



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107001343 B

(45) 授权公告日 2020.12.11

(21) 申请号 201580066092.6	(73) 专利权人 普尔莫赛德有限公司
(22) 申请日 2015.12.04	地址 英国伦敦
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107001343 A	(72) 发明人 须纳濂见广 T·C·科利 伊藤和浩 G·拉佩波特 P·斯特朗
(43) 申请公布日 2017.08.01	(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
(30) 优先权数据 14196662.2 2014.12.05 EP	代理人 胡晨曦 黄革生
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2017.06.05	(51) Int.Cl. C07D 405/06 (2006.01) C07D 295/155 (2006.01) A61K 31/496 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/GB2015/053731 2015.12.04	审查员 贾丹
(87) PCT国际申请的公布数据 W02016/087878 EN 2016.06.09	

权利要求书3页 说明书40页 附图2页

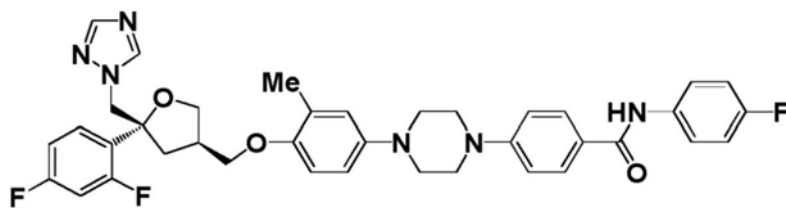
(54) 发明名称

抗真菌的化合物

(57) 摘要

本发明涉及可用于治疗真菌病的如说明书中所定义的化合物、包含其的组合物以及其在治疗中的用途。

1. 化合物, 即化合物(I)



化合物(I)

其是:

4- (4- (4- (((3R,5R)-5- ((1H-1,2,4-三唑-1-基) 甲基)-5- (2,4-二氟苯基) 四氢呋喃-3-基) 甲氧基)-3-甲基苯基) 哌嗪-1-基)-N- (4-氟苯基) 苯甲酰胺,

或其可药用盐。

2. 如权利要求1所述的化合物在制备用于治疗真菌病或用于预防或治疗与真菌病相关的疾病的药物中的用途。

3. 如权利要求2所述的用途, 其中所述真菌病是由曲霉属物种引起。

4. 如权利要求3所述的用途, 其中曲霉属物种是烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 或出芽曲霉 (*Aspergillus pullulans*)。

5. 如权利要求4所述的用途, 其中曲霉属物种是烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。

6. 如权利要求3所述的用途, 其中曲霉属物种是对唑类抗性的烟曲霉。

7. 如权利要求2所述的用途, 其中所述真菌病是由以下真菌引起: 假丝酵母属物种 (*Candida* spp.), 根霉属物种 (*Rhizopus* spp.), 隐球菌属物种 (*Cryptococcus* spp.), 毛壳菌属物种 (*Chaetomium* spp.), 青霉属物种 (*Penicillium* spp.), 或毛癣菌属物种 (*Trichophyton* spp.)。

8. 如权利要求7所述的用途, 其中假丝酵母属物种是白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 或光滑假丝酵母 (*Candida glabrata*), 根霉属物种是米根霉 (*Rhizopus oryzae*), 隐球菌属物种是新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*), 毛壳菌属物种是球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*), 青霉属物种是产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*), 以及毛癣菌属物种是红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)。

9. 如权利要求1所述的化合物与第二种或其它活性成分的组合在制备用于治疗真菌病或用于预防或治疗与真菌病相关的疾病的药物中的用途。

10. 药物组合物, 其包含如权利要求1所述的化合物和任选的一种或多种可药用稀释剂或载体。

11. 如权利要求10所述的药物组合物, 其包含第二种或其它活性成分。

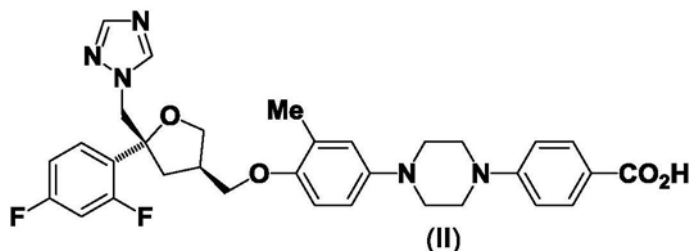
12. 如权利要求9所述的用途或如权利要求11所述的药物组合物, 其中第二种或其它活性成分选自抗真菌剂、两性霉素B、棘球白素和3-羟基-3-甲基-戊二酰基-CoA还原酶抑制剂。

13. 如权利要求12所述的用途或药物组合物, 其中抗真菌剂是伏立康唑或泊沙康唑, 棘球白素是卡泊芬净, 以及3-羟基-3-甲基-戊二酰基-CoA还原酶抑制剂是洛伐他汀、普伐他汀或氟伐他汀。

14. 如权利要求9所述的用途或如权利要求11所述的药物组合物, 其中第二种或其它活

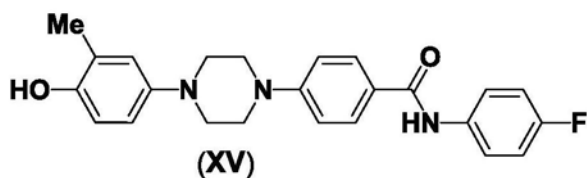
性成分选自克念菌素、非律平、哈霉素、纳他霉素、制霉菌素、龟裂霉素、联苯苄唑、布康唑、克霉唑、益康唑、芬替康唑、异康唑、酮康唑、鲁利康唑、咪康唑、奥莫康唑、奥昔康唑、舍他康唑、硫康唑、噻康唑、阿巴康唑、艾氟康唑、环氧菌唑、氟康唑、艾沙康唑、伊曲康唑、丙环唑、雷夫康唑、特康唑、阿巴芬净、阿莫罗芬、布替萘芬、萘替芬、特比萘芬、阿尼芬净、米卡芬净、苯甲酸、环吡酮、氟胞嘧啶、灰黄霉素、托萘酯和十一烯酸。

15. 式 (II) 化合物



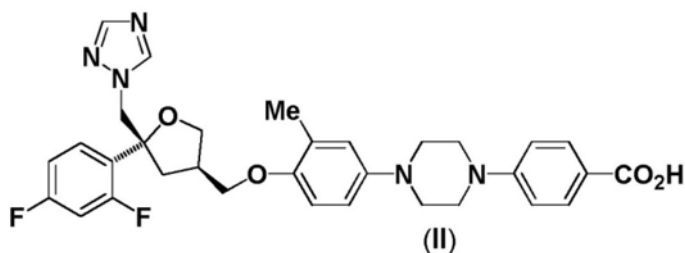
或其盐。

16. 式 (XV) 化合物:



或其盐。

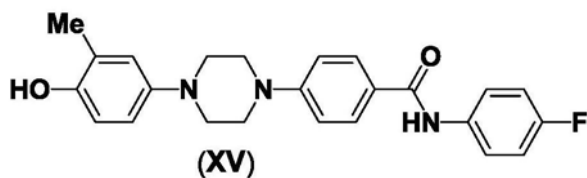
17. 制备如权利要求1所述化合物 (I) 或其盐的方法, 包括将式 (II) 化合物:



或其活化衍生物; 或其盐;

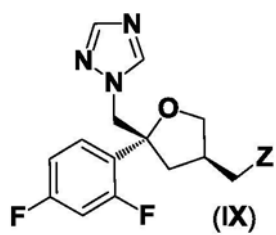
与4-氟苯胺或其盐反应。

18. 制备如权利要求1所述化合物 (I) 或其盐的方法, 包括将式 (XV) 化合物:



或其盐;

与式 (IX) 化合物或其盐反应:



其中：

Z代表离去基团。

抗真菌的化合物

发明领域

[0001] 本发明涉及可用于治疗真菌病的化合物,包含其的组合物及其在治疗中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 真菌感染的发病率在过去二十年中大幅增加,侵入性形式是发病率和死亡率的主要原因,特别是在免疫功能低下或免疫抑制患者中。传播性念珠菌病、肺曲霉菌病和新出现的机会性真菌是产生这些严重真菌病的最常见的因素。真菌的一种特殊特征是它们能够产生将其结合在一起的细胞外基质(ECM),并使得它们能够粘附于它们在体外或体内的底物上。这些生物膜用于保护其对抗宿主免疫系统的敌对环境并抵抗被抗菌剂杀死(Kaur和Singh,2013)。

[0004] 肺曲霉病可以分为那些患有非侵入性疾病的患者与患有侵入性疾病的患者。使用另外的亚分类来表征与未出现此类情况的患者相比的出现曲霉病的过敏症状(称为ABPA;过敏性支气管肺曲霉病)的患者。引发肺曲霉病的因素可能是急性的,例如接触高剂量的免疫抑制药物或重症监护室插管。或者,其可以是慢性的,例如以前感染结核病(Denning等人,2011a)。慢性肺部感染曲霉菌可使患者产生广泛而持续的肺损伤,需要用口服唑类药物终身治疗(Limper等人,2011)。

[0005] 越来越多的研究表明,曲霉菌感染可能在临床哮喘中发挥重要作用(Chishimba等人,2012;Pasqualotto等人,2009)。此外,最近出版的著作将曲霉菌感染与COPD患者中较差的临床结果相关联(Bafadhel等人,2013)。类似地,交叉部分研究已显示了在痰液中曲霉菌属物种(*Aspergillus* spp.)和假丝酵母属物种(*Candida* spp.)的存在与肺功能恶化之间的关联(Chotirmall等人,2010;Agbetile等人,2012)。

[0006] 侵入性曲霉病(IA)在免疫受损患者,例如接受同种异体干细胞移植或实体器官移植(如肺移植)的患者中表现出高死亡率。在免疫受损患者中报告的IA的第一例发生在1953年。这一事件与将皮质类固醇和细胞毒性化疗法引入治疗方案同时发生(Rankin,1953)。鉴于其高发病率和相关死亡率,侵入性曲霉病是在治疗白血病和其它血液恶性肿瘤中的主要顾虑。尽管口服三唑类药物(Salmeron等人,2012)有可用性,但同种异体造血干细胞移植受者中的死亡率通常也超过了50%(Lin等人,2001),长期死亡率可达90%。在进行实体器官移植(特别是肺)的患者中,使用高剂量的类固醇使患者易于感染(Thompson和Patterson,2008),这是一个严重的问题。这些疾病也出现在不太严重的免疫功能受损的患者群体中。这些患者包括患有COPD或硬化的患者、接受高剂量类固醇的患者和配有中央静脉导管或通过机械通气支持的个体(Dimopoulos等人,2012)。

[0007] 现有的抗真菌药物以口服或全身性给药为主。由于在感染部位达到的药物浓度倾向于低于在器官的浓度,所以这些通常使用的递送途径不足以治疗肺气道感染。对于肝脏而言尤其如此,这是一个毒性部位:高达15%的用伏立康唑治疗的患者出现转氨酶水平升高(Levin等人,2007;Lat和Thompson,2011)。肝脏接触也导致由肝P450酶的抑制所引起的显著的药物相互作用(Jeong,等人,2009;Wexler等人,2004)。

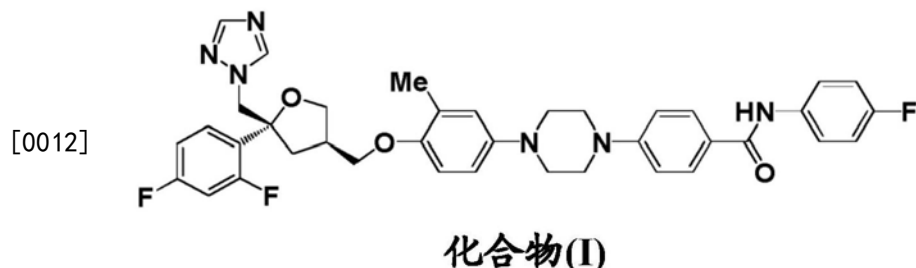
[0008] 此外,在诊所和农业中广泛使用三唑类导致了一些地方出现耐药性真菌病的增

