



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I478915 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：098136112

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 26 日

(51)Int. Cl. : C07D403/12 (2006.01)

A61K31/506 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

(30)優先權：2008/10/27 美國

61/108,595

(71)申請人：塞爾由提克斯公司 (美國) CELLCEUTIX CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：迪葛多 威廉 F DEGRADO, WILLIAM F. (US)；劉大會 LIU, DAHUI (US)；史考特 理查 W SCOTT, RICHARD W. (US)；徐永江 XU, YONGJIANG (CN)；唐海中 TANG, HAIZHONG (CN)；卡克列克 玻森那 KORCZAK, BOZENA (CA)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

WO 2008/083256A1

審查人員：李淑禎

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 96 頁

(54)名稱

宿主防禦之合成模擬物及其用途

SYNTHETIC MIMETICS OF HOST DEFENSE AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明提供芳基醯胺化合物以及製造該等化合物及使用該等化合物作為抗生素之方法。

The present invention provides arylamide compounds and methods of making and using them as antibiotics.

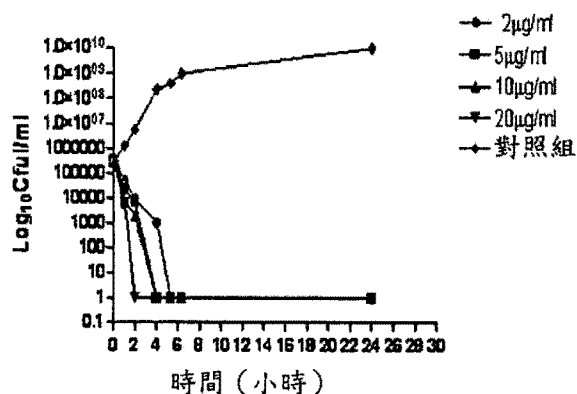
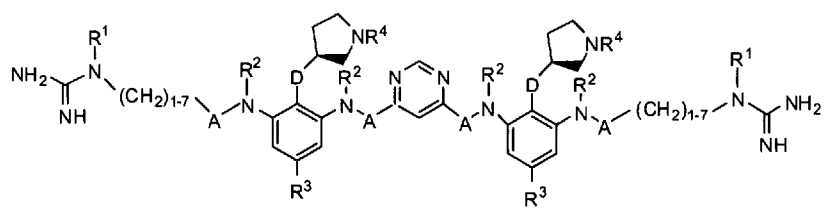


圖 1A



I

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 98136112

C07D 403/12 (2006.01)

※申請日： 98.10.26

※IPC 分類：

A61K 31/506 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 31/04 (2006.01)

宿主防禦之合成模擬物及其用途

SYNTHETIC MIMETICS OF HOST DEFENSE AND
USES THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明提供芳基醯胺化合物以及製造該等化合物及使用該等化合物作為抗生素之方法。

三、英文發明摘要：

The present invention provides arylamide compounds and methods of making and using them as antibiotics.

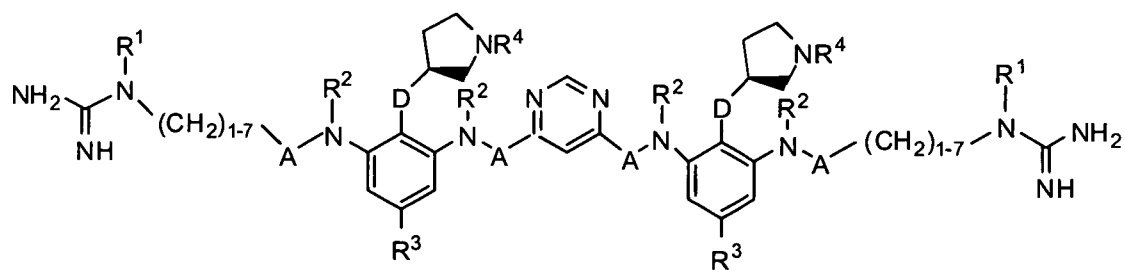
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1A ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



I

六、發明說明：

【相關申請案之交叉參考】

本申請案主張 2008 年 10 月 27 日申請之美國臨時申請案第 61/108,595 號之優先權，該臨時申請案以全文引用的方式併入本文中。

【政府補助聲明】

本發明受美國政府之資金資助（NIH 授權第 AI74866 號及第 1R43AI058407 號）且美國政府因此對本發明可具有某些權利。

【發明所屬之技術領域】

本發明部分係針對芳基醯胺化合物以及製造該等化合物及使用該等化合物之方法。

【先前技術】

抗微生物肽（antimicrobial peptide，AMP）代表許多物種防禦微生物之第一線。AMP 典型地為小型（12-80 個胺基酸）陽離子兩性分子。存在有兩類 AMP，包含核糖體及非核糖體合成肽。已鑑別出超過 700 種的 AMP 且一般為 α 螺旋結構（蛙皮素（magainin）及天蠶素（cecropin））或富含二硫鍵之 β 摺疊結構（牛中性粒細胞抗菌肽（bactenecin）及防禦素（defensin））。儘管該等肽係由許多不同序列組成，但其生理化學性質非常類似。其呈現兩親媒性結構，其中帶正電基團被分隔在二級結構之一側且疏水基團處於相對表面上。在哺乳動物中，該等肽係在皮膚、黏膜表面及嗜中性白血球中產生及分泌，且回應於感染於局部起作

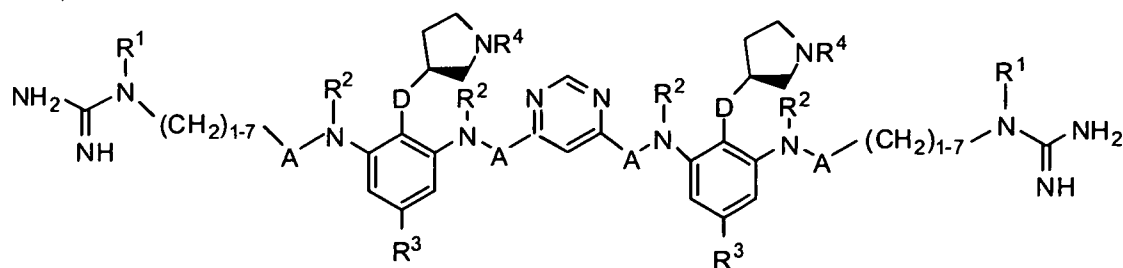
用。其為主要促成此等肽之生物活性的總體生理化學性質。

宿主防禦蛋白之一些抗微生物活性與直接細胞毒性作用及調節先天免疫系統相關聯。已提出其直接的抗微生物活性與膜及非膜效應有關。抗微生物肽隨著進化時間之推移依然為一種防禦細菌感染之有效武器，此表明其作用機制可阻止會導致針對有毒物質之抗性的細菌反應。此前提由直接實驗資料支持，該資料顯示在亞致死濃度之抗微生物肽存在下繼細菌多次連續繼代後，未對該等肽之作用產生明顯抗性。

迫切需要開發可進攻新目標以避開會限制許多抗生素之適用性的抗性問題之新型抗微生物劑。此外，此等新型製劑應經由細菌不能有效抵抗之機制來發揮其抗微生物活性。已開發出一系列非肽類似物，由於其尺寸小（此可增加穩定性且增強組織分布）且能夠微調其物理性質而優化效能及安全性，故其具有許多優於肽之優點。已發現一系列可模擬抗微生物肽之結構性質的芳基醯胺化合物具有有效抗細菌活性及對哺乳動物細胞之廣泛選擇性比。

【發明內容】

本發明提供一種式 I 化合物，



I

其中：各 A 獨立地為 -C=O、-C=S、或 -CH₂；各 D 獨立地為

O 或 S；各 R^1 獨立地為氫、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基；各 R^2 獨立地為氫、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基；各 R^3 獨立地為氫、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-4} 烷基；且各 R^4 獨立地為氫、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基；或其醫藥學上可接受之鹽。

在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ 。

在一些具體實例中，各 D 為 O。

在一些具體實例中，各 R^1 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^1 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^1 獨立地為氫、甲基、或甲氧基。在一些具體實例中，各 R^1 為氫。

在一些具體實例中，各 R^2 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^2 獨立地為氫、甲基、甲氧基、或鹵基。在一些具體實例中，各 R^2 為氫。

在一些具體實例中，各 R^3 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^3 獨立地為甲基、甲氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^3 獨立地為鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^3 獨立地為鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^3 為三氟甲基。

在一些具體實例中，各 R^4 獨立地為氫、甲基、乙基、

甲氧基、乙氧基、或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^4 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基、或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^4 獨立地為氫、甲基、甲氧基、或鹵基。在一些具體實例中，各 R^4 為氫。

在一些具體實例中，各 A 獨立地為 $-C=O$ 、 $-C=S$ 、或 CH_2 ；各 D 獨立地為 O 或 S；各 R^1 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、鹵甲基、或鹵乙基；各 R^2 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基、或鹵甲基；各 R^3 獨立地為 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、鹵基、或鹵烷基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、鹵甲基、或鹵乙基。

在一些具體實例中，各 A 獨立地為 $-C=O$ 或 $-C=S$ ；各 D 獨立地為 O 或 S；各 R^1 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基、或鹵甲基；各 R^2 獨立地為氫、鹵基、或鹵甲基；各 R^3 獨立地為甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、鹵甲基、或鹵乙基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、鹵甲基、或鹵乙基。

在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫、鹵基、或鹵甲基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為甲基、甲氧基、鹵基、或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基、或鹵甲基。

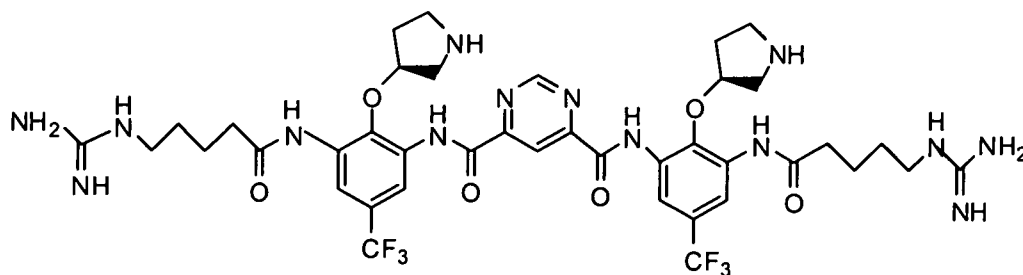
在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫或鹵基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為甲基、鹵基、或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、鹵

基、或鹵甲基。

在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫或鹵基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為鹵基或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫或鹵基。

在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫或鹵基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為甲基、鹵基、或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、鹵基、或鹵甲基。

在一些具體實例中，該化合物為



化合物 A

或其醫藥學上可接受之鹽。

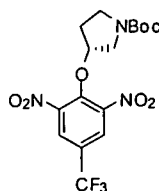
本發明亦提供醫藥組成物，其包含一或多種上述化合物或任何上述化合物之鹽及醫藥學上可接受之載劑。

本發明亦提供包含一或多種上述化合物之調配物，其中該調配物包含鹽水、水、環糊精溶液、或 pH 3 至 9 之緩衝溶液。在一些具體實例中，該調配物為口服不被吸收之調配物。在一些具體實例中，該調配物包含選自以下者之賦形劑：純水、丙二醇、聚乙二醇 400 (PEG 400)、甘油、DMA、乙醇、苯甲醇、檸檬酸/檸檬酸鈉 (pH 3)、檸檬酸/檸檬酸鈉 (pH 5)、參(羥甲基)胺基甲烷 HCl (pH 7.0)、0.9% 鹽水、及 1.2% 鹽水、或其任何組合。在一些具體實例中，

該調配物包含選自丙二醇、純水、及甘油之賦形劑。在一些具體實例中，該調配物包含選自以下者之賦形劑：20% w/v 丙二醇之鹽水溶液、30% w/v 丙二醇之鹽水溶液、40% w/v 丙二醇之鹽水溶液、50% w/v 丙二醇之鹽水溶液、15% w/v 丙二醇之純水溶液、30% w/v 丙二醇之純水溶液、50% w/v 丙二醇之純水溶液、30% w/v 丙二醇及 5 w/v 乙醇之純水溶液、15% w/v 甘油之純水溶液、30% w/v 甘油之純水溶液、50% w/v 甘油之純水溶液、20% w/v Kleptose 之純水溶液、40% w/v Kleptose 之純水溶液、及 25% w/v Captisol 之純水溶液。

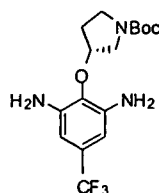
本發明亦提供製備化合物 A 之方法，其包含：

a) 使 (R)-(-)-N-Boc-3-吡咯啉醇 (pyrrolidinol) 與強鹼反應形成混合物；進一步使該混合物與 2-氯-5-(三氟甲基)-1,3-二硝基苯反應形成具有式 II 之化合物



II ;

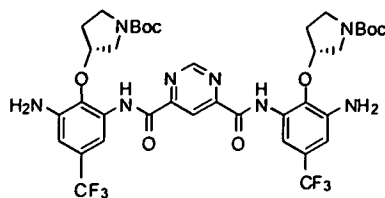
b) 使式 II 化合物與醇及過渡金屬催化劑在氫氣存在下反應形成式 III 化合物



III ;

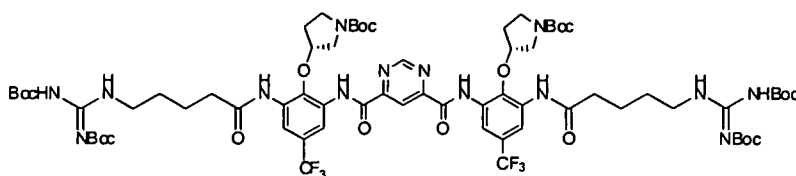
c) 將式 III 化合物及嘧啶-4,6-二甲酸添加至 2-氯-4,6-

二甲氧基-1,3,5-三吡與 N-甲基咪啉之混合物中，形成式 IV 化合物



IV；

d) 使式 IV 化合物與 N-Boc-胍丁酸反應形成式 V 化合物



V；及

e) 脫除式 V 化合物之保護基，產生化合物 A。在一些具體實例中，在 a) 中該強鹼為 NaH；且在 b) 中該過渡金屬催化劑為 Pd/C 且該醇為乙醇。

本發明亦提供製備化合物 A 之替代方法，其包含：

a) 使(R)-3-羥基吡咯啉-1-甲酸第三丁酯去質子化，且使所得化合物與 2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯反應形成(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

b) 在醇、過渡金屬催化劑、及氫氣存在下還原(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，形成(R)-3-(2,6-二氨基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

c) 使(R)-3-(2,6-二氨基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-

甲酸第三丁酯與嘧啶-4,6-二甲酸在 1-[(3-(二甲基胺基)-丙基)]-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽存在下偶合，形成嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}；

d) 使嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}與({[(第三丁氧基羰基)胺基][(第三丁氧基羰基)亞胺基]甲基}胺基)戊酸在氧氯化磷存在下反應形成嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-(5-({[(第三丁氧基羰基)胺基][(第三丁氧基羰基)亞胺基]甲基}胺基)-戊醯基胺基)-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]-醯胺}；

e) 脫除嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-(5-({[(第三丁氧基羰基)胺基][(第三丁氧基羰基)亞胺基]甲基}胺基)-戊醯基胺基)-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]-醯胺}之保護基，形成粗嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-(5-胍基-戊醯基胺基)-2-((R)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]-醯胺}四鹽酸鹽；及

f) 藉由例如逆相層析法來純化粗嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-(5-胍基-戊醯基胺基)-2-((R)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]-醯胺}四鹽酸鹽。

本發明亦提供製備化合物 A 之第二種替代方法，其包含：

a) 使(R)-3-羥基吡咯啉-1-甲酸第三丁酯去質子化且進一步使所得化合物與 2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯反應形

成(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

b) 在醇、過渡金屬催化劑、及氫氣存在下還原(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，形成(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

c) 使(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯與嘧啶-4,6-二甲酸在 1-[(3-(二甲基胺基)-丙基)]-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽存在下偶合，形成嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}；

d) 使嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}與 N-Cbz 酸在亞硫醯氯存在下反應；

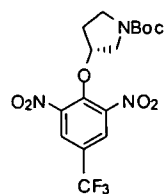
e) 在醇、過渡金屬催化劑、及氫氣存在下還原 d) 之所得化合物；

f) 使 e) 之所得化合物與二-Boc 吡啶反應；及

g) 脫除 f) 之所得化合物之保護基，產生化合物 A。

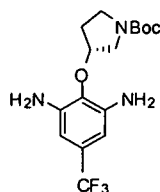
本發明亦提供製備化合物 A 之醫藥學上可接受之鹽的方法，其包含：

a) 使(R)-(-)-N-Boc-3-吡咯啉醇與強鹼反應形成混合物；進一步使該混合物與 2-氯-5-(三氟甲基)-1,3-二硝基苯反應形成具有式 II 之化合物



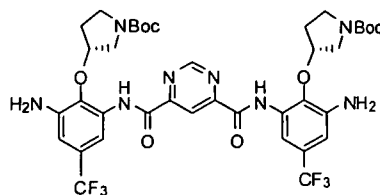
II ;

b) 使式 II 化合物與醇及過渡金屬催化劑在氫氣存在下反應形成式 III 化合物



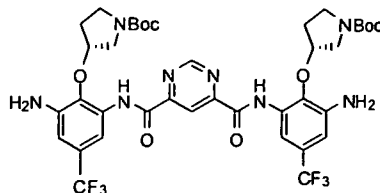
III ;

c1) 將式 III 化合物及嘧啶-4,6-二甲酸添加至 2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡與 N-甲基咪啉之混合物中，形成式 IV 化合物



IV ; 或

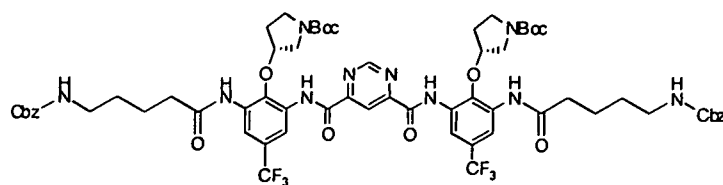
c2) 將式 III 化合物及嘧啶-4,6-二甲酸添加至 1-乙基-3-[3-(二甲基胺基)丙基]-碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC1) 與無水吡啶之混合物中，形成式 IV 化合物



IV ;

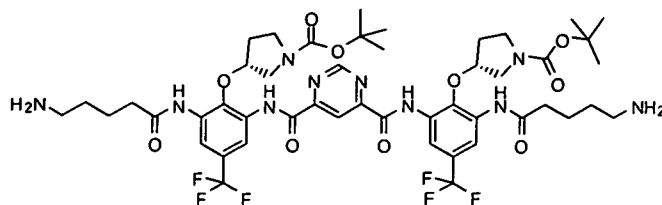
d) 將式 IV 化合物及 N-Cbz 酸添加至包含無水吡啶、二甲基胺基丙胺、及亞硫醯氯、 POCl_3 、 $(\text{EtO})_2\text{POCl}$ 、或乙

二鹽氮之任一者的溶液中，形成式 Va 化合物



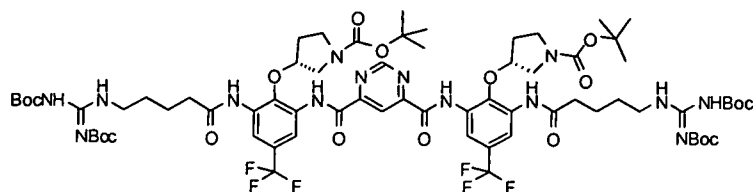
Va ;

e) 加氫分解式 Va 化合物之 Cbz 基團，產生式 VI 化合物



VI ;

f) 保護式 VI 化合物，產生式 VII 化合物



VII ; 及

g) 脫除式 VII 化合物之保護基，產生化合物 A 之醫藥學上可接受之鹽。

本發明亦提供抑制微生物生長之方法，其包含使該微生物與任何上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽接觸。

本發明亦提供治療具有微生物感染之哺乳動物的方法，其包含向該有需要之哺乳動物投予抗微生物有效量之任何上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

在一些具體實例中，該微生物或微生物感染為革蘭氏陰性需氧菌、革蘭氏陽性需氧菌、革蘭氏陰性厭氧菌、革蘭氏陽性厭氧菌、分枝桿菌或酵母。在一些具體實例中，

該革蘭氏陰性需氧菌為大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、弗氏檸檬酸桿菌 (*Citrobacter freundii*)、差異檸檬酸桿菌 (*Citrobacter diverus*)、柯氏檸檬酸桿菌 (*Citrobacter koseri*)、陰溝腸桿菌 (*Enterobacter cloacae*)、糞腸桿菌 (*Enterobacter faecalis*)、肺炎克氏桿菌 (*Klebsiella pneumonia*)、產酸克氏桿菌 (*Klebsiella oxytoca*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、斯氏普羅威登斯菌 (*Providencia stuartii*)、普通變形桿菌 (*Proteus vulgaris*)、奇異變形桿菌 (*Proteus mirabilis*)、黏質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、溶血不動桿菌 (*Acinetobacter haemolyticus*)、瓊氏不動桿菌 (*Acinetobacter junii*)、魯氏不動桿菌 (*Acinetobacter lwoffii*)、流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、嗜麥芽窄食單胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、或綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。在一些具體實例中，該革蘭氏陽性需氧菌為糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、屎腸球菌 (*Enterococcus faecium*)、結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎葡萄球菌 (*Staphylococcus pneumoniae*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、科氏葡萄球菌 (*Staphylococcus colmii*)、松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*)、沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、化膿性鏈球菌

