

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D413/10

A61K 31/38 A61K 31/42



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98811069.5

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1154645C

[22] 申请日 1998.11.23 [21] 申请号 98811069.5

[30] 优先权

[32] 1997.12.5 [33] US [31] 60/067,830

[32] 1998.6.16 [33] US [31] 60/089,498

[32] 1998.9.14 [33] US [31] 60/100,185

[86] 国际申请 PCT/US1998/024526 1998.11.23

[87] 国际公布 WO1999/029688 英 1999.6.17

[85] 进入国家阶段日期 2000.5.11

[71] 专利权人 法玛西雅厄普约翰美国公司

地址 美国密执安州

[72] 发明人 T·J·波尔 J·P·小马丁

M·R·巴巴奇恩

审查员 刘文霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

商标事务所

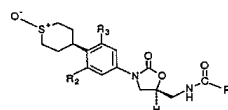
代理人 郭建新

权利要求书 3 页 说明书 19 页

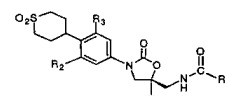
[54] 发明名称 S-氧化物和 S,S-二氧化物四氢噻喃苯基噁唑烷酮

[57] 摘要

本发明提供了式 I 和式 II 化合物，它们是有用的抗微生物剂，其中 R₁ 是甲基、乙基、环丙基或二氯甲基；R₂ 和 R₃ 独立地是氢或氟；R₄ 是乙基或二氯甲基。本发明也涉及新颖的用于测定噁唑烷酮对人单胺氧化酶的抑制活性的方法。



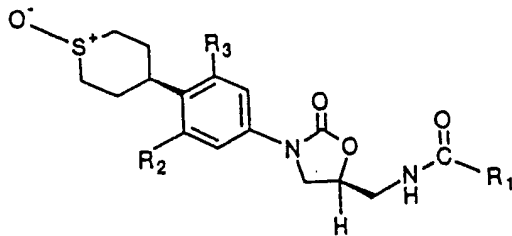
I



II

ISSN 1008-4274

1. 式 I 化合物



I

或其药学上可接受的盐，其中：

R₁ 是

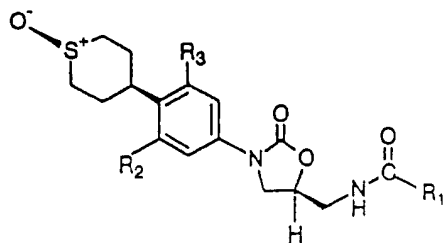
- a) 甲基,
- b) 乙基,
- c) 环丙基, 或
- d) 二氯甲基;

R₂ 是氟;

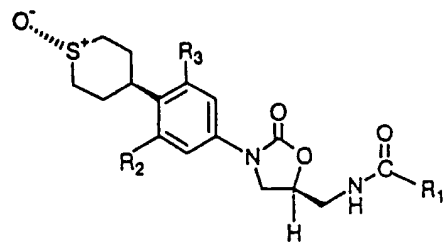
R₃ 是氢。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 R₁ 是甲基。

3. 权利要求 1 中的式 I 化合物，该化合物是



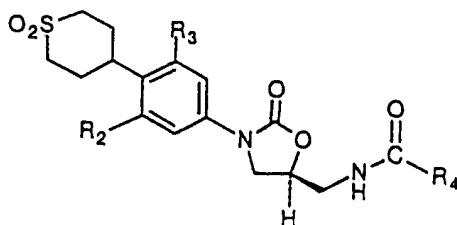
4. 权利要求 1 中的式 I 化合物，该化合物是



5. 权利要求 1 的化合物, 该化合物是

- a. [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺,
- b. [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺,
- c. [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]环丙烷甲酰胺,
- d. [4(S)-顺式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺,
- e. [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺,
- f. [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]环丙烷甲酰胺, 或
- g. [4(S)-反式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺。

6. 式 II 化合物



II

或其药学上可接受的盐, 其中:

R₂是氟;

R₃是氢;

R₄是

a) 乙基, 或

b) 二氯甲基。

7. 权利要求6的化合物, 该化合物是

a. (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺, 或

b. (S)-(-)-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺。

8. 如权利要求1中所示的式I化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗人或其他温血动物微生物感染的药物中的用途。

9. 如权利要求6中所示的式II化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗人或其他温血动物微生物感染的药物中的用途。

10. 权利要求8的用途, 其中所述药物被制成口服、胃肠外、透皮或局部给药的药物组合物。

11. 权利要求9的用途, 其中所述药物被制成口服、胃肠外、透皮或局部给药的药物组合物。

12. 权利要求8的用途, 其中所述药物包含约0.1至约100mg/kg体重/天的量的所述化合物。

13. 权利要求9的用途, 其中所述药物包含约0.1至约100mg/kg体重/天的量的所述化合物。

S-氧化物和 S, S-二氧化物四氢噻喃苯基噁唑烷酮

发明领域

本发明涉及硫氧化的四氢噻喃 N-苯基噁唑烷酮化合物，其中的苯基噁唑烷酮部分是通过碳-碳键与噻喃环连接的。本发明也涉及新颖的测定噁唑烷酮对人单胺氧化酶的抑制活性的方法。

