



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108137573 B

(45) 授权公告日 2021.06.11

(21) 申请号 201680055680.4

(22) 申请日 2016.09.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108137573 A

(43) 申请公布日 2018.06.08

(30) 优先权数据
62/222,430 2015.09.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.03.23

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2016/099482 2016.09.20

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2017/050218 EN 2017.03.30

(73) 专利权人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 E·奥宾 A·卡萨雷斯 A·菲希
李在兴 M·林德瓦尔
H·E·莫泽 M·慕兹 F·瑞克

B·U·雷布塞尔 M·肖恩亨兹
V·瑟苏拉曼 R·L·西蒙斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 杨昀 余颖

(51) Int.Cl.
C07D 417/14 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 106164072 A, 2016.11.23
WO 2015148379 A1, 2015.10.01
EP 0093376 A2, 1983.11.09
WO 2010070523 A1, 2010.06.24
WO 2012073138 A1, 2012.06.07
WO 2013110643 A1, 2013.08.01

审查员 柴伟

权利要求书1页 说明书27页
序列表5页 附图9页

(54) 发明名称

单环内酰胺抗生素的盐和固体形式

(57) 摘要

本发明提供了1-((Z)-1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸(在本文中被称作化合物X)的新固体形式、盐和多晶型,包含它们的药物组合物,以及它们的制造工艺和在治疗中的应用。

1.1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的(L)-精氨酸盐。

2.1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的钠盐。

3.1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的水合固体形式,其中所述水合固体形式选自:倍半水合物、二水合物、三水合物、四水合物和六水合物。

4.如权利要求3所述的水合固体形式,其50%或以上为1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的三水合物。

5.制备如权利要求4所述的水合固体形式的方法,其包括使1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸与相对湿度为25%-50%的气氛在20℃-30℃的温度下接触。

6.包含如权利要求1-4中任一项所述的化合物和至少一种药物可接受载体或赋形剂的药物组合物。

7.一种包含1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸和精氨酸的药物组合物。

8.如权利要求1-4中任一项所述的化合物在制造用于治疗革兰氏阴性细菌感染的药物中的应用。

单环内酰胺抗生素的盐和固体形式

发明领域

[0001] 本发明涉及适合于商业规模生产的1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的盐和晶体形式,以及包含这些材料的药物组合物,它们的制备方法,以及它们的治疗应用。

技术背景

[0002] 在过去的几十年中,抗菌素耐药性的频率及其与严重感染性疾病的相关性正以惊人的速率增加。院内病原体中的耐药性的流行率增大尤为令人不安。在美国每年发生的超过2百万院内(医源性)感染中,有50至60%是由耐药菌株引起的。对常用抗菌剂的高比率耐药性使得与院内感染相关的发病率、死亡率和费用增加。在美国,据信院内感染每年促成或导致超过77000例死亡并且每年花费约50至100亿美元。

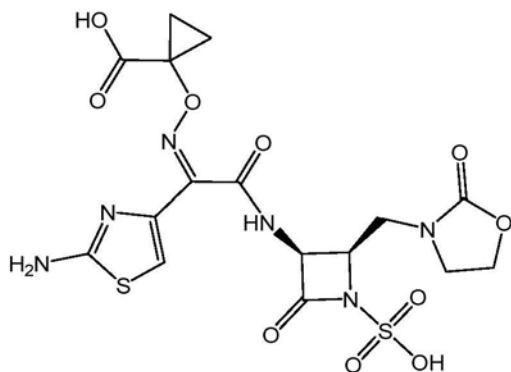
[0003] 革兰氏阴性耐药性的重要起因包括肺炎克雷白杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)、和奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)中的广谱 β -内酰胺酶(ESBL)、丝氨酸碳青霉烯酶(KPC)和金属- β -内酰胺酶(例如NDM-1),在肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)和弗罗因德氏柠檬酸(*Citrobacter freundii*)杆菌中的高水平第三代头孢菌素(AmpC) β -内酰胺酶耐药性,以及在假单胞菌(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、和寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)中观察到的多重耐药性基因。抗菌素耐药性问题由于存在耐受多种抗菌素的菌株而加剧。例如,含NDM-1金属- β -内酰胺酶的肺炎克雷白杆菌经常在携带该NDM-1的同一质粒上携带另外的丝氨酸- β -内酰胺酶。

[0004] 因此需要开发新的抗菌素,尤其是有效抵抗现有的耐药性微生物、或较少受新的细菌耐药性的发展影响的抗菌化合物。本发明提供了这种化合物的固体形式,尤其由于它们在制造所用的便利操作条件下的处理性质,其特别适合于商业规模生产。

[0005] 发明概述

[0006] 未公开专利申请PCT/US2015/022011描述了某些单环内酰胺抗生素。该申请中的一种化合物对革兰氏阴性细菌表现出强活性,这些细菌包括对其他单环内酰胺表现出耐受性的菌株,该化合物是1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸,其在本文中被称作化合物X:

[0007]



[0008] (化合物X)。

[0009] 对于制造药物化合物及其制剂,重要的是,该活性化合物作为能方便地处理和加工的形式,从而获得商业可行的、可靠的、和可重现的制造工艺。化合物X及其多种盐在室温下为固体,并取决于用于生产、纯化或结晶该材料的条件,能以多种固体形式生产。存在多种固体形式,通常是指多晶型,这对固体药物化合物是众所周知的,而且这些化合物的化学和物理稳定性以及处理性质通常取决于所用的固体形式。因此,活性药物物质的具体固体形式(例如盐形式、水合或溶剂化形式、或多晶型形式)的选择对于可靠和可重现生产工艺的设计,以及该药物物质的安全且有效形式的储存、处理和分销非常重要。

[0010] 一般发现制造药物成分的特定固态形式具有优势,这些优势见述于“药用盐手册:性质、选择和应用 (Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use)”, P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (编) (Verlag Helvetica Chimica Acta, 苏黎士)。制造固态形式的方法也见述于“实用工艺研究和开发 (Practical Process Research and Development)” Neal G. Anderson (学院出版社 (Academic Press), 圣地亚哥) 和“多晶型: 在药物工业中”, Rolf Hilfiker (编) (Wiley VCH)。

[0011] 本发明的发明人已经发现化合物X的某些盐和多晶型形式特别适合用于制造、储存或给予如本文所述的化合物X。

[0012] 重要的是使药物产品在商业实际条件下进行运输和储存时保持足够稳定以避免明显降解。本发明的发明人已经发现,在潮湿情况下,优选在pH为4-6的、更优选pH为4.0-5.5的条件下使用和储存溶液中的化合物X,以获得最大稳定性。在pH为约4.0-5.5的条件下能实现最佳的溶液稳定性。因此,本发明提供了pH为4-6、优选为4.0-5.5、更优选pH为约5±0.5或5±0.2的包含化合物X的药物组合物。合适的组合物包含水溶液中的化合物X,水溶液例如葡萄糖或盐水溶液,该溶液可以是等渗溶液,并可包含其他物质例如稳定剂、抗氧化剂、缓冲剂或pH调节剂、营养素等。在这些实施方式的一些中,所需的pH通过将化合物X和适合在水溶液中实现所需pH的pH调节剂混合而成。合适的pH调节剂包括但不限于氢氧化钠,碳酸钠,碳酸氢钠,碳酸钾,氢氧化钾,胺如TRIS (三 (羟甲基) 氨基甲烷), 和氨基酸如精氨酸、赖氨酸、组氨酸等。已知的单环内酰胺、包括氨曲南,用精氨酸配制。

[0013] 通过向化合物X的水溶液中加入pH调节剂、或者通过向包含pH调节剂的水溶液中加入化合物X,可以实现合适的pH。可由熟练人员容易地确定pH调节剂和化合物X的合适量。合适的pH调节剂包括氢氧化钠和精氨酸。因此可用氢氧化钠、或精氨酸处理化合物X的溶液或悬混液,以产生包含该化合物的钠盐或精氨酸盐的溶液。此外,可将这种溶液冻干以除去水和任何存在的共溶剂,留下包含化合物X与pH调节剂的冻干固体,或由化合物X和pH调节

剂形成的盐,例如化合物X的钠盐或精氨酸盐。

[0014] 此外,根据本发明,提供了化合物X的许多固体形式,它们具有适合工业规模制造的处理性质,还提供了生产这些多晶型的方法。

[0015] 以下列举的本发明实施方式是代表性的:

[0016] 1. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的精氨酸盐。在一些实施方式中,该盐是(L)-精氨酸盐。

[0017] 2. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的钠盐。

[0018] 3. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的水合固体形式。

[0019] 4. 根据实施方式3的水合固体形式,其主要由1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的三水合物组成。

[0020] 5. 制备实施方式4的水合固体形式的方法,其包括使1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸与相对湿度为25%-50%的气氛在20℃-30℃的温度下接触。

[0021] 6. 包含根据实施方式1-4中任一种的化合物和至少一种药物可接受载体或赋形剂的药物组合物。

[0022] 7. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式1),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以2 θ 角表示):6.6、13.4、和18.8。在一些实施方式中,形式1具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0023] 8. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式2),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以2 θ 角表示):7.5、19.3、和20.0。在一些实施方式中,形式2具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0024] 9. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式3),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以2 θ 角表示):7.3、18.9、和21.2。在一些实施方式中,形式3具有如下所述的另外的XRPD峰。

[0025] 10. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式4),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以2 θ 角表示):7.0、8.6、19.3和20.9。在一些实施方式中,形式4具有如下所述的另外的XRPD峰。

[0026] 11. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形

式(形式5),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):7.3、9.3、和27.8。在一些实施方式中,形式5具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0027] 12. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式6),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):8.1、9.2、和12.8;以及可任选的位于21.2和24.7的额外的峰。在一些实施方式中,形式6具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0028] 13. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式7),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):6.7、7.3、和20.3。在一些实施方式中,形式7具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0029] 14. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式8),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):6.2、21.8、和25.9。在一些实施方式中,形式8具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0030] 15. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式9),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):6.3、12.6、和22.3;以及可任选自22.1、23.1、27.0和27.5的一个或多个额外的峰。在一些实施方式中,形式9具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0031] 16. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式10),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):6.6、11.0、和16.5;以及可任选自22.2和23.4的一个或多个额外的峰。在一些实施方式中,形式10具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0032] 17. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式11),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):7.4、9.7、和29.3;以及可任选自17.0、19.5、22.2、26.3和28.1的一个或多个额外的峰。在一些实施方式中,形式11具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0033] 18. 1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸的晶体形式(形式12),其表现出至少以下特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):19.0、20.4、和24.0;以及可任选自7.3、24.7和27.2的一个或多个额外的峰。在一些实施方式中,形式12具有如下所述的额外的XRPD峰。

[0034] 19. 包含1-(((Z)-(1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噻唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸和精氨酸的药物组合物。

[0035] 20. 权利要求19的药物组合物,其还包含药物可接受载体。

[0036] 21. 权利要求20的药物组合物,其中该载体是水性的。

[0037] 22. 权利要求21的药物组合物,其pH约为5.0。

[0038] 23. 权利要求21或22的药物组合物,其还包含选自蔗糖、果糖、海藻糖、甘露醇和乳糖的至少一种赋形剂。

[0039] 24. 根据权利要求1-4中任一项的化合物,或根据权利要求7-18中任一项的其晶体形式,在治疗中的应用。

[0040] 25. 权利要求24的化合物,其中该治疗是治疗革兰氏阴性细菌感染。

[0041] 26. 权利要求24的化合物,其中导致革兰氏阴性细菌感染的该细菌选自柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、嗜血杆菌属、克雷白氏杆菌属、摩根氏菌属、摩拉克氏菌属、假单孢菌属、变形杆菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、志贺氏菌属、和奈瑟氏菌属细菌。

[0042] 27. 根据权利要求1-4中任一项的化合物、或根据权利要求7-18中任一项的其晶体形式在制造用于治疗革兰氏阴性细菌感染的药物中的应用。

[0043] 28. 根据权利要求27的应用,其中导致革兰氏阴性细菌感染的该细菌是选自柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、嗜血杆菌属、克雷白氏杆菌属、摩根氏菌属、摩拉克氏菌属、假单孢菌属、变形杆菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、志贺氏菌属、和奈瑟氏菌属的细菌。

[0044] 29. 治疗革兰氏阴性感染的方法,包括向有此需要的对象给予治疗有效量的根据权利要求1-4中任一项的化合物、或根据权利要求7-18中任一项的晶体形式、或根据权利要求19-23中任一项的药物组合物。

[0045] 30. 权利要求29的方法,其中导致革兰氏阴性细菌感染的该细菌是选自柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、埃希氏菌属、嗜血杆菌属、克雷白氏杆菌属、摩根氏菌属、摩拉克氏菌属、假单孢菌属、变形杆菌属、沙门氏菌属、沙雷氏菌属、志贺氏菌属、和奈瑟氏菌属的细菌。

[0046] 因此,在一个方面中,本发明提供了化合物X的晶体形式(形式1),其表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):6.6、13.4和18.8。在一种实施方式中,形式1表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰:6.6、13.4、16.6、17.9、18.8、20.3、25.1和28.9。在另一种实施方式中,形式1表现出至少如列表1中所示的特征性X射线粉末衍射峰,或选自列表1的至少五个峰的任意子集。在另一种实施方式中,形式1表现出与图1中所示基本相同的X射线粉末衍射图谱。

[0047] 在另一个方面中,本发明提供了化合物X的晶体形式(形式2),其表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):7.5、19.3和20.0。在一种实施方式中,形式2表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰:6.7、7.5、13.3、13.7、15.3、17.9、18.7、19.3和20.0。在另一种实施方式中,形式2表现出至少如列表2中所示的特征性X射线粉末衍射峰,或选自列表2的至少五个峰的任意子集。在另一种实施方式中,形式2表现出与图2中所示基本相同的X射线粉末衍射图谱。

[0048] 在另一个方面中,本发明提供了化合物X的晶体形式(形式3),其表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):7.3、18.9和21.2;以及任选还包括位于8.3的峰。在一种实施方式中,形式3表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰:7.3、13.9、16.7、18.9、20.3、21.2和24.6。在另一种实施方式中,形式3表现出至少如列表3中所示的特征性X射线粉末衍射峰,或选自列表3的至少五个峰的任意子集。在另一种实施方式中,形式3表现出与图4中所示基本相同的X射线粉末衍射图谱。

[0049] 在另一个方面中,本发明提供了化合物X的晶体形式(形式4),其表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):7.0、8.6、19.3和20.9。在一种实施方式中,形式4表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰:7.0、8.6、15.2、17.0、18.0、19.3、20.9、24.5和26.9。在另一种实施方式中,形式4表现出至少如列表4中所示的特征性X射线粉末衍射峰,或选自列表4的至少五个峰的任意子集。在另一种实施方式中,形式4表现出与图5中所示基本相同的X射线粉末衍射图谱。

[0050] 在另一个方面中,本发明提供了化合物X的晶体形式(形式5),其表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):7.3、9.3和27.8;以及任选还包括位于19.9的峰。在一种实施方式中,形式5表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰:7.3、9.3、16.3、18.6、19.2、21.7、24.1、24.9、27.3、27.8和29.8。在另一种实施方式中,形式5表现出至少如列表5中所示的特征性X射线粉末衍射峰,或选自列表5的至少五个峰的任意子集。在另一种实施方式中,形式5表现出与图6中所示基本相同的X射线粉末衍射图谱。

[0051] 在另一个方面中,本发明提供了化合物X的晶体形式(形式6),其表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):8.1、9.2、12.8、21.2和24.7。在一种实施方式中,形式6表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰:8.1、9.2、12.8、13.9、14.4、16.7、20.1、21.2、24.7和26.6。在另一种实施方式中,形式6表现出至少如列表6中所示的特征性X射线粉末衍射峰,或选自列表6的至少五个峰的任意子集。在另一种实施方式中,形式6表现出与图7中所示基本相同的X射线粉末衍射图谱。

[0052] 在另一个方面中,本发明提供了化合物X的晶体形式(形式7),其表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):6.7、7.3和20.3。在一种实施方式中,形式7表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰:6.7、7.3、17.6、18.0、20.3和24.9。在另一种实施方式中,形式7表现出至少如列表7中所示的特征性X射线粉末衍射峰,或选自列表7的至少五个峰的任意子集。在另一种实施方式中,形式7表现出与图8中所示基本相同的X射线粉末衍射图谱。

