



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118878638 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 01

(21) 申请号 202410703525.5

(22) 申请日 2019.06.25

(30) 优先权数据

62/689,602 2018.06.25 US

(62) 分案原申请数据

201980041706.3 2019.06.25

(71) 申请人 云顶新耀医药科技有限公司

地址 314199 浙江省嘉兴市嘉善县惠民街
道鑫达路8号4号厂房二楼

(72) 发明人 帕梅拉·布朗 迈克尔·道森

莫娜·西莫诺维克

史蒂文·博克斯

伊斯特·杜珀尔奇 迪恩·里弗斯

罗伊·莱斯特 斯科特·科尔曼

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

C07K 7/62 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书2页 说明书70页

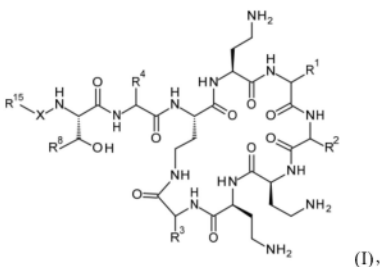
(54) 发明名称

多黏菌素化合物及其药物组合物和用途

文中所定义。

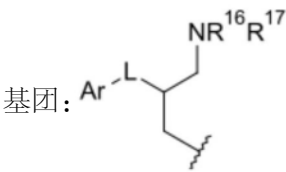
(57) 摘要

本发明提供式(I)的多黏菌素化合物及其盐、溶剂化物及经保护形式、包含式(I)化合物的药物组合物,以及该化合物及组合物在治疗方法,诸如治疗微生物感染的方法中的用途。式(I)化合物表示如下:



其中-R¹⁵为以下

(I),

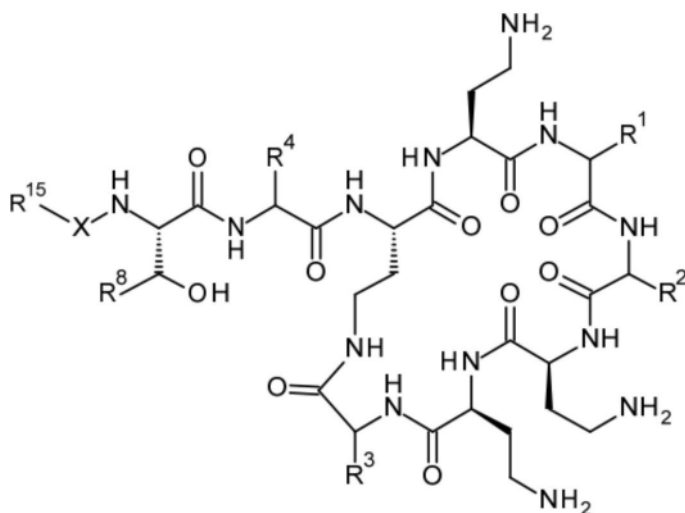


(II),

且-R¹⁶为氢;-R¹⁷

为氢;-L-为共价键或亚甲基;且-Ar为任选经取代的芳基。基团-X-、-R¹、-R²、-R³、-R⁴及-R⁸如本

1. 一种式 (I) 化合物,



其中:

-X- 表示 -C(=O)-;

-R¹ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为苯丙氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸或正缬氨酸残基;

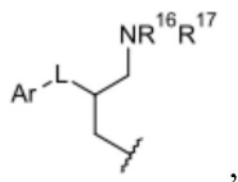
-R² 为任选经一个羟基取代的 C₁₋₄ 烷基;

-R³ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为苏氨酸残基;

-R⁴ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为 Dap;

-R⁸ 为氢或甲基;且

-R¹⁵ 为以下基团:



其中:

-R¹⁶ 为氢;

-R¹⁷ 为氢;

-L- 为共价键或亚甲基;

-Ar 为任选经取代的芳基, 诸如经取代的苯基, 及其盐、溶剂化物及经保护形式。

2. 如权利要求1所述的化合物, 其中 -R¹ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为苯丙氨酸或亮氨酸残基。

3. 如权利要求1或2所述的化合物, 其中 -R² 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为亮氨酸、氨基丁酸、异亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸或正缬氨酸残基。

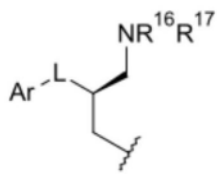
4. 如权利要求3所述的化合物, 其中 -R² 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为亮氨酸或氨基丁酸残基。

5. 如前述权利要求中任一项所述的化合物, 其中 -R⁴ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基

及氮一起为L-Dap。

6. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中-R⁸为甲基。

7. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中-R¹⁵为:



8. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中-L-为共价键。

9. 如权利要求1至7中任一项所述的化合物,其中-L-为亚甲基。

10. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中-Ar为任选经取代的苯基。

11. 如权利要求10所述的化合物,其中所述苯基经一或两个基团-R^S取代,其中各-R^S独立地选自卤素、烷基、卤代烷基及芳基。

12. 如权利要求10所述的化合物,其中所述苯基经一或两个基团-R^S取代,其中各-R^S独立地选自氯、丙基、苯基及噻吩基。

13. 如权利要求11所述的化合物,其中所述苯基经两个基团-R^S取代,其中各-R^S独立地选自卤素、烷基、卤代烷基及芳基。

14. 如权利要求11所述的化合物,其中所述苯基经两个基团-R^S取代,其中各-R^S独立地选自卤素。

15. 如权利要求10所述的化合物,其中所述苯基经一或两个基团-R^S取代,其中各-R^S独立地选自氟、溴、碘、烷基、卤代烷基及芳基。

16. 一种药物组合物,其包含权利要求1至15中任一项所述的化合物,任选连同一或多种药学上可接受的载剂。

17. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物或如权利要求16所述的药物组合物,其用于治疗或预防方法中。

18. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物或如权利要求16所述的药物组合物,其用于治疗微生物感染的方法中。

19. 如权利要求18所述的化合物或药物组合物,其中所述感染为细菌感染。

20. 如权利要求19所述的化合物或药物组合物,其中所述细菌感染为革兰氏阴性细菌感染。

21. 如权利要求20所述的化合物或药物组合物,其中所述革兰氏阴性细菌感染选自大肠杆菌属、克雷伯氏杆菌属、肠杆菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属、柠檬酸杆菌属、摩氏摩根菌、假性结核耶氏杆菌及其他肠杆菌科、假单胞菌属、不动杆菌属、莫拉氏菌、螺旋杆菌、寡养单胞菌、蛭弧菌、醋酸菌、军团杆菌及 α -变形菌门。

多黏菌素化合物及其药物组合物和用途

[0001] 相关申请案

[0002] 本案是第201980041706.3号专利申请的分案申请,并且主张2018年6月25日(25.06.2018)申请的US 62/689602的权益及优先权,该案的内容以引用的方式整体并入本案中。

技术领域

[0003] 本发明关于新颖多黏菌素化合物、包含该化合物的药物组合物,以及该化合物及该药物组合物用于医学治疗,例如治疗微生物感染,尤其是由革兰氏阴性细菌引起的感染的用途。

背景技术

[0004] WO 2013/072695及WO 2014/188178描述多黏菌素B或黏菌素的N末端脂肪酰基部分及相邻二氨基丁酸部分被具有氨基取代基的末端基团置换的多黏菌素衍生物。该衍生物具有良好抗细菌活性,同时具有降低的细胞毒性。

[0005] WO 2015/135976亦描述同样为多黏菌素B或黏菌素的N末端脂肪酰基部分及相邻二氨基丁酸被具有氨基取代基的末端基团置换的多黏菌素衍生物。此处,氨基取代基的特定位置及N末端部分中其他取代基的安置显示对诸如大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)的众多关键病原体的强抗微生物活性是重要的。所公开的化合物亦保持低细胞毒性。

[0006] WO 2016/083531描述同样为多黏菌素B或黏菌素的N末端脂肪酰基部分及相邻二氨基丁酸被具有氨基取代基的末端基团,诸如WO 2013/072695、WO 2014/188178及WO 2015/135976中所呈现的那些基团置换的多黏菌素衍生物。另外,相对于多黏菌素B及黏菌素,第6位及/或第7位的氨基酸残基是取代的。

[0007] 为了比目前可利用的多黏菌素更适用于对全身性感染进行非经肠治疗,新多黏菌素衍生物必须至少与这些已知多黏菌素的活性相匹配,同时具有显著较低的活体内肾毒性。

发明内容

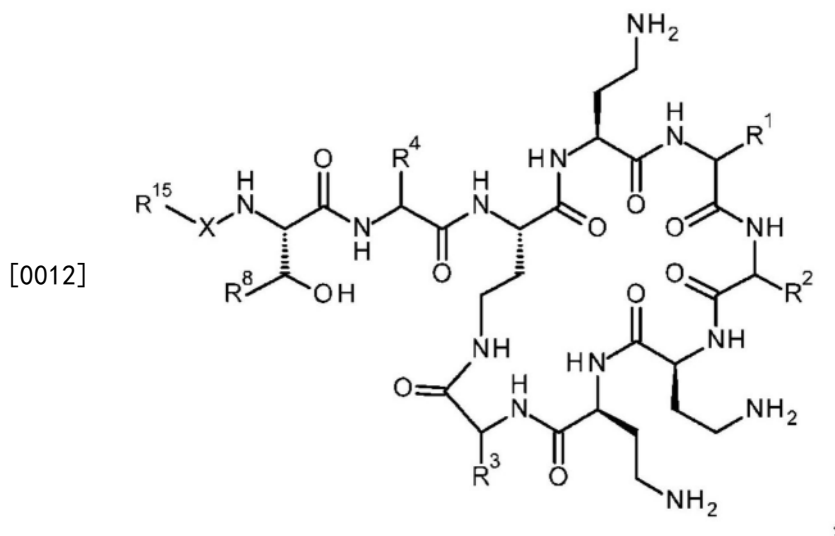
[0008] 在一般方面中,本发明提供具有去酰基化多黏菌素核心的化合物,该去酰基化多黏菌素核心为诸如第3位氨基酸残基经Dap取代且在其N末端具有如本文中所定义的基团-X-R¹⁵的多黏菌素B或黏菌素九肽核心。该化合物得以用于治疗或预防方法中,任选与第二活性剂组合。该化合物可用于治疗微生物感染,诸如革兰氏阴性细菌感染。

[0009] 本发明化合物显示在非经肠给药后具有与可接受的肾脏药物水平相称的低细胞毒性。本发明化合物显示优于多黏菌素B,以及本领域中已知的经修饰的多黏菌素化合物,包括本申请人先前报导的那些多黏菌素化合物。此优越性体现在一或多个以下特征:非经

肠给药后的较低细胞毒性、可接受的肾脏药物水平(即,由于肾脏药物水平不高而产生可接受的肾毒性);在小鼠大腿及肺模型中的效力;及/或针对病原性细菌株的优越MIC,而在其他细菌株中与先前技术化合物相当。

[0010] 典型地,本领域中已知的化合物展现这些有利特征中的一种或可能两种,而非全部。举例而言,现在发现具有较低细胞毒性的多黏菌素化合物是相对常见的,但此较低细胞毒性通常伴随抗细菌活性降低。此外,可能发现具有较低细胞毒性的化合物在给药后仍以高水平处于肾脏内。该化合物因此仍具毒性,且不适用于医学治疗方法中。

[0011] 在本发明的第一方面中,提供一种式(I)化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物、经保护形式及前药形式。式(I)化合物表示如下:



[0013] 其中:

[0014] -X-表示-C(=O)-;

[0015] -R¹与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为苯丙氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸或正缬氨酸残基;

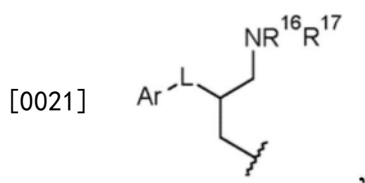
[0016] -R²为任选经一个羟基取代的C₁₋₄烷基;

[0017] -R³与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为苏氨酸残基;

[0018] -R⁴与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为Dap,诸如L-Dap;

[0019] -R⁸为氢或甲基;且

[0020] -R¹⁵为以下基团:



[0022] 其中:

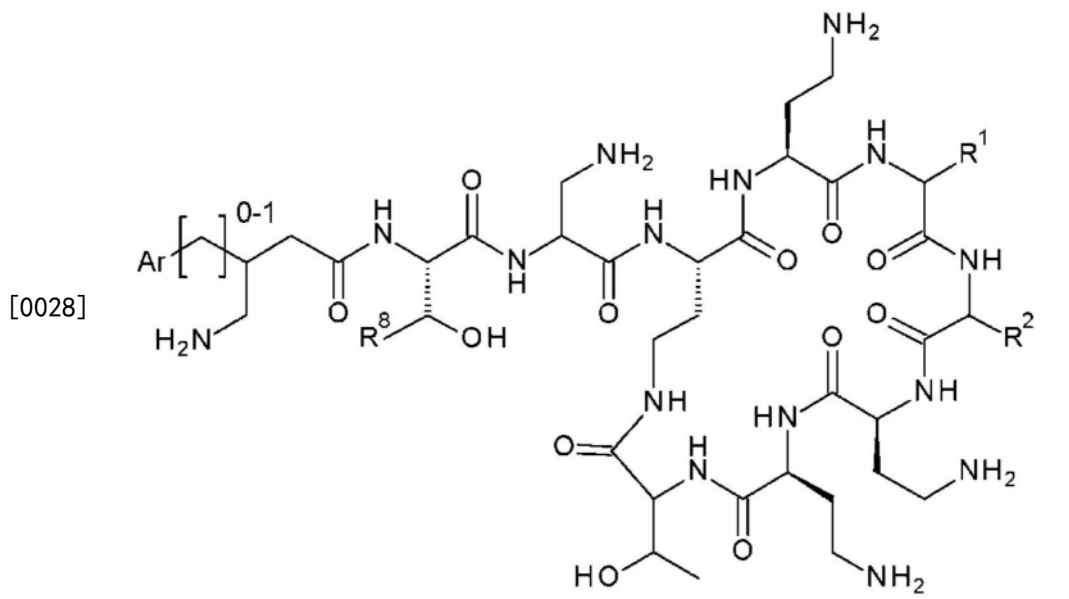
[0023] -R¹⁶为氢;

[0024] -R¹⁷为氢;

[0025] -L-为共价键或亚甲基(-CH₂-);

[0026] -Ar为任选经取代的芳基,诸如经取代的苯基。

[0027] 式(I)化合物也可由此表示如下:



[0029] 其中-R¹、-R²、-R⁸及-Ar具有与以上相同的含有,

[0030] 及其药学上可接受的盐、溶剂化物、经保护形式及前药形式。

[0031] 本发明还提供一种药物组合物,其包含式(I)化合物,任选连同一或多种药学上可接受的载体。

[0032] 在另一方面中,提供一种式(I)化合物或包含式(I)化合物的药物组合物,以用于治疗或预防方法中。

[0033] 在另一方面中,提供一种式(I)化合物或包含式(I)化合物的药物组合物,以用于治疗微生物感染的方法中。

[0034] 本发明还提供一种治疗方法,该方法包括向有需要的个体施用式(I)化合物或包含式(I)化合物的药物组合物的步骤。该方法可用于治疗微生物感染。

[0035] 微生物感染可为细菌感染,诸如革兰氏阴性细菌感染。革兰氏阴性细菌感染可选自由以下组成的群:大肠杆菌属(*Escherichia* spp.)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella* spp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)、沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、志贺氏菌属(*Shigella* spp.)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* spp.)及其他肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)及军团杆菌属(*Legionella*)。

[0036] 本发明还提供用于制备式(I)化合物的方法以及用于制备式(I)化合物的中间化合物。

[0037] 下文更详细描述本发明的这些及其他方面及实施例。

具体实施方式

[0038] 本发明提供式(I)化合物,包括如以下更详细描述式(II)及式(III)化合物,以用于医学治疗,任选与第二活性剂一起使用。

[0039] 一般而言,式(I)、式(II)及式(III)的化合物具有多黏菌素核心(其为九肽核心)及处在多黏菌素核心N末端的基团-X-R¹⁵。基团-R¹⁵为经取代的γ-氨基丙基。γ-氨基丙基

在相对于-X-部分的 β 位经任选取代的芳基或芳烷基取代。本发明化合物的环外链中的第一氨基酸残基,对应于多黏菌素中的第3位,为Dap残基(二氨基丙酸),诸如L-Dap,而非如多黏菌素B及黏菌素中所存在的L-Dab残基(L-二氨基丁酸)。

[0040] 多黏菌素化合物第6位及第7位的氨基酸残基(遵循用于多黏菌素的编号)可对应于多黏菌素B及黏菌素中所存在的那些氨基酸残基。第6位及/或第7位的氨基酸残基可经与多黏菌素B及黏菌素内所存在的氨基酸残基不同的氨基酸残基取代。

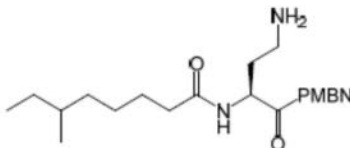
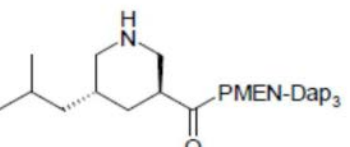
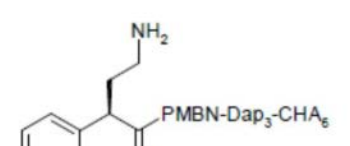
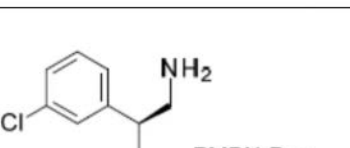
[0041] 为了比目前已知的系列多黏菌素化合物更适用于对全身性感染进行非经肠治疗,新多黏菌素衍生物必须至少匹配那些已知多黏菌素化合物的抗细菌活性,同时具有显著较低的活体内肾毒性。

[0042] 现已发现,多黏菌素化合物不足以展现较低细胞毒性,因而通常与活体内毒性降低无关。因而,药物在肾脏中积聚及从肾脏清除也必须是有利的。换言之,非经肠给药后细胞毒性与肾脏药物水平的组合为引起有利活体内毒性概况的原因。

[0043] 此可利用以下表A中所示的实例比较来显示,其中PMBN是指多黏菌素B九肽核心且PMEN是指多黏菌素E九肽核心,在适当时显示对第3位及第6位氨基酸残基(根据多黏菌素编号)的取代(例如,第3位处Dap置换Dab,及第6位处环己基丙氨酸(CHA)置换苯丙氨酸)。

[0044] 表A

[0045]

化合物	结构	细胞毒性	肾脏中药物水平		肾毒性*
			4 h	16 h	
多黏菌素B		1.0	128	18	++
参考实例D77 WO 2015/135976		23**	516	264	++++
参考实例38 WO 2016/083531		9.2***	567	333	+++
实例5		11.6	170	19	+/-

[0046] 细胞毒性是指相对于多黏菌素B针对HK-2细胞株记录的 IC_{50} 的量测 IC_{50} 。药物水平是指在小鼠中在17.2mg/kg皮下剂量后4或16小时在肾脏中发现的化合物的量($\mu\text{g/g}$ 肾脏)。

[0047] *将化合物以25mg游离碱/kg/剂量间隔8小时给予4个剂量,或以17.2mg游离碱/kg/剂量以4小时间隔每日三次持续4天。给药后收集尿液持续16-24小时以用于测定肾毒性的尿液生物标记物(KIM-1、白蛋白、胱抑素C)。将化合物分级为-(与媒剂对照不可区分)至+++ (来自所有生物标记物的强反应)。

[0048] **在WO 2015/135976中,针对此化合物(实例D77)引用数值13.3。现已进一步测试此化合物两次,且基于相同实验中的PMB值来计算相对值。平均值为23

[0049] ***在WO 2016/083531中,针对此化合物(实例38)引用255 $\mu\text{g/mL}$ 的 IC_{50} ,而针对多黏菌素B引用12 $\mu\text{g/mL}$ 。然而,该申请案中所使用的PMB数值为来自多次实验的中值。此处引用的数值9.2与相同实验中针对PMB测定的 IC_{50} 值相比较

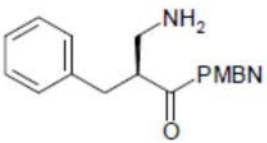
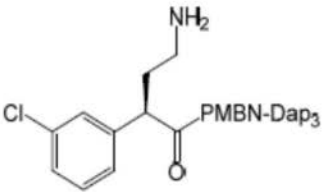
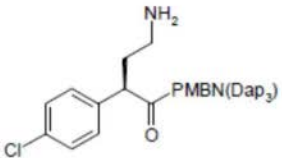
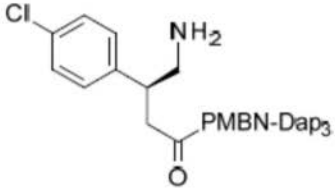
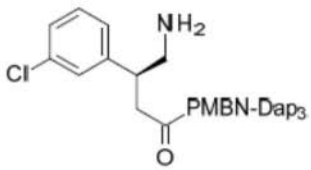
[0050] 本申请人先前已在WO 2015/135976中揭示具有经苯基或苯甲基部分取代的N末端 γ -氨基丙基的多黏菌素九肽。然而,苯基或苯甲基取代基相对于-X-基团提供在 α 位而非 β

位。WO 2015/135976亦描述具有在 α 位经苯甲基取代的N末端 β -氨基乙基的多黏菌素九肽。此处,氨基官能基相对于-X-基团提供在 β 位而非 γ 位。

[0051] 尽管这些已知化合物与多黏菌素B相比显示有前景的活性及适度改良的细胞毒性,但这些化合物次于本发明化合物,因为其在给药后不显示相称的低细胞毒性与可接受的肾脏水平的组合。

[0052] 此利用以下表B中所示的实例比较来显示,其中PMBN是指多黏菌素B九肽核心,适当时对第3位氨基酸残基进行取代(例如,第3位处Dap置换Dab)。

[0053] 表B

化合物	结构	细胞毒性	肾脏中药物水平 ($\mu\text{g/g}$ 肾脏, 4 h)	肾脏水平 / 肾细胞毒性
参考化合物D6 WO 2015/135976		4.4*	235	53
参考化合物**		5.1	589	115
[0054] 参考化合物**		4.8	533	111
实例1		8.8	268	30
实例5		11.6	170	15

[0055] *此化合物为W0 2015/135976中的实例D6。其中针对相对细胞毒性引用的数值为3.7。此数值为两次重复测定的平均值。

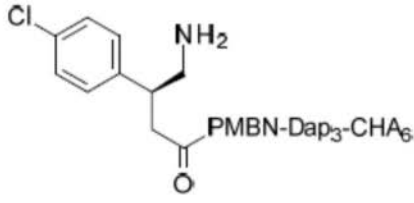
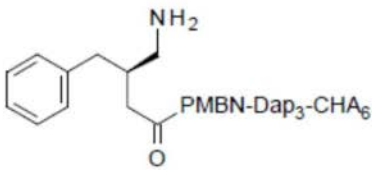
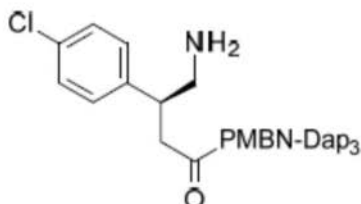
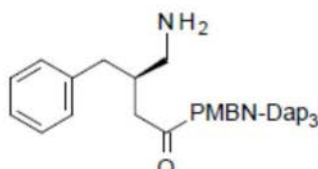
[0056] **这些参考实例的化合物可根据W0 2015/135976中所描述的方法来制备,该案的内容以引用的方式整体并入本文中。

