

發明專利分割說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：**92121194**

※申請日期：**87-12-4**

原申請案號：○八七一二○一八五

※IPC 分類：^{C07D263/04}
A61K31/42

專利證書號數：

壹、發明名稱：(中文/英文)

分析可能具單胺氧化酶抑制活性之化合物的方法

METHOD OF ASSAYING COMPOUND HAVING MONOAMINE
OXIDASE INHIBITORY ACTIVITY

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商法瑪西亞-普強公司

PHARMACIA & UPJOHN COMPANY

代表人：(中文/英文)

勞倫斯·特·威奇/LAWRENCE T. WELCH

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國密西根州卡林麻梅族市漢瑞特街 301 號

國籍：(中文/英文)

美國/U.S.A.

參、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

1. 湯尼-喬 波/TONI-JO POEL

2. 約瑟夫 P. 馬汀 二世/JOSEPH P. MARTIN JR.

3. 麥可 R. 芭芭晨/MICHAEL R. BARBACHYN

住居所地址：(中文/英文)

1. 美國密西根州威廉市安德森街 304 號

2. 美國密西根州理琦廉市北 32 街 6749 號

3. 美國康涅狄克州東漢普頓市瓦拉大道 32 號

國籍：(中文/英文)

1.2.3.均美國/U.S.A.

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

1. 美國 US；1997/12/05；60/067,830
2. 美國 US；1998/06/16；60/089,498
3. 美國 US；1998/09/14；60/100,185
- 4.
- 5.

主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 US；1997/12/05；60/067,830
2. 美國 US；1998/06/16；60/089,498
3. 美國 US；1998/09/14；60/100,185
- 4.
- 5.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

- 1.
- 2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

技術領域

本發明係有關四氫噻喃N-苯基喹啉啉酮化合物之S-氧化物，其中苯基喹啉啉酮部份經碳鍵與噻喃環連接。本發明也有關測定喹啉啉酮對人類單胺氧化酶抑制活性的新穎分析法。

先前技術

喹啉啉酮抗細菌劑為一類新穎合成抗微生物劑，對很多人類和獸醫學中的病原體具有強效活性，其中包括諸如多樣耐藥性的葡萄球菌和鏈球菌等革蘭氏陽性需氧細菌、諸如流感嗜血桿菌和黏膜炎微球菌(卡他球菌)等革蘭氏陰性需氧細菌以及諸如多形桿狀菌和梭狀芽胞桿菌等厭氧有機體，諸如結核桿菌和烏分枝桿菌等耐酸有機體。也已知道，一類化學化合物喹啉啉酮能抑制單胺氧化酶(MAO)，該酶能阻止由內源性和膳食性胺酪胺所致的急性血壓升高。因此，有需要去發現具有最小單胺氧化酶抑制活性的喹啉啉酮抗生素，以便消除由潛在的藥物-藥物相互作用所致的相關副作用。當前也有興趣開發具有高度處理能力的篩選分析法，以測定喹啉啉酮抗生素的單胺氧化酶抑制活性。

國際公告號世界專利97/09328；待批的美國專利申請書，系列號08/696,313，公佈了具有4-8員雜環的C-C鍵之喹啉啉

酮，其通常包含本申請書的化合物。

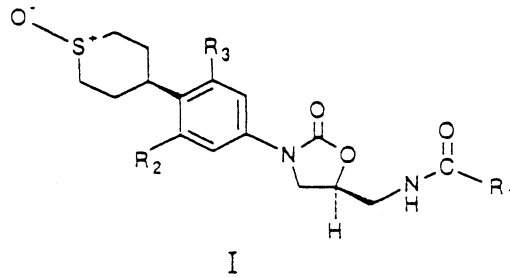
國際公告號世界專利97/30995公佈了抗生素喹唑啉酮的衍生物。

公佈附著於苯基喹唑啉酮的芳香雜環化合物之參考文獻包括歐洲專利公告號0352 781 A2、國際公告號世界專利9309103-A1和美國專利號5,130,316、5,254,577和4,948,801。

普遍感興趣的其他參考文獻包括：Castagnoli Jr.等，1-甲基-1,2,3,6-四氫吡啶-4-基胺基甲酸酯的合成和有擇的單胺氧化酶B-抑制性質：(R)-和(S)-去甲甲炔胺的有潛力的藥物前體，"醫學化學雜誌"，39卷，4756-4761頁(1996)；Walter Weyler和J.I. Salach，"人類胎盤線粒體A型單胺氧化酶的純化和性質" "生物化學雜誌"，260卷，24期，13199-13207頁(1985)(10/25/85)。J.I. Salach和Walter Weyler，人類胎盤和牛肝內含黃素類芳香胺氧化酶之製備，"酶學方法"，142卷，627-623(1987)；Joseph J.P. Zhou等，"單胺氧化酶B的直接持續熒光分析法"，"分析生物化學"，234卷，9-12頁(1996)；Matthew J. Krueger等，"單胺氧化酶A和B放射分析法可靠性的檢驗"，"分析生物化學"，214卷，116-123頁(1993)；Keith F. Tipton等，"評論—單胺氧化酶活性的放射化學分法：問題和缺陷"，"生化藥理學"，46卷，8期，1311-1316頁(1993)。