长和问题发生 (Denning等人, 2011b; Bowyer和Denning, 2014)。

[0009] 显而易见地是, 对于提供具有改善的功效和更好的系统耐受性特征的新型抗真菌药物仍有急迫的医疗需求。

[0010] 发明概述

[0011] 第一方面, 本发明提供了化合物 (I)



[0013] 其是:

[0014] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-氟苯基)苯甲酰胺, 及其可药用盐 (下文有时称作“本发明化合物”)。

[0015] 下文公开的生物学数据揭示了本发明化合物 (化合物 (I)) 在体外试验中 是烟曲霉生长的有效抑制剂。在免疫抑制的小鼠中, 化合物 (I) 表现出对烟曲霉感染的强烈抑制作用。本文描述了化合物 (I) 的其它所需特性。

[0016] 附图简述

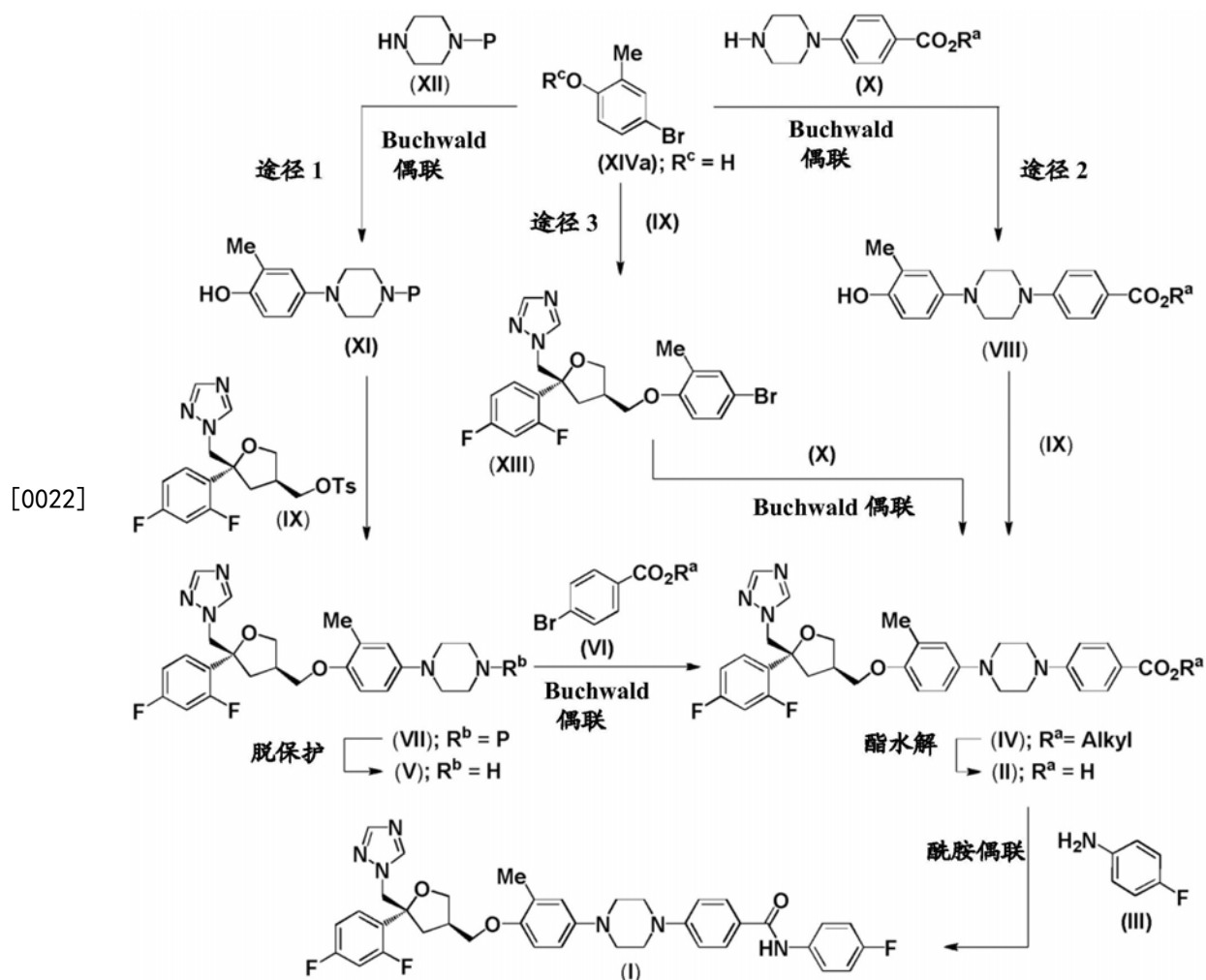
[0017] 图1显示了用化合物 (I) 进行的预防性和治疗性治疗对烟曲霉感染的免疫受损的嗜中性粒细胞减少症小鼠的肺中的CFU的效果。

[0018] 图2和图3分别显示了在烟曲霉感染的免疫受损的嗜中性粒细胞减少症小鼠中用化合物 (I) 进行的预防性和治疗性治疗对BALF和血清中半乳糖甘露聚糖浓度的效果。

[0019] 在图1-3中, 符号***是指显著性, $P < 0.001$ 。

[0020] 发明详述

[0021] 流程1: 经途径1-3制备化合物 (I)。



[0023] 已经开发了用于从市售的起始原料生成化合物 (I) 的三种可选的汇聚式合成途径, 如上所述 (流程1)。这些合成方法在制备式 (IV) 的高级苯甲酸酯中间体的方式上不同。

[0024] 途径1

[0025] 在通常用于这种反应的条件下, 适当保护的哌嗪衍生物 (XII) 与4-溴-2-甲基苯酚 (XIVa) 的Buchwald偶联提供单N-芳基化哌嗪 (XI)。用于这种转化的合适的氮保护基团是使用Boc基团 ($P = CO_2^tBu$) 作为氨基甲酸酯。本领域技术人员应当理解, 可以使用许多种条件来影响这种转换。具体而言, 钯催化剂和膦配体如RuPhos G3和RuPhos通常在碱的存在下使用, 例如碳酸铯或六甲基二硅烷基氨基锂。在碱性条件下, 使用甲苯磺酸酯 (IX) 将所得的酚 (XI) 进行烷基化产生醚 (VII)。甲苯磺酸酯 (IX) 是一种结构稳定的非挥发性 (固体) 试剂, 可从商业来源广泛获得, 具有高对映体纯度; 尽管其它亲电子衍生物如相应的甲磺酸酯以及卤代甲基 (例如氯甲基和溴甲基) 衍生物可被预期用作该转化的合适的替代物。除去氮保护基释放出单取代的哌嗪 (V)。在Boc衍生物 ($R^b = CO_2^tBu$) 的情况下, 胺脱保护步骤通常通过将氨基甲酸酯暴露于强无机酸或强有机酸如TFA, 在无溶剂条件下或在溶剂例如DCM的存在下进行。胺 (V) 与4-溴苯甲酸烷基酯 (VI) 的第二次 Buchwald偶联在碱性条件下和催化剂的作用下, 产生了N,N'-二芳基化产物 (IV), 其中 R^a 表示低级烷基, 例如 C_{1-5} 烷基, 例如甲基或乙基或叔丁基。

[0026] 途径2

[0027] 苯甲酸酯中间体 (IV) 可以在仅需要单一钯介导的偶联的替代方法中获得。在标准Buchwald偶联条件下, 溴酚 (XIVa) 与单N-芳基化哌嗪衍生物 [(X), R^a = 低级烷基, 例如 C_{1-5} 烷基, 例如甲基或乙基或叔丁基] 的反应生成1,4-二芳基哌嗪 (VIII)。如上所述, 该酚类产物与甲苯磺酸酯 (IX) 的O-烷基化提供了直接从市售的起始原料经两个步骤得到醚产物 (IV)。

[0028] 途径3

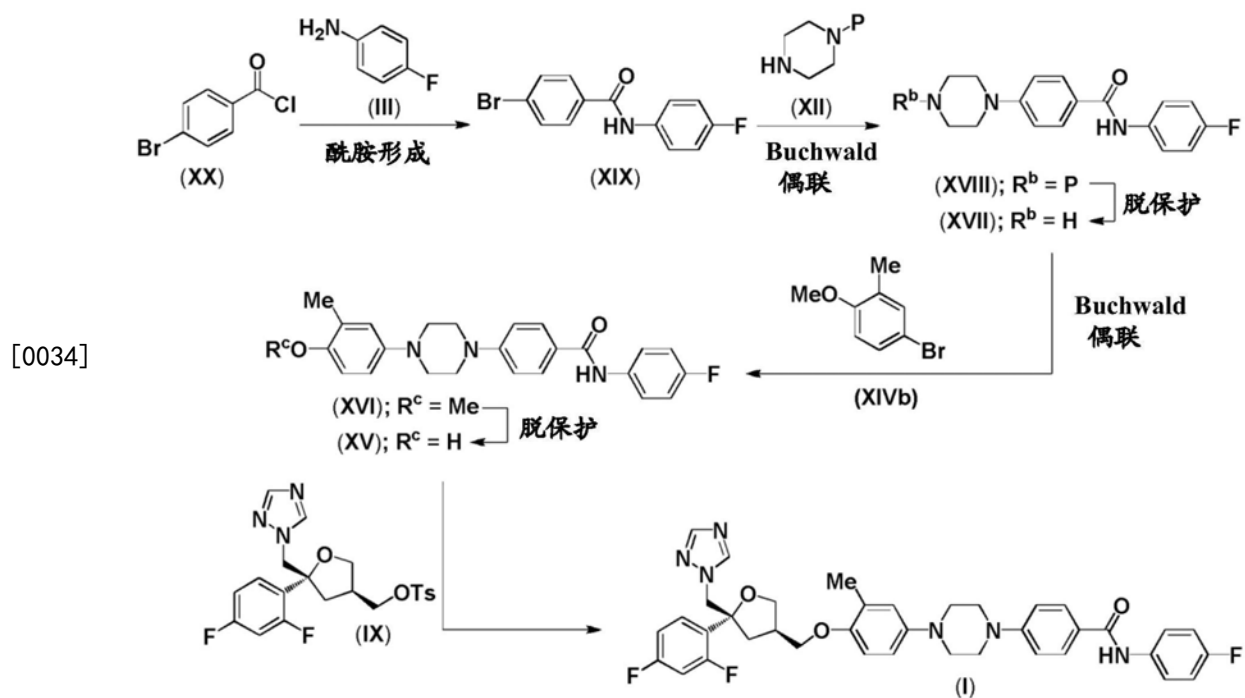
[0029] 从上述制备路径 (流程1) 可以看出, 在某些情况下, 有利的是以不同的顺序进行相同或相似的合成转化, 从而提高该方法的总体效率和/或从其所获的物质的质量。例如, 通过以相反的顺序进行上述两个步骤, 溴酚 (XIVa) 可以转化成式 (IV) 化合物。以这种方式, 用甲苯磺酸酯 (IX) 处理所述苯酚获得式 (XIII) 的醚衍生物。该芳基溴化物底物可以与式 (X) 的N-芳基哌嗪在如上所述的Buchwald偶联条件下反应, 得到式 (IV) 中间体,

[0030] 从中间体 (IV) 制备化合物 (I)