[0057] 本申请人先前已在W0 2016/083531中揭示具有经修饰的N末端基团,尤其是包括 β -芳基或 β -芳烷基的那些N末端基团的多黏菌素九肽。然而,这些已知化合物在第6位具有亲脂性氨基酸残基,诸如环己基丙氨酸残基,而本案的化合物在第6位具有例如苯丙氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸或正缬氨酸残基。鉴于给药后的不良细胞毒性与肾脏药物水平组合,这些已知化合物同样次于本发明化合物。

[0058] 此可利用以下表C中所示的实例比较来显示,其中PMBN是指多黏菌素B九肽核心,在适当时显示对第3位及第6位氨基酸残基(根据多黏菌素编号)的取代(例如,第3位处Dap置换Dab,及第6位处环己基丙氨酸(CHA)置换苯丙氨酸)。

[0059] 表C

[0060]

化合物	结构	细胞毒性	肾脏中药物水平 ($\mu\text{g/g}$ 肾脏, 4 h)	4 h肾脏水平/肾细胞毒性
参考化合物50 WO 2016/083531		7.4	463	63
参考化合物58 WO 2016/083531		5.2	212	32
实例1		8.8	268	30
实例9		12.0	159	13

[0061] 已知化合物50及化合物58来自WO 2016/083531,且这些为该案中鉴定为异构体1的化合物。

[0062] 多黏菌素化合物

[0063] 式(I)化合物为多黏菌素九肽系列化合物的N末端衍生物。式(I)化合物的核心为九肽衍生物,诸如多黏菌素B九肽(PMBN,多黏菌素B 2-10),其中第3位氨基酸残基经Dap取代。任选地,第6位及/或第7位的氨基酸残基经诸如本文中所描述的另一氨基酸取代。式(I)化合物具有处于多黏菌素核心N末端的基团-X-R¹⁵。此详细描述于下文。

[0064] -R¹

[0065] 基团-R¹与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起对应于多黏菌素系列化合物

中第6位的氨基酸残基。

[0066] 第6位的氨基酸残基可与多黏菌素B第6位的氨基酸残基相同。即, R^1 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起可为D-苯丙氨酸残基。

[0067] 第6位的氨基酸残基可与黏菌素的第6位氨基酸残基相同。即, R^1 与处于其连接的碳的 α 位的羰基及氮一起可为D-亮氨酸残基。

[0068] 在一个实施例中, $-R^1$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为苯丙氨酸、亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸或正缬氨酸残基。该氨基酸残基可为D形式。

[0069] 在一个实施例中, $-R^1$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为氨基酸残基, 诸如苯丙氨酸、亮氨酸或正亮氨酸残基。该氨基酸残基可为D形式。

[0070] 在一个实施例中, $-R^1$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为苯丙氨酸残基, 例如D-苯丙氨酸, 或亮氨酸残基, 诸如D-亮氨酸残基。

[0071] 对第6位氨基酸残基的取代可自例如WO 2016/083531获知。

[0072] $-R^2$

[0073] 基团 $-R^2$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起对应于多黏菌素系列化合物中第7位的氨基酸残基。

[0074] 基团 $-R^2$ 为任选经一个羟基取代的 C_{1-4} 烷基。

[0075] 在一个实施例中, $-R^2$ 为 C_{1-4} 烷基。此基团未经取代。

[0076] 在一个实施例中, $-R^2$ 为任选经一个羟基取代, 诸如未经取代的 C_{3-4} 烷基, 诸如 C_4 烷基。

[0077] 第7位的基团氨基酸残基可与多黏菌素B及黏菌素第7位的氨基酸残基相同。即, R^2 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起可为L-Leu残基。

[0078] 在一个实施例中, $-R^2$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、苏氨酸或氨基丁酸残基。该氨基酸残基可为L形式。

[0079] 在一个实施例中, $-R^2$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为亮氨酸、氨基丁酸或苏氨酸残基。该氨基酸残基可为L形式。

[0080] 在其他实施例中, 相对于多黏菌素B及黏菌素, 第7位氨基酸残基可经另一氨基酸残基取代。

[0081] 在一个实施例中, $-R^2$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为亮氨酸、苏氨酸或氨基丁酸 (Abu) 残基, 诸如L-亮氨酸、L-苏氨酸或L-Abu。

[0082] 对第7位氨基酸残基的取代尤其描述于例如WO 2016/083531及Velkov等人中。

[0083] $-R^3$

[0084] 基团 $-R^3$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起对应于多黏菌素系列化合物中第10位的氨基酸残基。

[0085] 基团 $-R^3$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为苏氨酸, 诸如L-苏氨酸。

[0086] $-R^4$

[0087] 基团 $-R^4$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起对应于多黏菌素系列化合物中第3位的氨基酸残基。

[0088] 在本发明化合物中, 第3位的氨基酸残基不为多黏菌素B及黏菌素第3位的氨基酸

残基L-Dab。在本发明化合物中, $-R^4$ 与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为Dap, 诸如L-Dap。

[0089] $-R^4$ 为Dap侧链, 诸如L-Dap的化合物可使用W0 2015/135976中所描述的方法来制备。

[0090] 在式(I)化合物中,Dap侧链内的氨基可受保护, 例如该氨基可受Boc保护。

[0091] $-R^8$

[0092] 基团 $-R^8$ 与处于其经由羟基亚甲基间隔基($-\text{CH}(\text{OH})-$)连接的碳的 β 位的羰基及氮一起对应于多黏菌素系列化合物中第2位的氨基酸残基。

[0093] 第2位的氨基酸残基可与多黏菌素B及黏菌素第2位的氨基酸残基相同。即, R^1 与处于其经由羟基亚甲基间隔基连接的碳的 β 位的羰基及氮一起可为L-苏氨酸残基。

[0094] 包括基团 $-R^8$ 的氨基酸残基对应于多黏菌素系列化合物中的第2位。

[0095] 在一个实施例中, $-R^8$ 为甲基。所得氨基酸因此为Thr。

[0096] 在一个实施例中, $-R^8$ 为H。所得氨基酸因此为Ser。

[0097] 典型地, $-R^8$ 为甲基。

[0098] $-X-$

[0099] 基团 $-X-$ 为 $-\text{C}(\text{O})-$ 。

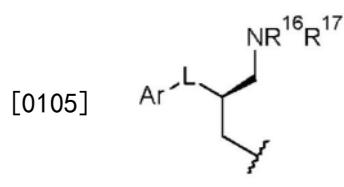
[0100] 星号指示与多黏菌素九肽核心氨基末端NH, 诸如第2位氨基酸的连接点。基团 $-X-$ 的左手侧为与 $-R^{15}$ 的连接点。

[0101] $-R^{15}$

[0102] 基团 $-R^{15}$ 与 $-X-$ 一起为多黏菌素核心N末端的修饰。

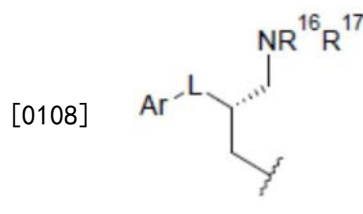
[0103] 本发明化合物含有在N末端部分 $-R^{15}$ 中 γ -氨基丙基的 β 位的立体中心。已发现立体异构体之一与较低细胞毒性及较低肾脏药物水平相关。此立体异构体为如本案的工作实例中详细描述在逆相层析中较快速洗脱的立体异构体。

[0104] 在一个实施例中,基团 $-R^{15}$ 为:



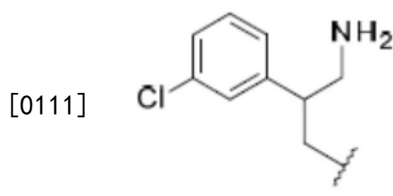
[0106] 此立体形式为在该相层析中较快洗脱的立体形式。

[0107] 替代地,基团 $-R^{15}$ 可为:

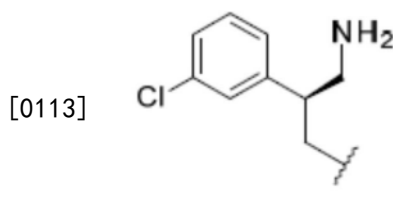


[0109] 此立体形式为较慢洗脱的立体形式。

[0110] 在一个实施例中,基团 $-R^{15}$ 为:



[0112] 在一个实施例中,基团-R¹⁵为:



[0114] -R¹⁵内的例示性基团如下所示。

[0115] -R¹⁶及-R¹⁷

[0116] 基团-R¹⁶及-R¹⁷皆为氢。

[0117] 在式(I)化合物中,基团-NR¹⁶R¹⁷可受保护,例如基团-NR¹⁶R¹⁷可受Boc保护。

[0118] -L-

[0119] 该基团可为共价键亚甲基(-CH₂-)。

[0120] 典型地,-L-为共价键。

[0121] -Ar

[0122] 基团-Ar为芳基,诸如碳芳基或杂芳基。该芳基任选经取代。

[0123] 该芳基可为C₆芳基,诸如苯基,或C₅芳基,诸如噻吩。

[0124] 基团-Ar可为苯基,且其任选经取代,诸如经取代。在一个实施例中,-Ar为未经取代的苯基。

[0125] 芳基可诸如经一或多个基团-R^S取代。各基团-R^S独立地选自卤素、烷基、卤代烷基及芳基,诸如卤素及烷基。

[0126] 芳基可经一、二或三个-R^S基团,诸如一或两个基团,诸如一个基团(单取代)取代。

[0127] 卤素可选自氟、氯、溴及碘,且可选自氟及氯,诸如氯。

[0128] 卤素可为氯。

[0129] 烷基可为C₁₋₆烷基,诸如C₁₋₄烷基,诸如C₁₋₃烷基,诸如C₃烷基。

[0130] 烷基可选自甲基、乙基及丙基,包括正丙基及异丙基。

[0131] 烷基可为异丙基。

[0132] 卤代烷基可为经一或多个卤素取代的C₁₋₆烷基,诸如C₁₋₄烷基,诸如C₁₋₂烷基。烷基可经卤素全取代,例如经氟全取代。

[0133] 卤代烷基可为三氟甲基。

[0134] 在-R^S为芳基时,其可为碳芳基或杂芳基。芳基可为C₅₋₆芳基,诸如C₅芳基。C₅芳基可选自噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡啶基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基及异噁唑基。C₆芳基可为苯基

[0135] 芳基可为噻吩基,诸如噻吩-2-基。

[0136] 芳基本身可任选经一、二或三个-R^{Ar}基团,诸如一或两个基团,诸如一个基团(单取代)取代。各基团-R^{Ar}独立地选自卤素、烷基、卤代烷基及芳基,诸如卤素及烷基。这些基团可

具有与以上所描述的基团相同的含义,但芳基未经取代。

[0137] 基团-Ar可为卤素苯基或烷基苯基。

[0138] 卤素苯基可选自2-卤素苯基,诸如2-氯苯基;3-卤素苯基,诸如3-氯苯基;及4-卤素苯基,诸如4-氯苯基。

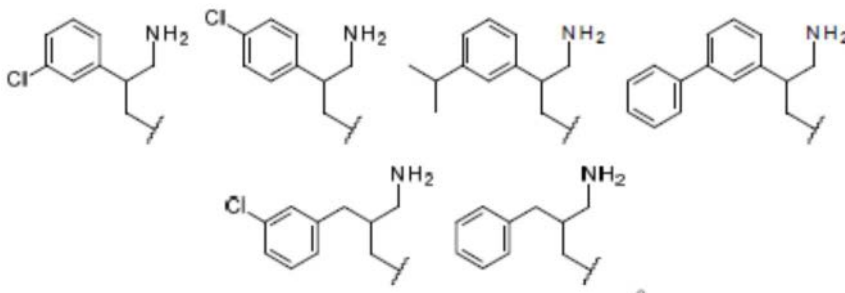
[0139] 烷基苯基可选自2-烷基苯基,诸如2-异丙基苯基;3-烷基苯基,诸如3-异丙基苯基;及4-烷基苯基,诸如4-异丙基苯基。

[0140] 基团-Ar可为2-氯苯基或3-异丙基苯基。

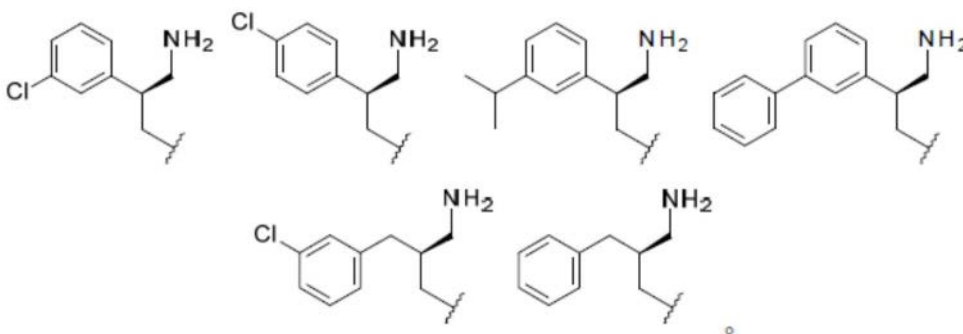
[0141] 基团-Ar可为2-氯苯基。

[0142] 所选择的-R¹⁵基团

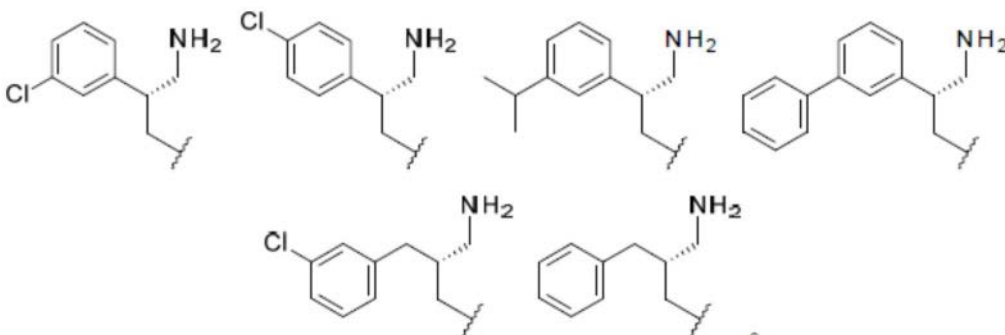
[0143] 基团-R¹⁵可选自以下基团:



[0145] 基团-R¹⁵可选自以下基团:



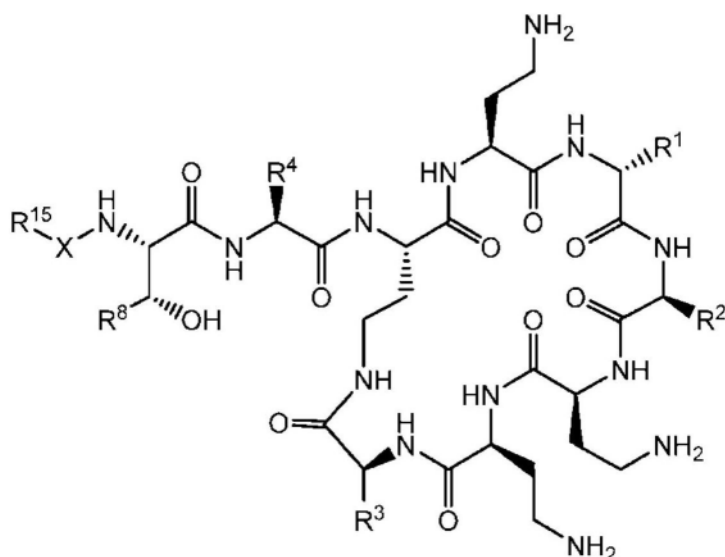
[0147] 基团-R¹⁵可选自以下基团:



[0149] 关于式(I)化合物的实施例

[0150] 在一些实施例中,式(I)化合物为具有如以下所描绘的R¹、R²、R³及R⁴部分的取向的式(Ia)化合物:

[0151]



[0152] 其中-X-、-R¹、-R²、-R³、-R⁴、-R⁸及-R¹⁵如针对式(I)化合物所定义，

[0153] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物、经保护形式或前药形式。

[0154] 在式(Ia)化合物内，-R¹与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为D-苯丙氨酸、D-亮氨酸或D-正亮氨酸。在式(Ia)化合物内，-R²与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为L-亮氨酸、L-氨基丁酸或L-苏氨酸残基。

[0155] 式(Ia)化合物可为如下化合物：其中-L-为共价键或-CH₂-且-Ar为任选经一或两个选自自由卤素、C₁-C₆烷基、任选经取代的芳基及任选经取代的杂芳基组成的群的基团取代的苯基。举例而言，-Ar可为任选经一或两个选自自由氯、溴、噻吩基、苯基、甲基、异丙基及异丁基组成的群的基团取代的苯基。

[0156] 此处，-Ar可选自苯基、3-氯苯基、4-氯苯基、3-异丙基苯基、3-异丁基苯基、3-甲基苯基、3-溴苯基、1,1'-联苯-3-基、3,5-二氯苯基及噻吩-3-基苯基。

[0157] 本发明化合物可为式(I)化合物，其中：

[0158] -R¹与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为D-苯丙氨酸、D-亮氨酸或D-正亮氨酸；

[0159] -R²与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为L-亮氨酸、L-氨基丁酸或L-苏氨酸残基；

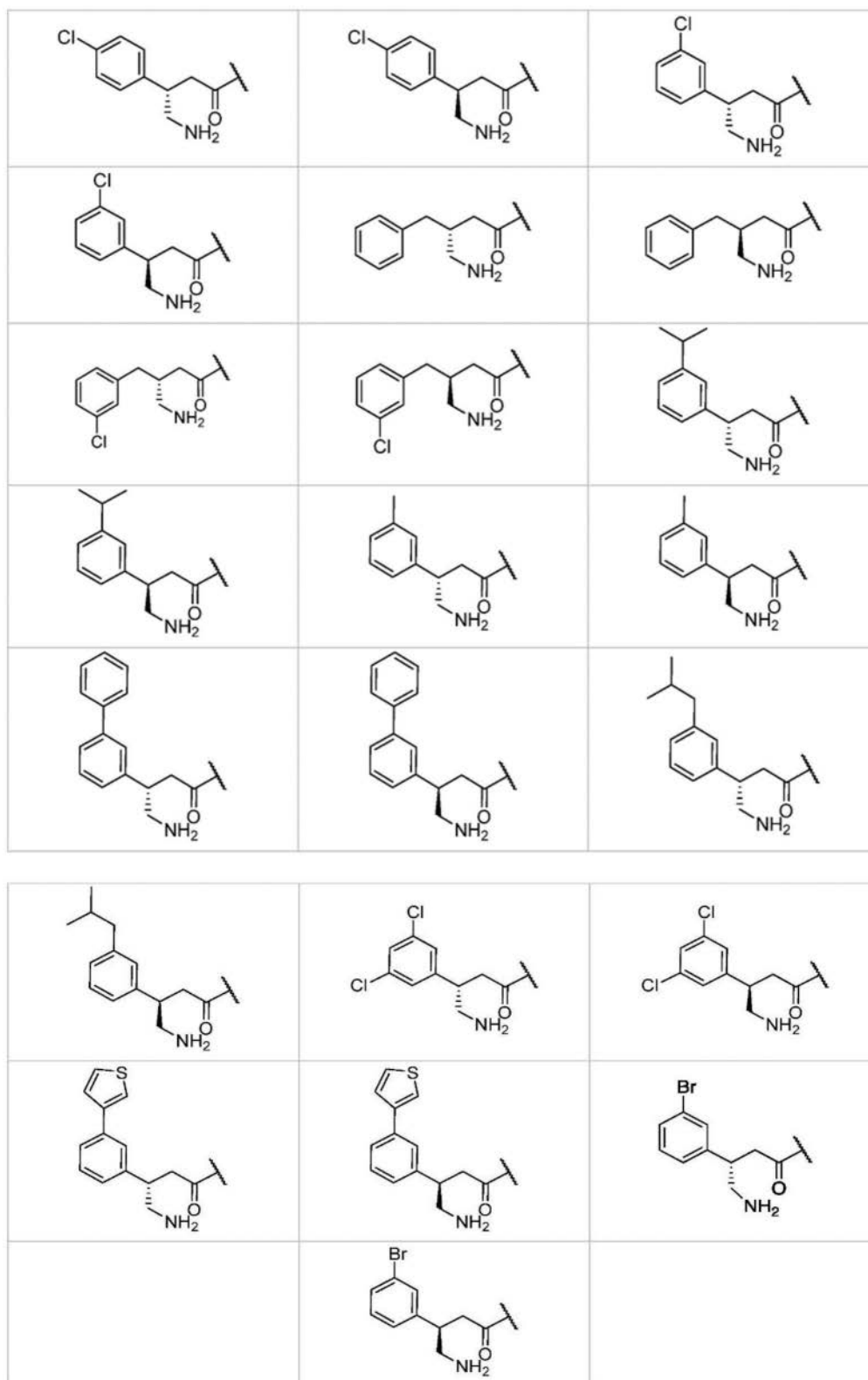
[0160] -R³为L-苏氨酸；

[0161] -R⁴为L-Dap；

[0162] -R⁸为甲基；且

[0163] R¹⁵-X-选自由以下各项组成的群：

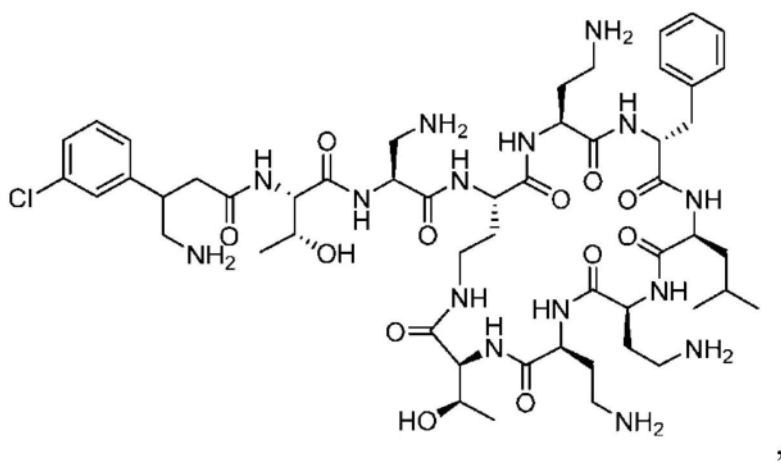
[0164]



[0165] 及其盐、溶剂化物、经保护形式及前药形式。化合物(II)及化合物(III)

[0166] 式(I)化合物可为如以下所示的式(II)化合物:

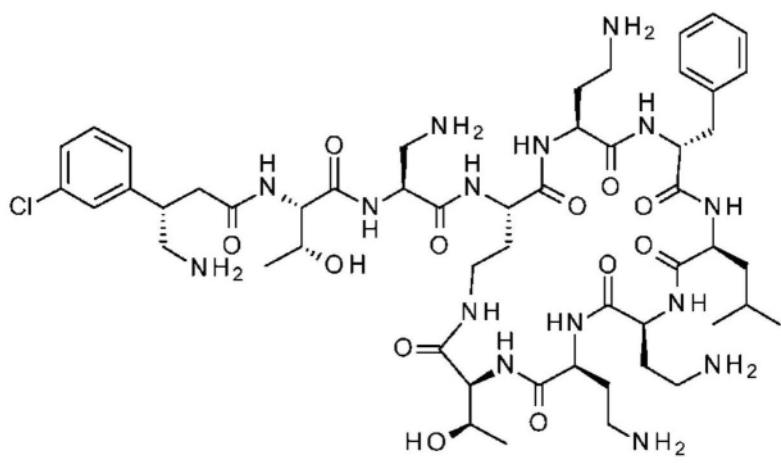
[0167]



[0168] 及其盐、溶剂化物及经保护形式。

[0169] 式(I)化合物可为如以下所示的式(IIa)化合物：

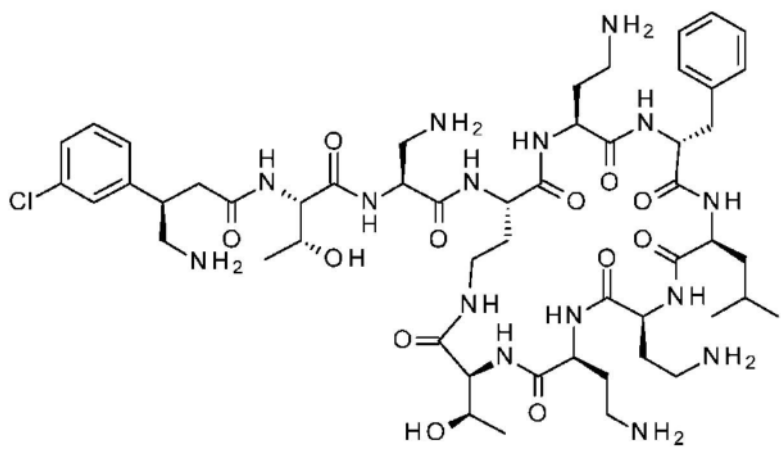
[0170]



[0171] 及其盐、溶剂化物及经保护形式。

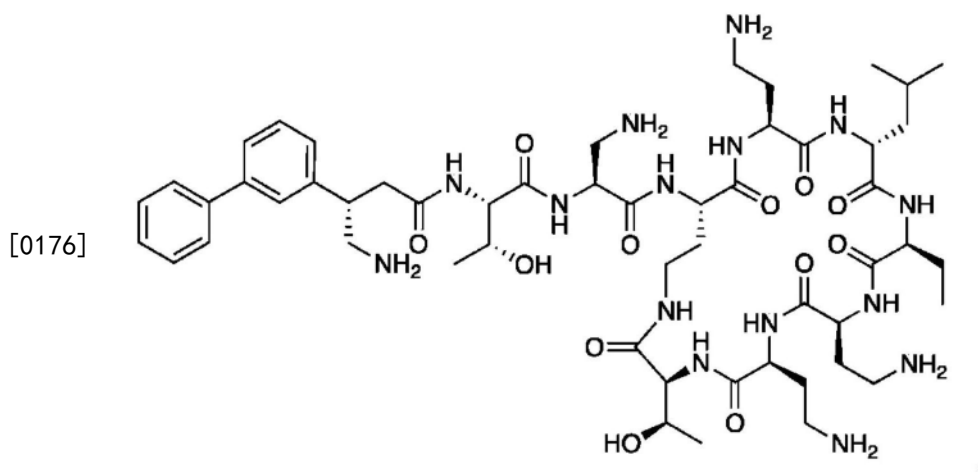
[0172] 式(I)化合物可为如以下所示的式(IIb)化合物：

[0173]



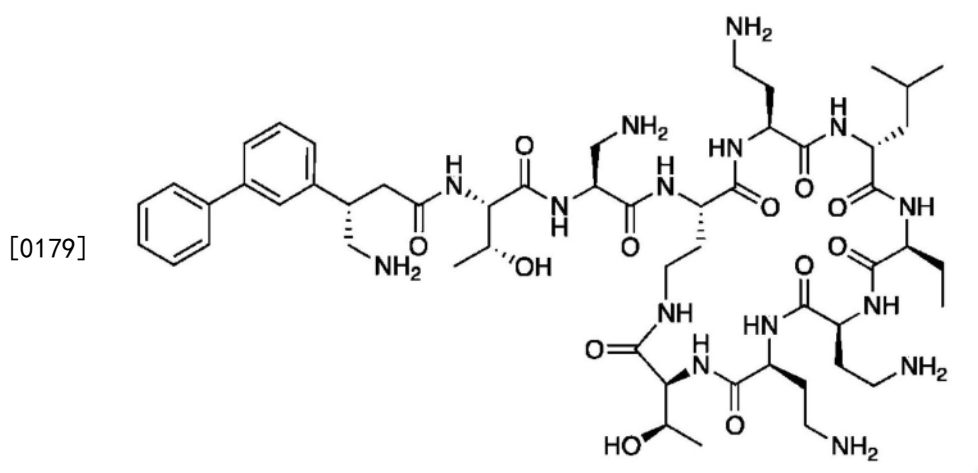
[0174] 及其盐、溶剂化物及经保护形式。

[0175] 式(I)化合物可为如以下所示的式(III)化合物：



[0177] 及其盐、溶剂化物及经保护形式。

[0178] 式(I)化合物可为如以下所示的式(III)化合物:

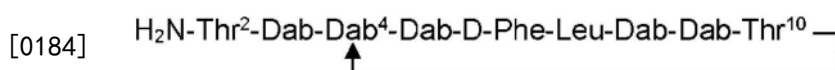


[0180] 及其盐、溶剂化物及经保护形式。

[0181] 多黏菌素化合物

[0182] 用于本案的化合物基于已知多黏菌素化合物,诸如多黏菌素B九肽及黏菌素九肽的经修饰形式。

[0183] 多黏菌素B九肽具有以下所示的结构:



[0185] 其中指示第2位、第4位及第10位(参考用于多黏菌素B十肽的编号系统),且除非指示,否则氨基酸残基呈L-构型。

[0186] 本发明化合物为多黏菌素B九肽的衍生物,其中(i)N末端氨基-NH₂经如本文中所描述的基团-NH-X-R¹⁵置换;(ii)第3位氨基酸残基经Dap取代;且任选(iii)第2位、第6位及/或第7位氨基酸残基经另一氨基酸残基取代。

[0187] 为便利起见,本发明化合物由式(I)表示,其中第2位、第3位、第6位、第7位或第10位氨基酸分别由基团R⁸、R⁴、R¹、R²及R³的性质决定。本发明化合物,包括以上所描述的变异体,具有生物活性。

[0188] 合成方法

[0189] 本发明化合物的制备对于本领域技术人员,尤其是已知悉W0 2015/135976中所描

述的用于制备经修饰多黏菌素九肽的方法的本领域技术人员为熟知的。考虑到本案中所采用的新颖N末端基团,可容易地对本领域中所描述的方法进行改适以用于制备本案的化合物。

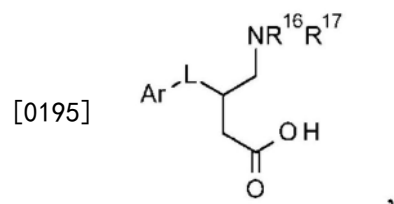
[0190] 一般而言,本发明化合物可通过使经适当保护的多黏菌素九肽中间物与具有基团 $-R^{15}$ 的羧酸偶联来制备。此反应的产物典型地为式(I)化合物的经保护形式。可视需要进行保护基移除。此为自W0 2015/135976获知的一般策略。

[0191] 经适当保护的九肽中间物本身可根据W0 2015/135976中所示的方法来制备。如本文中所描述,亦可通过固相合成线性九肽,继而自固体载体裂解线性形式,随后使该线性形式在第4位与第10位氨基残基之间环化来制备经适当保护的九肽中间物。

[0192] 可使用本领域技术人员已知的方法通过常规肽合成来制造本发明化合物。适合的方法包括固相合成,诸如以下文献所描述:de Visser等人,J.Peptide Res,61,2003,298-306;Vaara等人,Antimicrob.Agents and Chemotherapy,52,2008.3229-3236;或Velkov等人,ACS Chem.Biol.9,2014,1172。这些方法包括适合的保护策略及用于环化步骤的方法。

[0193] 在需要时,可将式(I)化合物至少部分纯化,例如以分离产物的非对映异构形式。

[0194] 在本发明的另一方面中,提供一种式(X)化合物:



[0196] 其中:

[0197] $-R^{16}$ 为氢;

[0198] $-R^{17}$ 为氢;

[0199] $-L-$ 为共价键或亚甲基;

[0200] $-Ar$ 为任选经取代的芳基,诸如经取代的苯基

[0201] 及其盐、溶剂化物、经保护形式及活化形式。

[0202] 式(X)化合物得以用于制备式(I)化合物。典型地,使化合物(X),诸如呈其经保护形式,与式(XI)的经保护多黏菌素九肽偶合,以产生式(I)化合物的经保护形式。

[0203] 式(I)化合物相关于基团 $-L-$ 及 $-Ar$ 的实施例亦适用于式(X)化合物。

[0204] 典型地,氨基官能基,即基团 $-NR^{16}R^{17}$ 经保护。

[0205] 在一个实施例中,式(X)化合物中的氨基官能基经Boc或CBZ保护。此处, $-R^{16}$ 为氢且 $-R^{17}$ 为 $-C(O)O-t-Bu$ 或 $-C(O)O-Bn$ 。

[0206] 式(XI)化合物为式(I)化合物,但基团 $R^{15}-X-$ 为氢,及其盐、溶剂化物及经保护形式。

[0207] 式(I)化合物相关于基团 $-R^1$ 、 $-R^2$ 、 $-R^3$ 、 $-R^4$ 及 $-R^8$ 的所选实施例亦适用于式(XI)化合物。

[0208] 式(XI)化合物典型地经保护,且更特定地,第3位、第5位、第8位及第9位氨基酸残基侧链中的氨基,例如第3位、第5位、第8位及第9位的氨基酸各自经Boc保护或经CBZ保护,且第2位及任选第10位的氨基酸残基侧链中的羟基经保护,例如这些氨基酸中的每一者均

经tBu保护。

[0209] 可使用常规酰胺偶合条件使式(X)的羧酸化合物与式(XI)的氨基化合物偶合。式(X)化合物可呈活化形式使用,该形式可原位产生,以便与式(XI)化合物反应。

[0210] 活化形式可通过在任选于碱存在下进行的酰胺键形成反应中适当选择偶合剂而原位产生。

[0211] 式(X)的羧酸可通过标准活化剂(诸如碳化二亚胺,诸如DIC(N,N'-二异丙基碳化二亚胺)或EDCI(水溶性碳化二亚胺;1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺)的反应来活化。该酸的活化形式为O-酰基异脲。

[0212] 羧酸可通过羟基苯并三唑或羟基氮杂苯并三唑,诸如HOBt(1-羟基-苯并三唑)或HOAt(1-羟基-7-氮杂-苯并三唑)加以活化。该酸的活化形式为酯。

[0213] 酯可经由碳化二亚胺活化形式形成,或其可由羧酸直接形成,例如使用适当的试剂,诸如HATU、HBTU、PyBOP、PyBROP或TBTU。

[0214] 可存在用于形成活化形式的有机碱,诸如DIPEA或TEA。

[0215] 经保护形式

[0216] 本发明化合物,诸如式(I)、式(II)及式(III)化合物,可呈经保护形式提供。此处,可掩蔽反应性官能基,诸如氨基官能基,以防止其在合成步骤期间反应。提供保护基以掩蔽反应性官能基,且可在合成的稍后阶段移除此保护基以露出原始反应性官能基。

[0217] 在一个实施例中,经保护形式为其中氨基、羟基、硫醇及/或羧基官能基经保护基保护(掩蔽)的化合物。在一个实施例中,经保护形式为其中用化合物保护氨基酸残基的侧链官能基的化合物。

[0218] 在式(I)、式(II)及式(III)的化合物中,第5位、第8位及第9位的氨基酸残基为Dab残基,且Dab残基的侧链包括氨基官能基。各Dab残基的氨基酸官能基可如本文中所描述用氨基保护基加以保护。类似地,第3位氨基酸残基为Dap,且此氨基酸残基的侧链包括氨基官能基。

[0219] 基团-R¹⁵含有呈基团-R¹⁶R¹⁷形式的氨基官能基,例如,其中-R¹⁶及-R¹⁷中的每一者皆为氢。该氨基官能基可如本文中所描述用氨基保护基加以保护。

[0220] 保护基,诸如氨基酸残基的保护基,在本领域中众所周知且已充分描述。

[0221] 具有侧基保护的氨基酸任选连同氨基及羧基保护可购自市面。因而,经保护的多黏菌素化合物可由经适当保护的氨基酸起始物质制备。

[0222] Velkov等人描述在固相上使用经适当保护的氨基酸逐步制备多黏菌素化合物。揭示苏氨酸及Dab的经保护形式的用途(参见补充信息)。

[0223] 在使用保护基时,可在实质上不破坏多黏菌素核心结构的条件,例如不改变氨基酸残基的立体化学性质的条件下将其移除。

[0224] 在一个实施例中,保护基为酸不稳定的、碱不稳定的或在还原条件下可移除的。

[0225] 用于氨基官能基的实例保护基包括Boc(叔丁氧基羰基)、Bn(苯甲基,Bzl)、CbZ(苯甲氧基羰基,Z)、2-Cl-Z(2-氯)、ivDde(1-[4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基]-3-甲基丁基)、Fmoc(苄基甲氧基羰基)、HSO₃-Fmoc(磺酰基化Fmoc,诸如2-磺酰基-Fmoc,如Schechter等人,J. Med. Chem. 2002, 45(19) 4264中所描述)、Dde(1-[4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基]乙基)、Mmt(4-甲氧基三苯甲基)、Mtt(4-甲基三苯甲基)、Nvoc(6-硝基芰苄

酰基羰基)、Tfa(三氟乙酰基)及Alloc(烯丙氧基羰基)。

[0226] 用于芳族氮官能基的实例保护基包括Boc、Mtt、Trt及Dnp(二硝基苯基)。

[0227] 在一个实施例中,用于氨基官能基的保护基选自Boc、ivDde、CbZ、Bn及Fmoc以及HSO₃-Fmoc。

[0228] 在一个实施例中,用于氨基官能基的保护基为Boc、ivDde、Fmoc或CbZ,诸如Boc、ivDde或Cbz。

[0229] 可针对第5位、第8位及第9位以及任选第3位所存在的氨基酸残基的侧链中所存在的氨基官能基提供Boc保护。

[0230] 用于羟基官能基的实例保护基包括Trt(三苯甲基)、Bn(苯甲基)及tBu(叔丁基)。

[0231] 在一个实施例中,用于羟基官能基的保护基为tBu。

[0232] 其他实例保护基包括硅烷基醚保护基,诸如TMS、TES、TBS、TIPS、TBDMS及TBDPS。此类保护基团可用例如TBAF移除。

[0233] 用于羧基官能基的实例保护基包括Bn(苯甲基,Bz)、tBu(叔丁基)、TMSET(三甲基硅烷基乙基)及Dmab({1-[4,4-二甲基-2,6-二氧化代环己-1-亚基]-3-甲基丁基}氨基苯甲基)。

[0234] 用于芳族氮官能基(例如此类官能基存在于基团-Ar中)的实例保护基包括Boc、Mtt、Trt及Dnp(二硝基苯基)。

[0235] 在一些实施例中,仅保护某些类型的官能基。举例而言,可仅保护氨基,诸如氨基酸残基侧链中的氨基。

[0236] 在一个实施例中,保护氨基及羟基。

[0237] LogP

[0238] 本发明化合物,诸如式(I)、式(II)或式(III)化合物,可具有在一定限度内的分配系数,诸如表示为LogP值。分配系数可指示化合物的亲脂性。

[0239] 发明人已确定具有较高亲脂性的化合物具有不良细胞毒性。本发明化合物典型地具有与较低细胞毒性相关的LogP值,诸如以下所描述的LogP值。

[0240] 化合物的LogP值可凭实验确定(例如通过使化合物分配在辛醇与水之间),或其可使用标准计算方法预测。

[0241] 举例而言,提及LogP可为提及ALogP,后者可使用Ghose等人,J.Phys.Chem.A,1998,102,3762-3772所描述的方法来确定,该文献的内容以引用的方式整体并入本文中。因而,ALogP为LogP的高斯(Ghose)/克里彭(Crippen)基团贡献估计值。

[0242] 在一个实施例中,化合物的LogP值,诸如ALogP值为至少为-6.5、至少-6.6、至少-6.7、至少-6.8、至少-6.9、至少-7.0、至少-7.5或至少-8.0。

[0243] 在一个实施例中,化合物的LogP值,诸如ALogP值为至多-6.4、至多-6.3、至多-6.2、至多-6.1、至多-6.0、至多-5.9或至多-5.8。

[0244] 在一个实施例中,化合物的LogP值在具有适当地选自以上所提供的界限的上限及下限的范围内,例如在-5.8至-8.0,诸如-6.0至-6.7,诸如-6.3至-6.7的范围内。当基团-R²为未经取代的烷基时,可选择这些范围。

[0245] 在另一实施例中,化合物的LogP值在-6.7至-7.4的范围内。当基团-R²为经一个羟基取代的烷基时,可选择此范围。

[0246] 发现具有在以上所论述的界限内的LogP值(诸如ALogP值)的化合物对多黏菌素敏感性及多黏菌素抗性细菌菌株具有优良活性。该化合物可具有与多黏菌素B相当的抗微生物活性。有利地,该化合物与多黏菌素B相比亦可具有降低的细胞毒性。

[0247] 发明人已发现,可通过选择本案的-R¹⁵基团连同适当选择第6位及/或第7位氨基酸残基(诸如适当选择-R¹及/或-R²)来获得具有最佳LogP值的化合物。

[0248] 活性剂

[0249] 式(I)、式(II)或式(III)化合物可各自与第二活性剂一起使用。发明人已发现,此类组合具有比根据两种化合物的单独活性预期的生物活性更高的生物活性。式(I)、式(II)或式(III)化合物可用于强化第二活性剂的活性。特定地,式(I)、式(II)或式(III)化合物可与第二活性剂一起使用以增强该试剂的抗微生物活性,例如针对革兰氏阴性细菌。

[0250] 不希望受理论束缚,认为式(I)、式(II)或式(III)化合物作用于细胞,例如革兰氏阴性细菌细胞的外膜,从而促进第二活性剂摄入该细胞中。因此,否则在越过外膜方面不能胜任或不良的试剂可在式(I)、式(II)或式(III)化合物的作用下吸收至靶细胞中。

[0251] 在一个实施例中,式(I)、式(II)或式(III)化合物与第二活性剂的组合对革兰氏阴性细菌具有活性。此处,不必需的是,式(I)、式(II)或式(III)化合物或该第二活性剂单独对革兰氏阴性细菌具有活性。

[0252] 在一个实施例中,该第二活性剂为对特定微生物(诸如细菌)具有低于10、低于5或低于1μg/mL的量测MIC值的试剂。该微生物可为革兰氏阴性细菌,诸如选自以下组成的群的革兰氏阴性细菌:大肠杆菌、肠道沙门氏菌(*S. enterica*)、肺炎克雷伯氏杆菌(*K. pneumoniae*)、产酸克雷伯氏杆菌(*K. oxytoca*)、阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)、产气肠杆菌(*E. aerogenes*)、聚团肠杆菌(*E. agglomerans*)、醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、鲍氏不动杆菌(*A. baumannii*);绿脓杆菌及嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)。

[0253] 对革兰氏阴性细菌具有活性的第二活性剂的实例包括β-内酰胺、四环素、氨基糖苷及喹诺酮。

[0254] 在一个实施例中,该第二活性剂为对特定微生物(诸如革兰氏阴性细菌)具有超过4、超过8、超过16或超过32μg/mL的量测MIC值的试剂。在此实施例中,该第二活性剂可对革兰氏阳性细菌具有活性。举例而言,该第二活性剂为对特定革兰氏阳性细菌具有低于10、低于5或低于1μg/mL的量测MIC值的试剂。此处,式(I)、式(II)或式(III)化合物用于促进第二活性剂摄入革兰氏阴性细菌细胞中。第二活性剂因此能够作用于革兰氏阴性细菌细胞内的标靶,该标靶可与革兰氏阳性细菌细胞中的第二活性剂标靶相同。

[0255] 革兰氏阳性细菌可选自以下组成的群:葡萄球菌属及链球菌属细菌,诸如金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) (包括MRSA)、表皮葡萄球菌(*S. epidermis*)、粪肠球菌(*E. faecalis*)及屎肠球菌(*E. faecium*)。

[0256] 对革兰氏阳性细菌具有活性(例如,在以上所提供的MIC值下)且对革兰氏阴性细菌具有中等活性的第二活性剂的实例包括利放平(rifampicin)、新生霉素(novobiocin)、大环内酯、截短侧耳素(pleuromutilin)。在一个实施例中,对革兰氏阴性细菌具有中等活性的化合物可对革兰氏阴性细菌具有低于32、低于64或低于128μg/mL的量测MIC值。

[0257] 亦适合使用对革兰氏阳性细菌具有活性且对革兰氏阴性细菌基本上无活性的试

剂。实例包括梭链孢酸 (fusidic acid)、噁唑烷 (例如利奈唑胺 (linezolid)、糖肽 (例如万古霉素 (vancomycin)、达托霉素 (daptomycin) 及羊毛硫抗生素 (lantibiotic)。在一个实施例中,对革兰氏阴性细菌基本无活性的化合物可对革兰氏阴性细菌具有超过32、超过64、超过128、超过256 $\mu\text{g/mL}$ 的量测MIC值。

[0258] 在正常情形下,此类试剂不必要适用于抗革兰氏阴性细菌,因为其越过革兰氏阴性细菌细胞外膜的能力相对不佳。如以上所解释,当与式(I)、式(II)或式(III)化合物一起使用时,此类试剂适合使用。

[0259] 在一个实施例中,活性剂可选自由以下组成的群:利放平(利福平)、利福布汀(rifabutin)、利福拉齐(rifalazil)、利福喷汀(rifapentine)、利福昔明(rifaximin)、氮烯内酰胺(aztreonam)、苯唑西林(oxacillin)、新生霉素(novobiocin)、梭链孢酸(fusidic acid)、阿奇霉素(azithromycin)、赛普沙辛(ciprofloxacin)、美罗培南(meropenem)、替加环素(tigecycline)、米诺环素(minocycline)、红霉素(erythromycin)、克拉霉素(clarithromycin)及莫匹罗星(mupirocin)及其药学上可接受的盐、溶剂化物及前药形式。

[0260] 本案发明人已发现式(I)、式(II)或式(III)的多黏菌素化合物可与利福霉素家族中的某些化合物一起用于治疗微生物感染。利福霉素家族包括分离物利福霉素A、B、C、D、E、S及SV,以及这些化合物的合成衍生型式,诸如利放平(利福平)、利福布汀、利福拉齐、利福喷汀及利福昔明,以及其药学上可接受的盐及溶剂化物。

