



(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 I447115 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：098115466

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 08 日

(51)Int. Cl. : C07D413/14 (2006.01)

A61K31/4709 (2006.01)

A61P31/04 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/09 世界智慧財產權組織 PCT/IB2008/051854

(71)申請人：艾克泰聯製藥有限公司 (瑞士) ACTELION PHARMACEUTICALS LTD. (CH)
瑞士(72)發明人：赫許威倫 克利斯提安 HUBSCHWERLEN, CHRISTIAN (FR)；洛赫 漢斯
LOCHER, HANS (CH)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 200829580A

WO 03/02560A1

WO 2004/096221A1

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：5 項 圖式數：1 共 0 頁

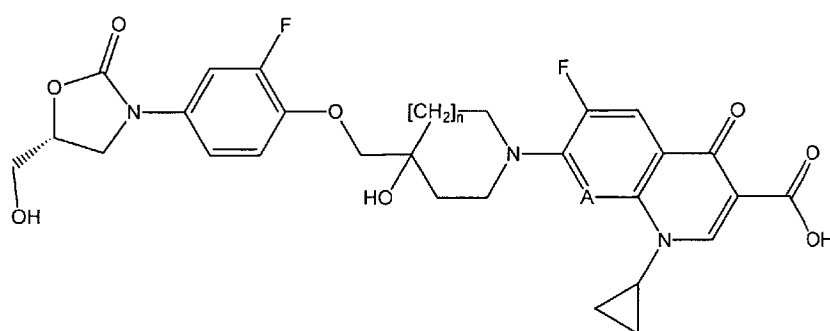
(54)名稱

用於治療細菌性腸疾病之 5-羥基甲基-噁唑啉-2-酮衍生物

5-HYDROXYMETHYL-OXAZOLIDIN-2-ONE DERIVATIVES FOR TREATING BACTERIAL
INTESTINAL DISEASES

(57)摘要

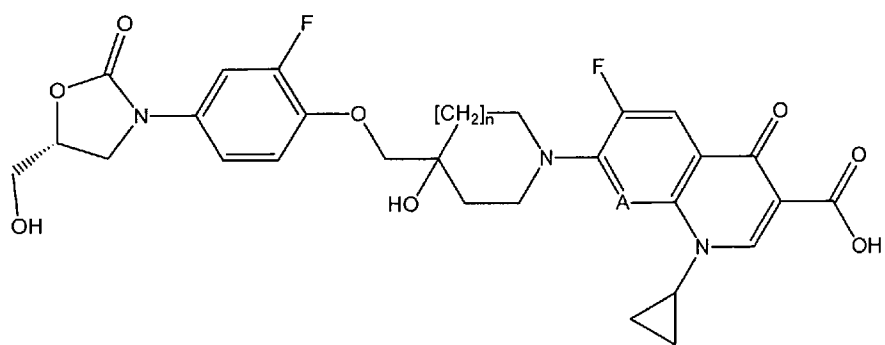
本發明係關於式 I 化合物



I

其中 A 係 N 或 CH；且 n 係 0 或 1；或其醫藥上可接受之鹽，其係用來預防或治療由選自難辨梭菌(*Clostridium difficile*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*) 或金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 之細菌引起之腸疾病。

The invention relates to the compounds of formula I



I

wherein A is N or CH; and n is 0 or 1; or the pharmaceutically acceptable salts thereof, for preventing or treating intestinal diseases which are caused by bacteria selected from *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* or *Staphylococcus aureus*.

(無元件符號說明)

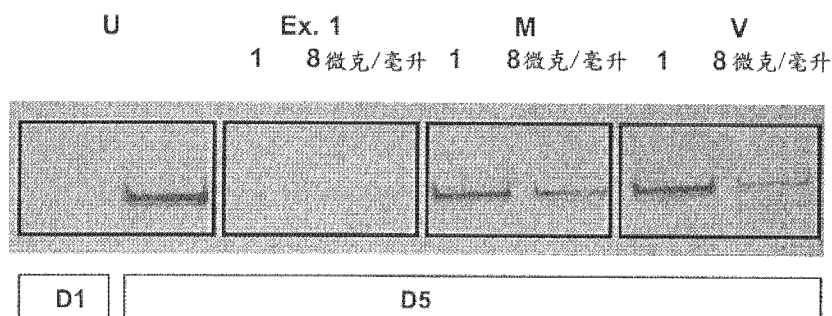
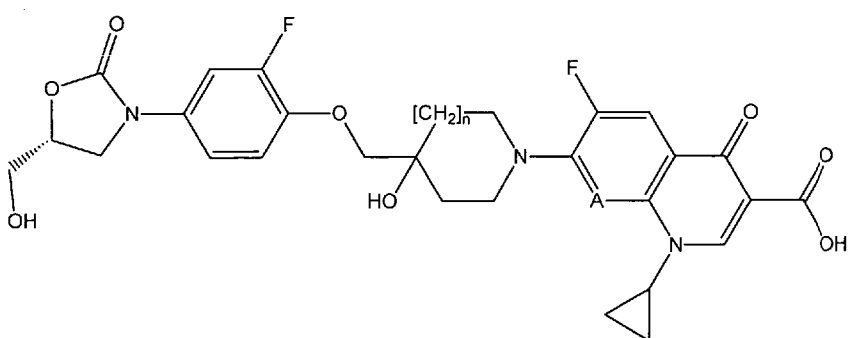


圖 1



I

發明專利說明書

(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： 98115466

※ 申請日： 98.5.8

※IPC 分類：C07D^{43/14} (2006.01)

A61K^{31/4709} (2006.01)

A61P^{31/04} (2006.01)

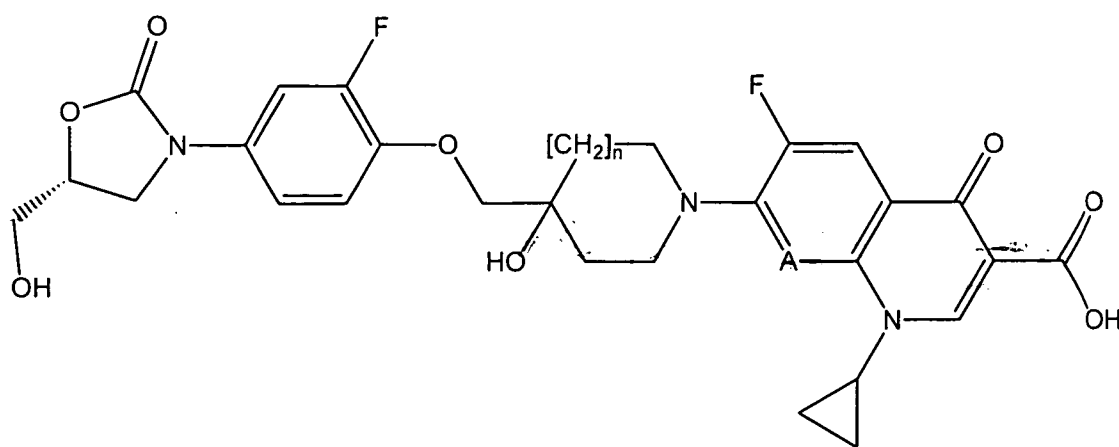
一、發明名稱：(中文/英文)

用於治療細菌性腸疾病之5-羥基甲基-噁唑啉-2-酮衍生物

5-HYDROXYMETHYL-OXAZOLIDIN-2-ONE DERIVATIVES FOR
TREATING BACTERIAL INTESTINAL DISEASES

二、中文發明摘要：

本發明係關於式I化合物



I

其中

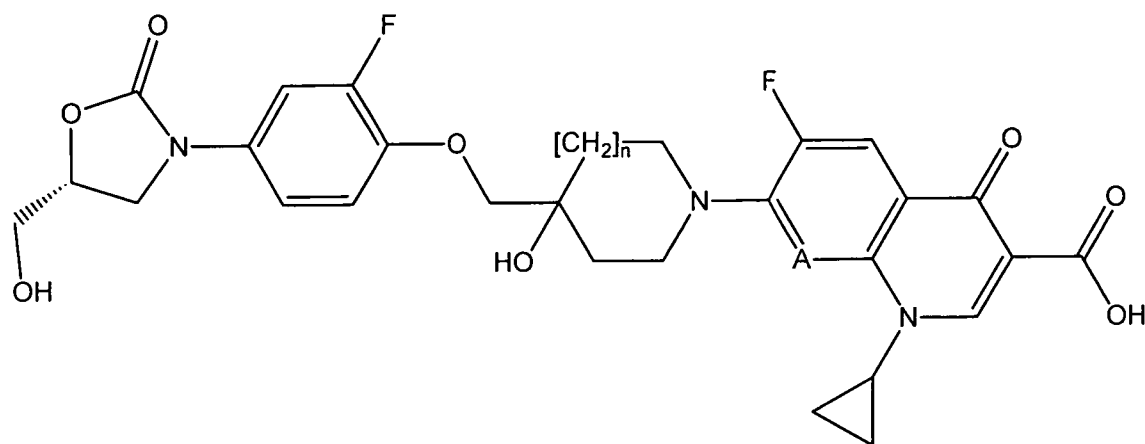
A係N或CH；且

n係0或1；

或其醫藥上可接受之鹽，其係用來預防或治療由選自難辨梭菌 (*Clostridium difficile*)、產氣莢膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 或金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 之細菌引起之腸疾病。

三、英文發明摘要：

The invention relates to the compounds of formula I



I

wherein

A is N or CH; and

n is 0 or 1;

or the pharmaceutically acceptable salts thereof, for preventing or treating intestinal diseases which are caused by bacteria selected from *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* or *Staphylococcus aureus*.

