



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109071511 B

(45) 授权公告日 2022.06.07

(21) 申请号 201780006105.X
 (22) 申请日 2017.01.09
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109071511 A
 (43) 申请公布日 2018.12.21
 (30) 优先权数据
 62/276,494 2016.01.08 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2018.07.09
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2017/012702 2017.01.09
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02017/120575 EN 2017.07.13
 (73) 专利权人 康涅狄格大学
 地址 美国康涅狄格州
 (72) 发明人 丹尼斯·赖特 埃米·C·安德森
 埃里克·斯科凯拉
 纳伦德兰·古姆迪蓬尼达亚南
 桑托什·凯希佩迪
 斯特凡妮·雷韦
 迈克尔·N·隆巴多
 (74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
 专利代理师 郑斌 彭鲲鹏

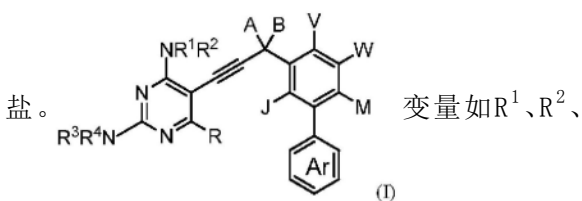
(51) Int.Cl.
 C07D 405/14 (2006.01)
 A61P 33/02 (2006.01)
 C07D 403/10 (2006.01)
 C07D 405/06 (2006.01)
 C07D 239/48 (2006.01)
 A61K 31/505 (2006.01)
 A61K 31/506 (2006.01)
 A61P 31/04 (2006.01)
 A61P 31/10 (2006.01)
 (56) 对比文件
 WO 2013070620 AL, 2013.05.16
 WO 2009025919 A2, 2009.02.26
 US 20150225353 A1, 2015.08.13
 Oztekin Algul, 等. 2,4-Diamino-5-(2-arylpropargyl)pyrimidine derivatives as new nonclassical antifolates for human dihydrofolate reductase inhibition.《J Mol Graph Model.》.2011,第608-613页.
 Kishore Viswanathan, 等. Toward New Therapeutics for Skin and Soft Tissue Infections: Propargyl-Linked Antifolates Are Potent Inhibitors of MRSA and Streptococcus pyogenes.《PLoS ONE》.2012,第1-9页. (续)

审查员 贾丹

权利要求书2页 说明书29页 附图5页

(54) 发明名称
 可用于治疗细菌感染的两性离子性炔丙基连接的抗叶酸剂

(57) 摘要
 本公开内容提供了式I的化合物及其可药用



R³、R⁴、A、B、J、V、W、M、J和Ar如本文所定义。本公开内容还提供了包含式I化合物或盐以及可药用载体的药物组合物,在体外或体内用式I化合物或盐抑制二氢叶酸还原酶(DHFR)的方法,以及用式I化合物或盐治疗细菌感染、真菌感染和原生动物的方法。式I化合物或盐可以是本公开内容的药物组合物或方法中使用的第一和唯一的活性成分,或者可以与不是式I化合物或盐的一种或更多种另外的活性成分组合。

CN 109071511 B

[接上页]

(56) 对比文件

Wangda Zhou,等.Acetylenic Linkers in Lead Compounds: A Study of the Stability of the Propargyl-Linked Antifolates.《DRUG METABOLISM AND DISPOSITION》.2012,第2002-2008页.

Janet L. Paulsen,等.In vitro biological activity and structural analysis of 2,4-diamino-5-(2-arylpropargyl)pyrimidine inhibitors of *Candida albicans*.《Bioorganic & Medicinal Chemistry》.2009,第4866-4872页.

Kathleen M. Frey,等.Towards the understanding of resistance mechanisms in clinically isolated trimethoprim-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* dihydrofolate reductase.《Journal of Structural Biology》.2009,第93-97页.

Kathleen M. Frey,等.Prospective Screening of Novel Antibacterial Inhibitors of Dihydrofolate Reductase for Mutational Resistance.《Antimicrobial Agents and Chemotherapy》.2012,第3556-3562页.

Janet L. Paulsen,等.Structural analysis of the active sites of dihydrofolate reductase from two species of *Candida* uncovers ligand-induced conformational changes shared among species.《Bioorg Med Chem Lett.》.2013,第1279-1284页.

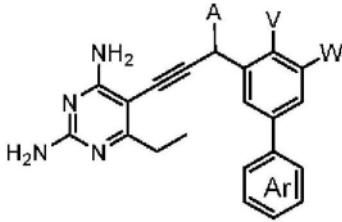
Narendran G-Dayananadan,等.Propargyl-Linked Antifolates are Dual Inhibitors of *Candida albicans* and *Candida glabrata*.《J. Med. Chem.》.2014,第2643-2656页.

Stephanie M. Reeve,等.MRSA Isolates from United States Hospitals Carry *dfrG* and *dfrK* Resistance Genes and Succumb to Propargyl-Linked Antifolates.《Cell Chemical Biology》.2016,第1458-1467页.

David B. Bolstad,等.Structure-Based Approach to the Development of Potent and Selective Inhibitors of Dihydrofolate Reductase from *Cryptosporidium*.《J. Med. Chem.》.2008,第6839-6852页.

Jieying Liu,等.Towards New Antifolates Targeting Eukaryotic Opportunistic Infections.《EUKARYOTIC CELL》.2009,第483-486页.

1. 下式的化合物



或其可药用盐,其中:

所述化合物选自表13中列出的化合物:

化合物	A	V	W	Ar
13	H	OCH ₃	H	<i>o</i> -COOH 苯基
14	H	OCH ₃	H	<i>m</i> -COOH 苯基
15	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH 苯基
16	H	H	OCH ₃	<i>p</i> -COOH 苯基
29	S-CH ₃	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH 苯基
30	R-CH ₃	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH 苯基
31	R-CH ₃	H	OCH ₃	<i>p</i> -COOH 苯基
32	S-CH ₃	H	OCH ₃	<i>p</i> -COOH 苯基
33	S-CH ₃	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOCH ₃ 苯基
34	R-CH ₃	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOCH ₃ 苯基

2. 药物组合物,其包含权利要求1所述的化合物或其可药用盐,以及可药用载体。

3. 权利要求1所述的化合物或其可药用盐或者权利要求2所述的药物组合物在制备用于在体外或体内抑制二氢叶酸还原酶DHFR的药物中的用途,所述抑制包括使所述DHFR与权利要求1所述的化合物或其可药用盐或者权利要求2所述的药物组合物接触。

4. 权利要求2所述的药物组合物在制备用于在需要DHFR抑制的患者中抑制二氢叶酸还

原酶的药物中的用途,所述抑制包括向所述患者施用治疗有效量的权利要求2所述的药物组合物。

5. 权利要求4所述的用途,其中所述二氢叶酸还原酶是细菌二氢叶酸还原酶,并且所述患者是人患者。

6. 权利要求1所述的化合物或其可药用盐在制备用于在患者中治疗细菌感染、真菌感染或原生动感染药物中的用途,所述治疗包括向所述患者施用治疗有效量的权利要求1所述的化合物或其可药用盐。

7. 权利要求6所述的用途,所述治疗还包括向所述患者施用不是式I化合物或其盐的活性剂。

8. 权利要求6或7所述的用途,其中所述细菌感染是革兰氏阴性细菌感染。

9. 权利要求6或7所述的用途,其中所述细菌感染是金黄色葡萄球菌(S.aureu)感染。

可用于治疗细菌感染的两性离子性炔丙基连接的抗叶酸剂

技术领域

[0001] 必需代谢酶二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 已经是用于肿瘤学和传染性疾病预防的成功并广泛靶向的蛋白质, 其中递送有效药物如氨甲蝶呤 (MTX)、甲氧苄啶 (trimethoprim, TMP) 和培美曲塞 (PMX)。其天然底物叶酸或二氢叶酸具有弱碱性蝶呤环和带负电荷的谷氨酸延伸, 这对酶的结合至关重要。不同物种DHFR的多种晶体结构显示经典抗叶酸剂如氨甲蝶呤 (图1) 和培美曲塞模拟了底物的这些基序, 其碱性含氮环与活性位点中的酸性残基形成强烈接触, 并且谷氨酸部分与碱性氨基酸 (金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) DHFR中的Arg57) 形成广泛的离子相互作用。作为底物模拟物, 经典抗叶酸剂通常对DHFR具有非常高的亲和力。例如, 氨甲蝶呤抑制人、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) DHFR, K_i 值分别为3.4pM、1pM和1nM。

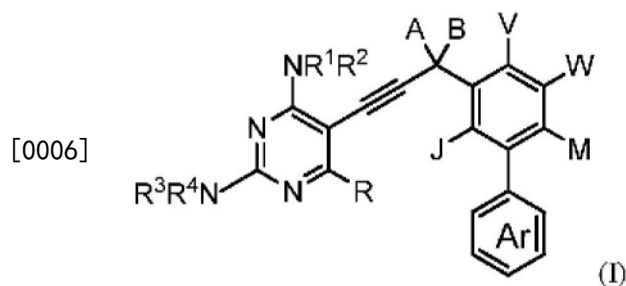
[0002] 然而, 由于这些经典抗叶酸剂在生理pH下是高度带负电荷的, 其看起来不能被动扩散并且需要主动运输通过人细胞膜以获得生理浓度。此外, 它们随后在细胞中被聚谷氨酰胺化 (polyglutamylated) 以获得最佳的细胞保留和酶亲和力。目前, 所有批准的抗癌DHFR抑制剂被归类为经典抗叶酸剂。相比之下, 由于细菌依赖于叶酸辅因子的从头合成, 它们不具有叶酸转运蛋白。因此, 经典抗叶酸剂仅能够依赖于被动扩散通过膜以实现抗菌作用, 因此非常有效的酶抑制剂MTX针对野生型革兰氏阴性大肠杆菌的MIC值大于1mM。即使当外排泵遗传缺失时, MIC值也为64-256 μ M, 证明该化合物除了作为外排底物外还具有有限的渗透性。类似地, 针对革兰氏阳性甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA), 氨甲蝶呤具有20 μ g/mL的MIC₅₀或100 μ g/mL的MIC₉₀。相比之下, 具有较弱DHFR抑制性的弱碱性非经典抗叶酸剂甲氧苄啶 (图1) (IC₅₀值为23nM和20nM) 实际上是针对MRSA和大肠杆菌两者的有效抗菌剂 (MIC值为0.3125 μ g/mL), 并且与磺胺甲基异噁唑是针对革兰氏阴性和革兰氏阳性感染两者的一线药剂。

[0003] 已经认识到, 具有单一酸性官能团的两性离子化合物 (如靶向细菌旋转酶 (gyrase) 的氟喹诺酮 (图1) 或靶向微生物核糖体的四环素) 显示出针对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌两者的效用。这些化合物的活性可能与其较低的clogD_{7.4}值 (氧氟沙星为-1.35) 和在中性条件下对提高极性的较大贡献有关。

[0004] 炔丙基连接的抗叶酸剂 (propargyl-linked antifolate, PLA) 充当了用于革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌两者的DHFR抑制剂。发明人和其他人先前报道了针对MRSA和酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 具有非常有效的MIC值 (Frey, K.M., 等, *Am.Soc.Microbiol.* (2012) 56 (7) :3556-3562, Keshipeddy, S., 等, *Synfacts* (2015) 11 (10) : 1026; Viswanathan, K., 等, *PloS One* (2012) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029434>) 并且对肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 良好抑制 (Lamb, K.M., 等, *Am.Soc.Microbiol.* (2014) 58 (12) 7484-7491) 的PLA。需要针对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌具有高效力的DHFR抑制剂。本公开内容如下面讨论的提供了这样的抑制剂和额外的优点。

发明内容

[0005] 本公开内容提供了式I的化合物及其可药用盐。



[0007] 在式I中,变量如R、R¹至R⁴、A、B、J、M、V、W和Ar具有以下定义。

[0008] R是H、羟基、C₁-C₆烷基或C₁-C₆烷氧基。

[0009] R¹、R²、R³和R⁴独立地选自H、C₁-C₆烷基和环烷基。

[0010] A和B独立地选自H、羟基、C₁-C₆烷基和C₁-C₆烷氧基。

[0011] V和W中的一个为甲氧基,并且另一个选自H、C₁-C₆烷基和C₁-C₆烷氧基。

[0012] J和M独立地选自H、卤素、羟基、硝基、氰基、-COOH、-CHO、-CONH₂、环烷基或C₁-C₆烷基,其中任意亚甲基(-CH₂)任选地被O、NH、N(C₁-C₆烷基)、S、SO₂、C(O)O、OC(O)或C(O)替换,并且其任选地被羟基、氨基或卤素取代。

[0013] W和M可以连接以形成5或6元碳环或含有1、2或3个独立地选自N、O和S的杂原子的5或6元杂环。

[0014] Ar环是被至少一个-COOH或-OCOOH基团取代的苯基、吡啶基或嘧啶基环,并且任选地被一个或多个独立地选自卤素、羟基、氨基、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₂卤代烷基和C₁-C₂卤代烷氧基的取代基取代。

[0015] 本公开内容提供了包含式I化合物或其盐以及可药用载体的药物组合物。

[0016] 本公开内容提供了在体外或体内抑制二氢叶酸还原酶(DHFR)的方法,其包括使DHFR与式I化合物或其盐接触。

[0017] 本公开内容还提供了在患者中治疗细菌感染、真菌感染或原生动感染(protozoal infection)的方法,其包括向患者施用治疗有效量的式I化合物或其盐。