(*Streptococcus pyogenes*)、咽峽炎鏈球菌 (*Streptococcus anginosus*)、緩症鏈球菌 (*Streptococcus mitis*)、或口腔鏈球菌 (*Streptococcus oralis*)。在一些具體實例中，該革蘭氏陰性厭氧菌為脆弱擬桿菌 (*Bacteroides fragilis*)。在一些具體實例中，該革蘭氏陽性厭氧菌為難養芽胞梭菌 (*Clostridium difficile*) 或產氣莢膜芽胞梭菌 (*Clostridium perfringens*)。在一些具體實例中，該分枝桿菌為結核分枝桿菌、牛分枝桿菌 (*Mycobacterium bovis*)、非洲分枝桿菌 (*Mycobacterium africanum*)、卡氏分枝桿菌 (*Mycobacterium canetti*)、或田鼠分枝桿菌 (*Mycobacterium microti*)。在一些具體實例中，該酵母為白色念珠菌 (*Candida albicans*) 或克柔念珠菌 (*Candida krusei*)。

本發明亦提供用於治療微生物感染之任何上述化合物。

本發明亦提供用於製造供治療微生物感染用之醫藥品的任何上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽。

本發明亦提供任何上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽用於抑制微生物生長的用途。

本發明亦提供任何上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽用於治療哺乳動物之微生物感染的用途。

【實施方式】

如本文中所使用，術語「約」意謂所述之值的 $\pm 5\%$ 之間。舉例而言，約 100 意謂 95 至 105。

如本文中所使用，術語「 C_{1-3} 烷基」、「 C_{1-4} 烷基」及

「 $(\text{CH}_2)_{1-7}$ 」意謂分別具有 1 至 3 個碳、1 至 4 個碳及 1 至 7 個碳之飽和、單價無支鏈或分支鏈烴鏈。烷基之實例包括（但不限於） $(\text{C}_1\text{-C}_7)$ 烷基，諸如甲基、乙基、丙基、異丙基、2-甲基-1-丙基、2-甲基-2-丙基、2-甲基-1-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-3-丁基、2-甲基-1-戊基、2,2-二甲基-1-丙基、3-甲基-1-戊基、4-甲基-1-戊基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、2,2-二甲基-1-丁基、3,3-二甲基-1-丁基、2-乙基-1-丁基、丁基、異丁基、第三丁基、戊基、異戊基、新戊基、己基及庚基。烷基可未經取代或經一或兩個合適之取代基取代。

如本文中所使用，術語「 C_{1-3} 烷氧基」及「 C_{1-4} 烷氧基」意謂 -O- 烷基，其中烷基如上文所定義。烷氧基可未經取代或經一或兩個合適之取代基取代。烷基氧基之烷基鏈的長度為 1 至 3 個或 1 至 4 個碳原子。

如本文中所使用，術語「鹵基」意謂鹵素，諸如氟、氯、溴或碘。

如本文中所使用，術語「鹵基 C_{1-3} 烷基」及「鹵基 C_{1-4} 烷基」意謂一或多個（亦即 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個）氫經如上文所定義之鹵基置換的如上文所定義之烷基。

如本文中所使用，「經分離」意謂諸如藉由習知技術使式 I 化合物與（a）天然來源（諸如細胞，諸如細菌培養物）或（b）合成有機化學反應混合物之其他組份分離，對式 I 化合物進行純化。

如本文中所使用，術語「哺乳動物」意謂齧齒動物（亦即小鼠、大鼠或天竺鼠）、猴、貓、狗、母牛、馬、豬或人類。在一些具體實例中，該哺乳動物為人類。

如本文中所使用，術語「微生物」意謂細菌、真菌、原生動物或病毒。

如本文中所使用，「醫藥學上可接受之鹽」一詞包括（但不限於）酸性或鹼性基團之鹽。

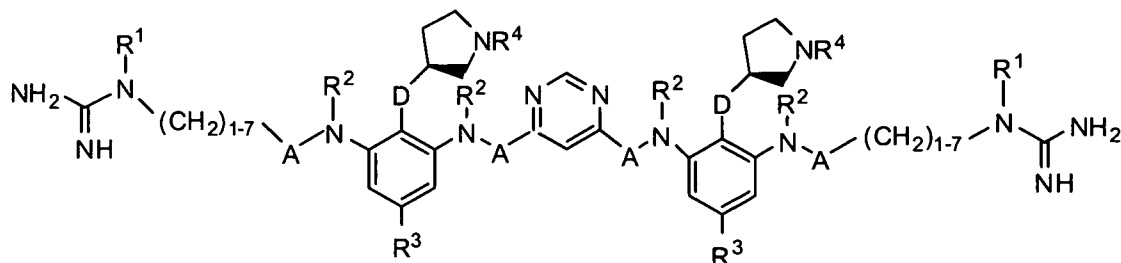
如本文中所使用，術語「經純化」意謂當經分離時，分離物含有以該分離物之重量計至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 之式 I 化合物。

如本文中所使用，「合適之取代基」一詞意謂不會使式 I 化合物或適用於其製備之中間物的合成或醫藥效用無效之基團。合適之取代基的實例包括（但不限於）： (C_1-C_4) 烷基、 (C_1-C_4) 烯基、 (C_1-C_4) 炔基、 (C_1-C_4) 烷氧基、-CN、-OH、側氧基、鹵基、-NO₂、-CO₂H、-NH₂、-NH((C₁-C₄)烷基)、-N((C₁-C₄)烷基)₂、-CHO、-CO((C₁-C₄)烷基)及-CO₂((C₁-C₄)烷基)。熟習此項技術者可容易地基於式 I 化合物之穩定性及藥理與合成活性來選擇合適之取代基。

如本文中所使用，具有式 I 之化合物的「抗微生物有效量」一詞係以該化合物之抗微生物效力來衡量。在一些具體實例中，抗微生物有效量對特定微生物生長之抑制率為至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 95%。在一些具體實例中，「抗微生物有效量」亦為「治療有效

量」，藉此該化合物減少或消除微生物對哺乳動物之至少一種有害作用。

本發明提供一種式 I 化合物，



I

其中：

各 A 獨立地為 $-C=O$ 、 $-C=S$ 或 CH_2 ；

各 D 獨立地為 O 或 S；

各 R^1 獨立地為氫、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基；

各 R^2 獨立地為氫、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基；

各 R^3 獨立地為氫、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、鹵基或鹵基 C_{1-4} 烷基；且

各 R^4 獨立地為氫、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基；

或其醫藥學上可接受之鹽。

在一些具體實例中，至少一個 A 為 $-C=O$ 。在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ 。

在一些具體實例中，至少一個 D 為 O。在一些具體實例中，各 D 為 O。

在一些具體實例中，各 R^1 獨立地為氫、甲基、乙基、

甲氧基、乙氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^1 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^1 獨立地為氫、甲基或甲氧基。在一些具體實例中，至少一個 R^1 為氫。在一些具體實例中，各 R^1 為氫。

在一些具體實例中，各 R^2 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^2 獨立地為氫、甲基、甲氧基或鹵基。在一些具體實例中，至少一個 R^2 為氫。在一些具體實例中，各 R^2 為氫。

在一些具體實例中，各 R^3 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^3 獨立地為甲基、甲氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^3 獨立地為鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^3 獨立地為鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，至少一個 R^3 為三氟甲基。在一些具體實例中，各 R^3 為三氟甲基。

在一些具體實例中，各 R^4 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^4 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基或鹵基 C_{1-3} 烷基。在一些具體實例中，各 R^4 獨立地為氫、甲基、甲氧基或鹵基。在一些具體實例中，至少一個 R^4 為氫。在一些具體實例中，各 R^4 為氫。

在一些具體實例中，各 A 獨立地為 $-C=O$ 或 $-C=S$ ；各 D 獨立地為 O 或 S；各 R^1 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、

乙氧基、鹵基、鹵甲基或鹵乙基；各 R^2 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基或鹵甲基；各 R^3 獨立地為 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基、鹵基或鹵烷基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、鹵甲基或鹵乙基。

在一些具體實例中，各 A 獨立地為 $-C=O$ 或 $-C=S$ ；各 D 獨立地為 O 或 S；各 R^1 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基或鹵甲基；各 R^2 獨立地為氫、鹵基或鹵甲基；各 R^3 獨立地為甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、鹵甲基或鹵乙基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、乙基、甲氧基、乙氧基、鹵基、鹵甲基或鹵乙基。

在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫、鹵基或鹵甲基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為甲基、甲氧基、鹵基或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、甲氧基、鹵基或鹵甲基。

在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫或鹵基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為甲基、鹵基或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、鹵基或鹵甲基。

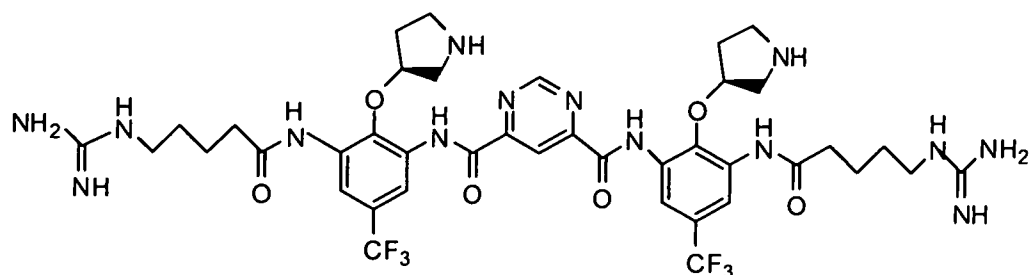
在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫或鹵基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為鹵基或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫或鹵基。

在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫或鹵基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為甲基、鹵基或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫、甲基、鹵基

或鹵甲基。

在一些具體實例中，各 A 為 $-C=O$ ；各 D 為 O；各 R^1 獨立地為氫或鹵基；各 R^2 獨立地為氫或鹵基；各 R^3 獨立地為鹵基或鹵甲基；且各 R^4 獨立地為氫、鹵基或鹵甲基。

在一些具體實例中，該化合物為化合物 A



或其醫藥學上可接受之鹽。

鹽之合適實例包括例如鹽酸及三氟乙酸。

式 I 化合物可含有一或多個手性中心及/或雙鍵且因此以立體異構體（諸如雙鍵異構體，亦即幾何異構體）、對映異構體或非對映異構體形式存在。根據本發明，本文中所示之化學結構及因此之式 I 化合物涵蓋所有相應化合物之對映異構體及立體異構體，亦即立體異構純形式（例如幾何純、對映異構純或非對映異構純形式）與對映異構體及立體異構體之混合物兩者。對映異構體及立體異構體之混合物可利用熟知方法拆分為其組份對映異構體或立體異構體，該等方法諸如手性相氣相層析法、手性相高效液相層析法、使化合物結晶為手性鹽複合物或使化合物於手性溶劑中結晶。對映異構體及立體異構體亦可利用熟知之不對稱合成方法由立體異構或對映異構純中間物、試劑及催化劑獲得。

式 I 化合物進一步包括水合物及溶劑合物。

含有胺官能基之化合物亦可形成 N 氧化物。本文中提及之含有胺官能基之化合物亦包括 N 氧化物。當化合物含有若干個胺官能基時，一個或一個以上氮原子可被氧化形成 N 氧化物。N 氧化物之實例包括三級胺或含氮雜環之氮原子的 N 氧化物。N 氧化物可藉由用諸如過氧化氫或過酸（例如過氧羧酸）之氧化劑處理相應胺來形成（參見 *Advanced Organic Chemistry*, Jerry March, 第 4 版, Wiley Interscience）。

在一些具體實例中，式 I 化合物經分離及/或純化。

本發明亦提供包含一或多種上述化合物或其一或多種鹽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組成物。

合適之組成物包括（但不限於）口服不被吸收之組成物。合適之組成物亦包括（但不限於）鹽水、水、環糊精溶液及 pH 3-9 之緩衝溶液。

本文所述之化合物（包括化合物 A）或其醫藥學上可接受之鹽可與多種賦形劑一起調配，該等賦形劑包括（但不限於）純水、丙二醇、PEG 400、甘油、DMA、乙醇、苯甲醇、檸檬酸/檸檬酸鈉（pH 3）、檸檬酸/檸檬酸鈉（pH 5）、參(羥甲基)胺基甲烷 HCl（pH 7.0）、0.9% 鹽水及 1.2% 鹽水及其任何組合。在一些具體實例中，賦形劑係選自丙二醇、純水及甘油。

在一些具體實例中，賦形劑為選自以下者之多組份系統：20% w/v 丙二醇之鹽水溶液、30% w/v 丙二醇之鹽水溶液、40% w/v 丙二醇之鹽水溶液、50% w/v 丙二醇之鹽水溶

液、15% w/v 丙二醇之純水溶液、30% w/v 丙二醇之純水溶液、50% w/v 丙二醇之純水溶液、30% w/v 丙二醇及 5 w/v 乙醇之純水溶液、15% w/v 甘油之純水溶液、30% w/v 甘油之純水溶液、50% w/v 甘油之純水溶液、20% w/v Kleptose 之純水溶液、40% w/v Kleptose 之純水溶液及 25% w/v Captisol 之純水溶液。在一些具體實例中，賦形劑係選自 50% w/v 丙二醇之純水溶液、15% w/v 甘油之純水溶液、20% w/v Kleptose 之純水溶液、40% w/v Kleptose 之純水溶液及 25% w/v Captisol 之純水溶液。在一些具體實例中，賦形劑係選自 20% w/v Kleptose 之純水溶液、20% w/v 丙二醇之純水溶液及 15% w/v 甘油之純水溶液。

在一些具體實例中，調配物包含 50 mg/mL 化合物 A 於 20% w/v Kleptose 之純水溶液中。

在一些具體實例中，調配物可被凍乾成固體且在使用之前例如用水複配。

當向哺乳動物投予（例如向動物投予用於獸醫用途或向人類投予用於臨床用途）時，式 I 化合物可以經分離形式投予。或者，式 I 化合物可與其他抗生素一起投予（亦即以組合之調配物或獨立調配物形式投予），該等抗生素例如：

- 1) 蛋白質合成抑制劑，包括（但不限於）阿米卡星（amikacin）、茴香黴素（anisomycin）、安普黴素（apramycin）、阿奇黴素（azithromycin）、保米黴素 S（blasticidine S）、布雷菲德菌素 A（brefeldin A）、丁甘菌素（butirosin）、氯黴素（chloramphenicol）、金黴素

(chlortetracycline)、克林達黴素 (clindamycin)、克黴唑 (clotrimazole)、環己醯亞胺 (cycloheximide)、地美環素 (demeclocycline)、地貝卡星 (dibekacin)、二氫鏈黴素 (dihydrostreptomycin)、多西環素 (doxycycline)、耐久黴素 (duramycin)、依米丁 (emetine)、紅黴素 (erythromycin)、夫西地酸 (fusidic acid)、G 418、慶大黴素 (gentamicin)、煙麴黴酸 (helvolic acid)、潮黴素 B (hygromycin B)、交沙黴素 (josamycin)、康黴素 (kanamycin)、黃色黴素 (kirromycin)、林可黴素 (lincomycin)、甲氯環素 (meclocycline)、甲帕黴素 (mepartricin)、麥迪黴素 (midecamycin)、二甲胺四環素 (minocycline)、新黴素 (neomycin)、奈替米星 (netilmicin)、硝基呋喃妥因 (nitrofurantoin)、諾爾絲菌素 (nourseothricin)、竹桃黴素 (oleandomycin)、土黴素 (oxytetracycline)、巴龍黴素 (paromomycin)、嘌呤黴素 (puromycin)、雷帕黴素 (rapamycin)、核糖黴素 (ribostamycin)、利福平 (rifampicin)、利福黴素 (rifamycin)、薔薇黴素 (rosamicin)、紫蘇黴素 (sisomicin)、壯觀黴素 (spectinomycin)、螺旋黴素 (spiramycin)、鏈黴素 (streptomycin)、四環素 (tetracycline)、甲硯黴素 (thiamphenicol)、硫鏈絲菌肽 (thiostrepton)、妥布拉黴素 (tobramycin)、衣黴素 (tunicamycin)、泰黴素 (tylosin)、紫黴素 (viomycin) 及維吉黴素 (virginiamycin); 2) DNA 合成干擾劑, 包括 (但不限於) 喜樹鹼 (camptothecin)、10-去乙醯基漿果赤黴素

III (10-deacetylbaecatin III)、氮胞苷 (azacytidine)、7-氨基放線菌素 D (7-aminoactinomycin D)、8-羥基喹啉 (8-quinolinol)、9-二氫-13-乙酰基漿果赤黴素 III (9-dihydro-13-acetylbaecatin III)、阿柔比星 (aclarubicin)、放線菌素 D (actinomycin D)、放線菌素 I (actinomycin I)、放線菌素 V (actinomycin V)、巴佛洛黴素 A1 (bafilomycin A1)、博來黴素 (bleomycin)、卷麴黴素 (capreomycin)、色黴素 (chromomycin)、西諾沙星 (cinoxacin)、環丙沙星 (ciprofloxacin)、順-二胺二氯鉑 (II) (cis-diammineplatinum(II) dichloride)、庫馬黴素 A1 (coumermycin A1)、L(+)-乳酸、細胞遲緩素 B (cytochalasin B)、細胞遲緩素 D (cytochalasin D)、氮烯唑胺 (dacarbazine)、道諾黴素 (daunorubicin)、偏端黴素 A (distamycin A)、阿黴素 (doxorubicin)、棘黴素 (echinomycin)、恩氟沙星 (enrofloxacin)、依託泊苷 (etoposide)、氟甲喹 (flumequine)、間型黴素 (formycin)、煙麴黴素 (fumagillin)、更昔洛韋 (ganciclovir)、膠黴毒素 (gliotoxin)、洛美沙星 (lomefloxacin)、甲硝唑 (metronidazole)、米拉黴素 A (mithramycin A)、絲裂黴素 C (mitomycin C)、萘啶酮酸 (nalidixic acid)、紡錘菌素 (netropsin)、硝基呋喃妥因、諾加黴素 (nogalamycin)、無活菌素 (nonactin)、新生黴素 (novobiocin)、氧氟沙星 (ofloxacin)、奧索利酸 (oxolinic acid)、太平洋紫杉醇 (paclitaxel)、吩吡 (phenazine)、腐草黴素 (phleomycin)、

吡哌酸 (pipemidic acid)、雷別卡黴素 (rebeccamycin)、西
 奈芬淨 (sinefungin)、鏈黑菌素 (streptonigrin)、鏈佐星
 (streptozocin)、丁二醯磺胺噻唑 (succinylsulfathiazole)、
 磺胺嘧啶 (sulfadiazine)、磺胺地索辛 (sulfadimethoxine)、
 純磺胺胍 (sulfaguanidine purum)、磺胺二甲嘧啶
 (sulfamethazine)、泰滅淨 (sulfamonomethoxine)、胺苯磺
 醯胺 (sulfanilamide)、磺胺喹啉 (sulfaquinoxaline)、柳
 氮磺胺吡啶 (sulfasalazine)、磺胺噻唑 (sulfathiazole)、三
 甲氧苄二胺嘧啶 (trimethoprim)、殺結核菌素 (tubercidin)、
 5-氮胞苷 (5-azacytidine)、蛹蟲草菌素 (cordycepin) 及間
 型黴素 A；3) 細胞壁合成干擾劑，包括 (但不限於) (+)-6-
 胺基青黴烷酸 ((+)-6-aminopenicillanic acid)、7-胺基去乙
 醯氧基頭孢烷酸 (7-aminodesacetoxycephalosporanic
 acid)、胺羧苄青黴素 (amoxicillin)、胺苄青黴素
 (ampicillin)、阿洛西林 (azlocillin)、枯草菌素 (bacitracin)、
 羧苄青黴素 (carbenicillin)、頭孢克洛 (cefaclor)、頭孢孟
 多 (cefamandole)、頭孢唑林 (cefazolin)、頭孢美唑
 (cefmetazole)、頭孢哌酮 (cefoperazone)、頭孢噻肟
 (cefotaxime)、頭孢磺啶 (cefsulodin)、頭孢曲松
 (ceftriaxone)、頭孢力新 (cephalexin)、頭孢菌素 C
 (cephalosporin C)、頭孢噻吩 (cephalothin)、環己烯胺頭
 孢菌素 (cephradine)、氯唑西林 (cloxacillin)、D-環絲胺
 酸、雙氯西林 (dicloxacillin)、D-青黴胺 (D-penicillamine)、
 益康唑 (econazole)、乙胺丁醇 (ethambutol)、溶葡萄菌素

(lysostaphin)、拉氧頭孢 (moxalactam)、萘夫西林 (nafcillin)、尼柯黴素 Z (nikkomycin Z)、硝基呋喃妥因、苯唑西林 (oxacillin)、青黴素 (penicillic)、青黴素 G (penicillin G)、非奈西林 (phenethicillin)、苯氧基甲基青黴酸、磷黴素 (phosphomycin)、吡哌酸、哌拉西林 (piperacillin)、瑞斯托黴素 (ristomycin) 及萬古黴素 (vancomycin)；4) 細胞膜滲透性干擾劑 (離子載體)，包括 (但不限於) 2-巰基吡啶、4-溴卡西黴素 (4-bromocalcimycin) A23187、丙甲甘肽 (alamethicin)、兩性黴素 B (amphotericin B)、卡西黴素 A23187、氯己定 (chlorhexidine)、克黴唑、黏菌素 (colistin)、益康唑、氫皮質酮 (hydrocortisone)、非律平 (filipin)、膠黴毒素、短桿菌肽 A (gramicidin A)、短桿菌肽 C (gramicidin C)、依諾黴素 (ionomycin)、拉沙里菌素 A (lasalocid A)、吸濕黴素 A (lonomycin A)、莫能菌素 (monensin)、N-(6-胺基己基)-5-氯-1-萘磺醯胺、甲基鹽黴素 (narasin)、尼日利亞菌素 (nigericin)、乳鏈菌肽 (nisin)、無活菌素、制黴菌素 (nystatin)、吩吡 (phenazine)、匹馬菌素 (pimaricin)、多黏菌素 B (polymyxin B)、DL-青黴胺、多黏菌素 B、吡喹酮 (praziquantel)、鹽黴素 (salinomycin)、表面活性素 (surfactin) 及纈胺黴素 (valinomycin)；5) 酶抑制劑，包括 (但不限於) (+)-地衣酸 ((+)-usnic acid)、(±)-咪康唑 ((±)-miconazole)、(S)-(+)-喜樹鹼、1-去氧基甘露野尻黴素 (1-deoxymannojirimycin)、2-庚基-4-羥基喹啉 N 氧化物、蛹蟲草菌素、1,10-菲啉、6-