[0261] 在一个实施例中,该活性剂为利放平(利福平)及其药学上可接受的盐、溶剂化物及前药形式。

[0262] 盐、溶剂化物及其他形式

[0263] 式(I)、式(II)及式(III)化合物的盐的实例包括所有药学上可接受的盐,诸如但不限于强无机酸的酸加成盐,诸如HCl及HBr盐;及强有机酸加成盐,诸如甲磺酸盐。盐的其他实例包括硫酸盐及乙酸盐,诸如乙酸盐本身、三氟乙酸盐或三氯乙酸盐。

[0264] 在一个实施例中,本发明化合物呈硫酸盐或三氟乙酸(TFA)盐形式提供。在一个实施例中,本发明化合物呈乙酸盐,诸如乙酸盐形式提供。

[0265] 式(I)、式(II)或式(III)化合物亦可调配为前药。前药可包括本文中所描述的抗菌化合物,其中一或多个氨基用可在活体内裂解从而释放生物活性化合物的基团加以保护。在一个实施例中,前药为“胺前药”。胺前药的实例包括如例如Bergen等人, Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 2006, 50, 1953中所描述的磺基甲基或如例如Schechter等人, J. Med. Chem. 2002, 45 (19) 4264中所描述的 HSO_3 -Fmoc及其盐。胺前药的其他实例由Krise及Oliyai, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, 2007, 5 (2), 101-131提供。

[0266] 在一个实施例中,式(I)、式(II)或式(III)化合物提供为前药。

[0267] 提及式(I)、式(II)或式(III)化合物或本文中所描述的任何其他化合物亦是指该化合物的溶剂化物。溶剂化物的实例包括水合物。

[0268] 式(I)、式(II)或式(III)化合物或本文中所描述的任何其他化合物包括原子被天然存在或非天然存在的同位素置换的化合物。在一个实施例中,同位素为稳定同位素。因而,此处描述的化合物包括例如含氘化合物及其类似物。举例而言,H可呈任何同位素形式,包括 ^1H 、 ^2H (D)及 ^3H (T);C可呈任何同位素形式,包括 ^{12}C 、 ^{13}C 及 ^{14}C ;O可呈任何同位素形式,包

括¹⁶O及¹⁸O;及其类似物。

[0269] 某些式(I)、式(II)或式(III)化合物或本文中所描述的任何其他化合物可呈一或多种特定几何异构、光学异构、对映异构、非对映异构、差向异构、同素异构、立体异构、互变异构、构形异构或端基异构形式存在,包括但不限于顺式及反式形式;E及Z形式;c、t及r形式;内型及外型;R、S及内消旋形式;D及L形式;d及l形式;(+)和(-)形式;酮、烯醇及烯醇化物形式;同及反形式;向斜及背斜形式;a及p形式;轴向及赤道形式;船形、椅形、螺旋形、封套形及半椅形;及其组合,下文统称为“异构体”(或“异构形式”)。

[0270] 注意,以下针对互变异构形式的论述排除,特定地,如本文中所使用的术语“异构体”中不包括结构(或组成)异构体(即,在原子之间的连接方面而非仅在原子空间位置方面不同的异构体)。举例而言,提及甲氧基- OCH_3 不应被视为提及其结构异构体羟甲基- CH_2OH 。类似地,提及邻氯苯基不应被视为提及其结构异构体间氯苯基。然而,提及一类结构可充分包括属该类的结构异构形式(例如, C_{1-6} 烷基包括正丙基及异丙基;丁基包括正丁基、异丁基、仲丁基及叔丁基;甲氧基苯基包括邻甲氧基苯基、间甲氧基苯基及对甲氧基苯基)。

[0271] 除非另外规定,否则提及特定化合物包括所有此类异构形式,包括其混合物(例如外消旋混合物)。该异构形式的制备(例如,不对称合成)及分离(例如,分级结晶及层析方法)方法在本领域中为已知的,或通过以已知方式修改本文中所教示的方法或已知方法而容易地获得。

[0272] 本发明的一个方面关于呈实质上经纯化的形式及/或呈实质上不含污染物的形式的化合物。

[0273] 在一个实施例中,实质上经纯化的形式为至少50重量%,例如至少60重量%,例如至少70重量%,例如至少80重量%,例如至少90重量%,例如至少95重量%,例如至少97重量%,例如至少98重量%,例如至少99重量%。

[0274] 除非规定,否则实质上经纯化的形式是指呈任何立体异构或对映异构形式的化合物。举例而言,在一个实施例中,实质上经纯化的形式是指立体异构体的混合物,即,相对于其他化合物经纯化。在一个实施例中,实质上经纯化的形式是指一种立体异构体,例如光学纯立体异构体。在一个实施例中,实质上经纯化的形式是指对映异构体的混合物。在一个实施例中,实质上经纯化的形式是指对映异构体的等摩尔混合物(即,外消旋混合物、外消旋物)。在一个实施例中,实质上经纯化的形式是指一种对映异构体,例如光学纯对映异构体。

[0275] 在一个实施例中,污染物占不超过50重量%,例如不超过40重量%,例如不超过30重量%,例如不超过20重量%,例如不超过10重量%,例如不超过5重量%,例如不超过3重量%,例如不超过2重量%,例如不超过1重量%。

[0276] 除非规定,否则污染物是指其他化合物,即,除立体异构体或对映异构体以外。在一个实施例中,污染物是指其他化合物及其他立体异构体。在一个实施例中,污染物是指其他化合物及其他对映异构体。

[0277] 在一个实施例中,实质上经纯化的形式为至少60%光学纯(即,以摩尔计60%化合物为所要立体异构体或对映异构体,且40%为非所要立体异构体或对映异构体),例如至少70%光学纯,例如至少80%光学纯,例如至少90%光学纯,例如至少95%光学纯,例如至少97%光学纯,例如至少98%光学纯,例如至少99%光学纯。

[0278] 治疗方法

[0279] 式(I)、式(II)或式(III)化合物或含有这些化合物的医药调配物适用于治疗及预防方法中。该化合物可施用有需要的个体。该化合物适合与活性剂(“第二活性剂”),例如作为抗微生物剂的第二活性剂一起使用。

[0280] 式(I)、式(II)或式(III)化合物用于通过疗法治疗人体或动物体的方法中。在本发明的一些方面中,式(I)、式(II)或式(III)化合物可施用于哺乳动物个体,诸如人类,以治疗微生物感染。

[0281] 本发明的另一方面关于式(I)或式(II)化合物在制造供治疗使用的药物中的用途。在一个实施例中,该药物包含式(I)、式(II)或式(III)化合物。在一个实施例中,该药物用于治疗微生物感染。

[0282] 术语“微生物感染”是指病原性微生物对宿主动物的侵袭。此包括动物体内或体表上通常存在的微生物的过度生长。更一般而言,微生物感染可为微生物群体的存在正损害宿主动物的任何情况。因而,当动物体内或体表存在过量微生物群体时,或当微生物群体的存在正损害动物的细胞或其他组织时,动物正“遭受”微生物感染。

[0283] 该化合物可用于治疗患有微生物感染或处在感染微生物(诸如细菌)风险下的个体。

[0284] 微生物感染可为细菌感染,诸如革兰氏阴性细菌感染。

[0285] 革兰氏阴性细菌的实例包括但不限于大肠杆菌属(*Escherichia* spp.)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella* spp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)、沙门氏菌属(*Salmonella* spp.)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* spp.)及其他肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)及军团杆菌属(*Legionella*)以及众多其他革兰氏阴性细菌。

[0286] 医学相关革兰氏阴性杆菌包括众多种群。其中一些主要造成呼吸问题(流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎克雷伯氏杆菌、嗜肺性军团杆菌(*Legionella pneumophila*)、绿脓杆菌)、主要尿路问题(大肠杆菌、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*))及主要胃肠问题(肠道沙门氏菌)。

[0287] 与医院感染相关的革兰氏阴性细菌包括鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*),其引起医院机构重症监护病房中的菌血症、继发性脑膜炎及呼吸机相关性肺炎。

[0288] 在一个实施例中,革兰氏阴性细菌种群选自大肠杆菌、肠道沙门氏菌、肺炎克雷伯氏杆菌、产酸克雷伯氏杆菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、聚团肠杆菌、醋酸钙不动杆菌、鲍氏不动杆菌、绿脓杆菌及嗜麦芽寡养单胞菌。

[0289] 在一个实施例中,革兰氏阴性细菌种群选自由以下组成的群:大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、绿脓杆菌及鲍氏不动杆菌。

[0290] 式(I)、式(II)或式(III)化合物或包含其的组合可用于治疗皮肤及软组织感染、胃肠感染、尿路感染、肺炎、败血症、腹腔内感染及产科/妇科感染。该感染可为革兰氏阴性细菌感染。

[0291] 式(I)、式(II)或式(III)化合物或包含其的组合可用于治疗假单胞菌感染(包括绿脓杆菌感染,例如皮肤及软组织感染)、胃肠感染、尿路感染、肺炎及败血症。

[0292] 式(I)、式(II)或式(III)化合物或包含其的组合可用于治疗不动杆菌感染(包

括鲍氏杆菌感染)、肺炎、创伤感染、尿路感染及败血症。

[0293] 式(I)、式(II)或式(III)化合物或包含其的组合物可用于治疗克雷伯氏杆菌感染(包括肺炎克雷伯氏杆菌感染)、肺炎、腹膜内感染、尿路感染、脑膜炎及败血症。

[0294] 式(I)、式(II)或式(III)化合物或包含其的组合物可用于治疗大肠杆菌感染(包括大肠杆菌感染)、菌血症、胆囊炎、胆管炎、腹膜内感染、尿路感染、新生儿脑膜炎及肺炎。

[0295] 式(I)、式(II)或式(III)化合物或包含其的组合物可与活性剂一起用于治疗方法中。

[0296] 活性剂可为对微生物具有活性的试剂。活性剂可对革兰氏阴性细菌具有活性。活性剂可对选自以上所提供的清单的微生物具有活性。

[0297] 在一个实施例中,第二活性剂在不存在式(I)、式(II)或式(III)化合物的情况下对诸如大肠杆菌的微生物具有10 μ g/mL或更低的MIC值。微生物可为选自以上群组的微生物。

[0298] 用作第二活性剂的特定化合物描述于本文中且包括:

[0299] 利放平、利福布汀、利福拉齐、利福喷汀及利福昔明;

[0300] 苯唑西林、甲氧西林(methicillin)、安比西林(ampicillin)、氯唑西林(cloxacillin)、卡本西林(carbenicillin)、哌拉西林(piperacillin)、曲卡西林(tricarcillin)、氟氯噻西林(flucloxacillin)及萘夫西林(nafcillin);

[0301] 阿奇霉素、克拉霉素、红霉素、泰利霉素(telithromycin)、赛红霉素(cethromycin)及索利霉素(solithromycin);

[0302] 氮烯内酰胺及BAL30072;

[0303] 美罗培南、多尼培南(doripenem)、亚胺培南(imipenem)、厄他培南(ertapenem)、比阿培南(biapenem)、托莫培南(tomopenem)及帕尼培南(panipenem);

[0304] 替加环素(tigecycline)、奥马环素(omadacycline)、呃伐环素(eravacycline)、多西环素(doxycycline)及米诺环素(minocycline);

[0305] 赛普沙辛(ciprofloxacin)、左氧氟沙星(levofloxacin)、莫西沙星(moxifloxacin)及德拉沙星(delafloxacin);

[0306] 梭链孢酸;

[0307] 新生霉素;

[0308] 替考拉宁(teichoplanin)、替拉万星(telavancin)、达巴万星(dalbavancin)及奥利万星(oritavancin),

[0309] 及其药学上可接受的盐及溶剂化物;

[0310] 在一个实施例中,用作第二活性剂的特定化合物描述于本文中且包括利放平(利福平)、利福布汀、利福拉齐、利福喷汀、利福昔明、氮烯内酰胺、苯唑西林、新生霉素、梭链孢酸、阿奇霉素、赛普沙辛、美罗培南、替加环素、红霉素、克拉霉素及莫匹罗星,及其药学上可接受的盐及溶剂化物。

[0311] 在一替代方面中,式(I)化合物适用于治疗真菌感染,例如与抗真菌剂组合在一起。抗真菌剂可选自聚烯抗真菌剂,例如两性霉素B、咪唑、三唑或噻唑抗真菌剂,例如美可那唑(miconazole)、氟康那唑(fluconazole)或阿巴芬宁(abafungin)、烯丙胺、棘白菌素(echinocandin)或另一试剂,例如环吡酮胺。

[0312] 治疗

[0313] 如本文中在治疗病状的情形下使用的术语“治疗”一般关于治疗及疗法,无论是人类或动物(例如,在兽医应用中),其中达成一些所要治疗效果,例如抑制病状进展,且包括进展速率减缓、进展速率停止、病状的症状缓解、病状改善及病状治愈。亦包括作为预防性措施的治疗(即,预防)。举例而言,术语“治疗”涵盖用于尚未罹患病状但处在罹患病状的风险下的患者。

[0314] 如本文中所使用的术语“治疗有效量”关于化合物或者包含化合物的材料、组合物或剂型的量,其在根据所要治疗方案施用时对产生一定的所要治疗效果有效,与合理益处/风险比相称。

[0315] 术语“治疗”包括如本文中所描述的组合治疗及疗法,其中将两种或更多种治疗或疗法组合,例如顺序或同时。

[0316] 组合疗法

[0317] 式(I)、式(II)或式(III)化合物可与活性剂联合施用。施用可为同时、独立或顺序的。

[0318] 施用方法及方式将视式(I)、式(II)或式(III)化合物及第二活性剂的药物动力学性质而定。

[0319] “同时”施用意谓式(I)、式(II)或式(III)化合物及第二活性剂以单一剂量通过相同施用途径施用个体。

[0320] “单独”施用意谓式(I)、式(II)或式(III)化合物及第二活性剂通过同时发生的两种不同的施用途径施用个体。举例而言,这可在通过输注施用一种试剂而在输注过程中经口给予另一试剂的情况下发生。

[0321] “顺序”意谓在不同的时间点施用两种试剂,条件为首先施用的试剂的活性在施用第二活性剂时存在于个体中并持续。

[0322] 一般而言,将发生顺序给药以使得两种试剂中的第二种在第一试剂的48小时内,诸如在24小时内,诸如在12、6、4、2或1小时内施用。替代地,可首先施用活性剂,继之以式(I)、式(II)或式(III)化合物。

[0323] 最终,在组合治疗中施用化合物及第二活性剂的顺序及时机将视各自的药物动力学性质而定。

[0324] 施用个体的式(I)、式(II)或式(III)化合物的量最终将视个体的性质及欲治疗的疾病而定。同样,施用个体的活性剂的量最终将视个体的性质及欲治疗的疾病而定。

[0325] 调配物

[0326] 在一个方面中,本发明提供一种药物组合物,其包含式(I)、式(II)或式(III)化合物以及药学上可接受的载剂。该药物组合物可另外包含第二活性剂。在一替代实施例中,其中提供第二活性剂以供疗法使用,该第二活性剂可与式(I)、式(II)或式(III)化合物分开调配。在分开调配时,以下关于式(I)、式(II)或式(III)化合物作出的注解因此亦可适用于第二活性剂。

[0327] 尽管式(I)、式(II)或式(III)化合物可单独或与第二活性剂一起施用,但希望将其提供为包含至少一种如本文中所描述的式(I)、式(II)或式(III)化合物以及本领域技术人员熟知的一或多种其他药学上可接受的成分,包括但不限于药学上可接受的载剂、稀释

剂、赋形剂、佐剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂(例如润湿剂)、掩蔽剂、着色剂、调味剂及甜味剂的医药调配物(例如,组合物、制剂、药物)。调配物可进一步包含其他活性剂,例如其他治疗剂或预防剂。

[0328] 因而,本发明进一步提供如以上所定义的药物组合物以及制造药物组合物的方法,包括将至少一种如本文中所描述的式(I)、式(II)或式(III)化合物与本领域技术人员熟知的一或多种其他药学上可接受的成分(例如载剂、稀释剂、赋形剂等)混合。若调配为离散单元(例如片剂等),则各单元含有预定量(剂量)的化合物。该组合物任选进一步包含预定量的第二活性剂。

[0329] 如本文中所使用的术语“药学上可接受”关于化合物、成分、材料、组合物、剂型等,其在合理医学判断的范畴内,适用于与所论述的个体(例如人类)的组织接触而无过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理利益/风险比相称。各载剂、稀释剂、赋形剂等在与调配物的其他成分兼容的意义上亦必须为“可接受的”。

[0330] 适合的载剂、稀释剂、赋形剂等可见于标准医药文件中,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1990;及Handbook of Pharmaceutical Excipients,第5版,2005。

[0331] 可通过制药领域中熟知的任何方法来制备调配物。该方法包括使式(I)或式(II)化合物与构成一或多种辅助成分的载剂缔合的步骤。一般而言,调配物通过使本发明化合物与载剂(例如液体载剂、细粉状固体载剂等)均匀且密切地缔合,随后在必要时对产物进行成形来制备。

[0332] 可制备调配物以提供快速或缓慢释放;立即、延迟、定时或持续释放;或其组合。

[0333] 调配物可适当地呈液体、溶液(例如,水性、非水性)、悬浮液(例如水性、非水性)、乳液(例如,水包油、油包水)、酏剂、糖浆、舐剂、漱口剂、滴剂、片剂(包括例如包衣片剂)、颗粒剂、粉剂、口含锭、软锭剂、胶囊(包括例如硬及软明胶胶囊)、扁囊剂、丸剂、安瓿、药团、栓剂、子宫托、酊剂、凝胶、糊剂、软膏、乳膏、乳液、油剂、泡沫剂、喷雾剂、雾剂或气溶胶形式。

[0334] 调配物可适当地提供为浸渍有一或多种化合物及任选用的一或多种其他药学上可接受的成分,包括例如穿透、渗透及吸收增强剂的贴片、絆创膏、绷带、敷料或其类似物。调配物亦可适当地呈贮库或储器形式提供。

[0335] 化合物可溶解、悬浮于一或多种其他药学上可接受的成分中或与其混合。该化合物可存在于设计用于使化合物靶向例如血液组分或者一或多个器官的脂质体或其他微粒中。在使用脂质体的情况下,应注意脂质体可含有式(I)、式(II)、式(III)化合物及第二活性剂。

[0336] 适于经口施用(例如,通过摄取)的调配物包括液体、溶液(例如,水性、非水性)、悬浮液(例如,水性、非水性)、乳液(例如,水包油、油包水)、酏剂、糖浆、舐剂、片剂、颗粒剂、粉剂、胶囊剂、扁囊剂、丸剂、安瓿、药团。

[0337] 适于经口腔施用的调配物包括漱口剂、口含锭、软锭剂以及贴片、絆创膏、贮库及储器。口含锭典型地包含处于调味基质,通常为蔗糖及阿拉伯胶或黄蓍胶中的化合物。软锭剂典型地包含处于惰性基质,诸如明胶及甘油或蔗糖及阿拉伯胶中的化合物。漱口剂典型地包含处于适合的液体载剂中的化合物。

[0338] 适用于舌下施用的调配物包括片剂、口含锭、软锭剂、胶囊剂及丸剂。

[0339] 适于经口经黏膜施用的调配物包括液体、溶液(例如,水性、非水性)、悬浮液(例如,水性、非水性)、乳液(例如,水包油、油包水)、漱口剂、口含锭、软锭剂以及贴片、絆创膏、贮库及储器。

[0340] 适于非经口经黏膜施用的调配物包括液体、溶液(例如,水性、非水性)、悬浮液(例如,水性、非水性)、乳液(例如,水包油、油包水)、栓剂、子宫托、凝胶剂、糊剂、软膏、乳膏剂、洗液、油剂以及贴片、絆创膏、贮库及储器。

[0341] 适于经皮施用的调配物包括凝胶剂、糊剂、软膏、乳膏剂、洗液及油剂,以及贴片、絆创膏、绷带、敷料、贮库及储器。

[0342] 片剂可通过任选与一或多种辅助成分一起进行常规手段,例如压制或模制来制造。压制片剂可通过在适合的机器中对呈自由流动形式(诸如粉末或颗粒)的任选与一或多种黏合剂(例如聚维酮、明胶、阿拉伯胶、山梨糖醇、黄蓍胶、羟丙基甲基纤维素)、填充剂或稀释剂(例如乳糖、微晶纤维素、磷酸氢钙)、润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石、二氧化硅)、崩解剂(例如,淀粉乙醇酸钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂或润湿剂(例如月桂基硫酸钠)、防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、山梨酸)、调味剂、增味剂及甜味剂混合的化合物进行压制来制备。模制片剂可通过在适合的机器中对经惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物进行模制来制造。片剂可任选包覆或刻痕,且可为了提供所要释放概况而使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素进行调配以提供其中化合物的缓慢或控制释放。片剂可任选提供有包覆层,例如以影响释放,例如肠溶衣,以便在除胃以外的肠部分中提供释放。

[0343] 软膏典型地由化合物及石蜡或水混溶性软膏基质制备。

[0344] 乳膏典型地由化合物及水包油乳膏基质制备。若需要,则乳膏基质的水相可包括例如至少约30%w/w多元醇,即,具有两个或更多个羟基的醇,诸如丙二醇、丁-1,3-二醇、甘露醇、山梨糖醇、甘油及聚乙二醇及其混合物。局部调配物可理想地包括增强化合物经皮肤或其他受影响区域的吸收或穿透的化合物。此种皮肤穿透增强剂的实例包括二甲亚砷及相关类似物。

[0345] 乳液典型地由化合物及油相制备,该油相可任选仅包含乳化剂(或称为利泄剂),或其可包含至少一种乳化剂与脂肪或油或与脂肪及脂肪二者的混合物。可包括亲水性乳化剂连同充当稳定剂的亲脂性乳化剂。亦可能包括油及脂肪二者。总之,含或不含稳定剂的乳化剂组成所谓的乳化蜡,且该蜡与油及/或脂肪一起组成所谓的乳化软膏基质,其形成乳膏调配物的油性分散相。

[0346] 适合的利泄剂及乳液稳定剂包括Tween 60、Span 80、鲸蜡硬脂醇、肉豆蔻醇、单硬脂酸甘油酯及月桂基硫酸钠。用于调配物的适合油或脂肪的选择系基于达成所要化妆品性质,因为化合物在可能用于医药乳液调配物的大部分油中的溶解度可能非常低。因而,乳膏应为不油腻、无污染且可洗涤的产品,其具有适合的稠度以避免自管或其他容器渗漏。可使用直链或支链单烷基或二元烷基酯,诸如二异己二酸酯、硬脂酸异十六烷基酯、可可脂肪酸丙二醇二酯、肉豆蔻酸异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸2-乙基己酯或称为Crodamol CAP的支链酯掺合物。这些可单独或组合使用,视所要性质而定。替代地,可使用高熔点脂质,诸如白色软石蜡及/或液体石蜡或其他矿物油。

