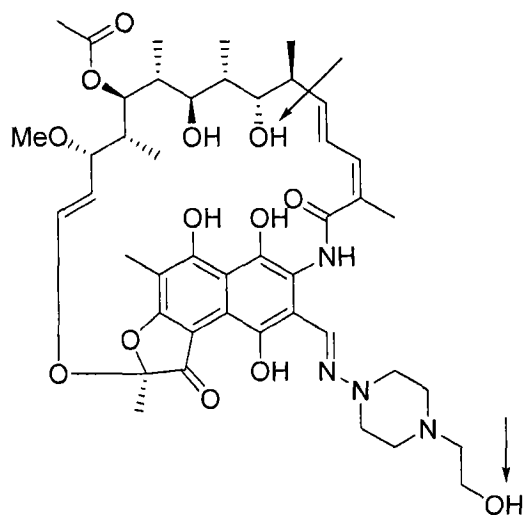
R_1 , 其中 R_1 如上定义 ;

[0283] T 为卤素或 R_2 , 其中 R_2 如上定义 ; 和

[0284] Z 为 O、S 或 NR_3 , 其中 R_3 如上定义。

[0285] 根据一个具体的实施方案, 利福霉素是利福平、其醌形式、其脱乙酰基形式或其醌形式的脱乙酰基形式。根据另一个具体的实施方案, 利福霉素是 1-氨基-4-(2-羟乙基)哌嗪的腙和 3-甲酰基利福霉素 S(实施例 1 化合物 9)、其醌形式、其脱乙酰基形式或其醌形式的脱乙酰基形式。根据另一个具体实施方案, 利福霉素是利福布汀或其脱乙酰基形式。根据另一个具体实施方案, 利福霉素是利福喷汀、其醌形式、其脱乙酰基形式或其醌形式的脱乙酰基形式。根据另一个具体的实施方案, 利福霉素是利福拉齐或其脱乙酰基形式。根据另一个具体的实施方案, 利福霉素是 Rifamixin 或其脱乙酰基形式。根据另一个具体的实施方案, 利福霉素是利福定、其醌形式、其脱乙酰基形式或其醌形式的脱乙酰基形式。根据另一个具体的实施方案, 利福霉素是实施例 1 的化合物 56 或其脱乙酰基形式。根据另一个具体的实施方案, 利福霉素是实施例 1 的化合物 63 或其脱乙酰基形式。根据另一个具体的实施方案, 利福霉素是实施例 1 的化合物 69 或其脱乙酰基形式。这些分子的化学结构如下。箭头表示连接磷酸化基团的优选位置。

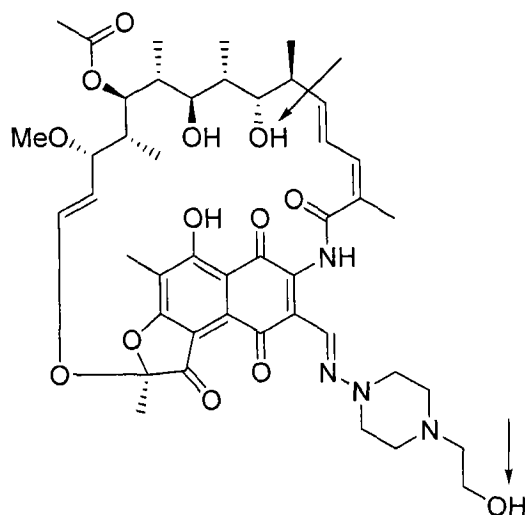
[0286]



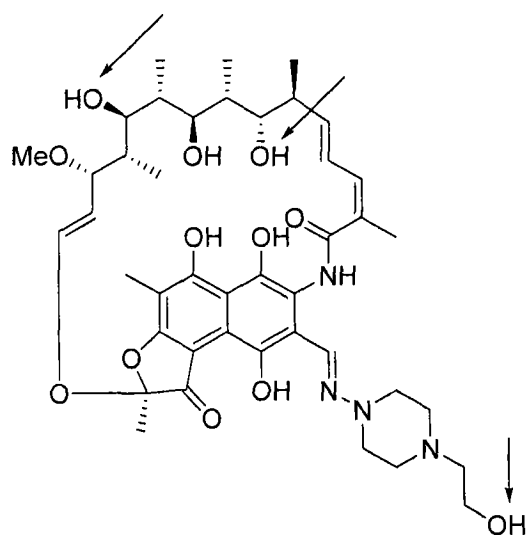
[0287] 化合物 9

形式

[0288]

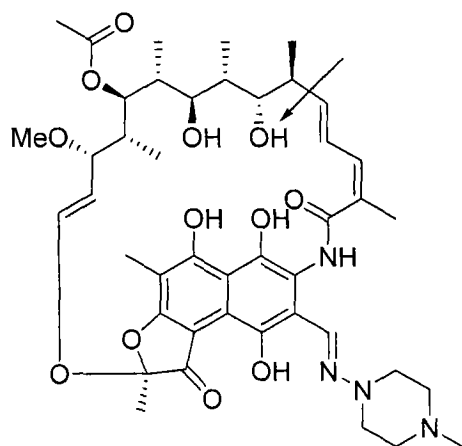


化合物 9 的醌



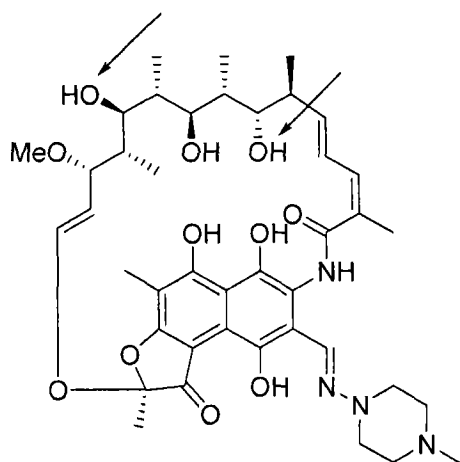
[0289] 脱乙酰化合物 9
9 的醌形式

[0290]



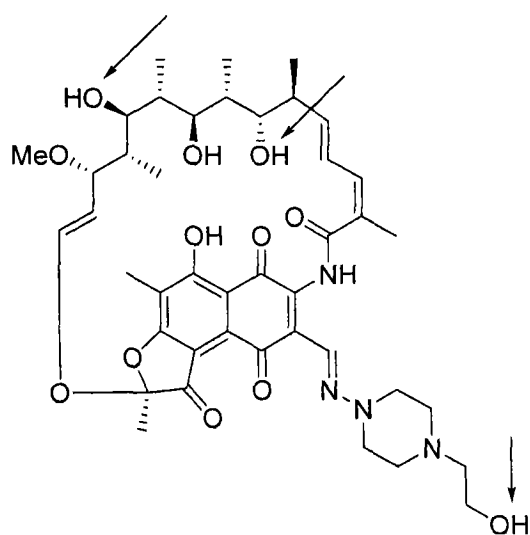
[0291] 利福平
式

[0292]

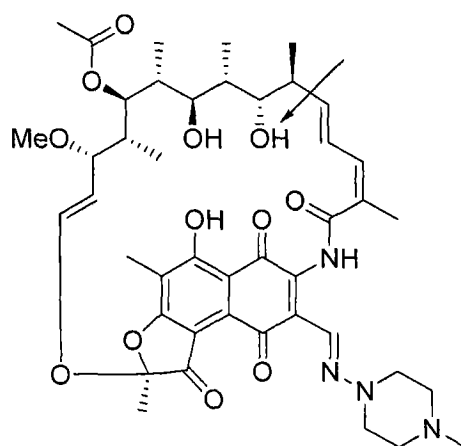


[0293] 脱乙酰利福平
醌形式

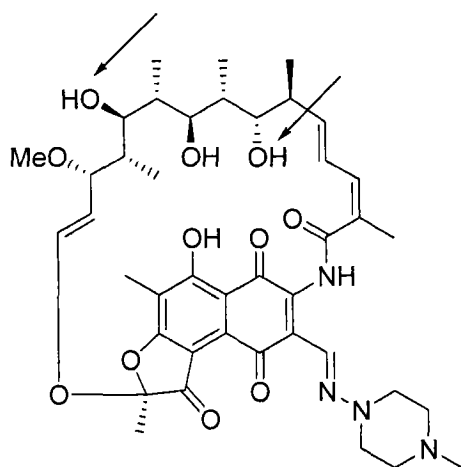
[0294]



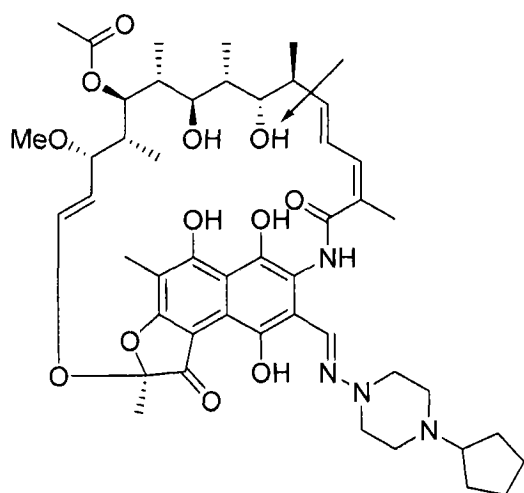
脱乙酰化合物



利福平的醌形



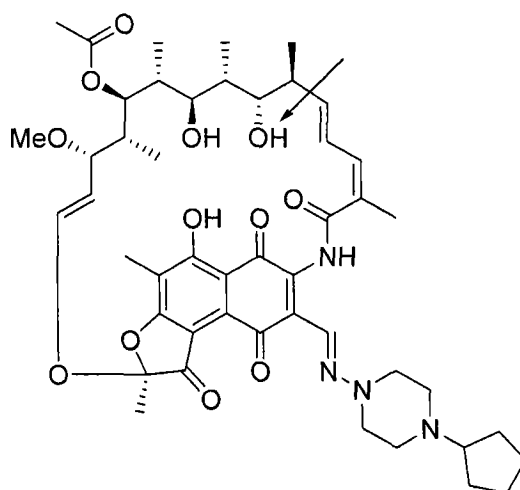
脱乙酰利福平的



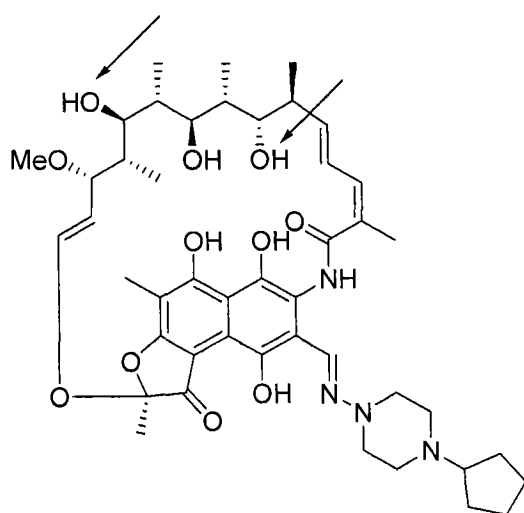
[0295] 利福喷汀

形式

[0296]



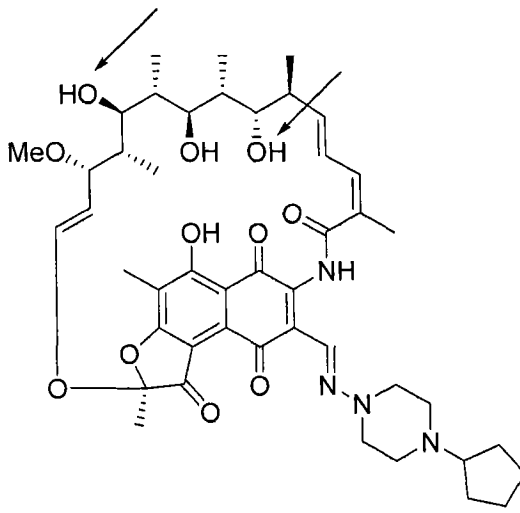
利福喷汀的醌



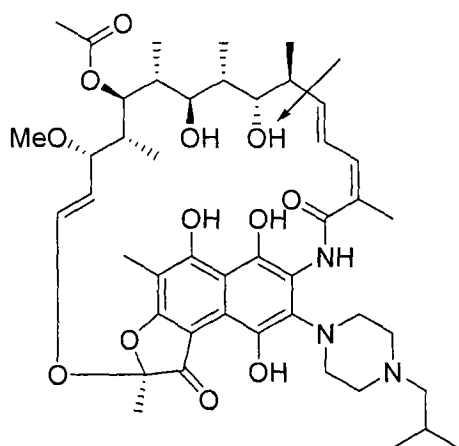
[0297] 脱乙酰利福喷汀

的醌形式

[0298]

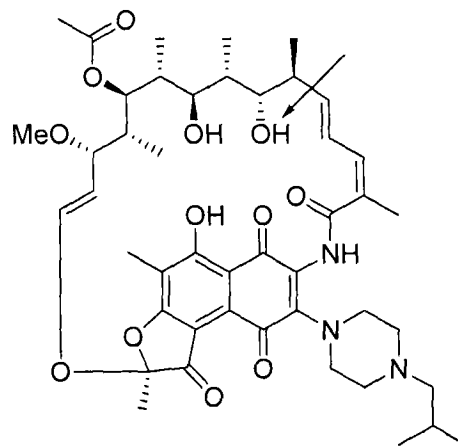


脱乙酰利福喷



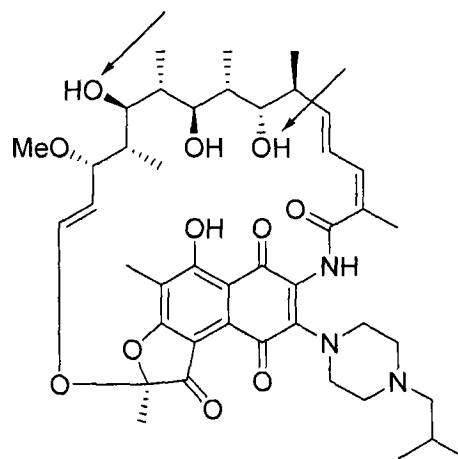
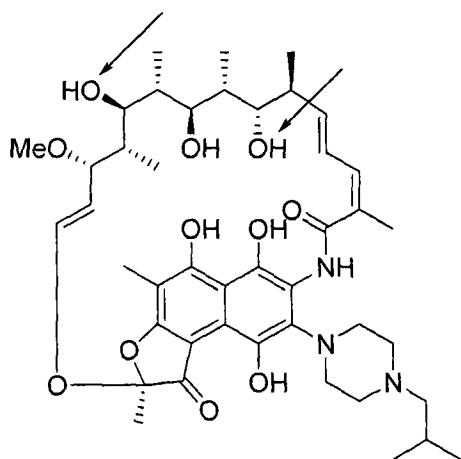
[0299] 利福定

式



利福定的醌形

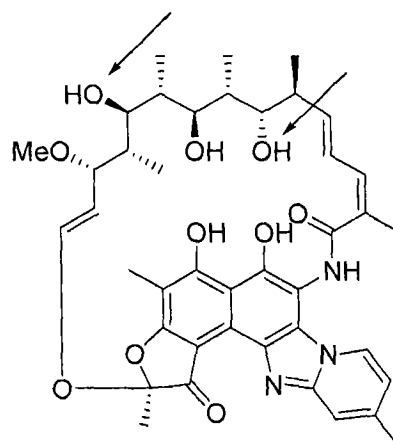
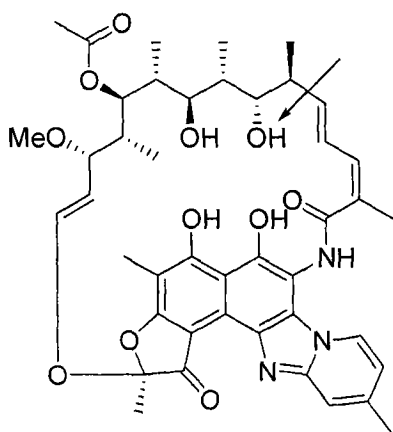
[0300]



[0301] 脱乙酰利福定
定的醌形式

脱乙酰利福

[0302]

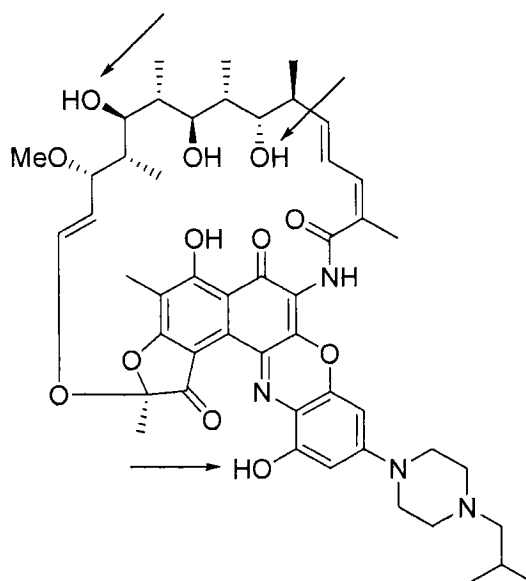
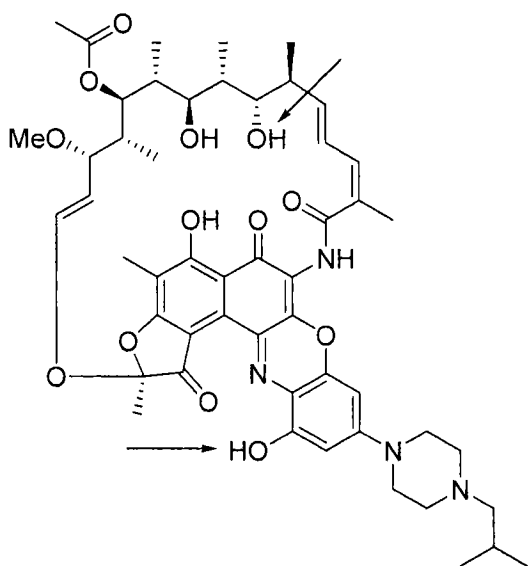


[0303] Rifamixin

Deacetylated

Rifamixin

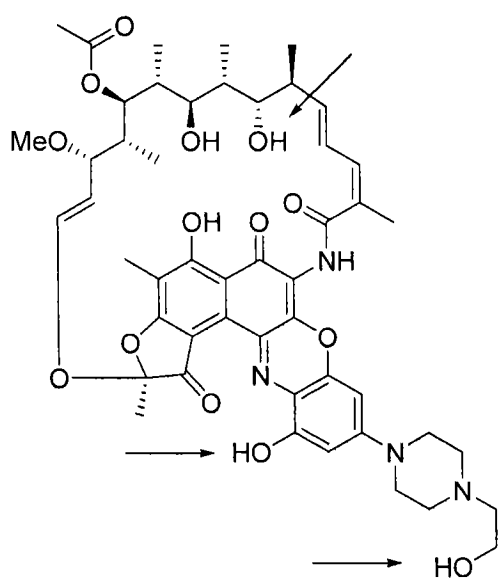
[0304]



[0305] 利福拉齐

脱乙酰利福拉齐

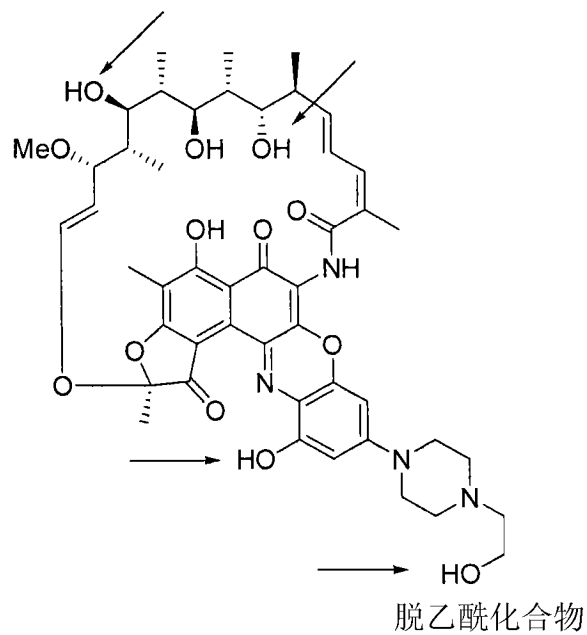
[0306]



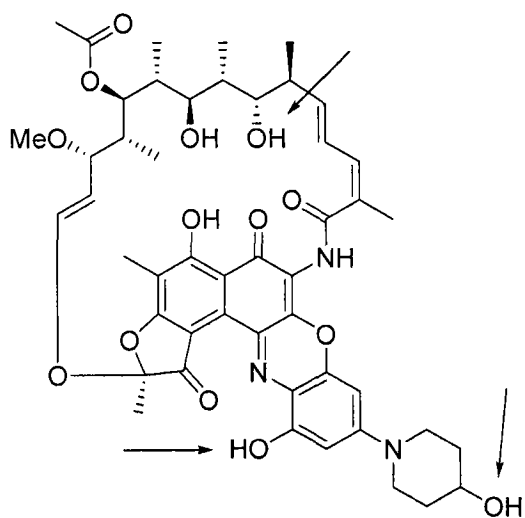
[0307] 化合物 56

56

[0308]



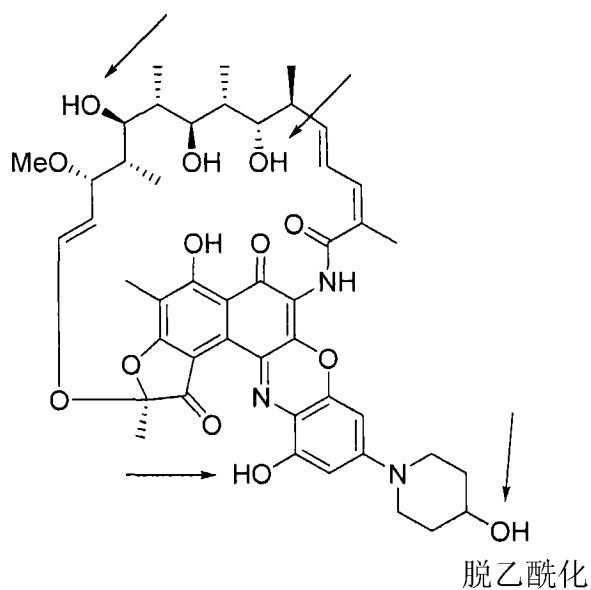
脱乙酰化合物



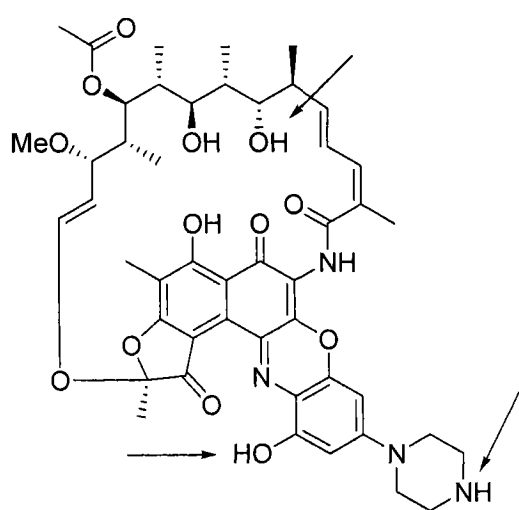
[0309] 化合物 63

合物 63

[0310]



脱乙酰化

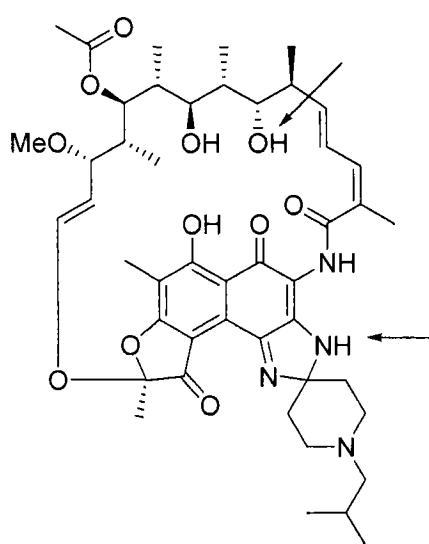


[0311] 化合物 69

脱乙酰

化合物 69

[0312]



[0313] 利福布汀

和

利福布汀的醌形式。

[0314] 本发明磷酸化利福霉素的具体实例见下文实施例小节。本发明也涵盖具有不止一个磷酸化基团的磷酸化利福霉素。如上所述，以上鉴别的连接位点仅为连接磷酸化基团的优选位点，本发明涵盖所有其它可能位点（例如在利福霉素的任何羟基上）。

[0315] 连接基团 (Linker)

[0316] 可裂解连接基 L 将磷酸化基团 B 与利福霉素 A 共价而可逆地偶合在一起。本文所用的术语“可裂解 (cleavable)”是指在生理条件下具有化学或生化不稳定性。优选化学不稳定性是由可逆化学过程、分子内化学反应或水解（即分子或基团中因净插入一个或多个水分子而断裂成两个或更多新的分子或基团）所致的自发分解，当其取决于分子间化学反应时。

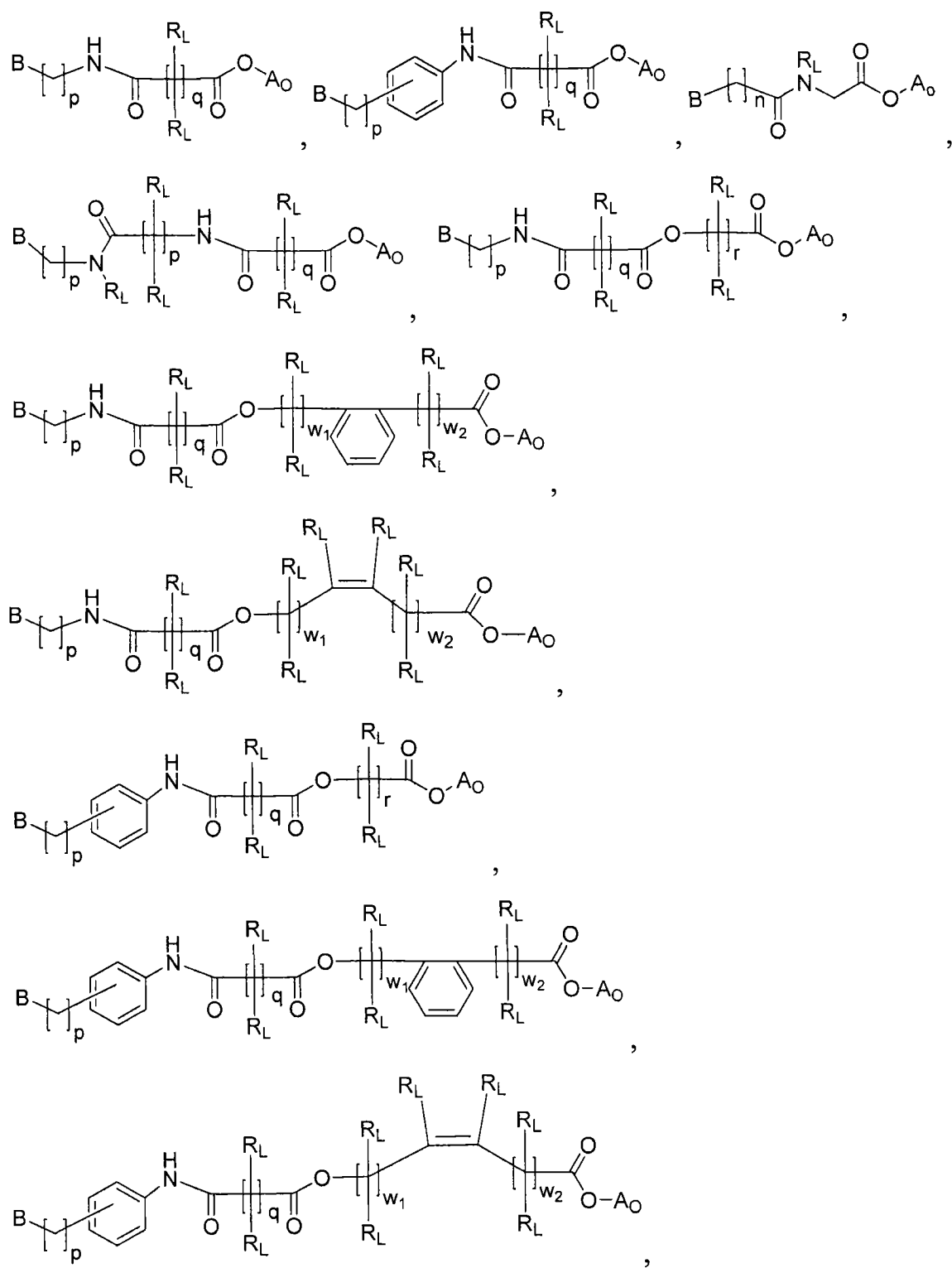
[0317] 对连接基团进行切除可以非常快或非常慢。例如，可裂解连接基的半衰期可以为约 1 分钟、约 15 分钟、约 30 分钟、约 1 小时、约 5 小时、约 10 小时、约 15 小时、约 1 天或约

48 小时。可裂解连接基可以是仅由所选特定酶（例如酰胺酶、酯酶、金属蛋白酶等）来切割的酶敏感型连接基团，或者可以是对其它化学裂解方法敏感的连接基团，例如但不限于酸/碱催化裂解或自动裂解。例如可以使用仅由骨特异性酯酶（Goding 等，*Biochim Biophys Acta*(2003), 1638(1):1-19）或骨特异性金属蛋白酶（MMP）（Kawabe 等，*Clin Orthop.* (1986) 211:244-51; Tuckermann 等，*Differentiation*(2001), 69(1):49-57; Sellers 等，*BiochemJ.* (1978) 171(2):493-6）切割的酯酶敏感型连接基团，或者通过碱性磷酸酶活动而在其所需作用位点上释放利福霉素的连接基团。同样，可以使用这样的可裂解连接基：这类连接基团在血浆中不太容易被切除，因而允许足够量的磷酸化利福霉素到达骨组织并在其中蓄积，然后被切除以释放利福霉素。例如，可以选择连接基团，使得在给予本发明化合物后 1 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、5 小时、10 小时、15 小时、1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、1 周、2 周、3 周或更长时间周期中，释放仅 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60% 或 70% 的与骨结合的抗生素。最好选择连接基团，使得每天仅释放约 1% 至约 25% 的与骨结合的利福霉素。连接基团的选择因以下因素而异：例如 (i) 磷酸酯基团与利福霉素的连接位点，(ii) 所用的磷酸化基团的类型；(iii) 所用利福霉素的类型，和 (iv) 连接基团切除和相关利福霉素释放的所需容易程度。

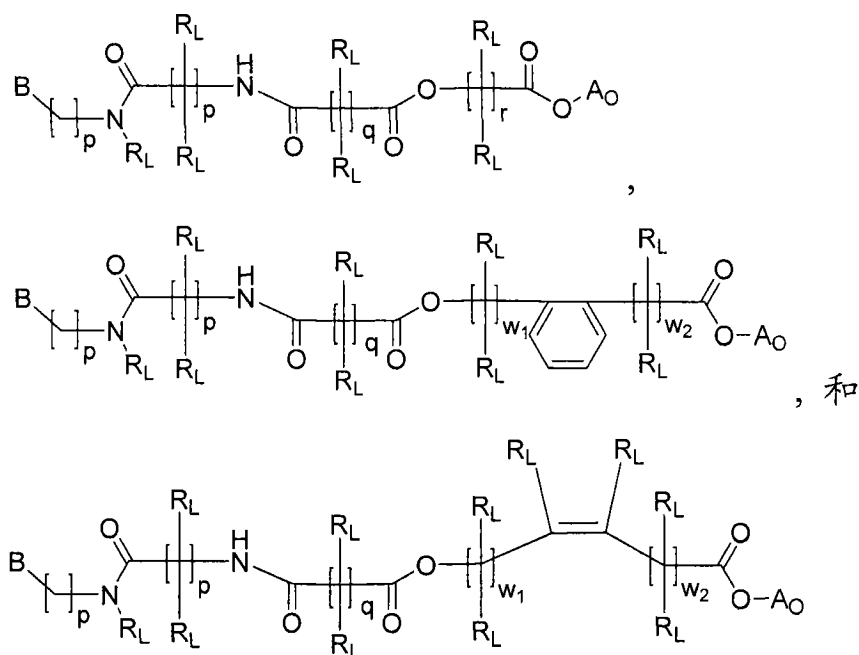
[0318] 优选的连接基 L 通过 A 上的一个或多个羟基，通过 A 上的一个或多个氮原子，通过 A 上的一个或多个巯基，或者通过 A 上的一个或多个羟基、一个或多个氮原子和 / 或一个或多个巯基的组合，将磷酸化基团 B 与利福霉素 A 偶合。在 1 和 7 的磷酸化基团之间，可以通过连接基 L 的任何组合来与 A 偶合。

[0319] 当 L 通过 A 上的羟基将 B 与 A 偶合时，优选 L 是下列连接基团之一：

[0320]



[0321]



[0322] 其中：

[0323] n 为 ≤ 10 的整数，优选 1、2、3 或 4，更优选 1 或 2；

[0324] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数，优选 0、1、2、3 或 4，更优选 0 或 1；

[0325] q 为 2 或 3；

[0326] r 为 1、2、3、4 或 5；

[0327] w_1 和 w_2 为 ≥ 0 的整数，致使其总和 $(w_1 + w_2)$ 为 1、2 或 3；

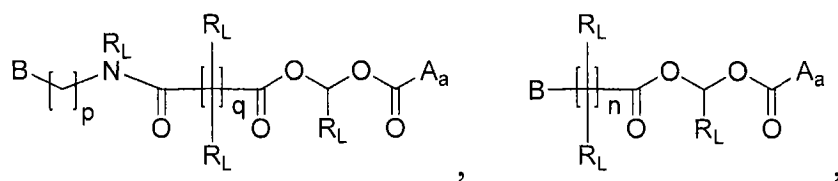
[0328] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基，优选 H；

[0329] B 代表磷酸化基团；

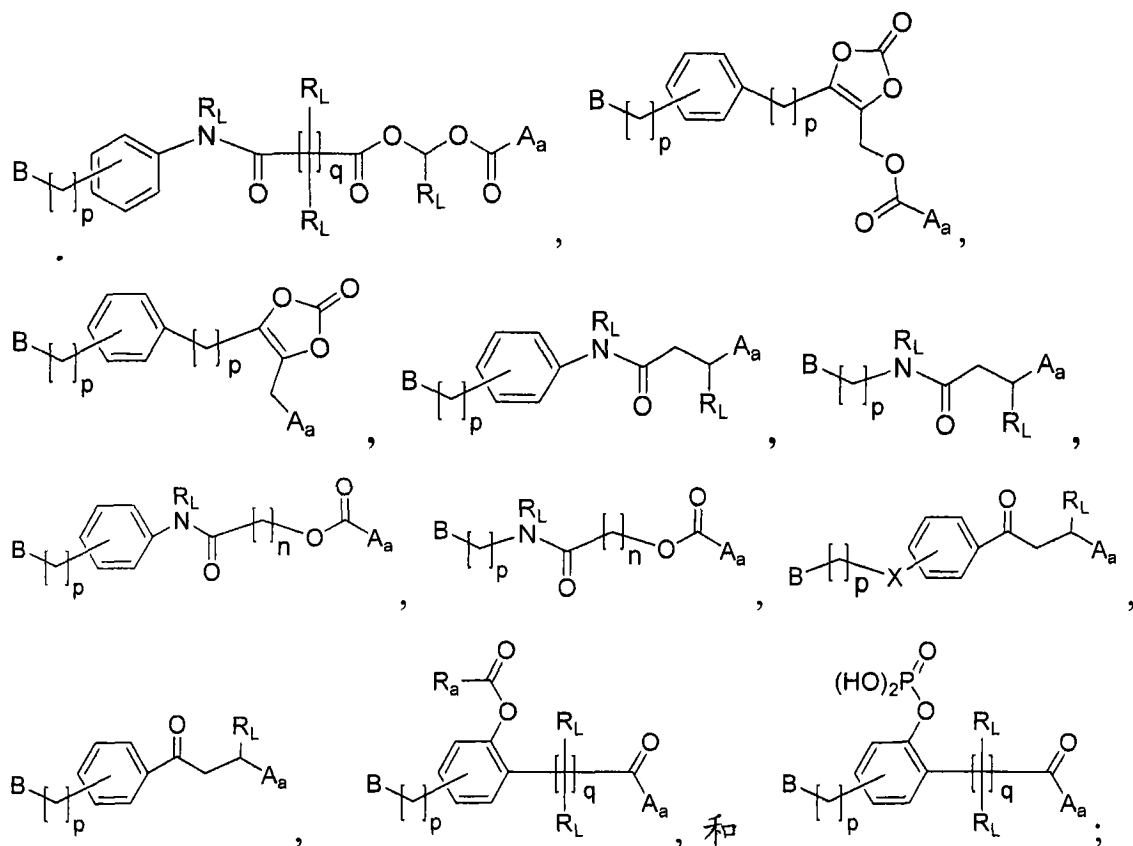
[0330] 连接基团的亚结构 A_0 代表 A 的羟基部分。

[0331] 当 L 通过 A 上的氮原子将 B 与 A 偶合时，优选 L 是下列连接基团之一：

[0332]



[0333]



[0334] 其中：

[0335] n 为 ≤ 10 的整数，优选 1、2、3 或 4，更优选 1 或 2；

[0336] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数，优选 0、1、2、3 或 4，更优选 0 或 1；

[0337] q 为 2 或 3；

[0338] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基，优选 H；

[0339] R_a 为 C_xH_y，其中 x 为 0 至 20 的整数，y 为 1 至 2x+1 的整数；

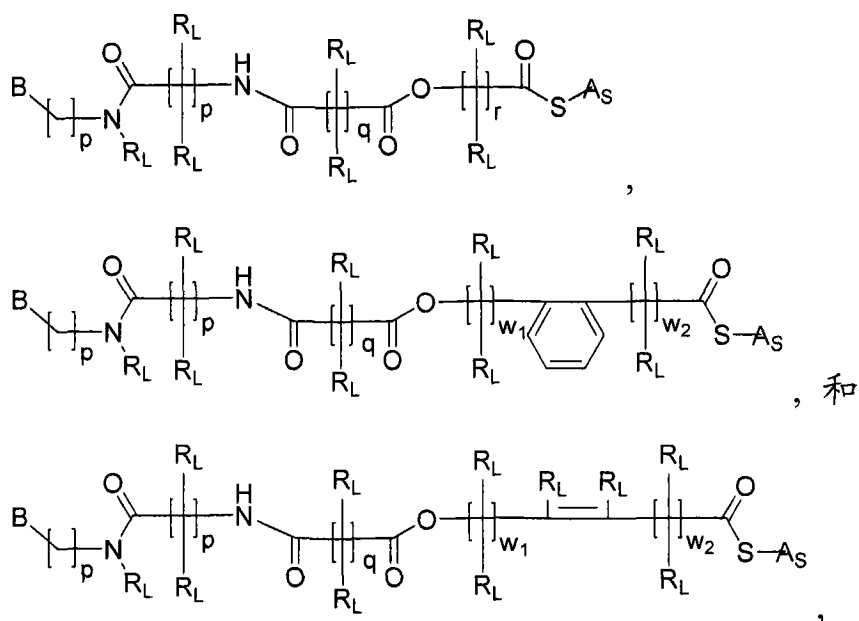
[0340] X 为 CH₂、-CONR_L-、-CO-O-CH₂- 或 -CO-O-；

[0341] B 代表磷酸化基团；和

[0342] A_a 代表 A 上的氮原子。

[0343] 当 L 通过 A 上的巯基将 B 与 A 偶合时，优选 L 是下列连接基团之一：

[0344]



[0346] 其中：

[0347] n 为 ≤ 10 的整数, 优选 1、2、3 或 4, 更优选 1 或 2；

[0348] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数, 优选 0、1、2、3 或 4, 更优选 0 或 1；

[0349] q 为 2 或 3；

[0350] r 为 1、2、3、4 或 5；

[0351] w_1 和 w_2 为整数, 使得其总和 ($w_1 + w_2$) 为 1、2 或 3；

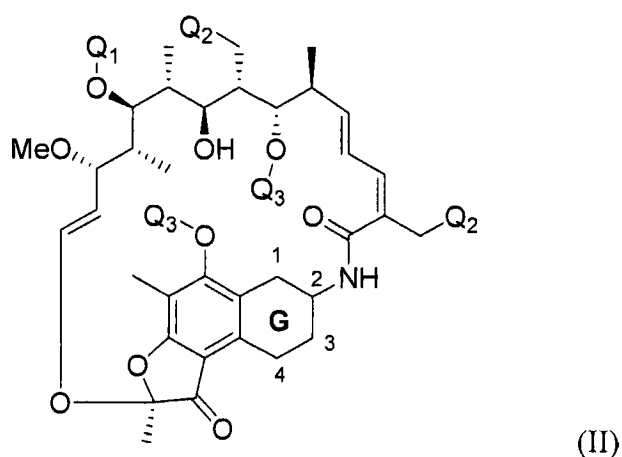
[0352] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基, 优选 H；

[0353] B 代表磷酸化基团；

[0354] 连接基团的亚结构 A_s-S 代表 A 的巯基部分；

[0355] 根据另一个具体的实施方案, 本发明的化合物以下式 (II) 或其药学上可接受的盐或前体药物为代表：

[0356]

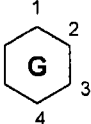


[0357] 其中：

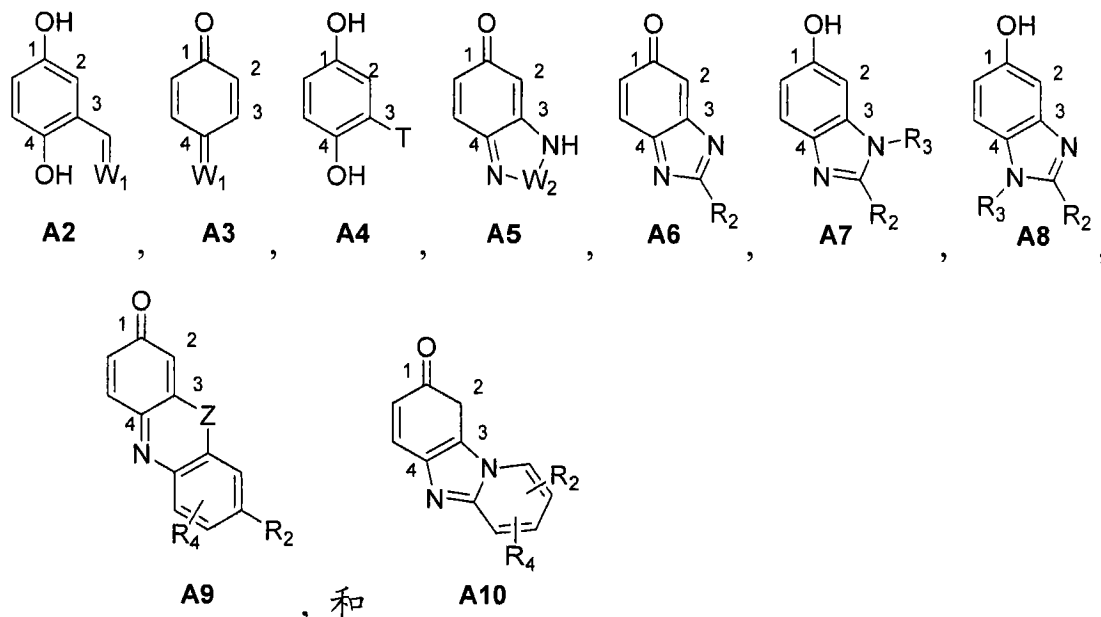
[0358] Q_1 为 H-、 R_1CO- 或 L_1- , 其中 R_1 为 1-6 个碳原子的取代或未取代的烷基链；

[0359] 各 Q_2 独立选自 H-、 $RO-$ 和 L_2O- , 其中 R 为 H-、 R_1- 或 R_1CO- , 其中 R_1 如上定义；

[0360] 各 Q_3 独立选自 H- 和 L_3- ；

[0361]  选自下式 A2-A10 :

[0362]



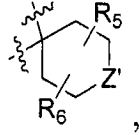
[0363] 其中

[0364] R_2 为 H-、1-10 个碳原子的取代或未取代的烷基链、或者二烷基氨基, 优选所述二烷基氨基为取代哌啶、取代吗啉或取代哌嗪, 其中如果 R_2 为 1-10 个碳原子的取代烷基链、取代哌啶、取代吗啉或取代哌嗪, 则该取代基为选自 L_4O- 、 L_5S- 和 L_6NR_7- 中的一个成员, 其中 R_7 为 1-7 个碳原子的取代或未取代的烷基链;

[0365] R_3 为 H-、1-7 个碳原子的取代或未取代的烷基链、或 L_7- ;

[0366] R_4 为羟基、巯基或 1-3 个碳原子的取代或未取代的烷基链、 L_8O- 或 L_9S- ;

[0367] W_1 为氧或 $-NR_2$, 其中 R_2 如上定义;

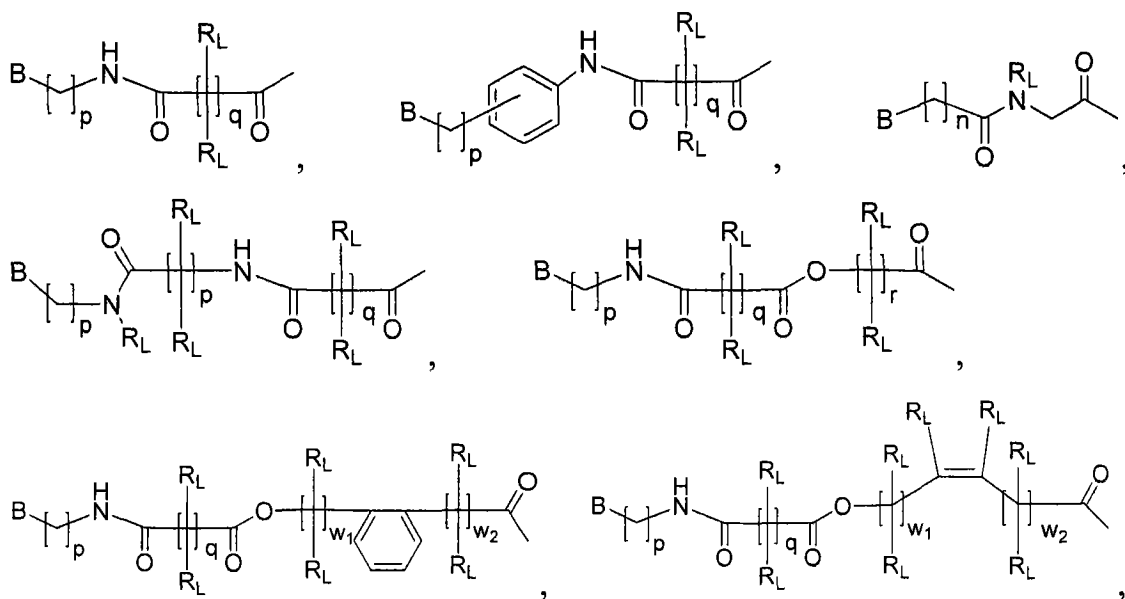
[0368] W_2 为取代或未取代的亚甲基, 包括 , 其中 R_5 和 R_6 独立地为 H- 或 1-5 个碳原子的取代或未取代的烷基链, Z' 为氧原子、硫原子、取代亚甲基、羰基、 $-NR_1$ 或 $-N(O)R_1$, 其中 R_1 如上定义;

[0369] T 为卤素或 R_2 , 其中 R_2 如上定义;