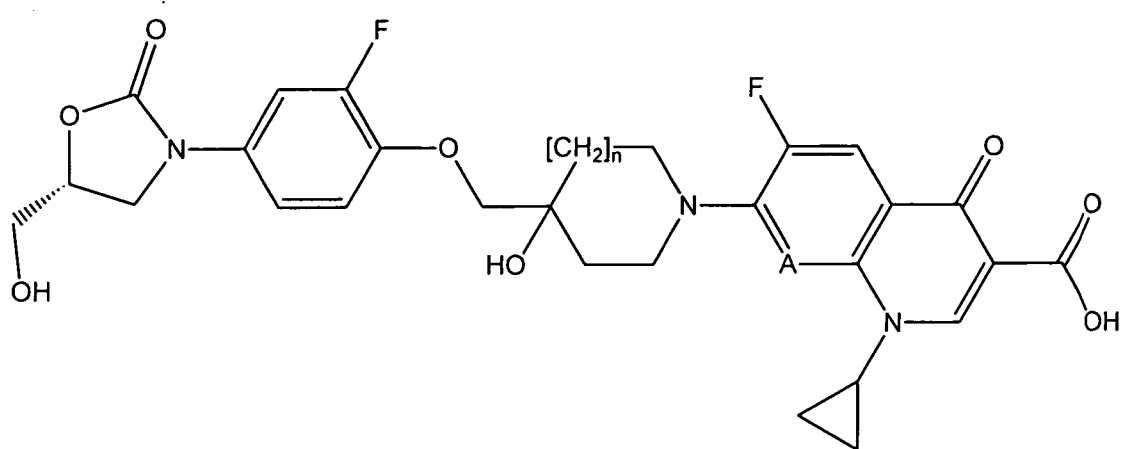
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

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：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於某些5-羥基甲基-呋唑啉-2-酮衍生物之用途，其係用來預防或治療藉由難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌引起之腸疾病。

【先前技術】

難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌之某些菌株產生引起腹瀉之毒素。該等產生毒素之菌株的出現通常與使用抗生素有關。

在該等菌株中，難辨梭菌係一種厭氧性可形成芽孢的革蘭氏(Gram)陽性菌，其產生兩種腸毒素(A及B)且不僅可引起腹瀉，而且會引起更嚴重腸病況，例如威脅生命之假膜性結腸炎(pseudomembranous colitis)。目前，在工業發達國家其係醫院及長期保健機構中最常見的感染性腹瀉源。近年來，其發病率逐漸增加且現在在北美及歐洲係重要的臨床問題。風險因素包含預先採用抗生素治療、年齡及由(例如)細胞毒性化學療法或器官移植導致之受損免疫系統。

當前用於治療與難辨梭菌有關之腹瀉(CDAD)的藥物係萬古黴素或甲硝唑(metronidazole)。然而，在兩種情況下皆觀察到高復發率且無法阻止毒素及芽孢之產生。此外，採用萬古黴素或甲硝唑治療係促進腸內出現耐萬古黴素之腸球菌屬(*Enterococcus spp.*)(糞腸球菌(*E. faecalis*)及屎腸球菌(*E. faecium*))及金黃色葡萄球菌菌株(分別係VRE及

VRSA)的另一因素(參見W.N. Al-Nassir等人, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 印刷前公開, 2008年4月28日)。腸球菌係棲居在胃腸道內之常見革蘭氏陽性球菌。然而, 其亦可成為重要的病原體, 導致心內膜炎及泌尿道、血流、及傷口感染。一旦獲得後, VRE可在腸道內寄居長達數年, 成為被寄居患者受到潛在感染及將VRE傳播至其他患者之源泉。感染難辨梭菌之患者可同時感染VRE, 或其更常見地在某些高風險患者中引發感染, 例如在血液病及腫瘤患者、重症監護患者、長期護理機構中的老年患者及接受實體器官移植之患者中引發感染。

因此, 對於CDAD及相關感染之情況, 業內需求更好的治療, 具體而言藉由確定具有較強的抗難辨梭菌活性之化合物, 該等化合物可明顯降低毒素負荷, 減少芽孢之產生並克服VRE, 同時對共生腸菌群具有較小影響。

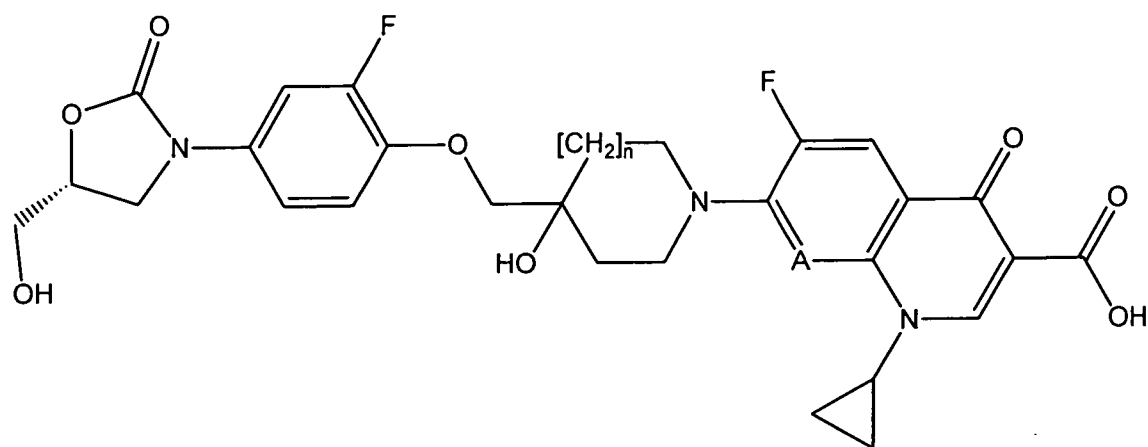
WO 03/032962、WO 2004/096221及WO 2005/058888揭示含有嘔唑啉部分及1-環丙基-6-氟-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸或1-環丙基-6-氟-4-側氧基-1,4-二氫-[1,8]噻啉-3-甲酸之抗細菌化合物。

此外, 如下文所定義之式I化合物及其抗細菌活性先前已闡述於PCT申請案第PCT/IB2007/054557號中。

【發明內容】

下文給出本發明各個實施例：

i) 根據其第一主要實施例, 本發明係關於式I化合物



I

其中

A 係 N 或 CH；且

n 係 0 或 1；

或其醫藥上可接受之鹽，其係用來預防或治療藉由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌之細菌引起的腸疾病。

【實施方式】

以下段落提供本文中所用各個術語之定義，且除非另有明確闡述之定義提供更廣或更窄之定義，否則，意欲在整個說明書及申請專利範圍中統一使用。

當提及一疾病用詞語「預防(preventing、prevent或prevention)」時意指患者或動物不會發生該疾病，或者儘管此動物或患者受該疾病影響，但該疾病之部分或全部症狀減少或不存在。

當提及一疾病用詞語「治療(treating、treat或treatment)」時意指治癒患者或動物之該疾病，或者儘管此動物或患者仍受該疾病影響，但該疾病之部分或全部症狀減少或消

除。

術語「醫藥上可接受之鹽」係指無毒、無機酸或有機酸及/或鹼加成鹽。可參照「Salt selection for basic drugs」, *Int. J. Pharm.* (1986), 33, 201-217。

術語「鹵素」係指氟、氯、溴及碘，且較佳係指氟或氯。

除非使用相關溫度，否則放在數值「X」前的詞語「約 (about)」在本申請案中係指自X減去X之10%延伸至X加上X之10%之間隔，且較佳係指自X減去X之5%延伸至X加上X之5%之間隔。在特定溫度情況下，放在溫度「Y」前的詞語「約」在本申請案中係指自溫度Y減去10°C 延伸至Y加上10°C 之間隔，且較佳地係指自Y減去5°C 延伸至Y加上5°C 之間隔；此外，在本專利申請案中室溫應意指25°C。

ii) 較佳地，如實施例i)中所定義之式I化合物或其醫藥上可接受之鹽將容許有效預防或治療與難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌之產腸毒素菌株有關之腹瀉疾病，而不增加腸內耐萬古黴素之腸球菌(VRE)的濃度。

iii) 更佳地，如實施例i)中所定義之式I化合物或其醫藥上可接受之鹽將容許有效預防或治療與難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌之產腸毒素菌株有關之腹瀉疾病並降低腸內VRE之濃度。

iv) 較佳地，如實施例i)至iii)中任一項所定義之式I化合物或其醫藥上可接受之鹽係A為CH者。

v) 亦較佳地，如實施例i)至iv)中任一項所定義之式I化

合物或其醫藥上可接受之鹽係n為1者。

vi) 根據實施例i)至iii)之較佳次級實施例，式I化合物或其醫藥上可接受之鹽將選自：

- 1-環丙基-6-氟-7-{4-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-呋唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-4-羥基-六氫吡啶-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸；

- 1-環丙基-6-氟-7-{4-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-呋唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-4-羥基-六氫吡啶-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-[1,8]噻啉-3-甲酸；

- 1-環丙基-6-氟-7-{3-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-呋唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-3-羥基-吡咯啉-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸；

及其醫藥上可接受之鹽。

vii) 根據實施例i)至iii)之更佳次級實施例，式I化合物或其醫藥上可接受之鹽將係1-環丙基-6-氟-7-{4-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-呋唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-4-羥基-六氫吡啶-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸或其醫藥上可接受之鹽。

viii) 根據實施例i)至vii)之一個態樣，本發明係關於如實施例i)至vii)中任一項所定義之式I化合物或其醫藥上可接受之鹽，其係用來治療由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病。

ix) 根據實施例viii)之一個較佳態樣，本發明係關於如實施例i)至vii)中任一項所定義之式I化合物或其醫藥上可

接受之鹽，其係用來治療由難辨梭菌(尤其由難辨梭菌之產生毒素之菌株)引起之腸疾病。

x) 根據實施例i)至vii)之另一主要態樣，本發明係關於如實施例i)至vii)中任一項所定義之式I化合物或其醫藥上可接受之鹽，其係用來預防由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病。

xi) 根據實施例x)之一個較佳態樣，本發明係關於如實施例i)至vii)中任一項所定義之式I化合物或其醫藥上可接受之鹽，其係用來預防由難辨梭菌(尤其由難辨梭菌之產生毒素之菌株)引起之腸疾病。

xii) 較佳地，其中實施例i)至xi)中所述之腸疾病意欲預防之患者係用其他抗生素或用抗病毒療法治療之患者、具有免疫受損系統之患者(例如細胞毒性化學療法或器官移植患者)、老年(65歲或更年老)患者、或重症監護或長期護理機構之患者。

xiii) 本發明另一主要實施例係關於預防或治療患者由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病的方法，該方法包括投與該患者有效量的如實施例i)至vii)中任一項所定義之式I化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽一段時間足以預防或治療腸疾病。

xiv) 較佳地，實施例xiii)之方法將容許有效預防或治療與難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌之產腸毒素菌株有關之腹瀉疾病，而不增加腸內耐萬古黴素之腸球菌(VRE)的濃度。

xv) 更佳地，實施例 xiii) 之方法將容許有效預防或治療與難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌之產腸毒素菌株有關之腹瀉疾病且降低腸內 VRE 之濃度。

xvi) 根據實施例 xiii) 至 xv) 之一個態樣，本發明係關於治療患者由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病的方法，該方法包括投與該患者有效量的如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽一段時間足以治療腸疾病。

xvii) 根據實施例 xvi) 之一個較佳態樣，本發明係關於治療患者由難辨梭菌(尤其由難辨梭菌之產生毒素之菌株)引起之腸疾病的方法。

xviii) 根據實施例 xiii) 至 xv) 之另一態樣，本發明係關於預防患者由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病之方法，該方法包括投與該患者有效量的如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽一段時間足以預防腸疾病。

xix) 根據實施例 xviii) 之一個較佳態樣，本發明係關於預防患者由難辨梭菌(尤其由難辨梭菌之產生毒素之菌株)引起之腸疾病之方法。

xx) 較佳地，經受實施例 xiii) 至 xix) 中一種方法之患者係用其他抗生素或用抗病毒療法治療之患者、具有免疫受損系統之患者(例如細胞毒性化學療法或器官移植患者)、老年(65歲或更年老)患者、或重症監護或長期護理機構之患者。

xxi) 本發明再一態樣係關於如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽之用途，其係用來製造意欲預防或治療由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病的藥劑。

xxii) 根據實施例 xxi) 之一個態樣，本發明係關於如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽之用途，其係用來製造意欲治療由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病的藥劑。

xxiii) 根據實施例 xxii) 之一個較佳態樣，意欲治療之腸疾病係由難辨梭菌(尤其由難辨梭菌之產生毒素之菌株)引起。

xxiv) 根據實施例 xxi) 之另一態樣，本發明係關於如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽之用途，其係用來製造意欲預防由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病的藥劑。

xxv) 根據實施例 xxiv) 之一個較佳態樣，意欲預防之腸疾病係由難辨梭菌(尤其由難辨梭菌之產生毒素之菌株)引起。

xxvi) 較佳地，根據實施例 xxi) 至 xxv) 中一個實施例所製造之藥劑意欲用於其之患者係用其他抗生素或用抗病毒療法治療之患者、具有免疫受損系統之患者(例如細胞毒性化學療法或器官移植患者)、老年(65歲或更年老)患者、或