发明背景

噁唑烷酮抗菌剂是一类新颖的合成抗微生物剂，它对一些人和兽病原体具有有效的对抗活性，包括革兰氏阳性需氧菌（例如多耐药性葡萄球菌和链球菌），革兰氏阴性需氧菌（例如流感嗜血杆菌和卡他球菌），以及厌氧生物（例如拟杆菌和梭菌类），耐酸性生物（例如结核分支杆菌和鸟分支杆菌）。还已知作为一类化合物，噁唑烷酮抑制单胺氧化酶(MAO)，该酶负责防止由内源性和来自饮食的胺即酪胺引起的急性血压升高。因此，需要发现具有最小 MAO 抑制活性的噁唑烷酮抗生素，以排除由可能的药物-药物相互作用引起的有关副作用。而且，为了测定噁唑烷酮抗生素的 MAO 抑制活性，目前人们的兴趣还在于开发一种高通过量的筛选测定法。

信息公开

国际公报 WO 97/09328；未决美国申请 08/696, 313 号公开了具有与 4-8 元杂环连接的 C-C 键的苯基噁唑烷酮，这些化合物在属类上覆盖了本申请的化合物。

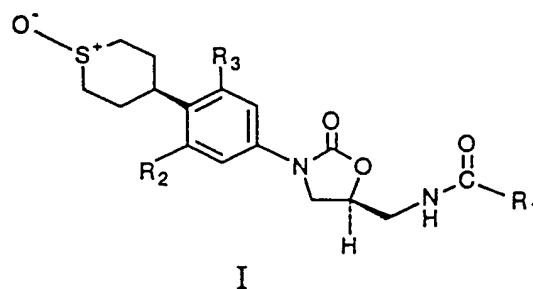
国际公报 WO 97/30995 公开了抗生的噁唑烷酮衍生物。

其他公开了与苯基噁唑烷酮连接的芳族杂环的参考文献包括欧洲专利公开 No. 0352 781 A2、国际公报 WO 9309103-A1 和美国专利 5, 130, 316、5, 254, 577 和 4, 948, 801。

其他一般性的参考文献包括：Castagnoli Jr. 等，“1-甲基-1,2,3,6-四氢吡啶-4-基氨基甲酸酯衍生物的合成和选择性单胺氧化酶 B 的抑制性质：(R)-和(S)-正苜甲炔胺(Nordeprenyl)的有效前体药物”，《医药化学杂志》，39卷，4756-4761页(1996)；Walter Weyler 和 J. I. Salach，“来源于人胎盘的 A 型线粒体单胺氧化酶的纯化和性质”，《生物化学杂志》，260卷，24期，13199-13207页(1985) (10/25/85)；J. I. Salach 和 Walter Weyler，“人胎盘和牛肝脏的含有黄素的芳族胺氧化酶的制备”，《酶学方法》，142卷，627-623页(1987)；Joseph J. P. Zhou 等，“单胺氧化酶 B 的直接连续性荧光测定”，《分析生物化学》，234卷，9-12页(1996)；Matthew J. Krueger 等，“单胺氧化酶 A 和 B 的放射化学测定的可靠性检查”，《分析生物化学》，214卷，116-123页(1993)；Keith F. Tipton 等，“评论—单胺氧化酶活性的放射化学测定—问题和易犯的错误”，《生物化学药理学》，46卷，8期，1311-1316页(1993)。

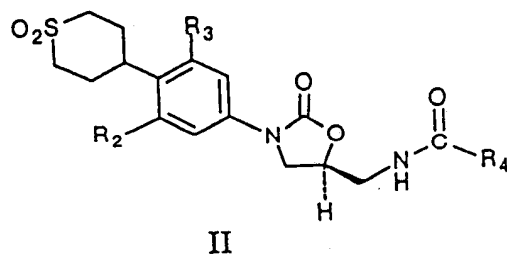
发明概要

一方面，本发明是式 I 化合物



或其药学上可接受的盐，其中 R_1 是甲基、乙基、环丙基或二氯甲基； R_2 和 R_3 是相同或不同的，是氢或氟。本发明的式 I 既包括反式异构体，也包括顺式异构体。

另一方面，本发明是式 II 化合物



或其药学上可接受的盐，其中 R_2 和 R_3 与上述定义相同； R_4 是乙基或二氯甲基。

优选地，在上式 I 中， R_1 是甲基或乙基。

优选地，在上式 II 中， R_4 是乙基。

还优选地，式 I 和 II 化合物是单氟化合物。

本发明优选的化合物是：

- a. [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺，
- b. [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺，
- c. [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]环丙烷甲酰胺，
- d. [4(S)-顺式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺，
- e. (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺，
- f. (S)-(-)-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺，
- g. [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺，
- h. [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]环丙烷甲酰胺，或
- i. [4(S)-反式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺。

更优选的化合物是[4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺。

另一方面，本发明提供了测定噁唑烷酮抗生素的 MAO 抑制活性的方法，该方法包括下列步骤：

a) 将噁唑烷酮与单胺氧化酶在 pH 值为约 7.0 至约 7.5 的缓冲溶液中温育；

b) 向所述温育溶液中加入 1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氢吡啶；和

c) 测定所述噁唑烷酮的单胺氧化酶抑制活性。

发明的详细说明

本发明提供了如上所定义的式 I 和式 II 的硫氧化的四氢噻喃苯基噁唑烷酮。该化合物是有用的抗微生物剂，有效对抗上文公开的一些人和兽病原体。特别是已经发现，尽管作为一类化合物的噁唑烷酮是人单胺氧化酶 A (MAO A) 和单胺氧化酶 B (MAO B) 的抑制剂，本发明化合物也具有并非例外的弱 MAO 抑制活性，这说明这些化合物具有最小化或排除可能的药物-药物相互作用的能力，因为对单胺氧化酶的强抑制作用能够改变其他在正常情况下通过该酶代谢的化合物的清除率，包括若干种药物。