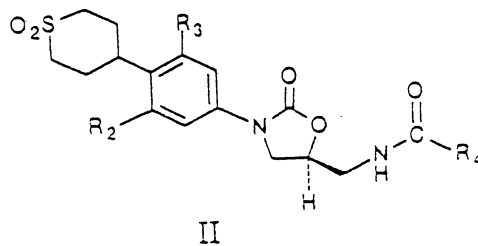
發明內容

一方面，本發明為式I化合物



或其醫藥上可接受的鹽，其中R₁為甲基、乙基、環丙基或二氯甲基；R₂與R₃相同或不同，為氫或氟。本發明的式I包括反式-和順式-異構體兩者。

在另一方面，本發明為式II化合物



或其醫藥上可接受的鹽，其中R₂和R₃與以上定義相同；R₄為乙基或二氯甲基。

較佳的是，在以上式I中，R₁為甲基或乙基。

較佳的是，在以上式II中，R₄為乙基。

也較佳的是，式I和式II化合物為單氟化合物。

本發明的較佳化合物為：

a. [4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺，

b.[4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺，

c.[4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]環丙烷羧醯胺，

d.[4(S)-順式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺，

e.(S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1,1-二氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺，

f.(S)-(-)-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1,1-二氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺，

g.[4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺，

h.[4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]環戊烷羧醯胺，或

i.[4(S)-反式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺。

更佳的是化合物[4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑基]甲基]乙醯胺。

還有在另一方面，本發明提供方法，以分析噁唑啉酮抗生素的單胺氧化酶抑制活性，該法包括以下步驟：

a)在pH值從約7.0至約7.5的緩衝液內，將噁唑啉酮與單胺

氧化酶一起保溫；

b) 添加 1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氫吡啶至該保溫液內；以及

c) 測定該喹啉酮的單胺氧化酶抑制活性。

實施方式

本發明提供定義如上的式 I 和式 II 的四氫噻喃苯基喹啉酮之 S-氧化物。這些化合物為有用的抗微生物劑，對以上公佈的很多人類和獸醫學中的病原體有效。特定言之，已經發現，儘管作為一個化學化合物類別，喹啉酮為人類單胺氧化酶 A (MAO A) 和單胺氧化酶 B (MAO B) 的抑制劑，但本發明的化合物單胺氧化酶抑制活性出乎意料地微弱，此表明這些化合物具有減少或消除潛在的藥物-藥物相互作用之能力，因為強效抑制單胺氧化酶可導致在正常情況下由其進行分解代謝的其他化合物(包括一些藥物)之清除率改變。

本發明也提供新穎分光光度分析法，用於測定喹啉酮抑制人類單胺氧化酶的能力。單胺氧化酶 A 和單胺氧化酶 B 為位於線粒體外膜的膜結合黃素蛋白。在催化生物源性胺和生物異源性胺的氧化脫胺時，兩酶偏愛不同的作用物。歷史上，單胺氧化酶用兩種不同作用物由放射性終點(不連續)法分析。這些方法已受到批評，因為如通常實施時那樣，在通行條件下，缺乏反應時間進程之直線性的證據。當在短時間內

篩選大量化合物時，由於其不方便的性質，使用這些方法也並不合適。這些方法包括多個處理步驟，其中有反應產物的溶劑萃取。這些步驟導致所得數據的不正確性。參見：Matthew J. Krueger等，"單胺氧化酶A和B放射化學分析法可靠性的檢驗"，"分析生物化學"，214卷，116-123頁(1993)；Keith F. Tipton等，"評論—單胺氧化酶活性放射化學分析法：問題和缺陷"，"生化藥理學"，46卷，8期，1311-1316頁(1993)。

作者現已開發了一種連續的、明顯的、高篩選能力的單胺氧化酶分光光度分析法，依據顯色作用物1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氫吡啶的氧化有色產物。該分析法對單胺氧化酶A和單胺氧化酶B同樣完好。此法敏感、呈線性，並能耐受由溶解的和部份純化的單胺氧化酶A和單胺氧化酶B所引起的低濁度水平。反應產物可穩定很多小時，且兩酶的反應速度都為時間和酶濃度的線性函數。此分析法已成功地改寫為微量滴定板格式，故可在短時間內提供有關成千受試嘧啶酮化合物的信息。甚至在微量滴定板篩選格式中，已經得到在通行分析條件下有關反應速度線性的準確信息。

此外，儘管評估嘧啶酮化合物的單胺氧化酶抑制活性為此分析法之最重要用途，但本發明也可用於檢測單胺氧化酶的任何抑制劑。

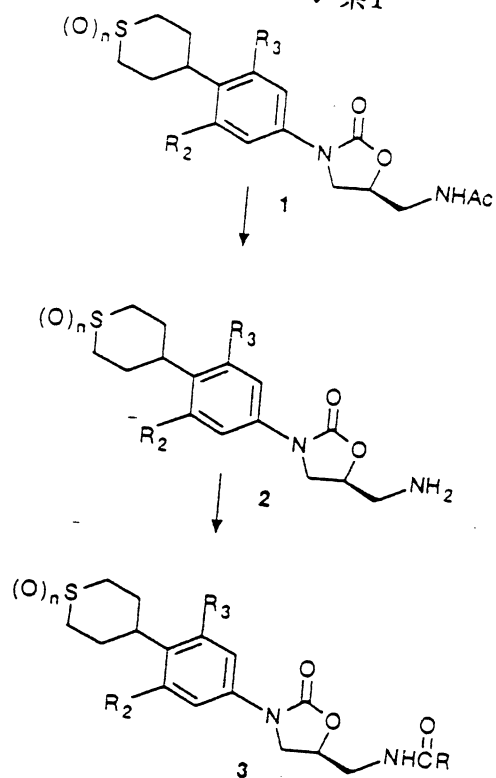
就本發明的目的而言，專門術語"其醫藥上可接受的鹽"指

的是用於本發明的化合物投藥的鹽，並包括鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽、丙酸鹽、乳酸鹽、甲磺酸鹽、馬來酸鹽、蘋果酸鹽、琥珀酸鹽、油石酸鹽、檸檬酸鹽、2-羥基乙基磺酸鹽和富馬酸鹽等。這些鹽可以水合物形式存在。

