



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0007818
(43) 공개일자 2017년01월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/538 (2006.01) A61K 31/527 (2006.01)
A61K 31/5383 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/538 (2013.01)
A61K 31/527 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7035906
- (22) 출원일자(국제) 2015년05월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년12월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2015/001585
- (87) 국제공개번호 WO 2015/181637
국제공개일자 2015년12월03일
- (30) 우선권주장
62/004,246 2014년05월29일 미국(US)

- (71) 출원인
엔타시스 테라퓨틱스 리미티드
영국 더블유2 6비디 런던 킹덤 스트리트 2
- (72) 발명자
허밴드, 마이클
미국 02451 메사추세츠주 월섬 게이트하우스 드라이브 35 아스트라젠카 알앤디 보스턴
- (74) 대리인
양영준, 서정애

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **박테리아 감염의 치료를 위한 융합된, 스피로환식 헤테로방향족 화합물**

(57) 요약

(2R, 4S, 4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 사용한 다양한 박테리아 감염의 치료 방법이 개시되어 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/5383 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유효량의 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 박테리아 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서의 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 버크홀데리아속(*Burkholderia spp.*), 브루셀라속(*Brucella spp.*), 프란시셀라속(*Francisella spp.*), 예르시나속(*Yersina spp.*), 마이코플라즈마속(*Mycoplasma spp.*), 우레아플라즈마속(*Ureaplasma spp.*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 또는 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*)로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염의 치료 방법.

청구항 2

바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니아로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염의 치료를 위한, (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

청구항 3

바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니아로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염의 치료에 사용하기 위한, (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니아로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염의 치료용 의약의 제조에 있어서의 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

청구항 5

바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니아로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염의 치료를 위한, (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 대상체가 인간인, 박테리아 감염의 치료 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 대상체가 1종 초과 박테리아 감염을 앓고 있는, 박테리아 감염의 치료 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 대상체가 클라미디아 트라코마티스 감염 및 나이세리아 고노레아(*Neisseria gonorrhoeae*) 감염을 앓고 있는, 박테리아 감염의 치료 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 박테리아는 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온 이외의 1종 이상의 항균제에 대해 내성이 있는, 박테리아 감염의 치료 방법.

발명의 설명

배경 기술

[0001] 항생제 저항성 및 내성은 수많은 일반적 박테리아 감염의 성공적인 치료에 대한 심각한 위협이 되고 있다. 사실 상, 미국 전염병 학회(Infectious Disease Society of America)에 따르면, 메티실린 내성 황색포도상구균(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)은 폐기종, HIV/AIDS, 파킨슨병 및 조합된 치사보다 매년 보다 많은 미국인이 사망하고 있다. 일반적인 감염성 그람-양성 및 -음성 병원균 예컨대 엔테로코쿠스 패숨(*Enterococcus faecium*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 아시네토박터 바우마니이(*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 에어루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 엔테로박터(*Entebacter*) 종에서의 다제 내성이 증가하고 있을 뿐만 아니라, 또한 내성의 증거가 살모넬라(*Salmonella*) 및 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*), 및 증가적으로 입균(나이세리아 고노레아)(*Neisseria gonorrhoeae*)에서 보여지고 있다(문헌 [Gerard D. Wright, "Antibiotics: A New Hope," 19 (2012), 3-10]). 내성에 있어서의 이러한 증가로 인해, 신규한 항균성 의약의 개발이 중요한 의료적 필요성이 되고 있다.

발명의 내용

[0002] 박테리아 감염을 치료하기 위한 신규한 요법에 대한 필요성이 존재한다. 박테리아 감염을 치료하는 잠재적인 용도를 위한 화합물 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 제공된다.

[0003] 일 양태에서, 유효량의 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 박테리아 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서의 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 버크홀데리아속(*Burkholderia spp.*), 브루셀라속(*Brucella spp.*), 프란시셀라속(*Francisella spp.*), 예르시나속(*Yersina spp.*), 마이코플라즈마속(*Mycoplasma spp.*), 우레아플라즈마속(*Ureapiasma spp.*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 또는 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*)에 의해 야기되는 박테리아 감염을 치료하기 위한 방법이 제공된다.

[0004] 일 양태에서, 바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니아로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염을 치료하기 위한 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

[0005] 일 양태에서, 바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니아로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로

로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

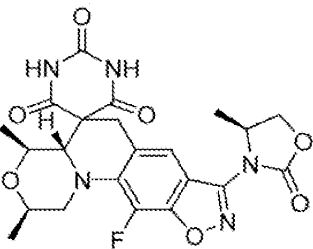
[0006] 일 양태에서, 바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니에로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염을 치료하기 위한 2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007] 상세한 설명

[0008] 유효량의 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 박테리아 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것에 의한 바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니에로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염을 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0009] 화합물 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온은 하기 구조를 가진다:



[0010] 상술한 화합물, 및 이의 합성 방법은 국제출원 PCT/GB2014/050164에 개시되어 있고, 이는 이의 전문이 본원에 명확하게 포함되어 있다.

[0012] 용어 "박테리아 감염"은 그람-음성, 그람-양성, 또는 비정형성 박테리아(atypical bacteria)의 하나 이상의 종에 의해 야기되는 감염을 포함한다.

[0013] 일부 구현예에서, 박테리아 감염은 바실러스 안트라시스 또는 바실러스 세레우스에 의해 야기된다.

[0014] 일부 구현예에서, 박테리아 감염은 버크홀데리아속, 예들 들면, 버크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*), 버크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*) 및 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*)에 의해 야기된다.

[0015] 일부 구현예에서, 박테리아 감염은 브루셀라속, 예들 들면, 브루셀라 멜리텐시스(*Brucella melitensis*), 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*), 브루셀라 카니스(*Brucella canis*), 브루셀라 수이스(*Brucella suis*) 및 브루셀라 오비스(*Brucella ovis*)에 의해 야기된다.

[0016] 일부 구현예에서, 박테리아 감염은 프란시셀라속, 예들 들면, 프란시셀라 투라렌시스(*Francisella tularensis*), 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*) 및 프란시셀라 필로미라지아(*Francisella philomiragia*)에 의해 야기된다.

[0017] 일부 구현예에서, 박테리아 감염은 예르시나속, 예들 들면, 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*) 및 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)에 의해 야기된다.

[0018] 일부 구현예에서, 박테리아 감염은 마이코플라즈마속, 예들 들면 마이코플라즈마 갤리셉티쿰(*Mycoplasma gallisepticum*), 마이코플라즈마 제니탈리움(*Mycoplasma genitalium*), 마이코플라즈마 헤모펠리스(*Mycoplasma haemofelis*), 마이코플라즈마 호미니스(*Mycoplasma hominis*), 마이코플라즈마 하이오뉴모니에(*Mycoplasma*

hyopneumoniae), 마이코플라즈마 오비뉴모니에(*Mycoplasma ovipneumoniae*) 및 마이코플라즈마 뉴모니에(*Mycoplasma pneumoniae*)에 의해 야기된다.

