

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 7/06

A61K 38/08 A61P 31/10

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00810331.3

[43]公开日 2002年10月9日

[11]公开号 CN 1373770A

[22]申请日 2000.6.8 [21]申请号 00810331.3

[30]优先权

[32]1999.7.15 [33]US [31]60/143,840

[86]国际申请 PCT/US00/15016 2000.6.8

[87]国际公布 WO01/05813 英 2001.1.25

[85]进入国家阶段日期 2002.1.14

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 S·H·陈 M·J·罗德里格茨
X 孙.

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

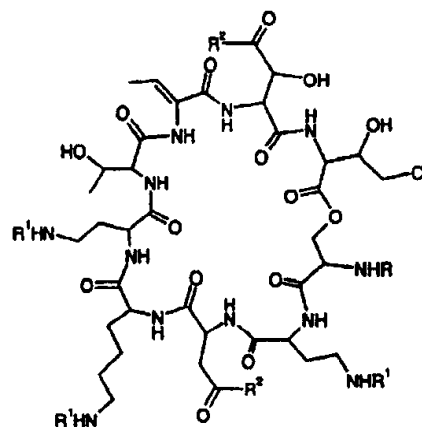
代理人 温宏艳 钟守期

权利要求书9页 说明书29页 附图页数0页

[54]发明名称 假单胞菌素前药

[57]摘要

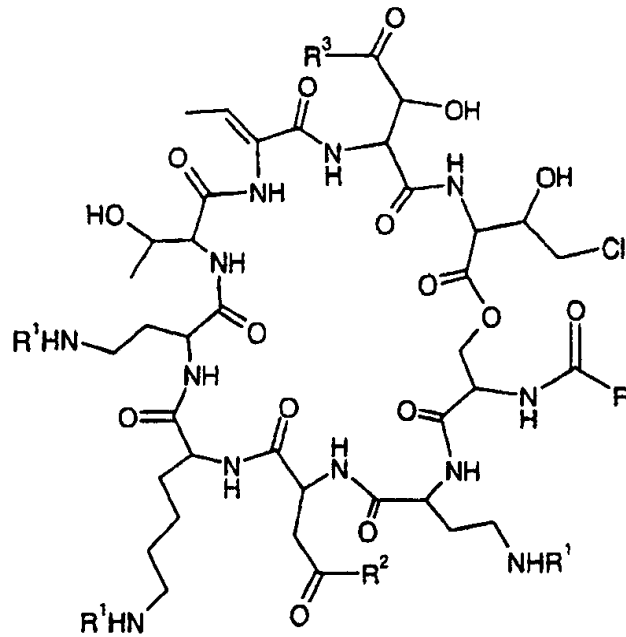
本发明描述了一种结构(A)所代表的假单胞菌素前药,其中R¹是酰氧基烷基氨基甲酸酯键。所述前药具有抗真菌活性,并且副作用低。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

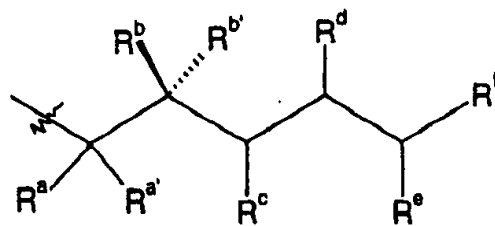
权 利 要 求 书

1. 一种具有以下结构的假单胞菌素前药、其可药用盐及其溶剂化物，



5

其中 R 是



其中

10 R^a 和 $R^{a'}$ 独立地是 H 或甲基，或者 R^a 或 $R^{a'}$ 是烷基氨基，与 R^b 或 $R^{b'}$ 一起形成 6-元环烷基环、6-元芳族环或双键，或者与 R^c 一起形成 6-元芳族环；

R^b 和 $R^{b'}$ 独立地是 H、卤素或甲基，或者 R^b 或 $R^{b'}$ 是氨基、烷基氨基、 α -乙酰乙酸酯、甲氧基或羟基；

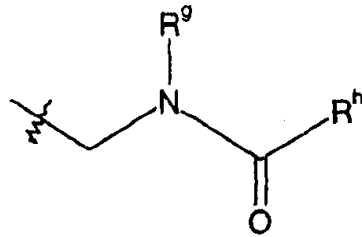
15 R^c 是 H、羟基、 C_1 - C_4 烷氧基、羟基烷氧基、或者与 R^e 一起形成 6-

元芳族环或 C₅-C₆ 环烷基环;

R^e 是 H, 或者与 R^f 一起是 6-元芳族环、C₅-C₁₄ 烷氧基取代的 6-元芳族环、或者 C₅-C₁₄ 烷基取代的 6-元芳族环, 和

R^f 是 C₈-C₁₈ 烷基, C₅-C₁₁ 烷氧基或联苯基;

5 R 是

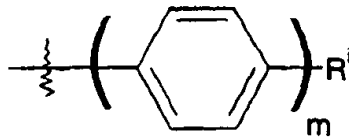


其中

R^g 是 H 或 C₁-C₁₃ 烷基, 而且

10 R^h 是 C₁-C₁₅ 烷基、C₄-C₁₅ 烷氧基、(C₁-C₁₀ 烷基) 苯基、-(CH₂)_n-芳基、或-(CH₂)_n-(C₅-C₆ 环烷基), 其中 n=1 或 2; 或者

R 是

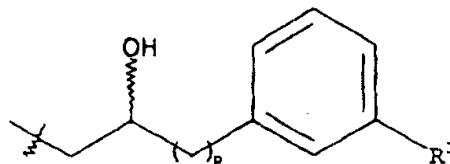


15 其中

Rⁱ 是 H、卤素、或 C₅-C₈ 烷氧基,

而且 m 是 1、2 或 3;

R 是



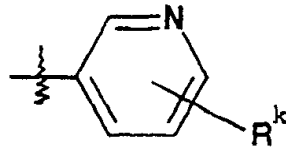
其中

R^j 是 C_5-C_{14} 烷氧基或 C_5-C_{14} 烷基, 并且

$p=0, 1$ 或 2 ;

R 是

5



其中

R^k 是 C_5-C_{14} 烷氧基, 或者

R 是 $-(CH_2)-NR^m-(C_{13}-C_{18}$ 烷基), 其中 R^m 是 H、 $-CH_3$ 或 $-C(O)CH_3$;

10

R^1 独立地是 H、酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮、或者酰氧基亚甲基羧酸酯, 条件是至少一个 R^1 是酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮或者酰氧基亚甲基羧酸酯;

R^2 和 R^3 独立地是 $-OR^{2a}$ 、或者 $-N(R^{2b})(R^{2c})$,

其中

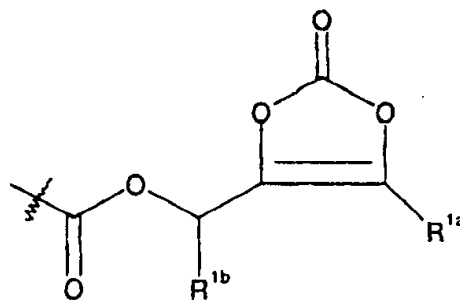
15

R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_6 环烷基、羟基 (C_1-C_{10}) 烷基、烷氧基 (C_1-C_{10}) 烷基、 C_2-C_{10} 链烯基、氨基 (C_1-C_{10}) 烷基、一-或二-烷基氨基 (C_1-C_{10}) 烷基、芳基 (C_1-C_{10}) 烷基、杂芳基 (C_1-C_{10}) 烷基、环杂烷基 (C_1-C_{10}) 烷基, 或者

R^{2b} 是氨基酸烷基酯的羧酸烷基酯残基并且 R^{2c} 是 H 或 C_1-C_6 烷基。

20

2. 权利要求 1 的前药, 其中所述酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮是由下式 1(a) 所表示的:

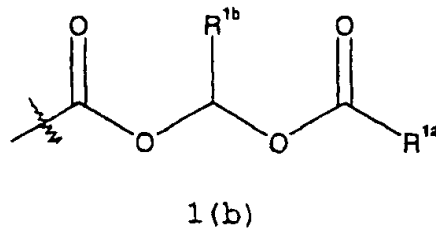


1(a)

其中 R^{1a} 是 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 烯基、苄基、或芳基，而且 R^{1b} 是 H 或甲基。

3. 权利要求 1 的前药，其中所述酰氧基亚甲基羧酸酯是由下式 1(b) 所表示的：

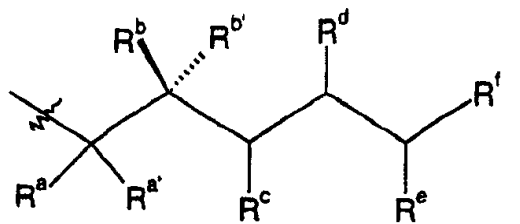
5



其中 R^{1a} 是 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 烯基、苄基、或芳基，而且 R^{1b} 是 H 或甲基。