[0018] 本公开内容提供了组合制剂和治疗方法,其中式I化合物或其盐是第一活性剂,其与不是式I化合物或盐的第二活性剂组合或一起施用。

[0019] 附图简述

[0020] 图1.具有相关生理学特性的有效针对革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌的抗菌剂。将先前的PLA UCP1021与COOH-PLA进行比较。

[0021] 图2A-图2D.用NADPH和化合物15或化合物16结晶的金黄色葡萄球菌DHFR的图。图2A,与化合物15结合的金黄色葡萄球菌DHFR;图2B,与化合物16结合的金黄色葡萄球菌DHFR;2C,与化合物15结合的复合物金黄色葡萄球菌DHFR的溶剂暴露表面;图2D,与化合物16结合的复合物金黄色葡萄球菌DHFR的溶剂暴露表面。

[0022] 详述

[0023] 术语

[0024] 使用标准命名法描述化合物。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。除非上下文明确禁

止,否则每个化合物名称包括化合物的游离酸或游离碱形式以及化合物的所有可药用盐、溶剂合物和水合物。

[0025] 术语“式I”涵盖满足式I的所有化合物,包括这样的化合物的任何对映异构体、外消旋体和立体异构体,以及所有可药用盐、溶剂合物和水合物。“式I”包括式I的所有子类群,除非使用该短语的上下文明确禁止。

[0026] 未用数量词限定的名词不表示数量的限制,而是表示存在至少一个所引用的项目。术语“或”表示“和/或”。开放式过渡短语“包含”涵盖中间过渡短语“基本上由……组成”和封闭式短语“由……组成”。记载了这三种过度短语中的一种或者使用了替代的过渡短语如“包括”或“含有”的权利要求可以用任何其他过渡短语书写,除非上下文或本领域明确排除。除非本文另有说明,否则对数值范围的描述仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独的值并入本说明书中,如同其在本文中单独记载一样。所有范围的端点都包括在该范围内并且可独立组合。除非本文另有说明或上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法均可以合适的顺序进行。除非另外声明,否则任何和所有实例或示例性语言(如,“例如”)的使用仅旨在用于说明而不构成对本公开内容范围的限制。说明书中的任何语言都不应被解释为表示任何未要求保护的要素对于本文所用的本发明的实践是必不可少的。除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0027] 式I化合物包括在任何位置具有同位素取代的所有式I化合物。同位素包括具有相同原子序数但不同质量数的原子。作为一般实例,但不限于,氢的同位素包括氘和氚,碳的同位素包括¹¹C、¹³C和¹⁴C。在一些实施方案中,任何一个或更多个氢原子被氘原子替换。

[0028] “活性剂”是指化合物(包括本文公开的化合物)、元素或混合物,当单独地或与另一种化合物、元素或混合物组合向患者施用,其直接或间接赋予对象生理效应。间接生理效应可通过代谢物或其他间接机制发生。“活性剂”还可以增强其他活性剂或使其他活性剂更具活性。例如,式I化合物可以直接作用以杀死细菌或抑制细菌生长,或者当与另外的抗菌化合物组合施用时可以增强其他抗菌化合物的活性,例如通过降低其他抗菌化合物的MIC。

[0029] 不在两个字母或符号之间的连接号(“-”)用于表示取代基的连接点。例如,-C(O)NH₂通过酮C(O)基团的碳连接。

[0030] “烷基”是具有指定数目的碳原子,通常为1至约8个碳原子的支链或直链饱和脂族烃基。本文所用的术语C₁-C₆-烷基表示具有1、2、3、4、5或6个碳原子的烷基。其他实施方案包括具有1至6个碳原子、1至4个碳原子或者1或2个碳原子的烷基,例如C₁-C₈-烷基、C₁-C₄-烷基和C₁-C₂-烷基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、3-甲基丁基、叔丁基、正戊基和仲戊基。

[0031] “环烷基”是具有指定数目的碳原子的饱和烃环基团。单环环烷基通常具有3至约8个碳环原子或3至6个(3、4、5或6个)碳环原子。环烷基取代基可以连接在经取代的氮、氧或碳原子上,或者可以具有两个取代基的经取代的碳原子可以具有作为螺基连接的环烷基。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0032] “卤代”或“卤素”表示氟、氯、溴和碘中的任意一种。

[0033] “卤代烷基”表示被1个或更多个卤素原子至最大可允许数目的卤素原子取代的具

有指定碳原子数的支链和直链烷基。卤代烷基的实例包括但不限于三氟甲基、二氟甲基、2-氟乙基、2,2,2-三氟乙基和五氟乙基。

[0034] “卤代烷氧基”表示通过氧桥(醇基的氧)连接的如本文所定义的卤代烷基。

[0035] 如本文所用,术语“经取代”是指指定原子或基团上的任意一个或多个氢被来自指定基团的选择替换,条件是不超过指定原子的正常化合价。当取代基是氧代(即=O)时,原子上的2个氢被替换。当氧代取代杂芳族部分时,所得分子有时可以采用互变异构形式。例如,在2位或4位被氧代取代的吡啶基有时可以写成吡啶或羟基吡啶。只有当组合产生稳定的化合物或有用的合成中间体时,取代基和/或变量的组合才是允许的。稳定的化合物或稳定的结构意味着化合物足够稳定以经受从反应混合物中分离并随后配制成有效治疗剂。除非另有说明,否则取代基命名到核心结构中。例如,应理解,氨基烷基表示该取代基与核心结构的连接点在烷基部分中,烷基氨基表示连接点是与氨基的氮的键。

[0036] “剂型”是指活性剂的施用单位。剂型的实例包括片剂、胶囊剂、注射剂、混悬剂、液体、乳剂、乳膏、软膏、栓剂、可吸入形式、经皮形式等。

[0037] “药物组合物”是包含以下的组合物:至少一种活性剂,例如式(I)的化合物或盐、溶剂合物或水合物或其前药,以及至少一种其他物质,例如载体。药物组合物任选地含有一种或更多种另外的活性剂。当指定时,药物组合物符合美国FDA用于人或非人药物的GMP(良好生产规范,good manufacturing practice)标准。“药物组合”是至少两种活性剂的组合,其可以在单一剂型中组合,或者在独立的剂型中与说明书一起提供,活性剂共同用于治疗疾病如革兰氏阴性细菌感染。

[0038] “可药用盐”包括所公开化合物的衍生物,其中通过制备其无机和有机、无毒、酸或碱加成盐对母体化合物进行修饰。本发明化合物的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常,这些盐可以通过使这些化合物的游离酸形式与化学计算量的适当碱(例如Na、Ca、Mg或K氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等)反应,或通过使这些化合物的游离碱形式与化学计算量的适当酸反应来形成。此类反应通常在水或有机溶剂中或在两者的混合物中进行。本发明化合物的盐还包括化合物的溶剂合物和化合物盐的溶剂合物。

[0039] 可药用盐的实例包括但不限于碱性残基如胺或含氮杂芳基环(例如吡啶、喹啉、异喹啉)的无机或有机酸盐;酸性残基如羧酸的碱性或有机盐;等。可药用盐包括母体化合物的无毒盐或季铵盐,其例如由无毒的无机或有机酸形成。例如,常规的无毒酸盐包括衍生自无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等的那些;以及由有机酸制备的盐,有机酸例如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、甲磺酸(mesylic acid)、乙磺酸(esylic acid)、苯磺酸(besylic acid)、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟乙磺酸、 $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}_2\text{H}$,其中n为0至4,等。其他合适的盐的列表可以在例如以下中找到:G.Steffen Paulekuhn等,Journal of Medicinal Chemistry 2007, 50,6665以及Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection and Use, P.Heinrich Stahl和Camille G.Wermuth编辑,Wiley-VCH,2002。

[0040] 应用于本公开内容的药物组合物/组合的术语“载体”是指与活性化合物一起提供的稀释剂、赋形剂或载剂。

[0041] “患者”是需要医学治疗的人或非人动物。在一些实施方案中，患者是人患者。

[0042] “提供”意指给予、施用、销售、分配、转移(盈利或不盈利)、制造、配制或分发。

[0043] 如本文所用的“治疗”包括提供作为唯一的活性剂或与至少一种另外的活性剂一起的本公开内容的化合物，例如式I的化合物，其足以：(a) 抑制疾病，即阻止其发展；(b) 减轻疾病，即引起疾病消退，并且在细菌感染的情况下，消除或减少对象中感染的毒力。“治疗”还意指向患有或易感于细菌感染的对象提供作为唯一的活性剂或与至少一种另外的活性剂一起的本公开内容的化合物。“预防性治疗”包括在可能易感于疾病但尚未患疾病的对象中提供足以显著降低疾病可能性的量的本公开内容的化合物。

[0044] 药物组合物/组合的“治疗有效量”是当施用于对象时有效提供治疗益处的量，例如降低与细菌感染相关的发病率和死亡率和/或实现治愈。在某些情况下，患有微生物感染的对象可能未出现被感染的症状。因此，治疗有效量的化合物也是足以显著降低对象血液、血清、其他体液或组织中微生物的可检测水平的量。在某些实施方案中，本公开内容还包括在预防性治疗和治疗性治疗中使用本公开内容的化合物。在预防或预防性治疗的背景下，“治疗有效量”是足以显著降低与细菌感染相关的发生率或发病率和死亡率的量。例如，当已知对象具有提高的细菌感染风险时，例如囊性纤维化或呼吸机患者，可以施用预防性治疗。显著降低是在统计显著性的标准参数测试中统计学显著(例如Student's T检验，其中 $p < 0.05$)的任何可检测的负变化。

[0045] 化合物描述

[0046] 本公开内容提供了作为用于革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌两者的DHFR抑制剂的—类炔丙基连接的抗叶酸剂(PLA)。PLA的特征在于弱碱性非经典抗叶酸剂，其被动扩散通过膜并有效抑制DHFR酶，通常以亚微摩尔MIC值抑制细菌细胞的生长。本发明人和其他人先前已经获得了针对MRSA和酿脓链球菌的非常有效的MIC值以及对肺炎克雷伯菌的良好抑制。本公开内容提供了我们设计的两性离子PLA和对映体纯的化合物，其具有通常由带负电荷的谷氨酸尾部形成的接触，同时保持或提高细菌细胞的渗透性。酶抑制的评估以及用金黄色葡萄球菌DHFR酶的高分辨率晶体结构揭示羧酸部分与活性位点中的精氨酸残基形成关键相互作用。这种新的高亲和力接触的引入还可以提供补偿相互作用以抵消已知的赋予抗性的突变的影响。本公开内容的某些化合物有效抑制MRSA。例如，本公开内容的某些化合物对这些MRSA表现出约1ng/mL的MIC值。本公开内容的某些化合物还抑制大肠杆菌，MIC值为10 μ g/mL或更低。本公开内容的某些化合物还具有优异的药物样性质。这些性质可包括，例如，不抑制人细胞系的生长，不抑制关键的CYP酶如CYP3A4和CYP2D6，并且在微粒体(microsomal)稳定性测定中具有长的半衰期。

[0047] 在中性pH下，本公开内容的两性离子PLA分成两种主要物质：两者在羧酸根基团上去质子化。嘧啶环在35%的物质中质子化，形成两性离子抑制剂；其余部分具有中性嘧啶环，产生带负电荷的分子。在某些实施方案中，羧酸分别与活性位点中的保守酸性残基(金黄色葡萄球菌DHFR[SaDHFR]中的Asp 27)和精氨酸(SaDHFR中的Arg 57)形成氢键。本公开内容提供了COOH-PLA，其具有在炔丙基位置未取代或甲基取代的C₆-乙基二氨基嘧啶环，和具有2'或3'-甲氧基取代基的联苯系统。将用炔丙基取代合成的任何抑制剂制备为对映体纯的实体。

[0048] 布置羧酸基团的结构-活性分析表明，虽然布置在邻位和间位对人酶产生最大选

择性,但布置在对位产生对致病酶的最高亲和力。在SaDHFR中,将COOH从对位移动到间位或邻位分别导致活性损失5倍和12倍。当羧酸从对位移动到间位时,针对EcDHFR的活性降低6倍,但当移动到邻位时仅降低2.2倍。

[0049] 在野生型和孔蛋白敲除菌株($\Delta ompF$ 和 $\Delta ompC$)之间维持了MIC值,表明化合物被动扩散到细胞中。在革兰氏阳性细菌中的优异活性表明,可以在分子中引入带负电荷的官能团以产生与酶的关键接触,而不会像氨甲蝶呤一样降低细胞渗透。或者,在革兰氏阴性细菌中,高度阴性的脂多糖屏障可以通过静电排斥减轻带负电荷的PLA群体的渗透。

[0050] 本公开内容的某些PLA对结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) DHFR具有活性。目前,DHFR尚未被用于TB治疗。临床上批准的抗叶酸剂氨甲蝶呤、乙胺嘧啶和三甲曲沙是MtbDHFR酶的有效抑制剂,但不能抑制Mtb的生长,最可能是因为不能渗透富含脂质的细胞壁。本公开内容的某些PLA抑制MtbDHFR酶活性并且还抑制活Mtb的生长。多种化合物以小于 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的MIC值有效抑制Mtb的生长。本公开内容的某些化合物是MDR-和XDR-TB菌株生长的非常有效的抑制剂,并且不因其他已知机制产生交叉抗性。