重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、8-羥基喹啉、抗黴素 (antimycin)、抗蛋白酶 (antipain)、子囊黴素 (ascomycin)、重氮絲胺酸 (azaserine)、巴佛洛黴素、淺藍菌素 (cerulenin)、氯喹 (chloroquine)、西諾沙星、環丙沙星、美伐他汀 (mevastatin)、伴刀球黴素 A (concanamycin A)、伴刀球黴素 C (concanamycin C)、庫馬黴素 A1、L(+)-乳酸、環孢素 A (cyclosporin A)、益康唑、恩氟沙星、依託泊苷、氟甲喹、間型黴素 A、呋喃唑酮 (furazolidone)、鐮孢菌酸 (fusaric acid)、格爾德黴素 (geldanamycin)、膠黴毒素、短桿菌肽 A、短桿菌肽 C、除莠黴素 A (herbimycin A)、吲哚美辛 (indomethacin)、玉潔新 (irgasan)、洛美沙星、黴酚酸、黏噻唑 (myxothiazol)、N-(6-胺基己基)-5-氯-1-萘磺醯胺、萘啶酮酸、紡錘菌素、氯硝柳胺 (niclosamide)、尼柯黴素、N-甲基-1-去氧基野尻黴素、諾加黴素、無活菌素、新生黴素、氧氟沙星、竹桃黴素、寡黴素 (oligomycin)、奧索利酸、粉蝶黴素 A (piericidin A)、吡哌酸、根赤殼菌素 (radicicol)、雷帕黴素、雷別卡黴素、西奈芬淨、星形孢菌素 (staurosporine)、標椿菌素 (stigmatellin)、丁二磺胺噻唑、丁二磺胺噻唑、磺胺嘧啶、磺胺地索辛、磺胺胍、磺胺二甲嘧啶、磺胺間甲氧嘧啶、胺苯磺醯胺、磺胺喹啉、柳氮磺胺吡啶、磺胺噻唑、脂醯 CoA 合成抑制劑 (triacycin C)、三甲氧苄二胺嘧啶及酒色黴素 A1 (vineomycin A1)；及 6) 膜調節劑，包括 (但不限於) 副胞菌素 (paracelsin)。

在一些具體實例中，術語「醫藥學上可接受」意謂經美國聯邦政府或州政府之管理機構批准或美國藥典（U.S. Pharmacopeia）或其他公認藥典中所列可用於動物且更尤其可用於人類。術語「載劑」係指與式 I 化合物一起投予之稀釋劑、佐劑或賦形劑。該等醫藥載劑可為液體，諸如水及油，包括源自石油、動物、植物或合成之油，諸如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及其類似物。醫藥載劑亦可為鹽水、阿拉伯膠、明膠、澱粉糊、滑石、角蛋白、膠狀二氧化矽、尿素及其類似物。另外，可使用助劑、穩定劑、增稠劑、潤滑劑及著色劑。當向人類投予時，式 I 化合物及醫藥學上可接受之載劑可為無菌的。當靜脈內投予式 I 化合物時，水為合適之載劑。鹽水溶液及右旋糖與甘油水溶液亦可用作液體載劑，尤其用於可注射溶液。合適之醫藥載劑亦包括賦形劑，諸如澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇及其類似物。必要時，本發明組成物亦可含有少量潤濕劑或乳化劑或 pH 值緩衝劑。

本文所述之組成物可呈現溶液、懸浮液、乳液、錠劑、丸劑、圓粒、膠囊、含有液體之膠囊、散劑、持續釋放調配物、栓劑、氣溶膠、噴霧劑之形式或任何其他適合使用之形式。合適之醫藥載劑的實例描述於 Remington's Pharmaceutical Sciences, A.R. Gennaro (Editor) Mack 出版公司中。

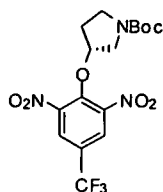
在一項具體實例中，根據常規程序，將式 I 化合物調配為適合於向人類投予之醫藥組成物。式 I 化合物典型地為於無菌等張水性緩衝液中之溶液。必要時，組成物亦可包括增溶劑。用於靜脈內投藥之組成物可視情況包括用於減輕注射部位疼痛之局部麻醉劑，諸如利多卡因 (lidocaine)。各成份一般分開供應或一起混合成單位劑型，例如在密閉容器（諸如指示活性劑數量之安瓿或藥囊）中之乾燥凍乾粉末或無水濃縮物。當藉由輸注投予本發明之化合物時，可例如用含有無菌醫藥級水或鹽水之輸注瓶來分配化合物。當藉由注射投予式 I 化合物時，可提供一安瓿無菌注射用水或鹽水以便可在投予之前混合各成份。

式 I 化合物及包含式 I 化合物之組成物可經口投予。用於經口傳遞之化合物及組成物可呈例如錠劑、口含錠、水性或油性懸浮液、顆粒、散劑、乳液、膠囊、糖漿或酏劑之形式。經口投予之組成物可含有一或多種視情況選用之藥劑以提供醫藥學上適口之製劑，該等藥劑例如甜味劑，諸如果糖、阿斯巴甜糖或糖精；調味劑，諸如胡椒薄荷、冬青油或櫻桃；著色劑；及防腐劑。此外，當呈錠劑或丸劑形式時，組成物可包覆包衣以延緩在胃腸道中之崩解及吸收，從而在較長時間內提供持續作用。包圍滲透活性推進化合物之選擇性滲透膜亦適合於經口投予之式 I 化合物。口服組成物可包括標準媒劑，諸如甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。該等媒劑適當地為醫藥級。

醫藥組成物可呈單位劑型。在該形式中，組成物可分成含有適當量之活性組份的單位劑量。該單位劑型可為包裝製劑，該包裝含有不連續量之製劑，諸如包裝錠劑、膠囊及小瓶或安瓿中之散劑。單位劑型亦可為膠囊、扁膠劑或錠劑本身，或其可為適當數目之任何此等包裝形式。

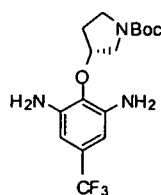
本發明亦提供製備化合物 A 之方法，其包含：

1a) 使 (R)-(-)-N-Boc-3-吡咯啉醇與強鹼反應形成混合物；進一步使該混合物與 2-氯-5-(三氟甲基)-1,3-二硝基苯反應形成具有式 II 之化合物



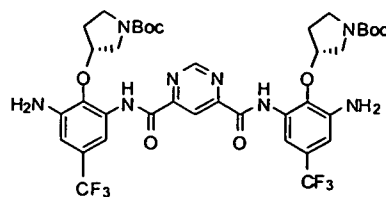
II ;

1b) 使式 II 化合物與醇及過渡金屬催化劑在氫氣存在下反應形成式 III 化合物



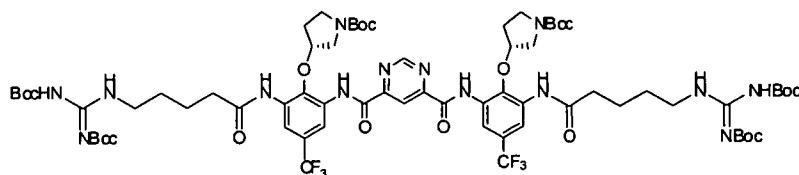
III ;

1c) 將式 III 化合物及嘓啉-4,6-二甲酸添加至 2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡與 N-甲基咪啉之混合物中，形成式 IV 化合物



IV ;

1d)使式 IV 化合物與 N-Boc-胍丁酸反應形成式 V 化合物



V；及

1e) 脫除式 V 化合物之保護基，產生化合物 A。

在一些具體實例中，在 a) 中該強鹼為 NaH；且在 b) 中該過渡金屬催化劑為 Pd/C 且該醇為乙醇。詳言之，此方法在下文更詳細地描述於實施例 1 中。

本發明亦提供製備化合物 A 之替代方法，其包含：

a) 使(R)-3-羥基吡咯啉-1-甲酸第三丁酯去質子化，且使所得化合物與 2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯反應形成(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

b) 在醇、過渡金屬催化劑及氫氣存在下還原(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，形成(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

c) 使(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯與嘧啶-4,6-二甲酸在 1-[(3-(二甲基胺基)-丙基)]-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽存在下偶合，形成嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]鹽胺}；

d) 使嘧啶-4,6-二甲酸雙- $\{[3\text{-胺基-2-}((R)\text{-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基}]醯胺\}$ 與($\{[(\text{第三丁氧基羰基})\text{胺基}][(\text{第三丁氧基羰基})\text{亞胺基}]\text{甲基}\}$ 胺基)戊酸在氧氯化磷存在下反應形成嘧啶-4,6-二甲酸雙- $\{[3\text{-(5-}(\{[(\text{第三丁氧基羰基})\text{胺基}][(\text{第三丁氧基羰基})\text{亞胺基}]\text{甲基}\})\text{胺基})\text{-戊醯基胺基})\text{-2-}((R)\text{-1-(第三丁氧基羰基)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基}]\text{-醯胺}\}$;

e) 脫除嘧啶-4,6-二甲酸雙- $\{[3\text{-(5-}(\{[(\text{第三丁氧基羰基})\text{胺基}][(\text{第三丁氧基羰基})\text{亞胺基}]\text{甲基}\})\text{胺基})\text{-戊醯基胺基})\text{-2-}((R)\text{-1-(第三丁氧基羰基)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基}]\text{-醯胺}\}$ 之保護基，形成粗嘧啶-4,6-二甲酸雙- $\{[3\text{-(5-胍基-戊醯基胺基})\text{-2-}((R)\text{-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基}]\text{-醯胺}\}$ 四鹽酸鹽；及

f) 藉由逆相層析法來純化粗嘧啶-4,6-二甲酸雙- $\{[3\text{-(5-胍基-戊醯基胺基})\text{-2-}((R)\text{-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基}]\text{-醯胺}\}$ 四鹽酸鹽。

在一些具體實例中，在 b) 中該過渡金屬催化劑為 Pd/C 且該醇為乙醇。詳言之，此方法在下文更詳細地描述於實施例 2 中。

本發明亦提供製備化合物 A 之第二種替代方法，其包含：

a) 使 (R)-3-羥基吡咯啉-1-甲酸第三丁酯去質子化且進一步使所得化合物與 2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯反應形成 (R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第

三丁酯；

b) 在醇、過渡金屬催化劑及氫氣存在下還原(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，形成(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

c) 使(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯與嘧啶-4,6-二甲酸在 1-[(3-(二甲基胺基)-丙基)]-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽存在下偶合，形成嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}；

d) 使嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}與 N-Cbz 酸在亞硫醯氯存在下反應；

e) 在醇、過渡金屬催化劑及氫氣存在下還原 d) 之所得化合物；

f) 使 e) 之所得化合物與二-Boc 吡啶反應；及

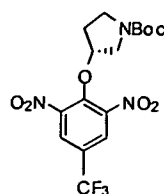
g) 脫除 f) 之所得化合物之保護基，產生化合物 A。

在一些具體實例中，在 b) 及 e) 中該過渡金屬催化劑為 Pd/C 且該醇為乙醇。詳言之，此方法在下文更詳細地描述於實施例 3 中。

熟習此項技術者應能夠用合適之試劑替代本文所述之方法中所列的試劑以產生化合物 A 以及其他式 I 化合物。

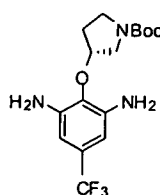
本發明亦提供製備化合物 A 之醫藥學上可接受之鹽的方法，其包含：

a) 使 (R)-(-)-N-Boc-3-吡咯啉醇與強鹼反應形成混合物；進一步使該混合物與 2-氯-5-(三氟甲基)-1,3-二硝基苯反應形成具有式 II 之化合物



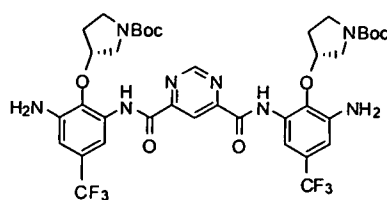
II ;

b) 使式 II 化合物與醇及過渡金屬催化劑在氫氣存在下反應形成式 III 化合物



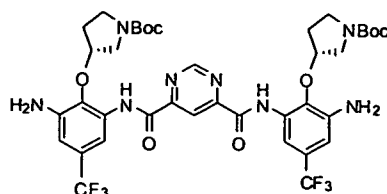
III ;

c1) 將式 III 化合物及嘧啶-4,6-二甲酸添加至 2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡與 N-甲基咪啉之混合物中，形成式 IV 化合物



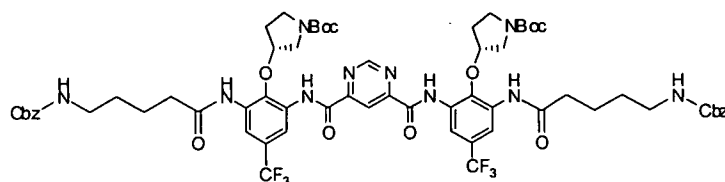
IV ; 或

c2) 將式 III 化合物及嘧啶-4,6-二甲酸添加至 1-乙基-3-[3-(二甲基胺基)丙基]-碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC1) 與無水吡啶中之混合物中，形成式 IV 化合物



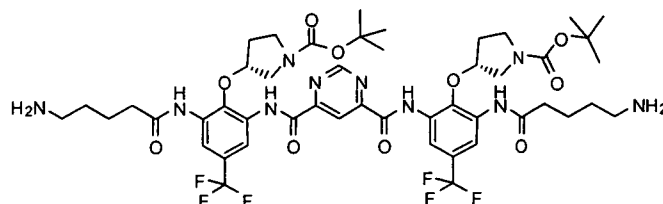
IV ;

d) 將式 IV 化合物及 N-Cbz 酸添加至包含無水吡啶、二甲基胺基丙胺及亞硫醯氯、 POCl_3 、 $(\text{EtO})_2\text{POCl}$ 或乙二醯氯中之任一者的溶液中，形成式 Va 化合物



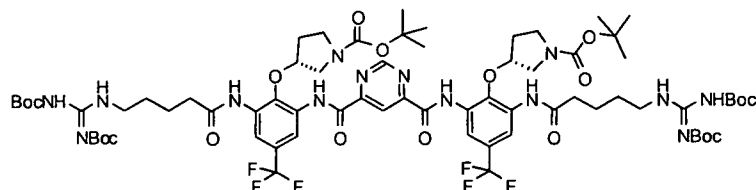
Va ;

e) 加氫分解式 Va 化合物之 Cbz 基團，產生式 VI 化合物



VI ;

f) 保護式 VI 化合物，產生式 VII 化合物



VII ; 及

g) 脫除式 VII 化合物之保護基，產生化合物 A 之醫藥學上可接受之鹽。

式 I 化合物之製備可涉及各種化學基團之保護及脫除保護基。對保護及脫除保護基之需要以及適當保護基之選擇可容易地由熟習此項技術者確定。保護基之化學性質可例如見於 T. W. Greene 及 P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第 3 版, Wiley & Sons 公司, New York

(1999)中，該文獻以全文引用的方式併入本文中。

本發明亦提供抑制微生物生長之方法，其包含使該微生物與一或多種上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽接觸。在一些具體實例中，式 I 化合物可充當用於清潔表面（諸如在例如廚房及浴室中）之消毒劑。在此等具體實例中，式 I 化合物可藉由熟習此項技術者所熟知之程序來調配以用於該等用途。

本發明亦提供治療具有微生物感染之哺乳動物的方法，其包含向該有需要之哺乳動物投予抗微生物有效量之一或多種上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽。在一些具體實例中，該哺乳動物可在治療之前被預先診斷為具有微生物感染。在一些具體實例中，可能未作正式診斷；在該等具體實例中，哺乳動物可能被懷疑具有被認為需要治療之微生物感染。

在一項具體實例中，「治療」係指改善微生物感染或其至少一種可辨別之症狀；或改善至少一種可量測但未必可由患者辨別之身體參數；或抑制微生物感染之進展；或延緩微生物感染之發作。

在一些具體實例中，該微生物為以下者或微生物感染係歸因於以下者：革蘭氏陰性需氧菌、革蘭氏陽性需氧菌、革蘭氏陰性厭氧菌、革蘭氏陽性厭氧菌或酵母。在一些具體實例中，該革蘭氏陰性需氧菌係選自（但不限於）大腸桿菌、弗氏檸檬酸桿菌、差異檸檬酸桿菌、柯氏檸檬酸桿菌、陰溝腸桿菌、糞腸桿菌、肺炎克氏桿菌、產酸克氏桿

菌、摩氏摩根菌、斯氏普羅威登斯菌、普通變形桿菌、奇異變形桿菌、黏質沙雷氏菌、溶血不動桿菌、瓊氏不動桿菌、魯氏不動桿菌、流感嗜血桿菌、嗜麥芽窄食單胞菌及綠膿桿菌。在一些具體實例中，該革蘭氏陽性需氧菌係選自（但不限於）糞腸球菌、屎腸球菌、結核分枝桿菌、金黃色葡萄球菌、肺炎葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、科氏葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、無乳鏈球菌、化膿性鏈球菌、咽峽炎鏈球菌、緩症鏈球菌及口腔鏈球菌。在一些具體實例中，該革蘭氏陰性厭氧菌為脆弱擬桿菌。在一些具體實例中，該革蘭氏陽性厭氧菌為難養芽胞梭菌或產氣莢膜芽胞梭菌。在一些具體實例中，分枝桿菌為結核分枝桿菌、牛分枝桿菌、非洲分枝桿菌、卡氏分枝桿菌或田鼠分枝桿菌。在一些具體實例中，該酵母係選自（但不限於）白色念珠菌及克柔念珠菌。

在一些具體實例中，微生物為抗生素抗性細菌菌株，諸如以下實施例中所列之菌株。

式 I 化合物或其醫藥學上可接受之鹽及包含該等化合物之組成物可以各種途徑（例如藉由輸注或快速注射）來投予，且可與另一種生物活性劑（諸如另一種抗生素）一起投予。投藥可為全身性或局部的。各種傳遞系統為已知的，例如囊封於脂質體、微粒、微膠囊、膠囊等中，且可用於投予式 I 化合物。投藥途徑包括（但不限於）皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內、皮下、鼻內、硬膜外、口服、舌下、鼻內、腦內、陰道內、經皮、經直腸、經肺、藉由吸

入或局部投藥，尤其向耳、鼻、眼或皮膚投藥。在一些具體實例中，合適之投藥途徑包括靜脈內、局部及皮下投藥。所需投藥途徑留由行醫者斟酌決定，且在某種程度上應視所治療之哺乳動物或人類的微生物感染部位及醫學病況而定。在多數情況下，投藥可使得式 I 化合物釋放至血流中。

在一些具體實例中，可能需要向需要治療之區域局部投予一或多種式 I 化合物或其醫藥學上可接受之鹽。此可例如（但不限於）藉由在手術期間局部輸注、在手術後表面施用（例如結合傷口敷料）、藉由注射、藉助於導管、藉助於栓劑或藉助於植入物（其中該植入物具有多孔、無孔或凝膠狀物質，包括膜，諸如矽橡膠（Sialastic）膜或纖維）來達成。

可有效治療特定微生物感染之式 I 化合物或其醫藥學上可接受之鹽的量應視病症或病狀之性質而定，且可藉由標準臨床技術來確定。另外，可視情況採用試管內或活體內檢定來幫助確定最佳劑量範圍。欲用於組成物中之精確劑量亦應視投藥途徑及感染嚴重性而定，且應根據行醫者之判斷及各患者情況來決定。然而，適合於投藥之劑量範圍一般為每公斤體重約 0.001 毫克至約 200 毫克。在一些具體實例中，劑量為每公斤體重約 0.01 毫克至約 70 毫克、或每公斤體重約 0.1 毫克至約 50 毫克、或每公斤體重約 0.5 毫克至約 20 毫克、或每公斤體重約 1 毫克至約 10 毫克。在一些具體實例中，劑量為每公斤體重約 5 毫克。本文所述之劑量係指總投予量；亦即，若投予一種以上式 I 化合

物，則劑量對應於所投予之式 I 化合物的總量。組成物可含有 10 重量%至 95 重量%之活性成份。有效劑量可自源自於試管內或動物模型測試系統之劑量-反應曲線外推而得出。該等動物模型及系統在此項技術中係熟知的。

本發明亦提供一或多種上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽，或包含一或多種上述化合物之醫藥組成物，其係用於治療微生物感染。

本發明亦提供一或多種上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽，或包含一或多種上述化合物之醫藥組成物，其係用於製造供治療微生物感染用之醫藥品。

本發明亦提供一或多種上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽或包含一或多種上述化合物之醫藥組成物用於抑制微生物生長的用途。