[0053] 在另一个方面中,本发明提供了化合物X的晶体形式(形式8),其表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰(以 2θ 角表示):6.2、21.8和25.9。在一种实施方式中,形式8表现出至少以下的特征性X射线粉末衍射峰:6.2、17.8、20.7、21.8和25.9。在另一种实施方式中,形式8表现出至少如列表8中所示的特征性X射线粉末衍射峰,或选自列表8的至少五个峰的任意子集。在另一种实施方式中,形式8表现出与图9中所示基本相同的X射线粉末衍射图谱。

[0054] 在本发明的一个方面中,本发明的多晶型具有晶状性质并且优选为至少50%晶态、更优选为至少60%晶态、更优选为至少70%晶态、最优选为至少80%晶态。可通过常规X射线衍射测量技术或通过红外光谱技术估计结晶度。

[0055] 在一些实施方式中,化合物X的固体形式包括一种或多种本文所述的形式。化合物X的固体形式可包括两种或更多种这些形式,即,可以是两种或更多种形式的混合物。在一些实施方式中,固体形式的样品可主要由选自形式1-8的一种单一形式组成,这意味着该材料中的50%或以上为一种固体形式。各形式在混合物中的相对量可由XRPD数据确定。如本文所述,一些形式可能在合适条件下演化或互变,例如形式4和5,其可作为混合物产生,并取决于该保存材料的相对湿度和温度,可互变。

[0056] 在本发明的一个方面中,本发明的多晶型为50%、60%、70%、80%或90%至95%、96%、97%、98%、99%或100%的晶体。

[0057] 在本说明书中,使用波长为1.5406Å (α_1) 和1.5444Å (α_2) 的铜X射线测定X射线粉末衍射峰(以2 θ 角表示)。峰位置按2 θ 角报告,并理解为存在小的数值变化,因此该角度应理解为存在 $\pm 0.2^\circ$ 的变化。

[0058] 本发明的晶体形式可以非溶剂化或溶剂化形式存在。本文中使用术语“溶剂化”描述包含本发明化合物和定量的一种或多种药学上可接受溶剂的分子复合物。药学上可接受溶剂的例子包括乙醇和水。当溶剂为水时使用术语“水合物”。本文所述的化合物X的几种多晶型为水合物。

[0059] 在一个方面中,本发明提供了用于治疗的本文定义的盐或晶体形式。在另一个方面中,本发明提供了医疗治疗方法,其包括向有此需要的对象给予药学上可接受量的根据本发明的盐或晶体形式。

[0060] 在一个方面中,本发明提供了本文定义的盐或晶体形式在制造治疗用药物中的应用。

[0061] 在一种实施方式中,该治疗是治疗由革兰氏阴性细菌引起的感染。

[0062] 本发明还提供了用于制备本文所述晶体形式的工艺。因此,在一个方面中,本发明提供了用于制备如本文所述形式1、2、3、4、5、6、7和8中任一种的工艺,其包括使用如本文提供的实施例中所所述的溶剂体系和条件从化合物X的溶液中结晶所需的形式。

[0063] 在本发明的上下文中,本文关于“治疗”的引述包括对治愈性、姑息性和预防性处理的引述,除非有相反的具体指示。术语“治疗”、“治疗的”和“治疗地”应按相同方式理解。

[0064] 化合物X通常通过注射或输注给药,可通过将化合物X溶解在合适的水或水溶液中来准备给药,水溶液例如葡萄糖或盐水,例如等渗葡萄糖或盐水。配制好的组合物还可任选地包含能提供所需pH例如pH为4-6的足量pH调节剂,例如氢氧化钠、碳酸氢钠、碳酸钠、氢氧化钾、碳酸钾、氢氧化钙、氢氧化镁、葡甲胺、TRIS或氨基酸(例如赖氨酸、组氨酸或精氨酸)。虽然实施例中所用的氨基酸为(L)-氨基酸,也可替代使用(D)-氨基酸或外消旋混合物。通常将包含化合物X的溶液形式的药物组合物调节成pH为4.5-5.5,或pH约为5,例如pH为4.8-5.2。

[0065] 在一些实施方式中,对化合物X以pH调节剂配制在水溶液中,然后冻干成固体形式以便储存和分发。给药时可通过加入水性载体来重建冻干的药物产品,载体通常是无菌水性载体例如水或等渗葡萄糖或盐水溶液或其他IV溶液例如林格氏溶液、乳酸盐林格氏溶液或哈特曼氏溶液。因此,本发明还提供了包含化合物X和如上所述pH调节剂例如(L)-精氨酸、(L)-赖氨酸、葡甲胺、TRIS或氢氧化钠的冻干物(通过冻干制备的固体)。可任选包含其他赋形剂例如蔗糖。在一种实施方式中,制备了化合物X和精氨酸(两当量)的溶液,按照需要使用例如氢氧化钠或氢氯酸将pH调节至4.8-5.2。然后将该溶液冻干形成白色或略微黄色的固体,其储存稳定并能容易地用合适的无菌水溶液重建以供静脉内给药。

[0066] 在另一种实施方式中,制备了适合于注射的化合物X、蔗糖和精氨酸(两当量)在水中的溶液,按照需要使用例如氢氧化钠或氢氯酸将pH调节至4.8-5.2。然后将该溶液冻干形成白色或略微黄色的固体,其储存稳定并能容易地用合适的无菌水溶液重建以供静脉内给药。

[0067] 本发明的盐和晶体形式可单独给药或者与一种或多种其他药物组合给药。一般来说,它们与一种或多种药物可接受赋形剂一起作为制剂给药。本文使用术语“赋形剂”描述除本发明化合物以外的可向该制剂赋予功能特征(即药物释放速率控制)和/或非功能特征(即加工助剂或稀释剂)的任意组分。赋形剂的选择在很大程度上取决于以下因素,例如给药的特定模式、赋形剂对溶解度和稳定性的影响、以及剂型的性质。药物组合物还可包含载体,其基本为惰性材料,通常是液体,用于稀释活性成分。合适的载体是本领域中已知的,包括无菌水以及例如盐水或葡萄糖的无菌溶液。

[0068] 适合于递送化合物X的固体形式的药物组合物及其制备方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。这些组合物及其制备方法见述于例如,雷明顿药物科学,第19版(Mack出版公司,1995)。

[0069] 对于向人类病人给药,盐或晶体形式的总日剂量通常为1000mg至10000mg,或2000mg至8000mg,或3000mg-8000mg,或4000mg-6000mg,取决于对象条件以及诸如对象体重、年龄、和性别等参数。总日剂量可以单一剂量给予,或可将其分成两个或更多个剂量,且可按医师的决定,以超出本文给出的典型范围的剂量给予。通常经由静脉内注射或通过输注递送日剂量,可以一个、两个、三个或四个剂量给予,多剂量累计提供所需的总日剂量。输注可快速进行,或可在约15分钟-4小时、通常1-3小时的时间内进行。典型的剂量方案提供每天三次或四次输注,每次持续0.25-2小时或0.25-3小时,每个剂量递送1-2克或1-2.5克化合物X,典型的总日剂量为3-8克。例如,剂量方案可每次输注递送2克化合物X,每天进行三次一个小时的输注。或者,可采用1或1.5或2或2.5或3小时单次输注2-6克、或3-5克。以上剂量基于约60kg至70kg的人类对象平均体重,对其他对象可按比例适当缩放。医师能轻易决定体重超出这个范围的对象的剂量,例如婴儿和老年人。

[0070] 附图简要描述

[0071] 通过以下非限制性实施例说明本发明。在实施例中提出以下附图:

[0072] 图1:形式1的X射线粉末衍射图谱。

[0073] 图2:形式2的X射线粉末衍射图谱。

[0074] 图3:形式1用丙酮搅拌之后的X射线粉末衍射图谱,与形式1的XRPD重叠进行对比。

[0075] 图4:形式3的X射线粉末衍射图谱。

[0076] 图5:形式4的X射线粉末衍射图谱。

[0077] 图6A:形式5的X射线粉末衍射图谱与图4的XRPD重叠。

[0078] 图6B:来自更大规模制备的形式5的X射线粉末衍射图谱。

[0079] 图7:形式6的X射线粉末衍射图谱。

[0080] 图8:形式7的X射线粉末衍射图谱。

[0081] 图9:形式8的X射线粉末衍射图谱。

[0082] 图10:形式9的X射线粉末衍射图谱。

[0083] 图11:形式10的X射线粉末衍射图谱。

[0084] 图12:形式11的X射线粉末衍射图谱。

[0085] 图13:形式12的X射线粉末衍射图谱。

[0086] 一般性实验细节

[0087] 将每个样品(几毫克)置于三层聚合物箔(Kapton®和/或聚丙烯)之间。值得注意

的是, Kapton®在 $2\theta=5.5^\circ$ 附近表现出强度弱的宽峰。

[0088] 然后将样品置于设置成传输模式的PANALYTICAL X' PERT PRO MPD衍射计中, 并使用下示条件分析。分析在 2° - 50° 进行 (除非另外指明)。

[0089] 放射源: CuK_α

[0090] 发生器设定: 40kV和40mA

[0091] 步长: 0.026°

[0092] 步数: 1828

[0093] 测量类型: 重复扫描 (3/5/20次)

[0094] 用于合成本发明化合物的所有起始材料、构件块、试剂、酸、碱、脱水剂、溶剂和催化剂都是可商购的或可通过本领域普通技术人员已知的有机合成方法生产 (Houben-Weyl 第四版1952, 有机合成方法 (Methods of Organic Synthesis), Thieme, 第21卷)。

[0095] 一般性条件

[0096] 使用以下设置的一系列仪器通过电子喷射、化学和电子冲击离子化方法在LC-MS、SFC-MS或GC-MS系统上采集质谱: Waters ACQUITY UPLC系统并配备ZQ 2000或SQD MS系统, 其中 (M+1) 表示该化学物种的质子化分子离子, (M+) 表示非质子化的季铵阳离子, (M+Na) 表示钠-结合离子, (M-1) 表示该化学物种的脱质子化分子离子。

[0097] 使用ICON-NMR在TopSpin程序控制下在Bruker AVANCE 500MHz或Varian400MHz NMR频谱仪上运行NMR谱。在298K测定频谱, 除非另外指明, 并相对于溶剂共振进行参比。

[0098] 仪器

[0099] MS方法: 使用带Agilent 6110质谱仪的Agilent 1100HPLC系统

[0100] 方法2m__酸性:

[0101] 柱: Kinetex C18 50x2.1mm, 2.6 μm

[0102] 柱温: 50°C

[0103] 洗脱剂: A: H_2O , B: 乙腈, 都含0.1% TFA

[0104] 流速: 1.2ml/分钟

[0105] 梯度: 1.30分钟内从2%至88%B, 0.15分钟95%B

[0106] 方法2m__酸性__极性:

[0107] 柱: Kinetex C18 50x2.1mm, 2.6 μm

[0108] 柱温: 50°C

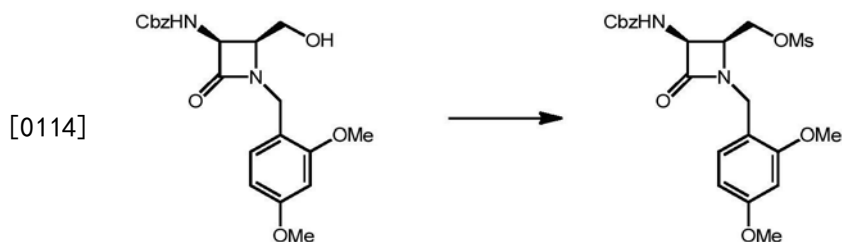
[0109] 洗脱剂: A: H_2O , B: 乙腈, 都含0.1% TFA

[0110] 流速: 1.2ml/分钟

[0111] 梯度: 1.30分钟内从1%至30%B, 0.15分钟98%B

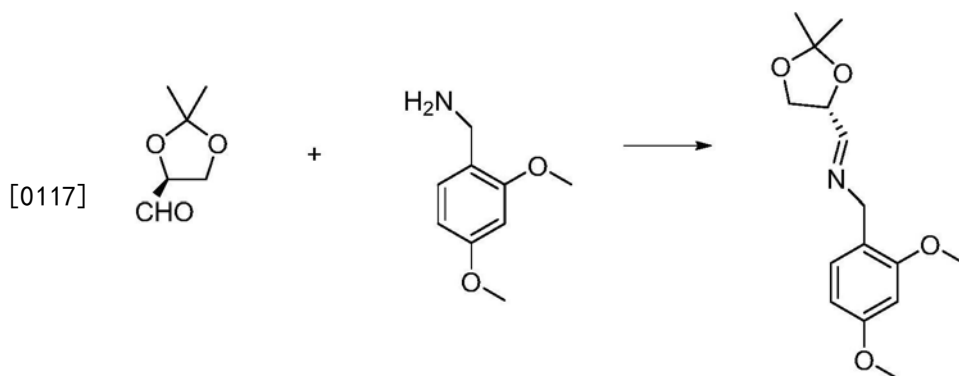
[0112] 化合物X的制备

[0113] 中间体A: ((2S,3S)-3-(((苄基氧)羰基)氨基)-1-(2,4-二甲氧基苄基)-4-氧代氮杂环丁烷-2-基)甲磺酸甲酯

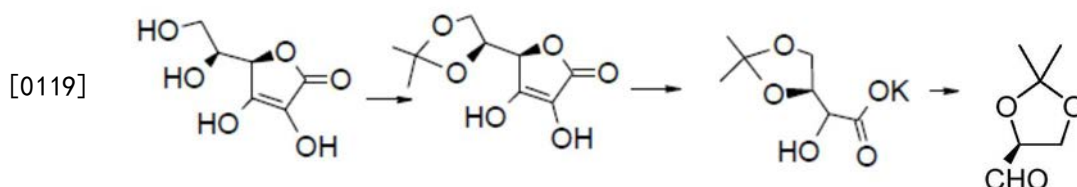


[0115] 向((2S,3S)-1-(2,4-二甲氧基苄基)-2-(羟基甲基)-4-氧代氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸苄酯(5.37g,13.41mmol)和TEA(3.72ml,26.8mmol)的0℃DCM溶液中加入甲磺酰氯(MsCl)(1.15ml,14.75mmol)。在0℃搅拌1小时之后,用水/DCM稀释,分层。用DCM萃取水性层(2x),合并的有机层用盐水洗,以Na₂SO₄干燥,真空浓缩。将粗制残留吸收在甲苯中并浓缩(2x),提供灰白色固体状的标题化合物。在随后的反应中就此使用。LCMS:R_t=0.86分钟,m/z=479.2(M+1)方法2m_酸性。

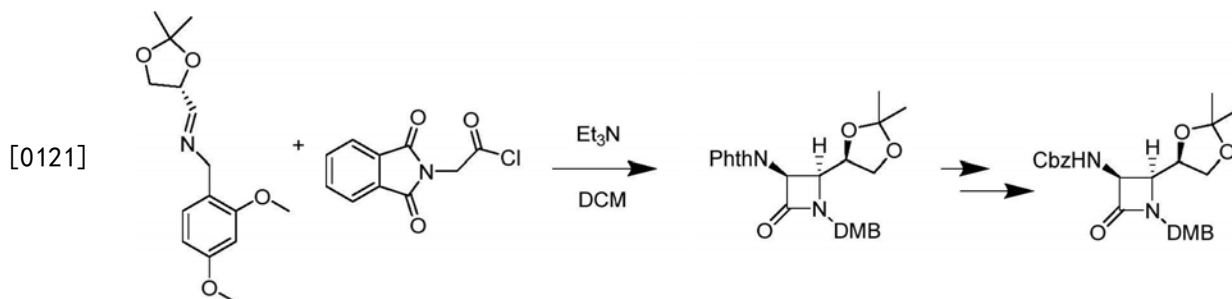
[0116] 这个步骤的起始材料可使用以下途径或基于这些途径的一些步骤组合而制得。在第一途径中,用2,4-二甲氧基苄基胺缩合受保护的手性醛以制成手性亚胺。



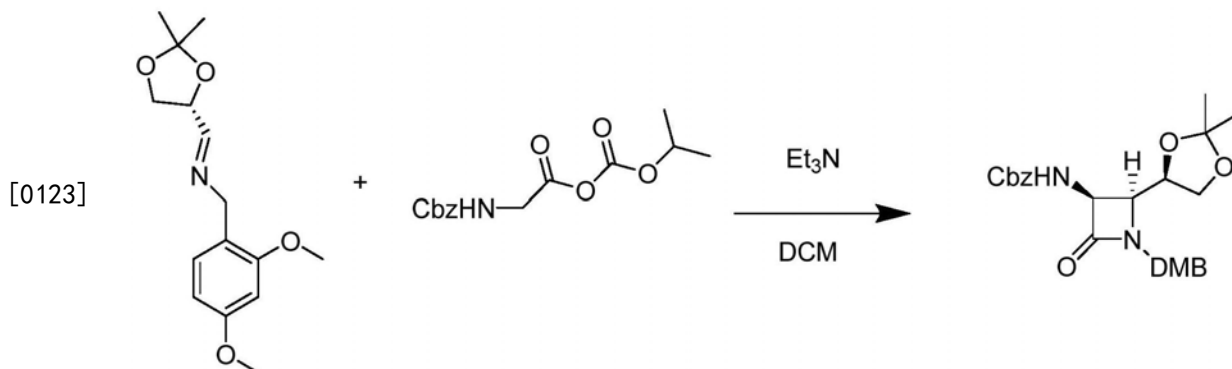
[0118] 该手性醛是已知的,可从柠檬酸制得:



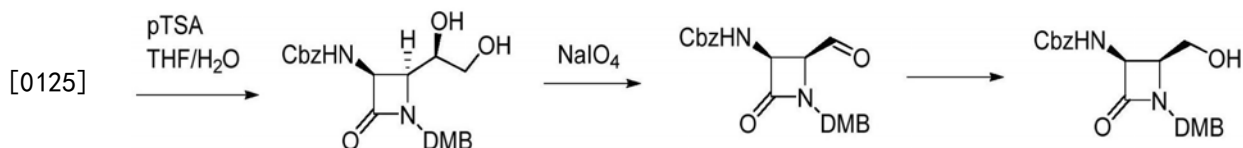
[0120] 可使该手性亚胺与受保护形式的氨基乙酸反应,例如:



[0122] 和

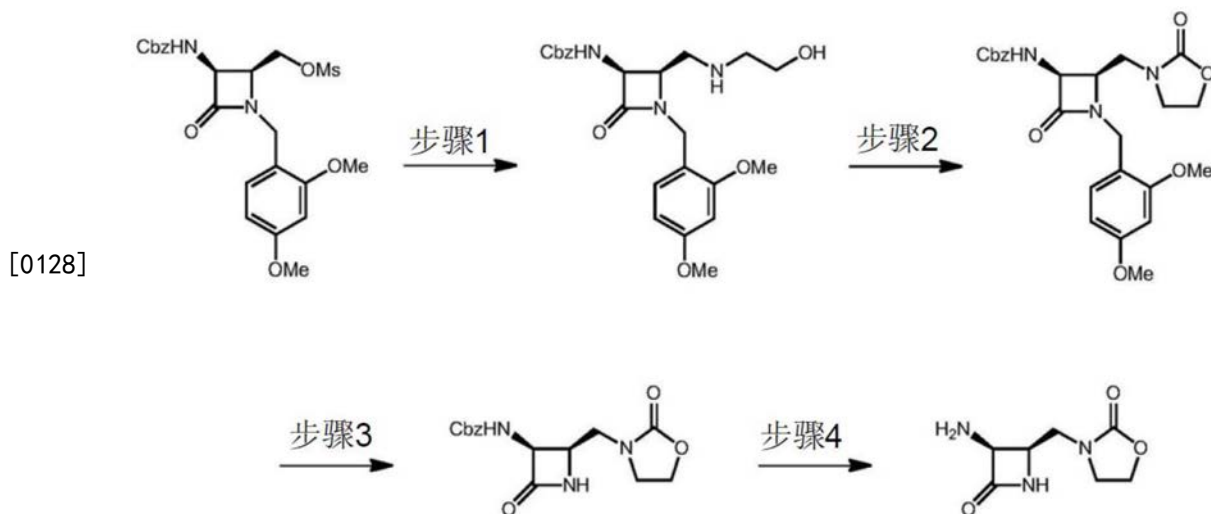


[0124] 第二选项所必须的混合醛可从CBZ-保护的氨基乙酸和氯甲酸异丙酯在二氯甲烷中制备 (DMB表示2,4-二甲氧基苄基基团)。这个受保护的中间体的二氧戊环然后在温和的酸性条件下水解并氧化成醛,其可容易地用例如硼氢化钠还原,以提供所示双保护的伯醇。



[0126] 这个中间体的伯醇可被转化成离去基团,例如通过用碘和三苯膦处理以生成伯碘化物,或者通过用碱和磺酰氯处理以生成例如甲磺酸盐或甲苯磺酸盐。这个活化的中间体如以下步骤1中所示与羟乙胺立即反应。

[0127] 中间体B: 3-((2R,3S)-3-氨基-4-氧代氮杂环丁烷-2-基)甲基)噁唑烷-2-酮



[0129] 步骤1: ((2R,3S)-1-(2,4-二甲氧基苄基)-2-(((2-羟基乙基)氨基)甲基)-4-氧代氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸苄酯

[0130] 向((2S,3S)-3-(((苄基氧)羰基)氨基)-1-(2,4-二甲氧基苄基)-4-氧代氮杂环丁烷-2-基)甲磺酸甲酯(6.43g,13.4mmol)的乙腈溶液(44.8ml)中加入乙醇胺(8.13ml,134mmol),然后加入DIEA(7.0ml,40mmol)。将该溶液加热到80℃保持20小时,然后冷却至室温,用EtOAc稀释,用水洗涤,用Na₂SO₄干燥,真空浓缩,提供白色固体状的标题化合物(4.47g,75%)。LCMS:R_t=0.60分钟,m/z=444.2(M+1)。

[0131] 步骤2: ((3S,4R)-1-(2,4-二甲氧基苄基)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸苄酯

[0132] 向((2R,3S)-1-(2,4-二甲氧基苄基)-2-(((2-羟基乙基)氨基)甲基)-4-氧代氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸苄酯(4.47g,10.08mmol)的氯仿溶液(50ml)中加入羰基二咪唑(CDI)(4.90g,30.2mmol)。在室温搅拌30分钟之后,将反应混合物真空浓缩。粗制残留经由二氧化硅凝胶色谱(MeOH-DCM,0-5%)纯化,提供白色泡沫状的标题化合物(3.84g,81%)。LCMS: $R_t=0.76$ 分钟, $m/z=470.1$ (M+1)。

[0133] 步骤3:((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸苄酯

[0134] 与Mastalerz等J.Med.Chem.1988,31,1190中的制法类似地制备,使用((3S,4R)-1-(2,4-二甲氧基苄基)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸苄酯(3.84g,8.18mmol)、 $K_2S_2O_8$ (3.10g,11.5mmol)和 K_2HPO_4 (1.852g,10.6mmol)在ACN:水(2:1,136ml)中并在90℃加热40分钟。加入更多的 $K_2S_2O_8$ (663g,2.45mmol)和 K_2HPO_4 (370mg,2.13mmol),将混合物再加热3小时。加入更多的 $K_2S_2O_8$ (332mg,1.23mmol)和 K_2HPO_4 (185mg,1.06mmol),再加热2小时,然后真空浓缩,除去大部分ACN。用盐水/EtOAc稀释混合物,分离各层。用EtOAc萃取水性层(3x),混合的有机层用 Na_2SO_4 干燥。粗制残留经由二氧化硅凝胶色谱(EtOAc-庚烷,0-100%然后MeOH-DCM,10%)纯化,提供米色泡沫状的标题化合物(1.61g,62%)。LCMS: $R_t=0.51$ 分钟, $m/z=320.0$ (M+1)方法2m__酸性。

[0135] 步骤4:3-(((2R,3S)-3-氨基-4-氧代氮杂环丁烷-2-基)甲基)噁唑烷-2-酮

[0136] 按照Malmström等Bioorg.Med.Chem.Lett.2012,22,5293制备,使用((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸苄酯(96mg,0.30mmol)和Pd/C 10%Degussa型101(10%,64mg)和氢气在EtOH:MeOH(4:1,1.5ml)中保持1小时。在以下步骤中就此使用粗制的残留。LCMS: $R_t=0.11$ 分钟, $m/z=186.0$ (M+1)方法2m__酸性。

[0137] 化合物X:1-(((Z)-(1-(2-氨基噁唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸

[0138] 步骤1:1-(((Z)-(1-(2-((叔-丁氧基羰基)氨基)噁唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸二苯甲酯

[0139] 向按照公开的专利申请US2011/0190254制备的(Z)-2-((1-((二苯甲基氧)羰基)环丙氧基)亚氨基)-2-(2-((叔-丁氧基羰基)氨基)噁唑-4-基)乙酸(854mg,1.59mmol)、中间体B(324mg,1.75mmol)和HATU(785mg,2.07mmol)的DMF溶液(7.9ml)中加入DIPEA(832μl,4.77mmol)。搅拌1小时之后,倒入水中并用EtOAc萃取。向水层中加入盐水,进一步用乙酸乙酯(EtOAc)萃取(3x)。混合的有机层用 Na_2SO_4 干燥,真空浓缩。粗制的残留经由二氧化硅凝胶色谱(0-10%MeOH-DCM)纯化,提供米色泡沫状的标题化合物(1.09g,97%)。LCMS: $R_t=0.97$ 分钟, $m/z=705.3$ (M+1)方法2m__酸性。

[0140] 可使用多种其他的偶联剂来代替HATU,例如任意的典型碳二亚胺,或CDMT(2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪)和N-甲基吗啉,从而形成在步骤1中产生的酰胺键。

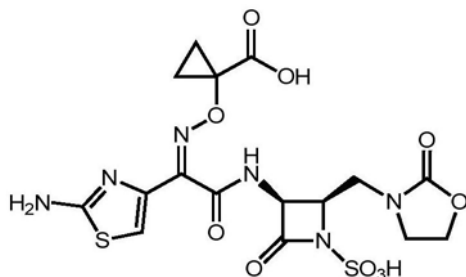
[0141] 步骤2:((3S,4R)-3-((Z)-2-((1-((二苯甲基氧)羰基)环丙氧基)亚氨基)-2-(2-((叔-丁氧基羰基)氨基)噁唑-4-基)乙酰氨基)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)氮杂环丁烷-1-磺酸

[0142] 在0℃用 $SO_3 \cdot DMF$ (448mg,2.84mmol)处理DMF(7.0ml)中的1-(((Z)-(1-(2-((叔-

丁氧基羰基)氨基)噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸二苯甲酯(1.00g,1.42mmol)。在室温搅拌2小时之后,将溶液倒入用冰冷却的盐水中,用EtOAc萃取(3x)。混合的有机层用Na₂SO₄干燥,真空浓缩,提供白色固体状的标题化合物(假定定量)。LCMS:R_t=0.90分钟,m/z=785.2(M+1)方法2m__酸性。

[0143] 步骤3:1-((Z)-1-(2-氨基噻唑-4-基)-2-氧代-2-(((3S,4R)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)-1-磺基氮杂环丁烷-3-基)氨基)亚乙基)氨基)氧)环丙甲酸

[0144]



[0145] 向(3S,4R)-3-((Z)-2-((1-((二苯甲基氧)羰基)环丙氧基)亚氨基)-2-(2-((叔丁氧基羰基)氨基)噻唑-4-基)乙酰氨基)-2-氧代-4-((2-氧代噁唑烷-3-基)甲基)氮杂环丁烷-1-磺酸的0℃DCM溶液(1.5ml)中加入TFA(5.39ml,70.0mmol),10分钟之后,撤去冰浴。在室温保持1小时之后再加入TFA(3.24ml,42.0mmol),用DCM稀释溶液,30分钟之后真空浓缩。可任选向TFA反应中加入苯甲醚以减少副产物形成,其可增大这个步骤中所需产物的产率。粗制的残留用反相制备型HPLC(XSelect CSH,30x100mm,5μm,C18柱;ACN-水和0.1%甲酸调节剂,60ml/分钟)纯化,提供白色粉末状的标题化合物(178mg,23%)。LCMS:R_t=0.30分钟,m/z=518.9(M+1)方法2m__酸性;¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) 9.27(d,J=9.0Hz,1H) 6.92(s,1H) 5.23(dd,J=9.1,5.7Hz,1H) 4.12-4.23(m,3H) 3.72-3.62(m,2H估计;被水遮蔽) 3.61-3.52(m,1H估计;被水遮蔽) 3.26(dd,J=14.5,5.9Hz,1H) 1.36(s,4H)。¹H NMR(400MHz,D₂O) 7.23(s,1H), 5.48(d,J=5.8Hz,1H), 4.71-4.65(m,1H), 4.44(t,J=8.2Hz,2H), 3.89-3.73(m,3H), 3.54(dd,J=14.9,4.9Hz,1H), 1.65-1.56(m,2H), 1.56-1.46(m,2H)。这个工艺的产物是无定形的。除了以上讨论的溶剂,化合物X可从丙酮、乙醇、pH为3的柠檬酸盐缓冲剂(50mM)或pH为4.5的乙酸盐缓冲剂(50mM)中结晶。

[0146] 仪器

[0147] DSC:Pyris Diamond DSC,氮气(20ml/分钟)

[0148] TGA:Pyris 1TGA,氮气(20ml/分钟),以10℃/分钟扫描

[0149] XRPD:X'Pert Pro MPD Panalytical,Cu,40kV,40mA电流

[0150] 管阳极:(Cu)

[0151] 发生器电压:40kV

[0152] 管电流:40mA

[0153] 起始角[2θ]:3

[0154] 终止角[2θ]:40

[0155] 扫描时间2分钟

[0156] 形式1和形式2

[0157] 如上所述制备化合物X并从溶剂中结晶以提供具有图1或图2中的X射线粉末衍射

图谱 (XRPD) 的材料。这些代表两个独立批次的晶体材料,在本文中被称为形式1和形式2。形式1和2具有一些类似的XRPD峰,形式2的XRPD显示变宽的谱线,因此被鉴定为形式2的产物可包含一些形式1材料,或者两种样品都可以是晶体形式的混合物。这两种形式是基本无水的,根据Karl Fischer分析,包含小于约1%重量的水。

[0158] 将形式1的化合物X (1.2g) 悬浮在12ml丙酮中并在20℃搅拌3天。样品显示未发生变化:但是一些谱线变宽,该产物的XRPD (图3) 仍然显示与形式1基本一致。

[0159] 给出图1中XRPD的样品在DSC过程中于约205℃表现出强放热,经由TGA测定有平缓失重到180℃总计约为2%失重。

[0160] 产生图2中XRPD (形式2) 的样品在DSC过程中于约203℃表现出强放热,到160℃的质量损失 (3.7%) 略大于形式1。

[0161] 列表1:形式1的XRPD峰列表 (2 θ :下划线表示最强的那些峰)

[0162]	1 <u>6.6</u>
[0163]	2 11.1
[0164]	3 <u>13.4</u>
[0165]	4 14.4
[0166]	5 15.2
[0167]	6 <u>16.6</u>
[0168]	7 <u>17.9</u>
[0169]	8 <u>18.8</u>
[0170]	9 <u>20.3</u>
[0171]	10 22.5
[0172]	11 23.3
[0173]	12 <u>25.1</u>
[0174]	13 27.7
[0175]	14 <u>28.9</u>
[0176]	15 30.2
[0177]	形式1还可通过这些峰的子集表征,例如位于6.6、13.4和18.8的峰。
[0178]	列表2:形式2的XRPD峰列表 (2 θ :下划线表示最强的那些峰)
[0179]	1 <u>6.7</u>
[0180]	2 <u>7.5</u>
[0181]	3 11.3
[0182]	4 <u>13.3</u>
[0183]	5 <u>13.7</u>
[0184]	6 <u>15.3</u>
[0185]	7 <u>17.9</u>
[0186]	8 <u>18.7</u>
[0187]	9 <u>19.3</u>
[0188]	10 <u>20.0</u>
[0189]	11 22.8

[0190] 12 24.8

[0191] 13 27.9

[0192] 形式2还可通过这些峰的子集表征,例如位于7.5、19.3和20.0的峰。

[0193] 形式3

[0194] 将形式1的化合物X悬浮在甲醇中,在几分钟内,其变化成粘性的固体产物。该产物表现出图4中所示的XRPD图谱,在本文中被称为形式3。注意到,如下所述,以更大规模在甲醇中搅拌更长时间之后,获得不同的形式(形式8);因此形式3可能是形式1在这些条件下变化而形成的瞬时形式或混合物。

[0195] 列表3:形式3的XRPD峰列表(2 θ :下划线表示最强的那些峰)