[0031] 在某些情况下, 例如其中 R^a 是甲基或乙基的那些, 通过在水存在下用碱处理酯 (IV) 可以方便地生成游离苯甲酸 (II)。通常的条件包括用碱金属氢氧化物如氢氧化锂在水和合适的水溶性溶剂的混合物中进行处理。在其它情况下, 如在叔丁酯的情况下, 在酸性条件下进行水解步骤可能是有利的。用于这种相互转化的常用试剂包括在水溶性有机溶剂如IPA的存在下的强无机酸, 例如盐酸。

[0032] 在本领域广泛使用的标准酰胺偶联条件下用4-氟苯胺处理苯甲酸产物 (II), 提供了本发明的化合物, 即化合物 (I)。例如, 反应可以通过在非亲核有机碱 (通常为DIPEA等) 存在下, 在极性非质子溶剂如DMF中将酸 (II) 和4-氟苯胺与偶联试剂HOBt和EDCI混合来进行。

[0033] 流程2: 通过途径4制备化合物 (I)



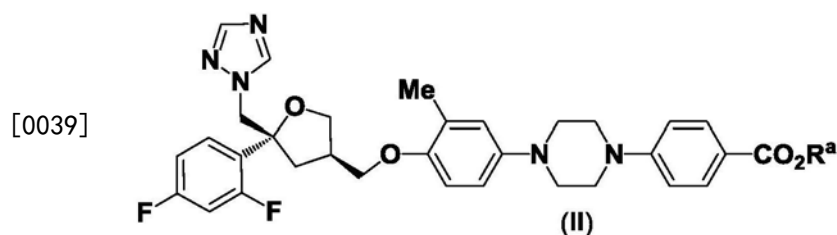
[0035] 途径4

[0036] 本发明的化合物还可以使用本文所述制备技术的另一种变通方案 (流程2) 来配

制。在该替代方法(途径4)中,酰胺键形成作为第一步进行,并且 醚连接的生成构成最后的合成转化。用4-氟苯胺(III)与4-溴苯甲酰氯(XX)的酰化得到苯甲酰胺片段(XIX)。如已经提到的,这样的酰胺产物可以直接使用多种活化剂(包括肽偶联试剂)由相应的胺和苯甲酸制备,其在本领域内具有广泛的选择。将芳基溴化物产物用合适的单保护哌嗪(XII)经Buchwald偶联条件在催化剂的作用下以所述方式进行反应,产生式(XVIII)的中间体。在Boc保护基团[P=CO₂^tBu]的情况下,通过短时间暴露于强酸可容易地获得所需的N-芳基哌嗪(XVII),例如通过用TFA处理,随后经减压蒸发将其从反应介质中方便地除去。然后分两步从与溴-苯甲醚(XIVb)的第二次Buchwald偶联得到甲基醚中间体[(XVI) R^c=Me],随后用三溴化硼进行O-脱烷基化,得到化合物(I)的酚类前体[(XV); R^c=H]。然后将苯酚(XV)通过前述方式用甲苯磺酸酯试剂(IX)重新烷基化而转化为化合物(I)。

[0037] 保护基团及其去除方式如“Protective Groups in Organic Synthesis”, Theodora W.Greene和Peter G.M.Wuts,由John Wiley&Sons Inc出版;第4版,2006,ISBN-10:0471697540中所述。关于制备酰胺的方法综述包含于:“Amide bond formation and peptide coupling”Montalbetti, C.A.G.N.和Falque, V.Tetrahedron,2005,61,10827-10852。

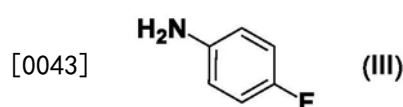
[0038] 因此,本发明还提供了制备化合物(I)或其可药用盐的方法,其包括将式(II)化合物:



[0040] 其中R^a代表氢;

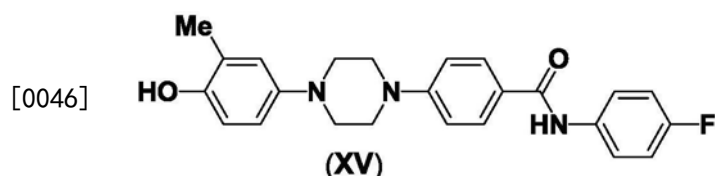
[0041] 或其活化衍生物(例如酰卤如酰氯或酸酐);或其盐;

[0042] 与式(III)化合物反应:



[0044] 或其盐。

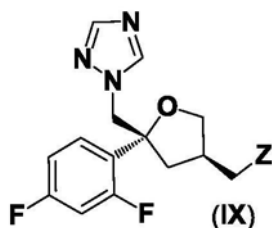
[0045] 本发明还提供了制备化合物(I)或其可药用盐的方法,其包括将式(XV)化合物:



[0047] 或其盐;

[0048] 与式(IX)化合物反应:

[0049]



[0050] 其中：

[0051] Z代表离去基团，例如对甲苯基SO₂O；

[0052] 或其盐。

[0053] 式(I)化合物的可药用盐特别包括所述化合物的可药用酸加成盐。式(I)化合物的可药用酸加成盐意图包括式(I)化合物能够形成的治疗活性无毒的酸加成盐。这些可药用酸加成盐可以方便地通过在合适的溶剂或溶剂混合物中用合适的酸处理游离碱形式来获得。合适的酸包括例如无机酸，例如氢卤酸，如盐酸或氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等；或有机酸，例如乙酸、丙酸、羟基乙酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、环拉酸、水杨酸、对氨基水杨酸、双羟萘酸等。

[0054] 相反，所述盐形式可以通过用合适的碱处理转化为游离碱形式。

[0055] 式(I)化合物的定义意图包括所述化合物的所有互变异构体。

[0056] 式(I)化合物的定义意图包括所述化合物的所有溶剂合物(包括所述化合物的盐的溶剂合物)，除非上下文另有具体说明。溶剂合物的实例包括水合物。

[0057] 本公开物的化合物包括其中指定的一个或多个原子是天然存在或非天然存在的同位素的实施方案。在一个实施方案中，同位素是稳定的同位素。因此，本公开物的化合物包括例如含氘化合物等。

[0058] 本公开物还延伸到本文定义的化合物的所有多晶型物。

[0059] 如本文所述式(II)、(IV)、(V)、(VII)、(VIII)、(XIII)和(XV)的新中间体及其盐，形成本发明另一方面。盐包括可药用盐(例如上述那些)和非可药用盐。酸(例如羧酸)的盐包括第一和第二族金属盐，包括钠、钾、镁和钙盐。

[0060] 在一个实施方案中，提供了包含任选与一种或多种可药用稀释剂或载体组合的本发明化合物的药物组合物。

[0061] 适当地，本发明的化合物经肺或鼻局部施用，特别是经肺局部施用。因此，在一个实施方案中，提供了包含任选与一种或多种局部可接受的稀释剂或载体组合的本发明化合物的药物组合物。

[0062] 用于肺或鼻内施用的合适的组合物包括粉末、液体溶液、液体悬浮液、包含溶液或悬浮液或加压或非加压气溶胶的滴鼻剂。

[0063] 该组合物可以方便地以单位剂型施用，并且可以通过制药领域众所周知的任何方法制备，例如如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985)中所述。该组合物还可以方便地以多个单位剂型施用。

[0064] 可以通过使用非加压制剂如水溶液或悬浮液来实现对鼻子或肺的局部给药。这样的制剂可以通过喷雾器例如可以手持和便携式或家庭或医院使用(即不便携式)。一种示例装置是RESPIMAT吸入器。该制剂可以包含赋形剂如水、缓冲剂、张力调节剂、pH调节

剂、粘度调节剂、表面活性剂和共溶剂(如乙醇)。混悬液和气溶胶制剂(无论是加压还是未加压)通常以精细粉碎形式包含本发明的化合物,例如用0.5-10 μ m的D₅₀,例如约1-5 μ m。可以使用D₁₀、D₅₀和D₉₀值来表示粒度分布。颗粒尺寸分布的D₅₀中值被定义为将分布分成两半的微米粒度。从激光衍射得到的检测结果更准确地描述为体积分布,并因此使用该方法获得的D₅₀值更有意义地称为D_{v50}值(体积分布的中值)。如本文所用,D_v值是指使用激光衍射检测的粒度分布。类似地,在激光衍射背景下使用的D₁₀和D₉₀值被认为是指D_{v10}和D_{v90}值,并且分别是指分布的10%低于D₁₀值的粒径,并且90%的分布低于D₉₀值。

[0065] 根据本发明的一个具体方面,提供了包含悬浮在水性介质中的颗粒形式的本发明化合物的药物组合物。水性介质通常包含水和一种或多种选自缓冲剂、张力调节剂、pH调节剂、粘度调节剂和表面活性剂的赋形剂。

[0066] 也可以通过使用气溶胶制剂来实现对鼻子或肺的局部给药。气溶胶制剂通常包含悬浮或溶解在合适的气溶胶推进剂如氯氟烃(CFC)或氢氟烃(HFC)中的活性成分。合适的CFC推进剂包括三氯一氟甲烷(推进剂11)、二氯四氟甲烷(推进剂114)和二氯二氟甲烷(推进剂12)。合适的HFC推进剂包括四氟乙烷(HFC-134a)和七氟丙烷(HFC-227)。推进剂通常包含40%-99.5%例如40%-90%总吸入组合物重量。该制剂可以包含赋形剂,包括共溶剂(例如乙醇)和表面活性剂(例如卵磷脂、脱水山梨糖醇三油酸酯等)。其它可能的赋形剂包括聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、甘油等。气溶胶制剂包装在罐中,并且通过计量阀(例如由Bespak、Valois或3M提供,或者由Aptar、Coster或Vari提供)提供合适的剂量。

[0067] 也可以通过使用干粉制剂来实现对肺的局部施用。干粉制剂将以细碎形式包含本公开物的化合物,通常具有1-10 μ m的MMD或0.5-10 μ m的D₅₀,例如约1-5 μ m。细碎形式的本发明化合物的粉末可以通过微粉化方法或类似的尺寸减小方法制备。微粉化可以使用诸如由Hosokawa Alpine制造的喷射磨机进行。可以使用激光衍射(例如使用Malvern Mastersizer 2000S仪器)检测所得的粒度分布。该制剂通常含有局部可接受的稀释剂,例如乳糖、葡萄糖或甘露醇(优选乳糖),通常具有比较大的粒度,例如50 μ m或以上的MMD,例如100 μ m或以上或者D₅₀为40-150 μ m。如本文所用,术语“乳糖”是指含乳糖的组分,包括 α -乳糖一水合物、 β -乳糖一水合物、无水 α -乳糖、无水 β -乳糖和无定形乳糖。可以通过微粉化,筛分,研磨,压缩,附聚或喷雾干燥来处理乳糖成分。还包括各种形式的市售形式的乳糖,例如**Lactohale**[®](吸入级乳糖;DFE Pharma)、**InhaLac**[®]70(干粉吸入器的筛分乳糖;Meggle)、**Pharmatose**[®](DFE Pharma)和**Respitose**[®](筛选吸入级乳糖;DFE Pharma)产品。在一个实施方案中,乳糖组分选自 α -乳糖一水合物、无水 α -乳糖和无定形乳糖。优选地,乳糖是 α -乳糖一水合物。

[0068] 干粉制剂还可以含有其它赋形剂,例如硬脂酸钠、硬脂酸钙或硬脂酸镁。

[0069] 干粉制剂通常使用干粉吸入器(DPI)装置递送。干粉递送系统的实例包括SPINHALER、DISKHALER、TURBOHALER、DISKUS、SKYEHALER、ACCUHALER和CLICKHALER。干粉递送系统的其它实例包括ECLIPSE、NEXT、ROTAHALER、HANDIHALER、AEROLISER、CYCLOHALER、BREEZHALER/NEOHALER、MONODOSE、FLOWCAPS、TWINCAPS、X-CAPS、TURBOSPIN、ELPENHALER、MIATHALER、TWISTHALER、NOVOLIZER、PRESSAIR、ELLIPTA、ORIEL干粉吸入器、MICRODOSE、PULVINAL、EASYHALER、ULTRAHALER、TAIFUN、PULMOJET、OMNIHALER、GYROHALER、TAPER、CONIX、XCELOVAIR和PROHALER。