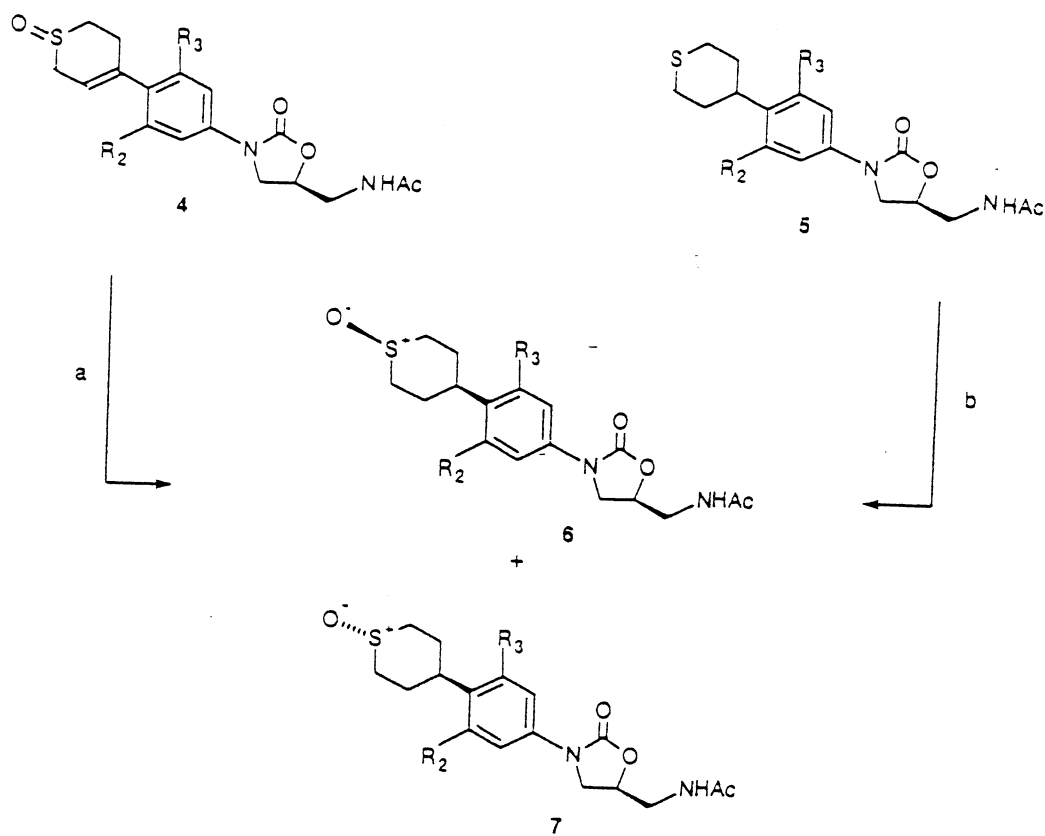
本發明的化合物可按照方案I和方案II以技藝熟練者所知的的方法學製備。簡言之，如方案I所示，以鹽酸羥胺水解N-乙醯噁唑啉酮I，例如，提供胺2。在鹼存在下以酸性氯化物或酸酐處理結構2，可提供N-醯基噁唑啉酮3，其中n為1或2，R為定義如上的R₁或R₄。按照在國際公告號世界專利97/09328中公佈的步驟，可得到其中n為2的結構1；其中n為1的結構1可如方案II所示而製備。

可按照國際公告號世界專利97/09328中公佈的步驟得到方案II中的化合物4，再可在合適催化劑和合適溶劑存在下經催化性氫化作用還原成相應的順式-和反式亞砜6和7，如途徑a中所述。硫化物5，可作為途徑a中所示的還原作用之副產物而分離到，或可以磺酸-碘化鈉系統還原6或7而合成，可在合適溶劑中以諸如過碘酸鈉或間-氯過苯甲酸等合適氧化劑氧化，提供6和7，如方案II的途徑b中所述。6和7的異構體混合物可以色譜法分開。

方案I



方案II



這些化合物可經胃腸道外或口服投藥，用於人類和其他溫血動物，治療微生物感染，其中包括眼科感染。

使用標準和通常技術，將本發明的式I和式II化合物與固體或液體醫藥上可接受的載體(和視需要與醫藥上可接受的佐劑和賦形劑)合併，可製備本發明的醫藥組合物。固體形式組合物包括粉劑、片劑、分散顆粒、膠囊、扁形膠囊和栓劑。固體載體可至少為一種物質，也可作為稀釋劑、增香劑、助溶劑、潤滑劑、懸浮劑、黏合劑、藥片崩解劑和封膠劑而發揮功能。惰性固體載體包括碳酸鎂、硬脂酸鎂、滑石、糖、乳糖、果膠、糊精、澱粉、明膠、纖維素類物料、低熔點蠟和可可脂等。液體形式組合物包括溶液、懸浮液和乳狀液。例如，可提供溶於水和水-丙二醇和水-聚乙二醇系統中之本發明的化合物溶液，並視需要含有合適的常用著色劑、增香劑、穩定劑和增稠劑。

較佳的是，使用通常技術在含有有效量或合適量的活性成份(即，按照本發明的式I或式II化合物)的單位劑型提供醫藥組合物。

在醫藥組合物及其單位劑型中活性成份(即，按照本發明的式I或式II化合物)的量可以變動或大加調整，取決於特定的應用、特定化合物的功效和所需濃度。一般而言，活性成份量的範圍可在組合物重量的0.5%至90%之間。