本發明亦提供一或多種上述化合物或其醫藥學上可接受之鹽或包含一或多種上述化合物之醫藥組成物用於治療哺乳動物之微生物感染的用途。

為了可更有效地瞭解本文所揭示之本發明，以下提供實施例。應瞭解此等實施例僅用於說明性目的且不應理解為以任何方式限制本發明。在此等實施例中，除非另有說明，否則根據 Maniatis 等人，Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Press (1989) 中所述之方法，使用市售試劑進行分子選殖反應及其他標準重組 DNA 技術。

實施例

簡言之，由以下實施例產生之結果指示化合物 A 對葡萄球菌屬 (*Staphylococci spp.*) 及其他革蘭氏陽性與革蘭氏陰性生物體具有活性。舉例而言，針對對其他抗微生物劑具有確定的抗細菌敏感性之金黃色葡萄球菌及凝固酶陰性葡萄球菌之 150 個分離株進行敏感性篩選。一般而言，在對 150 個葡萄球菌生物體之篩選中獲得 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 至 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 之 MIC₉₀ 值，且該等值不受對其他抗生素之敏感性表型影響。於 0.5×MIC 濃度下金黃色葡萄球菌之二甲氧苯青黴素 (methicillin) 敏感性菌株 (MSSA ATCC 29213) 及抗性菌株 (MRSA ATCC 33591) 連續繼代 17 次不會引起 MIC 值之任何變化。一般而言，化合物 A 具有殺細菌性，其時間殺死 (time-kill) 之範圍為 30 分鐘至 6 小時。

化合物 A 在小鼠大腿負荷模型活體內對 MSSA 29213 及 MRSA 33591 有效且在小鼠腹膜炎/敗血症模型中對 MSSA 27660 有效。在使用 MSSA 27660 之小鼠大腿負荷模型中，於重複劑量毒性研究中耐受性良好之劑量下，相對於未經處理之受感染對照組小鼠，化合物 A 在感染後 24 小時達成多至 4^{10} (以每條大腿之 cfu 數計) 之減少。因此，在小鼠大腿負荷模型中觀察到對 MSSA 及 MRSA 之穩固功效，且在大鼠大腿負荷模型及小鼠腹膜炎模型中觀察到對 MSSA 之穩固功效。化合物 A 在血漿及自多種物種分離之肝細胞存在下為穩定的。

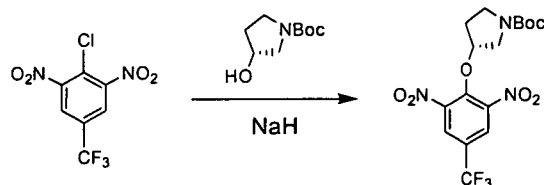
化合物 A 在急性毒性研究中在藉由靜脈內輸注投予時

耐受性良好。在小鼠中化合物 A 之 MTD (靜脈內快速注射) (30 mg/kg) 顯著高於大腿負荷模型中之固定功效劑量 (2-4 mg/kg)。

化合物 A 目前作為靜脈內泛葡萄球菌藥劑處於 1 期人類臨床試驗階段以供開發。

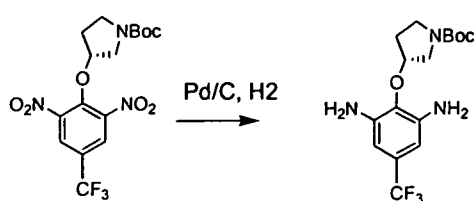
實施例 1：化合物 A 之合成

步驟 1：



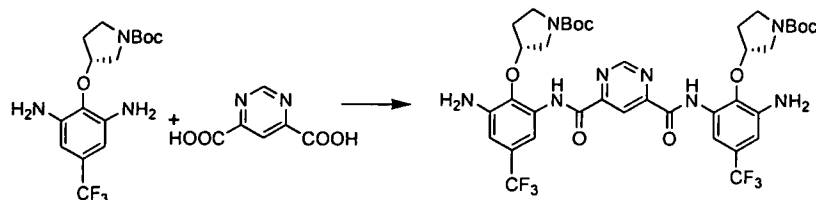
於室溫下將氫化鈉 (1.12 g, 60% 於礦物油中, 28 mmol) 逐份添加至 (R)-(-)-N-Boc-3-吡咯啉醇 (5.0 g, 27.6 mmol) 之無水 DMF (24 mL) 溶液中。再攪拌所得混合物 15 分鐘。隨後於 0°C 下將此混合物逐滴添加至 2-氯-5-(三氟甲基)-1,3-二硝基苯 (7.45 g, 27.6 mmol) 之 DMF (20 mL) 溶液中。於室溫下攪拌深紅色溶液 4 小時。用冰水使反應物驟冷且用乙酸乙酯萃取。用鹽水及水洗滌有機層，且經 Na₂SO₄ 脫水。移除溶劑後，藉由急驟管柱層析 (乙酸乙酯/己烷 = ¼, v/v) 純化殘餘物。產率為 54%。

步驟 2：



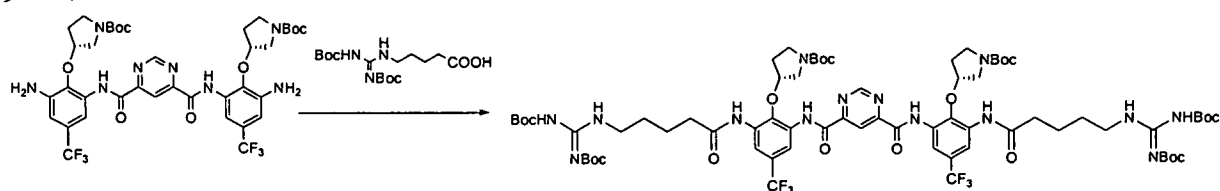
將(R)-3-(4-(三氟甲基)-2,6-二硝基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯 (4.84 g, 9.8 mmol) 及 Pd/C (0.78 g, 10%於碳上) 及乙醇 (140 mL) 置於帕爾瓶 (Parr bottle) 中。於氫氣下將混合物閃蒸三次且於 40 psi 氫氣下在室溫下攪拌隔夜。經由矽藻土過濾該混合物。用乙醇 (2×20 mL) 洗滌濾餅兩次。於真空下蒸發濾液。獲得灰白色固體且就此用於後續反應中。產率為 100%。

步驟 3：



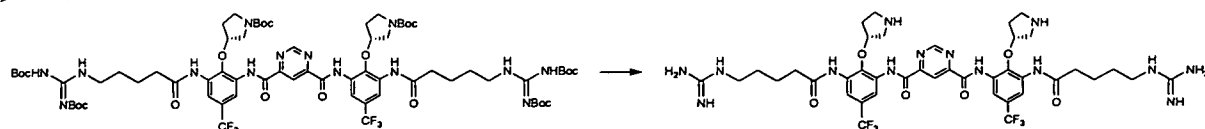
在無水 THF (200 mL) 中攪拌 2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡啶 (5.97 g, 34 mmol)。添加 N-甲基咪啉 (7.5 mL, 68 mmol)。於室溫下攪拌所得混合物 30 分鐘。隨後添加 (R)-3-(2,6-二胺基-4-(三氟甲基)苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯 (10.84 g, 30 mmol) 及嘧啶-4,6-二甲酸 (2.48 g, 14.8 mmol)。於室溫下攪拌混合物 24 小時。於真空中完全蒸發溶劑。添加水 (250 mL) 且攪拌混合物 4 小時。過濾後，用水 (3×100 mL) 洗滌黃色濾餅且在水 (250 mL) 中攪拌 4 小時。對過濾及洗滌程序重複兩次。風乾固體且在二氯甲烷 (20 mL) 中攪拌 30 分鐘，隨後作超音波處理 1 小時。過濾後，用冷二氯甲烷 (2×10 mL) 快速洗滌黃色濾餅。產物 (10.0 g, 產率：79.1%) 就此用於後續反應中。

步驟 4：



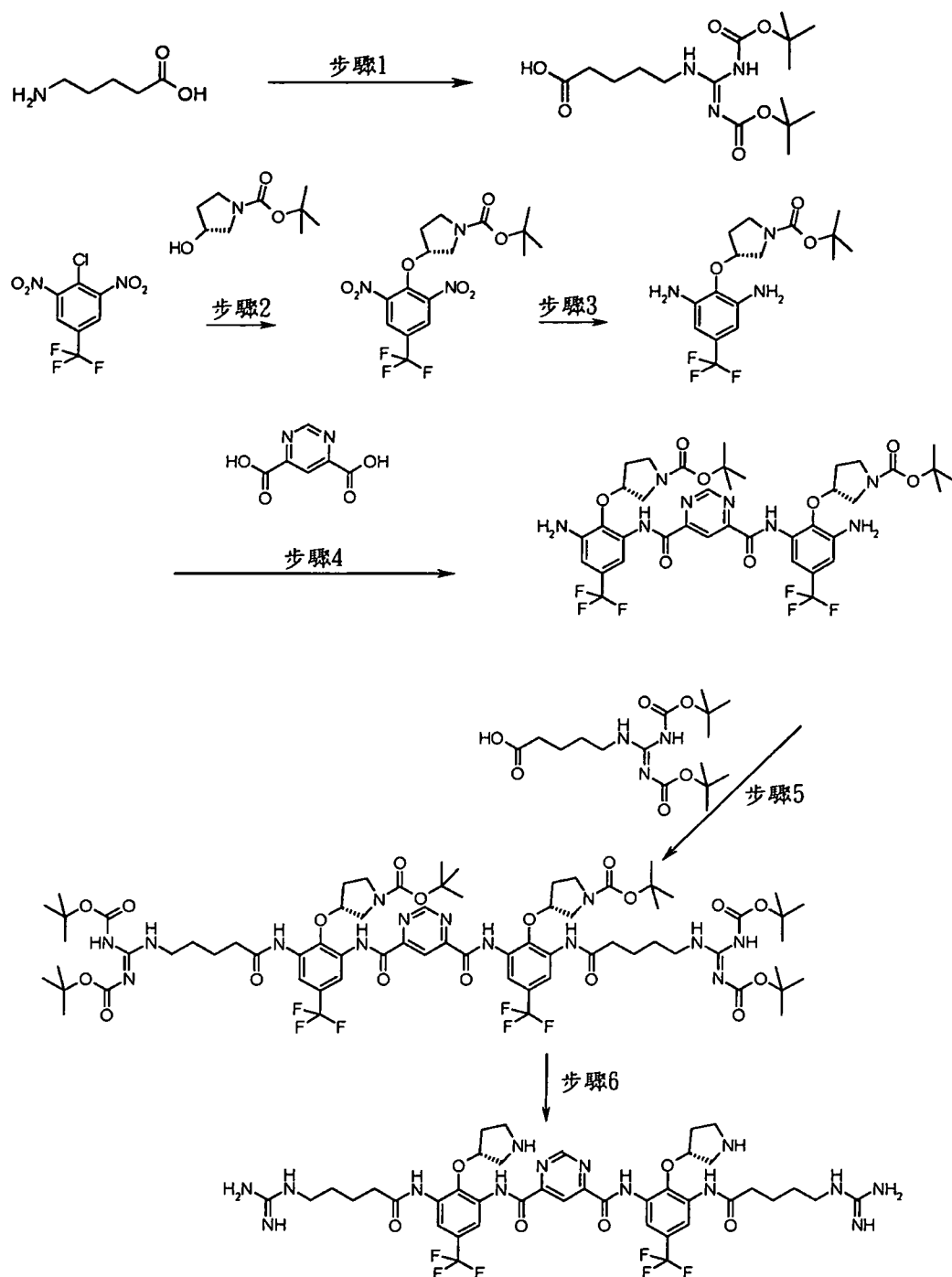
於 0°C 下在無水吡啶 (40 mL) 中攪拌起始物質 (6.5 g, 7.6 mmol)、N-Boc 胍丁酸 (10.9 g, 30.4 mmol)。逐滴添加於吡啶 (4 mL) 中之 POCl_3 (2.78 mL, 30.4 mmol)。於 0°C 下攪拌所得混合物 1.5 小時。於真空下蒸發反應混合物。將水 (140 mL) 添加至殘餘物中。用乙酸乙酯 (260 mL) 萃取混合物。用鹽水 (100 mL) 洗滌有機層且經 Na_2SO_4 脫水。蒸發後，藉由管柱 (洗提劑：乙酸乙酯/己烷/二氯甲烷 = 1/1/1, v/v/v, 隨後為 2% ~ 4% 甲醇之二氯甲烷溶液) 純化殘餘物。產率為 29.1%。 R_f 與藉由 NMR 特性化之標準樣品相同。

步驟 5：



於室溫下在 4 N HCl 之二噁烷溶液 (34 mL) 中攪拌起始物質 (3.4 g, 2.3 mmol) 隔夜。於真空下移除溶劑。用乙醚滴定殘餘物。過濾固體且藉由 C18 逆相 C18 管柱純化。獲得淡黃色固體作為產物，其純度為 98% (HPLC)；LC-MS ($M+1$): 937。產率：51%。

實施例 2：化合物 A 之合成



步驟 1：於四氫呋喃（THF）中用第三丁醇鉀（KOtBu）使(R)-3-羥基吡咯啉-1-甲酸第三丁酯去質子化。使所得陰離子與於第三丁基甲基醚（MTBE）/THF 中之 2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯反應。當反應完成時，用水中止反應混合物反應且用較多 MTBE 使其分配。用鹽水及水洗滌有機層且在旋轉蒸發器上濃縮。將固體濃縮物再溶解於甲醇中且

用水使其再沈澱。過濾及乾燥所得沈澱物，得到(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，其可不經進一步純化而用於下一步驟中。

步驟 2：將來自步驟 1 之產物溶解於甲醇中且於 100-200 psi 及 30-50°C 下在 10% Pd/C 存在下氫化直至根據 HPLC 認為還原完成為止。經由矽藻土過濾反應混合物。濃縮及乾燥濾液，得到(R)-3-(2,6-二氨基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，其可不經進一步純化而用於下一步驟中。

步驟 3：在 1-[(3-(二甲基氨基)-丙基)]-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDCI) 存在下，於吡啶中，於惰性氛圍下，於周圍溫度下，使來自步驟 2 之產物與嘧啶-4,6-二甲酸以 2 mol 二胺:1 mol 二酸之近似比率偶合。當反應完成時，用水稀釋反應混合物。分離所得沈澱物且再溶解於 MTBE 中。用水、0.2 N HCl 及鹽水洗滌 MTBE 溶液，經無水硫酸鈉脫水，分離且用庚烷稀釋。藉由過濾分離所得沈澱物且乾燥，得到嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-氨基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}，其可不經進一步純化而用於下一步驟中。

步驟 4：於吡啶中，在氧氯化磷存在下，於約 -5 至 -10 °C 之溫度下，使來自步驟 3 之產物與 2.5-3 莫耳當量之({[(第三丁氧基羰基)胺基][(第三丁氧基羰基)亞胺基]甲基}胺基)戊酸反應。於 15°C 之溫度下用水中止反應。使上清液與無晶型沈澱物分離，將該無晶型沈澱物再溶解於 MTBE 中，用水及鹽水洗滌，經無水硫酸鈉脫水，分離且用庚烷稀釋。

藉由過濾分離所得沈澱物且乾燥，得到嘧啶-4,6-二甲酸雙- $\{[3-(5-(\{[(\text{第三丁氧基羰基})\text{胺基}][(\text{第三丁氧基羰基})\text{亞胺基}]\text{甲基}\})\text{胺基})\text{-戊醯基胺基})\text{-2-}((\text{R})\text{-1-}(\text{第三丁氧基羰基})\text{-吡咯啶-3-基氧基})\text{-5-三氟甲基-苯基})\text{-醯胺}\}$ ，其不經進一步純化而用於下一步驟中。

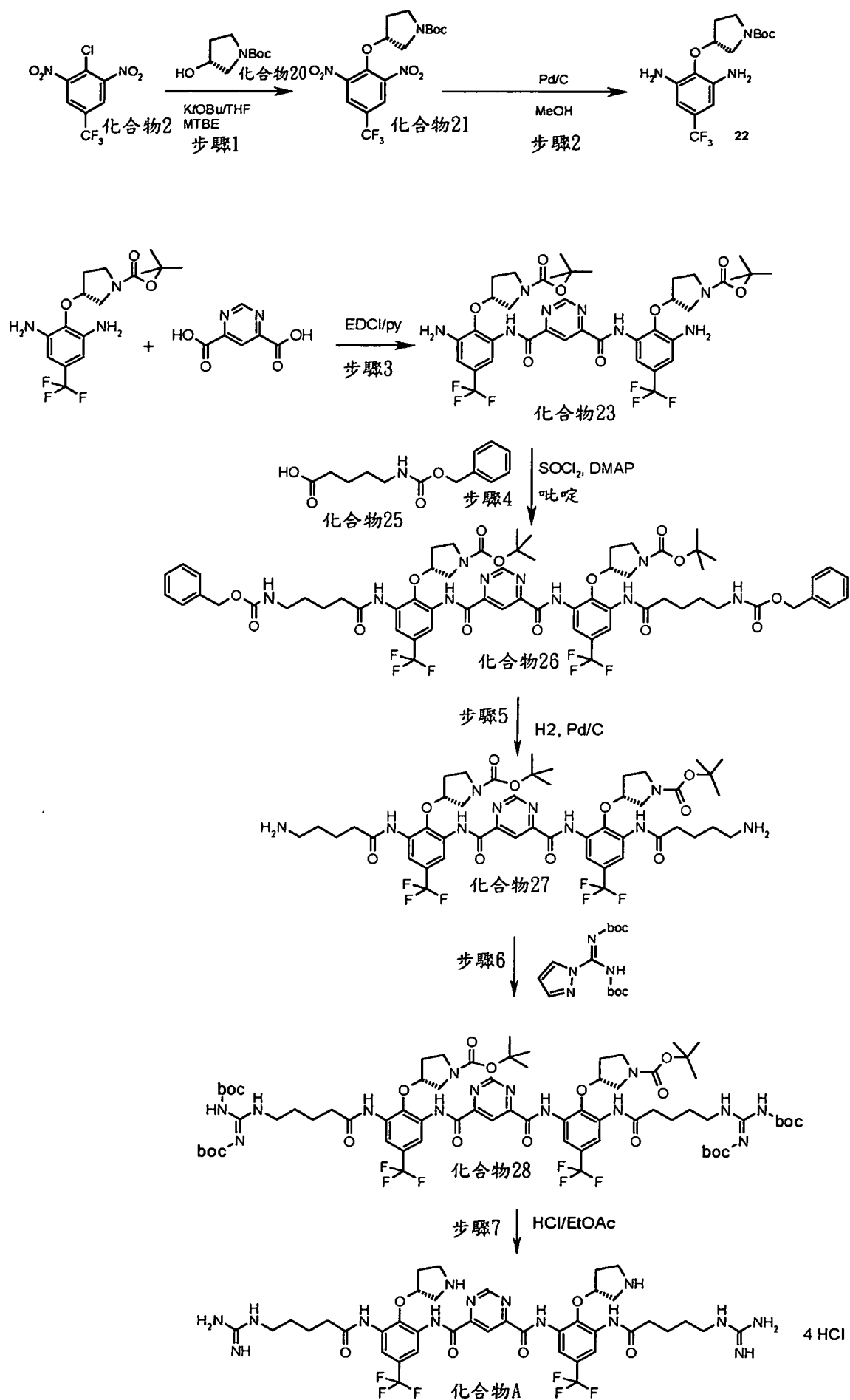
步驟 5：於周圍溫度下用 4 M HCl/1,4-二噁烷之甲酸溶液脫除來自步驟 4 之產物的保護基（移除 6 個第三丁氧基羰基）。用 1,4-二噁烷稀釋反應混合物。過濾所得沈澱物，用 1,4-二噁烷洗滌且乾燥，得到粗嘧啶-4,6-二甲酸雙- $\{[3-(5\text{-胍基-戊醯基胺基})\text{-2-}((\text{R})\text{-吡咯啶-3-基氧基})\text{-5-三氟甲基-苯基})\text{-醯胺}\}$ 四鹽酸鹽（粗化合物 A）。進一步藉由自具有 THF 之甲醇溶液再沈澱（50°C 至周圍溫度）且/或於周圍溫度下自具有 THF 之水/甲醇溶液再沈澱來純化粗產物。

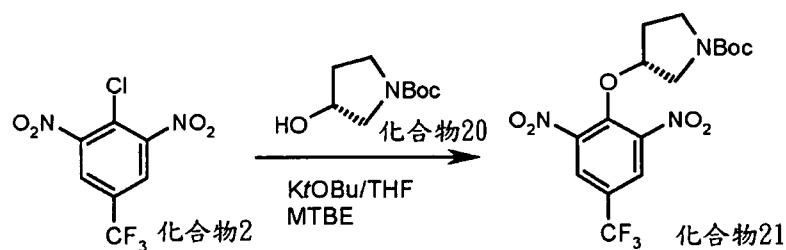
步驟 6（層析純化）：化合物 A 之最後純化係藉由逆相層析法（RP-HPLC），使用填充於 ProChrom 動態軸向壓縮（dynamic axial compression）管柱中之 YMC ODS-AQ 相、50 微米、120 埃（Angstrom）漿料來達成。移動相為溶劑 B 於溶劑 A 中之梯度，其中溶劑 A 為具有 0.05% 三氟乙酸（TFA）之水且溶劑 B 為具有 0.05% TFA 之乙腈。藉由旋轉蒸發濃縮含有純化產物之洗提份，得到呈三氟乙酸鹽之化合物 A。藉由使三氟乙酸鹽之水/甲醇溶液通過 Dowex 1x2-400（Cl 形式）離子交換柱，收集含有 API 之洗提液，濃縮且乾燥來再生最終鹽酸鹽形式。