- [0019] 일부 구현예에서, 박테리아 감염은 우레아플라즈마속, 예를 들면, 우레아플라즈마 파븀(*Ureaplasma parvum*) 및 우레아플라즈마 우레아리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*)에 의해 야기된다.
- [0020] 일부 구현예에서, 박테리아 감염은 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니에에 의해 야기된다.
- [0021] 일부 구현예에서, 박테리아는 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온 이외의 1종 이상의 항균제에 대해 내성이 있다. 용어 "내성" 및 "항균 내성" 은 1종 이상의 항균제에 대한 노출을 견딜 수 있는 박테리아와 관련된다. 일 구현예에서, 박테리아는 1종 이상의 아미노글리코시드 항생제(예를 들면, 아미카신, 겐타마이신, 카나마이신, 네오마이신, 네틸마이신, 토브라마이신, 파로모마이신, 스펙티노마이신), 안사마이신 항생제(예를 들면, 리팍시민, 스트렙토마이신), 카르바페넴 항생제(예를 들면, 에르타페넴, 도리페넴, 이미페넴/실라스타틴, 메로페넴), 세팔로스프린 항생제(예를 들면, 세파드록실, 세팍술린, 세파탈린, 세팔렉신, 세파클로르, 세파만돌, 세폭시틴, 세프프로질, 세푸록심, 세피심, 세프디니르, 세프디토렌, 세포페라존, 세포탁심, 세스포독심, 세프타지딤, 세르티부텐, 세프티족심, 세프트리악손, 세페핌, 세프타롤린 포사미, 세프트바이프롤), 글리코펩타이드 항생제(예를 들면, 테이코플라닌, 반코마이신, 텔라반신), 린코사마이드 항생제(예를 들면, 클린다마이신, 린코마이신), 다프토마이신, 마크로라이드 항생제(예를 들면, 아지트로마이신, 클라리트로마이신, 디리트로마이신, 에리트로마이신, 록시트로마이신, 트롤레안도마이신, 텔리트로마이신, 스피라마이신), 아스트레오남, 푸라졸리돈, 니트로푸안토인, 옥사졸리디논 항생제(예를 들면, 리네졸리드, 포시졸리드, 라데졸리드, 토레졸리드), 페니실린 항생제(예를 들면, 아목사실린, 암피실린, 아질로실린, 카르베니실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플루클록사실린, 메즐로실린, 메티실린, 나프실린, 옥사실린, 페니실린, 피페라실린, 테모실린, 티카르실린), 아목시실린/클라불란테, 암피실린/설박탐, 피페라실린/타조박탐, 티카르실린/클라불라네이트, 퀴놀론 항균제(예를 들면, 시프로플록사신, 에녹사신, 가티플록사신, 제미플록사신, 레보플록사신, 로메플록사신, 목시플록사신, 날리딕스산, 노르플록사신, 오픈플록사신, 트로바플록신, 그레파플록사신, 스파르플록사신, 테마플록사신), 설프론아미드 항생제(예를 들면, 마페나이드, 설파아세타마이드, 설파디아진, 실버 설파디아진, 설파디메톡신, 설파메티졸, 설파메톡사졸, 설파닐이미드, 설파살라진, 설피스옥사졸, 트리메토프림/설파메톡사졸 -TMP-SMX) 및 테트라사이클린 항생제(예를 들면, 데메클로사이클린, 독시사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 티게클리사이클린)에 대해 내성이 있다. 일부 구현예에서, 박테리아는 독시사이클린에 대해 내성이 있다. 일부 구현예에서, 박테리아는 레보플록사신 및/또는 시프로플록사신에 대해 내성이 있다. 일부 구현예에서, 박테리아는 아지트로마이신에 대해 내성이 있다. 일부 구현예에서, 박테리아는 테트라사이클린에 대해 내성이 있다.
- [0022] 일부 구현예에서, 대상체에게 유효량의 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 성매개 박테리아 감염을 앓고 있는 대상체의 치료 방법을 제공한다.
- [0023] 일부 구현예에서, 바실러스 안트라시스, 바실러스 세레우스, 버크홀데리아속, 브루셀라속, 프란시셀라속, 예르시나속, 마이코플라즈마속, 우레아플라즈마속, 클라미디아 트라코마티스 또는 클라미디아 뉴모니에로부터 선택되는 1종 이상의 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 감염을 치료하는데 사용하기 위한, (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-비스테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 제공된다.
- [0024] 일 양태에서, 대상체에게 유효량의 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서의 낭포성 섬유증, 브루셀라증, 야토병, 흑사병, 패혈증, 예르시니아증, 골반 염증성 질환, 비정형 폐렴, 비특이적 요도염, 폐렴, 기관지폐 이형성증 또는 수막염을 앓고 있는 대상체의 탄저 감염, 마비저(glanders), 유비저(melioidosis), 폐 감염의 치료 방법을 제공한다.
- [0025] 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 대상체에서의 박테리아 감염과 관련된 효소 또는 단백질 활성의 감소 또는 저해, 대상체에서의 박테리아 감염의 하나 이상의 증상의 완화, 또는 대상체에서의 박테리아 감염의 진행

의 지체 또는 지연을 포함한다. 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 박테리아 성장, 복제의 감소 또는 저해 또는 대상체에서의 박테리아의 박테리아 양의 감소 또는 저해를 포함한다.

[0026] 용어 "대상체"는, 예를 들면, 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 개, 고양이, 토끼, 랫트, 조류(야생 및 가축 조류, 예컨대 칠면조, 거위, 닭, 오리 등을 포함) 및 마우스를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 영장류, 예를 들면, 인간을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 그람-양성 박테리아 감염을 앓고 있고, 일부 구현예에서, 대상체는 그람-음성 박테리아 감염을 앓고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 비정형 박테리아 감염을 앓고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 치료를 필요로 한다(예를 들면, 대상체는 치료로부터 생물학적 또는 의료적으로 유익을 얻게 된다). 일부 구현예에서, 대상체는 박테리아 감염, 예를 들면, 낭포성 섬유휘증의 치료에 대한 반응을 복잡하게 하는 중요한 기저 질환 상태를 앓고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 1종 이상의 박테리아 감염(예를 들면, 2종 이상의 박테리아 감염에 의해 동시-감염됨)을 앓고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 나이세리아 고노레아에 의해 야기된 감염을 앓고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 클라미디아 트라코마티스 및 나이세리아 고노레아에 동시-감염되어 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 성 매개성 박테리아 감염(예를 들면, *클라미디아 트라코마티스* 또는 *나이세리아 고노레아* 감염)에 걸릴 위험성이 있다.

[0027] 용어 "유효량"은 대상체의 생물학적 또는 의료적 반응, 예를 들면, 박테리아 DNA 자이레이스 또는 박테리아 감염과 관련된 효소 또는 단백질 활성의 감소 또는 저해, 박테리아 감염의 증상의 완화, 또는 박테리아 감염의 진행의 지연 또는 지체를 유도할 것인 (2*R*,4*S*,4*aS*)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4*S*)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4*a*-테트라하이드로-2'*H*,6'*H*'스피로[1,4-옥사지노[4,3-*a*][1,2]옥사졸로[4,5-*g*]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 포함한다. 일부 구현예에서, 용어 "유효량"은 대상체에의 투여 시 박테리아 감염을 적어도 부분적으로 완화, 저해 및/또는 개선하거나, 또는 박테리아 DNA 자이레이스를 저해하고/하거나, 대상체에서의 박테리아 성장, 복제 또는 박테리아의 박테리아 양을 감소시키거나 저해하는데 효과적인 (2*R*,4*S*,4*aS*)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4*S*)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4*a*-비스테트라하이드로-2'*H*,6'*H*'스피로[1,4-옥사지노[4,3-*a*][1,2]옥사졸로[4,5-*g*]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-트리온, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 포함한다.

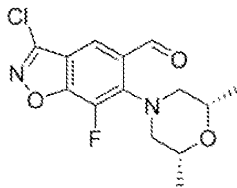
[0028] **실례**

[0029] 실시에 1. (2*R*,4*S*,4*aS*)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4*S*)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4*a*-테트라하이드로-2'*H*,6'*H*'스피로[1,4-옥사지노[4,3-*a*][1,2]옥사졸로[4,5-*g*]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'*H*,3'*H*)-트리온(화합물 1)의 합성

[0030] 화합물 1을 하기에 기재된 바와 같이 합성하였다.

