



(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 I657818 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：104117219

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 28 日

(51)Int. Cl. : A61K31/496 (2006.01)

A61K31/41 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

(30)優先權：2014/05/29 美國

62/004,246

(71)申請人：英商安特西醫療有限公司 (英國) ENTASIS THERAPEUTICS LIMITED (GB)
英國

(72)發明人：修班德 麥可 HUBAND, MICHAEL (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2010/043893A1

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：0 共 38 頁

(54)名稱

用於治療細菌感染的方法

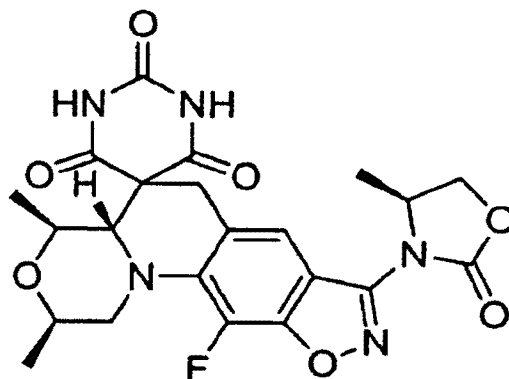
METHODS FOR TREATING BACTERIAL INFECTIONS

(57)摘要

本發明揭示利用(2R,4S,4aS)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4S)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4a-四氫-2'H,6H-螺[1,4-噁嗪并[4,3-a][1,2]噁唑并[4,5-g]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'H,3'H)-三酮或其醫藥上可接受之鹽於治療各種細菌感染之方法。

Disclosed are methods for treating various bacterial infections with (2R,4S,4aS)-11-fluoro-2,4-dimethyl-8-[(4S)-4-methyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-1,2,4,4a-tetrahydro-2'H,6H-spiro[1,4-oxazino[4,3-a][1,2]oxazolo[4,5-g]quinoline-5,5'-pyrimidine]-2',4',6'(1'H,3'H)-trione, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

特徵化學式：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於治療細菌感染的方法

METHODS FOR TREATING BACTERIAL INFECTIONS

【先前技術】

抗生素耐受性及抗性亦成為成功治療許多常見細菌感染之重大威脅。的確，根據美國感染病協會(Infectious Disease Society of America)，甲氧西林抗性金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*，MRSA)每年害死的美國人相比於合併之肺氣腫、HIV/AIDS、帕金森氏病(Parkinson's disease)及殺人罪更多。不僅在常見感染性革蘭氏(Gram)陽性及-陰性病原體中具有多重抗藥性，例如屎腸球菌(*Enterococcus faecium*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、克雷伯氏肺炎菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鮑氏不動細菌(*Acinetobacter baumannii*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)及愈來愈多之腸桿菌(*Enterobacter species*)，且亦在中可見抗性之證據沙門桿菌屬(*Salmonella*)及難養芽胞梭菌(*Clostridium difficile*)及漸增之淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*) (Gerard D. Wright, 「Antibiotics: A New Hope,」 19 (2012), 3-10)。由於此抗性增加，新抗細菌藥品之研發係重要之醫學需求。

【發明內容】

業內需要用於治療細菌感染之新療法。提供化合物(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-₅

2',4',6'(1'H,3'H)-三酮或其醫藥上可接受之鹽，其用於治療細菌感染之可能用途。

在一態樣中，提供用於治療需要其之個體中由以下細菌引起之細菌感染之方法：炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*)、蠟狀芽孢桿菌 (*Bacillus cereus*)、伯克氏菌 (*Burkholderia spp.*)、布氏桿菌 (*Brucella spp.*)、弗朗西斯氏菌 (*Francisella spp.*)、耶爾森氏菌 (*Yersina spp.*)、黴漿菌 (*Mycoplasma spp.*)、尿漿菌 (*Ureaplasma spp.*)、沙眼衣原體 (*Chlamydia trachomatis*) 或肺炎衣原體 (*Chlamydia pneumoniae*)，其包含向該個體投與有效量之 (2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽。

在一態樣中，提供 (2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽之用途，其用於治療由一或多種選自由以下組成之細菌引起之細菌感染：炭疽桿菌、蠟狀芽孢桿菌、伯克氏菌、布氏桿菌、弗朗西斯氏菌、耶爾森氏菌、黴漿菌、尿漿菌、沙眼衣原體或肺炎衣原體。

在一態樣中，提供 (2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽之用途，其用於製造用以治療由一或多種選自由以下之細菌引起之細菌感染之藥劑：炭疽桿菌、蠟狀芽孢桿菌、伯克氏菌、布氏桿菌、弗朗西斯氏菌、耶爾森氏菌、黴漿菌、尿漿菌、沙眼衣原體或肺炎衣原體。

在一態樣中，提供醫藥組合物，其包含(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽，其用於治療由一或多種選自以下之細菌引起之細菌感染：炭疽桿菌、蠟狀芽孢桿菌、伯克氏菌、布氏桿菌、弗朗西斯氏菌、耶爾森氏菌、黴漿菌、尿漿菌、沙眼衣原體或肺炎衣原體。

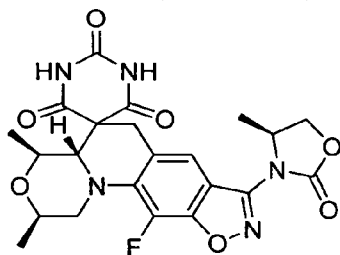
【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

提供治療由一或多種選自以下之細菌引起之細菌感染之方法：炭疽桿菌、蠟狀芽孢桿菌、伯克氏菌、布氏桿菌、弗朗西斯氏菌、耶爾森氏菌、黴漿菌、尿漿菌、沙眼衣原體或肺炎衣原體，其藉由向需要其之個體投與有效量之(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽來達成。

化合物(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮具有以下結構：



上文所提及之化合物及其合成方法係揭示於國際申請案第 PCT/GB2014/050164 號中，其明確地全文併入本文中。

5

用語「細菌感染」包括由一或多種革蘭氏陰性、革蘭氏陽性或非典型細菌之物種引起之感染。

在一些實施例中，細菌感染係由引起炭疽桿菌或蠟狀芽孢桿菌。

在一些實施例中，細菌感染係由伯克氏菌引起，例如鼻疽伯克氏菌 (*Burkholderia mallei*)、類鼻疽伯克氏菌 (*Burkholderia pseudomallei*)及洋蔥伯克氏菌 (*Burkholderia cepacia*)。

在一些實施例中，細菌感染係由布氏桿菌引起，例如，馬爾他布氏桿菌 (*Brucella melitensis*)、流產布氏桿菌 (*Brucella abortus*)、犬布氏桿菌 (*Brucella canis*)、豬布氏桿菌 (*Brucella suis*)及綿羊布氏桿菌 (*Brucella ovis*)。

在一些實施例中，細菌感染係由弗朗西斯氏菌引起，例如，土倫病菌 (*Francisella tularensis*)、新兇手弗朗西斯氏菌 (*Francisella novicida*)及蜃樓弗朗西斯氏菌 (*Francisella philomiragia*)。

在一些實施例中，細菌感染係由耶爾森氏菌引起，例如，鼠疫耶爾森氏菌 (*Yersinia pestis*)及小腸大腸炎耶爾森氏桿菌 (*Yersinia enterocolitica*)。

在一些實施例中，細菌感染係由黴漿菌引起，例如雞敗血性黴漿菌 (*Mycoplasma gallisepticum*)、生殖器黴漿菌 (*Mycoplasma genitalium*)、貓血液黴漿菌 (*Mycoplasma haemofelis*)、人型黴漿菌 (*Mycoplasma hominis*)、豬肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、綿羊肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma ovipneumoniae*)及人肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma pneumoniae*)。