將化合物 A 塊狀藥物物質於 2-8°C 下避光密封儲存於琥珀

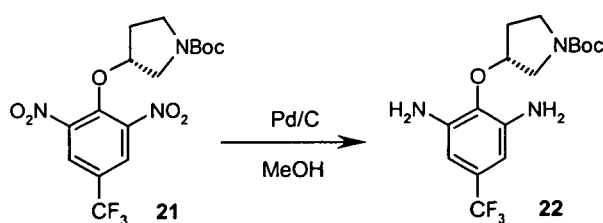
珀色 HDPE 容器或紙板桶 (fiber drum) 中之雙層聚乙烯袋中。

實施例 3：化合物 A 之合成

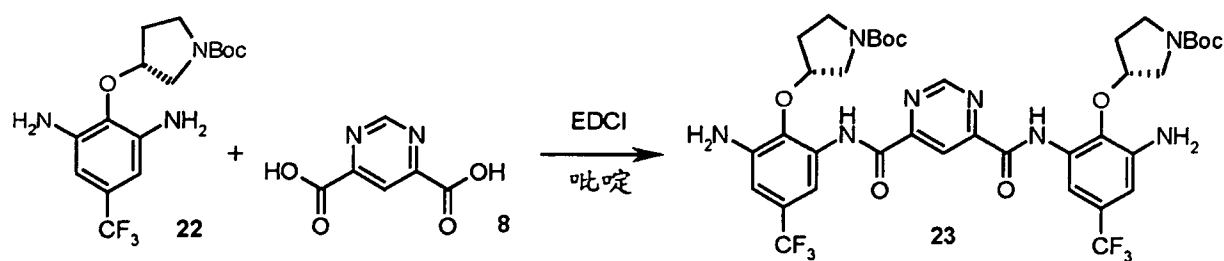




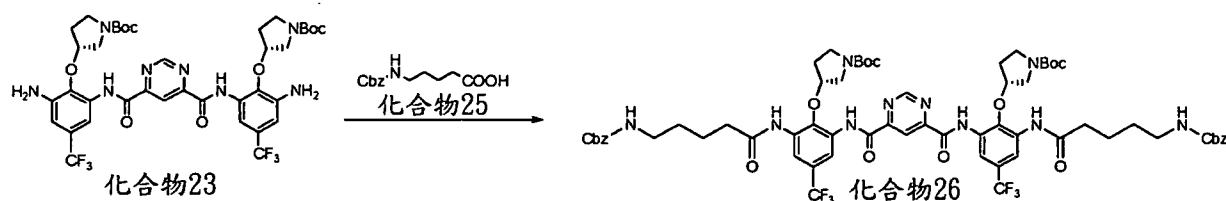
步驟 1：於四氫呋喃（THF）中用第三丁醇鉀（KOtBu）使(R)-3-羥基吡咯啉-1-甲酸第三丁酯（化合物 20）去質子化。使所得陰離子與於第三丁基甲基醚（MTBE）/THF 中之 2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯（化合物 2）反應。當反應完成時，用水中止反應混合物反應且用較多 MTBE 使其分配。用鹽水及水洗滌有機層且在旋轉蒸發器上濃縮。將固體濃縮物再溶解於甲醇中且用水使其再沈澱。過濾及乾燥所得沈澱物，得到(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，其可不經進一步純化而用於下一步驟中。此反應係以使用 4.2 Kg 化合物 2 之規模進行。



步驟 2：將化合物 21 溶解於甲醇中且於 100-200 psi 及 30-50°C 下在 10% Pd/C 存在下氫化直至根據 HPLC 認為還原完成為止。經由矽藻土過濾反應混合物。濃縮及乾燥濾液，得到(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯（化合物 22），其 HPLC 純度為 92.2%。該反應係分四批次以各批 1.64 kg 化合物 21 之規模進行。

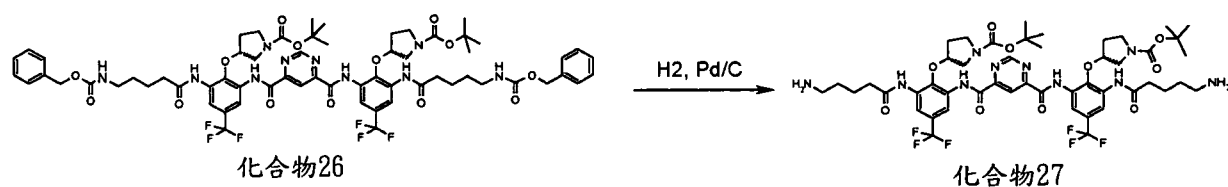


步驟 3：在 1-[(3-(二甲基氨基)-丙基)]-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽化合物 (EDCI) 存在下，於吡啶中，於惰性氛圍下，在周圍溫度下，使化合物 22 與嘧啶-4,6-二甲酸 (化合物 8) 以 2 mol 二胺:1 mol 二酸之近似比率偶合。當反應完成時，用水稀釋反應混合物。分離所得沈澱物且再溶解於 MTBE 中。用水、0.2 N HCl 及鹽水洗滌 MTBE 溶液，經無水硫酸鈉脫水，分離且用庚烷稀釋。藉由過濾分離所得沈澱物且乾燥，得到嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺} (化合物 23)，其可不經進一步純化而用於下一步驟中。該反應係以使用 3.15 kg 化合物 22 之規模進行。

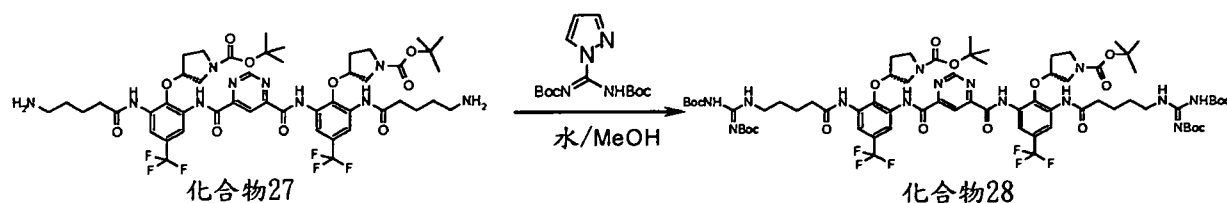


步驟 4：用冰浴將 3.66 g DMAP 於 60 ml 無水吡啶中之溶液冷卻至 0°C。緩慢添加 3.60 g 亞硫醯氯。攪拌所得溶液 10 分鐘。分別將起始物質 N-Cbz 酸 (7.53 g, 30 mmol)、化合物 23 (8.54 g, 10 mmol) 添加至溶液中。於室溫下攪拌所得混合物 4 小時。添加水 (500 mL)。於室溫下劇烈攪拌混合物 2 小時後，過濾固體且用 250 mL 水洗滌。將該固

體溶解於乙酸乙酯 (300 mL) 中。用 10% 檸檬酸溶液 (100 mL) 及鹽水 (100 mL) 洗滌有機層且經 Na_2SO_4 脫水。蒸發後，將殘餘物溶解於 40 mL DCM 中，隨後添加 250 mL 己烷。收集沈澱物且於真空下乾燥。獲得 95% 純度之 13.20 g 產物。產率：100%。

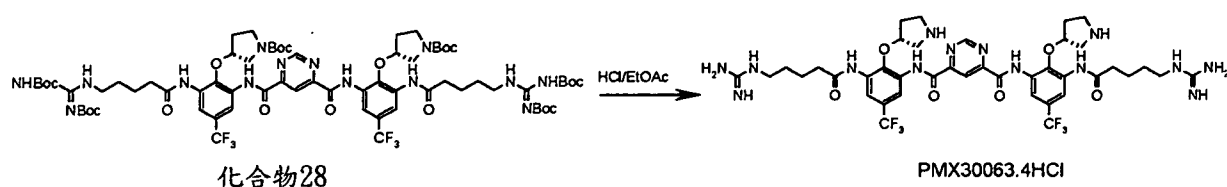


步驟 5：將化合物 26 (13.20 g) 溶解於具有 2 當量 1 N HCl 之 MeOH 中，且添加 1.0 g 催化劑 Pd/C (10%)。將反應混合物置於帕爾氫化器上且於 60 psi 氫氣下震盪 2 小時。LCMASS 顯示無進展且再添加 1.0 g 催化劑。將反應混合物置於帕爾氫化器上且於 60 psi 氫氣下震盪 3 小時。經由矽藻土過濾混合物以移除催化劑。於 30°C 下在旋轉蒸發器上濃縮濾液至乾燥。獲得 95% 純度之 11.50 g 產物。產率：100%。



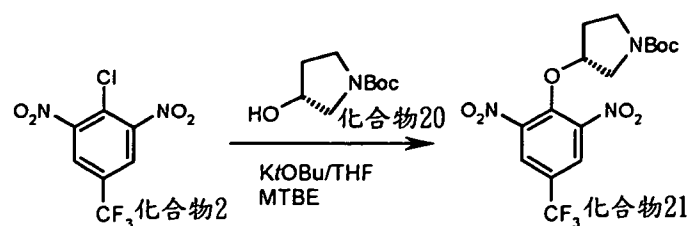
步驟 6：將化合物 27 (11.50 g, 10 mmol) 溶解於 60 ml 甲醇及 DCM (1:1) 中。隨後添加 4.04 g 三乙胺 (40 mmol)。添加 9.3 公克 (30 mmol) 二-Boc 吡唑且於室溫下攪拌所得混合物 1 小時。移除 95% 溶劑後，添加 300 mL 水且劇烈攪

拌混合物 2 小時。過濾固體且用 300 mL 水洗滌。將固體溶解於 300 mL 乙酸乙酯中且經 Na_2SO_4 脫水。蒸發溶劑後，將固體溶解於 40 mL DCM 中，隨後使用 500 mL 己烷使產物沈澱析出。收集固體且於真空下乾燥。獲得 85% 產率之 13.0 公克產物（90% 純度）。



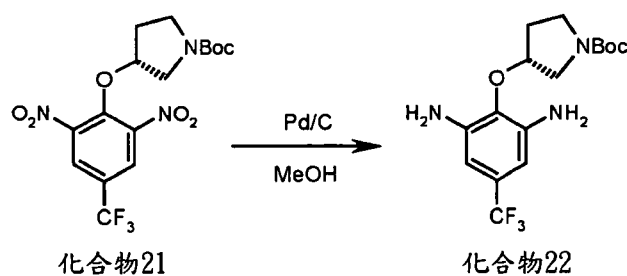
步驟 7：藉由使用 10-88% EtOAc 於 DCM 中之梯度，於 80 g 矽膠管柱上純化化合物 28（1.5 g）。收集純度超過 95% 之洗提份，於真空下蒸發且乾燥。回收率為 50-60%。於室溫（22°C）下於氫氣下在乙酸乙酯（3 mL）中溶解及攪拌具有 95% 純度之化合物 28（0.3 g）。將 HCl 氣體鼓泡至該溶液中歷時 20 分鐘。當鼓泡正在進行時，溶液顏色變成深黃色。在 15 分鐘內固體開始顯現出（crushing out）。於室溫下再攪拌溶液 1 小時。由於損失乙酸乙酯，故再將 4 mL 乙酸乙酯引入反應混合物中。用 HCl 氣體對該混合物鼓泡 10 分鐘。攪拌混合物 2.5 小時。過濾混合物的三分之一且用乙酸乙酯洗滌。於室溫下隔夜攪拌混合物的三分之二。隨後將 30 mL 乙酸乙酯添加至該混合物中。過濾後，用乙酸乙酯洗滌濾餅兩次（2×140 mL）且乾燥。將固體浸於乙酸乙酯（8 mL）中且保存於冷凍器中。在 4 小時內進行反應過程。隔夜攪拌並未顯示很大變化。最終產物之純度為 98%，其中一種主要雜質為 1.2%。





步驟 1：在攪拌下向經氮氣淨化之 4 頸 12 L RBF 中添加 305.32 g 化合物 2、700 mL MTBE 且在冰/水浴中冷卻該混合物。用第三丁醇鉀（1.31 L 於 THF 中之 1 M 溶液）溶解化合物 20（212.43 g），得到略微混濁之混合物。在攪拌下經 86 分鐘將此混合物添加至該 RBF 中之化合物 21 溶液中，同時維持內部溫度小於 9.0°C。30 分鐘後自冷水浴移出反應物且於周圍溫度下攪拌 15.5 小時。在攪拌後，添加若干小冰片，溫度自 21.4°C 下降至 18.4°C。隨後添加水（1.5 L）及 MTBE（1.5 L）且攪拌混合物 10 分鐘。在 6 L 分液漏斗中使混合物分相且分離。用 MTBE（500 mL）再萃取水層。合併有機層且用 2:1 水/飽和鹽水（3×900 mL）洗滌，並於減壓下濃縮成紅色/鐵鏽色固體。將此固體溶解於 2.45 L MeOH 中且將溶液轉移至 4 L 錐形瓶（Erlenmeyer flask）中。隨後在攪拌下逐份添加水（1 L），產生濃漿。覆蓋混合物且置於冷凍器（-15°C）中 16 小時。藉由過濾收集固體且於真空下乾燥。經乾燥之產物為亮黃色粉末。產率：395.3 g，HPLC 純度為 94.0%。

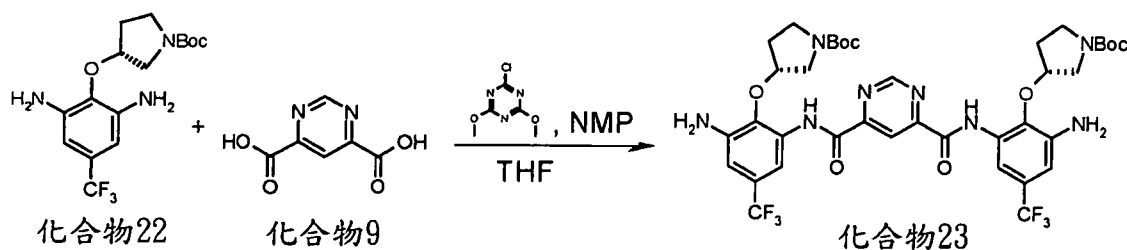
第三丁醇鉀可由例如任何烷醇鹽、氫化鈉、氫化鉀或可使化合物 20 之羥基去質子化的任何鹼替換。化合物 2 可在 2 位置處經任何鹵基取代。



步驟 2：在渦旋下小心地向不鏽鋼 2 加侖 (gal) 帕爾攪拌器裝置中依序添加催化劑 Pd/C (10 wt%, 20 g)、來自步驟 1 之化合物 21 (394.37 g) 及 2 L MeOH。向容器中填充氫氣且排放兩次。隨後在 82 psi 氫氣下開始攪拌混合物；壓力下降至 0 psi。分別將容器反覆地填充至 62 psi、28 psi 及 36 psi，每次均使壓力回至 0 psi (在 51 分鐘內總通入量 (total uptake) 為 208 psi)。內部溫度起始於 16°C 且混合物顯示逐漸但快速的放熱，達 38°C 之最大值。內部溫度維持於 33-38°C。在 23 psi 通入量下使容器加壓至 49 psi。經 1 小時在 12 psi 通入量下使容器加壓至 90 psi。經 6 小時在 82 psi 通入量下使容器加壓至 120 psi。隨後經 14.33 小時在 37 psi 通入量下使容器再加壓至 51 psi (氫氣之總通入量為 362 psi)。拆除反應器且經由經 MeOH 預潤濕之矽藻土 545 墊 (11.0 cm 直徑布氏漏斗 (Büchner funnel)) 過濾混合物。用 MeOH 沖洗反應器及矽藻土墊且抽吸該墊直至滴液緩慢及得到無色濾液 (約 3.0 L 總體積) 為止。進一步經由凹槽形紙片過濾濾液以移除一些深色細粉。將澄清濾液轉移至 5 L RBF 中且濃縮成橙色/棕色黏性油狀物，將其冷卻至 3-4 °C 隔夜，在此期間物質部分凝固/結晶。使該物質升溫且進一步於減壓下抽吸，形成鐵鏽色/棕色膠狀/蠟狀硬固體塊。向 RBF 中添加庚烷 (2×700 mL) 及 MTBE (700 mL)。在頂

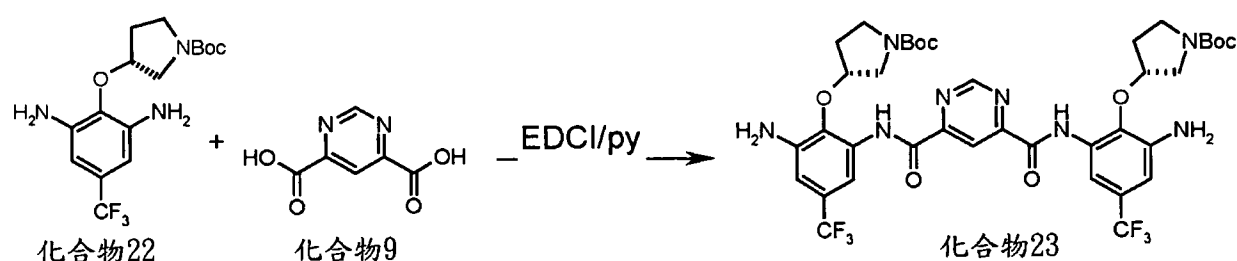
置式機械攪拌下攪拌混合物 3.5 小時。自固體傾析出液體層，使塊碎裂成較小塊，將液體置放回 RBF 中且劇烈攪拌懸浮液 16.75 小時。隨後使用玻璃攪拌桿之末端進一步壓碎餘下之小塊且劇烈攪拌混合物 70 分鐘。經由配衡燒結玻璃漏斗過濾懸浮液，使用濾液完成轉移。覆蓋該漏斗且在低熱（41℃）下真空乾燥 4 小時，得到呈微桃色/米色粉末之產物。產率為 270.60 g，HPLC 純度為 98.5%。

Pd/C 催化劑可由例如適合於氫化硝基之任何催化劑替換。



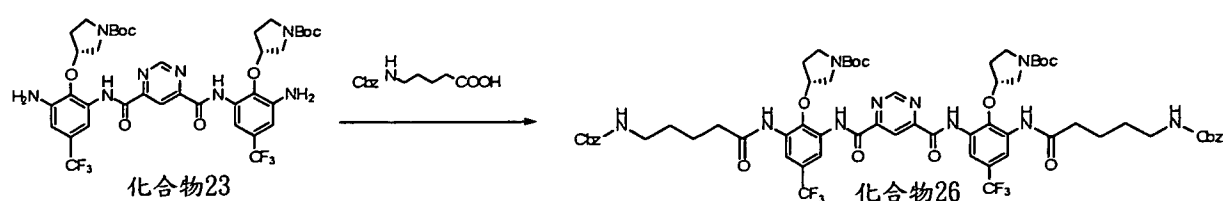
步驟 3(選擇 1): 在無水 THF(60 mL)中攪拌 2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡啶 (4.0 g)。添加 N-甲基咪啉 (4.4 g)。於室溫下攪拌所得混合物 30 分鐘。隨後添加化合物 22(7.2 g) 及嘧啶-4,6-二甲酸 (1.68 g)。於室溫下攪拌混合物 24 小時。隨後於真空中完全蒸發溶劑。添加水 (250 mL) 且攪拌混合物 4 小時。過濾後，用水 (3×100 mL) 洗滌黃色濾餅且再次在水 (250 mL) 中攪拌 4 小時。對過濾及洗滌程序重複兩次。隨後風乾固體。將該固體溶解於 15 mL DCM: 己烷: 丙酮 (5:5:1) 溶液中。將混合物保持於室溫下 2 天。過濾固體且用 10 mL DCM: 己烷 (1:1) 溶液洗滌兩次。再次重複再結晶程序，得到淡黃色固體。產率為 70%，HPLC 純

度為 100%。



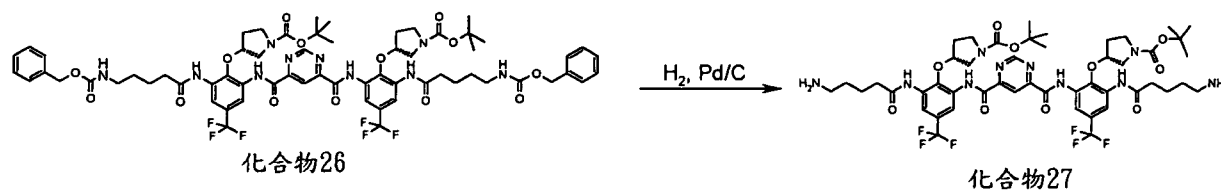
步驟 3 (選擇 2): 在無水吡啶 (60 mL) 中攪拌 EDCI (6.0 g)。隨後添加化合物 22 (7.2 g) 及化合物 9 (0.56 g)。於室溫下攪拌混合物 2 小時。隨後添加另一份嘧啶-4,6-二甲酸 (0.56 g)。於室溫下再攪拌混合物 2 小時後，添加第三份嘧啶-4,6-二甲酸 (0.56 g)。於室溫下攪拌所得混合物 24 小時。隨後於真空中完全蒸發溶劑。添加水 (250 mL) 且攪拌混合物 4 小時。過濾後，用水 (3×100 mL) 洗滌黃色濾餅且再次在水 (250 mL) 中攪拌 4 小時。對過濾及洗滌程序重複兩次。隨後風乾固體。將該固體溶解於 15 mL DCM:己烷:丙酮 (5:5:1) 溶液中。將混合物保持於室溫下 2 天。過濾固體且用 10 mL DCM:己烷 (1:1) 溶液洗滌兩次。再次重複再結晶程序，得到淡黃色固體。產率為 70%，HPLC 純度為 100%。

