(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 036243 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.16

(21) Номер заявки
201990012

(22) Дата подачи заявки
2017.06.12

(51) Int. Cl. ***C07D 261/08*** (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА (R)-4-(5-(ЦИКЛОПРОПИЛЭТИНИЛ)ИЗОКСАЗОЛ-3-ИЛ)-N-ГИДРОКСИ-2-МЕТИЛ-2-(МЕТИЛСУЛЬФОНИЛ)БУТАНАМИДА КАК АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ СРЕДСТВО

(31) **PCT/CN2016/085694**
(32) **2016.06.14**
(33) **CN**
(43) **2019.05.31**
(86) **PCT/IB2017/053468**
(87) **WO 2017/216705 2017.12.21**

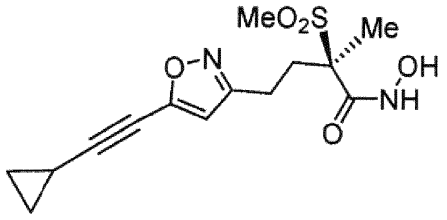
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Фу Цзипин (US), Цзян Сыи (CN), Кордиковски Андреас (CH), Суини Закари Кевин (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2015164458
WO-A1-2016097995

(57) Настоящее изобретение относится к кристаллической форме (R)-4-(5-(циклопропилэтинил)изоксазол-3-ил)-N-гидрокси-2-метил-2-(метилсульфонил)бутанамида (т.е. соединения формулы (A)) с низкой гигроскопичностью. Соединение и его композиции особенно полезны для лечения бактериальных инфекций, и в частности грамотрицательных бактериальных инфекций, включая мультирезистентные штаммы. Кристаллическую форму получают путем растворения аморфной формы соединения в галогенированном органическом растворителе (например, дихлорметане) и осаждения кристаллической формы с помощью углеводородного растворителя (например, гептана).



(A)

036243 B1

036243 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к целом к соединениям и композициям и способам лечения бактериальных инфекций. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения гидроксамовой кислоты, соединения (A), которое применимо для лечения инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями, и фармацевтическим композициям, содержащим кристаллическое соединение, описанное в настоящем документе. В одном аспекте настоящее изобретение относится к лечению грамотрицательных инфекций с использованием кристаллического соединения, раскрытого в настоящем документе.

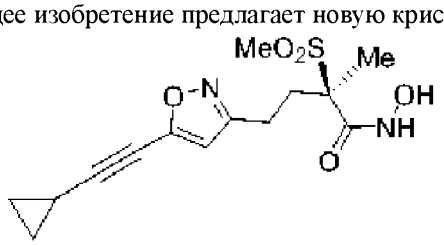
Уровень техники

За последние несколько десятилетий с угрожающей скоростью выросла частота резистентности к противомикробным препаратам и ее связь с серьезными инфекционными заболеваниями. Особое беспокойство вызывает возрастающая распространенность патогенов, резистентных к одному или нескольким антибиотикам, разрешенным для лечения инфекционных агентов, вызывающих нозокомиальные инфекции, также называемые госпитальными инфекциями. Из более чем 2 млн случаев нозокомиальных инфекций, каждый год имеющих место в Соединенных Штатах, от 50 до 60% вызваны резистентными к противомикробным препаратам штаммами бактерий. Высокий уровень резистентности к обычно используемым антибактериальным средствам повышает заболеваемость, смертность и затраты, связанные с нозокомиальными инфекциями. Считается, что в Соединенных Штатах нозокомиальные инфекции вносят вклад или вызывают более чем 77000 смертельных случаев в год и обходятся ежегодно приблизительно в 5-10 млрд долларов. Только несколько классов разрешенных антибактериальных препаратов эффективны в отношении грамотрицательных бактерий, и многие из разрешенных лекарственных средств теряют эффективность, поскольку резистентные штаммы грамотрицательных бактерий становятся более распространенными. Важными причинами грамотрицательной резистентности являются β-лактамазы расширенного спектра (ESBL) в Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli и Proteus mirabilis, высокая (AmpC) β-лактамазная резистентность к цефалоспоринам третьего поколения у видов Enterobacter и Citrobacter freundii и гены множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), обнаруженные в видах Pseudomonas, видах Acinetobacter и видах Stenotrophomonas.

Проблема антибактериальной резистентности усугубляется наличием бактериальных штаммов, резистентных к нескольким семействам антибактериальных препаратов. Например, практически все изоляты Pseudomonas aeruginosa, резистентные к фторхинолонам, резистентны также к дополнительным антибактериальным лекарственным препаратам. Большая часть усилий по поиску антибактериальных препаратов в фармацевтической промышленности направлена на разработку лекарственных средств, эффективных в отношении грамположительных бактерий. Однако существует настоятельная необходимость в новых препаратах против грамотрицательных бактерий, которые в целом более резистентны к большинству антибактериальных препаратов, чем грамположительные бактерии. Сообщалось о таких антибактериальных соединениях, действующих на биосинтез липополисахаридов, в том числе о различных соединениях гидроксамовых кислот: см., например, WO 2004/062601, WO 2010/032147, WO 2011/073845, WO 2012/120397 и WO 2012/137094. Сообщалось, что один из ферментов биосинтеза липополисахаридов, UDP-3-O-(R-3-гидроксидеканоил)-N-ацетилглюкозаминдеацетилаза (LpxC), является подтвержденной мишенью для антибактериальных препаратов. (Mdluli, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(6), 2178-84 (2006).) Хотя описаны ингибиторы LpxC, остается потребность в новых ингибиторах LpxC с лучшей антибактериальной эффективностью, особенно в отношении штаммов с МЛУ. Настоящее изобретение предлагает кристаллическое соединение, которое, как полагают, действует путем ингибирования LpxC и которое предотвращает некоторые из распространенных механизмов резистентности к известным антибактериальным средствам и особенно подходит для использования при производстве антибактериальных продуктов в промышленном масштабе.

Сущность изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает новую кристаллическую форму соединения



(A)

и способы получения и применения этого кристаллического материала. Данный кристаллический материал хорошо подходит для использования в коммерческих производственных процессах, поскольку он обладает низкой гигроскопичностью и обеспечивает постоянные технологические и эксплуатационные характеристики, которые необходимы для получения или производства в большом объеме. Без ограничения какой-либо теорией, полагают, что соединение (A) действует путем ингибирования активности UDP-3-O-(R-3-гидроксидеканоил)-N-ацетилглюкозаминдеацетилазы (LpxC).

Данный ингибитор можно использовать для лечения бактериальных инфекций, в частности грамотрицательных инфекций, включая лекарственнорезистентные и мультирезистентные инфекции, у субъектов, включая людей, и его можно использовать отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами, такими как другие антибактериальные препараты.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает соединение (A) в кристаллической форме. Это соединение раскрыто и заявлено в неопубликованной патентной заявке PCT/IB2015/059631 (поданной 15 декабря 2015 года). Способ синтеза из этой заявки обеспечивает соединение (A) в аморфной форме, которая, как оказалось, поглощает влагу и принимает с течением времени коричневатый цвет, если оставить ее при комнатной температуре. Из-за этих свойств аморфный материал плохо подходит для крупномасштабного производства или длительного хранения. Настоящее изобретение предлагает хорошо ведущую себя кристаллическую форму соединения (A), которая является более стойкой и более стабильной, обладает низкой гигроскопичностью и поэтому особенно подходит для использования в автоматизированных производственных процессах и аппаратах и для способов масштабного производства, требующихся для промышленного производства. Кристаллический продукт не обязательно должен быть чисто кристаллическим: он может сохранять некоторый аморфный материал, но предпочтительно является преимущественно кристаллическим (например, более чем на 50% кристаллическим) или по существу кристаллическим, например по меньшей мере на 75% кристаллическим. Степень кристалличности может быть оценена способами, известными в данной области техники, такими как XRPD.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способы получения соединения (A) в кристаллической форме. Один такой способ включает в себя растворение аморфного материала в умереннополярном растворителе, таком как эфир (например, диэтиловый эфир, ТГФ, диоксан, метил-т-бутиловый эфир, диизопропиловый эфир), или галогенированном растворителе (например, дихлорметане, трихлорэтилене, тетрахлорэтилене, хлороформе) и индуцирование кристаллизации путем охлаждения или путем добавления углеводородного растворителя, такого как гексан или гексаны, циклогексан, гептан или гептаны, октан или октаны или их смесь. Растворение аморфного материала может потребовать нагревания, особенно при использовании углеводородных или менее полярных эфирных растворителей (MTBE, диэтиловый эфир), причем оно может легче происходить в галогенированном растворителе. Если для индуцирования растворения требуется нагревание, для индуцирования кристаллизации может оказаться достаточно охлаждения раствора; когда нагревание не требуется, для индуцирования кристаллизации часто оказывается необходимым добавить углеводородный растворитель.

В предпочтительном способе аморфное соединение (A) растворяют в дихлорметане, и раствор приводят в контакт с углеводородным растворителем, таким как гептан (или циклогексан, или гексаны и т.д.), в условиях, которые способствуют кристаллизации.

Другие способы, в которых получают, по меньшей мере, частично кристаллический материал, включают суспендирование аморфного соединения (A) в гептане, гексане или циклогексане в присутствии некоторого количества MTBE; растворение аморфного соединения A в горячем растворителе (выбранном из MTBE; 1:1 гептан+этилацетат; 2:1 гептан+этанол; или 1:1 изопропанол+гептан); и растворение аморфного соединения (A) в "хорошем" растворителе (например, дихлорметане, этилацетате, изопропилацетате, изопропаноле или тетрагидрофуране) и смешивание раствора с "плохим" растворителем, таким как гексан, гептан, циклогексан, октан или их смесь, с использованием способа осаждения антирастворителем или обратного осаждения антирастворителем. Такие условия кристаллизации обеспечивают материал, который более стабилен, чем первоначально полученный аморфный продукт, который является, по меньшей мере, частично кристаллическим, предпочтительно главным образом или по существу кристаллическим, а также более стабилен и обеспечивает более постоянные эксплуатационные характеристики. Однако материал, кристаллизующийся во многих из этих систем, сохраняет некоторое количество остаточного растворителя, который трудно удалить; поэтому в предпочтительном способе кристаллизации для растворения аморфного соединения (A) используют дихлорметан или аналогичный хлорированный органический растворитель с последующим смешиванием раствора с углеводородным растворителем.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтические композиции, содержащие кристаллическую форму соединения (A), смешанную с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. Необязательно фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере два фармацевтически приемлемых носителя и/или вспомогательных вещества. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию получают для введения в форме разовой дозы, которая содержит терапевтически эффективное количество соединения (A) для лечения субъекта с грамотрицательной бактериальной инфекцией. Обычно разовая доза имеет в форму, подходящую для инъекции, инфузии, ингаляции или пероральной доставки.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения субъекта с грамотрицательной бактериальной инфекцией, причем данный способ содержит введение субъекту антибактериально эффективного количества соединения (A) в кристаллической форме или фармацевтической композиции, содержащий соединение (A) в кристаллической форме.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения предлагает фармацевтическую компози-

цию, содержащую кристаллическое соединение (А) и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Соответственно композиции и способы можно использовать для лечения субъекта, инфицированного грамотрицательной бактерией, выбранной из группы, состоящей из

Pseudomonas aeruginosa и других *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* и других *Burkholderia* spp., *Alcaligenes xylosoxidans*, *Acinetobacter* spp., *Achromobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Enterobacter* spp., *Eschericia coli*, *Haemophilus* spp., *Klebsiella* spp., *Moraxella* spp., *Bacteroides* spp., *Francisella* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Mannheimia haemolyiticus*, *Pastuerella* spp., *Providencia* spp., *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Bordetella* spp., *Borrelia* spp., *Helicobacter* spp., *Legionella* spp., *Citrobacter* spp., *Cedecea* spp., *Serratia spp.*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Fusobacterium* spp. и *Neisseria* spp.

Кристаллическое соединение и его композиции особенно подходят для лечения лекарственно-резистентных и мультирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий, таких как Pseudomonas aeruginosa.