本发明也提供了新颖的用于测定噁唑烷酮抑制人单胺氧化酶的能力的分光光度测定法。MAO A 和 MAO B 是位于线粒体外膜的膜结合黄素蛋白。这两种酶在催化生物所产生的和生物异源的胺的氧化脱氨基作用时，会选择不同的底物。历史上，已经使用两种不同的底物通过放射性终点（不连续）法测定了 MAO 酶。这些方法已经受到批评，因为在普遍的实践中，它们缺乏在通行的测定条件下的反应时间过程线性化的证据。这些方法的使用也是不适当的，因为在短时间内筛选大量化合物时，显得不够方便。该方法涉及多个操作步骤，包括反应产物的溶剂萃取。这些步骤导致所得数据不精确。参见：Matthew J. Krueger 等，“单胺氧化酶 A 和 B 的放射化学测

定的可靠性检查”，《分析生物化学》，214卷，116-123页(1993)；Keith F. Tipton 等，“评论—单胺氧化酶活性的放射化学测定—问题和易犯的错误”，《生物化学药理学》，46卷，8期，1311-1316页(1993)。

我们现在已经开发出一种连续性、可见的、高通过量筛选 MAO 的分光光度测定法，该方法基于显色底物 1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氢吡啶发生氧化反应的有色产物。该测定对 MAO-A 和 MAO-B 都是非常适合的。它是敏感的，线性的，对由于增溶和部纯化了的 MAO A 和 MAO B 所引起的低浊度水平也能耐受。反应产物在很多小时内都是稳定的，两种酶的反应速率都是时间和酶浓度的线性函数。该测定已经成功地适用于微量滴定板方式，因此能够在短时间内提供上千种供试噁唑烷酮化合物的信息。即使在用微量滴定板方式进行筛选时，也得到了关于在通行测定条件下的反应速率线性的准确信息。

另外，尽管噁唑烷酮化合物的 MAO 抑制活性评价是这项测定的最重要的用途，本发明也能用于检测任意的 MAO 酶抑制剂。

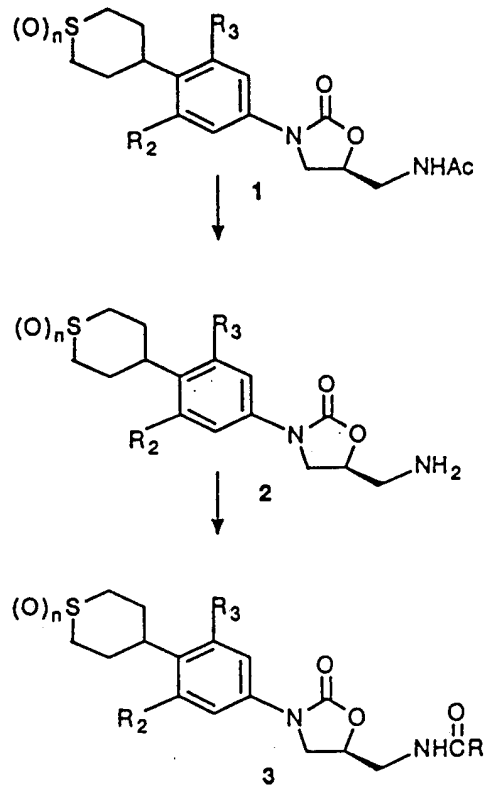
本发明意义上的术语“药学上可接受的盐”指的是可用于本发明化合物给药的盐，包括盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、磷酸盐、乙酸盐、丙酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、2-羟乙基磺酸盐、富马酸盐等。这些盐可以是水合形式。

本发明化合物可以按照下列本领域技术人员已知的方法根据流程 I 和 II 进行制备。简单地说，如流程 I 所示，N-乙酰基噁唑烷酮 1 与盐酸羟胺的水解反应例如得到胺 2。在碱的存在下，结构 2 化合物用酰氯或酸酐处理，得到 N-酰基噁唑烷酮 3，其中 n 是 1 或 2，R 是如上定义的 R₁ 或 R₄。其中 n 是 2 的结构 1 化合物可以按照国际公报 WO 97/09328 公开的程序得到；其中 n 是 1 的结构 1 化合物可以如流程 II 所示制备。