在一些實施例中，細菌感染係由尿漿菌引起，例如，細小尿漿菌 (*Ureaplasma parvum*)及溶尿尿漿菌 (*Ureaplasma urealyticum*)。

在一些實施例中，細菌感染係由沙眼衣原體或肺炎衣原體引

起。

在一些實施例中，細菌對一或多種除(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮以外之抗細菌劑具有抗性。用語「抗性」及「抗細菌抗性」係指能夠倖免於一或多種抗細菌劑之暴露之細菌。在一個實施例中，細菌對如下抗生素中之一或多者具有抗性：胺基糖苷抗生素(例如，阿米卡星(amikacin)、慶大黴素(gentamicin)、康黴素(kanamycin)、新黴素(neomycin)、奈替米星(netilmicin)、妥布黴素(tobramycin)、巴龍黴素(paromomycin)、觀黴素(spectinomycin))、安沙黴素(ansamycin)抗生素(例如，利福昔明(rifaximin)、鏈黴素)、碳青黴烯(carbapenem)抗生素(例如，厄它培南(ertapenem)、多尼培南(doripenem)、亞胺培南(imipenem)/西司他丁(cilastatin)、美羅培南(meropenem))、頭孢菌素抗生素(例如，頭孢羥胺苄(cefadroxil)、頭孢唑林(cefazolin)、頭孢妥林(cefatolin)、頭孢胺苄(cefalexin)、頭孢克洛(cefaclor)、頭孢孟多(cefamandole)、頭孢西丁(cefoxitin)、頭孢丙烯(cefprozil)、頭孢呋辛(cefuroxime)、頭孢克肟(cefixime)、頭孢地尼(cefdinir)、頭孢妥侖(cefditoren)、頭孢哌酮(cefoperazone)、頭孢噻肟(cefotaxime)、頭孢泊肟(cefpodoxime)、頭孢他啶(ceftazidime)、頭孢布烯(ceftibuten)、頭孢唑肟(ceftizoxime)、頭孢曲松(ceftriaxone)、頭孢吡肟(cefepime)、頭孢洛林酯(ceftarolin fosamil)、頭孢吡普(ceftobiprole))、糖肽抗生素(例如，替考拉寧(teicoplanin)、萬古黴素(vancomycin)、特拉萬星(telavancin))、林可醯胺類(lincosamide)抗生素(例如，克林黴素(clindamycin)、林可黴素(lincomycin))、達托黴素(daptomycin)、巨環內酯抗生素(例如，疊氮紅黴素(azithromycin)、克拉黴素(clarithromycin)、地紅黴素(dirithromycin)、紅黴素^S

(erythromycin)、羅紅黴素(roxithromycin)、醋竹桃黴素(troleandomycin)、泰利黴素(telithromycin)、螺旋黴素(spiramycin)、胺曲南(aztreonam)、富來頓(furazolidone)、硝基呋喃妥因(nitrofurantoin)、噁唑啉酮抗生素(例如,雷奈佐利(linezolid)、潑斯唑來(posizolid)、雷得唑來(radezolid)、特地佐利(torezolid))、青黴素抗生素(例如,阿莫西林(amoxicillin)、胺苄青黴素(ampicillin)、阿洛西林(azlocillin)、卡本西林(carbenicillin)、氯唑西林(cloxacillin)、雙氯唑西林(dicloxacillin)、氟氯西林(flucloxacillin)、美洛西林(mezlocillin)、甲氧西林(methicillin)、萘夫西林(nafcillin)、苯唑西林(oxacillin)、青黴素、哌拉西林(piperacillin)、替莫西林(temocillin)、替卡西林(ticarcillin)、阿莫西林/克拉維酸鹽(clavulante)、胺苄青黴素/舒巴克坦(sulbactam)、哌拉西林/他唑巴坦(tazobactam)、替卡西林/克拉維酸鹽、喹啉酮抗細菌(例如,環丙沙星(ciprofloxacin)、依諾沙星(enoxacin)、加替沙星(gatifloxacin)、吉米沙星(gemifloxacin)、左氧氟沙星(levofloxacin)、洛美沙星(lomefloxacin)、莫西沙星(moxifloxacin)、喹啉酮酸(nalidixic acid)、諾氟沙辛(norfloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、曲伐沙星(trovafloxin)、格帕沙星(grepafloxacin)、司帕沙星(sparfloxacin)、替馬沙星(temafloxacin))、磺醯胺抗生素(例如,磺胺米隆(mafenide)、磺胺醋醯(sulfacetamide)、磺胺嘧啶(sulfadiazine)、磺胺嘧啶銀(silver sulfadiazine)、磺胺二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine)、磺胺甲二唑(sulfamethizole)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)、苯磺胺(sulfanilimide)、磺胺塞拉金(sulfasalazine)、磺胺異噁唑(sulfisoxazole)、甲氧苄啶(trimethoprim)/磺胺甲噁唑-TMP-SMX)及四環素抗生素(例如,地美環素(demeclocycline)、多西環素(doxycycline)、米諾環素(minocycline)、土黴素(oxytetracycline)、四

環素(tetracycline)、老虎黴素(tigecycline)。在一些實施例中，細菌對多西環素具有抗性。在一些實施例中，細菌對左氧氟沙星及/或環丙沙星具有抗性。在一些實施例中，細菌對疊氮紅黴素具有抗性。在一些實施例中，細菌對四環素具有抗性。

在一些實施例中，提供治療患有性傳播之細菌感染之個體之方法，其包含向個體投與有效量之(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽。

在一些實施例中，提供(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽，其用於治療由一或多種選自以下之細菌引起之細菌感染：炭疽桿菌、蠟狀芽孢桿菌、伯克氏菌、布氏桿菌、弗朗西斯氏菌、耶爾森氏菌、黴漿菌、尿漿菌、沙眼衣原體或肺炎衣原體。

在一態樣中，提供一種為有此需要之個體治療炭疽感染、馬鼻疽、類鼻疽、患有囊性纖維化之個體之肺部感染、布氏桿菌病(brucellosis)、兔熱病、鼠疫、敗血症、耶爾森氏鼠疫桿菌腸道病、骨盆腔發炎性疾病、非典型肺炎、非特異性尿道炎、肺炎、支氣管肺發育不良或腦膜炎之方法，其包含向該個體投與有效量之(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽。

用語「治療(treat、treating及treatment)」包括降低或抑制個體中與細菌感染相關之酶或蛋白質活性，改善個體中細菌感染之一或多種症狀，或減緩或延遲個體中細菌感染之進展。用語「治療(treat、S

treating及treatment)」亦包括降低或抑制個體中細菌之細菌生長、複製或降低或抑制細菌載量。

術語「個體」包括(例如)靈長類動物、牛、馬、豬、綿羊、狗、貓、兔、大鼠、鳥(包括野生鳥及家禽，例如火雞、鵝、雞、鴨及諸如此類)及小鼠。在一些實施例中，個體係靈長類動物，例如人類。在一些實施例中，個體患有革蘭氏陽性細菌感染。在一些實施例中，個體患有革蘭氏陰性細菌感染。在一些實施例中，個體患有非典型細菌感染。在一些實施例中，個體需要治療(例如，個體將在生物學上或在醫學上自治療受益)。在一些實施例中，個體患有使對細菌感染(例如囊性纖維化)之治療之反應複雜化之原有重大疾病狀態。在一些實施例中，個體患有一或多種細菌感染(例如，受到兩種或更多種細菌感染之共同感染)。在一些實施例中，個體患有由淋病奈瑟球菌引起之感染。在一些實施例中，個體係經沙眼衣原體及淋病奈瑟球菌共同感染。在一些實施例中，個體處於感染性傳播之細菌感染(例如，沙眼衣原體或淋病奈瑟球菌感染)之風險。