重症監護或長期護理機構之患者。

xxvii) 本發明另一態樣係關於預防或治療動物(例如，狗、貓、豬、牛或馬)由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病的方法，該方法包括投與該動物有效量的如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽一段時間足以治療腸疾病。

xxviii) 根據實施例 xxvii) 之一個態樣，本發明係關於治療動物(例如，狗、貓、豬、牛或馬)由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病的方法，該方法包括投與該患者有效量的如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽一段時間足以治療腸疾病。

xxix) 根據實施例 xxvii) 之另一態樣，本發明係關於預防動物(例如，狗、貓、豬、牛或馬)由選自難辨梭菌、產氣莢膜梭菌及金黃色葡萄球菌之細菌引起之腸疾病的方法，該方法包括投與該患者有效量的如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或此化合物之醫藥上可接受之鹽一段時間足以預防腸疾病。

根據本發明實施例 i) 至 xxix) 欲預防或治療之腸疾病包括明顯腹瀉、大腸炎及假膜性結腸炎。較佳地，該等腸疾病係由難辨梭菌(且尤其由難辨梭菌之產生毒素之菌株)引起。

根據本發明實施例 i) 至 xxix) 所用式 I 化合物之最適宜投與路徑係經口路徑。可每天投與(例如，每天一至四次)或

可降低頻率(例如，每隔一天一次或每週一次或兩次)。

儘管如實施例 i) 至 vii) 中任一項所定義之式 I 化合物或其醫藥上可接受之鹽的確切投與劑量須由治療醫師或獸醫師確定，但預期 0.5 與 50 毫克之間式 I 化合物或其醫藥上可接受之鹽的量/公斤患者體重/天(例如，1 與 5 毫克之間式 I 化合物或其醫藥上可接受之鹽的量/公斤患者體重/天)每天給予一或兩次、持續時間 3-15 天(例如持續時間 7-14 天)係適宜的。

含有如實施例 i) 至 vii) 中一個實施例中所定義之式 I 化合物或其醫藥上可接受之鹽之醫藥組合物的製備可以任何熟習此項技術人員熟悉之方式(參見例如 Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 21 版(2005), 第 5 部分「Pharmaceutical Manufacturing」[由 Lippincott Williams & Wilkins 出版])藉由將所述式 I 化合物或其醫藥上可接受之鹽、視情況與其他有治療價值之物質組合連同適宜無毒惰性治療相容固體或液體載劑材料及若需要常用醫藥佐劑製成蓋侖製劑投與形式來達成。

式 I 化合物可根據本發明使用下文所述程序來製造。

式 I 化合物之製備

縮寫：

以下縮寫使用於整個說明書及實例中：

AcOH

乙酸

AD-混合物 α

1,4-雙(二氫奎寧)酞嗪、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 K_2CO_3
及 $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$

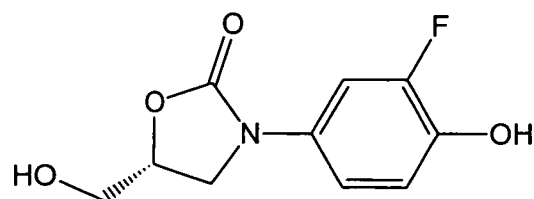
AD-混合物β	1,4-雙(二氫奎尼丁)酞嗪、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 K_2CO_3 及 $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$
Alloc	烯丙氧基羰基
aq.	含水
Boc	第三-丁氧基羰基
<i>t</i> -BuOK	第三丁醇鉀
Cbz	苄氧基羰基
CDAD	與難辨梭菌有關之腹瀉
CFU	菌落形成單位
CLSI	臨床實驗室標準委員會(Clinical Laboratory Standards Institute)
DBU	1,8-二氮雜二環[5.4.0]十一碳-7-烯
DCM	二氯甲烷
DIAD	偶氮二甲酸二異丙酯
DIPEA	<i>N,N</i> -二異丙基乙胺
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲醯胺
DMSO	二甲亞砜
EA	乙酸乙酯
EDC	1-(二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽
ESI	電噴霧離子化
醚或 Et_2O	二乙醚
FC	急驟層析法
h	小時

Hex	正己烷
IC50	使效果降低50%之濃度
LZD-R	耐利奈唑胺(linezolid -resistant)
MeCN	乙腈
MCPBA	間-氯過苯甲酸
MIC	抑制細菌生長之最低抑制濃度
MIC90	抑制≥90%菌株生長之最低抑制濃度
MRSA	耐甲氧西林(methicillin)之金黃色葡萄球菌
MeOH	甲醇
MS	質譜
NaOMe	甲醇鈉
NMP	N-甲基吡咯啉酮
OD595	在595 nM下量測之光學密度
org.	有機
Pd/C或Pd(OH) ₂ /C	炭上鈀或二羥基鈀
PPh ₃	三苯基膦
rt	室溫
sat.	飽和
SiO ₂	矽膠
TBDMSCl	第三丁基二甲基氯矽烷
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃
TMSCl	三甲基氯矽烷

通用製備方法：

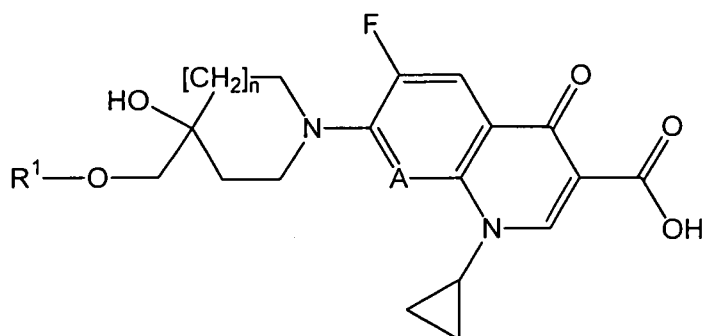
式I化合物可根據本發明由以下製造：

a) 使式II化合物



II

與式III化合物

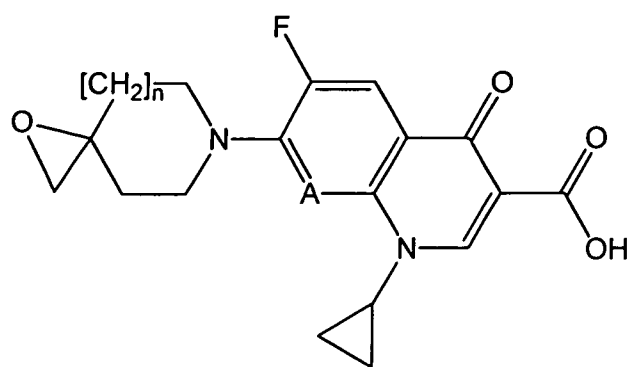


III

其中 n 及 A 如式I中所定義， R^1 係 (C_1-C_3) 烷基磺醯基 (例如 甲基磺醯基)、三氟甲基磺醯基或芳基磺醯基 (例如 苯基-或對-甲苯基-磺醯基)，較佳地在介於約 10°C 與 100°C 之間 (更佳地介於約 40°C 與 80°C 之間) 在無機鹼 (例如 K_2CO_3) 或有機鹼 (例如 TEA) 存在下於有機溶劑 (例如 DMF) 中反應；

或

b) 使式II化合物與式IV化合物反應

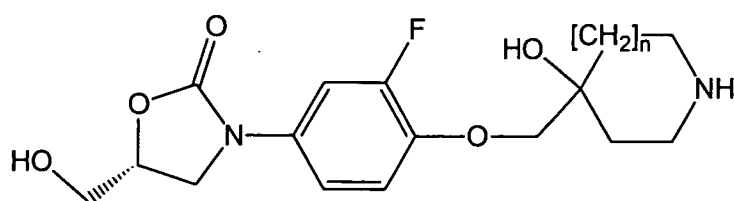


IV

其中 n 及 A 皆如式 I 中所定義，如 a) 部分中所述。該等式 IV 化合物可藉由在有機鹼(例如，TEA)或無機鹼(例如， K_2CO_3 或鹼金屬之甲醇鹽(例如 NaOMe) 或鹼金屬氫化物(例如 NaH)) 存在下於有機溶劑(例如，DMF) 中處理式 III 化合物來獲得；

或

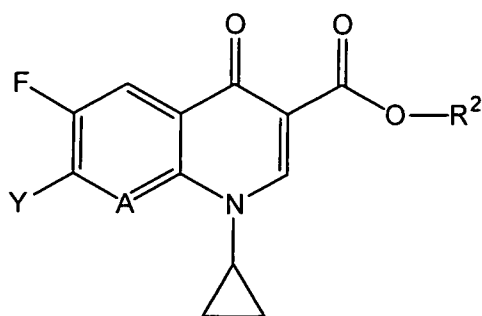
c) 使式 V 化合物



V

其中 n 如式 I 中所定義，

與式 VI 化合物

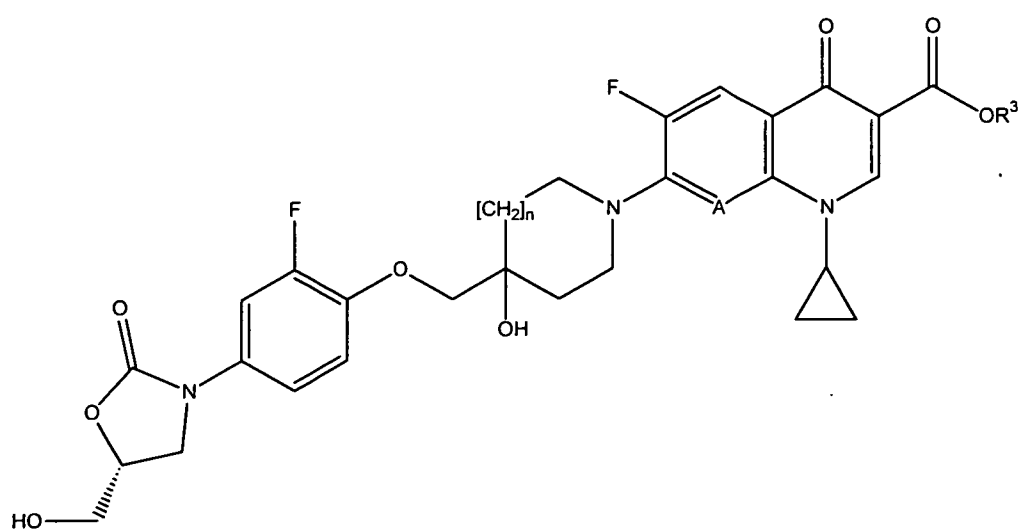


VI

其中 A 如式 I 中所定義，Y 係鹵素且 R^2 係氫、 BF_2 或 $B(OC(=O)(C_1-C_4)烷基)_2$ 、 (C_1-C_5) 烷基(例如，甲基、乙基、正丙基、異丙基或第三丁基)、烯丙基、芳基- (C_1-C_5) 烷基(例如，苄基、對硝基苄基或對甲氧基苄基)、三- (C_1-C_5) 烷基甲矽烷基(例如，三甲基甲矽烷基或第三丁基二甲基甲矽烷基)或二芳基- (C_1-C_5) 烷基甲矽烷基(例如，第三丁基二苯基甲矽烷基)，較佳地在介於約 $10^\circ C$ 與 $100^\circ C$ 之間、更佳地在介於約 $40^\circ C$ 與 $80^\circ C$ 之間在有機鹼(例如 TEA 或 DIPEA)存在下於有機溶劑(例如 NMP)中反應；