Настоящее изобретение также предлагает применение кристаллического соединения (А) для получения лекарственных средств и фармацевтических композиций, применение данного кристаллического соединения при ингибировании LpxC и применение данного кристаллического соединения в качестве лекарственных средств, в частности для лечения бактериальных инфекций у субъекта.

Настоящее изобретение также направлено на способы комбинированной терапии для лечения или предупреждения грамотрицательной бактериальной инфекции у пациентов с использованием кристаллического соединения настоящего изобретения, или его фармацевтических композиций, или наборов, содержащих это кристаллическое соединение или его фармацевтические композиции, в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтическим средством. Другие аспекты настоящего изобретения рассмотрены в настоящем документе.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - SEM кристаллического соединения А.

Фиг. 2 - XRPD кристаллического соединения.

Фиг. 3 - термогравиметрический анализ и анализ с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии кристаллического соединения А.

Фиг. 4 - изотермы, демонстрирующие обратимые изменения массы кристаллического соединения А в диапазоне относительной влажности 0-90%.

Подробное описание

Для целей интерпретации этого описания изобретения применяются следующие определения, и в соответствующих случаях термины, используемые в единственном числе, также охватывают множественное число.

Термины, используемые в описании изобретения, имеют следующие значения, если контекст явно не указывает иначе.

"LpxC" представляет собой аббревиатуру, обозначающую UDP-3-O-(R-3-гидроксидеканоил)-N-ацетилглюкозаминдеацетилазу. Без ограничения теорией полагают, что соединение настоящего изобретения обеспечивает свой антибактериальный эффект в основном путем ингибирования LpxC.

При использовании в настоящем документе термин "субъект" относится к животному. В некоторых аспектах животное является млекопитающим. Субъект также относится, например, к приматам (например, людям), коровам, овцам, козам, лошадям, собакам, кошкам, кроликам, крысам, мышам, рыбам, птицам и т.п. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. "Пациент" при использовании в настоящем документе относится к субъекту-человеку.

При использовании в настоящем документе термин "ингибировать" или "ингибирование" относится к уменьшению или подавлению указанного состояния, симптома или нарушения или заболевания или к значительному снижению базовой активности биологической активности или процесса.

При использовании в настоящем документе термин "лечить" или "лечение" любого заболевания или нарушения относится в одном варианте осуществления к облегчению заболевания или нарушения (т.е. к замедлению, или остановке, или уменьшению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечить" или "лечение" относится к ослаб-

лению или уменьшению по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые могут не ощущаться пациентом. В еще одном варианте осуществления "лечить" или "лечение" относится к модулированию заболевания или нарушения физически (например, стабилизация ощущаемого симптома), физиологически (например, стабилизация физического параметра) или обоими способами. В еще одном варианте осуществления "лечить" или "лечение" относится к предотвращению или отсрочке начала, или развития, или прогрессирования заболевания или нарушения.

При использовании в настоящем документе используемые в контексте настоящего изобретения термины в единственном числе (особенно в контексте формулы изобретения) следует интерпретировать как охватывающие как единственное, так и множественное число, если иное не указано в настоящем документе и если это явно не противоречит контексту.

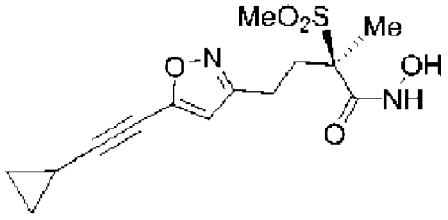
Все способы, описанные в настоящем документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе и если это явно не противоречит контексту. Использование любых примеров или языка примеров (например, "такой как"), предлагаемых в настоящем документе, предназначено только для лучшего освещения настоящего изобретения и не представляет собой ограничения объема настоящего изобретения, отличного от заявленного.

Термин "антибактериальное средство" относится к средствам, синтезированным или модифицированным в лаборатории, которые обладают или бактерицидной, или бактериостатической активностью. "Активное" средство в этом контексте ингибирует рост P. aeruginosa и/или других грамотрицательных бактерий. Термин "ингибирование роста" указывает на то, что скорость роста величины популяции конкретной бактерии снижается. Таким образом, данный термин включает ситуации, в которых бактериальная популяция растет, но со сниженной скоростью, а также ситуации, когда рост популяции прекращается, а также ситуации, когда число бактерий в популяции уменьшается, или популяция даже исчезает. Если для скрининга ингибиторов используют анализ активности фермента, можно сделать в соединениях модификации бактериального захвата/эффлюкса, растворимости, периода полувыведения и т.д. для того, чтобы получить корреляцию ингибирования фермента с ингибированием роста.

"Галогено" или "галоген" при использовании в настоящем документе могут представлять собой фтор, хлор, бром или йод.

В настоящем документе описаны различные варианты осуществления настоящего изобретения. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть объединены с другими указанными признаками для получения дополнительных вариантов осуществления. Ниже перечислены типичные варианты осуществления.

1. Кристаллическая форма соединения формулы (A):



(A).

Один вариант осуществления настоящего изобретения содержит кристаллическую форму, раскрытую в настоящем документе.

2. Кристаллическая форма варианта осуществления 1 с низкой гигроскопичностью. Предпочтительно данная кристаллическая форма демонстрирует увеличение веса из-за гигроскопичности менее приблизительно 5%, когда сухой образец подвергается воздействию относительной влажности вплоть до 80%; более предпочтительно, она демонстрирует увеличение веса из-за гигроскопичности менее приблизительно 10% при относительной влажности вплоть до 90% и обычно менее 5% прироста веса при воздействии относительной влажности вплоть до 90%.

3. Кристаллическая форма варианта осуществления 1, которая содержит стержневидные кристаллы.

4. Кристаллическая форма варианта осуществления 1, которая демонстрирует эндотерму при дифференциальной сканирующей калориметрии между 75 и 90°C. Предпочтительно эндотерма расположена в основном между 80 и 88°C, например приблизительно 80% эндотермы или большее расположено в этом температурном диапазоне.

5. Кристаллическая форма варианта осуществления 1, отличающаяся пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 18,4 и 14,0°.

6. Кристаллическая форма варианта осуществления 5, дополнительно отличающаяся одним или несколькими дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 3,9, и 2,5, и 4,4°.

7. Кристаллическая форма варианта осуществления 5, дополнительно отличающаяся дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 3,9, и 2,5, и 4,4°.

8. Кристаллическая форма в соответствии с одним из вариантов осуществления 5-7, дополнительно отличающаяся одним или несколькими дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 18,8, и/или 5,3°, и/или 21,8°, и/или 22,1°, и/или 18,0°.

9. Кристаллическая форма в соответствии с одним из вариантов осуществления 5-7, дополнительно отличающаяся дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 18,8 и 5,3°.

10. Кристаллическая форма варианта осуществления 9, дополнительно отличающаяся дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 21,8 и 22,1°.

11. Кристаллическая форма варианта осуществления 10, дополнительно отличающаяся дополнительным пиком XRPD при угле дифракции (2 тета) 18,0°.

12. Кристаллическая форма варианта осуществления 10, дополнительно отличающаяся дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 14,3 и 13,4°. Этот вариант осуществления включает в себя кристаллическую форму в соответствии с любым из вариантов осуществления 5-11, демонстрирующую спектр XRPD, по существу, аналогичный спектру на фиг. 2.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая антибактериально эффективное количество кристаллической формы в соответствии с одним из вариантов осуществления 1-12; и фармацевтически приемлемый носитель.

Обычно соединение (А) в этой композиции состоит в основном (по меньшей мере на 50%) из кристаллической формы по одному из вариантов осуществления 1-12; предпочтительно, оно состоит, по существу, из кристаллической формы по одному из вариантов осуществления 1-12.

14. Фармацевтическая комбинация, содержащая

антибактериально эффективное количество кристаллической формы в соответствии с одним из вариантов осуществления 1-12,

антибактериально эффективное количество второго терапевтического средства,

фармацевтически приемлемый носитель.

Обычно соединение (А) в этой комбинация состоит в основном из кристаллической формы в соответствии с одним из вариантов осуществления 1-12; предпочтительно оно состоит, по существу, из кристаллической формы в соответствии с одним из вариантов осуществления 1-12.

15. Фармацевтическая комбинация по варианту осуществления 14, в которой второе терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из ампициллина, пиперациллина, пенициллина G, тикарциллина, имипенема, меропенема, азитромицина, эритромицина, азтреонама, цефепима, цефотаксима, цефтриаксона, цефтазидима, ципрофлоксацина, левофлоксацина, клиндамицина, доксициклина, гентамицина, амикацина, тобрамицина, тетрациклина, тигециклина, рифампицина, ванкомицина и полимиксина.

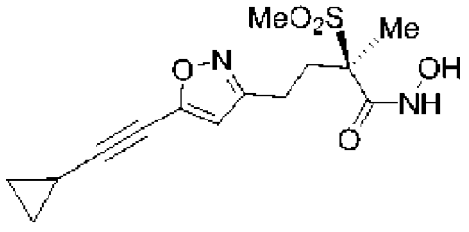
16. Способ получения высококристаллической формы соединения (А) из некристаллического соединения (А), который содержит растворение некристаллического соединения (А) в галогенированном органическом растворителе с образованием раствора и приведение данного раствора в контакт с углеводородным растворителем для индуцирования осаждения кристаллического соединения (А). Предпочтительно некристаллическое соединение (А) является аморфным или демонстрирует мало данных в пользу кристалличности по XRPD, например менее 10% кристалличности. Высококристаллическая форма соединения (А) является по меньшей мере на 75% кристаллической, обычно по меньшей мере на 80% и часто на 90% или более кристаллической по данным XRPD.

17. Способ по варианту осуществления 16, в котором галогенированный органический растворитель выбирают из дихлорметана, хлороформа, этилендихлорида, трихлорэтилена и тетрахлорэтилена.

18. Способ по варианту осуществления 16 или 17, в котором углеводородный растворитель содержит гексан, циклогексан, гептан, октан или смесь изомеров гексана, гептана или октана.

19. Способ по варианту осуществления 18, в котором углеводородный растворитель представляет собой гептан или смесь изомеров гептана.

20. Кристаллическая форма соединения формулы (А):



(А)

которую получают с помощью способа по варианту осуществления 16, 17, 18 или 19. Этот вариант осуществления также может представлять собой кристаллическую форму соединения (А), которую можно получить с помощью способа по п.16, 17, 18 или 19. Кристаллическая форма этого варианта осуществления обычно характеризуется описаниями, приведенными для любого из вариантов осуществления 1-12.

21. Способ лечения субъекта с грамотрицательной бактериальной инфекцией, содержащий введение нуждающемуся в этом субъекту антибактериально эффективного количества кристаллической формы в соответствии с одним из вариантов осуществления 1-12 или 20.

22. Способ по варианту осуществления 21, в грамотрицательная бактериальная инфекция является

инфекцией, содержащий по меньшей мере одну бактерию, выбранную из группы, состоящей из Pseudomonas aeruginosa и других Pseudomonas spp., Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia и других Burkholderia spp., Alcaligenes xylosoxidans, Acinetobacter spp., Achromobacter spp., Aeromonas spp., Enterobacter spp., Eschericia coli, Haemophilus spp., Klebsiella spp., Moraxella spp., Bacteroides spp., Francisella spp., Shigella spp., Proteus spp., Porphyromonas spp., Prevotella spp., Mannheimia haemolyiticus, Pastuerella spp., Providencia spp., Vibrio spp., Salmonella spp., Bordetella spp., Borrelia spp., Helicobacter spp., Legionella spp., Citrobacter spp., Cedecea spp., Serratia spp., Campylobacter spp., Yersinia spp., Fusobacterium spp. и Neisseria spp.

23. Способ по варианту осуществления 22, в котором бактерия представляет собой вид Pseudomonas и необязательно резистентна к одному или нескольким антибиотикам, выбранным из пиперациллина/тазобактама, имипенема, меропенема, азтреонама, цефепима, цефтазидима, метициллина, ципрофлоксацина, левофлоксацина, амикацина, гентамицина и тобрамицина.