用語「有效量」包括(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-噻啉]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽可引發個體之生物或醫學反應(例如降低或抑制與細菌DNA回旋酶或細菌感染相關之酶或蛋白質活性、改善細菌感染之症狀、或減緩或延遲細菌感染之進展)之量。在一些實施例中，用語「有效量」包括(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-噻啉]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽之量，當向個體投與該量時可在個體中有效地至少部分緩和、抑制及/或改善細菌感染、或抑制細菌DNA回旋酶、及/或降低或抑制細

菌之生長、複製或細菌載量。

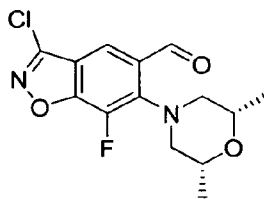
例證

實例 1. (2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮(化合物1)之合成

如下文所述合成化合物 1：

中間體 1

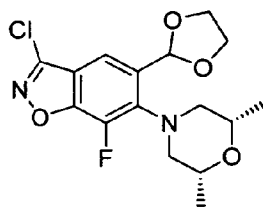
3-氯-6-[(2*R*,6*S*)-2,6-二甲基嗎啉-4-基]-7-氟-1,2-苯并噁唑-5-甲醛



向經冰冷卻之溶液中3-氯-6,7-二氟-1,2-苯并噁唑-5-甲醛(根據國際申請公開案第WO 2010/043893號中所述之程序來製備，5.0 g，23.0 mmol)存於無水乙腈(50 ml)中添加二異丙基乙胺(5.9 g，45.9 mmol)，接著添加順式-2,6-二甲基嗎啉(2.6 g，23.0 mmol)，並在85°C下在密封管中將該混合物加熱12小時。使該溶液冷卻至室溫並在真空下移除揮發物。將殘餘物溶解於乙酸乙酯中，用水、接著鹽水洗滌且然後經無水Na₂SO₄乾燥。在真空下移除溶劑提供粗產物，經矽膠管柱使用存於石油醚中之乙酸乙酯之梯度對其進行純化，從而得到呈固體之標題化合物。產量：6.0 g (84%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.0 (d, 6H), 2.9 (t, 2H), 3.1 (d, 2H), 3.8 (m, 2H), 7.7 (s, 1H), 10.2 (s, 1H)。對於C₁₄H₁₄ClFN₂O₃而言MS (ES) MH⁺：313。

中間體 2

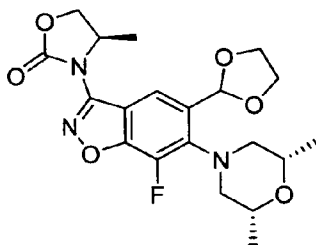
3-氯-6-[(2*R*,6*S*)-2,6-二甲基嗎啉-4-基]-5-(1,3-二氧戊環-2-基)-7-氟-1,2-苯并噁唑



在回流下在Dean-Stark裝置中將中間體1 (16.3 g, 52.2 mmol)、乙二醇(8.1 g, 130.6 mmol)及對甲苯磺酸吡啶鎊(1.31 g, 5.2 mmol)存於甲苯(300 mL)中之溶液加熱16小時。在真空下移除溶劑，並將殘餘物溶解於二乙醚(75 mL)中，用水(3×25 mL)及鹽水溶液(25 mL)洗滌。將有機層經無水Na₂SO₄乾燥並過濾。在真空下移除溶劑提供標題化合物，藉由與熱己烷一起研磨來對其進行進一步純化。產量：18.0 g (80%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.1 (d, 6H), 2.8 (t, 2H), 3.0 (d, 2H), 3.3 (m, 4H), 3.8 (m, 2H), 5.7 (s, 1H), 7.6 (s, 1H)。

中間體3

(4R)-3-{6-[(2R,6S)-2,6-二甲基嗎啉-4-基]-5-(1,3-二氧戊環-2-基)-7-氟-1,2-苯并噁唑-3-基}-4-甲基-1,3-噁唑啉-2-酮

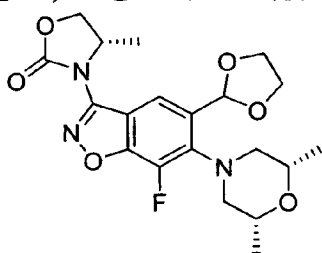


在0°C下經10分鐘之時期向NaH (0.24 g, 9.9 mmol)存於二甲基甲醯胺(10 mL)中之攪拌溶液中緩慢添加(4R)-4-甲基-1,3-噁唑啉-2-酮(根據Nishiyama, T.; Matsui, Shigeki; Yamada, F. *J. Het. Chem.* (1986), 23(5), 1427-9中所述之程序合成) (1.0 g, 9.9 mmol)存於二甲基甲醯胺(10 mL)中之溶液。在室溫下將該混合物攪拌30分鐘，並在相同溫度下添加中間體2 (1.1 g, 3.1 mmol)存於二甲基甲醯胺(5 mL)中之溶液。在80°C下將此混合物加熱12小時，並傾倒至經冰冷卻之水中，並用乙酸乙酯(2×20 mL)萃取。將有機層經無水Na₂SO₄乾燥，並在真空下移

除溶劑。藉由矽膠管柱層析使用存於石油醚中之乙酸乙酯之梯度純化粗產物。產量：0.15 g (12%)。對於 $C_{20}H_{24}FN_3O_6$ 而言MS (ES) MH^+ ：422.4。

中間體4

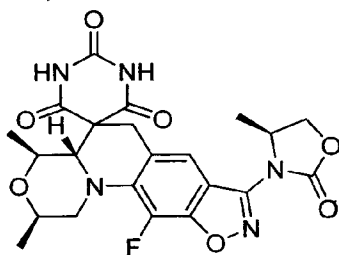
(4*S*)-3-{6-[(2*R*,6*S*)-2,6-二甲基嗎啉-4-基]-5-(1,3-二氧戊環-2-基)-7-氟-1,2-苯并噁唑-3-基}-4-甲基-1,3-噁唑啉-2-酮



中間體4係自中間體2使用(4*S*)-4-甲基-1,3-噁唑啉-2-酮(根據Nishiyama, T.; Matsui, Shigeki; Yamada, F. *J. Het. Chem.* (1986), 23(5), 1427-9中所述之程序合成)以與針對中間體3合成所闡述之方法類似之方法製備。針對 $C_{20}H_{24}FN_3O_6$ 而言MS (ES) MH^+ ：422.4。

化合物1

(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-啞啉]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮

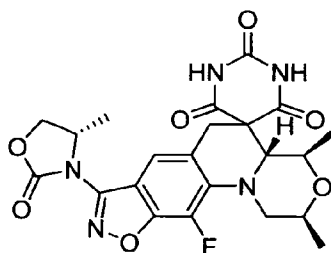


在85°C下將中間體4 (0.36 mmol)及巴比妥酸(0.3 mmol)存於乙酸(1 ml)中之經攪拌混合物加熱16小時。蒸發溶劑，將殘餘物溶解於甲醇(2 ml)中，並添加水(5 ml)。將所沈澱固體過濾並藉由反相HPLC(存於水中之10 mM乙酸銨、 CH_3CN)、溶析兩個組份來純化。第二溶

5

析組份係以固體形式經分離並鑑別為標題化合物。藉由反相HPLC (存於水中之10 mM乙酸銨、CH₃CN)分離標題化合物作為兩個組份之第一溶析。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.9 (d, 3H), 1.15 (d, 3H), 1.4 (d, 3H), 2.9 (d, 1H), 3.1 (t, 1H), 3.5-3.6 (m, 2H), 3.8 (m, 1H), 3.9 (d, 1H), 4.0 (d, 1H), 4.2 (q, 1H), 4.6-4.7 (m, 2H), 7.6 (s, 1H), 11.5 (s, 1H), 11.8 (s, 1H)。針對C₂₂H₂₂FN₅O₇而言MS (ES) MH⁺: 488.4; [α]_D²⁰ = -92 (c = 1; MeOH)。