4. 权利要求 2 的前药，其中 R 由下面结构所表示：

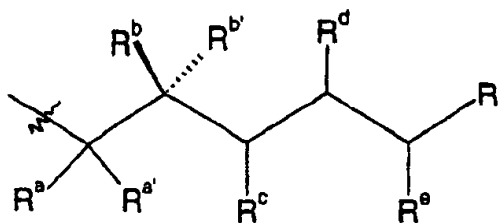
10



其中 $R^{b'}$ 是羟基， R^a 、 $R^{a'}$ 、 R^b 、 R^c 、 R^d 和 R^e 都是 H，并且 R^f 是正辛基。

5. 权利要求 3 的前药，其中 R 由下面结构所表示：

15

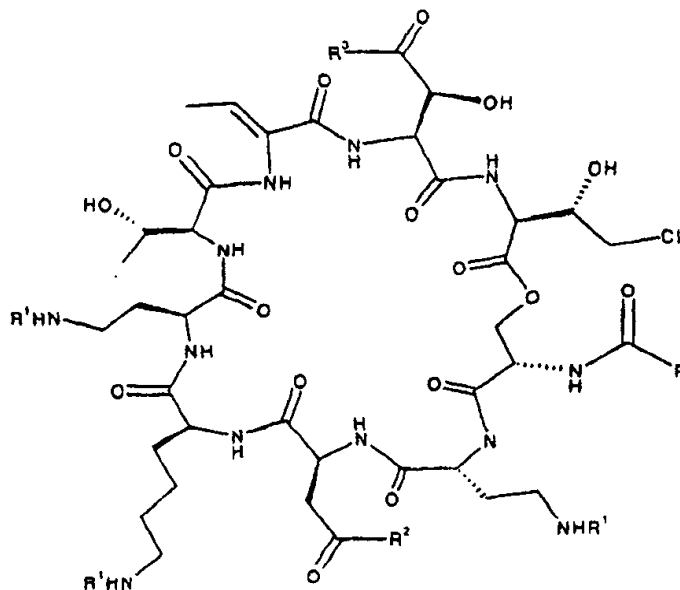


其中 $R^{b'}$ 是羟基， R^a 、 $R^{a'}$ 、 R^b 、 R^c 、 R^d 和 R^e 都是 H，并且 R^f 是正辛基。

6. 权利要求 1 的前药，其中所述氨基酸烷基酯的羧酸烷基酯残基是由以下表示的： $-CH_2CO_2CH_3$ 、 $-CH(CO_2CH_3)CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CO_2CH_3)CH(\text{苯基})$ 、 $-CH(CO_2CH_3)CH_2OH$ 、 $-CH(CO_2CH_3)CH_2(\text{对羟基苯基})$ 、

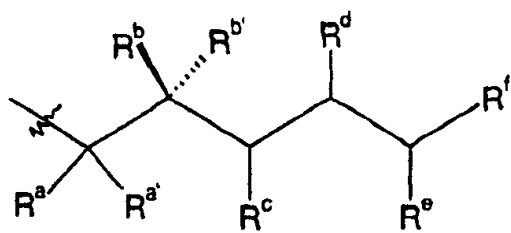
-CH(CO₂CH₃)CH₂SH、 -CH(CO₂CH₃)CH₂(CH₂)₃NH₂、 -CH(CO₂CH₃)CH₂(4-咪唑)、
 -CH(CO₂CH₃)CH₂(5-咪唑)、 -CH(CO₂CH₃)CH₂CO₂CH₃、 或者
 -CH(CO₂CH₃)CH₂CO₂NH₂。

7. 一种具有以下结构的假单胞菌素前药、其可药用盐及其溶剂
 5 化物，



其中
 R 是

10



其中

R^a 和 R^{a'} 独立地是 H 或甲基，或者 R^a 或 R^{a'} 是烷基氨基，与 R^b 或 R^{b'}
 15 一起形成 6-元环烷基环、6-元芳族环或双键，或者与 R^c 一起形成 6-元
 芳族环；

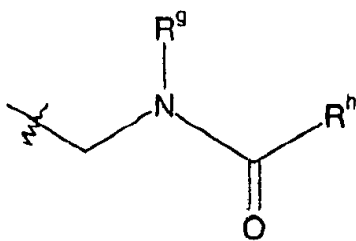
R^b 和 R^{b'} 独立地是 H、卤素或甲基，或者 R^b 或 R^{b'} 是氨基、烷基氨基、
 α-乙酰乙酸酯、甲氧基或羟基；

R^c 是 H、羟基、 C_1-C_4 烷氧基、羟基烷氧基、或者与 R^e 一起形成 6-元芳族环或 C_5-C_6 环烷基环；

R^e 是 H，或者与 R^f 一起是 6-元芳族环、 C_5-C_{14} 烷氧基取代的 6-元芳族环、或者 C_5-C_{14} 烷基取代的 6-元芳族环，和

5 R^f 是 C_8-C_{18} 烷基， C_5-C_{11} 烷氧基或联苯基；

R 是

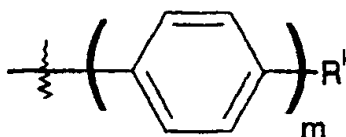


其中

10 R^g 是 H 或 C_1-C_{13} 烷基，且

R^h 是 C_1-C_{15} 烷基、 C_4-C_{15} 烷氧基、(C_1-C_{10} 烷基) 苯基、 $-(CH_2)_n$ -芳基、或 $-(CH_2)_n$ -(C_5-C_6 环烷基)，其中 $n=1$ 或 2；或者

R 是



15

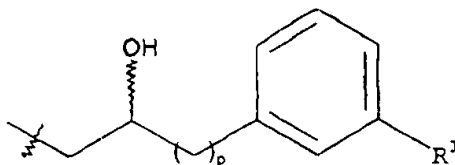
其中

R^i 是 H、卤素、或 C_5-C_8 烷氧基，

而且 m 是 1、2 或 3；

R 是

20



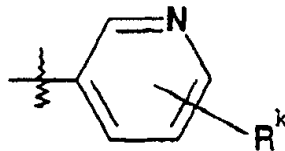
其中

R^j 是 C_5-C_{14} 烷氧基或 C_5-C_{14} 烷基, 并且

$p=0, 1$ 或 2 ;

R 是

5



其中

R^k 是 C_5-C_{14} 烷氧基, 或者

R 是 $-(CH_2)-NR^m-(C_{13}-C_{18}$ 烷基), 其中 R^m 是 H、 $-CH_3$ 或 $-C(O)CH_3$;

10 R^1 独立地是 H、酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮、或者酰氧基亚甲基羧酸酯, 条件是至少一个 R^1 是酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮或者酰氧基亚甲基羧酸酯;

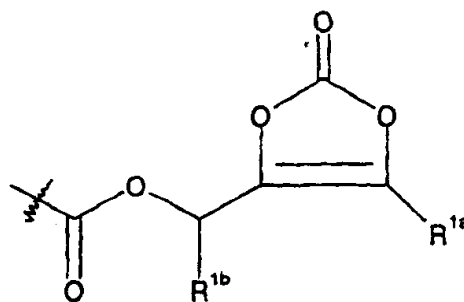
R^2 和 R^3 独立地是 $-OR^{2a}$ 、或者 $-N(R^{2b})(R^{2c})$,

其中

15 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是 H、 C_1-C_{10} 烷基、 C_3-C_6 环烷基、羟基 (C_1-C_{10}) 烷基、烷氧基 (C_1-C_{10}) 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、氨基 (C_1-C_{10}) 烷基、一-或二-烷基氨基 (C_1-C_{10}) 烷基、芳基 (C_1-C_{10}) 烷基、杂芳基 (C_1-C_{10}) 烷基、环杂烷基 (C_1-C_{10}) 烷基, 或者

R^{2b} 是氨基酸烷基酯的羧酸烷基酯残基并且 R^{2c} 是 H 或 C_1-C_6 烷基。

20 8. 权利要求 7 的前药, 其中所述酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮是由下式 1(a) 所表示的:

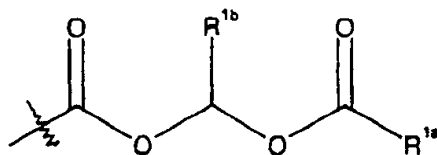


1(a)

其中 R^{1a} 是 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 烯基、苄基、或芳基，而且 R^{1b} 是 H 或甲基。

9. 权利要求 7 的前药，其中所述酰氧基亚甲基羧酸酯是由下式 1(b) 所表示的：

5

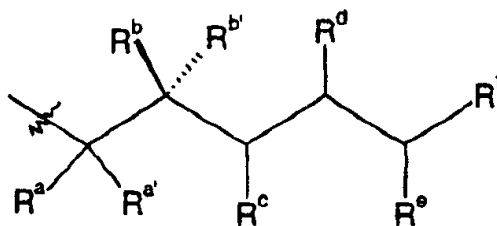


1(b)

其中 R^{1a} 是 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 烯基、苄基、或芳基，而且 R^{1b} 是 H 或甲基。

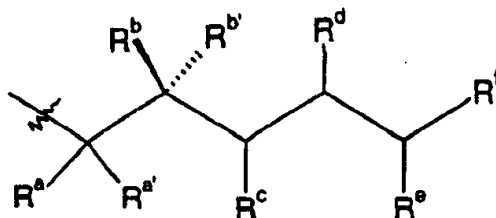
10. 权利要求 8 的前药，其中 R 由下面结构所表示：

10



其中 $R^{b'}$ 是羟基， R^a 、 $R^{a'}$ 、 R^b 、 R^c 、 R^d 和 R^e 都是 H，并且 R^f 是正辛基。

11. 权利要求 9 的前药，其中 R 由下面结构所表示：



15

其中 $R^{b'}$ 是羟基， R^a 、 $R^{a'}$ 、 R^b 、 R^c 、 R^d 和 R^e 都是 H，并且 R^f 是正辛基。

12. 权利要求 7 的前药，其中所述氨基酸烷基酯的羧酸烷基酯残基是由以下表示的： $-CH_2CO_2CH_3$ 、 $-CH(CO_2CH_3)CH(CH_3)_2$ 、 $-CH(CO_2CH_3)CH$ (苯基)、 $-CH(CO_2CH_3)CH_2OH$ 、 $-CH(CO_2CH_3)CH_2$ (对羟基苯基)、

-CH(CO₂CH₃)CH₂SH、 -CH(CO₂CH₃)CH₂(CH₂)₃NH₂、 -CH(CO₂CH₃)CH₂(4-咪唑)、
 -CH(CO₂CH₃)CH₂(5-咪唑)、 -CH(CO₂CH₃)CH₂CO₂CH₃、 或者
 -CH(CO₂CH₃)CH₂CO₂NH₂。