或

- d) 藉由水解、皂化或氫解使式 VII 化合物轉化為相應的式 I 化合物



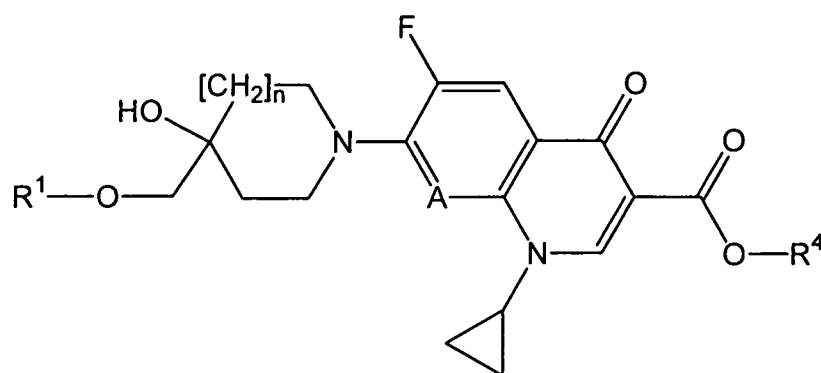
VII

其中 R^3 係 (C_1-C_5) 烷基(例如，甲基、乙基、正丙基、異丙基或第三丁基)、芳基- (C_1-C_5) 烷基(例如，苄基)

基、對硝基苄基或對甲氧基苄基)、烯丙基、三-(C₁-C₅)烷基甲矽烷基(例如，三甲基甲矽烷基或第三丁基二甲基甲矽烷基)或二芳基-(C₁-C₅)烷基甲矽烷基(例如，第三丁基二苯基甲矽烷基)且n及A皆如式I中所定義(例如，如 Protecting groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994)中所論述)。

關於以上製程，應注意以下：

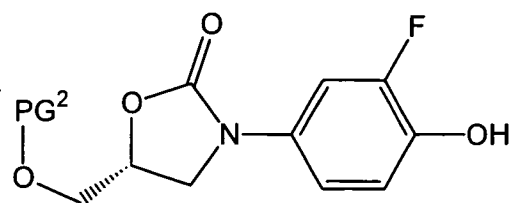
- ❖ 對於變化形式a)，式III化合物亦可由其酯即式III_E化合物替代



III_E

其中n、A及R¹皆如式III中所定義且R⁴表示烷基、烯丙基或芳基烷基，在該情況下酯去保護步驟應在式III_E化合物與式II化合物之反應之後實施(實施酯去保護步驟之常用方法已在Protecting groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994)中進行論述)；

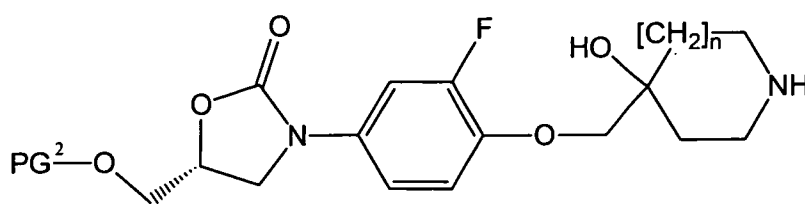
- ❖ 對於變化形式a)，式II化合物亦可由其甲矽烷基醚即式II_{PG}化合物替代



II_{PG}

其中PG²表示醇官能團之甲矽烷基保護基團，例如三-(C₁-C₅)烷基甲矽烷基(例如，三甲基甲矽烷基或第三丁基二甲基甲矽烷基)或二芳基-(C₁-C₅)烷基甲矽烷基(例如，第三丁基二苯基甲矽烷基)，在該情況下去保護步驟應在式III或III_E化合物與式II_{PG}化合物之反應之後實施(實施此等反應之常用方法已在Protecting groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994)中進行論述)；

❖ 對於變化形式c)，式V化合物亦可由式V_p化合物替代



V_P

其中n如式V中所定義且PG²表示醇官能團之保護基團(例如，烷基甲矽烷基或二芳基烷基甲矽烷基，例如三甲基甲矽烷基、第三丁基二甲基甲矽烷基或第三丁基二苯基甲矽烷基)，在該情況下適當去保護步驟應在式V_p化合物與式VI化合物之反應之後實施(實施此等反應之常用方法已在Protecting groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994)中進行論述)；

❖ 對於變化形式c)，當R²不為H時，需要另外酯去保護步

驟(實施此等反應之常用方法已在 Protecting groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994)中進行論述), 但其中 R^2 係 BF_2 或 $B(OC(=O)(C_1-C_4)烷基)_2$ 及其中在酸化處理期間已發生水解之情況除外。

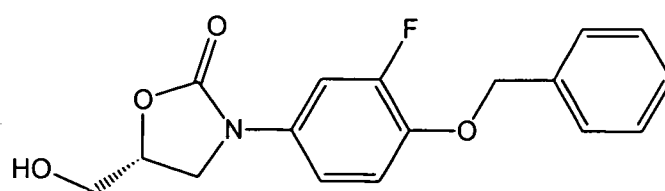
若需要, 如此獲得之式I化合物可轉化為其鹽、且尤其轉化為其醫藥上可接受之鹽。

除此以外, 當式I化合物以對映異構體之混合物形式獲得時, 對映異構體可使用為熟習此項技術者所習知之方法分離(例如, 藉由形成及分離非對映異構體鹽或藉由在對掌性固定相上層析)。當式I化合物以非對映異構體之混合物形式獲得時, 其可藉由矽膠層析、HPLC及結晶技術之適當組合來分離。

各種合成中間體之製備:

式II化合物之製備

式II化合物可藉由使式VIII化合物

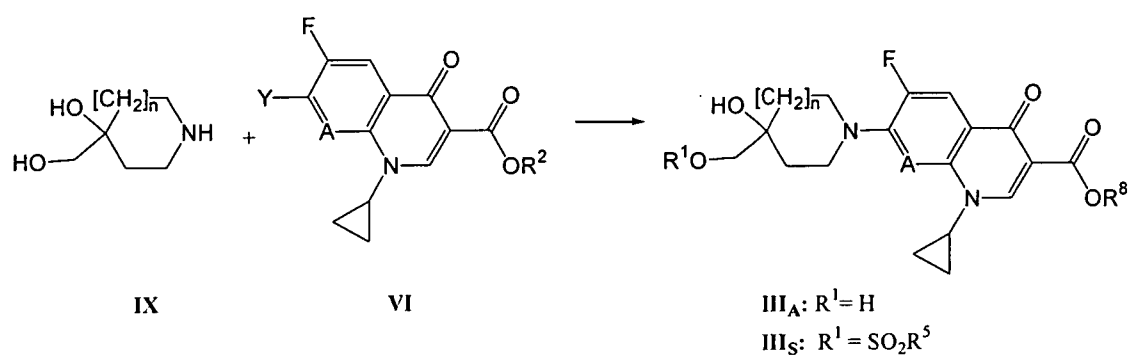


VIII

在貴金屬觸媒(例如炭上鈀或鉑)上於溶劑(例如 THF、MeOH或EA)中在介於 $0^{\circ}C$ 與 $40^{\circ}C$ 之間氫化、或藉由在HBr溶於水或AcOH之溶液存在下在介於 $0^{\circ}C$ 與 $80^{\circ}C$ 之間於溶劑(例如AcOH)中水解來獲得。

式III化合物之製備

式III化合物可如下文反應圖1中所概述來製備。



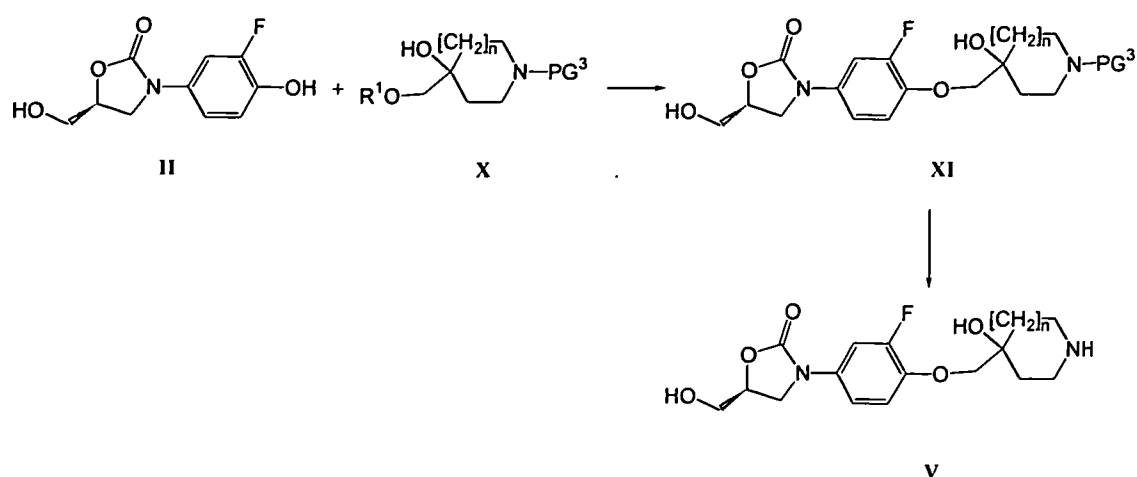
反應圖 1

在反應圖1中，R²係H、烷基、烯丙基或芳基烷基，且其他符號與上文相同。

其中R¹係SO₂R⁵(R⁵係烷基、三氟甲基或芳基(如苯基或對甲苯基))之式III化合物可由式III_A化合物(其中R¹係H)藉由在有機鹼(例如TEA)存在下於溶劑(例如DCM或THF)中在介於-10°C與50°C之間與相應磺醯氯反應來獲得(反應圖1)。式III_A化合物可藉由在有機鹼(例如TEA或DIPEA)存在下在介於40°C與100°C之間於溶劑(例如THF、DMF或NMP)中使式VI化合物與式IX之六氫吡啶或吡咯啶反應來製備。若R²係苄基，則式III_S之羧酸可根據如Protecting groups, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994)中所述之標準程序(例如，在Pd/C上氫化)來釋放。