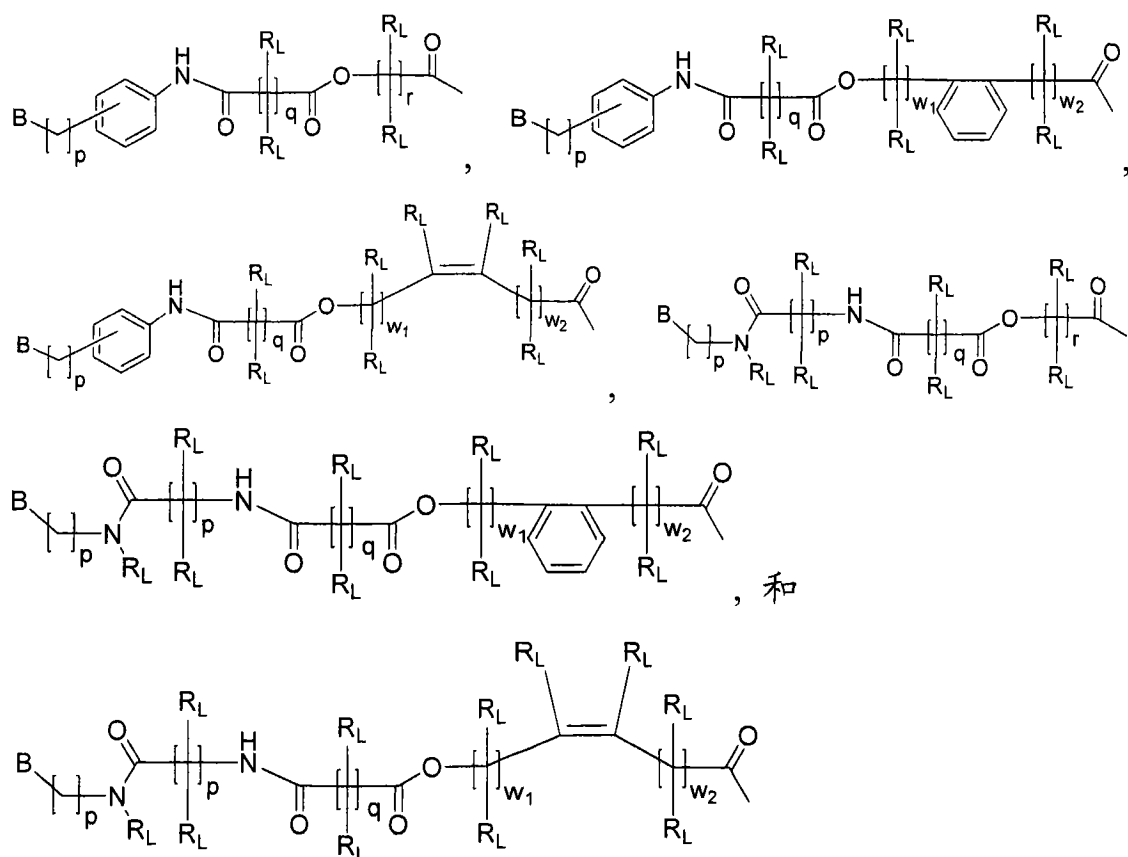
[0370] Z 为 O、S 或 NR_3 , 其中 R_3 如上定义;

[0371] L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 L_8 和 L_9 各自为独立选自以下的可裂解连接基团:

[0372]



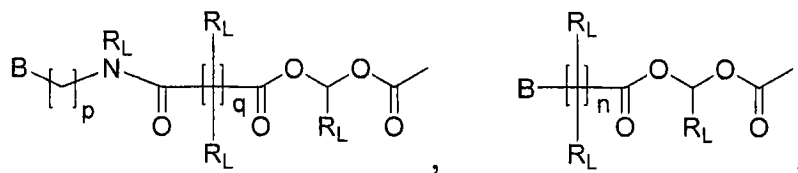
[0373]



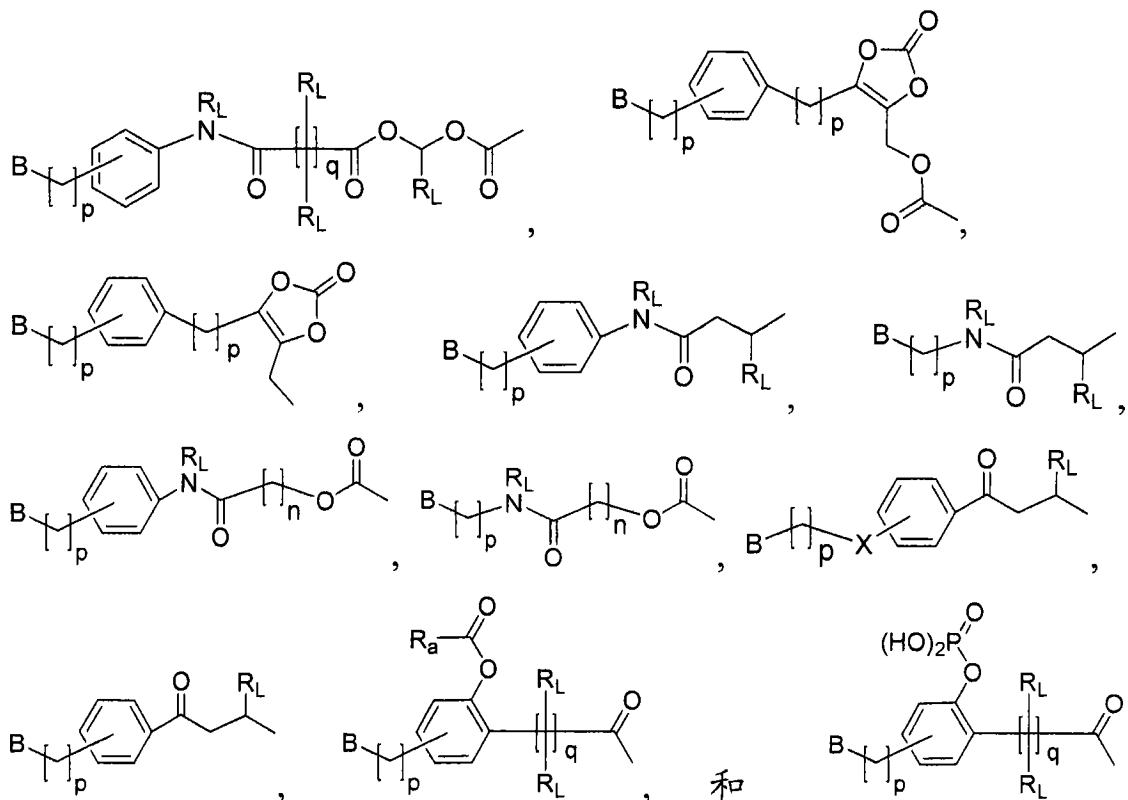
[0374] 其中：

[0375] n 为 ≤ 10 的整数, 优选 1、2、3 或 4, 更优选 1 或 2；[0376] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数, 优选 0、1、2、3 或 4, 更优选 0 或 1；[0377] q 为 2 或 3；[0378] r 为 1、2、3、4 或 5；[0379] w_1 和 w_2 为 ≥ 0 的整数, 致使其总和 $(w_1 + w_2)$ 为 1、2 或 3；[0380] 各 R_L 独立选自 H、乙基和甲基, 优选 H；[0381] L_6 和 L_7 各自为独立选自以下的可裂解连接基团：

[0382]



[0383]



[0384] 其中：

[0385] n 为 ≤ 10 的整数, 优选 1、2、3 或 4, 更优选 1 或 2;

[0386] 各 p 独立地为 0 或 ≤ 10 的整数, 优选 0、1、2、3 或 4, 更优选 0 或 1;

[0387] q 为 2 或 3；

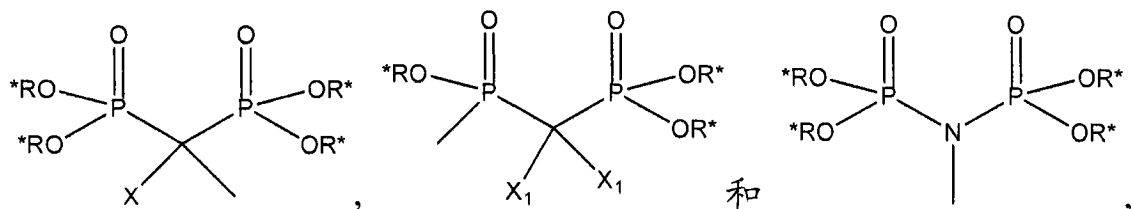
[0388] 各 R_1 独立选自 H、乙基和甲基, 优选 H;

[0389] R_a 为 C_xH_y , 其中 x 为 0 至 20 的整数, y 为 1 至 $2x+1$ 的整数; 和

[0390] X 为 CH_2 、 $-\text{CONR}_1-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{CO}-\text{O}-$;

[0391] B 是选自以下的磷酸化基团：

[0392]



[0393] 其中：

[0394] 各 R* 独立选自 H、低级烷基、环烷基、芳基和杂芳基,前提条件是至少两个 R* 为 H;

[0395] X 为 H、OH、NH₂ 或卤素基团；

[0396] 各 X_1 独立选自 H、OH、 NH_2 和卤素基团；

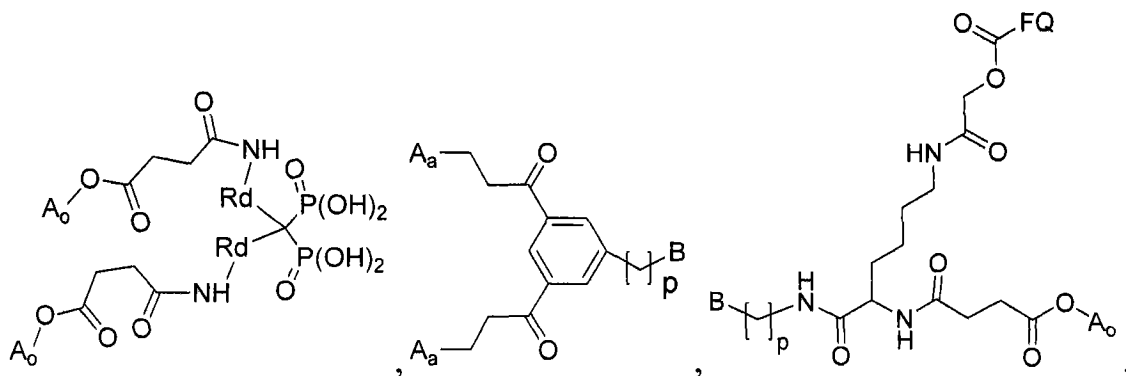
[0397] 前提条件是 L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 、 L_6 、 L_7 、 L_8 和 L_9 中至少存在一个。

[0398] 本发明还包括使用单个磷酸化基团与一个或多个抗菌分子偶合。在此情况下，抗菌分子可以相同（例如两分子利福霉素）或不同（例如一分子氟喹诺酮类抗菌环丙沙星（Cipro®; US 4, 670, 444）和一分子利福霉素）。磷酸化基团也可连接相似基团（例如羟基）或不同基团（例如一个氟喹诺酮分子的羧基和利福霉素的羟基）。

[0399] 可以通过单个磷酸化基团与本发明化合物偶合的有用抗生素的非限制性名单包括：磺胺类、 β -内酰胺类、四环素类、氯霉素、氨基糖苷类、大环内酯类、糖肽类、链阳性菌素类、喹诺酮类、氟喹诺酮类、噁唑烷酮类和脂肽类。具体地讲，优选四环素、四环素衍生的抗菌药物、甘氨酰环素、甘氨酰环素衍生的抗菌药物、米诺环素、米诺环素衍生的抗菌药物、噁唑烷酮类抗菌药物、氨基糖苷类抗菌药物、喹诺酮类抗菌药物、万古霉素、万古霉素衍生的抗菌药物、替考拉宁、替考拉宁衍生的抗菌药物、伊瑞霉素、伊瑞霉素衍生的抗菌药物、氯伊瑞霉素、氯伊瑞霉素衍生的抗菌药物、达托霉素和达托霉素衍生的抗菌药物。

[0400] 本发明可能有用的可裂解抗菌连接基团的实例包括但不限于具有下列结构的连接基团：

[0401]



[0402] 其中：

[0403] 各 R_a 独立地为烷基或芳基；

[0404] p 为 0 或 ≤ 10 的整数，优选 0、1、2、3 或 4，更优选 0 或 1；

[0405] 连接基团的亚结构 A_0-O- 代表利福霉素 A 的羟基部分；

[0406] A_3 代表利福霉素 A 的胺基；

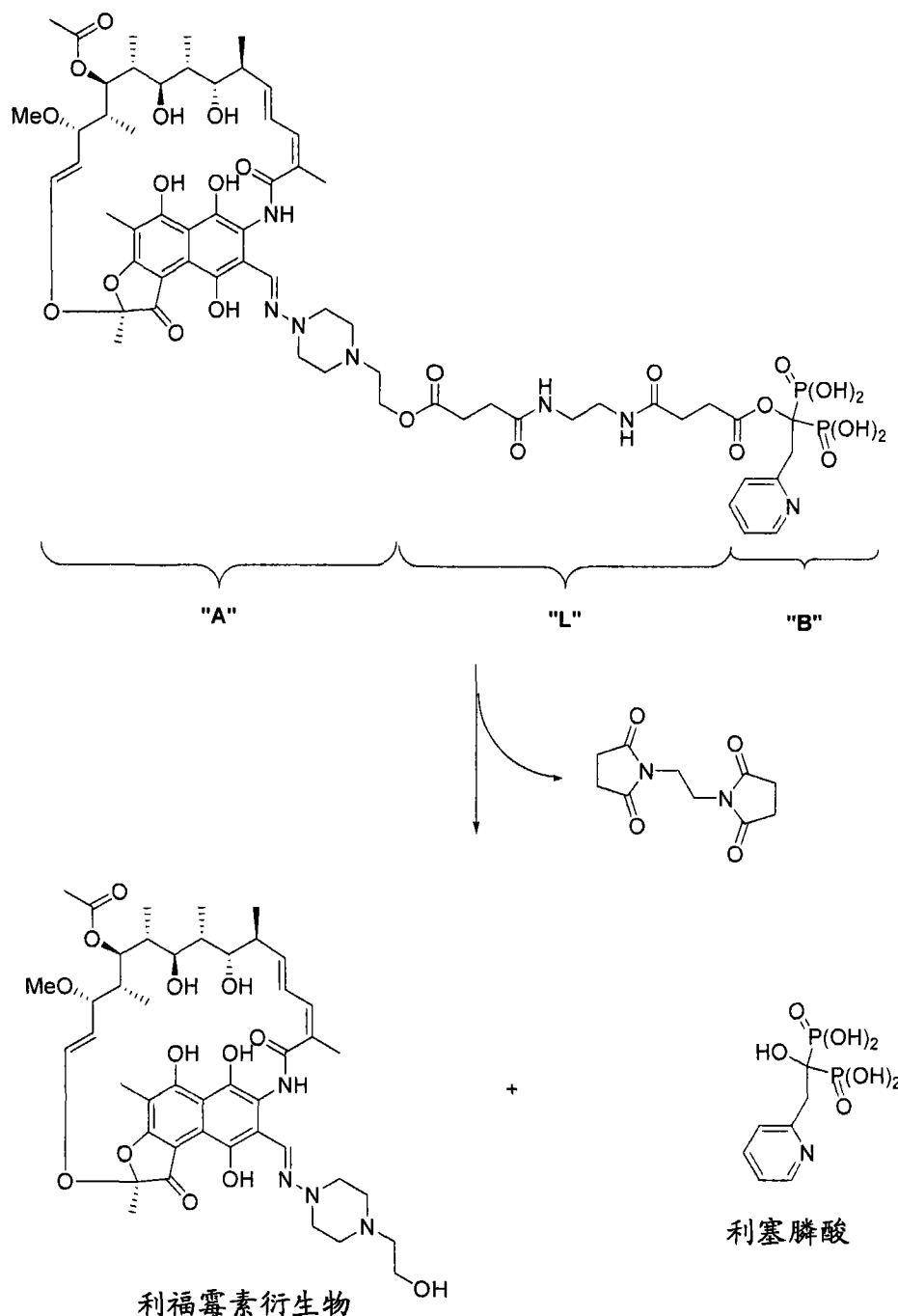
[0407] 连接基团的亚结构 $FQ-C(=O)-O-$ 代表氟喹诺酮类抗微生物药物的羧基部分。

[0408] 因为磷酸化基团 B 对骨组织具有高亲和力，所以它可能在延长的时间周期（长达数年）内保持与骨的结合。因此，具有低毒性、优选没有可检测毒性的磷酸化基团是非常重要的。根据另一个实施方案，选择磷酸化基团 B 和连接基 L，使得连接基团在体内被水解或切除（优选大部分在骨组织内），因而释放：(i) 利福霉素 A 和 (ii) 具有经证实的骨治疗活性的所选无毒磷酸化分子。因此这类化合物具有以下双重用途：1) 在延长的时间周期内和/或以增加的浓度，局部给骨骼提供用于预防和/或治疗细菌性骨感染的抗生素，和 2) 给骨骼提供药物，刺激骨再生或抑制骨吸收，因此便于骨骼从因感染或其它损伤所致的损伤中

恢复过来。可用于本发明的、经证实具有骨治疗活性的合适的磷酸化分子包括但不限于利塞膦酸盐和奥帕膦酸盐（其它例如（其它例如帕米膦酸盐、阿仑膦酸盐、伊卡膦酸盐、依替膦酸盐、伊班膦酸盐、唑来膦酸盐或奈立膦酸），这些分子是众所周知的二膦酸盐类骨吸收抑制药，通常用于治疗骨质疏松症。

[0409] 下面的流程阐明实施方案的原理：

[0410]



[0411] 本发明也包括使用 pH 敏感型连接基团，该连接基团仅在预定 pH 范围内才能裂解。在一个实施方案中，pH 敏感型连接基团是碱敏感型连接基团，在 pH 约 7 至约 9 的碱性 pH 范围内裂解。根据另一个实施方案，连接基团是酸敏感型连接基团，在 pH 约 7.5 至约 4、优选在约 6.5 和更低的酸性 pH 范围内裂解。假设这样的酸敏感型连接基团 允许利福霉素 A 主要在细菌感染部位特异性释放，因为已知在感染期间通常会发生组织酸化 (O' Reilly 等，

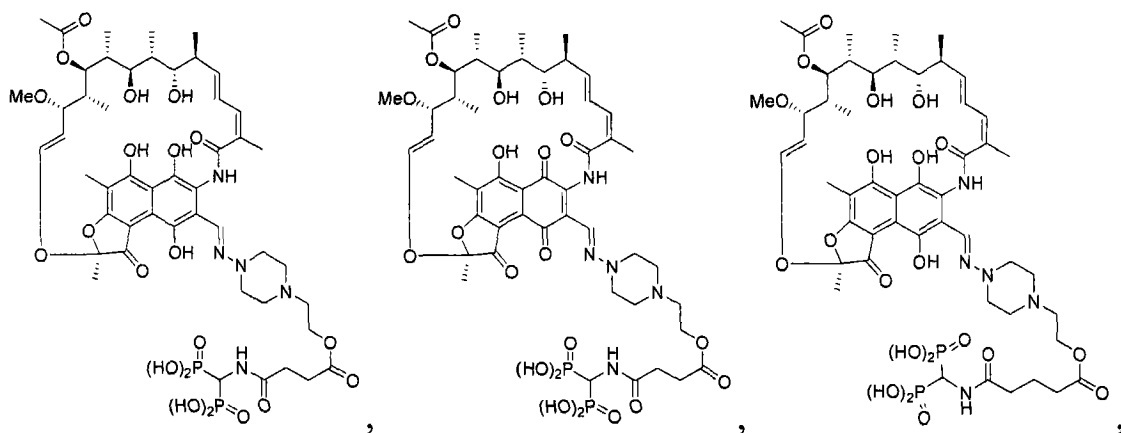
Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1992), 36 (12) :2693-97)。

[0412] 共价键或不可裂解连接基也可将磷酸化基团 B 与利福霉素 A 共价偶合。选择这样的键或连接基团,使其不被裂解,或者主要由实际发生感染部位存在的细菌进行切除。假设对于这样的化合物,磷酸化基团将保留与利福霉素 A 的缔合,整个化合物将会从骨骼中逐渐释放出来并由细菌吸收,因此发挥其抗菌效果。

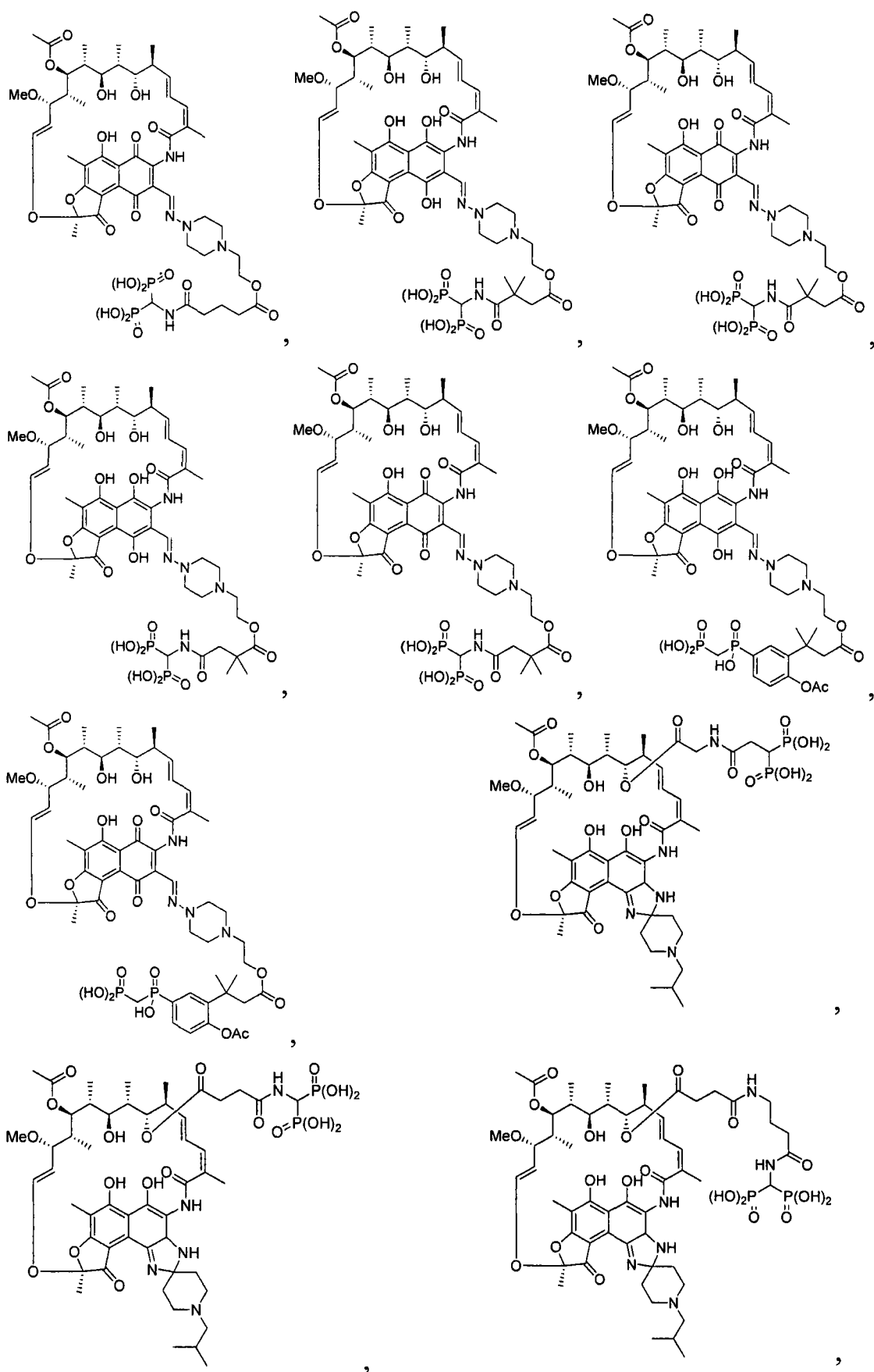
[0413] 当然,本领域技术人员可以选择并合成了其它类型的连接基团。例如,连接基团也可含有对骨骼具有亲和力的体内可水解的磷酸化基团,参见 Ilex Oncology Research, WO 04/026315。连接基团也可含有活性基团(例如刺激骨形成或减少骨吸收的可释放基团)。这些和其它合适连接基团都涵盖在本发明内。

[0414] 除了上文和实施例部分所述的那些化合物之外,本发明额外的式(I)化合物包括但不限于具有下列结构式的那些化合物:

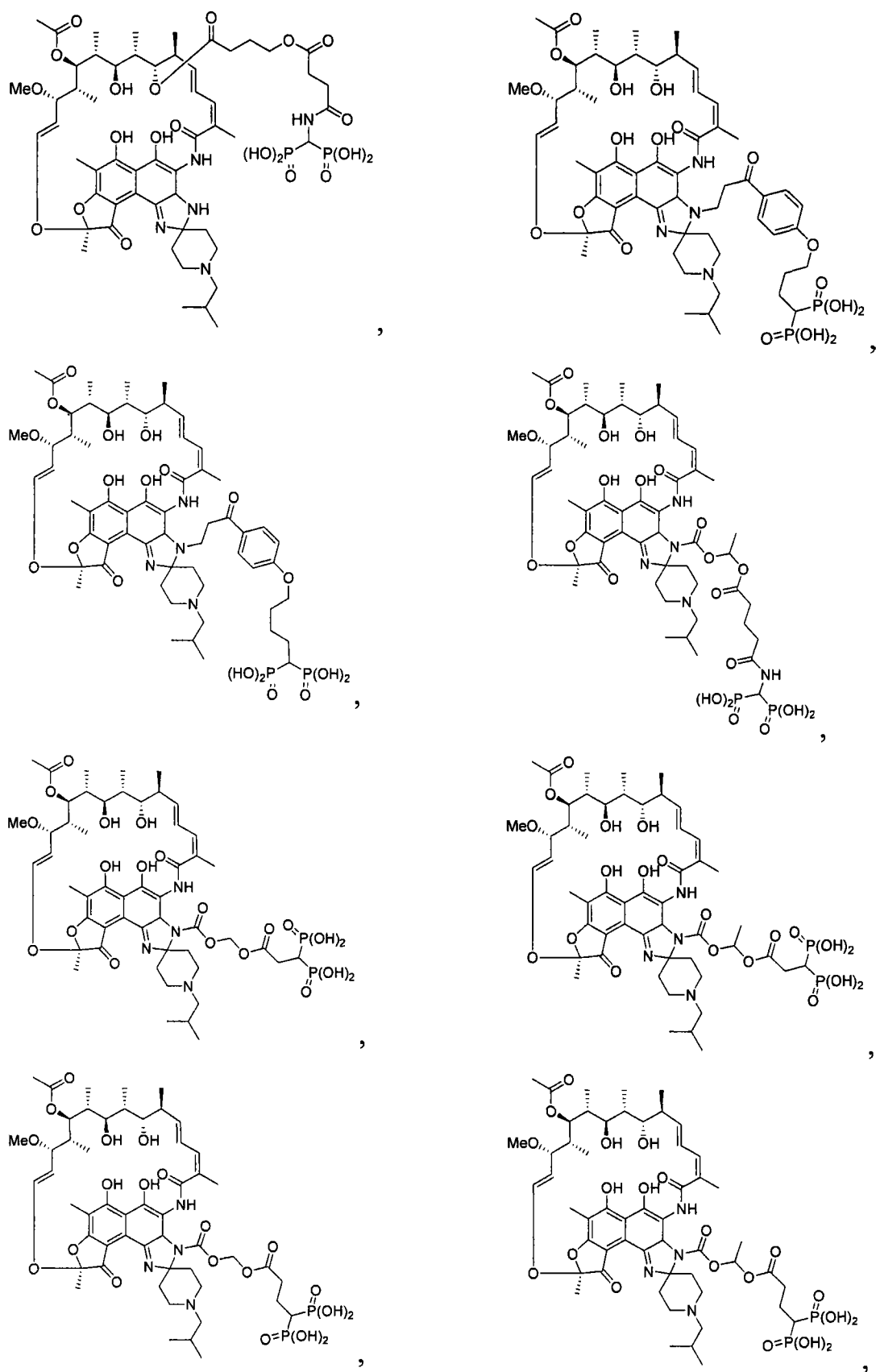
[0415]



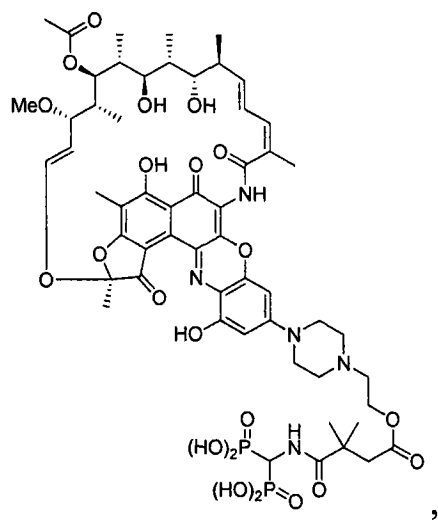
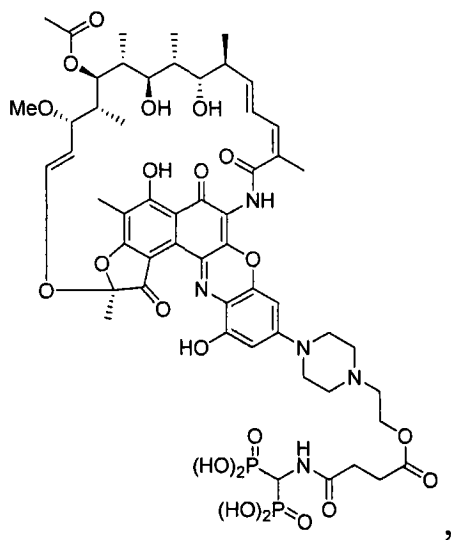
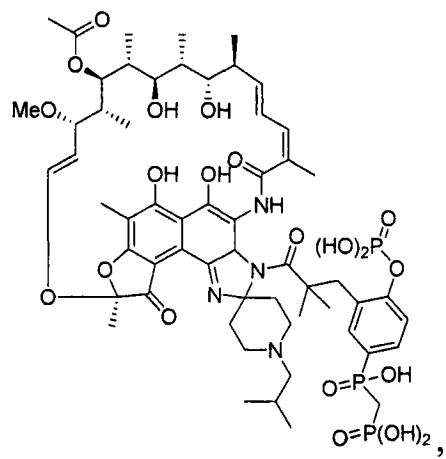
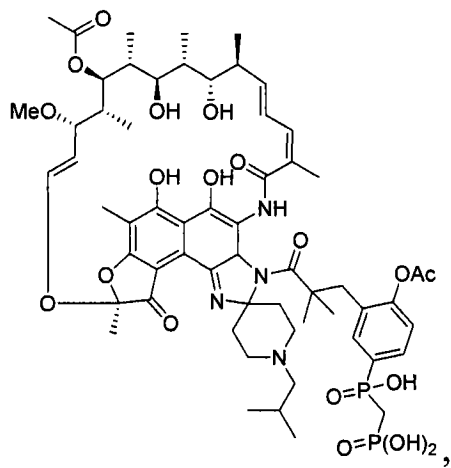
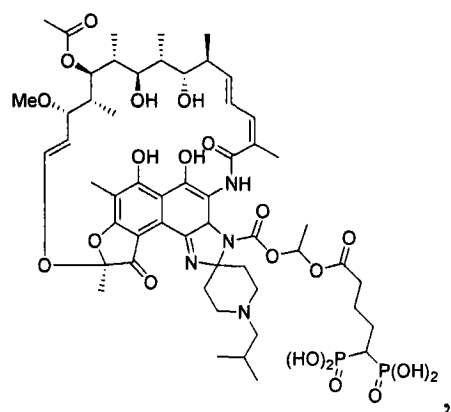
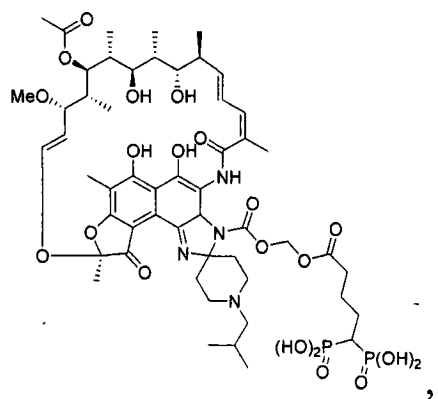
[0416]



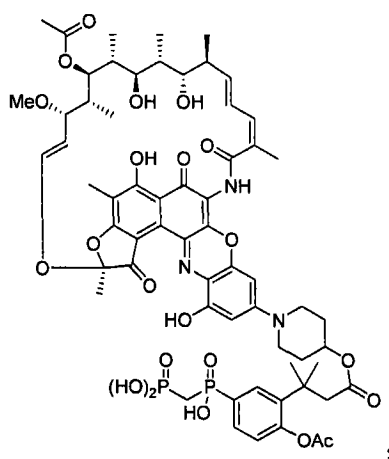
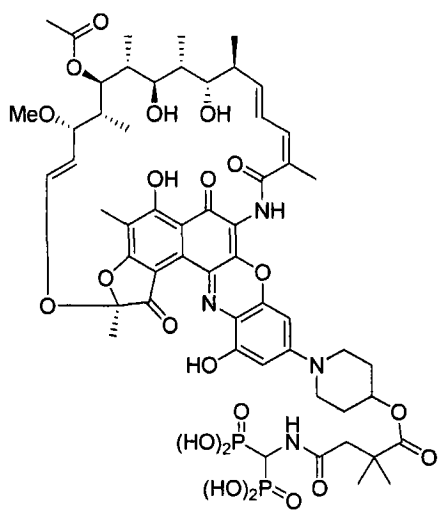
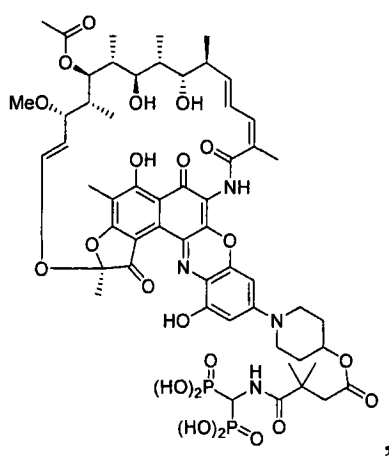
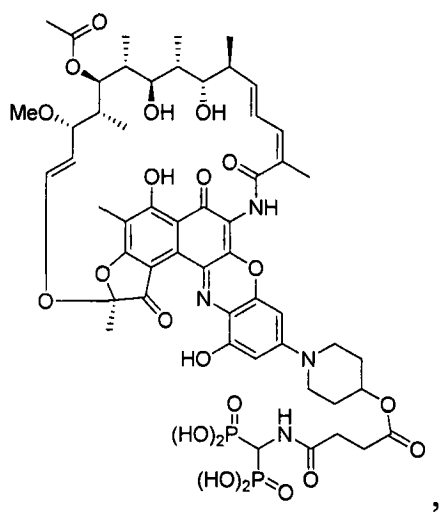
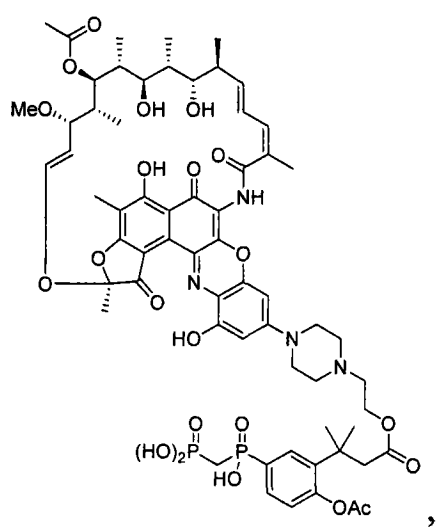
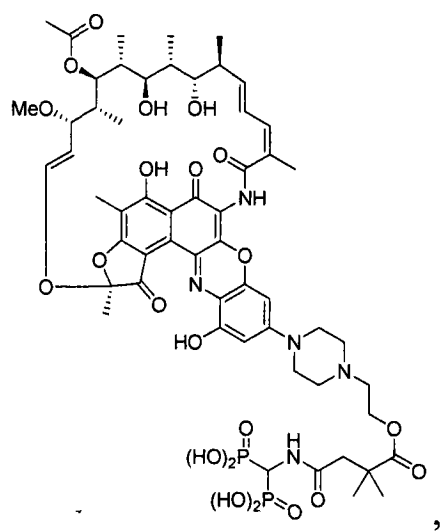
[0417]



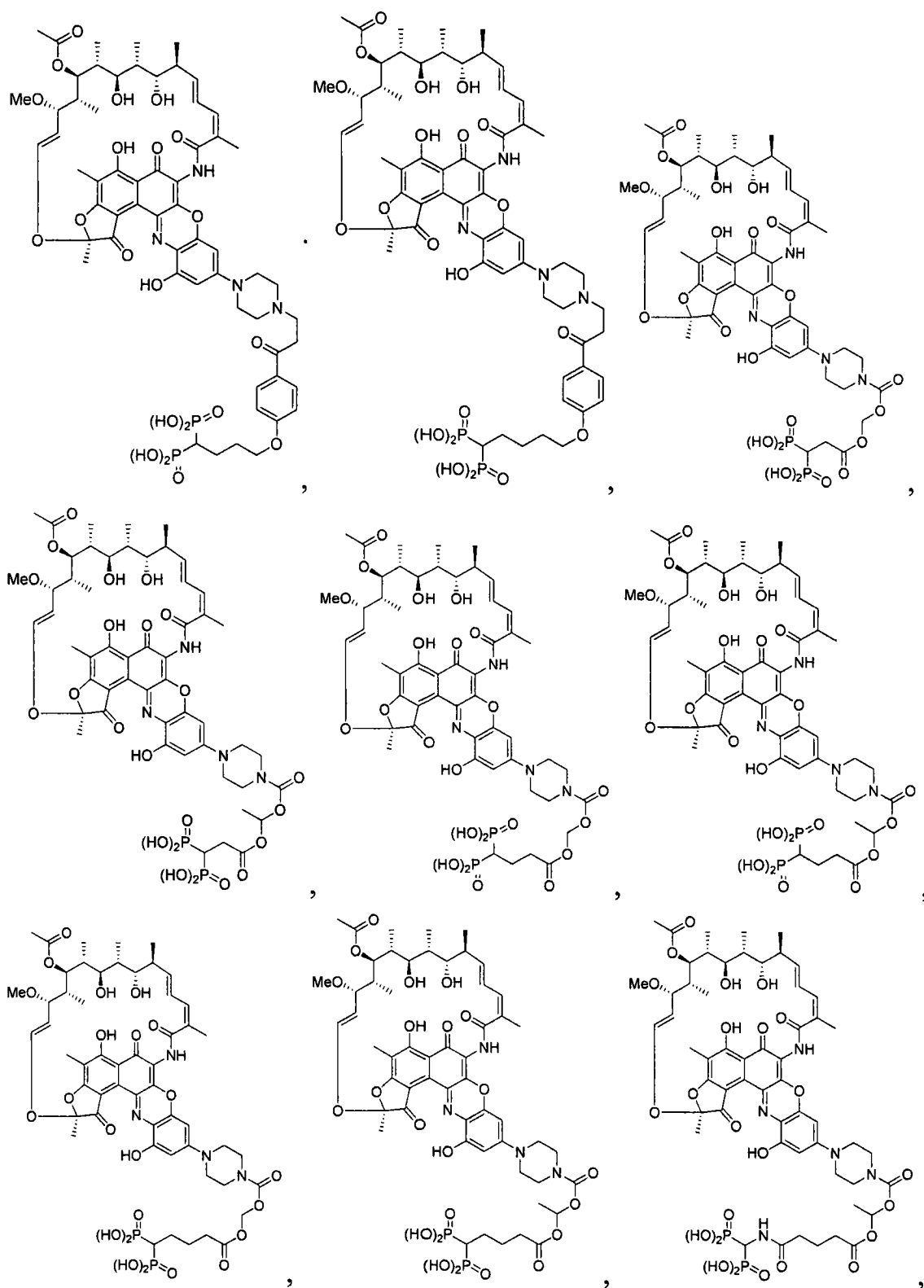
[0418]



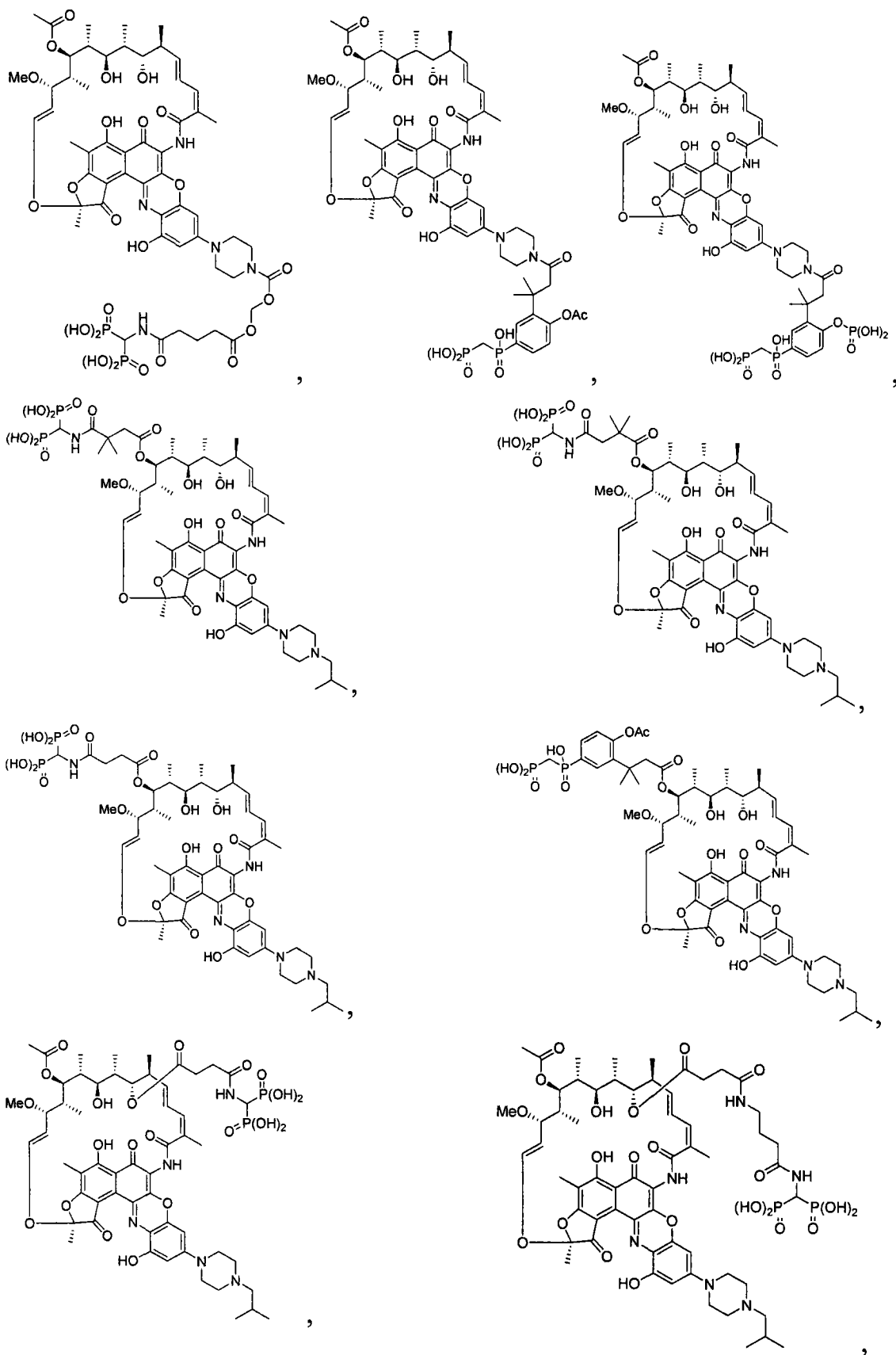
[0419]



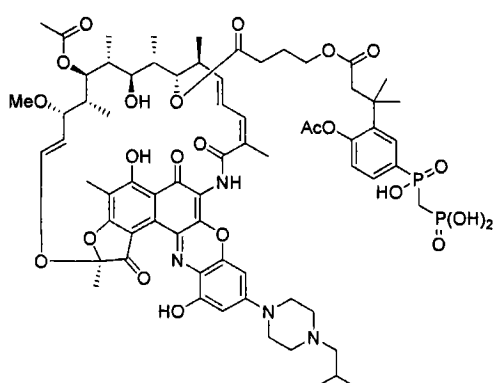
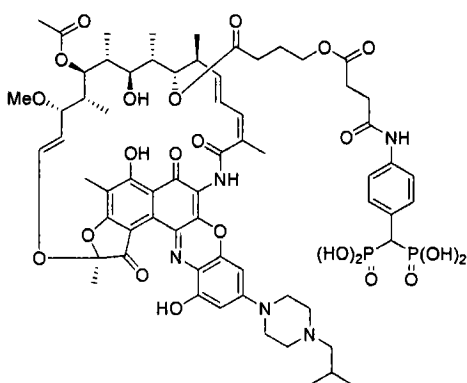
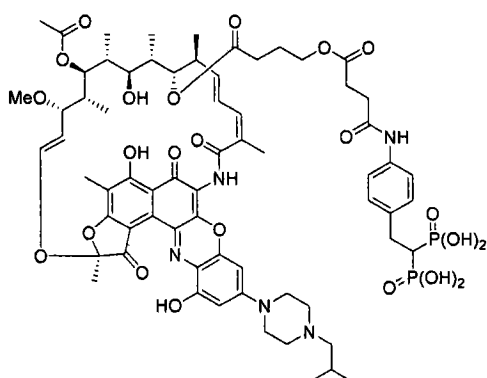
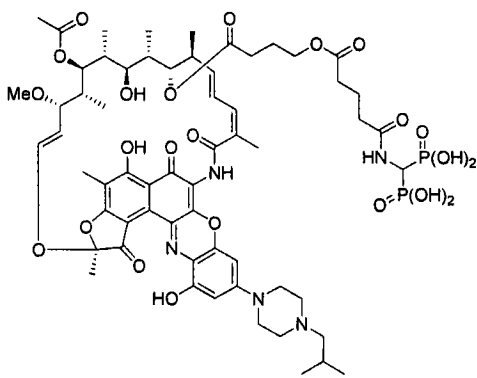
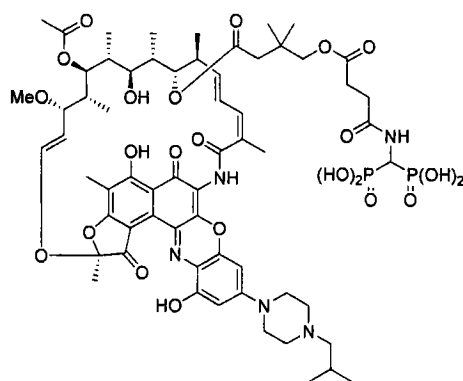
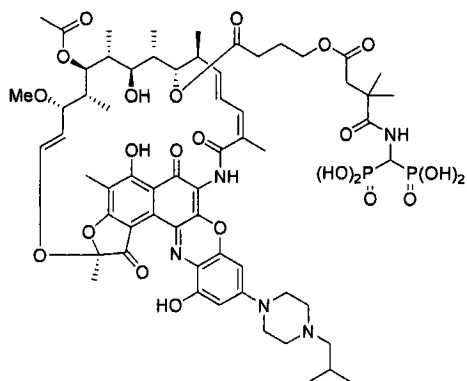
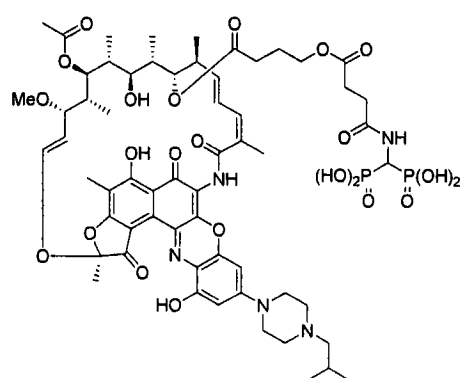
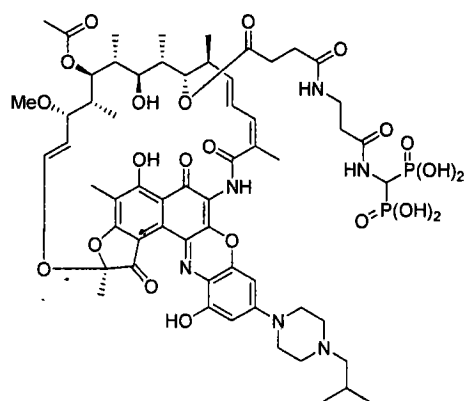
[0420]