5 13. 前述权利要求任一项的化合物在制备用于对抗全身性真菌感染或者真菌皮肤感染的药物中的用途。

14. 一种药用制剂，含有权利要求 1 或 7 的假单胞菌素前药和可药用载体。

15. 一种治疗动物抗真菌感染的药物，其中所述药物含有权利要求 1 或 7 的化合物。

10 16. 一种治疗需要治疗的动物抗真菌感染的方法，包括向所述动物给药权利要求 7、8、9、10 或 11 的假单胞菌素前药。

说明书

假单胞菌素前药

发明领域

5 本发明涉及假单胞菌素 (pseudomycin) 化合物, 尤其是假单胞菌素化合物前药。

发明背景

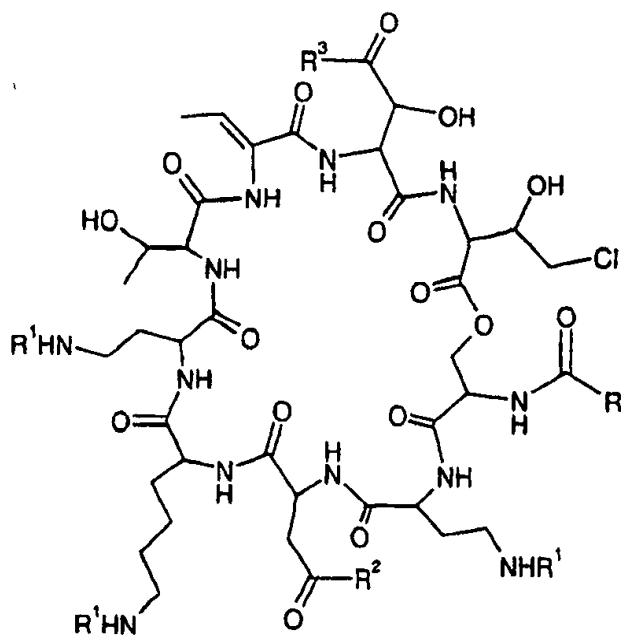
假单胞菌素是从丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*, 与植物有
10 关的细菌) 的液体培养物中分离的天然产物, 并且已显示具有抗真菌活性。
(例如参见, Harrison, L. 等, “假单胞菌素, 一族得自丁香假单胞菌的具有广谱抗真菌活性的新肽”, J. Gen. Microbiology, 137(12),
2857-65 (1991) 以及美国专利 US5, 576, 298 和 5, 837, 685)。与前面所述得自丁香假单胞菌的抗霉菌剂 (例如丁香霉素、丁香假单胞菌毒素和
15 丁香假单胞菌抑制素) 不同, 假单胞菌素 A-C 含有羟基天冬氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、脱氢氨基丁酸、赖氨酸和二氨基丁酸。假单胞菌素 A、
A'、B、B'、C、C' 的肽部分相应于具有末端羧基的 L-Ser-D-DabL-
Asp-L-Lys-L-Dab-L-aThr-Z-Dhb-L-Asp(3-OH)-L-Thr(4-Cl), 该羧基
20 在 N-末端 Ser 的 OH 上将大环闭合。这些类似物是通过 N-酰基侧链加以区别的, 即假单胞菌素 A 是被 3,4-二羟基十四烷酰基 N-酰化的, 假
单胞菌素 A' 是被 3,4-二羟基十五烷酰基 N-酰化的, 假单胞菌素 B 是
被 3-羟基十四烷酰基 N-酰化的, 假单胞菌素 B' 是被 3-羟基十二烷酰
基 N-酰化的, 假单胞菌素 C 是被 3,4-二羟基十六烷酰基 N-酰化的,
以及假单胞菌素 C' 是被 3-羟基十六烷酰基 N-酰化的。(例如参见 Ballio,
25 A., 等人, “得自丁香假单胞菌的生物活性脂缩肽: 假单胞菌素,” FEBS Letters, 355(1), 96-100, (1994) 和 Coiro, V.M., 等人, “使用得自
NMR 数据的几何位距和分子动力学通过计算机模拟确定的丁香假单胞菌
MSU 16H 植物毒性脂缩肽假霉素 A 的溶液构象,” Eur. J. Biochem.,
257(2), 449-456 (1998))。

30 已知假单胞菌素具有一定的生物副作用。例如, 当假单胞菌素经

静脉内给药时，已观察到静脉内皮破坏、组织破坏、发炎和宿主组织的局部毒性。因此，需要从这类化合物中鉴别出对治疗真菌感染有用而没有目前观察到的副作用的化合物。

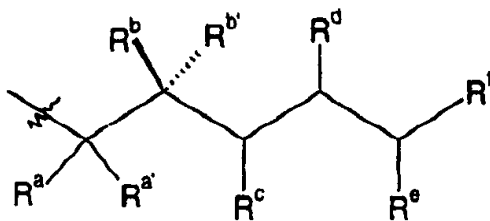
发明简述

- 5 本发明提供了一种用作抗真菌剂的下面结构式所表示的假单胞菌素前药、其可药用的盐及其溶剂化物，



其中 R 是

10



其中

- R^a 和 $R^{a'}$ 独立地是 H 或甲基，或者 R^a 或 $R^{a'}$ 是烷基氨基，与 R^b 或 $R^{b'}$ 一起形成 6-元环烷基环、6-元芳族环或双键，或者与 R^c 一起形成 6-元芳族环；

15

R^b 和 $R^{b'}$ 独立地是 H、卤素或甲基，或者 R^b 或 $R^{b'}$ 是氨基、烷基氨基、

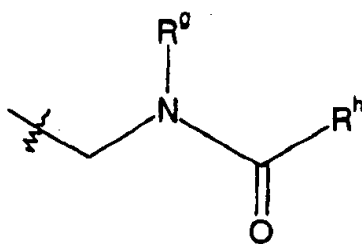
α -乙酰乙酸酯、甲氧基或羟基;

R^c 是 H、羟基、 C_1-C_4 烷氧基、羟基 C_1-C_4 烷氧基、或者与 R^e 一起形成 6-元芳族环或 C_5-C_6 环烷基环;

R^e 是 H, 或者与 R^f 一起形成 6-元芳族环、 C_5-C_{14} 烷氧基取代的 6-元芳族环、或者 C_5-C_{14} 烷基取代的 6-元芳族环, 和

R^f 是 C_8-C_{18} 烷基, 或 C_5-C_{11} 烷氧基;

R 是



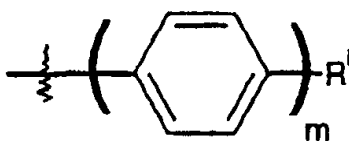
10 其中

R^e 是 H 或 C_1-C_{13} 烷基, 而且

R^h 是 C_1-C_{15} 烷基、 C_4-C_{15} 烷氧基、(C_1-C_{10} 烷基) 苯基、 $-(CH_2)_n$ -芳基、或 $-(CH_2)_n$ -(C_5-C_6 环烷基), 其中 $n=1$ 或 2; 或者

R 是

15

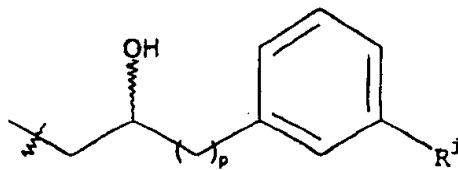


其中

R^i 是 H、卤素、或 C_5-C_8 烷氧基, 而且

m 是 1、2 或 3;

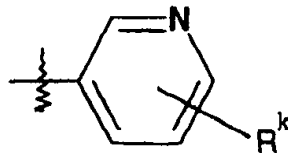
20 R 是



其中

R^j 是 C_5-C_{14} 烷氧基或 C_5-C_{14} 烷基并且 $p=0, 1$ 或 2 ;

5 R 是

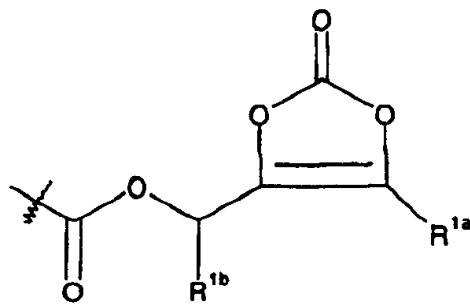


其中

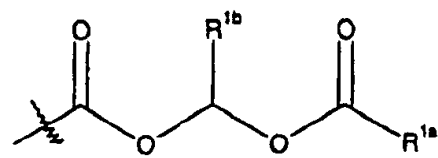
R^k 是 C_5-C_{14} 烷氧基, 或者

10 R 是 $-(CH_2)-NR^m-(C_{13}-C_{18}$ 烷基), 其中 R^m 是 H, $-CH_3$ 或 $-C(O)CH_3$;

R^1 独立地是 H, 酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮 (例如下面所述的化合物 1(a))、或者酰氧基亚甲基羧酸酯 (例如下述的化合物 1(b))



1(a)



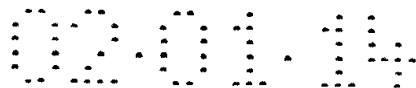
1(b)

15

其中

R^{1a} 是 H, C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 烯基、苄基、或芳基, 而且

R^{1b} 是 H 或甲基



条件是至少一个 R^1 是酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮或者酰氧基亚甲基羧酸酯;

R^2 和 R^3 独立地是 $-OR^{2a}$ 、或者 $-N(R^{2b})(R^{2c})$,

其中

5 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地是 H、 C_1-C_{10} 烷基(例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基等)、 C_3-C_6 环烷基(例如环丙基、环丁基、环戊基、环戊基亚甲基、甲基环戊基、环己基等)、羟基(C_1-C_{10})烷基、烷氧基(C_1-C_{10})烷基(例如甲氧基乙基)、或 C_2-C_{10} 烯基、氨基(C_1-C_{10})烷基、一-或二-烷基氨基(C_1-C_{10})烷基、芳基(C_1-C_{10})烷基(例如苄基)、
10 杂芳基(C_1-C_{10})烷基(例如 3-吡啶基甲基、4-吡啶基甲基)、或环杂烷基(C_1-C_{10})烷基(例如 N-四氢-1,4-咪嗪基乙基和 N-哌嗪基乙基), 或者