在溫血動物內，用於治療或防止細菌感染的醫療用途中，上述化合物或其醫藥組合物可口服、局部和/或胃腸道外投藥，其劑量為使在進行治療的動物中的活性成份得到和維持有效抗菌濃度(即量，或血液中水平)。一般而言，活性成份的這類有效抗菌劑量範圍為約0.1至約100毫克/千克體重/天，更佳的是約3.0至約50毫克/千克體重/天。要瞭解的是，劑量可以變動，取決於患者的需要、正在治療中的細菌感染的嚴重程度和所用的特定化合物。也要瞭解的是，可增加最初投藥劑量，超過上述上限，以便迅速達到所需的血液中水平，最初劑量或可小於最適劑量，在治療過程中每天劑量可進行性地增加，這取決於特定情況。必要時，每天量也可分作多次投藥量，例如，每天兩至四次。

按照本發明的式I和式II化合物為胃腸道外給藥的，即，經注射，例如，經靜脈注射或經其他胃腸道外投藥途徑。用於胃腸道外投藥的醫藥組合物通常含有醫藥上可接受量的按照式I或式II之化合物，該化合物作為可溶性鹽(酸加成鹽或鹼鹽)，溶於醫藥上可接受的液體載體，諸如，例如，注射用水和緩衝劑，以提供合適的經緩衝的等張溶液，例如，pH約為3.5-6的。合適的緩衝劑包括，例如，正磷酸三鈉、碳酸氫鈉、檸檬酸鈉、N-甲基葡糖胺、L(+)-離胺酸和L(+)-精胺酸，僅給出少數有代表性的緩衝劑之名稱。按照式I或式II的化合物通

常溶於載體，其量足以提供醫藥上可接受的針劑濃度範圍在約1毫克/毫升至約400毫克/毫升溶液。所得液體醫藥組合物可投藥，以得到上述有效抗菌劑量。按照本發明的式I和式II化合物可以固體和液體劑型有利地口服投藥。

本發明的呋唑啉酮抗菌劑對很多有機體都有有效活性。本發明的化合物之體外活性可以標準測試步驟評估，諸如以瓊脂稀釋法測定最小抑制濃度(MIC)，如在"批准的標準。需氧生長細菌的稀釋抗微生物敏感性測試法"(第三版，1993年由國家臨床實驗室標準委員會出版，維拉諾瓦，賓夕凡尼亞州，美國)中所述。本發明的化合物之抗金黃色葡萄球菌和流感嗜血桿菌活性示於表1。

單胺氧化酶活性測定的連續性分光光度分析法依據顯色性作用物1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氫吡啶經單胺氧化酶作用後的有色氧化產物。該產物於室溫下可穩定很多天。從單胺氧化酶與作用物混合的片刻間，作用物轉變成氧化物即連續發生，並可直接觀測到最初的反應速度曲線。鮮艷黃綠色氧化產物的峰值吸光度在421毫微米，在390毫微米與440毫微米之間可測量到寬帶。故該分析可在最不尖端的分光光度設備上進行。作用物本身無色，且在分析條件下並不自發地轉變成產物，故無干擾的背景速度。

該分析法是敏感的，能在作用物濃度變化極低水平(<1%)

時測定準確的速度。其敏感性可使測定在極低濃度單胺氧化酶時進行，不管酶是純的還是在組織勻漿中的。該分析法不受生物源性物料的背景干擾，後者全部在210-350毫微米之間吸收。

該分析法在廣大範圍單胺氧化酶、作用物和嘔唑啉酮濃度內顯示線性反應速度，並在任何作用物或酶濃度下在進度曲線的相當部份內顯示線性反應速度。例如，在以下情況時本分析法都顯示線性反應速度：在嘔唑啉酮最後濃度從約1 mM至約1 nM時，在於421毫微米足以產生0.0005-0.05/分鐘吸光度改變的任何單胺氧化酶濃度時，在作用物濃度從約10 μ M至約10 mM時。即使在低酶濃度時在長時間間隔(直至90分鐘)後反應速度也是線性的。這些性質使高度準確的速度測定能作為作用物濃度、酶濃度或嘔唑啉酮抑制劑濃度的函數。

該分析法可在對反應無不利影響並提供約7.0至7.5 pH值範圍的緩衝液內進行。較佳緩衝液為磷酸鈉。分析法的較佳pH值約為7.3。此外，該分析法以在約25°C至約40°C的溫度下進行較佳。最佳分析溫度約為37°C。

顯色作用物1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氫吡啶可如N. Castagnoli Jr.等,"醫學化學",39卷,4756-4761頁(1996)及其所引參考文獻所述製備。作用物作為在50 mM磷酸鈉中的10-15 mM儲存液而製備。溶液在冰上或冷凍保存，在典型

情況下在分析時以 50 mM 磷酸鈉 (pH=7-7.5) 稀釋 10 倍至 100 倍。

人類胎盤單胺氧化酶 A 如 N. Castagnoli Jr. 等, "醫學化學", 39 卷, 4756-4761 頁 (1996) 和 J.I. Salach 等, "生物化學雜誌", 260 卷, 13199 頁 (1985) 中所述溶解和純化。人類胎盤單胺氧化酶 A 作為濃縮液 (每毫升 5 毫微莫耳) 而得到。牛肝單胺氧化酶 B 如 N. Castagnoli Jr. 等, "醫學化學", 39 卷, 4756-4761 頁 (1996) 和 J.I. Salach 等, 「酶學方法」, 142 卷, 627-623 頁 (1987) 中所述純化。牛肝單胺氧化酶 B 作為濃縮液 (每毫升 8 毫微莫耳) 而得到。酶溶液的工作儲存液由最初儲存液以 50 mM 磷酸鈉 (並視需要 10% 甘油) 稀釋 50 倍而製備。溶液保存於冰上, 直至最後稀釋進行分析。冷凍的單胺氧化酶可在使用前立即以 50 mM 磷酸鈉緩衝液稀釋 800-3200 倍。當篩選大量喹唑啉酮時, 此法是有用的。