[0070] 本发明的化合物也可以局部施用于另一种内部或外部表面(例如粘膜 表面或皮肤)或口服施用。本发明的化合物可以常规配制用于这种给药途 径。

[0071] 本发明的化合物可用于治疗真菌病和预防或治疗与真菌病相关的疾 病。

[0072] 在本发明的一个方面,提供了本发明化合物在制备用于治疗真菌病和 用于预防或治疗与真菌病相关的疾病的药物中的用途。

[0073] 在本发明的另一方面,提供了治疗患有真菌病的个体的方法,其包括 向所述个体施用有效量的本发明化合物。

[0074] 在本发明的另一方面,提供了预防或治疗个体中与真菌病相关的疾病 的方法,其包括向所述个体施用有效量的本发明化合物。

[0075] 具体而言,真菌病可以由曲霉属物种(*Aspergillus* spp.)引起,例如烟曲 霉(*Aspergillus fumigatus*)或出芽曲霉(*Aspergillus pullulans*),尤其是烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)。真菌病还可由假丝酵母属物种(*Candida* spp.),例 如白色假丝酵母(*Candida albicans*)或光滑假丝酵母(*Candida glabrata*),根 霉属物种(*Rhizopus* spp.),例如米根霉(*Rhizopus oryzae*),隐球菌属物种 (*Cryptococcus* spp.),如新生隐球 菌(*Cryptococcus neoformans*),毛壳菌属物 种(*Chaetomium* spp.),如球毛壳菌(*Chaetomium globosum*),青霉属物种 (*Penicillium* spp.),如产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*),以及毛癣菌属物 种(*Trichophyton* spp.),如红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)引起。

[0076] 与真菌病有关的疾病是例如肺曲霉病。

[0077] 本发明的化合物可以在预防性治疗中通过在发生真菌病之前施用所述 化合物来使用。

[0078] 个体包括人类和动物个体,特别是人类个体。

[0079] 本发明的化合物特别可用于治疗真菌病如烟曲霉菌感染,并且用于预 防或治疗与危险个体中例如烟曲霉感染等真菌病相关的疾病。危险个体包 括早产儿、肺或心脏先天性缺陷的儿童、免疫受损的个体(例如患有HIV 感染的个体)、哮喘患者、囊性纤维化个体、老年个体和患有影响心脏或肺 的慢性健康病症的个体(例如充血性心力衰竭或慢性阻塞性肺病)。

[0080] 本发明的化合物还可用于治疗对唑类有抗性的真菌病,例如唑类抗性 的烟曲霉感染,特别是与泊沙康唑组合。

[0081] 本发明的化合物可以与第二种或其它活性成分组合施用。第二种或其 它活性成分可以例如选自其它抗真菌剂(如伏立康唑或泊沙康唑)、两性霉 素B、棘球白素(例如卡泊芬净)和3-羟基-3-甲基-戊二酰基-CoA还原酶抑 制剂(如洛伐他汀、普伐他汀或氟伐他汀)。

[0082] 第二种或其它活性成分包括适用于治疗或预防真菌病例如烟曲霉感 染、或与真菌病例如烟曲霉菌感染相关的疾病、或与真菌病如烟曲霉菌感 染并发的病症的活性成分。

[0083] 本发明的化合物可以与第二种或其它活性成分共同配制,或者第二种 或其它活性成分可以配制成通过相同或不同的途径分开施用。

[0084] 例如,本发明的化合物可以向已经用抗真菌剂如伏立康唑或泊沙康唑 进行全身治疗的患者施用。

[0085] 例如,本发明的化合物可以与选自两性霉素B、棘球白素(如卡泊芬净)和3-羟基-3-甲基-戊二酰CoA还原酶抑制剂(如洛伐他汀、普伐他汀或氟伐他汀)的一种或多种药物共同施用,例如共同配制。

[0086] 本发明的化合物可以替代地(或另外)与一种或多种选自以下的药物共同施用,例如共同配制:克念菌素、非律平、哈霉素、纳他霉素、制霉菌素、龟裂霉素、联苯苄唑、布康唑、克霉唑、益康唑、芬替康唑、异康唑、酮康唑、鲁利康唑、咪康唑、奥莫康唑、奥昔康唑、舍他康唑、硫康唑、噻康唑、阿巴康唑(albaconazole)、艾氟康唑(efinaconazole)、环氧菌唑(epoxiconazole)、氟康唑、艾沙康唑(isavuconazole)、伊曲康唑、丙环唑、雷夫康唑、特康唑、阿巴芬净(abafungin)、阿莫罗芬、布替萘芬、萘替芬、特比萘芬、阿尼芬净、米卡芬净、苯甲酸、环吡酮、氟胞嘧啶(5-氟胞嘧啶)、灰黄霉素、托萘酯和十一烯酸。

[0087] 优选的组合伙伴包括伊曲康唑、伏立康唑、卡泊芬净和泊沙康唑。

[0088] 根据本发明的一个方面,提供了药盒,包括:(a)包含本发明化合物和任选的一种或多种稀释剂或载体的药物组合物;(b)包含第二活性成分和任选的一种或多种稀释剂或载体的药物组合物;(c)任选的一种或多种其它药物组合物,其各自包含第三种或其它活性成分和任选的一种或多种稀释剂或载体;以及(d)将所述药物组合物向有需要的个体施用的说明书。所述有需要的个体可能患有或易感真菌病,如烟曲霉菌感染。

[0089] 本发明的化合物可以以合适的间隔施用,例如每天一次、每天两次、每天三次或每天四次。

[0090] 预期平均体重(50-70kg)的人的合适剂量为约50 μ g至10mg/天,例如500 μ g至5mg/天,但所施用的精确剂量可由技术人员确定。

[0091] 预期本发明的化合物具有以下的一个或多个有利属性:

[0092] • 有效的抗真菌活性,特别是针对曲霉菌例如烟曲霉的活性,或针对以下真菌的活性:假丝酵母属物种,例如白色假丝酵母或光滑假丝酵母,根霉菌属物种,例如米根霉,隐球菌属物种,例如新型隐球菌,毛壳菌属物种,例如球毛壳菌,青霉属物种,例如产黄青霉,或毛癣菌属物种,例如红色毛癣菌,特别是在向肺或鼻局部给药后;

[0093] • 长时间的肺部作用,优选按照每日一次给药;

[0094] • 肺或鼻局部施用后的全身接触量低;且

[0095] • 可接受的安全性,特别是向肺或鼻局部给药后。

[0096] 试验部分

[0097] 本文使用的缩写定义如下(表1)。任何未定义的缩写旨在表达其普遍接受的含义。

[0098] 表1:缩写

[0099]

ABPA	变应性支气管肺曲霉菌病
aq	含水的
ATCC	美国标准培养物保藏中心
BALF	支气管肺泡灌洗液
BEAS2B	SV40-永生化人支气管上皮细胞系
Boc	叔丁氧基羰基
br	宽
BSA	牛血清白蛋白
CC₅₀	50%细胞毒性浓度
CFU	菌落形成单位
CLSI	临床和实验室标准研究所
COI	截留指数
conc	浓度/浓的
d	二重峰
DCM	二氯甲烷
DFB₅₀	达到对照 50%的真菌负载的天数
DIPEA	<i>N,N</i> -二异丙基乙胺
DMAP	4-二甲基氨基吡啶
DMEM	达尔贝克改良的伊格尔培养基
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
DSS	葡聚糖硫酸钠
EBM	内皮基底介质
ECM	细胞外基质
EDCI.HCl	<i>N</i> -(3-二甲基氨基丙基)- <i>N'</i> -乙基碳二亚胺盐酸化物

[0100]

EGM2	内皮细胞生长培养基 2
EUCAST	欧洲抗菌药物敏感性测试委员会
(ES⁺)	电喷雾电离, 阳离子模式
Et	乙基
Et₃N	三乙胺
EtOAc	乙酸乙酯
FBS	胎牛血清
GM	半乳甘露聚糖
HPAEC	人肺动脉内皮细胞
HOBt.H₂O	1-羟基苯并三唑单水合物
HPLC	反相高效液相色谱
hr	小时
IA	侵入性曲霉病
i.n.	鼻内
IPA	2-丙醇
i.t.	气管内
LC-MS	液相色谱-质谱
Li Hep	锂肝素
LiHMDS	双(三甲基甲硅烷基)氨基锂
m	多重峰
(M+H)⁺	质子化的分子离子
MDA	丙二醛
Me	甲基
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
MHz	兆赫
MIC₅₀	50%的最小抑菌浓度
MIC₇₅	75%的最小抑菌浓度

[0101]

MIC₉₀	90%的最小抑菌浓度
min	分钟
MMD	质量中位直径
MOI	多重感染
MOPS	3-(N-吗啉代)丙磺酸
m/z:	质荷比
NCPF	国家病原真菌保藏中心
NMR	核磁共振(光谱学)
NT	未测出
OD	光密度
PBS	磷酸盐缓冲盐水
P	保护基团
q	四重峰
RT	室温
RP HPLC	反相高效液相色谱
RPMI	Roswell Park 纪念研究所培养基
RuPhos	2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基联苯基
RuPhosG3	(2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基联苯基)[2-(2'-氨基-1,1'-联苯基)]钌(II)甲磺酸盐
s	单峰
sat	饱和
sc	皮下
SDS	十二烷基硫酸钠
t	三重峰
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃
TR34/L98H	烟曲霉菌株, 其包含在密码子 98 处的亮氨酸到组氨酸的替代以及 34-bp 串联重复

[0102] 通用方法

[0103] 所有的原料和溶剂都是从商业来源获得或根据文献引用制备。除非另有说明, 否

则所有反应都被搅拌。有机溶液按照常规用无水硫酸镁干燥。

[0104] 分析方法

[0105] 反相HPLC方法:

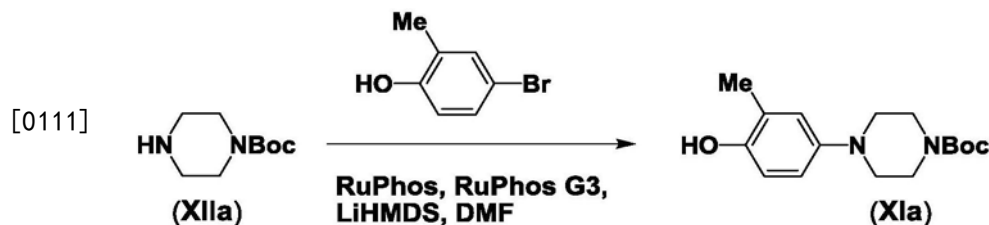
[0106] Waters Xselect CSH C18 XP柱, 2.5 μ m (4.6x30mm), 40 $^{\circ}$ C; 流速 2.5-4.5 mL min⁻¹, 用H₂O-MeCN(包含0.1% v/v甲酸(方法a)或10mM NH₄HCO₃的水溶液(方法b))梯度洗脱, 历经4min, 用UV在254nm检测。梯度信息: 0-3.00min, 从95% H₂O-5% MeCN向5% H₂O-95% MeCN 倾斜; 3.00-3.01min, 保持在5% H₂O-95% MeCN, 流速升至4.5 mL min⁻¹; 3.01-3.50min, 保持在5% H₂O-95% MeCN; 3.50-3.60min, 恢复至95% H₂O-5% MeCN, 流速减至3.50 mL min⁻¹; 3.60-3.90min, 保持在95% H₂O-5% MeCN; 3.90-4.00min, 保持在95% H₂O-5% MeCN, 流速减至2.5 mL min⁻¹。