[0031] **중간체 1**

[0032] 3-클로로-6-[(2*R*,6*S*)-2,6-디메틸모르폴린-4-일]-7-플루오로-1,2-벤즈옥사졸-5-카브알데하이드

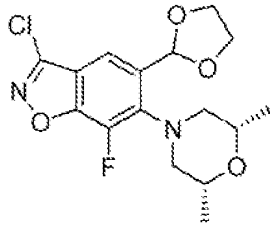


[0033]

[0034] 무수 아세트니트릴(50 ml) 중의 (국제공개출원 WO 2010/043893호에 개시된 과정에 따라 제조된) 3-클로로-6,7-디플루오로-1,2-벤즈옥사졸-5-카브알데하이드의 빙랭된 용액에 디이소프로필에틸아민(5.9 g, 45.9 mmol) 이후 *시스*-2,6-디메틸모르폴린(2.6 g, 23.0 mmol)을 첨가하였고, 이 혼합물을 밀봉된 튜브 내에서 12시간 동안 85 °C에서 가열하였다. 이 용액을 실온으로 냉각시킨 이후, 휘발물질을 진공 하에 제거하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시키고, 물 및 이후 염수로 세척하고, 이후 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 진공 하에 용매를 제거하여 미정제 생성물을 얻었고, 이를 석유 에테르 중의 에틸 아세테이트의 구배를 사용하는 실리카 겔 컬럼 상에서 정제하여 표제 화합물을 고형물로서 수득하였다. 수율 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, 1 H), 10.2 (s, 1 H). MS (ES) HH^+ : C₁₄H₁₄ClFN₂O₃에 대해 313.

[0035] **중간체 2**

[0036] 3-클로로-6-[(2R,6S)-2,6-디메틸모르폴린-4-일]-5-(1,3-디옥솔란-2-일)-7-플루오로-1,2-벤즈옥사졸

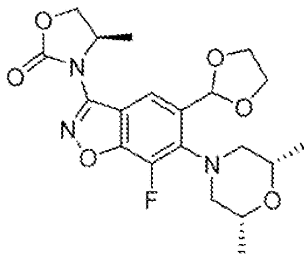


[0037]

[0038] 톨루엔(300 mL) 중의 **중간체 1**(16.3 g, 52.2 mmol), 에틸렌 글리콜(8.1 g, 130.6 mmol) 및 피리디늄 p-톨루엔 설포네이트(1.31 g, 5.2 mmol)의 용액을 16시간 동안 딘-스타크 장치에서 환류 하에 가열하였다. 용매를 진공 하에 제거하였고, 잔류물을 디에틸 에테르(75 mL)에 용해시키고, 물(3 x 25 mL) 및 수성 염수(25 mL)로 세정하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 여과시켰다. 진공 하에 용매를 제거하여 표제 화합물을 얻었고, 이를 고온 헥산을 사용한 연화(trituration)에 의해 정제하였다. 수율: 18.0 g (80 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 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).

[0039] **중간체 3**

[0040] (4R)-3-{6-[(2R,6S)-2,6-디메틸모르폴린-4-일]-5-(1,3-디옥솔란-2-일)-7-플루오로-1,2-벤즈옥사졸-3-일}-4-메틸-1,3-옥사졸리딘-2-온

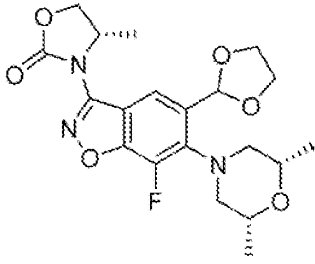


[0041]

[0042] 디메틸포름아미드(10 mL) 중의 NaH(0.24 g, 9.9 mmol)의 교반된 용액에 디메틸포름아미드(10 mL) 중의 (문헌 [Nishiyama, T.; Matsui, Shigeki; Yamada, F. *J. Het, Chem*, (1986), 23(5), 1427-9]에 기재된 과정에 따라 합성된) (4R)-4-메틸-1,3-옥사졸리딘-2-온(10 g, 9.9 mmol)의 용액을 10분의 기간에 걸쳐 0°C에서 서서히 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 실온에서 교반하였고, 디메틸포름아미드(5 mL) 중의 **중간체 2**(1.1 g, 3.1 mmol)의 용액을 동일한 온도에서 첨가하였다. 이 혼합물을 12시간 동안 80°C에서 가열하였고, 빙랭된 물에 부었고, 에틸 아세테이트(2x20 mL)로 추출하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조하였고, 용매를 진공 하에서 제거하였다. 미정제 생성물을 석유 에테르 중의 에틸 아세테이트의 구배를 사용하는 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 수율: 0.15 g (12%). MS (ES) MH⁺: C₂₀H₂₄FN₃O₆에 대해 422.4.

[0043] **중간체 4**

[0044] (4S)-3-{6-[(2R,6S)-2,6-디메틸모르폴린-4-일]-5-(1,3-디옥솔란-2-일)-7-플루오로-1,2-벤즈옥사졸-3-일}-4-메틸-1,3-옥사졸리딘-2-온

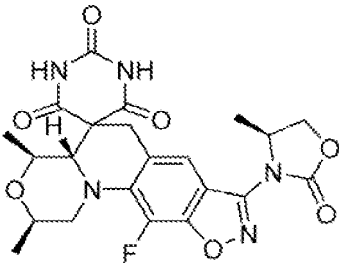


[0045]

[0046] **중간체 3**의 합성에 대해 기재된 것과 유사한 방법으로 (문헌 [Nishiyama, T.; Matsui, Shigeki; Yamada, F. *J. Het. Chem.*, (1986), 23(5), 1427-9]에 기재된 과정에 따라 합성된) (4S)-4-메틸-1,3-옥사졸리딘-2-온을 사용하여 **중간체 2**로부터 **중간체 4**를 제조하였다. MS (ES) MH⁺: C₂₀H₂₄FN₃O₆에 대해 422.4.

[0047] **화합물 1**

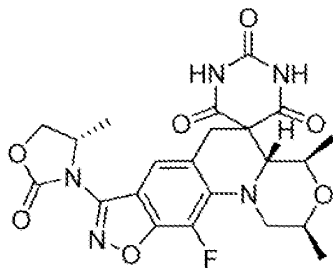
[0048] (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온



[0049]

[0050] 아세트산(1 ml) 중의 **중간체 4**(0.36 mmol) 및 바르비투르산(0.3 mmol)의 교반된 혼합물을 16시간 동안 85°C에서 가열하였다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 메탄올(2 mL)에 용해시키고, 물(5 mL)을 첨가하였다. 침전된 고형물을 여과시키고 역상 HPLC(수중의 10 mM 암모늄 아세테이트, CH₃CN)에 의해 정제하여 2개의 성분을 용출시켰다. 제2 용출 성분을 고형물로서 분리하였고, 표제 화합물로서 확인하였다. 표제 화합물을 2 성분 중 제1 용출물로서 역상 HPLC(수중의 10 mM 암모늄 아세테이트, CH₃CN)에 의해 분리하였다. 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). MS (ES) MH⁺: C₂₂H₂₂FN₅O₇에 대해 488.4; [α]_D²⁰ = -92 (c=1; MeOH).

[0051] 또한 HPLC 정제로부터 제2 용출 성분으로서 **화합물 1**의 합성으로부터 분리된 것은 (2R,4S,4aS)-11-플루오로-2,4-디메틸-8-[(4S)-4-메틸-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]-1,2,4,4a-테트라하이드로-2'H,6H-스피로[1,4-옥사지노[4,3-a][1,2]옥사졸로[4,5-g]퀴놀린-5,5'-피리미딘]-2',4',6'(1'H,3'H)-트리온이었다.



[0052]

[0053] 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). MS (ES) MH⁺: C₂₂H₂₂FN₅O₇에 대해 488.4; [α]_D²⁰ = +224 (c=1; MeOH).