EDCI 可由例如可產生酸酐或活性酯之任何醯胺偶合劑替換，該等偶合劑諸如 CDI、DCC、HOBt、HOAt、POCl₃。



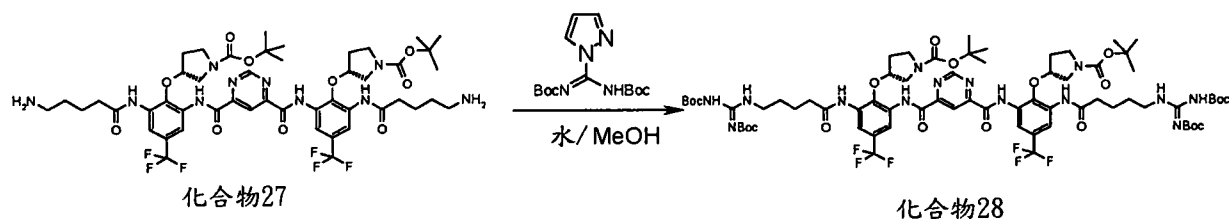
步驟 4：用冰浴將 DMAP (3.66 g) 於 60 ml 無水吡啶中之溶液冷卻至 0°C。緩慢添加亞硫醯氯 (3.60 g)。隨後攪拌所得溶液 10 分鐘。分別將起始物質 N-Cbz 酸 (7.53 g, 30 mmol)、化合物 5 (8.54 g, 10 mmol) 添加至溶液中。於室溫下攪拌所得混合物 4 小時。隨後添加水 (500 mL)。於室溫下劇烈攪拌混合物 2 小時後，過濾固體且用 250 mL 水洗滌。將該固體溶解於乙酸乙酯 (300 mL) 中。用 10% 檸檬酸溶液 (100 mL) 及鹽水 (100 mL) 洗滌有機層且經 Na₂SO₄ 脫水。蒸發後，將殘餘物溶解於 40 mL DCM 中，隨後添加 250 mL 己烷。收集沈澱物且於真空下乾燥。獲得 95% 純度之 13.20 g 產物。產率：100%。

亞硫醯氯可由例如 POCl₃、(EtO)₂POCl 或乙二醯氯替換。



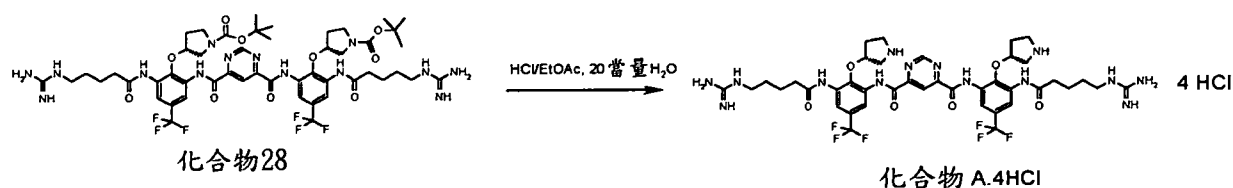
步驟 5：將化合物 26 (13.20 g) 溶解於具有 2 當量 1 N HCl 之 MeOH 中，且添加 1.0 公克催化劑 Pd/C (10%)。將反應混合物置於帕爾氫化器上且於 60 psi 氫氣下震盪 2 小時。LCMASS 顯示無進程且再添加 1.0 公克催化劑。將反應混合物置於帕爾氫化器上且於 60 psi 氫氣下震盪 3 小時。經由矽藻土過濾混合物以移除催化劑。於 30°C 下在旋轉蒸發器上濃縮濾液至乾燥。獲得 95% 純度之 11.50 g 產物。產率：100%。

Pd/C 催化劑可由例如適合於加氫分解 CBZ 基團之任何催化劑替換。



步驟 6：將化合物 27 (11.50 g, 10 mmol) 溶解於 60 ml 甲醇及 DCM (1:1) 中。隨後添加 4.04 g 三乙胺 (40 mmol)。添加 9.3 公克 (30 mmol) 二-Boc 吡唑且於室溫下攪拌所得混合物 1 小時。在移除 95% 溶劑後，添加 300 mL 水且劇烈攪拌混合物 2 小時。過濾固體且用 300 mL 水洗滌。將固體溶解於 300 mL 乙酸乙酯中且經 Na_2SO_4 脫水。蒸發溶劑後，將固體溶解於 40 mL DCM 中，隨後使用 500 mL 己烷使產物沈澱析出。收集固體且於真空下乾燥。獲得 85% 產率 (95% 純度) 之 13.0 g 產物。

二-Boc 吡唑可由例如異脲或二-Boc 異脲替換。



步驟 7：將化合物 28 (1.17 kg, 0.76 mol) 溶解於 24 L EtOAc 中，隨後添加 281 mL 水。將 HCl 氣體添加至溶液中，同時藉由調整添加速度來控制反應溫度低於 45°C 。總反應時間為 5 小時，其中 1.5 小時為 HCl 添加之時間。HPLC 指示起始物質不到 1% 且於氮氣下藉由過濾收集沈澱之產物。

用 EtOAc 沖洗固體，用 MeOH/THF (1:1) 濕磨且於真空下乾燥。產率為 84%。

HCl/EtOAc 可由例如 HCl/二噁烷替換。

實施例 5：對革蘭氏陽性臨床分離株（表 1A）及革蘭氏陰性臨床分離株（表 1B）之抗微生物活性

根據確定的 CLSI 文件（對此研究中所測試之生物體（需氧、厭氧者或酵母）係特定的）在試管內評估化合物 A。針對需氧細菌並排測試胺苄青黴素、頭孢他啶（ceftazidime）、頭孢呋辛（cefuroxime）、環丙沙星、利奈唑胺（linezolid）及萬古黴素作為比較藥劑；針對厭氧菌測試克林達黴素及甲硝唑作為比較者；針對酵母分離株測試氟康唑（fluconazole）作為比較者。在二甲亞砜（DMSO）中製備化合物 A 之儲備溶液。胺苄青黴素、頭孢他啶、頭孢呋辛、環丙沙星、利奈唑胺、萬古黴素、甲硝唑、克林達黴素及氟康唑各係根據其製造商之指南來製備。

需氧菌（M7-A7）1

根據 CLSI 指南 M7-A7，藉由液態培養基微量稀釋法，測定最小抑制濃度（minimum inhibitory concentration, MIC, $\mu\text{g/ml}$ ）。使用米勒-欣頓二氏（Mueller-Hinton）液態培養基測試所有需氧菌，只是鏈球菌屬係使用經陽離子調節之補充有 2-5% 溶胞馬血的米勒-欣頓二氏液態培養基來測試。結果展示於表 1A 及表 1B 中。

表 1A

生物體 革蘭氏陽性	MIC (μg/mL) *每一生物體 2-3 個分離株			
	化合物 A	利奈唑胺	萬古黴素	頭孢他啶
糞腸球菌	1	1-2	1	>64
屎腸球菌 (VRE)	1	1-2	>128	>64
金黃色葡萄球菌 (MRSA)	0.5-1	1-2	0.5-1	32
表皮葡萄球菌	0.25-0.5	0.5-1	2	16-32
腐生葡萄球菌	0.25-0.5	1-2	1-2	32->64
葡萄球菌屬 (凝固酶陰性)	0.25-0.5	1	1-2	16-32
無乳鏈球菌	2	1	0.5	0.5
肺炎葡萄球菌	4-8	1	0.5	0.25
化膿性鏈球菌	1-4	1	0.5	0.12
草綠色鏈球菌 (<i>Strept. viridians</i>)	2-8	1	0.5-1	0.5-4

*根據標準 CLSI 指南進行液態培養基微量稀釋檢定。

表 1B

生物體 革蘭氏陰性	MIC (μg/mL) *每一生物體 2-3 個分離株			
	化合物 A	頭孢他啶	利奈唑胺	萬古黴素
弗氏檸檬酸桿菌	2-4	0.25-2	>16	>128
柯氏檸檬酸桿菌	1-2	0.12-0.25	>16	>128
陰溝腸桿菌	0.5-4	0.25	>16	>128
大腸桿菌	1-2	0.06	>16	>128
產酸克氏桿菌	2-8	0.06-0.12	>16	>128
肺炎克氏桿菌	1-2	0.06-0.12	>16	>128
摩氏摩根菌	2->64	2-16	>16	>128
奇異變形桿菌	64->64	0.03-0.06	>16	>128
普通變形桿菌	64->64	0.12	>16	>128
斯氏普羅威登斯菌	16-64	0.12-0.64	>16	>128
不動桿菌屬物種	4	2-64	>16	128->128
綠膿桿菌	32	1-8	>16	>128
黏質沙雷氏菌	32	0.12-0.25	>16	>128
嗜麥芽窄食單胞菌	8->64	4-8	>16	32-128
流感嗜血桿菌	4-8	0.06-0.12	16->16	128

*根據標準 CLSI 指南進行液態培養基微量稀釋檢定。

化合物 A 對革蘭氏陽性病原體展現廣泛適用範圍，其中金黃色葡萄球菌及凝固酶陰性葡萄球菌物種顯示最低 MIC。化合物 A 對革蘭氏陰性病原體具有活性，但總適用範圍小於對革蘭氏陽性生物體之適用範圍。

實施例 6：對具有確定的抗性表型之葡萄球菌物種的 MIC

根據 CLSI 文件 M7-A7，藉由液態培養基微量稀釋方法，使用米勒-欣頓二氏液態培養基，在試管內評估化合物 A 對所選分離株之敏感性特徵。如 CLSI 文件 M100-S17 所指導，適當時，應用 CLSI 解釋斷點（interpretive breakpoint）。結果展示於表 2 中。

表 2

	藥物敏感性	OXA-R	VRSA/VISA OXA-R	LZD-NS OXA-R	DAP-NS OXA-R	VRSA/VISA DAP-NS OXA-R
分離株	59	69	7	5	5	3
化合物 A MIC 範圍	0.25-1	0.25-2	0.5-1	0.5-1	0.5-2	0.5-1

*根據標準 CLSI 指南進行液態培養基微量稀釋檢定。

OXA-R：苯唑西林抗性；VRSA：萬古黴素抗性金黃色葡萄球菌；VISA：萬古黴素中度抗性金黃色葡萄球菌；LZD-NS：利奈唑胺非敏感性；DAP-NS：達托黴素（daptomycin）非敏感性。

化合物 A 在試管內對金黃色葡萄球菌及凝固酶陰性葡萄球菌之所有分離株（包括對達托黴素、利奈唑胺及萬古黴素（用於處理諸如 MRSA 之抗性金黃色葡萄球菌的最後一線治療劑）具有特徵抗性之金黃色葡萄球菌的分離株）均具有活性。針對金黃色葡萄球菌分離株，相對於敏感性分離株，對抗性分離株之活性無變化。針對凝固酶陰性葡萄球菌，活性不受二甲氧苄青黴素抗性影響。

實施例 7：細胞毒性及選擇性

在比色檢定中使用經轉型之人類肝細胞系（HepG2，HB-8065）及胚胎小鼠細胞系（NIH/3T3 細胞，CRL-1658）評估化合物 A 之細胞毒性。此檢定量測新穎四唑鎢化合物被活細胞生物還原為可溶性甲臍產物之程度。在使用之前 24 小時，將 HepG2 細胞以每孔 2×10^4 個細胞接種於 96 孔板之具有 10% 胎牛血清（FBS）的 MEM 培養基中。在使用之前 24 小時，將 NIH/3T3 細胞以每孔 2×10^4 個細胞接種於 96 孔板之具有 10% 小牛血清（BCS）的 DMEM 培養基中。用無血清培養基沖洗細胞單層且與化合物 A 一起在無血清培養基中培育 1 小時。培育後，由補充有血清之培養基替換該培養基且使用 Cell Titer 96 水性非增殖檢定套組（Promega, Madison, WI）量測活細胞。使用 4 參數邏輯方程式求出 EC_{50} 值： $Y = \text{最低值} + (\text{最高值} - \text{最低值}) / (1 + 10^{((\text{Log}EC_{50} - X) * \text{希爾斜率}))}$ 。

亦在溶血檢定中使用人類紅血球評估化合物 A 之細胞毒性。對混合全人血離心以分離出紅血球 (red blood cell, RBC)。沖洗經分離之 RBC 且用 Tris 緩衝鹽水 (TBS 緩衝液, pH 7.4) 稀釋以獲得 0.22% RBC 儲備懸浮液。將 5 μ L 化合物 A 儲備溶液添加至 45 μ L RBC 懸浮液中且於 37°C 下在震盪下培育 1 小時。在培育時間結束時, 將樣品離心且將 30 μ L 上清液添加至 100 μ L 水中。讀取 OD₄₁₄ 量測值以獲得血紅蛋白濃度。使用蜂毒肽 (bee venom peptide/melittin) 作為陽性對照組。如上文所述測定 EC₅₀ 值。結果展示於表 3 中。

表 3

化合物	MIC 或 MIC ₉₀ * (μ g/mL)	細胞毒性 (EC ₅₀ μ g/mL)			選擇性 (EC ₅₀ /MIC)		
	金黃色葡萄球菌	RBC	3T3	HepG2	RBC	3T3	HepG2
化合物 A	1.0*	>500	430	1,031	>500	430	1,031
蜂毒肽	2	2	4	1	1	2	0.5

化合物 A 展示較大總選擇性。

實施例 8：對金黃色葡萄球菌 (ATCC 27660) 之時間殺死研究

以標準方案，藉由量測使初始接種物減少 3 個對數單位所花費之時間來確定化合物 A 對大腸桿菌 ATCC 25922、大腸桿菌 (實驗室菌株) D31 及金黃色葡萄球菌 ATCC 27660 之時間殺死研究。以 20 μ L 冷凍細菌儲備液給 3 mL 經陽離子調節之米勒-欣頓二氏培養基接種且在震盪器平台 (250 rpm) 上於 37°C 下培育隔夜。將懸浮液稀釋至約 5×10^5 cfu/mL

且用 2×、5×、10×及 20×MIC (MIC = 1 μ g/mL) 處理。在 DMSO 中製備 10 mg/mL 之化合物 A 儲備溶液。在各時間點進行收集且在培育 18 小時後在 MH 瓊脂板上對活細菌計數。檢驗於 2×MIC 濃度下化合物 A 對金黃色葡萄球菌 ATCC 27660 之時間殺死動力學的研究顯示在 5 小時內初始接種物減少 3 個 $\log_{10}$ 單位。於 1×MIC 濃度下經 72 小時在培養物中未觀察到再生長。參見圖 1A 及圖 1B。

實施例 9：MSSA (ATCC 29213) 及 MRSA (ATCC 33591) 之連續繼代抗性

將金黃色葡萄球菌 ATCC 29213 或二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌 (MRSA ATCC 33591) 之冷凍細菌儲備液 (20 μ L) 接種至 3 mL 經陽離子調節之米勒-欣頓二氏培養基中且於 37°C 下在震盪器平台 (250 rpm) 上培育隔夜。將懸浮液稀釋至約 5×10^5 cfu/mL 且接種至聚丙稀 (Costar) 96 孔圓底板 (90 μ L 體積) 中。在 DMSO 中製備化合物 A 及諾氟沙星 (norfloxacin) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO; 目錄號 N9890) 之化合物儲備溶液且直接在聚丙稀板之孔中以每孔 10 μ L 在 0.01% 乙酸、0.2% 牛血清白蛋白中製備化合物之連續兩倍稀釋液。化合物 A 之最終濃度為 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.19、0.098、0.049 及 0.024 μ g/mL。諾氟沙星之最終濃度範圍為 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.19、0.098 及 0.049 μ g/mL。在檢定中 DMSO 濃度不超過 1%。所有樣品均以一式三份進

行。於 37°C 下培育 24 小時後，藉由觀察由 CLSI 定義為 ≥ 2 mm 鈕釦狀物 (button) 或一定濁度之「可接受之生長」的存在來評估細胞生長。MIC 孔係定義為未觀察到可接受之生長的最低濃度。對於連續繼代，於 0.5×MIC 下自 3 個重複孔中之 2 個孔獲得 50 μ L 等分試樣且組合至 900 μ L 經陽離子調節之新鮮米勒-欣頓二氏培養基中。量測 OD₆₀₀ 且將細胞懸浮液以約 5×10^5 cfu/mL 接種至聚丙烯 96 孔圓底板 (90 μ L 體積) 中。預先將 10 μ L 化合物儲備溶液添加至孔中以達到上述各化合物之濃度範圍。所有樣品均以一式三份進行。於 37°C 下培育該等板 24 小時。重複此過程總共 17 代且每代均記錄 MIC 值。

在諾氟沙星下，金黃色葡萄球菌 MSSA 與 MRSA 之繼代與到第 3 代 (4 次二倍稀釋) 時之 MIC 值明顯升高相關，到第 15 代時該等值分別增加 128 倍及 64 倍。相反，在整個 17 次繼代之時間過程中，化合物 A 對 MSSA ATCC 29213 或 MRSA ATCC 33591 之 MIC 無變化。參見圖 2。

實施例 10：化合物 A 之試管內代謝穩定性-血漿

將來自人類 (混合性別)、大鼠 (混合育種及性別) 及狗 (混合育種及性別) 之混合血漿樣品與化合物 A (5 μ M) 一起於 37°C 下培育 0 及 60 分鐘 (一式兩份之樣品)。藉由添加冰冷沈澱溶劑 (乙腈：冰乙酸，9:1 v/v) 終止培育。用等體積之 0.1% 甲酸稀釋上清液且藉由 HPLC-MS/MS 加以分析。血漿穩定性係報導為相對於 0 分鐘時之母體化合物量

的 60 分鐘時之母體化合物%。結果展示於表 4 中。

表 4

物種	血漿穩定性 (%)
人類	96
大鼠 (混合育種)	102
狗 (混合育種)	100

於 37°C 下培育 1 小時後，化合物 A 在人類、大鼠及狗血漿中幾乎無損失，從而指示高血漿穩定性。化合物 A 在人類、石蟹獼猴及兔中亦幾乎無損失（資料未展示）。

實施例 11：在小鼠大腿負荷模型中化合物 A 之功效

在肌肉內接種金黃色葡萄球菌（ATCC 13709）之前 4 天及 1 天，用環磷醯胺（cyclophosphamide）（150 mg/kg，腹膜內）使 6-7 週齡雌性 CD-1 小鼠之嗜中性白血球減少。藉由將來自 18-20 小時胰蛋白酶大豆瓊脂（tryptic soy agar, TSA）培養物之群落轉移至無菌 PBS 中來製備金黃色葡萄球菌接種物。藉助於分光光度計將密度調整至約 10^6 cfu/mL，且藉由稀釋板計數方法來測定接種物濃度。藉由給各後大腿注射 0.1 mL 接種物來給小鼠接種。如表 5 中所示，在接種後 1 小時及 5 小時、1 小時及 9 小時或 1 小時及 13 小時時，藉由靜脈內快速投予每劑 1 mg/kg 或 2 mg/kg 來給予獨立的各組小鼠（每組 4 隻雌性小鼠）化合物 A。4 隻小鼠組成之一獨立對照組接受接種物，但不進行抗生素處理。將化合物 A 溶解於 50%/50% v/v 無菌 USP 純水/PBS 中。

在接種後 25 小時時，收集大腿。將大腿肌肉及骨組織均質化，將連續稀釋液之等分試樣塗於 TSA 上且於 37°C 下培育 20 小時，並獲得群落計數以計算每條大腿之 cfu 數。參數展示於表 5 中。

表 5

組號	處理	劑量 (每劑 mg/kg)	總劑量 (mg/kg)	體積 (ml/kg)	處理 (接種後 小時數)	大腿收集 (接種後 小時數)	小鼠編號
1	接種對照組	NA	NA	NA	NA	25	4
2	化合物 A	1	2	4	1 及 5	25	4
3	化合物 A	2	4	4	1 及 5	25	4
4	化合物 A	1	2	4	1 及 9	25	4
5	化合物 A	2	4	4	1 及 9	25	4
6	化合物 A	1	2	4	1 及 13	25	4
7	化合物 A	2	4	4	1 及 13	25	4

當在接種後 1 小時及 5 小時或 1 小時及 9 小時時以每劑 2 mg/kg 投予時，化合物 A 可最有效地減少接種大腿內之細菌群落。此 2 組中之細菌減少分別比接種對照組低 3.96 及 3.93 個對數。參見圖 3。

實施例 12：在大鼠大腿負荷模型中相對於萬古黴素之功效

對於各實驗，在肌肉內接種金黃色葡萄球菌（ATCC 13507）之前 4 天及 1 天，用環磷醯胺（150 mg/kg，腹膜內）使在股靜脈上裝插管之 8-9 週齡雌性 Crl:CD (SD) 大鼠之嗜中性白血球減少。由自隔夜培養物獲得之群落製備金黃色葡萄球菌之懸浮液，置於 PBS 中，且藉助於分光光度計調整至約 10^7 cfu/mL。給各大鼠之右後腿的大腿肌肉內注射

0.2 mL 接種物。在接種後 25 小時時收集大腿且進行加工以測出每條大腿之 cfu 數。藉由在接種後以不同時間間隔，靜脈內快速注射至尾靜脈中或經由股靜脈插管進行 1 小時靜脈內輸注或 4 小時靜脈內輸注來給予化合物 A。各實驗均包括獨立的接種對照組，且第一及第二實驗中包括萬古黴素組作為比較藥劑。包括對照物及比較藥劑之各組均由 4 隻大鼠組成。

對於化合物 A，與接種對照組相比，靜脈內快速輸注（每劑 10 mg/kg，總劑量為 20 mg/kg）及 1 小時靜脈內輸注（每劑 10 mg/kg，總劑量為 20 mg/kg）分別使細菌負荷降低 3.2 及 3.0 個對數。在感染後 1 小時，相對於接種物含量之減少分別為約 2.2 至 2.0 個對數。功效與萬古黴素相當。參見圖 4。