[0107] ¹H NMR光谱法:

[0108] ¹H NMR谱图获自Bruker Advance III光谱仪, 在400MHz用残余未氘化溶剂作为参考, 除非另有说明, 在DMSO-d₆中进行。

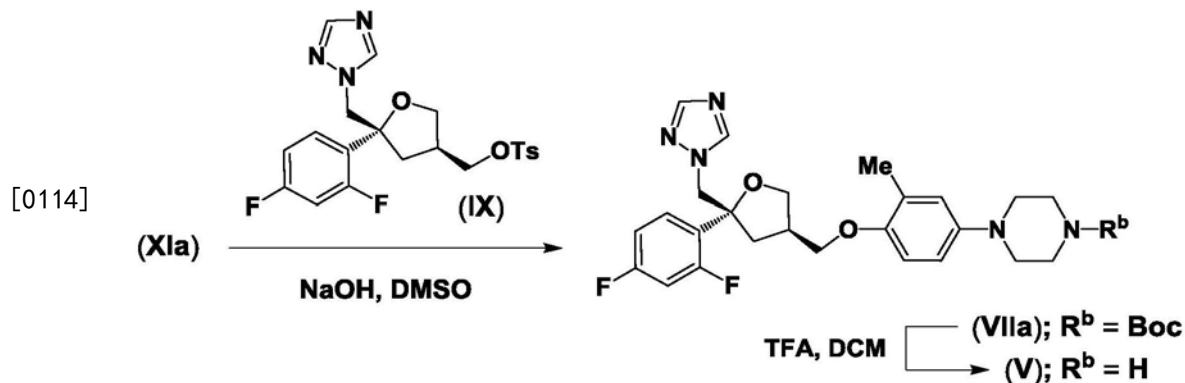
[0109] 制备化合物(I)的合成方法

[0110] 4-(4-羟基-3-甲基苯基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯



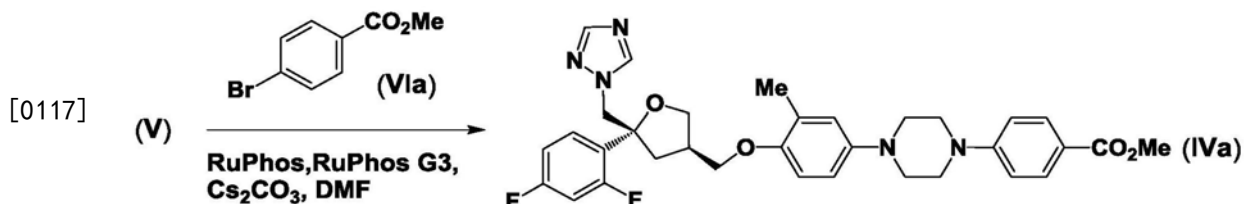
[0112] 将装有哌嗪-1-甲酸叔丁酯(XIIa) (7.44g, 40.0mmol)、4-溴-2-甲基苯酚 (6.23g, 33.3mmol)、RuPhos (311mg, 0.67mmol) 和RuPhos G3 (557mg, 0.67mmol) 的烧瓶抽真空, 并回充氮气三次。加入LiHMDS溶液(1M的 THF溶液, 100mL, 100mmol), 并将反应混合物在70 $^{\circ}$ C加热3小时。冷却至室温后, 将该混合物通过加入1M的盐酸(100mL)猝灭, 并随后用1M的NaHCO₃水溶液(100mL)中和。将水层用EtOAc萃取(3x100mL), 并将合并的有机萃取物干燥。真空除去挥发物, 得到粗产物, 将其经快速柱色谱(SiO₂, 120g, 0-100% EtOAc在异己烷中的溶液, 梯度洗脱), 得到标题化合物, 中间体(XIa), 为浅褐色固体(7.80g, 78%); R_t 2.07min(方法 b); m/z 293 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ : 1.41 (9H, s), 2.07 (3H, s), 2.86-2.88 (4H, m), 3.41-3.43 (4H, m), 6.58-6.65 (2H, m), 6.71 (1H, d) 和8.72 (1H, s)。

[0113] 1-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪



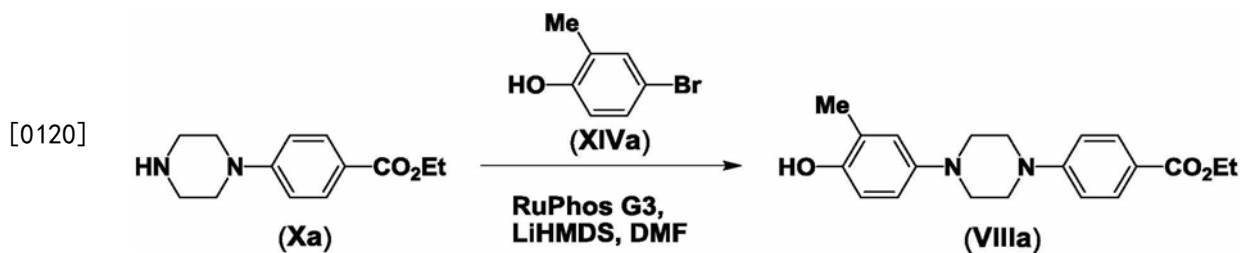
[0115] 向中间体 (XIa) (7.80g, 25.1mmol) 在 DMSO (60mL) 的溶液中加入氢氧化钠水溶液 (3.0mL, 12.5M, 37.6mmol)。将该混合物在 RT 下搅拌 10 分钟, 并随后用 ((3S,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-3-基)甲基 4-甲基苯磺酸酯 (IX) (ex APIChem, 目录号: AC-8330, 12.4g, 27.6mmol) 分批进行处理。将反应混合物在 30℃ 搅拌 18 小时, 冷却至 RT, 并加入水 (200mL)。将所得混合物用 EtOAc 萃取 (3x200mL), 并将合并的有机萃取物用盐水洗涤 (2x200mL), 然后干燥, 并真空蒸发, 得到褐色油状物。将粗的 Boc-保护的产物 (VIIa) 经 ^1H NMR 分析显示其包含 ~10% 的烯烃: (R)-1-((2-(2,4-二氟苯基)-4-亚甲基四氢呋喃-2-基)甲基)-1H-1,2,4-三唑, 其作为消除反应副产物形成。将粗的乌拉坦 (VIIa) 溶于 DCM (150mL) 中, 并用 TFA (39.0mL, 502mmol) 处理。RT 下 2 小时后, 将反应混合物真空浓缩以除去大部分挥发物, 并随后用 EtOAc (200mL) 稀释, 并用 NaOH 水溶液 (2M, 200mL) 洗涤。分离水相, 并用 EtOAc 萃取 (2x200mL)。将合并的有机萃取物用盐水洗涤 (2x200mL), 然后干燥并真空蒸发, 得到浅褐色油状物。将该粗产物经快速柱色谱纯化 (SiO_2 , 80g, 0-10% 0.7M NH_3/MeOH 在 DCM 中的溶液, 梯度洗脱), 得到标题化合物, 中间体 (V), 为粘稠状浅褐色油状物 (9.46g, 80%); R^t 1.91min (方法 b); m/z 470 ($\text{M}+\text{H}^+$) (ES^+); ^1H NMR δ : 2.07 (3H, s), 2.15 (1H, dd), 2.36-2.42 (1H, m), 2.52-2.56 (1H, m), 2.79-2.81 (4H, m), 2.87-2.90 (4H, m), 3.66 (1H, dd), 3.73-3.77 (2H, m), 4.04 (1H, t), 4.57 (2H, dd), 6.64 (1H, dd), 6.70-6.75 (2H, m), 6.99 (1H, td), 7.25-7.34 (2H, m), 7.76 (1H, s) 和 8.34 (1H, s)。

[0116] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸甲酯



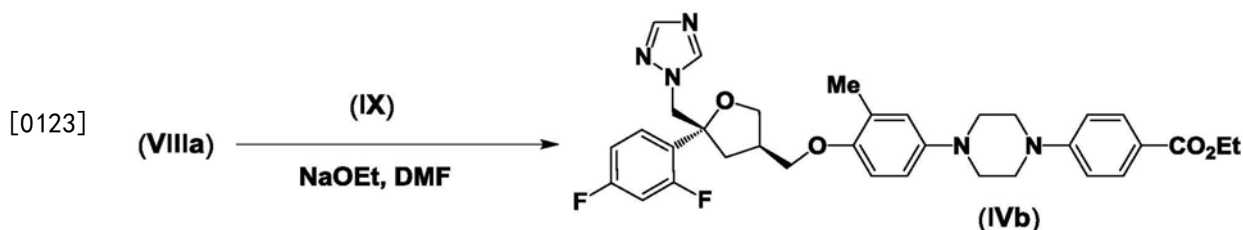
[0118] 将装有中间体 (V) (9.00g, 19.2mmol)、4-溴苯甲酸甲酯 (VIa) (4.95g, 23.0mmol)、RuPhos (0.18g, 0.38mmol, 2mol%)、RuPhosG3 (0.32g, 0.38mmol, 2mol%) 和碳酸铯 (9.99g, 30.7mmol) 的烧瓶抽真空和回充氮气三次, 然后加入 DMF (150mL)。将该混合物在 80℃ 加热 22 小时, 然后, 虽然还很热, 将其倒入水 (150mL) 中, 以形成褐色胶质。加入更多的水 (300mL), 并将水相用 DCM 萃取 (2x200mL)。将有机萃取物合并, 并真空浓缩, 得到褐色油状物, 将其倒入水 (100mL) 中。经过滤收集所得沉淀, 并随后再次悬浮于 THF (100mL) 中。将该混合物在回流下加热 1 小时, 期间形成乳状混悬液。将该混合物冷却至 RT, 并将所得沉淀经过滤收集, 用 THF 洗涤 (2x50mL), 并随后真空干燥, 得到标题化合物, 中间体 (IVa), 为浅黄色固体 (9.48g, 79%); R^t 2.79min (方法 b); m/z 604 ($\text{M}+\text{H}^+$) (ES^+); ^1H NMR δ : 2.09 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.43 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.11-3.14 (4H, m), 3.43-3.46 (4H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.79 (5H, s 与 m 重叠), 4.05 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 6.75 (2H, br s), 6.85 (1H, br d), 7.00 (1H, td), 7.04 (2H, d), 7.25-7.34 (2H, m), 7.76 (1H, s), 7.81 (2H, d) 和 8.34 (1H, s)。