[0051] 本公开内容的某些PLA针对具有甲氧苄啶-磺胺甲基异噁唑抗性的金黄色葡萄球菌(MRSA)感染,尤其是与社区获得性MRSA相关的感染具有活性。

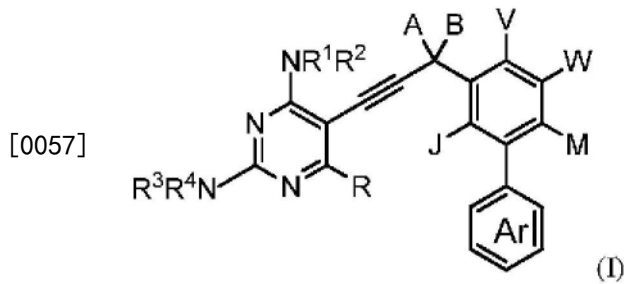
[0052] 甲氧苄啶抑制二氢叶酸还原酶,而磺胺甲基异噁唑抑制二氢蝶酸合成酶。这两种必需酶都参与叶酸生物合成途径,所述途径对于在代谢中产生单碳供体是重要的。虽然这种组合取得了广泛的成功,但抗性菌株已经变得普遍。dfrB染色体基因的突变是甲氧苄啶抗性的主要模式。另外的抗性机制包括获得由基因dfrA(也称为S1 DHFR、dfrG和dfrK)编码的质粒编码的甲氧苄啶抗性DHFR。dfrB中的点突变赋予抗性,MIC值 $\leq 256\mu\text{g}/\text{mL}$;获得S1 DHFR赋予更高水平的抗性,MIC值 $\geq 512\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0053] 对多种抗性临床分离株的分析显示突变F98Y非常普遍,尤其是与第二突变H149R或H30N组合。用Sa(F98Y)酶将TMP的 IC_{50} 值提高了约400倍,并且报道了SaDHFR酶的晶体结构,其中F98Y突变与辅因子NADPH和底物二氢叶酸结合。相对于TMP敏感的表皮葡萄球菌(*S. epidermis*),S1 DHFR蛋白天然地包含在98位的酪氨酸以及另外两个关键突变:G43A和V31I。已显示G43A和F98Y的引入赋予了TMP抗性。总之,抗性菌株的研究证实,除了野生型酶之外,靶向金黄色葡萄球菌DHFR的新一代抗叶酸剂必须抑制酶的突变形式,包括染色体突变体和质粒编码的抗性形式。

[0054] 对金黄色葡萄球菌的PLA抗性单步和双步突变体的完整表征,并显示获得了关键临床突变:F98Y、H30N、H149R、F98Y/H30N和F98Y/H149R,即便在较低的突变频率下,其也赋予了对TMP的抵抗力。本文公开的某些PLA化合物非常有效地抑制单突变酶和双突变酶以及野生型和突变型金黄色葡萄球菌菌株。

[0055] 总之,这一系列新化合物证明了如何可以将使用羧酸盐部分来模拟经典抗叶酸剂中常见的关键相互作用之一引入到炔丙基连接的抗叶酸剂结构中,而不会降低接近靶酶DHFR的能力。八种抑制剂的制备和评价表明,与早期的PLA相比,这些化合物具有高酶亲和力和增强的针对MRSA和大肠杆菌的抗菌活性。利用金黄色葡萄球菌DHFR的两种化合物的高分辨率晶体结构显示,通过羧酸盐与活性位点中Arg 57之间的水介导的接触增强了亲和力。另外的特性分析(profiling)支持这些化合物作为抗菌候选物的开发。

[0056] 本公开内容提供了式I的化合物及其可药用盐。



[0058] 式I中的变量(例如r、R¹至R⁴、A、B、W、M和J)可以具有概述部分中所示的定义。另外,这些变量可具有下面列出的任何定义。

[0059] 本公开内容包括本说明书中所述的变量定义的所有组合,只要形成稳定的化合物即可。本发明包括以下实施方案,其中:

[0060] (1) R是甲基或乙基;A是氢;B是氢或C₁-C₆烷基;V和W中的一个为甲氧基,并且另一个是H。

[0061] (2) R₁、R₂、R₃和R₄是H。

[0062] (3) J和M独立地选自H、卤素、羟基、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₂卤代烷基和C₁-C₂卤代烷氧基。

[0063] (4) A是H,并且B是甲基。

[0064] (5) J和M均是H。

[0065] (6) Ar环在对位被一个-COOH取代基取代,并且任选地被一个或多个独立地选自卤素、羟基、氨基、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₂卤代烷基和C₁-C₂卤代烷氧基的取代基取代。

[0066] (7) Ar环在间位被一个-COOH取代基取代,并且任选地被一个或多个独立地选自卤素、羟基、氨基、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₂卤代烷基和C₁-C₂卤代烷氧基的取代基取代。

[0067] (8) Ar环在邻位被一个-COOH取代基取代,并且任选地被一个或多个独立地选自卤素、羟基、氨基、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₂卤代烷基和C₁-C₂卤代烷氧基的取代基取代。

[0068] (9) Ar环是经取代的苯环。它可以具有在Ar环的其他实施方案中列出的任何取代基。

[0069] (10) R是甲基或乙基;A是氢;B是氢或C₁-C₆烷基;并且W和M连接以形成含有2个氧原子的5元杂环。

[0070] (11) 本发明包括下列式I化合物及其可药用盐:

[0071] (12) 本公开内容包括式I-A化合物或其可药用盐,其中所述化合物选自表1中列出的化合物。

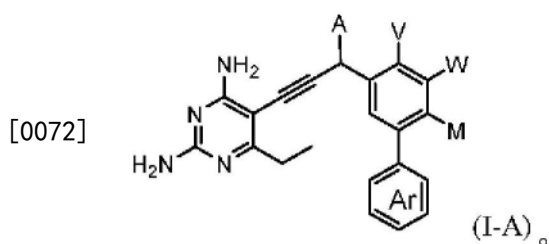
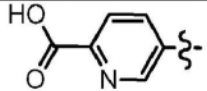
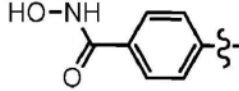
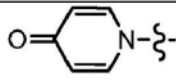
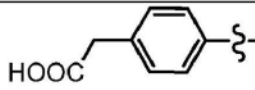


表 1

化合物	A	V	W	M	Ar
13	H	OCH ₃	H	H	<i>o</i> -COOH 苯基
14	H	OCH ₃	H	H	<i>m</i> -COOH 苯基
15	H	OCH ₃	H	H	<i>p</i> -COOH 苯基
16	H	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH 苯基
29	S-CH ₃	OCH ₃	H	H	<i>p</i> -COOH 苯基
30	R-CH ₃	OCH ₃	H	H	<i>p</i> -COOH 苯基
31	R-CH ₃	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH 苯基
32	S-CH ₃	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH 苯基

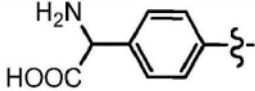
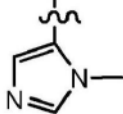
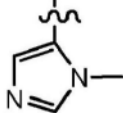
[0073]

表 1

化合物	A	V	W	M	Ar
33	S-CH ₃	OCH ₃	H	H	<i>p</i> -COOCH ₃ 苯基
34	R-CH ₃	OCH ₃	H	H	<i>p</i> -COOCH ₃ 苯基
35	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		<i>p</i> -O-C(O)-OH苯基
36	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		<i>p</i> -OH苯基
37	H	H	-O-CH ₂ -O-		<i>p</i> -OH苯基
38	H	H	-O-CH ₂ -O-		3-F,4-OH-苯基
39	H	H	-O-CH ₂ -O-		3,5-二-F,4-OH-苯基
40	H	H	-O-CH ₂ -O-		3,5-二-F,4-OCH ₃ -苯基
41	S-CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		<i>p</i> -COOH-苯基
42	R-CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		<i>p</i> -COOH-苯基
43	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		2,3,5-三-F,4-OH-苯基
44	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		2,3,5,6-四-F, 4-OH-苯基
45	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		3-CN, 4-OH-苯基
46	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		4-CH ₃ SO ₂ HN-苯基
47	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		4-CH ₃ HNSO ₂ -苯基
48	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		
49	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		
50	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		3,4,-二-OH-苯基
51	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		
52	H	H	OMe	H	

[0074]

表 1

化合物	A	V	W	M	Ar
53	H	H	OMe	H	
54	CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		
55	R-CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-		吡啶-4-基
56	H	OCH ₃	H	H	
57	R-CH ₃	OCH ₃	H	H	吡啶-4-基
58	R-CH ₃	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH 苯基
59	H	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH 苯基
60	H	H	OCH ₃	OCH ₃	4-吡啶基

[0075]

[0076] 药物组合物

[0077] 本公开内容包括含有作为活性剂的至少一种式I化合物以及可药用载体的药物组合物。

[0078] 本公开内容的药物组合物包括眼、口、鼻、透皮、封闭或不封闭的表面、静脉内(推注和输注两者)、可吸入、和注射(腹膜内、皮下、肌内或肠胃外)制剂。组合物可以是剂量单位,例如片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、脂质体、无菌眼用溶液剂、肠胃外溶液剂或混悬剂、计量气雾剂或液体喷雾剂、滴剂、安瓿剂、自动注射器装置或栓剂;用于眼部、经口、鼻内、舌下、肠胃外或直肠施用,或通过吸入或吹入施用。

[0079] 含有本发明组合物的剂型含有有效量的通过所选择的施用途径提供治疗效果所必需的活性剂。组合物可含有约5,000mg至约0.5mg(优选约1,000mg至约0.5mg)本公开内容的化合物或其盐形式,并且可以构成适合于所选择的施用方式的任何形式。剂型可以配制用于立即释放或控制释放,包括延迟释放或持续释放。药物组合物可包含式I化合物作为唯一活性剂或可与一种或更多种另外的活性剂组合。在某些实施方案中,药物组合物包含式I化合物和至少一种直接作用抗生素(在体内有效杀死致病细菌的化合物)。

[0080] 治疗方法

[0081] 本公开内容包括通过向具有细菌感染风险或患有细菌感染的对象施用有效量的一种或更多种本公开内容化合物来治疗对象中的细菌感染的方法。本公开内容包括其中式I化合物用于治疗细菌感染的治疗方法,以及其中化合物用于使细菌对抗菌剂敏感的方法。在该实施方案中,将式I化合物与治疗有效量的抗菌剂同时或依次向患有细菌感染的患者

施用。式I化合物通常通过降低其他抗菌剂的MIC来提高其功效。

[0082] 特别考虑了对人患者的治疗。然而,非人对象的治疗也在本公开内容的范围内。本公开内容包括治疗或预防鱼类、两栖动物、爬行动物或鸟类中的微生物感染,但本公开内容的优选实施方案包括治疗哺乳动物。

[0083] 在一些实施方案中,细菌感染或抗生素耐受性或抗生素抗性感染由革兰氏阳性细菌引起。

[0084] 在其他实施方案中,细菌感染或抗生素耐受性或抗生素抗性感染由革兰氏阴性细菌引起。

[0085] 在一些实施方案中,细菌感染是结核分枝杆菌(Mtb)。在一些实施方案中,结核分枝杆菌感染是多重药物抗性的菌株,例如对阿米卡星、卡那霉素和/或卷曲霉素具有抗性的菌株。本文公开的某些化合物以小于1 μ g/mL的MIC值抑制Mtb。

[0086] 在本公开内容的任何方法的一个实施方案中,微生物感染是致病性细菌感染的结果。致病菌的实例包括但不限于以下属中的细菌:气杆菌属(Aerobacter)、气单胞菌属(Aeromonas)、不动杆菌属(Acinetobacter)、土壤杆菌属(Agrobacterium)、芽孢杆菌属(Bacillus)、拟杆菌属(Bacteroides)、巴尔通氏体属(Bartonella)、博德特菌属(Bordetella)、布鲁氏菌属(Brucella)、伯克霍尔德菌属(Burkholderia)、鞘杆菌属(Calymmatobacterium)、弯曲菌属(Campylobacter)、柠檬酸杆菌属(Citrobacter)、梭菌属(Clostridium)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、肠杆菌属(Enterobacter)、肠球菌属(Enterococcus)、埃希氏杆菌属(Escherichia)、弗朗西斯氏菌属(Francisella)、嗜血杆菌属(Haemophilus)、哈夫尼菌属(Hafnia)、螺杆菌属(Helicobacter)、克雷伯菌属(Klebsiella)、军团菌属(Legionella)、李斯特菌属(Listeria)、摩根氏菌属(Morganella)、摩拉克氏菌属(Moraxella)、变形杆菌属(Proteus)、普罗威登斯菌属(Providencia)、假单胞菌属(Pseudomonas)、沙门氏菌属(Salmonella)、沙雷氏菌属(Serratia)、志贺氏菌属(Shigella)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、密螺旋体属(Treponema)、黄杆菌属(Xanthomonas)、弧菌属(Vibrio)和耶尔森氏菌属(Yersinia)。这样的细菌的具体实例包括哈氏弧菌(Vibrio harveyi)、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)、副溶血性弧菌(Vibrio parahaemolyticus)、溶藻弧菌(Vibrio alginolyticus)、发光假单胞菌(Pseudomonas phosphoreum)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(Yersinia enterocolitica)、大肠杆菌(Escherichia coli)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)、幽门螺旋杆菌(Helicobacter pylori)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、布氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitidis)、淋病奈瑟氏球菌(Neisseria gonorrhoeae)、鼠疫耶尔森氏菌(Yersinia pestis)、空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、粪肠球菌(Enterococcus faecalis)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)、肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumoniae)、洋葱伯克霍尔德菌(Burkholderia cepacia)、鲍氏不动杆菌(Acinetobacter baumannii)、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)和金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)。