[0347] 适于经鼻内施用的调配物在载剂为液体的情况下包括例如鼻用喷雾、滴鼻剂或通

过以喷雾器进行气雾剂施用,包括化合物的水性或油性溶液。作为替代施用方法,可使用干粉递送作为雾化气雾剂的替代。

[0348] 适于鼻内施用的调配物在载剂为固体的情况下包括例如提供为具有例如在约20至约500微米范围内的粒度的粗粉末的那些调配物,以吸取鼻烟,即,通过经鼻通道自保持在鼻子附近的粉末容器中快速吸入的方式施用。

[0349] 适于经肺施用(例如,通过吸入或吹入疗法)的调配物包括提供为来自加压包装的气雾剂喷雾且使用适合的推进剂,诸如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他适合的推进剂的那些调配物。另外地或替代地,用于经肺施用的调配物可经调配以便自喷雾器或干粉吸入器施用。举例而言,调配物可与载剂或脂质体一起提供以便提供适合的粒度以达到肺的适当部分,以便辅助递送适当剂量,从而增强在肺组织中的滞留。

[0350] 适于经眼施用的调配物包括滴眼剂,其中化合物溶解或悬浮于适合的载剂,尤其是针对化合物的水性溶剂中。

[0351] 适于经直肠施用的调配物可提供为具有包含例如天然或硬化油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇,例如可可脂或水杨酸盐的适合基质的栓剂,或提供为供通过灌肠进行治疗用的溶液或悬浮液。

[0352] 适于经阴道施用的调配物可提供为除化合物以外亦含有诸如本领域中已知适当的载剂的子宫托、棉塞、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂调配物。

[0353] 适于非经肠施用(例如,通过静脉内或皮下注射或输注)的调配物包括水性或非水性等渗无热原无菌液体(例如溶液、悬浮液),其中化合物被溶解、悬浮或以其他方式提供(例如,在脂质体或其他微粒中)。此种液体可另外含有其他药学上可接受的成分,诸如抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、悬浮剂、增稠剂及致使调配物与预定接受者的血液(或其他相关体液)等渗透压的溶质。赋形剂的实例包括例如水、醇、糖、多元醇、甘油、植物油及其类似物。用于此种调配物中的适合等渗透压载剂的实例包括氯化钠注射液、林格氏溶液或乳酸化林格氏注射液。典型地,液体中的化合物浓度为约1ng/mL至约500 μ g/mL,例如约1ng/mL至约100 μ g/mL,例如约10ng/mL至约10 μ g/mL,例如约10ng/mL至约1 μ g/mL。调配物可存在于单位剂量或多剂量密封容器中,例如安瓿及小瓶,且可储存在冷冻干燥(冻干)条件下,从而仅需要在临使用前添加无菌液体载剂,例如注射用水。可由无菌粉剂、颗粒剂及片剂来制备临时注射溶液及悬浮液。

[0354] 剂量

[0355] 一般而言,本发明的方法可包括向个体施用有效量的式(I)、式(II)或式(III)化合物,以提供抗微生物效果。式(I)、式(II)或式(III)化合物可以足以强化第二活性剂的活性的量施用。第二活性剂以有效量施用个体以提供抗微生物效果。

[0356] 本领域技术人员应了解,式(I)、式(II)或式(III)化合物或活性剂及包含式(I)、式(II)或式(III)化合物或活性剂的组合物的适当剂量可因患者而异。确定最佳剂量一般将涉及平衡治疗益处水平与任何风险或不利副作用。所选择的剂量水平将视多种因素而定,包括但不限于特定式(I)、式(II)或式(III)化合物或活性剂的活性、施用途径、施用时间、化合物的排泄速率、治疗的持续时间、组合使用的其他药物、化合物及/或材料、病状的严重程度以及患者的物种、性别、年龄、体重、病状、一般健康状况及既往病史。式(I)、式(II)或式(III)化合物或活性剂的量及施用途径最终将由医生、兽医或临床医生决定,但一

般将选择可在作用部位实现达成所要效果而不引起实质性有害或不利副作用的局部浓度的剂量。

[0357] 在整个治疗过程中,施用可呈一个剂量形式连续地或间歇性地(例如,以适当间隔的分次剂量)实现。确定最有效的施用手段及剂量的方法为本领域技术人员所熟知且将随用于疗法的调配物、疗法的目的、所治疗的靶细胞及所治疗的个体而变化。可在由治疗医师、兽医或临床医生选择的剂量水平及模式下进行单次或多次施用。

[0358] 一般而言,式(I)、式(II)或式(III)化合物或活性剂的适合剂量在每公斤个体体重每天约10 μ g至约250mg(更典型地约100 μ g至约25mg)的范围内。在式(I)、式(II)或式(III)化合物或活性剂为盐、酯、酰胺、前药或其类似物时,施用量以母体化合物计且实际使用重量按比例增加。

[0359] 试剂盒

[0360] 本发明的一个方面关于一种试剂盒,其包含(a)式(I)、式(II)或式(III)化合物或包含如式(I)、式(II)或式(III)中任一个所定义的化合物的组合物,例如典型地提供于适合的容器中及/或具有适合的包装;及(b)使用说明,例如关于如何施用化合物或组合物的书面说明。

[0361] 书面说明亦可包括式(I)、式(II)或式(III)化合物适合治疗的适应症的清单。

[0362] 在一个实施例中,该试剂盒进一步包含(c)第二活性剂或包含第二活性剂的组合物。此处,书面说明亦可包括第二活性剂与式(I)、式(II)或式(III)化合物共同适合治疗的适应症的清单。

[0363] 施用途径

[0364] 式(I)、式(II)或式(III)化合物、第二活性剂或者包含式(I)、式(II)或式(III)化合物或第二活性剂的药物组合物可通过任何便利施用途径,无论是全身/外周或是局部(即,在所作用部位)施用于个体。

[0365] 施用途径包括但不限于经口(例如通过摄入);经口腔;经舌下;经皮(包括例如贴片、石膏等);经黏膜(包括例如贴片、石膏等);经鼻内(例如通过鼻用喷雾);经眼(例如滴眼剂);经肺(例如通过吸入或吹入疗法,使用例如经由气雾剂,例如经口或鼻);经直肠(例如通过栓剂或灌肠剂);经阴道(例如通过子宫托);非经肠,例如通过注射或输注,包括皮下、皮内、肌肉内、静脉内、动脉内、心内、鞘内、脊柱内、囊内、被膜下、眶内、腹膜内、气管内、皮下、关节内、蛛网膜下及胸骨内;通过植入贮库或贮器,例如经皮下或肌肉内。

[0366] 个体/患者

[0367] 个体/患者可为脊索动物、脊椎动物、哺乳动物、胎盘哺乳动物、有袋动物(例如,袋鼠、袋熊)、啮齿动物(例如,豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠)、鼠类(例如,小鼠)、兔类动物(例如,兔子)、禽类(例如,鸟)、犬类(例如,狗)、猫类(例如,猫)、马类(例如,马)、猪类(例如,猪)、绵羊类(例如,绵羊)、牛类(例如,奶牛)、灵长类动物、猿类(例如,猴或猿)、猴(例如,狨、狒狒)、猿(例如,大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)或人类。此外,个体/患者可为其任何发育形式,例如胎儿。

[0368] 在一个实施例中,个体/患者为人类。

[0369] 亦设想本发明可实践于患有微生物感染的非人类动物。非人类哺乳动物可为啮齿动物。啮齿动物包括用于实验室研究的大鼠、小鼠、豚鼠、栗鼠及其他类似大小的小型啮齿

动物。

[0370] 其他选项

[0371] 以上所描述的实施例的各个及每个兼容组合均明确揭示于本文中,如同单独地且明确地叙述各个及每个组合。

[0372] 鉴于本发明,本发明的各种其他方面及实施例对本领域技术人员将显而易见。

[0373] “及/或”在用于本文中时应被视为在有或无另一者的情况下特定揭示两个规定特征或组分中的每一者。举例而言,“A及/或B”应被视为特定揭示(i)A,(ii)B及(iii)A及B中的每一种情况,如同在本文中逐一示出每一种情况。

[0374] 除非上下文另外指定,否则以上所示的特征的描述及定义不限于本发明的任何特定方面或实施例,且同样适用于所描述的所有方面及实施例。在技术上适当时可将实施例组合,因而本发明扩展至本文中所提供的实施例的所有排列及组合。

[0375] 现将通过实例且参考以上所描述的特征来说明本发明的某些方面及实施例。

[0376] 实例

[0377] 提供以下实例仅用于说明本发明,而不意欲限制如本文中所描述的本发明的范畴。

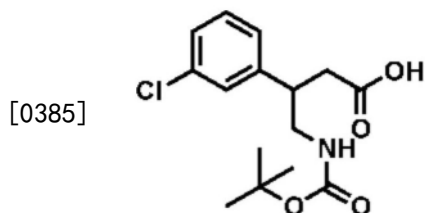
[0378] 缩写

缩写	含义
PMBN	多黏菌素B九肽
PMB	多黏菌素B
Thr	苏氨酸
Ser	丝氨酸
DSer	D-丝氨酸
Leu	亮氨酸
Ile	异亮氨酸
[0379] Phe	苯丙氨酸
DPhe	D-苯丙氨酸
Val	缬氨酸
Dab	α,γ -二氨基丁酸
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
HATU	六氟磷酸2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲
DCM	二氯甲烷

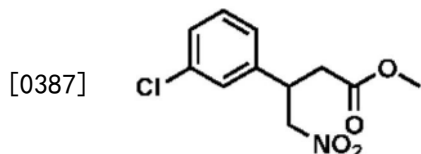
缩写	含义
TFA	三氟乙酸
ND	未测定
N/A	不适用
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
PMBH	多黏菌素B七肽(3-10)
PMBD	多黏菌素B十肽
Pro	脯氨酸
Dap	α,β -二氨基丙酸
Gly	甘氨酸
NorLeu	正亮氨酸
Ruphos	2-二环己基膦基-2',6'-二异丙基联苯
Xphos	2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基联苯
SFC	超临界流体层析
[0380] Fmoc	芴基甲氧基羰基
Cbz	苄基甲氧基羰基
HCTU	六氟磷酸 O-(1H-6-氯苯并三唑-1-基)- 1,1,3,3-四甲基脲
Boc	叔丁氧基羰基
PyBOP	六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯啉酮 基磷
NMM	N-甲基吗啉
THF	四氢呋喃
ivDde	1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)-3- 甲基丁基
DPPA	迭氮磷酸二苯酯
TIS	三异丙基硅烷
HOBt	1-羟基苯并三唑
IPA	异丙醇
[0381]	合成实例
[0382]	N末端酸的合成

[0383] 在目前的工作中,使用呈适当经保护的形式的3-经取代的4-氨基丁酸。以下详细描述非标准氨基酸的合成,以及对映异构体分离的方法

[0384] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸——异构体1及异构体2



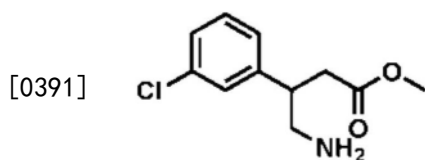
[0386] (i) 3-(3-氯苯基)-4-硝基丁酸甲酯



[0388] 在室温下将3-氯肉桂酸(10g)、甲醇(100mL)及浓硫酸(4mL)的混合物搅拌20小时。将混合物蒸干,并且使残余物分配在二氯甲烷(DCM)与水之间。分离水相且用额外的DCM萃取。合并有机萃取物,用硫酸镁干燥,过滤并蒸干,产生呈白色固体状的甲酯(10.19g)。将此固体溶解于硝基甲烷(32mL)中且用1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)(8.5mL)处理。在室温下将混合物搅拌20小时,随后蒸干且使残余物分配在0.5M HCl水溶液与乙醚之间。分离水相且用额外的乙醚萃取。合并有机萃取物,用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并蒸干。在硅胶上纯化残余物,用己烷及乙酸乙酯(0-100%)洗脱。合并适当洗脱份并蒸干,产生呈黄色油状的所要产物(9.93g,70%产率)。

[0389] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2.71-2.79(2H, m), 3.66(3H, s), 3.93-4.01(1H, m), 4.62及4.73(2H, ABq, 呈现为2x dd, J 12.8, 8.0Hz), 7.11-7.28(4H, m)。

[0390] (ii) 4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸甲酯



[0392] 向在约0℃下搅拌的3-(3-氯苯基)-4-硝基丁酸甲酯(9.93g)于乙酸(90mL)中的溶液中逐份添加锌粉(20.1g)(注意:延迟放热)。使混合物升温至室温,搅拌19小时。将混合物蒸干并且使残余物分配在 NaHCO_3 水溶液与乙酸乙酯之间。随后将混合物滤过硅藻土并且分离水相与有机相。用额外的乙酸乙酯再萃取水相。合并有机萃取物,用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并蒸干,产生呈橙色油状的所要产物(4.80g)。

[0393] (iii) 标题化合物——外消旋

[0394] 在室温下将4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸甲酯(4.80g)、二碳酸二叔丁酯(5.28g)及二氯甲烷(100mL)的混合物搅拌18小时。将混合物蒸干并且在硅胶上纯化残余物,用石油醚40-60及乙酸乙酯(0-100%)洗脱。合并适当洗脱份并蒸干,产生呈乳油色固体状经Boc保护的酯4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸甲酯(2.59g)。

[0395] 在室温下将4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸甲酯(2.49g)、氢氧化锂(546mg)、1,4-二氧己环(40mL)及水(40mL)的混合物搅拌64小时。随后将混合物蒸干。将残

余物溶解于水中,用1M HCl水溶液中和并且用乙酸乙酯($\times 2$)萃取。合并有机萃取物,用盐水洗涤,用硫酸镁干燥,过滤并蒸干,产生呈黄色油状的所要产物(2.51g)。

[0396] m/z 314(MH^+) $C_{15}H_{20}ClNO_4$ 需要313.11。 ^1H NMR(400MHz, CD_3OD): δ (ppm) 1.40 (9H, s), 2.42-2.73 (2H, m), 3.24-4.49 (4.4H, m, 包括 CH_3OD , CH_2 , 及CH), 7.17-7.38 (4H, m)。

[0397] (iv) 标题化合物——异构体分离——方法1

[0398] 将4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(2.09g)溶解于甲醇中达至60mg/mL,随后使用以下所描述的条件(制备分离条件1)通过SFC加以纯化。将含有增浓异构体1(较快跑出)及异构体2(较慢跑出)的合并洗脱份合并,浓缩并且在相同的层析条件下单独对每一者进行再纯化。

[0399] 随后使用旋转蒸发器将异构体1及异构体2各自的合并洗脱份蒸发至接近干燥,转移至含DCM的最终容器中,在40℃下在氮气流下将DCM移除,随后在真空烘箱中在40℃及5mbar下储存16小时。

[0400] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(异构体1)

[0401] 白色固体,883mg,95.6% ee。在分析系统1上的滞留时间2.89min。

[0402] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(异构体2)

[0403] 白色固体,876mg,98.6% ee。在分析系统1上的滞留时间3.29min。

[0404] 制备分离条件1:

[0405] Berger Multigram II SFC

[0406] 管柱详情:Lux A1 (Phenomenex, 21.2mm $\times$ 250mm, 5 μ m)

[0407] 管柱温度:40℃

[0408] 流速:50mL/min

[0409] BPR:125BarG

[0410] 侦测器波长:210nm

[0411] 注入体积:300 μ L (18mg)

[0412] 等度条件:12:88EtOH:CO₂ (0.1% v/v NH₃)

[0413] 分析条件1:

[0414] Waters UPC2

[0415] 管柱详情:Lux C4 (Phenomenex, 4.6mm $\times$ 250mm, 5 μ m)

[0416] 管柱温度:40℃

[0417] 流速:4mL/min

[0418] 侦测器波长:210-400nm

[0419] 注入体积:1.0 μ L

[0420] BPR:125BarG

[0421] 等度条件:10:90EtOH:CO₂ (0.1% v/v NH₃)

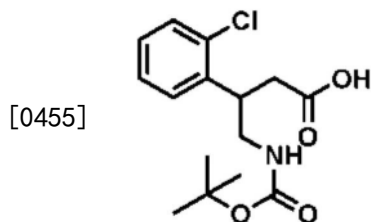
[0422] (v) 标题化合物——异构体分离——方法2

[0423] 使用以下所描述的条件(制备分离条件2)通过SFC来纯化4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸。分离之后,经由旋转蒸发器在浴液温度40℃下将洗脱份干燥,获得所要分离对映异构体。在相同管柱上进一步纯化较慢跑出的对映异构体,用20% B洗脱。

[0424] 制备分离条件2:

- [0425] 仪器:Thar 200制备型SFC(SFC-10)
- [0426] 管柱:ChiralPak AY,300×50mm内径,10 μ m
- [0427] 移动相:A用于CO₂且B用于IPA
- [0428] 梯度:B 25%
- [0429] 流速:200mL/min
- [0430] 背压:100bar
- [0431] 管柱温度:38℃
- [0432] 波长:220nm
- [0433] 循环时间:~4.5min
- [0434] 分析条件2:
- [0435] 仪器:Waters UPC2分析型SFC(SFC-H)
- [0436] 管柱:ChiralPak AY,150×4.6mm内径,3 μ m
- [0437] 移动相:A用于CO₂且B用于IPA(0.05% DEA)
- [0438] 梯度:B 5-40%
- [0439] 流速:2.5mL/min
- [0440] 背压:100bar
- [0441] 管柱温度:40℃
- [0442] 波长:220nm
- [0443] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(异构体1)。滞留时间2.796min。通过与以下异构体(2)相比较来指定(R)立体化学
- [0444] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(异构体2)。滞留时间3.264min。通过如以下所描述对脱去BOC保护的物质进行小分子结晶来指定(S)立体化学。
- [0445] (vi)立体化学的证实
- [0446] (S)-4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸的三氟乙酸盐
- [0447] 向4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸异构体2(基于分析方法2的滞留时间3.264min)(1.5g,4.78mmol)于二氯甲烷(20ml)中的冰水冷却溶液中添加三氟乙酸(5mL)。添加之后,在此温度下将混合物搅拌4小时。随后浓缩反应混合物。将粗混合物溶解于水(10mL)中并冻干,得到产物;(S)-4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸的TFA盐(1.5g,95%产率)。LC-MS:m/z 214(M+H)⁺
- [0448] (S)-4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸
- [0449] 向(S)-4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸的三氟乙酸盐(0.5g,1.53mmol)于水(10mL)中的溶液中添加稀氢氧化铵水溶液直至pH值达到7。将所得溶液储存在开放25mL烧瓶中并且在室温下静置1天。结晶后,倾析母液并且对固体晶体进行X射线绕射研究。
- [0450] X射线绕射研究显示化合物具有(S)立体化学。
- [0451] X射线绕射条件:
- [0452] 使用Bruker APEX-II CCD绕射仪。
- [0453] 在数据收集期间将晶体保持在302.71K下。使用Olex2(Dolomanov等人),利用ShelXT[2]结构解析程序(Sheldrick A71)使用Intrinsic Phasing来解析结构,并且利用ShelXL[3]精化软件包使用最小平方方法最小化(Sheldrick C71)进行精化。

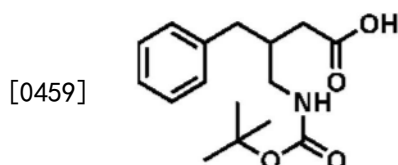
[0454] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(2-氯苯基)丁酸



[0456] 遵循如以上步骤(i)至(iii)中所描述的4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸的方法,由2-氯肉桂酸制备该化合物。获得呈无色油状的化合物。

[0457] m/z 314 (MH^+), $C_{15}H_{21}ClNO_4$ 精确质量313.11。

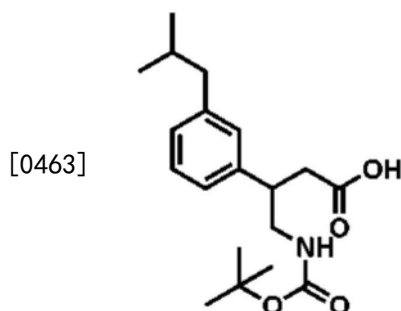
[0458] 3-苯甲基-4-((叔丁氧基羰基)氨基)丁酸



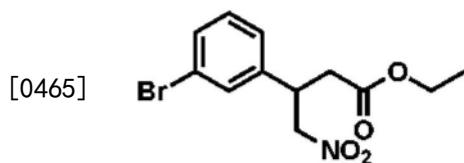
[0460] 遵循如以上步骤(i)至(iii)中所描述的4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸的方法,将3-苯甲基-4-硝基丁酸甲酯(Tetrahedron Asymmetry, 19, 2008, 945)转化为标题化合物。

[0461] m/z 294 (MH^+), $C_{16}H_{23}NO_4$ 精确质量293.16。

[0462] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸



[0464] (i) 3-(3-溴苯基)-4-硝基丁酸乙酯



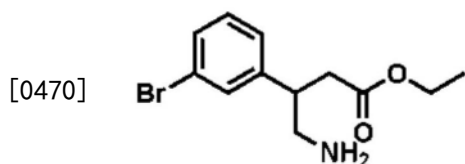
[0466] 将氢化钠(60%)于矿物油(394.26mg, 9.86mmol)及2-二甲氧基乙烷(22.5mL)(DME)中的混合物冷却至0℃。逐滴添加三乙基膦酰基乙酸酯(10.2mL, 51.43mmol)并且将混合物搅拌10分钟。逐滴添加3-溴苯甲醛(1.0mL, 8.57mmol)于DME(5mL)中的溶液。使反应混合物升温至室温并回流3小时。

[0467] 将混合物蒸干并且使残余物分配在己烷与水之间。分离水层且用额外的己烷萃取。合并有机萃取物,用水洗涤,用 $MgSO_4$ 干燥,过滤并蒸干。在硅胶上纯化残余物,用石油醚40-60及乙酸乙酯(0-100%)洗脱。合并适当洗脱份并蒸干,产生呈白色固体状的(E)-3-(3-溴苯基)丙-2-烯酸乙酯(1.44g, 65%)。使用如以上所描述的步骤(i)中制备4-((叔丁氧基

羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸时的硝化条件将此转化为3-(3-溴苯基)-4-硝基丁酸乙酯,以60%产率得到产物。

[0468] m/z 316,318(MH^+)。C₁₂H₁₄BrNO₄需要315.01。

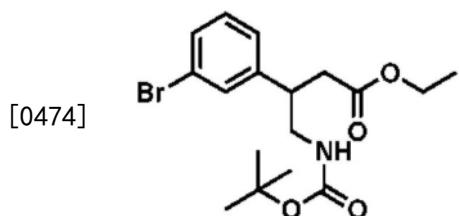
[0469] (ii)4-氨基-3-(3-溴苯基)丁酸乙酯



[0471] 使用以上针对步骤(ii)中的4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸所描述的条件将3-(3-溴苯基)-4-硝基丁酸乙酯(1.08g)转化为4-氨基-3-(3-溴苯基)丁酸乙酯,以67%产率得到产物。