式V化合物之製備

式V化合物可如下文反應圖2中所概述來製備。



反應圖 2

式 V 化合物可藉由使其中 PG^3 表示胺基保護基團 (例如烷氧基羰基 (例如, Boc)、苄氧基羰基 (例如, Cbz)、Alloc 或苄基) 之式 XI 化合物去保護來獲得。實施此第二胺之保護 / 去保護順序的常用方法已在 Protecting groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994) 中進行論述。

式 XI 化合物可藉由使式 II 化合物與式 X 化合物 (其中 R^1 係 SO_2R^5 , R^5 係烷基、三氟甲基或芳基 (如苯基或對甲苯基)) 反應、或藉由使式 II 化合物與衍生自式 X 化合物之相應環氧化物反應來獲得。在溶劑 (例如 THF、醚或 DCM) 中於介於 -10°C 與 40°C 之間用有機鹼 (例如 TEA、吡啶或 DBU) 或無機鹼 (例如 K_2CO_3) 處理後可自式 X 化合物 (其中 R^1 係 SO_2R^5) 獲得該等環氧化物。式 X 化合物 (其中 R^1 係 H) 可購得 (例如, 其中 $\text{PG}^3 = \text{Boc}$ 、 $n=1$ 及 $\text{R}^1 = \text{H}$ 之化合物 X, 或衍生自式 X 化合物 (其中 $\text{PG}^3 = \text{Boc}$, $n=0$) 之環氧化物) 或可如稍後所闡釋來製備。或者, 式 XI 化合物可藉由在 Mitsunobu 條件下使式 II 化合物與式 X 化合物 (其中 R^1 係 H) 反應來獲得。

式 VI 化合物之製備

式 VI 化合物 (其中 R^2 係 氫、Me 或 Et) 可購得 (例如，其中 $A=CH$ 、 $Y=Cl$ 及 $R^2=H$ 、Me 或 Et、或 $Y=F$ 及 $R^2=BF_2$ 之化合物，或其中 $A=N$ 、 $Y=Cl$ 及 $R^2=H$ 或 Et 之化合物)。式 VI 化合物 (其中 R^2 係 $B(OC(=O)(C_1-C_4)烷基)_2$) 可根據 WO 88/07998 由其中 R^2 係 H 之式 VI 化合物獲得。其他式 VI 化合物可根據標準方法由其中 R^2 係 H 之式 VI 化合物獲得。

式 VII 化合物之製備

式 VII 化合物可藉由在與彼等針對式 V 化合物與式 VI 化合物之反應所述者相同的條件下使式 V 化合物或者如前文所定義之式 V_p 化合物與如前文所定義之式 VI 化合物偶合來獲得，只是 R^2 表示 (C_1-C_5) 烷基 (例如，甲基、乙基、正丙基、異丙基或第三丁基)、芳基- (C_1-C_5) 烷基 (例如，苄基、對硝基苄基或對甲氧基苄基)、烯丙基、三- (C_1-C_5) 烷基甲矽烷基 (例如，三甲基甲矽烷基或第三丁基二甲基甲矽烷基) 或二芳基- (C_1-C_5) 烷基甲矽烷基 (例如，第三丁基二苯基甲矽烷基)。若使用式 V_p 化合物，則可在偶合反應後實施去保護步驟。

式 VIII 化合物之製備

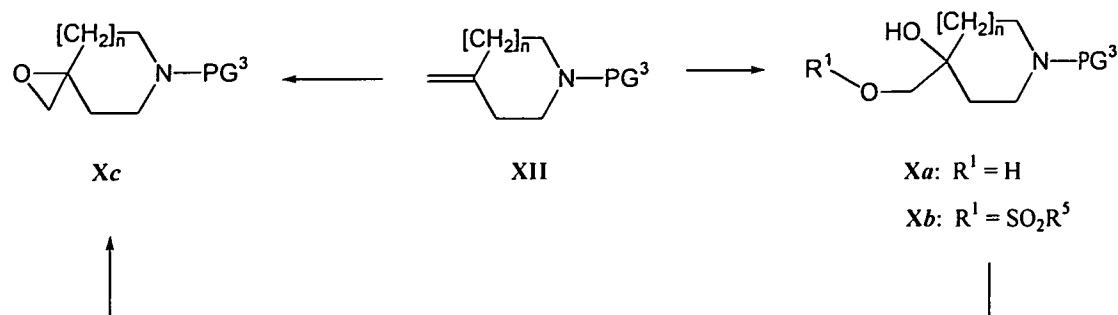
式 VIII 化合物可根據 WO 2004/096221 來獲得。

式 IX 化合物之製備

式 IX 化合物可藉由式 X 化合物 ($R^1=H$) 之去保護來獲得，例如藉由用 TFA 處理相應經 Boc 保護的化合物、或者藉由在 Pd/C 上氫化相應經 Cbz 保護的化合物。

式 X 化合物之製備

式X化合物可如下文反應圖3中所概述由式XII之亞甲基衍生物來製備。



反應圖3

式Xb化合物即其中R¹係SO₂R⁵之式X化合物係使用針對式III_A化合物轉化為式III_S化合物所用相同的方法由其中R¹係H之相應式Xa化合物來製備。式Xa化合物可藉由經四氧化鐵催化的順二羥基化或藉由其不對稱形式(使用AD-混合物α或β之廈普勒斯(Sharpless)二羥基化)如*J. Am. Chem. Soc.* (1988), 110, 1968中所述由習知式XII亞甲基衍生物(例如, 彼等其中n=0且PG³=苄基、Boc或苄氧基羰基者-參見歐洲專利第241206號及歐洲專利第550025號; 或彼等其中n=1且PG³=苄基、Boc者, 該等可購得)來獲得。式Xc化合物即衍生自式Xb化合物之環氧化物係藉由用無機鹼(例如K₂CO₃或NaH)或有機鹼(例如TEA或DBU)使式Xb化合物分子內環閉合、或藉由用過酸(例如MCPBA)使式XII化合物之亞甲基雙鍵環氧化來獲得。或者, 式Xc化合物亦可藉由在鹼金屬類氫氧化物(例如氫氧化鉀)存在下於極性溶劑(例如MeCN)中在介於20與100°C之間使相應氧代衍生物(當n=0或1且PG³=Cbz或Boc時, 其可購得)與三甲基碘化氧銻

或三甲基碘化銻反應來獲得(如 *J. Am. Chem. Soc.* (1965), 87, 1353-1364及 *Tetrahedron Lett.* (1987), 28, 1877-1878中所述)。

本發明具體實施例闡述於以下實例中，該等實例用來更詳細地闡釋本發明而不以任何方式限制其範圍。

實例

所有溫度皆以 $^{\circ}\text{C}$ 來說明。所有非對掌相上之分析型及製備型HPLC研究皆使用基於RP-C18之管柱來實施。分析型HPLC研究係在兩個不同儀器上實施，且循環時間分別為約2.5分鐘及約3.5分鐘。除非另有說明，否則表示MS之值等於主峰 $((\text{M}+\text{H})^{+})$ ，變化量為 ± 0.5 單位)。在NMR光譜中，偶聯常數J以Hz給出。

標準處理程序：

在適當有機溶劑中稀釋後(參見相應的實例文本)，分離有機相並用水及鹽水依次洗滌。在可溶於水溶劑(例如，MeOH、THF或DMF)中實施反應的情況下，採用與實施處理所用者相同的溶劑回洗經合併含水層。經合併有機相經 MgSO_4 乾燥並過濾。在減壓下蒸發濾液。

標準層析程序：

將粗材料溶於最少量的洗脫液中(參見相應的實例文本)並在 SiO_2 上層析。彙集相關部分並在減壓下蒸發。

實例1：1-環丙基-6-氟-7-{4-[2-氟-4-((*R*)-5-羥基甲基-2-側氧基-5噁唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-4-羥基-六氫吡啶-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸：

1.i. (R)-3-(3-氟-4-羥基-苯基)-5-羥基甲基-噁唑啉-2-酮：

將 (R)-3-(4-苄氧基-3-氟-苯基)-5-羥基甲基-噁唑啉-2-酮 (6.34 克，根據 WO 2004/096221 來製備) 溶於 THF/MeOH(1:1；200 毫升) 之溶液在 Pd/C 10%(1 克) 上氫化過夜。過濾觸媒，在減壓下蒸發濾液並使殘餘物在 EA 中攪拌。藉由過濾收集結晶，得到 3.16 克 (70% 產率) 無色固體。

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 3.5 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.74 (dd, J=8.8, 6.4, 1H), 3.99 (t, J=8.8, 1H), 4.64 (m, 1H), 5.16 (t, J=5.6, 1H), 6.93 (dd, J=9.7, 8.8, 1H), 7.08 (ddd, J=8.8, 2.6, 1.2, 1H), 7.45 (dd, J=13.5, 2.6, 1H), 9.66 (s, 1H)。

MS(ESI): 228.1.

1.ii. 4-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-噁唑啉-3-基)-苄氧基甲基]-4-羥基-六氫吡啶-1-甲酸苄基酯：

將中間體 1.i(1.27 克) 及 1-氧雜-6-氮雜-螺[2.5]辛烷-6-甲酸苄基酯(1.60 克；根據美國專利第 4244961 號來製備) 之溶液溶於 DMF(15 毫升) 中並用 Na₂CO₃(1.16 克) 處理。將混合物在 100°C 下加熱過夜。將處理(DCM)後所獲得之殘餘物在 EA 中攪拌，且藉由過濾收集固體並用 EA 及 Hex 依次洗滌，得到 2.52 克 (94.5% 產率) 淺褐色固體。

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1.57 (m, 4H), 3.14 (m, 2H), 3.54 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.79(m, 5 H), 4.03 (t, J=9.1, 1 H), 4.66 (m, 1 H), 4.78 (s, 1 H), 5.05 (s, 2 H), 5.16 (t, J=5.6, 1 H), 7.18 (m, 2 H), 7.32 (m, 5 H), 7.55 (d, J=12, 1 H)。

MS(ESI):475.0.

1.iii. (R)-3-[3-氟-4-(4-羥基-六氫吡啶-4-基甲氧基)-苯基]-5-羥基甲基-噁唑啉-2-酮:

將中間體 1.ii(2.5 克)存於 EA/MeOH(1:1; 100 毫升)中之懸浮液在 Pd/C 上氫化 48 小時。將懸浮液在 40°C 下加熱並過濾觸媒。在減壓下蒸發濾液，得到 1.61 克(89%產率)黃色粉末。

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1.4-1.63 (m, 4H), 2.67 (m, 2H), 2.83 (m, 2H), 3.53 (dd, J=4.0, 12.0, 1H); 3.66 (dd, J=3.3, 12.0, 1H), 3.71 (s, 2H); 3.80 (m, 1H), 4.05(t, J=9.0, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.68 (m, 1H), 5.20 (s, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.57 (d, 1H)。

MS(ESI):341.5.