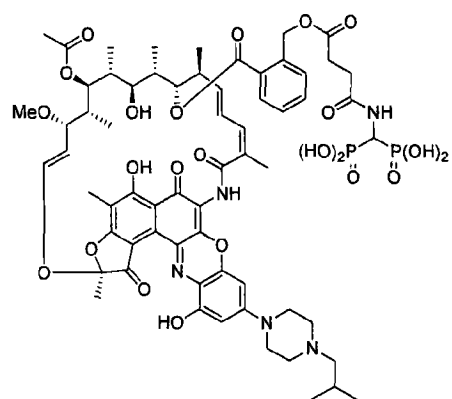
[0421]



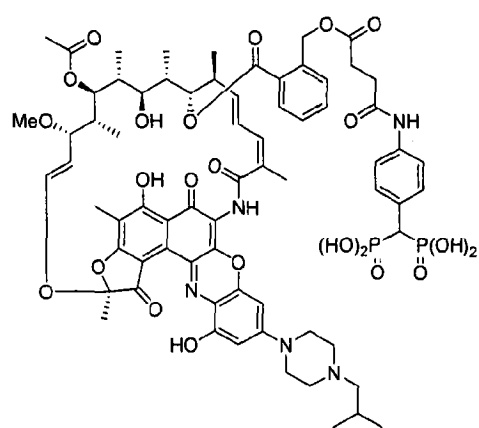
[0422]



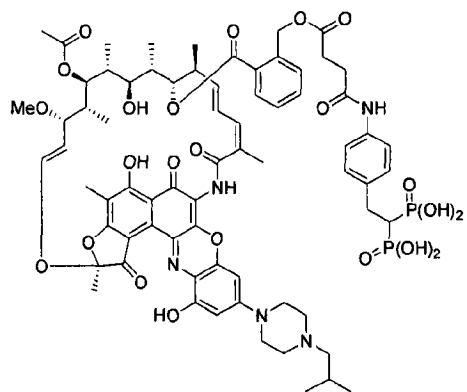
[0423]



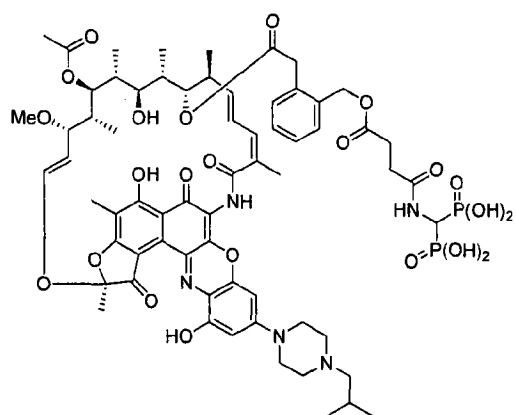
,



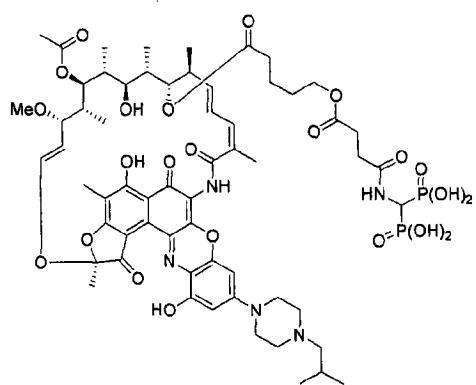
,



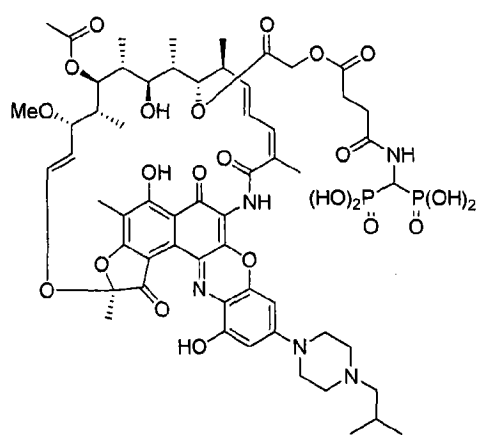
,



,

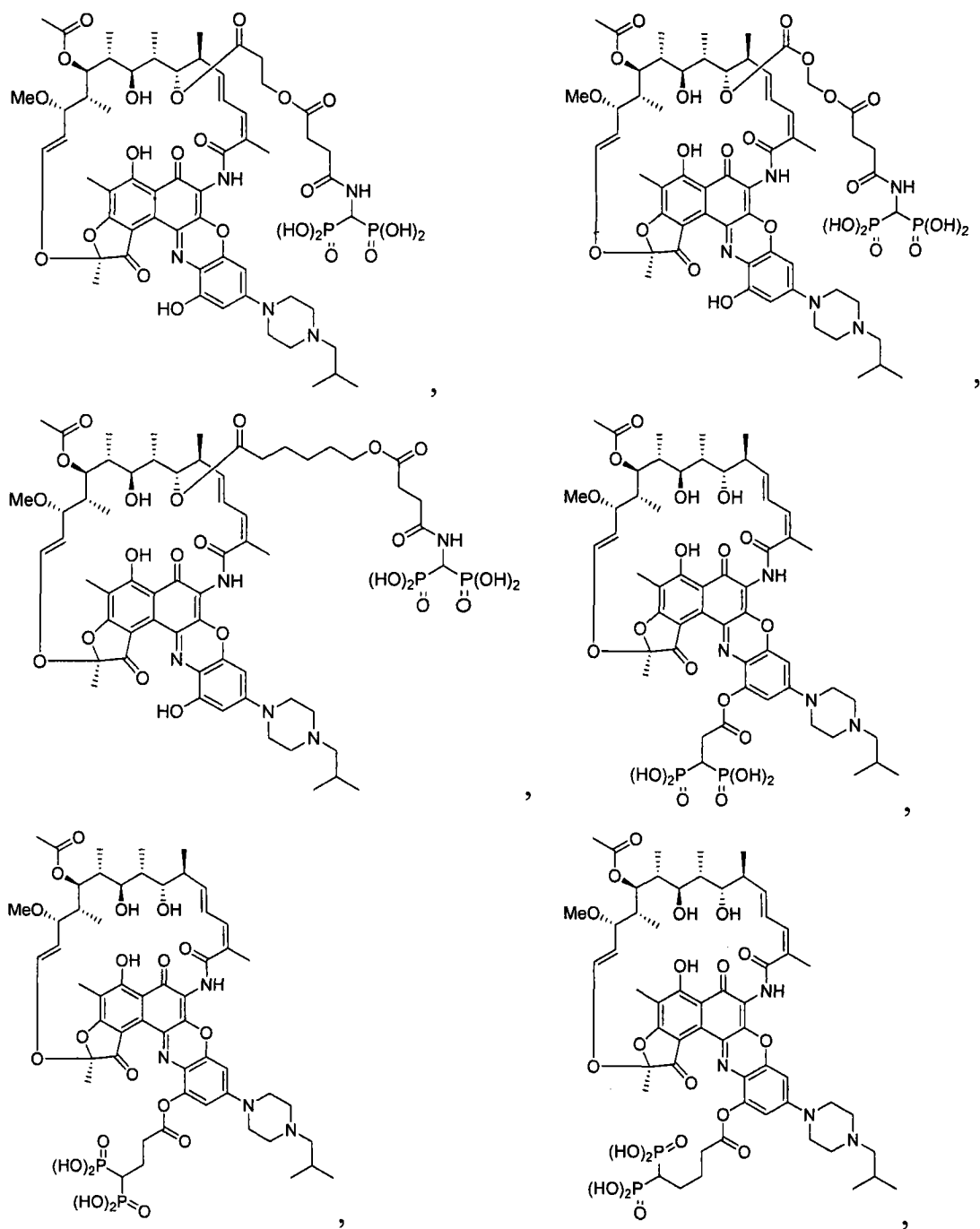


,

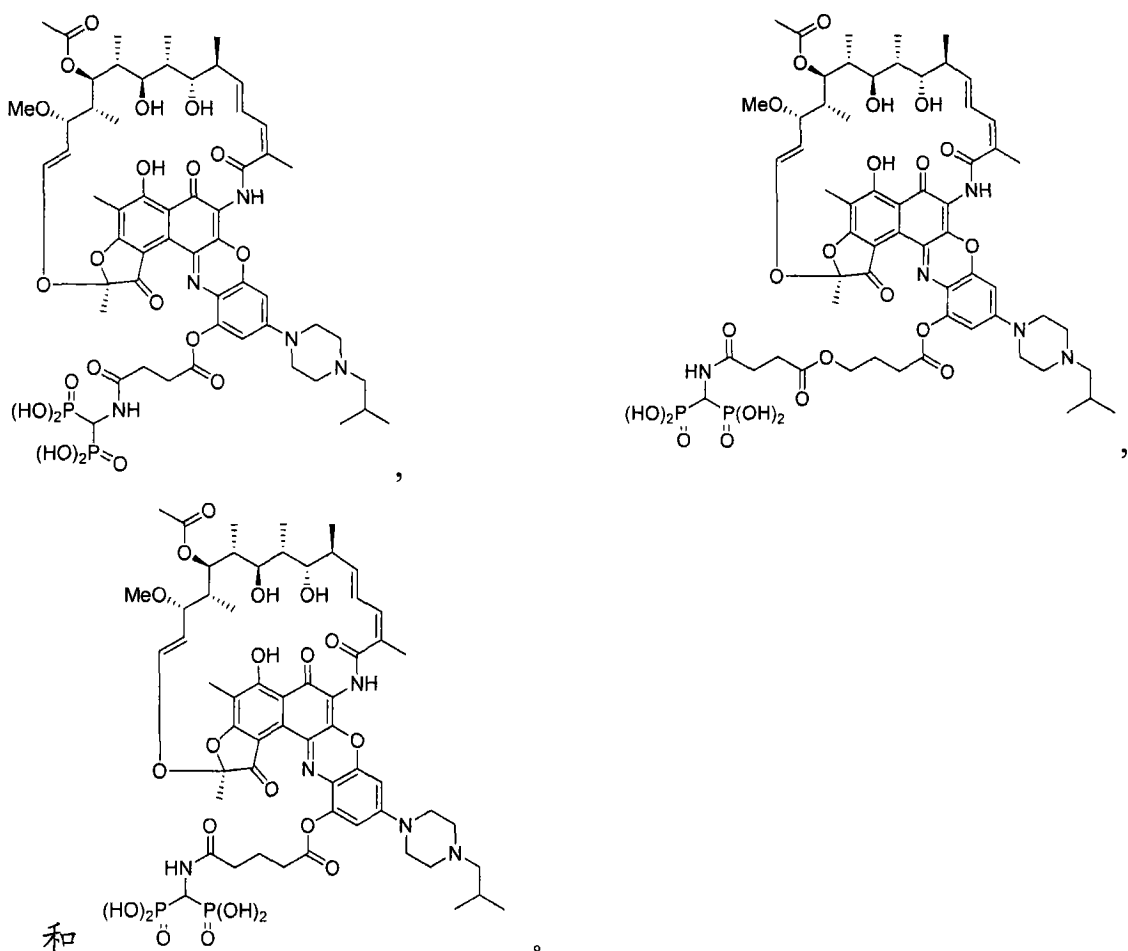


,

[0424]



[0425]



[0426] 此外,本发明涵盖式(I)和式(II)的化合物及其药学上可接受的盐、代谢物、溶剂合物和前体药物。药学上可接受的盐的实例包括但不限于硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯基乙酸盐、苯基丙酸盐、苯基丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 γ -羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙烷磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐和扁桃酸盐。

[0427] 如果本发明的化合物是碱的话,所需盐可采用本领域已知的任何合适方法来制备,包括用无机酸或有机酸处理游离碱,所述无机酸例如:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等;所述有机酸例如乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃糖苷酸(例如葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸)、 α -羟酸(例如柠檬酸和酒石酸)、氨基酸(例如天冬氨酸和谷氨酸)、芳族酸(例如苯甲酸和肉桂酸)、磺酸(例如对甲苯磺酸或乙磺酸)等。

[0428] 如果本发明的化合物是酸的话,所需盐可采用本领域已知的任何合适方法来制备,包括用无机碱或有机碱处理游离酸,所述碱例如胺(伯、仲、叔)、碱金属或碱土金属的氢氧化物等。合适的盐的说明性实例包括有机盐 and 无机盐,所述有机盐是由氨基酸(甘氨酸和精氨酸)、氨、伯胺、仲胺、叔胺和环状胺(例如哌啶、吗啉和哌嗪)衍生的;而所述无机

盐是由钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂衍生的。

[0429] 在化合物、盐、前体药物或溶剂合物为固体的情况下,本领域技术人员知道本发明的化合物、盐和溶剂合物可以不同的晶型存在,它们全都涵盖在本发明的范围之内。

[0430] 本发明的化合物可以单一立体异构体、外消旋体和 / 或对映体和 / 或非对映体的混合物形式存在。所有这些单一立体异构体、外消旋体及其混合物都涵盖在本发明的范围之内。优选使用旋光纯形式的本发明化合物。

[0431] 可以前体药物形式给予式 (I) 和 / 或式 (II) 的化合物,这样的前体药物在人或动物体内能分解并释放出式 (I) 或式 (II) 的化合物。前体药物的实例包括式 (I) 和 / 或式 (II) 化合物的体内可水解的酯。

[0432] 含有羧基或羟基的式 (I) 和 / 或式 (II) 化合物的体内可水解的酯是例如药学上可接受的酯,其在人或动物体内被水解,产生母体酸或醇。对于羧基而言的合适的药学上可接受的酯包括 (1-6C) 烷氧基甲酯 (例如甲氧基甲酯)、(1-6C) 烷酰基氧基甲基酯 (例如新戊酰氧基甲酯)、酰基酯、(3-8C) 环烷氧基羰基氧基 (1-6C) 烷基酯 (例如 1- 环己基羰基氧基乙酯);1,3- 二氧杂环戊烯 -2- 酮基甲酯 (例如 5- 甲基 -1,3- 二氧杂环戊烯 -2- 酮基甲酯);和 (1-6C) 烷氧基羰基氧基乙酯 (例如 1- 甲氧基羰基氧基乙酯) 并且可以在和本发明化合物的任何羧基上成酯。

[0433] 含有羟基的式 (I) 和 / 或式 (II) 化合物的体内可水解酯包括无机酯 (例如磷酸酯) 和 α - 酰氧基烷基醚及相关化合物,它们是酯在体内水解而得到母体羟基的结果。 α - 酰氧基烷基醚的实例包括乙酰氧基甲氧基和 2,2- 二甲基丙酰氧基甲氧基。与羟基形成体内可水解的酯的基团包括烷酰基、苯甲酰基、苯基乙酰基和取代苯甲酰基和苯基乙酰基、烷氧基羰基 (得到烷基碳酸酯)、二烷基氨基甲酰基和 N-(二烷基氨基乙基)-N- 烷基氨基甲酰基 (得到氨基甲酸酯)、二烷基氨基乙酰基和羧基乙酰基。

[0434] D) 制备方法

[0435] 采用本领域合适技术,使用易得原料,可以制备本发明的化合物及其盐、溶剂合物、晶型、活性代谢物和前体药物。制备本发明化合物的某些新的示例性方法可参见实施例部分。这类方法涵盖在本发明范围之内。

[0436] E) 抗微生物组合物和治疗方法

[0437] 本发明的相关方面涉及将本发明化合物作为治疗性或抗菌药物组合物中的活性成分,用于治疗或预防的目的。

[0438] 药物组合物

[0439] 本发明的化合物可以配制成药学上可接受的组合物。

[0440] 本发明提供包含本发明化合物 (例如式 (I) 和 (II) 的化合物) 以及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。优选药物组合物中的本发明化合物是治疗有效量的化合物。载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。

[0441] 制备本发明药物组合物的合适药物形式的可接受的方法是本领域技术人员已知的。例如,可以按照药物化学家的常规技术制备药物制剂,这类技术包括例如以下步骤:混合、制粒和压制 (如果需要片剂形式的话),或者混合、填充和溶解合适组分,以得到所需产品,用于各种给药途径。

[0442] 本发明的化合物和组合物具有广谱活性,包括针对抗生素抗性菌株革兰氏阳性

菌（例如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermis*)、酿脓葡萄球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)）和革兰氏阴性菌（例如大肠杆菌 (*E. coli*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*)、肠杆菌 (*Enterobacter sp.*)、流感嗜血杆菌 (*H. influenza*)、肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*)、肺炎军团菌 (*Legionella pneumoniae*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)）。

[0443] 药物组合物和第二治疗药

[0444] 各种各样的第二治疗药（例如抗生素）都可与本发明的化合物、药物组合物和本发明的方法联用。用作第二治疗药的抗生素可以通过干扰细胞壁合成、质膜完整性、核酸合成、核糖体功能、叶酸合成等而起作用。第二治疗药可包含在含有本发明磷酸化利福霉素化合物的药物组合物中，或者第二治疗药可以与含有本发明磷酸化利福霉素化合物的药物组合物一起给予。

[0445] 可与本发明化合物和组合物联用的抗生素的非限制性名单包括：磺胺类、 β -内酰胺类、四环素类、氯霉素、氨基糖苷类、大环内酯类、糖肽类、链阳性菌素类、喹诺酮类、氟喹诺酮类、噁唑烷酮类和脂肽类。具体地讲，优选四环素、四环素衍生的抗菌药物、甘氨酸环素、甘氨酸环素衍生的抗菌药物、米诺环素、米诺环素衍生的抗菌药物、噁唑烷酮类抗菌药物、氨基糖苷类抗菌药物、喹诺酮类抗菌药物、万古霉素、万古霉素衍生的抗菌药物、替考拉宁、替考拉宁衍生的抗菌药物、伊瑞霉素、伊瑞霉素衍生的抗菌药物、氯伊瑞霉素、氯伊瑞霉素衍生的抗菌药物、达托霉素和达托霉素衍生的抗菌药物。

[0446] 抑制细菌生长的方法

[0447] 根据相关方面，本发明涉及抑制细菌生长的方法。方法包括为了所述抑制的目的，使细菌接触有效量的本发明磷酸化利福霉素化合物或者包含本发明化合物（或其药学上可接受的前体药物、盐、活性代谢物或其溶剂合物）。例如，可以通过使细菌接触本发明的化合物，来抑制细菌 RNA 聚合酶、细菌 RNA 聚合酶依赖型 DNA 转录和 / 或细菌翻译。

[0448] 可以在体外（例如在实验室的组织培养物中，在生化和 / 或细胞测定中）、非人类动物的体内、哺乳动物（包括人）体内和 / 或离体（例如用于无菌目的）进行接触。

[0449] 可以采用本领域技术人员可用的任何方法，测定本发明化合物作为 DNA 转录和 / 或翻译抑制剂的活性，包括体内和体外测定。细菌 RNA 聚合酶测定方法的某些实例可参见美国专利 5,635,349 和 Sawadogo 及其合作者 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 82 : 4394-4398), Doan 及其合作者 (FEMS Microbiol. Lett. (2001), 196 : 135-139) 和 Wu 及其合作者 (Anal. Biochem. (1997), 245 : 226-230)。

[0450] 治疗方法

[0451] 本发明的相关方面涉及本发明化合物作为治疗用药物组合物、治疗性组合物或抗菌组合物中的活性成分的用途。如上定义的“治疗”是指因减少任何细菌（例如革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌）的生长、复制和 / 或繁殖而至少缓解患者（包括哺乳动物，例如人）的细菌感染相关的疾病状态，包括治疗、治愈、抑制、减轻、改善和 / 或缓解全部或部分疾病状况。

[0452] 可以任何有效而方便的方式给予药物组合物，这些方式例如局部、胃肠外、口服、肛门、阴道内、静脉内、腹膜内、肌内、眼内、皮下、鼻内、支气管内或皮内途径等。

[0453] 具体地讲，在治疗中或作为预防药（正如下文所详述的那样），本发明化合物和药

物组合物和 / 或药学上可接受的前体药物、盐、活性代谢物和溶剂合物可作为注射用组合物给予个体,所述组合物例如无菌含水混悬剂,优选等渗混悬剂。或者,化合物和组合物可配制成供局部用,其形式例如软膏剂、乳膏剂、洗剂、眼用软膏剂、滴眼剂、滴耳剂、漱口剂、浸药敷料剂和缝合线和气溶胶,并且可含有合适的常规添加剂,包括例如防腐剂、利于药物渗透的溶剂以及软膏剂和乳膏剂中的软化剂。这类局部制剂也可含有相容的常规载体,例如乳膏基或软膏基,以及用于洗剂的乙醇或油醇。这类载体可占制剂重量的约 1% 至约 98%;更常见的是它们可占制剂重量的约 80%。

[0454] 系统给药的替代方法包括透皮给药和经皮给药,采用渗透剂例如胆盐或夫西地酸或其它去垢剂。另外,如果本发明的化合物或药物组合物可配制成肠溶制剂或胶囊剂,也可以口服给药。这些化合物和组合物的给药也可以是局部和 / 或定域,其形式为药膏剂、贴剂、凝胶剂等。

[0455] 尽管可以通过上述系统方式给予治疗,但是也可以局部方式给予治疗。例如,治疗可直接给予骨骼,例如通过向骨骼注射。也可用其它局部方式给予治疗,例如通过局部组合物用于伤口或直接给予皮下或其它形式的伤口。

[0456] 也可将活性化合物、药物组合物和药学上可接受的前体药物、盐、代谢物和溶剂合物作为骨替代物或骨修复化合物(例如骨粘固剂或填充剂(例如 Skelite™, Millenium Biologies, Kingston, ON, Canada) 和钙或羟基磷灰石珠)的组成部分,给予个体。

[0457] 化合物或药物组合物的剂量含有至少药用有效量或治疗有效量的活性化合物(即式 (I) 化合物、式 (II) 化合物和 / 或其药学上可接受的前体药物、盐、活性代谢物或溶剂合物),优选由一个或多个药物剂量单位组成。可将所选剂量给予需要治疗的患者,例如人类患者。“治疗有效量”是指式 (I) 化合物和 / 或式 (II) 化合物(和 / 或其药学上可接受的前体药物、盐、活性代谢物或溶剂合物)对所治疗患者具有疗效的用量。疗效可以是客观的(即通过某些测定或标记(例如降低细菌计数)来测定)或是主观的(即患者给出的指示或感觉效果)。

[0458] 符合“治疗有效量”的用量因以下因素而异:例如具体化合物、给药途径、所用赋形剂、疾病症状及其严重程度、对需要治疗患者的判定和同时使用其它药物治疗疾病的可能性。然而,本领域技术人员能够容易地确定治疗有效量。对于给予患者(例如哺乳动物,尤其是人),希望活性化合物的日剂量水平为 0.1mg/kg 至 200mg/kg,通常为 1-5mg/kg。主治医师在任何情况下将会确定最适合个体的实际剂量,该剂量因具体个体的年龄、体重和反应而异。以上剂量是普通病例的示例性剂量。当然,在个别情况下也允许更高或更低剂量范围,这些都涵盖在本发明范围之内。

[0459] 尽管本发明优选针对骨相关感染的预防和 / 或治疗,但是本发明涵盖针对由细菌感染引起或与之有关的其它疾病的治疗和预防方法,所述疾病包括但不限于耳炎、结膜炎、肺炎、菌血症、鼻窦炎、胸膜肺气肿(pleural emphysema)和心内膜炎、动脉粥样硬化血管钙化附近的低度感染和脑膜炎。在这些方法中,将如上所述的治疗或预防有效量的化合物和 / 或药物组合物给予患者(优选人),其用量足以提供疗效,因而预防或治疗患者的感染。本领域技术人员可以常规确定实际用量,所述用量因例如以下一些因素而异:所涉及的特定细菌菌株和所用的具体抗菌化合物。

[0460] 预防方法

[0461] 本发明化合物特别具有的额外用途就是用于预防和防止的目的。的确,许多矫形外科医生考虑到具有人工关节的人应当考虑在进行可引起菌血症的治疗前采用抗生素预防。深度感染是严重的并发症,有时可导致人工关节损失并伴有明显的发病率和死亡率。因此,在这种情况下,本发明的化合物和药物组合物可用来代替预防性抗生素。例如,在进行侵入性治疗之前的短期内可通过注射给予本发明化合物和 / 或药物组合物,以达到针对相关细菌的系统性和 / 或局部疗效,所述侵入性治疗例如外科手术或植入留置装置(例如关节置换(臀、膝、肩等)、骨移植、骨折修复、牙科手术或植入)。治疗可持续到侵入性治疗之后,例如术后或在装置植入体内期间。

[0462] 另外,本发明化合物和 / 或药物组合物也可在侵入性治疗之前给予,以便在治疗前在骨组织中蓄积本发明化合物。

[0463] 在各种情况下,本发明的化合物和 / 或药物组合物可在手术前 1、2、3、4、5、6、7 天或更长时间,至 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 小时或更短时间,给予 1、2、3 次或更多次,以便让本发明化合物适当地存在于系统或局部和 / 或在骨骼中蓄积,优选在手术期间可能会暴露给细菌污染的区域。甚至更优选给予本发明的磷酸化化合物和 / 或药物组合物,使得它们的局部浓度比给予未经修饰的母体利福霉素(即非磷酸化等同物)通常所达到的浓度相比约高出 5、10、20、30、40、50、75、100、500 或甚至 1000 倍。可在侵入性治疗之后一段时间内例如 1、2、3、4、5 或 6 天,1、2、3 周或更长时间,或者在装置存在于体内的所有时间内,给予本发明的化合物。

[0464] 因此,本发明提供诱导利福霉素在患者(例如哺乳动物)骨骼内蓄积的方法,其中将对骨组织具有高亲和力的磷酸化利福霉素给予患者。磷酸化利福霉素与骨组织结合并蓄积在患者骨骼内,其数量大于非磷酸化利福霉素等同物的数量。优选的磷酸基团通过可裂解连接基与利福霉素偶合。

[0465] 本发明还提供延长利福霉素在患者(例如哺乳动物)骨骼中存在时间的方法,其中将对骨组织具有高亲和力的磷酸化利福霉素给予患者。磷酸化基团通过可裂解连接基与利福霉素偶合。磷酸化利福霉素与骨组织结合并蓄积在患者骨骼内,连接基团在骨骼内逐渐被切除,因而释放出利福霉素并延长骨骼中利福霉素的存在时间。

[0466] F) 涂覆有磷酸化利福霉素的留置装置和产品

[0467] 本发明还涵盖涂覆有本发明化合物和药物组合物的留置装置。本文所用的术语“留置装置”是指手术植入物、矫形装置、假体装置和导管,即放入个体体内并在其位置上留置一段时间的装置。这类装置包括但不限于人工关节和植入物、心脏瓣膜、起搏器、血管移植、血管导管、脑脊液分流、导尿管、持续非住院腹膜透析(CAPD)导管。

[0468] 根据一个实施方案,将留置装置插入体内之前,将其浸泡在或喷涂浓度约 1mg/ml 至约 10mg/ml 本发明化合物和 / 或药物组合物。

[0469] 根据另一个实施方案,留置装置是由骨质样类型的材料(例如磷酸钙、Ca²⁺ 离子和羟基磷灰石(Yoshinari 等, Biomaterials(2001), 22(7):709-715))制成或者预先涂覆所述材料。这类材料能有利地改善本发明化合物和药物组合物与留置装置的结合,无论是在用本发明化合物或药物组合物涂覆装置期间和 / 或在局部或系统给予它们之后。也可用预先加载或含有本发明的骨结合靶向化合物的骨质材料来涂覆留置装置。对于上述实施方案,优选羟基磷灰石作为骨质材料。有关涂覆方法、羟基磷灰石涂层假体的用途和优势的综

述详见Dumbleton和Manly(The Journal of Bone & Joint Surgery(2004)86A :2526-40), 所述文献通过引用结合到本文中。

[0470] G) 制备方法

[0471] 采用本领域合适技术,使用易得原料,可以制备本发明的化合物及其盐、溶剂合物、晶型、活性代谢物和前体药物。制备本发明化合物的某些新的示例性方法可参见以下实施例部分。这类方法涵盖在本发明范围之内。

[0472] 实施例

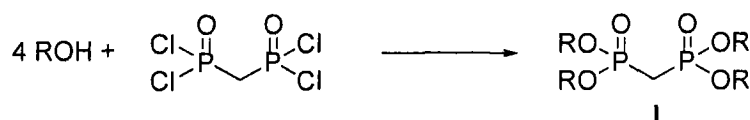
[0473] 本文所给出的实施例提供了本发明代表性化合物的示例性合成方法。也提供了本发明化合物的骨结合活性的示例性测定方法、提供了本发明化合物抗微生物的最小抑制浓度(MIC)的测定方法,并提供了测定体内活性和细胞毒性的方法。

[0474] 实施例1:磷酸化利福霉素的合成

[0475] A) 通用实验方法

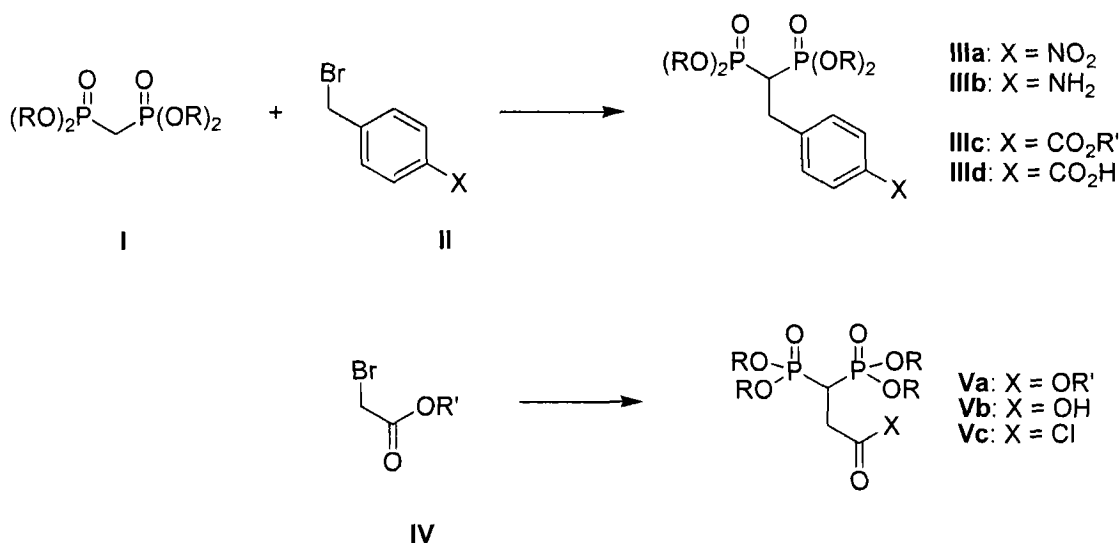
[0476] A1) 二磷酸酯结构单元的制备

[0477]



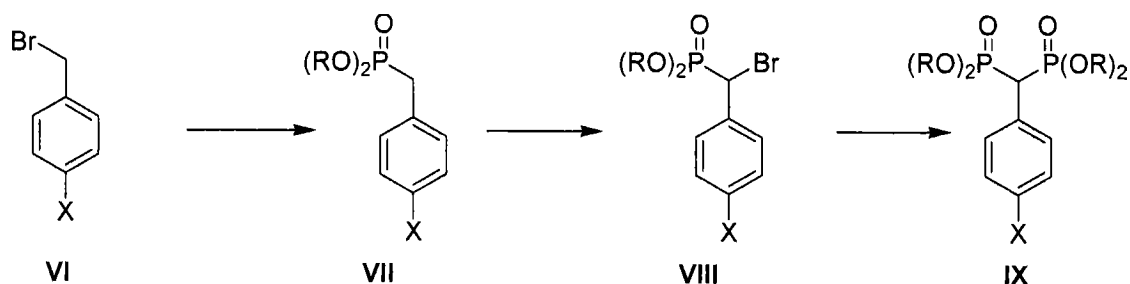
[0478] 按照 Synth. Commun. (2002), 32 ;211-218 中的所述方法,可自母体四氯化物和醇制备亚甲基二磷酸的四酯(I)。

[0479]



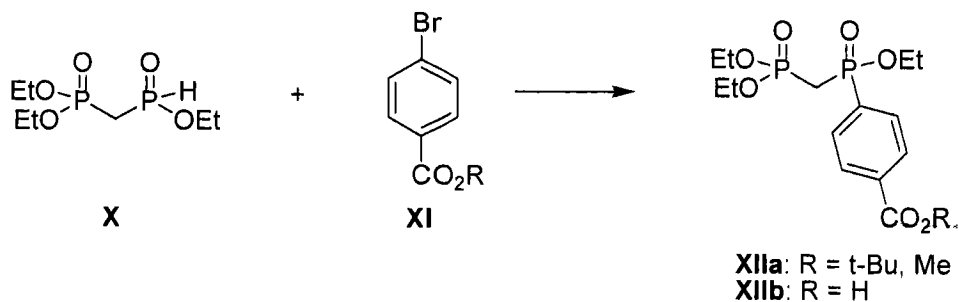
[0480] 按照 Bioorg. Med. Chem. (1999), 7 ;901-919 中所述的方案,用 4- 取代苄基溴 II 或溴乙酸酯 IV 使 I 的阴离子烷基化,得到通式 III 和 V 的苄基取代的二磷酸酯结构单元(building block)。在氢化条件下,用催化剂例如 PtO₂ 将硝基还原,使硝基化合物 IIIa 转化为苯胺 IIIb。通过酯裂解,IIIc 和 Va 等酯可以转化为相应的酸 IIId 或 Vb。例如, R' = t-Bu 的酯 IIIc 可用 TFA 处理,得到相应的酸 IIId。在类似条件下, X = Ot-Bu 的酯 Va 可转化为酸 Vb。

[0481]



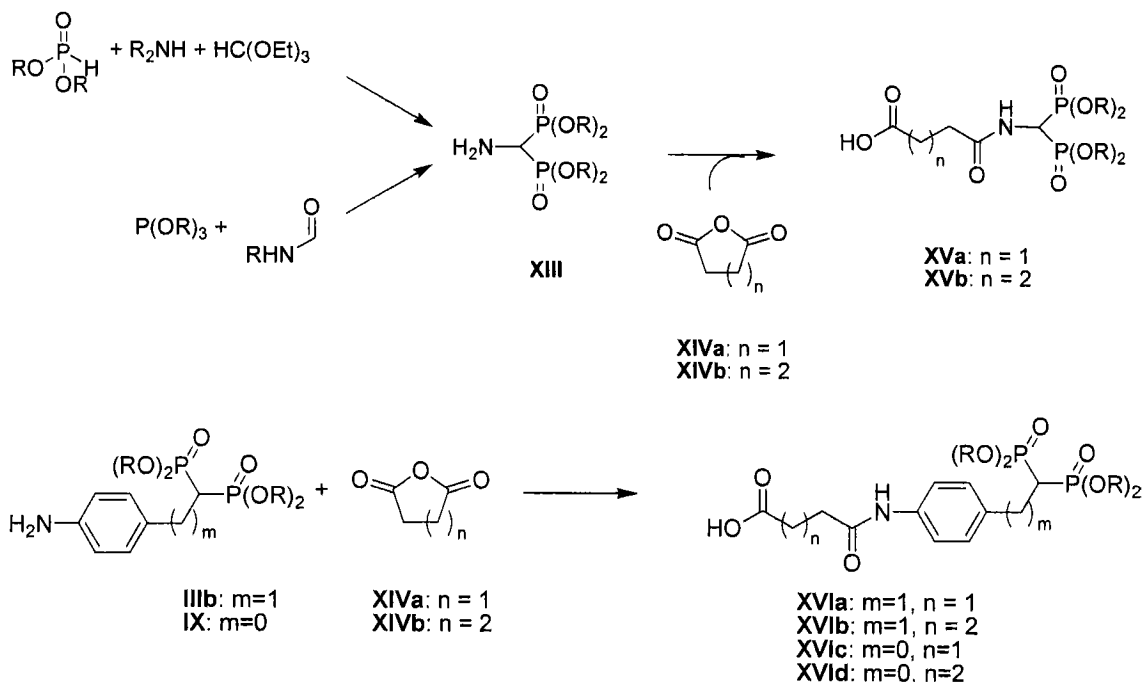
[0482] 在由苄基卤化反应间隔开的两步 Arbuzov 反应过程中,可自母体苄基卤 VI 得到通式 IX 的芳基取代的亚甲基二膦酸酯。

[0483]



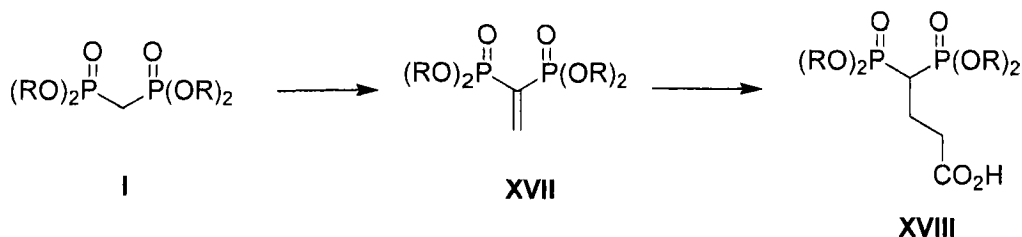
[0484] 采用 Synth. Comm. (2002), 32 ;2951-2957 和专利 US 5, 952, 478 (1999) 中所述的方法,可制备 (乙氧基次膦酰基) 甲基膦酸二乙酯 X。可将其与 4-取代溴苯 (XI) 偶合,再使酯中间体 XIIa 发生裂解,得到酸 XIIb。

[0485]



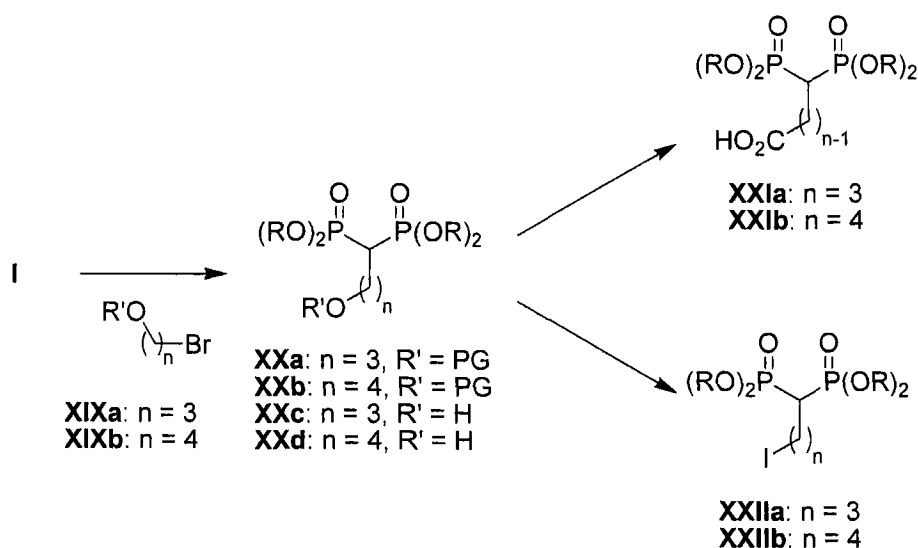
[0486] 按照 Synth. Commun. (1996), 26 ;2037-2043 中所述的方案,自二苄胺或二烯丙基胺、亚磷酸二烷基酯和原甲酸三乙酯,制备胺 XIII,或者按照 Phosphorus, Sulfur and Silicon (2003), 178, 38-46, 自亚磷酸三烷基酯和适当取代的甲酰胺 (例如烯丙基甲酰胺) 制备胺 XIII。用琥珀酸酐 XIVa 或戊二酸酐 XIVb 使 XIII 酰化,分别得到酸 XVa 和 XVb (J. Drug Targeting (1997), 5 ;129-138)。按照类似方式,用 XIV (a-b) 处理前述 IIIb 或 IX, 得到琥珀酰胺酸和戊酰胺酸 XVI (a-d)。

[0487]



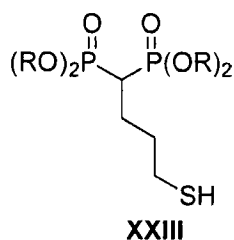
[0488] 按照 J. Org. Chem. (1986), 51 ;3488-3490 中所述的方案,可自 I 制备烯烃 XVII。按照 J. Org. Chem. (2001), 66 ;3704-3708 中所述的方案,将其转化为母体二膦酰基丁酸 XVIII。

[0489]



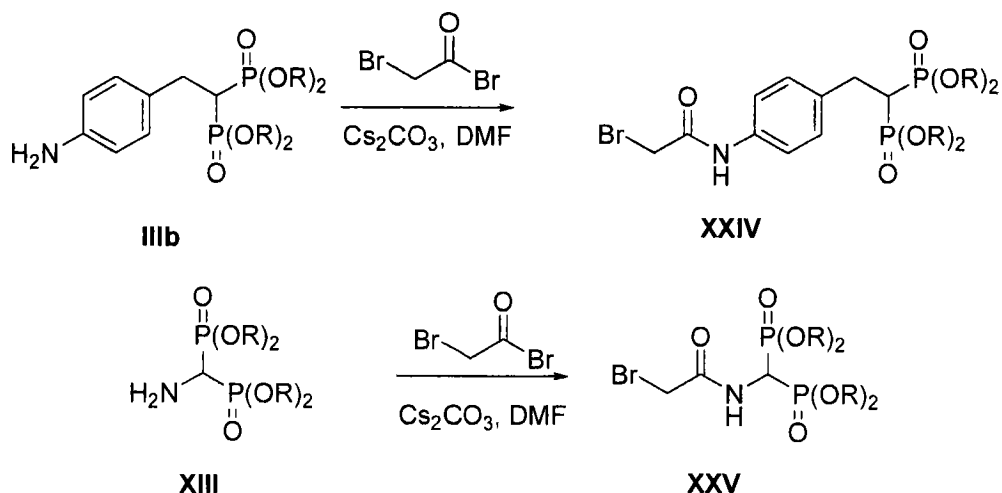
[0490] 正如 Phosphorus, Sulfur and Silicon, (1998), 132 ;219-229 所述,通过用不同链长 XIX(a-b) 的保护 ω -羟基溴使 I 的阴离子烷基化,制备通式结构 XX(c-d) 的醇和通式结构 XXII 的碘化物。脱保护后,通过用原位产生的三苯基膦:碘络合物处理,可使醇转化为相应的碘化物。通过常规氧化方法(例如用重铬酸吡啶鎓处理),还可将这些醇 XX(c-d) 转化为通式结构 XX 的酸。

[0491]



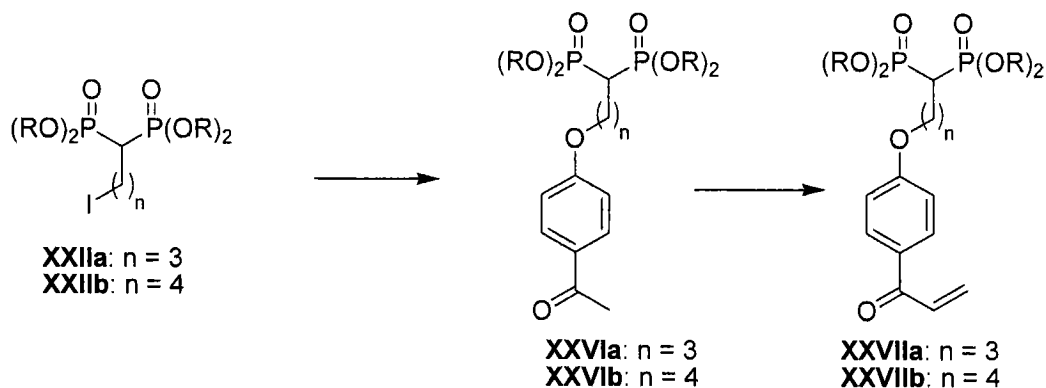
[0492] 按照 Bioorg. Med. Chem. (1999), 7 ;901-919 中所述的方案,用保护的 3-碘丙烷-1-硫醇使 I 的阴离子烷基化,可制备硫醇 XXIII。

[0493]



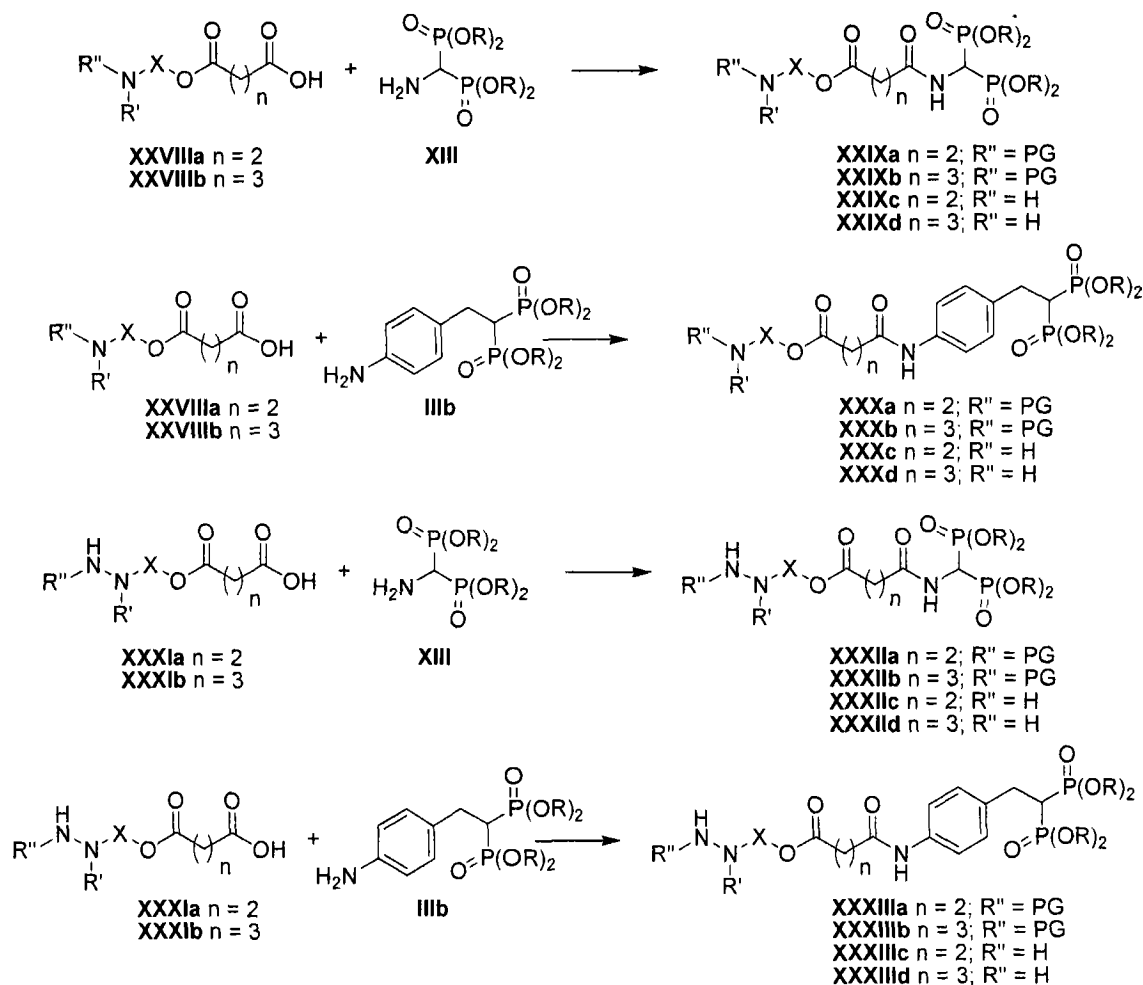
[0494] 按照 J. Drug Targeting (1995), 3, 273-282 中所述方法的改进方法, 可以自母体胺 **IIIb** 和 **XIII** 来制备溴乙酰胺 **XXIV** 和 **XXV**。

[0495]