[0472] m/z 286及288(MH^+), C₁₂H₁₆BrNO₂精确质量285.04。

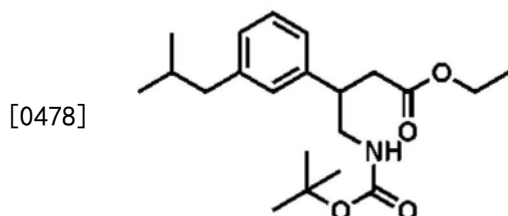
[0473] (iii)4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-溴苯基)丁酸乙酯



[0475] 在以上针对步骤(iii)中的4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸所描述的条件下将4-氨基-3-(3-溴苯基)丁酸乙酯(655mg)转化为4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-溴苯基)丁酸乙酯,以72%产率得到产物。

[0476] m/z 386及388(MH^+), C₁₇H₂₄BrNO₄精确质量385.09。

[0477] (iv)4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸乙酯



[0479] 通过排空/氮气冲洗将Ruphos(48.3mg,0.1mmol)、磷酸三钾(330mg,1.55mmol)、3-(3-溴苯基)-4-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸乙酯(200mg,0.52mmol)及异丁基硼酸(132mg,1.29mmol)于甲苯(9mL)中的混合物脱气四次,随后添加乙酸钪(II)(5.8mg,0.03mmol)。在110℃下将混合物搅拌100分钟。使反应混合物冷却,随后将其滤过硅藻土并且留在溶液中隔夜。将混合物蒸干且在硅胶上纯化,用石油醚40-60及乙酸乙酯(0-100%)洗脱。合并适当洗脱份并蒸干,产生呈无色油状的4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸乙酯(74mg,39%)。

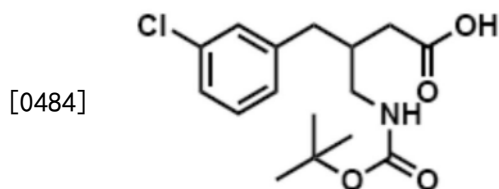
[0480] m/z 364(MH^+)。C₂₁H₃₃NO₄精确质量363.24。

[0481] (iv)标题化合物

[0482] 在室温下将4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸乙酯(74mg,0.2mmol)及氢氧化锂(15mg,0.6mmol)于1,4-二氧己环(3mL)及水(3mL)中的混合物搅拌16小时。将混

合物蒸干并且使残余物分配在乙酸乙酯与水之间。分离有机相并丢弃。用1M HCl(水溶液)酸化水相并且用乙酸乙酯($\times 2$)萃取。合并有机萃取物,用 MgSO_4 干燥,过滤并蒸干,产生呈无色油状的4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸(65mg)。m/z 336 (MH^+) $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ 精确质量335.21。

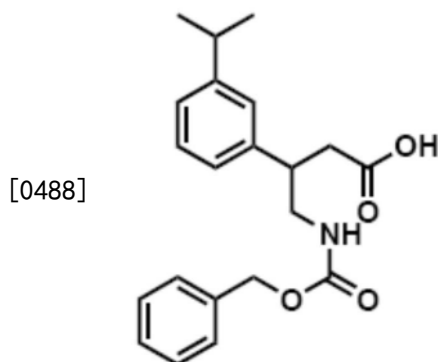
[0483] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯甲基)丁酸



[0485] 如针对以上所描述的步骤(i)中的4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸所描述将2-(3-氯苯基)乙醛转化为3-(3-氯苯甲基)-4-硝基丁酸乙酯。如步骤(ii)及(iii)中进行还原及保护,继而如以上步骤(v)中进行水解,得到呈无色油状的标题化合物。

[0486] m/z 328 (MH^+)。 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4$ 精确质量327.12。

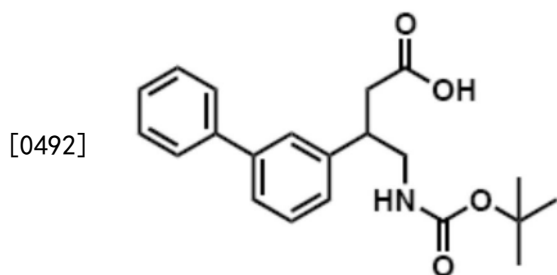
[0487] 4-(((苯甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-异丙基苯基)丁酸



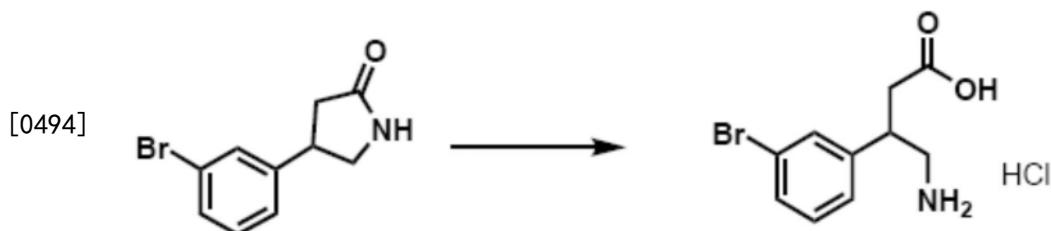
[0489] 将4-氨基-3-(3-异丙基苯基)丁酸乙酯(1.55g, 6.21mmol)(使用如以上所描述的4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸步骤(i)至(ii)中的方法制备)及碳酸氢钠(0.783g, 9.32mmol)的混合物溶解于水(10mL)及1,4-二氧己环(5mL)中。在冰浴中冷却混合物,并且用氯甲酸苯甲酯溶液(0.98mL, 6.84mmol)处理。在10℃下将混合物搅拌1小时,随后允许升温至室温。搅拌20小时之后,将混合物蒸干,并且将残余物分配在乙醚与0.5M HCl HCl水溶液之间。分离水层且用额外的乙醚萃取。合并有机萃取物,用盐水洗涤,经无水 MgSO_4 干燥,并蒸发。在硅胶上纯化粗产物,用石油醚40-60及乙酸乙酯(0-100%)洗脱。合并含产物的洗脱份并蒸发至浅黄色油(1.74g, 73%)。如先前于步骤(iii)中针对制备4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸所描述用氢氧化锂使乙酯水解,继而在硅胶上层析,用石油醚40-60及乙酸乙酯(0-100%)洗脱,得到呈白色固体状的标题化合物(60%)。

[0490] m/z 356 (MH^+)。 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ 精确质量:355.18。

[0491] 4-([1,1'-联苯]-3-基)-3-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)丁酸



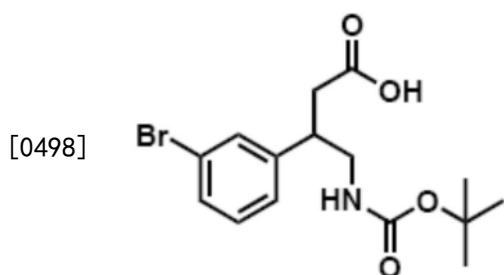
[0493] (i) 4-氨基-3-(3-溴苯基)丁酸盐盐酸盐



[0495] 在100℃下将4-(3-溴苯基)吡咯啉-2-酮(1.0g, 4.16mmol)及6M HCl水溶液(15.0mL, 90mmol)的混合物加热16小时。将混合物蒸干, 与水、继而依序与乙酸乙酯及二氯甲烷(DCM)一起共蒸发, 以假定定量产率得到呈白色固体状的所要产物。

[0496] m/z 258及260 (MH⁺) C₁₀H₁₂BrNO₂精确质量: 257.01。

[0497] (ii) 3-(3-溴苯基)-4-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸



[0499] 在室温下将4-氨基-3-(3-溴苯基)丁酸盐盐酸盐(1.31g, 4.45mmol)、碳酸叔丁氧基羰基叔丁酯(Boc-O-Boc, 1.41g, 6.45mmol)、1,4-二氧己环(8mL)及1M NaOH水溶液(8.0mL, 8mmol)的混合物搅拌64小时。将混合物蒸干。将残余物溶解于水中, 用1M HCl水溶液中和并且用乙酸乙酯(×2)萃取。合并有机萃取物, 用MgSO₄干燥, 过滤并蒸干, 产生呈无色油状的所要产物(1.60g, 86%)。

[0500] m/z 357.5及359.4 (MH⁺) C₁₅H₂₀BrNO₄精确质量: 357.06。

[0501] (iii) 标题化合物

[0502] 在100℃下在氮气氛围下将3-(3-溴苯基)-4-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸(2.69g, 7.51mmol)、苯基硼酸(2.3g, 18.8mmol)、乙酸钯(II)(84mg, 0.38mmol)、Xphos(716mg, 1.5mmol)及磷酸三钾(4781.9mg, 22.53mmol)于1,4-二氧己环(130mL)中的混合物搅拌2小时。随后使混合物冷却至室温, 滤过硅藻土, 用乙酸乙酯洗涤并蒸干。在硅胶上纯化残余物, 用石油醚及乙酸乙酯(0-100%)洗脱。合并适当洗脱份并蒸干, 产生呈灰色固体状的所要产物(1.44g, 42%产率)。

[0503] m/z 355 (M⁺), 可见。C₂₁H₂₅NO₄精确质量: 355.18。

[0504] (iv) 对掌性分离

[0505] 将4-([1,1'-联苯]-3-基)-3-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)丁酸(1.44g)溶解于MeOH中达至30mg/mL,随后使用以下方法通过SFC进行纯化。随后使用旋转蒸发器将异构体1(较快跑出)及异构体2(较慢跑出)各自的合并洗脱份蒸发至接近干燥,转移至含DCM的最终容器中,在40℃下在压缩空气流下将DCM移除,随后储存在真空烘箱中在40℃及5mbar下直至恒重。

[0506] 4-([1,1'-联苯]-3-基)-3-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)丁酸异构体1。白色固体523mg。滞留时间:(分析条件3)2.70min。ee 99.8%。

[0507] 4-([1,1'-联苯]-3-基)-3-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)丁酸异构体2。白色固体537mg。滞留时间:(分析条件3)3.46min。ee 99.8%。

[0508] 纯化条件3:

[0509] Berger Multigram II SFC

[0510] 管柱详情:Lux A1 (Phenomenex, 21.2mm×250mm, 5μm)

[0511] 管柱温度:40℃

[0512] 流速:50mL/min

[0513] BPR:100BarG

[0514] 侦测器波长:215nm

[0515] 注入体积:1,000μL (30mg)

[0516] 等度条件:15:85EtOH:CO₂ (0.2% v/v NH₃)

[0517] 分析条件3:

[0518] Waters UPC2

[0519] 管柱详情:Amy-C (YMC GmbH, 4.6mm×250mm, 5μm)

[0520] 管柱温度:40℃

[0521] 流速:4mL/min

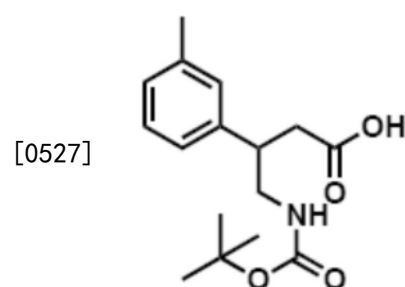
[0522] 侦测器波长:210-400nm

[0523] 注入体积:1.0μL

[0524] BPR:125BarG

[0525] 等度条件:15:85EtOH:CO₂ (0.2% v/v NH₃)

[0526] 4-(((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-甲基苯基)丁酸。

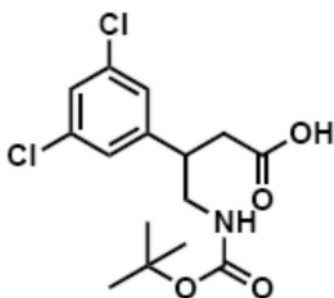


[0528] 使用以上针对步骤(i)至(ii)中制备4-([1,1'-联苯]-3-基)-3-(((叔丁氧基羰基)氨基)甲基)丁酸所描述的方法将4-(3-甲基苯基)吡咯啉-2-酮转化为标题化合物。获得呈无色油状的标题化合物。

[0529] m/z 294(MH⁺)。C₁₆H₂₃N₄O₄精确质量293.16。

[0530] 4-(((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3,5-二氯苯基)丁酸

[0531]

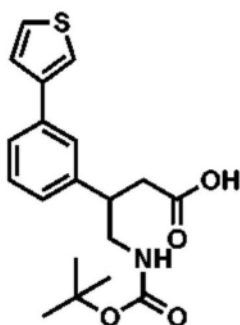


[0532] 使用以上针对步骤(i)至(iii)中制备4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-异丁基苯基)丁酸所描述的方法将3,5-二氯苯甲醛转化为标题化合物。如针对步骤(v)中制备(3-异丁基苯基)丁酸所描述使乙酯水解,得到呈无色油状的标题化合物。

[0533] m/z 348. (MH^+)。C₁₅H₁₉C₁₂NO₄精确质量347.07。

[0534] 4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-(噻吩-3-基)苯基)丁酸

[0535]



[0536] 使用以上针对步骤(iv)中制备(3-异丁基苯基)丁酸所描述的方法使4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-溴苯基)丁酸乙酯(207mg,0.54mmol)与3-噻吩基硼酸反应。如步骤(v)中所描述使产物水解,得到呈无色油状的标题化合物。

[0537] m/z 362 (MH^+)。C₁₉H₂₃NO₄S精确质量361.13。

[0538] 中间物多黏菌素九肽及产物化合物

[0539] 中间物1:H-Thr(O-tBu)-Dap(BOC)-环[Dab-Dab(BOC)-DPhe-Leu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr]

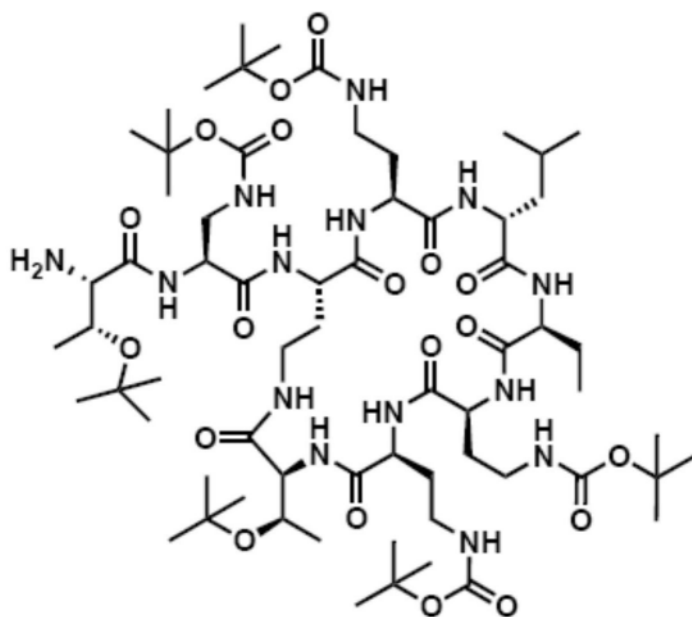
[0540] 先前在W0 2015/135976中描述为中间物11-四-(N-Boc)-L-Thr(O-tBu)-L-Dap-多黏菌素B七肽。

[0541] 中间物2:H-Thr(O-tBu)-Dap(BOC)-环[Dab-Dab(BOC)-Leu-Leu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr]

[0542] 先前在W0 2015/135976中描述为中间物14-四-(N-Boc)-L-Thr(O-tBu)-L-Dap-多黏菌素E七肽。

[0543] 中间物3:H-Thr(O-tBu)-Dap(BOC)-环[Dab-Dab(BOC)-Dleu-L-Abu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr(O-tBu)]

[0544]



[0545] (i) CBZ-Thr (O-*t*Bu) -Dap (Boc) -Dab-Dab (Boc) -DLeu-L-Abu-Dab (Boc) -Dab (Boc) -Thr (O-*t*Bu) -OH

[0546] 使用以上所描述的一般方法3的方法,在树脂上通过固相肽合成使用Fmoc化学反应来制备线性肽CBZ-Thr (O-*t*Bu) -Dap (Boc) -Dab (ivDde) -Dab (Boc) -DLeu-L-Abu-Dab (Boc) -Dab (Boc) -Thr (O-*t*Bu)。该序列以氯三苯甲氯 (CTC) -树脂 (2.0g) 开始,该树脂预先负载有Fmoc-Thr (*t*Bu) -OH,负载量为0.75mmol/g。将树脂结合的肽 (3.93g,对应于1.5mmol) 置于500mL锥形烧瓶中且用含4%脲的DMF (100mL) 处理。将混合物置于振荡器上并轻缓振荡30分钟。将混合物倾入烧结管柱中,随后用DMF (3×100mL) 洗涤。施加压缩空气以移除最后的痕量DMF。随后用THF及用DCM重复该程序。

[0547] 随后用4:1DCM:六氟异丙醇 (100mL) 处理树脂以使肽自树脂裂解。30分钟之后将管柱排空且重复该程序。随后用DCM (100mL) 将树脂洗涤三次。在减压下蒸发所合并的洗脱液及洗涤液并且在真空中干燥隔夜。获得724mg白色固体 (2.35g,定量)。

[0548] m/z 1552, $C_{73}H_{126}N_{14}O_{22}$ 需要1550.92。

[0549] (ii) CBZ-Thr (O-*t*Bu) -Dap (Boc) -环[Dab-Dab (Boc) -DLeu-L-Abu-Dab (Boc) -Dab (Boc) -Thr (O-*t*Bu)]

[0550] 将粗CBZ-Thr (O-*t*Bu) -Dap (Boc) -Dab-Dab (Boc) -DLeu-L-Abu-Dab (Boc) -Dab (Boc) -Thr (O-*t*Bu) -OH (724mg, 0.466mmol) 溶解于DMF (75mL) 中,用二异丙基乙胺 (DIPEA) (361mg, 0.49mL, 2.8mmol) 处理,随后在冰浴中冷却。逐滴添加迭氮磷酸二苯酯 (256mg, 0.2mL, 0.93mmol),随后在冰浴冷却下将混合物搅拌2小时。移除冰浴且在室温下将溶液再搅拌2小时。蒸发溶剂并且将残余物施加至SiO₂ ISC0管柱 (40g),且用0-10% MeOH/DCM进行层析。合并含产物的洗脱份并蒸发至白色泡沫体。获得418mg (58%)。

[0551] m/z 1534, $C_{73}H_{124}N_{14}O_{21}$ 需要1532.91。

[0552] (iii) 标题化合物

[0553] 将CBZ-Thr (O-*t*Bu) -Dap (Boc) -环[Dab-Dab (Boc) -DLeu-L-Abu-Dab (Boc) -Dab (Boc) -Thr (O-*t*Bu)] (531mg, 0.346mmol) 溶解于甲醇 (50mL) 中,且用甲酸铵 (545mg, 8.6mmol) 及10% Pd/C (173mg) 处理。在室温下搅拌隔夜之后,将反应混合物滤过硅藻土,且

用MeOH洗涤残余物。蒸发溶剂并且将残余物溶解于含10% MeOH的EtOAc中,用水洗涤3次并且用硫酸镁干燥。蒸发溶剂,留下白色固体。为了移除任何痕量甲酸盐,将固体溶解于甲醇(160mL)中并且与Ambersep 900树脂(12mL)一起振荡30分钟。过滤混合物并蒸干,获得464mg白色固体(96%)。

[0554] m/z 1400, $C_{65}H_{118}N_{14}O_{19}$ 需要1398.87。

[0555] 一般方法

[0556] 如下进行多黏菌素九肽衍生物的全合成。

[0557] 在树脂上构筑参与环化的Dab残基的 γ -氨基受正交保护的线性肽,其中C末端氨基酸(典型地为Thr)连接至固相。在将参与环化的Dab(多黏菌素编号系统中的残基4)部分脱去保护继而自树脂移出后,在树脂外将所得线性肽环化。使用两种一般方法,如以下所描述。

[0558] 一般方法1:使用CBZ保护氨基的全合成

[0559] 在自动化肽合成仪上使用标准Fmoc固相肽化学反应进行受保护的线性肽(残基2-10及N末端基团)的合成。特定地,使用Fmoc-Thr(tBu)-PEG-PS树脂作为起始物质来进行合成。使用5摩尔当量(相对于树脂负载)的Fmoc氨基酸及HATU在DMF中利用原位活化,使用10摩尔当量DIPEA进行Fmoc-氨基酸与末端氨基上CBZ保护的偶合。使用20%哌啶/二甲基甲酰胺进行Fmoc去保护。使用BOC作为参与环化的Dab上的正交保护基。

[0560] 将树脂结合的线性肽用TFA/TIS/H₂O(96/2/2v/v)处理2小时,以露出参与环化的Dab残基,并且使肽自树脂裂解。使用含PyBop/HOBt/NMM(4/4/8摩尔当量相对于初始负载)的DMF使此物质环化3小时。部分蒸发粗物质,溶解于乙腈/水中并且冻干隔夜。随后使用含10% Pd/C的乙酸/MeOH/水(5/4/1v/v)移除CBZ基团。

[0561] 通过制备型HPLC纯化粗产物且分离非对映异构体(表3)。注意针对每一对非对映异构体对特定条件进行优化。

[0562] 一般方法2:使用Boc保护氨基的全合成

[0563] 在自动化肽合成仪上使用标准Fmoc固相肽化学反应进行受保护的线性肽(残基2-10及N末端基团)的合成。特定地,使用预先负载Fmoc-Thr(tBu)-OH(负载约0.78mmol/g)的氯三苯甲氯(CTC)-树脂,以0.05至0.1mmol规模进行合成。使用5摩尔当量(相对于树脂负载)的Fmoc氨基酸及HATU在DMF中利用原位活化,使用10摩尔当量DIPEA进行Fmoc-氨基酸的偶合。使用20%哌啶/二甲基甲酰胺进行Fmoc去保护。使用ivDde保护基作为参与环化的Dab残基上的正交保护基。

[0564] 为了移除ivDde基团,用含3%肼的DMF(100mL/100 μ mol,重复两次)处理线性肽,继而用DMF $\times$ 3、EtOH $\times$ 3及乙醚 $\times$ 3洗涤。随后通过用20% HFIP/DCM洗涤树脂而使部分脱去保护的线性肽自树脂裂解。将所得残余物溶解于50%乙腈/水中并且冻干隔夜。将受保护的线性肽溶解于DMF(20mL/mmol树脂)中,用DPPA(3摩尔当量,相对于树脂负载)及DIPEA(6摩尔当量,相对于树脂负载)环化。在室温下将此溶液搅拌隔夜。用TFA移除BOC基团,并且将粗肽冻干。

[0565] 通过制备型HPLC,使用以下所描述的制备型HPLC条件4来纯化粗产物且分离非对映异构体。注意针对每一对非对映异构体对特定条件进行优化。

[0566] 一般方法3:酸与九肽偶合及分离

[0567] 以下关于实例化合物5及6来描述用于使九肽末端与氨基酸偶合的方法。所描述的条件可改适以用于其他九肽与氨基酸组合。

[0568] 步骤1

[0569] 将H-Thr (0-^tBu) -Dap (BOC) -环[Dab-Dab (BOC) -DPhe-Leu-Dab (BOC) -Dab (BOC) -Thr]. (中间物1) (0.07mmol) 溶解于二氯甲烷(4mL)中,且用4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(1.5当量,相对于多黏菌素受质)、N,N-二异丙基乙胺(3.0当量)、继之以HATU(2.0当量)进行处理。16小时之后,通过LCMS证实反应完毕并且将反应混合物蒸干。添加水(约10mL)并且对混合物进行湿磨,随后剧烈搅拌1小时。通过过滤来收集所得沉淀物且在真空中干燥隔夜。

[0570] 步骤2

[0571] 将来自步骤1的经Boc保护的衍生物溶解于二氯甲烷(3mL)中并且用TFA(1mL)处理。在室温下搅拌反应混合物直至LCMS证实完全脱去保护。蒸发溶剂并且通过制备型HPLC使用制备型HPLC条件4所提供的条件对残余物进行层析,以分离非对映异构体。合并含早期跑出的非对映异构体的洗脱份,蒸发至低体积并冻干,得到呈TFA盐形式的实例5。合并含稍后跑出的非对映异构体的洗脱份,蒸发至低体积并冻干,得到呈TFA盐形式的实例6。

[0572] 注意针对每一对非对映异构体对特定条件进行优化。

[0573] 制备型HPLC条件4:

[0574] 管柱: Waters Sunfire C18 OBD 5 μ m $\times$ 19 mm $\times$ 150 mm

[0575] 移动相:A:水/乙腈90/10,v/v,0.15% TFA.