1.iv. 1-環丙基-6-氟-7-{4-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-噁唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-4-羥基-六氫吡啶-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸:

將中間體 1.iii(200 毫克)、7-氟-1-環丙基-6-氟-1,4-二氫-4-側氧基-3-喹啉甲酸硼二乙酸鹽複合物(241 毫克; 根據 WO 88/07998 來製備)及 DIPEA(100 微升)溶於 NMP(2 毫升)中之溶液在 85°C 下攪拌 5 小時。在減壓下蒸發反應混合物並將殘餘物吸收於存於 MeOH(3 毫升)中之 5M HCl 中並實施攪拌。藉由過濾收集所得固體並用 MeOH 洗滌，以得到 230 毫克(67%產率)黃色固體。

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1.66-1.35 (m, 4H), 1.75 (d,

$J=12.8$, 2H), 1.95 (m, 2H), 3.33(t 寬峰, $J=11.0$, 2H), 3.57 (m, 3H), 3.67 (dd, $J=12.3$, 3.3, 1H), 3.83 (m, 2H), 3.92(s, 2H), 4.06 (t, $J=9.0$, 1H), 4.69 (m, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.90 (d, $J=13.3$, 1H), 8.66 (s, 1H)。

MS(ESI):585.9.

實例 2：1-環丙基-6-氟-7-{4-[2-氟-4-((*R*)-5-羥基甲基-2-側氧基-嘓唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-4-羥基-六氫吡啶-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-[1,8]噻啉-3-甲酸：

用 TEA(0.32 毫升)及 TMSCl 處理 7-氟-1-環丙基-6-氟-1,4-二氫-4-側氧基-1,8-噻啉-3-甲酸(166 毫克；市售)及中間體 1.iii(200 毫克)溶於 NMP(5 毫升)中之溶液並在 85°C 下加熱 5 小時。在減壓下蒸發反應混合物並將殘餘物吸收於存於 MeOH(3 毫升)中之 5M HCl 中並攪拌 30 分鐘。在減壓下蒸發溶液並將殘餘物吸收於 EA 中。藉由過濾收集所得固體並用 EA 進行洗滌，得到 271 毫克(78%產率)黃色固體。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 0.89-1.27 (m, 4H); 1.78 (d, $J=12.8$, 2H); 1.90-2.04 (m, 2H); 3.53-3.88 (m, 6H); 3.88 (s, 2H), 4.06 (t, $J=9.0$, 1H), 4.42 (d 寬峰, $J=13.2$, 2H), 4.44(m, 1H); 7.11 (m, 2H); 7.55 (d, $J=14.5$, 1H); 8.05 (d, $J=13.5$, 1H); 8.60 (s, 1H) ,

MS(ESI):586.8.

實例 3：1-環丙基-6-氟-7-{(*RS*)-3-[2-氟-4-((*R*)-5-羥基甲基-2-側氧基-嘓唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-3-羥基-吡咯啉-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸：

3.i. 二烯丙基-胺基甲酸苄基酯：

在0℃經30分鐘將苯甲醯氯(15.5毫升)逐滴添加至二烯丙基胺(12.3毫升)及TEA(21毫升)於DCM(100毫升)中之溶液中。反應混合物在室溫攪拌16小時。處理(DCM)後所獲得之殘餘物藉由層析(Hex/EA 95:5)純化以得到20.71克(88%產率)無色液體。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 3.83 (dt, $J=1$ 及 $J=6$, 4H); 5.05-5.18 (m, 6H); 5.70-5.86(m, 2H); 7.27-7.48 (m, 5H)。

3.ii. 2,5-二氫-吡咯-1-甲酸苄基酯：

在室溫於氮下將亞苄基-雙(三環己基膦)二氯鈦(5克)添加至中間體3.i(17.56克)於DCM(1.5升)中之溶液中。反應混合物在40℃攪拌2小時並在真空下濃縮。殘餘物藉由FC(Hex/EA 90:10)純化以得到14.08克(91%產率)黃色液體。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 4.05-4.16 (m, 4H); 5.08 (s, 2H); 5.81-5.92 (m, 2H); 7.27-7.41(m, 5H)。

3.iii. (RS)-3-羥基-吡咯啉-1-甲酸苄基酯：

在0℃於氮下將硼烷於THF(9毫升)中之1M溶液添加至中間體3.ii(1.81克)於THF(25毫升)中之溶液中。反應混合物在室溫攪拌16小時並冷卻至0℃。小心逐滴添加20% NaOH(1.8毫升)，隨後添加35%過氧化氫水溶液(1.2毫升)。混合物在0℃攪拌30分鐘且在室溫攪拌2小時。添加 Et_2O 及40%亞硫酸氫鈉水溶液並將反應混合物劇烈攪拌15分鐘。處理(Et_2O)後所得殘餘物藉由FC(Hex/EA 5:5至3:7)

純化，以得到1.01克(51%產率)無色油。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 1.67-1.82 (m, 1H); 1.82-1.96 (m, 1H); 3.16-3.25 (m, 1H); 3.28-3.44 (m, 3H); 4.20-4.29 (寬峰, 1H); 4.92 (d, $J=3$, 1H); 5.06 (s, 2H); 7.27-7.41 (m, 5H)。

3.iv. 3-側氧基-吡咯啉-1-甲酸苄基酯：

將中間體3.iii(1.10克)溶於DCM(8毫升)之溶液冷卻至 0°C 並逐滴添加DIPEA(2.5毫升)，隨後添加三氧化硫吡啶錯合物(1.79克)溶於DMSO(6.5毫升)之溶液。將反應混合物在 0°C 下攪拌1小時並藉由添加水(6毫升)淬滅。用 $\text{Et}_2\text{O}/\text{Hex}(1:1, 3 \times 5\text{毫升})$ 萃取含水層，並在真空下濃縮經合併有機層。藉由FC(Hex/EA 5:5)對處理($\text{Et}_2\text{O}/\text{Hex} 1:1$)後所得殘餘物實施純化，以得到1.05克(96%產率)微黃色油。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 2.48-2.61 (m, 2H); 3.61-3.80 (m, 4H); 5.09 (s, 2H); 7.27-7.41(m, 5H)。

3.v. 3-亞甲基-吡咯啉-1-甲酸苄基酯：

在室溫下於氮氣下將 $t\text{-BuOK}$ (617毫克)呈一份添加至溴化甲基三苯基磷(1.98克)存於THF(10毫升)中之白色懸浮液中。將黃色懸浮液在室溫下攪拌1小時且隨後冷卻至 -10°C 。經10分鐘逐滴添加中間體3.iv(1.05克)溶於THF(2毫升)之溶液並經2小時使反應混合物溫熱至室溫。藉由添加飽和含水 NH_4Cl (1毫升)淬滅反應並用EA進行稀釋。藉由層析(Hex/EA 90:10)對處理後所得殘餘物(EA)實施純化，以得

到 633 毫克 (64% 產率) 微黃色液體。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 2.48-2.61 (m, 2H); 3.36-3.53 (m, 2H); 3.84-4.01 (m, 2H); 4.97-5.03 (m, 2H); 5.08 (s, 2H); 7.27-7.41 (m, 5H)。

3.vi. 1-氧雜-5-氮雜-螺[2.4]庚烷-5-甲酸苄基酯：

在室溫下用 MCPBA (20.1 克) 及 NaHCO_3 (22.3 克) 處理中間體 3.v (7.21 克) 溶於 DCM (400 毫升) 之溶液。將反應在室溫下攪拌 2 小時，用 DCM (200 毫升) 稀釋並倒入 Na_2SO_3 (45 克) 溶於水 (400 毫升) 之溶液中。將混合物攪拌 10 分鐘並分離有機層。藉由 FC (Hex/EA 6:4) 對處理 (DCM) 後所得殘餘物實施純化，以得到 4.37 克 (56% 產率) 黃色油。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 1.70-1.83 (m, 1H); 2.22-2.37 (m, 1H); 2.90-2.94 (m, 1H); 2.95-2.99 (m, 1H); 3.15 (t, $J=11$, 1H); 3.39-3.77 (m, 3H); 5.09 (s, 2H); 7.27-7.41 (m, 5H)。

3.vii. (RS)-3-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-嘮唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-3-羥基-吡咯啉-1-甲酸苄基酯：

將 K_2CO_3 (274 毫克) 添加至中間體 1.i (300 毫克) 及中間體 3.vi (338 毫克) 存於 DMF (3 毫升) 之懸浮液中。將反應混合物在 80°C 下攪拌 3 小時並在真空下除去溶劑。藉由 FC (DCM/MeOH 95:5) 對處理 (DCM) 後所得殘餘物實施純化，以得到 531 毫克 (87% 產率) 淺褐色發泡體。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 1.80-1.92 (m, 1H); 1.96-2.08 (m, 1H); 3.32-3.59 (m, 5H); 3.66 (ddd, $J=3$, $J=6$ 及 $J=13$,

1H); 3.80 (dd, J=6及J=9, 1H); 3.97-4.09 (m, 3H); 4.64-4.72 (m, 1H); 5.07 (s, 2H); 5.19 (t, J=6, 1H); 5.23 (s, 1H); 7.18-7.23 (m, 2H); 7.27-7.38 (m, 5H); 7.57 (dd, J=2及J=14, 1H)。

MS(ESI):460.9.

3.viii. (R)-3-[3-氟-4-((RS)-3-羥基-吡咯啉-3-基甲氧基)-苯基]-5-羥基甲基-嘮唑啉-2-酮：

在室溫下將中間體3.vii(259毫克)溶於THF/MeOH(1:1；20毫升)之溶液在10% Pd/C(60毫克)上氫化20小時。將反應混合物在真空下濃縮，吸收於DCM/MeOH 90:10(20毫升)中並在室溫下攪拌30分鐘。過濾觸媒並在真空下濃縮濾液，以得到184毫克(100%產率)橙色發泡體。

MS (ESI):327.3.

