



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103328441 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 25

(21) 申请号 201180064357. 0

(22) 申请日 2011. 12. 07

(30) 优先权数据

10194154. 0 2010. 12. 08 EP

61/420, 922 2010. 12. 08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 07. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2011/050467 2011. 12. 07

(87) PCT申请的公布数据

WO2012/076016 EN 2012. 06. 14

(71) 申请人 丹麦技术大学

地址 丹麦林比

(72) 发明人 托马斯·巴恩索特 尼尔斯·霍伊比

彼得·奥斯楚普·延森

理查德·菲尔普斯

明尼克斯基·孙达拉姆·尚姆格汉姆

玛丽亚·范·格尼普

路易斯·达尔·克里斯滕森

提姆·霍姆·雅各布森 大卫·坦那

托马斯·奥斯滕费尔德·拉森

迈克尔·吉夫斯科夫

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司 31220

代理人 郑立 高为华

(51) Int. Cl.

C07C 319/22 (2006. 01)

C07C 323/65 (2006. 01)

A61K 31/105 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

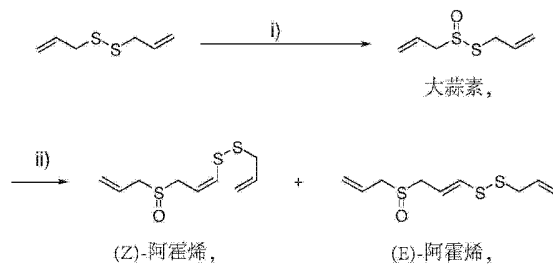
权利要求书3页 说明书15页 附图7页

(54) 发明名称

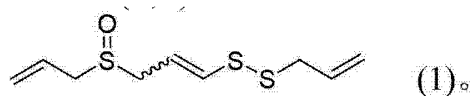
阿霍烯衍生物的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及式 (1) 的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯化合物。本发明的另一方面是包含式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯和至少一种抗生素的组合物。本发明的又另一方面涉及式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯的制备方法, 其中内部的 $-C=C-$ 键的构象可以是任一 E 或 Z 或它们的混合物, 所述方法包含在溶剂的存在下使式 (3) 的大蒜素与酸反应以提供如上定义的式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯。本发明的又另一方面是能通过上述方法可获得的式 1 的 (E, Z)-阿霍烯。



1. 式 (1) 中用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯,



2. 根据权利要求1所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述细菌感染是包含生物膜形成细菌的感染。

3. 根据权利要求2所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述生物膜形成细菌是产生 N-酰基-高丝氨酸内酯的细菌。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述细菌选自于由费氏弧菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、根癌土壤杆菌、洋葱伯克霍尔德菌、紫色色杆菌、成团肠杆菌、胡萝卜软腐欧文氏菌、菊欧文氏菌、玉米细菌性枯萎病菌、大肠杆菌、致金色假单胞菌、铜绿假单胞菌、青枯雷尔氏菌、埃特里根瘤菌、豆科根瘤菌、类球红细菌、鼠伤寒沙门氏菌、液化沙雷菌、苜蓿中华根瘤菌、鳃弧菌、哈氏弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌组成的组, 特别是铜绿假单胞菌。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述细菌感染在肺中。

6. 根据权利要求1-4任一项所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述细菌感染在慢性伤口中。

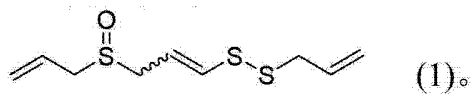
7. 根据权利要求1-6任一项所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述细菌感染是在具有免疫缺陷的哺乳动物中。

8. 根据权利要求7所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述免疫缺陷是由免疫损害疾病引起的或由使用免疫抑制剂药物治疗所引起的。

9. 根据权利要求7-8所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述哺乳动物选自于由人类、宠物和家畜组成的组。

10. 根据权利要求1-8任一项所述的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 其中所述细菌感染是在患有囊性纤维化的哺乳动物中。

11. 一种组合物, 其包含式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯和至少一种抗生素,



12. 根据权利要求11所述的组合物, 其中所述抗生素选自于由氨基糖甙类、安莎霉素类、碳头孢烯类、碳青霉烯类、头孢菌素类、糖肽类、大环内酯类、单环 β -内酰胺类、青霉素类、多肽类、喹诺酮类、磺酰胺类和四环素类组成的组。

13. 根据权利要求11-12任一项所述的组合物, 其中所述抗生素选自于由氨苄西林、巴氨西林、卡茆西林、美洛西林、哌拉西林、替卡西林、阿莫西林-克拉维酸、氨苄西林-舒巴坦、苄青霉素、氯唑西林、双氯西林、甲氧西林、苯唑西林、青霉素 G、青霉素 V、哌拉西林他唑巴坦、替卡西林克拉维酸、萘夫西林、头孢羟氨苄、头孢唑林、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢匹林、环己烯胺头孢菌素、头孢克洛、头孢孟多、头孢尼西、头孢替坦、头孢西丁、头孢丙烯、头孢美唑、头孢呋辛、氯碳头孢、头孢地尼、头孢布烯、头孢哌酮、头孢克肟、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢他啶、头孢唑肟、头孢曲松、头孢吡肟、阿奇霉素、克拉霉素、克林霉素、地红霉素、红

霉素、林可霉素、醋竹桃霉素、西诺沙星、环丙沙星、依诺沙星、加替沙星、格帕沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、莫西沙星、萘啶酸、诺氟沙星、氧氟沙星、司帕沙星、曲伐沙星、奥索利酸、吉米沙星、培氟沙星、亚胺培南-西司他丁、美罗培南、氨曲南、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、奈替米星、链霉素、妥布霉素、巴龙霉素、替考拉宁、万古霉素、地美环素、强力霉素、甲烯土霉素、米诺环素、土霉素、四环素、氯四环素、磺胺米隆、磺胺嘧啶银、磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺甲恶唑、柳氮磺吡啶、磺胺异恶唑、复方新诺明、磺胺甲二唑、利福平、利福布汀、利福平、利福喷汀、利奈唑胺、奎因普汀达福普汀、杆菌肽、氯霉素、磷霉素、异烟肼、乌洛托品、甲硝唑、莫匹罗星、呋喃妥因、呋喃西林、新生霉素、多粘菌素、大观霉素、甲氧苄啶、粘菌素、环丝氨酸、卷曲霉素、乙硫异烟胺、吡嗪酰胺、对氨基水杨酸和琥乙红霉素组成的组，特别是妥布霉素。

14. 根据权利要求 11-13 所述的用于治疗细菌感染的组合物。

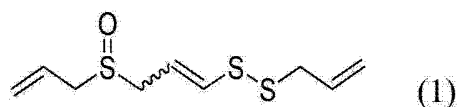
15. 根据权利要求 14 所述的用于治疗细菌感染的组合物，其中所述细菌是产生 N-酰基-高丝氨酸内酯的细菌。

16. 根据权利要求 14-15 所述的用于治疗细菌感染的组合物，其中所述细菌选自于由费氏弧菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、根癌土壤杆菌、洋葱伯克霍尔德菌、紫色色杆菌、成团肠杆菌、胡萝卜软腐欧文氏菌、菊欧文氏菌、玉米细菌性枯萎病菌、大肠杆菌、致金色假单胞菌、铜绿假单胞菌、青枯雷尔氏菌、埃特里根瘤菌、豆科根瘤菌、类球红细菌、鼠伤寒沙门氏菌、液化沙雷菌、苜蓿中华根瘤菌、鳗弧菌、哈氏弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌组成的组，特别是铜绿假单胞菌。

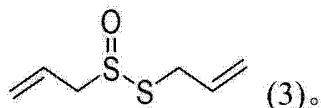
17. 根据权利要求 14-16 任一项所述的用于治疗细菌感染的组合物，其中所述细菌感染在肺中。

18. 根据权利要求 14-16 任一项所述的用于治疗细菌感染的组合物，其中所述细菌感染在慢性伤口中。

19. 一种制备式 (1) 中 (E, Z)-阿霍烯的方法，

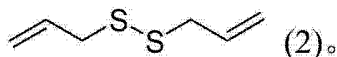


其中内部 -C=C- 键的构象可以是任一 E 型或 Z 型或其混合物，所述方法包括在溶剂的存在下使式 (3) 中的大蒜素与酸反应以提供上述定义的式 (1) 中的 (E, Z)-阿霍烯，



20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中式 (1) 中的 (E, Z)-阿霍烯的纯度为 95 ~ 99.5%，例如 97 ~ 99.5%、98 ~ 99.5%、99 ~ 99.5%，例如约 99.5%。

21. 根据权利要求 19-20 任一项所述的方法，其中式 (3) 中的大蒜素是通过使式 (2) 中的二烯丙基二硫化物与选自于由 DMDO (二甲基二环氧乙烷)、MCPBA (间氯过氧化苯甲酸)、过氧乙酸、高锰酸钾、氧化镁和 Swern 氧化剂组成的组中的氧化剂反应来提供的，



22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述氧化剂是 DMDO。

23. 根据权利要求 19-22 任一项所述的方法,其中在随后的酸处理之前纯化所述大蒜素 (3)。

24. 根据权利要求 19-23 任一项所述的方法,其中所添加的酸是羧酸、羧酸酐或磺酸。

25. 通过权利要求 19-24 所述的方法可获得的 (E, Z)-阿霍烯。

26. 根据权利要求 1-10 任一项所述的 (E, Z)-阿霍烯,其中式 (1) 中的 (E, Z)-阿霍烯是通过权利要求 19 ~ 24 中提供的方法获得的。

27. 根据权利要求 11 ~ 18 任一项所述的组合物,其中式 (1) 中的 (E, Z)-阿霍烯是通过权利要求 19 ~ 24 中提供的方法获得的。

阿霍烯衍生物的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种化学方法,其终产物展示出直接医疗应用。已经发现被称为阿霍烯的化学方法的产物对治疗细菌感染(包含生物膜形成细菌)是非常有用的,其阻断重要的群体感应控制的毒力因子的表达。本发明还涉及可通过上述化学方法获得的产物,其显示出与抗生素的协同抗菌效应。特别是,本发明涉及阿霍烯衍生物的合成,其通过将二烯丙基二硫化物氧化为大蒜素,然后使用酸处理以给定的比率获得阿霍烯 E, Z 异构体。可以对阿霍烯进行氧化以获得被氧化的变体。本发明的进一步方面涉及阿霍烯衍生物与抗生素的组合物以及阿霍烯衍生物对于治疗细菌感染(包含生物膜形成细菌)的应用。

背景技术

[0002] 细菌感染是一个全球日益严重的问题。随着充分有效的抗生素储库的耗尽,常规抗生素的广泛使用已经引起了越来越多耐药菌株的产生。

[0003] 因此,针对更深入的了解细胞感染所涉及的机理的研究日益增加。因此,已经发现各种各样的细菌通过由小的可扩散信号介导的细胞-至-细胞的通讯来协调它们的行为。这种现象被称为群体感应(QS)[W. C. Fuqua 等, J. Bacteriol., 1994, 176, p269-275], 并且在形成称为生物膜的复杂表面附着群落的细菌之间普遍存在。据美国国家卫生研究所(National Health Institute of America)估计 80% 的持续性细菌感染涉及生物膜。QS 使得细菌能够追踪它们的数量,并且被认为它们提供了一种最小化宿主反应的机制,其通过延迟毒力因子的生产直到积累了足够的细菌以压倒宿主防御机理。QS 的阻断(完全地或部分地)恢复了宿主防御系统的固有作用,其随后消除细菌入侵。因此, QS 的抑制为传统抗生素介导的杀菌或生长抑制提供了一种替代的治疗方法。

[0004] 已经显示大蒜提取物阻断 QS 并且促进快速清除由菌株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)导致的肺部感染[T. Bjarnsholt et al., Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880]。铜绿假单胞菌形成生物膜群落并且通过产生信号分子如 N-酰基高丝氨酸内酯(AHL)和喹诺酮类(PQS)利用 QS。大蒜提取物也是一种众所周知的天然药物产品,其具有抗菌和降低胆固醇的作用等等。