[0196] 1 6.6

[0197] 2 7.3

[0198] 3 8.3

[0199] 4 12.7

[0200] 5 13.3

[0201] 6 13.9

[0202] 7 16.7

[0203] 8 18.9

[0204] 9 20.3

[0205] 10 21.2

[0206] 11 22.2

[0207] 12 23.9

[0208] 13 24.6

[0209] 14 25.1

[0210] 15 27.2

[0211] 16 28.0

[0212] 形式3还可通过这些峰的子集表征,例如位于7.3、18.9和21.2的峰。

[0213] 形式4

[0214] 将形式1的化合物X(1.2g)悬浮在水(12ml)中并在20℃搅拌3天。该产物表现出图5中所示的XRPD图谱,在本文中被称为形式4。该XRPD来自用滤纸干燥的样品。形式4的TGA分析显示,从约40℃开始平缓失重,在约100℃开始变快,在120-170℃达到原始重量约60%的平台。在该温度以上,看到平缓失重。早期失重与形式4的失水和DSC一致,DSC显示在相同温度范围内的强吸热以及在约110-180℃的平台。类似地,形式4的动态蒸汽吸附(DVS)分析显示,随着相对湿度降至约50%,样品质量快速损失约20%,然后是相对湿度降低-升高-降低-升高的循环产生对应于样品质量在约65%原始重量的最小重量和约80%原始重量的最大重量之间发生减小、增大、减小和增大。因此形式4是水合形式,根据相对湿度发生变化。样品的含水度随着相对湿度从非常低湿度时的无水形式变化到相对湿度约20-50%时的三水合物,到相对湿度超过60%时的六水合物。在0%相对湿度时干燥的形式4样品产生与形式1一致的XRPD。

[0215] 列表4:形式4的XRPD峰列表(2 θ :下划线表示最强的那些峰)

[0216] 1 7.0

[0217] 2 8.6

[0218] 3 13.7

[0219] 4 15.2

[0220] 5 16.1

[0221] 6 17.0

[0222] 7 18.0

[0223] 8 19.3

[0224] 9 20.9

[0225] 10 24.5

[0226] 11 26.9

[0227] 形式4还可通过这些峰的子集表征,例如位于7.0、8.6、19.3和20.9的峰。

[0228] 形式5

[0229] 形式4的样品在干气流下干燥一天,给出的粉末表现出图6A中所示的XRPD。这种材料在本文中被称为形式5。形式5的DSC显示在约204℃有急剧放热,该样品在大约这个温度下开始变黑,指示分解。TGA显示在45℃-160℃失重约7%。Karl Fisher分析显示形式5的水含量为9.6%,对应于三水合物,但该样品似乎在相对湿度低于约30%时失重;在超过80%的湿度下,其在一天内转化成形式4。

[0230] 因此化合物X的形式1、4和5似乎随着相对湿度的变化而发生互变,其可以为这些水合形式的混合物。形式5是一种在制造过程中在约25℃的环境温度下进行处理的优选形式,因为其结晶为表现良好的固体,在储存和处理过程中比其他形式更稳定,条件是保持约20-50%、优选30-40%的合适的相对湿度。在这些相对湿度范围之内,该材料主要是三水合物,对于没有特殊预防措施的处理和储存而言表现良好且稳定。

[0231] 更大规模的形式5制备

[0232] 将水(20ml)和THF(40ml)在烧瓶中混合,在25℃在搅拌条件下加入化合物X(10g, HPLC纯度约91%),提供清澈的黄色溶液。加入20mg的形式5样品(见上)作为晶种,将该混合物搅拌50分钟。然后用1小时缓慢加入THF(140ml),将该混合物再搅拌2小时。过滤悬混液,潮湿饼状物用冷(低于5℃)水洗涤,然后在20-25℃以100mbar压力干燥11小时,提供6.6g形式5的三水合物,HPLC纯度为97.8%。该样品产生图6B中所示的XRPD图谱。其在25-50%相对湿度、优选30-40%相对湿度下储存时似乎保持稳定;在更低或更高的相对湿度条件下,其可变化成如本文所述的不同水合状态。过度干燥产生在室温下几小时之内分解的一种形式,进一步证明水合形式的稳定性优点。

[0233] 列表5:形式5的XRPD峰列表(2θ:下划线表示最强的那些峰)

[0234] 1 7.3

[0235] 2 9.3

[0236] 3 12.0

[0237] 4 13.6

[0238] 5 15.8

[0239] 6 16.3

[0240]	7	18.0
[0241]	8	<u>18.6</u>
[0242]	9	<u>19.2</u>
[0243]	10	<u>19.9</u>
[0244]	11	20.2
[0245]	12	<u>21.7</u>
[0246]	13	23.0
[0247]	14	23.5
[0248]	15	<u>24.1</u>
[0249]	16	<u>24.9</u>
[0250]	17	<u>27.3</u>
[0251]	18	<u>27.8</u>
[0252]	19	<u>29.8</u>

[0253] 形式5还可通过这些峰的子集表征,例如位于7.3、9.3和27.8的峰;任选通过位于7.3、9.3、19.9和27.8的峰表征。

[0254] 形式5(三水合物)或可通过单一的晶体X射线结构表征,其为单斜晶系,空间群P2(1),具有以下晶胞大小 $a=13.121(4) \text{ \AA}$; $b=7.400(3) \text{ \AA}$; $c=25.017(8) \text{ \AA}$ ($\alpha=90^\circ$; $\beta=96.037^\circ$; $\gamma=90^\circ$);晶胞体积为 $2415.6(14) \text{ \AA}^3$ 。这个结构的数据在波长 $1.54178 \text{ \AA}$, 100°K ; θ 范围 3.99° 至 68.44° 采集;采集47822次反射。该单一晶体结构确认,在晶胞中每个化合物X分子存在三个水分子,水分子位于沟道中。

[0255] 形式6

[0256] 将形式1的化合物X(1.2g)悬浮在DMSO:水(25:75体积比,12ml)中并在 20°C 搅拌3天。收集固体样品并用滤纸干燥。该产物表现出图7中所示的XRPD图谱,在本文中被称作形式6。DSC和TGA一致,高至约 130°C 有溶剂损失、且 150°C - 200°C 间再次溶剂损失、随后在 200°C 以上降解。

[0257] 列表6:形式6的XRPD峰列表(2θ :下划线表示最强的那些峰)

[0258]	1	6.6
[0259]	2	<u>8.1</u>
[0260]	3	<u>9.2</u>
[0261]	4	<u>12.8</u>
[0262]	5	<u>13.9</u>
[0263]	6	<u>14.4</u>
[0264]	7	<u>16.7</u>
[0265]	8	17.8
[0266]	9	19.4
[0267]	10	<u>20.1</u>
[0268]	11	<u>21.2</u>
[0269]	12	<u>24.7</u>

[0270] 13 26.6

[0271] 14 27.3

[0272] 形式6还可通过这些峰的子集表征,例如位于8.1、9.2和12.8的峰;任选可通过位于21.2和24.7的另外的峰表征。

[0273] 形式7

[0274] 将如上所述制得的形式6的化合物X在干气流下干燥一天。所得粉末表现出图8中所示的XRPD图谱,在本文中被称为形式7。DSC显示从约134℃开始并延续至约170℃的大放热。¹H NMR显示存在约2当量的DMSO和一些水(3.6%)。Karl Fisher滴定确定存在3.6%的水,对应于1当量。因此这种形式是溶剂化物。

[0275] 列表7:形式7的XRPD峰列表(2θ:下划线表示最强的那些峰)

[0276] 1 6.7

[0277] 2 7.3

[0278] 3 9.2

[0279] 4 10.6

[0280] 5 12.8

[0281] 6 14.4

[0282] 7 16.0

[0283] 8 17.6

[0284] 9 18.0

[0285] 10 19.5

[0286] 11 20.0

[0287] 12 20.3

[0288] 13 24.9

[0289] 14 27.0

[0290] 15 27.6

[0291] 形式7还可通过这些峰的子集表征,例如位于6.7、7.3和20.3的峰。

[0292] 形式8

[0293] 将形式1的化合物X(1.2g)悬浮在甲醇(12ml)中并在20℃搅拌3天。收集固体样品并产生图9中所示的XRPD图谱(没有干燥),其在本文中被称为形式8。形式8的样品在干气流下干燥之后,峰显著变宽但一般出现在相同位置附近。干燥后样品的TGA显示至140℃的平缓失重(约4%),以及从约170℃开始的更急剧的失重。DSC显示在约172℃的强放热,可与样品降解相关。

[0294] 列表8:形式8的XRPD峰列表(2θ:下划线表示最强的那些峰)

[0295] 1 6.2

[0296] 2 12.5

[0297] 3 16.8

[0298] 4 17.8

[0299] 5 19.5

[0300] 6 20.7

[0301] 7 21.8

[0302] 8 25.9

[0303] 形式8还可通过这些峰的子集表征,例如位于6.2、21.8和25.9的峰。

[0304] 形式9

[0305] 在25℃-40℃将形式3的化合物X悬浮在丙酮和水中。水与丙酮的比例从2:98变化至10:90。平衡24小时之后,在每种情况中都获得低结晶度的杂-溶剂化物形式。虽然XRPD随着水与丙酮的比例而变化,所有样品都产生具有宽的突起而非尖峰的XRPD图谱。图10显示在40℃在10:90水/丙酮中平衡24小时的样品的XRPD,下表总结了这种样品的XRPD。这种固体形式在本文中被称为形式9。

2θ 角°	d 值 Å	相对强度	强度描述
6.263687	14.09934	100.0%	强
11.86655	7.451857	11.9%	弱
12.42631	7.117408	17.4%	弱
12.61893	7.009192	91.6%	强
12.63825	6.998521	94.2%	强
13.42144	6.591842	21.0%	中等
14.4584	6.121322	23.6%	中等
19.28026	4.599924	23.3%	中等
[0306] 20.21352	4.389602	15.3%	弱
22.13261	4.013133	38.6%	中等
22.32398	3.979161	45.7%	中等
23.14303	3.840154	35.3%	中等
24.56875	3.620444	13.9%	弱
25.45017	3.49702	17.2%	弱
26.95376	3.305257	30.7%	中等
27.52409	3.23805	35.9%	中等
33.01997	2.710583	12.5%	弱
39.13803	2.299801	11.5%	弱

[0307] 形式9可通过这些峰的子集表征,例如在上表中被鉴定为相对强度“强”的峰,例如位于6.3和12.6的峰,以及可任选该表中一个或多个具有中等相对强度的峰,例如位于22.1、22.3、23.1、27.0和27.5的峰。

[0308] 形式10

[0309] 使形式1的化合物X(无水)暴露于43%相对湿度中保持一天或更长时间。根据水含量测定,该晶体产物似乎是倍半水合物(化合物X·1.5H₂O)。注意到形式5(三水合物)在类似条件下是稳定的,而从无水物开始时,其在这些条件下似乎会平衡形成倍半水合物,并在相同的相对湿度下保持该形式至少14天。这种晶体形式产生图11中所示的XRPD图谱,在本文中被称为形式10。下表总结了这种样品的XRPD中的主要峰。

[0310]

2θ 角°	d 值 Å	相对强度	强度描述
6.614136	13.35305	54.0%	中等
7.75259	11.39455	14.9%	弱
11.04603	8.003481	88.8%	强
13.25272	6.675381	33.7%	中等
15.63391	5.663605	25.2%	中等
16.49456	5.369978	100.0%	强
17.94729	4.93845	17.1%	弱
18.62139	4.761168	23.3%	中等
19.39448	4.573091	17.4%	弱
20.28656	4.373962	10.7%	弱
22.23199	3.995416	44.1%	中等
23.39858	3.798789	41.6%	中等
24.7725	3.591125	17.5%	弱
27.42817	3.249156	34.8%	中等
30.97646	2.884582	10.5%	弱
31.35952	2.850214	7.6%	弱
33.26275	2.691351	6.5%	弱
34.28825	2.613168	4.3%	弱
35.97828	2.494198	4.5%	弱
37.32749	2.407085	3.2%	弱
38.84248	2.316617	6.5%	弱

[0311] 形式10可通过上表中具有中等至强相对强度的XRPD峰表征,例如位于6.6、11.0、13.3、15.6、16.5、18.6、22.2、23.4和27.4的峰。其还可通过这些峰的子集表征,例如具有40或更高相对强度的峰,例如位于6.6、11.0、16.5、22.2和23.4的峰,或通过这此峰中至少3或4个峰的子集表征。

[0312] 形式11

[0313] 使形式5的化合物X(三水合物)暴露于22%相对湿度约3天以提供根据水含量分析表征为二水合物(化合物X-2H₂O)的晶体固体。这种材料若暴露于超过约40%的相对湿度则容易转变成三水合物(形式5)。该二水合物在本文中被成为形

[0314] 式11,产生图12中所示的XRPD图谱:该XRPD图谱中的主要峰在下表中列出。

[0315]

2θ 角°	d 值 Å	相对强度	强度描述
3.571943	24.71601	1.5%	弱
7.436401	11.87831	35.5%	中等
9.691609	9.118732	100.0%	强
15.62894	5.665396	15.8%	弱
16.27854	5.440749	13.8%	弱
17.03032	5.20223	26.8%	中等

[0316]

2θ 角°	d 值 Å	相对强度	强度描述
19.52173	4.543567	28.0%	中等
20.30047	4.370997	12.2%	弱
22.21399	3.998612	26.5%	中等
25.2108	3.529677	14.4%	弱
25.26935	3.521632	20.2%	中等
26.31417	3.384125	26.2%	中等
27.24226	3.270906	11.1%	弱
28.06091	3.177313	25.0%	中等
29.32342	3.043323	34.3%	中等
30.2374	2.953383	14.5%	弱
31.95423	2.798512	13.9%	弱
32.37313	2.76325	5.1%	弱
33.33318	2.685825	4.2%	弱
35.18906	2.548309	3.3%	弱
36.32229	2.471361	3.8%	弱
38.46064	2.338733	5.4%	弱

[0317] 形式11通过这个表中相度强度20或更高的XRPD峰、或相对强度至少为25的那些峰表征,例如位于7.4、9.7、17.0、19.5、22.2、26.3、28.1和29.3的峰,或该表中相对强度至少26或至少28的这些峰中3、4或5个峰的子集。

[0318] 形式12

[0319] 使形式5的化合物X在相对湿度65%的空气中暴露约3天,提供根据水含量分析表征为四水合物的晶体材料。若将相对湿度降低至约40%,则这种材料容易转变成三水合物(形式5)。该四水合物在本文中被称为形式12,产生图13中所示的XRPD图谱:该XRPD图谱中的主要峰在下表中列出。

[0320]

2θ 角°	d 值 Å	相对强度	强度描述
6.631469	13.31819	15.1%	弱
7.33743	12.0383	72.0%	强
9.266574	9.536012	20.4%	中等
11.93609	7.408599	22.6%	中等
13.52676	6.540754	24.4%	中等
13.84431	6.391434	16.2%	弱
14.79842	5.98143	17.5%	弱
15.04928	5.882283	20.4%	中等
15.66726	5.651626	17.4%	弱
16.26423	5.445504	22.3%	中等
16.73753	5.292569	26.6%	中等
17.82639	4.971669	51.5%	中等
18.53134	4.784101	23.2%	中等
19.00545	4.665812	100.0%	强
19.80871	4.478384	49.8%	中等

[0321]

2θ 角°	d 值 Å	相对强度	强度描述
20.37349	4.355495	82.5%	强
21.28466	4.171054	21.3%	中等
21.54339	4.121543	27.1%	中等
22.20079	4.000961	25.6%	中等
22.99691	3.864222	17.5%	弱
23.42381	3.794754	25.5%	中等
24.03782	3.699195	80.9%	强
24.68722	3.603338	73.6%	强
24.89251	3.574084	40.2%	中等
25.51126	3.488783	15.7%	弱
26.01732	3.42206	13.3%	弱
26.66767	3.340063	33.5%	中等
27.24035	3.27113	67.3%	强
27.76732	3.210236	50.0%	中等
28.03201	3.180522	23.7%	中等
28.61161	3.117397	17.1%	弱
29.06848	3.069431	17.4%	弱
29.78494	2.997208	28.9%	中等
31.00716	2.881796	27.2%	中等
32.11536	2.784838	42.0%	中等
33.47732	2.67459	13.0%	弱
35.87286	2.501286	20.9%	中等

[0322] 形式12可通过上表中相对强度至少40的XRPD峰表征,即,位于7.3、17.8、19.0、19.8、20.4、24.0、24.7、24.9、27.2、27.8和32.1的XRPD峰。或者,其可通过这些峰中至少3个、或至少4个、或至少5个峰的子集表征。形式12还可通过在该表中被描述为相对强度强的XRPD峰表征,即,位于7.3、19.0、20.4、24.0、24.7和27.2的峰。

[0323] 化合物X的水合物样品,包括形式5、11和12,显示容易随着相对湿度从约22%变化到约92%而互变。注意到在92%相对湿度下,化合物X似乎是表征为六水合物的晶体形式和形式12的四水合物的混合物。相比之下,无水物(形式1)随着相对湿度增大至43%而优先转化成倍半水合物,并在更高的相对湿度下转变成三水合物和四水合物。