[0119] 4-(4-(4-羟基-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸乙酯



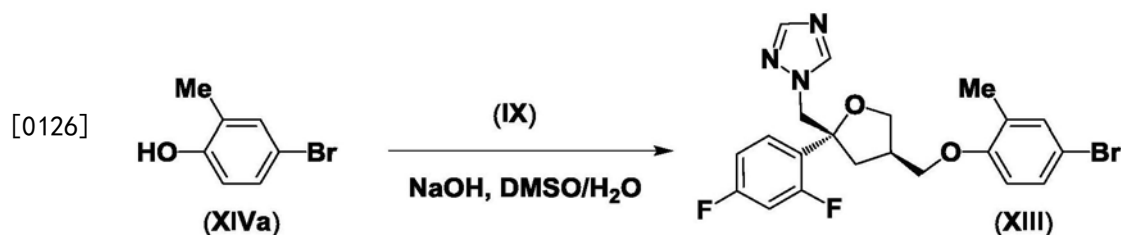
[0121] 将装有4-(哌嗪-1-基) 苯甲酸乙酯 (Xa) (20.0g, 85.0mmol) 和4-溴-2-甲基 苯酚 (19.2g, 102mmol) 在DMF (213mL) 中的溶液的烧瓶抽真空, 并回充氮 气三次。加入RuPhos G3 (1.43g, 1.71mmol), 并将该烧瓶抽真空, 并回充 氮气。将反应混合物冷却至0℃, 并加入 LiHMDS (17.1g, 102mmol)。将 反应物在RT搅拌10分钟, 然后在水浴中冷却, 并以5分钟间隔 以等量部 分 (7x2.85g) 加入LiHMDS (20.0g, 120mmol)。将所得溶液在RT下搅拌 30分钟, 并 随后冷却至0℃, 用2M盐酸 (200mL) 处理, 得到pH 6-7。将 该混合物在RT搅拌15分钟, 然后用 EtOAc (220mL) 萃取。分离水层, 并 用EtOAc萃取 (4x50mL), 并将合并的有机物用盐水洗涤 (6x50mL), 然 后干燥并真空蒸发, 得到乳状固体。加入异己烷和IPA混合物 (1:1, 150 mL), 并将该混悬液在RT搅拌30分钟。经过滤收集固体, 并在RT搅拌 30分钟。经过滤收集固体, 将 滤饼用异己烷和IPA混合物 (1:1, 2x10mL) 洗涤, 然后用异己烷洗涤 (4x10mL), 并在40℃真 空干燥18小时, 得到 标题化合物, 中间体 (VIIIa), 为乳状固体 (15.3g, 50%); R^t 2.29min (方法 b); m/z 341 (M+H)⁺ (ES⁺); 1H NMR δ : 1.29 (3H, t), 2.09 (3H, s), 3.06-3.09 (4H, m), 3.42-3.44 (4H, m), 4.24 (2H, dd), 6.66 (2H, br s), 6.76 (1H, br s), 7.03 (2H, d), 7.80 (2H, d), 8.72 (1H, s)。

[0122] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢吡喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸乙酯



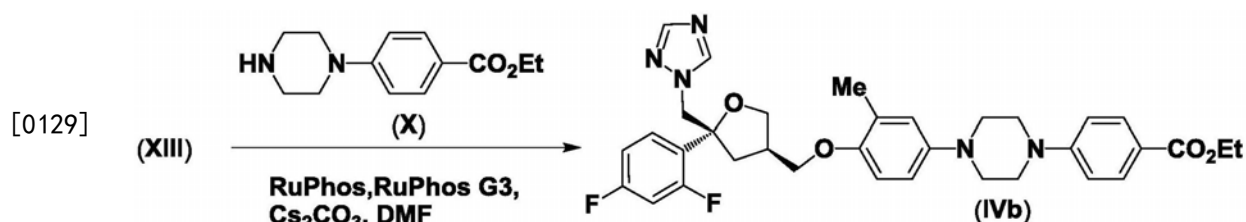
[0124] 向冷却至0℃的中间体(VIIIa)(15.3g,44.9mmol)在DMF(110mL)的溶液中加入乙醇钠(3.13g,46.1mmol),并将该混合物在0℃搅拌10分钟,然后用甲苯磺酸酯(IX)(20.2g,44.9mmol)处理。将反应混合物加温至RT,加热至50℃持续1小时,然后冷却至RT。加入盐酸(1M,60mL)和水(200 mL),并将该混合物在RT搅拌30分钟,然后用DCM(150mL)萃取。分离水层,并用DCM萃取(2x50mL),将合并的有机物用盐水洗涤(4x30 mL),随后干燥并真空蒸发,得到乳状固体。将该固体悬浮于等量的异己烷和IPA混合物(80mL)中,并在RT下搅拌1小时。将该固体经过滤收集,用异己烷和IPA 1:1混合物(3x20mL)洗涤,然后在40℃真空干燥18小时,得到标题化合物,中间体(IVb),为白色固体(16.4g,56%); R^t 2.92min (方法b); m/z 618 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ : 1.29 (3H, t), 2.10 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.42 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.12-3.14 (4H, m), 3.43-3.46 (4H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.79 (2H, m), 4.05 (1H, dd), 4.24 (2H, dd), 4.58 (2H, dd), 6.76 (2H, br s), 6.86 (1H, br s), 6.98-7.05 (3H, m), 7.26-7.34 (2H, m), 7.77 (1H, s), 7.81 (2H, d), 8.34 (1H, s)。

[0125] 1-(((2R,4R)-4-((4-溴-2-甲基苯氧基)甲基)-2-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-2-基)甲基)-1H-1,2,4-三唑



[0127] 向4-溴-2-甲基苯酚(920mg, 4.89mmol)在DMSO(10mL)的溶液中加入 氢氧化钠水溶液(0.39mL, 12.5M, 4.89mmol), 并将该混合物在RT下搅拌 10分钟, 并随后用甲苯磺酸酯(IX)(2.00g, 4.45mmol)处理。将反应混合物 在60℃搅拌72小时, 然后冷却至RT, 并在水(25mL)和EtOAc(20mL) 之间分配。分离并保存有机相, 将水层用EtOAc萃取(3x25mL)。将合并 的有机萃取物用盐水洗涤(3x15mL), 然后干燥并真空蒸发。将粗产物经 快速柱色谱纯化(SiO₂, 12g, 0-30%EtOAc在DCM中的溶液, 梯度洗脱), 得到标题化合物, 中间体(XIII), 为无色油状物(1.84g, 86%); R^t 2.78min (方法a); m/z 464 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMRδ: 2.09 (3H, s), 2.17 (1H, dd), 2.37-2.43 (1H, m), 2.52-2.60 (1H, m), 3.72-3.78 (2H, m), 3.82 (1H, dd), 4.00-4.06 (1H, m), 4.57 (2H, dd), 6.82 (1H, d), 7.00 (1H, td), 7.25-7.34 (4H, m), 7.76 (1H, s), 8.34 (1H, s)。

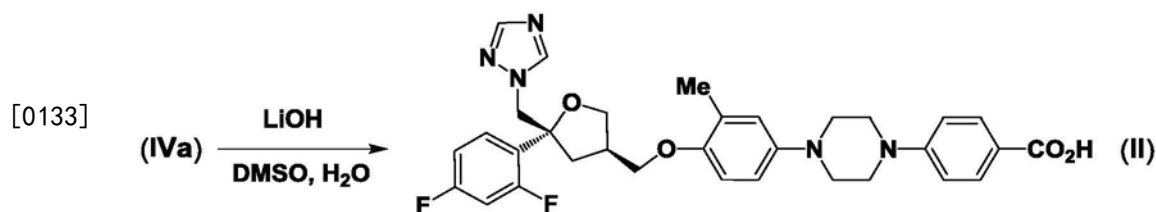
[0128] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸乙酯



[0130] 将装有4-(哌嗪-1-基)苯甲酸乙酯(X)(103mg, 0.44mmol)、中间体(XIII)(170mg, 0.37mmol)、RuPhos(8.5mg, 18μmol)、RuPhos G3(14.2mg, 18 μmol)和碳酸铯(191mg, 0.59mmol)的瓶抽真空, 并回充氮气三次, 然后加入DMF(3.0mL)。将该混合物在80℃加热18小时, 然后在100℃加热 24小时。将反应混合物冷却至RT, 并在水(10mL)和EtOAc(10mL) 之间 分配。分离并保存有机相, 将水层用EtOAc萃取(3x10mL)。将合并的有 机物用盐水洗涤(3x10mL), 随后干燥并真空蒸发。将粗产物经快速柱色 谱纯化(SiO₂, 12g, 0-100%EtOAc在异己烷中的溶液, 梯度洗脱), 得到标 题化合物, 中间体(IVb), 为白色固体(100mg, 43%)。

[0131] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸

[0132] 甲基酯的水解(IVa)

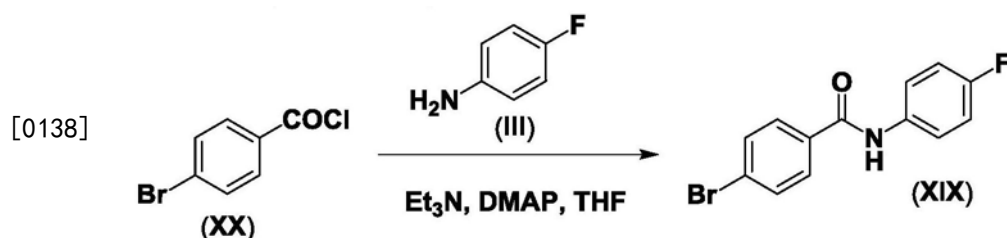


[0134] 向中间体 (IVa) (9.00g, 14.9mmol) 在 DMSO (370mL) 的混悬液中加入 氢氧化锂 (1.79g, 74.5mmol) 在水 (37.0mL) 中的溶液。将该混合物在 70°C 加热 22 小时, 并随后冷却至 RT, 用水 (1000mL) 稀释, 并通过加入 1M 盐酸水溶液 (80mL) 酸化 (至 ~pH 2)。将该混合物在冰浴中冷却 2 小时, 并经过滤收集所得沉淀。将滤饼用水洗涤 (3x80mL), 并在 50°C 真空干燥, 得到标题化合物, 中间体 (II), 为白色固体 (4.66g, 54%); R^t 2.21min (方法 1a); m/z 590 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ : 2.10 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.43 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.12-3.14 (4H, m), 3.42-3.45 (4H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.79 (2H, m), 4.05 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 6.76 (2H, br s), 6.86 (1H, br d), 6.97-7.03 (3H, m), 7.25-7.34 (2H, m), 7.77-7.80 (3H, m), 8.34 (1H, s) 和 12.31 (1H, s)。

[0135] 乙基酯的水解 (IVb)

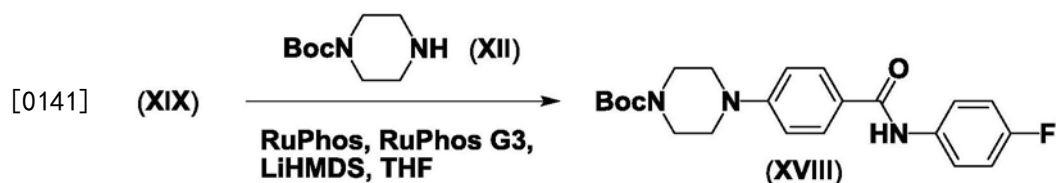
[0136] 向中间体 (IVb) (16.4g, 26.6mmol) 在 DMSO (375mL) 的混悬液中加入 氢氧化锂 (3.18g, 74.5mmol) 在水 (50mL) 的溶液中。将该混合物在 70°C 加热 22 小时, 然后冷却至 RT, 倒入水 (500mL) 中, 并通过加入 2M 盐酸 (70 mL) 酸化 (至 ~pH 5-6)。将该混合物在 RT 下搅拌 30 分钟, 并经过滤收集所得固体, 用水 (2x20mL) 和乙醚 (3x30mL) 洗涤, 并随后在 40°C 真空干燥 18 小时, 得到标题化合物, 中间体 (II), 为棕褐色固体 (14.2g, 84%); R^t 2.26 min (方法 1a); m/z 590 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ : 2.09 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.42 (1H, m), 2.52-2.58 (1H, m), 3.12-3.14 (4H, m), 3.42-3.44 (4H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.79 (2H, m), 4.05 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 6.75 (2H, br s), 6.86 (1H, br s), 6.97-7.03 (3H, m), 7.26-7.34 (2H, m), 7.77-7.80 (3H, m), 8.34 (1H, s), 12.31 (1H, br s)。