[0005] 先前已经证明阿霍烯[(E, Z)-4, 5, 9-三硫杂十二烷-1, 6, 11-三烯-9-氧化物]与大蒜素和其它有机硫衍生物一起为抗菌大蒜提取物中的活性成分。但是,在阿霍烯(使用 E:Z=1:4 异构体)的一项研究中,虽然为强劲的革兰氏阳性菌的生长抑制剂,但显示阿霍烯对革兰氏阴性菌具有不同的抑制作用,且对铜绿假单胞菌没有显著的生长抑制作用[R. Naganawa 等, Applied and Environmental Microbiology, 62, 1996, p. 4238-4242]。

[0006] 用于制备阿霍烯衍生物的本方法包括从大蒜提取物中阿霍烯衍生物或前体的分离以及各种合成方法。从大蒜的分离是高度繁琐且低效的,因为每 Kg 生蒜中可得到的阿霍烯的量是微少的,即在 10mg 的范围内,并且与大蒜中相关化合物的分离需要使用 HPLC。在现有技术中已经公开了阿霍烯和各种衍生物的一些合成或半合成方法。Eric Block 与合作者公开了一种合成方法,其起始为二烯丙基二硫化物或衍生物的氧化,然后加热得

到的粗制大蒜素或衍生物以形成阿霍烯和衍生物 [EP185324and Block 等, J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, p. 7045-7055]。Apitz-Castro 与合作者提出了一种半合成方法, 其中从蒜头中分离出大蒜素 (2-丙烯硫代亚磺酸烯丙酯), 然后加热并用低烷基醇处理以产生 (E, Z)-阿霍烯衍生物 [US4, 665, 088]。最近还报道了一种使用乙酸在丙酮中将提取的大蒜素转化为阿霍烯的方法, 但是使用了粗制不纯的初始原料 (即从大蒜中提取的粗制大蒜素) [W02010/100486]。但是, 上述方法中的收率通常很差或需要通过 HPLC 色谱的纯化导致高纯化成本地得到低收率的阿霍烯。另外, 这些合成方法通常缺乏对反应的 (E, Z)-异构产物的控制并同时保持高收率。

[0007] 因此, 一种替代且改进的用于制备阿霍烯衍生物的方法将是有利的。

[0008] 现在惊奇地发现, 与先前获得的相比, 能够以更高收率且更好的粗品纯度实现阿霍烯衍生物的合成, 同时通过反应条件的特定变化能改变终产物中 (E, Z) 异构体的比例。另外, 还惊奇地发现, 在单独应用以及和常规抗生素组合应用时, 阿霍烯衍生物和 / 或异构体 (包括通过上述合成方法并施用单一的层析法纯化步骤得到的那些) 的某些混合物是生物膜形成细菌的有效 QS 抑制剂。

发明内容

[0009] 因此, 本发明的一个目的涉及提供一种有效生产阿霍烯衍生物或其特定混合物的合成工序, 所述阿霍烯衍生物或其特定混合物使用 QS 抑制可应用于治疗细菌感染。

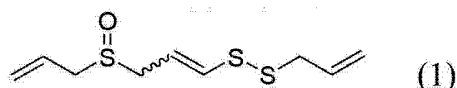
[0010] 特别地, 本发明的一个目的是提供一种以可控的 E:Z 比率制备 (E, Z)-阿霍烯 [(E, Z)-4, 5, 9-三硫杂十二烷-1, 6, 11-三烯-9-氧化物] 的方法, 其解决了现有技术的上述问题 (低产品收率和耗时和昂贵的纯化工序)。

[0011] 因此, 本发明的一方面是式 (1) 的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯。

[0012] 本发明的另一方面是一种包含式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯和至少一种抗生素的组合物。

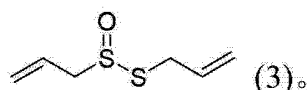
[0013] 本发明的又另一方面涉及一种制备式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯的方法,

[0014]



[0015] 其中内部 -C=C- 键的构象可以是任一 E 或 Z 或它们的混合物, 所述方法包含在溶剂的存在下使式 (3) 的大蒜素与酸反应以提供上述定义的式 (1) 的 (E, Z) 阿霍烯),

[0016]



[0017] 本发明的又另一方面是可通过上述方法获得的式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯。

附图说明

[0018] 图 1 是描绘 (E, Z)-阿霍烯衍生物合成路线的例示性流程图, 包括控制异构体的 E:Z 比率。反应条件是 i) 二甲基二环氧乙烷 (DMD0), 丙酮, $-50^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$, 30min, 96% 收率; ii) 或者 A) 20%AcOH, 40% 含水丙酮, 64°C , 4h, 36% 收率, (Z:E - 4:1) 或者 B) 20%AcOH, 40% 甲

苯, 40°C, 48h, 32% 收率, (Z:E - 1:10)。

[0019] 图 2 是描述阿霍烯的进一步氧化的衍生物的合成路线的示例性方案。反应条件是 iii) 二氯甲烷中 4 当量的过氧乙酸, 在 0°C 至室温下 12h, 38% 收率, 或者丙酮中 4 当量的 DMD0, 在 -10°C 下 6h, 82% 收率。iv) 丙酮中的高锰酸钾, 在 -20°C 下 2h, 96% 收率。v) 丙酮中 2 当量的 DMD0, 在 -10°C 下 6h, 得到 78% 收率。vi) THF 中的锂硫化物 (PhSLi), 在 -78°C ~ 0°C 下 1h, 得到 86% 收率。

[0020] 图 3 是通过 RT-PCR (暗灰色条) 和 DNA 微阵列 (浅灰色条) 测量的 rh1A 和 lasB 的基因表达的倍数变化 (- 显示为下降调节) 的比较。数据表示为三个独立实验的平均值。星 (*) 表示 Student 氏 t 检验 $P < 0.05$ 。误差线为平均值 \pm SD。

[0021] 图 4 是未经处理的 (“未添加”) 和阿霍烯治疗的浮游生长的铜绿假单胞菌中的总鼠李糖脂浓度。培养物生长于补充有 10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml 和 80 μ g/ml 的阿霍烯的培养基中 (在 40 μ g/ml 和在 80 μ g/ml 时, 鼠李糖脂含量低于 OD=1.5 的检测水平)。回收在 OD₆₀₀=1.5 (暗灰色条) 和在 OD₆₀₀=2.0 (浅灰色条) 的样品。数据表示为三个独立实验的平均值。误差线为平均值 \pm SD。

[0022] 图 5 是在第四天于 37°C 下暴露于 PMNs (单一的 PMN 由箭头指出) 180min 和随后用 DNA 染料碘化丙啶 (PI) 染色的铜绿假单胞菌的生物膜的全面的荧光和光学显微镜研究。A) 在无阿霍烯的培养基中生长出了生物膜。B) 在培养基中在 100 μ g/mL 阿霍烯存在下生长出了生物膜。红色荧光标示漏出它们的 DNA 内容物的坏死的 PMN's (如通过 PI 染色的)。绿色荧光标示铜绿假单胞菌生物膜的顶部区域。

[0023] 图 6 是在第四天用 10 μ g/ml 妥布霉素处理 24 小时后铜绿假单胞菌 PA01 (浅灰色) (A) 和临床铜绿假单胞菌分离 CF438 (浅灰色, 用 syto9 染色) (B) 的生物膜。死细胞是用 DNA 染料 PI (深灰色 / 黑色) 染色的。使用 CSLM 目测生物膜。C) 使用阿霍烯和妥布霉素处理的植入体模型。

[0024] 图 7 是使用肺部感染的小鼠模型的阿霍烯治疗的三个独立实验与未经治疗 (安慰剂) 对比的综合结果。在感染后的第一天或第三天杀死小鼠, 并且测量肺中细菌的含量。空方框表示每一个体小鼠每肺的细菌肺含量。用填充的黑色方框表示中值。使用曼-惠特尼 U 检验 (非参数的数据分析) 测试了统计学的清除差异显著性, 并且在第一天和第三天的差异的 p- 值分别为 0.9 和 0.002。

[0025] 图 8 是使用肺部感染的小鼠模型, 使用 HPLC 纯化的阿霍烯 (顶图, 阿霍烯纯度 >99.5%) 和未经 HPLC 纯化的阿霍烯 (底图, 纯度 95-99.5%) 治疗实验结果与未经治疗 (安慰剂) 的实验结果的对比。在感染的第三天杀死小鼠并测定肺中的细菌的含量。

[0026] 现在, 将在下文更详细的描述本发明。

具体实施方式

[0027] 定义

[0028] 在进一步详细论述本发明之前, 首选定义以下术语和约定:

[0029] 在本发明的上下文中, 术语 (E, Z)-阿霍烯衍生物或阿霍烯衍生物的 (E, Z)-异构体是指阿霍烯的衍生物, 其为任一分离的作为基本上纯的 E-阿霍烯衍生物、基本上纯的 Z-阿霍烯或作为 E-和 Z-阿霍烯衍生物的混合物。(E, Z) 名称是指结构中通过波形线所示

的阿霍烯内部的 $-C=C-$ 双键的构型可以变化。术语“衍生物”是指异构体 (E) 和 (Z) 两者以及它们的混合物, 并且还指 (E, Z) 阿霍烯的氧化的和 / 或还原的衍生物以及它们的混合物。

[0030] 本文中定义的氧化剂是能够将分子的氧化态从其初始氧化态改变为更高氧化态的任何化学反应物。类似地, 还原剂是能够将分子的氧化态从其初始氧化态改变为更低氧化态的任何化学反应物。

[0031] 在本发明的上下文中, 酸包含无机酸和有机酸两者。这包括有机酸酐或任何其它前体酸。本文中定义的前体酸是在特定条件下能够转化为酸的任何化合物。此类条件可以包括加热或接触含水环境。也可以推断为酸的任何混合物。

[0032] 本文所述的生物膜是指任何聚集的但通常不一定为嵌入在生物聚合物基质中的细菌的表面束缚(固着)群落, 与它们的浮游对应物相比, 其显示出例如对抗生素和先天免疫系统的重要部分的增加的抗性。

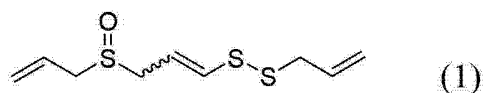
[0033] 在本发明的上下文中, 术语群体感应 (QS) 是指通过由低分子量可扩散信号分子传递的细胞-至-细胞的通信来操作的细菌行为协调机制。QS 系统在初次感染事件中发挥重要作用。通过采用三种 QS 系统(表示为 Las、RhI 和 PQS) 以控制其毒力因子的重要储库的表达, 其中许多为抗原决定簇, 某些细菌如铜绿假单胞菌能够以隐蔽的方式运行直到某些细胞密度达到 QS 系统被激活和毒力和免疫防护被开启。一旦 QS 系统被激活, 即发生组织破坏和降解毒力因子的免疫防御的协调释放。

[0034] 并且在本上下文中, 将产生 N-酰基-高丝氨酸内酯的细菌定义为在群体感应期间在它们的细胞-至-细胞的通信中利用 N-酰基-高丝氨酸内酯作为信使分子的细菌。

[0035] 在本文中定义的群体感应抑制剂或 QS-抑制剂是能够抑制细菌 QS 基通信的物质或物质的混合物。通过调节基因中的突变或通过 QS 抑制剂对 QS 过程的阻断使得所述细菌更容易受到两种常规抗生素的攻击, 特别是氨基糖甙类如妥布霉素和细胞宿主防御的重要组成部分如 PMN-白细胞(多形核白细胞)。

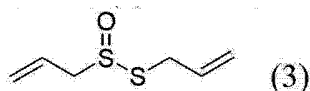
[0036] 如上所述, 本发明的第一方面提供一种制备通式 (1) 的化合物的方法,

[0037]



[0038] 其也称为 (E, Z)-阿霍烯。其内部的 $-C=C-$ 键的构象可以为任一 E 或 Z 或它们的混合物。所述方法包含提供也称为大蒜素的式 (3) 的中间体化合物,