[0087] 在一些实施方案中,感染是酵母感染,例如白色念珠菌。

[0088] 在一些实施方案中,感染是多微生物感染,例如包含多于一种生物体的感染。在一些实施方案中,感染包含至少一种上文列出的生物体,例如以下一种或更多种:假单胞菌,例如铜绿假单胞菌,克雷伯菌,例如肺炎克雷伯菌,和/或不动杆菌,例如鲍氏不动杆菌。

[0089] 在一些实施方案中,所述方法还包括与本公开内容化合物组合施用另外的活性剂,例如选自但不限于以下的抗生素: β -内酰胺类,如青霉素类、头孢菌素类、碳头孢烯类、头孢霉素类、碳青霉烯类、单环内酰胺类、喹诺酮类,包括氟喹诺酮类和类似的DNA合成抑制剂,四环素类、氨基糖苷类、大环内酯类、糖肽类、氯霉素类、甘氨酸环素类、林可酰胺类、脂肽类、脂缩肽类,如达托霉素,噁唑烷酮类。

[0090] 在一些实施方案中,细菌感染是上呼吸道感染和下呼吸道感染、肺炎、菌血症、全身性感染、脓毒症和脓毒症性休克、尿路感染、胃肠感染、心内膜炎、骨感染、中枢神经系统感染如脑膜炎,或者皮肤和软组织感染。

[0091] 在一些实施方案中,对象是哺乳动物,例如人或非人哺乳动物。在一些实施方案中,方法包括处理一种或更多种细胞,例如培养皿中的细胞。

[0092] 在一个方面,本公开内容的特征在于治疗对象中的革兰氏阴性感染的方法,该方法包括向需要这种治疗的对象施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0093] 在一些实施方案中,革兰氏阴性感染由铜绿假单胞菌引起。

[0094] 在另一些实施方案中,本公开内容包括治疗由革兰氏阳性细菌如表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌引起的感染。

[0095] 在一些实施方案中,对象是患有烧伤或皮肤伤口的创伤患者或烧伤患者。

[0096] 在另一方面,本公开内容的特征在于降低对象中细菌耐受性的方法,该方法包括向所述对象施用治疗有效量的本文所述化合物。

[0097] 在一些实施方案中,该方法还包括鉴定患有对抗微生物治疗具有抗性的细菌感染的所述对象。

[0098] 本公开内容包括治疗方法,其中本公开内容的化合物或组合物经口、表面、静脉内或肠胃外施用,或吸入。

[0099] 本公开内容的化合物可以每天施用约1至约5次。可以采用每日施用或周期后给药(post-periodic dosing)。剂量频率也可以根据使用的化合物、所治疗的特定疾病和引起疾病的细菌而变化。然而,应理解,任何特定对象的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所用特定化合物的活性、年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄率、药物组合和进行治疗的特定疾病的严重程度。

[0100] PLA DHFR抑制剂的抗结核病作用

[0101] 发明人已经建立了DHFR抑制作为细胞生长抑制的机制。还在两种不同启动子控制下过表达DHFR的两种耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)菌株中测试了本公开内容的某些化合物的抗菌活性。除UCP 1066外的所有化合物在两种菌株中具有至少32 μ g/mL的显著提高的MIC值,表明抗菌活性可能是由于DHFR抑制。该化合物在过表达菌株中的MIC值为4 μ g/mL,这与其针对Erdmann菌株的值相同。

[0102] 发明人使用标准方法表达和纯化了结核分枝杆菌DHFR(MtbDHFR)蛋白并测量了酶抑制(参见表6,实施例10),其通过色谱法在340nm下经辅因子NADPH的氧化后进行。实验一

式三份进行,并在两个不同的日期进行验证。测定中测试的许多抑制剂对MtbDHFR酶具有中等效力,IC₅₀值在70至600nM范围内。IC₅₀值的范围比MIC值的范围相对更窄,再次表明针对酶的活性仅是驱动抗菌效力的因素之一。表6显示大多数化合物对于人酶具有非常类似的IC₅₀值。为了研究潜在的人细胞毒性,已经在人皮肤成纤维细胞HepG2和MCF-10细胞中评估了这些有效化合物的细胞毒性作用。在所有情况下,化合物浓度小于500μM时细胞的生长不受抑制。

[0103] 还评估了本公开内容的PLA:五种多重药物抗性TB菌株Mtb 365、Mtb 276、Mtb 352、Mtb 56和Mtb C-31以及一种广泛耐药(XDR)菌株Mtb 5。参见表7,实施例10。总之,每种菌株对INH具有抗性,MIC值为0.25至4μg/mL。其中三种菌株Mtb 5、Mtb 365和Mtb 56对利福平也具有高度抗性,MIC值分别为8、64和32μg/mL。所述菌株还对多种其他药剂包括乙胺丁醇、链霉素和莫西沙星具有抗性。PLA对大部分MDR菌株具有活性,尽管水平略有下降。该化合物对菌株C-31没有显示出活性。令人兴奋的是,化合物58和59对MDR菌株(Mtb 352)和XDR菌株(Mtb 5)具有非常高的活性,针对Mtb 352的MIC值分别为0.06或0.5μg/mL,针对Mtb 5的MIC值分别为0.25和2μg/mL。

[0104] 缩写

BSA	牛血清白蛋白	MeOH	甲醇
DCM	二氯甲烷	NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
DMF	二甲基呋喃	Sa	金黄色葡萄球菌
DMSO	二甲基亚砷	TES	N-[三(羟甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸
Ec	大肠杆菌	TFA	三氟乙酸
EDTA	乙二胺四乙酸乙酯	THF	四氢呋喃
EtOAc	乙酸乙酯	TLC	薄层色谱法
HRMS	高分辨率质谱法	TMSCl	三甲基甲硅烷基氯
KOAc	乙酸钾	UPLC	超高效液相色谱法

实施例

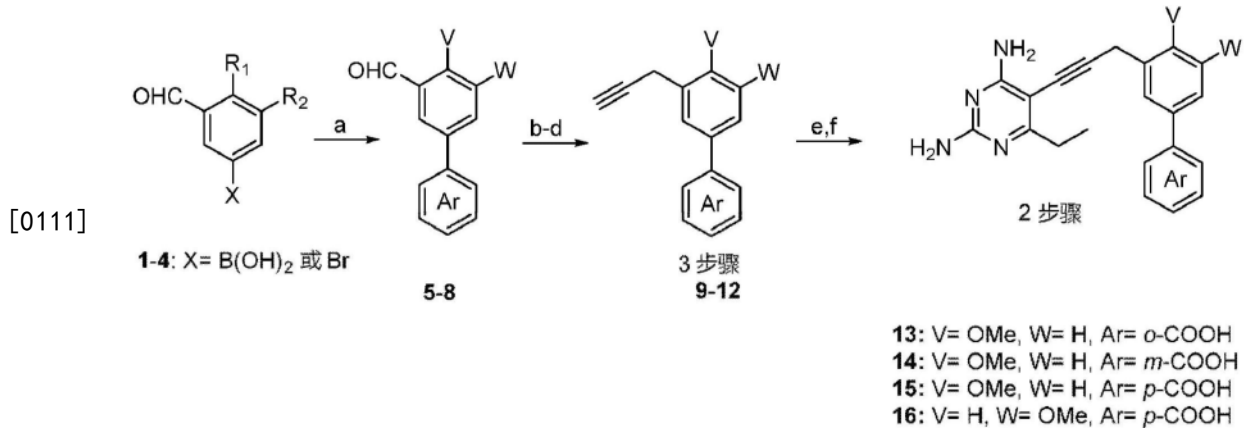
[0106] 一般方法

[0107] 在Bruker仪器上以400MHz记录¹H和¹³C NMR谱。化学位移以ppm为单位报告,并且参考残留的DMSO溶剂;¹H和¹³C分别为2.50和39.51ppm。高分辨率质谱法由康涅狄格大学质谱实验室(University of Connecticut Mass Spectrometry Laboratory)使用带有DART源的AccuTOF质谱仪提供。在Jasco P-2000旋光仪上在589nm下测量旋光度。在Sorbent Technologies硅胶HL TLC板上进行TLC分析。将所有玻璃器皿烘干并在氩气氛下冷却。无水二氯甲烷、乙醚和四氢呋喃从Baker Cycle-Tainers直接使用。无水二甲基甲酰胺购自Acros并通过用氩气吹扫脱气。除非另有说明,否则所有试剂均从商业来源直接使用。将预先混合的Pd(PPh₃)₂Cl₂中的GuI (10%/w) (10%/w)的非均相混合物用于Sonogashira偶联。

[0108] 实施例1.两性离子PLA的合成

[0109] 通过经Suzuki反应将苯甲酸叔丁酯与合适的B-环苯甲醛1偶联,然后进行链延伸和与二氨基嘧啶头部基团的Sonagashira偶联来制备本发明的化合物。在强酸性条件下对叔丁酯的最终解封闭平稳且以良好产率进行(方案1)。

[0110] 方案1.两性离子PLA合成

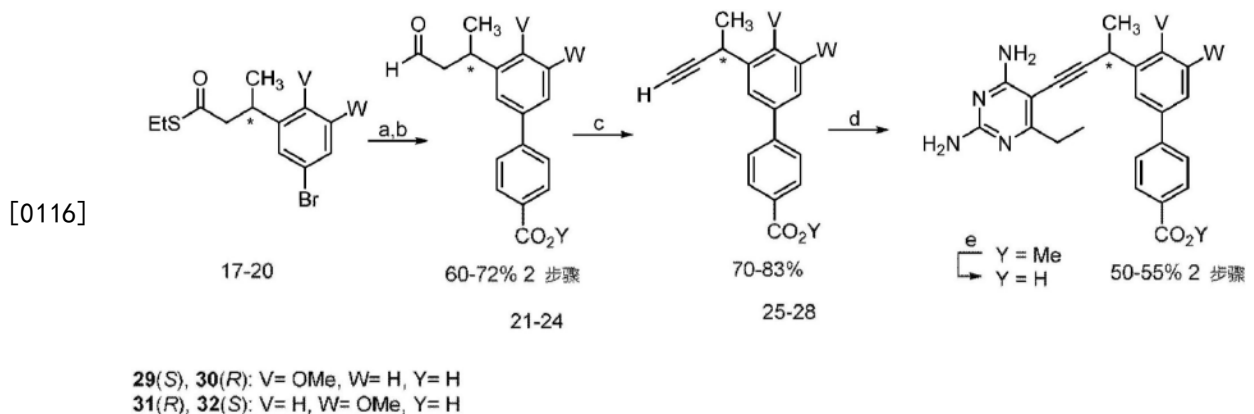


[0112] (a) Ar-B(OH)₂或Ar-Br, Pd(PPh₃)₄, Cs₂CO₃, 二噁烷:H₂O, 90°C; (b) 甲氧基甲基三苯基氯化磷, NaO^tBu, THF, 0°C; (c) NaI, TMSCl, MeCN, -20°C; (d) 二甲基(1-重氮-2-氧代丙基)膦酸酯, K₂CO₃, MeOH; (e) 碘乙基二氨基嘧啶, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, KOAc, DMF, 50°C; (f) TFA, DCM。

[0113] 实施例2.甲基支化同系物的合成

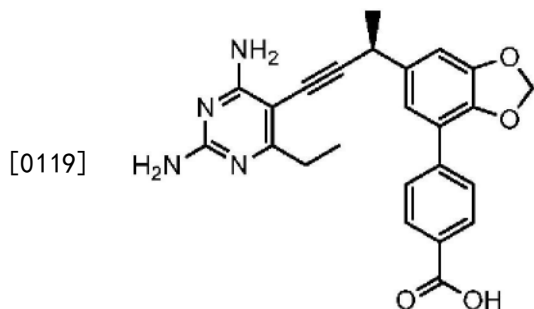
[0114] 使用已知方法制备15和16的甲基-支化同系物。(Viswanathan, K., 等, PloS One (2012) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029434>)。PLA对映体的合成从先前报道的不对称硫酯(17至20)开始,其通过Suzuki偶联与4-甲基苯甲酸硼酸偶联。与外消旋合成类似,甲酯切割可以作为最后的合成步骤实现,得到化合物29至34。

[0115] 方案2.两性离子PLA的不对称合成



[0117] (a) PdCl₂(PPh₃)₂, 4-甲氧基羰基苯基硼酸, 二噁烷:H₂O, 90°C; (b) 10% Pd/C, Et₃SiH, DCM; (c) Nonaflyl氟化物, P1-t-Bu-三(四亚甲基)磷腈碱, DMF, -15°C至室温; (d) 碘乙基二氨基嘧啶, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, KOAc, DMF, 50°C; (e) LiOH, THF:H₂O, 32°C。

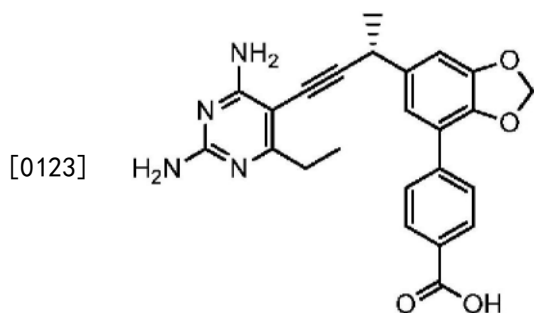
[0118] 实施例3. (S)-4-(6-(4-(2,4-二氨基-6-乙基吡啶-5-基)丁-3-炔-2-基)苯并[D][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)苯甲酸的合成:(化合物41)