喹唑啉酮在二甲亞砜中以 50 mM 的濃度製備。在二甲亞砜中對 50 mM 儲存液進行一系列稀釋, 以形成範圍從 20 mM 至 0.3125 mM 的額外儲存液。然後冷凍儲存液, 直至使用。在分析時儲存液稀釋 100 倍, 達到最後的酶分析體積。

在典型情況下, 在分析前, 酶與喹唑啉酮抑制劑在磷酸鈉緩衝液內預保溫約 15 分鐘。通常在一至 60 分鐘間隔內收集初速度數據。

在分光光度計比色杯內評估單個喹啉酮的單胺氧化酶抑制活性時，本分析法很好地發揮了功能。本分析法也已修改成功，以在高處理能力的微量滴定板格式(即，96,384和1536孔板讀數)中運作。成百個分析可同時進行。分析體積為250微升，每孔的有效徑長為0.75厘米。一般而言，在微滴定板內分析的最後組合物包含0.05 mM磷酸鈉(pH=7.3)、喹啉酮濃度範圍達500 μ M、1%二甲亞砷、80 μ M作用物(單胺氧化酶A)或200 μ M作用物(單胺氧化酶B)以及足以在421毫微米產生每分鐘從0.0005至0.050之吸光度變化的酶。反應在37°C進行，通過在約37°C預保溫微滴定板和儲存液以使分析溶液迅速達到溫度平衡狀態。隨後在421毫微米記錄吸光度增值。420毫微米處氧化產物的消光係數為25,000 M^{-1} 厘米 $^{-1}$ 。參見：N. Castagnoli Jr.等，"醫學化學"，39卷，4756-4761頁(1996)。初速度於421毫微米處在0.06-0.12吸光度變化範圍內由進程曲線的直線迴歸測定。此範圍代表分析時約5%作用物之耗用。根據以下方程式測定喹啉酮的抑制百分率

$$\text{抑制百分率} = 100 \left\{ 1 - \frac{[\text{速度(I)} - \text{速度(陰性對照)}]}{[\text{速度(陽性對照)} - \text{速度(陰性對照)}]} \right\}$$

在上述方程式中，專門術語"陰性對照"指的是以1%二甲亞砷(但無單胺氧化酶)進行的完全分析。專門術語"陽性對照"指的是以1%二甲亞砷(但無抑制劑)進行的完全分析。專門術

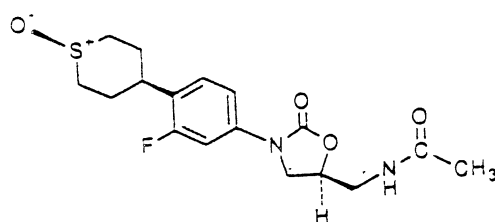
語"速度(I)"指的是在完全分析條件下的反應速度。專門術語"速度(陰性對照)"指的是在陰性對照條件下的反應速度。專門術語"速度(陽性對照)"指的是在陽性對照條件下的反應速度。在微滴定板篩選格式中評估單個喹啉酮的單胺氧化酶抑制活性之例子中，進行兩份陽性對照平行測定分析和兩份陰性對照平行測定分析，以得到平均對照速度。在微量滴定板用於導出喹啉酮抑制劑的抑制常數(Ki)之例子中，每板包含無抑制劑(陽性對照)的四至八孔。這些速度取平均值，得到該板的平均未抑制對照速度。每個抑制劑測試六至八個濃度。確定每個濃度與未抑制對照速度相對比的抑制百分率。由於喹啉酮為單胺氧化酶之競爭性抑制劑，用以下方程式從初速度計算出解離常數：

$$\text{抑制百分比} = 100[I] / ([I] + K_i(1 + [S]/K_{m(s)}))$$

參見：I.H. Segal，"酶動力學"，957卷，105頁，(1975)。Wiley Interscience. NY, NY。此方程中，[S]指的是顯色作用物的濃度；[I]指的是喹啉酮抑制劑的濃度；以及Km(s)指的是單胺氧化酶作用物的解離常數。在實踐中，來自抑制劑實驗的數據點根據非線性最小二乘迴歸是適合該方程式的。用可迴歸方法估算Ki參數及其標準誤。Ki值小表明受試抑制劑具有與單胺氧化酶緊密結合的能力，故為強效單胺氧化酶抑制劑。

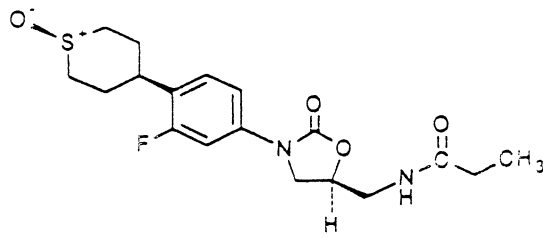
本發明的化合物及其製劑與以下實例相聯繫時便可較好理解，這些例子是意指本發明範圍的說明，而並非其限制因素。