[0039]



[0040] 并且在溶剂的存在下用酸处理所述式 (3) 的化合物以提供以上定义的式 (1) 的化合物。在一个优选的具体实施方式中, 含有化合物 (3) 的溶液的浓度可以是 0.06-6.0M, 优选 0.12-3.0M, 0.24-1.5M, 0.48-0.8M, 如 0.6M。可以以过量的量或化学计量的量加入酸, 但通常可以是以催化剂量加入, 如 5-50mol%, 10-40mol%, 15-30mol% 如 20mol%。在一个优选的具体实施方式中, 向中间体 (3) 至式 (1) 的化合物的转化中加入的酸可以是许多种酸, 如羧酸(包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸或三氟乙酸 (TFA)) 或对-甲苯磺酸 (TsOH)、甲磺

酸 (MsOH)、樟脑磺酸 (CSA)。优选的酸是乙酸。酸的选择对获得的 E:Z 异构体的比例有影响,即使用的酸和获得的相应的 E:Z 比可以是例如,当使用 40V/V% 的含水丙酮作为溶剂时,三氟乙酸 (E:Z= 约 1:1),对 - 甲苯磺酸 (E:Z= 约 1:4),甲磺酸 (E:Z= 约 1:4) 和樟脑磺酸 (E:Z= 约 1:5)。

[0041] 在提供式 (1) 的化合物的酸处理的优选的具体实施方式中,使用的溶剂为 10-70V/V% 含水丙酮,优选 20-60V/V%,30-50V/V%,如 40V/V% 含水丙酮 (即 60% 丙酮在 40% 水中)。在添加酸之后,可以将反应温度调节至 0-100℃ 的范围内,优选 20-80℃,例如 40-70℃,优选 50-65℃,例如 64℃。反应时间可以为 1-24h,优选 2-10h,例如 3-5h,优选 4h。当在酸处理中使用乙酸时,使用含水丙酮作为溶剂以 1:2-1:6 的 E:Z 比提供式 (1) 的化合物,优选 1:3-1:5,例如约 1:4。

[0042] 在以上所述的提供式 (1) 的化合物的方法的又另一优选的具体实施方式中,在中间体 (3) 的酸处理期间使用的溶剂是甲苯或含水苯。所述含水苯可以是 1-50V/V% 含水苯,优选 5-30V/V%,例如 7-20V/V%,优选 10V/V% 含水苯 (即 90% 苯在 10% 水中)。在加入酸之后,可以将反应温度调节至 0-100℃ 的范围内,优选 10-80℃,例如 20-60℃,优选 30-50℃,例如 40℃。在甲苯或含水苯中所述酸处理的反应时间可以是 2-96h,优选 24-72h,例如 36-60h,优选 48h。当在酸处理中使用乙酸时,使用甲苯或含水苯作为溶剂以 6:1-20:1 的 E:Z 比提供式 (1) 的化合物,例如约 10:1。

[0043] 所获得的产物的纯化通常可使用标准溶剂萃取技术然后通过柱色谱纯化来进行,但也可以使用其它方法,如蒸馏、制备薄层色谱法或固体化合物的结晶。

[0044] 在化合物 (1) 的纯化的一个优选的具体实施方式中,将反应混合物冷却至室温并且使用 3 体积 1:1 水和甲醇的混合物稀释,然后使用非极性溶剂 (如戊烷) 萃取。可以用硫酸铵饱和含水组分并用比戊烷极性更强的溶剂 (如二氯甲烷) 进一步萃取。可以通过浓缩合并的有机萃取液并使用在戊烷中包含 40-99V/V% 乙酸乙酯 (优选 50-90V/V%,60-80V/V%,如 70V/V%) 的洗脱液流动相将粗产物通过硅胶柱色谱来分离 (E, Z)-阿霍烯 (1)。

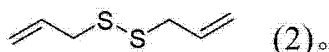
[0045] 经过上述工序后, (E, Z)-阿霍烯的纯度可以为 95-99.5%,例如 97-99.5%,98-99.5%,99-99.5% 如约 99.5%。本发明人惊奇地发现,一旦进一步纯化在通过柱色谱后获得的产物,例如使用反相 HPLC 色谱或其它纯化步骤,所述 (E, Z)-阿霍烯产物失去其生物活性的全部或部分,在例如实施例所述的检测中。当例如使用 HPLC 分离纯的 (E)-阿霍烯和 / 或纯的 (Z)-阿霍烯时,也发现了这种现象。推测少量 (例如低于 5%,3%,2%,1%,例如低于 0.5%) 的阿霍烯衍生化学物 (即与阿霍烯相关的化合物) 在 (E, Z)-阿霍烯和衍生物的稳定中可能是非常重要的,对于降解,例如氧化、还原和 / 或裂解,在体外和体内都是重要的。

[0046] 本发明的一个具体实施方式是如上所述的方法,其中式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯进行不超过一个色谱纯化步骤。所述色谱纯化步骤不包含反相 HPLC。

[0047] 经纯化后,可以以基于化合物 (3) 至少为 10mol% 的收率分离出作为异构体混合物的 (E, Z)-阿霍烯衍生物,优选至少 15mol%、20mol%、25mol%,例如至少 30mol%。

[0048] 在一个具体实施方式中,式 (3) 的大蒜素可以通过用氧化剂也称为二烯丙基二硫化物 (DADS) 的式 (2) 的化合物处理来制备。

[0049]

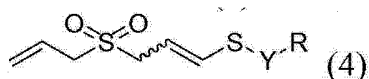


[0050] 在所述方法的一个有用的具体实施方式中,用于将式 (2) 的化合物氧化至式 (3) 的化合物的氧化剂可以选自于由 DMDO、MCPBA、过氧乙酸、高锰酸钾、氧化镁和 Swern 氧化剂 (例如草酰氯、二甲亚砜 (DMSO) 和有机碱,如三乙胺) 组成的组。DMDO 为优选的氧化剂,因为其提供最高的收率。相对于化合物 (2) 的量,可以以起催化作用的量或化学计量的量加入氧化剂,但优选以过量的量加入,如 1.01-10.0mol 当量,优选 1.05-5.0mol 当量,例如 1.07-2.0mol 当量,优选 1.10mol 当量。可以有利地在低温下,在几分钟的时间内将式 (2) 的化合物加入至所述氧化剂的溶液中。所述溶液中氧化剂的浓度可以是 0.001-1.0M,优选 0.005-0.5M,0.01-0.1M,例如 0.07M。所述溶液可以是在低温下能够保持为流体的溶剂中,例如丙酮、二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳、二乙醚、乙酸乙酯或四氢呋喃。在加入化合物 (2) 时溶液的温度可以为 -100°C ~ 10°C , 优选 -80°C 至 -10°C , -60°C 至 -40°C , 例如 -50°C 。可以 1-120min 的一段时间内加入化合物 (2), 优选 5-90min, 7-60min, 10-30min, 12-20min, 例如 15min。在向溶液中加入化合物 (2) 之后,可有利地在 10-120min (优选 15-90min, 20-60min, 25-40min, 例如 30min) 的时间内将其缓慢地加热 $10-60^{\circ}\text{C}$, 优选 $20-40^{\circ}\text{C}$, 例如 30°C 。通过蒸发溶剂的浓缩提供粗制形式的中间体化合物 (3), 其纯度为至少 80mol%, 优选至少 85mol%, 至少 90mol%, 例如至少 95mol%。

[0051] 粗品大蒜素 (3) 无需进一步纯化即可使用,并且在以下步骤中仍然提供良好的收率。这可能归因于氧化工序中缺乏酸的存在,其似乎有助于氧化期间和随后的存储中大蒜素的降解。但是,在一个优选的具体实施方式中,在随后的酸处理之前,可以有利地纯化大蒜素 (3) 以充分地分离大蒜素 (3)。发现这在随后的酸处理步骤中提供了更加清洁的反应和更高的收率以提供式 (1) 的化合物。可以使用任何常规纯化方法进行纯化,优选硅胶柱色谱法。色谱法可以使用由二乙醚在戊烷中的混合物组成的流动相洗脱剂来进行,优选戊烷中有 0.5-20V/V% 二乙醚,例如 1-10V/V%, 2-8V/V%, 3-7V/V%, 4-6V/V%, 优选 5V/V%。如此,以基于化合物 (2) 至少为 80mol% 的收率获得了式 (3) 的化合物,优选至少 85mol%, 至少 90mol%, 例如至少 95mol%。

[0052] 在本发明的第二方面,提供了一种制备式 (4) 的化合物的方法,

[0053]



[0054] 其中 Y 选自于 -S-、-S(O) 或 -S(O)₂-, R 选自于烯丙基、苯基、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、苄基、对甲苯酰基、间甲苯酰基、邻甲苯酰基,并且内部的 -C=C- 键的构象可以为任一 E 或 Z 或它们的混合物。本方法包含如上定义的用于制备式 (1) 的化合物的方法,然后进行包括使式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯与至少一种附加的氧化剂反应的附加反应步骤,以提供其中 R 为烯丙基的式 (4) 的化合物,并且任选地使式 (4) 的化合物与 R 取代的锂硫化物 (R-SLi) 反应以提供其中 R 为苯基、甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、苄基、对甲苯酰基、间甲苯酰基或邻甲苯酰基的式 (4) 的化合物。

[0055] 在如上定义的方式的一个具体实施方式中,用于将式 (1) 的化合物氧化至式 (4) 的化合物的第二氧化剂可以选自于由 DMDO、MCPBA、过氧乙酸、高锰酸钾、过氧化氢、双 TMS 过氧化物、或任何温和过氧化物组成的组。所述与 R-取代的锂硫化物的反应可以在四氢呋喃溶剂中在 -78°C 至 0°C 下进行。反应时间可以为 30min 至 24 小时,优选 30min 至 2 小时。

[0056] 式 (4) 的化合物的纯化可以以与上述式 (1) 的化合物的类似方式进行。

[0057] 获得的通式 (4) 的化合物可以分离为 (E, Z)-异构体的混合物, 或者可以分开这些异构体以提供基本上纯的 (E)-异构体或基本上纯的 (Z)-异构体。此外, 具有不同氧化态的 Y (即 Y 等于 -S-, S(O)-或 -S(O₂)-) 的式 (4) 的化合物可以为任一分开的异构体或分离为异构体的混合物。

[0058] 本发明的另一个具体实施方式为通过上述方法获得的式 (1) 的化合物或者为通过上述方法可获得的式 (1) 的化合物。如上所述, 上述方法产生良好的粗品纯度, 这使得只要使用一个色谱纯化步骤, 已经证明这对于获得更多生物活性的 (E, Z)-阿霍烯衍生物 (1) 是至关重要的。可以说此类活性阿霍烯衍生物具有 95-99.5% 范围的纯度, 例如约 97-99.5%, 98-99.5%, 99-99.5% 如约 99.5%。优选地, 获得的 (E, Z) 阿霍烯的 E:Z 比率可以为从 20:1 到 1:10, 例如从 15:1 至 1:6, 12:1 至 1:5, 优选从约 10:1 至约 1:4。或者, 优选地 E:Z 比可以为从 1:1 至 1:10, 如从 1:2 至 1:8, 1:3 至 1:5, 优选约 1:4。

[0059] 本发明的又进一步方面是包含具有式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯和至少一种抗生素的组合物。可以通过上述的方法或提供生物活性 QS-抑制 (E, Z)-阿霍烯产物的任何其它方法来获得所述化合物 (即, 具有可获得的 E:Z 比的 (E, Z)-阿霍烯, 包括纯 E 或纯 Z)。此类组合物可以用于配制药剂, 并因此可以配制为包含具有式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯、至少一种抗生素和药学上可接受的载体和 / 或粘合剂的药剂或剂型。所述药剂可以配制为液体或固体剂型, 其中液体组合物可以包括局部给药用液体组合物, 静脉注射、肌肉注射或皮下注射用液体组合物, 或作为气雾剂的吸入剂用液体组合物。固体剂型可以包括片剂、胶囊剂、粉剂、包括吸入剂用粉剂。还推断其中 (E, Z)-阿霍烯以上述方式之一给药而抗生素以任一其它上述方式给药的具体实施方式。例如, 阿霍烯可以通过吸入法给药 (通过粉末剂或气雾剂), 而抗生素通过静脉注射给药。