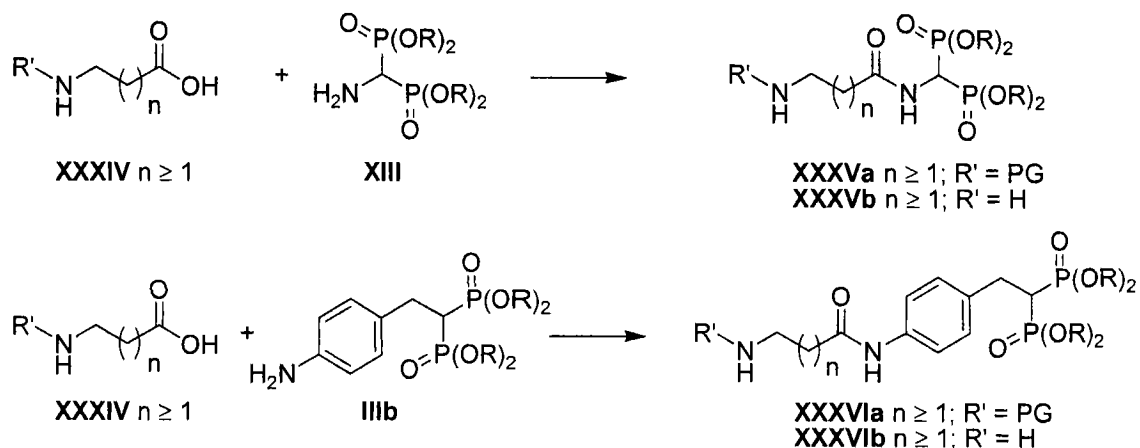
[0496] 按照 Org. Syn. (1983) ;60 ;88-91 中所述的亚甲基转移反应, 可通过用对羟基苯乙酮处理母体碘化物 **XXII** (a-b), 制备二磷酸化乙烯基芳基酮, 例如 **XXVII** (a-b)。

[0497]



[0498] 通过在叔胺和标准酰胺偶联剂 (DCC、EDCI、HBTU、HATU、PyBOP、BOP-Cl) 存在下,用 IIIb 或 XIII 与适当保护的胺 XXVIII(a-b) 和胍 XXXI(a-b),产生二磷酸化胺 XXIX(a-d) 和 XXX(a-d) 和胍 XXXII(a-d) 和 XXXIII(a-d)。在所有这些情况下,X 是间隔氧原子和氮原子的原子组合,而 R' 是可与 X 中的原子键合的另一原子组合。

[0499]



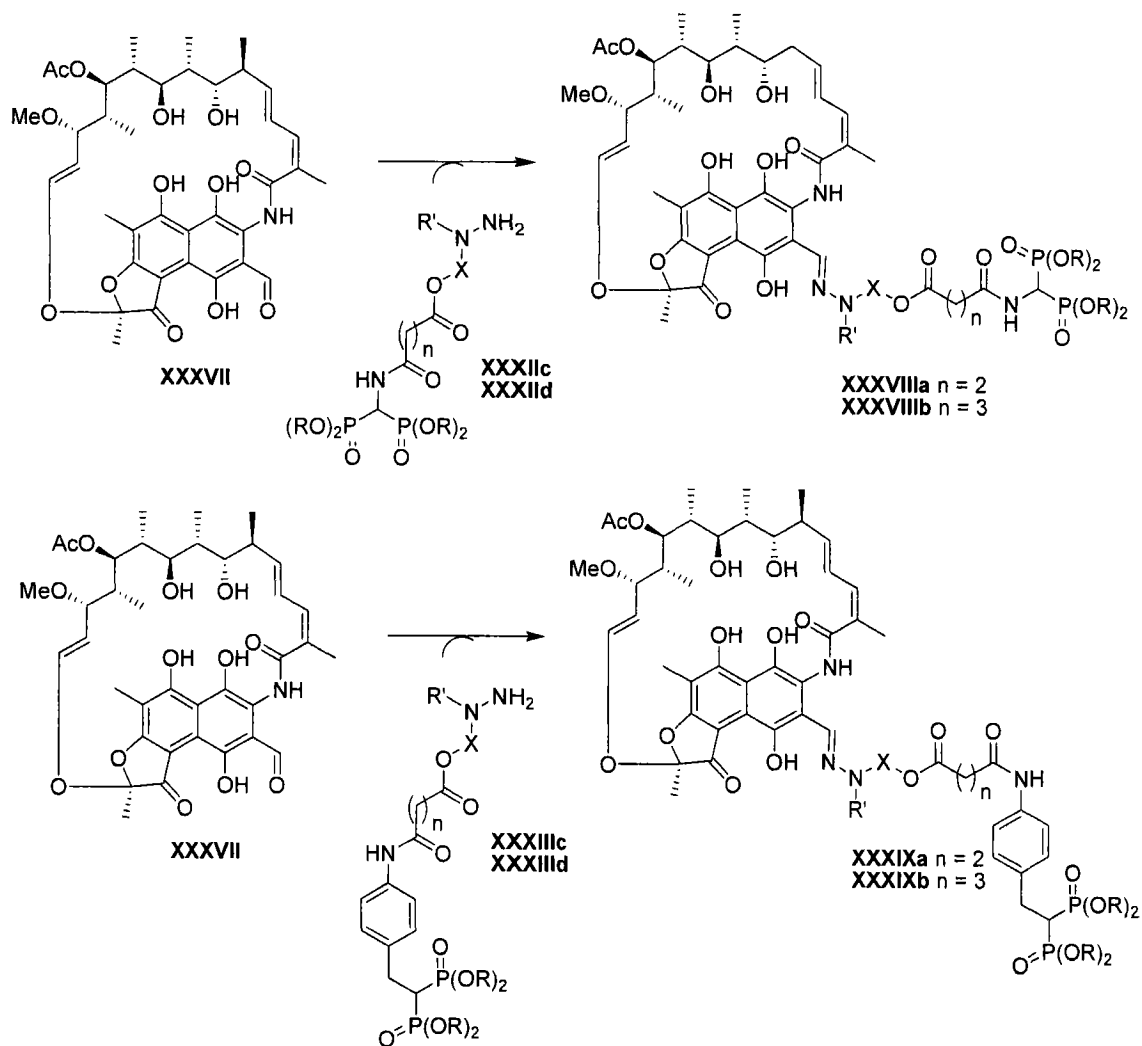
[0500] 在标准酰胺偶联条件 (叔胺和标准酰胺偶联剂例如 DCC、EDCI、HBTU、HATU、PyBOP、BOP-Cl) 下,分别用受保护的氨基酸 XXXIV 使胺 XIII 和 IIIb 酰化,可以容易地产生二磷酸化胺 XXXVa-b 和 XXXVIa-b。

[0501] 本部分所述的二磷酸酯结构单元呈其磷酸酯的形式,其中 R 为 Me、Et、i-Pr 或 Bn;

或者作为游离二磷酸。

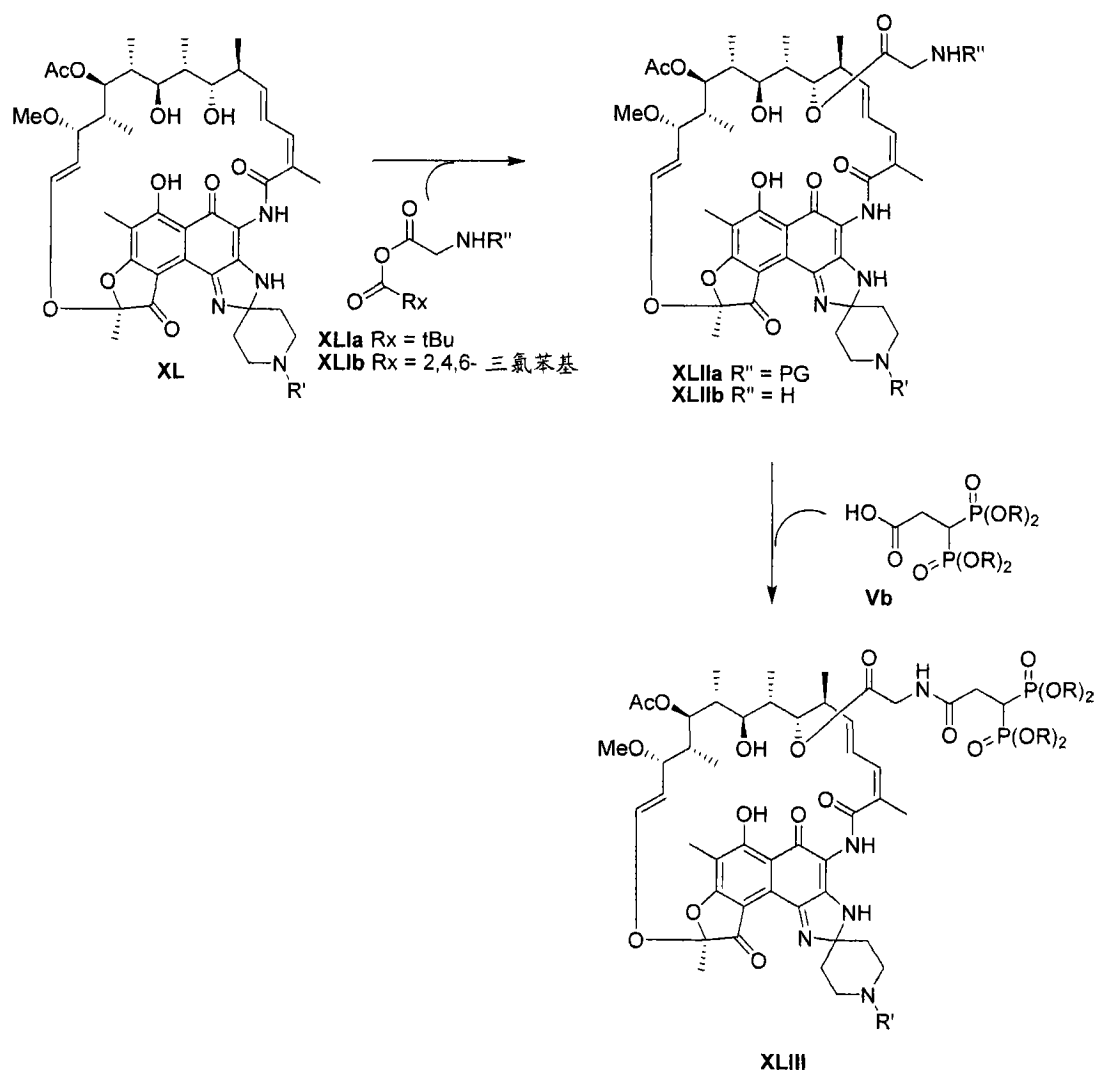
[0502] A2) 利福霉素-二磷酸酯缀合物 (Rifamycin-bisphosphonate conjugate) 的合成

[0503]



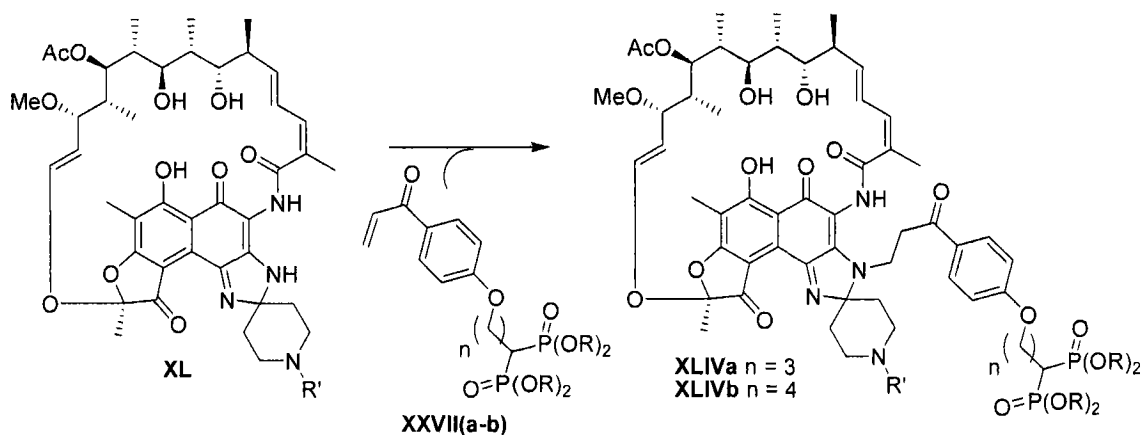
[0504] 按照 Farmaco, Ed. Sci. (1975), 30, 605-619 中所述的类似方式, 通过 3- 甲酰基利福霉素 S XXXVII 与肼 XXXII(c-d) 和 XXXIII(c-d) 的缩合, 制备二磷酸化前体药物 XXXVIII(a-b) 和 XXXIX(a-b)。

[0505]



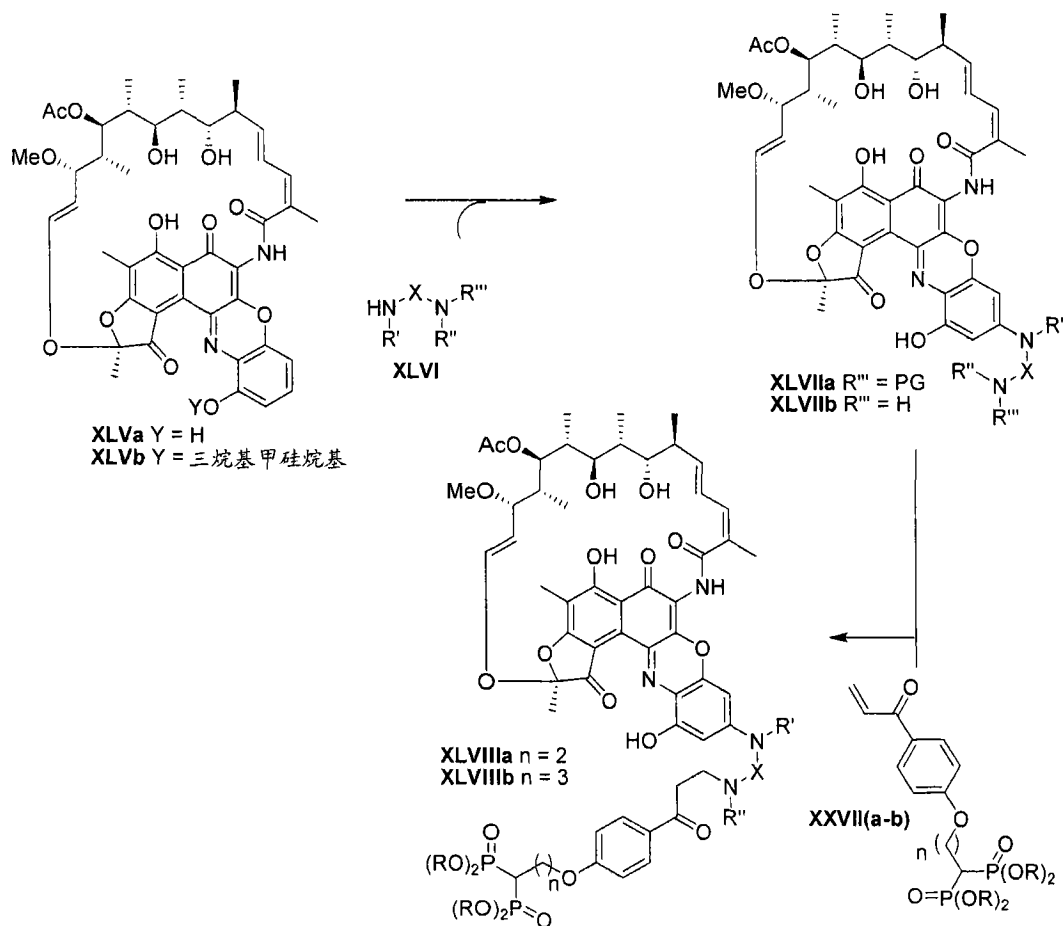
[0506] 按照 J. Mol. Struct. (2001), 563-564, 61-78 对于其它酸酐所述的类似方式, 使利福霉素衍生的化合物 XL 与由保护的甘氨酸制备而来的混合酸酐反应, 选择性地产生酯产物 XLIa。甘氨酸部分脱保护后, 游离氨基与酸 Vb 反应, 产生所需二磷酸化利福霉素衍生物 XLIII。

[0507]



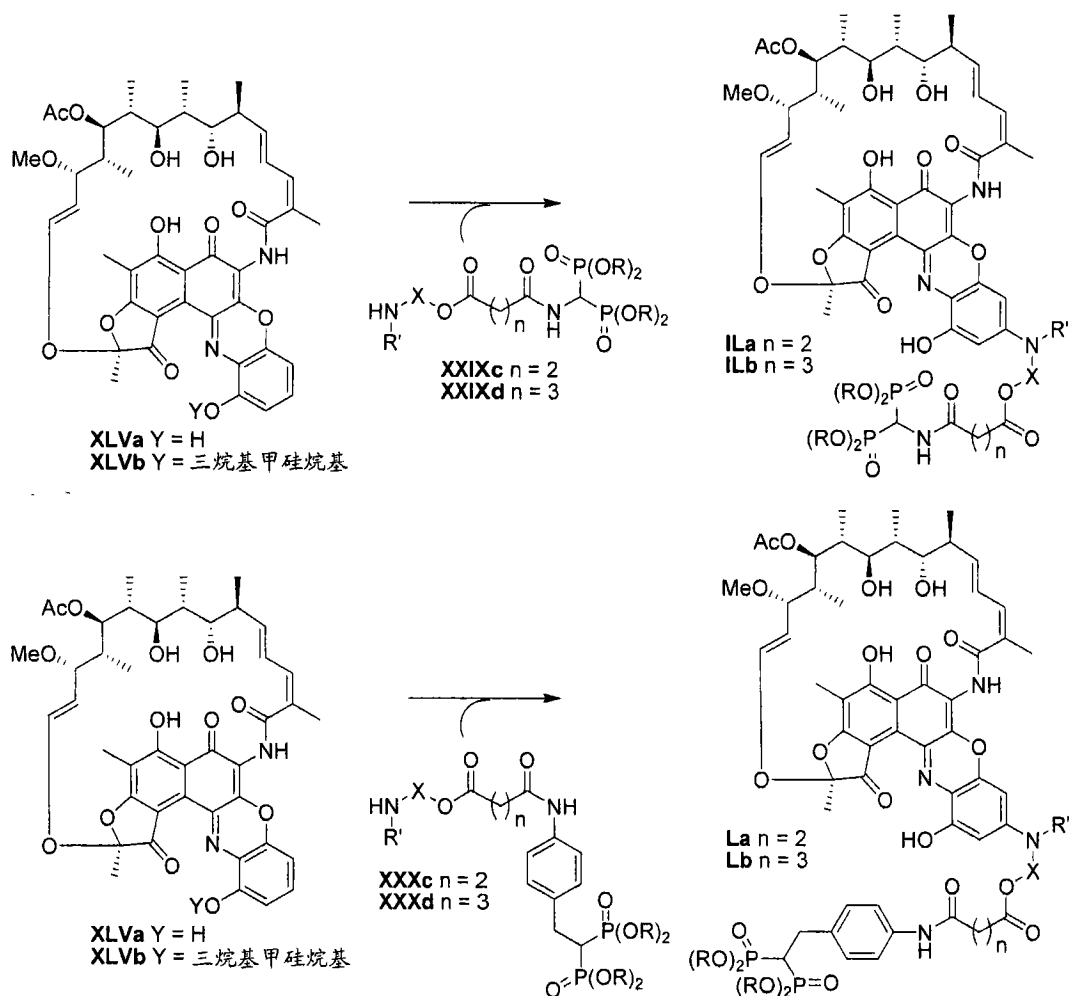
[0508] 按照 Ind. J. Pharm. Sci. (1999) ;61, 223-226 对于环丙沙星的非二磷酸化前体药物所述的类似方式, XL 与乙烯基酮 XXVII(a-b) 的加成反应得到二磷酸化利福霉素衍生的前体药物 XLIV(a-b)。

[0509]



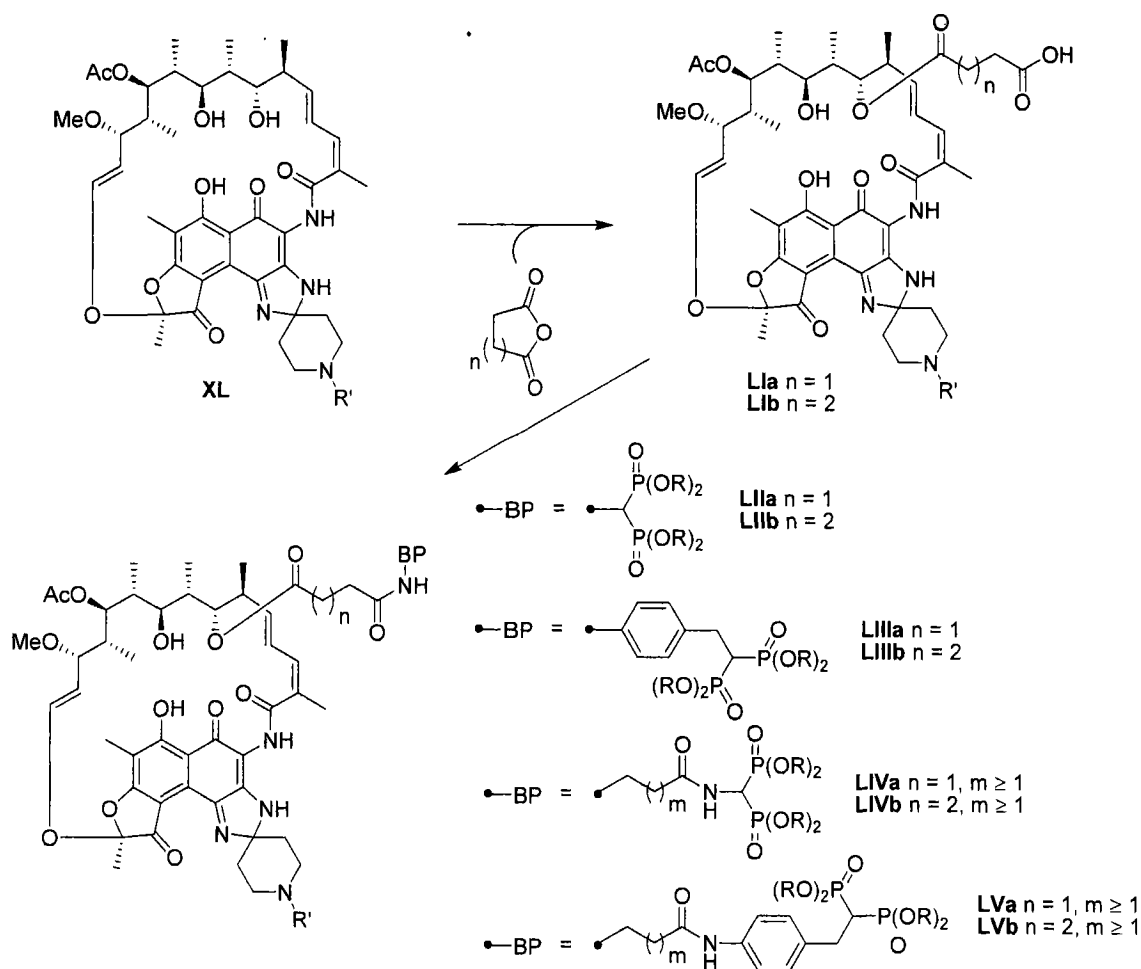
[0510] 同样, 按照 US 4,690,919、US 4,983,602 和 Chem. Pharm. Bull. (1993), 41: 148-155 所述, 在温和氧化剂例如二氧化锰存在下, 经苯并噁嗪并利福霉素 XLV(a-b) 与二胺 XLVI 缩合而得到的化合物 XLVIIb 可与乙烯基酮 XXVII(a-b) 反应, 得到二磷酸化前体药物 XLVIII(a-b)。

[0511]



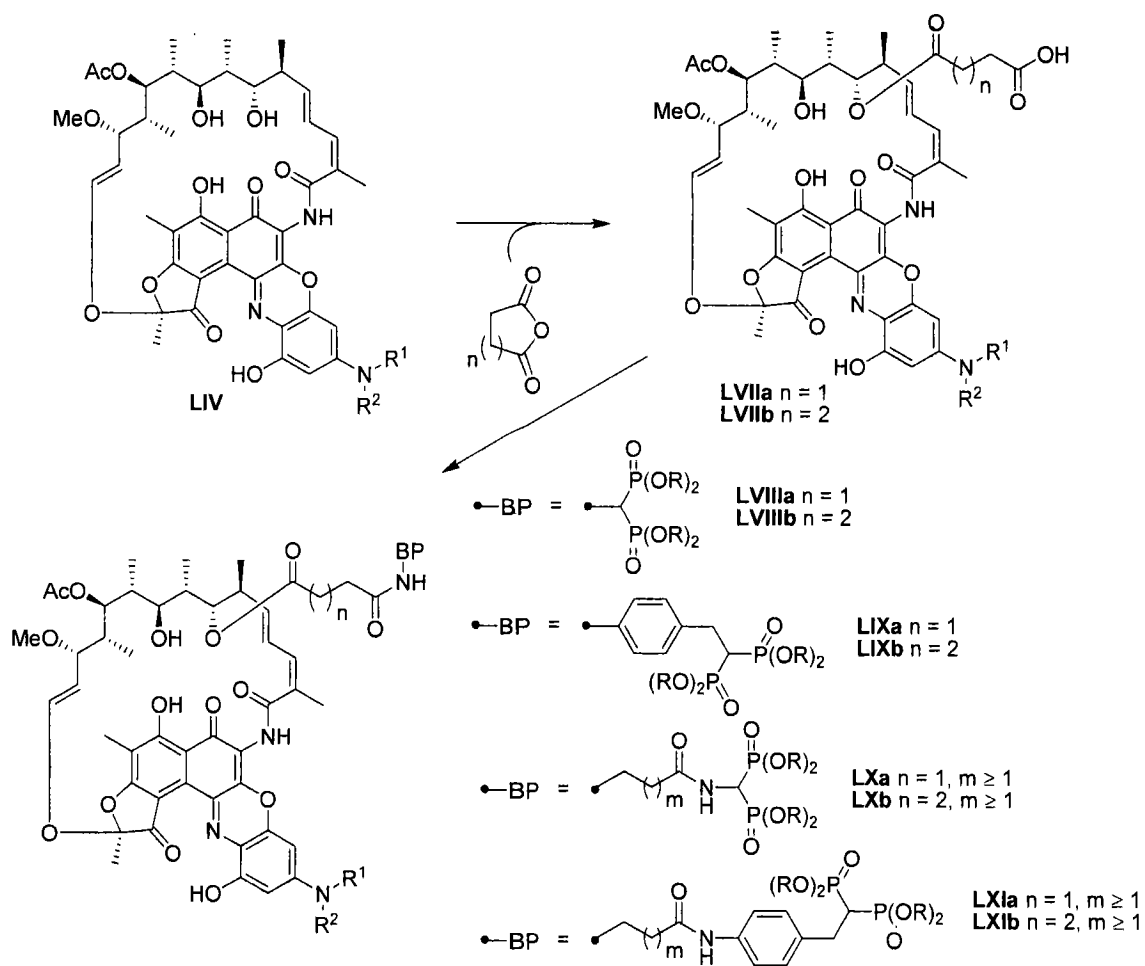
[0512] 按照 US 4,690,919、US 4,983,602 和 Chem. Pharm. Bull. (1993),41:148-155 所述,在温和氧化剂例如二氧化锰存在下,通过二磷酸化胺 XXIX(c-d) 和 XXX(c-d) 与苯并噁嗪并利福霉素衍生物 XLV(a-b) 缩合,制备二磷酸化苯并噁嗪并利福霉素衍生物 IL(a-b) 和 L(a-b)。

[0513]



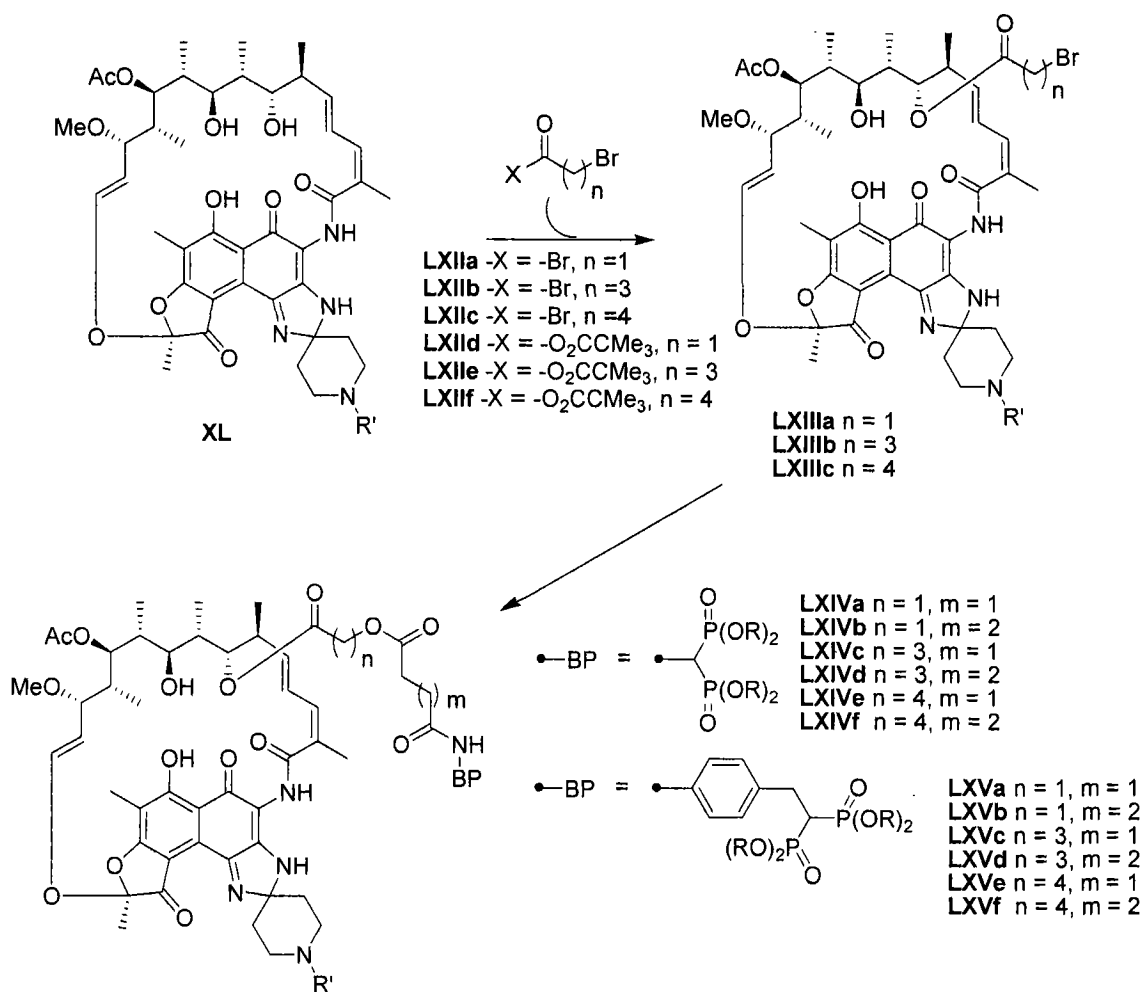
[0514] 利福霉素 XL 与琥珀酸酐和戊二酸酐缩合, 分别得到酸 LIa 和 LIb。在标准酰胺偶联条件 (叔胺和标准酰胺偶联剂例如 DCC、EDCI、HBTU、HATU、PyBOP、BOP-Cl) 下, 这些酸可以与胺 XIII 偶合而得到二磷酸酯前体药物 LII(a-b), 与胺 IIIb 偶合而得到二磷酸化前体药物 LIII(a-b), 与胺 XXXVb 偶合而得到二磷酸化前体药物 LIV(a-b), 与胺 XXXVIb 偶合而得到磷酸化前体药物 LV(a-b)。

[0515]



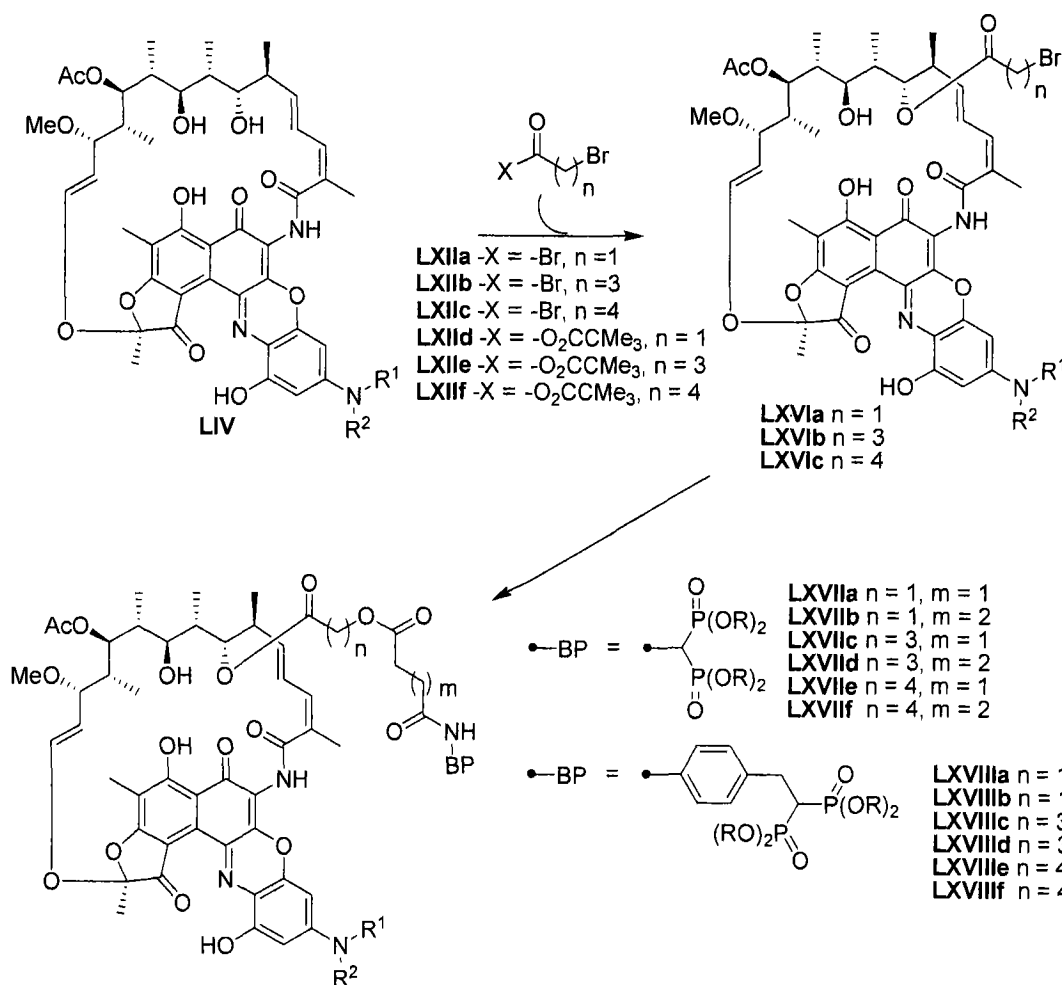
[0516] 同样, 苯并噁嗪并利福霉素 LIV 与琥珀酸酐和戊二酸酐缩合, 得到酸 LIIa 和 LIIb, 其可分别与胺 XIII、IIIb、XXXVb 和 XXXVIb 偶合, 得到二膦酸化前体药物 LVII(a-b)、LVIII(a-b)、LIX(a-b) 和 LX(a-b)。

[0517]



[0518] 在非亲核碱存在下,用溴代酰溴 (bromoacyl bromide) LXII(a-c) 或用混合酸酐 LXII(d-f) 处理利福霉素 XL,提供溴代酰酯 (bromoacyl ester) LXIII(a-c)。在碱存在下,它们可与琥珀酰胺酸 XVa 和 XVIa 和戊酰胺酸 XVb 和 XVIb 反应,得到二磷酸化前体药物 LXIV(a-f) 和 LXV(a-f)。

[0519]



[0520] 同样,在碱存在下,苯并噁嗪并利福霉素 LIV 可用 LXII (a-f) 处理,得到溴代酰酯 (bromoacyl ester) LXVI (a-c),其可与酸 XV (a-b) 和 XVI (a-b) 反应,得到二磷酸化前体药物 LXVII (a-f) 和 LXVIII (a-f)。

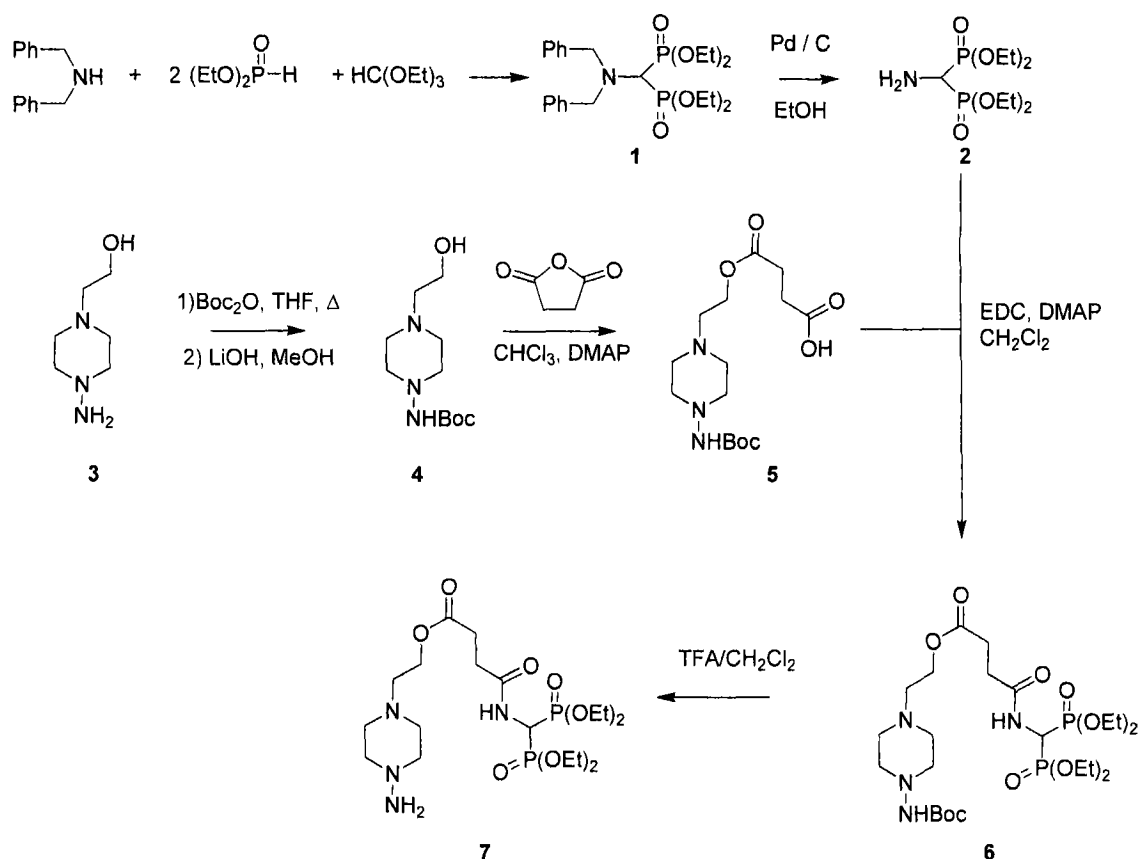
[0521] 本部分所述的二磷酸(包括酯和盐)结构单元呈其磷酸酯的形式,其中 R 为 Me、Et、i-Pr、烯丙基或 Bn;或者作为游离二磷酸和/或游离二磷酸盐。通过常规方法,二磷酸酯可转化成游离酸和酸式盐,所述方法例如在碱存在或不存在条件下,用三甲基甲硅烷基溴或三甲基甲硅烷基碘处理,当二磷酸酯为二磷酸苄酯时,通过钯催化剂处理而氢化,而当二磷酸酯为二磷酸烯丙酯时用亲核试剂。

[0522] 可用文献所述的常规方法添加和脱去所用的其它保护基,所述文献例如参见 "Protective Groups in Organic Synthesis", Greene, T.W. 和 Wuts, P.M.G., Wiley-Interscience, New York, 1999。

[0523] B) 详细实验方法

[0524] 流程 1. (4-(2-(1-氨基-哌嗪-4-基)乙氧基)-4-氧代-丁酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯 (7) 的合成

[0525]



[0526] N, N-二苄基-1-氨基亚甲基二膦酸四乙酯 (1): 按照 Synth. Comm. (1996), 26 : 2037-2043 的改进方案制备化合物 1。在装有蒸馏头的 100ml 圆底烧瓶中, 将原甲酸三乙酯 (8.89g, 60mmol)、亚磷酸二乙酯 (16.57g, 120mmol) 和二苄胺 (11.80g, 60mmol) 混合在一起。在 Ar 下将反应物加热至 180-195℃ 1 小时。当 EtOH 产生完成后, 将反应混合物冷却至室温, 用 CHCl_3 (300ml) 稀释, 用 NaOH 水溶液 (2M, $3 \times 60\text{ml}$) 和盐水 ($2 \times 75\text{ml}$) 洗涤, 再经 MgSO_4 干燥。蒸发后, 得到粗产物 25.2g (87%)。将 4.95g 部分粗制油状物用色谱法纯化 (乙酸乙酯: 己烷: 甲醇 14 : 4 : 1), 得到纯的产物 1 (2.36g, 41%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.32 (dt, $J = 2.0, 7.0, 12\text{H}$), 3.55 (t, $J = 25.0, 1\text{H}$), 3.95-4.25 (m, 12H), 7.20-7.45 (m, 10H)。

[0527] 1-氨基亚甲基二膦酸四乙酯 (2): 将化合物 1 (2.00g, 4.14mmol) 溶于 EtOH (40ml) 中。向该溶液中加入披钨碳 (10%, 1.5g) 和环己烯 (2.5ml, 24.7mmol)。反应混合物在氩气中回流 15 小时, 通过硅藻土过滤并蒸发, 得到 2 (1.50g, 119%, 为含有少量杂质的黄白色油状物), 其无需进一步纯化就可直接用于下一步骤。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.35 (t, $J = 7.0, 12\text{H}$), 3.58 (t, $J = 20.3, 1\text{H}$), 3.65-3.90 (br s, 2H), 4.20-4.28 (m, 8H)。

[0528] 1-(叔丁氧羰基氨基)-4-(2-羟乙基)哌嗪 (4): 将 1-氨基-4-(2-羟乙基)-哌嗪 3 (1.18g, 8.1mmol) 和 Boc 酸酐 (4.4g, 20.3mmol) 加入到 100ml THF 中, 在 60℃ 加热 1.5 小时。真空蒸发溶剂, 将残余物溶于 MeOH (50ml) 中, 加入 LiOH (970mg, 40.4mmol) 水溶液 (50ml)。所得溶液在室温下搅拌 16 小时。混合物再用水 (50ml) 稀释, 用 CH_2Cl_2 ($3 \times 75\text{ml}$) 萃取, 用盐水 (75ml) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥并浓缩, 得到无色胶状物。粗制残余物在 Et_2O 中研磨, 冷却至 0℃ 并过滤, 得到固体 (1.21g, 61%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.45 (s, 9H), 2.55 (表观 t, $J = 5.4\text{Hz}, 2\text{H}$), 2.64 (m, 4H), 2.83 (m, 4H), 3.60 (表观 t, $J = 5.4\text{Hz},$

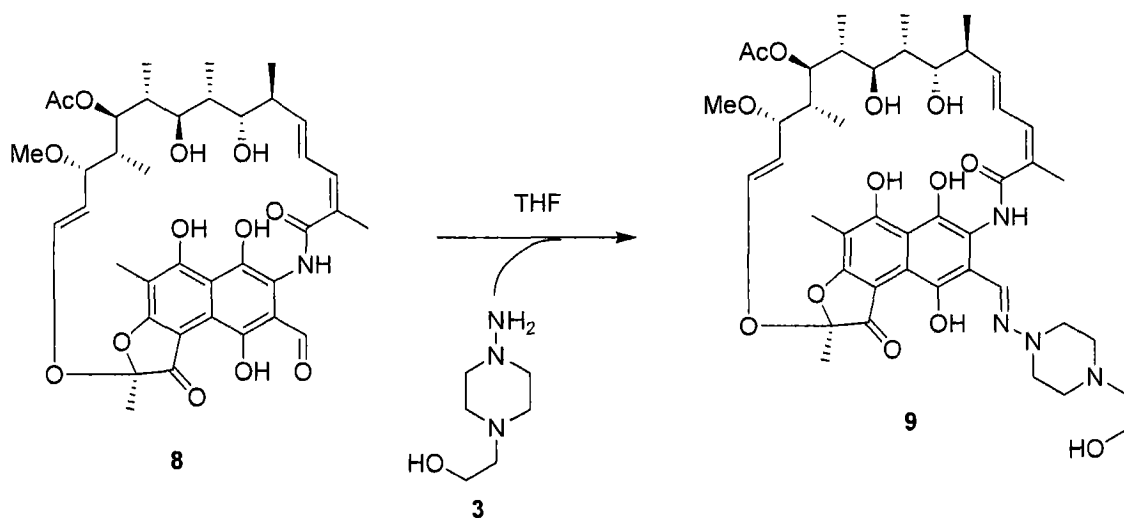
2H) 5.40 (br s, 1H)。

[0529] 1-(叔丁氧羰基氨基)-4-(2-(4-羟基-4-氧代-丁酰氧基)乙基)哌嗪(5): 将化合物4(250mg, 1.0mmol)、琥珀酸酐(105mg, 1.05mmol)和4-DMAP(催化量)溶于 CHCl_3 (600 μl)中, 搅拌12小时。溶液经真空浓缩, 无需进一步纯化就可使用。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 1.43(s, 9H), 2.60(s, 4H), 2.76(m, 6H), 2.86(m, 4H), 4.23(t, $J = 5.5\text{Hz}$, 2H), 5.71(br s, 1H), 10.82(br s, 1H)。

[0530] (4-(2-(1-(叔丁氧羰基氨基)-哌嗪-4-基)乙氧基)-4-氧代-丁酰基-氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯(6): 向化合物2(303mg, 1.0mmol)和5(345mg, 1.0mmol)的 CH_2Cl_2 (10ml)溶液中加入EDC(230mg, 1.2 mmol)和4-DMAP(催化量)。在Ar下将所得溶液在室温下搅拌4小时。反应混合物在 CH_2Cl_2 中稀释, 用水、盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥。蒸发后, 残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化(4% $\rightarrow$ 10% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 梯度), 得到无色胶状物(410mg, 65%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 1.33(t, $J = 7.1\text{Hz}$, 12H), 1.45(s, 9H), 2.56-2.69(m, 10H), 2.81(br s, 4H), 4.12-4.26(m, 10H), 5.00(dt, $J = 10.1, 21.7\text{Hz}$, 1H), 5.51(br s, 1H), 6.50(br d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H)。

[0531] (4-(2-(1-氨基-哌嗪-4-基)乙氧基)-4-氧代-丁酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯(7): 将化合物6(490mg, 0.78mmol)溶于10% TFA/ CH_2Cl_2 (8ml)溶液中。溶液在室温下搅拌直到原料全部用完(TLC监测)。真空蒸发挥发物, 残余物无需纯化就可用于下一步骤。

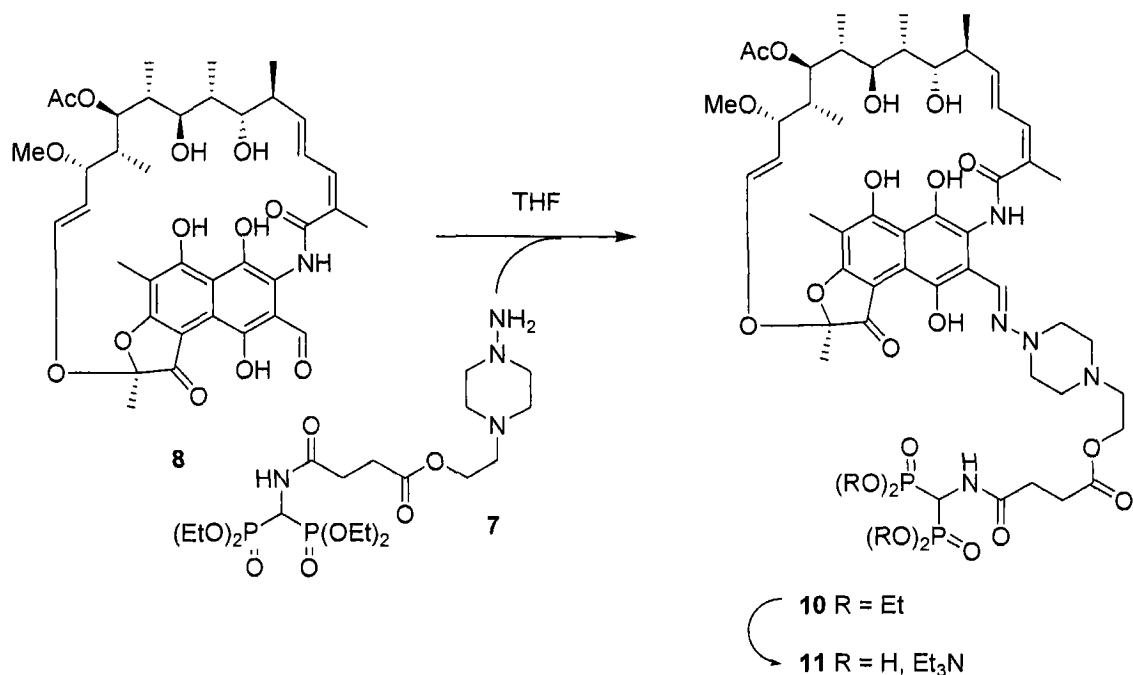
[0532] 流程2.3-(((4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基)亚氨基)甲基)利福霉素(9)的合成
[0533]