R^{2b} 是氨基酸烷基酯的羧酸烷基酯残基(例如 $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{苯基})$ 、 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2$ (对羟基苯基)、 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{SH}$ 、
15 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2$ (4-或5-咪唑)、 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_2$ 等), 而且

R^{2c} 是 H 或 C_1-C_6 烷基。

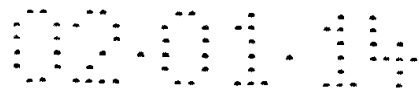
在本发明的另一实施方案中, 提供了一种药用制剂, 它包括上述的假单胞菌素前药和可药用的载体。

20 在本发明的又一实施方案中, 提供了一种在需要治疗的动物中治疗抗真菌感染的方法, 该方法包括向所述动物给药上述的假单胞菌素前药。本发明还提供了上述假单胞菌素前药在生产用于治疗动物内抗真菌感染的药物的用途。

定义

25 除非另有说明, 本文所用的术语“烷基”指的是含有 1-30 个碳原子的通式 C_nH_{2n+1} 烃基。烷基可以是直链(例如甲基、乙基、丙基、丁基等)、支链(例如异丙基、异丁基、叔丁基、新戊基等)、环状(例如环丙基、环丁基、环戊基、甲基环戊基、环己基等)、或者多环状(例如二环[2.2.1]庚烷、螺[2.2]庚烷等)。所述烷基可以是被取代或者没有
30 取代的。类似地, 烷氧基、烷酰基或链烷酸酯中的烷基部分具有上面的相同定义。

术语“烯基”指的是含有至少一个碳碳双键的无环烃。所述烯基



可以是直链、支链、环状或多环状。所述烯基可以是被取代或者未取代的。链烯氧基、链烯酰基或链烯酸酯中的烯基部分具有上面的相同定义。

5 术语“芳基”指的是具有单环体系(例如苯基)或稠环体系(例如萘、蒽、菲等)的芳族部分。所述芳族可以是被取代或者没有取代的。

在有机化学领域,特别是有机生化领域,应广泛地理解为,化合物的有效取代是允许的,或者甚至是有用的。例如,在本发明中,术语烷基允许包括典型的烷基取代基,例如甲基、乙基、丙基、己基、异辛基、十二烷基、硬脂基(stearyl)等。术语“基团”特定假设并
10 允许包括在本领域常规的烷基上取代,例如羟基、卤素、烷氧基、羰基、酮基、酯基、氨基甲酸酯基(Carbamato)等,以及包括没有取代的烷基部分。然而,本领域技术人员通常理解为,取代基应经选择,以便对化合物的药理特性没有负面影响,或者对该药物的使用没有负面干扰。上面定义的任意基团的合适取代基包括烷基、烯基、炔基、
15 芳基、卤素、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、一-和二-烷基氨基、季铵盐、氨基烷氧基、羟基烷基氨基、氨基烷硫基、氨基甲酰基、羰基、羧基、羟乙酰基、甘氨酸基、胍基、脒基、及其组合。

20 术语“前药”指的是一类药物,它们在体内由于代谢过程转化(即生物转化)产生药理作用。在本发明中,假单胞菌素前药化合物含有连接体,所述连接体在血浆中可以经酯酶裂开,从而产生所述活性药。

术语“动物”指的是人、宠物(例如狗、猫和马)、食物源动物(例如牛、猪、羊和家禽)、动物园动物、海洋动物、鸟类和其它类似动物种。

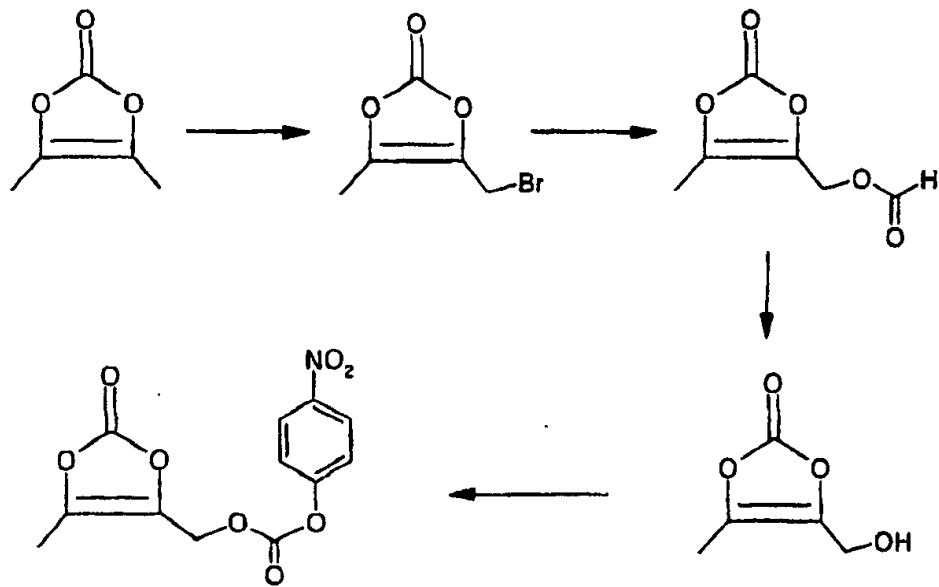
25

发明详述

30 申请人发现假单胞菌素天然或半合成产物的前药衍生物的副作用比相应天然产物的低并且在体内保留了抗白色念珠菌(*C. albican*)、新型隐球酵母(*C. neoformas*)和烟曲霉(*A. fumigatus*)的功效。该前药是通过将与假单胞菌素环肽环体系中的赖氨酸或2,4-二氨基丁酸肽单元相连的侧氨基中至少一个酰化以形成酰基取代基生产的。酰化剂(或连接体)通常是含有合适的离去基团的酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环

戊烯-2-酮或酰氧基亚甲基羧酸酯酰化化合物，以便可以形成与假单胞菌素结构上的侧氨基连接的氨基甲酸酯键。合适的离去基团对本领域技术人员为公知并包括例如对硝基苯氧基和 N-氧基琥珀酰亚胺的基团。

5 酰氧基亚甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮酰化化合物可以使用下面路线 I 所示的合成路径合成。为了说明的目的，描述了一特定酰化化合物。然而，本领域技术人员应理解的是，人们可以使用相同的基本合成方法合成各种衍生物。

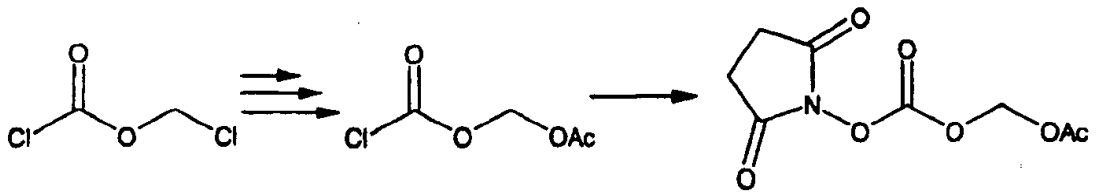


10

路线 I

对于这些合成步骤更详细的描述，参见下面实施例的制备部分。

15 酰氧基亚甲基羧酸酯酰化化合物可以使用下面路线 II 所示的合成路径合成。为了说明的目的，描述了一特定的酰化化合物。然而，本领域技术人员应理解的是，人们可以使用相同的基本合成方法合成各种衍生物。



路线 II

5 对于这些合成步骤更详细的描述，参见下面实施例的制备部分。

正如早先所讨论的，假单胞菌素是从丁香假单胞菌分离的天然产物，它被表征为酯缩肽 (Lipodepsinonapetpides)，其含有通过内酯键闭环的环肽部分并包括不寻常的氨基酸 4-氯苏氨酸 (ClThr)、3-羟基天冬氨酸 (HOAsp)、2,3-脱氢-2-氨基丁酸 (Dhb) 和 2,4-二氨基丁酸 (Dab)。
 10 (Dab)。生长丁香假单胞菌的不同菌株从而生产不同假单胞菌素类似物 (A、A'、B、B'、C 和 C') 的方法描述如下并且更详细地描述在 Hilton 等人于 2000 年 4 月 14 日提交的题为“通过丁香假单胞菌生产假单胞菌素 (Pseudomycin Production by Pseudomonas Syringae)”的 PCT 专利申请，其序列号为 PCT/US00/08728、Kulanthaivel 等人于 2000
 15 年 4 月 14 日提交的题为“假单胞菌素天然产物 (Pseudomycin Natural Products)”的 PCT 专利申请，其序列号为 PCT/US00/08727、以及 US 5,576,298 和 5,837,685 中，在此将它们都引入作为参考。

产生一种或多种假单胞菌素的丁香假单胞菌分离菌株在本领域为已知。野生型菌株 MSU 174 和通过转座子诱变产生的该菌株突变体 MSU
 20 16H，描述在 US 5,576,298 和 5,837,685；Harrison 等人的“Pseudomycins, a family of novel peptides from Pseudomonas syringae possessing broad-spectrum antifungal activity,” J. Gen. Microbiology, 137, 2857-2865 (1991)；以及 Lamb 等人的“Transposon mutagenesis and tagging of fluorescent pseudomonas: Antimycotic production is necessary for control of Dutch elm disease,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6447-6451 (1987) 中。

适合生产一种或多种假单胞菌素的丁香假单胞菌菌株可以从包括植物 (例如大麦植物、柑橘植物和丁香植物) 的环境源以及，例如土壤、

水、空气和灰尘的源分离。优选菌株是从植物分离的。从环境源分离的丁香假单胞菌菌株可以称之为野生型。正如本文所用的，“野生型”是指天然存在于丁香假单胞菌正常菌群中的显性基因型(例如在自然界中发现且不是通过实验室操作生产的丁香假单胞菌菌株或分离物)。与大多数生物体相同，所用的产假单胞菌素(丁香假单胞菌菌株如 MSU 5 174、MSU 16H、MSU 206、25-B1、7H9-1)的培养物的特性易于变化。因此，这些菌株的后代(例如重组体、突变体和变种)可以通过本领域已知的方法获得。