[0060] 组合物中 (E, Z) 阿霍烯的 E:Z 比可优选地为从 20:1 至 1:10, 例如从 15:1 至 1:6, 12:1 至 1:5, 优选地为从约 10:1 至约 1:4。或者 E:Z 比可优选地为从 1:1 至 1:10, 例如从 1:2 至 1:8, 1:3 至 1:5, 优选地约 1:4。

[0061] 因此, 一个具体的实施方式为上述的组合物, 其包含具有式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯和至少一种抗生素, 其用于治疗感染, 优选地为包含生物膜形成细菌的细菌感染。

[0062] 此类组合物的一个优点是当在组合物中与抗生素一起使用 QS-抑制剂时获得了协同效应, 如本文所示。在本发明的上下文中, 抗生素定义为抗菌作用不是基于 QS 抑制的任何抗菌物质。典型地, 与 QS-抑制剂组合使用的抗生素可以分类为任一杀菌剂或抑菌剂。杀菌剂直接杀死细菌, 而抑菌剂防止细菌分裂。抗生素的分类包括氨基糖甙类、安莎霉素类、碳头孢烯类、碳青霉烯类、头孢菌素类、糖肽类、大环内酯类、单环 β -内酰胺类、青霉素类、多肽类、喹诺酮类、磺酰胺类和四环素类。抗生素可以选自于这些类的任何一种。

[0063] 所述抗生素可以选自于由氨苄西林、巴氨西林、卡茆西林、美洛西林、哌拉西林、替卡西林、阿莫西林-克拉维酸、氨苄西林-舒巴坦、苄青霉素、氯唑西林、双氯西林、甲氧西林、苯唑西林、青霉素 G、青霉素 V、哌拉西林他唑巴坦、替卡西林克拉维酸、萘夫西林、头孢羟氨苄、头孢唑林、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢匹林、环己烯胺头孢菌素、头孢克洛、头孢孟多、头孢尼西、头孢替坦、头孢西丁、头孢丙烯、头孢美唑、头孢呋辛、氯碳头孢、头孢地尼、头孢布烯、头孢哌酮、头孢克肟、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢他啶、头孢唑肟、头孢曲松、头孢吡

肱、阿奇霉素、克拉霉素、克林霉素、地红霉素、红霉素、林可霉素、醋竹桃霉素、西诺沙星、环丙沙星、依诺沙星、加替沙星、格帕沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、莫西沙星、萘啶酸、诺氟沙星、氧氟沙星、司帕沙星、曲伐沙星、奥索利酸、吉米沙星、培氟沙星、亚胺培南-西司他丁、美罗培南、氨曲南、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、奈替米星、链霉素、妥布霉素、巴龙霉素、替考拉宁、万古霉素、地美环素、强力霉素、甲烯土霉素、米诺环素、土霉素、四环素、氯四环素、磺胺米隆、磺胺嘧啶银、磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺甲恶唑、柳氮磺吡啶、磺胺异恶唑、复方新诺明、磺胺甲二唑、利福平、利福布汀、利福平、利福喷汀、利奈唑胺、奎因普汀达福普汀、杆菌肽、氯霉素、磷霉素、异烟肼、乌洛托品、甲硝唑、莫匹罗星、呋喃妥因、呋喃西林、新生霉素、多粘菌素、大观霉素、甲氧苄啶、粘菌素、环丝氨酸、卷曲霉素、乙硫异烟胺、吡嗪酰胺、对氨基水杨酸和琥乙红霉素组成的组。例如所述抗生素可以是妥布霉素。

[0064] 本发明的一个方面是式 (1) 的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯, 优选包含生物膜形成细菌的细菌感染。

[0065] 本发明的另一方面是通过本文所述的方法获得的式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯, 其用于治疗细菌感染, 优选包含生物膜形成细菌的细菌感染。

[0066] 因此以下描述的具体实施方式涉及一般地 (E, Z)-阿霍烯, 并且也涉及本文所述的方法中提供的 (E, Z)-阿霍烯, 并且最终还涉及包含上述 (E, Z)-阿霍烯和抗生素的组合物。

[0067] 所获得的 (E, Z) 阿霍烯的 E:Z 比可优选地为从 20:1 至 1:10, 例如从 15:1 至 1:6, 12:1 至 1:5, 优选为从约 10:1 至约 1:4。或者 E:Z 比可优选为从 1:1 至 1:10, 如从 1:2 至 1:8, 1:3 至 1:5, 优选为约 1:4。

[0068] 细菌感染 (包括包含生物膜形成细菌的那些) 的治疗可以是预防性的。所使用的化合物可以在具有抗生素和 / 或药学上可接受的载体的组合物中。所述化合物或组合物可以通过静脉内注射、肌肉注射或皮下注射、口服、局部给药或者它们可以被吸入 (优选地使用合适的吸入装置)。它们可以作为固体组合物 (例如粉末剂) 或作为气雾剂形式的液体组合物而被吸入。

[0069] 在一个具体实施方式中, 所治疗的细菌感染是在具有免疫缺陷的哺乳动物中。在本发明的上下文中, 具有免疫缺陷的哺乳动物是由于任何原因免疫受损的哺乳动物, 是指天然防御的部分或所有方面的性能比正常的低。典型地, 这可能是由于免疫损害疾病或由于使用免疫抑制剂药物治疗所引起的。这种哺乳动物处于较高的生物膜形成细菌 (如铜绿假单胞菌) 的感染风险, 因此可潜在地受益于用 QS 抑制剂的预防性和急性治疗, 所述 QS 抑制剂可以处于具有抗生素的组合物中。哺乳动物可以包含人类、宠物和家畜, 或者哺乳动物可选自于由人类、宠物和家畜组成的组。免疫损害疾病包括选自于由囊性纤维化、糖尿病、COPD、恶性血液病、癌症、HIV、AIDS、慢性伤口、烧伤伤口组成的组中的疾病。患者可包括患有留置导尿管的患者, 用医疗器械、植入物、支架治疗的患者和处于 ICU 的患者。

[0070] 在本发明的一个优选的具体实施方式中, 所述细菌特别是引起上述感染的生物膜形成细菌可以选自于能够 QS 控制毒力的细菌的组, 如革兰氏阴性菌, 特别是以下革兰氏阴性菌的组: 费氏弧菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、根癌土壤杆菌、洋葱伯克霍尔德菌、紫色色杆菌、成团肠杆菌、胡萝卜软腐欧文氏菌、菊欧文氏菌、玉米细菌性枯萎病菌、大肠杆菌、致金色假单胞菌、铜绿假单胞菌、青枯雷尔氏菌、埃特里根瘤菌、豆科根瘤菌、类球红细

菌、鼠伤寒沙门氏菌、液化沙雷菌、苜蓿中华根瘤菌、鳗弧菌、哈氏弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌，特别是铜绿假单胞菌。

[0071] 本发明的又一附加优选的具体实施方式为式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯，其用于治疗细菌感染，其中所述感染区域为伤口，例如慢性伤口和 / 或不愈合伤口。在这些情形下，所述化合物可有利地局部给药。

[0072] 另一个有用的具体实施方式是式 (1) 的用于治疗细菌感染的 (E, Z)-阿霍烯，其中感染区域是肺。该治疗特别是与囊性纤维化患者相关，由于他们降低的免疫应答使得所述患者经常患有持续性肺部感染，包含生物膜形成细菌，如铜绿假单胞菌。因此，一个优选的实施方式是式 (1) 的 (E, Z)-阿霍烯，其用于治疗细菌感染，其中感染区域为囊性纤维化患者的肺。在这些情形下，所述化合物可以有利地通过吸入或通过静脉注射给药。

[0073] 在另一优选的具体实施方式中，所述感染区域为植入物或植入物周围的区域。本文所定义的植入物是制备用于替代或充当哺乳动物中失去的生物结构的医疗装置。此类植入物可包括含有电子器件的植入物（如人工起搏器和耳蜗植入物）、可植入药丸或药物洗脱支架形式的皮下药物输送装置、假体装置（如骨替代品和支撑装置或牙种植体）。

[0074] 在又另一个具体实施方式中，所述感染区域可以是部分的消化系统，如胃和 / 或肠。此种感染可包括食物中毒或由胰腺或胆道支架引起的感染。

[0075] 应该注意的是描述于上下文中本发明的方面之一的具体实施方式和特征也适用于本发明的其它方面。另外，以上描述的用于治疗各种指征的化合物和组合物的所有上述具体实施方式全部都可以同样地描述为通过给药所述化合物或组合物以治疗所述指征的方法。

[0076] 本申请中引用的所有专利和非专利参考文献都通过引用的方式全部地并入本文。

[0077] 现在将在下面的非限制性实施例中进一步详细描述本发明。

[0078] 实施例

[0079] 实施例 1：化合物 (3)，大蒜素的合成

[0080] 在 -50℃ 在氩气下，于 15min 内向在丙酮 (1mL) 中的化合物 (2) 二烯丙基二硫化物 (0.29g, 2.0mmol) 中滴加 DMDO 的丙酮溶液 (31mL, 0.07M, 2.2mmol)。将得到的浅黄色的反应混合物搅拌 30min，同时缓慢地加温至 -20℃。在真空中浓缩得到的澄清的反应混合物。通过柱色谱（使用具有 5%Et₂O 的戊烷洗脱）进一步纯化粗品残留物 (0.31g, 98%) 以产出浅黄色液体的化合物 (3) 大蒜素 (0.31g, 1.9mmol, 96% 收率，纯度 >95% 且多达 99.9%)。

[0081] 在基于溶液和温度的不同条件下重复上述反应。其余参数保持不变。如以下表 1 所示，在许多条件下所述反应都是有效的。

[0082]

条目	溶剂	温度	2/收率
1	丙酮	-100℃, 78℃, -50 ~ -20℃	96%
2	CH ₂ Cl ₂	-100℃, 78℃, -50 ~ -20℃	90%
3	CHCl ₃	-70 ~ -60℃	92%
4	CCl ₄	-78 ~ -60℃	96%
5	Et ₂ O	-50 ~ -20℃	86%
6	EtOAc	-50 ~ -20℃	80%
7	THF	-50 ~ -20℃	85%

[0083] 表 1 :二烯丙基二硫化物向大蒜素 (3) 的转化

[0084] 实施例 2 :化合物 (1), (E, Z)-阿霍烯的合成 (使用丙酮溶剂)

[0085] 使用 AcOH(0.011mL, 0.2mmol) 处理在 40% 含水丙酮溶液 (1.6mL) 中的化合物 (3) 大蒜素 (0.162g, 1.0mmol) 的溶液。将得到的混合物加热至 64℃ 4h。使用 50% 的含水甲醇 (6mL) 稀释冷却的反应混合物, 并且使用戊烷 (5x10mL) 萃取。使用固体 NH₄SO₄ 饱和含水组分, 并且使用 CH₂Cl₂ (5x10mL) 萃取所述混合物。干燥 (Na₂SO₄) 合并的有机提取物并在真空下浓缩。通过柱色谱 (使用具有 60-80%EtOAc 的戊烷洗脱) 进一步纯化粗品残留物 (0.16g) 以产出作为浅黄色液体的化合物 (1), (E, Z)-阿霍烯 (E:Z 比 =1:4, 0.025g, 0.1mmol, 32% 收率)。

[0086] 使用各种酸重复上述反应。其余参数保持与上述相同。如以下表 2 所示, 酸的变换对两者阿霍烯的收率和 E:Z 比都有影响:

[0087]

条目	酸	条件	收率(E:Z)
1	TsOH	40%含水丙酮, 64℃, 4h	24 (1:4)
2	CSA	40%含水丙酮, 64℃, 4h	20 (1:5)
3	MsOH	40%含水丙酮, 64℃, 4h	22 (1:4)
4	TFA	40%含水丙酮, 64℃, 4h	12 (1:1)