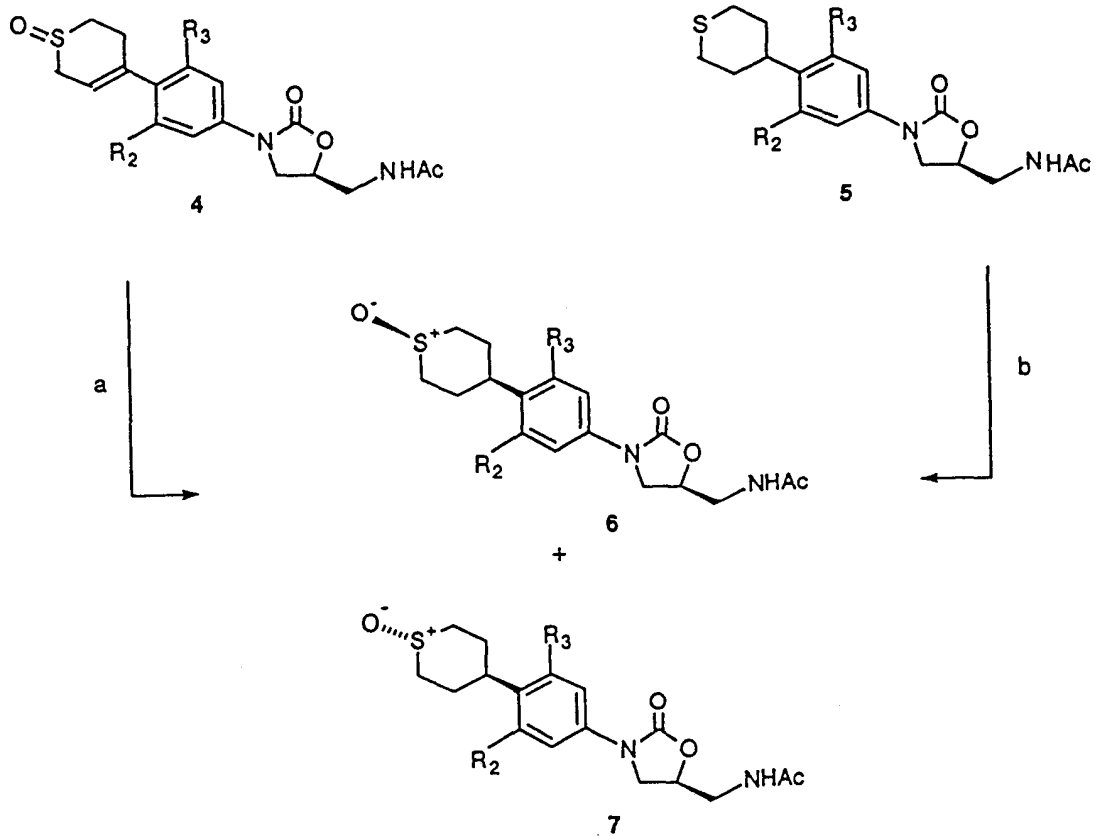
流程 II 中的化合物 4 可以按照国际公报 WO 97/09328 公开的程

序得到，在适当催化剂和适宜溶剂的存在下，它可被催化氢化作用还原为相应的顺式和反式亚砷 6 和 7，如途径 a 所述。或者，可以作为如途径 a 所示还原反应的副产物分离出硫化物 5 或者通过 6 或 7 与磺酸-碘化钠系统的还原反应合成硫化物 5，在适当溶剂中，它可被适当氧化剂氧化，例如 NaIO_4 或间氯过苯甲酸，得到 6 和 7，如流程 II 的途径 b 所述。6 和 7 的异构体混合物可以用色谱法分离。

流程 I



流程 II



这些化合物可用于人和其他温血动物微生物感染的治疗,包括眼科学感染,既可以胃肠外给药也可以口服给药。

本发明的药物组合物可以按照下列方法制备:利用标准和常规工艺,将本发明的式 I 和 II 化合物与固体或液体药学上可接受的载体混合,可选地还与药学上可接受的助剂和赋形剂混合。固体形式的组合物包括药剂、片剂、可分散的颗粒、胶囊、扁囊剂和栓剂。固体载体可以是至少这样一种物质,它也可以起到下列作用:稀释剂、矫味剂、增溶剂、润滑剂、悬浮剂、粘合剂、片剂崩解剂和包封剂。惰性固体载体包括碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、蔗糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、纤维索材料、低熔点蜡、可可脂等。液体形式

的组合包括溶液、混悬液和乳液。例如，所提供的本发明化合物的溶液可以是溶于水、水-丙二醇和水-聚乙二醇系统中的溶液，可选地含有适当的常规着色剂、矫味剂、稳定剂和增稠剂。

优选地，药物组合物是利用常规工艺所提供的单位剂型，含有有效量或适量活性组分，即根据本发明的式 I 或 II 化合物。

活性组分，即根据本发明的式 I 或 II 化合物在药物组合物及其单位剂型中的量可以是不同的或者是被广泛调节的，这取决于特定的应用、特定化合物的功效和所需浓度。一般来说，活性组分的量在 0.5% 至 90% 之间的范围内，以组合物重量计。

在治疗或对抗温血动物细菌感染的治疗用途中，该化合物或其药物组合物将以达到和维持一定浓度的剂量口服、局部、透皮和/或胃肠外给药，也就是说，活性组分在受治疗动物内的量或血液水平将是抗菌有效的。一般来说，活性组分剂量的该抗菌有效量是在约 0.1 至约 100、更优选为约 3.0 至约 50mg/kg 体重/天的范围内。可以理解的是，剂量可以因下列因素而异：患者的需要、所治疗细菌感染的严重性和所用的特定化合物。还可以理解的是，为了快速达到所需血液水平，初始给药剂量可以超过该上限水平，或者根据具体情况，初始剂量可以低于该最优值，在治疗过程中可以逐渐增加每日剂量。如果需要的话，每日剂量也可以分为多剂量给药，例如每天二至四次。

根据本发明的式 I 和 II 化合物是胃肠外给药的，即注射，例如通过静脉内注射或其他胃肠外给药途径。用于胃肠外给药的药物组合物一般含有药学上可接受量的根据式 I 或 II 的化合物的可溶性盐（酸加成盐或碱盐），溶解在一种药学上可接受的液体载体中，例如注射用水，还有缓冲剂，以提供适当缓冲的等渗溶液，例如具有约 3.5-6 的 pH。适当的缓冲剂包括例如正磷酸三钠、碳酸氢钠、柠檬酸钠、N-甲基葡糖胺、L(+)-赖氨酸和 L(+)-精氨酸，以上列举的仅是一部分代表性缓冲剂。根据式 I 或 II 的化合物一般溶解在载体中的量足以提供药学上可接受的可注射浓度，在约 1mg/ml 至约