[0120] 向带有搅拌棒的20mL螺旋盖小瓶中添加(0.57mmol, 0.15g, 1当量)乙基-碘代二氨基嘧啶、(0.05mmol, 0.03g, 0.08当量)Pd/Cu和(5.7mmol, 0.55g, 10当量)KOAc。添加氩气吹扫的无水DMF(0.05M, 11.3mL), 然后添加炔烃(0.73mmol, 0.25g, 1.3当量)。将反应混合物在氩气下搅拌15分钟并使用冷冻/泵/解冻方法脱气一次。将小瓶在氩气下密封, 在60°C下加热并通过TLC监测反应。在反应结束时, 浓缩暗红棕色溶液并通过快速柱色谱法纯化产物(对于预吸收粗混合物: 在10%/w半胱氨酸中的SiO₂-1.5g, NH₂封端的SiO₂-1.5g), 13g SiO₂用于柱, 2%MeOH/CH₂Cl₂), 得到作为浅棕色固体的偶联的嘧啶。(0.2g, 72%产率)。TLC R_f=0.4(5%MeOH/CH₂Cl₂)。将冷却至0°C的(0.02M, 2mL)d-CHCl₃中的嘧啶偶联的叔丁酯产物(0.0411mmol, 0.02g, 1当量)用三氟乙酸(TFA)(8.22mmol, 200当量, 0.63mL)脱保护。滴加后, 将反应混合物升至室温。在反应结束时, 通过NMR监测, 将反应混合物在20°C下旋转蒸发, 在真空下保持15分钟以除去过量的TFA。向含有少量TFA的产物混合物中添加无水CH₂Cl₂, 用于预吸收到硅胶(1g)上。初始用100%EtOAc, 然后用EtOAc中的0.01%TFA进行快速柱色谱法(5g硅胶); TLC R_f=0.3(10%MeOH/CH₂Cl₂, 含0.01%TFA)。将清洁级分在20°C下旋转蒸发, 确保完全除去溶剂。用pH7的磷酸盐缓冲液中和油性TFA盐。将得到的白色沉淀物与缓冲溶液一起转移到Eppendorf管中并离心以将水与沉淀物分离。倾析出水层后, 用乙醚和甲醇冲洗白色沉淀物以除去水。对具有粉红色泽的干燥白色固体(0.01g, 57%产率)进行表征和生物学评价。

[0121] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d) δ8.03(d, J=8.4Hz, 2H), 7.86(d, J=8.4Hz, 2H), 7.28(s, 1H), 7.09(s, 1H), 6.28(宽, 2H), 6.18(s, 2H), 6.12(s, 2H), 4.12(q, J=7Hz, 1H), 2.55(q, J=7.6Hz, 2H), 1.54(d, J=7.1Hz, 3H), 1.11(t, J=7.6Hz, 3H); ¹³C NMR(100MHz, DMSO-d) δ171.5, 167.1, 164.2, 161.1, 148.1, 143.4, 139.5, 138.4, 129.8, 129.7, 127.5, 120.2, 118.8, 107.3, 101.2, 100.5, 87.8, 76.0, 32.0, 28.8, 24.6, 124; HRMS(DART, M⁺+H) m/z 431.1708(C₂₄H₂₃N₄O₄计算值, 431.1719); [α]_D²⁴+3.3°(c, 0.146, DMSO)。

[0122] 实施例4. (R)-4-(6-(4-(2,4-二氨基-6-乙基吡啶-5-基)丁-3-炔-2-基)苯并[D][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)苯甲酸的合成



[0124] 向带有搅拌棒的20mL螺旋盖小瓶中添加(0.45mmol,0.12g,1当量)乙基-碘代二氨基嘧啶、(0.04mmol,0.025g,0.08当量)Pd/Cu和(4.47mmol,0.44g,10当量)KOAc。添加氩气吹扫的无水DMF(0.05M,8.9mL),然后添加炔烃(0.58mmol,0.20g,1.3当量)。在与(S)对映体相同的后处理后,得到作为浅棕色固体的(R)对映体(0.164g,75%产率)。TLC_{Rf}=0.4(5% MeOH/CH₂Cl₂);将冷却至0℃的(0.02M,3mL)d-CHCl₃中的嘧啶偶联的叔丁酯产物(0.062mmol,0.03g,1当量)用三氟乙酸(TFA)(18.50mmol,300当量,1.42mL)脱保护。重复与上述相同的脱保护后处理,得到作为具有粉红色泽的白色固体的(R)羧酸(0.015g,56%产率)。TLC R_f=0.3(10%MeOH/CH₂Cl₂,含0.01%TFA);

[0125] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d) δ8.03(d,J=7.6Hz,2H),7.87(d,J=7.2Hz,2H),7.27(s,1H),7.09(s,1H),6.26(宽,2H),6.15(s,2H),6.12(s,2H),4.11(q,J=7Hz,1H),2.56(m,2H),1.53(d,J=7.0Hz,3H),1.11(t,J=7.5Hz,3H);¹³C NMR(100MHz,DMSO-d) δ171.6,167.0,164.2,161.1,148.1,143.4,139.5,138.4,129.8,129.7,127.5,120.2,118.8,107.3,101.2,100.5,87.8,76.0,32.0,28.8,24.6,12.4;HRMS(DART,M⁺+H)m/z 431.1708(C₂₄H₂₃N₄O₄计算值,431.1719);[α]²⁴-5.2°(c,0.143,DMSO)。

[0126] 实施例5.DHFR抑制测定

[0127] 在大肠杆菌BL21(DE3)(Invitrogen)细胞中过表达重组SaDHFR和EcDHFRin PET-41a(+),并使用镍亲和层析(5Prime)纯化。使用PD-10柱(GE Healthcare)将蛋白质脱盐到含有20mM Tris pH7.0、20%甘油、0.1mM EDTA、2mM DTT的缓冲液中,并以等分试样储存在-80℃。

[0128] 金黄色葡萄球菌MIC

[0129] 根据临床和实验室标准协会的标准微量稀释肉汤测定指南(Clinical and Laboratory Standards Institute's guideline for Standard Micro-dilution broth assay),使用Isosensitest肉汤(Oxoid)中的5×10⁵CFU/mLATCC菌株43300的最终接种物测定最低抑制浓度。MIC定义为视觉上抑制生长的抑制剂的最低浓度。在37℃孵育18小时后,在A₆₀₀监测生长。使用Presto Blue(Life Technologies)以比色法确认MIC。

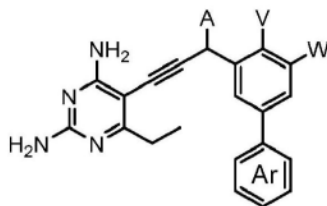
[0130] 大肠杆菌

[0131] 使用大肠杆菌(ATCC 25922)和利用Isosensitest肉汤(Oxoid)中的1×10⁵CFU/mL接种物的微量稀释肉汤测定确定最小抑制浓度。使用Alamar Blue测定在A₆₀₀监测生长;MIC定义为完全抑制生长的抑制剂的最低浓度。

[0132] 评估化合物13至16和29至34对金黄色葡萄球菌(Sa)、大肠杆菌(Ec)和人(hu)DHFR酶的抑制(IC₅₀值),数据显示在表1中。通过340nm的吸光度来监测DHFR对NADPH的氧化率,来使用酶抑制测定法确定Sa和EcDHFR酶二者的IC₅₀值。反应在室温下在含有20mM TES pH 7.0、50mM KCl、0.5mM EDTA、10mM ME和1mg/mL BSA、0.1mM NADPH和2μg/mL酶的缓冲液中进行。将DMSO中的抑制剂添加到酶/NADPH混合物中并孵育5分钟,然后添加在50mM TES中的0.1mM二氢叶酸。在SaDHFR和EcDHFR IC₅₀列的括号中提供的数字表示相对于人DHFR酶的抑制的倍数选择性。

[0133] 显示了金黄色葡萄球菌(Sa)、大肠杆菌(Ec)和人(Hu)DHFR酶(表2和3)的化合物抑制。

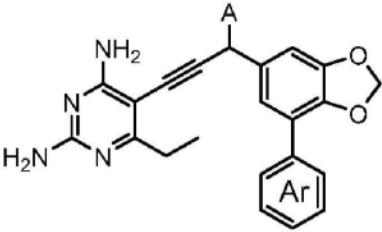
表2. 两性离子PLA化合物和生物活性



化合物	A	V	W	Ar = 苯基, 被以下取代	Sa IC ₅₀ (μM)	Ec IC ₅₀ (μM)	Hu IC ₅₀ (μM)	金黄色葡萄球菌 43300 (μg/mL)	大肠杆菌 25922 (μg/mL)	大肠杆菌 NR698 (μg/mL)
13	H	OCH ₃	H	<i>o</i> -COOH	0.359 (10)	0.195 (17.9)	3.5	>20	>32	20
14	H	OCH ₃	H	<i>m</i> -COOH	0.157 (9.5)	0.526 (3.4)	1.5	0.625	>20	0.0391
15	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH	0.032 (25)	0.090 (9)	0.817	0.0195	>20	0.0098
16	H	H	OCH ₃	<i>p</i> -COOH	0.011 (63)	0.507 (1.35)	0.688	0.0195	>20	0.0049
29	S-CH ₃	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH	0.037 (7.2)	0.177 (1.5)	0.266	0.625	>20	0.0391
30	R-CH ₃	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH	0.216 (2.4)	0.289 (1.8)	0.52	0.0195	20	0.0012
31	R-CH ₃	H	OCH ₃	<i>p</i> -COOH	0.009 (28)	0.084 (3)	0.254	0.0098	10	0.0024
32	S-CH ₃	H	OCH ₃	<i>p</i> -COOH	0.014 (36)	0.166 (3)	0.502	0.0098	10	0.0024
33	S-CH ₃	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOCH ₃	0.022	0.034		0.625	>20*	0.156
34	R-CH ₃	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOCH ₃	0.205	0.172		10	>20*	1.875

[0134]

表3. 另外的两性离子PLA结构和生物活性

化合物	A	Ar = 苯基, 被以下 取代						
			Sa IC ₅₀ (μM)	Ec IC ₅₀ (μM)	Hu IC ₅₀ (μM)	金黄色葡萄球菌 43300 (μg/mL)	大肠杆菌 25922 (μg/mL)	大肠杆菌 NR698 (μg/mL)
35	CH ₃	<i>p</i> -O-C(O)-OH						
36	CH ₃	<i>p</i> -OH						
37	H	<i>p</i> -OH		2.5			0.625	0.002
38	H	3-F,4-OH		1.25			0.625	0.001
39	H	3,5-二-F, OH		0.625			0.625	0.001
40	H	3,5-二-F, OCH ₃		>20			5	0.78

[0136] 实施例6. 结构研究

[0137] 通过X射线晶体学确定与两性离子化合物15和16结合的SaDHFR的结构。

[0138] SaDHFR:NADPH:15

[0139] 通过悬滴法将纯化的SaDHFR以18mg/mL蛋白质与2mM NADPH和1mM抑制剂15在DMSO中共结晶。将蛋白质和辅因子的混合物在冰上孵育3小时。将等体积的蛋白质溶液添加到含有0.1M MES pH5.5、0.2M乙酸钠、17%PEG 10,000和12.5% γ -丁内酯的优化缓冲溶液中。当储存在4°C时,晶体通常在7天内形成。收获晶体并在含有25%甘油的冷冻保护缓冲液中冷冻。在SLAC国家加速器实验室Stanford同步辐射光源(Synchrotron Radiation Lightsource)的beamline 7-1上远程收集数据。使用HKL2000对数据进行索引和缩放。Phaser晶体学软件(McCoy, A. J. 等, J. Appl. Cryst., (2007) 40:658-674)用于使用PDB ID: 3F0Q作为探针鉴定分子置换溶液。Coot和Phenix用于结构精细化,直到获得可接受的R_{Work}和R_{Free}。

[0140] SaDHFR:NADPH:16

[0141] 通过悬滴法将纯化的SaDHFR与2mM NADPH和1mM 16在DMSO中共结晶。除了将缓冲液换成0.1M MES, pH 5.0之外,结晶细节与上面所用的类似。在康涅狄格大学蛋白质X射线晶体学设施的Rigaku Highflux Homelab系统上收集数据。使用Structure Studio(d*Trek)对数据进行索引和缩放。与上述类似,Phaser用于分子置换;Coot(Emsley, P. 和 Cowtan, K., Acta Cryst., (2004) D50:2126-2132)和Phenix(Adams, P. D., Acta Cryst.,