[0324] 化合物X的药物组合物

[0325] 将化合物X (500mg) 和L-精氨酸 (332.5mg) 混合在小瓶中。加入蔗糖(晶体,无热原蔗糖:1000mg) 和适于注射的水 (8.00ml)。需要时使用1.0N HCl或1.0N NaOH调节该溶液的pH,达到pH为 5.0 ± 0.5 ,优选为 5.0 ± 0.2 。这样提供包含约62.5mg/ml化合物X的精氨酸盐的溶液。需要时可将这种溶液过滤,并可冻干提供白色或灰白色固体(冻干物)。可用无菌水或药物可接受水性载体例如等渗盐水或葡萄糖重建冻干的固体,以提供适合于静脉内给药的溶液。冻干物应储存在避光容器中以保护冻干物以免发生光降解。这种工艺可放大或缩小以提供便于储存和分发的单位剂量,或可按需要进一步加工的散装材料。对于规模放大,温度控制很重要:在加入精氨酸或其他碱之前,溶液中的化合物X应保持在低于10℃的温度,优选为0℃-8℃,更优选为2℃-8℃,因为该化合物在没有碱或在pH为4-6范围以外容易在水中发生水解。

[0326] 在一种实施方式中,如所述使用包含约500mg无水化合物X的化合物X三水合物(形式5)制备根据以上实施例的混合物,并在小瓶中冻干,然后密封储存和分发,优选使用丁基橡胶塞(例如D777塞),每个小瓶中的冻干物包含约500mg化合物X。装有冻干物的小瓶在使用前储存在等于或低于室温的条件下。

[0327] 另一种适合于IV注射的制剂包含化合物X(100mg)和0.5N碳酸氢钠(0.75ml),需要时可含pH调节剂(按需要1N NaOH或1N HCl)从而使pH约为5.5(pH为5-6),加上足以实现100mg/ml最终浓度的一定量的注射用水。

[0328] 化合物X的稳定性

[0329] 化合物X在固体形式中是稳定的,但化合物X的盐在溶液中比游离酸更稳定;因此,重要的是确定用于给药的合适药学上可接受盐。通过向水中的化合物X加入碱(1.0或2.0当量)来制备化合物X的盐,并将该溶液冻干。通过XRPD发现由此获得的固体似乎是无定形的。通过这种方式,尝试用氢氧化钠、(L)-赖氨酸、(L)-精氨酸、氢氧化钙、葡甲胺和氢氧化镁形成化合物X的盐。发现钠盐和精氨酸盐特别稳定,因此适合形成通常用于静脉内注射和输注的水性介质给药形式。

[0330] 在25℃和40℃对固体形式的二钠盐和二-(L)-精氨酸盐的样品进行稳定性测试。开始时钠盐样品HPLC纯度为97.2%,在25℃保持6周之后,仍然为96.2%纯度。同样材料在40℃保持3周之后为94.8%纯度,6周之后为93.6%纯度。在研究过程中出现或增多的明显杂质在相对保留时间(RRT)为0.34和1.11时出现(对于化合物X定义RRT=1)。

[0331] 精氨酸盐开始时HPLC纯度为97.3%,在25℃保持6周之后为96.3%纯度。在40℃保持3周之后,其纯度降至95.1%,6周之后为94.2%。在这项研究过程中出现或增多的明显杂质在相对保留时间(RRT)为1.09、1.11和1.13时出现(对于化合物X定义RRT=1)。分别在25℃和40℃进行6周的稳定性研究之后,这些样品的HPLC图谱显示在图10和11中。每张图中位于下方的图谱是用于测量定量限(LOQ)的样品;其上方图谱代表用于形成盐的化合物X样品;其上方图谱代表6周之后的精氨酸盐;其上方(顶部)图谱代表6周之后的钠盐。

[0332] 用于稳定性研究(图10和11)的HPLC条件:

[0333] 带260nmUV检测器的Agilent 1290系统

[0334] Acquity HSS T3柱,100mmx2.1mm ID;1.8μm粒径(由Waters提供)

[0335] 柱温:40℃

[0336] 移动相

[0337] A:水中的0.05%TFA

[0338] B:甲醇中的0.05%TFA

[0339] 流速:0.45ml/分钟

[0340] 梯度(A/B比率):97:3保持8分钟;75:25保持3分钟;0:100保持1分钟

[0341] 还发现化合物X会发生光化学降解;因此应将化合物X储存在深色或不透明的容器中才能达到最佳保存期限。在本发明的一种实施方式中,将化合物X包装在显著减少光暴露的容器中,优选在相对湿度为25-50%的气氛中,更优选为30-40%或30-45%相对湿度。

[0342] 生物活性

[0343] 细菌筛选和培养

[0344] 细菌分离物从-70℃冷冻储备料通过两个连续过夜传代培养,在环境空气中在35

℃在5%血琼脂上(Remel, Lenexa, Kans.)。质量对照和绿脓杆菌(ATCC 27853)来自美国典型培养物保藏所(ATCC; Rockville, Md.)，并且PA01来自K. Poole博士。

[0345] 构建大肠埃希氏菌同基因菌株，菌株NB27273-CDY0026(亲本)，NB27273-CDY0033(KPC2)和NB27273-CDY0030(SHV12)

[0346] 菌株NB27273(BW25113 pspB::Km^r)来自Keio转座子插入集。该菌株pspB基因被卡那霉素耐受性标记物替换(BW25113 pspB::Km^r)。采用公开的方法经由FLP重组酶，这种菌株的pspB中的转座子被矫正。得到的菌株BW25113 pspB被用作表达关键β-内酰胺酶的多拷贝载体的宿主。引导β-内酰胺酶组成型表达的多拷贝质粒创建如下：通过DNA2.0(Palo Alto, CA)制成编码大肠埃希氏菌KPC2和SHV12-内酰胺酶的合成的、密码子优化的基因。将每个合成片段设计成在它们的末端包含NotI和NcoI限制性位点，允许接合到NotI/NcoI消化的pET28a(+)衍生物中用于蛋白表达。这些载体中的插入物被用作模板DNA用于编码KPC2和SHV12的基因的PCR扩增，分别使用引物对E225(tcgcCTCGAGgcgactgcgctgacgaatttgg)(SEQ ID NO:1)和E202(aatcGAATTCttactgaccattaacgcccgaagc)(SEQ ID NO:2)和E227(tcgcCTCGAGgcgagccccgaaccgctgga)(SEQ ID NO:3)和E204(aatcGAATTCttaacgctgccagt gctcaatc)(SEQ ID NO:4)。密码子优化的核苷序列和相关的引物识别信息如下所示：

[0347] SHV12

[0348] ATGGGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGCGAGCCCGCA
ACCGCTGGAGCAGATCAAGCAGTCTGAGAGCCAGCTGAGCGGCCGTGTGGGTATGATCGAGATGGATCTGGCTTCC
GGCCGTACGCTGACGGCATGGCGTGCCGACGAACGTTTCCCGATGATGTGCGACCTTTAAAGTTGTTCTGTGTGGTG
CGGTCTTGGCACGTGTAGACGCGGGTGACGAACAAGTGGAGCGCAAGATCCATTACCGCCAACAGGACTTGGTCGA
CTACAGCCCGGTTAGCGAAAAGCACCTGGCGGATGGCATGACCGTGGGTGAATTGTGCGCCGCTGCGATTACCATG
AGCGACAATAGCGCGGCTAATCTGCTGTTGGCGACCGTTGGTGGCCAGCGGGCTTGACCGCATTTCTGCGTCAAA
TCGGCGATAATGTTACGCGTCTGGATCGCTGGGAAACGGAGCTGAACGAGGCACTGCCGGGTGATGCCCGTGATAC
CACGACTCCTGCTAGCATGGCAGCGACCCTGCGTAACTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCACGTAGCCAACGC
CAGCTGCTGCAATGGATGGTGGATGACCGCGTGGCGGGTCCGCTGATCCGCTCCGTCCTGCCAGCAGGCTGGTTCA
TTGCGGACAAAAGTGGTGCCTCTAAGCGTGGTGGCGTGGTATCGTCGCGCTGCTGGGTCCGAACAACAAGCCGA
ACGTATTGTGGTTATCTATCTGCGCGACACCCCGCAAGCATGGCCGAGCGCAACCAGCAAATTGCGGGCATTGGT
GCGGCACTGATTGAGCACTGGCAGCGTTAACGCCGGCG(SEQ ID NO:5)

[0349] E227 TCGCCTCGAGGCGAGCCCGCAACCGCTGGA(SEQ ID NO:6)

[0350] E204 AATCGAATTCTTAACGCTGCCAGTGCTCAATC(SEQ ID NO:7)

[0351] REV.COMP.E204 GATTGAGCACTGGCAGCGTTAAGAATTCGATT(SEQ ID NO:8)

[0352] KPC2

[0353] ATGGGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCGCGACTGCGCT
GACGAATTTGGTGGCCGAGCCGTTGCGGAAATTGGAGCAAGATTTTGGTGGTTCGATCGGTGTCTACGCGATGGAC
ACCGGTAGCGGTGCCACCGTGAGCTACCGTGCCGAAGAGCGTTTTCCGCTGTGTAGCTCTTTCAAGGGTTTTCTGG
CCGAGCCGTGCTGGCACGCAGCCAACAGCAAGCGGGCCTGCTGGACACCCCGATCCGTTACGGCAAAAATGCGCT
GGTTCCGTGGAGCCCGATTAGCGAAAAGTACCTGACCACCGGCATGACGGTGGCGGAGTTGAGCGCTGCGGCGGTT
CAGTATTCCGATAACGCTGCGGCAAATCTGCTGCTGAAAGAAGTGGGCGGTCCAGCGGTCTGACGGCTTTTCATGC
GTTCTATTGGCGACACCACCTTTCGCTTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACAGCGCGATTCCGGGCGACGCACG

TGATACGAGCAGCCCGCGTGCAGTGACCGAGAGCCTGCAGAAGCTGACCCTGGGCAGCGCACTGGCCGCACCGCAG
CGCCAACAGTTCGTCGATTGGCTGAAGGGTAACACCACCGGTAACCATCGTATTCGCGCAGCGGTCCCGGCTGATT
GGGCAGTTGGTGACAAGACTGGTACGTGCGGCGTTTATGGTACGGCGAATGACTACGCGGTTGTTTGGCCTACGGG
TCGTGCGCCGATCGTCTCGGCGGTGTATACCCGTGCTCCGAACAAAGACGATAAACACTCCGAAGCGGTCATCGCC
GCAGCAGCGCTCTGGCCCTGGAAGGCTTGGGCGTTAATGGTCAGTAACGCCGGCG (SEQ ID NO:9)

[0354] E225 TCGCCTCGAGGCGACTGCGCTGACGAATTTGG (SEQ ID NO:10)

[0355] E202 AATCGAATTCTTACTGACCATTAAACGCCCAAGC (SEQ ID NO:11)

[0356] REV.COMP.E202 GCTTGGGCGTTAATGGTCAGTAAGAATTTCGATT (SEQ ID NO:12)

[0357] 下划线=编码BL的DNA

[0358] 然后用XhoI和EcoRI消化PCR产物并接合到类似消化的质粒pAH63-pstS (BlaP) 中。质粒pAH63-pstS (BlaP) 是质粒pAH63的一种衍生物 (J Bacteriol:183 (21):6384-6393), 通过将TEM-1 (bla) 启动子和来自质粒pBAD的信号肽编码区域 (J Bacteriol.1995年7月177 (14):4121-30) 克隆至质粒pAH63中而制得。使用引物对E192 (ttcaCTGCAGtgaacgttgcaagcaacggC) (SEQ ID NO:13) 和E194 (TCGAggatcctcgagagcaaaa acaggaaggcaaaatgccg) (SEQ ID NO:14) 从pBAD中PCR扩增该片段, 用PstI和BamHI消化并插入到类似消化的质粒pAH63中。因此, 从基于pAH63-pstS (BlaP) 的构建体表达β-内酰胺酶是组成型的, 并且提供信号序列将这些蛋白引导至周质。使用基于质粒pAH63的载体以单拷贝插入到基因组中, 但是, 要提供更高的表达水平从而允许更敏感地检测化合物对β-内酰胺酶的敏感性, 就要将这些载体中包含的表达插入物移动到可复制的多拷贝载体pBAD-Kan (J Bacteriol.1995年7月177 (14):4121-30)。要完成这项工作, 从它们对应的载体对包含β-内酰胺酶基因的插入物、以及相关的TEM启动子和信号序列进行PCR扩增, 使用引物E269 (ccgTCTAGAcggatggcctttttgcggtttc) (SEQ ID NO:15) 和用于构建KPC2的E202 (aatcGAATT Cttactgaccattaacgcccgaagc) (SEQ ID NO:16) 以及用于构建SHV12的引物E204 (aatcGAATT Cttaacgctgccagtgcctcaatc) (SEQ ID NO:17)。然后用XbaI和EcoRI消化这些片段, 各自插入已经用相同酶进行了消化的pBAD18-kan中, 从而产生一对分别表达KPC2和SHV12的多拷贝载体。将这些载体转化入BW25113 pspB以产生菌株NB27273-CDY0033 (表达KPC2) 和NB27273-CDY0030 (表达SHV12)。pBAD18-kan载体也包含TEM启动子区域和信号序列 (但不含任何完整的β-内酰胺酶基因), 并使用标准操作转化入BW25113 pspB以产生对照菌株NB27273-CDY0026。β-内酰胺酶的表达通过验证对示例测试抗生素 (已知的KPC2或SHV12底物) 的敏感性降低来确认。

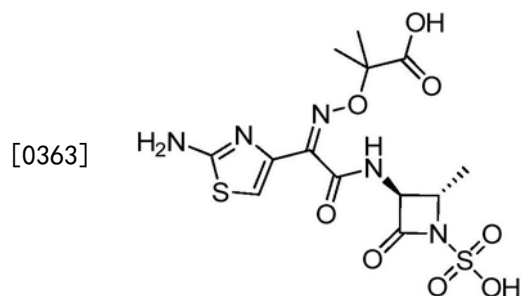
[0359] 敏感性测试

[0360] 通过微量液基稀释法按照临床和实验室协会 (CLSI) 指导原则确定最小抑菌浓度 (MIC)。简言之, 将新鲜的过夜细菌培养物悬浮在无菌盐水中, 并调节到0.5McFarland浊度标准。然后将细菌悬混液稀释到阳离子调节的Mueller-Hinton Broth (MHB II; BBL) 中得到约 5×10^5 成集落单位 (CFU) /ml的最终接种体。制备抗生素母板, 在100%二甲亚砜 (DMSO) 中, 浓度相当于最高所需最终浓度的一百倍。然后用多通道吸液管通过系列两倍稀释对抗生素母板进行稀释。得到的化合物稀释系列用无菌水1:10稀释, 得到10%DMSO最终浓度。将10μl体积的药物稀释系列转移至96孔试验板。试验板接种90μl的细菌悬混液并在35-37℃孵育20小时。使用微孔板阅读器 (Molecular Devices) 在600nm以及用阅读镜通过视觉观察阅读

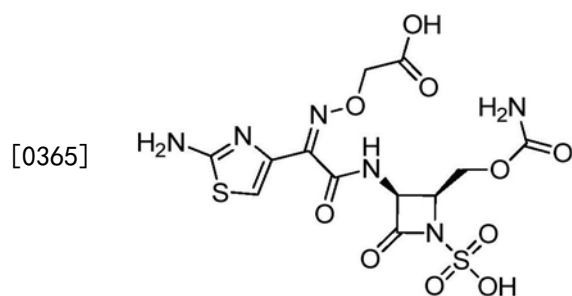
试验板。将能防止可视生长的最低化合物浓度记录为MIC。按照CLSI的指导原则,通过相对于实验室质量控制菌株测试氨曲南来监控试验表现。

[0361] 参比化合物:为了进行比较,在本文中使用以下的已知单环内酰胺化合物:

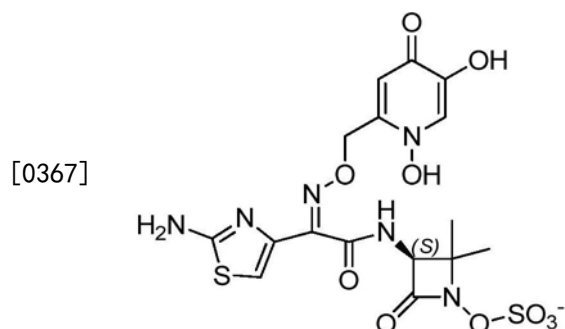
[0362] 参比化合物1:氨曲南



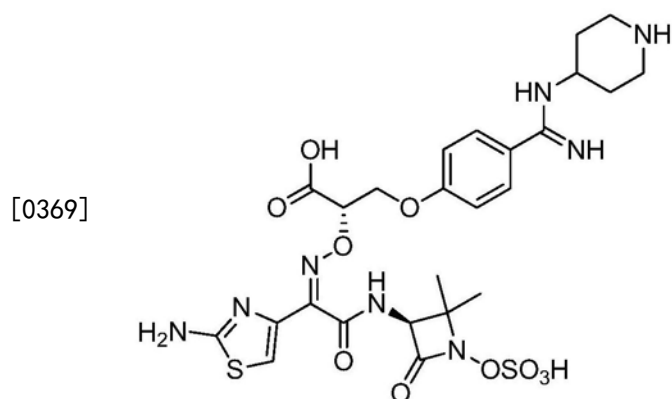
[0364] 参比化合物2:卡芦莫南



[0366] 参比化合物3: BAL30072



[0368] 参比化合物4: Aicuris W02013110643



[0370] 表A: 相对于携带各种耐受性决定子的大肠埃希氏菌同基因株的最小抑菌浓度(MIC)。

示例编号	菌株 1 MIC (μg/mL)	菌株 2 MIC (μg/mL)	菌株 3 MIC (μg/mL)
[0371] 参比化合物 1	0.125	>32	>32
参比化合物 2	0.125	1	>32
参比化合物 3	0.25	0.5	>32
参比化合物 4	≤ 0.06	0.25	32
化合物 X	≤ 0.06	0.125	0.5

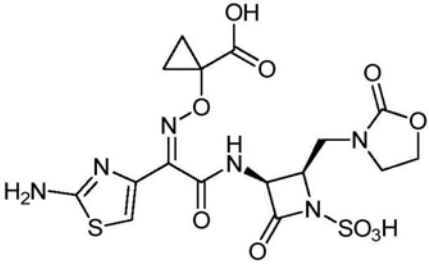
[0372] 菌株1:大肠埃希氏菌NB27273-CDY0026 (亲本)

[0373] 菌株2:大肠埃希氏菌NB27273-CDY0033 (KPC2)

[0374] 菌株3:大肠埃希氏菌NB27273-CDY0030 (SHV12)

[0375] 表A中的数据显示,化合物X对于大肠埃希氏菌具有优良的抗菌效力,包括对几种已知的单环内酰胺和sulfactam抗生素显示强耐受性的菌株。

[0376] 下表提供化合物X的其他活性数据。化合物X在大肠埃希氏菌菌株25922和包含KPC-2的大肠埃希氏菌(以上菌株2,是一种已知的来自肺炎克雷白氏菌属的碳青霉烯酶)上进行测试,并表现出这些抑菌浓度(MIC),单位是mg/ml。

化合物 X	盐	Ec 25922	Ec KPC2 Iso
[0377] 	无	0.25	0.125

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 诺华股份有限公司 (Novartis AG)
- [0003] <120> 单环内酰胺抗生素的盐和固体形式
- [0004] <130> PAT057065-WO-PCT
- [0005] <150> 62/222430
- [0006] <151> 2015-09-23
- [0007] <160> 17
- [0008] <170> PatentIn 3.5版
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 32
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223> 合成寡核甘酸
- [0015] <400> 1
- [0016] tcgcctcgag gcgactgcgc tgacgaattt gg 32
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 33
- [0019] <212> DNA
- [0020] <213> 人工序列
- [0021] <220>
- [0022] <223> 合成寡核甘酸
- [0023] <400> 2
- [0024] aatcgaattc ttactgacca ttaacgccca agc 33
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 30
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <220>
- [0030] <223> 合成寡核甘酸
- [0031] <400> 3
- [0032] tcgcctcgag gcgagccgc aaccgctgga 30
- [0033] <210> 4
- [0034] <211> 32
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> 人工序列
- [0037] <220>
- [0038] <223> 合成寡核甘酸

[0039]	<400> 4
[0040]	aatcgaattc ttaacgctgc cagtgtctca tc 32
[0041]	<210> 5
[0042]	<211> 866
[0043]	<212> DNA
[0044]	<213> 人工序列
[0045]	<220>
[0046]	<223> 合成多核苷酸
[0047]	<400> 5
[0048]	atgggccatc atcatcatca tcacagcagc ggccctggaag ttctgttcca ggggcccgcg 60
[0049]	agccccgaac cgctggagca gatcaagcag tctgagagcc agctgagcgg ccgtgtgggt 120
[0050]	atgatcgaga tggatctggc ttccggccgt acgctgacgg catggcgtgc cgacgaacgt 180
[0051]	ttcccgatga tgtcgacctt taaagttgtt ctgtgtgggt cggtcttggc acgtgtagac 240
[0052]	gcgggtgacg aacaactgga gcgcaagatc cattaccgcc aacaggactt ggtcgactac 300
[0053]	agccccgtta gcgaaaagca cctggcggat ggcatgaccg tgggtgaatt gtgcgccgct 360
[0054]	gcgattacca tgagcgacaa tagcgcggct aatctgctgt tggcgaccgt tgggtggcca 420
[0055]	gcgggcttga ccgcatttct gcgtcaaate ggcgataatg ttacgcgtct ggatcgctgg 480
[0056]	gaaacggagc tgaacgaggc actgccgggt gatgcccgtg ataccacgac tcctgctagc 540
[0057]	atggcagcga ccctgcgtaa actgctgacc agccagcgtc tgagcgcacg tagccaacgc 600
[0058]	cagctgctgc aatggatggt ggatgaccgc gtggcgggtc cgctgatccg ctccgtcctg 660
[0059]	ccagcaggct ggttcattgc ggacaaaact ggtgcctcta agcgtggtgc gcgtggtatc 720
[0060]	gtcgcgctgc tgggtccgaa caacaaagcc gaacgtattg tggttatcta tctgcgcgac 780
[0061]	accccgga gcatggccga gcgcaaccag caaattgcgg gcattggtgc ggcactgatt 840
[0062]	gagcactggc agcgttaacg ccggcg 866
[0063]	<210> 6
[0064]	<211> 30
[0065]	<212> DNA
[0066]	<213> 人工序列
[0067]	<220>
[0068]	<223> 合成寡核苷酸
[0069]	<400> 6
[0070]	tcgcctcgag gcgagcccgc aaccgctgga 30
[0071]	<210> 7
[0072]	<211> 32
[0073]	<212> DNA
[0074]	<213> 人工序列
[0075]	<220>
[0076]	<223> 合成寡核苷酸
[0077]	<400> 7

[0078]	aatcgaattc ttaacgctgc cagtgtctca tc 32
[0079]	<210> 8
[0080]	<211> 32
[0081]	<212> DNA
[0082]	<213> 人工序列
[0083]	<220>
[0084]	<223> 合成寡核苷酸
[0085]	<400> 8
[0086]	gattgagcac tggcagcggtt aagaattcga tt 32
[0087]	<210> 9
[0088]	<211> 884
[0089]	<212> DNA
[0090]	<213> 人工序列
[0091]	<220>
[0092]	<223> 合成多核苷酸
[0093]	<400> 9
[0094]	atgggccatc atcatcatca tcacagcagc ggccctggaag ttctgttcca ggggcccgcg 60
[0095]	actgcgctga cgaatttggt ggccgagccg ttcgcgaaat tggagcaaga ttttggtggt 120
[0096]	tcgatcggtg tctacgcgat ggacaccggt agcgggtgcca ccgtgagcta ccgtgccgaa 180
[0097]	gagcgttttc cgctgtgtag ctctttcaag ggttttctgg ccgcagccgt gctggcacgc 240
[0098]	agccaacagc aagcgggcct gctggacacc ccgatccgtt acggcaaaaa tgcgctgggt 300
[0099]	ccgtggagcc cgattagcga aaagtacctg accaccggca tgacgggtggc ggagttgagc 360
[0100]	gctgcggcgg ttcagtattc cgataacgct gcggcaaatc tgctgctgaa agaactgggc 420
[0101]	ggtccagcgg gtctgacggc tttcatgcgt tctattggcg acaccacctt tcgcttgac 480
[0102]	cgctgggagc tggagctgaa cagcgcgatt ccgggcgacg cacgtgatac gagcagccccg 540
[0103]	cgtgcagtga ccgagagcct gcagaagctg accctgggca gcgcactggc cgcaccgcag 600
[0104]	cgccaacagt tcgtcgattg gctgaagggt aacaccaccg gtaaccatcg tattcgcgca 660
[0105]	gcggtcccgg ctgattgggc agttggtgac aagactggta cgtgcggcgt ttatggtacg 720
[0106]	gcgaatgact acgcggttgt ttggcctacg ggtcgtgcgc cgatcgtcct ggcggtgtat 780
[0107]	accctgctc cgaacaaaga cgataaacac tccgaagcgg tcatcgccgc agcagcgcgt 840
[0108]	ctggccctgg aaggcttggg cgttaatggt cagtaacgcc ggcg 884
[0109]	<210> 10
[0110]	<211> 32
[0111]	<212> DNA
[0112]	<213> 人工序列
[0113]	<220>
[0114]	<223> 合成寡核苷酸
[0115]	<400> 10
[0116]	tcgcctcgag gcgactgcgc tgacgaattt gg 32

[0117] <210> 11
[0118] <211> 33
[0119] <212> DNA
[0120] <213> 人工序列
[0121] <220>
[0122] <223> 合成寡核甘酸
[0123] <400> 11
[0124] aatcgaattc ttactgacca ttaacgccca agc 33
[0125] <210> 12
[0126] <211> 33
[0127] <212> DNA
[0128] <213> 人工序列
[0129] <220>
[0130] <223> 合成寡核甘酸
[0131] <400> 12
[0132] gcttgggcgt taatggtcag taagaattcg att 33
[0133] <210> 13
[0134] <211> 31
[0135] <212> DNA
[0136] <213> 人工序列
[0137] <220>
[0138] <223> 合成寡核甘酸
[0139] <400> 13
[0140] ttcactgcag tgaacgttgc gaagcaacgg c 31
[0141] <210> 14
[0142] <211> 41
[0143] <212> DNA
[0144] <213> 人工序列
[0145] <220>
[0146] <223> 合成寡核甘酸
[0147] <400> 14
[0148] tcgaggatcc tcgagagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc g 41
[0149] <210> 15
[0150] <211> 30
[0151] <212> DNA
[0152] <213> 人工序列
[0153] <220>
[0154] <223> 合成寡核甘酸
[0155] <400> 15

[0156] ccgtctagac ggatggcctt ttgcgtttc 30
[0157] <210> 16
[0158] <211> 33
[0159] <212> DNA
[0160] <213> 人工序列
[0161] <220>
[0162] <223> 合成寡核甘酸
[0163] <400> 16
[0164] aatcgaattc ttactgacca ttaacgcca agc 33
[0165] <210> 17
[0166] <211> 32
[0167] <212> DNA
[0168] <213> 人工序列
[0169] <220>
[0170] <223> 合成寡核甘酸
[0171] <400> 17
[0172] aatcgaattc ttaacgctgc cagtgc tca tc 32