亦自化合物1合成分離(2*S*,4*R*,4*aR*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮作為來自HPLC純化之第二溶析組份



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0.9 (d, 3H), 1.15 (d, 3H), 1.4 (d, 3H), 2.9 (d, 1H), 3.1 (t, 1H), 3.6-3.7 (m, 2H), 3.8-4.0 (m, 1H), 3.9 (d, 1H), 4.1 (d, 1H), 4.2 (q, 1H), 4.6-4.7 (m, 2H), 7.6 (s, 1H), 11.5 (s, 1H), 11.8 (s, 1H)。對於C₂₂H₂₂FN₅O₇而言MS (ES) MH⁺: 488.4; [α]_D²⁰ = +224 (c = 1; MeOH)。

實例2. 化合物1針對人類黴漿菌之活體外抗細菌活性

化合物1係對若干不同類型之細菌具有活性之DNA回旋酶及拓撲異構酶IV之超螺旋及解環套活性之研究性抑制劑。初步數據表明此藥劑維持針對對諸如氟喹啉酮及四環素等其他藥劑(包括諸如淋病奈瑟球菌等性傳播感染之藥劑)具有抗性之生物體之活性。藉由測試少量之臨床分離物及代表5種為重要人類病原體之柔膜細菌屬之參照菌株

來實施本研究以增加化合物1針對其他人類病原體之活體外活性之知識。所測試之生物體包括人肺炎黴漿菌、人型黴漿菌、生殖器黴漿菌、溶尿尿漿菌及細小尿漿菌。儘管人肺炎黴漿菌主要為引起諸如咽炎、氣管支氣管炎及肺炎等疾病之呼吸道病原體，其餘物種為成年男性及女性中泌尿生殖道之重要病原體且亦可在懷孕期間或在分娩時垂直傳遞時在新生兒中引起全身性疾病。依照臨床實驗室標準協會 (Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI) (CLSI 2011)之指南實施敏感性測試。所測試之菌株包括含有介導四環素抗性之tetM基因之生物體，賦予巨環內酯抗性之23S核糖體RNA突變，及含有賦予對氟喹啉酮之抗性之DNA回旋酶及/或拓撲異構酶IV突變之其他。

方法

抗細菌劑。 該研究中所包括之藥物係總結於表1中。考慮到各自之百分比純度，稱量適當量之各粉末狀藥物以製備10 mL之原液。根據各製造商之說明書溶解抗微生物劑。

表1. 測試化合物及對照/參照化合物

化合物	純度	來源
化合物1	98.9%	
疊氮紅黴素	95.2%	Fluka/Sigma-Aldrich 瑞士
多西環素	100%	Sigma-Aldrich St. Louis, MO
左氧氟沙星	99%	Sigma-Aldrich St. Louis, MO

細菌菌株。 在此研究中使用來源自成人及兒童之各個身體部位且已儲存在 -70 °C 下 UAB 診斷黴漿菌實驗室 (UAB Diagnostic Mycoplasma Laboratory) 之培養物保藏中之具有已知效價之臨床分離物之純培養物。分離物之初始來源及分離年份(當可獲得時)以及比電

阻特徵(若相關)係總結於表2中。

表2. 所測試之細菌菌株

生殖器黴漿菌(n - 5)

登錄號或貯存標識符	分離年份	身體部位 菌株名稱	註解
M2341	未知	尿道	患有 NGU 之丹麥 (Danish) 男性
M30	1980	尿道 ATCC 49895	患有 NGU 之英國 (British) 男性
M2321	未知	尿道	患有 NGU 之丹麥男性
M6282	未知	尿道	患有 NGU 之日本 (Japanese) 男性
UTMB-10G	1986	滑液 ATCC 49899	患有肺炎及關節炎之德克薩斯州(Texas) 男性
G37 QC菌株 ATCC 33530	1980	尿道	患有 NGU 之英國男性

人肺炎黴漿菌(n - 12)

登錄號或貯存標識符	分離年份	身體部位 菌株名稱	註解
54484	2009	咽喉	UAB 臨床分離物 巨環內酯抗性
54506	2009	BAL	UAB 臨床分離物 巨環內酯抗性
55246	2010	咽喉	UAB 臨床分離物
55612	2010	痰	UAB 臨床分離物
57807	2012	BAL	UAB 臨床分離物
58188	2012	BAL	UAB 臨床分離物
58772	2012	BAL	UAB 臨床分離物
59598	2013	BAL	UAB 臨床分離物

59597	2013	BAL	UAB臨床分離物
53938	2009	BAL	UAB臨床分離物
53706	2009	BAL	UAB臨床分離物
51494	2006	CSF	UAB臨床分離物
M-129 QC菌株 ATCC 29342- B7	未知	呼吸道	患有肺炎之患者

人型黴漿菌(n = 12)

登錄號或貯存 標識符	分離年份	身體部位	註解
10848	1991	子宮內膜	UAB臨床分離物 含有 <i>tetM</i>
10505	1991	子宮內膜	UAB臨床分離物 含有 <i>tetM</i>
59793	2013	子宮頸	UAB臨床分離物
59744	2013	子宮頸	UAB臨床分離物
58881	2012	未知	UAB臨床分離物
58603	2012	引導	UAB臨床分離物
11124	1991	子宮內膜	UAB臨床分離物
11063	1991	子宮內膜	UAB臨床分離物
11140	1991	子宮內膜	UAB臨床分離物 含有 <i>tetM</i> 基因
11121	1991	子宮內膜	UAB臨床分離物
11612	1991	子宮內膜	UAB臨床分離物
12434	1992	子宮內膜	UAB臨床分離物
PG21 QC菌株 ATCC 23114	未知	直腸拭子	

尿漿菌(n - 15)

登錄號或 貯存標識 符	物種	分離年 份	身體部位	註解
25353	Uu	1997	胸膜液	UAB臨床分離物 含有 <i>tetM</i> ，氟喹啉酮及 巨環內酯抗性
48105	Up	2001	引導	氟喹啉酮抗性
48736	Up	2002	未知	UAB臨床分離物
51110	Up	2005	未知	UAB臨床分離物 氟喹啉酮抗性
49718	Uu	2003	未知	UAB臨床分離物 含有 <i>tetM</i>
50826	Uu	2005	未知	UAB臨床分離物 含有 <i>tetM</i>
43306	Uu	1999	組織	UAB臨床分離物
44062	Uu	1999	引導	UAB臨床分離物
45623	Up	2000	ETA	UAB臨床分離物
48750	Up	2002	直腸拭子	UAB臨床分離物
52863	Up	2008	ETA	UAB臨床分離物
59913	Up/Uu	2013	尿道	UAB臨床分離物
59967	Up	2013	尿道	UAB臨床分離物
60052	Up/Uu	2013	尿道	UAB臨床分離物
60153	Up/Uu	2013	引導	UAB臨床分離物 氟喹啉酮抗性
Uu血清型 9 QC菌株 ATCC 33175	Uu	未知	尿道	患有 NGU 之加拿大 (Canadian)男性 含有 <i>tetM</i>

表2之注釋

縮寫：Uu = 溶尿尿漿菌，Up = 細小尿漿菌，BAL = 支氣管肺泡灌洗液，CSF = 腦脊髓液，ETA = 氣管內抽吸物

藉由即時PCR如先前所闡述鑑別尿漿菌(Xiao等人 *Detection and characterization of human Ureaplasma species and serovars by real-time PCR. J. Clin. Microbiol.* 2010,48, 2715-2723)。顯示3種臨床分離物為兩個物種之混合物，此有時存在(Xiao等人，*Extensive horizontal gene transfer in ureaplasmas from humans questions the utility of serotyping for diagnostic purposes. J. Clin. Microbiol.* 2011, 49, 2818-2826)。