實施例 13：在小鼠敗血症模型中化合物 A 對金黃色葡萄球菌感染之功效

在腹膜內注射金黃色葡萄球菌（ATCC 13709， 5×10^7 cfu/mL，於 5% 黏蛋白中，每隻小鼠 0.5 mL）1 小時及 7 小時，向獨立的各組 8 週齡雌性 CD-1 小鼠（每組 8 隻小鼠）投予無菌鹽水、萬古黴素或化合物 A。將化合物 A 溶解於 50%/50% v/v 無菌 USP 純水/TBS 中。由自 TSA 板轉移至無菌 PBS 中之群落製備金黃色葡萄球菌懸浮液。將儲備懸浮液之等分試樣添加至 5% 黏蛋白中以達到約 5×10^7 cfu/mL 之最終濃度。研究設計及劑量展示於表 6 中。觀察小鼠之死

亡率，歷時接種後 6 天。

表 6

處理	劑量 (每劑 mg/kg)	總劑量 (mg/kg)	測試化合物 之途徑	體積 (ml/kg)	測試化合物 注射時程 (接種後 小時數)	小鼠 編號
接種對照組	NA	NA	NA	NA	NA	8
萬古黴素	10	10	皮下	10	1	8
化合物 A	3	6	靜脈內	4	1 及 7	8
化合物 A	5	10	靜脈內	4	1 及 7	8
化合物 A	10	20	靜脈內	4	1 及 7	8

對於化合物 A，觀察到劑量依賴性功效與萬古黴素處理組相當。所有未經處理之小鼠在處理之第一天內死亡。於 2×5 及 2×10 mg/kg 劑量之化合物 A 下，由化合物 A 達成完全保護。參見圖 5。

實施例 14：急性毒性研究-最大耐受劑量

在遞增/遞減劑量研究中對小鼠及大鼠測定最大耐受劑量 (maximum tolerated dose, MTD)。藉由在小鼠及大鼠之尾靜脈內靜脈內快速注射或藉由在大鼠之股靜脈內經由導管靜脈內輸注來投予化合物 A。以各劑量，向 2 至 3 隻動物投予化合物且經 4 至 7 天之時間記錄臨床跡象。在研究結束時進行肉眼屍檢。結果展示於表 7 中。

表 7

給藥化合物 A	MTD (mg/kg)	
	小鼠	大鼠
靜脈內快速注射	30	N.D.
靜脈內輸注-1 小時	N.D.	>24

當藉由靜脈內輸注 1 小時投予時，在大鼠中化合物 A 之 MTD 大於 24 mg/kg。

實施例 15：在大鼠中化合物 A 之藥物動力學

藉由以指示劑量靜脈內快速注射來向 Cr1:CD (SD) 大鼠投予化合物 A。由經 28 小時在 9 個時間點採集之血樣 ($n = 3$) 製備血漿。藉由 HPLC-MS/MS 測定化合物含量。所有動物均裝有 2 個頸靜脈插管 (jugular vein cannula, JVC)，每一個皆用於劑量投予及血液收集。以 $N = 3$ 進行各投藥途徑。無限制地向動物供應市售齧齒動物食物及水。在給藥當天之零時間，各大鼠經由適當投藥途徑接受單次劑量。採血時間展示於表 8 中。

經由 JVC 自大鼠採集各血樣且置於含有 EDTA 鈉作為抗凝血劑之經冷卻聚丙烯管中。於 4°C 之溫度下且以 13,000 rpm 之速度將樣品離心 5 分鐘。在整個處理中保持樣品為冷的。隨後將各血漿樣品轉移至經標記之聚丙烯管中，置於乾冰上，且儲存於經設定維持於 -60°C 至 -80°C 之冷凍器中。

萃取血漿研究樣品且使用以前開發之方法加以分析。使用含有 0.1% 甲酸之 DMSO 萃取單一標準曲線樣品及 3 種濃度之品質控制樣品之 6 個重複樣品。將血漿樣品 (50 μ L) 添加至 150 μ L 溶劑中且進行離心。藉由 LC/MSMS，使用 Perkin Elmer 系列 200 微型泵及 PE Sciex API4000 電噴霧質譜儀分析上清液。在 10000、5000、1000、500、250、100、

50 及 25 ng/mL 之濃度下製備標準曲線。製備濃度為 5000、500 及 50 ng/mL 之品質控制樣品。由獨立製備之儲備溶液製備標準曲線及品質控制樣品。至少 5/8 之標準物必須具有 $\pm 15\%$ 內之精確度，只是在 LLOQ 下可接受 $\pm 20\%$ 。三分之二的批次 QC 必須具有標稱 $\pm 15\%$ 內之精確度，且至少一次 QC 必須在各含量下通過以便接受操作。

使用藥物動力學程式 WinNonlin v4.1 對化合物 A 之個別血漿濃度相對於時間之資料進行非隔室分析。對於藥物動力學分析，指定低於定量限（25 ng/mL）之血漿濃度為零值。所有計算中均使用標稱給藥濃度。

表 8

處理組	測試化合物	動物 (N)	劑量 (mg/kg，自由鹼)	給藥溶液濃度 (mg/mL)	給藥體積 (mL/kg)	媒劑	取樣時間點
1	化合物 A	3	5	1.25	4	Tris 緩衝鹽水，pH 7.4	給藥前、給藥後 2 分鐘、5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時及 8 小時

結果展示於以下表 9 中。

表 9

PK 參數	化合物 A (5 mg/kg, 靜脈內快速注射)
$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	89.2
$T_{1/2}$ (小時)	3
V_D (mL/kg)	110
C_L (mL/hr/kg)	28

大鼠血漿中化合物 A 之血漿半衰期明顯很長且清除率值很低。

實施例 16：調配物

於 25°C 下研究化合物 A 在各種賦形劑中之飽和溶解度且結果報導於表 10 中（呈自由鹼之化合物 A 之飽和溶解度）。

表 10

賦形劑	功能類別	於 25°C 下化合物 A (自由鹼) 飽和溶解度 (mg/mL)
純水	對照組	65
丙二醇	共溶劑	90
PEG 400		18.5
甘油		53
DMA		0.60
乙醇		1.13
苯甲醇		1.83
檸檬酸/檸檬酸鈉 (pH 3)	緩衝液	65.5
檸檬酸/檸檬酸鈉 (pH 5)		11.2
參(羥甲基)胺基甲烷 HCl (pH 7.0)		61.4
0.9% 鹽水	稀釋劑	N/A
1.2% 鹽水		N/A

N/A：因為調配物形成黏性黃色凝膠，所以不可獲得

初步研究指示苯甲醇、乙醇及 DMA 為化合物 A 之不良媒劑，飽和溶解度值分別為 1.83、1.13 及 0.60 mg/mL。另一方面，在丙二醇、純水及甘油中達到 90 mg/mL、65 mg/mL 及 53 mg/mL 之良好飽和溶解度且因此作進一步研究。於 pH 3 及 7.4 下達到良好溶解度值，值分別為 65.5 及 61.4 mg/mL。然而，於 pH 5 下溶解度似乎下降，值為 12.1 mg/mL。因為調配物形成黏性黃色凝膠，所以無法偵測出化合物 A 在 0.9% 及 1.2% 氯化鈉溶液中之飽和溶解度。

於 25°C 下研究化合物 A 在各種多組份系統中之飽和溶解度且結果報導於表 11 中（呈自由鹼之化合物 A 之飽和溶解度）。

表 11

賦形劑	稀釋劑	於 25°C 下化合物 A（自由鹼） 飽和溶解度（mg/mL）
20% w/v 丙二醇	鹽水	N/A
30% w/v 丙二醇	鹽水	N/A
40% w/v 丙二醇	鹽水	N/A
50% w/v 丙二醇	鹽水	N/A
15% w/v 丙二醇	純水	64.9
30% w/v 丙二醇	純水	59.1*
50% w/v 丙二醇	純水	74.7
30% w/v 丙二醇及 5 w/v 乙醇	純水	43.9
15% w/v 甘油	純水	63.5
30% w/v 甘油	純水	63.1
50% w/v 甘油	純水	56.8
20% w/v Kleptose	純水	79.7
40% w/v Kleptose	純水	102.0
25% w/v Captisol	純水	64.3

N/A：因為調配物形成黏性黃色凝膠，所以不可獲得

*：調配物在離心期間膠凝，但在靜置後液化。

展現合適之結果的調配物包括 50% w/v 丙二醇及 15% w/v 甘油之純水溶液，其於 25°C 下飽和溶解度值分別為 74.7 mg/mL 及 63.5 mg/mL。亦由各種錯合劑獲得良好飽和溶解度，20% w/v Kleptose、40% w/v Kleptose 及 25% w/v Captisol 之值分別為 79.7、102.0 及 64.3 mg/mL。結果亦指示將化合物 A 添加至 20-50% w/v 丙二醇之鹽水溶液中導致形成黏性黃色凝膠且因此不能藉由 UV 來分析。然而膠凝現象具有濃度依賴性且在調配物中當調配物中之化合物 A 濃度接近藥物之飽和溶解度值時觀察到該膠凝現象。另外，膠凝過程可容易地藉由添加少量賦形劑調配物或數滴乙醇來逆轉。將 5% w/v 乙醇添加至調配物中不會抑制膠凝現象，但其仍可容易地逆轉且能夠藉由 UV 分光光度測定法來分析。

在評估初步賦形劑篩選資料後，選擇三種合適之調配物用於進一步調配開發。此等調配物為 20% w/v Kleptose 溶液、20% w/v 丙二醇之純水溶液及 15% w/v 甘油之純水溶液。

在 I 期臨床試驗中選擇 50 mg/mL 化合物 A 於 20% w/v Kleptose 中之調配物。另外，化合物於水、Kleptose 或甘露糖醇中之溶液可分成等分試樣且凍乾成固體。該固體可在使用之前用水複配。

根據以上描述，除本文所述修改外對本發明之各種修改對熟習此項技術者應為顯而易見。該等修改亦意欲屬於

隨附申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖 1A 及圖 1B 展示關於化合物 A 對金黃色葡萄球菌 ATCC 27660 之時間-殺死研究結果（圖 1B 為圖 1A 之展開圖）。

圖 2 展示金黃色葡萄球菌之繼代與諾氟沙星之相關性，其中 MSSA 及 MRSA 兩者到第 3 代（4 次二倍稀釋）時之 MIC 值皆顯著升高。

圖 3 展示在小鼠大腿負荷模型中化合物 A 對金黃色葡萄球菌之功效。

圖 4 展示在大鼠大腿負荷模型中化合物 A 相對於萬古黴素對金黃色葡萄球菌之功效。

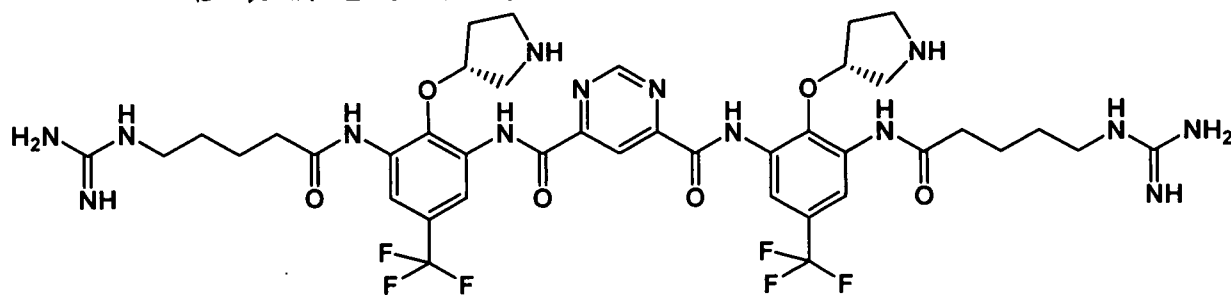
圖 5 展示在小鼠敗血症模型中化合物 A 對金黃色葡萄球菌之功效。

【主要元件符號說明】

無

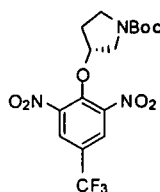
七、申請專利範圍：

1. 一種製備包含下式化合物之調配物的方法，



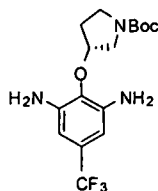
其包含：

a) 使 (R)-(-)-N-Boc-3-吡咯啉醇 (pyrrolidinol) 與強鹼反應以形成混合物，並進一步使該混合物與 2-氯-5-(三氟甲基)-1,3-二硝基苯反應以形成具有式 II 之化合物



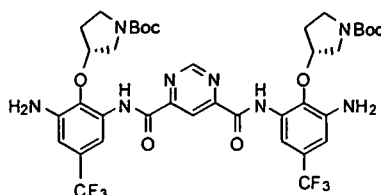
II；

b) 使式 II 化合物與醇及過渡金屬催化劑在氫氣存在下反應以形成式 III 化合物



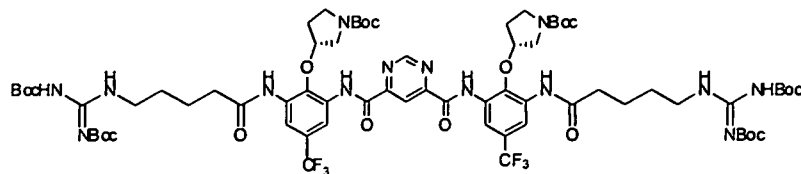
III；

c) 將式 III 化合物及嘧啶-4,6-二甲酸添加至 2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嘧啶與 N-甲基咪啉之混合物中，以形成式 IV 化合物



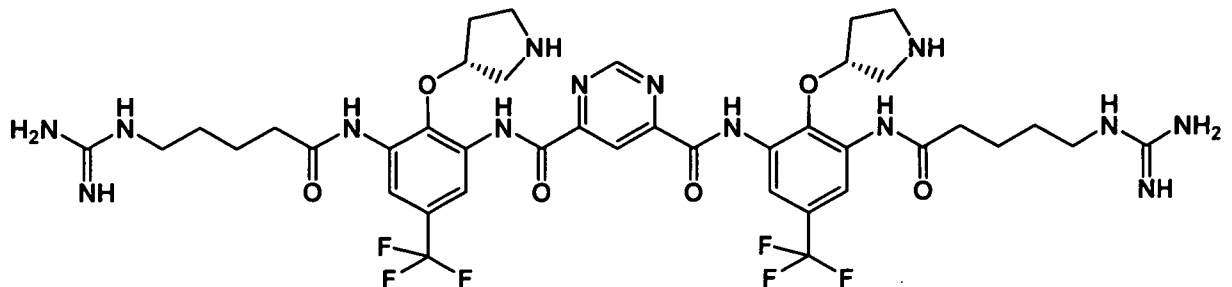
IV ;

d) 使式 IV 化合物與 N-Boc-胍丁酸反應以形成式 V 化合物



V ; 及

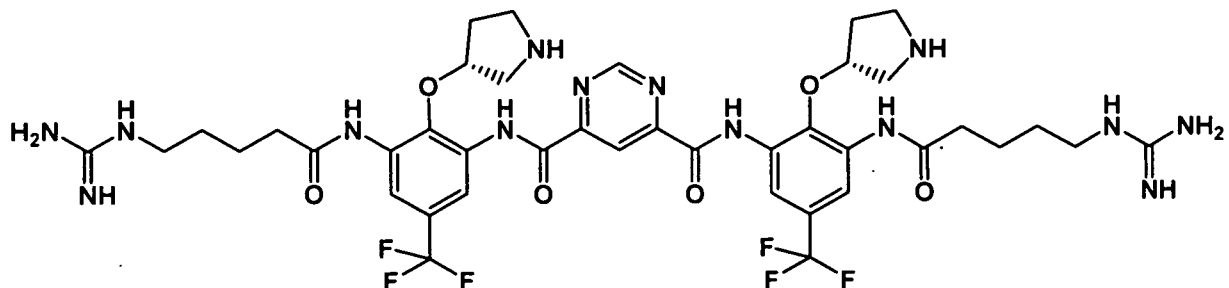
e) 脫除式 V 化合物之保護基以產生下式化合物



並

f) 將該化合物調配於在純水中的 20% w/v Kleptose(β-環糊精)、40% w/v Kleptose(β-環糊精)或 25% w/v Captisol(β-環糊精)中。

2. 一種製備包含下式化合物之調配物的方法，



其包含：

a) 使(R)-3-羥基吡咯啉-1-甲酸第三丁酯去質子化，且使所得化合物與 2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯反應以形成(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三

丁酯；

b) 在醇、過渡金屬催化劑、及氫氣存在下還原 (R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，以形成 (R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

c) 使 (R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯與嘧啶-4,6-二甲酸在 1-[(3-(二甲基胺基)-丙基)]-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽存在下偶合，以形成嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}；

d) 使嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}與({[(第三丁氧基羰基)胺基][(第三丁氧基羰基)亞胺基]甲基}胺基)戊酸在氧氯化磷存在下反應以形成嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-(5-({[(第三丁氧基羰基)胺基][(第三丁氧基羰基)亞胺基]甲基}胺基)-戊醯基胺基)-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]-醯胺}；

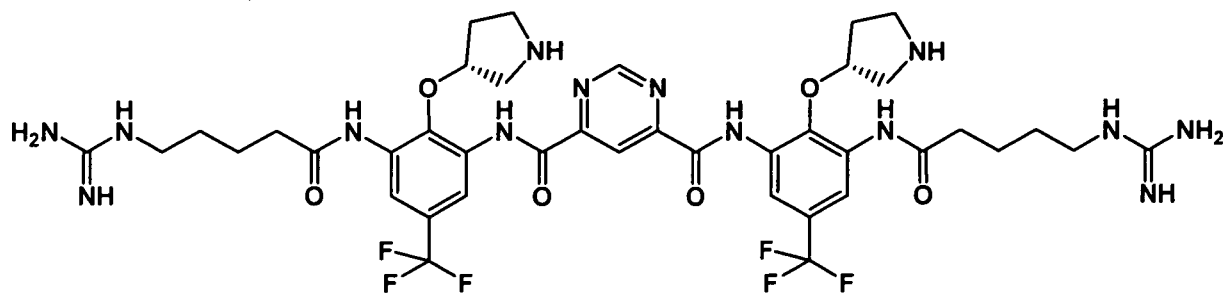
e) 脫除嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-(5-({[(第三丁氧基羰基)胺基][(第三丁氧基羰基)亞胺基]甲基}胺基)-戊醯基胺基)-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]-醯胺}之保護基，以形成粗嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-(5-胍基-戊醯基胺基)-2-((R)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]-醯胺}四鹽酸鹽；及

f) 藉由逆相層析法來純化粗嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-(5-

胍基-戊醯基胺基)-2-((R)-吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]-醯胺}四鹽酸鹽，並

g) 將該化合物調配於在純水中的 20% w/v Kleptose(β-環糊精)、40% w/v Kleptose(β-環糊精)或 25% w/v Captisol(β-環糊精)中。

3.一種製備包含下式化合物之調配物的方法，



其包含：

a) 使(R)-3-羥基吡咯啉-1-甲酸第三丁酯去質子化且進一步使所得化合物與 2-氯-1,3-二硝基-5-三氟甲基苯反應以形成(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

b) 在醇、過渡金屬催化劑、及氫氣存在下還原(R)-3-(2,6-二硝基-4-三氟甲基苯氧基)吡咯啉-1-甲酸第三丁酯，以形成(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯；

c) 使(R)-3-(2,6-二胺基-4-三氟甲基苯氧基)-吡咯啉-1-甲酸第三丁酯與嘧啶-4,6-二甲酸在 1-[(3-(二甲基胺基)-丙基)]-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽存在下偶合，以形成嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}；

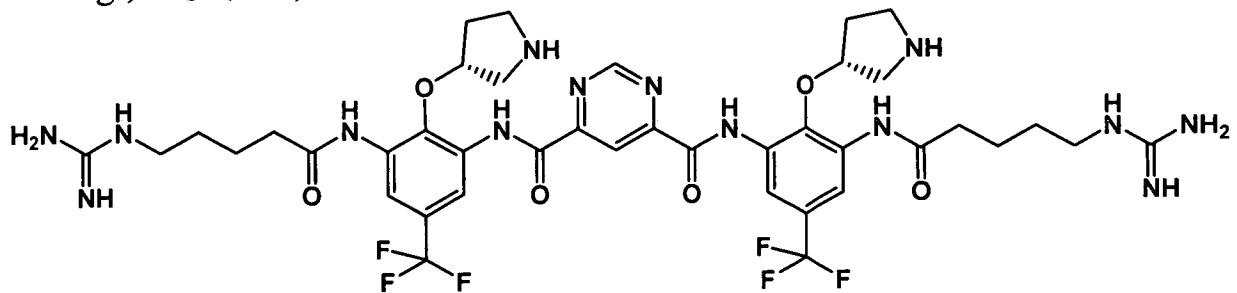
d) 使嘧啶-4,6-二甲酸雙-{[3-胺基-2-((R)-1-(第三丁氧

基羰基)吡咯啉-3-基氧基)-5-三氟甲基-苯基]醯胺}與 N-Cbz 酸在亞硫醯氯存在下反應；

e) 在醇、過渡金屬催化劑、及氫氣存在下還原 d) 之所得化合物；

f) 使 e) 之所得化合物與二-Boc 吡啶反應；

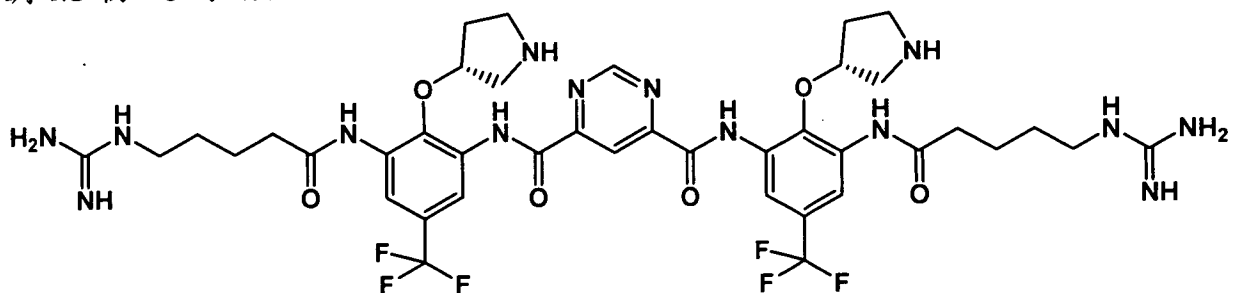
g) 脫除 f) 之所得化合物之保護基，產生下式化合物，



並

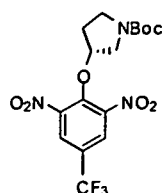
h) 將該化合物調配於在純水中的 20% w/v Kleptose(β-環糊精)、40% w/v Kleptose(β-環糊精)或 25% w/v Captisol 中。