實例 1 [4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺之製備。



在 40 磅/英寸² 氬氣下在甲醇(164 毫升)中的 (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(3,6-二氫-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺之 S-氧化物(4.50 克，可按照在國際公告號世界專利 97/09328 中公佈的步驟得到)和氧化鉑(697 毫克)混合物在帕爾儀器內搖動 18 小時。然後經賽力特硅藻土過濾去除催化劑，減壓濃縮濾液，殘餘物在硅膠(230-400 篩目，350 克)上行色譜術，以甲醇/二氯甲烷(3/97-7/93)梯度洗脫。合併並以薄層色譜法(甲醇/氯仿，10/90)濃度這些部份， $R_f=0.44$ ，得到標題化合物，mp 203-204°C。

實例 2 [4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺之製備



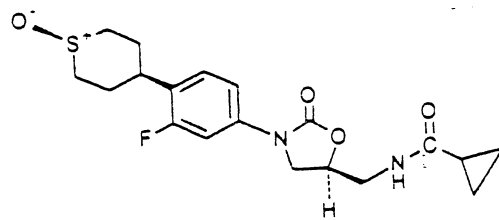
第1步：[4(S)-順式]-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮之製備。

在吡啶 (30.6 毫升) 和乙醇 (3.4 毫升) 中的 [4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺 (實例 1, 2.50 克) 和羥胺鹽酸鹽 (2.36 克) 之混合物在螺旋蓋小瓶內於 100°C 攪拌 22 小時並於室溫攪拌 16 小時, 在此期間添加額外的羥胺鹽酸鹽 (944 毫克) 和吡啶 (4 毫升)。反應混合物然後減壓濃縮, 以飽和碳酸氫鈉水溶液 (100 毫升) 和鹽水 (50 毫升) 稀釋, 以固體碳酸鈉調節 pH 至 11, 並以甲醇/二氯甲烷 (10/90, 5 × 100 毫升) 萃取。合併的有機相減壓濃縮, 粗製產物在矽膠 (230-400 篩目, 150 克) 上行色譜法, 以甲醇/二氯甲烷 (6/94-10/90) 梯度洗脫。合併並以薄層色譜法 (甲醇/氯仿, 10/90) 濃縮這些部份, $R_f=0.14$, 得到標題化合物, mp 159-161°C。

第2步：[4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺之製備。

在二氯甲烷中的[4(S)-順式]-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮(實例2, 第1步, 150毫克)、丙酸酐(62微升)和吡啶(75微升)溶液於氮氣下攪拌66小時, 在此期間添加額外的丙酸酐(12微升)。反應混合物然後以水(15毫升)稀釋, 並以二氯甲烷(2×20毫升)萃取, 合併的有機相以鹽水(10毫升)洗滌, 以無水硫酸鈉乾燥, 減壓濃縮, 得到粗製產物, 在矽膠(230-400篩目, 35克)上行色譜法, 以甲醇/二氯甲烷(3/97-5/95)梯度洗脫。合併並以薄層色譜法(甲醇/氯酚, 10/90)濃縮這些部份, $R_f=0.51$, 並從二氯甲烷/乙醚再結晶, 得到標題化合物, mp 212-214°C (分解)。

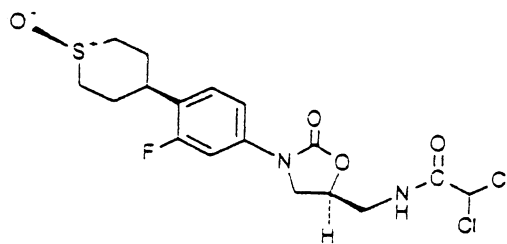
實例3 [4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-噁唑啉基]甲基]環丙烷羧醯胺之製備。



在二氯甲烷(3.1毫升)中的[4(S)-順式]-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮(實例2, 第1步, 250毫克)和三乙胺(0.16毫升)溶液於0°C在氮氣下以環丙烷羧醯氯(73微升)處理, 並於0°C攪拌2小時。反應混合物然後以二氯甲烷(25毫升)稀釋, 以水(10毫升)和鹽水(10毫升)洗

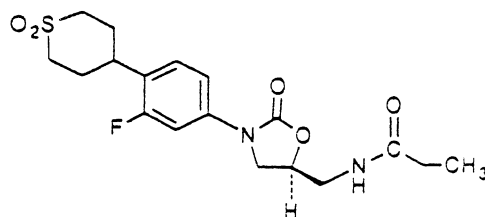
滌，以無水硫酸鈉乾燥，並減壓濃縮，得到粗製產物，在硅膠(230-400篩目，40克)上行色譜法，以甲醇/二氯甲烷(5/95)洗脫。合併並以薄層色譜法(甲醇/氯仿，10/90)濃縮這些部份， $R_f=0.65$ ，隨後以二氯甲烷/乙醚(50/50)研磨並過濾，得到標題化合物，mp 242-243°C(分解)。

實例4 [4(S)-順式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺之製備。



按照實例3的一般步驟，進行非關鍵性變動，但得到標題化合物，mp 198-200°C(分解)。

實例5 (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1,1-二氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺之製備。



第1步：(S)-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1,1-二氧橋-2H-噻喃-4-基)

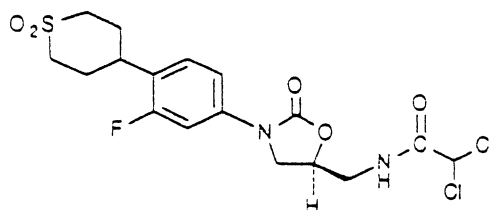
苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮之製備。

按照實例2第一步的一般步驟，進行非關鍵性變動，但以(S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺S,S-二氧化物(可按照在國際公告號世界專利97/09328中公佈的步驟而得到)取代[4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺，得到標題化合物，mp 194°C(分解)。

