

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 295/084 (2006.01)

A61K 31/4453 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410093540.5

[43] 公开日 2006 年 7 月 5 日

[11] 公开号 CN 1796375A

[22] 申请日 2004.12.24

[21] 申请号 200410093540.5

[71] 申请人 上海人类基因组研究中心

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区郭守敬路 351 号

[72] 发明人 任双喜 殷世亮 钱 震 汤生荣

[74] 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司
代理人 丁纪铁

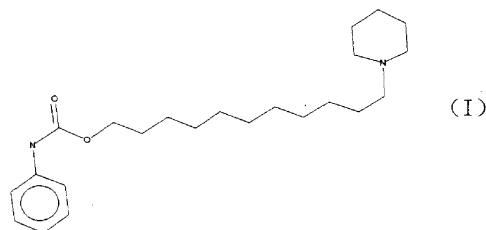
权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

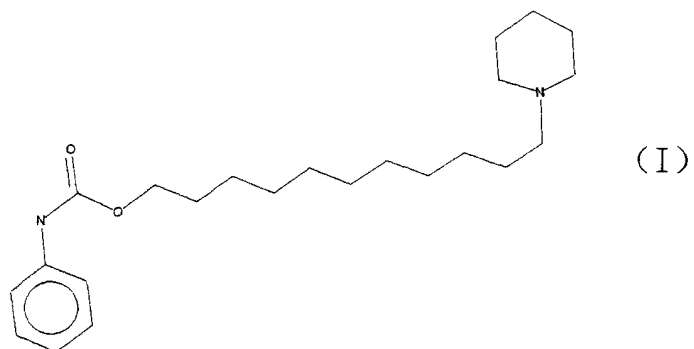
抗菌化合物 B-26 及其在制备抗菌药物上的应用

[57] 摘要

本发明公开了一种结构式(I)的抗菌化合物 B-26, 化学命名为苯氨基甲酸-(11-哌啶-1-十一烷基)酯。该化合物在制备抗菌药物上的应用及含有该化合物的药物组合物。该化合物及其药理上容许的酯衍生物、醚衍生物、氨基甲酰基的 N-烷基衍生物、其药理上容许的盐等, 具有优良强大广谱的抗菌活性, 对霉菌、酵母、钩端螺旋体以及其它 G⁻细菌, G⁺细菌有强大的杀灭作用, 可用于治疗或预防感染症。



1. 下述结构式 (I) 的抗菌化合物 B-26, 化学命名为苯氨基甲酸-(11-哌啶-1-十一烷基) 酯。



2. 权利要求 1 所述抗菌化合物 B-26 在制备抗菌药物上的应用。
3. 含有权利要求 1 所述的抗菌化合物 B-26 的药物组合物。

抗菌化合物 B-26 及其在制备抗菌药物上的应用

技术领域

本发明涉及一种化合物，尤其是一种抗菌化合物；另外，本发明还涉及该抗菌化合物在制备抗菌药物上的应用。

背景技术

在上个世纪 40 年代，大量的抗生素的发现使得抗生素作为抗菌药物被广泛的应用于临床，然而，这些抗生素所作用的靶位点非常的有限，病原菌对抗生素交叉耐药性的出现使得很多的靶位点变得不敏感，使得病原菌的耐药性越来越严重。所以人们开始寻找更多的新的靶位点来设计能够封闭靶位点的化合物分子和一些新颖的以及其它抗菌途径的化合物来作为新的抗菌药物。对微生物基因组的研究人们已经发现了许多潜在的药物作用靶位点（Corinne J.Cramer. N-Alkyl Urea Hydroxamic Acids as a New Class of Peptide deformylase Inhibitors with Antibacterial Activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept.2002,p.2752-2764.）。