[0088] 表 2 :使用不同的酸大蒜素 (3) 向 (E, Z) 阿霍烯 (1) 的转化

[0089] 重要地, 发现当使用少于高纯度大蒜素 (3) 时, 上述反应中的收率急剧减少, 如果不为零。还发现当使用现有技术方法去获得大蒜素 (3) 时, 源自于任一大蒜提取物或反应物或大蒜素的嵌段合成中使用的产品的一些杂质导致阿霍烯的收率不高于 6-12%。不论在阿霍烯的合成中使用哪种溶剂和酸, 这都适用。

[0090] 实施例 3 :化合物 (1), (E, Z)-阿霍烯 [E:Z=10:1] 的合成

[0091] 使用 AcOH(0.011mL, 0.2mmol) 处理在 10% 含水苯溶液 (1.6mL) 中的化合物 (3) 大蒜素 (0.162g, 1.0mmol) 的溶液。将得到的混合物加热至 37℃ 48h。使用 50% 的含水甲醇 (6mL) 稀释冷却的反应混合物, 并且使用戊烷 (5x10mL) 萃取。使用固体 NH₄SO₄ 饱和含水组分, 并且使用 CH₂Cl₂ (5x10mL) 萃取所述混合物。干燥 (Na₂SO₄) 合并的有机提取物并在真空下浓缩。使用柱色谱 (使用具有 60-80%EtOAc 的戊烷洗脱) 进一步纯化粗品残留物 (0.15g) 以产出作为浅黄色液体的化合物 (1) (E, Z)-阿霍烯 (E:Z 比 10:1, 0.023g, 0.1mmol, 30% 收率)。

率)。

[0092] 实施例 4 : 式 (4) 的化合物的合成

[0093] 已经显示 (E, Z) 阿霍烯的氧化砜衍生物具有 QS 抑制作用。因此, 使用下述各种途径合成了此类衍生物, 即式 (4) 的化合物 (也参见图 2) :

[0094] Y=S, R= 烯丙基

[0095] 在 -20°C 下于丙酮中使用高锰酸钾 (KMnO_4) 处理式 (1) 的化合物 ((E, Z) 阿霍烯) 2 小时以获得具有 Y=S 且 R= 烯丙基的式 (4) 的化合物, 96% 收率。检查与纯化与用于 (E, Z) 阿霍烯的类似。

[0096] Y=S(O)₂, R= 烯丙基

[0097] 在 0°C 下于二氯甲烷中使用过氧乙酸处理式 (1) 的化合物 ((E, Z) 阿霍烯) 12 小时以得到具有 S(O)₂、R= 烯丙基的式 (4) 的化合物, 38% 收率。检查与纯化与用于 (E, Z) 阿霍烯的类似。

[0098] 或者, 在 -10°C 下于丙酮中使用 4 当量的 DMDO 处理式 (1) 的化合物 ((E, Z) 阿霍烯) 6 小时以获得具有 S(O)₂、R= 烯丙基的式 (4) 的化合物, 82% 收率。检查与纯化与用于 (E, Z) 阿霍烯的类似。

[0099] 在以另一个替代的途径中, 在 -10°C 下于丙酮中使用 2 当量的 DMDO 处理上述 Y=S 且 R= 烯丙基的式 (4) 的化合物 6 小时以得到具有 S(O)₂、R= 烯丙基的式 (4) 的化合物, 78% 收率。

[0100] Y=S, R= 苯基

[0101] 在 -78°C 的温度下于四氢呋喃中使用锂硫化物 (PhSLi) 处理其中 Y=S(O)₂、R= 烯丙基的式 (4) 的化合物, 在 1 小时内使温度上升至 0°C 以获得具有 Y=S、R= 苯基的式 (4) 的化合物, 86% 摩尔收率。

[0102] Y=S, R= 甲基、乙基、苄基

[0103] 与其中 Y=S、R= 苯基的上述方法类似, 使用相应的锂硫化物 (即, MeSLi 、 EtSLi 和 烯丙基 SLi) 以相似的收率生产了具有 R= 甲基、乙基、苄基的式 (4) 的相应化合物。其余参数保持不变。

[0104] 实施例 5 : 通过阿霍烯处理调节的铜绿假单胞菌基因

[0105] 使用 DNA 微阵列分析来鉴别通过阿霍烯治疗所调节的基因。我们使用先前被 Hentzer 等 [M. Hentzer 等, EMBO J., 2003, 22, p. 3803-3815] 确定的 QS 调节子作为参照并且将这些数据用于验证假定群体感应抑制 (QSI) 化合物的靶向特异性。使用以下四种浓度的阿霍烯处理呈指数生长的铜绿假单胞菌培养物: $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($42.7\text{ }\mu\text{M}$), $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($85.4\text{ }\mu\text{M}$), $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($170.8\text{ }\mu\text{M}$) 和 $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($341.6\text{ }\mu\text{M}$)。使用具有 1:4 的 E:Z 比的 (E, Z) 阿霍烯。这些浓度不发挥任何生长抑制作用。在 OD_{600nm} 为 2.0 (光密度) 时回收样品, 因为先前的调查显示在该细胞密度时 QS 基因的活性最高。将经处理的培养物的基因表达与未经处理的控制进行比较。

[0106] 一般来说, 只有少量的基因被四个不同浓度的阿霍烯下调超过 5 倍: 在 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 阿霍烯为 0 基因, 在 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 阿霍烯为 0 基因, 在 $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ 阿霍烯为 2 基因和在 $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ 阿霍烯为 11 基因。上调超过 5 倍的基因的量在经治疗的培养物之间没有显著的不同。根据我们的实验设置, 总数为 163 个 QS 控制的铜绿假单胞菌基因 (根据 Hentzer 等, [M.

Hentzer 等,EMBO J., 2003, 22, p. 3803-3815]) 中有 10 个的表达被阿霍烯处理下调。80 μ g/ml 浓度的阿霍烯影响总数为 5570 个铜绿假单胞菌基因中的 11 个的表达。因此,阿霍烯对于 QS 控制的基因的亚类具有高度的特异性(表 3)。

[0107]

基因号	基因	[阿霍烯] μg/ml				描述
		10	20	40	80	
PA0852	cbpD	-2.8	-2.5	-3.9	-6.9	几丁质结合蛋白
PA1871	lasA	-2.6	-2.2	-3.0	-8.7	LasA 蛋白酶酶原
PA2069	-	-2.3	-2.4	-4.0	-5.3	可能的氨基甲酰转移酶
PA2146	-	-1.3	-1.8	-2.6	-7.3	保守假定蛋白
PA2300	chiC	-2.5	-2.1	-5.1	-24.6	几丁质酶
PA2570	palL	-1.8	-2.0	-3.3	-6.3	LecA
PA3478	rhlB	-2.6	-2.0	-3.3	-8.7	鼠李糖基转移酶链B
PA3479	rhlA	-2.2	-1.5	-2.6	-8.8	鼠李糖基转移酶链A
PA4141	-	-1.0	-1.1	-1.3	-5.4	假定蛋白
PA4142	-	-2.0	-2.2	-2.7	-5.1	可能的分泌蛋白
PA4175	prpL	-3.7	-3.3	-5.3	-6.8	Pvds-调节的内切蛋白酶

[0108] 表 3 :通过阿霍烯对基因表达的改变。通过 80 μ g/ml 阿霍烯治疗对包括的基因下调了 >5 倍。数字为与未经治疗的控制相比基因表达的倍数改变。数据代表三个独立实验的平均值。Student 氏 t 检验,* 表示 P<0. 05,** 表示 P<0. 01。

[0109] 基因中被阿霍烯显著下调的是以下 QS 调节的重要的毒力因子, LasA 蛋白酶(lasA, PA1871), 几丁质酶(chiC, PA2300), 细胞毒素的亲乳凝集素(lecA, PA2570), 鼠李糖基转移酶AB操纵子(rhlA, PA3478 和 rhlB, PA3479), 降解酪蛋白、弹性蛋白、乳铁蛋白、转铁蛋白和核心蛋白聚糖的 PvdS- 调节的内切蛋白酶(prpL, PA4175), 和相关的几丁质结合蛋白cbpD(PA0852)(其介导向含几丁质的底物的结合并可能协助生物膜形成。lasB的下调不大于 5 倍。

[0110] 实施例 6 :微阵列数据的验证

[0111] 为了验证微阵列数据,使用两个关键 QS 基因进行 RT-PCR :lasB 和 rhlA(参见图 3)。当比较这两种方法时,对 lasB 和 rhlA 基因表达的抑制两者都遵循相同的趋势,使用基于 RT-PCR 的方法观察到一般略微增加的倍数减少。RT-PCT 数值显示 80 μ g/ml 浓度的阿霍烯降低了 rhlA 的表达几乎 12 倍且 lasB 几乎 5 倍。rhlA 的表达主要由 RhI QS 系统和信号分子 BHL 所控制,而 lasB 的表达受到 Las 和 RhI QS 系统两者以及信号分子 OdDHL 和 BHL 的浓度的影响。根据 Rasmussen 等,[Rasmussen 等, Microbiology, 2005, 151, p. 1325-

1340], 列于表 3 中的基因 (除了 prpL, 其调节完全受 Las QS 系统所支配) 都受 Las 和 RhI QS 系统两者的调节。这表明阿霍烯主要靶向 RhI QS。在这些实验中使用了具有 1:4 的 E:Z 比的 (E, Z) 阿霍烯。

[0112] 实施例 7: 阿霍烯对鼠李糖脂生产的弱化

[0113] 为了例证阿霍烯在抑制合成主要毒力因子之一的实际功效, 通过 LC-MS 直接量化对于 DNA 阵列和 RT-PCR 生长的培养物中存在的鼠李糖脂的浓度。鼠李糖脂的生产在稳定期 (stationary phase) 的初期被由 rhIA、rhIB 和 rhIC 基因 (PA3479、PA3478 和 PA1131) 编码的 RhI QS 系统的协调调节而起始 [V. E. Wagner 等, J Bacteriol., 2003, 185, p. 2080-2095 和 R. Rahim 等, Mol Microbiol., 2001, 40, p. 708-718]。因此, 在合成全面启动之前和之后, 回收 OD600nm 在 1.5 和 2.0 处的样品以监控鼠李糖脂的生产。发现随着阿霍烯浓度的增加, 样品中鼠李糖脂的浓度逐渐下降。当在 OD600nm 为 2.0 处使用 20 μ g/ml 阿霍烯处理时, 与未经处理的培养物相比, 鼠李糖脂含量减少到了约为 1/3, 并且当用 80 μ g/ml 阿霍烯处理细胞时样品中几乎没有可检测出的鼠李糖脂存在。因此, 该浓度几乎完全阻断鼠李糖脂的合成。使用了具有 1:4 的 E:Z 比的 (E, Z) 阿霍烯。

[0114] 实施例 8: 阿霍烯处理使得体外生物膜鼠李糖脂缺乏并防止 PMNs 致死

[0115] 暴露于 PMN 白细胞的生物膜产生起护罩作用并保护生物膜细菌不受吞噬的鼠李糖脂。使用体外连续培养单程流室生物膜系统演示阿霍烯对 PMNs 的溶解的影响 [B. B. Christensen 等, Methods Enzymol., 1999, 310, p. 20-42]。在存在或不存在 100 μ g/ml 阿霍烯下使铜绿假单胞菌生长四天。当随后将 PMNs 导入到流室时, 在不存在阿霍烯下生长的生物膜的上部, 碘化丙啶 (PI) 染色显示了坏死的 PMNs (图 5A)。相反, 当在阿霍烯的存在下生长生物膜时, 未观察到坏死的 PMNs (图 5B)。因此, 阿霍烯处理通过阻断阿霍烯的生物膜合成救援 PMN 白细胞。先前已经表明被救援的 PMN's 能够吞噬生物膜细菌 [T. Bjarnsholt 等, Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880]。使用了具有 1:4 的 E:Z 比的 (E, Z) 阿霍烯。