24. Кристаллическая форма (R)-4-(5-(циклопропилэтинил)изоксазол-3-ил)-N-гидрокси-2-метил-2-(метилсульфонил)бутанамида, получаемая, или кристаллическая форма, полученная с помощью способа в соответствии с одним из вариантов осуществления 16-20, причем галогенированным растворителем является дихлорметан и углеводородным растворителем является гептан.

Соединения и композиции, описанные в настоящем документе, можно применять или вводить в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами, которые действуют как иммуномодуляторы, например активатором костимулирующей молекулы, или ингибитором иммуноингибирующей молекулы, или вакциной. Белок программируемой смерти 1 (PD-1) является ингибирующим членом расширенного семейства CD28/CTLA4 Т-клеточных регуляторов (Okazaki et al. (2002) Curr Opin Immunol 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J. Immunol. 170:711-8). PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и моноцитах. PD-1 является иммунноингибирующим белком, который отрицательно регулирует сигналы TCR (Ishida, Y. et al. (1992) EMBO J. 11:3887-3895; Blank, C. et al. (Epub 2006 Dec. 29) Immunol. Immunother. 56(5):739-745) и повышающе регулируется при хронических инфекциях. Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 может играть роль иммунной контрольной точки, и оно может приводить, например, к уменьшению инфильтрации лимфоцитов, уменьшению опосредованной Т-клеточным рецептором пролиферации и/или иммунной эвазии раковыми или инфицированными клетками (Dong et al. (2003) J. Mol. Med. 81:281-7; Blank et al. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314; Konishi et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100). Иммунная супрессия может быть обращена ингибированием локального взаимодействия PD-1 с PD-L1 или PD-L2; эффект является аддитивным, если также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2 (Iwai et al. (2002) Proc. Nat'л. Acad. Sci. USA 99:12293-7; Brown et al. (2003) J. Immunol. 170:1257-66). Иммуномодуляция может быть достигнута путем связывания или с иммуноингибирующим белком (например, PD-1), или со связывающими белками, которые модулируют ингибирующий белок (например, PD-L1, PD-L2).

В одном варианте осуществления комбинированные терапии настоящего изобретения включают в себя иммуномодулятор, который является ингибитором или антагонистом ингибирующей молекулы молекулы иммунной контрольной точки. В другом варианте осуществления иммуномодулятор связывается с белком, который естественным образом ингибирует иммуноингибирующую молекулу контрольной точки. При использовании в комбинации с антибактериальными соединениями эти иммуномодуляторы могут усиливать противомикробный ответ и, таким образом, повышать эффективность по сравнению с лечением только антибактериальным соединением. Таким образом, соединение в соответствии с одним из вариантов осуществления 1-12 или фармацевтическую композицию варианта осуществления 13 можно вводить субъекту, которого подвергают лечению иммуномодулятором; иммуномодулятор и соединение можно вводить вместе или по отдельности, но их одновременно используют для лечения инфекции, поддающейся лечению соединением (А), описанным в настоящем документе.

Термин "иммунные контрольные точки" относится к группе молекул на клеточной поверхности CD4 и CD8 Т-клеток. Эти молекулы могут эффективно служить в качестве "тормозов" для подавления модуляции или ингибирования адаптивного иммунного ответа. Молекулы иммунных контрольных точек включают, но без ограничения, молекулу программируемой смерти 1 (PD-1), цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4), B7H1, B7H4, OX-40, CD137, CD40 и LAG3, которые непосредственно ингибируют иммунные клетки. Иммунотерапевтические средства, которые могут играть роль ин-

гибиторов иммунных контрольных точек, полезных в способах настоящего изобретения, включают, но без ограничения, ингибиторы PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и/или TGFR-бета. Ингибирование ингибирующей молекулы может быть осуществлено путем ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка. В некоторых вариантах осуществления для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы можно использовать ингибирующую нуклеиновую кислоту (например, дцРНК, миРНК или мшРНК). В других вариантах осуществления ингибитором ингибирующего сигнала является полипептид, например растворимый лиганд или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с ингибирующей молекулой.

Иммуномодулятор можно вводить одновременно, до или после одного или нескольких соединений настоящего изобретения и необязательно одной или нескольких дополнительный терапий или терапевтических средств. Терапевтические средства в комбинации можно вводить в любом порядке. Вообще говоря, каждое средство можно вводить в дозе и/или по расписанию, определенному для этого средства. Кроме того, следует понимать, что терапевтические средства, используемые в этой комбинации, можно вводить вместе в одной композиции или вводить по отдельности в различных композициях. Вообще говоря, ожидается, что каждое из терапевтических средств, используемых в комбинации, будет использоваться в количествах, которые не превышают количеств, в которых их используют по отдельности. В некоторых вариантах осуществления количества, используемые в комбинации, ниже, чем используемые по отдельности.

В некоторых вариантах осуществления антибактериальные соединения, описанные в настоящем документе, вводят в комбинации с одним или несколькими иммуномодуляторами, которые являются ингибиторами PD-1, PD-L1 и/или PD-L2. Каждый такой ингибитор может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, белок слияния или олигопептид. Примеры таких иммуномодуляторов известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор представляет собой анти-PD-l антитело, выбранное из MDX-1106, Merck 3475 или CT-011.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или связывающую PD-1 часть PD-L1 или PD-L2, слитую с константной областью (например, Fc-областью последовательности иммуноглобулина).

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор представляет собой ингибитор PD-1, такой как AMP-224.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор представляет собой ингибитор PD-L1, такой как анти-PD-Ll антитело.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор представляет собой анти-PD-Ll связывающий антагонист, выбранный из YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C или MDX-1105. MDX-1105, также известный как BMS-936559, представляет собой анти-PD-Ll антитело, описанное в WO2007/005874. Антитело YW243.55.S70 представляет собой анти-PD-L1 антитело, описанное в WO 2010/077634.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятором является ниволумаб (номер регистра CAS: 946414-94-4). К альтернативным названиям ниволумаба относятся MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 или BMS-936558. Ниволумаб является полностью человеческим моноклональным антителом IgG4, которое специфически блокирует PD-1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1, раскрыты в US 8008449, EP 2161336 и WO 2006/121168.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятором является анти-PD-1 антитело пембролизумаб. Пембролизумаб (также называемый ламбролизумабом, MK-3475, MK03475, SCH-900475 или KEYTRUDA®; Merck) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1. Пембролизумаб и другие гуманизированные анти-PD-1 антитела раскрыты в документах Hamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2): 134-44, US 8354509, WO 2009/114335 и WO 2013/079174.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятором является пидилизумаб (CT-011; Cure Tech), гуманизированное моноклональное антитело IgG1k, которое связывается с PD1. Пидилизумаб и другие гуманизированные анти-PD-1 моноклональные антитела раскрыты в WO 2009/101611.

Другие анти-PD1 антитела, используемые в качестве иммуномодуляторов для использования в способах, раскрытых в настоящем документе, включают AMP 514 (Amplimmune) и анти-PD1 антитела, раскрытые в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-L1 антителом является MSB0010718C. MSB0010718C (также называемый A09-246-2; Merck Serono) является моноклональным антителом, которое связывается с PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятором является MDPL3280A (Genentech/Roche), человеческое Fc-оптимизированное моноклональное антитело IgG1, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A, и другие человеческие моноклональные антитела к PD-L1 раскрыты в патенте США № 7943743 и публикации США № 20120039906. Другие анти-PD-L1 связывающие средства, используемые в качестве иммуномодуляторов для способов настоящего изобретения, включают

YW243.55.S70 (см. WO 2010/077634), MDX-1105 (также называемый BMS-936559) и анти-PD-L1 связывающие средства, раскрытые в WO 2007/005874.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятором является AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, раскрытый в WO 2010/027827 и WO 2011/066342), который представляет собой Fc-слитый растворимый рецептор PD-12, который блокирует взаимодействие между PD1 и B7-H1.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятором является анти-LAG-3 антитело, такое как BMS-986016. BMS-986016 (также называемый BMS986016) представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с LAG-3. BMS-986016 и другие гуманизированные анти-LAG-3 антитела раскрыты в US 2011/0150892, WO 2010/019570 и WO 2014/008218.

В некоторых вариантах осуществления комбинированные терапии, раскрытые в настоящем документе, включают в себя модулятор костимулирующей молекулы или ингибирующей молекулы, например коингибирующий лиганд или рецептор.

В одном варианте осуществления костимулирующий модулятор, например агонист, костимулирующей молекулы выбирают из агониста (например, агонистического антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или растворимого слияния) 0X40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) , ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 или лиганда CD83.

В другом варианте осуществления комбинированные терапии, раскрытые в настоящем документе, включают в себя иммуномодулятор, который является костимулирующей молекулой, например агонистом, связанным с положительным сигналом, который включает в себя костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS и/или GITR.

Примеры агонистов GITR включают, например, белки слияния GITR и анти-GITR антитела (например, двухвалентные анти-GITR антитела), такие как белок слияния GITR, описанный в патенте США № 6111090, европейском патенте № 090505B1, патенте США № 8586023, публикациях PCT №№ WO 2010/003118 и 2011/090754, или анти-GITR антитело, описанное, например, в патенте США № 7025962, европейском патенте № 1947183B1, патенте США № 7812135, патенте США № 8388967, патенте США № 8591886, европейском патенте № EP 1866339, публикации PCT № WO 2011/028683, публикации PCT № WO 2013/039954, публикации PCT № WO 2005/007190, публикации PCT № WO 2007/133822, публикации PCT № WO 2005/055808, публикации PCT № WO 99/40196, публикации PCT № WO 2001/03720, публикации PCT № WO 99/20758, публикации PCT № WO 2006/083289, публикации PCT № WO 2005/115451, патенте США № 7618632 и публикации PCT № WO 2011/051726.

В одном варианте осуществления используемый иммуномодулятор представляет собой растворимый лиганд (например, CTLA-4-Ig), или антитело, или фрагмент антитела, которые связываются с PD-L1, PD-L2 или CTLA4. Например, молекулу анти-PD-1 антитела можно вводить, например, в комбинации с анти-CTLA-4 антителом, например ипилимумабом. Примеры анти- CTLA4 антител включают тремелимумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от Pfizer, ранее известное как тицилимумаб, CP-675206); и ипилимумаб (антитело CTLA-4, также известное как MDX-010, CAS № 477202-00-9).

В одном варианте осуществления молекулу анти-PD-1 антитела вводят после лечения с помощью соединения настоящего изобретения, как описано в настоящем документе.

В другом варианте осуществления молекулу анти-PD-1 или PD-L1 антитела вводят в комбинации с анти-LAG-3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В другом варианте осуществления молекулу анти-PD-1 или PD-L1 антитела вводят в комбинации с анти-TIM-3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В других вариантах осуществления молекулу анти-PD-1 или PD-L1 антитела вводят в комбинации с анти-LAG-3 антителом и анти- TIM-3 антителом или их антигенсвязывающими фрагментами. Комбинацию антител, перечисленных в настоящем документе, можно вводить по отдельности, например в виде отдельных антител или в виде связанных, например биспецифических или триспецифических, молекул антител. В одном варианте осуществления вводят биспецифическое антитело, которое включает в себя молекулу анти-PD-1 или PD-L1 антитела и анти- TIM-3 или анти-LAG-3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления комбинацию антител, перечисленных в настоящем документе, используют для лечения бактериальной инфекции, выбранной из описанных в настоящем документе. Эффективность вышеуказанных комбинаций может быть проверена в моделях на животных, известных в данной области техники.

Примеры иммуномодуляторов, которые могут быть использованы в комбинированных терапиях, включают, но без ограничения, например, афутузумаб (доступный от Roche®); пэгфилграстим (Neulasta®); леналидомид (CC-5013, Revlimid®); талидомид (Thalomid®), актимид (CC4047); и цитокины, например IL-21 или IRX-2 (смесь человеческих цитокинов, включающую в себя интерлейкин 1, интерлейкин 2 и интерферон γ, CAS 951209-71-5, доступна от IRX Therapeutics).