丁香假单胞菌 MSU 16H 从 the American Type Culture 10 Collection, Parklawn Drive, Rockville, MD, USA 是公众可得的，其保藏号为 ATCC 67028。丁香假单胞菌菌株 25-B1、7H9-1 和 67 H1 于 2000 年 3 月 23 日保藏在 the American Type Culture Collection 并且分别具有以下保藏号：

- 25-B1 保藏号 PTA-1622
- 15 7H9-1 保藏号 PTA-1623
- 67 H1 保藏号 PTA-1621

丁香假单胞菌的突变体菌株也适合生产一种或多种假单胞菌素。正如本文所用的，“突变体”是指在菌株表型中突然可遗传的变化，它可以是自发的或者通过已知诱变剂诱导的，例如辐射(例如紫外线辐射或 x-射线)、化学诱变剂(例如甲基磺酸乙酯(EMS)、二环氧辛烷、N-甲 20 基-N-硝基-N'-硝基鸟嘌呤(NTG)和亚硝酸)、位置特异性诱变和转座子介导诱变。产假单胞菌素的丁香假单胞菌突变体可以通过用有效地产生突变体的量的诱变剂处理该细菌来生产，所示突变体过量地生产一种或多种假单胞菌素、生产一种超过其它假单胞菌素的假单胞菌素(例 25 如假单胞菌素 B)、或者在有利的生长条件下生产一种或多种假单胞菌素。尽管所用诱变剂的类型和数量可以变化，但是优选方法是可系列地将 NTG 稀释到 1-100 $\mu\text{g/ml}$ 的水平。优选突变体是过量地产生假单胞菌素 B 并在最小限定的培养基中生长的那些。

为了以下所需特性：生长习性、生长培养基营养源、碳源、生长 30 条件、氨基酸需要等，可以对丁香假单胞菌的环境分离物、突变体菌株和其它所需的丁香假单胞菌菌株经过选择。优选选择在最小限定的培养基例如 N21 培养基上生长和/或产生一种或多种量大于约 10 $\mu\text{g/ml}$

的假单胞菌素的产假单胞菌素的丁香假单胞菌菌株。优选菌株当在含有三种或更少氨基酸，任选含有脂类、马铃薯产品或其组合的培养基上生长时，呈现产生一种或多种假单胞菌素的特性。

5 使用本领域中已知的方法，通过转化丁香假单胞菌菌株，可以培育重组菌株。除了这些菌株产生的抗生素之外，通过使用重组 DNA 技术，可将丁香假单胞菌菌株转化而表达不同的基因产物。例如，人们可以修饰这些菌株，从而引入多重拷贝的内源假单胞菌素生物合成基因，以获得更大的假单胞菌素产量。

10 为了从丁香假单胞菌野生型或突变体菌株生产一种或多种假单胞菌素，该生物体在含有有效量的三种或更少氨基酸，优选谷氨酸、甘氨酸、组氨酸或其组合的水性营养培养基中搅拌培养。或者，将甘氨酸与一种或多种的马铃薯产品和脂类组合。在丁香假单胞菌能够有效生长并产生所需假单胞菌素的条件下进行培养。有效条件包括温度为约 22℃-约 27℃，时间为约 36 小时-约 96 小时。在丁香假单胞菌的培养过程中控制培养基中的氧浓度对假单胞菌素的生产是有益的。优选氧水平保持在约 5-50%饱和度，更优选约 30%饱和度。用空气、纯氧或含有氧的气体混合物喷射可以调节培养基中的氧浓度。

15 在丁香假单胞菌的培养过程中控制培养基的 pH 也是有益的。假单胞菌素在碱性 pH 下不稳定，并且如果培养基的 pH 在约 6 以上持续约 12 小时以上的时间，能够产生明显的降解。优选培养基的 pH 保持在 6-4 之间。丁香假单胞菌当在分批培养物中生长时可以产生一种或多种假单胞菌素。然而，分批补加 (fed-bath) 或半连续加入葡萄糖和任选，加入酸或碱 (例如氢氧化铵) 控制 pH 可以提高产量。假单胞菌素产量还可以使用自动加入葡萄糖和氢氧化铵的连续培养法来提高。

25 丁香假单胞菌菌株的选择可以影响产生的假单胞菌素的量和分布。例如，菌株 MSU 16H 和 67 H1 各自主要产生假单胞菌素 A，但是还产生假单胞菌素 B 和 C，其比例典型地为 4:2:1。菌株 67 H1 典型地产生的假单胞菌素的量要比菌株 MSU 16H 所产生的的高约 3-5 倍。与菌株 MSU 16H 和 67 H1 相比，菌株 25-B1 产生更多的假单胞菌素 B 和更少的假单胞菌素 C。菌株 7H9-1 的特点是主要产生假单胞菌素 B，并且假单胞菌素 B 的产量比其它菌株的高。例如，该菌株可以产生的假单胞菌素 B 是假单胞菌素 A 或 C 的至少 10。

另外，该前药可以由 N-酰基半合成化合物形成。半合成假单胞菌素化合物可以通过交换 L-丝氨酸单元上的 N-酰基基团来合成。各种 N-酰基衍生物的例子描述在 Belvo 等人于同期申请的题为“假单胞菌素 N-酰基侧链类似物 (Pseudomycin N-Acyl Side-Chain Analogs)”的 PCT 专利申请序列号 _____ 中，将其引入本文作为参考。一般说来，使用以下的四个合成步骤将天然存在的假单胞菌素化合物生产为其半合成化合物：(1) 选择性氨基保护；(2) 所述 N-酰基侧链的化学或酶促脱酰化；(3) 用不同侧链再酰化；和(4) 所述氨基去保护。

位置 2、4 和 5 的侧氨基可以使用氨基保护领域的技术人员已知的任意标准方法加以保护。所用氨基保护基团的精确种类不关键，只要衍生化的氨基在中间体分子的其它位置上相对接下来的反应条件稳定并且所述保护基团可以在适宜时候选择性地除去，而对包括任意其它氨基保护基团的分子剩余部分没有破坏即可。适合的氨基保护基团包括苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、对溴苄氧基羰基、对甲氧基苄氧基羰基、对甲氧基苄基偶氮苄氧基羰基、对苄基偶氮苄氧基羰基、叔丁氧基羰基、环戊氧基羰基和邻苯二甲酰亚氨基。优选的氨基保护基团是叔丁氧基羰基 (t-Boc)、烯丙氧基羰基 (Alloc)、邻苯二甲酰亚氨基和苄氧基羰基 (CbZ 或 CBZ)。适合的保护基团的进一步的例子描述在 T.W. Greene, “Protective Groups in Organic Synthesis,” John Wiley and Sons, New York, N.Y., (2nd ed., 1991), at chapter 7.

具有 γ 或 δ 羟基化侧链 (例如 3,4-二羟基十四碳酸酯) 的 N-酰基的脱酰作用可以用含水溶剂中的酸处理氨基保护的假单胞菌素化合物来实现。适合的酸包括乙酸和三氟乙酸。优选的酸是三氟乙酸。如果使用三氟乙酸的话，可以在室温或接近室温下进行该反应。然而，当使用乙酸时，反应通常在约 40°C 下进行。适合的含水溶剂体系包括乙腈、水、及其混合物。有机溶剂加大该反应速度；然而，加入有机溶剂可能导致其它副产物。在侧链上缺少 δ 或 γ 羟基的假单胞菌素化合物 (例如假单胞菌素 B 和 C') 可以经酶促脱酰。适合的脱酰酶包括多粘菌素酰基转移酶 (164-16081 脂酰转移酶 (粗品) 或 161-16091 脂酰转移酶 (纯品))，可从 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 获得)、或者 ECB 脱酰酶。可以使用本领域技术人员公知的标准脱酰步骤进行该酶促脱酰作用。例如，使用多粘菌素酰基转移酶的常规步骤可以在如下文献

各种(即荚膜组织胞浆菌(*H. capsulatum*)); 隐球酵母属各种(即新型隐球酵母(*C. neoformans*)); 芽生菌属各种(即皮炎芽生菌(*B. dermatitidis*)); 镰孢属各种; 发癣菌属各种、*Pseudallescheria boydii*、粗球孢子菌、申克氏孢子丝菌等。

5 所以, 本发明的化合物和制剂在制备用于对抗全身性真菌感染或者真菌皮肤感染的药物中 useful。因此, 提供了一种抑制真菌活性的方法, 该方法包括将本发明的假单胞菌素前药与真菌接触。优选方法包括抑制白色念珠菌或烟曲霉活性。术语“接触”包括本发明化合物与真菌结合或接合, 或者表面接触或相互接触。该术语对该方法没有赋予任何其它限制, 例如通过抑制机理。这些方法定义为包含通过这些化合物的作用及其内在抗真菌性能抑制寄生物和真菌的活性。

10 还提供了一种治疗真菌感染的方法, 包括对需要这种治疗的宿主动物给药有效量的本发明药物制剂。优选方法包括治疗白色念珠菌、新型隐球酵母或烟曲霉感染。术语“有效量”是指能够抑制真菌活性的活性化合物的量。给药剂量随例如以下因素而变化: 感染的性质和严重程度、宿主的年龄和总体健康状况、宿主对抗真菌剂的耐受性和宿主的种类。具体剂量方案同样可以根据这些因素而变化。药物可以单一日剂量或在一天期间的多次剂量的方式施用。该方案可以从约 2-3 天延续至约 2-3 周或更长。典型的日剂量(以单一或均分剂量给药)含有约 0.01 mg/kg-100 mg/kg 体重的活性化合物的剂量水平。优选日剂量通常为约 0.1 mg/kg-60 mg/kg, 更优选为约 2.5 mg/kg-40 mg/kg。宿主通常是包括以下的动物: 人、宠物(例如狗、猫和马)、食物源动物(例如牛、猪、羊和家禽)、动物园动物、海洋动物、鸟类和其它类似的动物种类。