[0116] 实施例 9: 使用阿霍烯和抗生素治疗的协同效应在体内和体外的形态

[0117] 治疗细菌生物膜感染中的一个重要的问题是抗生素给药的有效性较低。CF 患者呼吸道的感染会产生高浓度的阴离子聚电解质 [T. Brandt 等, Thorax, 1995, 50, p. 880-882], 如从溶解的炎症细胞 (例如 PMN's 和细菌) 中释放出的 DNA。已经表明阴离子聚电解质且特别是 DNA 结合至阳离子抗生素 (如妥布霉素) 并降低该阳离子抗生素的活性, 这会导致生物可利用的妥布霉素减少至低至存在数量的 5% [P. M. Mendelman, 1985, Am Rev Respir Dis., 132, p. 761-765]。这表明通过阻断鼠李糖脂和 eDNA 的生产和释放, 能够减少随后妥布霉素的失活。

[0118] 依此, 我们先前已经公布, 使用大蒜提取物和抗生素妥布霉素联合处理三日龄的生物膜 (在连续培养单程流动池中体外生长) 显示了协同杀灭效应 [T. Bjarnsholt 等, Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880]。但是, 不知大蒜提取物中的活性成分是什么。因此, 在存在或不存在 100 μ g/ml 阿霍烯下生长铜绿假单胞菌菌珠的生物膜。在第三天, 使用 10 μ g/ml 妥布霉素处理所述生物膜 24 小时。前期处理研究表明使用 10 μ g/ml、100 μ g/ml 或 340 μ g/ml 的处理显示杀灭的程度没有差别。因此选择 10 μ g/ml 的妥布霉素用于本研究。使用活死染色剂和共焦激光扫描显微镜 (CSLM) 来评价杀灭效力, 并且显示出几乎 100%

杀灭在阿霍烯〔阿霍烯未进行例如 HPLC 纯化〕的存在下生长并随后使用妥布霉素处理的生物膜（图 6A）。同时，使用拥有功能 QS 系统的临床 CF 分离 CF438（从诊断的 CF 儿童中第一次分离）评价所述协同效应，并再次检测到几乎 100% 杀灭生物膜（图 6B）。

[0119] 我们使用异物感染模型来检验阿霍烯与妥布霉素在体内联合治疗的效果 [L. D. Christensen 等, Microbiology, 2007, 153, p. 2312-2320]。将具有尺寸为 4mm（内径 4mm/ 外径 6mm）预植有野生型铜绿假单胞菌的硅胶管植入物插入到小鼠的腹腔内。每 24 小时皮下注射治疗，其中分别在插入前两天和插入后 24 小时开始阿霍烯和妥布霉素的治疗。在插入 72 小时后，从小鼠中取出植入物并测量每个植入物上的菌落形成单位的数目。我们发现与安慰剂组和使用阿霍烯或妥布霉素的单一治疗两者相比，使用阿霍烯和妥布霉素的结合对野生型铜绿假单胞菌的治疗显著更快速地清除所述植入物（分别为 $p < 0.0001$, $p = 0.009$ 和 $p = 0.01$ ）。在安慰剂和单一治疗组之间观察到清除的显著差异（ $p = 0.008$ 和 $p < 0.0001$ ）。我们发现在两个单一治疗组之间在清除上没有显著差异（ $p = 30$ ）（图 6C）。使用了具有 1:4 的 E:Z 比的 (E, Z) 阿霍烯。

[0120] 我们已经表明在体外向生物膜中加入 $100 \mu\text{g/ml}$ 阿霍烯，然后加入 $10 \mu\text{g/ml}$ 妥布霉素，杀灭几乎 100% 的生物膜，而仅存在妥布霉素或阿霍烯的结果是没有或只杀灭少量生物膜细菌。据记载 eDNA 的释放是由 QS 控制，考虑到此并与我们的结果相结合，其指出阿霍烯可能弱化 eDNA 的释放。

[0121] 实施例 10：阿霍烯治疗肺部铜绿假单胞菌感染

[0122] 在本研究中，预防性地给药阿霍烯，并在感染后继续给药。在腹膜中进行皮下注射。我们使用铜绿假单胞菌 PA01 在肺部感染的小鼠模型中使用阿霍烯进行了三个独立的体内治疗实验。以含有 $1.5 \times 10^8 \text{CFU/ml}$ 铜绿假单胞菌的藻酸盐微球气管内挑战（在第 0 天）BALB/c 小鼠。两组小鼠为任一未经治疗（安慰剂）的或每天一次使用 $25 \mu\text{g/g}$ 阿霍烯治疗的小鼠。在细菌挑战之前，给小鼠提供两天的预防性治疗或安慰剂。治疗持续三天。平板计数列举显示在第三天的治疗组和对照组之间具有显著差异。当结合实验时，在第三天看到组之间在清除上具有 500 倍差异的显著差异（ $p < 0.002$ ）（图 7）。这与 Bjarnsholt 等（2005）在类似的肺部感染模型中使用生蒜提取物作为治疗所获得的结果一致 [T. Bjarnsholt 等, Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880]。小鼠良好地耐受了 $25 \mu\text{g/g}$ 体重的给药剂量。

[0123] 当使用非常高纯度阿霍烯（ $>99.5\%$, HPLC 纯化的）或纯度为从 95% 到 99.5% 的阿霍烯（即粗品阿霍烯或进行了单一柱色谱步骤的阿霍烯）时，对比阿霍烯诱导清除如上所述的铜绿假单胞菌感染的能力的类似实验表明非常高纯度的阿霍烯不能有效清除肺部感染而 95 ~ 99.5% 纯度的阿霍烯则能（图 8，分别为顶图和底图）。这突出了提供足够纯的“粗品”阿霍烯产物的合成是必要的，以避免使用 HPLC 纯化，因这该步骤对生物活性具有不利影响。因此，在检查和可选择地柱色谱后提供纯度高于 95% 且低于 99.5% 的阿霍烯的本发明方法与现有技术相比具有惊人的优势。使用了具有 1:4 的 E:Z 比的 (E, Z) 阿霍烯。

[0124] 当将使用阿霍烯的本研究与使用大蒜提取物的先前研究进行对比时，本研究提供了阿霍烯及接近衍生物是大蒜中能够减少铜绿假单胞菌感染的主要活性组分的令人信服的指示。

[0125] 结论

[0126] 总之，我们已经论证了使用阿霍烯通过抑制铜绿假单胞菌中少数重要 QS 控制毒

力基因的转录以弱化体内铜绿假单胞菌的毒力。从我们的转录组分析,我们已经提出阿霍烯的可能的靶向为 Rh1 QS 系统。值得注意的是 QS 抑制没有去除铜绿假单胞菌形成生物膜的能力。但是,所有可用的数据都表明缺乏 QS 的生物膜无论如何都比富含 QS 的生物膜更加脆弱。例如,由于失去了基质组分 DNA(基质生产由 Rh1 QS 控制),所述生物膜对剪切力敏感并且能够依赖于流体动力而脱落。此外,由于没有形成鼠李糖脂,所述生物膜对 PMNs 的作用敏感(因为当与生物膜接触时 PMNs 没有被杀灭)。我们先前已经表明,与富含 QS 的生物膜形成对比,缺乏 QS 的细菌的体外生物膜能够被新分离的 PMNs 吞噬。生物膜对 PMNs 耐受的核心是鼠李糖脂的生产形成抵抗引入的 PMNs 的防护屏,并且我们有若干数据以支持这也是此种情况。因此,使用 QS 抑制剂应该是极大地提高了 PMNs 的抗菌性能并使它们能够有效地根除生物膜形成细菌。另外,鼠李糖脂裂解 PMNs 并使其随后溢出它们的内容物 DNA、水解酶和氧自由基。这产生了特别是相对于组织损伤的“恶圈”,增加了炎症并诱导铜绿假单胞菌突变,其中类粘蛋白表型的出现显著地促进病情恶化。

[0127] 小鼠实验中感染的减少,与妥布霉素组合实验中体外生物膜的去除表明使用阿霍烯作为今后治疗慢性铜绿假单胞菌感染的抗菌药物的潜力。

[0128] 参考文献

- [0129] • W. C. Fuqua 等, J. Bacteriol., 1994, 176, p269-275
- [0130] • T. Bjarnsholt 等, Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880
- [0131] • R. Naganawa 等, Applied and Environmental Microbiology, 62, 1996, p. 4238-4242
- [0132] • EP185324
- [0133] • Block 等, J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, p. 7045-7055
- [0134] • US4, 665, 088
- [0135] • W02010/100486
- [0136] • M. Hentzer 等, EMBO J., 2003, 22, p. 3803-3815
- [0137] • Rasmussen 等, Microbiology, 2005, 151, p. 1325-1340
- [0138] • [V. E. Wagner 等, J Bacteriol., 2003, 185, p. 2080-2095
- [0139] • R. Rahim 等, Mol Microbiol., 2001, 40, p. 708-718]
- [0140] • B. B. Christensen 等, Methods Enzymol., 1999, 310, p. 20-42
- [0141] • T. Brandt 等, Thorax, 1995, 50, p. 880-882
- [0142] • P. M. Mendelman, 1985, Am Rev Respir Dis., 132, p. 761-765
- [0143] • L. D. Christensen 等, Microbiology, 2007, 153, p. 2312-2320