[0576] B:乙腈/水90/10,v/v,0.15% TFA

[0577] 流速:10mL/min

梯度:	时间(min)	%移动相A
[0578]	0	100%
	3	100%
	8	85%
	13.5	85%
	15	75%
[0579]	18	0%
	23	100%
	25	100%

[0580] 侦测:210nm

[0581] 制备型HPLC条件4:

[0582] 管柱: Phenomenex Hyperclone C18 BDS 5 μ m $\times$ 4.6 mm $\times$ 150 mm

移动相:A:水/乙腈90/10,v/v,0.15% TFA.

[0583] B:乙腈/水90/10,v/v,0.15% TFA

[0584] 流速:1mL/min

	梯度:	时间(min)	%移动相A
		0	100%
		20	40%
[0585]		21	0%
		23	0%
		23.5	100%
		25	100%

[0586] 侦测: 210,254nm

[0587] 注入体积: 20 μ L

[0588] 一般方法3b:使个别对映异构体与九肽偶合

[0589] 使用与以上一般方法3a中针对对映异构混合氨基酸所描述相同的条件,使对映异构纯氨基酸与九肽化合物N末端偶合。

[0590] 化合物实例5及6

[0591] 在一般方法3a的条件下使4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(异构体2)(滞留时间3.46min分析方法1或3.264min分析方法2)偶合,继而脱去保护,得到实例5。在X射线测定由4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(异构体2)衍生的4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸的绝对构形后,给实例(5)指定(S)立体化学。

[0592] 在一般方法3a的条件下使4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(异构体1,滞留时间2.89min分析方法1或2.796min分析方法2)偶合,继而脱去保护,得到实例6。在X射线测定由4-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(3-氯苯基)丁酸(异构体1)衍生的4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸的绝对构形后,给实例(6)指定(R)立体化学。

[0593] 一般方法4:转化为乙酸盐

[0594] 通过用10%乙酸水溶液继之以1%乙酸水溶液进行洗涤使AG1-X2树脂(Bio-Rad Laboratories Ltd)乙酸盐形式200-4 μ 目再生,并置于烧结玻璃滤筒中。使用30g树脂:1g TFA盐负载将呈TFA盐形式的化合物于水中的溶液施加至管柱,并且允许管柱在重力下滴注,用水洗脱。合并含产物的洗脱份并且冻干至白色固体。

[0595] 通过HPLC使用以上所描述的条件(分析型HPLC条件)对最终化合物进行分析。

[0596] 以下提供呈乙酸盐形式的实例5及实例6化合物的例示性分析资料。

[0597] 实例5:(较快异构体)乙酸盐的¹H NMR(400MHz, D₂O): δ (ppm) 0.70(3H,d,J 6.1Hz), 0.77(3H,d,J 6.3Hz), 0.78-0.90(1H,m), 1.13(3H,d,J 6.3Hz), 1.17(3H,d,J 6.4Hz), 1.36-1.52(2H,m), 1.75-2.06(17H,m,包括1.91,s,0Ac), 2.10-2.30(4H,m), 2.72-2.91(4H,m), 3.02-3.49(14H,m), 4.12-4.32(8H,m), 4.48(1H,dd,J 5.6,9.0Hz), 4.54-4.60(1H,m), 4.63-4.68(1H,m), 7.25-7.41(9H,m)。m/z 1145[MH⁺], 573[M+2H]²⁺。

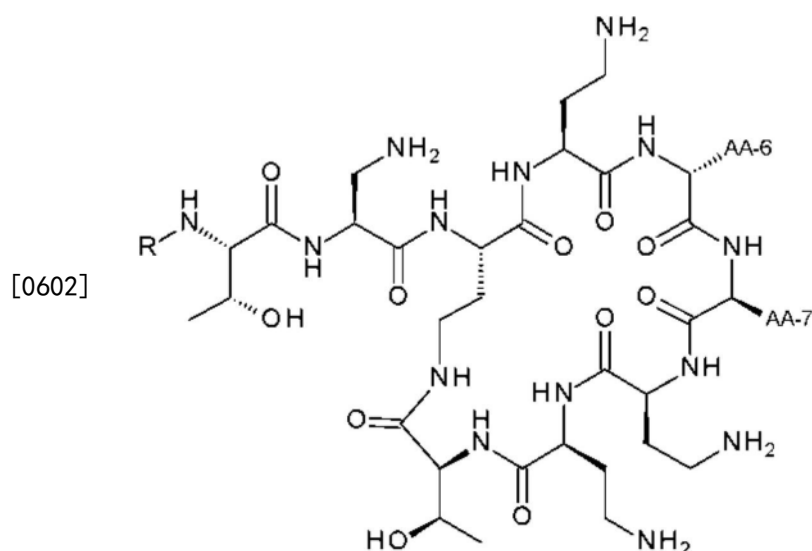
[0598] 实例6:(较慢异构体)乙酸盐的¹H NMR(400MHz, D₂O): δ (ppm) 0.60-0.67(6H,m), 0.69-0.84(4H,m), 1.16(3H,d,J 6.4Hz), 1.33-1.50(2H,m), 1.76-2.04(19H,m,包括1.88,

s, OAc), 2.06-2.26 (4H, m), 2.67-2.86 (4H, m), 3.00-3.46 (14H, m), 3.98-4.04 (1H, m), 4.14-4.30 (7H, m), 4.45 (1H, dd, J 5.6, 9.0 Hz), 4.54 (1H, 呈现为 t, J 8.3 Hz), 4.72 (1H, dd, J 5.0, 8.9 Hz), 7.20-7.40 (9H, m)。m/z 1145 [MH⁺], 573 [M+2H]²⁺。

[0599] 在所有实例中, 基于HPLC滞留时间(快洗脱异构体及慢洗脱异构体)以及Thr残基(自快洗脱异构体中的1.13ppm移动至慢洗脱异构体中的约0.65ppm)的化学位移来指定非对映异构体。

[0600] 实例化合物

[0601] 表1列出本发明的实例化合物。这些为具有以下所示的一般结构的化合物:



[0603] 基团R对应于本发明化合物中的-X-R¹⁵, 且此基团与当连同处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起时分别对应于基团-R¹及-R²的第6位及第7位氨基酸残基(分别为AA-6及AA-7, 使用多黏菌素编号系统)一起示于表中。

[0604] 在这些实例化合物中, 基团-R³与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为L-Thr, 基团-R⁴与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为L-Dap(因而-R⁴为-CH₂NH₂), 且基团-R⁸与处于其所连接的碳的 α 位的羰基及氮一起为L-Thr(因而-R⁸为甲基)。

[0605] 通过已与具有已知绝对立体化学的材料相关联的实例5及实例6相比较来指定侧链-R中的绝对立体化学。

[0606] 在实例1至实例6及实例15至实例33中, 通过比较非对映异构体的相对滞留时间及¹H NMR光谱(例如, 考虑第2位处Thr残基的化学位移)进行该确定。

[0607] 在实例7至实例14中, 通过比较非对映异构体的相对HPLC滞留时间来进行该确定。

[0608] 该表提供实例化合物的HPLC滞留时间。分析所使用的HPLC条件如以下所示。

[0609] 管柱: Phenomenex Hyperclone BDS C18, 4.6mm×150mm, 5 μ m 流速: 1mL/min

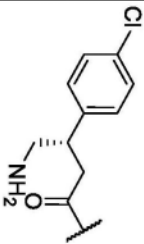
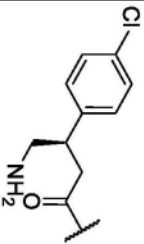
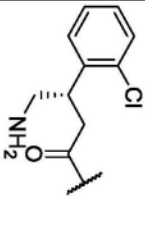
[0610] 洗脱剂:

[0611] A=10% AcN/90% 水/0.15% TFA

[0612] B=90% AcN/10% 水/0.15% TFA

梯度:		Min	% A	% B
[0613]		0	100	0
		20	40	60
		21	0	100
		23	0	100
		23.5	100	0
		25	100	0
[0614]	侦测:210,254nm			

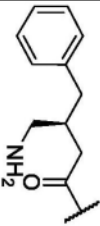
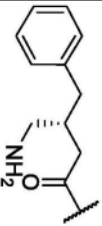
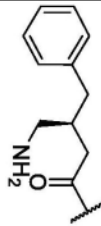
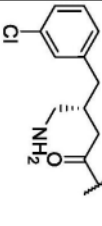
表 1 - 实例化合物

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方法	式	质量	HPLC <i>t_R</i> (min)	<i>m/z</i>
1	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(4-氯苯基)丁酰基-Thr- Dap-环 [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab -Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82ClN15O12	1143.6	9.6	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
2	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(4-氯苯基)丁酰基-Thr- Dap-环 [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82ClN15O12	1143.6	9.7	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
3	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(2-氯苯基)丁酰基-Thr- Dap-环 [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82ClN15O12	1143.6	9.1	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺

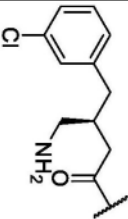
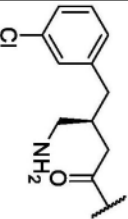
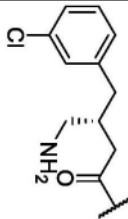
[0615]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方式	质量	HPLC <i>t_R</i> (min)	<i>m/z</i>
4	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(2-氯苯基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82CIN15O12	1143.6 9.4	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
5	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a, 3b	C52H82CIN15O12	1143.6 9.6	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
6	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a, 3b	C52H82CIN15O12	1143.6 9.8	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
7	(<i>R</i>)-4-氨基-3-苯甲基丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. 异构体 I		Leu	Leu	3a	C50H87N15O12	1089.7 8.8	1091 [MH+] 546 [M+2H] ²⁺

[0616]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般 方式	质量	HPLC t_R (min)	m/z
8	(S)-4-氨基-3-苯甲基丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Thr]. 异构体2		Leu	Leu	3a	C50H87N15O12	1089.7	9.1
								1091 [MH+] 546 [M+2H] ²⁺
9	(R)-4-氨基-3-苯甲基丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Thr]. 异构体1		Phe	Leu	3a	C53H85N15O12	1123.7	10.7
								1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
10	(S)-4-氨基-3-苯甲基丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Thr]. 异构体2		Phe	Leu	3a	C53H85N15O12	1123.7	11.0
								1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
11	(R)-4-氨基-3-(3-氯苯甲基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Thr]. 异构体1		Phe	Leu	3a	C53H84ClN15O12	1157.6	11.0
								1159 [MH+] 580 [M+2H] ²⁺

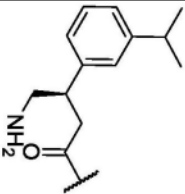
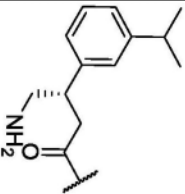
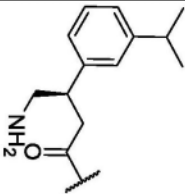
[0617]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方法	式	质量	HPLC <i>t_R</i> (min)	<i>m/z</i>
12	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(3-氯苯甲基)丁酰基-Thr-Dap-环 [Dab- Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. 异构体2		Phe	Leu	3a	C53H84CIN15O12	1157.6	11.4	1159 [MH+] 580 [M+2H] ²⁺
13	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(3-氯苯甲基)丁酰基-Thr-Dap- 环 [Dab- Dab-DLLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. 异构体2		Leu	Leu	3a	C50H86CIN15O12	1123.6	10.4	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
14	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(3-氯苯甲基)丁酰基-Thr-Dap- 环 [Dab- Dab-DLLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. 异构体1		Leu	Leu	3a	C50H86CIN15O12	1123.6	9.9	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺

[0618]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方法	式	质量	HPLC t_R (min)	m/z
15	(S)-4-氨基-3-(3-异丙基苯基)丁酰基-Thr-Dap-环 [Dab-Dab-DLLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Leu	3a	C52H91N15O12	1117.7	10.7	1119 [MH+] 560 [M+2H] ²⁺
16	(R)-4-氨基-3-(3-异丙基苯基)丁酰基-Thr-Dap-环 [Dab-Dab-DLLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Leu	3a	C52H91N15O12	1117.7	10.9	1119 [MH+] 560 [M+2H] ²⁺
17	(S)-4-氨基-3-(3-异丙基苯基)丁酰基-Thr-Dap-环 [Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Abu	1	C53H85N15O12	1123.7	9.2	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺

[0619]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方法	式	质量	HPLC <i>t_R</i> (min)	<i>m/z</i>
18	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(3-异丙基苯基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Abu	1	C53H85N 15012	1123.7	9.4	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
19	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(3-异丙基苯基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DLLeu-Thr-Dab-Dab-Thr]		Leu	Thr	1	C50H87N 15013	1105.7	7.6	1107 [MH+] 554 [M+2H] ²⁺
20	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(3-异丙基苯基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DLLeu-Thr-Dab-Dab-Thr]		Leu	Thr	1	C50H87N 15013	1105.7	7.8	1107 [MH+] 554 [M+2H] ²⁺

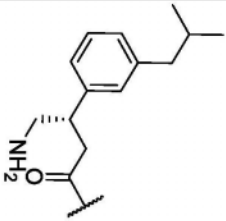
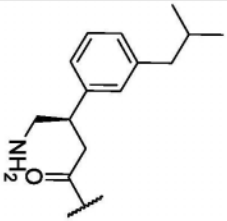
[0620]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方法	式	质量	HPLC <i>tr</i> (min)	<i>m/z</i>
21	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(间甲基)-丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C53H85N 15O12	1123.7	8.7	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
22	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(间甲基)-丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C53H85N 15O12	1123.7	8.9	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
23	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(3-氯苯基)-丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	2	C47H80Cl 1N15O12	1081.6	9.2	1083 [MH+] 542 [M+2H] ²⁺

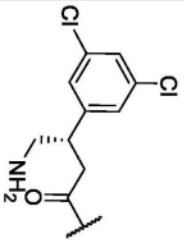
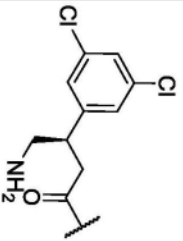
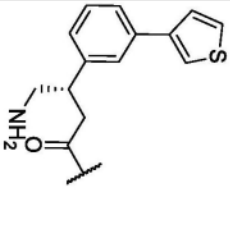
[0621]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方法	式	质量	HPLC <i>t_R</i> (min)	<i>m/z</i>
24	(<i>S</i>)-3-([1,1'-联苯]-3-基)-4-氨基丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab- DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3b	C53H85N 15O12	1123.7	8.5	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
25	(<i>R</i>)-3-([1,1'-联苯]-3-基)-4-氨基丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab- DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3b	C53H85N 15O12	1123.7	8.7	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺

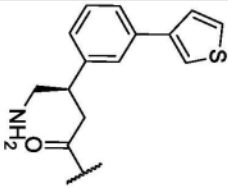
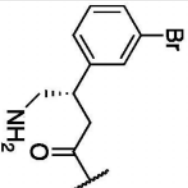
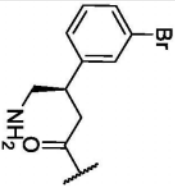
[0622]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方式	质量	HPLC <i>t_R</i> (min)	<i>m/z</i>
26	(S)-4-氨基-3-(3-异丁基苯基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DLLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H89N 15012	1103.7 8.9	1105 [MH+] 553 [M+2H] ²⁺
27	(R)-4-氨基-3-(3-异丁基苯基)丁酰基-Thr-Dap-环[Dab-Dab-DLLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H89N 15012	1103.7 9.1	1105 [MH+] 553 [M+2H] ²⁺

[0623]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方法	式	质量	HPLC t_R (min)	m/z
28	(S)-4-氨基-3-(3,5-二氯苯基)丁酰基--Thr-Dap-环[Dab-Dab-DnorLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Norleu	Abu	2	C47H79C 12N15O1 2	1115.5	8.0	1117 [MH+] 559 [M+2H] ²⁺
29	(R)-4-氨基-3-(3,5-二氯苯基)丁酰基--Thr-Dap-环[Dab-Dab-DnorLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Norleu	Abu	2	C47H79C 12N15O1 2	1115.5	8.1	1117 [MH+] 559 [M+2H] ²⁺
30	(S)-4-氨基-3-(3-(噻吩-3-基)苯基)丁酰基--Thr-Dap-环[Dab-Dab-DLLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H83N 15O12S	1129.6	8.4	1131 [MH+] 566 [M+2H] ²⁺

[0624]

实例	名称	-R	AA-6	AA-7	一般方法	式	质量	HPLC <i>t_R</i> (min)	<i>m/z</i>
31	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(3-(噻吩-3-基)苯基)丁酰基-Thr-Dap-环 [Dab- Dab-DLLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H83N I5O12S	1129.6	8.5	566 [M+2H] ²⁺
32	(<i>S</i>)-4-氨基-3-(3-溴苯基)丁酰基-Thr-Dap-环 [Dab- Dab-DLLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C47H80B rN15O12	1125.5	7.1	1128 [MH ⁺] 564 [M+2H] ²⁺
33	(<i>R</i>)-4-氨基-3-(3-溴苯基)丁酰基-Thr-Dap-环 [Dab- Dab-DLLeu-Abu-Dab-Dab-Thr].		Leu	Abu	3a	C47H80B rN15O12	1125.5	7.5	1128 [MH ⁺] 564 [M+2H] ²⁺

[0625]

[0626] 生物学结果

[0627] 测试本发明化合物,并且将结果与比较实例,包括本领域中先前报导的化合物相

比较。

[0628] MIC测定

[0629] 通过使分离的菌落(选自18至24小时Mueller-Hinton琼脂平板)直接悬浮来制备接种物,调节至0.5麦克法兰标准。通过两倍连续抗生素稀释于无菌96孔微量滴定板中经阳离子调节的Mueller-Hinton肉汤中来进行MIC测试,总体积为170 μ L(150 μ L含抗微生物剂的肉汤、20 μ L接种物)。以一式两份进行分析。在35 $^{\circ}$ C下在无振荡的情况下将平板有氧孵育18至20小时,其中MIC定义为防止可见生长的最低药物浓度。对若干化合物进行多次测试,且在此情况下,所提供的MIC为所获得的中值。MIC值以 μ g/mL列出。

[0630] 活体外肾细胞毒性分析

[0631] 根据以下方案进行活体外肾细胞毒性分析。

[0632] 在补充有5ng/mL表皮生长因子(EGF)及50 μ g/mL牛垂体提取物(BPE)的角质细胞-SFM培养基中维持并分析HK-2细胞。将细胞以7,500个细胞/孔接种在96孔板中并允许其黏附隔夜。将多黏菌素B(PMB)及测试化合物溶解于10% DMSO水溶液中,分别得到20及60mg/mL的储备溶液。利用半对数稀释将测试化合物稀释,得到最高浓度3,000或1,000 μ g/mL,得到9点浓度范围加媒介剂对照。亦利用半对数稀释将PMB稀释,得到最高浓度1,000 μ g/mL。水及DMSO含量分别保持恒定在5%及0.5%。将测试化合物与细胞一起在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下在湿润气氛中孵育24小时。将CellTiter-Blue稀释于PBS中(1:4)并添加20%(v/v),且在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时,随后检测荧光产物。

[0633] 减去仅有培养基的背景值,随后使用GraphPad Prism分析资料。对于各化合物,将个别值相对于媒介剂对照进行标准化。将化合物浓度值标绘为对数值,以便能够拟合剂量-反应曲线。将曲线的底部约束为零并确定IC₅₀值。

[0634] 表述IC₅₀值相对于同一实验中PMB的IC₅₀值。在进行多次测定的情况下,提供中值。

[0635] 四小时肾脏水平量测

[0636] 将化合物以17.2mg/kg游离碱经皮下给予小鼠(n=2或3)。给药之后四小时,对动物施以安乐死并移出肾脏,修剪脂肪及结缔组织,称重并立即快速冷冻。在室温下解冻之后,将来自各动物的成对肾脏置于含有预先称重的经二氧化铈稳定的氧化锆珠粒的2mL锥形管中。添加三氟乙酸TFA(0.25mL,0.15%v/v处于水中)并将管装载至FastPrep-24均质机(MP Biomedicals Europe)上,且以6m/s的速度经受3个30秒循环。将均质物的等分试样(200 μ L)用计算体积的TFA溶液(0.15%v/v于水中)稀释,得到0.167克肾脏/克均质物的最终浓度。

[0637] 将肾脏均质物(100 μ L)与甲醇(190 μ L)及TFA(110 μ L,10%v/v于水中)混合,并且储存在-20 $^{\circ}$ C下隔夜以使蛋白质沉淀。在13,000rpm及6 $^{\circ}$ C下离心10分钟之后,将200 μ L上清液转移至玻璃插入物中并通过LC-MS-MS进行分析。

表2 - 生物学结果

实例	AlogP	大肠杆菌		肺炎克雷伯氏杆菌		绿脓杆菌		鲍氏不动杆菌		HK-2 相对4小时肾脏水平4小时肾脏水平/肾HK-2		
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
1	-6.3	4	0.125	8	0.125	0.25	0.06	0.06	0.06	8.8	267	30
2	-6.3	8	0.25	2	0.25	0.5	0.25	0.25	0.25	7.2	538	75
3	-6.3	32	1	65	0.5	0.5	0.5	1	2	ND	ND	ND
4	-6.3	16	0.5	16	0.25	0.5	0.25	1	1	ND	ND	ND
5	-6.3	8	0.125	16	0.125	0.25	0.25	0.06	0.125	11.6	170	15
6	-6.3	8	0.125	8	0.125	0.5	0.125	0.5	0.5	7.8	381	49
7	-6.9	16	0.25	32	ND	0.25	0.125	0.125	0.125	ND	ND	ND
8	-6.9	16	0.125	32	ND	0.5	0.06	0.25	0.125	ND	ND	ND
9	-6.5	8	0.25	64	0.25	0.5	0.125	0.125	0.25	12.0	159	13
10	-6.5	8	0.125	16	0.5	0.25	0.125	0.25	0.25	8	346	43
11	-5.9	4	0.5	16	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	5.2	163	32
12	-5.9	4	0.5	8	0.5	0.5	0.125	0.25	0.25	ND	ND	ND
13	-6.2	8	0.5	16	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	ND	ND	ND