[0534] 3-(((4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基)亚氨基)甲基)利福霉素(9): 将3-甲酰基利福霉素S(8,724mg, 1mmol)悬浮于3ml THF中。一次性加入固体1-氨基-4-(2-羟乙基)-哌嗪(3, 145mg, 1mmol)。混合物在室温下搅拌15分钟。然后在50ml CH_2Cl_2 以及10ml饱和盐水与2g抗坏血酸钠的30ml水溶液的混合物之间分配。收集有机层, 水层再用50ml CH_2Cl_2 萃取一次。合并的有机层经 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩, 得到9(830mg, 0.97mmol, 97%, 黑色固体)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ -0.32(d, $J = 6.9, 3\text{H}$), 0.58(d, $J = 6.9, 3\text{H}$), 0.86(d, $J = 7.0, 3\text{H}$), 1.00(d, $J = 7.0, 3\text{H}$), 1.34(m, 1H), 1.52(m, 1H), 1.69(m, 1H), 1.80(s, 3H), 2.05(s, 3H), 2.08(s, 3H), 2.22(s, 3H), 2.38(m, 1H), 2.91(br t, $J = 4.6, 2\text{H}$), 3.04(重叠

[0535] 流程 3.3-(((4-(2-(3-((二膦酰基甲基)氨基甲酰基)丙酰氧基)乙基)-1-哌嗪基)亚氨基)甲基)利福霉素(11)的合成

[0536]

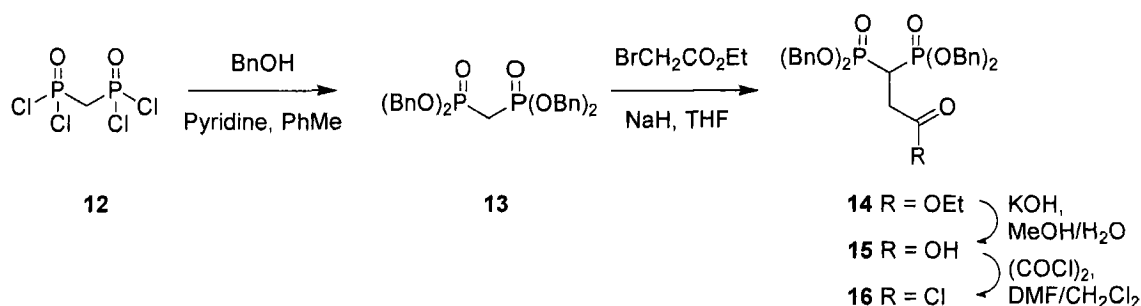


[0538] 3-(((4-(2-(3-((二磷酰基甲基)氨基甲酰基)丙酰氧基)乙基)-1-哌嗪基)亚氨基)甲基)利福霉素(11):在氩气中,在-78℃,向10(1.18g,0.96mmol)和2,6-二甲基吡啶(5.6ml,48mmol)的CH₂Cl₂(30ml.)溶液中滴加TMSBr(3.17ml,24mmol)。除去冷浴,混合物在室温下搅拌24小时。真空除去溶剂至干。残余物溶于50mmol NH₄OAc/AcOH水溶液(调节至pH 5.1),在室温下搅拌过夜。再将溶液冻干。粗制残余物通过反相快速色谱法纯化

(pH 5.1, 线性梯度 10% → 40% 乙腈的 50mmolNH₄OAc/AcOH 水溶液), 得到 11 (680mg, 54%, 橘黄色固体)。¹HNMR(400MHz, DMSO) δ -0.26(d, J = 6.6Hz, 3H), 0.43(d, J = 6.5Hz, 3H), 0.82(d, J = 7.6Hz, 3H), 0.85(d, J = 6.7Hz, 3H), 1.04(m, 1H), 1.30(m, 1H), 1.54(m, 1H), 1.60(s, 3H), 1.87(s, 3H), 1.89(s, 3H), 1.96(s, 3H), 2.13(m, 1H), 2.44(br s, 4H), 2.48(m, 10H), 2.52-2.64(m, 6H), 2.81(br d, J = 9.6Hz, 1H), 2.87(s, 3H), 3.20(br d, J = 8.2Hz, 1H), 3.70(br d, J = 8.3Hz, 1H), 4.10(m, 2H), 4.18(dt, J = 9.8, 19.1Hz, 1H), 4.90(dd, J = 8.3, 12.7Hz, 1H), 5.05(d, J = 10.7, 1H), 5.83(dd, J = 6.5, 15.8Hz, 1H), 6.20(m, 1H), 6.94(dd, J = 11.2, 15.6Hz, 1H), 7.46(m, 1H), 7.95(s, 1H), 9.11(s, 1H), 12.44(s, 1H)。

[0539] 流程 4. 1-氯-1-氧代-亚丙基-3,3-二磷酸四苄酯 (16) 的合成

[0540]



[0541] 按照 J. Org. Chem. (2001), 66 ;3704-3708 所述完成该反应过程。

[0542] 亚甲基二磷酸四苄酯 (13): 在 0℃, 在 80 分钟内通过注射器泵, 将无水苯甲醇 (8.66ml, 83.0mmol) 和无水吡啶 (6.15ml, 76.1mmol) 混合物加入到剧烈搅拌的亚甲基双(磷酸二氯) (5.00g, 20.0mmol) 的无水甲苯 (10ml) 悬浮液中。加液完成后, 让反应物升至室温, 再搅拌 3 小时。过滤除去固体, 用甲苯 (2×20ml) 洗涤 2 次。滤液用 2M NaOH (2×15ml) 和水 (15ml) 洗涤, 经 MgSO₄ 干燥并真空浓缩。蒸馏除去苯甲醇杂质, 得到 13 (8.1g, 75%, 无色油状物)。光谱数据参见上述文献。

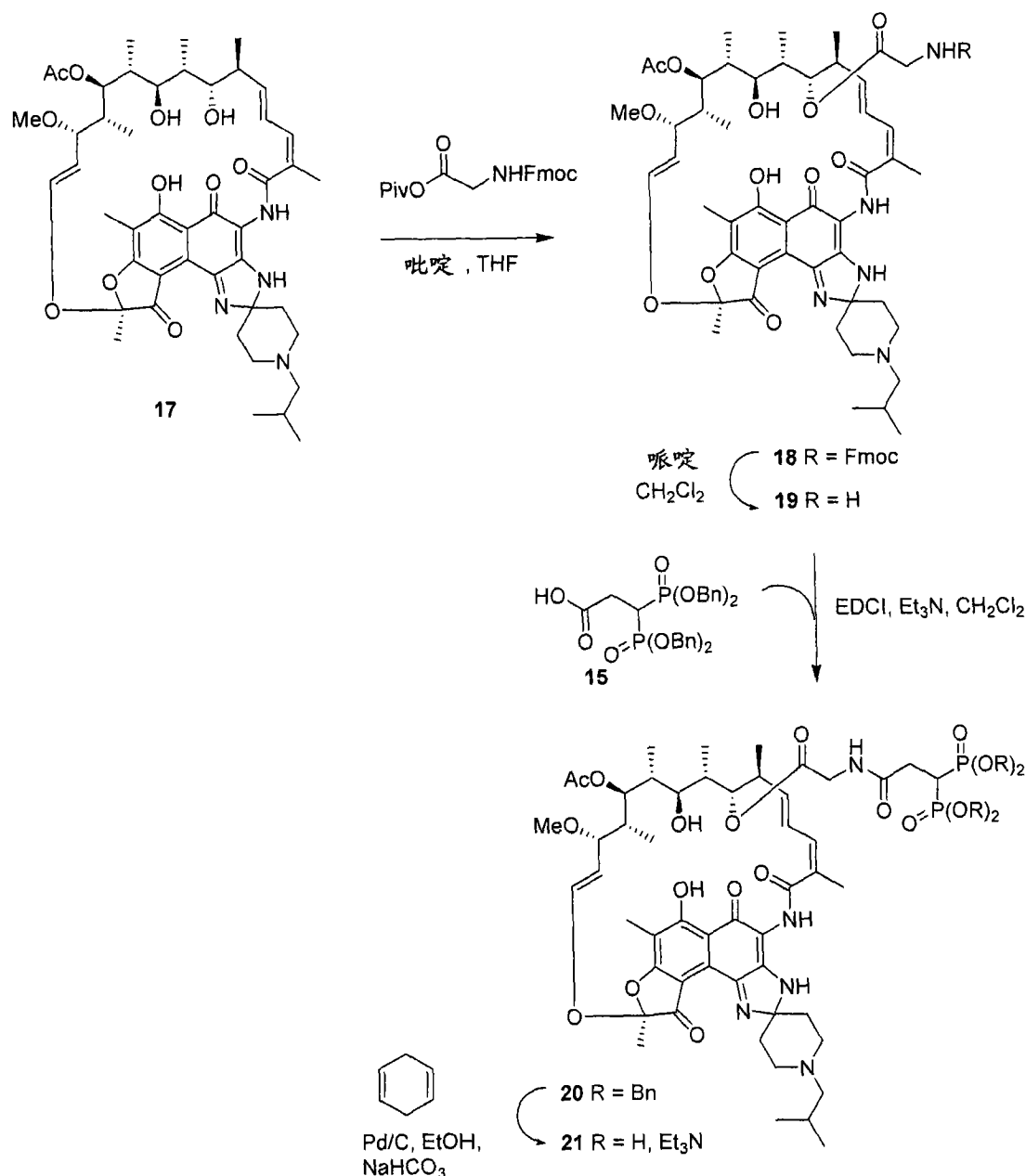
[0543] 1-乙氧基-1-氧代-亚丙基-3,3-二磷酸四苄酯 (14): 在 0℃, 在 5 分钟内, 将 13 (1.00g, 1.87mmol) 的 THF (10ml) 溶液加入到 NaH (0.047g, 1.96mmol) 的 THF (20ml) 悬浮液中。让溶液升至室温, 再搅拌 30 分钟。然后加入 220 μl 溴乙酸乙酯 (1.98mmol)。搅拌过夜后, 将混合物倒入 NH₄Cl 饱和溶液中, 用二氯甲烷萃取。合并的有机萃取液经 MgSO₄ 干燥并真空浓缩。残余物经过 SiO₂ 色谱纯化 (70% EtOAc/己烷), 得到 14 (0.7g, 60%, 无色油状物)。光谱数据参见上述文献。

[0544] 1-羧基亚乙基-2,2-二磷酸四苄酯 (15): 在 0℃, 将 14 (1.27g, 2.04mmol) 的甲醇 (6ml) 溶液加入到 KOH (0.127g, 2.26mmol) 的水 (6ml) 和甲醇 (6ml) 溶液中。让反应物在 1 小时内升至室温并在此温度下搅拌过夜。真空除去甲醇, 残余液用乙醚 (20ml) 洗涤。水层用 HCl 水溶液酸化至 pH 2, 再用 CH₂Cl₂ (3×20ml) 和 EtOAc (1×20ml) 萃取。合并的有机萃取液经 MgSO₄ 干燥并真空浓缩, 得到 15 (0.95g, 78%, 无色油状物)。光谱数据参见上述文献。

[0545] 1-氯-1-氧代-亚丙基-3,3-二磷酸四苄酯 (16): 向 15 (68mg, 1.14×10⁻⁴mol) 的 3ml 无水 CH₂Cl₂ 溶液中加入 22 μl (2.6×10⁻⁴mol) 草酰氯, 再加 1 滴 DMF。混合物在室温下搅拌 10 分钟, 再经真空浓缩, 得到粗产物 16, 无需纯化就可使用。

[0546] 流程 5. 利福布汀-二磷酸酯缀合物 21 的合成

[0547]



[0548] 21-O-(N-((9H- 芴 -9- 基) 甲氧基羰基)-甘氨酸基)-1', 4- 二脱氢-1- 脱氧-1, 4- 二氢-5'- (2- 甲基丙基)-1- 氧代利福霉素 XIV(18) :将新戊酰氯 ($145\ \mu\text{L}$, 1.18mmol) 滴加到 N-Fmoc- 甘氨酸 (351mg , 1.18mmol) 和吡啶 ($95\ \mu\text{L}$, 1.18mmol) 的 THF (3mL) 溶液中, 所得溶液搅拌 1 小时, 然后加入到利福布汀 (100mg , 0.118mmol) 和吡啶 ($38\ \mu\text{L}$, 0.47mmol) 的 THF (2mL) 搅拌溶液中。所得产物在 Ar 下搅拌 3 天, 再用 Et_2O (10mL) 和 H_2O (10mL) 稀释。分离后, 水层用 Et_2O ($2 \times 10\text{mL}$) 萃取 2 次。合并的有机层用 NaCl 饱和溶液 (10mL) 洗涤, 经 MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗产物通过反相色谱法纯化 (用含水缓冲液 ($\text{Et}_3\text{N}/\text{CO}_2$, $\text{pH} = 7$)/ CH_3CN ($10\% \rightarrow 100\%$ 线性梯度) 洗脱), 得到 18 (114mg , 0.102mmol , 86% , 深紫色固体)。 ^1H NMR (400MHz , CDCl_3) δ 8.34 (br s, 1H), 7.94 (br s, 1H), 7.79–7.71 (m, 4H), 7.42 (t, $J = 3.0\text{Hz}$, 2H), 7.34 (t, $J = 3.0\text{Hz}$, 2H), 6.43 (dd, $J = 16\text{Hz}$, 1H), 6.14 (d, $J = 11\text{Hz}$, 1H), 6.08 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 1H), 5.95–5.91 (m, 2H), 5.19 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 1H), 5.05 (dd, $J = 9.3$, 1.2Hz , 1H), 4.97 (d, $J = 10.6\text{Hz}$, 2H), 4.51–2.19 (m, 3H), 3.83 (d, $J = 4.6\text{Hz}$, 2H), 3.55 (s,

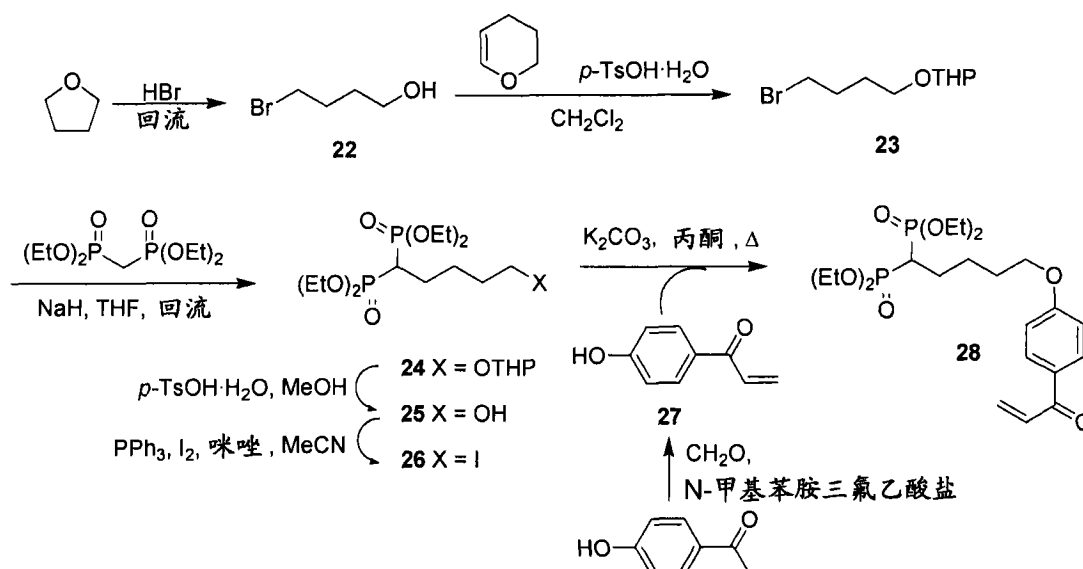
1H), 3.14 (br d, $J = 1.2\text{Hz}$, 1H), 3.10 (s, 3H), 3.08–2.84 (m, 4H), 2.73–2.52 (m, 4H), 2.30 (d, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.31 (m, 1H), 2.05 (s, 6H), 2.02 (m, 2H), 1.86–1.79 (m, 4H), 1.80 (s, 3H), 1.27 (m, 3H), 1.08 (d, $J = 6.9\text{Hz}$, 3H), 0.95 (d, $J = 6.6\text{Hz}$, 9H), 0.53 (d, $J = 6.9\text{Hz}$, 3H), -0.75 (d, $J = 7.0\text{Hz}$, 3H)。

[0549] 21-O-甘氨酸-1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(19): 将哌啶 (100 μL , 1.02mmol) 加入到 N-Fmoc-利福布汀衍生物 18 (114mg, 0.102mmol) 的 CH_2Cl_2 (5ml) 搅拌溶液中。在室温下搅拌 24 小时后, 真空浓缩混合物。粗产物通过反相色谱法纯化 (用含水缓冲液 ($\text{Et}_3\text{N}/\text{CO}_2$, $\text{pH} = 7$)/ CH_3CN (10% $\rightarrow$ 100% 线性梯度) 洗脱), 得到 19 (77mg, 0.085mmol, 84%, 深紫色固体)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.32 (br s, 1H), 7.94 (s, 1H), 6.41 (t, $J = 11.1\text{Hz}$, 1H), 6.12–6.05 (m, 2H), 5.90 (dd, $J = 15.8, 7.4\text{Hz}$, 1H), 5.12 (d, $J = 10.3\text{Hz}$, 1H), 5.04 (dd, $J = 15.8, 1.5\text{Hz}$, 1H), 3.59 (br s, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.20 (d, $J = 9.5\text{Hz}$, 2H), 3.05 (s, 3H), 3.04–2.91 (m, 3H), 2.86 (dd, $J = 10.1, 3.0\text{Hz}$, 1H), 2.72–2.63 (m, 2H), 2.58–2.47 (m, 2H), 2.31 (d, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.19–2.09 (m, 2H), 2.06–1.97 (m, 8H), 1.93–1.84 (m, 2H), 1.84–1.78 (m, 2H), 1.77 (s, 3H), 1.24 (m, 1H), 1.28 (d, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H), 0.92 (m, 9H), 0.97 (d, $J = 6.9\text{Hz}$, 3H), 0.40 (d, $J = 7.1\text{Hz}$, 3H)。

[0550] 21-O-(N-(3,3-双(二苄基膦酰基)丙酰基)-甘氨酸基)-1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(20): 向胺 19 (77mg, 0.085mmol) 和酸 15 (51mg, 0.085mmol) 的 CH_2Cl_2 (2ml) 搅拌溶液中加入 Et_3N (24 μL , 0.170mmol) 和 EDCI (18mg, 0.094mmol)。在室温下搅拌 24 小时后, 真空浓缩混合物。粗产物通过反相色谱法纯化 (用含水缓冲液 ($\text{Et}_3\text{N}/\text{CO}_2$, $\text{pH} = 7$)/ CH_3CN (10% $\rightarrow$ 100% 线性梯度) 洗脱), 得到 20 (96mg, 0.065mmol, 76%, 深紫色固体)。

[0551] 21-O-(N-(3,3-二膦酰基丙酰基)-甘氨酸基)-1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(21): 将二膦酸四苄酯 20 (96mg, 0.065mmol) 和 NaHCO_3 (22mg, 0.26mmol) 的 EtOH (5ml) 搅拌溶液用 Ar 脱气 10 分钟。向该混合物中加入环己二烯 (303 μL , 3.24mmol) 和 10% Pd/C (70mg, 0.065mmol)。所得产物在 Ar 下搅拌 6 小时, 然后通过硅藻土垫过滤 (EtOH)。真空除去溶剂后, 粗产物通过反相色谱法纯化 (用含水缓冲液 ($\text{Et}_3\text{N}/\text{CO}_2$, $\text{pH} = 7$)/ CH_3CN (10% $\rightarrow$ 50% 线性梯度) 洗脱), 得到 21 (34mg, 0.065mmol, 48%, 浅紫色固体)。LC/MS 纯度: 99.2% (254nm)、94.9% (220nm)、99.4% (320nm)。MS (MH^+) 1117.9。

[0552] 流程 6.1-(4-(5,5-双(二乙基膦酰基)戊氧基)苯基)丙-2-烯-1-酮的合成
[0553]



[0554] 4-溴-1-丁醇 (22): 向 67.5ml (832.2mmol) 回流的四氢呋喃中, 滴加 31ml (274mmol) 48% 氢溴酸, 让黄色溶液再回流 2 小时。冷却至室温后, 将反应物小心地用饱和碳酸氢钠水溶液中和。所得混合物用乙醚萃取 (3 次), 经无水硫酸钠干燥。除去溶剂, 得到产物 19 (10.7g, 26%, 黄色油状物)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.69-1.76 (m, 2H), 2.01-1.94 (m, 2H), 3.46 (t, J = 6.6Hz, 2H), 3.70 (t, J = 6.4Hz, 2H)。

[0555] 2-(4-溴丁氧基)-四氢-2H-吡喃(23): 将3,4-二氢-2H-吡喃(8.5ml, 90.96mmol)滴加到22(10.7g, 69.93mmol)和对甲苯磺酸一水合物(26.5mg, 0.1372mmol)的二氯甲烷(20ml)溶液中。混合物在室温下搅拌过夜。除去溶剂后,残余物通过硅胶快速色谱法纯化,用5:1的己烷/乙酸乙酯作为洗脱液,得到产物23(15.3g, 92%, 无色油状物)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ. 1.48-1.62(m, 4H), 1.68-1.85(m, 4H), 1.94-2.02(m, 2H), 3.40-3.53(m, 4H), 3.74-3.88(m, 2H), 4.57-4.59(m, 1H)。

[0556] 5-(2- 四氢 -2H- 吡喃基氧基) 亚戊基 -1,1- 二膦酸四乙酯 (24): 向氢化钠 (60%, 840.5mg, 21.01mmol) 的 40ml THF 悬浮液中小心加入亚甲基二膦酸四乙酯 (6.16g, 20.95mmol), 所得浅黄色澄清溶液在室温下搅拌 45 分钟。然后加入溴化物 23 (4.97g, 20.96mmol), 再加上 5ml THF 清洗。反应物回流过夜, 让其冷却至室温, 再用饱和氯化铵水溶液猝灭。再加入少量水溶解固体。混合物用乙酸乙酯萃取 (3 次), 经无水硫酸钠干燥并真空浓缩。硅胶快速色谱法纯化 (用 20 : 1 (v/v) 二氯甲烷 / 甲醇作为洗脱液), 得到不纯的产物 24 (7.3g, 浅黄色油状物)。该材料无需进一步纯化就可直接用于下一步骤。选择 ^1H NMR 信号 (400MHz, CDCl_3): δ 2.28 (tt, $J = 6.1, 24.3\text{Hz}$, 1H), 3.37-3.51 (m, 2H), 3.71-3.89 (m, 2H), 4.56-4.58 (m, 1H)。

[0557] 5-羟基亚戊基-1,1-二磷酸四乙酯 (25): 将粗制化合物 24 溶于 20ml 甲醇中, 加入 74.6mg (0.3863mmol) 对甲苯磺酸一水合物。在室温下搅拌过夜后, 浓缩混合物并进行快速色谱 (依次用 15 : 1 乙酸乙酯 / 甲醇 $\rightarrow$ 8 : 1 $\rightarrow$ 6 : 1 的梯度洗脱), 得到 25 (3.1g, 41%, 无色油状物, 经两步)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : δ 1.24-1.36 (m, 12H), 1.55-1.72 (m, 4H), 1.89-2.03 (m, 2H), 2.16 (bs, 1H), 2.29 (tt, J = 6.1, 24.3Hz, 1H), 3.66 (bs, 2H), 4.11-4.22 (m, 8H)。

[0558] 5-碘亚戊基-1,1-二膦酸四乙酯 (26): 将醇 25 (1.419g, 3.938mmol)、三苯膦

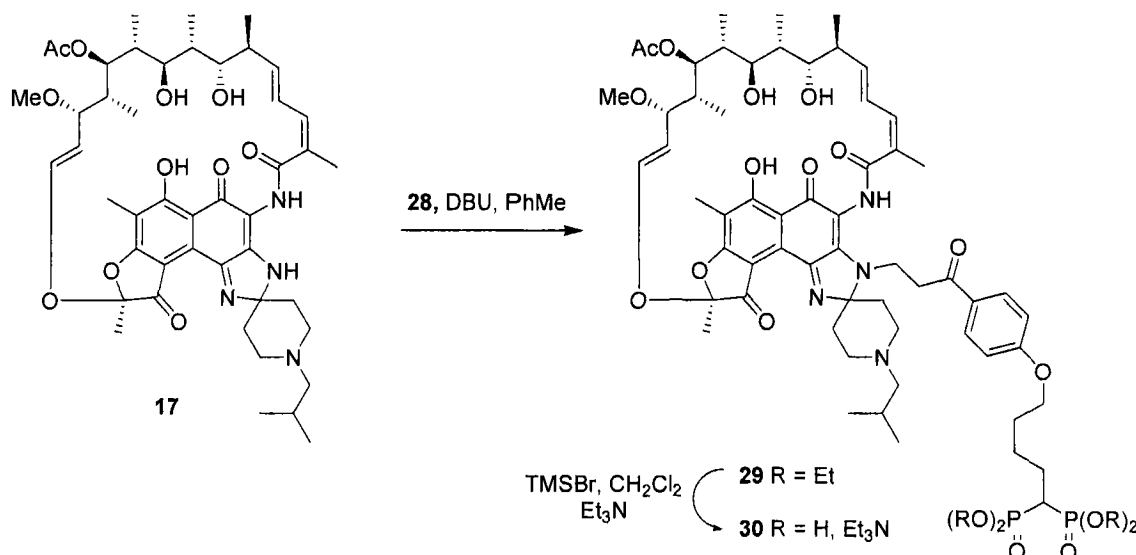
(1.25g, 4.718mmol) 和咪唑 (325.6mg, 4.735mmol) 溶于 15ml 无水乙腈中, 分几次加入 I_2 (1.196g, 4.703mmol)。在室温下搅拌过夜后, 真空除去溶剂, 将残余物溶于乙酸乙酯和饱和 $Na_2S_2O_3$ 水溶液。搅拌混合物, 直到有机层变为浅黄色, 分离两相。有机相经无水硫酸钠干燥并浓缩。通过硅胶快速色谱法纯化 (用 15 : 1 乙酸乙酯 / 甲醇作为洗脱液), 得到产物 26 (1.26g, 68%, 黄色油状物)。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) : δ 1.36 (t, $J = 7.0$ Hz, 12H), 1.66-1.72 (m, 2H), 1.81-1.99 (m, 4H), 2.35 (tt, $J = 5.9, 24.1$ Hz, 1H), 3.20 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.17-4.23 (m, 8H)。

[0559] 1-(4-羟基苯基)丙-2-烯-1-酮 (27): 将 4-羟基苯乙酮 (2.719g, 20mmol)、低聚甲醛 (2.702g, 90mmol) 和 N-甲基苯胺三氟乙酸盐 (6.603g, 30mmol) 的 20ml 无水 THF 混合物回流 3.5 小时, 然后冷却至室温。向所得红色溶液中加入 60ml 乙醚, 将所得混合物剧烈搅拌 15 分钟。倾出所得黄色溶液, 残余红褐色粘稠浆液反复用乙醚萃取 (每次 50ml), 直到浆液变为黄色固体。合并的有机萃取液用半饱和碳酸氢钠溶液洗涤 (2 次), 含水洗涤液用乙醚萃取 (2 次)。合并的有机层经无水硫酸钠干燥, 然后浓缩。通过硅胶快速色谱法纯化 (用 5 : 1 己烷 / 乙酸乙酯作为洗脱液), 得到产物 27 (1.21g, 41%, 浅黄色固体)。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) : δ 5.89 (dd, $J = 1.8, 10.6$ Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 6.43 (dd, $J = 1.6, 16.9$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.17 (dd, $J = 10.6, 17.2$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H)。

[0560] 1-(4-(5,5-双(二乙基膦酰基)戊氧基)苯基)丙-2-烯-1-酮 (28): 将碘化物 26 (1.066g, 2.267mmol)、烯酮 27 (373mg, 2.514mmol) 和碳酸钾 (369mg, 2.673mmol) 与 10ml 丙酮的混合物回流, 直到经 1H NMR 监测得知碘化物 26 已耗尽。这通常需要 6-8 小时。真空除去溶剂后, 将残余物溶于二氯甲烷中, 滤出不溶物。滤液用饱和碳酸氢钠洗涤 (2 次), 经无水硫酸钠干燥。真空浓缩, 得到黄色油状物 (定量收率, 1.14g), 其无需进一步纯化就可直接用于下一步骤。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) : δ 1.31-1.37 (m, 12H), 1.70-1.86 (m, 4H), 1.92-2.08 (m, 2H), 2.31 (tt, $J = 6.2, 24.2$ Hz, 1H), 4.04 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 4.14-4.22 (m, 8H), 5.87 (dd, $J = 1.8, 10.6$ Hz, 1H), 6.42 (dd, $J = 1.8, 17.2$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.17 (dd, $J = 10.6, 16.9$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H)。

[0561] 流程 7. 利福布汀-二磷酸酯缀合物 30 的制备

[0562]

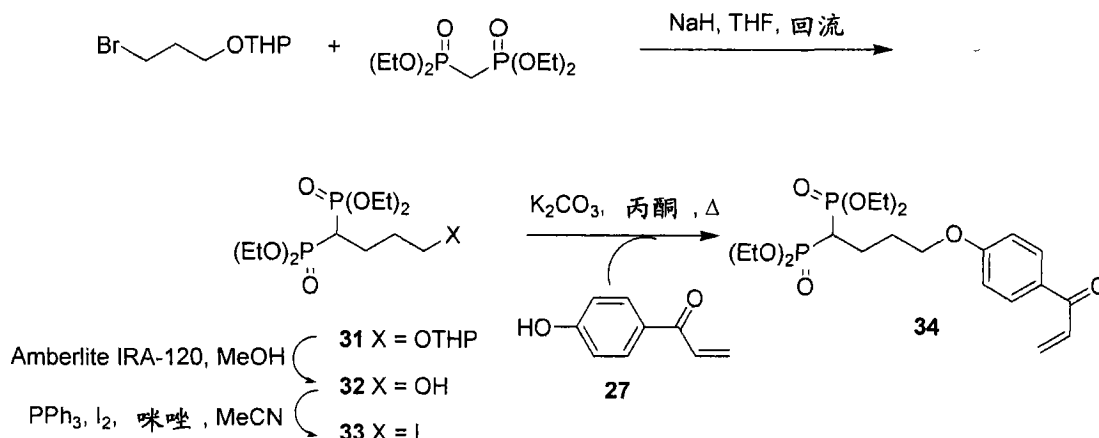


[0563] 利福布汀-二磷酸酯缀合物 29:将利福布汀 (573.8mg, 0.6774mmol)、二磷酸酯 28 (351.7mg, 0.7171mmol) 和 DBU (0.22ml, 1.471mmol) 与 7ml 甲苯的混合物在室温下搅拌过夜。除去溶剂后,将残余物溶于乙酸乙酯中,用饱和氯化铵洗涤 (2 次),再经无水硫酸钠干燥。通过硅胶快速色谱法纯化 (用 30 : 1 二氯甲烷 / 甲醇,再用 25 : 1 作为洗脱液),得到利福布汀-二磷酸酯缀合物 29 (400mg, 44%, 红色固体) 以及回收的未反应利福布汀 (275mg, 48%), 其中污染痕量的连接基团样杂质。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 0.19 (d, J = 7.0Hz, 3H), 0.60 (d, J = 6.6Hz, 3H), 0.73 (d, J = 7.0Hz, 3H), 0.92 (d, J = 5.9Hz, 6H), 0.99 (d, J = 7.0Hz, 3H), 1.32 (t, J = 7.0Hz, 12H), 1.56-1.85 (m, 13H), 1.91-2.05 (m, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.16-2.45 (m, 9H), 2.64-2.74 (m, 2H), 2.80-2.88 (m, 1H), 2.92-3.04 (m, 3H), 3.07-3.18 (m, 4H), 3.24-3.32 (m, 2H), 3.54-3.58 (m, 2H), 3.79 (d, J = 9.9Hz, 1H), 3.97 (d, J = 5.5Hz, 1H), 4.03 (t, J = 5.5Hz, 2H), 4.13-4.22 (m, 8H), 5.15 (d, J = 10.2Hz, 1H), 5.25 (dd, J = 4.8, 12.5Hz, 1H), 6.02 (dd, J = 6.6, 16.1Hz, 1H), 6.20-6.25 (m, 2H), 6.90 (d, J = 9.2Hz, 2H), 7.04 (dd, J = 10.6, 15.8Hz, 1H), 7.88 (d, J = 9.2Hz, 2H), 8.19 (s, 1H)。

[0564] 利福布汀-二磷酸酯缀合物 30:向化合物 29 (397.6mg, 0.2973mmol) 和三乙胺 (2.10ml, 15.05mmol) 与 5ml 无水二氯甲烷的混合物中,加入 0.98ml (7.425mmol) 溴代三甲基硅烷。将所得黑色混合物在室温下搅拌 20 小时以上。真空浓缩后,残余物在 15ml 0.1N 盐酸和 15ml 乙腈混合物中,在室温下搅拌 2.5 小时,然后用 0.38ml (2.723mmol) 三乙胺中和。将混合物冻干,加到 10g (35cc) Waters C18 Sep-Pak 柱上,用水 → 10 : 1 水 / 乙腈、再用 8 : 1 → 6 : 1 → 5 : 1 梯度洗脱。浓缩黄色流分,将其冻干,得到化合物 30 (50mg, 14%, 橘黄色固体)。选择 ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 0.01 (d, J = 6.9Hz, 3H), 0.49 (d, J = 6.6Hz, 3H), 0.72 (d, J = 6.9Hz, 3H), 0.85 (d, J = 7.0Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.6Hz, 6H), 1.09 (t, J = 7.3Hz, 6H), 1.16 (tt, J = 1.8, 7.3Hz, 2H), 1.20-1.28 (m, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 3.40 (d, J = 6.2Hz, 1H), 3.53-3.54 (m, 1H), 5.07 (dd, J = 6.2, 12.8Hz, 1H), 5.18 (d, J = 10.3Hz, 1H), 5.92 (d, J = 7.3, 15.4Hz, 1H), 6.20-6.23 (m, 2H), 6.82 (dd, J = 11.0, 15.8Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.8Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.8Hz, 2H), 8.74 (s, 1H)。 ³¹P (162MHz, DMSO-d₆): δ 20.53。

[0565] 流程 8.1-(4-(5,5-双(二乙基膦酰基)戊氧基)苯基)丙-2-烯-1-酮的合成

[0566]



[0567] 4-(2-四氢-2H-吡喃基氧基)亚丁基-1,1-二磷酸四乙酯 (31): 向 NaH (60% 悬浮于矿物油中, 900mg, 22.0mmol) 的无水 THF (20ml) 悬浮液中, 滴加亚甲基二磷酸四乙酯 (6.46g, 22.4mmol)。所得澄清溶液在室温下搅拌 15 分钟, 然后滴加 2-(3-溴丙氧基) 四氢-2H-吡喃 (5.05g, 22.6mmol)。反应混合物加热回流 6 小时, 用 CH_2Cl_2 (75ml) 稀释, 用盐水 ($2 \times 50ml$) 洗涤, 干燥 ($MgSO_4$) 并蒸发。它可直接用于下一步骤。

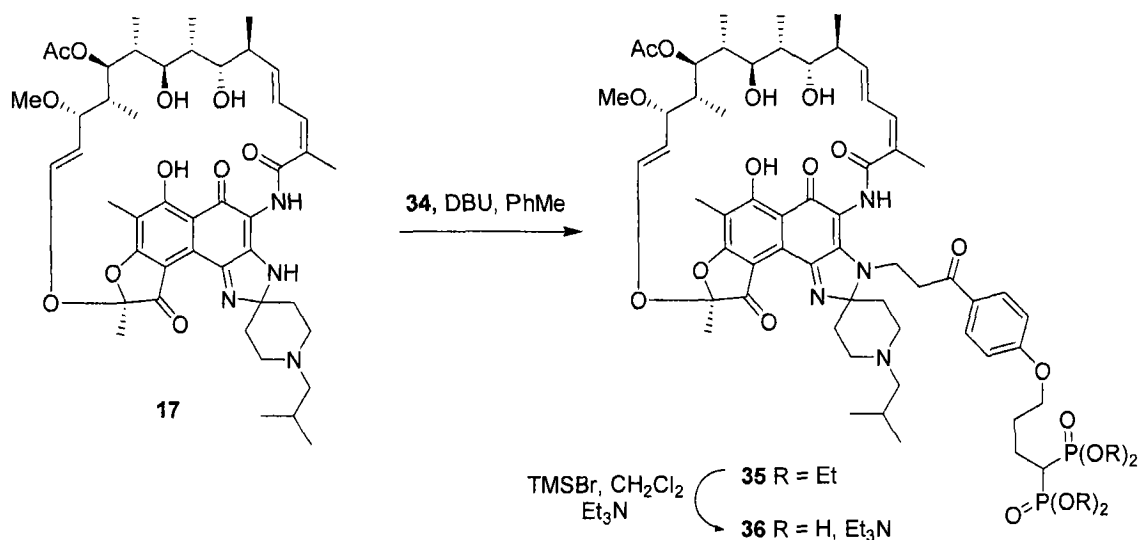
[0568] 4-羟基亚丁基-1,1-二磷酸四乙酯 (32): 向粗产物 31 (最大 22.4mmol) 的 MeOH (40ml) 搅拌溶液中加入 Amberlite IR-120 (0.6g)。反应混合物加热至 $50^\circ C$ 4 小时, 过滤并蒸发。粗产物通过硅胶快速色谱法纯化 (用 5-10% 甲醇 / 乙酸乙酯的梯度洗脱), 得到纯的 32 (2.67g, 34% 来自亚甲基二磷酸四乙酯)。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 1.30-1.36 (m, 12H), 1.75-1.85 (m, 2H), 1.97-2.13 (m, 2H), 2.30-2.64 (m, 2H), 3.66 (t, $J = 5.8$, 2H), 4.12-4.23 (m, 8H)。

[0569] 4-碘亚丁基-1,1-二磷酸四乙酯 (33): 向 32 (1.52g, 4.39mmol) 的 CH_2Cl_2 (50ml) 溶液中, 加入三苯膦 (1.32g, 5.033mmol) 和咪唑 (0.45g, 6.61mmol)。将反应混合物冷却至 $0^\circ C$, 加入碘 (1.22g, 4.81mmol)。将混合物从冷却浴中移出, 搅拌 2 小时, 用己烷 (100ml) 稀释, 过滤, 用更多己烷 ($2 \times 30ml$) 洗涤沉淀物。蒸发滤液, 通过硅胶快速色谱法纯化 (用 0-10% 甲醇 / 乙酸乙酯的梯度洗脱), 得到纯的 33 (1.6g, 80%)。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 1.32-1.38 (m, 12H), 1.95-2.15 (m, 4H), 2.28 (tt, $J = 24.1, 6.1$, 1H), 3.18 (t, $J = 6.6$, 2H), 4.12-4.24 (m, 8H)。

[0570] 1-(4-(4,4-双(二乙基膦酰基)丁氧基)苯基)丙-2-烯-1-酮 (34): 将碘化物 33 (3.1g, 6.8mmol)、苯酚 27 (1.21g, 8.17mmol) 和 K_2CO_3 (1.033g, 7.47mmol) 的丙酮 (75ml) 混合物回流 6.5 小时。冷却混合物, 过滤并蒸发。残余物重新溶于 CH_2Cl_2 (170ml), 通过硅藻土过滤并蒸发, 得到粗产物 34 (3.2g, 99%), 其可直接用于下一步骤。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 1.28-1.39 (m, 12H), 1.89-2.25 (m, 4H), 2.26-2.48 (m, 1H), 4.05 (t, $J = 5.7$, 2H), 4.12-4.26 (m, 8H), 5.87 (dd, $J = 10.6, 1.8$, 1H), 6.42 (dd, $J = 16.9, 1.8$, 1H), 6.93 (d, $J = 8.8$, 2H), 7.17 (dd, $J = 17.0, 10.4$, 1H), 7.95 (d, $J = 8.8$, 2H)。

[0571] 流程 9. 利福布汀-二磷酸酯缀合物 36 的制备

[0572]

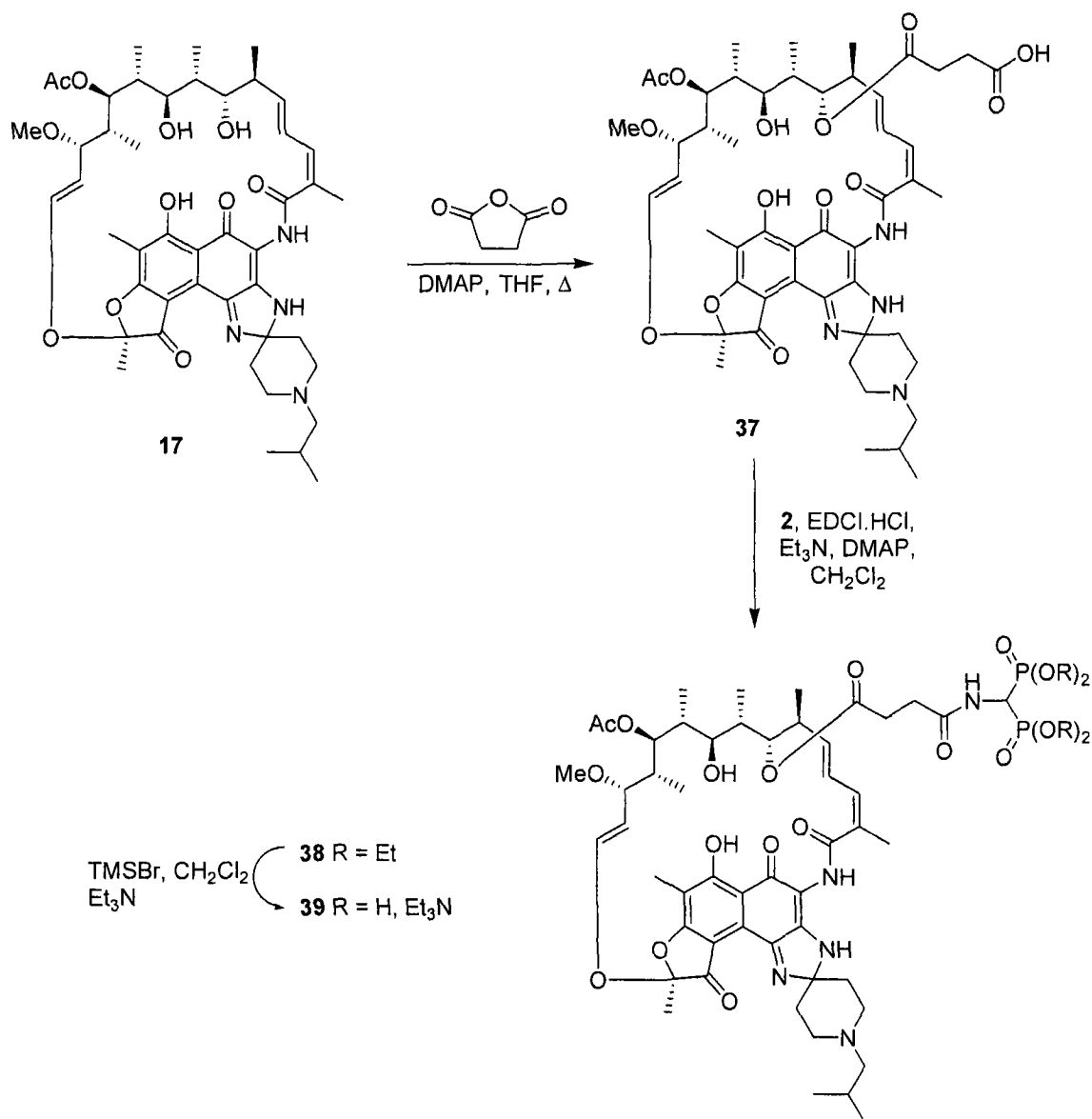


[0573] 利福布汀-二磷酸酯缀合物 35:将 6g (7.088mmol) 利福布汀、化合物 34 (3.656g, 7.431mmol) 和 DBU (2.20ml, 14.71mmol) 的 70ml 甲苯混合物在室温下搅拌过夜。反应物用氯化铵饱和水溶液洗涤 (2 次), 经无水硫酸钠干燥。进行硅胶快速色谱, 依次用 40 : 1、30 : 1、20 : 1、15 : 1 和 10 : 1 (v/v) 二氯甲烷 / 甲醇梯度洗脱。得到产物 35 (4.4g, 47%, 红褐色固体)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 0.20 (d, J = 7.0, 3H), 0.60 (d, J = 6.6, 3H), 0.72 (d, J = 6.6, 3H), 0.91 (d, J = 6.6, 3H), 0.92 (d, J = 6.6, 3H), 0.99 (d, J = 7.0, 3H), 1.34 (dt, J = 7.0, 1.1, 12H), 1.56-1.85 (m, 10H), 2.00-2.46 (m, 20H), 2.64-2.74 (m, 2H), 2.80-2.88 (m, 1H), 2.92-3.02 (m, 3H), 3.11 (s, 3H), 3.12-3.18 (m, 1H), 3.25-3.32 (m, 1H), 3.55-3.57 (m, 1H), 3.79 (d, J = 9.5, 1H), 3.95 (d, J = 5.1, 1H), 4.02-4.06 (m, 2H), 4.14-4.23 (m, 8H), 5.14 (d, J = 10.2, 1H), 5.24 (dd, J = 12.6, 5.1, 1H), 6.02 (dd, J = 16.1, 6.6, 1H), 6.19-6.24 (m, 2H), 6.90 (d, J = 9.2, 2H), 7.06 (dd, J = 16.1, 11.0, 1H), 7.88 (d, J = 8.8, 2H), 8.17 (s, 1H); ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 24.58。

[0574] 利福布汀-二磷酸酯缀合物 36:将化合物 35 (4.4g, 3.325mmol) 溶于 50ml 无水二氯甲烷中。向该溶液中加入 23ml (164.1mmol) 三乙胺, 再加入 11ml (83.34mmol) 溴代三甲基硅烷。将混合物在室温下搅拌 20 小时以上。除去溶剂后, 残余物溶于 200ml 0.1N 盐酸和 75ml 乙腈混合物中, 在室温下搅拌 5 小时。处理结束后, 加入 4.7ml 三乙胺, 过滤不溶物。除去有机溶剂, 冻干残余物。所得材料进行 C18 反相快速色谱, 用 20% 乙腈 / 30mM 三乙胺 / 二氧化碳水溶液 (pH 6.8) → 纯乙腈线性梯度洗脱。对于含有产物的流分, 真空除去乙腈, 冻干所得水溶液, 得到化合物 36 (1.137g, 24%, 双三乙铵盐形式, 黄褐色固体)。¹H NMR (400MHz, D₂O) δ 0.01 (d, J = 6.6, 3H), 0.63 (d, J = 6.6, 3H), 0.81 (d, J = 7.0, 3H), 0.95 (d, J = 7.0, 3H), 1.01 (d, J = 6.2, 6H), 1.26 (t, J = 7.3, 18H), 1.60 (s, 3H), 1.54-1.62 (m, 1H), 1.68-2.16 (m, 11H), 2.03 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.30-2.37 (m, 2H), 2.42-2.50 (m, 2H), 2.66-2.75 (m, 2H), 3.00-3.28 (m, 3H), 3.07 (s, 3H), 3.18 (q, J = 7.3, 12H), 3.53-3.59 (m, 4H), 3.76 (d, J = 8.8, 1H), 4.13-4.16 (m, 3H), 5.10 (d, J = 11, 1H), 5.35 (dd, J = 12.5, 7.0, 1H), 6.04 (dd, J = 15.8, 1H), 6.26 (d, J = 12.5, 1H), 6.38 (d, J = 11.4, 1H), 6.74 (dd, J = 16.1, 11.4, 1H), 6.99 (d, J = 8.8, 2H), 7.71 (d, J = 8.8, 2H); ³¹P NMR (162MHz, D₂O) δ 21.00。