[0054] 실시예 2. 인간 마이코플라즈마에 대한 화합물 1의 생체의 항균 활성

[0055] 화합물 1은 다수의 상이한 유형의 박테리아에 대한 활성을 갖는 토포이소머라아제 IV 및 DNA 자이레이스의 초나선(supercoiling) 및 연결분리 활성(decatenation activity)의 임상실험 저해제이다. 예비 데이터는 이러한 제제가 성 매개 감염 예컨대 나이세리아 고노레아를 포함하는 플루오로퀴놀론 및 테트라사이클린과 같은 다른 제제에 대해 내성이 있는 유기체에 대한 활성을 유지하는 것을 제시한다. 본 연구는 중요한 인간 병원균인 5종의 물리쿠틀를 나타내는 참조 균주 및 소수의 임상적 분리물을 시험함으로써 추가적인 인간 병원균에 대한 화합물 1의 생체의 활성에 대한 지식을 증가시키기 위해 착수된 것이다.

[0056] 시험되는 유기체는 마이코플라즈마 뉴모니에, 마이코플라즈마 호미니스, 마이코플라즈마 제니탈리움, 우레아플라즈마 우레아리티쿰 및 우레아플라즈마 파붐을 포함하였다. M. 뉴모니에가 주로 호흡기 유도 질환 예컨대 인후염, 기관지염, 및 폐렴의 병원균인 한편, 나머지 종은 성인 남자 및 여자에서의 비뇨 생식기의 중요 병원균이고, 이는 또한 임신 과정에서 또는 출산 시 수직적으로 이동하는 경우 신생아에서의 전신 질환(systemic disease)을 야기할 수 있다. 감수성 시험을 임상 검사 표준 연구원(Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI)(CLSI 2011)의 지침에 따라 수행하였다. 시험된 균주는 테트라사이클린 내성을 매개하는 tetM 유전자, 마크로라이드 내성을 부여하는 23S 리보솜 RNA에서의 돌연변이를 함유하는 유기체, 및 플루오로퀴놀론에 대한 내성을 부여하는 토포이소머라아제 IV 및/또는 DNA 자이레이스에서의 돌연변이를 함유하는 것을 포함하였다.

[0057] 방법

[0058] **항균제.** 연구에 포함된 약물은 표 1에 요약되어 있다. 적절한 양의 각각의 분말화된 약물을 칭량하여 각각의 순도 백분율을 감안하여 10 mL의 저장 용액을 준비하였다. 항균제를 각각의 제조사의 지시에 따라 용해시켰다.

[0059] **표 1. 시험 화합물 및 대조군/참조 화합물**

화합물	순도	공급처
화합물 1	98.9%	
아지트로마이신	95.2%	Fluka/Sigma-Aldrich Switzerland
독시사이클린	100%	Sigma-Aldrich St. Louis, MO
레보플록사신	99%	Sigma-Aldrich St. Louis, MO

[0060]

[0061] **박테리아 균주.** UAB 마이코플라즈마 진단 임상실험실(UAB Diagnostic Mycoplasma Laboratory)의 배양 수집물에서의 -70°C에서 보관된 성인 및 아동의 다양한 신체 부위로부터 유래된 공지된 적정농도의 임상적 분리물의 순수 배양액을 본 발명에서 사용하였다. 입수 가능한 경우, 분리물의 본래 출처 및 분리 연도 및 관련된 경우, 특정 내성 프로파일이 표 2에 요약되어 있다.

[0062] **표 2. 시험되는 박테리아 균주**

[0063] 마이코플라즈마 제니탈리움 (n - 5)

부여 번호 또는 저장액 식별자	분리 연도	신체 부위 균주 명칭	주석
M2341	미공지	요도	NGU를 가진 덴마크 남성
M30	1980	요도 ATCC 49895	NGU를 가진 영국 남성
M2321	미공지	요도	NGU를 가진 덴마크 남성
M6282	미공지	요도	NGU를 가진 일본 남성
UTMB-10G	1986	윤활액 ATCC 49899	폐렴 및 관절염을 가진 텍사스 남성
G37 QC 균주 ATCC 33530	1980	요도	NGU를 가진 영국 남성

[0064]

[0065] 마이코플라즈마 뉴모니애 (n - 12)

부여 번호 또는 저장액 식별자	분리 연도	신체 부위 균주 명칭	주석
54484	2009	인후	UAB 임상 분리물 마크로라이드-내성
54506	2009	BAL	UAB 임상 분리물 마크로라이드-내성
55246	2010	인후	UAB 임상 분리물
55612	2010	객담	UAB 임상 분리물
57807	2012	BAL	UAB 임상 분리물
58188	2012	BAL	UAB 임상 분리물
58772	2012	BAL	UAB 임상 분리물
59598	2013	BAL	UAB 임상 분리물
59597	2013	BAL	UAB 임상 분리물
53938	2009	BAL	UAB 임상 분리물
53706	2009	BAL	UAB 임상 분리물
51494	2006	CSF	UAB 임상 분리물
M-129 QC 균주 ATCC 29342-B7	미공지	호흡기	폐렴을 가진 환자

[0066]

[0067] 마이코플라즈마 호미니스 (n = 12)

부여 번호 또는 저장액 식별자	분리 연도	신체 부위	주석
10848	1991	자궁 내막	UAB 임상 분리물 <i>tetM</i> 함유
10505	1991	자궁 내막	UAB 임상 분리물 <i>tetM</i> 함유
59793	2013	자궁 경부	UAB 임상 분리물
59744	2013	자궁 경부	UAB 임상 분리물
58881	2012	미공지	UAB 임상 분리물
58603	2012	질	UAB 임상 분리물
11124	1991	자궁 내막	UAB 임상 분리물
11063	1991	자궁 내막	UAB 임상 분리물
11140	1991	자궁 내막	UAB 임상 분리물 <i>tetM</i> 유전자 함유
11121	1991	자궁 내막	UAB 임상 분리물
11612	1991	자궁 내막	UAB 임상 분리물
12434	1992	자궁 내막	UAB 임상 분리물
PG21 QC 균주 ATCC 23114	미공지	직장 도말	

[0068]

[0069] 우레아플라즈마 중 (n - 15)

부여 번호 또는 저장액 식별자	종	분리 연도	신체 부위	주석
25353	Uu	1997	홍수	UAB 임상 분리물 <i>tetM</i> 함유 플루오로퀴놀론 및 마크로라이드-내성
48105	Up	2001	질	플루오로퀴놀론-내성
48736	Up	2002	미공지	UAB 임상 분리물
51110	Up	2005	미공지	UAB 임상 분리물 플루오로퀴놀론-내성
49718	Uu	2003	미공지	UAB 임상 분리물 <i>tetM</i> 함유
50826	Uu	2005	미공지	UAB 임상 분리물 <i>tetM</i> 함유
43306	Uu	1999	조직	UAB 임상 분리물
44062	Uu	1999	질	UAB 임상 분리물
45623	Up	2000	ETA	UAB 임상 분리물
48750	Up	2002	직장 도말	UAB 임상 분리물
52863	Up	2008	ETA	UAB 임상 분리물
59913	Up/Uu	2013	요도	UAB 임상 분리물
59967	Up	2013	요도	UAB 임상 분리물
60052	Up/Uu	2013	요도	UAB 임상 분리물
60153	Up/Uu	2013	질	UAB 임상 분리물 플루오로퀴놀론-내성
Uu 혈청형 9 QC 균주 ATCC 33175	Uu	미공지	요도	NGU를 가진 캐나다 남성 <i>tetM</i> 함유

[0070]

[0071] 표 2에 대한 주석

[0072] 약어: Uu = 우레아플라즈마 우레아리티쿰, Up = 우레아플라즈마 파뮌, BAL = 기관지 폐포세척액, CSF = 뇌척수액, ETA = 기관 흡입물

[0073] 우레아플라즈마 종은 사전 기술된 문헌 [Xiao *et al.* Detection and characterization of human Ureaplasma species and serovars by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2010,48, 2715-2723]에 기술된 실시간 PCR에 의해 확인되었다. 3개의 임상적 분리물은 때때로 문헌 [Xiao *et al.* Extensive horizontal gene transfer in ureaplasmas from humans questions the utility of serotyping for diagnostic purposes. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49, 2818-2826]에서 볼 수 있는 2종의 혼합물인 것을 나타내었다.