400mg/ml 溶液的范围。所得液体药物组合物给药，以得到上述剂量的抗菌有效量。根据本发明的式 I 和 II 化合物有利地以固体和液体剂型口服给药。

本发明的噁唑烷酮抗菌剂具有对抗多种生物的有用活性。本发明化合物的体外活性可以用标准试验操作进行评估，例如利用琼脂稀释法测定最小抑制浓度(MIC)，见“Approved Standard. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically”，1993年第3版，National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, USA。本发明化合物对抗金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*) 的活性如表 1 所示。

用于测定 MAO 活性的连续性分光光度测定法基于显色底物 1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氢吡啶被 MAO 酶作用的有色氧化产物。该产物在室温下保持多日稳定。从 MAO 酶与底物混合开始，底物向氧化产物的转化被连续跟踪，初始反应速率曲线被直接观察。亮黄绿色氧化产物在 421nm 具有峰吸收，可以测量的宽带在 390nm 至 440nm 之间。因此，测定可以用最简单的分光光度设备进行。底物本身是无色的；在测定条件下也不会自发转化为产物；因此没有干扰背景速率。

测定是敏感的，即使底物浓度发生非常低水平的变化 (<1%) 也可以精确地测量速率。测定的敏感性允许测量可以针对非常低浓度的 MAO 酶进行，无论纯品或组织匀浆均可。测定对所有在 210-350nm 之间产生吸收的生物来源物质的背景干扰不敏感。

测定显示，反应速率对广泛 MAO 酶、底物和噁唑烷酮浓度以及对任意底物或酶浓度下的大部分进程曲线都是线性的。例如，测定显示，在下列条件下的反应速率都是线性的：最终噁唑烷酮浓度为约 1mM 至约 1nM；在 421nm 下足以产生 0.0005-0.05/分钟的吸光度变化的任意酶浓度；底物浓度为约 10 μ M 至约 10mM。即使在低酶浓度下，反应速率对长时间间隔（长达 90 分钟）也是线性的。这些性

质使高精确性的速率测定成为底物浓度、酶浓度或噁唑烷酮抑制剂浓度的函数。

测定可以在一种缓冲溶液中进行，后者不应对反应产生不利影响，并提供约 7.0 至 7.5 的 pH 值范围。优选的缓冲溶液是磷酸钠。用于测定的优选 pH 值为约 7.3。而且，测定优选在约 25℃ 至约 40℃ 的温度下进行。最优选的测定温度约为 37℃。

显色底物 1-甲基-4-(1-甲基-2-吡咯基)-1,2,3,6-四氢吡啶的制备方法可以见 N. Castagnoli Jr. 等《医药化学杂志》，39 卷，4756-4761 页(1996)，引用其作为参考文献。底物制备成 50mM 磷酸钠中的 10-15mM 储备溶液。溶液在冰上或冷冻保存，在测定时通常用 50mM 磷酸钠 (pH=7-7.5) 稀释 1/10-1/100。

将人胎盘 MAO A 增溶并纯化，例如参见 N. Castagnoli Jr. 等《医药化学杂志》，39 卷，4756-4761 页(1996)和 J. I. Salach 等《生物化学杂志》，260 卷，13199 页(1985)。人胎盘 MAO 以浓溶液 (5nmols/ml) 形式得到。将牛肝脏 MAO B 纯化，方法见 N. Castagnoli Jr. 等《医药化学杂志》，39 卷，4756-4761 页(1996)和 J. I. Salach 等《酶学方法》，142 卷，627-623 页(1987)。牛肝脏 MAO B 以浓溶液 (8nmols/ml) 形式得到。酶溶液的测定储备液是将原始储备溶液以 1/50 稀释在 50mM 磷酸钠和可选的 10%甘油中制备的。该溶液保存在冰上，直到最后稀释进行测定。或者，冷冻的 MAO 酶可以以 800-3200 倍稀释在 50mM 磷酸钠缓冲溶液中，然后立即使用。在筛选大量噁唑烷酮时，这种方法是有益的。

噁唑烷酮在 DMSO 中制备，浓度为 50mM。在 DMSO 中连续对 50mM 储备溶液进行稀释，得到另外的储备溶液，浓度为 20mM 至 0.3125mM。然后将储备溶液冷冻备用。在测定时将储备溶液以 1/100 稀释为最终酶测定体积。

通常，在测定前将酶、以及噁唑烷酮抑制剂在磷酸钠缓冲液中预温育约 15 分钟。反应从加入底物开始。一般经过一至六十分钟的间隔记录初始速度。

在用分光光度计比色杯评价单独噁唑烷酮的 MAO 抑制活性时，测定是完美的。测定也已经成功地适用于对高通过量的微量滴定板进行操作（即 96、384 和 1536 孔板读数器）。可以同时进行上百个测定。测定体积为 250 μ l，孔的有效通路长度为 0.75cm。一般来说，微量滴定板中测定的最终组成包含 0.05mM 磷酸钠 (pH=7.3)、浓度高至 500 μ M 的噁唑烷酮、1% DMSO、80 μ M 底物 (MAO A) 或 200 μ M 底物 (MAO B) 和足量的酶，以在 421nm 下产生每分钟 0.0005 至 0.050 的吸光度变化。反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行，通过在约 37 $^{\circ}$ C 下对板和储备溶液进行预温育可以实现测定溶液的快速温度平衡。反应后记录在 421nm 下吸光度的增加。氧化产物在 420 下的消光系数为 25,000 $M^{-1}cm^{-1}$ 。见 N. Castagnoli Jr. 等《医药化学杂志》，39 卷，4756-4761 页 (1996)。利用 421nm 下进程曲线对吸光度变化为 0.06-0.12 的线性回归来测定初始速率。该范围代表测定中的底物消耗约为 5%。由下列等式确定噁唑烷酮的百分抑制率：

$$\% \text{抑制率} = 100 \{1 - [\text{速率}(I) - \text{速率}(\text{阴性对照})] / [\text{速率}(\text{阳性对照}) - \text{速率}(\text{阴性对照})]\}$$