人型黴漿菌及尿漿菌中 *tetM* 之存在係藉由PCR在UAB診斷黴漿菌實驗室中來測定。

活體外敏感性測試方法：

此研究所採用之分析係於「*Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Human Mycoplasmas. Approved Guideline, CLSI Document M43-A*」(CLSI 2011)中所公佈之肉湯微量稀釋法最低抑菌濃度(MIC)分析。此分析採用96孔微量滴定板，以小體積將欲測試生物體之經界定接種物添加至該等板中抗微生物劑之倍增稀釋液中。培育各板，直至生長對照變色為止。然後藉由含有pH指示劑之肉湯中沒有顏色變化來測定MIC終點。所使用程序之具體態樣如下。

培養基。 使用SP4肉湯及SP4瓊脂用於測試人肺炎黴漿菌及生殖器黴漿菌。使用改良Hayflick黴漿菌肉湯及瓊脂用於測試人型黴漿菌。Shepard 10B肉湯及A8瓊脂使用用於測試尿漿菌。該等培養基及其配方係闡述與CLSI文件(CLSI 2011)中。

接種物之製備。 將生物體解凍至室溫並稀釋於在50 mL錐形管中之適當的經預熱培養基中以產生大約 10^4 個CFU/mL之最終接種物。基s

於測試一式二份8個稀釋液及適當對照，針對每一藥物製備至少5 mL之接種物。若需要更多稀釋液來達成終點MIC，則製備額外體積之接種物。在使用前在37°C下將經接種肉湯以有氧方式培育2小時，以使得黴漿菌在接種微量滴定板之前變得具有代謝活性。由於其更快之生長速率，在接種該等板之前僅將尿漿菌培育1小時。

肉湯微量稀釋法分析之性能。 使用單一微量滴定板用於4種藥物。一式二份測試每一藥物(藥物1-列A、B；藥物2-列C、D；藥物3-列E、F)。使用孔9、10、11及12分別用於溶劑、培養基、藥物及生長對照。將0.025 mL之適當肉湯培養基添加至微量滴定板之列2至8及10及12中。將0.025 mL之最高濃度之欲測試藥物添加至列A、B中之孔1、2及11中。孔11充當藥物對照。以相同方式將欲測試之其他藥物添加於其各別列中。藉由對原液實施適當稀釋來製備最高藥物濃度。使用0.025 mL多通道吸量管連續稀釋抗微生物劑，在第二個孔處開始，並繼續直至孔8，丟棄最後0.025 mL。若使用除水以外之任何物質作為溶劑，則於孔9中藉由納入0.025 mL之最高濃度(於無菌去離子水中1:10稀釋)之所用溶劑以溶解正測試之抗微生物劑來製備溶劑對照。將0.175 mL已預熱2小時之期望接種培養基稀釋液添加至列1至9及12中之每一孔中。孔12充當生長對照。以孔12起始並逆向作業至孔1來添加接種物以防止藥物殘留。將0.175 mL之適當的未經接種培養基添加至孔10及11 (總共0.2 mL)中用於培養基及藥物對照。藉由製備接種物(存於0.9 mL之適當肉湯中之0.1 mL接種物)之6個系列稀釋液並將20 μ l之各稀釋液移液至適當瓊脂板上來最終確定用於接種每一微量滴定板之工作稀釋液之CFU/mL，來檢查是否製得適當稀釋液且接種物是否含有 10^4 個CFU/mL至 10^5 個CFU/mL。在37°C下在空氣加上5% CO₂中培育瓊脂板，直至菌落可見且可計數為止。直至生長變得可見所需之時間隨物種而有所不同，在對於尿漿菌及人型黴漿菌而言之24小時至

72小時直至對於人肺炎黴漿菌及生殖器黴漿菌而言之若干天範圍內。在37°C下以有氧方式培育微量稀釋塔板，並在18小時至24小時後且然後每天檢查生長對照孔中之顏色變化。

MIC終點之確定、品質控制及分析驗證。 MIC係記錄為在生物體對照孔第一次顯示顏色變化時抗微生物劑抑制肉湯培養基之顏色變化之最低濃度。對10B肉湯中之尿漿菌生長之陽性反應係藉由生物體對照孔(即孔12)中自黃色至粉色之顏色變化來證明。對黴漿菌肉湯中之人型黴漿菌之陽性反應係藉由生物體生長對照孔(即孔12)中自粉色至較深紅色之顏色變化來證明。對SP4肉湯中之人肺炎黴漿菌及生殖器黴漿菌之陽性反應係藉由生長對照孔中自粉色至黃色之顏色變化來證明。若用於生物體濃度之對照瓊脂板指示介於 10^4 個CFU/mL與 10^5 個CFU/mL之間，則認為結果有效。對照孔及預期結果為：孔9 (溶劑對照) – 無顏色變化；孔10 (培養基對照) – 無顏色變化；孔11 (藥物對照) – 無顏色變化；孔12 (生長對照) – 生長及顏色變化取決於正測試之生物體，不渾濁。藉由對所測試之每一分離物之接種物實施CFU量化，驗證生物體之純度。SP4瓊脂檢測污染物或當接種人肺炎黴漿菌及生殖器黴漿菌時與黴漿菌之混合培養物。人型黴漿菌在SP4或黴漿菌瓊脂上生長。人型黴漿菌及共生呼吸道黴漿菌產生煎蛋樣菌落而人肺炎黴漿菌及生殖器黴漿菌產生小球狀菌落。A8瓊脂板產生對於尿漿菌而言之棕色顆粒狀菌落且亦可檢測是否污染黴漿菌或細菌。生長對照孔之任何渾濁皆指示細菌污染並使結果無效。

肉湯微量稀釋法MIC品質控制極限。 出於品質控制(QC)目的，在實施之每一天每個分析皆包括每一所測試生物體之藉由CLSI (CLSI 2011)指定之美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)菌株。該等菌株(CLSI 2011)已確定若干抗微生物劑之MIC參照範圍。所使用之QC菌株為：人肺炎黴漿菌ATCC 29342、人型黴漿菌

ATCC 23114及溶尿尿漿菌ATCC 33175。無CLSI推薦之生殖器黴漿菌品種菌株，此乃因敏感性測試未針對此生物體進行標準化。因此，選擇菌株ATCC 33530品種用於此生物體。此菌株已在實驗室中用於其他研究並具有若干抗微生物劑之可預測MIC。單一測試(單一藥物/單一生物體組合)之可接受之MIC QC極限係列示於表3中，如來源於CLSI文件(CLSI 2011)。QC菌株皆如呈現數據之所有MIC分析所預期一樣表現。

表3. 藉由肉湯微量稀釋法測試之人型黴漿菌、人肺炎黴漿菌及溶尿尿漿菌之品質控制菌株之MIC極限($\mu\text{g}/\text{mL}$)

抗微生物劑	人型黴漿菌 ATCC 23114	人肺炎黴漿菌 ATCC 29342	溶尿尿漿菌 ATCC 33175
疊氮紅黴素	--	--	0.5 – 8
克林黴素	0.0032 – 0.25	0.25 – 4	2 – 32
紅黴素	--	0.004 – 0.063	1 - 8
左氧氟沙星	0.032 – 0.5	0.125 - 1	0.5 - 2
莫西沙星	0.016 – 0.125	0.032 – 0.25	0.5 - 2
泰利黴素	--	--	0.125 - 1
四環素	--	0.063 – 1	16 – 256

表3之注釋

表3中之數據係源自M-43-A CLSI文件(CLSI 2011)。

結果

生殖器黴漿菌。化合物1顯示與左氧氟沙星及多西環素相當之活體外活性。該3種藥物之總體MIC範圍係在4個2倍稀釋液= 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 內。化合物1 (MIC範圍為0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)相比於疊氮紅黴素(MIC範圍 < 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$)較不有效。