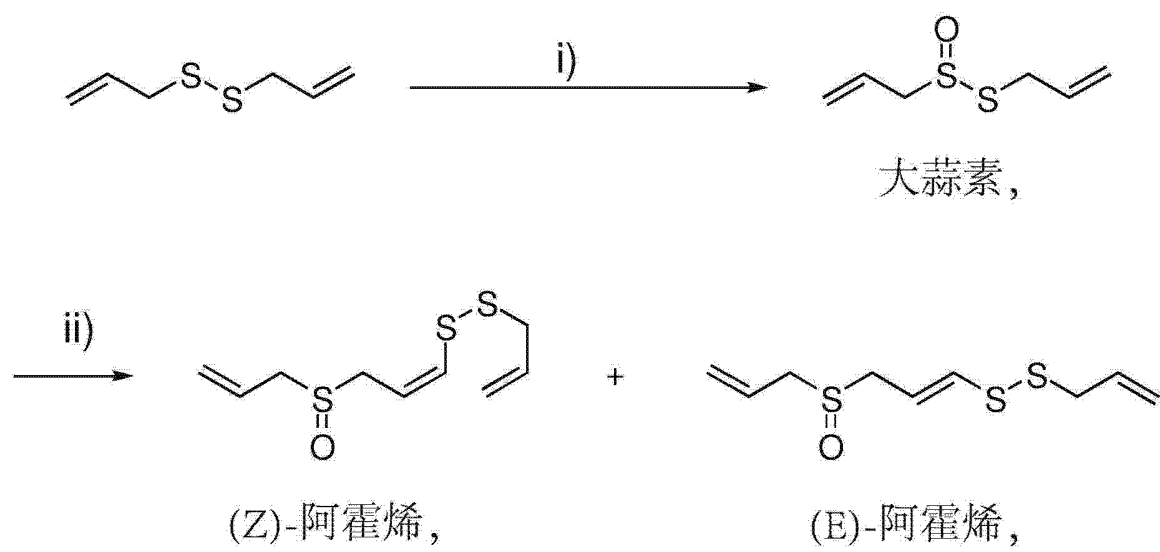


图 1

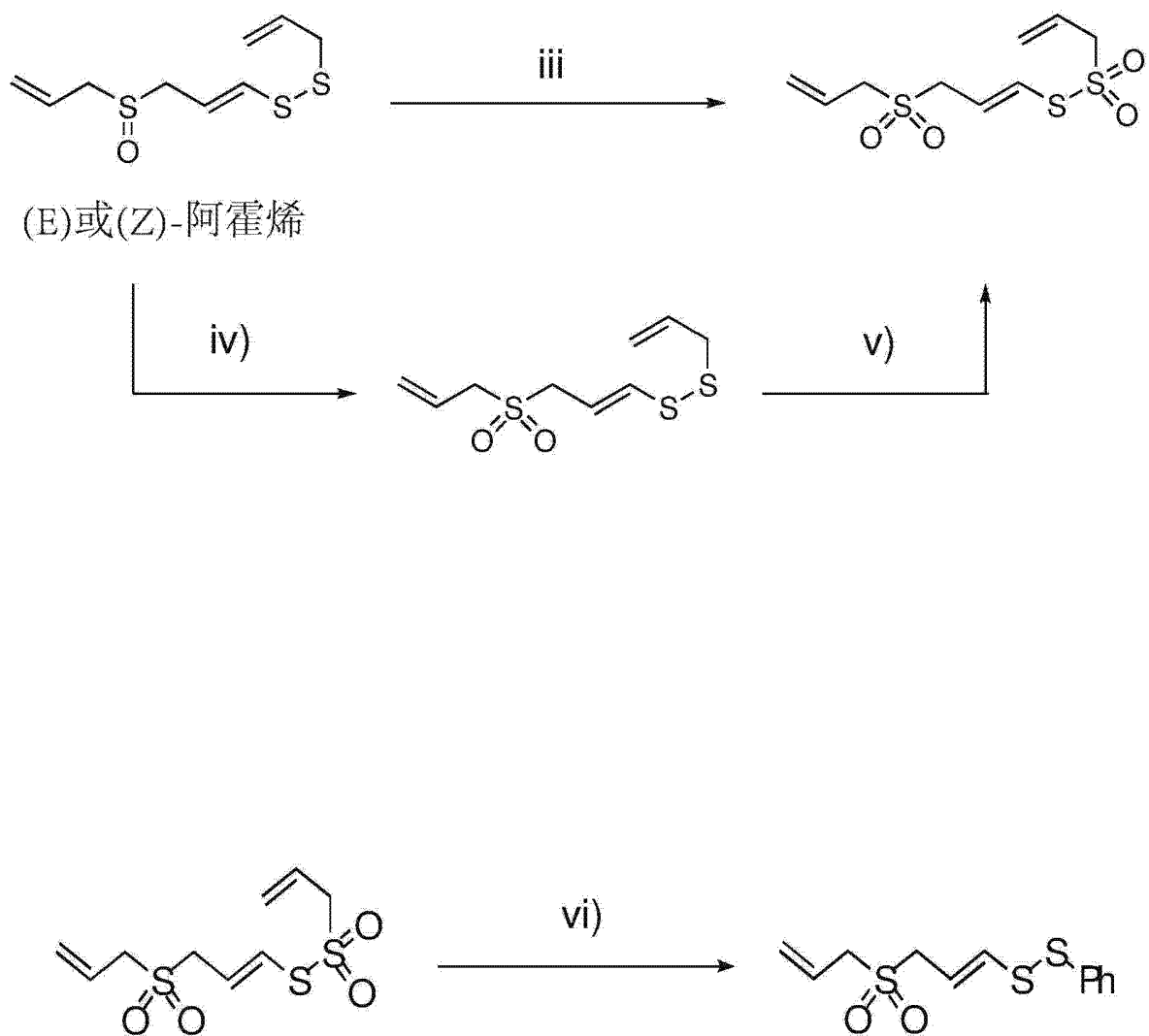


图 2

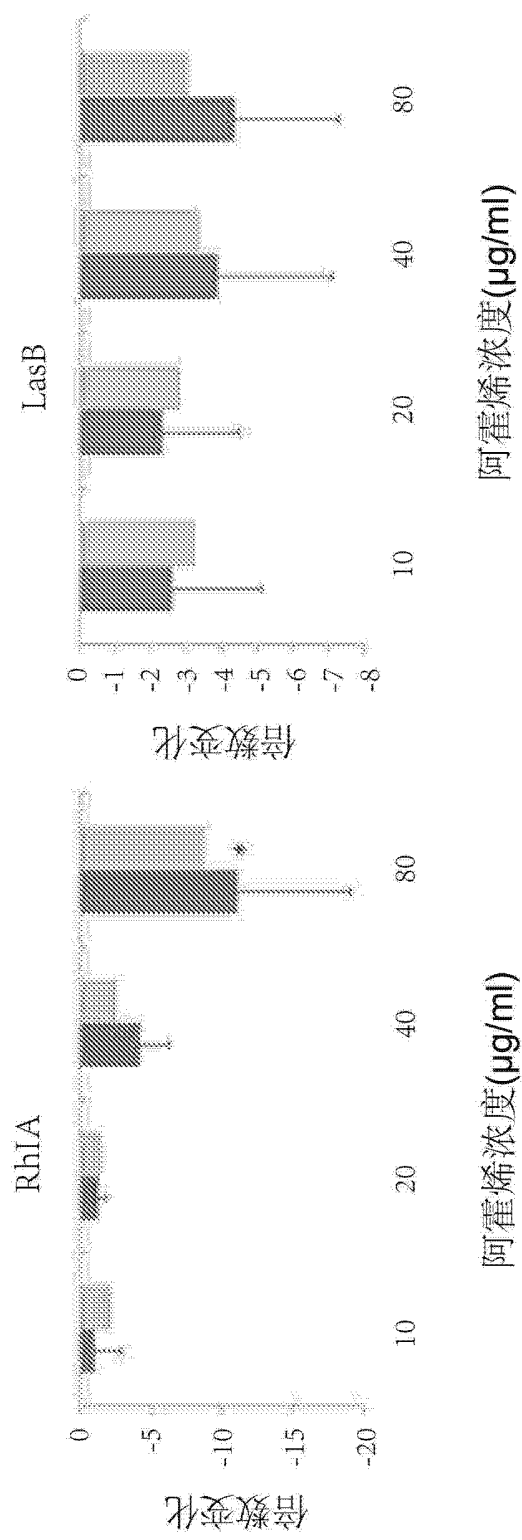


图 3

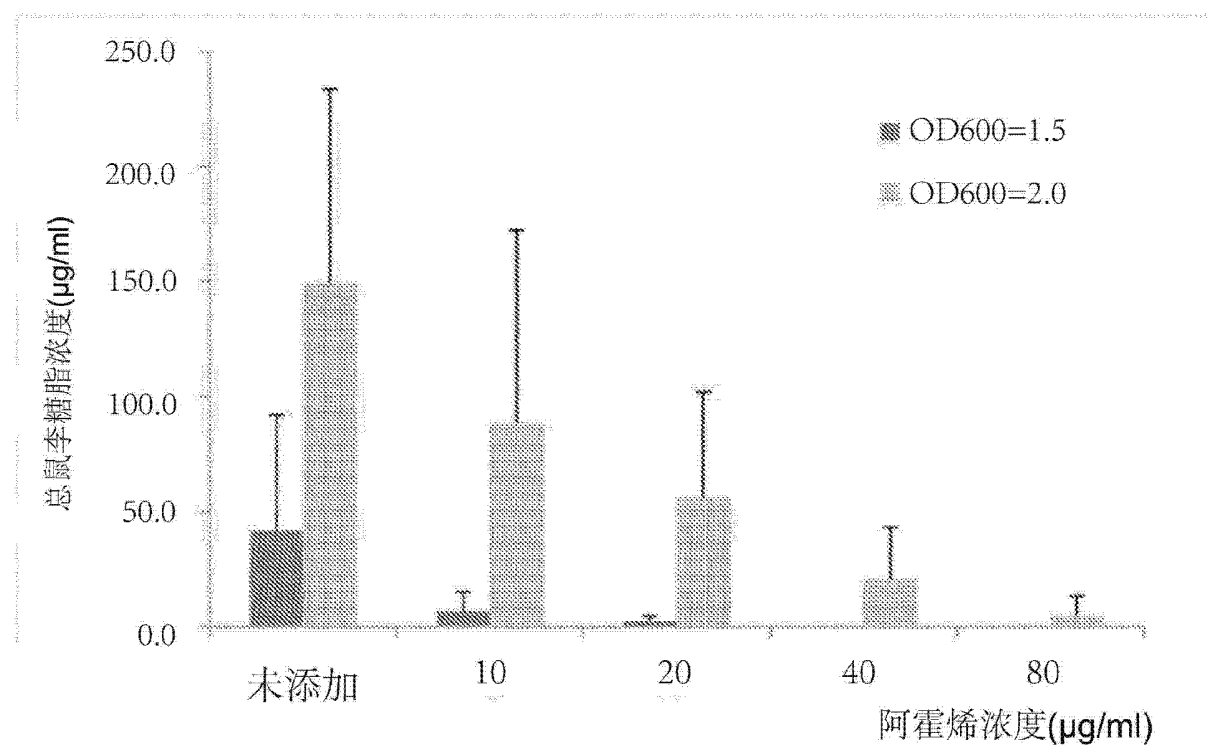


图 4