[0074] M. 호미니스 및 우레아플라즈마 종에서의 *tetM*의 존재는 UAB 마이코플라즈마 진단 임상실험실에서의 PCR에 의해 결정하였다.

[0075] 생체의 감수성 시험 방법:

[0076] 본 연구를 위해 이용되는 검정은 문헌 ["Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Human Mycoplasmas. Approved Guideline, CLSI Document M43-A" (CLSI 2011)]에 공개된 액체배지 미량희석(broth microdilution) 최소 억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 검정이었다. 본 검정은 시험되는 유기체의 정의된 접종물이 적은 용적의 항미생물제의 이중 희석물에 부가된 96 웰 마이크로타이터 플레이트를 이용한다. 플레이트를 성장 대조군이 색상이 변할 때까지 배양시켰다. MIC 종료점은 이후 pH 지시약을 함유하는 액체 배지에서 색상 변화의 부족에 의해 결정되었다. 사용되는 절차의 특정 양태는 하기와 같았다.

[0077] 배지. SP4 액체배지 및 SP4 한천을 M. 뉴모니아 및 M. 제니탈리움을 시험하는데 사용하였다. 개질된 헤이플릭 마이코플라즈마 액체배지 및 한천(Hayflick's Mycoplasma broth and agar)을 M. 호미니스를 시험하는데 사용하였다. 셰파드 10B 액체배지 및 A8 한천(Shepard's 10B Broth and A8 agar)을 우레아플라즈마 종을 시험하는데 사용하였다. 이러한 배지 및 이의 제형은 CLSI 문헌(CLSI 2011)에 기술되어 있다.

[0078] 접종물의 제조. 유기체를 실온으로 해동시키고, 50 mL 코니칼 튜브에서 적절한 사전증온된 배지에서 희석시켜 대략 10⁴ CFU/mL의 최종 접종물을 수득하였다. 적어도 5 mL의 접종물을 두 벌의 8개의 시험 희석액 및 적절한

대조군에 기초하여 각각의 약물에 대해 준비하였다. 더 많은 희석액이 종료점 MIC를 달성하는데 필요한 경우, 추가적인 용적의 접종물을 준비하였다. 마이크로타이터 플레이트를 접종시키기 이전에 마이크로플라즈마가 신선 대사적으로 활성화되게 하기 위해, 사용하기 이전 2시간 동안 37°C에서 접종된 액체배지를 호기적 조건으로 배양시켰다. 이의 보다 급속한 성장 속도로 인해, 플레이트를 접종시키기 이전에 한 시간 동안만 우레아플라즈마를 배양시켰다.

[0079] 액체배지 미량희석 검정의 수행. 단일 마이크로타이터 플레이트를 4개의 약물에 대해 사용하였다. 각각의 약물을 2회 시험하였다. (약물 1-열 A, B; 약물 2-열 C, D; 약물 3-열 E, F. 웰 9, 10, 11 및 12를 용매, 배지, 약물 및 성장 대조군에 대해 각각 사용하였다. 0.025 mL의 적절한 액체 배지를 마이크로타이터 플레이트의 2 내지 8 및 10 및 12 열에 첨가하였다. 시험되는 최고 농도의 약물 0.025 mL를 열 A, B 열에서의 1, 2, 및 11번 웰에 첨가하였다. 11번 웰은 약물 대조군으로서 역할을 하였다. 시험되는 다른 약물을 이들 각각의 열에 동일한 방식으로 첨가하였다. 최고 약물 농도를 저장 용액에 대해 적절한 희석을 실시하여 준비하였다. 항미생물제를 0.025 mL 다중채널 피펫을 사용하여 연속적으로 희석시키고, 2번째 웰에서 시작하였고, 8번 웰까지 지속하였고 최종 0.025 mL를 폐기하였다. 물 이외 다른 물질이 용매로서 사용되는 경우 시험되는 항미생물제를 용해시키기 위해 사용되는 0.025 mL의 최고 농도(멸균 탈이온수에서의 1:10 희석)의 용매를 혼입시킴으로써 용매 대조군을 9번 웰에서 제조하였다. 2시간 동안 사전증온된 접종된 배지의 원하는 희석액 0.175 mL를 1 내지 9 및 12번 열에서의 각각의 웰에 첨가하였다. 12번 웰은 성장 대조군으로서 역할을 하였다. 접종물은 12번 웰에서 출발하여 역으로 1번 웰로 작업하여 첨가하여 약물 캐리오버(drug carryover)를 방지하였다. 0.175 mL의 적절한 비접종 배지를 배지 및 약물 대조군에 대한 10 및 11번 웰(총 0.2 mL)에 첨가하였다. 접종물의 6개의 연속 희석액(0.9 mL의 적절한 액체배지 중의 0.1 mL 접종물)을 제조하였고, 20 µl의 각각의 희석액을 적절한 한천 플레이트로 피펫팅하여 적절한 희석액이 만들어진 것인지의 여부 및 접종물이 10^4 내지 10^5 CFU/mL를 함유하였는지의 여부를 확인함으로써 각각의 마이크로타이터 플레이트를 접종시키는데 사용하는 작용 희석액의 CFU/mL를 최종 결정하였다. 콜로니가 가시적이며 계수할 수 있을 때까지 5% CO₂가 부가된 공기 중에서 한천 플레이트를 37°C에서 배양시켰다. 성장이 가시적이 될 때까지 필요한 시간은 종에 따라 변화되고, 이는 우레아플라즈마 종 및 M. 호미니스에 대해 24 내지 72 시간으로부터 M. 뉴모니아 및 M. 제니탈리움에 대해 수일까지의 범위이다. 미량희석 트레이를 호기적 조건으로 37°C에서 배양하였고, 18 내지 24 시간 이후 그리고 그 다음 매일 성장 대조군 웰에서의 색상 변화에 대해 조사하였다.

[0080] MIC 종료점, 품질 관리, 및 검정 유효성의 결정. MIC는 유기체 대조군 웰이 최초로 색상 변화를 나타낸 경우 그 시점에서의 액체 배지에서의 색상 변화를 억제하는 항미생물제의 최소 농도로서 기록되었다. 10B 액체배지에서의 우레아플라즈마속의 성장에 대한 양성 반응은 유기체 대조군 웰(즉, 12번 웰)에서 황색으로부터 분홍색으로의 색상 변화에 의해 입증되었다. 마이크로플라즈마 액체배지에서의 M. 호미니스에 대한 양성 반응은 유기체 성장 대조군 웰(즉, 12번 웰)에서 분홍색에서 더 깊은 적색으로의 색상 변화에 의해 입증되었다. SP4 액체배지에서의 M. 뉴모니아 및 M. 제니탈리움에 대한 양성 반응은 성장 대조군 웰에서 분홍색으로부터 황색으로의 색상 변화에 의해 입증되었다. 유기체 농도에 대한 대조군 한천 플레이트가 10^4 내지 10^5 CFU/mL가 존재하는 것을 나타내는 경우 결과가 유효한 것으로 고려되었다. 대조군 웰 및 예상된 결과는 하기와 같았다: 9번 웰(용매 대조군) - 색상 변화 없음; 10번 웰(배지 대조군) - 색상 변화 없음; 11번 웰(약물 대조군) - 색상 변화 없음; 12번 웰(성장 대조군) - 혼탁도 없이 유기체가 시험되는 것에 따른 성장 및 색상 변화. 시험되는 각각의 분리물의 접종물에 대한 CFU 정량화를 수행하여, 유기체의 순도를 입증하였다. M. 뉴모니아 및 M. 제니탈리움으로 접종하는 경우 SP4 한천은 마이크로플라즈마 종을 갖는 혼합된 배양물 또는 오염물을 검출한다. M. 호미니스가 SP4 또는 마이크로플라즈마 한천 상에서 성장한다. M. 호미니스 및 공생하는 호흡기 마이크로플라즈마 종은 프라이드 에그형 콜로니(fried egg colony)를 생성하고, 반면 M. 뉴모니아 및 M. 제니탈리움은 작은 구체 콜로니를 생성한다. A8 한천 플레이트는 우레아플라즈마 종에 대한 갈색의 과립형 콜로니를 산출하고, 또한 오염된 마이크로플라즈마 종 또는 박테리아를 검출할 것이다. 성장 대조군 웰에서의 임의의 혼탁도는 박테리아 오염을 나타내고, 결과를 무효화한다.