人肺炎黴漿菌. 化合物1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之 MIC_{90} 與左氧氟沙星之 MIC_{90} 相當且為多西環素(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之4倍。大部分人肺炎黴漿菌分離物具有疊氮紅黴素 $\text{MIC} < 0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，但選擇兩種菌株用於測試，此乃因其具有16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之疊氮紅黴素 MIC 且含有23S核糖體RNA之突變。化合物1維持針對該2種巨環內酯抗性分離物之活體外功效與完全易受巨環內酯影響之彼等分離物之活體外功效相當。

人型黴漿菌. 化合物1具有針對人型黴漿菌之最低總體活性且 MIC_{90} 為4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 且最大 MIC 值為8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。不具有tetM之人型黴漿菌分離物之多西環素 MIC 在0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至0.063 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內，而具有tetM之彼3種人型黴漿菌分離物之 MIC 為4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。對於彼等分離物而言相應四環素 MIC 為32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。多西環素之化合物1 MIC 不受tetM之存在之影響。化合物1 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之 MIC_{90} 為左氧氟沙星(0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之16倍且與疊氮紅黴素(即通常針對此物種不甚具有活性之藥物)相當。在無關於化合物1之可達成之藥物濃度之資訊之情況下，不能指示該等 MIC 將被認為是易受影響的還是具有抗性。

尿漿菌. 化合物1之 MIC_{90} 為1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，此使其與左氧氟沙星功效相當。針對左氧氟沙星抗性尿漿菌及易受左氧氟沙星影響之分離物之化合物1 MIC 不存在任何差異。類似地，在3種含有tetM之尿漿菌分離物中，化合物1之 MIC 不受影響，且相對於對於多西環素而言之4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 其 MIC 在0.5至2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 範圍內，但易受多西環素影響之生物體(0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之 MIC_{90} 之活性為化合物1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)之8倍。溶尿尿漿菌之單一巨環內酯抗性分離物之化合物1 MIC (疊氮紅黴素 $\text{MIC} = 32 \mu\text{g}/\text{mL}$)為2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其為此藥物之 MIC_{90} 之2倍稀釋，但總體上，化合物1之效力為疊氮紅黴素之4倍(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相對於4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 MIC_{90})。

表4. 化合物1及所測試之3種比較物針對人類黴漿菌之 MIC 數據集₅

生殖器黴漿菌(n = 5) MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

登錄號或貯存標識符	化合物1	AZI	DOX	LEV
M2341	0.5	<0.001	1	0.5
M30	1	<0.001	0.25	2
M2321	0.5	<0.001	1	0.5
M6282	0.5	<0.001	1	0.5
UTMB-10G	0.5	<0.001	0.5	2
G37 QC菌株 ATCC 33530	0.5	<0.001	0.25	2

人肺炎黴漿菌(n - 12) MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

登錄號或貯存標識符	化合物1	AZI	DOX	LEV
54484	0.5	32	0.25	0.5
54506	0.5	16	0.25	0.5
55246	1.0	<0.001	0.25	1
55612	1.0	<0.001	0.25	0.5
57807	0.5	<0.001	0.25	0.5
58188	0.5	<0.001	0.125	0.5
58772	0.5	<0.001	0.5	1
59598	0.5	<0.001	0.25	1
59597	0.5	<0.001	0.25	0.5
53938	0.5	<0.001	0.25	1
53706	0.5	<0.001	0.25	0.5
51494	0.5	<0.001	0.25	1
M-129 QC菌株 ATCC 29342-B7	0.5	<0.001	0.5	1

人型黴漿菌(n = 12) MIC ($\mu\text{g}/\text{L}$)

登錄號或貯存標識符	化合物1	AZI	DOX	LEV
10848	8	8	4	0.25
10505	2	4	4	0.063
59793	2	4	0.032	0.25
59744	2	2	0.016	0.125
58881	4	4	0.032	0.25
58603	1	1	0.032	0.125
11124	2	1	0.032	0.25
11063	4	4	0.063	0.125
11140	4	1	4	0.125
11121	1	4	0.032	0.125
11612	4	4	0.016	0.25
12434	4	2	0.032	0.125
PG21 QC菌株 ATCC 23114	2	1	0.032	0.5

尿漿菌(n - 15) MIC ($\mu\text{g/mL}$)

登錄號或貯存標識符	物種	化合物1	AZI	DOX	LEV
25353	Uu	2	32	8	8
48105	Up	0.5	2	0.125	32
48736	Up	0.5	1	0.063	1
51110	Up	0.5	1	0.016	8
49718	Uu	1	2	8	1
50826	Uu	0.5	2	4	0.5

43306	Uu	1	4	0.125	1
44062	Uu	1	4	0.25	1
45623	Up	0.25	1	0.016	0.25
48750	Up	0.125	1	2	0.25
52863	Up	0.5	2	0.125	1
59913	Up/Uu	0.5	2	0.125	1
59967	Up	0.5	4	0.063	1
60052	Up/Uu	0.5	2	0.125	1
60153	Up/Uu	0.5	2	0.063	4
Uu血清型 9 QC菌株 ATCC 33175	Uu	0.5	2	8	1

表5. 化合物1及所測試之3種比較物針對人類黴漿菌之數據總結

生殖器黴漿菌 MIC ($\mu\text{g/mL}$) n = 5	化合物 1	疊氮紅黴素	多西環素	左氧氟沙星
範圍	0.5-1	<0.001	0.25-1	0.5-2
M2341	0.5	<0.001	1	0.5
M30	1	<0.001	0.25	2
M2321	0.5	<0.001	1	0.5
M6282	0.5	<0.001	1	0.5
UTMB	0.5	<0.001	0.5	2
G37 QC菌株 ATCC 33530	0.5	<0.001	0.25	2

人肺炎黴漿菌 MIC ($\mu\text{g/mL}$) n=12	化合物 1	疊氮紅黴素	多西環素	左氧氟沙星
範圍	0.5-1	<0.001-32	0.125-0.5	0.5-1
MIC ₅₀	0.5	<0.001	0.25	0.5
MIC ₉₀	1	16	0.25	1
M-129-B7 QC 菌株 ATCC 29342	0.5	<0.001	0.5	1
人型黴漿菌 MIC ($\mu\text{g/mL}$) n=12	化合物 1	疊氮紅黴素	多西環素	左氧氟沙星
範圍	1-8	1-8	0.016-4	0.063-0.25
MIC ₅₀	2	4	0.032	0.125
MIC ₉₀	4	4	4	0.25
PG21 QC Strain ATCC 23114	2	1	0.032	0.5
尿漿菌 ($\mu\text{g/mL}$) n=15	化合物 1	疊氮紅黴素	多西環素	左氧氟沙星
範圍	0.125-2	1-32	0.016-8	0.25-32
MIC ₅₀	0.5	2	0.125	1
MIC ₉₀	1	4	8	8
Uu 血清型 9 QC 菌株 ATCC 33175	0.5	2	8	1

表4及5之注釋

縮寫：AZI = 疊氮紅黴素，DOX = 多西環素，LEV = 左氧氟沙

星，Uu = 溶尿尿漿菌，Up = 細小尿漿菌。

亦與多西環素同時針對四環素測試3種含有tetM基因之人型黴漿菌分離物。所有3種分離物對於四環素皆具有32 µg/mL之MIC。

討論

感染人類之黴漿菌及尿漿菌可在呼吸道以及泌尿生殖道中引起重大疾病。除淋病奈瑟球菌及沙眼衣原體以外，生殖器黴漿菌及溶尿尿漿菌二者皆可引起男性尿道炎，且生殖器黴漿菌亦引起女性子宮頸炎及骨盆腔發炎性疾病(Waites KB、Taylor-Robinson D. *Mycoplasma and Ureaplasma. Manual of Clinical Microbiology*, 第10次編輯，Washington, D.C., ASM Press: 970-985, 2011)。有時新生兒中由於人型黴漿菌及尿漿菌而發生血流、CSF及肺之侵襲性感染(Waites及Taylor-Robinson 2011)。侵襲性疾病亦可發生在免疫缺失情況下之成人中(Waites及Taylor-Robinson 2011)。