(2010) D66:213-221) 用于结构精细化。

[0142] 与NADPH和抑制剂15或16配合的SaDHFR的晶体分别产生 2.24 \AA 或 1.81 \AA 的衍射振幅。使用基于PDB 3FOQ的分子置换方法(Frey, K.M.等, *J. Structural Biology* (2010) 170 (1):93-97) 作为模型来解析结构。两种结构具有以下特征:结合的抗叶酸和 β -NADPH及其替代 α -异头异构体的双重占据(化合物15的结构显示 α -异头异构体为 α -环封闭互变异构体状态(Fox, K.M.和Karplus, P.A., *Structure* (1994) 2 (11):1089-1105) 或完全占据 α -异头异构体(具有化合物16的结构)。与化合物15结合的结构显示羧酸与Arg 57侧链之间的水分子的配位(图2A)。具有化合物16的结构(图2B)表现出广泛的水网络,其涉及在16的羧酸、Arg 57上的两个氨基以及Leu 28的羰基氧之间配位的至少四个水分子。水网络扩展到包括与Asn 56和Thr 36的侧链的额外氢键相互作用(图2B)。抑制剂的结合模式表现出晶体结构与抑制剂15和16的显著差异。化合物15的R₁位置的甲氧基取代使二芳基系统向溶剂暴露表面移动 1.2 \AA ,这可能是化合物15和16之间观察到的水网络差异的原因(图2C)。

[0143] 两种结构均以辅因子结合位点中的NADPH的 α -异头异构体为特征。具有SaDHFR:NADPH:15的结构显示40%的占有率,并且具有SaDHFR:NADPH:16的结构显示100%的占有率。 α -异头异构体置换了在 β -NADPH的烟酰胺磷酸酯与Asn 18的侧链之间配位的水分子,其被 α -NADPH的环化核糖部分占据。在 α -NADPH结构中,三个水分子在烟酰胺酰胺与Phe 92、Ile 14和Ala 7的骨架之间配位。

[0144] 表4中提供了具有NADPH和化合物15或NADPH和化合物16的SaDHFR晶体的X射线晶体学测定和数据收集和精细化统计。

表4		
	Sa(WT):NADPH:15 -	Sa(WT):NADPH:16
PDB ID		
空间群	<i>P6₁22</i>	<i>P6₁22</i>
不对称单元中的单体数目	1	1
晶胞 (<i>a, b, c</i> , 以Å计)	79.09, 79.09, 107.93 90.0, 90.0, 120.0	79.02, 79.02, 108.25 90.0, 90.0, 120.0
分辨率 (Å)	32.65-2.24 (2.28-2.24)	25.15-1.81 (1.87-1.81)
完整性 % (最后的壳, %)	100 (99.9)	99.8 (100)
独特反射	10,059	18,798
冗余 (最后的壳)	14 (14.2)	12.32 (12.03)
R _{sym} , (最后的壳)	0.055 (0.144)	0.110 (0.644)
<I/σ> (最后的壳)	68.5 (31.9)	11.7 (2.3)
R-因子/R _{free}	0.2167, 0.1703	0.2322/ 0.1991
原子数目(蛋白质、配体、溶剂)	1,499	1,489
Rms偏差键长 (Å),角度(度)	0.008, 1.912	0.009, 1.810
蛋白质的平均B因子(Å ²)	22.34	28.01
配体的平均B因子(Å ²)	17.46 aNADPH 16.91 bNADPH 31.29 抑制剂	24.65 NADPH 24.93 抑制剂
溶剂分子的平均B因子(Å ²)	25.25	35.10
最有利区域的残留 (%) ^a	96.86	98.73
其他允许区域的残留 (%) ^a	3.14	1.27
不允许区域的残留 (%) ^a	0.00	0
收集位置	SSRL Beamline 7-1	Rigaku HighFlux-007

[0145]

[0146] 实施例7.COOH-PLA的细胞活性

[0147] p-COOH PLA对SaDHFR酶以及金黄色葡萄球菌表现出高水平的活性,大部分MIC值为0.0098至0.625(表1)。化合物对野生型大肠杆菌表现出降低的活性,化合物31和32的MIC值为10μg/mL。针对革兰氏阴性细菌的活性的两个主要障碍是通过外膜的渗透性和通过外排的抑制剂的活性去除。为了探测作为内在抗性手段的渗透性,测量针对NR698的MIC值,其

中NR698是在编码外膜组装必需的蛋白质的imp基因中含有框内缺失的工程菌株。化合物15、16和29-32对NR698菌株的抑制浓度显示出约2,000至4,000倍的降低,表明通过外膜的渗透减少限制了大肠杆菌中的PLA活性。

[0148] 为了检查COOH-PLA是否经受通过普通AcrB外排泵的外排,我们比较了亲本大肠杆菌菌株中的MIC值和其中缺失AcrB的菌株(JW0451)中的MIC值。由于针对JW0451菌株的MIC值与亲本菌株而非NR698菌株类似(表5),所以化合物可能不受AcrB的外排。

[0149]

化合物	大肠杆菌 <i>BW25113</i>	<i>JW0451</i>
13	>32	>32
14	>20	>20
15	>20	>20
16	>20	>20
29	>20	>20
30	20	20
31	10	5
32	10	10
33	>20*	2.5*
34	>20*	20*

[0150] AcrB不太可能,因为在 Δ acrB、 Δ macB、 Δ emrB或 Δ acrF菌株中MIC值也没有移位,进一步证实针对主要泵AcrB的外排活性不太可能。

[0151] 实施例8.公开的化合物对人细胞的作用

[0152] COOH-PLA具有优异的药物样特性

[0153] 为了检查本公开内容的COOH-PLA化合物的药物样潜力,一系列体外测定探测了其对人细胞的作用,其对关键CYP同种型的抑制以及其在微粒体稳定性测定中的寿命。COOH-PLA对HepG2和MCF-10以及细胞没有可测量的细胞毒性($IC_{50} > 500\mu M$)。将对于革兰氏阳性细菌细胞的有效活性与低细胞毒性偶联产生了高治疗指数($> 500,000$)。

[0154] 实施例9.公开的化合物对CYP酶的作用

[0155] 申请人还测量了本公开内容的某些化合物的细胞色素P450抑制。测定了化合物15对CYP3A4和CYP2D6两种最常见的同种型的活性。两种酶的抑制需要大于 $50\mu M$ 的浓度,表明可以预测该化合物不会干扰其他共同施用的治疗剂的代谢。

[0156] 实施例10.微粒体稳定性

[0157] 测定化合物15在微粒体稳定性测定中的寿命。使用UPLC通过遵照母体化合物测量该化合物半衰期。阶段I半衰期为99分钟。阶段II为约87分钟。这些体外实验的结果表明COOH-PLA具有优异的药物样特性。实施例11.化合物对结核分枝杆菌DHFR和人DHFR的抑制作用

[0158] 药物

[0159] 异烟肼 (INH) 购自Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., 并且在-20℃冷冻之前, 将其在100%二甲基亚砜 (DMSO) 中溶解至浓度为1mg/ml。将DHFR抑制剂在100% DMSO中溶解至浓度为20mg/ml。

[0160] 分离株

[0161] 结核分枝杆菌ATCC 35801 (菌株Erdman) 获自美国模式培养物保藏所, Manassas, VA。临床分离株获自SUNY Upstate医学院, Syracuse, NY (由Betz Forbes提供), 斯坦陵布什大学, 南非 (由Tommy Victor提供), 佐治亚国立结核病和肺病中心, Tbilisi, Georgia (由Natalia Shubladze提供), 国立犹太中心, Denver, CO (由Leonid Heifets提供)。

[0162] 将分枝杆菌分离物在旋转振荡器上的补充有10% Middlebrook油酸-白蛋白-葡萄糖-过氧化氢酶富集 (Difco Laboratories, Detroit, MI) 和0.05% Tween 80的改良的Middlebrook 7H10肉汤 (pH 6.6; 7H10琼脂制剂, 省略了琼脂和孔雀石绿) 中在37℃下培养5至10天。使用光电比色计 (Manostat Corp., New York, NY) 将生物体在7H10肉汤中稀释至1Klett单位 (相当于约 5×10^5 CFU/ml), 用于肉汤稀释测定。

[0163] 微量滴定肉汤稀释MIC测试

[0164] 用50μl改良的7H10肉汤填充聚苯乙烯96孔圆底微量滴定板 (Corning Inc., Corning, NY)。以测试的最大浓度的4倍制备化合物, 然后添加到第一个孔中, 然后连续2倍稀释。使用8μg/ml至0.008μg/ml的浓度范围测试INH。使用32μg/ml至0.03μg/ml的范围测试DHFR抑制剂。通过滴定测量用于每种菌株的接种物, 并将其铺在7H10琼脂板上以确定实际的接种物。将7H10琼脂板在37℃下孵育4周。将50微升接种物添加到含有化合物的每个孔中, 得到约 2.5×10^5 CFU/ml的初始浓度 (测试的各种分离物的范围是 1.25×10^6 CFU/ml至 8×10^4 CFU/ml)。用SealPlate黏合剂密封膜 (Exel Scientific, Wrightwood, CA) 覆盖微量滴定板, 并在读数前在37℃下在环境空气中孵育14至21天。每种分离物一式两份进行测试。MIC定义为不产生可见的浊度的抗微生物剂的最低浓度。

[0165] 结核分枝杆菌和人DHFR的表达和纯化

[0166] 用含有由GenScript构建的dfrA基因的重组pET-41a (+) 质粒转化BL21 (DE3) 感受态大肠杆菌细胞 (New England BioLabs)。转化的细胞在补充有30μg/mL卡那霉素的LB培养基中于37℃生长, 直至OD₆₀₀达到0.6至0.7。将细胞用1mM IPTG在20℃下诱导20小时, 并以8000rpm旋转15分钟。将每克湿细胞沉淀重悬于5ml补充有200μg/mL溶菌酶和1mM DNA酶I (Thermo Scientific) 的1×BugBuster试剂 (Novagen) 中。将细胞悬浮液在轻轻旋转下室温孵育30分钟, 然后以18,000rpm离心30分钟, 收集上清液。为了使一些非靶蛋白沉淀, 向细胞裂解物中添加40%硫酸铵并在4℃下搅拌过夜。在18,000rpm离心15分钟后, 将上清液通过0.22μm过滤器并缓慢上样到用4CV平衡缓冲液A (20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM DTT, 0.1mM EDTA和15% (v/v) 甘油, pH 7.5) 预平衡的氨甲蝶呤-琼脂糖柱上。用3CV的洗涤缓冲液B (20mM Tris-HCl, 500mM KCl, 2mM DTT, 0.1M EDTA和15% (v/v) 甘油, pH 7.5) 洗涤柱。用3CV的洗脱缓冲液C (20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM DTT, 2mM DHF, 0.1mM EDTA和15% (v/v) 甘油, pH 8.5) 洗脱酶。收集含有DHFR酶的级分, 浓缩并上样到用1CV平衡缓冲液A (pH 8.5) 预平衡的Hi-Prep 26/60Sephacryl s-200HR柱上。用AKTA UV/vis二极管阵列分光光度计在280nm监测蛋白质洗脱。合并含有纯酶的级分, 浓缩至10mg/ml, 在液氮中快速冷冻并储存

在-80℃。

[0167] 酶抑制

[0168] 通过监测DHFR酶催化的二氢叶酸的NADPH依赖性还原来进行酶活性和抑制测定。在含有20mM TES pH 7.0、50mM KCl、10mM 2-巯基乙醇、0.5mM EDTA和1mg/mL牛血清白蛋白的测定缓冲液中,在340nm处通过分光光度法测量NADPH氧化速率。所有测量均在室温下通过向缓冲液中添加纯酶(2mg/mL)、100 μ M NADPH和100 μ M DHF进行。对于抑制测定,将溶解在100%DMSO中的抑制剂添加到混合物中并孵育5分钟,然后添加DHF。一式三份地测量平均IC₅₀值和标准偏差。

[0169] 表6中提供了在Mtb和人DHFR以及Mtb MIC处的某些PLA化合物的IC₅₀。使用非DHFR抑制性抗生素甲氧苄啶(TMP)作为阴性对照。使用DHFR抑制剂异烟肼(INH)和三甲氧喋呤作为阳性对照。

[0170]

化合物	MtbDHFR IC ₅₀ (nM)	HuDHFR IC ₅₀ (nM)	MIC (μ g/ mL) Mtn
14	311	1577	1
15	173	870	4
29	111	1955	0.5
54	326	323	2
55	206	2914	4
56	126	1452	2
57	73	144	2
58	177	1015	<0.03
59	460	688	0.5
TMP	19,560	97,179	256
三甲曲沙	17 ^a	Nd	4
INH	-	-	0.03

[0171] ^a数据来自Nixon,M.,等,Chem.Biol.(2014) 21:819-30。

[0172] 评估本公开内容的某些化合物针对结核分枝杆菌的多重药物抗性分离株的抗菌活性。各种菌株的MIC值列于表7中。

表 7

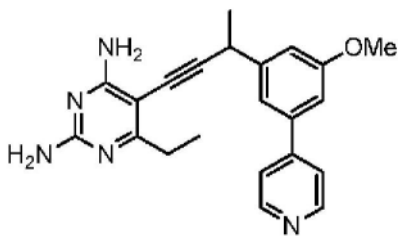
化合物	Mtb Erdman	Mtb 5	Mtb 365	Mtb 276	Mtb 352	Mtb56	Mtb C-31
1113	8	16	8	16	8	8	16
15	16	8	4	16	16	16	>32
54	4	8	8	4	4	8	8
55	8	8	4	8	8	8	16
56	4	4	4	4	4	4	8
1071	8	16	8	16	8	8	32
1066	8	16	8	16	16	8	32
58	<0.03	0.25	<0.03	ND	0.06	0.06	8
59	0.5	2	0.125	ND	0.5	0.5	8
INH	0.125	4	2	ND	1	1	4

[0173]

[0174] 实施例12. 对化合物A具有抗性的MRSA菌株的产生和表征

[0175] 先前报道了对金黄色葡萄球菌43300菌株克服化合物A抑制的潜在抗性机制的初步研究。(Freabxy, K. 等, J. Struct. Biol. (2010) 170:93-97.)