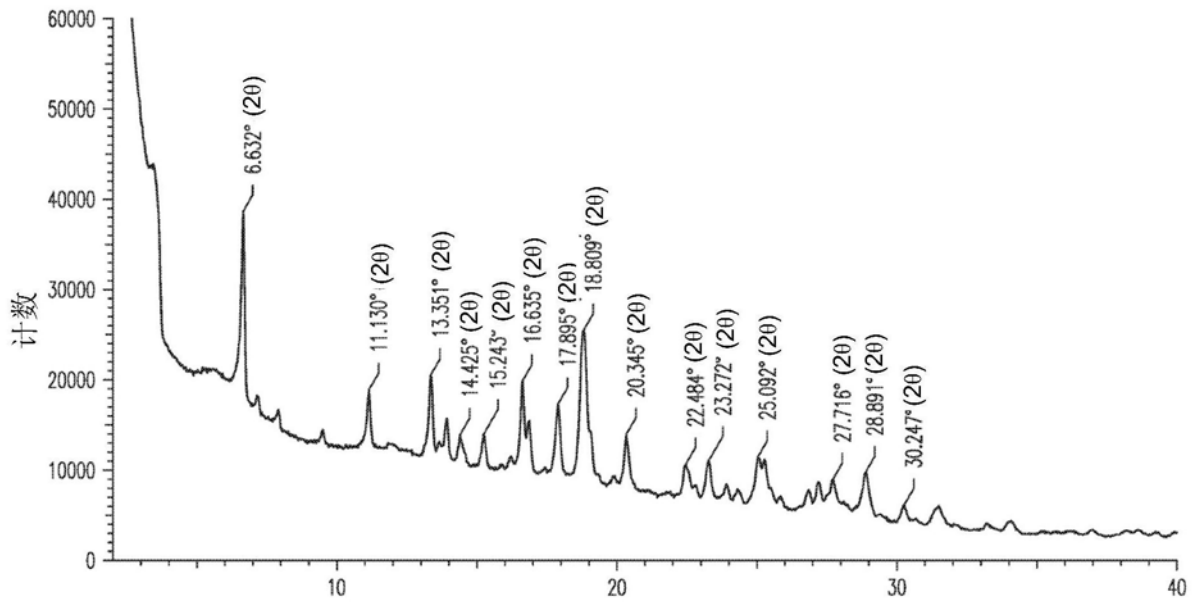


图1

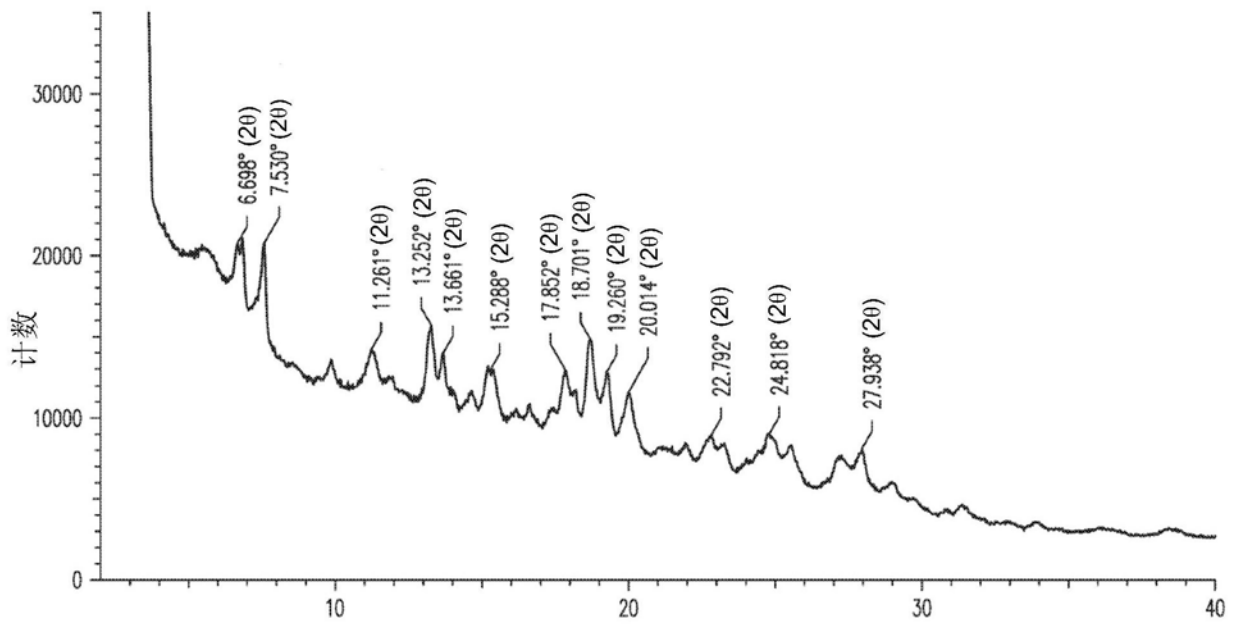


图2

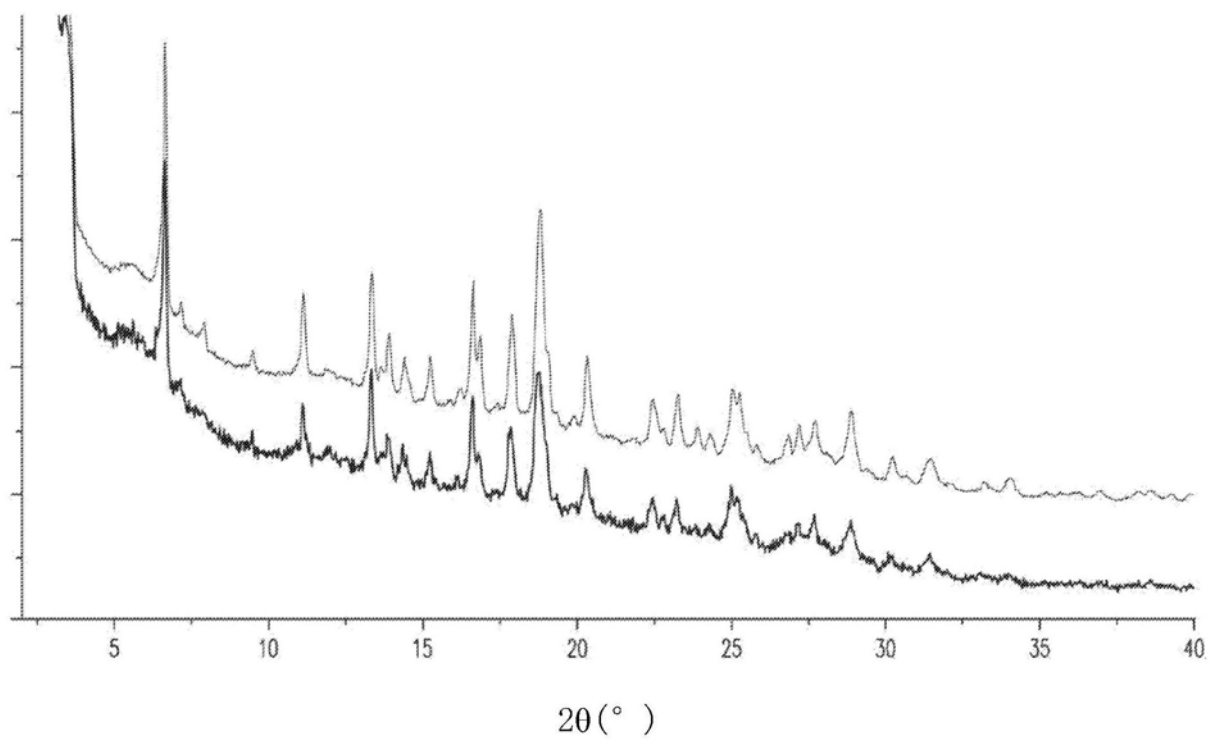


图3

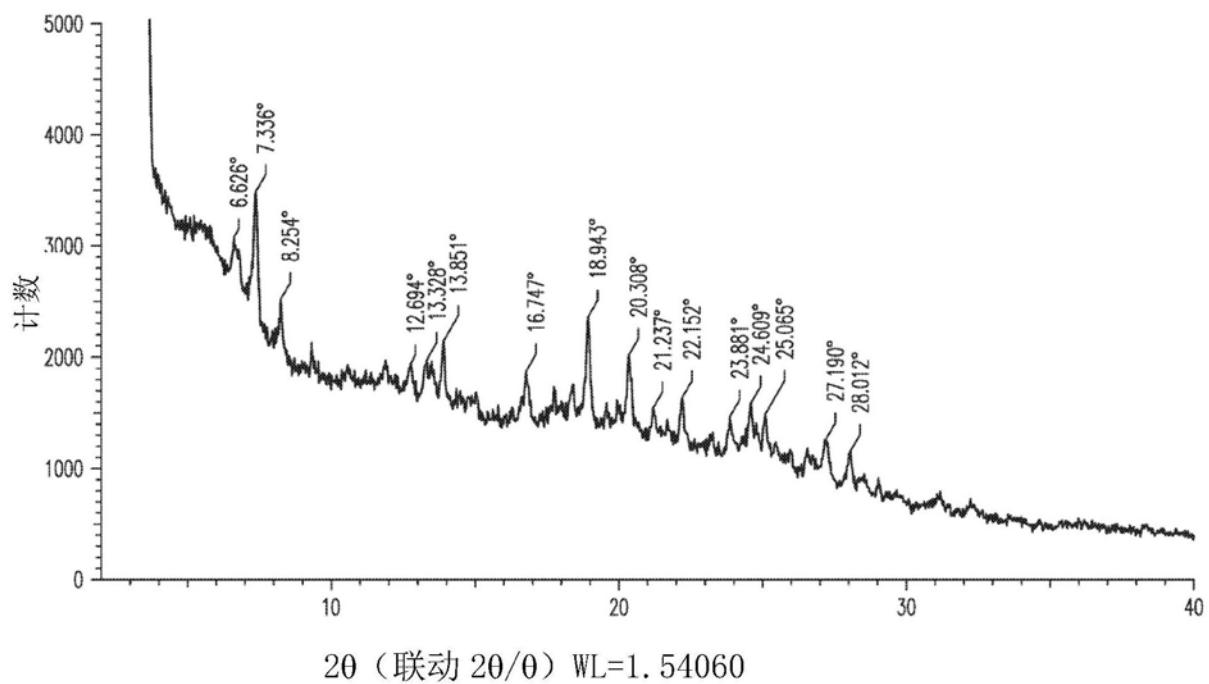


图4

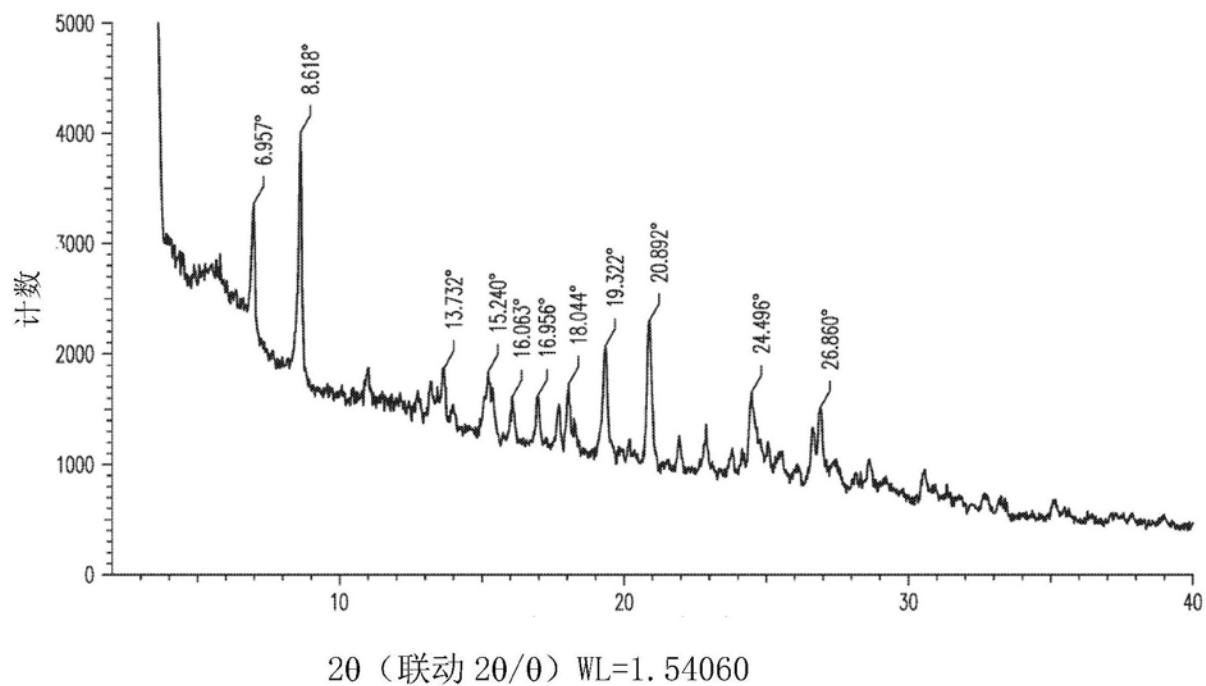


图5

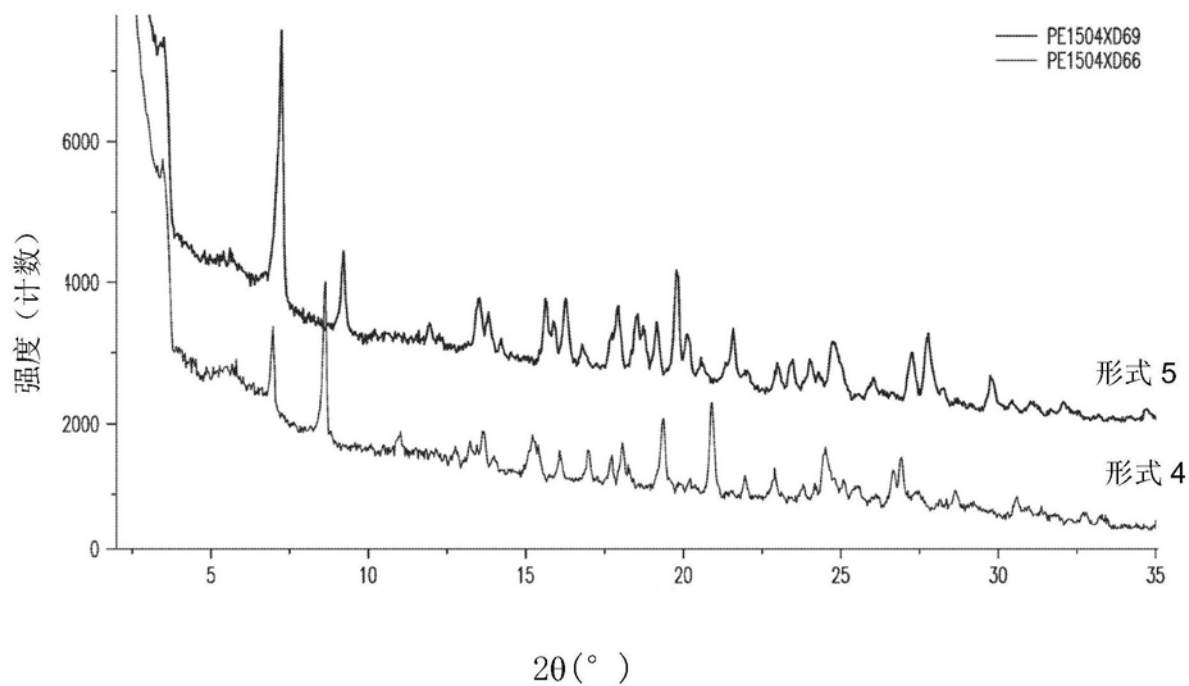


图6A

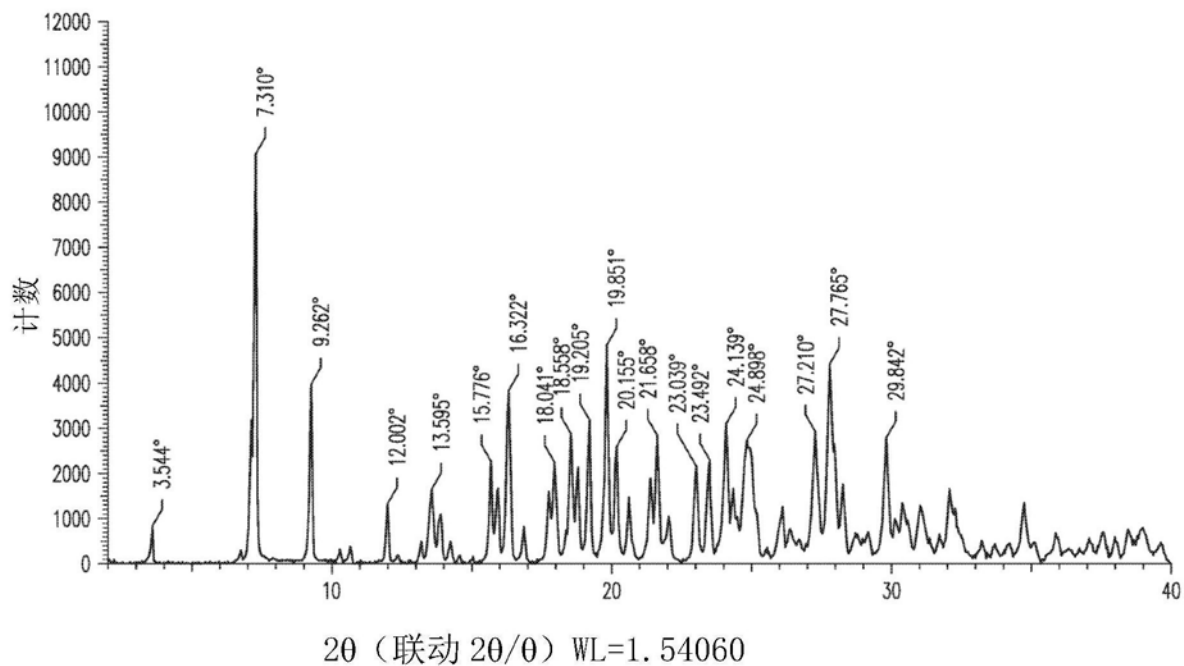


图6B

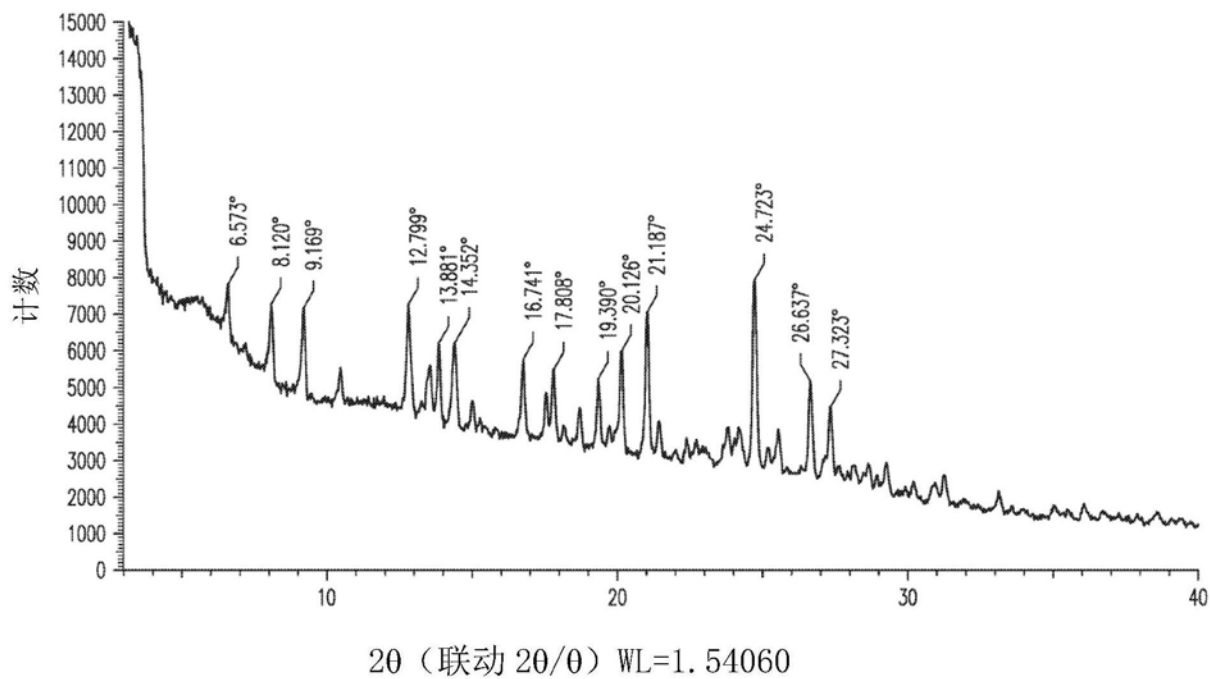