4. 一種製備包含下式化合物的醫藥學上可接受之鹽的調配物之方法，



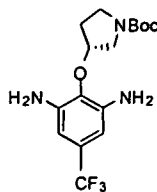
其包含：

a) 使(R)-(-)-N-Boc-3-吡咯啉醇與強鹼反應以形成混合物；進一步使該混合物與 2-氯-5-(三氟甲基)-1,3-二硝基苯反應以形成具有式 II 之化合物



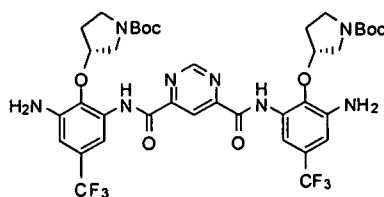
II ;

b) 使式 II 化合物與醇及過渡金屬催化劑在氫氣存在下反應以形成式 III 化合物



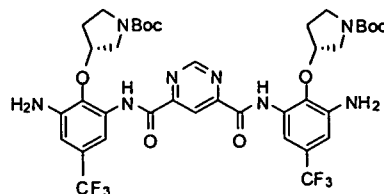
III ;

c1) 將式 III 化合物及嘧啶-4,6-二甲酸添加至 2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡與 N-甲基咪啉之混合物中，以形成式 IV 化合物



IV ; 或

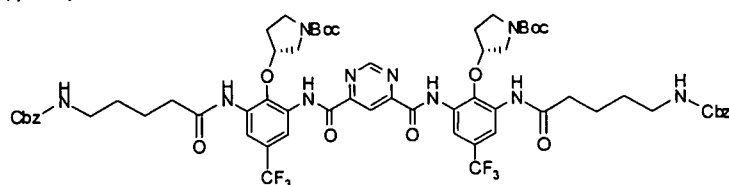
c2) 將式 III 化合物及嘧啶-4,6-二甲酸添加至 1-乙基-3-[3-(二甲基氨基)丙基]-碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDCI) 與無水吡啶之混合物中，以形成式 IV 化合物



IV ;

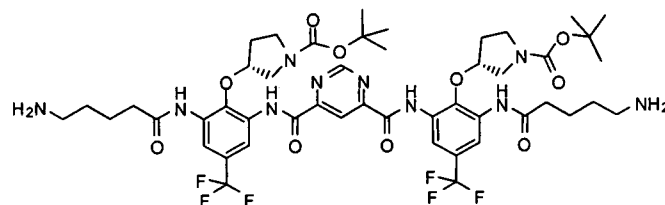
d) 將式 IV 化合物及 N-Cbz 酸添加至包含無水吡啶、二甲基氨基丙胺及亞硫醯氯、 POCl_3 、 $(\text{EtO})_2\text{POCl}$ 、或乙二

鹼氣之任一者的溶液中，以形成式 Va 化合物



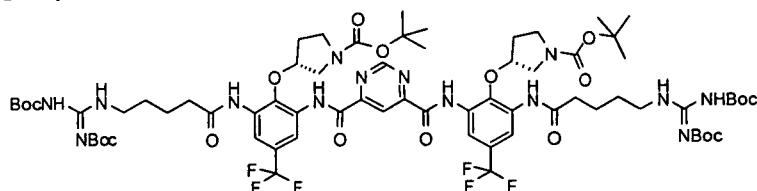
Va ;

e) 加氫分解 (hydrogenolysis) 式 Va 化合物之 Cbz 基團，
產生式 VI 化合物



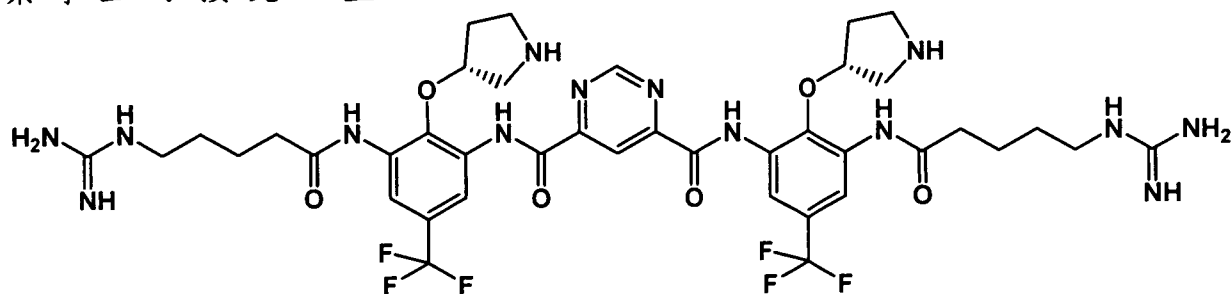
VI ;

f) 保護式 VI 化合物，產生式 VII 化合物



VII ; 及

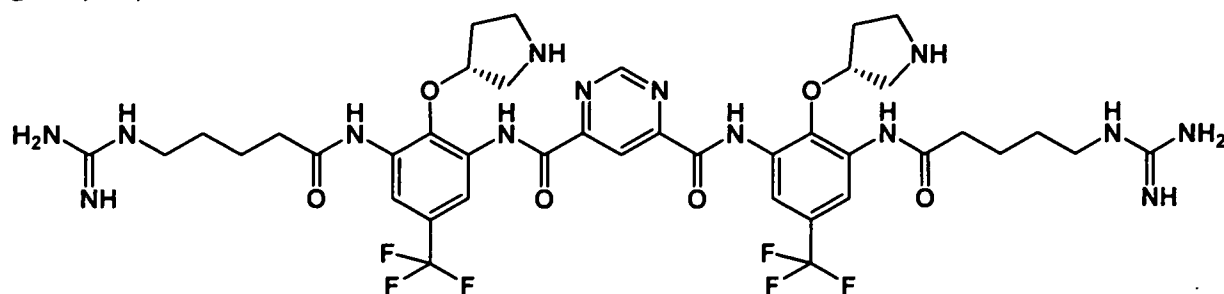
g) 脫除式 VII 化合物之保護基，產生下式化合物的醫
藥學上可接受之鹽，



並

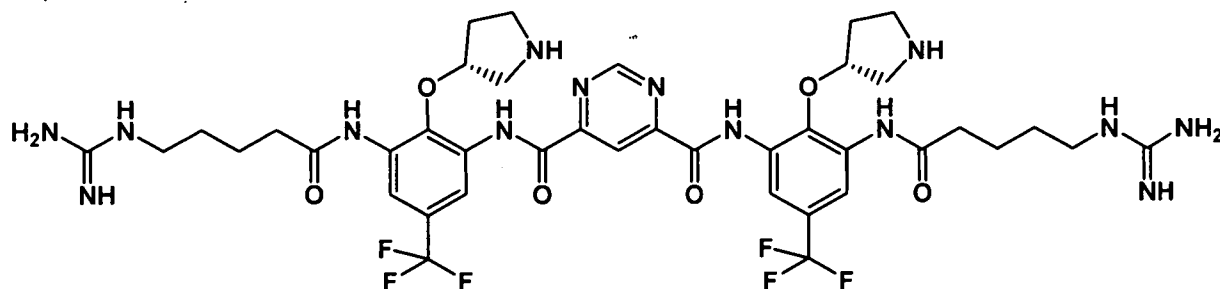
h) 將化合物調配於在純水中的 20% w/v Kleptose (β-環糊精)、40% w/v Kleptose (β-環糊精) 或 25% w/v Captisol 中。

5. 一種包含具有下式之化合物或其醫藥學上可接受之鹽的調配物，



其中該調配物包含 20% w/v 純水中的 Kleptose (β-環糊精)、40% w/v 純水中的 Kleptose (β-環糊精) 或 25% w/v 純水中的 Captisol (β-環糊精)。

6. 如申請專利範圍第 5 項之調配物，其在 20% w/v 純水中的 Kleptose (β-環糊精) 中包含具有下式之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，



7. 一種消毒性地清潔表面以抑制微生物生長的方法，其包含將該微生物與如申請專利範圍第 5 或 6 項之調配物試管內接觸。

8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該微生物為革蘭氏陰性需氧菌、革蘭氏陽性需氧菌、革蘭氏陰性厭氧菌、革蘭氏陽性厭氧菌或酵母。

9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該革蘭氏陰性需氧菌為大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、弗氏檸檬酸桿菌

(*Citrobacter freundii*)、差異檸檬酸桿菌 (*Citrobacter diverus*)、柯氏檸檬酸桿菌 (*Citrobacter koseri*)、陰溝腸桿菌 (*Enterobacter cloacae*)、糞腸桿菌 (*Enterobacter faecalis*)、肺炎克氏桿菌 (*Klebsiella pneumonia*)、產酸克氏桿菌 (*Klebsiella oxytoca*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、斯氏普羅威登斯菌 (*Providencia stuartii*)、普通變形桿菌 (*Proteus vulgaris*)、奇異變形桿菌 (*Proteus mirabilis*)、黏質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、溶血不動桿菌 (*Acinetobacter haemolyticus*)、瓊氏不動桿菌 (*Acinetobacter junii*)、魯氏不動桿菌 (*Acinetobacter lwoffii*)、流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*)、嗜麥芽窄食單胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、或綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。

10.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該革蘭氏陽性需氧菌為糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)、屎腸球菌 (*Enterococcus faecium*)、結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎葡萄球菌 (*Staphylococcus pneumoniae*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、科氏葡萄球菌 (*Staphylococcus colmii*)、松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*)、沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*)、無乳鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、化膿性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、咽峽炎鏈球菌 (*Streptococcus*

anginosus)、緩症鏈球菌 (*Streptococcus mitis*)、或口腔鏈球菌 (*Streptococcus oralis*)。

11.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該革蘭氏陰性厭氧菌為脆弱擬桿菌 (*Bacteroides fragilis*)。

12.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該革蘭氏陽性厭氧菌為難養芽胞梭菌 (*Clostridium difficile*) 或產氣莢膜芽胞梭菌 (*Clostridium perfringens*)。

13.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該酵母為白色念珠菌 (*Candida albicans*) 或克柔念珠菌 (*Candida krusei*)。

14.一種如申請專利範圍第 5 或 6 項之調配物之用途，其係用於製備用於治療微生物感染的醫藥品。

15.如申請專利範圍第 14 項之用途，其中該微生物為革蘭氏陰性需氧菌、革蘭氏陽性需氧菌、革蘭氏陰性厭氧菌、革蘭氏陽性厭氧菌、或酵母。

16.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該革蘭氏陰性需氧菌為大腸桿菌、弗氏檸檬酸桿菌、差異檸檬酸桿菌、柯氏檸檬酸桿菌、陰溝腸桿菌、糞腸桿菌、肺炎克氏桿菌、產酸克氏桿菌、摩氏摩根菌、斯氏普羅威登斯菌、普通變形桿菌、奇異變形桿菌、黏質沙雷氏菌、溶血不動桿菌、瓊氏不動桿菌、魯氏不動桿菌、流感嗜血桿菌、嗜麥芽窄食單胞菌、或綠膿桿菌。

17.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該革蘭氏陽性需氧菌為糞腸球菌、屎腸球菌、結核分枝桿菌、金黃色葡

萄球菌、肺炎葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、科氏葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、無乳鏈球菌、化膿性鏈球菌、咽峽炎鏈球菌、緩症鏈球菌、或口腔鏈球菌。

18.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該革蘭氏陰性厭氧菌為脆弱擬桿菌。

19.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該革蘭氏陽性厭氧菌為難養芽胞梭菌或產氣莢膜芽胞梭菌。

20.如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該酵母為白色念珠菌或克柔念珠菌。

八、圖式：

(如次頁)

公告本

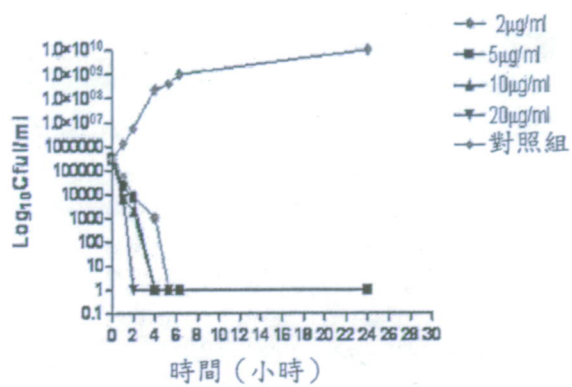


圖1A

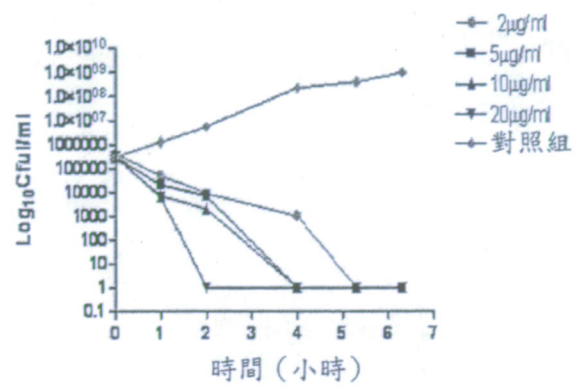


圖1B

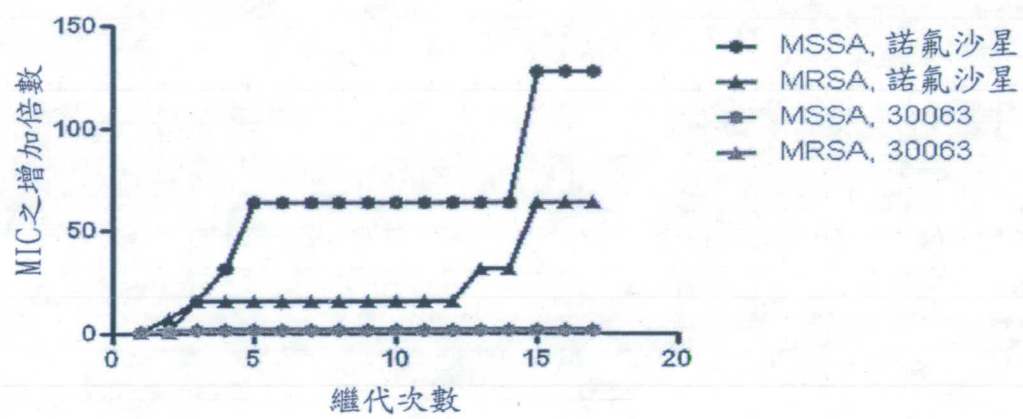


圖2

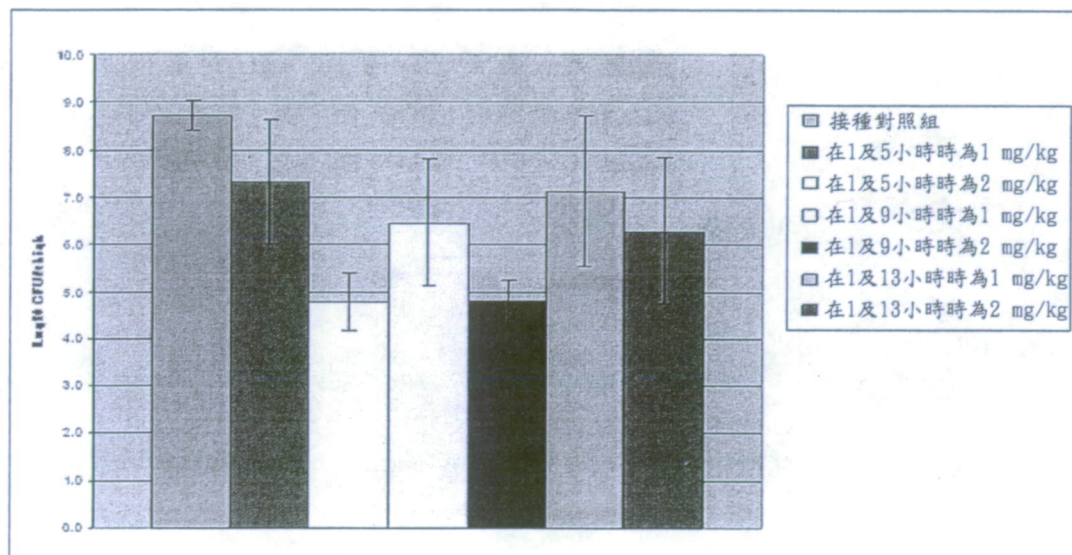


圖3

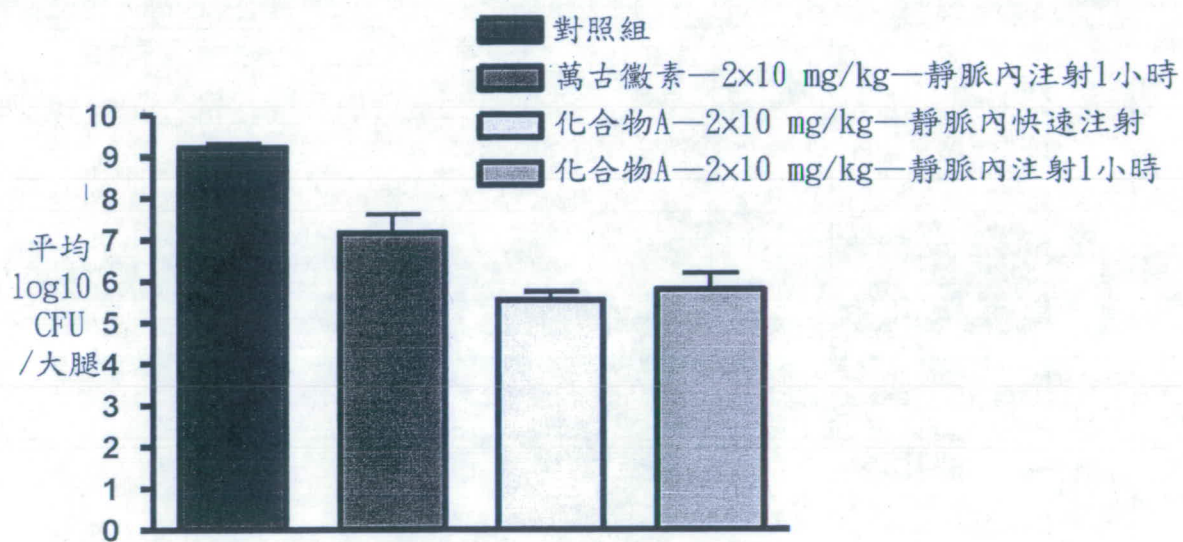


圖4

PMX30063對金黃色葡萄球菌之存活功效

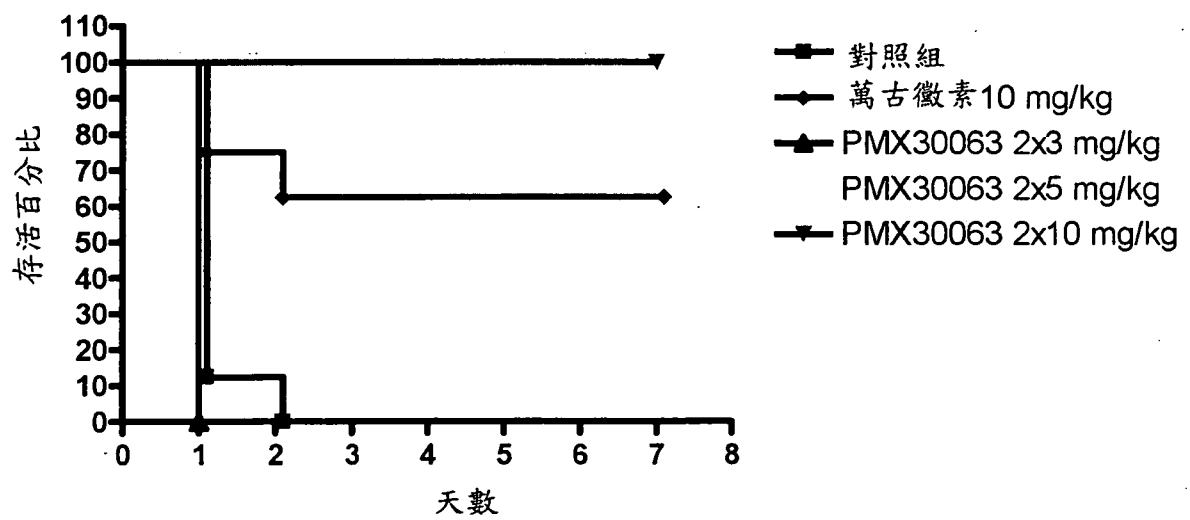


圖5