[0081] 액체배지 미량희석 MIC 품질 관리 제한. 품질 관리(QC) 목적을 위해, 시험되는 각각의 유기체에 대해 CLSI(CLSI 2011)로 표시되는 미국 미생물보존센터(American Type Culture Collection, ATCC) 균주를 수행하는 매일 각각의 검정을 사용하여 포함시켰다. 사용된 QC 균주는 하기와 같았다: M. 뉴모니아 ATCC 29342, M. 호미니스 ATCC 23114, 및 U. 우레라리티쿰 ATCC 33175. 감수성 시험이 이러한 유기체에 대해 표준화되지 않았기 때문에 CLSI에 의해 권장되는 M. 제니탈리움 유형 균주는 존재하지 않는다. 따라서, 본 발명자들은 이러한 유기체에 대해 균주 유형 ATCC 33530을 선택하였다. 이 균주는 다른 연구에 대해 본 발명자들의 실험실에서 사용되었고, 다수의 항

미생물체에 대해 예측가능한 MIC를 가진다. 단일 시험(단일-약물/단일 유기체 조합)에 대한 허용가능한 MIC QC 제한은 CLSI 문서(CLSI 2011)로부터 유도된 바와 같이 표 3에 열거되어 있다. QC 균주는 데이터가 제공된 모든 MIC 검정과 관련하여 예상되는 바와 같이 수행되었다.

[0082] 표 3. 액체배지 미량희석에 의해 시험되는 *마이코플라즈마 호미니스*, *마이코플라즈마 뉴모니아* 및 *우레아플라즈마 우레아리티쿰*에 대한 품질 관리 균주(Quality control strain)에 대한 MIC 제한 ($\mu\text{g/mL}$)

항미생물제	<i>마이코플라즈마 호미니스</i> ATCC 23114	<i>마이코플라즈마 뉴모니아</i> ATCC 29342	<i>우레아플라즈마 우레아리티쿰</i> ATCC 33175
아지트로마이신	--	--	0.5 - 8
클린다마이신	0.0032 - 0.25	0.25 - 4	2 - 32
에리트로마이신	--	0.004 - 0.063	1 - 8
레보플록사신	0.032 - 0.5	0.125 - 1	0.5 - 2
목시플록사신	0.016 - 0.125	0.032 - 0.25	0.5 - 2
테리트로마이신	--	--	0.125 - 1
테트라사이클린	--	0.063 - 1	16 - 256

[0083]

[0084] 표 3에 대한 주석

[0085] 표 3에서의 데이터를 M-43-A CLSI 문서(CLSI 2011)로부터 유도하였다.

[0086] 결과

[0087] M. 제니탈리움. 화합물 1은 레보플록사신 및 독시사이클린의 것과 유사한 생체의 활성을 나타내었다. 이러한 3개의 약물에 대한 전체 MIC 범위는 42배 희석 = 0.25 내지 2 $\mu\text{g/mL}$ 내의 것이었다. 화합물 1(MIC는 0.5 내지 1 $\mu\text{g/mL}$ 범위임)은 아지트로마이신 (MIC 범위는 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 미만임)보다 효능이 적었다.

[0088] M. 뉴모니아. 화합물 1에 대한 MIC₉₀(1 $\mu\text{g/mL}$)은 레보플록사신의 것과 동등하였고, 독시사이클린보다 4배 더 높았다(0.25 $\mu\text{g/mL}$). 대부분의 *M. 뉴모니아* 분리물은 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 미만의 아지트로마이신 MIC를 가지나, 2가지 균주가 시험을 위해 선택되었는데, 그 이유는 이들이 16 및 32 $\mu\text{g/mL}$ 의 아지트로마이신 MIC를 갖고 23S 리보솜 RNA에서 돌연변이를 함유하기 때문이다. 화합물 1은 완전하게 마크로라이드-감수성인 이들 분리물에 대한 것과 비슷하게 이러한 2가지 마크로라이드-내성 분리물에 대해 생체의 효능을 유지하였다.

[0089] M. 호미니스. 화합물 1은 4 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC₉₀ 및 8 $\mu\text{g/mL}$ 의 최대 MIC 값으로 *M. 호미니스*에 대해 최저의 전체 활성을 가졌다. tetM가 없는 *M. 호미니스* 분리물에 대한 독시사이클린 MIC는 0.016 내지 0.063 $\mu\text{g/mL}$ 범위였고, 한편 tetM을 갖는 이들 3가지에 대한 MIC는 4 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 대응되는 테트라사이클린 MIC는 이들 분리물에 대해 32 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 독시사이클린에 대한 화합물 1 MIC는 tetM의 존재에 대해 영향을 받지 않았다. 화합물 1에 대한 MIC₉₀(4 $\mu\text{g/mL}$)은 레보플록사신의 것(0.25 $\mu\text{g/mL}$)보다 16배 높았고, 이는 이들 중에 대해 보통 매우 활성적이지 않은 약물인 아지트로마이신의 것과 동등하였다. 화합물 1에 대한 달성가능한 약물 농도에 대한 정보 없이, 이 MIC가 감수성이거나 내성을 가지는 것으로 고려될 것인지 여부를 나타낼 수 없다.

[0090] 우레아플라즈마 종. 화합물 1에 대한 MIC₉₀은 1 $\mu\text{g/mL}$ 였고, 효능에 있어서 레보플록사신과 비슷하였다. 레보플록사신-내성 우레아플라즈마 및 레보플록사신-감수성 분리물에 대해 화합물 1 MIC에 있어서 차이가 없었다. 마찬가지로, tetM을 함유하는 3가지 우레아플라즈마 분리물 중, 화합물 1에 대한 MIC는 독시사이클린에 대해 0.5 내지 2 $\mu\text{g/mL}$ 대 4 내지 8 $\mu\text{g/mL}$ 범위의 이의 MIC로 영향을 받지 않았으나, 독시사이클린-감수성 유기체에 대한 MIC₉₀(0.125 $\mu\text{g/mL}$)은 화합물 1(1 $\mu\text{g/mL}$)보다 8배보다 높게 활성적이었다. *U. 우레아리티쿰*(아지트로마이신 MIC = 32 $\mu\text{g/mL}$)의 단일 마크로라이드-내성 분리물에 대한 화합물 1 MIC는 2 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 이는 이 약물에 대한 MIC₉₀보다 2배 높은 희석물이었고, 그러나, 전체적으로, 화합물 1은 아지트로마이신보다 4배 초과로 더 높은 효능을 가졌다 (1 대 4 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC₉₀).