[0176]



(化合物 A)

[0177] 这些研究显示DHFR基因中的两个突变体F98Y和F98I以低突变频率(10^{-10})进行选择。为了进一步表征炔丙基连接的抗叶酸剂的抗性特性,进行单步和双步选择研究并表征所得菌株。在单步研究中,用经受 $6 \times \text{MIC}$ 的化合物1的ATCC质量控制菌株43300进行的突变体选择产生了三个临床观察到的突变:F98Y、H30N和H149R,以及三个新突变:F151S、F151C和D142Y。使用化合物A和具有F98Y或H149R的祖先菌株的第二轮抗性选择产生了一系列新的和临床相关的双突变体(表8)。由于临床上已分离出含有H30N/F98Y和F98Y/H149R突变体的菌株,因此在生化、结构和细胞水平上对这些突变酶和细菌(包括其单突变体对应物(F98Y、H30N和H149R))的适合性进行了全面表征。

[0178] 通过将祖先菌株的 $100 \mu\text{L}$ 过夜培养物(约 10^{12}CFU/mL)铺在含有 $6 \times \text{MIC}$ 的1的Isosensitest (Oxoid) 琼脂板上并在 37°C 下孵育18小时来选择抗性菌株。分离单菌落,通过菌落PCR产物的直接测序鉴定dfrB基因。对于菌落PCR,使用 0.1M Tris, pH 7.5中的 1mg/mL 溶葡萄球菌素和 $20 \mu\text{g/mL}$ 蛋白酶K裂解细胞。使用有义引物($5' - \text{ATGACTTTATCCATTCTAGTTGC} - 3'$)、反义引物($5' - \text{TTATTTTTTACGAATTAATGTAG} - 3'$)和rTaq聚合酶(Takara)按照标准PCR条件扩增基因。使用Promega Wizard SV Gel和PCR Clean Up系统纯化PCR产物,并使用有义引物测序。

[0179] 对于每种祖先菌株,通过所得菌落数除以总接种物($1 \times 10^{11} \text{CFU/mL}$)来确定1的突

变频率。通过抑制剂-菌株对的突变频率乘以含有特定突变的测序菌落的频率来确定特定突变的频率。

[0180] 最低抑制浓度 (MIC)

[0181] 根据临床和实验室标准协会的标准微量稀释肉汤20测定指南,使用Isosensitest肉汤(Oxoid)中 5×10^5 CFU/mL的最终接种物测定最低抑制浓度。MIC定义为视觉上抑制生长的抑制剂的最低浓度。在37°C下孵育18小时后,在 A_{600} 监测生长。使用Presto Blue (Life Technologies)以比色法确认MIC。用补充有10 μ g/mL胸苷的Isosensitest肉汤确定任何脱靶抗菌活性。

[0182] 生长曲线

[0183] 用1mL过夜培养物接种LB培养基(50mL)。每30分钟在 A_{600} 监测生长。通过以下等式由生长曲线的线性部分确定倍增时间:

$$[0184] \quad \text{倍增时间} = \frac{\Delta \text{时间} * \log 2}{\log(\text{终浓度}) - \log(\text{初始浓度})}$$

[0185] Sa (F98Y, H149R) 和Sa (H149R) DHFR酶的产生、表达和纯化

[0186] 先前已经报道了Sa (F98Y)、Sa (H30N) 和Sa (F98Y, H30N) DHFR酶的产生、表达和纯化^{15,16}。通过QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) 使用有义引物5' - CTAGATGAGAAAATACAATTCCACGTAC - 3' 和反义引物5' - CGAATTAATGTAGAAAGGTACGTGGAAT - 3' 根据制造商的说明将pET-41a (+) 构建体中的Sa (WT) 和Sa (F98Y) 用于产生Sa (H149R) 和Sa (F98Y, H149R) DHFR质粒。通过测序确认诱变。根据先前报道的方法,用1mM IPTG在大肠杆菌BL21 (DE3) (Invitrogen) 细胞中过表达重组Sa (H149R) 和Sa (F98Y, H149R) 酶。将沉淀使用1x BugBuster (Novagen) 和DNA酶A (ThermoFisher Scientific) 裂解,并使用镍亲和层析(5Prime) 纯化。使用PD-10柱 (GE Healthcare) 将蛋白质脱盐到含有20mM Tris pH 7.0、20%甘油、0.1mM EDTA、2mM DTT的缓冲液中,并以等分试样储存在-80°C。

表 8.

DHFR 突变	祖先菌株	单核苷酸多态性	测序菌落 (%)	突变频率 ^a	倍增时间 (分钟)
WT	--	--	--	--	32.04
F98Y	Sa43300	TTT 到 TAT	2/19 (10.5)	3.11×10^{-11}	34.53
H30N	Sa43300	CAT 到 AAT	3/19 (15.8)	4.67×10^{-11}	35.62
[0187] H149R	Sa43300	CAT 到 CGT	7/19 (36)	1.65×10^{-10}	38.34
F98Y/H30N	Sa(F98Y)	CAT 到 AAT	2/16 (12.5)	8.2×10^{-12}	35.06
F98Y/H149R	Sa(H149R)	TTT 到 TAT	1/1 (100)	1.23×10^{-11}	30.89

^a 利用 $6 \times \text{MIC}$ 的化合物 A 时 Sa43300 的总体抗性频率 = $2.96 (\pm 1.58) \times 10^{-10}$

利用 $6 \times \text{MIC}$ 的化合物 A 时 Sa43300(H149R) 的总体抗性频率 = 3.75×10^{-11}

利用 $6 \times \text{MIC}$ 的化合物 A 时 Sa43300(F98Y) 的总体抗性频率 = $6.56 (\pm 1.57) \times 10^{-11}$

[0188] 基于利用 $6 \times \text{MIC}$ 的浓度的化合物1的多个板上的接种物和出现的菌落数计算暴露

于化合物A的每个菌株的平均总体突变频率。Sa43300在 2.96×10^{-10} 的极低频率下表现出对化合物A的MIC增加。对于具有F98Y和H149R的祖先菌株,总体突变频率甚至更低,比率为 6.56×10^{-11} 和 3.75×10^{-11} 。然后基于具有特定突变的测序菌落的数量计算特定的突变频率。如果双突变体的产生以逐步方式发生,则抗性的组合频率可低至 10^{-21} 。通过倍增时间测量的细菌适合度评估表明,除Sa (F98Y/H149R) 外,大多数突变菌株的生长时间(1.08-1.2×野生型倍增时间)仅有轻微损失,其保持或稍微改善了倍增时间(表8)。总体而言,这些研究表明,与野生型相比,突变菌株相对适合。

[0189] 通过野生型酶的定点诱变产生重组突变DHFR酶,并使用亲和层析纯化。使用Frey等(2010)先前公开的测定条件测量每种酶的Michaelis-Menten动力学(表9)。总体而言,除Sa (H149R) 外,所有酶的 k_{cat}/K_M 值均在野生型值的约2倍以内。Sa (H149R) 具有显著降低的 k_{cat}/K_M 值(降低6倍),这是DHF和NADPH两者的 K_M 值更高的结果。有趣的是,双突变体Sa (F98Y/H149R) 补偿了单Sa (H149R) 突变体的低效率,因为Sa (F98Y/H149R) 酶将DHF和NADPH的 K_M 值恢复到接近野生型值。用Sa (F98Y/H30N) 双突变体也观察到这种补偿关系。单H30N突变提供了显著降低的NADPH K_M (31.21至79.89 μ M);在双Sa (H30N/F98Y) 突变体中,该 K_M 值恢复到接近野生型的值。

表9. 突变酶表征

DHFR	K_M DHF (μ M)	V_{max} DHF	K_M NADPH (μ M)	k_{cat} DHF (s^{-1})	k_{cat}/K_M DHF
WT	17.5	62.93	31.21	41.13	2.4
F98Y	8.38	68.38	57.08	44.76	5.3
[0190] H30N	24.49	45.76	79.89	29.91	1.2
H30N, F98Y	11.24	39.98	51.17	26.1	2.3
H149R	63.54	42.44	303.4	27.74	0.4
F98Y, H149R	5.24	44.98	45.08	29.40	5.6

[0191] 实施例12. 突变金黄色葡萄球菌的PLA抑制剂

[0192] 评估了表10中所示的化合物作为突变金黄色葡萄球菌的抑制剂。化合物A至F先前已公开。

表10. 突变DHFR的PLA抑制剂

化合物	R _p	R ₁	R ₂	R ₃	Ar
A	CH ₃	H	OCH ₃	H	吡啶
B	CH ₃	H	OCH ₂	OCH ₂	吡啶
60	H	H	OCH ₃	OCH ₃	吡啶
C	CH ₃	OCH ₃	H	H	吡啶
D	R-CH ₃	H	OCH ₃	H	吡啶
E	R-CH ₃	OCH ₃	H	H	吡啶
F	R-CH ₃	H	OCH ₂	OCH ₂	吡啶
15	H	OCH ₃	H	H	<i>p</i> -COOH
29	S-CH ₃	OCH ₃	H	H	<i>p</i> -COOH
16	H	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH
31	R-CH ₃	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH
32	S-CH ₃	H	OCH ₃	H	<i>p</i> -COOH

[0193]

[0194] 使用以下DHFR结合测定法测定表10化合物的抑制作用。使用0.1mM NADPH和2μg/mL酶,在含有20mM TES,pH 7.0、50mM KCl、0.5mM EDTA、10mM β-巯基乙醇和1mg/mL BSA的测定缓冲液中,于室温下通过340nm的吸光度监测DHFR对NADPH的氧化速率,从而进行酶抑制测定。将在DMSO中的抑制剂添加到酶:NADPH混合物中并孵育5分钟,然后添加50mM TES,pH 7.0中的0.1mM DHF。抑制剂浓度和体积基于导致酶活性降低50%的条件。

[0195] 通过酶活性测定产生的Lineweaver-Burke图测定酶动力学,使用12.5至100μM DHF和20μM NADPH用于DHF K_M和V_{max},或12.5至100μM NADPH和50μM DHF用于NADPH K_M。使用GraphPad通过非线性回归分析确定K_M值。表11公开了PLA化合物对WT和突变DHFR酶的抑制常数K_i (nM)。

表 11

化合物	Sa(WT)	Sa(F98Y)	Sa(H30N)	Sa(H149R)	Sa(H30N, F98Y)	Sa(F98Y, H149R)
TMP	3.43	14.68	6.89	240.8	595.1	1729
A	2.83	13.14	12.98	681.7	191.7	2059
B	2.53	3.01	33.25	1363	485.9	779.3
60	2.09	12.13	4.54	119.3	449.3	107.1
C	4.51	19.71	5.90	1563	820.3	878.5
[0196] D	2.68	8.57	16.72	1154	801.2	894.5
E	1.64	16.69	16.53	269.6	417.9	422.3
F	5.21	13.60	8.85	174.0	345.7	289.1
15	4.76	11.75	3.89	130.9	158.3	142.2
29	5.51	11.83	3.74	862.4	35.87	295.3
16	1.64	11.36	3.36	323.9	45.17	184.4
31	1.33	7.88	3.54	111.5	19.10	69.41
32	2.09	5.57	3.34	153.1	16.57	55.77

[0197] 所有表10的化合物对单突变酶Sa (F98Y) 和Sa (H30N) 表现出良好的效力 (K_i 值小于15nM), 相对于野生型仅有轻微损失 (表11)。化合物B对Sa (H30N) 酶损失最大的亲和力, 损失12.6倍。然而, 针对单突变体Sa (H149R) 的活性损失更多。TMP对Sa (H149R) 突变体的活性损失69倍。PLA对该酶具有一系列亲和力, 范围从化合物12的 K_i 值为185nM到化合物B的 K_i 值为1649nM。有趣的是, 与化合物B相比, 具有不受约束的3'和4'甲氧基的化合物3保持合理的亲和力 (144nM), 表明柔性对于对突变酶的亲和力可能是关键的。对于双突变体Sa (F98Y, H30N), TMP的亲和力损失130倍。通常, 二氧戊环化合物 (B和F) 以及化合物C至E对Sa (F98Y, H30N) 双突变体酶损失显著的亲和力 (180至300倍损失)。

[0198] 化合物15至16、29、31至32的设计基于与保守精氨酸的可能相互作用, 以在这些突变酶中提供补偿相互作用。欣喜的是, 化合物29、16和31至32对双突变体Sa (F98Y, H30N) 酶显示出更高的亲和力, K_i 值为16至45nM。保持针对双突变体Sa (F98Y, H149R) 酶的活性显然更具挑战性, 因为化合物A至F、60和15以及TMP显示 K_i 值为107至2059nM。然而, 化合物31和32显示出对该酶的显著抑制, K_i 值分别为69和55nM。同样, 看起来离子化的羧酸盐的存在可以提供关键的额外相互作用以补偿复合物中其他地方的减少的接触。

[0199] 还测试了化合物对金黄色葡萄球菌的野生型和突变体菌株 (Sa (F98Y)、Sa (H30N)、Sa (H149R)、Sa (H30N, F98Y) 和Sa (F98Y/H149R)) 的生长的抑制 (表12)。即使是单一突变, TMP的抗菌活性也明显削弱, 并且对双突变菌株的MIC值达到50至100 μ g/mL。相比于TMP, PLA A至F、60、15和29针对野生型菌株更有效, 并且许多针对单突变体更有效 (MIC值为0.078至5 μ

g/mL)。然而,对于DHFR中具有双突变的菌株,PLA A至F、60、15和29也具有显著损失。PLA 16、31和32对野生型菌株以及具有单突变和双突变的菌株具有优异的活性。