黴漿菌及尿漿菌感染之治療選擇不再明確，此乃因在亞洲巨環內酯抗性在人肺炎黴漿菌中變得極為普遍且逐漸擴散至歐洲及北美；在一些區域中四環素抗性速率在人型黴漿菌及尿漿菌中可達到50%；且在生殖器黴漿菌中對巨環內酯及氟喹啉酮之抗性已在許多文獻中有記載(Waites KB、Lysynyansky I、Bebear CM. (2014)。Emerging antimicrobial resistance in mycoplasmas of humans and animals. *Mollicutes Molecular Biology and Pathogenesis*. G. Browning and C. Citti. Norfolk, UK, Caister Academic Press: 289-322)。受到免疫阻抑之患者及已隨時間接受多個療程之抗生素之彼等具有較大之經藥物抗性生物體感染之風險(Waites 2014)。出於該等原因，需要不受對諸如巨環內酯、四環素及氟喹啉酮等其他藥物類別之交叉抗性影響之新藥劑。

此較小初步研究已展示化合物1具有針對生殖器黴漿菌、人肺炎

黴漿菌、溶尿尿漿菌及細小尿漿菌之與左氧氟沙星(即靶向DNA複製之另一藥劑)相當之活體外活性，且其功效不受賦予氟喹啉酮抗性之突變之存在影響。此外，在黴漿菌及尿漿菌中對巨環內酯及四環素之抗性似乎對化合物1之MIC無任何顯著之可量測影響，但應測試更多分離物來證實此觀測結果。疊氮紅黴素為針對不存在影響巨環內酯與核糖體結合之突變之生殖器黴漿菌及人肺炎黴漿菌測試之最強效藥劑。針對尿漿菌，化合物1之MIC₉₀為疊氮紅黴素之1/4，從而使其為在4種所測試藥劑中最具活性之藥物。

結論

- 針對人肺炎黴漿菌、生殖器黴漿菌及尿漿菌之化合物1活體外活性在總體上與左氧氟沙星類似，且所有MIC < 2 µg/mL，而其針對人型黴漿菌之功效在MIC₉₀ (4 µg/mL)方面略低。

- 針對尿漿菌，化合物1之MIC₉₀ (1 µg/mL)為疊氮紅黴素之1/4，從而使其為針對該等生物體所測試之4種藥劑之最有效藥劑。

- 化合物1活體外針對人肺炎黴漿菌、人型黴漿菌及尿漿菌之活性不受賦予巨環內酯或氟喹啉酮抗性之突變或少量所測試分離物中tetM之存在影響。

- 化合物1可為用於進一步研發作為由泌尿生殖道或呼吸道中之人類黴漿菌及尿漿菌引起之感染之可能治療之可能有用藥劑。

實例3. 化合物1針對生物恐怖主義之可能藥劑之活體外抗細菌活性

種類A及B受管制藥物(Category A and B Select Agents)用作生物恐怖主義之藥劑之可能性在許多文獻中有記載。為此，確定來自多個藥物類別之化合物及化合物1針對炭疽桿菌(*Bacillus anthracis*、*B. anthracis*)、鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia mallei*、*B. mallei*)、類鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia pseudomallei*、*B. pseudomallei*)、流產布氏桿菌(*Brucella abortus*、*B. abortus*)、馬爾他布氏桿菌(*Brucella*

melitensis、*B. melitensis*)、豬布氏桿菌(*Brucella suis*、*B. suis*)、土倫病菌(*Francisella tularensis*、*F. tularensis*)及鼠疫耶爾森氏菌(*Yersinia pestis*、*Y. pestis*)各自之多個分離物之抗微生物敏感性特徵。在肉湯微量稀釋法分析格式中遵循臨床及實驗室標準協會(Clinical and Laboratory Standards Institut, CLSI)指南實施測試。結果係報告為抗微生物劑之目測完全抑制生物體在微量稀釋孔中之生長之最低濃度($\mu\text{g/mL}$)。

材料及方法

抗細菌劑

根據針對炭疽桿菌(*Bacillus anthracis*、*B. anthracis*)、鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia mallei*、*B. mallei*)、類鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia pseudomallei*、*B. pseudomallei*)、流產布氏桿菌(*Brucella abortus*、*B. abortus*)、馬爾他布氏桿菌(*Brucella melitensis*、*B. melitensis*)、豬布氏桿菌(*Brucella suis*、*B. suis*)、土倫病菌(*Francisella tularensis*、*F. tularensis*)及鼠疫耶爾森氏菌(*Yersinia pestis*、*Y. pestis*)各自之多個分離物之抗細菌活性篩選三種(3)比較化合物(多西環素、左氧氟沙星及 chloramphenicol)及化合物1。根據由贊助商提供之說明書並依照CLSI指南製備化合物。一式三份測試所有測試及比較化合物各自之總共12個濃度。濃度範圍為起始濃度為64 $\mu\text{g/mL}$ 且最終濃度為0.031 $\mu\text{g/mL}$ 之2倍稀釋方案。

細菌菌株

利用炭疽桿菌、鼠疫耶爾森氏菌、鼻疽伯克氏菌、類鼻疽伯克氏菌、豬布氏桿菌、馬爾他布氏桿菌、流產布氏桿菌各自之10個分離物及土倫病菌之3個分離物用於藥物篩選(表6)。另外，包括以下品質控制菌株：大腸桿菌25922、金黃色葡萄球菌29213、綠膿桿菌27853、肺炎鏈球菌49619及大腸桿菌35218。

表6. 所篩選在細菌分離物

炭疽桿菌	Ames	¹ Health Protection Agency Culture Collections ; Porton Down, UK ² BEI Resources ; Manassas, VA
	36	
	38	
	41	
	46	
	411	
	412	
	413	
	415	
鼻疽伯克氏菌	120	¹ Health Protection Agency Culture Collections ; Porton Down, UK ² BEI Resources ; Manassas, VA
	3708	
	3709	
	10229	
	10230	
	10245	
	10247	
	10248	
	10260	
	12938	
類鼻疽伯克氏菌	1688	¹ Health Protection Agency Culture Collections ; Porton Down, UK ² BEI Resources ; Manassas, VA
	4845	
	4846	
	6700	
	7383	
	7431	
	8016	
	8707	
	8708	
	10274	

流產布氏桿菌	624	¹ Health Protection Agency Culture Collections ; Porton Down, UK ² BEI Resources ; Manassas, VA
	1408	
	3605	
	4487	
	5059	
	7470	
	7471	
	7472	
	8038	
	8200	
	3511	
	3605	
	8200	
馬爾他布氏桿菌	8223	¹ Health Protection Agency Culture Collections ; Porton Down, UK ² BEI Resources ; Manassas, VA
	8334	
	8631	
	8632	
	10200	
	10502	
	11361	
豬布氏桿菌	3142	¹ Health Protection Agency Culture Collections ; Porton Down, UK ² BEI Resources ; Manassas, VA
	3143	
	4490	
	5061	
	10095	
	10098	
	10385	
	10510	
	10511	
	10364	

土倫病菌	643	¹ Health Protection Agency Culture Collections ; Porton Down, UK ² BEI Resources ; Manassas, VA
	644	
	645	
鼠疫耶爾森氏菌	CO92	¹ Health Protection Agency Culture Collections ; Porton Down, UK ² BEI Resources ; Manassas, VA ³ Lovelace Respiratory Research Institute ; Albuquerque, NM
	16	
	17	
	20	
	637	
	639	
	640	
	8775	
	10029	
	10030	