肽键去甲基化酶 Peptide deformylase (PDF)，是细菌中蛋白质合成以及成熟起着至关重要的酶，是至今为止几个重要的可以被用来作为抗菌化合物药物分子设计的靶位点之一。在细菌中，蛋白质的合成起始于 N-甲酰甲硫氨酸（N-formylmethionine），所以所有新合成的蛋白质都带有 N 端的甲基。PDF 可以从绝大多数的蛋白质中裂解掉 N 端的甲基，许多这些蛋白质还要进一步的经历去掉 N 端蛋氨酸以形成成熟蛋白质的过程。作为生命代谢所必须的活性蛋白，PDF 在所有细菌中都存在。而另一方面，在真核细胞的细胞质中蛋白质的合成并不需要由 N 端的甲基化氨基酸所起始，并且 PDF 在哺乳动物的线粒体中也没有表现出这种作用。因此，PDF 抑制剂向我们展示了一个广谱的抗菌制剂

(Patricia M.Robin.In Vitro Activity of a New Antibiotic, NVP-PDF386(VRC4887),against *Chlamydia pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Apr.2003,p.1447-1448.) (Xubo Hu .Structure-Based Design of a Macrocyclic Inhibitor for Peptide Deformylase. Journal of Medicinal Chemistry. Volume 46, Number18, August 28,2003)。

Meinzel,和 Blanquet(J.Bacteriology,1993)所介绍的方法包括用一些硫酸铵沉淀来纯化这种酶蛋白,会造成酶蛋白分子的损伤以及分子空间结构的改变,目前的实验通过改造 Meinzel,和 Blanquet 用的方法,通过一个 DE-52 的离子交换树脂来纯化细胞裂解初提物来获得高活性的酶蛋白 (Jason waggoner.Purification of *Escherichia coli* Peptide Deformylase. Chemistry and Biochemistry-Summer Research-1997.)。

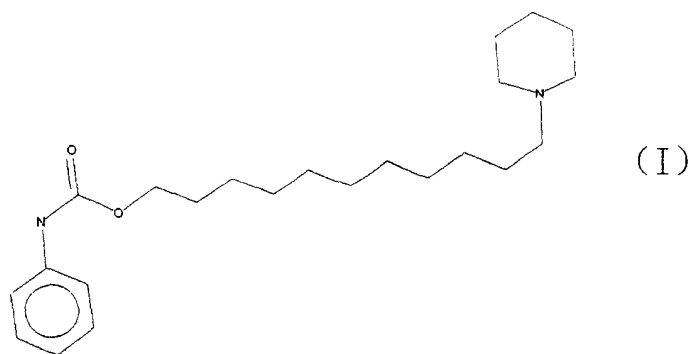
PDF 是一种结构特异的金属酶蛋白,它可以利用 Fe^{2+} 作为辅基水解氨基化合物。由于 Fe^{2+} 活性中心对环境中的氧以及氧化物的敏感性,天然的 PDF 是非常的不稳定并难以进行操作。然而用 Ni^{2+} 或 Co^{2+} 来替代 Fe^{2+} , PDF 可以获得高度的稳定性,并可以保持酶的所有活性以及对底物作用的专一性。因此所有的关于 PDF 的化学性质、结构性质以及抑制剂的研究都是将 Ni^{2+} 或 Co^{2+} 来替代 Fe^{2+} 后来完成的 (Xubo Hu .Structure-Based Design of a Macrocyclic Inhibitor for Peptide Deformylase. Journal of Medicinal Chemistry. Volume 46, Number18, August 28,2003)。

发明内容

本发明的目的在于提供了一种抗菌化合物B-26及该化合物在制备抗菌药物上的应用。

本发明的上述目的是通过如下技术方案来实现的:

本发明公开了一种结构式(I)的抗菌化合物 B-26,化学命名为苯氨基甲酸-(11-哌啶-1-十一烷基)酯。



本发明还公开了上述化合物在制备抗菌药物方面的应用以及含有上述化合物的药物组合物。

式 I 化合物可与有机酸和无机酸形成可药用酸加成盐。式 I 化合物的酸加成盐的实例有与下列酸形成的盐：无机酸，例如氢卤酸如盐酸、氢溴酸和氢碘酸，硫酸、硝酸、磷酸等，有机磺酸例如烷基磺酸和芳香磺酸例如甲磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸等，以及有机羧酸例如乙酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、苯甲酸、水杨酸、抗坏血酸等。