表 12

化合物	Sa43300	Sa(F98Y)	Sa(H30N)	Sa(H149R)	Sa(H30N, F98Y)	Sa(F98Y, H149R)
TMP	0.3125	10	2.5	2.5	50	100
A	0.0781	2.5	2.5	2.5	20	80
B	0.0781	1.25	5	5	40	40
60	0.0195	0.625	0.625	0.625	20	40
[0200] C	0.625	2.5	2.5	2.5	20	40
D	0.0391	0.625	0.625	0.625	40	20
E	0.0195	1.25	0.625	1.25	10	20
F	0.0195	1.25	2.5	2.5	20	20
15	0.0195	0.1563	0.1563	0.1564	6.25	>50
29	0.0391	0.1563	0.1563	0.0781	>40	>40
16	0.0195	0.1563	0.1563	0.1563	5	10

表 12

化合物	Sa43300	Sa(F98Y)	Sa(H30N)	Sa(H149R)	Sa(H30N, F98Y)	Sa(F98Y, H149R)
[0201] TMP	0.3125	10	2.5	2.5	50	100
31	0.0098	0.0781	0.0781	0.0391	1.25	2.5
32	0.0098	0.0781	0.0781	0.0781	1.25	1.25

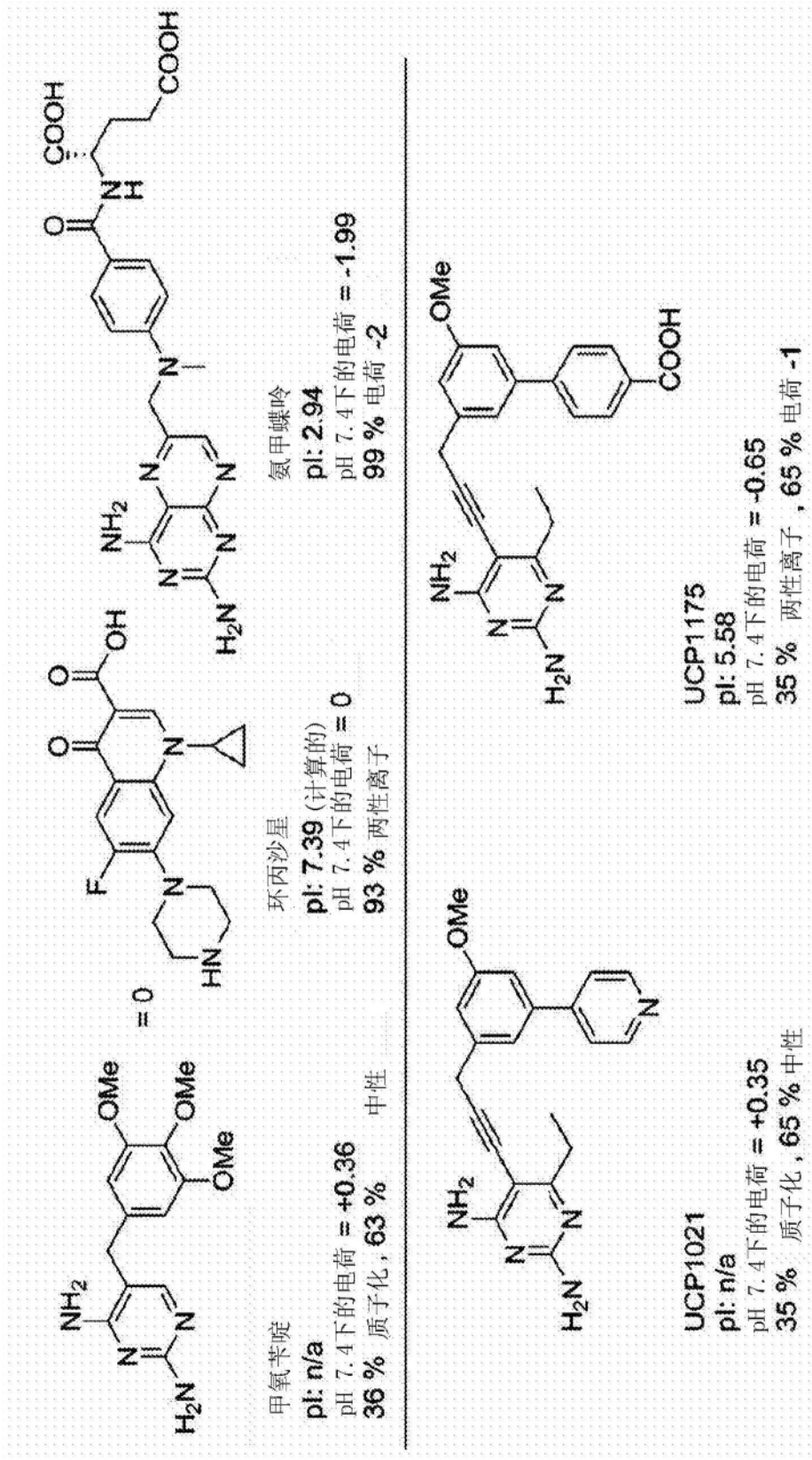


图1

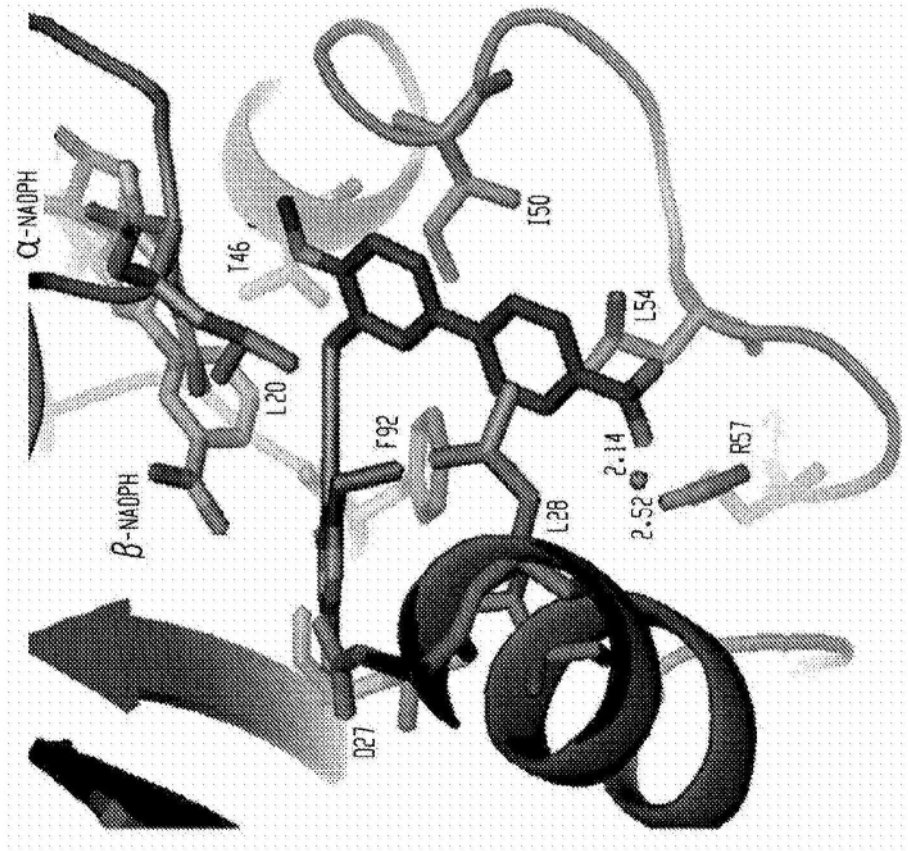


图2A

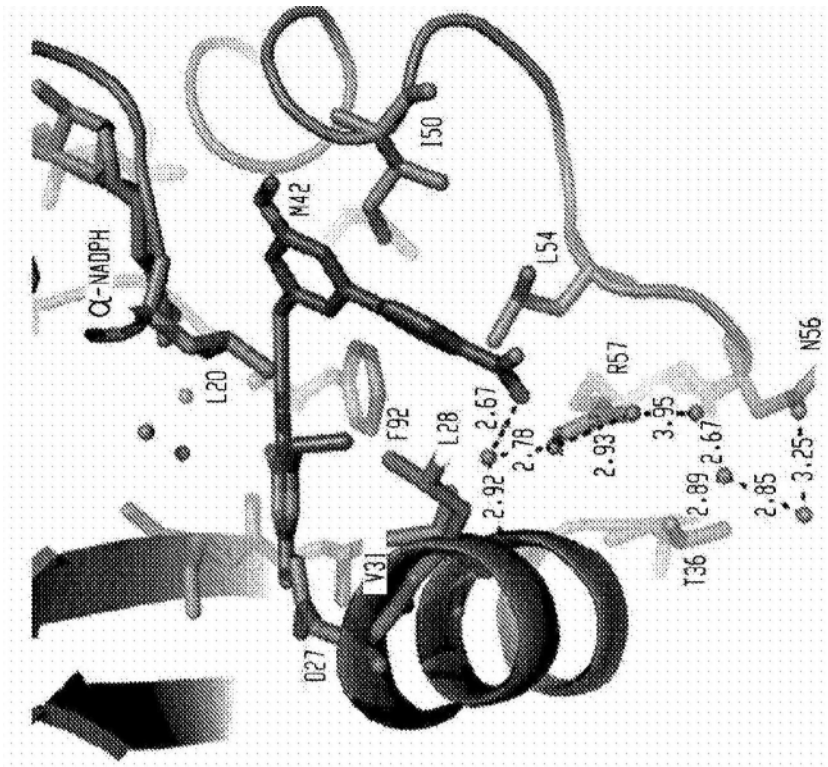


图2B

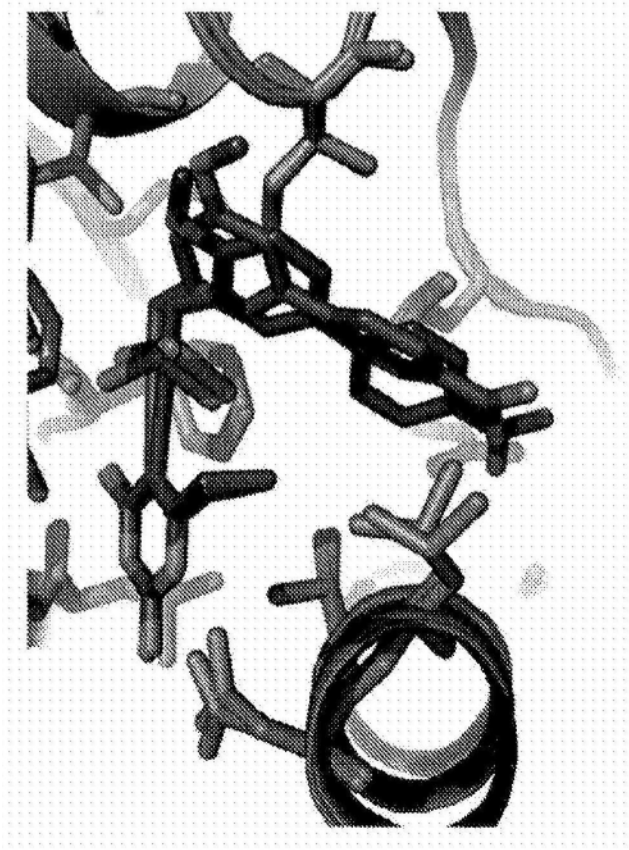


图2C

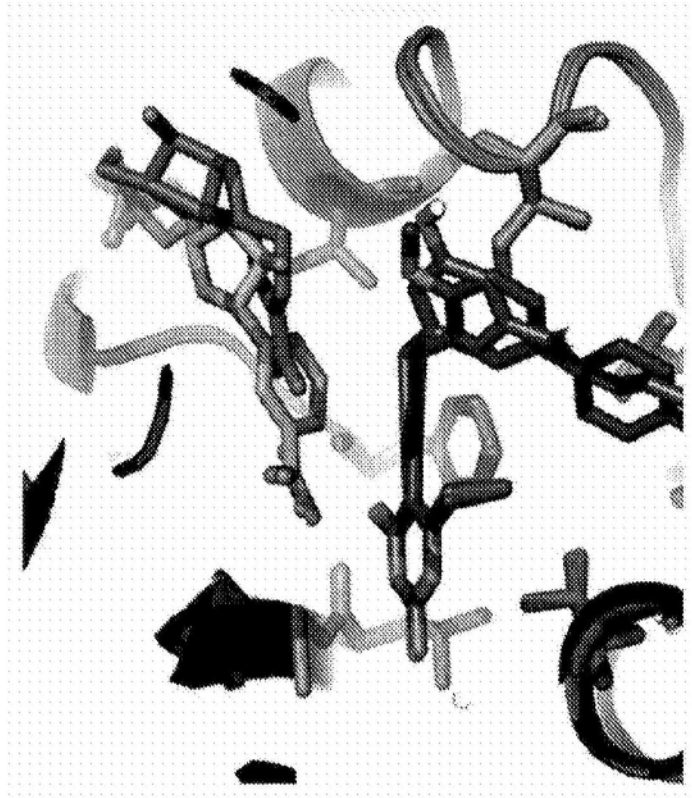


图2D