[0137] 4-溴-N-(4-氟苯基) 苯甲酰胺



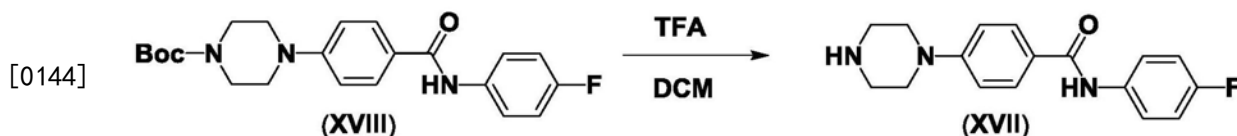
[0139] 向 4-氟苯胺 (III) (0.85mL, 9.00mmol)、三乙胺 (1.88mL, 13.5mmol) 和 DMAP (0.11g, 0.90mmol) 在 THF (15mL) 的溶液中加入 4-溴苯甲酰氯 (XX) (2.37g, 10.8mmol)。将反应混合物在 RT 下保持 1 小时, 并随后在 EtOAc (100mL) 和 1M 盐酸 (100mL) 之间分配。分离有机相, 并依次用 1M 盐酸 (100 mL)、饱和 NaHCO₃ 水溶液 (100mL) 和盐水 (100mL) 洗涤, 随后干燥并真空蒸发。将粗的残余物从温热的 DCM (100mL) 中研磨, 并将该混合物回流加热, 得到白色混悬液, 将其冷却至 RT。经过滤收集所得沉淀, 得到标题化合物, 中间体 (XIX), 为白色固体 (1.81g, 65%); R^t 2.23min; m/z 294/296 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ : 7.20 (2H, t), 7.74-7.79 (4H, m), 7.90 (2H, d) 和 10.36 (1H, s)。

[0140] 4-(4-((4-氟苯基) 氨甲酰基) 苯基) 哌嗪-1-甲酸叔丁酯



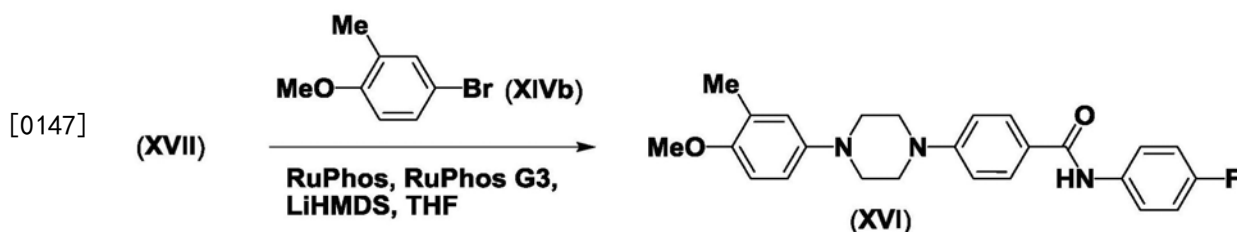
[0142] 将装有哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (XII) (4.00g, 21.5mmol)、中间体 (XIX) (6.63g, 22.6mmol)、RuPhos (100mg, 0.215mmol) 和 RuPhos G3 (180mg, 0.215 mmol) 的瓶抽真空, 并回充氮气三次。加入 LiHMDS 溶液 (1M 在 THF 中的溶液, 75.0mL, 75.0mmol), 并将反应混合物在 70℃ 加热 5 小时。冷却至 RT 后, 将该混合物在 EtOAc (150mL) 和 1M 盐酸 (150mL) 之间分配。分离并保存有机相, 将水相用 EtOAc 萃取 (3x150mL)。将合并的有机物干燥并真空浓缩, 得到褐色固体, 将其在异己烷和乙醚 (1:1, 100mL) 的混合物中研磨。将所得产物经过滤收集, 用异己烷和乙醚 (1:1, 25mL) 的混合物洗涤, 并随后在 40℃ 真空干燥, 得到标题化合物, 中间体 (XVIII), 为棕褐色固体 (6.44g, 85%); R^t 2.40min (方法a); m/z 400 (M+H)⁺; ¹H NMR δ : 1.43 (9H, s), 3.27-3.30 (4H, m), 3.45-3.48 (4H, m), 7.03 (2H, d), 7.14-7.18 (2H, m), 7.74-7.79 (2H, m), 7.88 (2H, d), 9.99 (1H, s)。

[0143] N-(4-氟苯基)-4-(哌嗪-1-基)苯甲酰胺



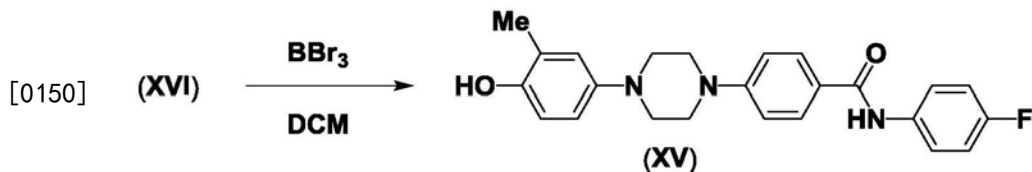
[0145] 向中间体 (XVIII) (6.44g, 16.1mmol) 在 DCM (200mL) 的溶液中加入 TFA (24.7mL, 322mmol)。将反应物在 RT 搅拌 2 小时, 然后真空蒸发。加入甲苯 (5.0mL), 并将该混合物再次真空蒸发。将所得油状物溶于 DCM (90mL) 和甲醇 (10mL) 的混合物中, 并随后用水 (50mL) 和饱和 NaHCO₃ 水溶液 (50mL) 的混合物萃取。分离并保存有机相, 将水层用 DCM 和甲醇 (9:1, 3x100mL) 的混合物萃取。将合并的有机层干燥并真空浓缩, 得到标题化合物, 中间体 (XVII), 为褐色固体 (3.74g, 70%); R^t 1.02min (方法a); m/z 300 (M+H)⁺; ¹H NMR δ : 2.81-2.83 (4H, m), 3.18-3.20 (4H, m), 6.99 (2H, d), 7.14-7.18 (2H, m), 7.74-7.80 (2H, m), 7.85 (2H, d), 9.99 (1H, s)。

[0146] N-(4-氟苯基)-4-(4-(4-甲氧基-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酰胺



[0148] 将装有 4-溴-1-甲氧基-2-甲基苯 (XIVb) (406mg, 2.02mmol)、中间体 (XVII) (550mg, 1.84mmol)、RuPhos (43mg, 0.092mmol) 和 RuPhos G3 (77 mg, 0.092mmol) 的瓶抽真空, 并用氮气回充三次。加入 LiHMDS (9.2mL, 1M 在 THF 中的溶液, 9.2mmol), 并将反应混合物在 70℃ 加热 8 小时。冷却至 RT 后, 将该混合物通过加入 1M 盐酸水溶液 (9.0mL) 猝灭, 并随后在水 (15mL) 和 EtOAc (15mL) 之间分配。分离并保存有机层, 将水层用 EtOAc 萃取 (2x15mL)。将合并的有机物用盐水 (20mL) 洗涤, 然后干燥并真空蒸发。将所得粗产物经快速柱色谱纯化 (SiO₂, 12g, 0-100% EtOAc 在异己烷中的溶液, 梯度洗脱), 得到黄色固体。将该物质经快速柱色谱再次纯化 (SiO₂, 4g, 0-10% EtOAc 在 DCM 中的溶液, 梯度洗脱), 得到标题化合物, 中间体 (XVI), 为灰白色固体 (83mg, 11%); R^t 2.27min (方法a); m/z 420 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ : 2.13 (3H, s), 3.13-3.16 (4H, m), 3.42-3.45 (4H, m), 3.72 (3H, s), 6.77-6.88 (3H, m), 7.08 (2H, d), 7.17 (2H, t), 7.75-7.80 (2H, m), 7.89 (2H, d), 10.02 (1H, s)。

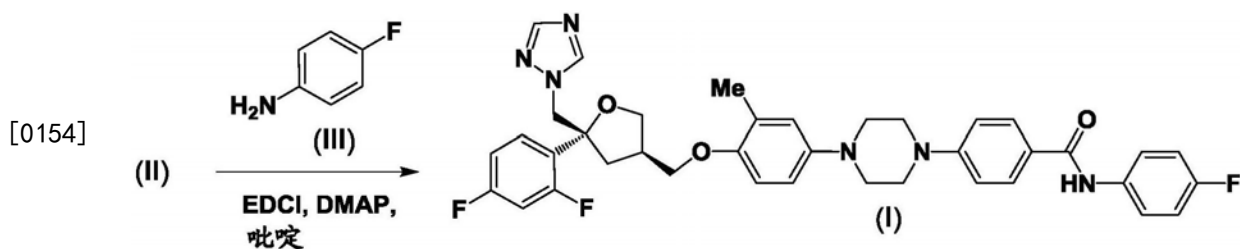
[0149] N-(4-氟苯基)-4-(4-(4-羟基-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酰胺



[0151] 在0℃下向中间体 (XVI) (83mg, 0.20mmol) 在DCM (5.0mL) 的混悬液中加入三溴化硼 (0.59mL, 1M在DCM中的溶液, 0.59mmol)。将反应混合物在0℃搅拌30分钟, 加温至RT持续8小时, 并随后在水 (15mL) 和 DCM (10mL) 之间分配。分离并保存有机层, 并将水层用DCM和MeOH (90:10, 5x15mL) 的混合物萃取。将合并的有机物干燥并真空蒸发, 得到粗产物, 将其经快速柱色谱纯化 (SiO₂, 4.0g, 0-3% MeOH在DCM中的溶液, 梯度洗脱), 得到标题化合物, 中间体 (XV), 为浅褐色固体 (61mg, 72%); R^t 1.73min (方法a); m/z 406 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ: 2.10 (3H, s), 3.08-3.11 (4H, m), 3.41-3.43 (4H, m), 6.67 (2H, br s), 6.77 (1H, br s), 7.07 (2H, d), 7.17 (2H, t), 7.76-7.80 (2H, m), 7.89 (2H, d), 8.73 (1H, s), 10.01 (1H, s)。

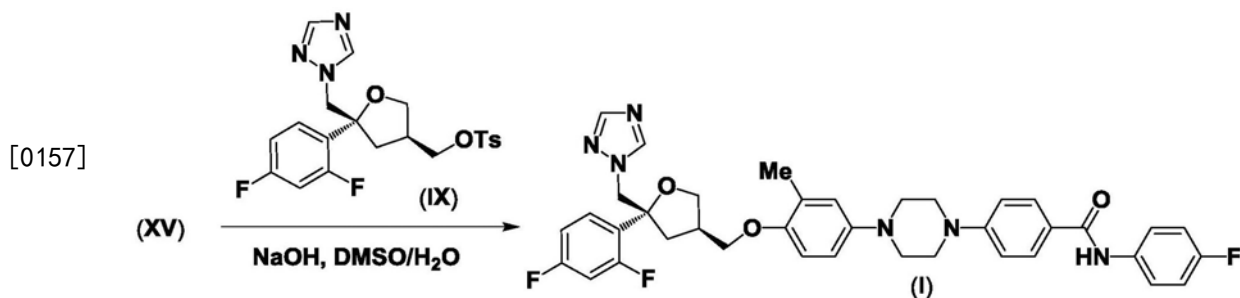
[0152] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-氟苯基)苯甲酰胺