式 I 化合物的药理上容许的酯衍生物、醚衍生物、氨基甲酰基的N-烷基衍生物及其可药用酸加成盐可通过本领域已知的方法制得。

本发明的产品可用做药物，例如经肠或非胃肠道给药用药物制剂形式的药物。本发明的产品可例如以片剂、包衣片剂、糖衣丸、硬和软明胶胶囊、溶剂、乳剂或混悬液的形式经口给药，以例如栓剂的形式直肠给药，以例如注射溶液的形式非胃肠道给药。

药物制剂的制备可以这样进行：按照本领域技术人员熟知的方式，将本发明物质，如果需要，与其它有治疗价值的物质一起，以及合适的无毒、惰性、在治疗上相容的固体或液体载体物质和，如果需要的话，常用药物辅剂制成各种给药剂型。

无机载体物质和有机载体物质都适合用作这样的载体。因此，乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石、硬脂酸或其盐可用作例如片剂、包衣片剂、糖衣丸和硬明胶胶囊的载体。适用于软明胶胶囊的载体是例如植物油、蜡、脂肪以及半

固体和液体多元醇（根据活性物质的性质，载体并不是必须的）。适于制备溶液剂和糖浆剂的载体物质是例如水、多元醇、蔗糖、转化糖和葡萄糖。适于制备注射液的载体材料是例如水、醇、多元醇、甘油和植物油、适于栓剂的载体物质是例如天然或硬化油、蜡、脂肪和半液体或液体多元醇。

药物辅助剂是常用的防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜料、矫味剂、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、包衣剂和抗氧化剂。

本发明的物质可以经口、直肠和非胃肠道给药可用于宿主、尤其是恒温动物宿主的治疗例如人类医疗。对于成人，可采用的日剂量为约0.2g~约2g本发明的上述化合物。

本发明的上述化合物可作为肽键去甲基化酶(Peptide deformylase, PDF)的抑制剂，从而阻断细菌中蛋白质合成过程，起到抗菌的效果。对霉菌、酵母、钩端螺旋体以及其它G⁻细菌，G⁺细菌有强大的杀灭作用，可用于治疗或预防感染症。

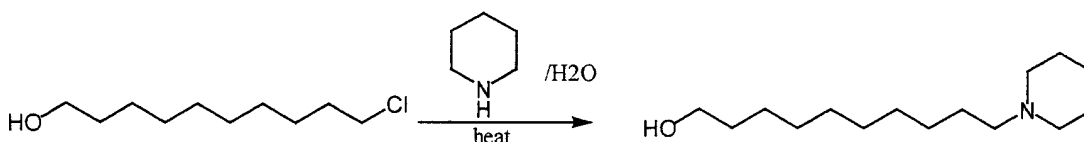
具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步描述。