25 实施例

在整个实施例中使用以下缩写代表各自所列的物料:

ACN-乙腈

TFA-三氟乙酸

DMF-二甲基甲酰胺

30 EDCI-1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐

BOC=叔丁氧基羰基, $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$

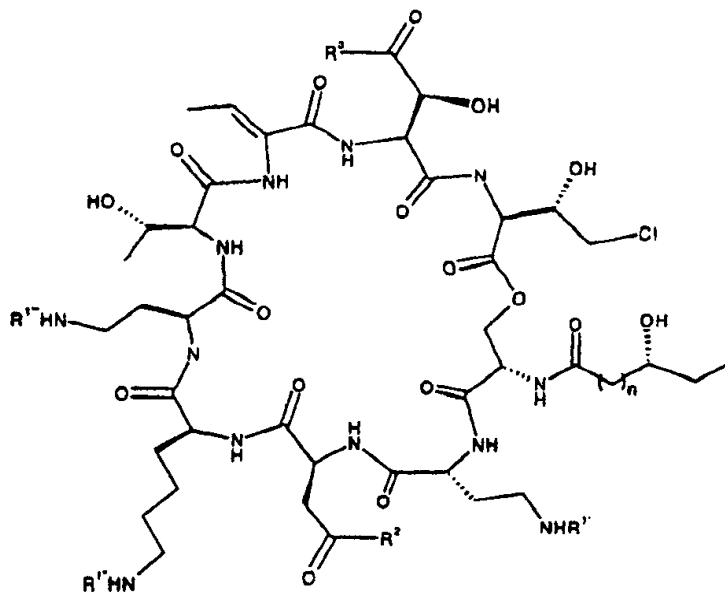
CBZ=苄氧基羰基, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$

PyBOP=苯并三唑-1-基氧基-三吡咯烷基磷六氟磷酸盐

TBTU=邻苯并三唑-1-基-N,N',N''-四甲基脒鎓四氟硼酸盐

DIEA=N,N-二异丙基乙胺

使用以下结构 II 描述实施例 1-7 中得到的产品。



II

5

抗真菌活性的检测和定量:

通过使用标准琼脂稀释试验或圆盘扩散试验获得化合物的最小抑制浓度(MIC)在体外测定抗真菌活性。在测定抗真菌活性中所用的典型真菌是白色念珠菌。当测定样品(50 μl)在白色念珠菌 x657 接种的琼脂平皿上产生 10-12 mm 直径区域的抑制时, 认为抗真菌活性显著。

10

尾静脉毒性:

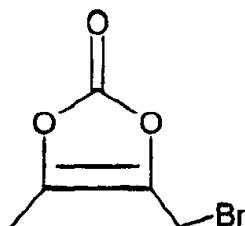
在 0、24、48 和 72 小时通过侧部尾静脉用 0.1 ml 的测定化合物(20 mg/kg)经静脉(IV)处理小鼠。每一组中有 2 只小鼠。化合物配制于 5.0% 葡萄糖和注射用无菌水中。在第一次处理之后对小鼠监控 7 天并密切观察包括以下的刺激信号: 红斑、肿胀、变色、坏死、尾失掉和任何其它的显示毒性副作用的信号。

15

本研究所用的小鼠是均重为 18-20 g 的远系繁殖的雄性 ICR 小鼠(可从 Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN 获得)。

制备

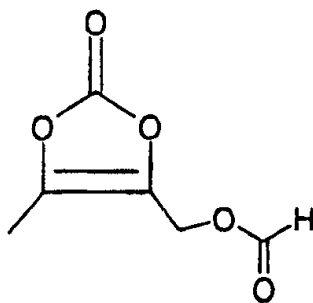
20 制备 4-溴甲基-5-甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮(1a-1):

1a-1

回流加热 0.1 mol 4,5-二甲基-1,3-二氧杂环戊烯-2-酮、0.1 mol N-溴琥珀酰亚胺和 0.1 g 2,2-偶氮二(2-甲基丙腈)的 70 ml 四氯化碳 (CCl₄) 混合物。6 小时之后, 该混合物用冰冷却并过滤。滤液用 2x50 ml 水、2x50 ml 氯化钠溶液和另一 50 ml 水洗涤。溶液用硫酸钠干燥并蒸发至干, 在真空下干燥获得 16.5 g (85%产率) 的油, 它具有与结构 1a-1 一致的 ¹H-NMR 数据。

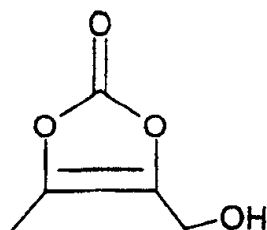
制备化合物 (1a-2):

10

1a-2

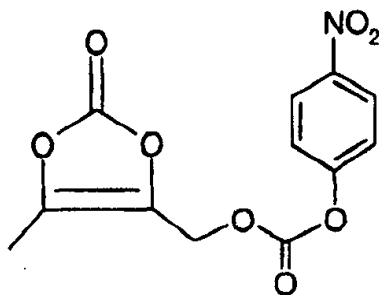
化合物 1a-2 是使用 Synthetic Communication, 22 (9), 1297 (1992) 中所述的方法合成的, 获得 11.5 g (78%产率) 的粗品油。

制备化合物 1a-3:

1a-3

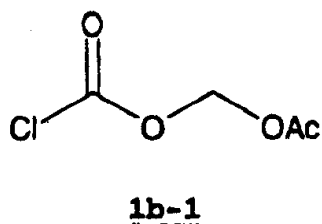
在 4℃ 下将 11.5 g 化合物 1a-2 (粗品油)、500 ml 37% HCl 和 300 ml 甲醇的混合物搅拌过夜。然后将该混合物浓缩形成油。通过柱色谱(1:1 乙酸乙酯/己烷)提纯获得 5.27 g (33.8%) 产品，它具有与结构 1a-3 一致的 ¹H-NMR 数据。

制备化合物 1a-4:

1a-4

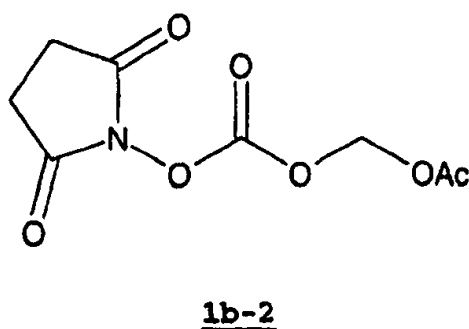
10 将 3.0 g 化合物 1a-3 和 2.02 g 吡啶的 30 ml 氯仿混合物冷却至 0-4℃。将 5.08 g 氯甲酸对硝基苯酯的 30 ml 氯仿溶液加入到该混合物中并搅拌约 4.5 小时。该混合物用冷 1% 氢氧化钠 (3x30 ml)、1N HCl (2x30 ml)、水 (2x30 ml) 和盐水 (2x30 ml) 洗涤。该溶液用硫酸钠干燥、过滤并用二氯甲烷洗涤。除去溶剂得到静置固化的油。将该固
15 体放入 10 ml 二氯甲烷中并加入己烷形成沉淀。将混合物过滤，用己烷洗涤，并在真空下干燥过夜，获得 6.39 g (94% 产率) 的产物，其 ¹H-NMR 数据与 1a-4 的结构一致。

制备化合物 1b-1:



化合物 1b-1 可以使用 Synthesis, 1159 (1990) 中所述的方法合成。
制备化合物 b-2:

5

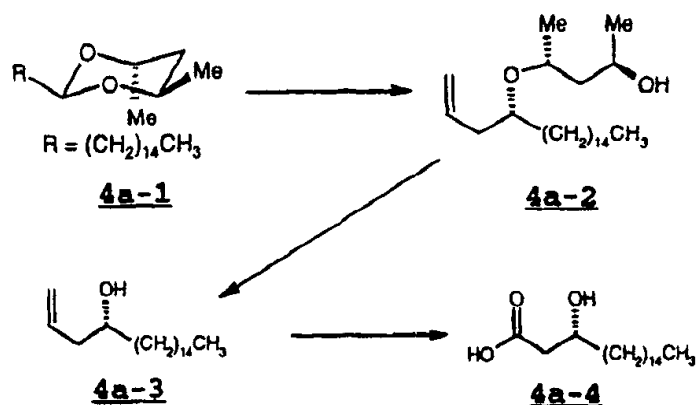


在 0℃ 下将 4.57 g (30 mmol) 粗品 1b-1 的 40 ml 二氯甲烷溶液加入到 3.91 g (34 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺和 2.7 g (34 mmol) 吡啶的 100 ml 二氯甲烷溶液中。0℃ 下搅拌 30 分钟之后，在室温下将该混合物静置过夜。混合物然后用水洗涤四次并将有机相用硫酸钠干燥。过滤之后，蒸发掉溶剂，获得 4.0 g (58% 产率) 的油状粗品，其 1H-NMR 数据与 1b-2 的结构一致。

制备 CBZ-保护的假单胞菌素 B (2a-1):

将假单胞菌素 B 溶解/悬浮于 DMF (20 mg/ml, Aldrich Sure Seal) 中。在室温下搅拌的同时加入 N-(苄氧基羰基氧基)琥珀酰亚胺 (6 eq)。室温下搅拌 32 小时。通过 HPLC (4.6x50 mm, 3.5 μm, 300-SB, C8, Zorbax 柱) 监控反应。在室温下于高真空旋转蒸发器上将反应物浓缩至 10 ml。将物料放入冷冻器中直到准备好制备色谱。在逆相制备 HPLC 纯化并冷冻干燥之后获得一非晶形白色固体 (化合物 2a-1)。