3.ix. 1-環丙基-6-氟-7-{(RS)-3-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-嘮唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-3-羥基-吡咯啉-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸：

中間體3.viii(226毫克)及7-氟-1-環丙基-6-氟-1,4-二氫-4-側氧基-3-喹啉甲酸硼二乙酸鹽錯合物(270毫克；根據WO 88/07998來製備)溶於NMP(5毫升)之溶液用DIPEA(120微升)處理並在60°C下攪拌2小時。將反應混合物在真空下濃縮並將殘餘物吸收於存於MeOH(2毫升)之5M HCl中。將溶液在室溫下攪拌1小時，在真空下濃縮並藉由FC(DCM/MeOH/AcOH 95:4:1至90:9:1)對殘餘物實施純化。將發泡體狀殘餘物吸收於MeOH(2毫升)中，攪拌1小

時並實施過濾。收集結晶並在真空下乾燥以得到23毫克(6%產率)淺褐色固體。

^1H NMR (DMSO-d_6 ; δ ppm): 1.10-1.34 (m, 4H); 1.98-2.10 (m, 1H); 2.14-2.26 (m, 1H); 3.48-3.70 (m, 3H); 3.71-3.89 (m, 5H); 4.05 (t, $J=9$, 1H); 4.09-4.18 (m, 2H); 4.66-4.74 (m, 1H); 5.19 (t, $J=6$, 1H); 5.40 (s, 1H); 7.09 (d, $J=8$, 1H); 7.18-7.31 (m, 2H); 7.59 (dd, $J=2$ 及 $J=14$, 1H); 7.82 (d, $J=14$, 1H); 8.59 (s, 1H); 15.52 (s, 1H)。

MS(ESI): 572.3.

實例4：本發明化合物對難辨梭菌或產氣莢膜梭菌之參考菌株的活體外抗菌活性：

4.i. 實驗方法：

最小抑制濃度(MIC)係藉由培養液微量稀釋法分析來測定。將補充有最終濃度為0.5毫克/升維生素 K_1 及5毫克/升氯化血紅素之布魯氏菌屬(*Brucella*)培養液用作測試培養基。簡言之，在DMSO(5.12毫克/毫升)中製備化合物之原液，且將5微升一系列於50% DMSO/50% H_2O 中之兩倍連續稀釋液分配至含有45微升補充布魯氏菌屬培養液之96孔微量滴定板中並振盪5分鐘。為了製備接種物，將補充有5%已溶羊血、5微克氯化血紅素/毫升及1微克維生素 K_1 /毫升之布魯氏菌屬瓊脂上生長之難辨梭菌的24小時菌落懸浮於補充布魯氏菌屬培養液中並調節至符合0.5 McFarland標準之密度。使用50微升此懸浮液之50倍稀釋液對96-孔板之孔實施接種，產生約 10^4 個菌落形成單位(CFU)/孔。最

終 DMSO 濃度為 2.5%。最終濃度範圍為 0.03-16 微克/毫升。將該等板在厭氧條件下於 37°C 下培育 48 小時。培育後，板讀數器中該等板之讀數為 OD₅₉₅(Ultramark, Biorad Laboratories)。首先在最低濃度下讀取 MIC，表明與對照孔相比 >90% 的生長受到抑制。亦可借助於讀數鏡目視檢測板，並藉由不存在可見生長確定 MIC。

4.ii. 結果：

在活體外測試實例 1-3 之化合物抑制難辨梭菌或產氣莢膜梭菌之三種參考菌株生長之活性。所得結果總結於下文表 1 中。

所測試化合物	對於難辨梭菌 之 MIC ATCC 43596 (微克/毫升)	對於難辨梭菌 之 MIC ATCC 9689 (微克/毫升)	對於難辨梭菌 之 MIC NC 13366 (微克/毫升)	對於產氣莢膜 梭菌之 MIC DSM 756 (微克/毫升)
環丙沙星 (Ciprofloxacin)	8	8	>16	0.25
利奈唑胺 (Linezolid)	8	2	1	4
實例 1	0.125	0.125	0.06	≤0.03
實例 2	0.06	0.125	0.03	≤0.03
實例 3	0.25	0.5	0.25	0.125

表 1

實例 1-3 之化合物對所測試難辨梭菌及產氣莢膜梭菌之菌株表現出潛在的活體外活性。對耐喹諾酮(quinolone)之超強毒性菌株 NC13366 亦可觀察到較強的活性。實例 1 及 2 之化合物具有比實例 3 化合物稍強的活性且所有實例化合物皆具有比環丙沙星及利奈唑胺明顯強的活性。

實例 5：實例 1 化合物對各種難辨梭菌之臨床分離物的活體外抗菌活性：

5.i. 實驗方法：

使用針對厭氧菌(M11-A6)之CLSI推薦參考瓊脂稀釋方法進行敏感性測試。補充有5%已溶羊血、5微克氯化血紅素/毫升及1微克維生素K₁/毫升之布魯氏菌屬瓊脂係測試培養基。將測試化合物連續稀釋並添加至熔融補充瓊脂中。在不含藥物之板上實施生長對照。測試前，在富含布魯氏菌屬之瓊脂板上對所有分離物實施兩次繼代培養。將細菌群落懸浮於布魯氏菌屬培養液中。使用Vitek比色計進行標定後以0.5 McFarland標準當量製備每一接種物，即用Steers replicator施加後為約 10^4 - 10^5 CFU/斑點。將該等板在厭氧條件下於37°C下培育48小時。最小抑制濃度(MIC)係與不含藥物之對照相比完全抑制可見生長之濃度。製備所有抗生素並與作為對照之萬古黴素及甲硝唑一起進行測試。

5.ii. 結果：

測試實例1化合物對總共209種難辨梭菌臨床分離物之活體外生長之抑制活性。實例1化合物表現出MIC90(抑制90%或更多菌株生長之最小抑制濃度)為0.25微克/毫升，所得MIC介於0.06-0.5微克/毫升之間。其平均起來比MIC90分別為2、1及8微克/毫升之萬古黴素、甲硝唑及利奈唑胺更具活性。

實例6：本發明化合物對好氧革蘭氏陽性細菌之活體外抗菌活性：

6.i. 實驗方法：

最小抑制濃度(MIC)係藉由培養液微量稀釋法分析按照臨床實驗室標準委員會[CLSI, 以前稱為NCCLS, 1997]之導則來測定。簡言之, 在DMSO(5.12毫克/毫升)中製備化合物原液, 連續稀釋於陽離子經調節之Mueller-Hinton Broth II (CaMHB)中, 並借助於Biomek 2000自動移液機械裝置(Beckman Coulter)將其分配在微量滴定板中。最終DMSO濃度為2.5%或更低。對板實施接種以達成通常 $3-6 \times 10^5$ CFU/毫升之濃度。在37°C下培育18-24小時後, 板讀數器中該等板讀數為OD₅₉₅(Ultramark, Biorad Laboratories)。首先在最低濃度下讀取MIC, 表明與對照孔相比>90%的生長受到抑制。亦可借助於讀數鏡目視檢查板, 且藉由不存在可見生長來確定MIC。

6.ii. 結果：

測試實例1化合物抗革蘭氏陽性好氧細菌。所得結果總結於下文表2中。

菌株	針對萬古黴素所量測MIC (微克/毫升)	針對環丙沙星所量測MIC (微克/毫升)	針對利奈唑胺所量測MIC (微克/毫升)	針對實例1化合物所量測MIC (微克/毫升)
金黃色葡萄球菌ATCC 29213	1	0.25	2	0.25
金黃色葡萄球菌A-798 (MRSA)	1	>16	2	0.25
金黃色葡萄球菌ATCC 43300 (MRSA)	1	0.25	2	0.25
金黃色葡萄球菌S1 (LZD-R)	1	0.25	>32	1
糞腸球菌ATCC 29212	1	2	2	0.25
糞腸球菌H 4060	>32	>16	2	0.25
糞腸球菌H 6279	>32	>16	2	0.25
糞腸球菌H 6897	>32	>16	4	1
糞腸球菌H 7094	>32	>16	4	0.5
糞腸球菌H 7460	>32	>16	16	1
屎腸球菌ATCC 19434	1	8	2	0.25

菌株	針對萬古黴素所量測 MIC (微克/毫升)	針對環丙沙星所量測 MIC (微克/毫升)	針對利奈唑胺所量測 MIC (微克/毫升)	針對實例1 化合物所量測 MIC (微克/毫升)
屎腸球菌H 9070	>32	>16	2	1
屎腸球菌H 7969	>32	>16	4	1
屎腸球菌H 7966	>32	>16	1	0.5
屎腸球菌H 7965	>32	>16	2	0.5
屎腸球菌H 7937	>32	>16	1	0.25
屎腸球菌A 962	>32	>16	4	0.5
屎腸球菌A 949	>32	>16	2	1
屎腸球菌L1 (LZD-R)	0.5	>16	> 32	2

表 2

總而言之，實例1化合物對金黃色葡萄球菌、金黃色葡萄球菌MRSA、糞腸球菌及屎腸球菌之菌株具有潛在的活體外活性。其對耐萬古黴素、環丙沙星或利奈唑胺之菌株亦具有活性。

實例7：實例1化合物對特定厭氧細菌菌株之活體外抗菌活性：

使用在實例5中所述之實驗方法(參見5.i)，活體外測試實例1化合物(實例1)抑制某些厭氧細菌生長之能力，該等厭氧細菌已習知或認為在正常腸菌群中具有重要作用且在抗難辨梭菌過度生長之保護中仍保持其重要作用(下文統稱為「共生腸細菌」)。作為參考，在同一時間對WO 2005/058888 (R1)之實例5化合物及環丙沙星(CP)進行測試。如此所得之MIC示於下文表3中。

菌株		MIC [微克/毫升]		
		R1	實例1	CP
難辨梭菌A-1179	NC 13366	≤0.06	≤0.06	>32
壞死梭桿菌(<i>Fusobacterium necrophorum</i>)A-1260	DSM 20698	1	1	4
卵形擬桿菌(<i>Bacteroides ovatus</i>)A-991	ATCC 8483	8	16	16
脆弱擬桿菌(<i>Bacteroides fragilis</i>)A-992	ATCC 25285	2	8	8
多形擬桿菌(<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>)A-990	ATCC 29741	4	8	16
普通擬桿菌(<i>Bacteroides vulgatus</i>)A-989	ATCC 8482	1	2	32
脆弱擬桿菌A-502	T 7403	2	4	8
脆弱擬桿菌A-348	T 8673	1	2	8
脆弱擬桿菌A-217	B 6306	2	4	8
脆弱擬桿菌A-501	B 8039	4	4	32
脆弱擬桿菌A-294	T 9174	2	4	8
脆弱擬桿菌A-293	B 2518	2	4	8
脆弱擬桿菌A-260	T 9865	1	4	8
淤泥真桿菌(<i>Eubacterium limosum</i>)A-1259	DSM 20698	0.125	1	2

表 3

菌株		MIC [微克/毫升]		
		R1	實例1	CP
大芬戈爾德菌(<i>Finegoldia magna</i>) A-1254	DSM 20470	≤0.06	0.25	2
青春雙歧桿菌(<i>Bifidobacterium adolescentis</i>) A-1257	DSM 20083	≤0.06	0.5	2
兩歧雙歧桿菌(<i>Bifidobacterium bifidum</i>)A-1258	DSM 20456	0.125	0.5	4
嗜酸乳桿菌(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)A-1255	DSM 20079	≤0.06	0.5	32
雷特氏乳球菌(<i>Lactococcus lactis</i>)A-1256	DSM 20069	≤0.06	0.5	1

表 3(續)