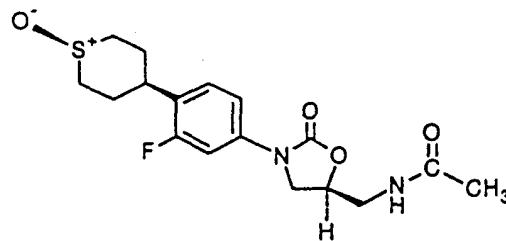
上式中，术语“阴性对照”指的是用 1% DMSO 但没有 MAO 酶进行的完整测定。术语“阳性对照”指的是用 1% DMSO 但没有抑制剂进行的完整测定。术语“速率(I)”指的是在完整测定条件下的反应速率。术语“速率(阴性对照)”指的是在阴性对照条件下的反应速率。术语“速率(阳性对照)”指的是在阳性对照条件下的反应速率。在以微量滴定板筛选方式评价单独噁唑烷酮的 MAO 抑制活性的情况下，分别重复进行两次阳性对照测定和两次阴性对照测定，计算平均对照速率。在微量滴定板方式用于导出噁唑烷酮抑制剂的抑制常数 (K_i) 的情况下，每板含有四至八个没有抑制剂的孔（阳性对照）。这些速率取平均，得到板的平均未抑制对照速率。每种抑制剂试验六至八个浓度。每种浓度的抑制百分率相对于未抑制的对照速率而言。由于噁唑烷酮是 MAO 酶的竞争性抑制剂，使用下列等式从初始速度数据计算离解常数 K_i ：

$$\%抑制率 = 100[I] / ([I] + K_i(1 + [S]/K_{m(s)}))$$

见 I. H. Segel, 《酶动力学》, 957 卷, 105 页 (1975), Wiley Interscience. NY, NY. 该等式中, [S]指的是显色底物的浓度; [I]指的是噁唑烷酮抑制剂的浓度; $K_{m(s)}$ 指的是 MAO 酶底物的离解常数。在实践中, 将从抑制剂实验得到的数据点用非线性最小平方回归分析拟合为该等式。用回归程序估算 K_i 参数及其标准偏差。低 K_i 值表示供试抑制剂具有紧密的与 MAO 酶结合的能力, 因此是强 MAO 抑制剂。

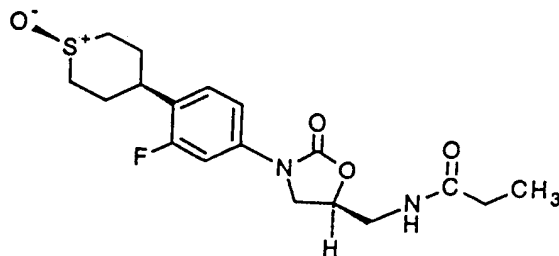
联系下列实施例有助于更好地理解本发明的化合物及其制备, 实施例意在阐述本发明, 而不是对发明范围的限制。

实施例 1: [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺的制备



在 6.9 千帕 (40psi) 氢气氛下, 将 (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(3,6-二氢-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺 S-氧化物 (4.50g, 可以按照国际公报 WO 97/09328 所公开的操作得到) 与氧化铂 (697mg) 在甲醇 (164ml) 中的混合物在帕尔仪器上摇动 18 小时。然后通过硅藻土过滤除去催化剂, 滤液在减压下浓缩, 残余物进行硅胶色谱 (230-400 目, 350g), 用甲醇/二氯甲烷 (3/97-7/93) 梯度洗脱。收集并浓缩 TLC (甲醇/氯仿, 10/90) $R_f=0.44$ 的级分, 得到标题化合物, mp 203-204°C。

实施例 2: [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺的制备



第 1 步: [4(S)-顺式]-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噁唑烷酮的制备

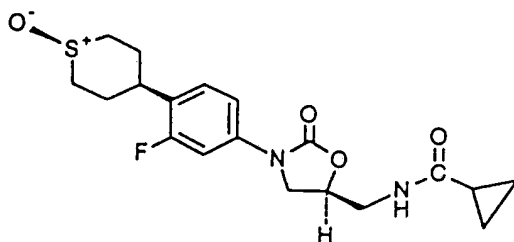
将 [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺 (实施例 1, 2.50g) 与盐酸羟胺 (2.36g) 在吡啶 (30.6ml) 与乙醇 (3.4ml) 中的混合物在 100 °C 螺帽小瓶中搅拌 22 小时, 然后在室温下搅拌 16 小时, 其间另加入盐酸羟胺 (944mg) 和吡啶 (4ml)。反应混合物然后在减压下浓缩, 用饱和含水碳酸氢钠 (100ml) 和盐水 (50ml) 稀释, 用固体碳酸钠调 pH 为 11, 用甲醇/二氯甲烷萃取 (10/90, 5 x 100ml)。合并后的有机相在减压下浓缩, 粗产物进行硅胶色谱 (230-400 目, 150g), 用甲醇/二氯甲烷 (6/94-10/90) 梯度洗脱。收集并浓缩 TLC (甲醇/氯仿, 10/90) $R_f=0.14$ 的级分, 得到标题化合物, mp 159-161 °C。