[0638]

[0639]

实例	AlogP	大肠杆菌		肺炎克雷伯氏杆菌		绿脓杆菌		鲍氏不动杆菌		HK-2 相对子PMB	4小时肾脏水平 ($\mu\text{g/g}$)*	4小时肾脏水平 平/肾HK-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
14	-6.2	8	1	32	0.5	1	0.5	0.5	0.5	ND	ND	ND
15	-6.1	4	0.125	16	0.125	0.5	0.25	0.06	0.06	52.1	443	8.5
16	-6.1	16	0.5	8	0.25	1	0.5	0.5	0.5	ND	ND	ND
17	-6.5	8	0.125	16	0.125	0.25	0.125	0.06	0.06	29.0	231	8
18	-6.5	16	0.25	8	0.25	0.25	0.25	0.125	0.125	32.8	535	16.3
19	-7.9	32	0.25	64	0.25	1	0.25	0.25	0.25	101.4	386	4
20	-7.9	64	1	64	2	2	0.5	1	2	ND	ND	ND
21	-6.5	16	0.125	32	0.25	0.5	0.25	0.125	0.125	26.7	209	8
23	-7.4	32	0.125	64	0.125	0.5	0.25	0.125	ND	>41	263	<6.4
22	-6.5	16	0.25	8	0.25	0.5	0.25	1	1	ND	ND	ND
24	-6.5	4	0.125	16	0.25	0.25	0.125	0.06	0.03	21.8	203	9
25	-6.5	16	0.25	2	0.5	0.5	0.25	0.125	0.125	ND	ND	ND
26	-6.4	8	0.06	8	0.5	0.5	0.25	0.03	0.06	>58	353	<6.1
27	-6.4	16	0.25	2	0.25	0.5	0.5	0.125	0.125	ND	ND	ND

实例	AlogP	大肠杆菌		肺炎克雷伯氏杆菌		绿脓杆菌		鲍氏不动杆菌		HK-2 相对4小时肾脏水平 于PMB	4小时肾脏水平 (µg/g)*	4小时肾脏水平 平/肾HK-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
28	-6.5	16	0.125	8	0.125	0.25	0.25	0.06	0.125	68.5	408	6.0
29	-6.5	16	0.25	8	0.25	0.5	0.25	0.125	0.125	ND	ND	ND
30	-6.8	8	0.125	16	0.125	0.5	0.25	0.06	ND	37.5	252	6.7
31	-6.8	16	0.125	4	0.25	0.25	0.25	0.125	ND	ND	ND	ND
32	-7.3	32	0.25	32	0.5	0.5	0.5	0.125	0.125	ND	ND	ND
33	-7.3	64	0.5	16	0.5	0.5	0.5	1	1	ND	ND	ND

ND - 未测定(未测试)

[0640]

[0641] 额外的生物学数据
[0642] 肾毒性比较——实例5以及参考实例D77及38

[0643] 每天三次以17.2mg游离碱/kg经皮下给予小鼠(n=6)多黏菌素B、硫酸黏菌素、参考实例D77、参考实例38或实例5。第4天在第一剂量之后立即开始,将小鼠转移至单独的代谢笼中并且在接下来的24小时内收集尿液以测定生物标记物水平(白蛋白、胱抑素C、KIM-1)。几何平均生物标记物水平提供于下表中:

[0644]	化合物	白蛋白 ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)	胱抑素C ($\text{ng}/24\text{ h}$)	KIM-1 ($\text{ng}/24\text{ h}$)
	PMB	1,154 - 1,912	1,155 - 1,400	4 - 22
	黏菌素	2,353 - 2,548	1,266 - 1,678	42 - 89
	参考实例D77	3,639	7,542	130
	参考实例38	2,362	14,015	79
	实例5	1,004	827	3

[0645] PMB值显示得自4次实验的范围且黏菌素得自2次实验。

[0646] 尿液中白蛋白、胱抑素C或KIM-1升高为肾损伤的征象。实例5显示所有3种肾毒性生物标记物的最低水平。

[0647] 参考实例D77描述于W0 2015/135976中。参考实例38描述于W0 2016/083531中。

[0648] 肾毒性比较——实例5、实例9及实例17

[0649] 以25mg游离碱/kg以8小时间隔经皮下给予小鼠(n=6)PMB、实例5、实例9或实例17,持续四个剂量。在第四剂量之后,将动物转移至单独的代谢笼中并收集尿液24小时以测定尿液生物标记物。收集尿液之后,对小鼠施以安乐死并收集肾脏用于组织病理学。

[0650]	化合物	白蛋白 ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)	胱抑素C ($\text{ng}/24\text{ h}$)	KIM-1 ($\text{ng}/24\text{ h}$)
	PMB	1,147	1,425	58
	实例5	343	448	1
	实例9	749	754	2

[0651] 依据组织病理学,实例5或实例9组中的动物无一显示任何退化或再生征象。相比的下,经PMB处理的所有6只动物均显示极低程度的肾小管再生。

[0652] 在单独的实验中,将实例17与PMB相比较。

[0653]	化合物	与媒剂对照相比升高		
		白蛋白	胱抑素C	KIM-1
	PMB	29×	2×	771×
	实例17	2.7×	1.8×	4.7×

[0654] 亦评定组织病理学征象:

	PMB	实例17
[0655] 肾小管退化/坏死	4个正常/1极低程度	均正常
嗜碱性肾小管	4个极低程度/1个中度	3个正常/2个极低程度

[0656] 在食蟹猕猴中比较实例5与PMB的肾毒性

[0657] 通过静脉内输注以20mg/kg/剂量经1小时给予雄性食蟹猕猴 (n=3) 实例5, 每天3次, 持续7天。在一单独的实验中, 以4mg/kg/剂量给予雄性猴子 (n=3) PMB持续相同的时段。在两个实验中, 每天3次给予对照动物生理盐水。

[0658] 在7天时段结束时, 对血液进行取样, 并且将血液尿素氮及肌酸酐的血清水平确定为肾损伤的指标。在实例5的情况下, 平均BUN及肌酸酐水平与生理盐水对照动物相比升高不足50%。然而, 对于给予PMB的动物, BUN水平与对照动物相比升高76%, 且肌酸酐水平高出2.6倍。

[0659] 在7天给药时段结束时收集肾脏并且用显微镜检查。在经PMB处理的三只动物中, 2只显示轻度肾小管退化且1只显示极低程度退化。在经实例5处理的动物中, 1只显示轻度肾小管退化且2只显示极低程度退化。

[0660] 在这些实验中, 实例5的剂量比PMB高出5倍, 但肾毒性征象降低。给药第7天时一个给药周期的药物暴露 (AUC_{0-8h}) 为234μg·h/mL (实例5) 及117μg·h/mL (PMB)。

[0661] 化合物在感染大肠杆菌ATCC 25922的嗜中性球减少性鼠类大腿模型中的效力

[0662] 在致使嗜中性球减少 (环磷酰胺150mg/kg d-4、100mg/kg d-1) 后, 将CD-1小鼠 (n=5) 在各大腿接种约105cfu大肠杆菌ATCC25922。在感染后1、3.5及6小时经静脉内给予小鼠0.125、0.5及3mg/kg硫酸PMB或测试化合物 (当量重量游离碱)。在感染后9小时, 对小鼠施以安乐死并且处理大腿以用于菌落计数。

[0663] 菌落计数相对于媒剂对照的减少示于下表中。在各情况下, 相同实验中所观测的在PMB情况下的减少示于括号中:

化合物	与媒剂对照相比的cfu对数下降		
	0.125 mg/kg	0.5 mg/kg	3 mg/kg
[0664] 实例5	0.1 (0.4)	2.2 (2.6)	3.4 (3.5)
实例9	0.1 (0.4)	0.5 (0.6)	3.7 (3.9)
实例17	0 (0.1)	1.3 (1.1)	3.7 (3.7)
实例24	0 (0)	0.4 (0.5)	2.4 (2.9)

[0665] 所有化合物均与PMB同样有效。

[0666] 化合物在感染肺炎克雷伯氏杆菌ATCC 43816的嗜中性球减少性鼠类大腿模型中的效力

[0667] 在致使嗜中性球减少 (环磷酰胺150mg/kg d-4、100mg/kg d-1) 后, 将CD-1小鼠 (n=5) 在各大腿接种约105cfu肺炎克雷伯氏杆菌ATCC43816。在感染后2、6及10小时经静脉内

以适当剂量给予小鼠硫酸PMB或测试化合物(当量重量游离碱)。在感染后16小时,对小鼠施以安乐死并且处理大腿以用于菌落计数。

[0668] 菌落计数相对于媒剂对照的减少示于下表中。在各情况下,相同实验中所观测的在PMB情况下的减少示于括号中:

剂量(mg/kg)	与媒剂对照相比的cfu对数下降	
	实例5	实例24
0.125	0 (0.2)	0 (0.2)
0.25	ND	0.2 (0.2)
0.5	4.8 (4.9)	0.2 (0.9)
1	4.8 (5.2)	ND
2	ND	4.7 (4.0)
4	5.3 (5.6)	ND

[0670] ND=未测定

[0671] 两种化合物皆与PMB同样有效。

[0672] 化合物在感染鲍氏不动杆菌NCTC13301的嗜中性球减少性鼠类大腿模型中的效力

[0673] 在致使嗜中性球减少(环磷酰胺150mg/kg d-4、100mg/kg d-1)后,将CD-1小鼠(n=5)在各大腿接种约105cfu鲍氏不动杆菌NCTC13301。在感染后2、6及10小时经静脉内给予小鼠0.125、0.5、1及4mg/kg硫酸PMB或测试化合物(当量重量游离碱)。在感染后16小时,对小鼠施以安乐死并且处理大腿以用于菌落计数。

[0674] 菌落计数相对于媒剂对照的减少示于下表中。在各情况下,相同实验中所观测的在PMB情况下的减少示于括号中:

剂量(mg/kg)	与媒剂对照相比的cfu对数下降	
	实例5	实例24
0.125	0.4 (0.3)	0.1 (0.1)
0.5	3.1 (4.2)	2.2 (4.1)
1	6.7 (5.8)	5.5 (5.0)
4	7.4 (6.5)	5.7 (5.3)

[0676] 两种化合物皆与PMB同样有效。

[0677] 化合物在感染鲍氏不动杆菌NCTC13301的嗜中性球减少性鼠类肺模型中的效力

[0678] 在致使嗜中性球减少(环磷酰胺200mg/kg d-4、150mg/kg d-1)后,将CD-1小鼠(n=8)经鼻内接种约107cfu/肺的鲍氏不动杆菌NCTC13301。在感染后2、6及10小时经皮下给予小鼠硫酸PMB(20mg/kg)或适当剂量的测试化合物(当量重量游离碱)。在感染后16小时,对小鼠施以安乐死并且处理肺以用于菌落计数。

[0679] 菌落计数相对于媒剂对照的减少示于下表中。在各情况下,相同实验中所观测的

在PMB情况下的减少示于括号中：

剂量(mg/kg)	与媒剂对照相比的cfu对数下降	
	实例5	实例24
2.5	0	0.9
10	0	1.6
20	2.5 (0)	2.7 (0)
30	4.0	3.9

[0681] PMB在此模型中在最大耐受剂量下无效。实例5在20mg/kg下更有效,且由于毒性降低亦可以更高水平给予以达成更大效果。

[0682] 化合物在感染绿脓杆菌ATCC 27853的嗜中性球减少性鼠类肺模型中的效力

[0683] 在致使嗜中性球减少(环磷酰胺200mg/kg d-4、150mg/kg d-1)后,将CD-1小鼠(n=8)经鼻内接种约104-105cfu/肺的绿脓杆菌ATCC 27853。在感染后2、6及10小时经皮下以适当剂量给予小鼠硫酸PMB或测试化合物(当量重量游离碱)。在感染后16小时,对小鼠施以安乐死并且处理肺以用于菌落计数。

[0684] 菌落计数相对于媒剂对照的减少示于下表中。在各情况下,相同实验中所观测的在PMB情况下的减少示于括号中：

剂量(mg/kg)	与媒剂对照相比的cfu对数下降	
	实例5	实例24
2.5	0 (0)	0.8 (0.3)
5	0 (0)	ND
7.5	ND	3.2 (1.0)
10	2 (0.7)	ND
20	3.6 (2.6)	4.4 (3.7)
40	ND	5.7

[0686] ND=未测定

[0687] 两种化合物在此模型中皆显示优于PMB的效力。

[0688] 实例5在利放平存在下的MIC值

[0689]

生物体	菌株保藏编号	已知抗性 基因型	多黏菌素 B(PMB)	PMB+ 利放 平(1 $\mu\text{g/mL}$)	实例5	实例5+利放 平(1 $\mu\text{g/mL}$)
大肠杆菌	ATCC 25922	NA	0.25	≤ 0.015	0.125	≤ 0.015
	CDF-1	MCR-1	4	0.06	8	0.06
	IHMA 940398	NA	16	0.06	32	0.125
肺炎克雷伯 氏杆菌	ATCC 13882	NA	0.25	0.06	0.125	0.06
	IHMA 580884	NA	8	0.06	16	0.125
	IHMA 520329	SHV-12, KPC-2	64	0.125	>64	0.06
绿脓杆菌	ATCC 27853	NA	0.5	0.125	0.25	0.125
	IHMA 517175	NA	8	0.25	8	0.5
	IHMA 644636	NA	32	0.5	32	1
鲍氏不动杆 菌	NCTC 13301	OXA-23	0.25	≤ 0.015	0.06	≤ 0.015
	IHMA 851735	OXA-23	8	0.03	0.25	≤ 0.015
	IHMA 517303	NA	>64	0.125	>64	0.03

[0690] 在CLSI条件下通过肉汤微量稀释来测定MIC值($\mu\text{g/mL}$)。

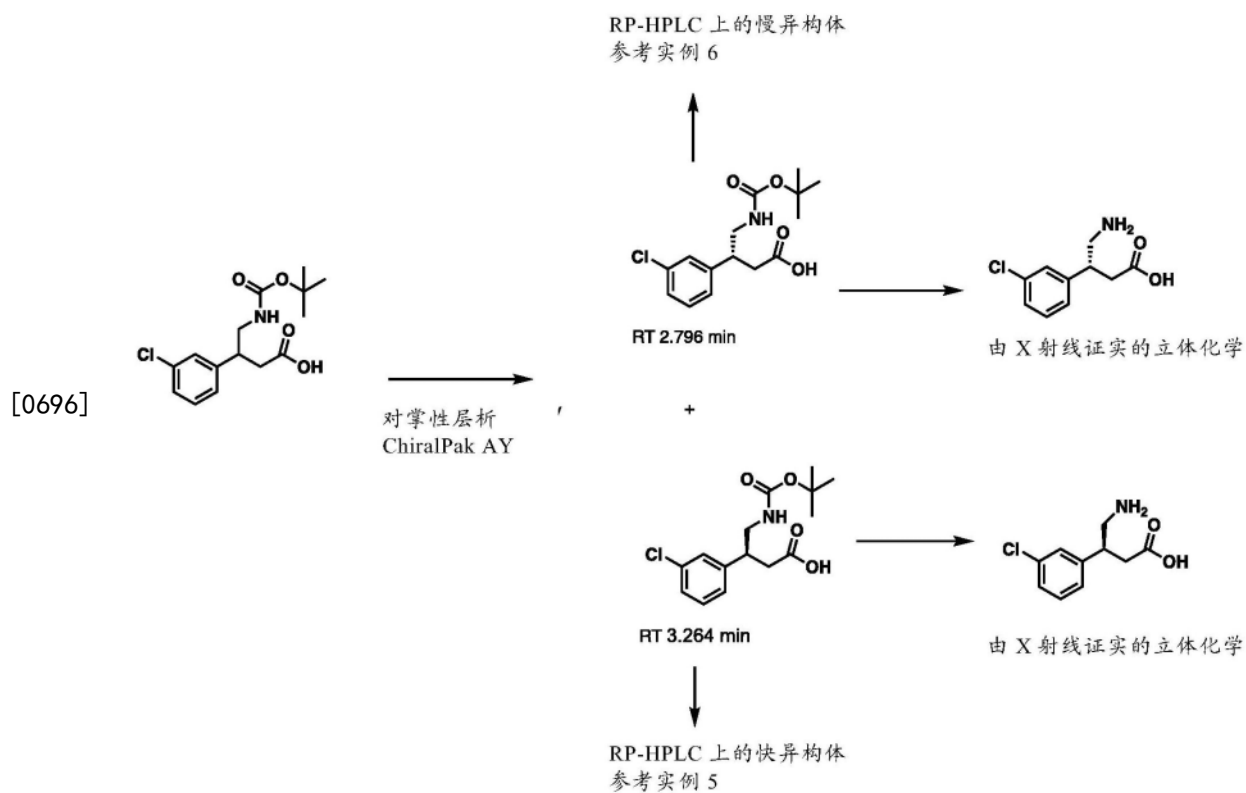
[0691] PMB及实例5二者皆显示与利放平的强协同作用,即便是对多黏菌素具有降低的易感性的菌株。

[0692] 立体化学研究

[0693] 本发明化合物含有处于N末端部分中 γ -氨基丙基的 β 位的立体中心。令人惊讶地,已发现此位置的立体异构体之一通常与较低细胞毒性及较低肾脏药物水平相关。其为在逆相层析上更快速洗脱的立体异构体。

[0694] 举例而言,在关于实例5及实例6的成对非对映异构体中,自逆相HPLC管柱中更快洗脱的非对映异构体显示比相应较慢异构体更低的肾脏暴露及更低的细胞毒性。依据相应氨基酸的小分子X射线分析(如以下方案中所示),较快非对映异构体(实例5)衍生自(S)-4-氨基-3-(3-氯苯基)丁酸。

[0695] 方案1

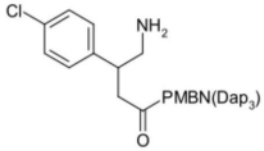
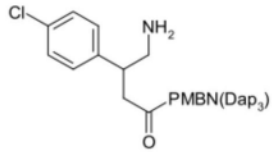
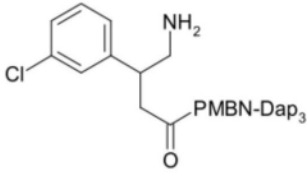
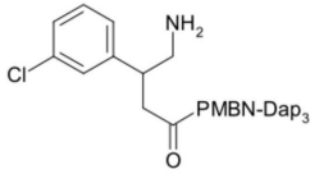


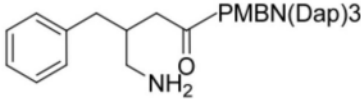
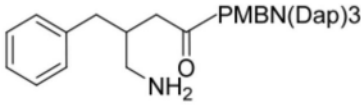
[0697] 进一步比较示于以下表3中。如以上所描述,在逆相层析上更快洗脱且具有与实例5相似的NMR化学位移的非对映异构体(N末端基团的差向异构体)可能具有与实例5相同的绝对立体化学结构。

[0698] 指定给表3中各化合物的绝对立体化学示于表1中。

[0699] 表3-立体化学结果

[0700]

实例	结构	细胞毒性	肾脏中药物水平	4 h肾脏水平/肾细胞毒性
1	 快异构体	8.8	268	30
2	 慢异构体	7.2	538	75
5	 快异构体	11.6	170	15
6	 慢异构体	7.8	381	49

[0701]	9	 快异构体	12.0	159	13
	10	 慢异构体	8.0	346	43

[0702] 细胞毒性是指相对于针对多黏菌素B针对HK-2细胞株记录的 IC_{50} 的量测 IC_{50} 。

[0703] 药物水平是指小鼠模型中在17.2mg/kg皮下剂量之后4小时在肾脏中发现的化合物的量($\mu\text{g/g}$)。

[0704] 额外的数据

[0705] 实例24与PMB相比在四个剂量之后在小鼠中的肾毒性

[0706] 数组雄性CD-1小鼠组($n=5$)以8小时间隔经皮下以12.5或25mg游离碱/kg给予四次多黏菌素B(PMB)或以25、50或75mg游离碱/kg给予实例24化合物。在第四剂量之后立即将小鼠转移至代谢笼中并收集尿液24小时以测定尿液生物标记物。收集尿液后,将小鼠处死以进行肾脏组织病理学检查。平均生物标记物水平示于以下表4中。

[0707] 表4-尿液生物标记物

化合物	剂 量 (mg/kg)	尿液生物标记物				
		胱抑素C	β -2微球蛋白	Kim-1	NGAL	白蛋白
媒剂	-	22.24	0.05	17.01	0.00	3.44
PMB	12.5	29.45	3.43	21.89	0.30	3.75
PMB	25	44.51	43.83	3,446.42	4.37	7.73
实例24	25	31.04	0.05	27.61	0.00	4.78
实例24	50	33.97	13.22	171.59	0.63	6.95
实例24	75	81.44	68.51	1,203.41	3.71	10.93

[0709] 将尿液生物标记物相对于尿液肌酐进行标准化。

[0710] 对于所有五种生物标记物,在50mg/kg实例24下的表现低于25mg/kg PMB,且对于该五种生物标记物中的两种(Kim-1、NGAL),在75mg/kg剂量下的表现低于25mg/kg PMB。

[0711] 组织病理学结果示于以下表5中。

[0712] 表5-组织病理学结果

[0713]

化合物	剂 量 (mg/kg)	组织病理学		
		肾小管退化/坏死	嗜碱性肾小管(皮质)	有丝分裂相增加
媒剂	-	0/5	0/5	0/5
PMB	12.5	0/5	0/5	0/5
PMB	25	5/5 (2个最低程度/2个轻度/1个中度*)	5/5 (1个最低程度/2个轻度/2个中度*)	3/5 (2个最低程度/1个轻度)
实例24	25	0/5	0/5	0/5
实例24	50	2/5 (2个最低程度)	2/5 (2个最低程度)	2/5 (2个最低程度)
实例24	75	5/5 (1个最低程度/3个轻度/1个中度))	5/5 (2个最低程度/1个轻度/1个中度/1个显著程度)	5/5 (5个最低程度)

[0714] *研究时一只动物死亡

[0715] 50mg/kg剂量的实例24的肾组织病理学严重程度低于25mg/kg剂量的PMB,且75mg/kg剂量的实例24的肾组织病理学与25mg/kg剂量的PMB相比为相似的。

[0716] 参考文献

[0717] 本说明书中所提及的所有文献均以引用的方式整体并入本文中。

[0718] de Visser等人,J.Peptide Res,61,2003,298

[0719] Dolomanov等人,J.Appl.Cryst.42,2009,339

[0720] Felluga等人,Tetrahedron Asymmetry,19,2008,945

[0721] Sheldrick Acta Cryst.A71,2015,3-8

[0722] Sheldrick Acta Cryst.C71,2015,3-8

[0723] Vaara等人,Antimicrob.Agents and Chemotherapy,52,2008.3229

[0724] Velkov等人,ACS Chem.Biol.9,2014,1172

[0725] Velkov等人,ACS Chem.Biol.9,2014,1172

[0726] WO 2014/188178

[0727] WO 2016/083531

[0728] WO 2013/072695

[0729] WO 2015/135976