[0575] 流程 10. 利福布汀-二磷酸酯缀合物 39 的制备

[0576]



[0577] 21-O-(3-羧基丙酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(37): 将利福布汀 17(153.8mg, 0.1816mmol) 与 44.3mg (0.4427mmol) 琥珀酸酐和 6.4mg (0.05239mmol) DMAP 的 3ml 无水 THF 一起回流过夜。浓缩后, 所得材料进行硅胶快速色谱 (用二氯甲烷/甲醇 (30 : 1(v/v)、然后 20 : 1、然后 10 : 1) 洗脱), 得到产物 37(136.4mg, 80%, 深紫色固体)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ -0.15(d, $J = 7.0$, 3H), 0.50(d, $J = 6.6$, 3H), 0.88-1.00(m, 9H), 1.07(d, $J = 7.0$, 3H), 1.20-1.26(m, 2H), 1.57(s, 1H), 1.79(s, 3H), 1.80-1.98(m, 4H), 2.02(s, 3H), 2.04(s, 3H), 2.26(s, 3H), 2.30-2.66(m, 9H), 2.86-3.21(m, 5H), 3.08(s, 3H), 3.47(br s, 1H), 3.66(s, 1H), 4.98-5.06(m, 2H), 5.76-5.86(m, 1H), 6.02(d, $J = 12.5$, 1H), 6.15(d, $J = 11.0$, 1H), 6.30-6.37(m, 1H), 7.99(s, 1H), 8.35(br s, 1H)。

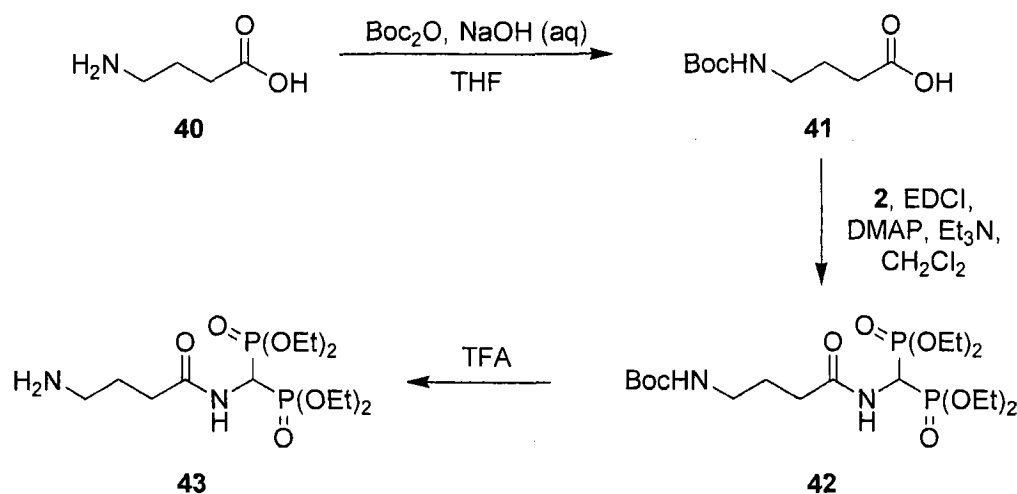
[0578] 21-O-(3-((双(二乙基膦酰基)甲基)氨基甲酰基)丙酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(38): 将酸 37(136mg, 0.1436mmol) 和胺 2(44mg, 0.1446mmol) 溶于 2ml 无水二氯甲烷中, 然后加入 40 μl (0.2854mmol) 三乙胺, 再加入 EDCI:HCl(64mg, 0.3338mmol) 和 DMAP(3.5mg,

0.02865mmol)。在室温下搅拌过夜后,浓缩混合物,进行硅胶快速色谱。先用10:1(v/v)乙酸乙酯/乙酸洗脱柱子,直到洗出未反应的利福布汀的深紫色条带。然后用二氯甲烷/甲醇(20:1(v/v)、再用10:1)洗脱,得到产物38(58.9mg,33%,深紫色固体)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ -0.18(d, J = 7.3, 3H), 0.47(d, J = 7.0, 3H), 0.92(d, J = 6.6, 3H), 0.95-1.03(m, 9H), 1.12-1.32(m, 2H), 1.35(t, J = 7.0, 12H), 1.79(s, 3H), 1.80-1.98(m, 4H), 2.02(s, 3H), 2.08(s, 3H), 2.00-2.10(m, 3H), 2.29(s, 3H), 2.32-2.76(m, 8H), 2.80-3.10(m, 5H), 3.07(s, 3H), 3.49(br s, 1H), 4.14-4.28(m, 8H), 4.95(d, J = 10.7, 1H), 4.98-5.12(m, 2H), 5.86(dd, J = 15.4, 7.7, 1H), 6.08-6.15(m, 1H), 6.40(dd, J = 15.4, 11.4, 1H), 6.65(d, J = 10.3, 1H), 8.15(s, 1H), 8.28(brs, 1H)。

[0579] 21-O-(3-((二磷酰基甲基)氨基甲酰基)丙酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(39):将化合物38(57.4mg, 0.04658mmol)溶于0.5ml无水二氯甲烷,依次加入0.33ml(2.355mmol)三乙胺和0.16ml(1.212mmol)TMSBr。将混合物在室温下搅拌过夜并浓缩。真空干燥至少30分钟后,将所得材料溶于2.8ml 0.1N HCl(水溶液)和2.8ml乙腈的混合物中。搅拌1.5小时后,将溶液用0.07ml三乙胺碱化,然后小心除去有机溶剂。残余物经过滤并冻干。将冻干后的固体材料加到自动 Biotage®分离设备的C18柱上,用10%乙腈/30mM三乙基碳酸氢铵缓冲液(pH = 6.8)→60%的线性梯度洗脱,接着用纯乙腈洗涤,得到深紫色固体39(20.5mg,33%,为双三乙胺盐)。选择¹H NMR(400MHz, D₂O): δ 0.16(bs, 3H), 0.40(d, J = 5.5, 3H), 0.74(br s, 1H), 0.88(d, J = 6.6, 3H), 1.00(d, J = 6.6, 3H), 1.06(d, J = 6.6, 6H), 1.27(t, J = 7.3, 18H), 1.55(br s, 1H), 1.78(s, 3H), 1.99(s, 3H), 2.01(s, 3H), 2.19(s, 3H), 2.20-2.26(m, 1H), 2.39(br s, 1H), 2.65(brs, 5H), 2.97-3.00(m, 1H), 3.02(s, 3H), 3.10-3.24(m, 5H), 3.19(q, J = 7.3, 12H), 3.29-3.32(m, 2H), 3.65(br s, 5H), 4.28(t, J = 19.0, 1H), 5.01-5.04(m, 1H), 5.32(bs, 1H), 5.99(dd, J = 15.4, 9.2, 1H), 6.19(d, J = 12.5, 1H), 6.43(d, J = 11.0, 1H), 6.80(br s, 1H)。³¹P NMR(162MHz, D₂O): δ 14.15. MS(M-H): 1118.2。

[0580] 流程11. (4-氨基丁酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯的制备

[0581]



[0582] 4-(叔丁氧羰基氨基)丁酸(41):在室温下将氨基酸40(956.2mg,9.273mmol)与 Boc_2O (2.037g,9.333mmol)和23ml 1N NaOH(水溶液)的5ml THF一起搅拌过夜。溶液用稀

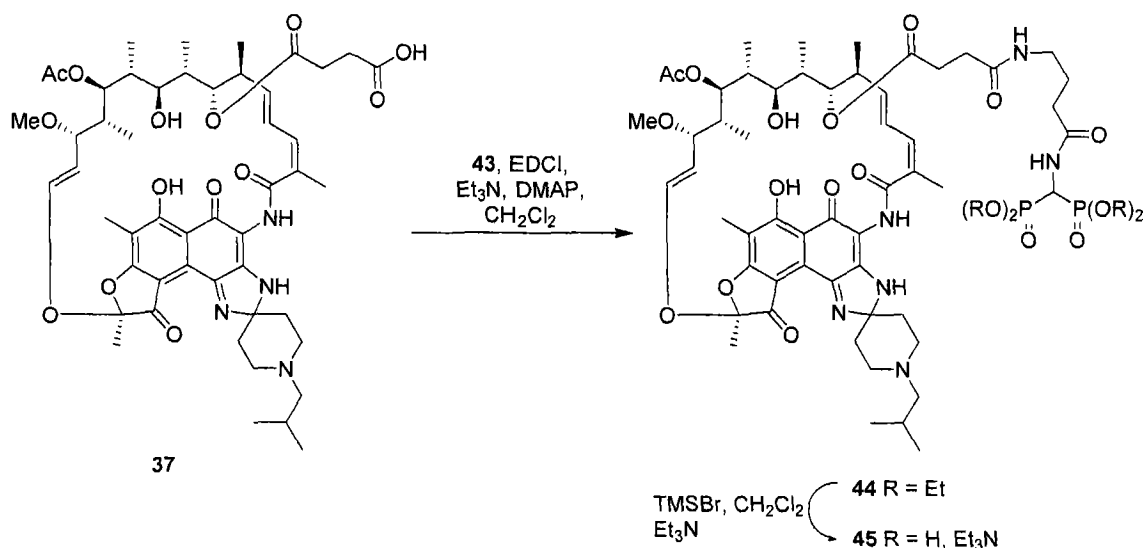
盐酸酸化,直到 pH 达到约 2,此时得到浑浊混合物。反应物用乙酸乙酯萃取(3次),经无水硫酸钠干燥,然后除去溶剂,得到 41(1.759g,93%,无色油状物)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 1.44(s, 9H), 1.83(五重峰 $J = 7.0$, 2H), 2.41(t, $J = 7.0$, 2H), 3.12-3.24(m, 2H), 4.66(br s, 1H)。

[0583] (4-(叔丁氧羰基氨基)丁酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯(42):将酸 41(314.6mg, 1.547mmol)和胺 2(466.8mg, 1.539mmol)溶于 15ml 无水二氯甲烷中。加入三乙胺(0.44ml, 3.14mmol),再加入 DMAP(37.6mg, 0.3078mmol)和 EDCI·HCl(592.4mg, 3.09mmol)。混合物在室温下搅拌过夜,然后浓缩。进行硅胶快速色谱(用 15:1(v/v)乙酸乙酯/甲醇洗脱),得到化合物 42(469.3mg, 62%, 浅黄色油状物)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 1.34(t, $J = 7.0$, 12H), 1.44(s, 9H), 1.83(五重峰 $J = 7.0$, 2H), 2.31(t, $J = 7.0$, 2H), 3.16-3.24(m, 2H), 4.16-4.26(m, 8H), 4.78(br s, 1H), 5.06(dt, $J = 21.6, 9.9$, 1H), 6.61(br d, $J = 10.3$, 1H)。

[0584] (4-氨基丁酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯(43):将化合物 42(469mg, 0.9602mmol)溶于少量 TFA, 浓缩溶液。残余物溶于 1N NaOH 水溶液,用乙酸乙酯萃取(5次)。合并萃取液经硫酸钠干燥,真空浓缩至干,得到化合物 43(82mg, 22%, 无色油状物)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 1.34(dt, $J = 7.0, 2.6$, 12H), 1.79(五重峰 $J = 7.0$, 2H), 2.38(t, $J = 7.0$, 2H), 2.79(t, $J = 7.0$, 2H), 4.14-4.26(m, 8H), 5.05(dt, $J = 21.3, 8.5$, 1H), 7.08(br d, $J = 8.0$, 1H)。

[0585] 流程 12. 利福布汀-二磷酸酯缀合物 45 的制备

[0586]



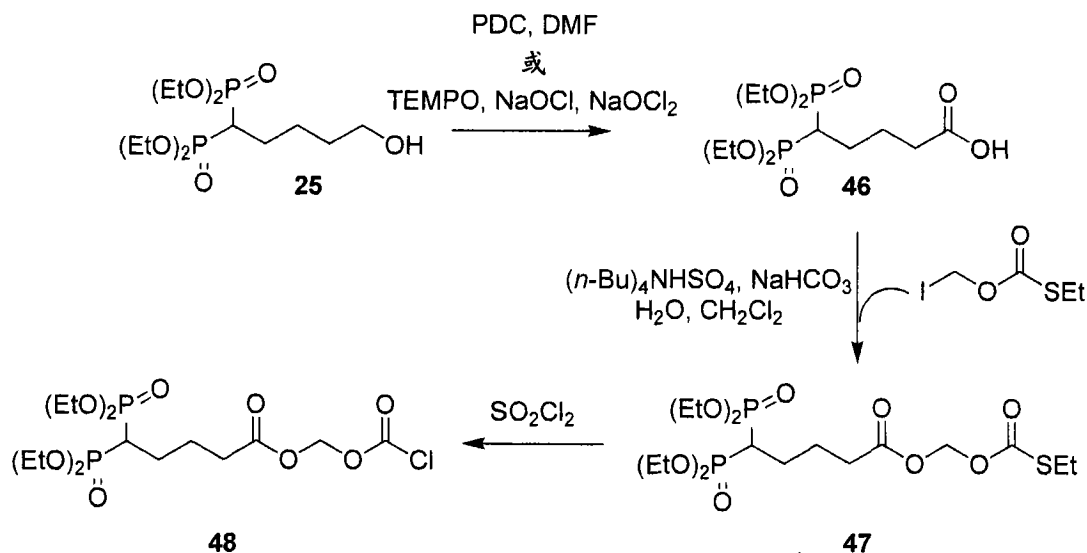
[0587] 21-O-(3-(3-((双(二乙基膦酰基)甲基)氨基甲酰基)丙基氨基甲酰基)丙酰基)-1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(44):将酸 37(432.5mg, 0.4567mmol)、胺 43(176.3mg, 0.4540mmol)、EDCI·HCl(180.1mg, 0.9394mmol)、DMAP(11.9mg, 0.09741mmol)和三乙胺(0.13ml, 0.9277mmol)与 5ml 二氯甲烷的混合物在室温下搅拌过夜。浓缩至干后,残余物通过 Biotage®自动快速纯化系统的 SiO_2 色谱法纯化(用 15 倍柱体积的 2-10% 甲醇/二氯甲烷梯度洗脱),得到 44(404.8mg, 68%, 深紫色固体)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ -0.21(d, $J = 7.0$, 3H), 0.47(d, $J = 7.0$, 3H), 0.91(d, $J = 7.0$, 3H), 0.98(brs, 3H), 1.03(d, $J = 7.0$, 6H), 1.41(t, $J = 7.3$, 12H),

1.79 (s, 3H), 1.72-2.00 (m, 11H), 2.01 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.28-2.54 (m, 10H), 2.84-2.92 (m, 2H), 3.05 (s, 3H), 3.18-3.23 (m, 2H), 3.32-3.37 (m, 2H), 3.45-3.49 (m, 2H), 4.11-4.28 (m, 8H), 4.96 (d, $J = 11.0$, 1H), 5.00-5.14 (m, 2H), 5.92 (dd, $J = 15.4, 7.0$, 1H), 6.07 (d, $J = 13.2$, 1H), 6.17 (d, $J = 11.4$, 1H), 6.39 (dd, $J = 15.4, 11.4$, 1H), 6.68 (br s, 1H), 6.79 (br s, 1H), 8.00 (brs, 1H), 8.18 (br s, 1H)。

[0588] 21-O-(3-(3-((二磷酸基甲基)氨基甲酰基)丙基氨基甲酰基)丙酰基)-1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(45): 将化合物 44 (396.5mg, 0.3010mmol) 溶于 3ml 二氯甲烷中, 加入 2.1ml (14.99mmol) 三乙胺, 再加入 1ml (7.577mmol) TMSBr。将红色混合物在室温下搅拌至少 20 小时, 然后浓缩至干。在高真空度下干燥至少 30 分钟后, 再将固体材料溶于 18ml 0.1N HCl 和 10ml 乙腈混合物中, 在室温下搅拌 1 小时, 此时得到澄清溶液。通过加入 0.43ml 三乙胺碱化 (终 pH = 9.6) 后, 小心除去有机溶剂, 滤出不溶物。冻干滤液, 残余物通过 Biotage® 自动快速色谱系统的 C18 柱, 用 15 倍柱体积的 10-60% MeCN/30mM 三乙基碳酸氢铵缓冲液 (pH = 6.5) 梯度洗脱, 得到 45 (194mg, 46%, 为双三乙铵盐, 深紫色固体)。 ^1H NMR (400MHz, D_2O): δ -0.04 (d, $J = 6.6$, 3H), 0.39 (d, $J = 6.2$, 3H), 0.76 (br s, 1H), 0.88 (d, $J = 7.0$, 3H), 0.95 (d, $J = 6.6$, 3H), 1.08 (d, $J = 6.6$, 6H), 1.26 (t, $J = 7.3$, 18H), 1.53 (br s, 1H), 1.80-2.32 (m, 8H), 1.81 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.32-2.72 (m, 10H), 2.96-3.02 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 3.18 (q, $J = 7.3$, 12H), 3.35 (d, $J = 7.3$, 1H), 3.60-3.84 (m, 4H), 4.33 (t, $J = 19.1$, 1H), 4.95 (d, $J = 10.3$, 1H), 5.04-5.06 (m, 1H), 5.21 (dd, $J = 12.4, 5.1$, 1H), 5.97 (dd, $J = 15.0, 7.7$, 1H), 6.10 (d, $J = 12.5$, 1H), 6.39 (d, $J = 10.6$, 1H), 6.63 (dd, $J = 15.1, 11.4$, 1H); ^{31}P NMR (162MHz, D_2O): δ 13.99; 质量 (M-H): 1203。

[0589] 流程 13.5, 5-双(二乙基磷酸基)戊酸(氯羰氧基)甲酯的制备

[0590]



[0591] 5-羧基亚戊基-1,1-二磷酸四乙酯 (46): 将醇 25 (1.3942g, 3.869mmol) 溶于 40ml 无水 DMF 中, 加入 5.098g (13.55mmol) 重铬酸吡啶鎓。深色溶液在室温下搅拌过夜。反应物浓缩至原体积的一半, 用水稀释。混合物用乙酸乙酯萃取 (3 次), 合并的萃取液经硫酸钠干燥并浓缩至干。进行硅胶快速色谱 (用 15 : 1 (v/v) 二氯甲烷 / 甲醇洗脱), 得到酸 46 (606mg, 42%, 无色油状物)。或者, 向加热至 35℃ 的醇 25 (475mg, 1.318mmol)、

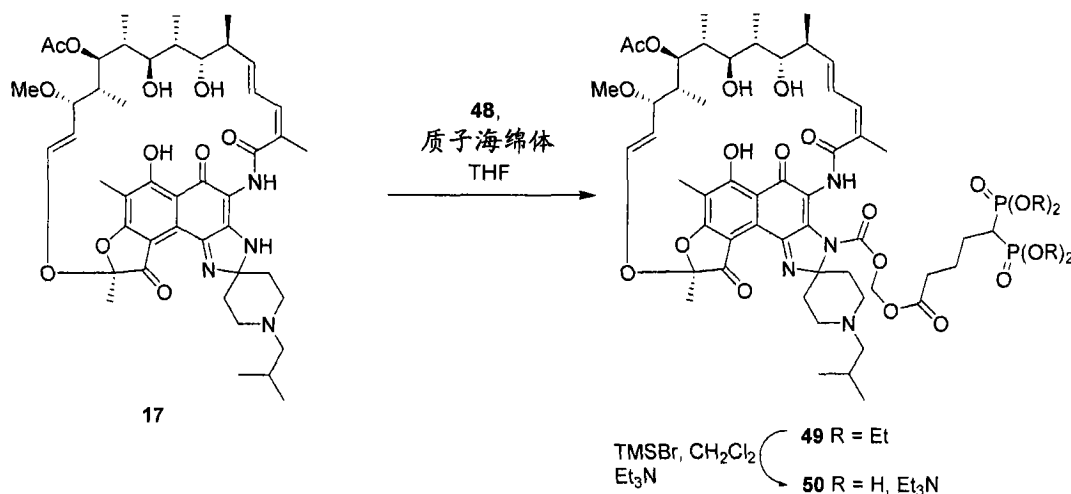
TEMPO(15mg, 0.095mmol)、MeCN(6ml) 和磷酸钠缓冲液 (6ml, 0.67M, pH = 6.7) 的混合物中, 用单独的注射器同时滴加亚氯酸钠溶液 (300mg/2ml 水) 和稀漂白水 (1ml 市售漂白水/19ml 水的 0.75ml 溶液)。混合物由黄变红。5 小时后, 经 TLC 和 ^1H NMR 监测 反应完成, 然后冷却至室温。加入 30ml 水, 加入 3ml 1N NaOH 将 pH 调节至约 9。通过将反应物倒入冷 Na_2SO_3 溶液 (500mg/10ml 水) 中并维持在 20℃ 以下而猝灭。在同一温度下搅拌 30 分钟之后, 用 30ml 乙醚萃取混合物, 弃去有机相。通过加入 5ml 1N HCl 将水相的 pH 重新调节至介于 3-4 之间, 所得混合物用二氯甲烷萃取 (3 次)。合并的萃取液经硫酸钠干燥并浓缩, 定量得到酸 46, 其无需进一步纯化就可用于下一步骤。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 1.34(t, J = 7.0, 12H), 1.86-2.06(m, 4H), 2.33(tt, J = 24.2, 5.9, 1H), 2.36(t, J = 7.3, 2H), 4.14-4.22(8H)。

[0592] 0-(5,5-双(二乙基膦酰基)戊酰氧基)甲基硫代碳酸 S-乙酯 (47): 将酸 46(606mg, 1.619mmol)、四丁基硫酸氢铵 (552mg, 1.626mmol) 和碳酸氢钠 (274.2mg, 3.264mmol) 加入到 4ml 水和 4ml 二氯甲烷的混合物中。产气停止后, 加入 310.8mg(1.263mmol) 0-碘甲基硫代碳酸 S-乙酯 (按照 Folkman, M.; Lund, F. J. Synthesis, 1990, 1159-1166 所述方法合成) 的 1ml 二氯甲烷, 将所得混合物搅拌 2 小时。分离有机相, 用水洗涤 (1 次), 经硫酸钠干燥。过滤和浓缩后, 残余物在乙醚中搅拌 10 分钟。除去固体, 浓缩滤液, 进行硅胶快速色谱 (用 20 : 1(v/v) 二氯甲烷 / 甲醇洗脱), 得到化合物 47(519.2mg, 83%, 无色油状物)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 1.33(t, J = 7.3, 3H), 1.35(t, J = 7.7, 12H), 1.86-2.04(m, 4H), 2.28(tt, J = 23.8, 6.2, 1H), 2.40(t, J = 7.3, 2H), 2.90(q, J = 7.3, 2H), 4.14-4.22(m, 8H), 5.80(s, 2H)。

[0593] 5,5-双(二乙基膦酰基)戊酸(氯羰氧基)甲酯 (48): 将纯净化合物 47(519.2mg, 1.054mmol) 在冰 / 水浴中冷却, 小心加入硫酰氯 (128 μ l, 1.579mmol)。让反应混合物升至室温并搅拌过夜。真空除去过量硫酰氯后, 粗产物酰氯 48, 无需进一步纯化就可直接用于下一步骤。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 1.35(t, J = 7.0, 12H), 1.86-2.06(m, 4H), 2.28(tt, J = 23.8, 6.2, 1H), 2.45(t, J = 7.0, 2H), 2.90(q, J = 7.3, 2H), 4.14-4.24(m, 8H), 5.82(s, 2H)。

[0594] 流程 14. 利福布汀-二膦酸酯缀合物 50 的制备

[0595]



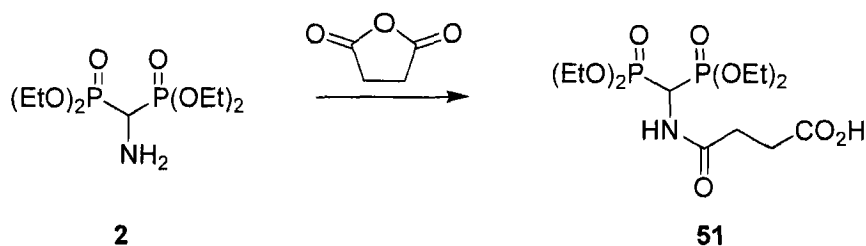
[0596] 利福布汀-二膦酸酯缀合物 49: 将利福布汀 17(899mg, 1.061mmol) 溶于 10ml THF

中,加入质子海绵 (proton sponge) (453.5mg, 2.116mmol) 和粗制酰氯 48 (1.054mmol)。混合物在室温下搅拌过夜,再用乙酸乙酯稀释。溶液用水洗涤 (2 次),经硫酸钠干燥并浓缩至干。残余物通过硅胶快速色谱法纯化,用 19 : 1(v/v) 乙酸乙酯 / 甲醇、再用二氯甲烷 / 甲醇 (30 : 1(v/v) $\rightarrow$ 20 : 1 $\rightarrow$ 10 : 1) 梯度洗脱深紫色利福布汀条带,得到化合物 49 (504.3mg, 37%, 深橘红色固体)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ -0.07 (br d, J = 7.0, 3H), 0.59 (d, J = 6.6, 3H), 0.85 (d, J = 7.0, 3H), 0.96 (d, J = 6.6, 6H), 1.02 (d, J = 7.0, 3H), 1.31-1.36 (m, 12H), 1.50-2.02 (m, 10H), 1.76 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.09 (br s, 3H), 2.20-2.40 (m, 6H), 2.32 (s, 3H), 2.84-3.04 (m, 6H), 3.09 (s, 3H), 3.38-3.44 (m, 2H), 3.74-3.82 (m, 2H), 4.12-4.22 (m, 8H), 4.98 (br d, J = 9.5, 1H), 5.15 (br s, 1H), 5.75-5.92 (m, 2H), 6.00-6.28 (m, 3H), 6.79 (br s, 1H), 8.03 (br s, 1H)。

[0597] 利福布汀二磷酸酯缀合物 50 : 将化合物 49 (499.1mg, 0.3907mmol) 溶于 4ml 二氯甲烷中,依次加入 2.7ml (19.27mmol) 三乙胺和 1.3ml (9.850mmol) TMSBr。亮橘红色混合物在室温下搅拌至少 20 小时,然后真空浓缩。将残余物溶于稀 HCl 水溶液 (20ml, pH = 4.5) 和 15ml MeCN 混合物中并在室温下搅拌 1 小时,此时得到澄清深红色溶液。加入三乙胺 (0.22ml, 4 当量) 将终 pH 调节至 9.4。小心除去有机溶剂,滤出不溶物。冻干所得含水混合物,以除去水。固体材料通过 Biotage® 自动快速色谱系统的 C18 柱,用 12 倍柱体积的 10 $\rightarrow$ 60% MeCN/30mM 三乙基碳酸氢铵缓冲液 (pH = 6.5) 梯度洗脱,得到 50 (166mg, 31%, 双三乙胺盐,深红色固体)。 ^1H -NMR (400MHz, D_2O) : δ -0.08 (br d, J = 5.9, 3H), 0.61 (d, J = 6.3, 3H), 0.89 (d, J = 5.9, 3H), 0.96 (d, J = 7.0, 6H), 1.08 (d, J = 6.6, 3H), 1.09 (d, J = 6.6, 3H), 1.26 (t, J = 7.3, 18H), 1.58-2.14 (m, 24H), 2.20-2.30 (m, 2H), 2.41 (br s, 3H), 3.06 (s, 3H), 3.10-3.22 (m, 2H), 3.18 (q, J = 7.3, 12H), 3.55 (br s, 2H), 3.72-3.88 (m, 4H), 3.99 (br s, 1H), 4.28 (br s, 1H), 4.98 (br s, 1H), 5.25 (br s, 1H), 5.83 (br s, 2H), 5.96-6.16 (m, 2H), 6.43 (br s, 1H), 7.35 (br s, 1H); ^{31}P NMR (162MHz, D_2O) : δ 20.81; 质量 (M-H) : 1163。

[0598] 流程 15.3-[(四乙基二磷酸基甲基) 氨基甲酰基] 丙酸的制备

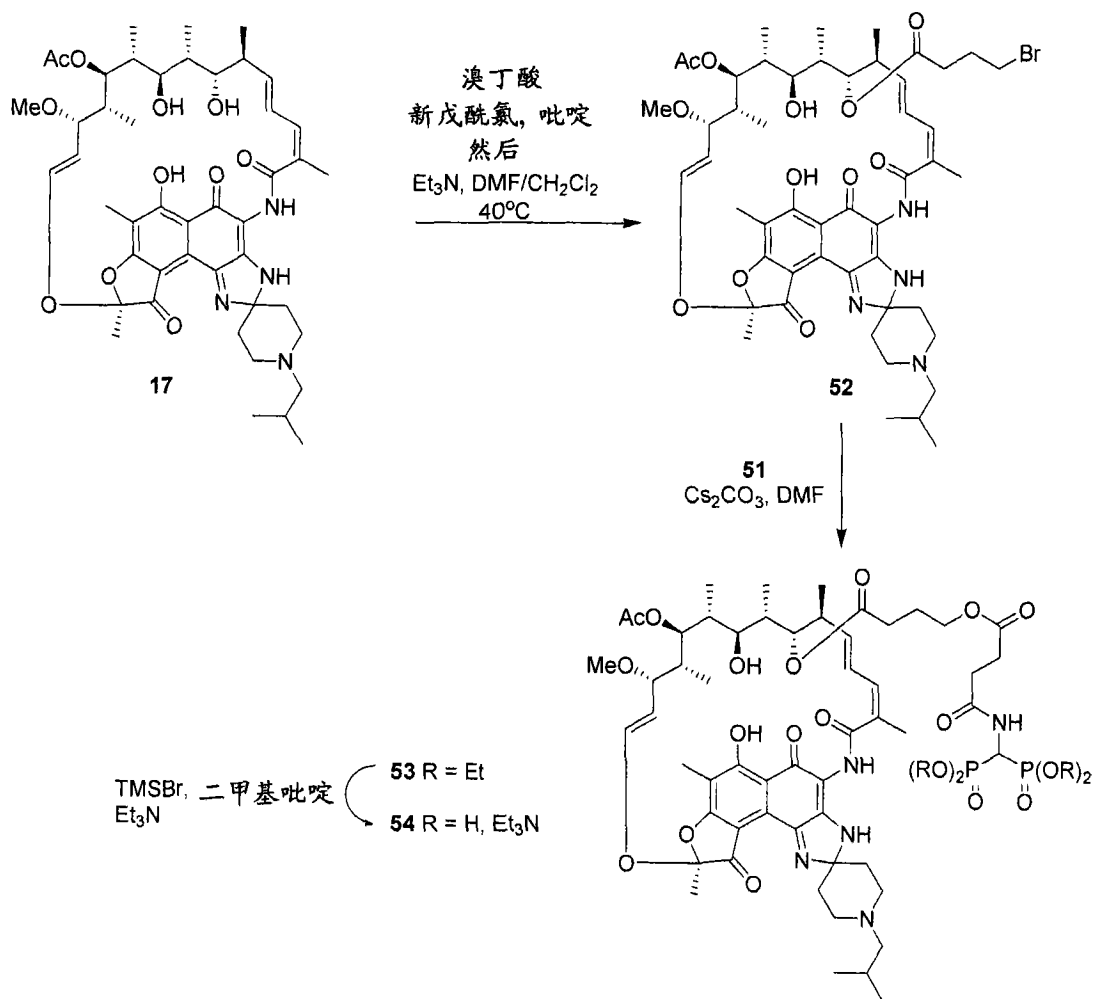
[0599]



[0600] 3-[(四乙基二磷酸基甲基) 氨基甲酰基] 丙酸 (51) : 按照 J. DrugTargeting, 1997, 5, 129-138 所述制备化合物 51。得到该化合物是油状物,让其缓慢固化,从 2 的粗收率为 57%。粗产物可用色谱法纯化 (10% AcOH/EtOAc),得到白色固体。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.31 (t, J = 7.0, 6H), 1.33 (t, J = 7.1, 6H), 2.61-2.73 (m, 4H), 4.05-4.28 (m, 8H), 5.07 (td, J = 21.6, J = 9.8, 1H), 7.90 (d, J = 9.4, 1H)。

[0601] 流程 16. 利福布汀 - 二磷酸酯缀合物 54 的制备

[0602]



[0603] 21-O-(4-溴丁酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(52): 将新戊酰氯 (1.2ml, 10mmol) 滴加到 4-溴丁酸 (1.7g, 10mmol) 和吡啶 (810 μ l, 10mmol) 的 CH₂Cl₂ (3ml) 溶液中, 所得溶液搅拌 0.5 小时, 然后过滤并加入到利福布汀 (1.2g, 2.0mmol) 和吡啶 (320 μ l, 4mmol) 的 THF (5ml) 溶液中。在 Ar 下将所得产物在 40°C 搅拌 11 天, 然后用 CH₂Cl₂ (50ml) 和 H₂O (30ml) 稀释。收集有机相, 水层用 CH₂Cl₂ (2 $\times$ 10ml) 再萃取 2 次。合并的有机层用 NaCl 饱和溶液 (20ml) 洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥并真空浓缩。粗产物通过硅胶色谱法纯化 (用 1% $\rightarrow$ 5% MeOH/CH₂Cl₂ (线性梯度) 洗脱), 得到 52 (1.2 g, 1.1mmol, 56%, 深紫色固体)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ -0.18 (d, J = 7, 3H), 0.48 (d, J = 7, 3H), 0.92 (d, J = 7, 3H), 0.94 (m, 6H), 1.04 (d, J = 7, 3H), 1.22 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.84-2.15 (m, 9H), 2.01 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.25-2.37 (m, 4H), 2.29 (s, 3H), 2.50 (m, 1H), 2.67 (m, 2H), 2.87 (m, 1H), 2.93-3.11 (m, 2H), 3.05 (s, 3H), 3.35-3.40 (m, 2H), 3.44 (m, 1H), 3.57-3.77 (m, 1H), 4.97 (d, J = 10, 1H), 5.03 (dd, J = 12, 5, 1H), 5.11 (d, J = 10, 1H), 5.92 (dd, J = 16, 7, 1H), 6.08 (d, J = 12, 1H), 6.12 (d, J = 11, 1H), 6.42 (dd, J = 16, 11, 1H), 7.72 (bs, 1H), 8.35 (bs, 1H)。

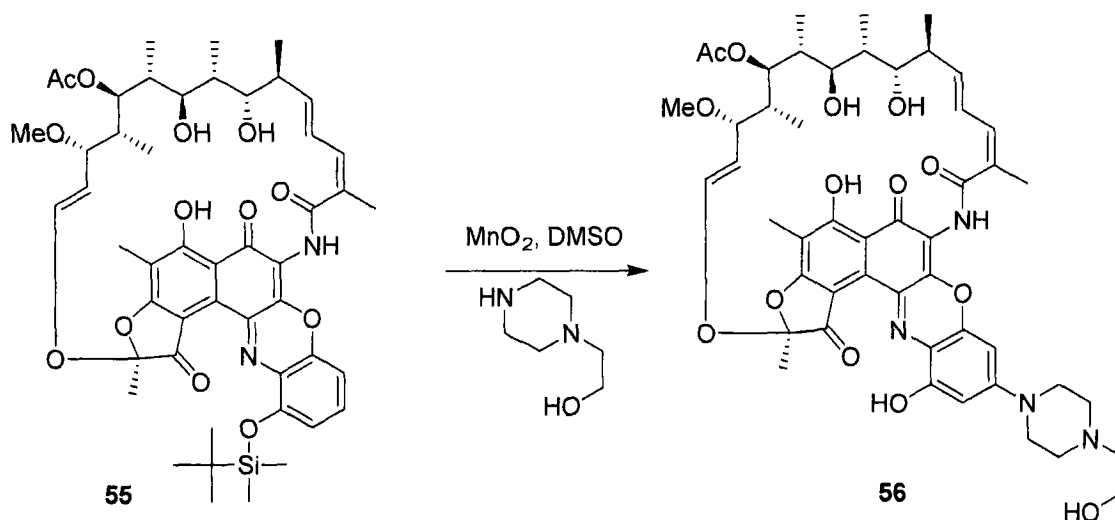
[0604] 21-O-(4-((3-(双(二乙基膦酰基)甲基)氨基甲酰基)丙酰氧基)丁酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(53): 在 Ar 下将 51 (260mg, 0.65mmol)、52 (643mg, 0.65mmol) 和 Cs₂CO₃ (212mg, 0.65mmol) 的 DMF (1ml) 溶液在室温下搅拌过夜。混合物用 CH₂Cl₂ (20ml) 稀释, 用水 (10ml) 洗涤, 再用盐水 (10ml) 洗

涤,经 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。粗产物无需进一步纯化就可用于下一步骤。

[0605] 21-O-(4-((3-(二磷酸基甲基)氨基甲酰基)丙酰氧基)丁酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-5'-(2-甲基丙基)-1-氧代利福霉素 XIV(54):在 -78°C ,将化合物 53(最大值 857mg,0.65mmol)溶于 20ml 无水二氯甲烷中。向该溶液中加入 2,6-二甲基吡啶 (3.8ml,32.5mmol),再加入溴代三甲基硅烷 (2.2ml,16.3mmol)。除去冷却浴,将混合物在室温下搅拌 20 小时以上。完全除去挥发物后,将残余物溶于 50ml 0.1N 盐酸和 10ml 乙腈混合物中,并在室温下搅拌 2 小时。在处理结束时,通过加入三乙胺将溶液调节至 pH 7。真空除去有机挥发物,冻干残余物。所得材料进行 C18 反相快速色谱,用 5% 乙腈 /30mM 三乙胺 / 二氧化碳水溶液 (pH 6.8) $\rightarrow$ 纯乙腈的线性梯度洗脱。对于含有产物的流分,真空除去乙腈,冻干所得水溶液,得到化合物 54(8.6mg, 双三乙胺盐形式,紫色固体)。LC/MS 纯度:97.0% (254nm)、96.4% (220nm)、97.6% (320nm)。MS(M+H) 1206.4。

[0606] 流程 17.3'-羟基苯并噁唑并利福霉素衍生物 56 的制备

[0607]

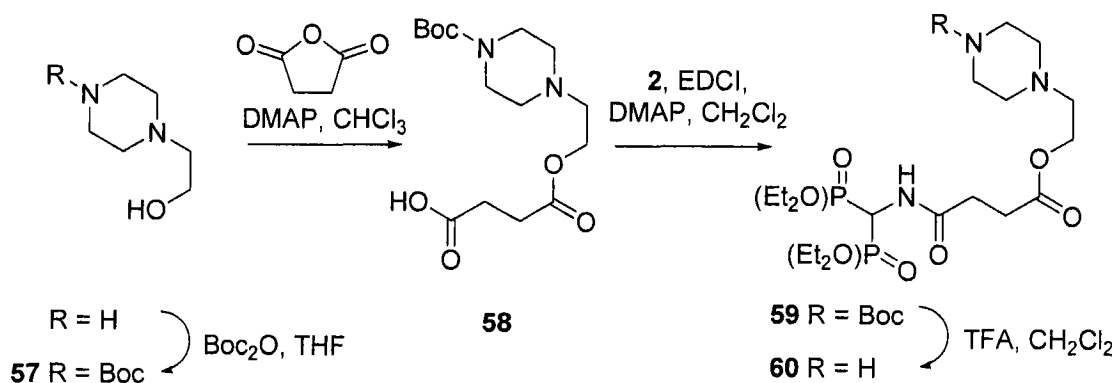


[0608] 1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-叔丁基二甲基甲硅烷基氧基-1-氧代利福霉素 VIII(化合物 37)的制备按照 Yamane 等 (Chem. Pharm. Bull. (1993), 41:148-155) 中所述的方法进行。

[0609] 1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII(56):向 1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-叔丁基二甲基甲硅烷基氧代-1-氧代利福霉素 VIII(化合物 55) (2.236g, 2.44mmol) 的 60ml DMSO 溶液中,加入 1-(2-羟乙基)哌嗪 (635mg, 4.88mmol) 和二氧化锰 (2.227g, 25.62mmol)。在 30 分钟内,混合物由红变蓝。在室温下搅拌过夜后,混合物通过硅藻土过滤并真空蒸发至原体积的一半。所得混合物倒入水中,用 CH_2Cl_2 萃取。有机萃取液用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥。蒸发后,残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (0% $\rightarrow$ 10% MeOH/ CH_2Cl_2 梯度),得到 56 (975mg, 43%, 蓝色固体)。LCMS 98.0% (254nm)、97.1% (220nm)、96.3% (320nm); $\text{C}_{49}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_{14}$ 的计算分子量:929, 实测值:929.2。

[0610] 流程 18.(4-(2-(哌嗪-4-基)乙氧基)-4-氧代-丁酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯的制备

[0611]



[0612] 4-(2-羟乙基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (57) : 向 1-(2-羟乙基)哌嗪 (3.0g, 23.0mmol) 的 THF 中加入二碳酸二叔丁酯 (5.5g, 25.3mmol)。将混合物搅拌 2 小时。真空蒸发溶剂至原体积的一半, 将混合物倒入水中, 用 CH_2Cl_2 萃取, 用盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥并浓缩, 得到浅黄色油状物 (5.3g, 定量)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.46 (s, 9H), 2.44-2.46 (m, 4H), 2.54-2.57 (m, 2H), 2.66 (m, $J = 5.3$, 1H), 3.42-3.45 (m, 4H), 3.62 (q, $J = 5.3$, 2H)。

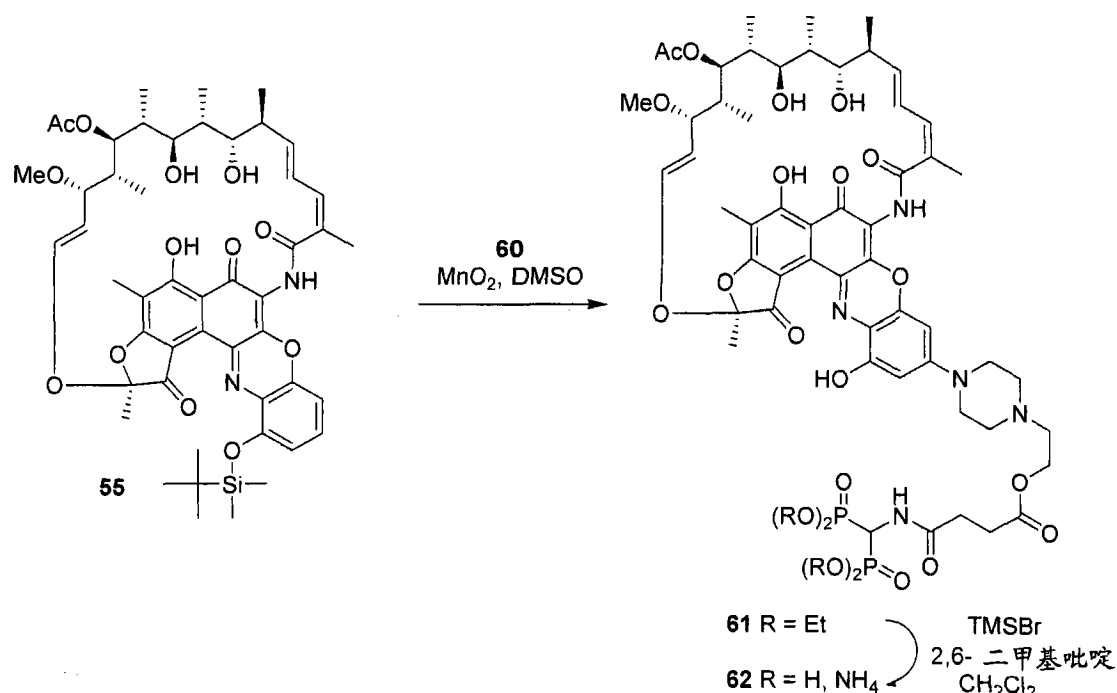
[0613] 1-(叔丁氧羰基)-4-(2-(4-羟基-4-氧代-丁酰氧基)乙基)哌嗪 (58) : 将化合物 57 (5.3g, 23.0mmol)、琥珀酸酐 (2.30g, 23.0mmol) 和 4-二甲氨基吡啶 (281mg, 2.30mmol) 溶于 CHCl_3 (14ml) 中, 搅拌 18 小时。溶液经真空浓缩后, 无需进一步纯化就可使用。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.42 (s, 9H), 2.54-2.60 (m, 8H), 2.72 (t, $J = 5.6$, 2H), 3.43-3.46 (m, 4H), 4.23 (t, $J = 5.5$, 2H)。

[0614] (4-(2-(1-(叔丁氧羰基)-哌嗪-4-基)乙氧基)-4-氧代-丁酰基-氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯 (59) : 向化合物 2 (3.0g, 9.9mmol) 和 58 (3.3g, 9.9mmol) 的 CH_2Cl_2 (50ml) 溶液中加入 EDC (2.08g, 10.9mmol) 和 4-二甲氨基吡啶 (121mg, 0.99mmol)。在 Ar 下将所得溶液在室温下搅拌 3 小时。将反应混合物倒入饱和 NaHCO_3 中, 分离各层, 水层用 CH_2Cl_2 萃取 2 次。合并的有机层用盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (0% $\rightarrow$ 10% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 的梯度) 得到浅黄色油状物, 其过一段时间就会固化 (4.5g, 74%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.33 (t, $J = 7.1$, 12H), 1.45 (s, 9H), 2.42-2.44 (m, 4H), 2.55-2.60 (m, 6H), 3.41-3.43 (m, 4H), 4.14-4.25 (m, 10H), 5.00 (dt, $J = 21.7, 10.1$, 1H), 6.18 (d, $J = 9.9$, 1H)。

[0615] (4-(2-(哌嗪-4-基)乙氧基)-4-氧代-丁酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯 (60) : 将化合物 59 (1.0g, 1.62mmol) 溶于 20% TFA/ CH_2Cl_2 (8ml) 溶液中。所得溶液在室温下搅拌, 直到没有原剩下 (TLC 监测)。真空除去挥发物。将 TFA 盐溶于 MeOH 中, 用 13cc Dowex 1X2 Cl^- 型树脂处理, 该树脂事先已用饱和 NaHCO_3 (3 次)、水 (3 次) 和 MeOH (3 次) 洗涤。过滤树脂, 浓缩滤液, 得到无色固体 (0.85g, 定量), 其无需进一步纯化就可用于下一步骤。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.29 (t, $J = 7.1$, 6H), 1.35 (t, $J = 7.1$, 6H), 2.65-2.74 (m, 4H), 3.22-3.24 (m, 2H), 3.44-3.46 (m, 4H), 3.56-3.59 (m, 4H), 4.06-4.23 (m, 8H), 4.38-4.41 (m, 2H), 5.06 (dt, $J = 21.6, 10.0$, 1H), 7.93 (d, $J = 10.1$, 1H)。

[0616] 流程 19.3' - 羟基苯并噁嗪并利福霉素二磷酸酯缀合物 62 的制备

[0617]