20 制备化合物 2b-1:



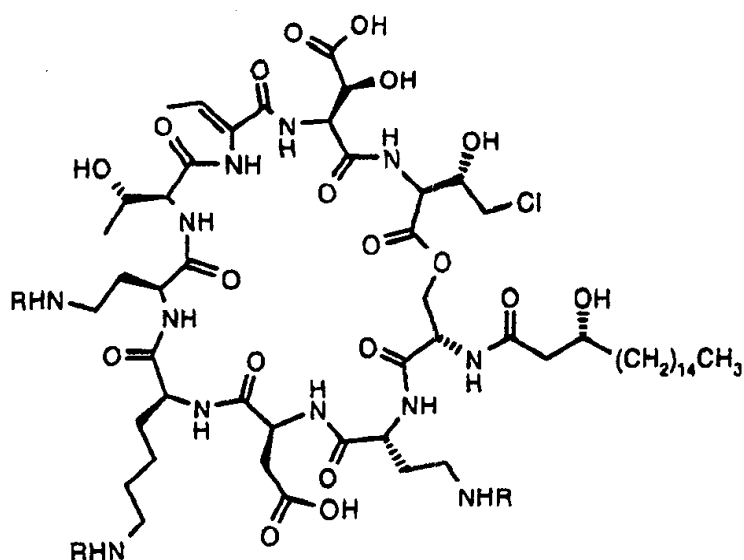
-78℃下向手性缩醛 4a-1 (6.22 g, 19.1 mmol) 的二氯甲烷溶液 (190 mL) 中加入三甲基烯丙基甲硅烷 (10.9 mL, 68.69 mmol), 接着加入纯
 5 TiCl_4 (2.94 mL, 26.71 mmol)。反应物在-78℃下搅拌 1 小时, 然后在-40℃下搅拌 2 小时。此时, 反应用甲醇 (15 mL) 终止并用二氯甲烷 (200 mL) 稀释。所得反应混合物用 1N HCl (2 x 50 mL)、水和盐水洗涤。有机层经过干燥并在真空下浓缩得到一残余物, 将其通过硅胶色谱 (10% EtOAc/己烷) 提纯, 得到 5.51 g (78%) 的目的产品 4b-1。

10 向 4b-1 (8.56 g, 23.3 mmol) 的二氯甲烷 (155 mL) 溶液中加入 PCC (10.0 g, 46.5 mmol)。反应物在室温下搅拌 18 小时, 然后通过一 Celite 垫过滤。滤液在真空下浓缩得到一微红色残余物, 将其通过硅胶色谱 (10% EtOAc/己烷) 提纯, 得到 8.36 g (80%) 甲基酮中间体 (结构未显示)。将这里获得的中间体 (8.36 g, 22.8 mmol) 溶于 THF (60 mL) 和 MeOH (30
 15 mL) 中。向该溶液中加入 7.5 M KOH (15 mL)。室温下搅拌 3 小时之后, 除去部分溶剂。剩余反应混合物用 EtOAc/Et₂O (3:1 比, 350 mL) 稀释。有机层用水 (3 x 50 mL) 和盐水洗涤。所得有机层经过干燥并在真空下浓缩得到残余物, 将其通过硅胶色谱 (10% EtOAc/己烷) 提纯, 得到 6.22 g (96%) 的目的白色固体产品 4c-1。

20 将甲醇 4c-1 (6.22 g, 22.0 mmol) 溶于 THF 水溶液 (5.5 mL 水和 55 mL THF)。向该溶液中加入 NMO (4.42 g, 33.0 mmol), 接着加入 OsO₄ (280 mg 溶于 THF, 1.10 mmol)。在室温下搅拌反应过夜。此时加入二硫化钠 (4 g)。搅拌反应 2 小时, 然后用 EtOAc (300 mL) 稀释。整个混合物用水 (2 x 40 mL) 和盐水洗涤。所得有机层经过干燥并在真空下
 25 浓缩得到相应的三醇中间体。将该物料溶于 MeOH (200 mL) 和水 (40 mL)

中。向该溶液中加入 NaIO_4 (10.6 g, 49.5 mmol)。室温下搅拌 1 小时之后，反应物通过 Celite 过滤并通过短柱硅胶色谱 (30% EtOAc/己烷) 提纯，得到约 10 g (>100%) 粗品 β -羟基醛。将由此获得的不纯醛溶于叔丁醇 (100 mL) 和环己烯 (14 mL) 中。室温下向该溶液中加入 NaClO_2 (15.97 g, 176 mmol) 和 KH_2PO_4 (17.8 g, 132 mmol) 的水溶液 (50 mL)。反应物在室温下搅拌 6 小时，然后在 0°C 下用 5N HCl 终止反应至 pH=4。反应物用 3:1 EtOAc/ Et_2O (3 x 250 mL) 混合溶剂萃取。有机层用盐水洗涤并干燥和浓缩，得到 7.3 g (>100%) 粗品酸 4d-1，将其直接用于偶合反应。

10 制备假单胞菌素 C-18 (化合物 4b-2):



4a-2 R = Cbz
4b-2 R = H

将粗品酸 4d-1 (2.1 g, 6.99 mmol) 溶于无水 THF (20 mL) 和 DMF (20 mL) 中。向该溶液中加入 HOBt (1.23 g, 9.08 mmol) 和 EDCI (1.74 g, 9.08 mmol)。室温下搅拌 8 小时之后，加入 CBZ-保护的假单胞菌素核 (3.87 g, 2.80 mmol)。在室温下搅拌反应 2 天。此时部分地除去溶剂。将反应混合物加样到制备逆相 HPLC 系统上提纯 (注射 4 次)。冷冻干燥之后，分离出 550 mg (12%) 的 CBZ-保护的 C18 酰基衍生物 4a-2 与 HOBt 活化的侧链酯 (1 g)。回收的侧链酯 (1.0 g, 2.40 mmol) 接下来与 CBZ-保护的假单胞菌素核 (1.33 g, 0.96 mmol) 在无水 THF 和 DMF (各 10 mL)

中反应。接着进行上述相同的提纯步骤之后，获得另外量的 CBZ-保护的 C18 衍生物 4a-2 (606 mg, 38%)。

-78℃ 下向 CBZ-保护的 C18 衍生物 4a-2 (550 mg, 0.33 mmol) 的 10% HOAc/MeOH 溶液 (55 mL) 中加入 Pd/C (550 mg, 10% 钯含量)。反应物在
5 1.5 大气压下氢化 40 分钟。通过分析 HPLC 监控反应过程。结束之后，
过滤出催化剂并在真空下将滤液于 30℃ 浓缩。所得残余物再次溶于 1:1
含水乙腈中并冷冻干燥，得到 250 mg (60%) 的目的产品 4b-2。

在以下每个实施例中，使用特定的假单胞菌素化合物作为原料；
然而，本领域技术人员将意识到，除了使用具有不同 N-酰基的假单胞
10 菌素化合物开始之外，使用相同步骤就可以合成其它 N-酰基衍生物。

实施例 1

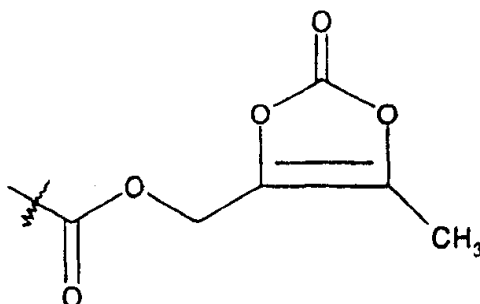
以下实施例举例说明假单胞菌素 C' (n = 12, R² 和 R³ = -OH) 的一
取代、二取代或三取代的酰氧基烷基氨基甲酸酯前药的制备。

15 向含有假单胞菌素 C' (1.5 g, 1 当量) 的 DMF 溶液 (1 升) 中加入 1.5
当量的化合物 1a-4 并在室温下搅拌混合物约 3 天。部分地除去溶剂并
将残余物通过逆相 HPLC (Waters™, Delta Pak C18 柱) 提纯获得以下产
物和产物的混合物:

- 86 mg 纯一取代的假单胞菌素 C' (1-1);
- 20 87 mg 一取代的假单胞菌素 C' 的混合物 (1-2);
- 177 mg 二取代的假单胞菌素 C' 的混合物 (1-3);
- 132 mg 纯二取代的假单胞菌素 C' (1-4); 和
- 248 mg 三取代的假单胞菌素 C' (1-5).