图7

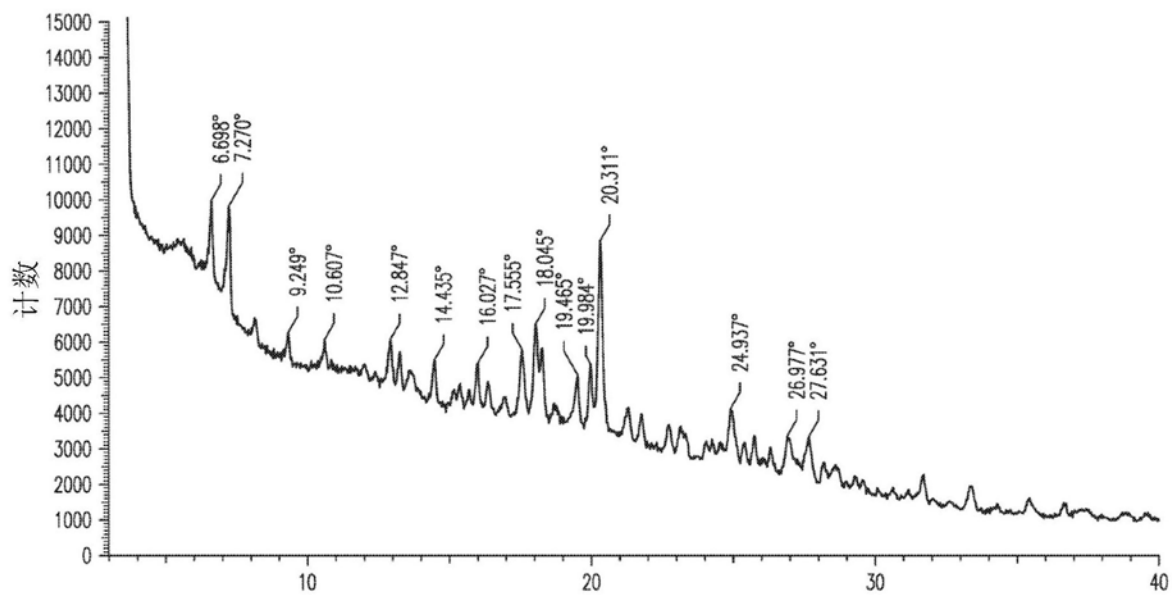


图8

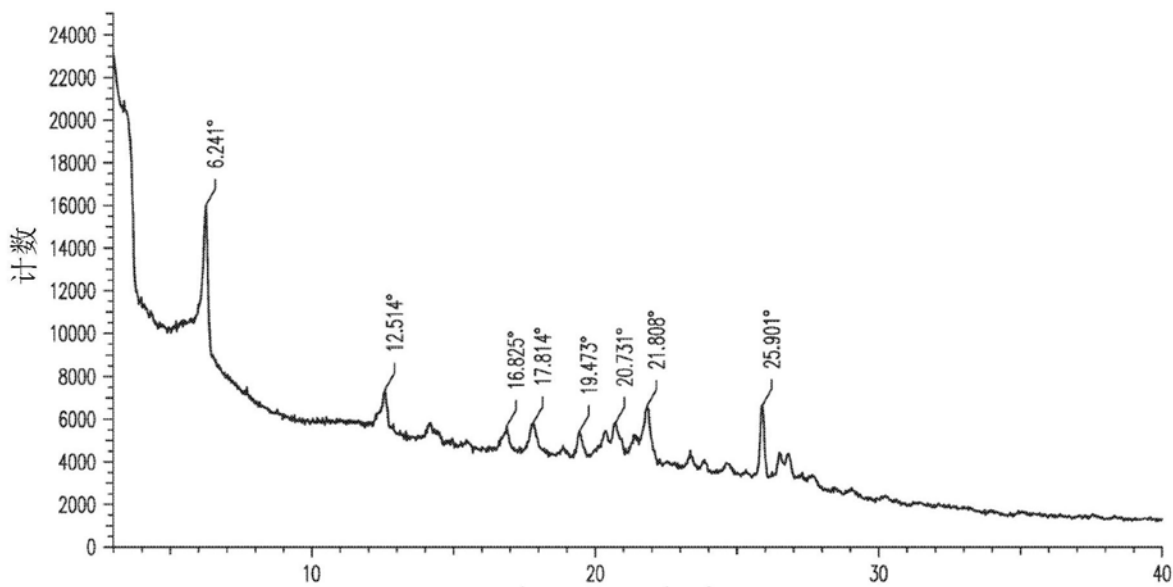
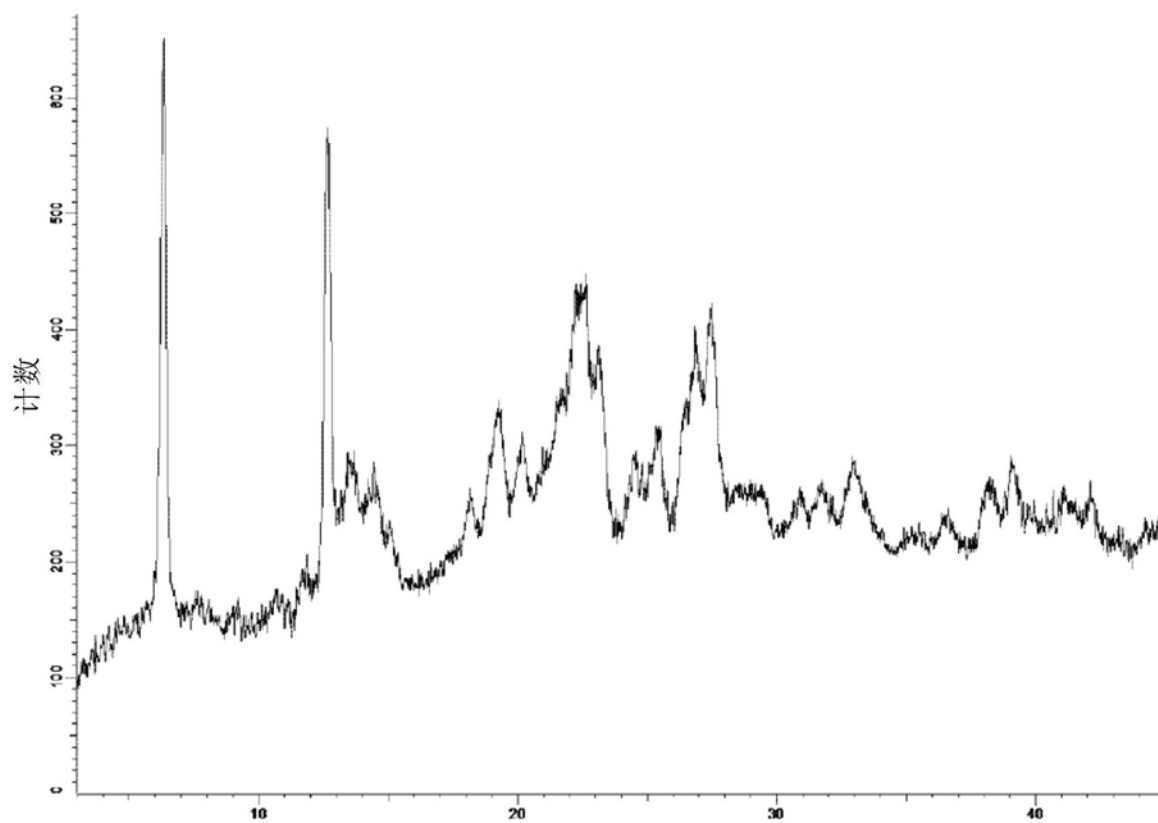


图9



2θ (联动 2θ/θ) WL=1.54060

图10

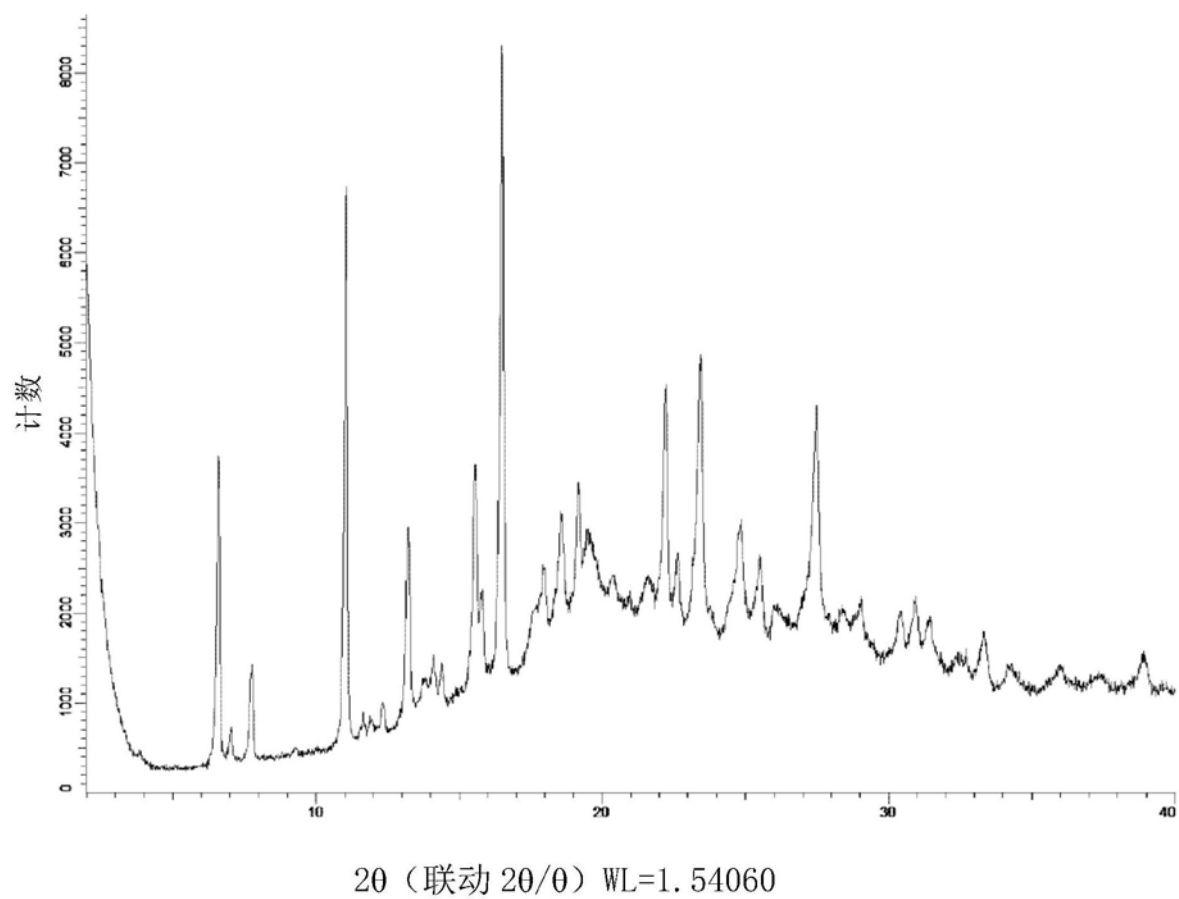
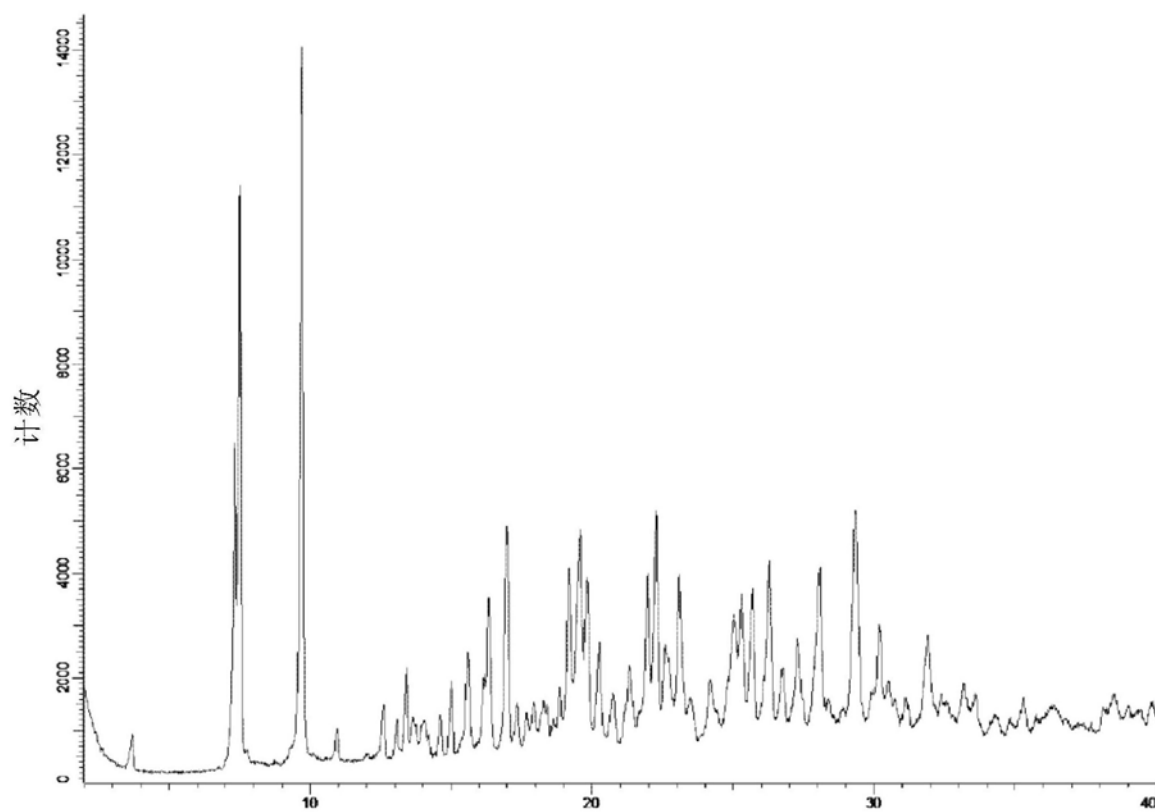


图11



2θ (联动 2θ/θ) WL=1.54060

图12

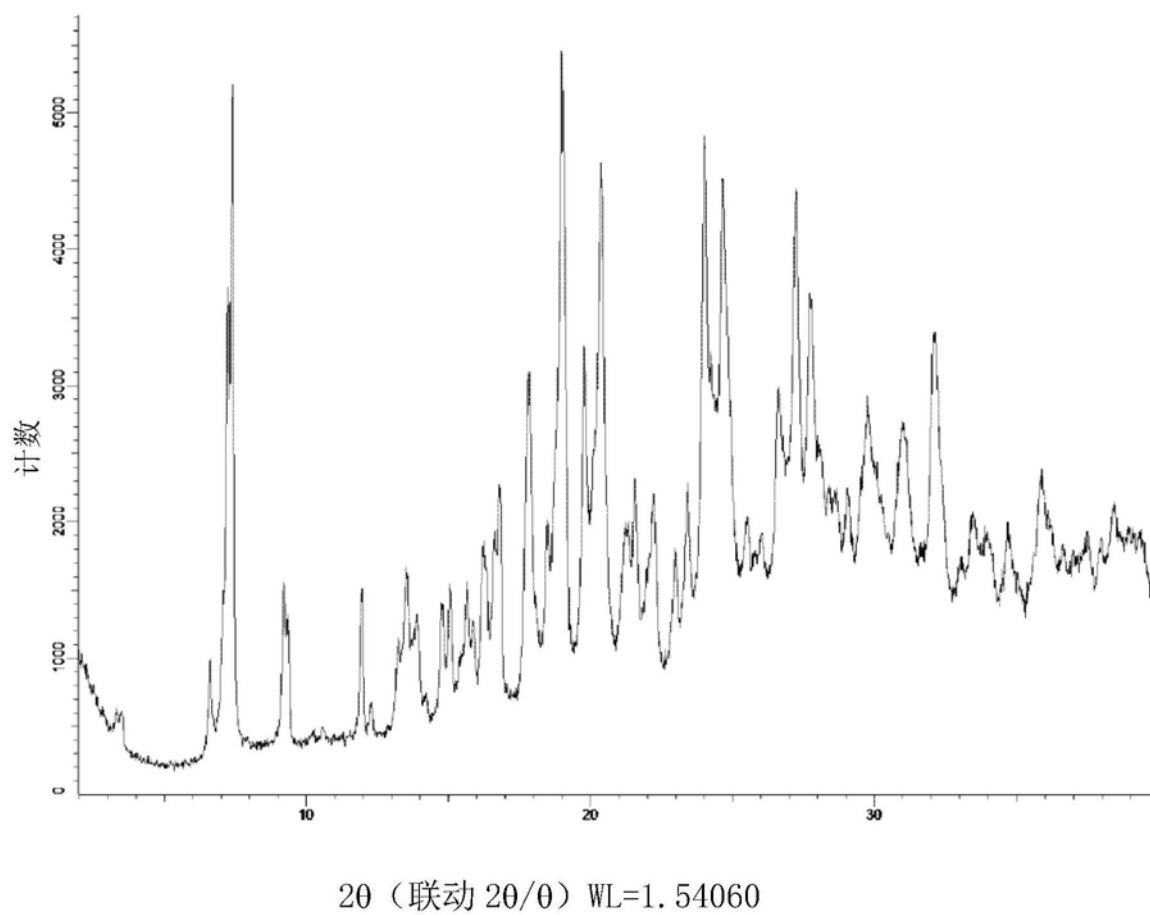


图13