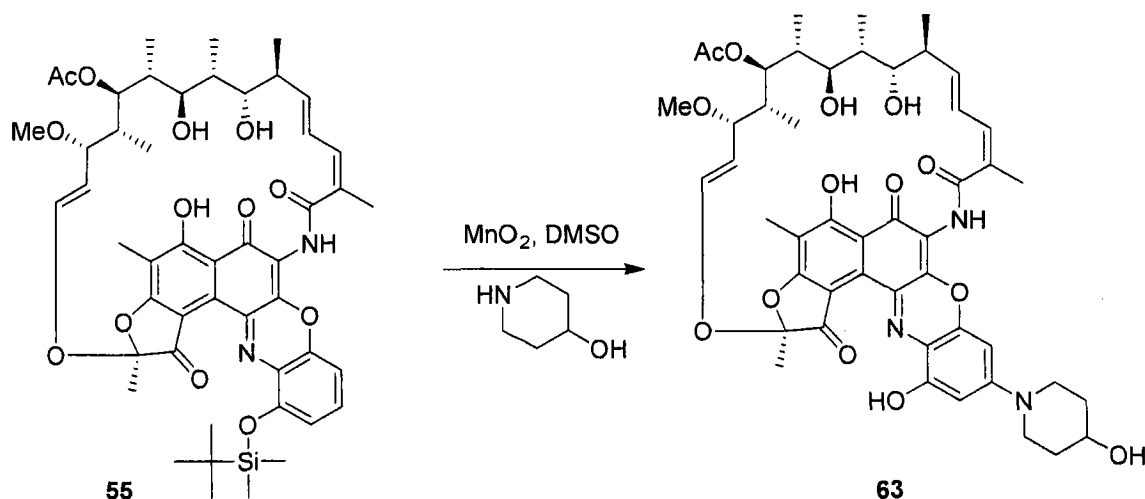


[0618] 3'-羟基苯并噁嗪并利福霉素二磷酸酯缀合物 61: 将化合物 60 (2.37g, 4.59mmol) 加入到 55 (2.8g, 3.06mmol) 的无水 DMSO (16ml) 溶液中。加入 NaHCO₃ (2.57g, 30.6mmol) 和 MnO₂ (2.66g, 30.6mmol)。在 Ar 下将混合物在 40℃ 搅拌 9 天。反应混合物用 CH₂Cl₂ 稀释, 大部分固体通过硅藻土过滤获取。固体用 CH₂Cl₂ 洗涤, 合并的有机层用半饱和盐水洗涤。分离有机层, 滤纸过滤以除去残留的细微黑色固体。滤液用水、盐水洗涤, 经 MgSO₄ 干燥。蒸发后, 残余物通过 SiO₂ 快速色谱法纯化 (0% → 10% MeOH/CH₂Cl₂ 梯度), 得到 61 (1.3g, 33%, 蓝色固体)。LCMS 纯度: 96.3% (254nm)、95.9% (220nm)、94.2% (320nm); C₆₂H₈₅N₅O₂₂P₂ 计算分子量: 1313, 实测值: 1312.0 (M-H)⁻。也回收了脱甲硅烷基的 37 (1.1g, 45%, 深红色固体)。

[0619] 3'-羟基苯并噁嗪并利福霉素二磷酸酯缀合物 62: 在氩气中, 在 -78℃, 向 61 (168mg, 0.13mmol) 和 2,6-二甲基吡啶 (594 μl, 5.11mmol) 的 CH₂Cl₂ (5ml) 溶液中, 滴加 TMSBr (337 μl, 2.55mmol)。移去冷却浴, 将混合物在室温下搅拌 24 小时。真空除去溶剂至干。残余物溶于 50mM NH₄OAc 水溶液 / AcOH 缓冲液 (pH 5) 中, 在室温下搅拌 18 小时, 冻干样品。粗制残余物通过反相快速色谱法纯化 (pH 5) (5% → 100% 乙腈 / 50mM NH₄OAc 水溶液 / AcOH 缓冲液的线性梯度)。将合并的纯流分浓缩并冻干, 得到 62 (120mg, 76%, 深蓝色二铵盐)。LCMS 纯度: 96.2% (254nm)、96.6% (220nm)、96.3% (320nm); C₅₄H₆₉N₅O₂₂P₂ 计算分子量: 1201, 实测值: 1200.3 (M-H)⁻。

[0620] 流程 20. 3'-羟基苯并噁嗪并利福霉素衍生物 63 的制备

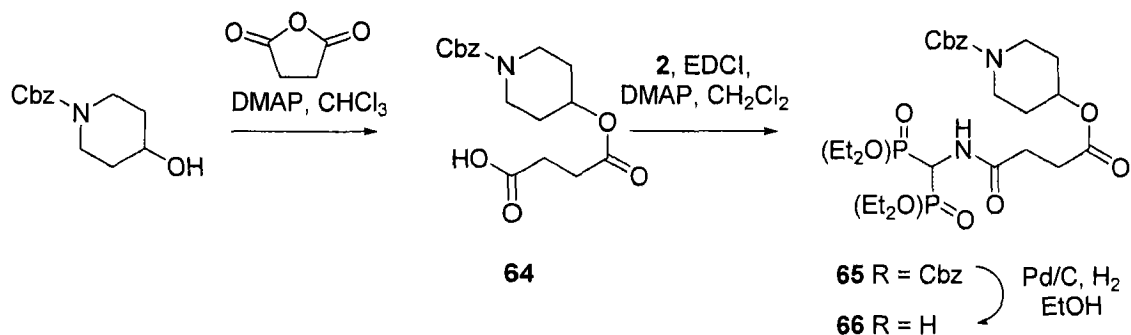
[0621]



[0622] 1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-羟基-1-哌啶基]-1-氧代利福霉素VIII (63): 向55 (0.60g, 0.65mmol) 的无水DMSO (10ml) 的搅拌溶液中加入4-羟基哌啶 (0.132g, 1.31mmol) 和 MnO_2 (0.57g, 6.56mmol)。混合物在室温下搅拌24小时。反应混合物用乙酸乙酯 (100ml) 稀释, 通过硅藻土过滤, 用乙酸乙酯 (100ml) 洗涤。合并的滤液依次用水 (2×75ml)、盐水 (2×75ml) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥并浓缩。残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (8% MeOH/ CH_2Cl_2), 得到63 (197mg, 33%, 蓝色固体)。LCMS纯度: 97.8% (254nm)、95.1% (220nm)、97.1% (320nm); $C_{48}H_{57}N_3O_{14}$ 计算分子量: 899, 实测值: 898 (M-H)。

[0623] 流程21. (4-(2-(1-(苄氧基羰基)-哌啶-4-基)乙氧基)-4-氧代-丁酰基-氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯的制备

[0624]



[0625] 3-((1-((苄氧基)羰基)哌啶-4-基氧基)羰基)丙酸 (64): 将4-羟基-1-哌啶甲酸苄酯 (1.0g, 4.25mmol)、琥珀酸酐 (0.425g, 4.25mmol) 和4-DMAP (52mg, 0.425mmol) 溶于 $CHCl_3$ (10ml) 中, 搅拌24小时。真空除去挥发物。加入 $NaHCO_3$ 水溶液 (100ml), 所得混合物用 Et_2O (2×50ml) 洗涤。水层用2N HCl 酸化至 $pH = 6 \sim 7$, 用 CH_2Cl_2 (2×60ml) 萃取。合并的有机萃取液用盐水 (60ml) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩, 得到化合物64 (768mg, 54%), 其无需进一步纯化就可使用。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 1.62 (m, 2H), 1.85 (m, 2H), 2.60-2.70 (m, 4H), 3.38 (m, 2H), 3.74 (m, 2H), 4.97 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 7.35 (m, 5H)。

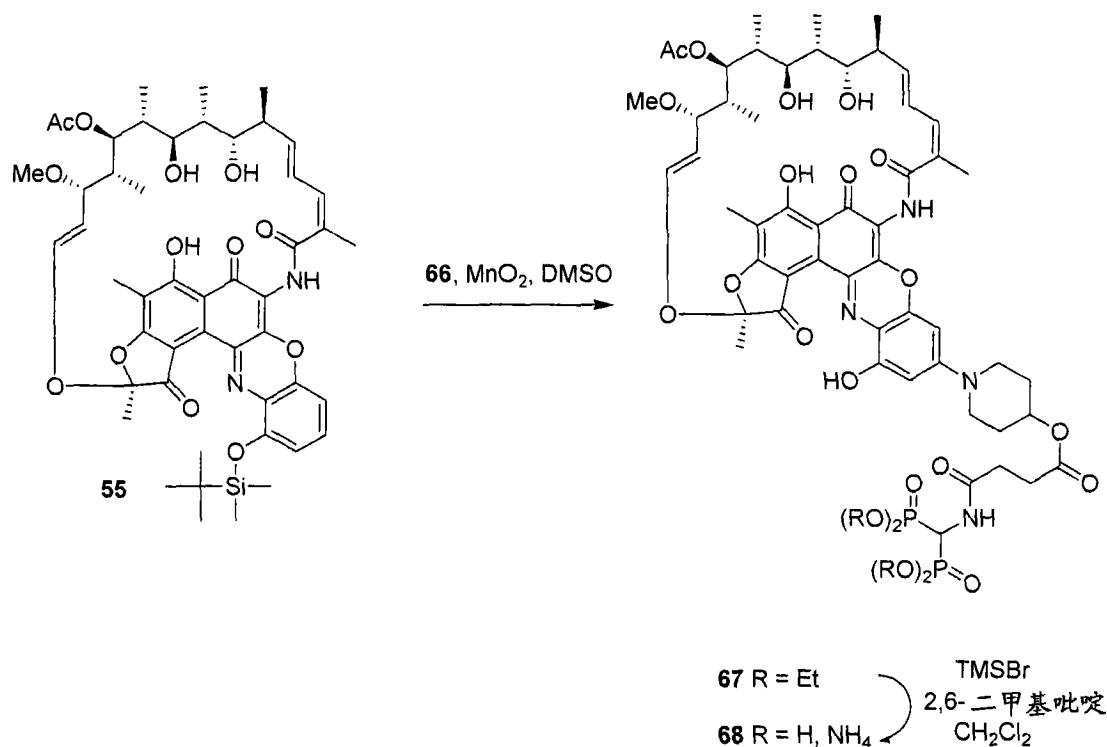
[0626] (4-(1-(苄氧基羰基)-哌啶-4-基氧基)-4-氧代-丁酰基-氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯 (65): 向化合物64 (0.76g, 2.26mmol) 和2 (0.687g, 2.26mmol) 的 CH_2Cl_2 (10ml) 的搅拌溶液中加入EDC (0.52g, 2.72mmol) 和4-DMAP (55mg, 0.45mmol)。在氮气下, 将所得溶液在室温下搅拌16小时。反应混合物用 CH_2Cl_2 稀释, 用 $NaHCO_3$ 水溶液

(2×50ml)、盐水 (50ml) 洗涤,再经 Na_2SO_4 干燥。蒸发后,残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (用 5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), 得到产物 65 (1.20g, 85%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.33 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 12H), 1.62 (m, 2H), 1.85 (m, 2H), 2.57–2.62 (m, 4H), 3.35 (m, 2H), 3.76 (m, 2H), 4.16 (m, 8H), 4.90–5.08 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 6.33 (d, $J = 9.8\text{Hz}$, 1H), 7.35 (m, 5H)。

[0627] (4-(哌啶-4-基)-4-氧代-丁酰基-氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯 (66): 向化合物 65 (1.20g, 1.93mmol) 的 EtOH (20ml) 溶液中加入 10% Pd/C (200mg), 在氢气氛围中将混合物搅拌 3.5 小时。通过硅藻土过滤催化剂,用乙醇洗涤,滤液浓缩至干,得到 66 (1.0g), 其无需进一步纯化就可用于下一步骤。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.33 (t, $J = 7.1\text{Hz}$, 12H), 1.82 (m, 2H), 2.08 (m, 2H), 2.64 (s, 4H), 3.02 (m, 2H), 3.20 (m, 2H), 4.16 (m, 8H), 4.90–5.08 (m, 2H), 6.88 (d, $J = 9.8\text{Hz}$, 1H)。

[0628] 流程 22.3' - 羟基苯并噁嗪并利福霉素二磷酸酯缀合物 68 的制备

[0629]



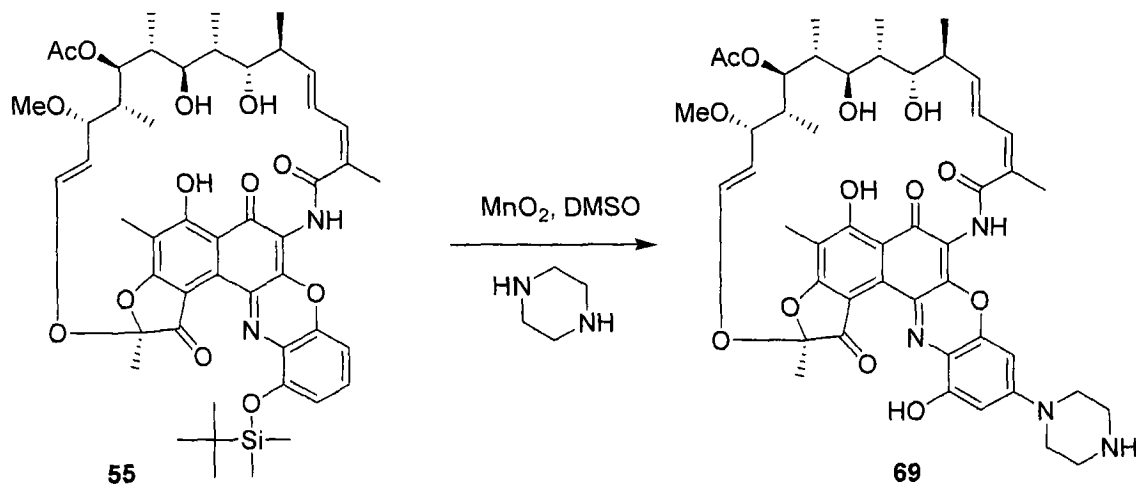
[0630] 3'-羟基苯并噁嗪并利福霉素二磷酸酯缀合物 67: 将 MnO_2 (1.45g, 16.66mmol) 加入到 55 (1.52g, 1.66mmol) 和化合物 66 (0.81g, 1.66mmol) 与无水 DMSO (20ml) 的搅拌溶液中。在氩气中,将混合物在室温下搅拌 4 天。反应混合物用 CH_2Cl_2 (50ml) 稀释,通过硅藻土过滤,再次用 CH_2Cl_2 (100ml) 洗涤,合并的滤液依次用水 (3×100ml) 和盐水 (2×100ml) 洗涤,经 Na_2SO_4 干燥并浓缩。残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (0%→5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 的梯度),得到 67 (0.42g, 19.7%, 蓝色固体)。LCMS: $\text{C}_{61}\text{H}_{82}\text{N}_4\text{O}_{22}\text{P}_2$ 计算分子量: 1284, 实测值: 1285 (M+H)。

[0631] 3'-羟基苯并噁嗪并利福霉素二磷酸酯缀合物 68: 在 -78°C , 向 67 (0.42g, 0.32mmol) 的 10ml 无水二氯甲烷溶液中加入 2,6-二甲基吡啶 (1.52ml, 13.08mmol), 再加入溴代三甲基硅烷 (0.86ml, 6.54mmol)。混合物在室温下搅拌 24 小时。除去溶剂后,将残余物溶于 8ml 50mM $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{AcOH}$ 缓冲液 (pH = 5) 中,并在室温下搅拌 20 小时,然后冻干。将残余物溶于水中,过滤除去不溶物。所得溶液进行 C 18 反相快速色谱,用 5% 乙腈 / 50mM

$\text{NH}_4\text{OAc}/\text{AcOH}$ 缓冲液 ($\text{pH} = 5$) $\rightarrow$ 纯乙腈的线性梯度洗脱。对于仅含产物的流分, 真空除去乙腈, 冻干所得水溶液, 得到化合物 68 (0.31g, 81%, 深蓝色固体)。LCMS 97.9% (254nm)、97.7% (220nm)、96.4% (320nm); $\text{C}_{53}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_{22}\text{P}_2$ 的计算分子量: 1172, 实测值: 1171 (M-H)。

[0632] 流程 23. 3' - 羟基苯并噁唑并利福霉素衍生物 69 的制备

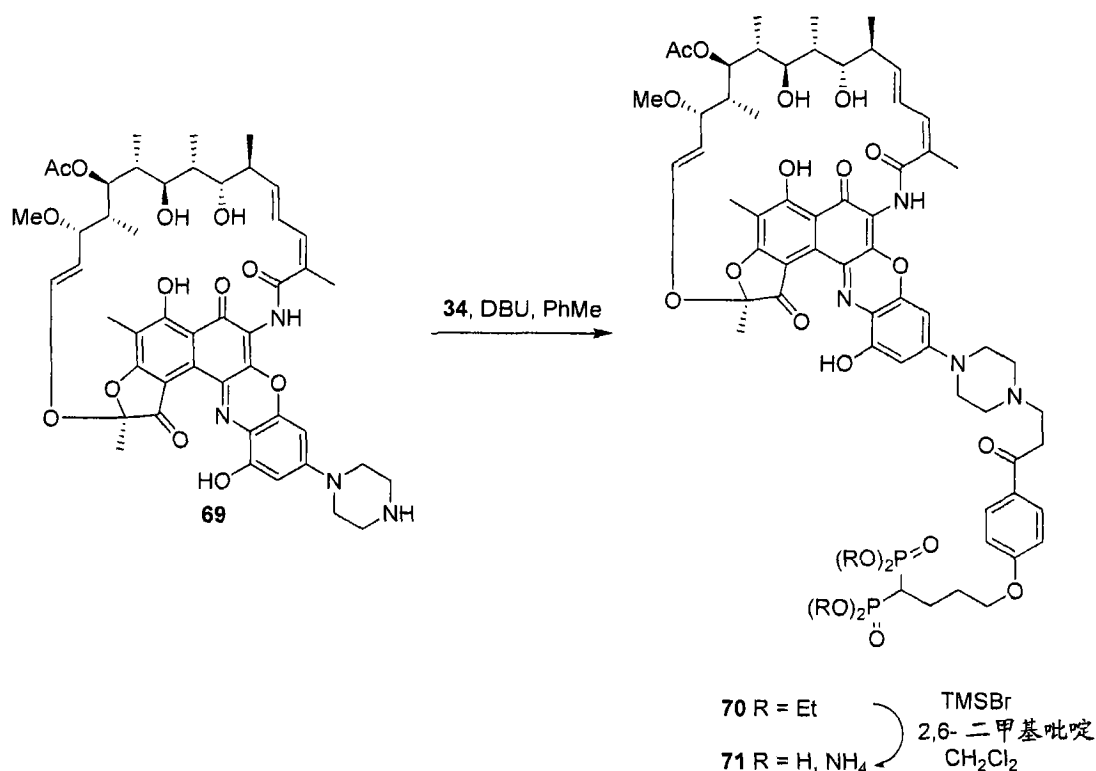
[0633]



[0634] 1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII (69): 向 55 (3.0g, 3.28mmol) 的无水 DMSO (60ml) 搅拌溶液中, 加入哌嗪 (1.13g, 13.12mmol) 和 MnO_2 (2.85g, 32.82mmol)。将混合物搅拌 48 小时, 用 CH_2Cl_2 (200ml) 稀释, 通过硅藻土过滤, 再次用 CH_2Cl_2 (200ml) 洗涤。合并的滤液依次用水 ($2 \times 300\text{ml}$) 和盐水 ($2 \times 200\text{ml}$) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥并浓缩。残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (0% $\rightarrow$ 20% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 的梯度洗脱), 得到 69 (2.28g, 78%, 蓝色固体)。LCMS 99.2% (254nm)、99.3% (220nm)、99.2% (320nm); $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{13}$ 计算分子量: 884, 实测值: 883 (M-H)。

[0635] 流程 24. 3' - 羟基苯并噁唑并利福霉素二磷酸酯缀合物 71 的制备

[0636]

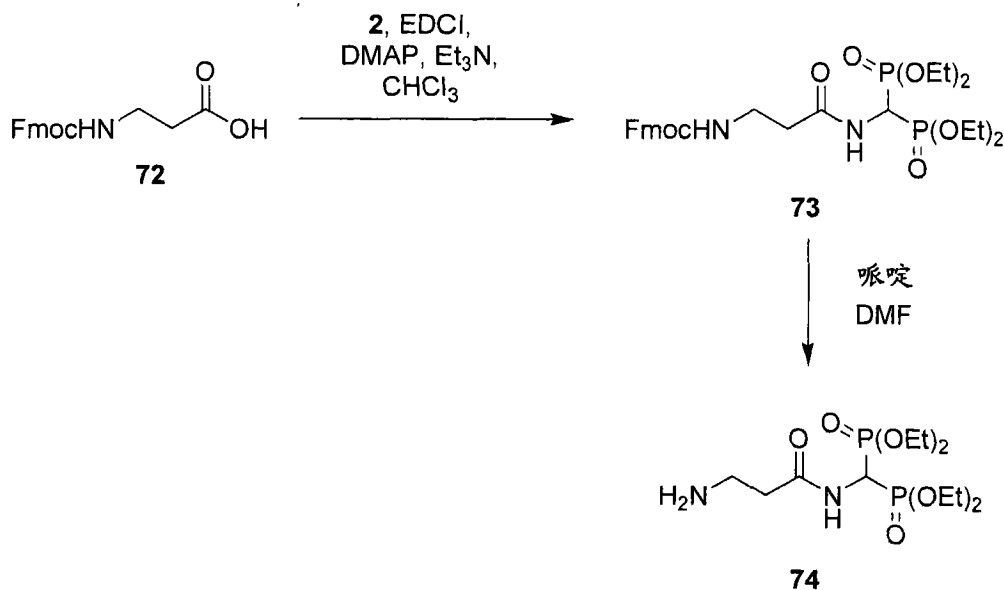


[0637] 3'-羟基苯并噁嗪并利福霉素二磷酸酯缀合物 70: 将化合物 69 (1.92g, 2.17mmol)、化合物 34 (1.03g, 2.17mmol) 和 DBU (0.714ml, 4.77mmol) 与 25ml 甲苯的混合物在室温下搅拌 16 小时, 然后减压除去挥发物。残余物溶于 CH₂Cl₂ (200ml) 中, 用饱和氯化铵水溶液 (2×80ml)、盐水 (1×80ml) 洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥并减压浓缩。通过硅胶快速色谱法纯化 (用 0-6% 甲醇 / 二氯甲烷的梯度洗脱), 得到产物 70 (1.92g, 65%)。LCMS: C₆₈H₉₀N₄O₂₁P₂ 计算分子量: 1360, 实测值: 1361 (M+H)。

[0638] 3'-羟基苯并噁嗪并利福霉素二磷酸酯缀合物 71: 将化合物 70 (1.92g, 1.41mmol) 溶于 25ml 无水二氯甲烷中。向该溶液中加入三乙胺 (9.83ml, 70.58mmol), 再加入溴代三甲基硅烷 (4.65ml, 35.29mmol)。混合物在室温下搅拌 23 小时。除去溶剂后, 将残余物溶于 70ml 0.1N 盐酸和 70ml 乙腈混合物中, 在室温下搅拌 3 小时, 然后用三乙胺中和。真空除去有机溶剂, 冻干残余物。将残余物溶于水, 过滤除去不溶物。所得滤液通过 C18 反相快速色谱法纯化, 用 0-40% 乙腈 / 30mM 三乙胺 / 二氧化碳水溶液 (pH 6.8) → 纯乙腈的线性梯度洗脱。对于含有产物的流分, 真空除去乙腈, 冻干所得水溶液, 得到化合物 71 (0.82g, 46%, 深蓝色固体)。LCMS 纯度: 96.0% (254nm)、92.1% (220nm)、95.5% (320nm); C₆₀H₇₄N₄O₂₁P₂ 计算分子量: 1248, 实测值: 1247 (M-H)。

[0639] 流程 25. (3-氨基丙酰基氨基) 亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯的制备

[0640]

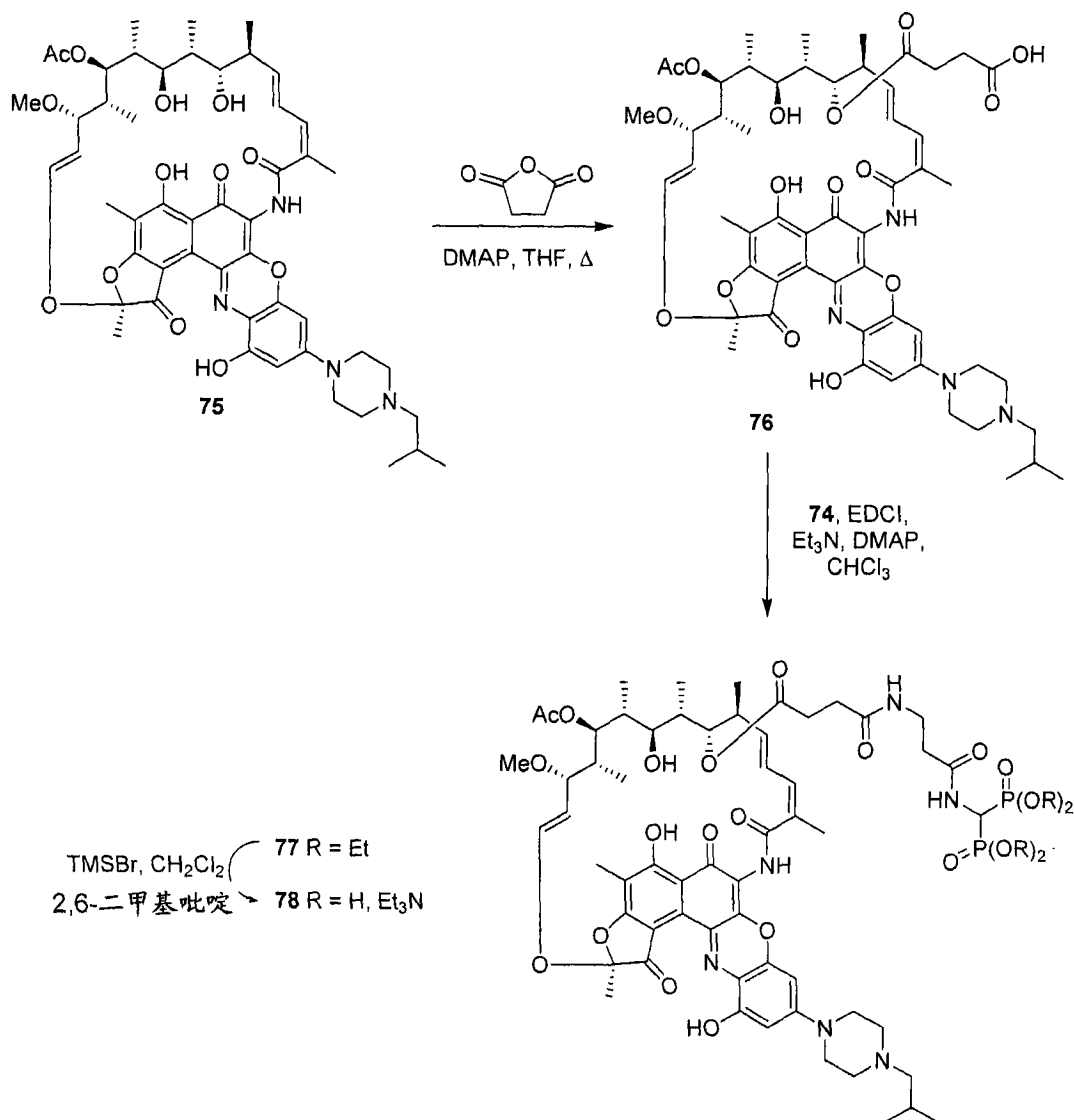


[0641] (3-(((9-芴-9-基)甲氧基)羰基氨基)丙酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯 (73): 向化合物 72 (200mg, 0.642mmol) 和 2 (195mg, 0.642mmol) 的无水无乙醇的 CHCl_3 (5ml) 溶液中, 加入 EDCI (147mg, 0.77mmol) 和 DIPEA (0.14ml, 0.77mmol)。在 Ar 下将所得溶液在室温下搅拌过夜。反应混合物浓缩至干, 残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (5% → 15% MeOH/ CH_2Cl_2 的梯度), 得到无色胶状物 (240mg, 65%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.30-1.34 (m, 12H), 2.50-2.24 (m, 2H), 3.51-3.54 (m, 2H), 4.14-4.24 (m, 8H), 4.36 (d, J = 7.0Hz, 2H), 5.03 (dt, J = 22.0, 9.9Hz, 1H), 5.66 (br s, 1H), 6.21 (br s, 1H), 7.30 (t, J = 7.3Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.7Hz, 2H), 7.59 (d, J = 7.3Hz, 2H), 7.75 (d, J = 7.3Hz, 2H); ^{31}P NMR (162MHz, CDCl_3) : δ 17.46。

[0642] (3-氨基丙酰基氨基)亚甲基-1,1-二磷酸四乙酯 (74): 将哌啶 (1.5ml, 15.15mmol) 加入到化合物 73 (240mg, 0.402mmol) 的 DMF (3.5ml) 溶液中。在 Ar 下将所得溶液在室温下搅拌 1 小时。反应混合物浓缩至干, 残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (5% → 15% MeOH/ CH_2Cl_2 的梯度), 得到无色胶状物 (78mg, 64%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.27-1.31 (m, 12H), 2.38-2.40 (m, 3H), 3.00 (m, 2H), 4.11-4.21 (m, 8H), 5.04 (t, J = 22.0Hz, 1H), 8.20 (bs, 1H); ^{31}P NMR (162MHz, CDCl_3) : δ 17.82。

[0643] 流程 26. 利福拉齐二磷酸酯缀合物 78 的制备

[0644]



[0645] 按照 Yamane 等 (Chem. Pharm. Bull. (1993), 41 :148-155) 中所述的方法, 制备 1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII (化合物 75)。

[0646] 21-O-(3-羧基丙酰基)-1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII (76): 向化合物 75 (400mg, 0.425mmol) 的无水 THF (50ml) 溶液中, 加入琥珀酸酐 (376mg, 3.74mmol) 和 DMAP (60mg, 0.49mmol)。所得溶液加热回流过夜。反应混合物浓缩至干, 残余物通过 SiO₂ 快速色谱法纯化 (50/45/5, 己烷 /EtOAc/MeOH), 得到深蓝色固体 (323mg, 73%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ -0.35 (d, J = 7.0Hz, 3H), -0.06 (d, J = 7.0Hz, 3H), 0.90-0.99 (m, 15H), 1.62 (m, 1H), 1.73-1.77 (m, 2H), 1.82 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.14- (m, 4H), 2.31 (s, 3H), 2.49-2.61 (m, 7H), 2.75 (m, 1H), 2.99 (s, 3H), 3.35 (d, J = 7.3Hz, 1H), 3.53 (bs, 3H), 4.69 (d, J = 10.6Hz, 1H), 4.96 (d, J = 11.0Hz, 1H), 5.04 (dd, J = 12.9, 7.3Hz, 1H), 5.97 (dd, J = 16.1, 7.3Hz, 1H), 6.19-6.26 (m, 2H), 6.34 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.83 (dd, J = 16.1, 11.0Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 10.23 (s, 1H); C₅₅H₆₈N₄O₁₆ 计算分子量: 1041, 实测值: 1042 (M+H)⁺。

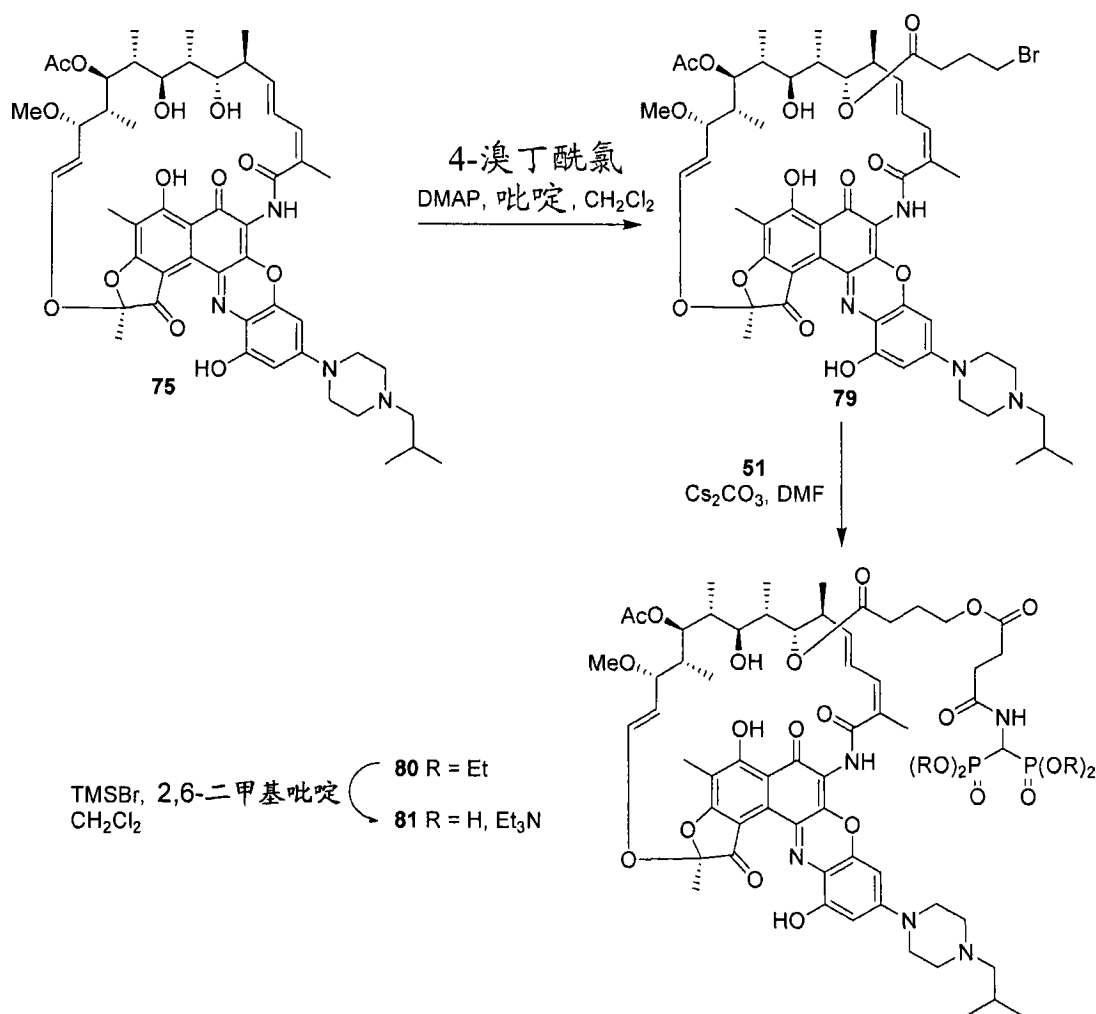
[0647] 21-O-(3-(2-((双(二乙基磷酰基)甲基)氨基甲酰基)乙基氨基甲酰基)丙

酰基)-1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII(77):向化合物 76(268mg, 0.257mmol) 和 74(78mg, 0.257mmol) 的无水无乙醇的 CHCl_3 (10ml) 溶液中, 加入 EDCI(100mg, 0.514mmol) 和 DMAP(63mg, 0.514mmol)。在 Ar 下将所得溶液在室温下搅拌过夜。反应混合物浓缩至干, 残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化(洗脱液为 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}/\text{MeOH}$, 50/40/10), 得到蓝色固体(52mg, 15%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ -0.37(d, $J = 7.0\text{Hz}$, 3H), -0.03(d, $J = 7.0\text{Hz}$, 3H), 0.90-0.99(m, 15H), 1.33(m, 12H), 1.52-1.75(m, 2H), 1.80(s, 3H), 1.95(s, 3H), 2.09-2.79(m, 28H), 2.97(s, 3H), 3.32-3.69(m, 10H), 4.19(m, 8H), 4.75(d, $J = 11.0\text{Hz}$, 1H), 4.99-5.14(m, 3H), 5.97(dd, $J = 16.1, 7.3\text{Hz}$, 1H), 6.23(dd, $J = 22.0, 11.0\text{Hz}$, 2H), 6.31(s, 1H), 6.45(s, 1H), 6.88-6.92(m, 3H), 7.03(m, 1H), 7.68(s, 1H), 10.11(s, 1H)。 ^{31}P NMR(162MHz, CDCl_3): δ 18.21; $\text{C}_{67}\text{H}_{94}\text{N}_6\text{O}_{22}\text{P}_2$ 计算分子量: 1396, 实测值: 1398.2(M+2H) $^-$ 。

[0648] 21-0-(3-(2-((二磷酸基甲基)氨基甲酰基)乙基氨基甲酰基)丙酰基)-1', 4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII(78):将化合物 77(50mg, 0.0358mmol) 溶于 10ml 二氯甲烷中, 加入 0.21ml (1.789mmol) 2,6-二甲基吡啶, 再加入 116 μl (0.8945mmol) TMSBr。在室温下将所得红色混合物搅拌至少 48 小时并浓缩至干。高真空度干燥至少 120 分钟后, 将固体材料溶于 2.15ml 0.1N HCl 和 2.5ml 乙腈的混合物中, 在室温下搅拌 2 小时, 此时得到澄清溶液。加入 0.05ml 三乙胺碱化(终 pH = 7.0)后, 真空下小心除去有机挥发物, 滤出不溶物。冻干滤液, 将残余物加到 Biotage® 自动快速色谱系统的 C18 柱上, 用 15 倍柱体积的 10-60% MeCN/30mM 三乙基碳酸氢铵缓冲液(pH = 6.5)梯度洗脱, 得到 78(15mg, 30%, 为双三乙铵盐, 深蓝色固体)。 ^1H -NMR(400MHz, CDCl_3): 关键信号 δ -0.57(bs, 3H), -0.38(bs, 3H), 0.88(s, 6H), 1.16(t, 18H), 3.05(q, 12H), 4.20(t, 1H); ^{31}P NMR(162MHz, CDCl_3): δ 14.02; LCMS 纯度: 99.0% (254nm), 98.5% (220nm), 99.1% (320nm); $\text{C}_{59}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_{22}\text{P}_2$ 计算分子量: 1284, 实测值: 1283.2(M-H) $^-$ 。

[0649] 流程 27. 利福拉齐-二磷酸酯缀合物 81 的制备

[0650]



[0651] 21-O-(4-溴丁酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII(79):将4-溴丁酰氯(2.18ml,18.82mmol)滴加到利福拉齐(rifalzil)(11.80g,12.55mmol)、吡啶(3.04ml,37.65mmol)和DMAP(153mg,1.25mmol)与二氯甲烷(150ml)的冷却(0°C)溶液中。在环境温度下搅拌16小时后,反应混合物用二氯甲烷(800ml)稀释,依次用水($2\times 500\text{ml}$)和盐水($2\times 500\text{ml}$)洗涤,经 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩至干。残余物通过硅胶色谱法纯化(用60-100%乙酸乙酯/己烷、再用1-5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 洗脱),得到79(12.40g,收率90%)。 $\text{C}_{55}\text{H}_{69}\text{BrN}_4\text{O}_{14}$ 计算分子量:1090,实测值:1091(M+H)。

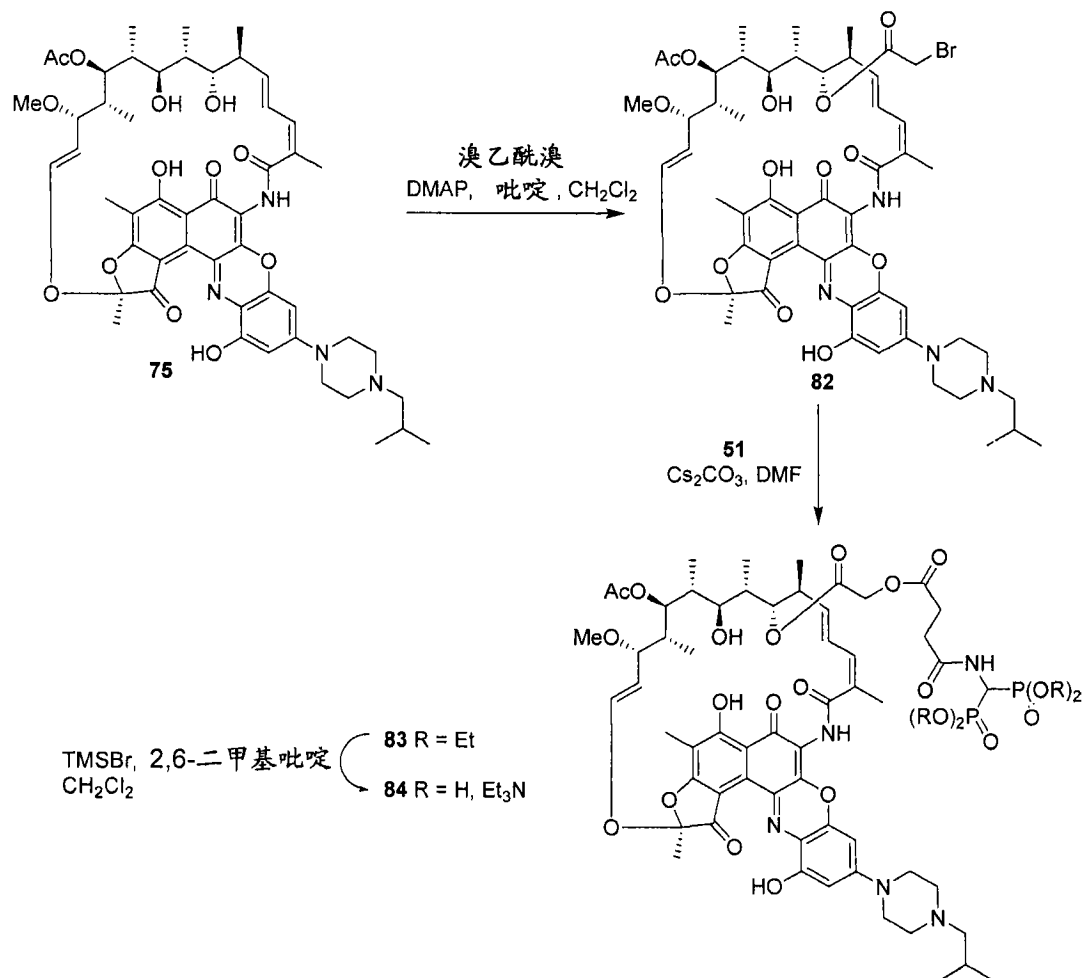
[0652] 21-O-(4-((3-(双(二乙基膦酰基)甲基)氨基甲酰基)丙酰氧基)丁酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII(80):将79(12.40g,11.37mmol)、51(4.58g,11.37mmol)和 Cs_2CO_3 (3.70g,11.37mmol)与无水DMF(150ml)的混合物在室温下搅拌16小时。反应混合物用水稀释,用乙酸乙酯($2\times 700\text{ml}$)萃取。合并的有机萃取液用盐水($2\times 700\text{ml}$)洗涤,经 Na_2SO_4 干燥并浓缩至干。残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化(用5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$),得到产物80(9.20g,收率57%)。LCMS: $\text{C}_{68}\text{H}_{95}\text{N}_5\text{O}_{23}\text{P}_2$ 计算分子量:1411,实测值:1412(M+H)。

[0653] 21-O-(4-((3-(二膦酰基甲基)氨基甲酰基)丙酰氧基)丁酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII(81):在氩气下,在 -78°C ,向80(9.20g,6.52mmol)和2,6-二甲基吡啶(30.37ml,

260.80mmol) 的 CH_2Cl_2 (180ml) 溶液中, 滴加溴代三甲基硅烷 (17.21ml, 130.40mmol)。移除冷却浴, 将混合物在室温下搅拌 24 小时。真空除去挥发物至干。残余物溶于 240ml 50mM NH_4OAc 水溶液 / AcOH 缓冲液 (pH 5) 中, 在室温下搅拌 18 小时, 然后冻干样品。所得材料进行 C18 反相快速色谱, 用 0 → 100% 乙腈 / 50mM NH_4OAc / AcOH 缓冲液 (pH = 5) 线性梯度洗脱。合并含有产物的流分, 真空除去乙腈, 冻干所得水溶液, 得到化合物 81 (5.30g, 收率 62%, 深蓝色固体)。LCMS: 94.2% (254nm)、94.2% (220nm)、94.2% (320nm); $\text{C}_{60}\text{H}_{79}\text{N}_5\text{O}_{23}\text{P}_2$ 计算分子量: 1299, 实测值: 1298 (M-H)。

[0654] 流程 28. 利福拉齐-二磷酸酯缀合物 84 的制备

[0655]



[0656] 21-O-(2-溴乙酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII (82): 将溴乙酰溴 (37 μl , 0.42mmol) 滴加到在冰浴中冷却的利福拉齐 (200mg, 0.21mmol)、DMAP (31mg, 0.25mmol) 的二氯甲烷 (10ml) 溶液中。在环境温度下搅拌 16 小时后, 反应混合物用二氯甲烷 (800ml) 稀释, 依次用水 (2×500ml) 和盐水 (2×500ml) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥并浓缩至干。残余物通过硅胶色谱法纯化 (依次使用 60-100% 乙酸乙酯 / 己烷、2-6% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), 得到 79 (200mg, 收率 88%)。 $\text{C}_{55}\text{H}_{69}\text{BrN}_4\text{O}_{14}$ 计算分子量: 1062, 实测值: 1063 (M+H)。

[0657] 21-O-(2-((3-(双(二乙基膦酰基)甲基)氨基甲酰基)丙酰氧基)乙酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII (83): 将 82 (200mg, 0.18mmol)、51 (76mg, 1.88mmol) 和 Cs_2CO_3 (61.4mg,

1.88mmol) 与无水 DMF (8ml) 的混合物在室温下搅拌 3 小时。反应混合物用二氯甲烷 (80ml) 稀释,用水 (2×50ml) 和盐水 (60ml) 洗涤,经 Na_2SO_4 干燥并浓缩至干。残余物通过 SiO_2 快速色谱法纯化 (用 2→6% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), 得到产物 83 (140mg, 收率 54%)。LCMS: $\text{C}_{66}\text{H}_{91}\text{N}_5\text{O}_{23}\text{P}_2$ 计算分子量: 1383, 实测值: 1384 (M+H)。

[0658] 21-O-(2-((3-(二磷酸基甲基)氨基甲酰基)丙酰氧基)乙酰基)-1',4-二脱氢-1-脱氧-1,4-二氢-3'-羟基-5'-[4-(2-甲基丙基)-1-哌嗪基]-1-氧代利福霉素 VIII (84): 在氩气下, 在 -78°C , 向 83 (140mg, 0.10mmol) 和 2,6-二甲基吡啶 (0.47ml, 4.0mmol) 的 CH_2Cl_2 (10ml) 溶液中, 滴加溴代三甲基硅烷 (0.26ml, 20.0mmol)。除去冷却浴, 将混合物在室温下搅拌 24 小时。真空除去挥发物至干。残余物溶于 10ml 50mM NH_4OAc 水溶液 / AcOH 缓冲液 (pH 5) 中, 在室温下搅拌 16 小时, 冻干样品。所得材料通过 C18 反相快速色谱法纯化, 用 0→100% 乙腈 / 50mM NH_4OAc / AcOH 缓冲液 (pH = 5) 线性梯度洗脱。合并含有产物的流分, 真空除去乙腈, 冻干所得水溶液, 得到化合物 84 (50mg, 收率 39%, 深蓝色固体)。LCMS: 95.8% (254nm)、96.0% (220nm)、96.3% (320nm); $\text{C}_{58}\text{H}_{75}\text{N}_5\text{O}_{23}\text{P}_2$ 计算分子量: 1271, 实测值: 1270 (M-H)。

[0659] 实施例 2: 体外抗菌活性和细胞毒性的测定

[0660] 体外抗菌活性

[0661] 按照 NCCLS (M26-A) 所提出的指南, 测定金黄色葡萄球菌菌株对已知抗生素和合成化合物的敏感性。将化合物在 DMSO 中连续稀释 2 倍, 转移到调节阳离子的 Mueller Hinton 肉汤 (CAMHB; Becton Dickinson) 中。在 96 孔微量滴定板中, 将在 CAMHB 中稀释的 50 μl 化合物与在 CAMHB 中稀释的 100 μl 细菌混合。测定中微生物的终浓度为 5×10^5 c.f.u./ml, 而测定中 DMSO 的终浓度为 1.25%。一式两份进行测定, 并在 37°C 孵育 18 小时。所报道的抑制可见生长的化合物最低浓度就是最小抑制浓度 (MIC)。

[0662] 也在血清存在下进行敏感性测定实验。按照以下改进的敏感性测定的类似方法, 进行这些实验。将在 CAMHB 中稀释的 75 μl 化合物与来自任何给定来源的 100% 血清 (市售混合小鼠血清 (MS) 和人血清 (HS), Equitech-Bio Inc.) 中稀释的 75 μl 细菌混合, 或者与在 8% 纯化人血清白蛋白 (HSA) (Calbiochem) 中稀释的 75 μl 细菌混合。测定中的动物血清终浓度为 50%, 而测定中的纯化人血清白蛋白终浓度为 4%; 所有其它成分浓度都与敏感性测定所述相同。数据归纳于下表 1。

[0663] 表 1: 细菌对所选化合物的抗菌敏感性 (最小抑制浓度, 单位为 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

[0664]