總而言之，與難辨梭菌相比，實例1化合物對共生腸細菌表現出降低的活性。對於擬桿菌屬(*Bacteroides spp.*)(其係人類保護性腸菌群之重要成員)而言，活性降低30-200倍。此選擇性活性為選擇性殺死腸內難辨梭菌同時不傷害腸菌群之重要細菌提供可能。

除此以外，當與WO 2005/058888之實例5化合物比較時，在多數情況下實例1化合物對所測試擬桿菌屬之活性降低2-4倍，對淤泥真桿菌A-1259或大芬戈爾德菌A-1254

菌株之活性降低4倍，對所測試雙歧桿菌(*Bifidobacterium spp.*)之活性降低4-8倍，且對嗜酸乳桿菌A-1255及雷特氏乳球菌A-1256菌株之活性降低8倍。

因此，當與WO 2005/058888(R1)之實例5化合物比較時，實例1化合物對共生腸細菌之活性明顯降低，表明選擇性殺死腸內難辨梭菌之優點。

實例8：實例1化合物對難辨梭菌毒素產生之影響：

8.i. 實驗方法：

使高產毒性難辨梭菌菌株NC13366在補充布魯氏菌屬培養液中於37°C下厭氧生長24小時至細胞密度約 1×10^8 CFU/毫升。藉由離心洗滌細菌且將其再懸浮於相同體積的補充布魯氏菌屬培養液中，該培養液分別以1及8微克/毫升含有抗生素。對照樣不含抗生素。在37°C下進一步厭氧培育培養物。第5天，收集培養物上清液並如下文所述針對毒素A及毒素B進行分析。

毒素A係藉由西方墨點法(Western Blotting)使用NuPage Large Protein Analysis System(Invitrogen LP0001，根據套組說明書)來檢測。使用含有抗CdTA小鼠單株抗體(PCG4.1, Biodesign C70517M)之西方Breeze抗小鼠免疫檢測套組(Invitrogen WB7103)。

難辨梭菌細胞毒性毒素(毒素B)係藉由測試難辨梭菌培養物上清液在CHO細胞內之細胞圓形化活性來半定量檢測。將CHO細胞接種至96-孔平底板(1×10^5 個細胞/孔)中並使其附著3小時。將過濾滅菌上清液之適當稀釋液添加至

細胞中並在37°C下於5% CO₂中進一步培育。培育20小時後，使用倒置顯微鏡測定細胞圓形化。將毒素效價定義為使得>90%細胞圓形化之上清液的最高連續10倍稀釋液。

菌落形成單位(CFU)係藉由將測試樣品之適當稀釋液鋪板於補充布魯氏菌屬瓊脂上並在厭氧條件下於37°C下培育48小時後之菌落計數來測定。

8.ii. 結果：

用來分析難辨梭菌NC 13366(高產毒性NAPI/027型菌株，其會在醫院中導致高死亡率發病)之靜態高密度細胞培養物上清液中毒素A產生之西方墨點板的略圖示於圖1中。

使用在段落8.i處所述之實驗方法來獲得圖1中所示之結果。第1天(D1)，用實例1化合物(實例1)、萬古黴素(V)、甲硝唑(M)以1及8微克/毫升處理培養物或者不加處理(U)；第5天(D5)，對上清液中毒素A之含量進行分析並與D1觀察之彼等相比較(參見圖1)。在產生毒素的難辨梭菌之高密度5天靜態培養物中，實例1化合物以1及8微克/毫升之濃度即以2及16x的MIC重新抑制毒素A產生(參見圖1)。相比而言，甲硝唑及萬古黴素在該等條件下未抑制毒素A產生或僅微弱地進行抑制。

培養物上清液之細胞毒性毒素B亦可藉由使用在段落8.i處所述之基於細胞的細胞圓形化分析來進行分析。用實例1化合物處理之培養物上清液的活性與未經處理對照樣相比降低至>90%。相比而言，經萬古黴素處理之培養物上

清液的活性未降低(在1微克/毫升)或僅降低30%(在8微克/毫升)。

總而言之，實例1化合物能夠有效終止難辨梭菌毒素A及B之合成，甚至在高密度靜態培養物中及不殺死的情況下亦如此，但對於萬古黴素及甲硝唑、目前用來治療難辨梭菌感染之較佳藥物情況並非如此。

實例9：實例1化合物對難辨梭菌芽孢形成之影響：

9.i. 實驗方法：

使難辨梭菌A-1050 (ATCC 43596)在補充布魯氏菌屬培養液中生長至對數生長期，產生符合McFarland 0.5標準之濁度(6-7小時，在37°C下，於厭氧條件下)。在含有1毫升補充布魯氏菌屬培養液(以不同濃度含有抗生素)之管中於2倍稀釋步驟中以1:50稀釋培養物。使管在厭氧條件下於37°C下進一步培育4天。將MIC定義為完全抑制可見生長(濁度)之濃度。0.5x MIC係容許可見生長之藥物的最高濃度。

全部細胞之菌落形成單位(CFU)的評價係藉由將培養物之適當10倍稀釋液鋪板於含有4%蛋黃懸浮液及1%溶解馬血(Lab M)之Brazier's瓊脂上來實施。在厭氧條件下於37°C下培育48小時後，對菌落計數。藉由在室溫下用50%乙醇處理1小時選擇性殺死營養細胞且隨後在如詳見上文之Braziers'瓊脂上CFU計數來實施芽孢計數。

9.ii. 結果：

難辨梭菌係芽孢形成生物體且芽孢可長時間存在於醫院

環境中。芽孢對普通消毒程序耐性極大。因此，芽孢在難辨梭菌感染之傳播及持續中具有重要作用。難辨梭菌之活體外生長培養物用不同的低於MIC濃度的實例1化合物、萬古黴素或甲硝唑處理，且在37°C下厭氧培育4天後研究其對芽孢產生之影響(參見段落9.i)。在表示0.5x MIC之濃度下，用實例1化合物處理產生低芽孢計數(芽孢數<總細胞計數的1%)。相比而言，未經處理之培養物及用甲硝唑或萬古黴素以0.5x MIC之濃度處理的培養物表現出高芽孢形成率(芽孢數>總細胞計數的90%)。此表明，實例1化合物在治療難辨梭菌感染期間具有減少芽孢產生之可能，且比萬古黴素或甲硝唑有效。

實例10：難辨梭菌倉鼠模型中本發明化合物之活體內活性：

10.i. 實驗方法：

給予金色敘利亞(Golden Syrian)倉鼠單次注射克林黴素磷酸酯(10毫克/公斤，皮下)，且1天後藉由管飼法使動物感染 10^5 CFU的產生毒素的難辨梭菌菌株10465。結果大部分(約95%)動物爆發性大腸炎且在投與難辨梭菌1-2天後出現。未經治療的，大腸炎發展迅速且轉變為嚴重大腸炎、盲腸出血性壞死並死亡。作為懸浮液以三個劑量量(10毫克/公斤、30毫克/公斤及100毫克/公斤；n=10/組)經口投與實例1化合物。使用萬古黴素(50毫克/公斤)作為對照。每天給動物治療一次持續5天且之後在監視下再維持21天。

每天觀察動物三次，確定發病率及存在或不存在腹瀉。

研究最終終點係存活。藉由單次注射戊巴比妥鈉使經判斷處於垂死狀態[長時間體重減輕發展至衰弱狀態，食欲減退24-48小時，長時間昏睡(3天以上)，出現癱瘓、皮膚潰爛或創傷跡象，縮成一團，腹部腫脹]之動物無痛致死。

10.ii. 結果：

使用段落10.i之方案測試實例1化合物之治療用途。所有受感染未經治療之動物皆在感染後2與5天之間死亡，而所有用10、30或100毫克實例1化合物/公斤治療之動物在5天治療階段期間存活。最低劑量時，40%的動物在治療後21天復發期後存活，而在30及100毫克/公斤組中，80及100%的動物存活而不復發。使用50毫克劑量之萬古黴素作為對照。該等結果表明，實例1化合物與萬古黴素相比具有治療患有難辨梭菌感染之動物的能力。

【圖式簡單說明】

圖1表示關於難辨梭菌NC 13366之靜態高密度細胞培養物上清液中毒素A產生之西方墨點法分析。

七、申請專利範圍：

1. 一種1-環丙基-6-氟-7-{4-[2-氟-4-((R)-5-羥基甲基-2-側氧基-嘮唑啉-3-基)-苯氧基甲基]-4-羥基-六氫吡啶-1-基}-4-側氧基-1,4-二氫-喹啉-3-甲酸或其醫藥上可接受之鹽於製備藥物之用途，該藥物係用來預防或治療由選自難辨梭菌(*Clostridium difficile*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)及金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)組成之群之細菌引起之腸疾病。
2. 如請求項1之用途，該藥物係用來預防或治療難辨梭菌引起之腸疾病。
3. 如請求項1之用途，該藥物係用來預防或治療難辨梭菌之產毒素菌株引起的腸疾病。
4. 如請求項1之用途，該藥物係用來預防或治療與難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌之產腸毒素菌株有關之腹瀉疾病，而不增加腸內抗萬古黴素(vancomycin)腸球菌的濃度。
5. 如請求項1之用途，該藥物係用來預防或治療與難辨梭菌、產氣莢膜梭菌或金黃色葡萄球菌之產腸毒素菌株有關之腹瀉疾病及降低腸內抗萬古黴素腸球菌的濃度。

八、圖式：

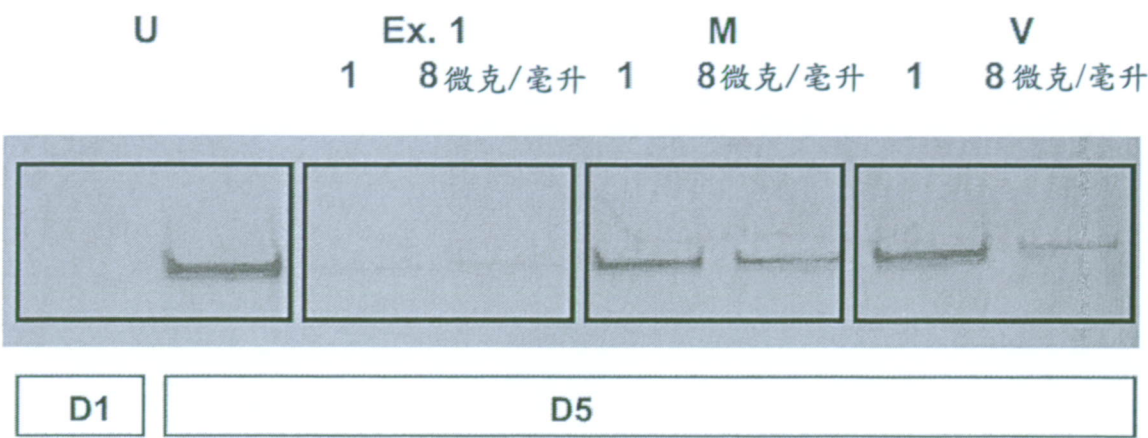


圖 1