[0091] 표 4. 인간 마이코플라즈마에 대해 시험된 화합물 1 및 3개의 비교예에 대한 MIC 데이터셋

[0092] *마이코플라즈마 제니탈리움* (n = 5) MIC (μg/mL)

부어 번호 또는 저장액 식별자	화합물 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 균주 ATCC 33530	0.5	<0.001	0.25	2

[0093]

[0094] *마이코플라즈마 뉴모니애* (n = 12) MIC (μg/mL)

부어 번호 또는 저장액 식별자	화합물 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
55812	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 균주 ATCC 29342-B7	0.5	<0.001	0.5	1

[0095]

[0096] *마이코플라즈마 호미니스* (n = 12) MIC (μg/mL)

부어 번호 또는 저장액 식별자	화합물 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 균주 ATCC 23114	2	1	0.032	0.5

[0097]

[0098] 우레이플라즈마 중 (n - 15) MIC (μg/mL)

부여 번호 또는 저장액 식별자	종	화합물 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 혈청형 9 QC 균주 ATCC 33175	Uu	0.5	2	8	1

[0099]

[0100] 표 5. 인간 마이코플라즈마에 대해 시험된 화합물 1 및 3개의 비교예에 대한 데이터 요약

<i>M. 제니탈리움</i> MICs (µg/mL) n = 5	화합물 1	아지트로마이신	독시사이클린	레보플록사신
범위	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 균주 ATCC 33530	0.5	<0.001	0.25	2
<i>M. 뉴모니아에</i> MICs (µg/mL) n=12	화합물 1	아지트로마이신	독시사이클린	레보플록사신
범위	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 균주 ATCC 29342	0.5	<0.001	0.5	1
<i>M. 호미니스</i> MICs (µg/mL) n=12	화합물 1	아지트로마이신	독시사이클린	레보플록사신
범위	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 균주 ATCC 23114	2	1	0.032	0.5
우레아플라즈마 종 (µg/mL) n=15	화합물 1	아지트로마이신	독시사이클린	레보플록사신
범위	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 혈청형 9 QC 균주 ATCC 33175	0.5	2	8	1

[0101]

[0102] 표 4 및 5에 대한 주석

[0103] 약어: AZI = 아지트로마이신, DOX = 독시사이클린, LEV = 레보플록사신, Uu = 우레아플라즈마 우레아리티쿰, Up = 우레아플라즈마 파룸.

[0104] 또한, tetM 유전자를 함유하는 3가지 *M. 호미니스* 분리물을 독시사이클린과 동시에 테트라사이클린에 대해 시험하였다. 모든 3가지 분리물은 테트라사이클린에 대해 32 µg/mL의 MIC를 가졌다.

[0105] 논의

[0106] 인간을 감염시키는 마이코플라즈마 및 우레아플라즈마 종은 호흡기뿐 아니라 비노생식기에 중대한 질환을 야기할 수 있다. *N. 고노레아* 및 *크라미디아 트라코마티스* 이외, *M. 제니탈리움* 및 우레아플라즈마 우레아리티쿰 모두 남성 요도염을 야기할 수 있고, *M. 제니탈리움*은 또한 여성 자궁경부염 및 골반염을 야기한다(문헌 [Waites KB, Taylor-Robinson D. Mycoplasma and Ureaplasma, Manual of Clinical Microbiology, 10th Ed. Washington, D.C., ASM Press: 970-985, 2011]). 신생아에서의 *M. 호미니스* 및 우레아플라즈마 종으로 인해 혈류, CSF, 및 폐의 침습성 감염이 종종 일어난다(문헌 [Waites and Taylor-Robinson 2011]). 침습성 질환은 또한 면역 결핍의 환경에서 성인에서 발생할 수 있다(문헌 [Waites and Taylor-Robinson 2011]).

[0107] 마이코플라즈마 및 우레아플라즈마 감염에 대한 치료적 선택사항은 더 이상 명확하지 않으며, 이는 마크로라이드 내성이 아시아에서의 *M. 뉴모니아에*에서 매우 일반적인 것이 되고 있고, 이는 점차적으로 유럽 및 북아메리카로 확산되고 있고; 그리고 테트라사이클린 내성 속도가 일부 지역에서 *M. 호미니스* 및 우레아플라즈마 종에서

50%에 달할 수 있고; 마크로라이드 및 플루오로퀴놀론에 대한 내성이 생식기 마크로플라즈마에 대해 문서로 잘 기록되어 있다(문헌 [Waites KB, Lysynynsky 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]). 면역-억제된 환자 및 수많은 과정의 항생제를 시간 경과에 따라 공급받은 사람은 약물-내성 유기체로의 감염의 위험성이 크다(Waites 2014). 이러한 이유로, 다른 약물 부류 예컨대 마크로라이드, 테트라사이클린, 및 플루오로퀴놀론에 대한 교차-내성에 영향을 받지 않는 신규한 제제가 요구된다.

[0108] 이러한 소규모의 예비 연구는 화합물 1이 DNA 복제를 타겟팅하는 다른 제제인 레보플록사신과 비슷한 M. 제니탈리움, M. 뉴모니에, U. 우레아리티쿰 및 U. 과뭉에 대한 생체의 활성을 가지는 것을 입증하였고, 이의 효능은 플루오로퀴놀론 내성을 부여하는 돌연변이의 존재에 영향을 받지 않았다. 또한, 마이코플라즈마 및 우레아플라즈마 종에서의 마크로라이드 및 테트라사이클린에 대한 내성은, 더 많은 분리물이 이러한 관찰을 확인하기 위해 시험되었음에도 불구하고, 화합물 1의 MIC에 대해 임의의 유의미한 측정가능한 영향을 갖지 않는 것으로 나타났다. 아지트로마이신은 리보솜과 결합되는 마크로라이드에 영향을 주는 돌연변이의 부재 하에서 M. 제니탈리움 및 M. 뉴모니에에 대해 시험된 가장 효능이 있는 제제였다. 화합물 1에 대한 MIC₉₀은 우레아플라즈마 종에 대해 아지트로마이신보다 4배 적었고, 이는 시험되는 4개의 제제 중 가장 활성적인 약물이 되게 하였다.

[0109] **결론**

[0110] • M. 뉴모니에, M. 제니탈리움 및 우레아플라즈마 종에 대한 화합물 1 생체의 활성은 모두 2 µg/mL 미만의 MIC를 갖는 레보플록사신과 전체적으로 유사하였고, 한편, M. 호미니스에 대한 이의 효능은 MIC₉₀(4 µg/mL)의 관점에서 다소 낮았다.

[0111] • 화합물 1의 MIC₉₀(1 µg/mL)은 우레아플라즈마 종에 대한 아지트로마이신의 것보다 4배 낮았고, 이는 이것을 이들 유기체에 대해 시험된 4가지 제제 중 가장 효능있게 만들었다.

[0112] • M. 뉴모니에, M. 호미니스 및 우레아플라즈마 종에 대한 화합물 1의 생체의 활성은 마크로라이드 또는 플루오로퀴놀론 내성을 부여하는 돌연변이에 의해, 또는 적은 수의 시험된 분리물에서의 tetM의 존재에 의해 영향을 받지 않았다.

[0113] • 화합물 1은 비노생식기 또는 호흡기에서의 인간 마이코플라즈마 및 우레아플라즈마에 의해 야기되는 감염에 대한 가능한 치료로서 추가 개발을 위한 잠재적으로 유용한 제제일 수 있다.

[0114] 실시예 3. 생물테러의 잠재적 제제에 대한 화합물 1의 생체의 항균 활성

[0115] 생물테러의 제제로서 사용하기 위한 카테고리 A 및 B 선별 제제의 잠재력은 문서에 잘 기록되어 있다. 이를 위해, 본 발명자들은 바실러스 안트라시스(B. 안트라시스), 버크홀더리아 말레이(B. 말레이), 버크홀더리아 슈도말레이(B. 슈도말레이), 브루셀라 아보투스(B. 아보투스), 브루셀라 멜리텐시스(B. 멜리텐시스), 브루셀라 수이스(B. 수이스), 프란시셀라 투라렌시스(F. 투라렌시스) 및 예르시나 페스티스(Y. 페스티스)의 각각의 다수의 분리물에 대해 화합물 1 및 다중 약물 부류로부터의 화합물에 대한 항미생물 감수성 프로파일을 확립하였다. 임상 검사실 품질협회(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 지침을 따르는 액체배지 미량희석 검정 방식으로 시험을 실시하였다. 미량희석 웰에서 시각적으로 유기체의 성장을 완전하게 억제하는 항미생물제의 최저 농도(µg/mL)로서 결과를 기록하였다.