活體外敏感性測試方法(若適當)

利用由CLSI指南概述之肉湯微量稀釋法方法實施測試。簡言之，使用分析體積為0.2 mL/孔之96孔U底微板實施測試。以細菌劑之 5.0×10^5 個CFU/mL (5.0×10^4 個CFU/孔)之標靶濃度接種含有適當肉湯及測試化合物之2倍稀釋液之板，且隨後根據該藥劑培育24小時至72小時。在培育後，且對板進行目測讀數，並針對渾濁、部分澄清或完全澄清對個別孔評分。MIC係報告為藥物之目測抑制生物體生長之最低濃度($\mu\text{g/mL}$)。生長培養基、接種物製備及培育條件係提供於下表7中。

表7. 生長培養基、接種物製備及培育條件

生物體	培養基	接種物	培育
炭疽桿菌	CAMHB	直接群落懸浮	37°C，約18小時
流產布氏桿菌	布氏桿菌肉湯pH	生長方法	37°C，48小時

S

	7.1±0.1		
馬爾他布氏桿菌	布氏桿菌肉湯pH 7.1±0.1	生長方法	37°C，48小時
豬布氏桿菌	布氏桿菌肉湯pH 7.1±0.1	生長方法	37°C，48小時
鼻疽伯克氏菌	CAMHB	生長方法	37°C，約18小時
類鼻疽伯克氏菌	CAMHB	生長方法	37°C，約18小時
土倫病菌	CAMHB + 2% IsoVitaleX™	直接群落懸浮	37°C，48至72小時
鼠疫耶爾森氏菌	CAMHB	生長方法	28°C，24至48小時

上文所述篩選之結果係顯示於表8及9中。

表8. 化合物1及3種比較物針對Select 細菌之抗微生物敏感性

生物體	化合物1 MIC (µg/mL)	多西環素 MIC (µg/mL)	氯黴素 MIC (µg/mL)	左氧氟沙 星 MIC (µg/mL)
類鼻疽伯克氏 菌	32	0.5	16	4
	32	0.5	8	2
	32	0.5	8	2
	64	0.5	16	4
	32	0.063	4	4
	32	0.5	16	4
	32	8	>256	16
	32	0.25	8	8
	64	0.25	8	4
	32	8	64	8
鼻疽伯克氏菌	4	≤ 0.031	4	0.5
	0.25	≤ 0.031	1	≤ 0.125
	4	≤ 0.031	4	0.25

	64	≤ 0.031	1	0.5
	32	0.063	8	0.5
	2	≤ 0.031	8	≤ 0.125
	8	≤ 0.031	4	≤ 0.125
	0.5	≤ 0.031	1	≤ 0.125
	2	≤ 0.031	4	0.5
	2	0.063	4	0.25
流產布氏桿菌	8	0.25	1	0.5
	4	0.25	1	0.25
	8	0.125	1	0.25
	4	0.125	2	0.25
	4	0.25	2	0.25
	0.063	0.063	0.5	0.25
	1	0.25	2	0.25
	0.5	0.063	1	0.25
	1	0.063	2	0.25
	16	0.5	4	0.5
鼠疫耶爾森氏菌	2	0.5	4	≤ 0.25
	2	0.5	8	≤ 0.25
	2	0.5	8	≤ 0.25
	>64	1	8	0.25
	2	1	4	≤ 0.25
	2	1	2	≤ 0.25
	2	0.5	8	≤ 0.25
	1	0.5	8	0.25
	2	0.5	8	≤ 0.25
	2	1	8	≤ 0.25
土倫病菌	16	4	2	≤ 0.125
	8	1	2	≤ 0.125
	16	2	1	≤ 0.125

炭疽桿菌	0.5	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	0.125	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	0.125	≤ 0.031	4	≤ 0.25
	0.25	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	0.5	≤ 0.031	4	≤ 0.25
	0.125	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	1	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	0.5	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	0.05	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	0.125	≤ 0.031	8	≤ 0.25
馬爾他布氏桿菌	8	0.25	4	0.5
	8	0.125	2	0.5
	16	0.25	8	1
	8	0.25	4	0.25
	8	0.125	4	0.5
	8	0.125	4	0.5
	8	0.125	4	0.5
	8	0.125	2	0.25
	8	0.125	4	0.5
	16	0.125	4	0.5
豬布氏桿菌	2	0.063	2	0.5
	1	0.063	1	0.25
	1	0.063	1	0.5
	1	0.125	2	0.5
	1	0.063	2	0.5
	2	0.125	2	0.25
	1	0.063	4	0.5
	1	0.063	2	0.5
	1	0.063	1	0.25
	1	0.063	2	0.5

表9. 化合物1之活體外活性($\mu\text{g/ml}$)

生物體	N	範圍	MIC ₅₀	MIC ₉₀
炭疽桿菌(<i>Bacillus anthracis</i>)	10	0.12-1	0.25	0.5
炭疽桿菌(<i>B. anthracis</i>)	30	0.12-4	0.25	1
豬布氏桿菌	10	1-2	1	2
鼻疽伯克氏菌 (<i>Burkholderia mallei</i>)	10	0.25-64	2	32
鼻疽伯克氏菌(<i>B. mallei</i>)	30	2-32	16	32
類鼻疽伯克氏菌 (<i>Burkholderia pseudomallei</i>)	10	32-64	32	64
類鼻疽伯克氏(<i>B. pseudomallei</i>)	28	32->32	32	>64
土倫病菌	27	8-16	16	16
鼠疫耶爾森氏菌(<i>Yersinia pestis</i>)	10	1->64	2	2
鼠疫耶爾森氏菌(<i>Y. pestis</i>)	30	2-8	4	8

【符號說明】

無

發明摘要

※ 申請案號： 104117219

※ 申請日： 104年5月28日

※IPC 分類： A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

【發明名稱】

用於治療細菌感染的方法

METHODS FOR TREATING BACTERIAL INFECTIONS

【中文】

本發明揭示利用(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽於治療各種細菌感染之方法。

【英文】

Disclosed are methods for treating various bacterial infections with (2*R*,4*S*,4*aS*)-11-fluoro-2,4-dimethyl-8-[(4*S*)-4-methyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]-1,2,4,4*a*-tetrahydro-2'*H*,6*H*-spiro[1,4-oxazino[4,3-*a*][1,2]oxazolo[4,5-*g*]quinoline-5,5'-pyrimidine]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-trione, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

申請專利範圍

1. 一種(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮或其醫藥上可接受之鹽於製備藥物之用途，該藥物係用於在個體中治療由一或多種選自以下之細菌引起之細菌感染：布氏桿菌(*Brucella spp.*)、弗朗西斯氏菌(*Francisella spp.*)、耶爾森氏菌(*Yersinia spp.*)、黴漿菌(*Mycoplasma spp.*)、尿漿菌(*Ureaplasma spp.*)、沙眼衣原體(*Chlamydia trachomatis*)或肺炎衣原體(*Chlamydia pneumoniae*)。
2. 如請求項1之用途，其中該個體係人類。
3. 如請求項1之用途，其中該個體患有一種以上細菌感染。
4. 如請求項3之用途，其中該個體患有沙眼衣原體感染及淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)感染。
5. 如請求項1之用途，其中該細菌對除了(2*R*,4*S*,4*aS*)-11-氟-2,4-二甲基-8-[(4*S*)-4-甲基-2-側氧基-1,3-噁唑啉-3-基]-1,2,4,4*a*-四氫-2'*H*,6*H*-螺[1,4-噁嗪并[4,3-*a*][1,2]噁唑并[4,5-*g*]喹啉-5,5'-嘧啶]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-三酮以外之一或多種抗細菌劑具有抗性。