Примеры доз таких иммуномодуляторов, которые могут быть использованы в комбинации с антибактериальными соединениями настоящего изобретения, включают дозу молекулы анти-PD-1 антитела приблизительно от 1 до 10 мг/кг, например 3 мг/кг, и дозу анти-CTLA-4 антитела, например ипилимумаба, приблизительно 3 мг/кг.

Примеры вариантов осуществления способов применения антибактериальных соединений настоящего изобретения в комбинации с иммуномодулятором включают следующие.

i) Способ лечения бактериальной инфекции у субъекта, содержащий введение субъекту кристаллического соединения (A), описанного в настоящем документе, и иммуномодулятора.

ii) Способ по варианту осуществления i), в котором иммуномодулятор является активатором костимулирующей молекулы или ингибитором молекулы иммунной контрольной точки.

iii) Способ по любому из вариантов осуществления i) и ii), в котором активатор костимулирующей молекулы является агонистом одного или нескольких из 0X40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и лиганда CD83.

iv) Способ по любому из вариантов осуществления i-iii) выше, в котором ингибитор молекулы иммунной контрольной точки выбирают из PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR-бета.

v) Способ по любому из вариантов осуществления i-iii), в котором ингибитор молекулы иммунной контрольной точки выбирают из ингибиторов PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 или CTLA4 или любой их комбинации.

vi) Способ по любому из вариантов осуществления i-v), в котором ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой растворимый лиганд, или антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с молекулой иммунной контрольной точки.

vii) Способ по любому из вариантов осуществления i-vi), в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент происходят от IgG1 или IgG4 (например, человеческих IgG1 или IgG4).

viii) Способ по любому из вариантов осуществления i-vii), в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент подвергают изменению, например мутации, для увеличения или уменьшения одного или нескольких из: связывания Fc-рецептора, гликозилирования антител, количества остатков цистеина, эффекторной клеточной функции или функции комплемента.

ix) Способ по любому из вариантов осуществления i-viii), в котором молекула антитела является биспецифической или мультиспецифической молекулой антитела, которая имеет первую специфичность связывания с PD-1 или PD-L1 и вторую специфичность связывания с TIM-3, LAG-3 или PD-12.

x) Способ по любому из вариантов осуществления i-ix), в котором иммуномодулятор представляет собой анти-PD-1 антитело, выбранное из ниволумаба, пембролизумаба или пидилизумаба.

xi) Способ по любому из вариантов осуществления i-x), в котором иммуномодулятор представляет собой анти-PD-L1 антитело, выбранное из YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C или MDX-1105.

xii) Способ по любому из вариантов осуществления i-x), в котором иммуномодулятор представляет собой молекулу анти-LAG-3 антитела.

xiii) Способ по варианту осуществления xii), в котором молекулой анти-LAG-3 антитела является BMS-986016.

xiv) Способ по любому из вариантов осуществления i-x), в котором иммуномодулятор представляет собой молекулу анти-PD-1 антитела, вводимую путем инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе приблизительно от 1 до 30 мг/кг, например приблизительно от 5 до 25 мг/кг, приблизительно от 10 до 20 мг/кг, приблизительно от 1 до 5 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг, например от одного раза в неделю до одного раза в 2, 3 или 4 недели.

xv) Способ по варианту осуществления xiv), в котором молекулу анти-PD-1 антитела вводят в дозе от приблизительно 10 до 20 мг/кг раз в две недели.

xvi) Способ по варианту осуществления xv), в котором молекулу анти-PD-1 антитела, например ниволумаб, вводят внутривенно в дозе от приблизительно 1 до 3 мг/кг, например приблизительно 1, 2 или 3 мг/кг, раз в две недели.

xvii) Способ по варианту осуществления xv), в котором молекулу анти-PD-1 антитела, например ниволумаб, вводят внутривенно в дозе приблизительно 2 мг/кг с 3-недельными интервалами.

Соединения настоящего изобретения, в частности соединения вариантов осуществления 1-12, описанных выше, проявляют большую эффективность в отношении важных лекарственнорезистентных грамотрицательных патогенов, чем соединения гидроксамовой кислоты, о которых сообщалось раньше, или улучшенные профили ненаправленного действия; таким образом, эти соединения особенно полезны для лечения субъектов с лекарственнорезистентными инфекциями или для предупреждения нежелательных побочных эффектов.

Все способы, описанные в настоящем документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе и если это явно не противоречит контексту. Использование любых примеров или языка примеров (например, "такой как"), предлагаемых в настоящем документе, предназначено только для лучшего освещения настоящего изобретения и не представляет собой ограничения объема настоящего изобретения, отличного от заявленного.

Настоящее изобретение предлагает новые соединения, фармацевтические композиции, включающие в себя данные соединения, способы ингибирования UDP-3-O-(R-3-гидроксидеканоил)-N-

ацетилглюкозаминдеацетилазы (LpxC) и способы лечения грамотрицательных бактериальных инфекций.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ ингибирования фермента деацетилазы в грамотрицательных бактериях, причем данный способ содержит этап приведения грамотрицательных бактерий в контакт с кристаллическим соединением настоящего изобретения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения субъекта с грамотрицательной бактериальной инфекцией, причем данный способ содержит этап введения нуждающемуся в этом субъекту антибактериально эффективного количества кристаллического соединения (А), необязательно вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Соединения настоящего изобретения можно вводить с помощью известных способов, включая пероральный, парентеральный, ингаляцию и т.п. В некоторых вариантах осуществления соединение настоящего изобретения вводят перорально в виде пилюли, пастилки, троше, капсулы, раствора или суспензии. В других вариантах осуществления соединение настоящего изобретения вводят путем инъекции или инфузии. Инфузию обычно проводят внутривенно, часто в течение периода времени от приблизительно 15 мин до 4 ч. В других вариантах осуществления соединение настоящего изобретения вводят интраназально или путем ингаляции; ингаляционные способы особенно полезны для лечения респираторных инфекций. В других вариантах осуществления соединение настоящего изобретения вводят внутривенно, например путем в/в инфузии, причем данное соединение можно вводить, когда оно растворено в любом подходящем внутривенном растворе, таком как лактат Рингера, или изотоническая глюкоза, или солевой раствор.

Соединения настоящего изобретения можно использовать для лечения состояний, вызываемых продуцированием эндотоксина бактериями и, в частности, грамотрицательными бактериями и бактериями, которые используют LpxC в биосинтезе липополисахарида (LPS) или эндотоксина.

Соединения настоящего изобретения также полезны при лечении пациентов, страдающих или подверженных инфекциям дыхательных путей (пневмонии, абсцессам легких, бронхоэктазам), бактериемии (сепсису), кистозному фиброзу, инфекциям кожи и мягких тканей (ранам, хирургическим инфекциям, осложнениям диабетической стопы, осложненным ожогам), осложненным инфекциям брюшной полости или мочевых путей и заболеваниям, передаваемым половым путем, вызываемым грамотрицательными патогенами. Соединения настоящего изобретения также полезны при состояниях, которые вызываются или усугубляются бактериальным продуцированием липида А и LPS или эндотоксина, таких как сепсис, септический шок, системное воспаление, локализованное воспаление, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и острые обострения хронического бронхита (АЕСВ). Для этих состояний лечение включает в себя введение соединения настоящего изобретения или комбинации соединений настоящего изобретения, необязательно со вторым средством, причем второе средство является вторым антибактериальным средством или вторым не антибактериальным средством.

Для сепсиса, септического шока, системного воспаления, локализованного воспаления, хронической обструктивнаой болезни легких (ХОБЛ) и острых обострений хронического бронхита (АЕСВ) предпочтительные вторые не антибактериальные средства включают антиэндотоксины, включая связывающие эндотоксиновый рецептор антитела, связывающие эндотоксин антитела, антитела против CD14-связывающего белка, антитела против липополисахарид-связывающего белка и ингибиторы тирозинкиназы.

При лечении тяжелых или хронических инфекций дыхательных путей соединения настоящего изобретения можно также использовать со вторыми не антибактериальными средствами, вводимыми путем ингаляции. Предпочтительные не антибактериальные средства, используемые при таком лечении, включают противовоспалительные стероиды, нестероидные противовоспалительные средства, бронхиодиляторы, муколитики, средства для антиастматической терапии и поверхностно-активные вещества для легочной жидкости. В частности, не антибактериальное средство может быть выбрано из группы, состоящей из альбутерола, сальбутерола, будесонида, беклометазона, дексаметазона, недокромила, беклометазона, флутиказона, флунизолида, триамцинолона, ибупрофена, рофекоксиба, напроксена, целекоксиба, недокромила, ипратропиума, метапротеренола, пирбутерола, сальнетерола, бронхиодиляторов, муколитиков, кальфактанта, берактанта, порактанта-альфа, сурфаксина и пульмозима (также называемого дорназа альфа).

Соединение настоящего изобретения можно использовать, отдельно или в комбинации со вторым антибактериальным средством, для лечения тяжелой или хронической инфекции дыхательных путей, включая тяжелые легочные и нозокомиальные инфекции, такие как инфекции, вызываемые

Enterobacter aerogenes, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter baumanii*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Providencia stuartii* и *Citrobacter freundi*,

внебольничные легочные инфекции, такие как инфекции, вызываемые *Haemophilus influenzae*, *Legionella species*, *Moraxella catarrhalis*, видами *Enterobacter*, видами *Acinetobacter*, видами *Klebsiella* и видами *Proteus*, и инфекции, вызываемые другими бактериальными видами, такими как виды *Neisseria*, виды *Shigella*, виды *Salmonella*, *Helicobacter* pylori, *Vibrionaceae* и виды *Bordetella*, а также инфекции, вызываемые видами *Brucella*, *Francisella tularensis* и/или *Yersinia pestis*.

Соединение настоящего изобретения можно также использовать в комбинации с другими средствами (партнерами по комбинации), например дополнительным антибиотическим средством, отличным от соединения (А), для лечения бактериальной инфекции у субъекта.

Под термином "комбинация" понимается или фиксированная комбинация в одной единичной лекарственной форме в виде отдельных лекарственных форм, подходящих для применения вместе или одновременно, или последовательно, или составной набор для комбинированного введения, при котором соединение настоящего изобретения и партнер по комбинации могут быть введены независимо в одно и то же время или по отдельности в пределах временных интервалов, которые, в частности, позволяют партнерам по комбинации демонстрировать кооперативный, например синергический, эффект, или любая их комбинация.

При использовании для лечения грамотрицательных бактерий соединения настоящего изобретения могут делать грамотрицательные бактерии чувствительными к воздействию второго средства, так что их можно использовать в комбинациях или в комбинированных терапиях с другими антибактериальными средствами.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение настоящего изобретения используют в комбинации со вторым антибактериальным средством; неограничивающие примеры вторых антибактериальных средств для такого использования могут быть выбраны из следующих групп.

(1) Макролиды или кетолиды, такие как эритромицин, азитромицин, кларитромицин и телитромицин.

(2) Бета-лактамы, включая пенициллин, такой как пенициллин G, пенициллин V, метициллин, оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин, нафциллин, ампициллин, амоксициллин, карбенициллин, тикарциллин, мезлоциллин, пиперациллин, азлоциллин, темоциллин, цефалоспорин, такой как цепалотин, цефапирин, цефрадин, цефалоридин, цефазолин, цефамандол, цефуроксим, цефалексин, цефпрозил, цефаклор, лоракарбеф, цефокситин, цефинетазол, цефотаксим, цефтизоксим, цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим, цефиксим, цефподоксим, цефтибутен, цефдинир, цефпиром, цефепим и карбапенемы, такие как карбапенем, имипенем, меропенем и PZ-601.

(3) Монобактамы, такие как азтреонам.