[0116] **물질 및 방법**

[0117] **항균제**

[0118] 세 가지(3)의 비교 화합물(독시사이클린, 레보플록사신 및 클로람페니콜) 및 화합물 1을 바실러스 안트라시스(B. 안트라시스), 버크홀더리아 말레이(B. 말레이), 버크홀더리아 슈도말레이(B. 슈도말레이), 브루셀라 아보투스(B. 아보투스), 브루셀라 멜리텐시스(B. 멜리텐시스), 브루셀라 수이스(B. 수이스), 프란시셀라 투라렌시스(F. 투라렌시스) 및 예르시나 페스티스(Y. 페스티스)의 각각의 다수의 분리물에 대한 항균 활성에 대해 선별하였다.

[0119] CLSI 지침에 따라 그리고 스폰서(Sponsor)에 의해 제공되는 지시에 따라 화합물을 제조하였다. 모든 시험 및 비교 화합물 각각에 대한 총 12가지 농축물을 3별로 시험하였다. 농도 범위는 64 µg/mL의 출발 농도 및 0.031 µ

g/mL의 최종 농도를 갖는 2배 희석 방식이었다.

[0120] **박테리아 균주**

[0121] B. 안트라시스, Y. 페스티스, B. 말레이, B. 슈도말레이, B. 수이스, B. 펠리텐시스, B. 아보투스의 각각의 10 가지 분리물 및 F. 투라렌시스의 3가지 분리물을 약물 선별을 위해 이용하였다(표 6). 또한, 하기 품질 관리 균주는 하기의 것을 포함하였다: E. 콜라이(*E. coli*) 25922, S. 아우레스 29213, P. 에어루기노사 27853, S. 뉴모니아에 49619 및 E. 콜라이 35218.

[0122] **표 6. 선별된 박테리아 분리물**

	에임스(Ames)		
바실러스 안트라시스	36	¹ Health Protection Agency Culture Collections; Porton Down, UK	
	38		
	41		
	46		
	411		
	412		
	413		
	415		
버크홀더리아 말레이	120	¹ Health Protection Agency Culture Collections; Porton Down, UK	
	3708		
	3709		
	10229		
	10230		
	10245		
	10247		
	10248		
버크홀더리아 슈도말레이	10260	² BEI Resources; Manassas, VA	
	12938		
	1688		
	4845		
	4846		
	6700		
	7383		
	7431		
브루셀라 아보투스	8016	¹ Health Protection Agency Culture Collections; Porton Down, UK	
	8707		
	8708		
	10274		
	624		² BEI Resources; Manassas, VA
	1408		
	3605		
	4487		
5059			
7470			
7471			
7472			

[0123]

	8038	
	8200	
	3511	
	3605	
	8200	
브루셀라 멜리텐시스	8223	¹ Health Protection Agency Culture Collections; Porton Down, UK
	8334	
	8631	
	8632	² BEI Resources; Manassas, VA
	10200	
	10502	
	11361	
브루셀라 수이스	3142	¹ Health Protection Agency Culture Collections; Porton Down, UK
	3143	
	4490	
	5061	
	10095	² BEI Resources; Manassas, VA
	10098	
	10385	
	10510	
	10511	
	10364	
프란시셀라 투라렌시스	643	¹ Health Protection Agency Culture Collections; Porton Down, UK
	644	
	645	² BEI Resources; Manassas, VA
에르시니아 페스티스	CO92	¹ Health Protection Agency Culture Collections; Porton Down, UK
	16	
	17	
	20	² BEI Resources; Manassas, VA
	637	
	639	
	640	
	8775	
	10029	
10030	³ Lovelace Respiratory Research Institute; Albuquerque, NM	

[0124]

[0125] 생체의 감수성 시험 방법(적절한 경우)

[0126]

CLSI 지침에 의해 개략된 액체배지 미량희석 방법을 이용하여 시험을 실시하였다. 간단하게는, 0.2 mL/웰의 검정 용적을 갖는 96-웰, U-바텀 마이크로플레이트를 사용하여 시험을 실시하였다. 적절한 액체배지 및 시험 화합물의 2배 희석액을 함유하는 플레이트를 박테리아 제제의 5.0 x 10⁵ CFU/mL(5.0 x 10⁴ CFU/웰)의 표적화 농도로 접종하였고, 이후 제제에 따라 24 내지 72시간 동안 배양하였다. 배양 이후, 플레이트를 시각적으로 관독하였고, 개개의 웰을 혼탁도, 부분 투명도 또는 완전한 투명도에 대해 점수를 기록하였다. MIC를 유기체의 성장을 시각적으로 억제하는 약물의 최저 농도($\mu\text{g/mL}$)로서 기록하였다. 성장 배지, 접종물 제조 및 배양 조건을 하기 표 7에 제공하였다.

[0127] 표 7. 성장 배지, 접종물 제조 및 배양 조건

유기체	배지	접종물	배양
바실러스 안트라시스	브루셀라 액체배지 pH CAMHB	직접 콜로니 현탁	37 °C, ~18 시간
브루셀라 아보투스	브루셀라 액체배지 pH 7.1 ±0.1	성장 방법	37 °C, 48 시간
브루셀라 멜리텐시스	브루셀라 액체배지 pH 7.1 ±0.1	성장 방법	37 °C, 48 시간
브루셀라 수이스	브루셀라 액체배지 pH 7.1 ±0.1	성장 방법	37 °C, 48 시간
버크홀더리아 말레이	CAMHB	성장 방법	37 °C, ~18 시간
버크홀더리아 슈도말레이	CAMHB	성장 방법	37 °C, ~18 시간
프란시셀라 투라렌시스	CAMHB + 2% IsoVitaleX™	직접 콜로니 현탁	37 °C, 48-72 시간
에르시니아 페스티스	CAMHB	성장 방법	28 °C, 24-48 시간

[0128]

[0129] 상기 기재된 선별 결과가 표 8 및 9에 나타나 있다.

[0130] 표 8. 선택된 박테리아에 대한 화합물 1 및 3개의 비교예의 항미생물 감수성

유기체	화합물 1 MIC (µg/mL)	독시사이클린 MIC (µg/mL)	클로람페니콜 MIC (µg/mL)	레보플록사신 MIC (µg/mL)
버크홀더리아 슈도말레이	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
버크홀더리아 말레이	32	8	64	8
	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

[0131]

	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
브루셀라 아보투스	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
에르시니아 페스티스	16	0.5	4	0.5
	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
프랑시셀라 투라렌시스	2	0.5	8	≤ 0.25
	2	1	8	≤ 0.25
	16	4	2	≤ 0.125
바실러스 안트라시스	8	1	2	≤ 0.125
	16	2	1	≤ 0.125
	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
브루셀라 멜리텐시스	0.5	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	0.05	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	0.125	≤ 0.031	8	≤ 0.25
	8	0.25	4	0.5
	8	0.125	2	0.5
브루셀라 멜리텐시스	16	0.25	8	1
	8	0.25	4	0.25
	8	0.125	4	0.5
	8	0.25	4	0.25
	8	0.125	4	0.5

[0132]

	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
브루셀라 수이스	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

[0133]

[0134]

표 9. 화합물 1의 생체의 활성 ($\mu\text{g/mL}$)

유기체	N	범위	MIC ₅₀	MIC ₉₀
바실러스 안트라시스	10	0.12-1	0.25	0.5
바실러스 안트라시스	30	0.12-4	0.25	1
브루셀라 수이스	10	1-2	1	2
버크홀더리아 말레이	10	0.25-64	2	32
버크홀더리아 말레이	30	2-32	16	32
버크홀더리아 슈도말레이	10	32-64	32	64
버크홀더리아 슈도말레이	28	32->32	32	>64
프란시셀라 투라렌시스	27	8-16	16	16
예르시니아 페스티스	10	1->64	2	2
예르시니아 페스티스	30	2-8	4	8

[0135]