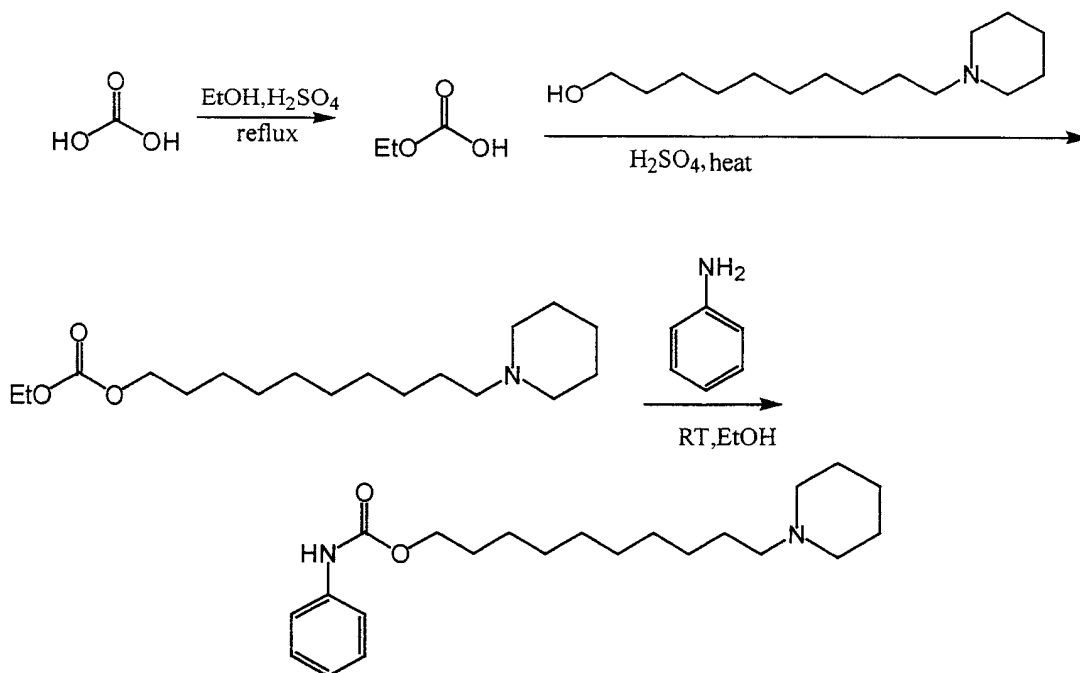
实施例1（制备苯氨基甲酸-（11-哌啶-1-十一烷基）酯）

本实施例按照下述步骤制备获得苯氨基甲酸-（11-哌啶-1-十一烷基）酯，所有步骤都在搅拌的条件下完成,其中：（1）heat 为加热（低于 100℃）；（2）reflux 为回流；（3）RT 表示室温。

步骤(1)



步骤(2)



实施例 2 (苯氨基甲酸-(11-哌啶-1-十一烷基)酯抗菌性能)

试验菌与菌液制备

试验菌

细菌:

1 问号状钩端螺旋体黄疸出血型一赖株。

2 金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538), 大肠杆菌 (8099), 表皮葡萄球菌, 枯草芽孢杆菌 (B921)。

3 马尔尼菲青霉菌。

4 赭色掷孢酵母。

菌液制备:

1 问号状钩端螺旋体黄疸出血型一赖株, 取连续在液体 EMJH 培养基第 3 代以上的菌液, 按照 1/10 的接种量, 接种于新鲜的 EMJH 液体培养基中, 培养 24h, OD600 在 0.10, 菌数 1×10^8 。

2 金黄色葡萄球菌, 大肠杆菌 取菌株第 3~14 代的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物(18~24h), 用 5mL 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液(以下简称 PBS)洗下菌苔,

使菌悬浮均匀后用上述 PBS 稀释至所需浓度。

3 马尔尼菲青霉菌，取菌株在乳糖营养琼脂培养基 5—7 天培养物，用 PBS 洗下孢子，用玻璃珠打匀，稀释至所需浓度。

4 赭色掷孢酵母，取菌株连续培养状态下液体 YPD 培养基的培养物，用 PBS 稀释至所需浓度。

抗菌化合物的配制

将实施例 1 制备获得的化合物苯氨基甲酸-(11-哌啶-1-十一烷基)酯溶解在(二甲基亚砜) DMSO 中，配制成 20mg/ml, 0.2um 微空滤膜过滤。

抗菌谱的测定方法

选择不同细菌作为试验菌，测其抑菌圈的大小（纸片法，纸片直径 5mm, 加样量 5ml）。

选择钩体菌作为试验菌，测定其溶液中的 OD 值。

用抗生素卡那霉素、壮观霉素、新霉素作为对照。

操作步骤

抗菌作用的测定：

1 问号状钩端螺旋体黄疸出血型一赖株取菌液 0.1ml 均匀的涂布在含有琼脂 0.6% 的 EMJH 培养基上，28℃ 培养 24h，菌体微微开始生长，加入纸片（直径 5mm），在纸片上加入抗菌液 5ul（100ug），28℃ 培养 3~5 天观察抗菌作用。将钩体以 1/100 接种，分别加入化合物以及抗生素致 100ug/ml，3~5 天测 OD₆₀₀ 直。

2 金黄色葡萄球菌，大肠杆菌取 0.1ml 10^7 菌数菌液均匀涂布于 LB 平板上，风干后在培养基中加入纸片（直径为 5mm）。30℃ 条件下培养至培养基表面长出薄薄的一层菌落，向纸片中加入抗菌液 5μl（100ug），培养过夜，观察抗菌作用。