(4) Хинолоны, такие как налидиксовая кислота, оксолиновая кислота, норфлоксацин, пефлоксацин, эноксацин, офлоксацин, левофлоксацин, ципрофлоксацин, темафлоксацин, ломефлоксацин, флероксацин, грепафлоксацин, спарфлоксацин, тровафлоксацин, клинафлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин, ситафлоксацин, ганефлоксацин, гемифлоксацин и пазуфлоксацин.

(5) Антибактериальные сульфонамиды и антибактериальные сульфаниламиды, включая парааминобензойную кислоту, сульфадиазин, сульфизоксазол, сульфаметоксазол и сульфаталидин.

(6) Аминогликозиды, такие как стрептомицин, неомицин, канамицин, паромицин, гентамицин, тобрамицин, амикацин, нетилмицин, спектиномицин, сизомицин, дибекалин и изепамицин.

(7) Тетрациклины, такие как тетрациклин, хлортетрациклин, демеклоциклин, миноциклин, окситетрациклин, метациклин, доксициклин, тегациклин.

(8) Рифамицины, такие как рифампицин (также называемый рифампин), рифапентин, рифабутин, безоксазинорифамицин и рифаксимин.

(9) Линкозамиды, такие как линкомицин и клиндамицин.

(10) Гликопептиды, такие как ванкомицин и тейкопланин.

(11) Стрептограмины, такие как квинупристин и дафлопристин.

(12) Оксазолидиноны, такие как линезолид и тедизолид.

(13) Полимиксин, колистин и колимицин;

(14) Триметоприм и бацитрацин.

(15) Ингибиторы эффлюксной помпы.

Второе антибактериальное средство можно вводить в комбинации с соединением настоящего изобретения, причем второе антибактериальное средство вводят до, одновременно или после соединения или соединений настоящего изобретения. Если желательно одновременное введение соединения настоящего изобретения и второго средства и путь введения одинаков, то соединение настоящего изобретения может быть составлено со вторым средством в одну лекарственную форму. Примером лекарственной формы, содержащей соединение настоящего изобретения и второе средство, является таблетка или капсула.

В некоторых вариантах осуществления комбинация соединения настоящего изобретения и второго антибактериального средства может обеспечивать синергическую активность. Например, использование соединения настоящего изобретения с ванкомицином или цефалоспорином может быть синергическим; таким образом, в некоторых вариантах осуществления соединение настоящего изобретения используют в комбинации с ванкомицином или цефалоспорином, обычно посредством инфузии. Соединение настоящего изобретения и второе антибактериальное средство можно вводить вместе, по отдельности, но одновременно, или последовательно.

При использовании для лечения тяжелых или хронических инфекций дыхательных путей соединение настоящего изобретения можно использовать отдельно или в комбинации со вторым антибактериальным средством; в некоторых вариантах осуществления второе антибактериальное средство вводят посредством ингаляции. Необязательно комбинацию можно вводить в виде одной композиции посредством ингаляции. В случае введения с помощью ингаляции подходящее второе антибактериальное средство выбирают из группы, состоящей из тобрамицина, гентамицина, азтреонама, ципрофлоксацина, полимиксина, колистина, колимицина, ванкомицина, цефалоспоринов, азитромицина и кларитромицина. Иногда предпочтительным является ванкомицин.

"Эффективным количеством" соединения является количество, необходимое или достаточное для лечения или предотвращения бактериальной инфекции и/или заболевания или состояния, описанного в настоящем документе. В одном примере эффективным количеством соединения (А) является количество, достаточное для лечения бактериальной инфекции у субъекта. В другом примере эффективным количеством ингибитора LpxC является количество, достаточное для лечения у субъекта бактериальной инфекции, такой как, но без ограничения, Pseudomonas aeruginosa и т.п. Эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов как размер и вес субъекта, тип заболевания или конкретное соединение настоящего изобретения. Например, на то, каким является "эффективное количество", может влиять выбор соединения настоящего изобретения. Средний специалист в данной области техники может изучить факторы, приведенные в настоящем документе, и сделать вывод относительно эффективного количества соединений настоящего изобретения без лишних экспериментов.

На то, каким является эффективное количество, может влиять схема введения. Соединение настоящего изобретения можно вводить субъекту до или после начала бактериальной инфекции. Кроме того, ежедневно или последовательно можно вводить несколько разделенных доз, а также отсроченных доз, или дозу можно непрерывно вводить с помощью инфузии, или она может представлять собой болюсную инъекцию. Кроме того, дозировки соединения(ий) настоящего изобретения могут быть пропорционально увеличены или уменьшены в зависимости от требований терапевтической или профилактической ситуации.

Соединения настоящего изобретения можно использовать в лечении состояний, нарушений или заболеваний, как описано в настоящем документе, или для изготовления фармацевтических композиций для применения в лечении этих заболеваний. Настоящее изобретение предлагает способы применения соединений настоящего изобретения в лечении этих заболеваний или для получения фармацевтических композиций с соединениями настоящего изобретения для лечения этих заболеваний.

Выражение "фармацевтическая композиция" включает препараты, подходящие для введения млекопитающим, например людям. Когда соединения настоящего изобретения вводят в виде фармацевтических препаратов млекопитающим, например людям, они могут быть даны сами по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, 0,1-99,5% (более предпочтительно 0,5-90%) соединения (А) в качестве активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или необязательно двумя или более фармацевтически приемлемыми носителями.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель" понятна в данной области техники и включает фармацевтически приемлемый материал, композицию или основу, подходящие для введения соединения настоящего изобретения млекопитающим. Носители включают в себя жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, который участвует в переносе или транспортировке рассматриваемого средства от одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с дру-

гими ингредиентами композиции и не причинять вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразную трагакантовую камедь; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и суппозиторные воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических композициях. Как правило, фармацевтически приемлемые носители являются стерильными и/или по существу апирогенными.

В композициях также могут присутствовать смачивающие средства, эмульгаторы и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красящие средства, средства для высвобождения, средства для покрытия, подслащивающие, ароматизирующие и отдушивающие средства, консерванты и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п; маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, α-токоферол и т.п; и хелатирующие металлы средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Композиции настоящего изобретения включают подходящие для перорального, назального, ингаляционного, местного, трансдермального, буккального, подъязычного, ректального, вагинального и/или парентерального введения. Композиции могут быть удобно представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом носителя для получения единичной лекарственной формы, обычно представляет собой такое количество соединения, которое дает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов это количество будет лежать в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 30%.

Способы получения этих составов или композиций включают в себя этап объединения соединения настоящего изобретения с носителем и необязательно одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Вообще говоря, композиции получают путем равномерного и тщательного объединения соединения настоящего изобретения с жидкими носителями, или тонкоизмельченными твердыми носителями, или и с теми и с другими, а затем при необходимости формования продукта.

Композиции настоящего изобретения, подходящие для перорального введения могут быть в форме капсул, облаток, пилюль, таблеток, пастилок (с использованием ароматизированной основы, например, обычно сахарозы и акациевой или трагакантовой камеди), порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин или сахароза и акациевая камедь), и/или в виде жидкости для полоскания полости рта и т.п., содержащих заранее определенное количество соединения настоящего изобретения в качестве активного ингредиента. Соединение настоящего изобретения можно вводить также в виде болюса, электуария или пасты.

В твердых лекарственных формах настоящего изобретения для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и т.п.) активный ингредиент смешивают с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или фосфат дикальция, и/или любым из следующего: наполнители или расширители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; связывающие вещества, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или акациевая камедь; увлажнители, такие как глицерин; дезинтегрирующие средства, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; задерживающие раствор средства, такие как парафин; ускорители впитывания, такие как соединения четвертичного аммония; смачивающие средства, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и красящие средства. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции могут также содержать буферные средства. Твердые композиции аналогичного типа можно также использовать в качестве наполнителей в желатиновых капсулах с мягким и твердым содержимым с использованием таких вспомогательных веществ как лактоза или молочные сахара, а также полиэтиленгликоли с высокой молекуляр-

ной массой и т.п.

Таблетка может быть изготовлена путем прессования или формования, необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены с использованием связывающего вещества (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, дезинтегратора (например, крахмалгликолята натрия или сшитой карбоксиметилцеллюлозы натрия), поверхностно-активного или диспергирующего средства. Формованные таблетки могут быть изготовлены путем формования в подходящей машине смеси порошкообразного соединения, смоченного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтических композиций настоящего изобретения, такие как драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут быть необязательно снабжены линией разлома или покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области составления фармацевтических композиций. Они также могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечивать медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для обеспечения желаемого профиля высвобождения, других полимерных матриц, липосом и/или микросфер. Они могут быть стерилизованы, например путем фильтрации через задерживающий бактерии фильтр или путем введения стерилизующих средств в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены в стерильной воде или какой-либо другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед использованием. Эти композиции могут также необязательно содержать замутняющие средства и могут иметь такой состав, что они высвобождают активный ингредиент(ы) только или преимущественно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно с задержкой. Примеры покрывающих композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент также может быть в микроинкапсулированной форме, если необходимо, с одним или несколькими из вышеописанных вспомогательных веществ.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения соединений настоящего изобретения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо активного ингредиента жидкие лекарственные формы могут содержать инертный разбавитель, обычно используемый в данной области техники, такой как, например, вода или другие растворители, солюбилизирующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана и их смеси.

Помимо инертных разбавителей пероральные композиции могут также включать в себя адъюванты, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подслащивающие, ароматизирующие, окрашивающие, отдушивающие и консервирующие средства.

Суспензии помимо активных соединений могут содержать суспендирующие средства, например этоксилированные изостеариловые спирты, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакантовую камедь и их смеси.

Композиции настоящего изобретения, которые подходят для вагинального введения, также включают пессарии, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или аэрозольные композиции, содержащие такие носители, о которых в данной области техники известно, что они являются подходящими.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения соединения настоящего изобретения включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и средства для ингаляций. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

Порошки и спреи могут содержать помимо соединения настоящего изобретения вспомогательные вещества, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок или смеси этих веществ. Спреи могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Офтальмологические композиции, глазные мази, порошки, растворы и т.п. также рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения, подходящие для парентерального введения, содержат одно или несколько соединений настоящего изобретения в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как стерильные изотонические водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии или стерильные порошки, которые могут быть восстановлены до стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед использованием, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают композицию изотоничной крови предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие средства.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях настоящего изобретения, включают воду, этанол, гликолевые эфиры, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено за счет включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательно включить в композиции изотонические средства, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть обеспечена включением средств, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Препараты настоящего изобретения можно вводить перорально, парентерально, местно или ректально. Конечно, их вводят в формах, подходящих для каждого способа введения. Например, их вводят в форме таблеток или капсул, посредством инъекции, ингаляции, лосьона для глаз, мази, суппозитория и т.д., введения посредством инъекции, инфузии или ингаляции; местно с помощью лосьона или мази; и ректально с помощью суппозиториев.

Фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" при использовании в настоящем документе означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают без ограничения внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрикапсульные, внутриорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, подкапсульные, субарахноидальные, интраспинальные и интрастернальные инъекцию и инфузию. Иногда предпочтительным способом доставки для соединения настоящего изобретения является внутривенная инфузия. Инфузию можно использовать для доставки одной суточной дозы или нескольких доз. В некоторых вариантах осуществления соединение настоящего изобретения вводят посредством инфузии в течение промежутка времени от 15 мин до 4 ч, обычно от 0,5 до 3 ч. Такую инфузию можно использовать один раз в день, два раза в день или вплоть до трех раз в день.

Фразы "системное введение," "вводимый системно", "периферическое введение" и "вводимый периферически" при использовании в настоящем документе означают введение соединения, лекарственного средства или другого материала, отличное от непосредственного введения в центральную нервную систему, таким образом, что они входят в систему пациента и, таким образом, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам, например подкожное введение.

Эти соединения можно вводить людям и другим животным для терапии с помощью любого подходящего способа введения, в том числе перорально, назально, например с помощью распыления, ректально, интравагинально, парентерально, интрацистернально и местно, например с помощью порошков, мазей или капель, в том числе буккально и подъязычно.