第2步：(S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1,1-二氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧化-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺

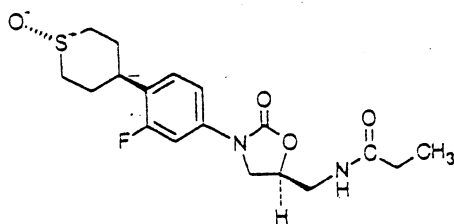
按照實例2第2步的一般步驟，進行非關鍵性變動，但以(S)-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1,1-二氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮(實例5，第1步)取代[4(S)-順式]-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮，並使其有2小時的反應時間，得到標題化合物，mp 200-201°C。

實例6 (S)-(-)-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1,1-二氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺之製備。



按照實例3的一般步驟，進行非關鍵性變動，但以二氯乙醯氯取代環丙烷碳醯氯，並以(S)-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1,1-二氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮(實例5，第1步)取代[4(S)-順式]-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮，以甲醇/氯仿(2/98)對粗製產物行色譜法，得到標題化合物，mp 136-137°C(分解)。

實例7 [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺之製備。



第1步：(S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺之製備。

按照實例1的一般步驟，進行非關鍵性的變動，但合併並以薄層色譜法(甲醇/氯仿，10/90)濃縮這些部份， $R_f=0.67$ ，得到標題化合物，mp 202-205°C。C₁₇H₂₁FN₂O₃S分析計算：C, 57.94；H, 6.01；N, 7.95；S, 9.10。測得：C, 57.95；H, 5.98；N, 7.94；S, 8.97。

第2步：[4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺之製備。

在二氯甲烷(35毫升)中的(S)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺生料(實例7, 第1步, 2.50克)於0°C在氮氣下以兩份MCPBA(2.16克, 純度<85%, <10.64毫莫耳)處理。使所得混合物加熱至室溫, 攪拌20小時, 在此期間添加額外的MCPBA(360毫克, 純度<85%, <1.77毫莫耳)。反應物然後以二氯甲烷(50毫升)稀釋, 以飽和碳酸氫鈉水溶液(50毫升)稀釋, 水相以甲醇/二氯甲烷(2×50毫升, 5/95)再萃取, 合併的有機相以鹽水(25毫升)洗滌, 以無水硫酸鈉乾燥, 並減壓濃縮。粗製反應混合物在矽膠(230-400篩目, 350克)上行色譜法, 以甲醇/二氯甲烷(3.5/96.5-5/95)梯度洗脫, 合併並以薄層色譜法(甲醇/氯仿, 10/90)濃縮這些部份, $R_f=0.42$, 得到順式和反式亞砜產物的混合物。以後經高效液相色譜法(Chiralcel OD柱, 乙醇洗脫)純化, 隨後以二氯甲烷/乙醚(50/50)研磨, 得到標題化合物, mp 211-212°C。

第3步: [4(S)-反式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基]-2-噁唑啉酮之製備。

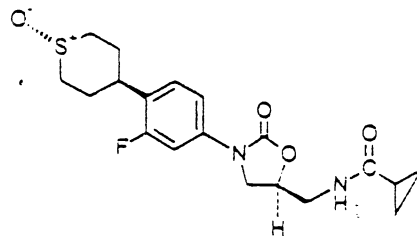
按照實例2第1步的一般步驟, 進行非關鍵性變動, 但以[4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺取代[4(S)-順式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧

代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺，得到標題化合物，mp為138-140°C。

第4步：[4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]丙醯胺之製備。

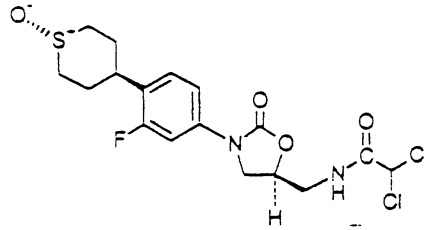
按照實例2第2步的一般步驟，進行非關鍵性變動，但以[4(S)-反式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮取代[4(S)-順式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮，得到標題化合物，mp 200-202°C (分解)。

實例8 [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]環丙烷羧醯胺之製備。



按照實例3的一般步驟，進行非關鍵性變動，但以[4(S)-反式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮取代[4(S)-順式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮，得到標題化合物，mp 189-191°C。

實例 9 [4(S)-反式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑啉基]甲基]乙醯胺之製備。



按照實例 3 的一般步驟，進行非關鍵性變動，但以二氯乙醯胺取代環丙烷碳醯氯，並以 [4(S)-反式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮取代 [4(S)-順式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氫-1-氧橋-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-胺基甲基-2-噁唑啉酮，得到標題化合物，mp 206-208 °C (分解)。

實例 10 噁唑啉酮對人類單胺氧化酶 A 抑制活性之評估人類單胺氧化酶 A 的溶解和純化形式以及作用物得自美國維吉尼亞州布萊克斯堡維吉尼亞技術大學化學系 Dr. Neal Castagnoli Jr. 實驗室。

緩衝液配製：配製磷酸鈉作為 50 mM 儲存液，於 37°C 時 pH=7.3。配製受試化合物：受試化合物的儲存液 (50 mM) 以二甲亞砷配製。以二甲亞砷連續稀釋 50 mM 儲存液，以得到範圍從 20 mM 至 0.3125 mM 的額外儲存液。這些儲存液然後冷凍直至需用時。在分析時，這些儲存液稀釋 100 倍，成為最後