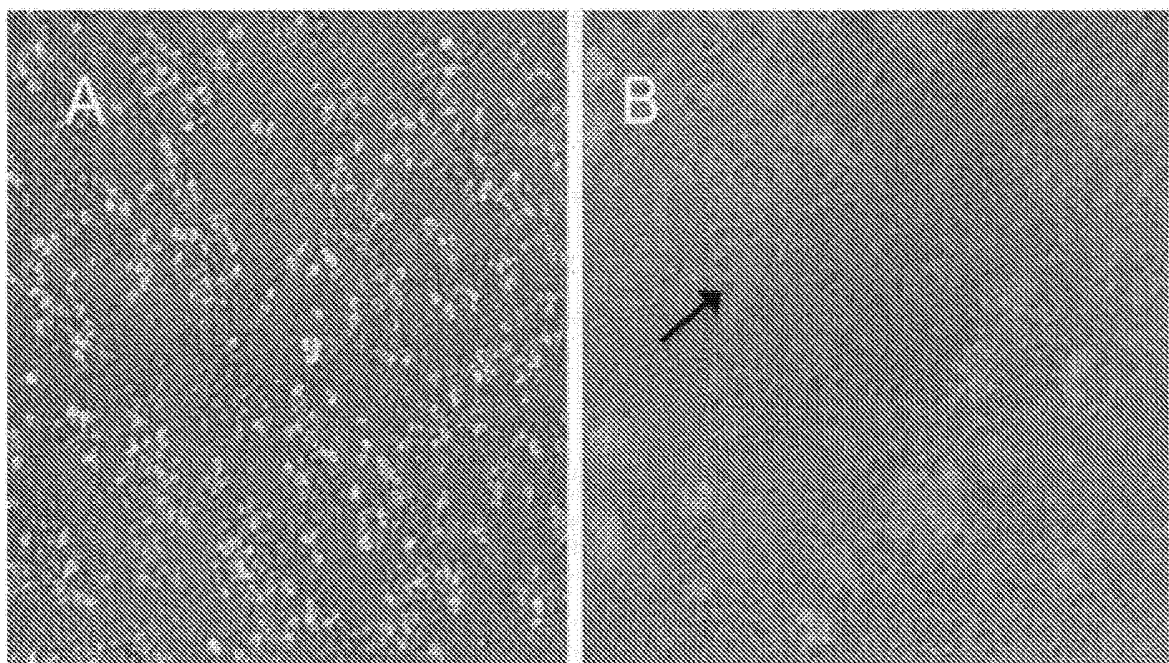


图 5

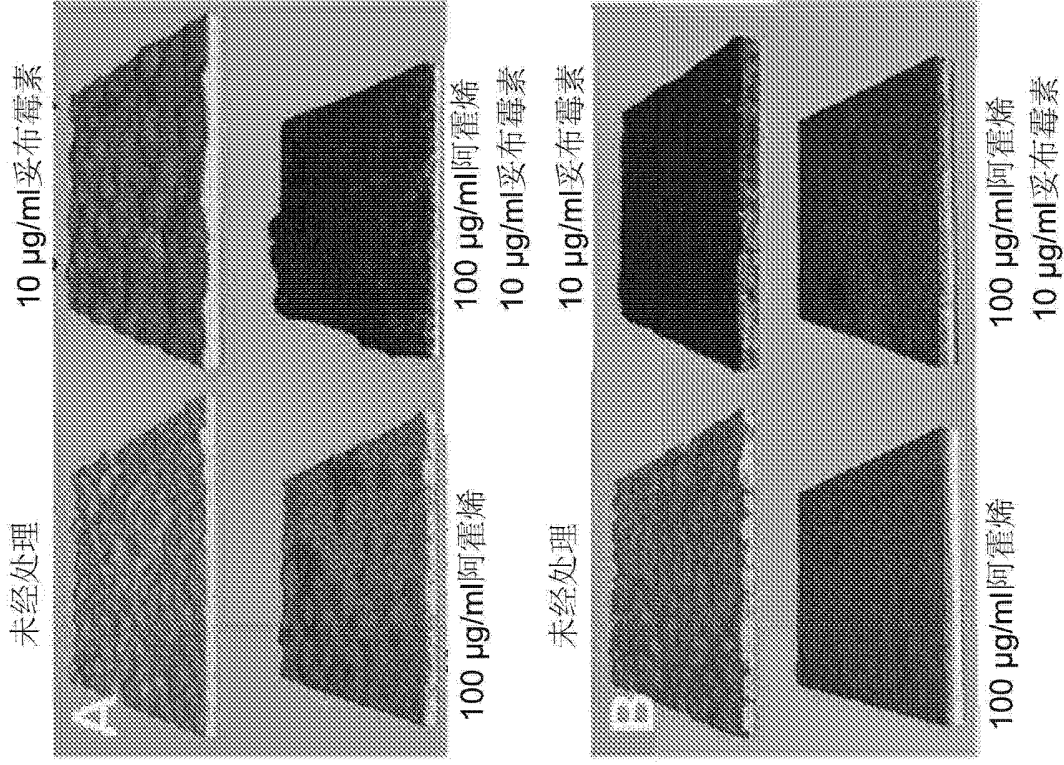
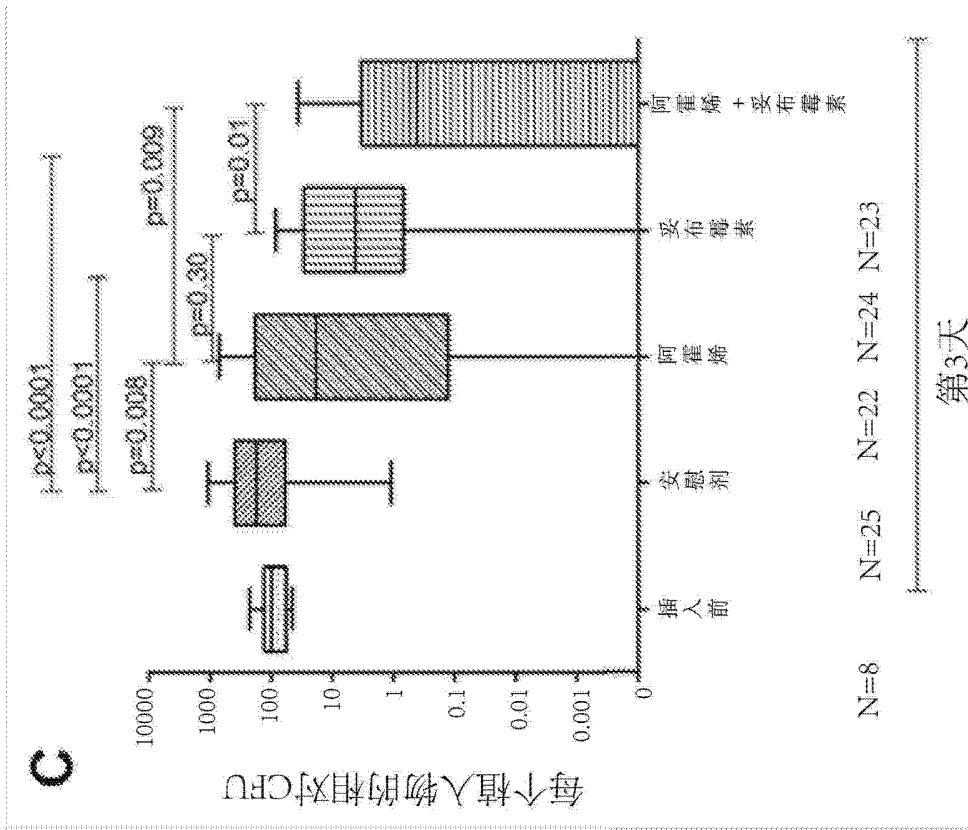


图 6



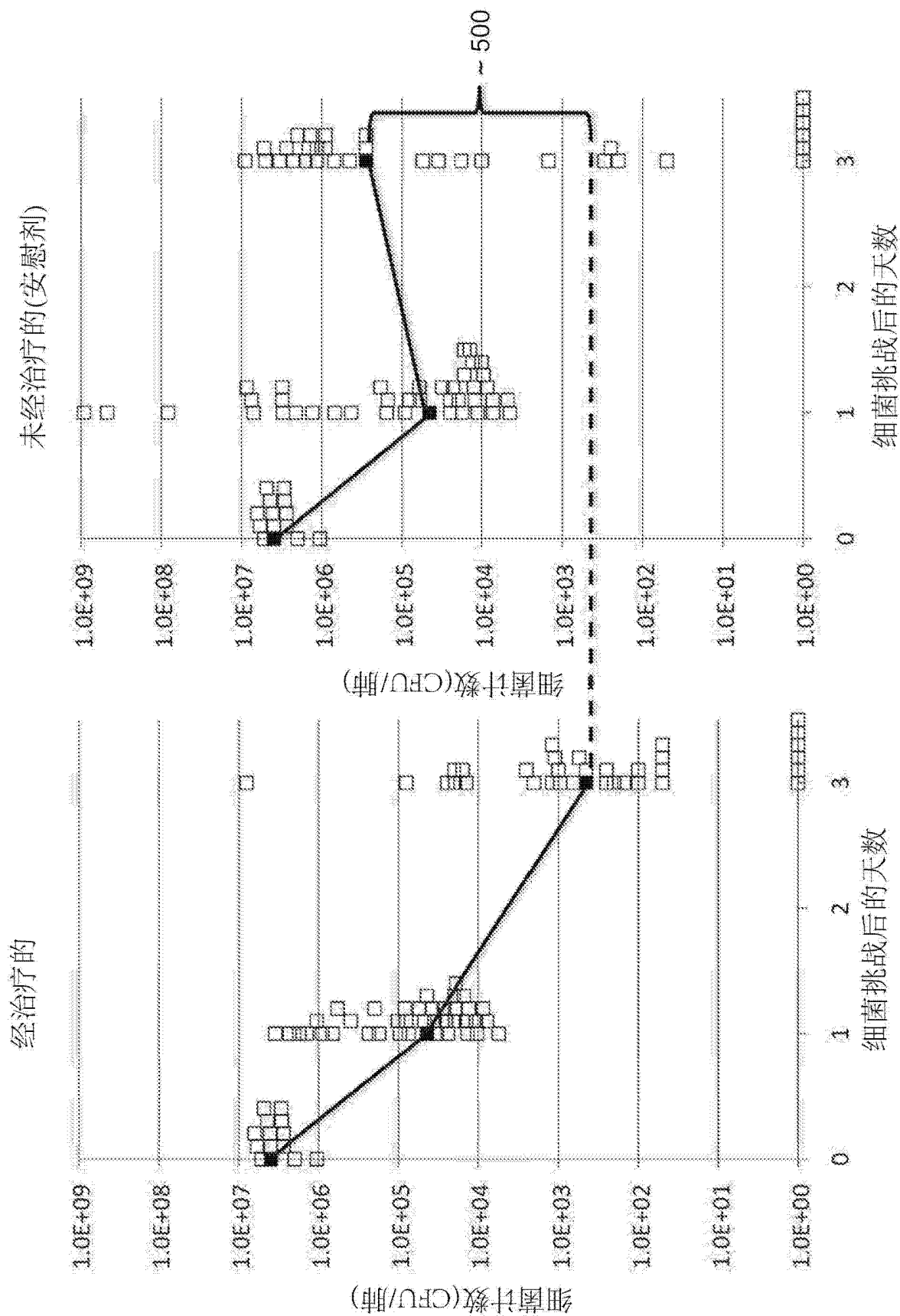


图 7

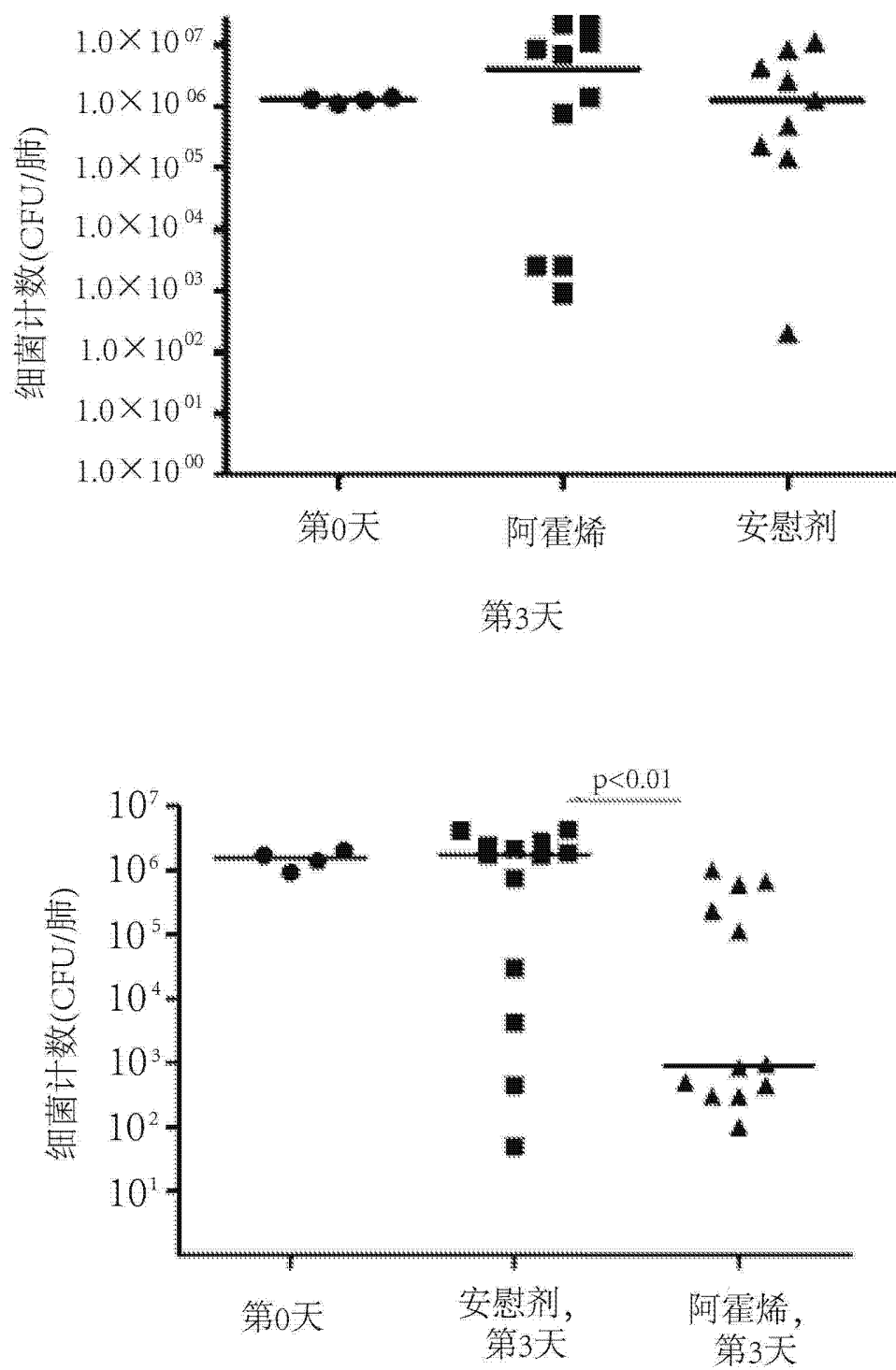


图 8