Независимо от выбранного способа введения соединения настоящего изобретения, которые можно использовать в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции настоящего изобретения, составляют в фармацевтически приемлемые лекарственные формы с помощью обычных способов, известных специалистам в данной области техники.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях настоящего изобретения можно варьировать для получения количества активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, но не токсично для пациента.

Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения настоящего изобретения или его сложного эфира, соли или амида, способа введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретным используемым соединением, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предшествующей истории болезни подвергаемого лечению пациента и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Врач или ветеринар, являющийся средним специалистом в данной области техники, может легко определить и прописать эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар могут начать вводить дозы соединений настоящего изобретения, используемых в фармацевтической композиции, в количествах меньше требуемого для достижения желаемого терапевтического эффекта и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта.

Вообще говоря, подходящей суточной дозой соединения настоящего изобретения будет такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно зависит от факторов, описанных выше. Как правило, внутри-

венные и подкожные дозы соединений настоящего изобретения для пациента при использовании для указанных эффектов будут лежать в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 мг на килограмм веса тела в день, часто от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/кг в день и часто от приблизительно 1,0 до приблизительно 50 мг/кг в день. Общая суточная доза при внутривенном введении обычно составляет 1-4 г в день для типичного субъекта (например, субъекта-человека весом 70 кг); общая суточная доза при ингаляции обычно будет составлять 50-500 мг в день или приблизительно 100-200 мг. Эффективным количеством является количество, которое лечит бактериальную инфекцию.

При желании эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде одной, двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых по отдельности через соответствующие интервалы в течение дня, необязательно в стандартных лекарственных формах. Для соединений, доставляемых перорально или посредством ингаляции, обычно вводят от одной до четырех доз в день. Соединения, доставляемые посредством инъекции, обычно вводят раз в день или через день. Для соединений, доставляемых внутривенно, обычно вводят от одной до трех доз в день.

В соответствии с вышесказанным настоящее изобретение предлагает в еще одном аспекте

фармацевтическую комбинацию, содержащую кристаллическое соединение (A) и b) вспомогательное средство, например второе лекарственное средство, как определено выше;

способ, как определено выше, содержащий совместное введение, например одновременно или последовательно, терапевтически эффективного количества кристаллического соединения (A) и вспомогательного средства, например второго терапевтического средства, как определено выше.

Предполагается, что термины "совместное введение" или "комбинированное введение" или т.п., используемые в настоящем документе, охватывают введение выбранных терапевтических средств одному пациенту, и включают схемы лечения, в которых средства не обязательно вводят с помощью одного способа введения или в одно время. Фиксированные комбинации также входят в объем настоящего изобретения. Введение фармацевтической комбинации настоящего изобретения приводит к благоприятному эффекту, например синергическому терапевтическому эффекту, по сравнению с монотерапией с применением только одного из ее фармацевтически активных ингредиентов.

Каждый компонент комбинации в соответствии с настоящим изобретением можно вводить по отдельности, вместе или любой комбинации указанного.

Соединение настоящего изобретения и любое дополнительное средство могут быть составлены в отдельные лекарственные формы. Альтернативно для уменьшения количества лекарственных форм, вводимых пациенту, соединение настоящего изобретения и любое дополнительное средство могут быть составлены вместе в любой комбинации. Например, ингибитор-соединение настоящего изобретения может быть составлен в одну лекарственную форму, а дополнительные средства могут быть составлены вместе в другую лекарственную форму. Любые отдельные лекарственные формы можно вводить в одно и то же время или в разное время.

Альтернативно композиция настоящего изобретения содержит дополнительное средство, как описано в настоящем документе. Все компоненты могут присутствовать в отдельных композициях, комбинированных композициях или в одной композиции.

Примеры

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Анализы, используемые во всех примерах, хорошо известны в данной области техники: демонстрация эффективности в этих анализах обычно рассматривается как прогноз эффективности у субъектов.

СОКРАЩЕНИЯ

Ac	ацетил
ACN	ацетонитрил
AcOEt/EtOAc	этилацетат
AcOH	уксусная кислота
водн	водный
CDI	карбонилдиимидазол
CH_3CN	ацетонитрил
DBU	1,8-диазабицикло[5.4.0]-ундец-7-ен
Boc_2O	ди-трет-бутилдикарбонат
DCE	1,2-дихлорэтан
DCM	дихлорметан
DiBAl-H	гидрид диизобутилалюминия
DIPEA	N-этилдиизопропиламин
DMAP	диметиламинопиридин
DMF	N,N'-диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
EI	ионизация электрораспылением
Et_2O	диэтиловый эфир
Et_3N	триэтиламин
эфир	диэтиловый эфир
EtOAc	этилацетат
EtOH	этанол
FC	флеш-хроматография
ч	час(ы)
HATU	гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N'N'-тетраметилурония
HBTU	гексафторфосфат O-(бензотриазол-1-ил)-

	N,N,N',N'-тетраметилурония
HCl	соляная кислота
HMPA	гексаметилфосфорамид
HOBt	1-гидроксибензотриазол
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
H_2O	вода
л	литр(ы)
LC-MS	жидкостная хроматография/масс-спектрометрия
LiHMDS	бис(триметилсилил)амид лития
$MgSO_4$	сульфат магния
Me	метил
MeI	йодметан
MeOH	метанол
мг	миллиграмм
мин	минута(ы)
мл	миллилитр
MS	масс-спектрометрия
$NaHCO_3$	Бикарбонат натрия
Na_2SO_4	Сульфат натрия
NH_2OH	гидроксиламин
Pd/C	палладий на углероде
$Pd(OH)_2$	гидроксид палладия
PG	защитнаягруппа
Ph	фенил
Ph_3P	трифенилфосфин
Prep	препаративный
Rf	отношение фронтов
RP	обратная фаза

Rt	время удерживания
rt	комнатная температура
SiO_2	силикагель
$SOCl_2$	тионилхлорид
TBAF	фторид тетрабутиламмония
TBDMS	т-бутилдиметилсилил
ТЭА	триэтиламин
ТФУ	трифторуксусная кислота
ТГФ	тетрагидрофуран
ТСХ	тонкослойная хроматография
TsCl	толуолсульфонилхлорид

Общие условия.

Масс-спектры получали на системах LC-MS с использованием ионизации электрораспылением. Использовали WATERS Acquity Single Quard Detector. $[M+H]^+$ относится к моноизотопным молекулярным массам.

Спектры ЯМР получали на ЯМР-спектрометрах с открытым доступом Varian 400 или Varian 500. Спектры измеряли при 298 К и использовали в качестве стандарта пик растворителя. Химические сдвиги для ^1H ЯМР приведены в миллионных долях (м.д.).

Масс-спектры получали на системах LC-MS в одних из следующих условий.

1. Система Waters Acquity UPLC-H class, оснащенная детектором SQD.

Колонка: ACQUITY UPLC HSS C18 (50×2,1) мм, 1,8 мкм.

Температура колонки: окружающая среда.

Подвижная фаза: A) 0,1% FA+5 мМ ацетата аммония в воде. B) 0,1% FA в ацетонитриле.

Градиент: 5-5% растворителя B за 0,40 мин, 5-35% растворителя B за 0,80 мин, 35-55% растворителя B за 1,2 мин, 55-100% растворителя B за 2,5 мин.

Скорость потока: 0,55 мл/мин.

Соединения детектировали с помощью матричного фотодиодного детектора Waters.

2. Система LCMS Waters, оснащенная детектором ZQ 2000.

Колонка: X-BRIDGE C18 (50×4,6) мм, 3,5 мкм.

Температура колонки: окружающая среда.

Подвижная фаза: A) 0,1% NH_3 в воде. B) 0,1% NH_3 в ацетонитриле.

Градиент: 5-95% растворителя B за 5,00 мин.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Соединения детектировали с помощью матричного фотодиодного детектора Waters.

3. Система Waters ACQUITY UPLC, оснащенная системой ZQ 2000 MS.

Колонка: Kinetex от Phenomenex, 2,6 мкм, 2,1×50 мм.

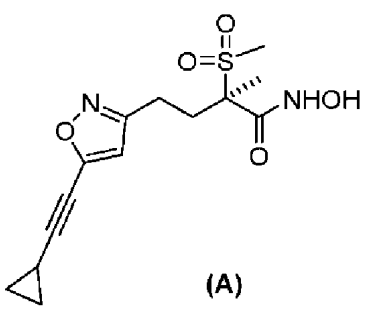
Температура колонки: 50°C.

Градиент: 2-88% (или 00-45% или 65-95%) растворителя B за период 1,29 мин.

Скорость потока: 1,2 мл/мин.

Соединения детектировали с помощью матричного фотодиодного детектора Waters.

1.1. Синтез (R)-4-(5-(циклопропилэтинил)изоксазол-3-ил)-N-гидрокси-2-метил-2-(метилсульфонил)бутанамида [A]



(A)

Способ A.

Этап 1. Синтез (циклопропилбута-1,3-диин-1-ил)триметилсилана [1.1a].

К раствору (бромэтинил)циклопропана (60 г, 414 ммоль) в пиперидине (345 мл) при 0°C добавляли этинилтриметилсилан (44,7 г, 455 ммоль) и CuI (7,88 г, 41,4 ммоль). Затем раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакцию гасили добавлением насыщ. водн. раствора NH_4Cl и затем экстрагировали с помощью TBME. Органический слой промывали водой, рассолом, сушили над $MgSO_4$ и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией на силикагеле с гептаном в качестве элюента с получением продукта (42 г, 62% выход). ^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) 0,13-0,24 (m, 9H) 0,72-0,91 (m, 4 H) 1,25-1,36 (m, 1H).

Этап 2. Синтез этил-5-хлор-5-(гидроксиимино)-2-метил-2-(метилсульфонил)пентаноата [1.1b].

NCS (10,8 г, 81 ммоль, 1,2 эквив.) добавляли к раствору этил-5-(гидроксиимино)-2-метил-2-(метилсульфонил)пентаноата (17 г, 67,6 ммоль) в DMF (34 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем растворитель удаляли под вакуумом. Остаток растворяли в EtOAc, промывали водой, рассолом, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением продукта (19 г, 98% выход). Неочищенный материал передавали на следующий этап без дальнейшей очистки. LCMS (m/z): 286,2 $[M+H]^+$.

Этап 3. Синтез (R)-этил-4-(5-(циклопропилэтинил)изоксазол-3-ил)-2-метил-2-(метилсульфонил)бутаноата [1.1c].

К раствору 1.1a (8,4 г, 51,8 ммоль) в MeOH (25 мл) добавляли K_2CO_3 (14,3 г, 104 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Затем смесь разбавляли CH_2Cl_2 (75 мл) и фильтровали. Затем фильтрат помещали в баню с ледяной водой и добавляли 1.1.b (14,79 г, 51,8 ммоль). Затем к вышеуказанному раствору добавляли ТЭА (14,43 мл, 104 ммоль) в течение 30 мин и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток разбавляли TBME и промывали водой, рассолом, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, EtOAc/гептан 0-60%, с получением (±)-1.1c (9,0 г, 51%). Два энантиомера разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ.

Условия разделения: колонка Chiral AD; скорость потока: 30 мл/мин; растворитель: гептан/EtOH=50/50; давление 1263 фунт/кв. дюйм. Продукт 1: tR 3,76 мин, продукт 2: tR 4,73 мин. Продукт 2 представляет собой желаемый изомер 1.1c (3,0 г). ^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) 0,84-1,08 (m, 4 H) 1,32 (t, J=7,14 Гц, 3 H) 1,45-1,56 (m, 2 H) 1,68 (s, 3 H) 2,17 (s, 1H) 2,25-2,40 (m, 1H) 2,53 -2,71 (m, 2 H) 2,80 (d, J=5, 04 Гц, 1 H) 3,05 (s, 3 H) 4,27 (q, J=7,11 Гц, 2 H) 6,17 (s, 1 H). LCMS (m/z): 340,3 $[M+H]^+$.