25 就三取代的前药或二取代的前药混合物而言，没有观察到尾静脉的刺
激。用纯一取代、一取代的混合物和纯二取代的前药样品观察到一定
的刺激。与之比较，未取代的假单胞菌素 C' 和未取代的假单胞菌素 B
清楚地显示了尾静脉的刺激。除了纯二取代的前药样品之外 (ED₅₀ > 20
mg/kgx4)，所有样品都显示了显著的体内功效。

30 使用上述的相同方法还制备了上面结构 II 的一取代、二取代或三
取代的前药样品，其中 R^{1'}、R^{1''} 和/或 R^{1'''} 是



并且 $n=10$ 、 12 和 14 。

5 化合物 1-1 和 1-5 呈现出与母体化合物假单胞菌素 C' 相似的体内功效。没有观察到化合物 1-5 的尾静脉刺激的现象，并且观察到化合物 1-1 的提高了的尾静脉毒性。出人意料地，没有观察到化合物 1-4 的体内功效。

实施例 2

10 以下实施例举例说明假单胞菌素 B ($n = 10$, R^2 和 $R^3 = -OH$) 的一取代、二取代或三取代的酰氧基烷基氨基甲酸酯前药的制备。

向溶于 500 ml 二甲基甲酰胺的假单胞菌素 B (2.0 g, 1.65 mmol) 溶液中加入 574 mg (2.47 mmol) 化合物 1b-2。在室温下搅拌混合物过夜。然后将溶液浓缩至约 50 ml 并且产品通过 HPLC 使用以下梯度洗脱
15 方案提纯: 0-30% 0.1% TFA/ACN 5 分钟和 30-70% TFA/ACN 40 分钟。
总收率 59%。

对三个分离产物(一取代前药(化合物 2-1), 其中 $R^{1'}$ 和 $R^{1''} = H$ 且 $R^{1'''} = -C(O)OCH_2OAc$, 二取代前药(化合物 2-2), 其中 $R^{1'}$ 和 $R^{1''} = -C(O)OCH_2OAc$ 且 $R^{1'''} = H$ 和三取代前药(化合物 2-3), 其中 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 和 $R^{1'''} = -C(O)OCH_2OAc$)
20 都进行测定并证实抗鼠全身性假丝酵母属的体内功效。然而, 尾静脉毒性为阳性。

实施例 3

使用与上述实施例 2 中相同的通用方法制备假单胞菌素 B ($n = 10$,
25 R^2 和 $R^3 = -OH$) 的一取代、二取代和三取代前药, 其中 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 和/或 $R^{1'''} = -C(O)OCH_2OC(O)C(CH_3)_3$ 。分离出下面 5 个样品:

3-1 一取代 $R^{1''''}$

3-2 混合一取代的 $R^{1'}$ 和 $R^{1''}$

3-3 混合二取代的 $R^{1''''} + R^{1'}$ 和 $R^{1''''} + R^{1''}$

3-4 二取代的 $R^{1'} + R^{1''}$

5 3-5 三取代的 $R^{1'} + R^{1''} + R^{1''''}$

样品 3-1、3-3 和 3-5 各自表明尾静脉毒性为阴性。所有 5 个样品都显示出抗鼠全身性假丝酵母属的体内功效。

实施例 4

10 使用与上述实施例 2 中相同的通用方法制备假单胞菌素 C' ($n = 12$, R^2 和 $R^3 = -OH$) 的一取代、二取代和三取代的前药, 其中 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 和/或 $R^{1''''} = -C(O)OCH_2OC(O)C(CH_3)_3$ 。分离出下面 5 个样品:

4-1 一取代的 $R^{1''''}$

4-2 混合一取代的 $R^{1'}$ 和 $R^{1''}$

15 4-3 混合二取代的 $R^{1''''} + R^{1'}$ 和 $R^{1''''} + R^{1''}$

4-4 二取代的 $R^{1'} + R^{1''}$

4-5 三取代的 $R^{1'} + R^{1''} + R^{1''''}$

20 没有测定样品 4-1。样品 4-3、4-4 和 4-5 表明都是尾静脉毒性阴性。样品 4-2、4-3、4-4 和 4-5 都显示出抗鼠全身性假丝酵母属的体内功效。

实施例 5

25 使用与上述实施例 2 中相同的通用方法制备假单胞菌素 B ($n = 10$) 的一取代、二取代和三取代的前药, 其中 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 和/或 $R^{1''''} = -C(O)OCH(CH_3)OC(O)CH_3$ 。仅测定了三取代的衍生物(化合物 5-1)。所述三取代的化合物显示尾静脉毒性为阴性。

实施例 6

30 使用与上述实施例 2 中相同的通用方法制备假单胞菌素 B ($n = 10$, R^2 和 $R^3 = -OH$) 的一取代、二取代和三取代的前药, 其中 $R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 和/或 $R^{1''''} = -C(O)OCH_2OC(O)CH_2CH_3$ 。仅测定了三取代的衍生物(化合物 6-1)。所述三取代的化合物显示了良好的抗鼠全身性假丝酵母属的体内功

效，而没有尾静脉刺激。

实施例 7

使用与上述实施例 2 中相同的通用方法制备假单胞菌素 B (n = 10, R² 和 R³ = -OH) 的一取代、二取代和三取代的前药，其中 R^{1'}、R^{1''}和/或 R^{1'''} = -C(O)OCH₂OC(O)CH(CH₃)CH₃。仅测定了三取代的衍生物(化合物 7-1)。所述三取代的化合物显示了良好的抗鼠全身性假丝酵母属的体内功效，而没有尾静脉刺激。

实施例 8

实施例 8 和 9 描述了由半合成的假单胞菌素化合物合成前药，其中对假单胞菌素结构中的 L-丝氨酸单元的 N-酰基进行改变。

使用与上述实施例 2 中相同的通用方法制备假单胞菌素 C-18 (n = 14, R² 和 R³ = -OH) (4b-2) 的一取代、二取代和三取代的前药，其中 R^{1'}、R^{1''}和/或 R^{1'''} = -C(O)OCH₂OC(O)C(CH₃)₃。仅测定了三取代的衍生物(化合物 8-1)。所述三取代的化合物显示尾静脉毒性为阴性。

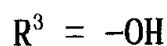
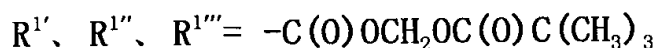
实施例 9

使用与上述实施例 2 中相同的通用方法制备假单胞菌素 C-18 (n = 14, R² 和 R³ = -OH) (4b-2) 的一取代、二取代和三取代的前药，其中 R^{1'}、R^{1''}和/或 R^{1'''} = -C(O)OCH₂OC(O)CH(CH₃)CH₃。仅测定了三取代的衍生物(化合物 9-1)。所述三取代的化合物显示了阴性的尾静脉毒性。

实施例 10

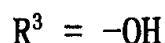
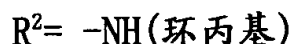
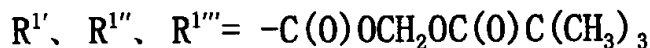
实施例 10 描述了上述前药的进一步修饰，其中将假单胞菌素环的天冬氨酸单元的羧基团经修饰形成一 3-单酰氨基衍生物。

化合物 10-1、10-2、10-3、10-4 和 10-5 的合成：



10-1

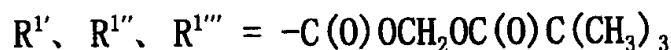
向前药 3-5 (864 mg, 0.52 mmol) 的 DMF 溶液 (9 ml) 中加入 1-二甲基氨基-2-氨基乙烷 (57.9 μ l, 0.52 mmol) 和 TBTU (168.6 mg, 0.52 mmol), 接着加入二异丙基乙胺 (423 μ l)。室温下搅拌 20 分钟之后, 反应混合物通过反相 HPLC (ACN:0.1% TFA/水) 提纯。冷冻干燥获得 295 mg (34%) 的化合物 10-1。



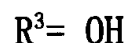
10-2

10

化合物 10-2 是使用与上面的相同方法合成的, 但使用 0.052 mmol 环丙基胺代替 1-二甲基氨基-2-氨基乙烷。



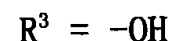
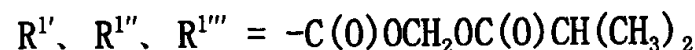
15



10-3

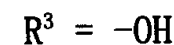
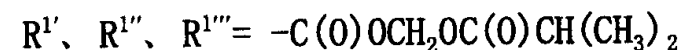
化合物 10-3 是使用与上面的相同方法合成的, 但使用甘氨酸甲酯代替 1-二甲基氨基-2-氨基乙烷。

20



10-4

25 化合物 10-4 是使用与上面的相同方法合成的, 但使用 0.052 mmol 前药 7-1 代替前药 3-5。



30

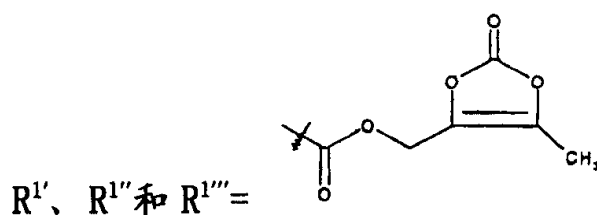
10-5

化合物 10-5 是使用与上面的相同方法合成的, 但使用 0.052 mmol

前药 7-1 代替前药 3-5 并使用 0.052 mmol 环丙基胺代替 1-二甲基氨基-2-氨基乙烷。

实施例 11

5 实施例 11 描述了假单胞菌素化合物前药的合成，其中对假单胞菌素环的天冬氨酸单元的羧酸基团进行修饰从而生成 3-酰氨基衍生物。
合成 3-单酰氨基衍生物 11-1:



$R^2 = -NH(\text{环丙基})$

$R^3 = -OH$

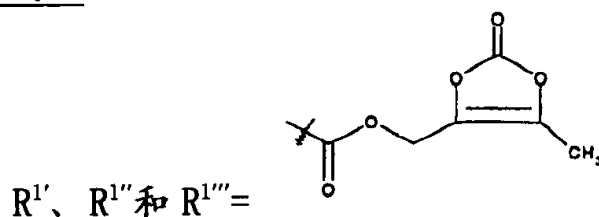
11-1

15 向含有化合物 2b-1 (1 当量) 的 DMF 溶液 (1 升) 中加入 1.5 当量的化合物 1a-4 并在室温下搅拌混合物约 3 天。部分地除去溶剂并将残余物通过反相 HPLC (Waters™, Delta Pak C18 柱) 提纯, 获得化合物 11-1 以及其它一取代和二取代的产物。

实施例 12

20 实施例 12 描述了前药的合成, 其中对天冬氨酸和羟基天冬氨酸上的羧酸基团进行修饰生成双酯衍生物。

双酯 12-1 的合成:



$R^2 = -OCH_3$

$R^3 = -OCH_3$

12-1

向含有化合物 3a-1 (1 当量) 的 DMF 溶液 (1 升) 中加入 1.5 当量的化合物 1a-4 并在室温下搅拌混合物约 3 天。部分地除去溶剂并将残余物通过反相 HPLC (Waters™, Delta Pak C18 柱) 提纯, 获得化合物 12-1 以及其它一取代和二取代的产物。