3 马尔尼菲青霉菌，取 0.1ml 10^7 孢子数的菌液制备沙氏混菌固体平板，风干后在培养基中加入纸片（直径为 5mm）。向纸片中加入抗菌液 5μl（100ug），25℃ 培养 3—5，观察抗菌作用。

4 赭色掷孢酵母，取 0.1ml10⁷ 菌数的菌液制备 YPD 混菌固体平板，风干后在培养基中加入纸片（直径为 5mm）。向纸片中加入抗菌液 5μl (100ug)，37℃培养 2—5，观察抗菌作用。

最低抑菌浓度的测定：分步稀释法，制备 EMJH 固体平板，分别含有化合物 40，20，10，5，2.5, 1.25，0.625ug/ml, 将问号状钩端螺旋体黄疸出血型—赖株菌液 0.1ml10⁷ 菌数均匀涂布平板，, 28℃培养 3~5 天观察抑菌情况，从而确定化合物对其最低抑菌浓度。

热稳定性的测定：分别取 1ml 样品于试管中，在 37、60、80、100、121℃下保持 30min 和 1h，冷却至室温，以未经处理的样品作对照。

酸碱稳定性的测定：在试管中加入 1ml 样品，用 1mol/L 氢氧化钠或 1mol/L 盐酸将样品溶液分别调至 pH3, 5, 7, 9, 11，室温保持 24h 后再将各管的 pH 调回至约 pH7. 0，以未调 pH 的样品作对照检测抑菌活性。

化合物抗菌谱的测定结果（如表 1 所示）

表 1

指示菌（细菌）		抑菌圈直径(mm)	拮抗能力
革兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	18	+++
	表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	20	+++
	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	16	+++
革兰氏阴性菌	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	22	++++
	问号状钩端螺旋体 (<i>leptospira interrogans</i>)	26	++++ +
霉菌	马尔尼菲青霉菌 (<i>Penicillium marneffe</i>)	35	++++ +
酵母	赭色掷孢酵母 (<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> YIM2024)	30	++++ +

PS：纸片直径为 5mm；抑菌圈直径 8—10mm 为+，11—15mm 为++，16 到 20mm 为+++，21 到 25 为++++，大于 26 为+++++，—表示无抗菌作用

化合物最低抑菌浓度结果（如表 2 所示）

表 2

指示菌（细菌）		最低抑菌浓度（ug/ml）
革兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌（ <i>Staphylococcus aureus</i> ）	30
	表皮葡萄球菌（ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ）	25
	枯草芽孢杆菌（ <i>Bacillus subtilis</i> ）	40
革兰氏阴性菌	大肠杆菌（ <i>Escherichia coli</i> ）	20
	问号状钩端螺旋体（ <i>leptospira interrogans</i> ）	2.5
霉菌	马尔尼菲青霉菌（ <i>Penicillium marneffe</i> i）	1
酵母	赭色掷孢酵母（ <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> YIM2024）	1

对问号状钩端螺旋体（*leptospira interrogans*）化合物于不同抗生素比较（如表 3 所示）

表 3

名称	浓度（ug/ml）	OD600（24h）	OD600（48h）	OD600（72h）
kanamycin	50	0.026	0.012	0.035
Spectomycin	50	0.019	0.011	0.031
neomycin	50	0.024	0.019	0.021
化合物	50	0.016	0.003	0.000
对照菌体		0.057	0.106	0.140
DMSO		0.051	0.100	0.184

对照菌体按 1/100 接种量，DMSO 为化合物对照。

化合物热稳定性的测定：

化合物在 37~80℃条件下 30min 活力不变，在 100℃条件下 30min 活力下降 5%，121℃条件下 30min 活力下降 20%。

化合物酸碱稳定性的测定：

化合物在 pH5~9 条件下稳定，在 pH3 条件下 24h 后活力下降 60%，在 pH11 条件下 24h 活力下降 20%。

实施例 3

片剂

苯氨基甲酸-（11-哌啶-1-十一烷基）酯

100mg

玉米淀粉	15mg
滑石粉	3mg
硬脂酸镁	2mg
总重量	120mg

实施例 4

注射溶液:

苯氨基甲酸-(11-哌啶-1-十一烷基)酯	5mg
丙二醇	0.5ml
双重蒸馏无菌水	加至 1.0ml