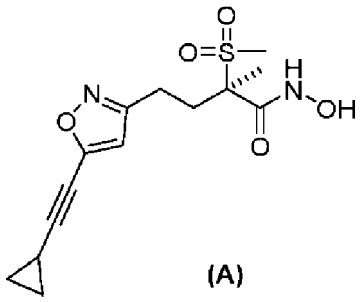
Этап 4. Синтез (R)-4-(5-(циклопропилэтинил)изоксазол-3-ил)-2-метил-2-(метилсульфонил)бутановой кислоты [1.1d]

$LiOH \cdot H_2O$ (0,3 г, 2,0 ммоль) добавляли к раствору 1.1c (1,2 г, 3,5 ммоль) в смеси ТГФ/MeOH/вода (12 мл, 1/1/1) и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Оставшийся материал подкисляли 3,0 н водн. раствором HCl и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением продукта (1,1 г, количественный выход). Неочищенный материал передавали на следующий этап без дальнейшей очистки. LCMS (m/z): 312,3 $[M+H]^+$.

Этап 5. Синтез (2R)-4-(5-(циклопропилэтинил)изоксазол-3-ил)-2-метил-2-(метилсульфонил)-N-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)бутанамид [1.1e].

К раствору 1.1d (1,1 г, 3,53 ммоль) в DMF (6 мл) при комнатной температуре добавляли aza-HOBt (0,866 г, 6,36 ммоль), EDC (1,016 г, 5,30 ммоль) и O-(тетрагидро-2H-пиран-2-ил) гидроксиламин (0,621 г, 5,30 ммоль), ТЭА (1,477 мл, 10,60 ммоль). Раствор перемешивали при 45°C в течение 3 ч, затем при комнатной температуре в течение 18 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток разбавляли EtOAc, промывали насыщ. водн. раствором $NaHCO_3$. Органический слой промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, EtOAc/гептан 0-70% с получением 1,2 г продукта (83% выход). LCMS (m/z) : 411,3 $[M+H]^+$.

Этап 6. Синтез (R)-4-(5-(циклопропилэтинил)изоксазол-3-ил)-N-гидрокси-2-метил-2-(метилсульфонил)бутанамида [A].



(A)

К раствору 1.1e (1,2 г, 2,92 ммоль) в MeOH (5,0 мл) и DCM (5,0 мл) при 0°C добавляли HCl (0,731 мл,

4,0 М в диоксане, 2,92 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем растворитель удаляли при пониженном давлении. Оставшийся материал очищали колоночной хроматографией на силикагеле, ацетон/гептан 0-60% с получением 0,79 г продукта (81% выход). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO): 10,97 (s, 1H), 9,24 (s, 1H), 6,73 (s, 1H), 3,06 (s, 3H), 2,71 (dd, J=17,3, 9,1 Гц, 1H), 2,56 (d, J=4,0 Гц, 1H), 2,47-2,40 (m, 1H), 2,06-1,95 (m, 1H), 1,69 (ddd, J=13,3, 8,3, 5,0 Гц, 1H), 1,50 (s, 3H), 0,99 (td, J=6,8, 4,0 Гц, 2H), 0,88-0,82 (m, 2H). LCMS (m/z): 327,3 $[M+H]^+$.

Материал, полученный таким способом, был, по существу, чистым, но был аморфным и не демонстрировал четко выраженной точки плавления. Он также поглощал влагу, т.е., находясь на воздухе, в значительной степени поглощал воду и имел склонность к потемнению, когда находился при температуре окружающей среды. Этот материал требовал специального обращения, и его посчитали неподходящим для дальнейшей разработки фармацевтического препарата.

Способ В.

Альтернативный синтез 1.1c.

Этап 7. Синтез этил-2-метил-2-(метилсульфонил)гекс-5-еноата [1.1f].

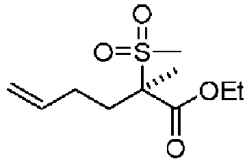
К раствору этил-2-(метилсульфонил)пропаноата (50 г, 277 ммоль) в DMF (277 мл) при 0°C добавляли NaH (14,43 г, 60%, 361 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем смесь охлаждали при 0°C и добавляли 4-бромбут-1-ен (41,2 г, 305 ммоль) в течение 30 мин. Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Растворитель удаляли в высоком вакууме. К остатку добавляли TBME, а затем гасили насыщ. водн. раствором NH_4Cl. Разделяли фазы, и водный слой экстрагировали с помощью TBME. Объединенный органический слой промывали рассолом и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, EtOAc/гептан 0-50%, с получением продукта. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$):1,32 (t, J=7,14 Гц, 3 H) 1,62 (s, 3 H) 1,91-2,06 (m, 2 H) 2,12-2,42 (m, 2 H) 3,04 (s, 3H) 4,28 (q, J=7,14 Гц, 2H) 4,92-5,14 (m, 2 H) 5,64-5,86 (m, 1H).

Этап 8. Разделение 1.1f для получения 1.1f-I и 1.1f-II.

Рацемический материал 1.1f разделяли на энантиомеры 1.1f-I и 1.1f-II с помощью хроматографии с псевдодвижущимся слоем.

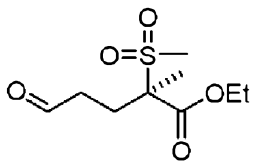
Оборудование	Модуль ПДС BAYCC50
Скорость потока	Элюент: 13,58 л/ч Подача: 0,53 л/ч Экстракт: 11,2 л/ч Рафинат: 2,9 л/ч Рециркуляция: 24,00 л/ч
Подвижная фаза	Гептан:EtOH 80:20
Колонка	Chiralpak AD 20 мкМ 8x (100x50 мм)
Время переключения	71 сек
Температура	25°C
Пик 1	5,5 мин
Пик 2	8,9 мин

Второй пик представляет собой желаемый изомер этил-(R)-2-метил-2-(метилсульфонил)гекс-5-еноат 1.1f-II.



1.1f-II

Этап 9. Синтез этил-(R)-2-метил-2-(метилсульфонил)-5-оксопентаноата [1.1g].



1.1g

К раствору 1.1f-II (6 г, 25,6 ммоль) в диоксане (128 мл) и воде (43 мл) добавляли 2,6-лутидин (5,49 г,

51,2 ммоль) и OsO_4 (3,25 г, 4% в воде, 0,512 ммоль). Через 30 мин раствор помещали в баню с ледяной водой и добавляли $NaIO_4$ (21,91 г, 102 ммоль). Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Затем смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. Остаток растворяли в EtOAc и промывали водн. раствором 1,0 HCl, рассолом, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Неочищенный материал передавали на следующий этап без дальнейшей очистки. ^{1}H ЯМР (400 МГц, растворитель): 1,32 (t, J=7,14 Гц, 3 H) 1,61 (s, 3 H) 2,22-2,36 (m, 1 H) 2,43-2,62 (m, 2 H) 2,63-2,76 (m, 1 H) 3,07 (s, 3H) 4,28 (q, J=7,14 Гц, 2H) 9,69-9,92 (m, 1H).

Этап 10. Синтез этил-(R)-5-(гидроксиимино)-2-метил-2-(метилсульфонил)пентаноата [1.1h].

К раствору гидрохлорида гидроксиламина (2,0 г, 28,2 ммоль) в воде (26 мл) добавляли $NaHCO_3$ (2,4 г). После перемешивания при комнатной температуре в течение 10 мин добавляли раствор 1.1g (6,0 г, 25 ммоль) в EtOH (26 мл) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Оставшийся материал экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением продукта 6,4 г. Неочищенный материал передавали на следующий этап без дальнейшей очистки. LCMS (m/z): 252,1 $[M+H]^+$.

Этап 11. Синтез (R)-этил 4-(5-(циклопропилэтинил)изоксазол-3-ил)-2-метил-2-(метилсульфонил)бутаноата [1.1c].

Соединение 1.1c синтезировали из 1.1h в соответствии с процедурой примера 1.1, этап 2-3. Хиральное разделение на этапе 3 не требуется, поскольку 1.1h энантиомерно чист.

Получение кристаллического соединения (A).

1501 мг соединения A в аморфный форме свободной кислоты растворяли в 5 мл DCM при 25°C и медленно добавляли к 20 мл гептана в течение 5 ч при 55°C. Вначале к стенке контейнера прилипал маслоподобный осадок, и поэтому использовали магнитное перемешивание вместо механической мешалки в течение 1 ч на 300 об/мин. Полученную суспензию выдерживали при 55°C в течение 20 ч при механическом перемешивании на 500 об/мин. Твердые вещества фильтровали в условиях окружающей среды и затем сушили при 60°C в течение 12 ч. Получили 1213 мг кристаллического соединения (A), выход приблизительно 81%.

Этот материал имеет вид стержневидных кристаллов (см. фиг. 1) и имеет достаточно острую точку плавления с пиком 80,8°C. В отличие от аморфного материала, который значительно поглощает влагу при влажности приблизительно 80% или выше, кристаллический продукт имеет низкую гигроскопичность: его масса увеличилась на 1,3% при относительной влажности (RH) 80% и на 3,2% при RH=90%. Спектр XRPD для этого кристаллического материала показан на фиг. 2 (WL=1,54060). Эти данные были собраны с помощью устройства Bruker D8 Advance с использованием детектора LYNXEYE (режим 1D); открытый угол 1,198°, отверстие щели 5 мм, с использованием длины волны Cu K-alpha (0,15406 нм), генератора рентгеновского излучения 40 кВ при 4 мА, величина шага 0,041°, значение 2 тета 2-45°; время сканирования 2162 с. Первая щель Соллера 2,5°; вторая щель Соллера 2,5°; дивергентная щель 0,6 мм; антирассеивающая щель 5,0 мм.

В таблице ниже приведен перечень пиков для спектра XRPD, углы дифракции (2 тета) приведены в градусах.

Угол	Значение d	Отн. интенсивность
3,889	22,69933	100,0%
2,542	34,73140	38,8%
4,403	20,05238	38,6%
18,437	4,80827	12,0%
14,004	6,31908	12,0%
18,820	4,71137	11,8%
18,769	4,72410	11,3%

5,281	16,71928	10,6%
21,840	4,06615	9,80%
22,069	4,02458	8,4%
18,020	4,91881	7,5%
14,287	6,19433	4,7%
13,439	6,58317	4,4%
20,566	4,31507	3,1%
7,733	11,42390	2,9%
5,845	15,10742	2,0%
2,891	30,53256	1,7%
8,138	10,85606	1,5%

В одном варианте осуществления кристаллическая форма отличается пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 3,9, и 2,5, и 4,4, и 18,4, и 14,0°. Этот вариант осуществления может дополнительно отличаться одним или несколькими дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 18,8, и/или 5,3°, и/или 21,8°, и/или 22,1°, и/или 18,0°.

Фармацевтическая активность

Анализ ингибирования LpxC P. aeruginosa.

Белок LpxC P. aeruginosa получают в соответствии с общим способом Hyland et al. (Journal of Bacteriology 1997 179, 2029-2037: Cloning, expression and purification of UDP-3-O-acyl-GlcNAc deacetylase from Pseudomonas aeruginosa: a metalloamidase of the lipid A biosynthesis pathway). Был разработан метод LC-MS/MS для количественного определения продукта LpxC с использованием системы капиллярной ВЭЖХ Agilent 1200, связанной с масс-спектрометром Applied Biosystems MDS Sciex 4000QTRAP. Обоими приборами управляли с использованием программного обеспечения Applied Biosystems MDS Sciex Analyst. Продукт реакции LpxC (UDP-3-O-(R-3-гидроксиацил)-глюкозамин) получали гидролизом субстрата LpxC, катализируемым LpxC P.a., и очищали с использованием хроматографии с обращенной фазой на колонке Phenomenex Luna C18(2) 4,6×50 мм. Была сгенерирована калибровочная кривая продукта LpxC для оценки чувствительности и динамического диапазона метода LC-MS/MS. Кратко говоря, соединения предварительно инкубировали с 1 нМ LpxC P. aeruginosa в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакции инициировали добавлением 2 мкМ UDP-3-O-(R-3-гидроксидеканоил)-GlcNAc. Реакции проводили в 384-луночном планшете с общим объемом каждой лунки 50 мкл, содержащем фосфат натрия 50 мМ pH 7,5, 0,005% Triton X-100, в течение 20 мин при комнатной температуре. После гашения с помощью 1,8% HOAc (в каждую лунку добавляли 5 мкл 20% HOAc) реакционные смеси анализировали с использованием метода LC-MS/MS и преобразовывали площади пиков в концентрацию продукта с использованием калибровочной кривой продукта LpxC. Общую активность (контроль 0% ингибирования) получали из реакций без ингибиторов, а контролем 100% ингибирования являлся фон при использовании образцов, погашенных до начала реакции. Для определения IC_{50} площади пиков преобразовывали в процентное ингибирование в Microsoft Excel. На график с помощью XLfit наносили зависимость значений процентного ингибирования от log концентрации соединения. Данные подгоняли под четырехпараметрическое логистическое уравнение с использованием алгоритма нелинейной регрессии в XLfit для получения IC_{50} и значений углового коэффициента Хилла.