第 2 步: [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺的制备

将 [4(S)-顺式]-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噁唑烷酮 (实施例 2, 第 1 步, 150mg)、丙酸酐 (62 μ l) 与吡啶 (75 μ l) 的二氯甲烷溶液在氮气气氛下搅拌 66 小时, 其间另加入丙酸酐 (12 μ l)。反应混合物然后用水 (15ml) 稀释, 用二氯甲烷萃取 (2 x 20ml), 合并后的有机相用盐水 (10ml) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 在减压下浓缩, 得到粗产物, 进行硅胶色谱 (230-400 目, 35g), 用甲醇/二氯甲烷 (3/97-5/95) 梯度洗脱。收集并浓缩 TLC (甲醇/氯

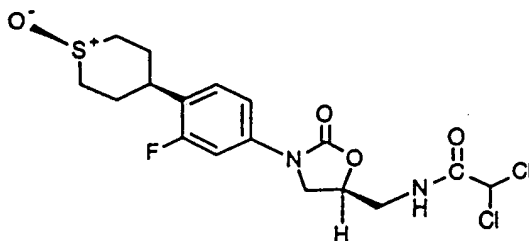
仿, 10/90) $R_f=0.51$ 的级分, 从二氯甲烷/二乙醚中重结晶, 得到标题化合物, mp 212-214°C (分解)。

实施例 3: [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]环丙烷甲酰胺的制备



将 [4(S)-顺式]-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氧甲基-2-噁唑烷酮 (实施例 2, 第 1 步, 250mg) 与三乙胺 (0.16ml) 在二氯甲烷 (3.1ml) 中的溶液在 0°C 氮气氛下用环丙烷碳酰氯 (73 μ l) 处理, 在 0°C 下搅拌 2 小时。反应混合物然后用二氯甲烷 (25ml) 稀释, 用水 (10ml) 和盐水 (10ml) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 在减压下浓缩, 得到粗产物, 进行硅胶色谱 (230-400 目, 40g), 用甲醇/二氯甲烷 (5/95) 洗脱。收集并浓缩 TLC (甲醇/氯仿, 10/90) $R_f=0.65$ 的级分, 然后用二氯甲烷/二乙醚 (50/50) 研制, 并过滤, 得到标题化合物, mp 242-243°C (分解)。

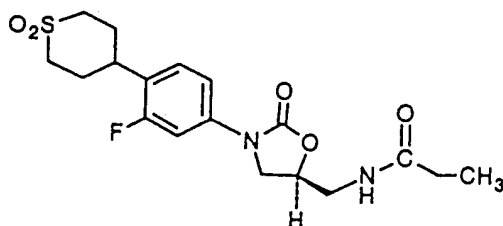
实施例 4: [4(S)-顺式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺的制备



按照实施例 3 的一般操作, 进行非关键性改变, 但是用二氯乙酰

氯代替环丙烷碳酰氯，得到标题化合物，mp 198-200℃ (分解)。

实施例 5: (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺的制备



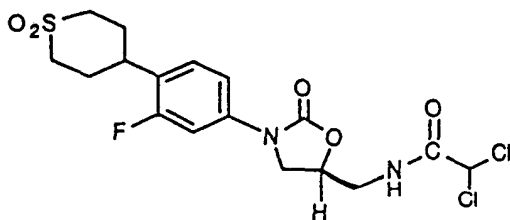
第 1 步: (S)-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噁唑烷酮的制备

按照实施例 2 第 1 步的一般操作，进行非关键性改变，但是用 (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺 S,S-二氧化物 (可以按照国际公报 WO 97/09328 所公开的程序得到) 代替 [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺，得到标题化合物，mp 194℃ (分解)。

第 2 步: (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺的制备

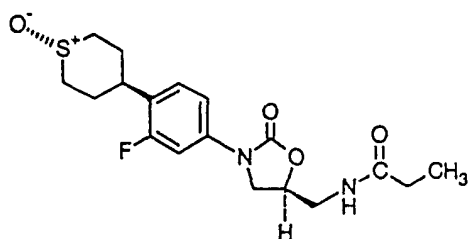
按照实施例 2 第 2 步的一般操作，进行非关键性改变，但是用 (S)-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噁唑烷酮 (实施例 5, 第 1 步) 代替 [4(S)-顺式]-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噁唑烷酮，并允许反应时间为 2 小时，得到标题化合物，mp 200-201℃。

实施例 6: (S)-(-)-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺的制备



按照实施例 3 的一般操作, 进行非关键性改变, 但是用二氯乙酰氯代替环丙烷碳酰氯, 用 (S)-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1,1-二氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基-2-噻唑烷酮(实施例 5, 第 1 步)代替 [4(S)-顺式]-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基-2-噻唑烷酮, 并用甲醇/氯仿 (2/98) 对粗产物进行色谱, 得到标题化合物, mp 136-137°C (分解)。

实施例 7: [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噻唑烷基]甲基]丙酰胺的制备



第 1 步: (S)-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噻唑烷基]甲基]乙酰胺的制备

按照实施例 1 的一般操作, 进行非关键性改变, 但是收集并浓缩 TLC 色谱(甲醇/氯仿, 10/90) $R_f=0.67$ 的级分, 得到标题化合物, mp 202-205°C. $C_{17}H_{21}FN_2O_3S$ 分析计算值: C, 57.94; H, 6.01; N, 7.95; S, 9.10; 实测值: C, 57.95; H, 5.98; N, 7.94; S, 8.97。