酶分析時的體積。顯色作用物的10 mM儲存液以50 mM磷酸鹽緩衝液製備，分裝成等份，然後冷凍，直至應用時。

酶分析-初速分析在SPECTRAmax 250微滴定板分光光度計(Molecular Devices Corp., 森尼韋爾，加利福尼亞州，美國)中進行。分析溶液的最後組合物包含0.05 M磷酸鈉(pH=7.3)、80 μ M作用物、抑制劑濃度範圍直至500 μ M、1%二甲亞砷以及在421毫微米處產生0.0005-0.005吸光度變化的足量酶。反應於37°C進行。隨後記錄在421毫微米處的吸光度增值。在啟動反應前，抑制劑與單胺氧化酶A在反應混合物中預保溫15分鐘。使用以上方程式從初速數據測定Ki值。結果示於表1中。

表1

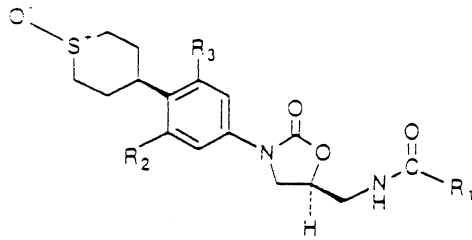
體外抗金黃色葡萄球菌UC®No.9213和革蘭氏陰性細菌流感嗜血桿菌的活性，以及人類單胺氧化酶A的抑制活性數據

Example No.	最小抑制濃度 (μ g/mL) S. aureus (UC 9213)	最小抑制濃度 (μ g/mL)H. influenzae 30063	Ki(μ M)
1	4	8	648
2	8	16	> 3000
3	8	16	734
4	2	8	2570
5	4	8	3000

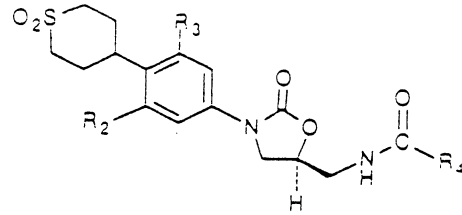
5	4	8	3000
6	2	2	> 3000
7	4	4	905
8	8	16	> 3000
9	1	2	396

伍、中文發明摘要：

本發明提供用作抗微生物劑的式I和式II化合物，其中R₁為甲基、乙基、環丙基或二氯甲基；R₂和R₃分別為氫或氟；R₄為乙基或二氯甲基。



I

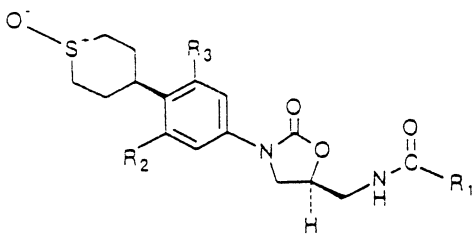


II

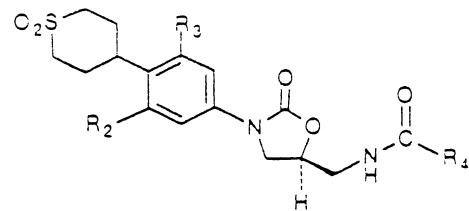
本發明係有關測定噁唑啉酮對人類單胺氧化酶抑制活性的新穎分析法。

陸、英文發明摘要：

The present invention provides compounds of formula I and formula II useful as antimicrobial agents wherein R₁ is methyl, ethyl, cyclopropyl, or dichloromethyl; R₂ and R₃ are independently hydrogen or fluoro; R₄ is ethyl or dichloromethyl.



I



II

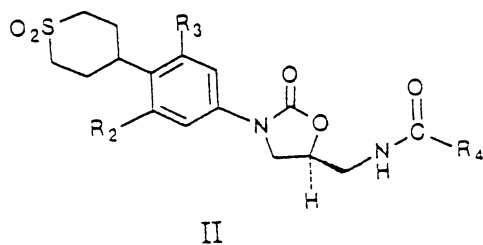
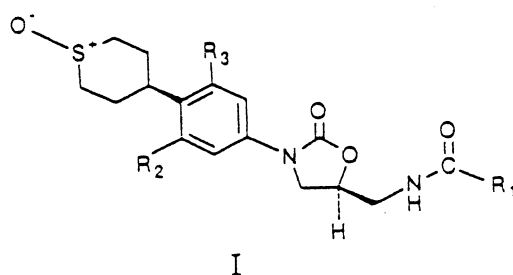
The invention relates to a novel assay for determining the inhibitory activity of oxazolidinones to human monoamine oxidase.

柒、指定代表圖：無

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



拾、申請專利範圍：

1. 一種分析可能具有單胺氧化酶抑制活性之化合物的方法，其包括以下步驟：
 - a) 在 pH 值 7.0 至約 7.5 的緩衝液內培育潛在的抑制劑與單胺氧化酶；
 - b) 添加 1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氫吡啶至該培育液內；並
 - c) 測定該喹啉酮之單胺氧化酶抑制活性。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該抑制劑為喹啉酮抗生素。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該緩衝液為磷酸鹽緩衝液。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該緩衝液之 pH 值為 7.3。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中培育時間為 10 至 30 分鐘。
6. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該單胺氧化酶為單胺氧化酶 A。
7. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該單胺氧化酶為單胺氧化酶 B。
8. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該喹啉酮之最

後濃度從 1 mM 至 1 nM。

9. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該單胺氧化酶足以在 421 毫微米處產生每分鐘 0.0005-0.05 的吸光度變化。
10. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該作用物之濃度從 50 μ M 至 500 μ M。
11. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該分析法在分光光度計中進行。
12. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該分析法在微滴定板分光光度計中進行。

I239331

拾壹、圖式：