Скрининг и культивирование бактерий

Бактериальные изоляты культивировали из замороженных при -70°C исходных культур за два последовательных пассажа в течение ночи при 35°C в окружающем воздухе на 5% кровяном агаре (Remel, Lenexa, Kans.). Штаммы для контроля качества, P. aeruginosa ATCC 27853, A. baumannii ATCC19606 и E. coli ATCC 25922, были из Американской коллекции типовых культур (ATCC; Rockville, Md.), а PAO1 были получены от Dr. K. Poole.

Тест на чувствительность

Минимальные ингибирующие концентрации (MIC) определяли методом микроразведений в бульоне в соответствии с рекомендациями Clinical and Laboratories Institute (CLSI) (CLSI M100-S25, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement). Кратко говоря, свежие бактериальные ночные культуры ресуспендировали в стерильном солевом растворе, доводили до 0,5 от стандарта мутности по Мак-Фарланду, а затем разбавляли в 2000 раз в бульоне Мюллера-Хинтона со стандартизированным содержанием катионов II (MHB; Remel BBL) с получением конечного инокулята приблизительно 5×10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Получали двухкратные серийные разведения соединений в 100% диметилсульфоксиде (DMSO) при 100-кратной наивысшей конечной концентрации анализа; полученную серию разбавления соединений разбавляли стерильной водой 1:10.

По 10 мкл серии разведения препарата в 10% DMSO переносили в лунки для микротитрования, и в лунки инокулировали 90 мкл бактериальной суспензии. Для тестирования способности соединений потенцировать активность известных антибиотиков анализ модифицировали следующим образом; известные антибиотики добавляли к бактериальному инокулюму при 1,1-кратной конечной концентрации анализа, указанной в табл. A. Все инокулированные лотки для микроразведения инкубировали в окружающем воздухе при 35°C в течение 20 ч. После инкубации аналитические планшеты считывали в считывающем устройстве для микротитровальных планшетов на 600 нм и визуально осматривали для подтверждения лунки с конечной точкой MIC по значению OD. Самую низкую концентрацию соединения, которая препятствовала видимому росту, регистрировали как MIC. Выполнение анализа контролировали путем тестирования ципрофлоксацина на штамме лабораторного контроля качества в соответствии с рекомендациями CLSI.

Ингибирующая активность LpxC для выбранных соединений настоящего изобретения на LpxC из P. aeruginosa приведена в таблице A. Анализ MIC для P. aeruginosa, E. coli и A. baumannii также проводили в присутствии субингибирующих концентраций рифампицина для демонстрации возможного синергизма с другими противомикробными средствами, см. табл. B.

Таблица A. Биологические данные

Номер соединения	P.A. LpxC IC_{50} [мкмоль $л^{-1}$]

Номер соединения	P.A. LpxC IC_{50} [мкмоль $л^{-1}$]
A	0,003

Таблица B. Антибактериальная эффективность и данные о синергизме

№ соед.	MIC P.A. PAO1 NB52019 (мкг/мл)	MIC E.C. ATCC 25922 (мкг/мл)	MIC E.C. ATCC 29522 (+ 2 мкг/мл RIF) (мкг/мл)	MIC A.B. ATCC 19606 (мкг/мл)	MIC A.B. ATCC 19606 (+ 2 мкг/мл RIF) (мкг/мл)
A	0,25	2	≤0,06	>64	0,125

P.A. =Pseudomonas aeruginosa

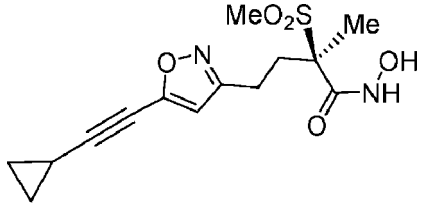
E.C.=Escherichia coli

A.B.=Acinetobacter baumannii

Специалисты в данной области техники увидят или смогут обнаружить с использованием только обычных экспериментов множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления и способов, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются объемом нижеследующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллическая форма соединения формулы (A):



(A)

2. Кристаллическая форма по п.1 с низкой гигроскопичностью.

3. Кристаллическая форма по п.1, которая содержит стержневидные кристаллы.

4. Кристаллическая форма по п.1, которая демонстрирует эндотерму при дифференциальной сканирующей калориметрии между 75 и 90°C.

5. Кристаллическая форма по п.1, отличающаяся пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 18,4 и 14,0°.

6. Кристаллическая форма по п.5, дополнительно отличающаяся одним или несколькими дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 3,9, и 2,5, и 4,4°.

7. Кристаллическая форма по любому из пп.5-6, дополнительно отличающаяся одним или несколькими дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 18,8, и/или 5,3°, и/или 21,8°, и/или

22,1°, и/или 18,0°.

8. Кристаллическая форма по любому из пп.5-7, дополнительно отличающаяся дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 18,8 и 5,3°.

9. Кристаллическая форма по п.8, дополнительно отличающаяся дополнительными пиками XRPD при углах дифракции (2 тета) 21,8 и 22,1°.

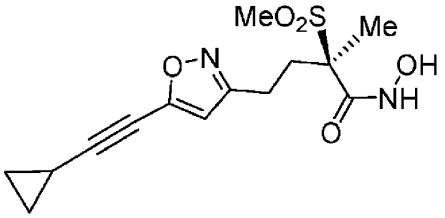
10. Фармацевтическая композиция, содержащая антибактериально эффективное количество кристаллической формы по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Фармацевтическая комбинация, содержащая антибактериально эффективное количество кристаллической формы по любому из пп.1-9, антибактериально эффективное количество второго терапевтического средства и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Фармацевтическая комбинация по п.11, в которой второе терапевтическое средство выбирают из группы, состоящей из ампициллина, пиперациллина, пенициллина G, тикарциллина, имипенема, меропенема, азитромицина, эритромицина, азтреонама, цефепима, цефотаксима, цефтриаксона, цефтазидима, ципрофлоксацина, левофлоксацина, клиндамицина, доксициклина, гентамицина, амикацина, тобрамицина, тетрациклина, тигециклина, рифампицина, ванкомицина и полимиксина.

13. Способ получения соединения (A) по любому из пп.1-9 из некристаллического соединения (A), включающий растворение некристаллического соединения (A) в галогенированном органическом растворителе с образованием раствора и приведение данного раствора в контакт с углеводородным растворителем для индуцирования осаждения кристаллического соединения (A).

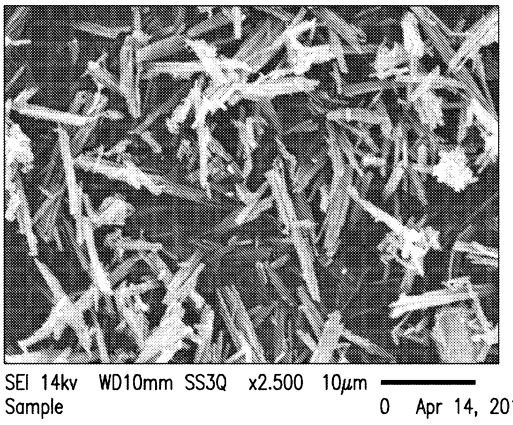
14. Кристаллическая форма соединения формулы (A)



(A)

которую получают с помощью способа по п.13.

15. Способ лечения субъекта с грамотрицательной бактериальной инфекцией, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту антибактериально эффективного количества кристаллической формы по любому из пп.1-9 или 14.



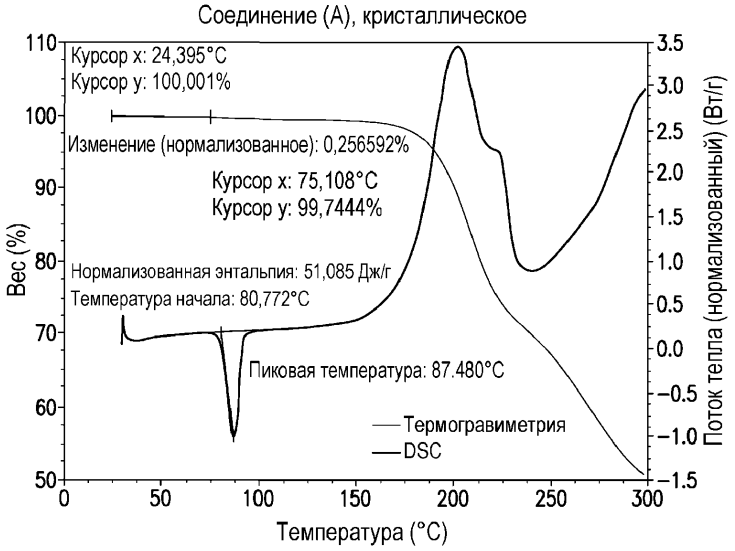
Изображение сканирующего электронного микроскопа кристаллического соединения (A)

Фиг. 1



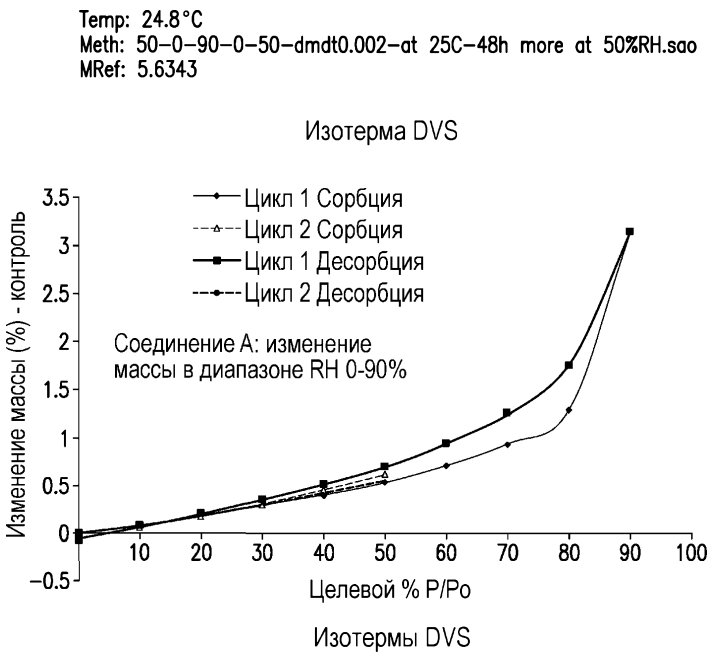
Спектр XRPD кристаллического соединения (A)

Фиг. 2



Термогравиметрический анализ и DSC кристаллического соединения (A)

Фиг. 3


Temp: 24.8°C
Meth: 50-0-90-0-50-dmdt0.002-at 25C-48h more at 50%RH.sao
MRef: 5.6343
Изотерма DVS
Цикл 1 Сорбция
Цикл 2 Сорбция
Цикл 1 Десорбция
Цикл 2 Десорбция
Соединение A: изменение массы в диапазоне RH 0-90%
Изменение массы (%) - контроль
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Целевой % P/Po
Изотермы DVS

Фиг. 4