化合物	菌种和菌株								
	金黄色葡萄球菌								大肠杆菌
	RN4220	BK85 ^a	ATCC 43300 ^b	ATCC 13709	ATCC 13709 ^c	ATCC 13709 + 50% 小鼠 血清	ATCC 13709 + 50% 人 血清	ATCC 13709 + 50% 大鼠 血清	LBB925 ^d
利福平	0.008	0.008	0.008	0.008	>128	0.125	0.062	0.125	8
利福布汀 (17)	0.016	0.031	0.016	0.031	-	0.062	0.031	0.031	4
利福拉齐 (75)	0.00048	0.001	0.001	0.001	16	0.032	0.032	0.0078	16
9	0.016	0.016	0.016	0.016	-	0.062	0.062	0.062	16
11	0.25	0.25	0.25	0.125	-	0.25	0.25	0.25	32
21	32	16	16	16	-	-	-	-	>128
30	1	0.5	0.5	1	-	1	1	0.25	1
36	1	1	1	1	>128	2	2	1	128
39	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	128
45	64	64	64	32	>128	128	64	-	>128
50	0.25	0.25	0.25	0.25	>128	0.125	0.125	0.032	16
54	64	64	64	64	>128	>128	>128	>128	>128
56	0.00025	-	0.00025	0.00025	-	0.002	0.001	0.002	8
62	0.0078	0.0078	0.0078	0.0039	>128	0.032	0.032	0.0156	>128
63	0.00048	0.00048	0.00048	0.00048	2	0.0156	0.0078	0.032	8
68	0.25	0.25	0.0625	0.0625	>128	1	1	2	64
69	-	0.00024	-	0.00048	-	0.0019	0.0019	0.0019	4
71	0.0039	0.0019	0.0019	0.0019	128	0.032	0.032	0.032	>128
78	16	16	8	8	>128	>128	>128	>128	>128
81	0.001	0.001	0.001	0.001	>128	0.0625	0.125	0.03125	>128
84	1	1	1	1	>128	16	16	1	>128

[0665] a: 氟喹诺酮抗性 MRSA。b: 氟喹诺酮敏感性 MRSA。c: 新生霉素和利福平抗性变异株。d: tolC 突变株。

[0666] 可以大致推断二磷酸化前体药物 11、21、30、36、39、45、50、54、68、78 和 84 所具有的抗菌活性至少在数量级上要比母体药物弱。事实上, 在 39、45、54 和 78 的情况下活性几乎完全丧失, 这表明引入二磷酸化部分对分子的抗菌特性不利。其它前体药物 62、71 和 81 得到非常低的 MIC, 这可能是在实验期间二磷酸化部分被切除并释放 活性母体抗菌药物的结果。前体药物 36、39、45、50、54、62、68、71、78、81 和 84 完全缺乏针对金黄色葡萄球菌 ATCC13709 的利福平抗性变异株的活性, 这证明这些化合物不能通过替代作用机制起到抗菌活性。表 1 也表明母体抗微生物分子 9、56、63、69、利福平、利福布汀和利福拉齐都显示出抗菌活性, 其范围彼此相同。

[0667] 血清对 MIC 值的影响在母体药物和前体药物之间具有良好相关性。对于利福平、尤其是苯并噁嗪并利福霉素衍生物 (利福拉齐和化合物 56、63 和 69), 在 50% 小鼠或大鼠血清存在下, MIC 显著增加 (> 4x)。对于苯并噁嗪并利福霉素前体药物 (62、68、71、78、81

和 84) 而言是同样的。另外,血清对化合物 11、30、36、39、45、50 和 54 的 MIC 没有影响,这表明可能不需要血清水解酶的参与,或者血清水解酶可能不负责切割溶液中的这些前体药物。

[0668] 实施例 3:化合物与骨粉的体外结合以及随后母体药物的再生

[0669] 骨粉结合

[0670] 用微生物学测定法进行检测,确定了实施例 1 的分子结合骨粉的能力。将各个化合物溶于 PBS 并以 1mg/ml 浓度重悬于 10mg/ml 骨粉 (Now Foods, Bloomingdale, Illinois, USA) 浆液的 PBS 中。将药物 / 前体药物与骨粉的悬浮液在 37℃ 孵育 1 小时,让其结合,在 13000rpm 离心 2 分钟,回收上清液。骨粉沉淀再用 1ml PBS+2% DMSO 洗涤 3 次。通过以下微生物学测定法检测上清液中前体药物的含量:将指示菌株 (金黄色葡萄球菌 K1758) 分离的菌落重悬于 0.85% 盐水中,直至 OD600 = 0.1,在调节阳离子的 Miller Hinton 琼脂 (CAMHA) 板上划线。将已知体积的上清液加入小碟中,让其干燥。将小碟放入已接种的 CAMHA 平板中。平板在 37℃ 孵育 18 小时,然后测定小碟所产生的抑制区直径。从用作各实验参考的已知含量的标准曲线推断出前体药物含量。

[0671] 该实验需要前体药物具有低 MIC,以便得到满意的检出限。因此

[0672] 用该方法无法测定 21 和 39 的结合。

[0673] 当用于化合物 11、30、36、45、50、62、68、71、78、81 和 84 时,体外结合实验显示 > 90%、通常 > 95% 的各化合物与骨粉结合,如表 2 所示。

[0674] 这证明骨材料能非常有效地从溶液中除去二磷酸化前体药物。结果的确支持使用二磷酸 (包括酯和盐) 作为介导物用于骨递送 (bonedelivery)。有理由相信,该方法所检测到的未结合材料部分并非二磷酸化前体药物,而是污染或再生的母体药物。然而,也可能与骨质的结合程度反映了骨吸收 / 吸附的动力学。

[0675] 从与骨粉结合的前体药物中再生药物

[0676] 前体药物在感染部位释放活性实体的能力对体内应用至关重要。这可通过体外测定药物从结合骨质的前体药物中释放出来而预测。

[0677] 母体药物从磷酸化前体药物“再生”的数量测定如下。上述实验中经洗涤的结合骨粉的前体药物重悬于 400 μ l PBS+2% DMSO 或 400 μ l 50% (v/v 的 PBS+2% DMSO) 人血清或大鼠血清中。悬液在 37℃ 孵育过夜,在 13,000rpm 离心 2 分钟,回收上清液。采用前述用于前体药物本身的微生物学测定法,检测上清液中再生的母体药物的数量。前体药物的数量可根据用于各实验的参考的已知含量的母体药物的标准曲线而推断出来。该生物测定所检测到的再生药物含量得到 MIC 的支持。孵育过夜后, PBS 或血清中的药物再生百分率 (表 2) 根据结合的前体药物数量和再生药物数量间的差异来推断 (未显示)。

[0678] 表 2:二磷酸化利福霉素前体药物的骨结合并在与骨结合后向母体药物的转化率 (表示为 24 小时孵育后转化 % 前体药物)

[0679]

化合物	母体	骨结合(%)	培养基	转化率(%)
11	9	95	PBS	0.97
			50% 人血清	1.01
			50% 大鼠血清	1.01
21	利福布汀	??	PBS	< lod
			50% 人血清	nd
			50% 大鼠血清	0.02
30	利福布汀	90	PBS	0.07
			50% 人血清	0.05
			50% 大鼠血清	0.07
36	利福布汀	99.4	PBS	0.38
			50% 人血清	0.25
			50% 大鼠血清	0.38
39	利福布汀	??	PBS	??
			50% 人血清	??
			50% 大鼠血清	??
45	利福布汀	99.8	PBS	< lod
			50% 人血清	-
			50% 大鼠血清	0.002
50	利福布汀	96.8	PBS	2.65
			50% 人血清	nd
			50% 大鼠血清	2.68
54	利福布汀	??	PBS	??
			50% 人血清	nd
			50% 大鼠血清	??
62	56	99.8	PBS	0.21
			50% 人血清	0.86

[0680]

			50% 大鼠血清	0.91
68	63	99.9	PBS	0.02
			50% 人血清	nd
			50% 大鼠血清	0.24
71	69	99.9	PBS	0.1
			50% 人血清	0.46
			50% 大鼠血清	0.38
78	利福拉齐	99.9	PBS	< lod
			50% 人血清	nd
			50% 大鼠血清	0.01
81	利福拉齐	94.8	PBS	1.98
			50% 人血清	nd
			50% 大鼠血清	2.50
84	利福拉齐	99.8	PBS	< lod
			50% 人血清	nd
			50% 大鼠血清	0.12

[0681] < lod :低于检出限。nd :未检测。?? :用现有技术无法检测。

[0682] 这些数据表明,化合物 21、39、45、78 和 84 一旦与骨结合后就不能再生其相应的母体药物,因此预测这些化合物在体内没有任何明显活性。在这些条件下,其它前体药物可释放明显数量的母体利福霉素抗菌药物。比较前体药物 11 和 62 的再生率 - 具有明显再生率 - 一方面,68- 仅稍微再生 - 而 39- 明显不再生 - 证明连接基团连接点的重要性。这些前体药物利用特定的琥珀酰胺酯作为连接基团,其过一段时间环化为母体琥珀酰亚胺,环化反应在涉及受阻酯的情况下变得更缓慢。二磷酸化部分与切割点之间的距离也很重要。因此,一方面比较结合骨的前体药物 30 的裂解率,另一方面比较 36 和 71 的裂解率,表明 30 中通向二磷酸(包括酯和盐)的链越长,对裂解率的影响越不利。

[0683] 此外,前体药物 11、21、30、36、45、50 和 81 的母体药物的再生率明显不受培养基的影响,表明化学裂解对母体利福霉素的释放已足够,酶促辅助过程既不需要,而且在测定的血清条件下也未体现(数据未显示)。另一方面,与 PBS 相比,在血清存在下,62、68、71、78 和 84 转化成其母体药物的转化率明显加快。这并不意味着具有生物催化作用,以及具有潜在的其它变化,例如培养基的影响。另外,在一方面比较 62 和 68,而在另一方面比较 9 表明,血清对携带相同连接基团的前体药物的裂解率具有不同影响。比较 36 和 71 也可得出类似结论。这进一步强调了各药物 - 连接基团组合的独特性决定裂解过程的性质(对血清酯酶需求、裂解速率)。

[0684] 实施例 4 :在大鼠骨感染模型中,对利福霉素抗菌药及其二磷酸化前体药物的预

防功效的比较

[0685] 为了测定利福霉素衍生的抗菌药二磷酸化前体药物的体内活性与其非二磷酸化母体的比较,化合物 11 及其母体药物 9,化合物 21、30、36、50 及其母体药物利福布汀,化合物 62 及其母体药物 56,化合物 68 及其母体药物 63,化合物 71 及其母体药物 63 和化合物 81 及其母体药物利福拉齐,都用作预防性治疗药,用于感染的动物模型。具体地讲,将金黄色葡萄球菌 ATCC 13709 自发新生霉素抗性突变菌株(一种临床骨髓炎分离株)在脑心浸汁肉汤(BHIB)中于 37℃培养过夜。培养 16 小时后,在 37℃将细胞用新鲜 BHIB 传代并培养 4-5 小时。细胞用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤 2 次,重悬于补充有 10% (体积/体积)胎牛血清的 BHIB 中,密度约为 10^{10} 菌落形成单位(CFU)/ml (按照比浊法)。等分悬液,一份用于检查 CFU 计数。将培养物冷冻贮存(-80℃),不需传代培养就可使用。为了用作接种物,将培养物融化,用 PBS 稀释并保持在冰浴中直到使用。

[0686] 按照 O' Reilly 等(Antimicrobial Agents and Chemotherapy(1992),36(12):2693-97)中所述的方法来感染动物,以引起骨感染。在手术前和手术中用异氟烷(isofluorane)麻醉雌性 CD 大鼠(57-70 日龄;n = 5/组;Charles River, St-Constant, Canada)。麻醉诱导完成后,将大鼠固定,让腹部朝上,剃去手术部位的毛。清洁腿上的皮肤并消毒(聚维酮碘-乙醇 70%)。在膝关节下的纵向切口开在羽状三辐骨针平面中。切口在骨下“膝关节”(胫骨头或髌)处,但不完全延伸到踝。用装有 2mm 球钻的高速钻头在胫骨上钻孔直到髓腔里面。给大鼠胫骨内注射 0.05ml 5% 鱼肝油酸钠(硬化剂),再注射 0.05ml 金黄色葡萄球菌悬液(约 2×10^7 CFU/大鼠)。用少量干的牙科粘固粉封闭此洞,该粘固粉立即吸收液体并粘在该部位。用 3 个金属皮肤夹(metal skin clip)使伤口闭合。感染 1 小时后,静脉内注射 10mg/kg 莫西沙星(作为阳性对照)的盐水一次,并且在感染后不同时间点,按照表 3 所示剂量,单次静脉内推注利福霉素衍生的前体药物(用 0.9% 盐水配制)。

[0687] 在感染 24 小时后,感染大鼠用 CO₂ 窒息处死,测定细菌 CFU 计数。取出感染胫骨,剥离软组织并称重。将骨头研磨,重悬于 5ml 0.9% NaCl 中,连续稀释并处理,用于定量培养。对于化合物 50、68 和 81,将 1ml 0.9% NaCl 溶液加入到 50mg 活性炭中,然后连续稀释。按照 Log 活细菌(Log CFU/克骨)测定疗效。通过计算平均 Log CFU 和标准差,评价各组大鼠所得结果。检出限是 2Log CFU。用 Dunnett 氏多重比较检验,对不同治疗组和未治疗组的活菌计数进行统计学比较。在比较经治疗的感染动物与未经治疗的感染动物时,当 P 值 < 0.05 时,就认为具有显著性差异。所用剂量、感染与治疗之间的时间长短和治疗结果见表 3。

[0688] 表 3:在金黄色葡萄球菌骨感染的大鼠模型中,预防性治疗之后回收的细菌滴度
[0689]

化合物 编号	剂量 (mg/kg 母体 药物当量)	给药时间 (感染后的 天数)	测定的细菌滴度 (Log CFU/g 骨)			
			未治疗	阳性对照	母体药物	试验化合物
母体药物: 9						
11	11	3	5.49±1.22	2.36±0.21	6.38±0.90	3.01±0.47
母体药物: 利福布汀						
21	12	1	6.32±1.34	2.53±0.39	nd	6.59±0.90
30	23	2	5.53±0.79	2.59±0.56	2.15±0.07	2.49±0.35
36	23	5	6.14±0.73	2.46±0.52	5.75±0.55	2.73±0.86
50	20	3	6.24±0.83	2.56±0.64	4.72±1.84	6.31±0.82
母体药物: 56						
62	20	2	4.89±1.04	2.20±0.33	3.61±1.57	1.98±0.06
母体药物: 63						
68	20	3	6.14±0.95	2.32±0.33	2.84±0.93	4.86±0.66
母体药物: 69						
71	20	3	5.28±0.73	2.06±0.04	4.08±1.53 ^a	2.77±1.00
母体药物: 利福拉齐						
81	10	3	6.14±0.95	2.32±0.33	2.21±0.34	2.05±0.06

[0690] nd:未检测。^a:用利福拉齐替代 69

[0691] 结果清楚表明了二磷酸化利福霉素衍生的前体药物 11、30、36、62、71 和 81 的统计学显著性 (t- 检验 ;p < 0.05) 预防效果,相比之下,在相同实验条件下使用母体药物则缺乏功效。例外的是利福布汀,当在感染前 2 天使用时它能提供有效预防,但在感染前 5 天使用则不行。这些结果和体外再生数据强烈支持这一观念:这些二磷酸化前体药物在体内靶向骨质,在此它们能释放其生物活性部分,其浓度高于抗菌活性所需浓度。

[0692] 前体药物 21 清楚显示出了裂解与抗菌活性之间的关系。该化合物在体外不能明显释放其母体药物利福布汀,而且在体内测定条件下缺乏功效(表 3)。前体药物的化学或生化上的不稳定性与预防活性间明确的关系证明了通过改变前体药物再生率而调节本发明磷酸化化合物体内效果的能力。也提供了进一步证据支持可裂解二磷酸化前体药物相对于不可裂解二磷酸化缀合物而言的重要性,以便在体内模型中提供所需治疗结果。

[0693] 这些实验都证明了本发明在预防骨感染中的明显优势。

[0694] 实施例 5:在由金黄色葡萄球菌所引起的慢性骨髓炎的大鼠模型中,比较利福霉素衍生物 9、56、69,利福布汀和利福拉齐及其各自的二磷酸化前体药物 11、62、71、36 和 81 的用途

[0695] 为了评价利福霉素衍生物的二磷酸化前体药物在治疗慢性骨感染中的能力,对母体化合物 9、56、69,利福布汀和利福拉齐(它们全都是非二磷酸化利福霉素衍生物)及其相应的二磷酸化前体药物 11、62、71、36 和 81 进行了比较,当用于治疗慢性(14-28 天)感染大鼠时,共进行 4 周抗微生物治疗。

[0696] 在该实验中,按照实施例 4 所述感染大鼠,在给予细菌之后,按照指定时间表,用 20mg/kg 体重的特定利福霉素衍生的抗细菌药物进行皮下治疗,或者用其相等摩尔数剂量的二磷酸化前体药物进行静脉内治疗。也包括涉及未治疗的标准对照和每天 20mg/kg 利福平的皮下治疗。在实验结束时,人道地处死大鼠,测定感染胫骨内细菌滴度。

[0697] 分别在给予细菌后第 20、24、28、32、36、40、44 和 47 天 (q4 天),皮下给予 20mg/kg 体重的利福霉素衍生物 9 治疗或静脉内给予 32mg/kg 其前体药物 11 (相当于 20mg/kg 的 9) 治疗,进行该实验。或者,在给予细菌后第 20、21、22、23、30、37、44 和 47 天 (q24hx4+q7d),按照同样的途径、以同样剂量给予 11。采用同样的对照 (未治疗或每天皮下给予 20mg/kg 剂量的利福平)。在感染开始后第 48 天人道地处死大鼠,测定感染胫骨内细菌滴度。结果见图 1。

[0698] 也可分别在给予细菌后第 28、32、36、40、44、48 和 52 天 (q4 天),类似感染的大鼠经皮下给予 20mg/kg 体重的利福布汀治疗或者经静脉内给予 33.4mg/kg 其前体药物 36 (相当于 20mg/kg 利福布汀) 治疗,进行该实验。采用同样的对照 (未治疗或每天皮下给予 20mg/kg 剂量的利福平)。在感染开始后第 55 天人道地处死大鼠,测定感染胫骨内细菌滴度。结果见图 2。

[0699] 也可分别在给予细菌后第 27、28、29、30、34、38、42、46 和 50 天 (q24hx4+q4 天),类似感染的大鼠经皮下给予 20mg/kg 体重的利福霉素衍生的抗细菌药物 56 治疗或者经静脉内给予 26mg/kg 其前体药物 62 (相当于 20mg/kg 的 56) 治疗,进行该实验。采用同样的对照 (未治疗或每天皮下给予 20mg/kg 剂量的利福平)。在感染开始后第 51 天人道地处死大鼠,测定感染胫骨内细菌滴度。结果见图 3。

[0700] 也可分别在给予细菌后第 18、19、20、21、25、29、33、37、41 和 45 天 (q24hx4+q4 天),类似感染的大鼠经皮下给予 20mg/kg 体重的利福霉素衍生的抗细菌药物 69 治疗或者经静脉内给予 28mg/kg 其前体药物 71 (相当于 20mg/kg 的 69) 治疗,进行该实验。采用同样的对照 (未治疗或每天皮下给予 20mg/kg 剂量的利福平)。在感染开始后第 46 天人道地处死大鼠,测定感染胫骨内细菌滴度。结果见图 4。

[0701] 也可分别在给予细菌后第 22、23、24、25、29、33、37、41 和 45 天 (q24hx4+q4 天),类似感染的大鼠经皮下给予 20mg/kg 体重的利福拉齐或者经静脉内给予 28mg/kg 其前体药物 81 (相当于 20mg/kg 利福拉齐) 治疗,进行该实验。采用同样的对照 (未治疗或每天皮下给予 20mg/kg 剂量的利福平)。在感染开始后第 46 天人道地处死大鼠,测定感染胫骨内细菌滴度。结果见图 5。

[0702] 另外,在感染后第 15-28 天,用每天一次皮下给予 20mg/kg 体重的利福平、利福布汀或化合物 9,进行单独的实验。在第 29 天人道地处死大鼠,测定感染胫骨内细菌滴度。结果见图 6。

[0703] 尽管每天用利福平或利福布汀进行治疗,在统计学显著性上大大降低了细菌滴度 ($p < 0.0001$),但是每天用利福霉素衍生物 9 治疗,显示出较少地减少骨内细菌滴度,但仍然在统计学显著性上降低了骨内的细菌滴度 (图 6, p 值 0.0022)。当每 4 天用一次时,衍生物 9 完全无效 (图 1, p 值 0.7272)。尽管二磷酸化前体药物 11 在所测定的两次给药方案中少许减低了细菌滴度 (图 1),但是这种下降没有统计学显著性 (对于 q4d 和 q24hx4+q7d 方案, p 值分别为 0.4107 和 0.2082)。对于前体药物 36,细菌滴度降低 1 个对数数量级是

具有统计学显著性的（图 2，p 值 0.0036），虽然它的体外再生率比 11 要差。另一方面，母体药物利福布汀，甚至在 4 天给药间隙中，仍然能很好地降低细菌滴度（大于 3 个对数数量级，图 2）。可以推测，36 的阳性结果不仅是因为它靶向骨骼，而且与利福霉素衍生物 9 相比，36 还降低了利福布汀从骨骼中的清除率。与使用前体药物 62、71 和 81 相关的细菌滴度减少约 1 个对数数量级都具有统计学显著性（分别为图 3、4 和 5；p 值 ≤ 0.001 ），这不仅是对未治疗组而言，而且也是对于母体利福霉素抗菌药而言，所有这些在所检查的给药方案下都无效。

[0704] 这强调了二磷酸连接基团在产生所需治疗性结果中的作用并证明本发明在治疗骨感染中的用途。

[0705] 实施例 6：当化合物 11 或化合物 9 用于在大鼠胫骨内预防或治疗骨感染时，测定化合物 9 的水平

[0706] 通过实验得到上述经治疗和感染大鼠的完整未感染（对侧）胫骨，研磨成粉，将其悬浮于 PBS+2% DMSO 中。混合物以 13,000rpm 离心 2 分钟。通过上述微生物学测定法（实施例 3），检测上清液中释放的化合物 9 的含量。

[0707] 在感染前 3 天使用 10mg/kg 体重时，在用化合物 9 治疗的动物的未感染胫骨内的化合物 9 含量低于检测限（ $0.17 \mu\text{g/g}$ ）。另一方面，在感染前 3 天，用 15.5mg/kg 体重（相当于 10mg/kg 的 9）的化合物 11 治疗动物中检测到浓度为 $0.88 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$ 骨。

[0708] 当感染后，每周一次共 4 周使用 32mg/kg 体重的化合物 11，测得化合物 9 的含量为 $1.28 \pm 0.18 \mu\text{g/g}$ 骨。

[0709] 数据表明，在用化合物 11 治疗的动物胫骨中，高浓度母体药物 9 存在于骨内，甚至在最后一次治疗一周，其浓度估计为针对上述用于确定体内感染的细菌菌株的最小抑制浓度（MIC）的两个数量级。这与直接使用 9 形成鲜明对比，直接使用 9 甚至在 3 天内都无法维持明显的骨内浓度。这表明可使用二磷酸化前体药物浓缩骨质中抗菌药的剂量并在更长时间内释放它。

[0710] 实施例 7：当化合物 30 和 36 用于在不同组织中预防或治疗骨感染时，测定利福布汀的水平

[0711] 将磨碎的骨样本和匀浆组织悬浮在 PBS 中，涡旋振荡并于 13000rpm 离心 2 分钟。收集上清液，用于如上所述的微生物学测定法（实施例 3），检测所释放的利福布汀水平。各水平见表 4，在感染前 2 天使用 33.8mg/kg 体重的 30，在感染前 5 天使用 36，在感染开始后第 14 天使用开始 36，共 4 周。

[0712] 表 4：所测得的利福布汀水平（ $\mu\text{g/g}$ 组织或 $\mu\text{g/ml}$ 血浆），是在不同组织中使用利福布汀或前体药物 30 或 36 的结果

[0713]

组织	所测的利福布汀水平 (g/g 组织或 g/ml 血浆)				
	30 (33.8 mg/kg) 治疗 A	利福布汀 (20mg/kg) 治疗 B	36 (33.4 mg/kg) 治疗 B	利福布汀 (20mg/kg) 治疗 C	36 (32 mg/kg) 治疗 C
胫骨	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0.69 ± 0.14
肝	1.23 ± 0.12	<LoD	0.33 ± 0.05	0.08 ± 0.02	0.87 ± 0.23
肾	3.27 ± 1.19	<LoD	0.31 ± 0.18	<LoD	0.42 ± 0.10
脾	<LoD	<LoD	<LoD	1.40 ± 0.40	1.21 ± 0.08
血浆	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD

[0714] 治疗 A:感染前 2 天单剂量;感染后 1 天处死。治疗 B:感染前 5 天单剂量;感染后 1 天处死。治疗 C:在感染后第 28 天开始,每 4 天一剂,在第 52 天停止;在第 55 天处死。
< LoD :低于检出限。

[0715] 令人吃惊的是,胫骨内水平非常低或低于检出限,但发现在肝肾中有大量的再生利福布汀。这可能是因为血液中存在钙离子而发生沉淀。沉淀可在肾中浓缩(是肾小球滤过的结果)或在肝中浓缩。前体药物的裂解率可能在这些器官中更高,导致更高的检测滴度。

[0716] 实施例 8:测定前体药物 11、36 和 62 在给药后的骨内水平

[0717] 胫骨、股骨和颞骨内前体药物 11 水平的测定

[0718] 为了测定用化合物 11 治疗的大鼠骨内前体药物 11 的水平,开发了一种分析方法,使用液相色谱与质谱联用(LC/MS)进行分析物的检测。将整个实验中所获得的骨(胫骨、股骨或颞骨)磨碎,再生的 9 用磷酸缓冲液(25mM, pH 7;1ml 用于 50mg 磨碎的骨头)萃取。将混合物涡旋震荡 10 分钟,在 10000g 离心 10 分钟。所得沉淀经干燥,称重并保存,用于化合物 11 的测定。

[0719] 对于骨内二磷酸化前体药物 11 水平的测定,如下制备标准、对照和空白(一式两份):向称重的(~20mg)干燥空白骨粉中加入在乙腈和 990 μ l 缓冲液(0.1M tris-HCl, pH 7, 0.15M NaCl)中配制的 11 的掺料溶液(10 μ l)。混合物经过涡旋震荡 30 分钟(RT),于 10000g 离心 15 分钟(RT),弃去上清液,保留沉淀,用于裂解步骤。标准范围(6 个水平)为 0.1-20 μ M(0.1-20nmol),而对照水平在 0.25 μ M 和 8.5 μ M(0.25nmol 和 8.5nmol)。

[0720] 向各标准、对照、空白和实验样品(来自前述所获沉淀的约 20mg)中加入含有抗坏血酸(1mg/ml)的 500 μ l 100mM 磷酸缓冲液(pH 调至 9)。通过在 50℃ 孵育 4 小时,使前体药物 11 经裂解成为药物 9。在此结束时,用 10%甲酸溶液(20 μ l)将溶液调节至中性 pH,加入内标(利福昔明)。在 10000g(RT)离心 10 分钟后,将 20 μ l 上清液注射到 LC/MS。

[0721] 用同样方法,在 Agilent 1100™ 系列的 LC/MSD Trap 上分析来自该方法的化合物 9 的数量。将上清液注射到 Inertsil ODS-3™ 柱(4.6×50 mm, 3 μ)上,用 (A)0.01%甲酸/水和 (B)0.01%甲酸/乙腈:甲醇(50:50),其中用 55-100% (B)的 (A)的梯度进行 5 分钟,再在 100% (B)中进行 1 分钟),流速 0.4ml/min。MS 设置如下:ESI 探头,正极性,雾化器

45psi,干气温度 350℃,干气流 10L/min,毛细管出口 120V(2.5-6min.) 或 140V(6-12min) 和分流器 (skimmer)30V。运行时间为 12 分钟,最初 2.5 分钟将转向阀设置到废液。按照 SRM 模式分析化合物 9, m/z 853.3 $\rightarrow$ 821.1;内标 (利福昔明), m/z 786.2 $\rightarrow$ 754.2。

[0722] 单次静脉内推注给予 32mg/kg 体重的 11 之后进行这些测定,结果见图 7。

[0723] 胫骨内前体药物 36 水平的测定

[0724] 为了测定用化合物 36 治疗的大鼠胫骨内前体药物 36 的水平,开发了一种分析方法,使用液相色谱与质谱联用 (LC/MS) 进行分析物的检测。将整个实验获得的胫骨研磨成粉,用 1ml 乙腈从 50mg 骨粉中萃取再生的利福布汀。混合物经过涡旋震荡 15 分钟,于 10000g 离心 10 分钟 (RT)。

[0725] 将实验骨沉淀干燥,称重并贮存,以便用于检测前体药物。对于骨头中前体药物的剂量,如下制备标准、对照和空白 (一式两份):向已称重的 ($\sim$ 20mg) 干燥空白骨粉中加入在水和 990 μ l 缓冲液 (0.1M tris-HCl, pH 7, 0.15M NaCl) 中配制的前体药物的掺料溶液 (spiking solution) (10 μ l)。混合物经过涡旋震荡 30 分钟 (RT),于 10000g 离心 10 分钟 (RT),弃去上清液,保留沉淀,用于裂解步骤。标准范围 (6 个水平) 为 0.05-10 μ M (0.05-10nmol), 而 Qcs 水平在 0.075 μ M、0.75 μ M 和 7.5 μ M (0.075nmol、0.75nmol 和 7.5nmol)。

[0726] 向各标准、Qc、空白和实验样品 (来自干燥的实验所获骨的约 20mg) 骨沉淀中加入 500 μ l 磷酸钠缓冲液 100mM (pH 调至 9)。通过在 70℃ 的 5 次各 1 小时的孵育期,使前体药物经裂解成为药物 (利福布汀)。每个 1 小时周期结束时,都用 10% 甲酸溶液 (15 μ l) 将上清液调至中性 pH,涡旋震荡混合物并离心 (于 10000g 离心 10 分钟, RT)。将上清液保持在 4℃,将沉淀重悬于磷酸缓冲液 (500 μ l),然后再孵育 1 小时的时间。在该步骤结束时,将内标 (化合物 56) 加入到合并上清液中,药物 (利福布汀) 和内标通过 SPE 在 Strata-X (30mg/1ml) 上萃取,用乙腈作为洗脱液。将洗出液蒸发至干,干燥残余物用流动相 (500 μ l) 重配。涡旋振荡 20 分钟后,将上清液 (10 μ l) 注射到 LC/MS 中。

[0727] 在 Agilent 1100 系列的 LC/MSD Trap 上分析来自该方法的利福布汀的数量。将上清液注射到 Inertsil ODS-3 柱 (4.6 $\times$ 50mm, 3 μ) 上,用 (A) 0.01% 甲酸 / 水和 (B) 0.01% 甲酸 / 乙腈: 甲醇 (50 : 50), 其中用 45-65% (B) 的 (A) 梯度进行 5 分钟,再用 65-95% (B) 的梯度进行 1 分钟,再在 95% (B) 中持续 1 分钟,流速 0.4ml/min。

[0728] MS 设置如下:ESI 探头,正极性,雾化器 45psi,干气温度 350℃,干气流 10L/min,毛细管出口 110V 和分流器 (skimmer)34.5V。运行时间为 13 分钟,最初 3 分钟将转向阀设置到废液。按照 SRM 模式分析利福布汀, m/z 847.3 $\rightarrow$ 815.4, 内标 (化合物 56), m/z 929.3.3 $\rightarrow$ 897.4。

[0729] 单次静脉内推注给予 15.5mg/kg 体重的 36 之后进行这些测定,结果见图 8。

[0730] 胫骨内前体药物 62 水平的测定

[0731] 为了测定用化合物 36 治疗的大鼠胫骨内前体药物 62 的水平,开发了一种分析方法,使用液相色谱与质谱联用 (LC/MS) 进行分析物的检测。将整个实验获得的骨研磨成粉,用 1ml 甲醇从 50mg 骨粉中萃取再生的 56。混合物经过涡旋震荡 15 分钟,于 10000g 离心 10 分钟。所得沉淀经干燥,称重后用于测定前体药物。

[0732] 对于剂量,制备标准、对照和空白 (一式两份) 如下:向已称重的 ($\sim$ 20mg) 干

燥空白骨粉中加入在水：甲醇（50：50）和 990 μ l 缓冲液（0.1M tris-HCl, pH 7, 0.15M NaCl）中配制的 62 的掺料溶液（10 μ l）。混合物经过涡旋震荡 10 分钟（室温），于 10000g 离心 15 分钟（室温），弃去上清液，保留沉淀，用于裂解步骤。标准范围（6 个水平）为 0.05–10 μ M（0.05–10nmol），而 Qcs 水平在 0.075 μ M、0.75 μ M 和 7.5 μ M（0.075nmol, 0.75nmol 和 7.5nmol）。

[0733] 向各标准、Qc、空白和实验样品（来自干燥沉淀的约 20mg）骨沉淀中加入 500 μ l 磷酸钠缓冲液 100mM（pH 调至 10）。通过在 70°C 的 10 次各 1 小时的孵育期，使前体药物经裂解成为药物（56）。每个 1 小时周期结束时，都用 10% 甲酸溶液（20 μ l）将上清液调至中性 pH，涡旋震荡混合物并离心（于 10000g 10 分钟，RT）。将上清液保持在 4°C，将沉淀重悬于磷酸缓冲液（500 μ l），然后再孵育 1 小时的时间。在该步骤结束时，将内标（利福布汀）加入到合并上清液中，将其加到条件 StrataX™ 柱（30mg/1ml）上进行萃取（SPE）。用 1% 甲酸水溶液（1ml）和 100% 水（1ml）洗涤后，化合物 56 和内标用 1ml 乙腈洗脱。将洗出液蒸发至干，干燥残余物用流动相（500 μ l）重配。涡旋振荡 15 分钟后，将上清液（20 μ l）注射到 LC/MS 中。

[0734] 在 Agilent 1100 系列的 LC/MSD Trap 上分析用该方法再生的化合物 56 含量。将样品溶液注射到 Inertsil ODS-3 柱（4.6×50mm, 3 μ ）上，用 (A) 0.01% 甲酸/水和 (B) 0.01% 甲酸/乙腈：甲醇（50：50），其中用 45 → 65% (B) 的 (A) 梯度进行 5 分钟，再用 65–95% (B) 的梯度进行 1 分钟，再在 95% (B) 中持续 1 分钟，流速 0.4ml/min。

[0735] MS 设置如下：ESI 探头，正极性，雾化器 45psi，干气温度 350°C，干气流 10L/min，毛细管出口 110V 和分流器 (skimmer) 34.5V。运行时间为 13 分钟，最初 3 分钟将转向阀设置到废液。按照 SRM 模式分析化合物 56, m/z 929.3 → 897.2, 内标（利福布汀），m/z 847.3 → 815.3。

[0736] 单次静脉内推注给予 26mg/kg 体重的 62 之后进行这些测定，结果见图 9。

[0737] 这些测定提供更多体内证据表明，二磷酸化利福霉素能集中在骨骼中，其中它们在可能的感染灶内能停留数天并释放其母体药物。这证明二磷酸酯连接基团在将这些利福霉素药物递送到骨骼中的作用，并且进一步支持将本发明用于预防和治疗骨感染。

[0738] 可以理解，本文所述的实施例和实施方案仅用于说明的目的，本领域技术人员根据它们提出各种修改或改动，并且包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求书的范围内。

[0739] 本文所参考的所有文件、论文和公开材料，包括书籍、期刊文章、手册、专利申请、已公布的专利申请和专利，全都通过引用结合到本文中。

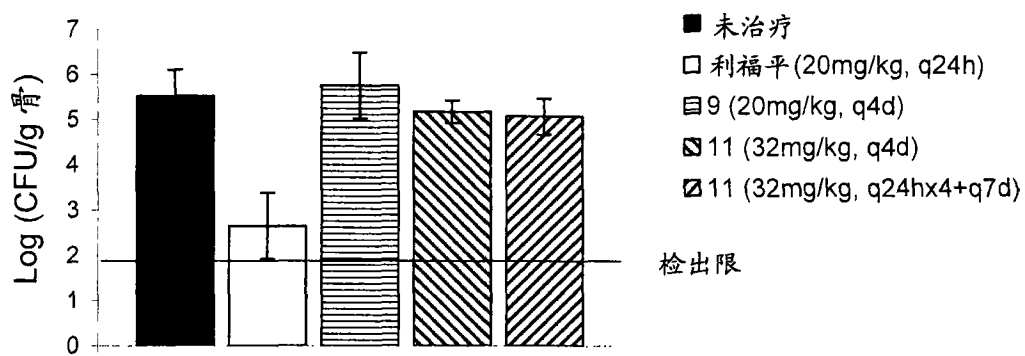


图 1

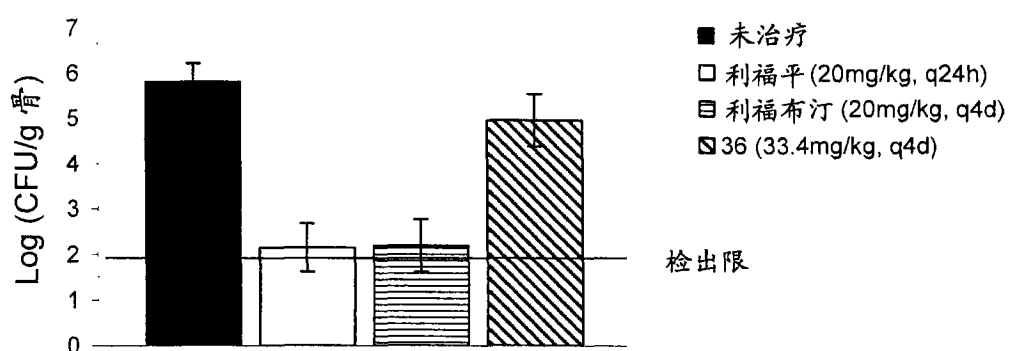


图 2

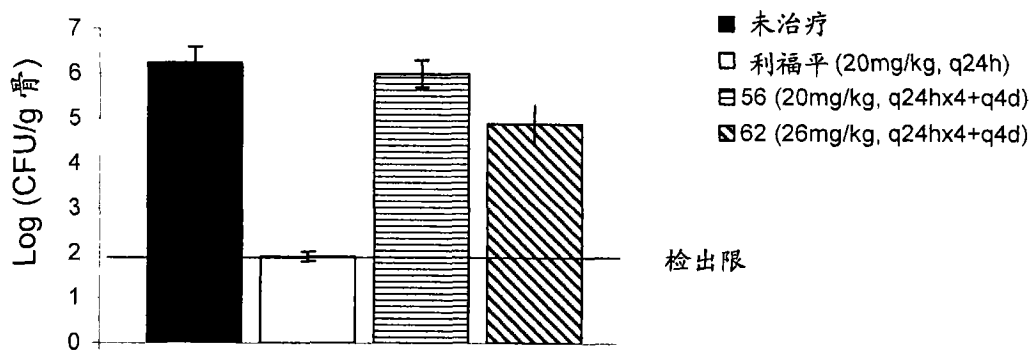


图 3

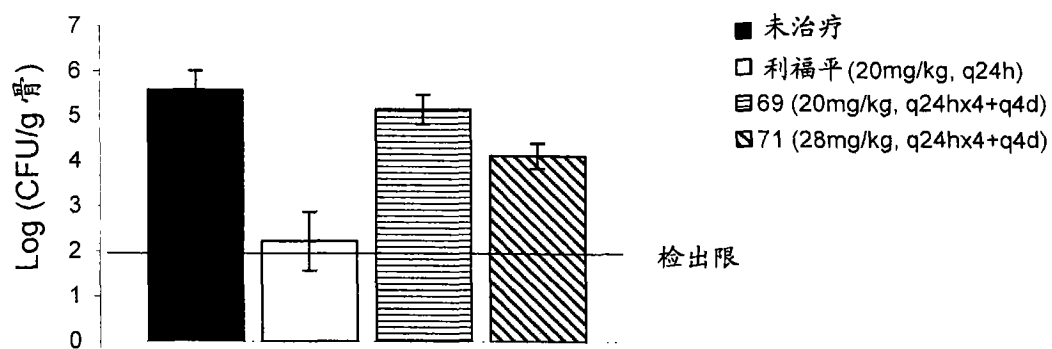


图 4

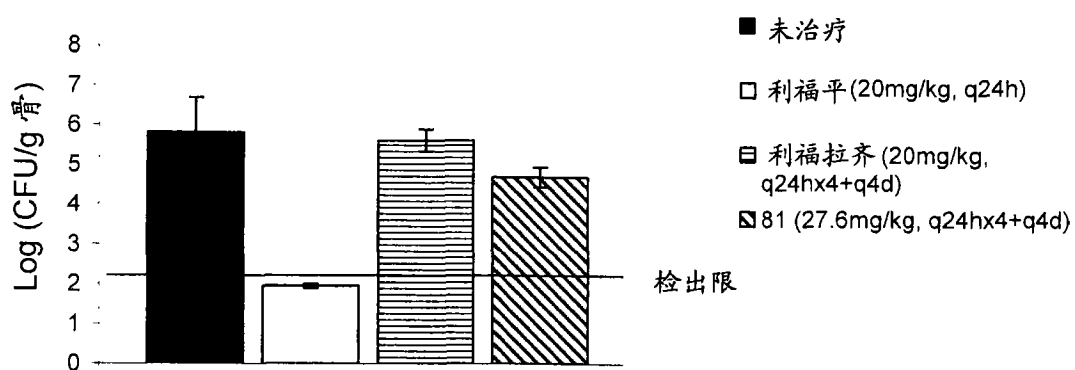


图 5

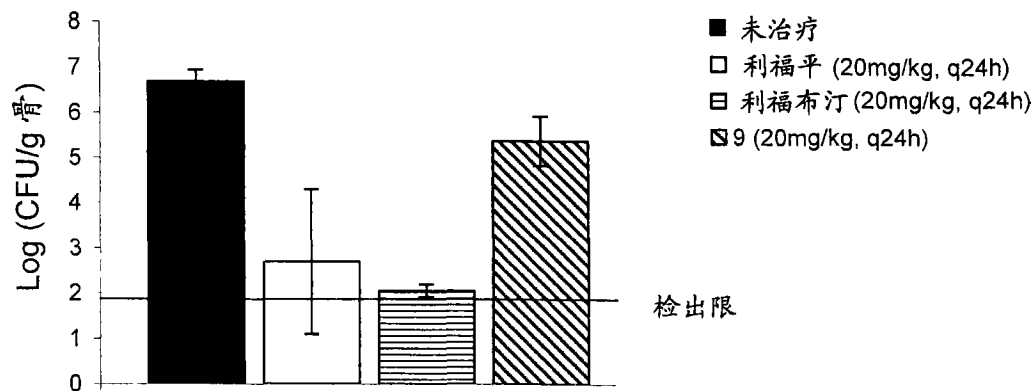


图 6

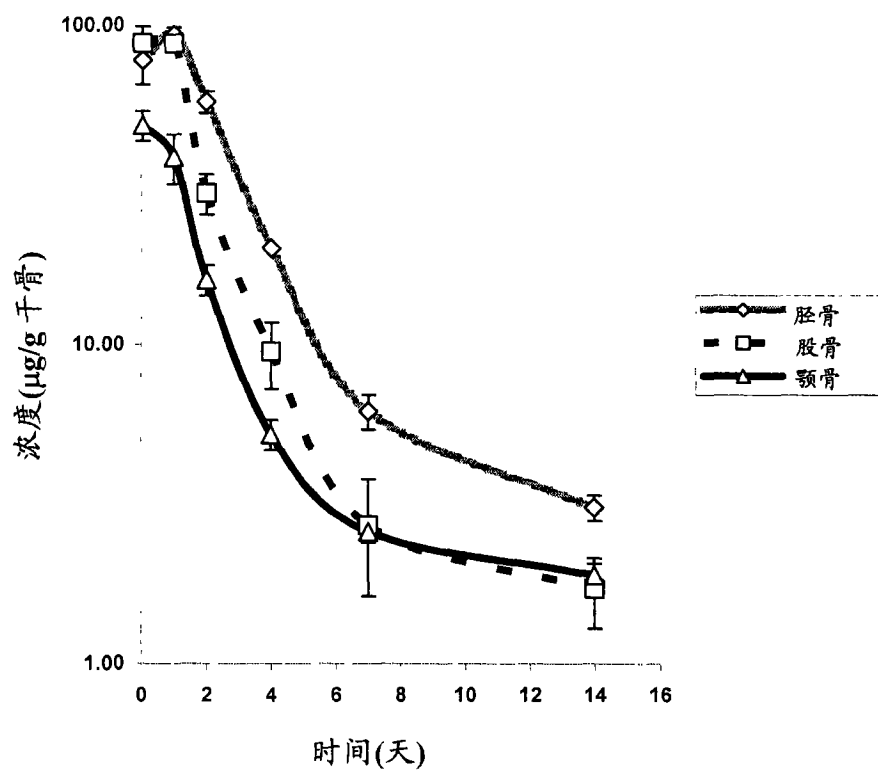


图 7

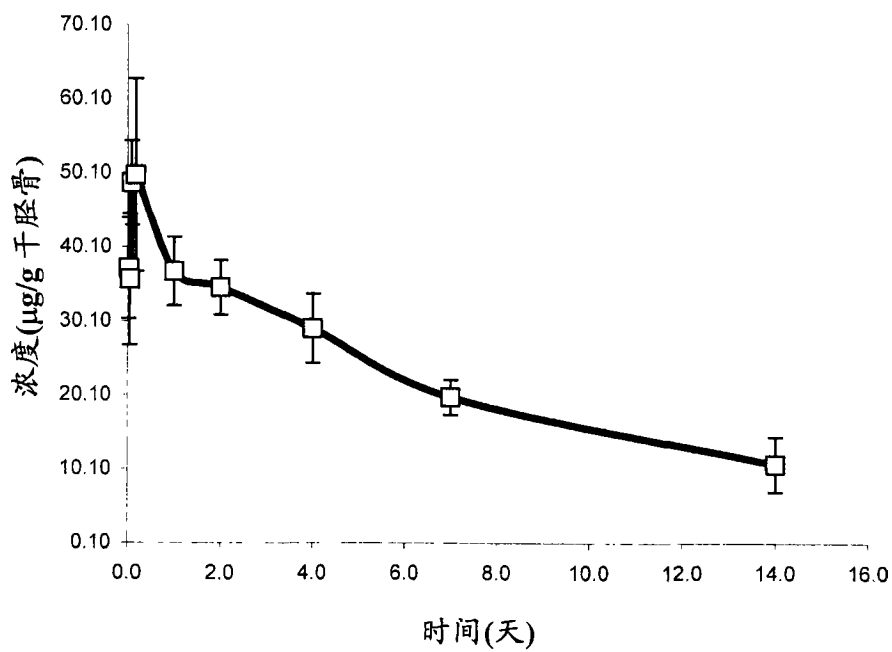


图 8

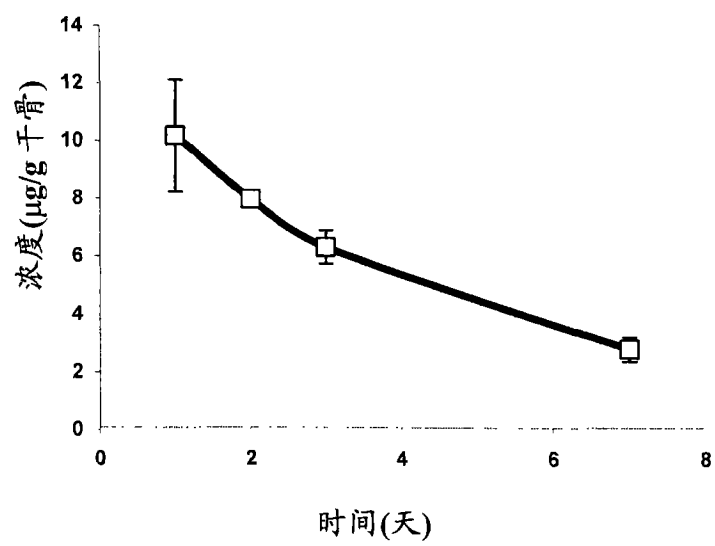


图 9