第 2 步: [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噻唑烷基]甲基]乙酰胺的制备

将 (S)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噻唑烷基]甲基]乙酰胺(实施例 7, 第 1 步, 2.50g) 在二氯甲烷 (35ml)

中的浆液在 0℃ 氮气气氛下用 MCPBA (2.16g, 纯度<85%, <10.64mmol) 分两部分处理。使所得混合物加温至室温, 搅拌 20 分钟, 其间另加入 MCPBA (360mg, 纯度<85%, <1.77mmol)。反应物然后用二氯甲烷 (50ml) 稀释, 用饱和含水碳酸氢钠 (50ml) 洗涤, 水相再用甲醇/二氯甲烷萃取 (2 x 50ml, 5/95), 合并后的有机相用盐水 (25ml) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 在减压下浓缩。粗反应混合物进行硅胶色谱 (230-400 目, 350g), 用甲醇/二氯甲烷 (3.5/96.5-5/95) 梯度洗脱, 收集 TLC (甲醇/氯仿, 10/90) $R_f=0.42$ 的级分, 浓缩得到顺式与反式亚砷产物的混合物。随后用 HPLC 纯化 (Chiralcel OD 柱, 乙醇洗脱剂), 然后用二氯甲烷/二乙醚 (50/50) 研制, 得到标题化合物, mp 211-212℃。

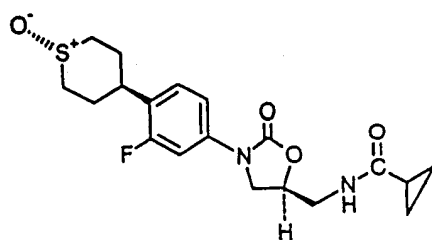
第 3 步: [4(S)-反式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基-2-噁唑烷酮的制备

按照实施例 2 第 1 步的一般操作, 进行非关键性改变, 但是用 [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺代替 [4(S)-顺式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]乙酰胺, 得到标题化合物, mp 138-140℃。

第 4 步: [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]丙酰胺的制备

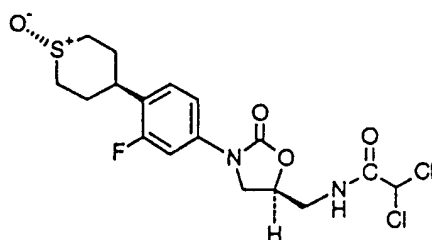
按照实施例 2 第 2 步的一般操作, 进行非关键性改变, 但是用 [4(S)-反式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基-2-噁唑烷酮代替 [4(S)-顺式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基-2-噁唑烷酮, 得到标题化合物, mp 200-202℃ (分解)。

实施例 8: [4(S)-反式]-(-)-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噁唑烷基]甲基]环丙烷甲酰胺的制备



按照实施例 3 的一般操作, 进行非关键性改变, 但是用[4(S)-反式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噻唑烷酮代替[4(S)-顺式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噻唑烷酮, 得到标题化合物, mp 189-191°C。

实施例 9: [4(S)-反式]-2,2-二氯-N-[[3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-2-氧代-5-噻唑烷基]甲基]乙酰胺的制备



按照实施例 3 的一般操作, 进行非关键性改变, 但是用二氯乙酰氯代替环丙烷碳酰氯, 用[4(S)-反式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噻唑烷酮代替[4(S)-顺式]-(-)-3-[3-氟-4-(四氢-1-氧桥-2H-噻喃-4-基)苯基]-5-氨基甲基-2-噻唑烷酮, 得到标题化合物, mp 206-208°C (分解)。

实施例 10: 噻唑烷酮对人 MAO-A 的抑制活性评价

增溶和纯化形式的人 MAO-A 和底物从 Dr. Neal Castagnoli Jr's lab in Department of Chemistry, Virginia Technical University, Blacksburg, Virginia 得到。

缓冲溶液的制备：制备磷酸钠的 50mM 储备溶液，37℃ 下 pH=7.3。供试化合物的制备：在 DMSO 中制备供试化合物的储备溶液 (50mM)。在 DMSO 中进行 50mM 储备溶液的连续稀释，形成另外的储备溶液，浓度范围为 20mM 至 0.3125mM。然后冷冻这些储备溶液备用。在测定时，将储备溶液以 1/100 稀释为最终酶测定体积。在 50mM 磷酸盐缓冲液中制备显色底物的 10mM 储备溶液，分成等份，然后冷冻备用。

酶测定-在 SPECTRAMax 250 微板分光光度计 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) 中进行初始速度测定。测定溶液的最终组成包含 0.05M 磷酸钠 (pH=7.3)、80 μ M 底物、浓度高至 500 μ M 的抑制剂、1% DMSO 和在 421nm 下足以产生 0.0005-0.005/分钟的吸光度改变的酶。反应在 37℃ 下进行。反应后记录 421nm 下吸光度的增加。在开始反应前将抑制剂与 MAO A 在反应混合物中预温育 15 分钟。使用上述等式，从初始速度数据测定 Ki 值。

结果也如表 1 所示。

表 1

抗金黄色葡萄球菌 UC® No. 9213 和革兰氏阴性细菌流感嗜血杆菌 30063 的体外活性和人 MAO A 的抑制活性数据

实施例 编号	MIC (μ g/ml) 金黄色葡萄球菌 (UC 9213)	MIC (μ g/ml) 流感嗜血杆菌 30063	Ki (μ M)
1	4	8	648
2	8	16	>3000
3	8	16	734
4	2	8	2570
5	4	8	3000
6	2	2	>3000
7	4	4	905
8	8	16	>3000
9	1	2	396