[0153] 1. 从苯甲酸中间体 (II) 制备化合物 (I)。



[0155] 向中间体 (II) (2.50g, 4.24mmol)、EDCI (1.63g, 8.48mmol) 和DMAP (30mg, 0.21mmol) 在吡啶 (30mL) 的混悬液中加入4-氟苯胺 (0.41mL, 4.3 mmol), 并将反应混合物在60℃加热2小时, 然后冷却至RT。用水 (60mL) 稀释该混合物, 并搅拌5分钟, 产生固体, 将其经过滤收集, 并随后用水 (3x10mL) 和乙醚 (2x15mL) 洗涤, 得到棕褐色粉末。将所得粗产物经快速柱色谱纯化 (SiO₂, 40g, 0-3% MeOH在DCM中的溶液, 梯度洗脱), 得到化合物 (I), 为黄色固体 (2.47g, 85%); R^t 2.60min (方法a); m/z 683 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ: 2.10 (3H, s), 2.15 (1H, dd), 2.37-2.43 (1H, m), 2.53-2.58 (1H, m), 3.13-3.16 (4H, m), 3.42-3.44 (4H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.79 (2H, m), 4.05 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 6.76 (2H, br s), 6.86 (1H, br s), 6.99 (1H, td), 7.08 (2H, d), 7.16 (2H, t), 7.25-7.35 (2H, m), 7.76-7.80 (3H, m), 7.89 (2H, d), 8.34 (1H, s) 和10.00 (1H, s)。

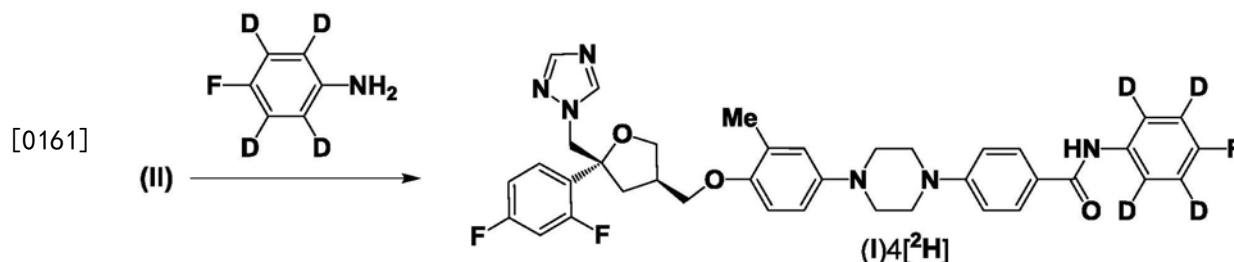
[0156] 2. 从苯酚中间体 (XV) 制备化合物 (I)。



[0158] 向中间体 (XV) (19mg, 0.047mmol) 在 DMSO (1.5mL) 的溶液中加入氢氧化钠水溶液 (1M, 98μL, 0.098mmol)。将该混合物在 RT 下搅拌 10 分钟, 并随后用甲苯磺酸酯 (IX) (ex APIChem, 目录号: AC-8330, 23.2mg, 0.052 mmol) 在 DMSO (0.5mL) 中的溶液处理。将反应混合物在 60℃ 搅拌 2 小时, 冷却至 RT, 并加入水 (10mL)。将所得混合物用 EtOAc 萃取 (3x10mL), 将合并的有机萃取物干燥并真空蒸发, 得到褐色油状物。将所得粗产物经快速柱色谱纯化 (SiO₂, 4g, 0-2% MeOH 在 DCM 中的溶液, 梯度洗脱), 得到浅褐色固体 (23mg)。将产物经快速柱色谱再次纯化 (SiO₂, 4.0g, 0-50% EtOAc 在 DCM 中的溶液, 梯度洗脱), 得到化合物 (I), 为灰白色固体 (14mg, 42%); R^t 2.60min (方法 a); m/z 683 (M+H)⁺ (ES⁺)。

[0159] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-氟苯基-2,3,5,6-d₄) 苯甲酰胺。

[0160] 制备化合物 (I) 的四氘代衍生物



[0162] 向中间体 (II) (200mg, 0.34mmol)、EDCI (130mg, 0.68mmol) 和 DMAP (2.1mg, 0.02mmol) 在吡啶 (1.5mL) 的混悬液中加入 4-氟苯胺-2,3,5,6-d₄ (43 mg, 0.37mmol) 在吡啶 (0.5mL) 中的溶液, 并将反应混合物在 60℃ 加热 1 小时。将反应混合物冷却至 RT, 用水 (10mL) 稀释, 并搅拌 5 分钟, 其产生沉淀。经过滤收集固体, 用水洗涤 (3x2.0mL), 并随后溶于 DCM 和 MeOH 的混合物 (9:1, 5.0mL) 中。将该混合物通过相分离器, 并将有机溶液真空蒸发, 得到棕褐色固体 (200mg)。将所得粗产物经快速柱色谱纯化两次 (SiO₂, 12g, 0-2% MeOH 在 DCM 中的溶液, 梯度洗脱; SiO₂, 40g, 0-2.5% MeOH 在 DCM 中的溶液, 梯度洗脱), 得到灰白色粉末。

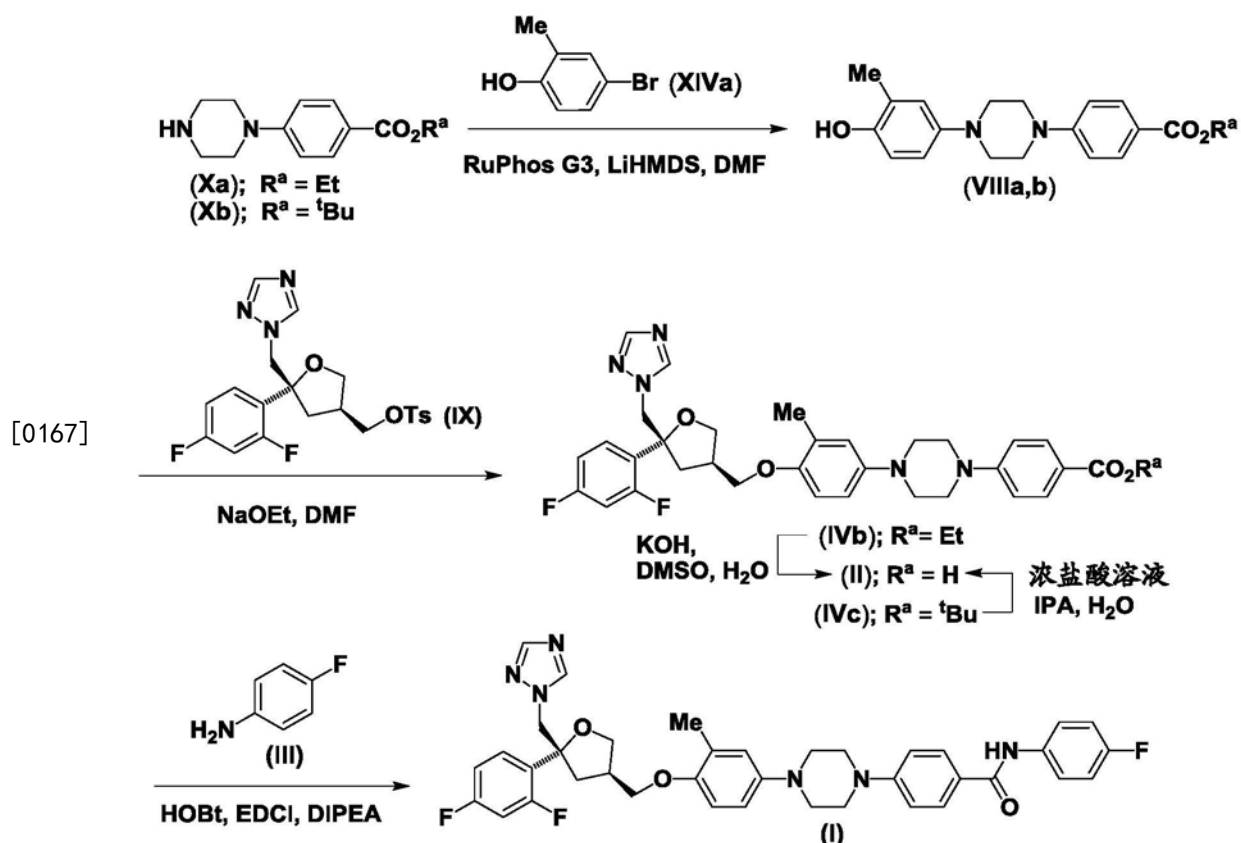
[0163] 将该固体悬浮于 DMSO (0.75mL) 中, 并加热至 60℃ 持续 5 分钟, 直至全部溶解。将所得溶液冷却至 RT, 并用水 (1.0mL) 处理, 得到沉淀。将该混悬液在 RT 下搅拌 20 分钟, 并经过滤收集固体, 用水冲洗 (3x0.5mL), 并在 50℃ 下真空干燥三天, 得到标题化合物, (I) 4[²H], 为白色固体 (147mg, 62%); R^t 2.59min (方法 1a); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H NMR δ: 2.10 (3H, s), 2.16 (1H, dd), 2.37-2.43 (1H, m), 2.52-2.60 (1H, m), 3.13-3.16 (4H, m), 3.42-3.44 (4H, m), 3.68 (1H, dd), 3.74-3.79 (2H, m), 4.05 (1H, dd), 4.58 (2H, dd), 6.76 (2H, br s), 6.86 (1H, br s), 7.00 (1H, td), 7.08 (2H, d), 7.25-7.35 (2H, m), 7.77 (1H, s), 7.89 (2H, d), 8.34 (1H, s) 和 10.01 (1H, s)。

[0164] 通过途径 2 对化合物 (I) 的制备进行放大

[0165] 上文所述途径 2 (流程 1) 的合成方法已经成功开发, 以超过 1.0kg 的 API (流程 3) 的规模制备本发明的化合物。已经开发了该方法的两种变通方法, 其中 4-哌嗪基苯甲酸酯 [中间体 (VIII)] 包括乙酯 (VIIIa) 或相应的叔丁酯 (VIIIb)。这两种化合物都可以与甲苯磺酸酯 (IX) 偶联, 得到苯甲酸 (II) 所对应的酯前体。在乙酯的情况下, 通过皂化获得游离酸, 而叔丁基衍生物是通过酸解被脱酯化。该合成活动所采用的方法如下所述, 并在本文

描述。

[0166] 流程3:化合物(I)合成的放大



[0168] 分析和光谱方法

[0169] 本实验部分的分析和光谱方法如下。

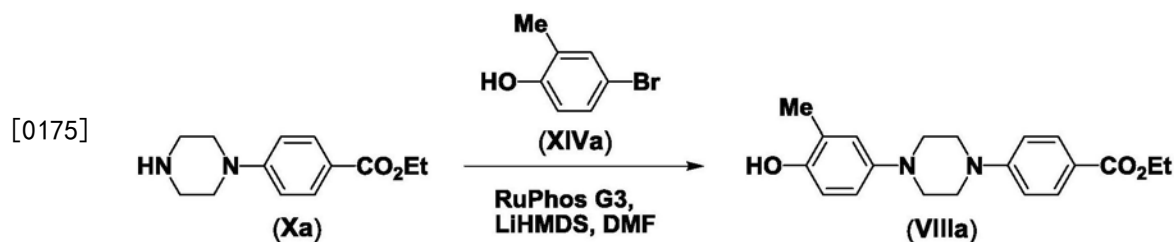
[0170] LCMS分析的反相HPLC条件:

[0171] XBridge BEH苯基4.6x150mm柱;2.5 μm (Ex.Waters #186006720), 40 $^{\circ}\text{C}$;流速 1.0mL $\cdot\text{min}^{-1}$,用纯 H_2O -MeCN(包含1%甲酸) 梯度洗脱25min,在300nm下用UV检测。注射体积 5 μL 。梯度信息: 0-2min,保持在95% H_2O -5%MeCN;2-15min,从95% H_2O -5%MeCN 倾斜至 10% H_2O -90%MeCN;15-25min,保持在10% H_2O -90%MeCN。

[0172] ^1H NMR光谱:

[0173] ^1H NMR谱用JOEL ECX 400MHz光谱仪收集。使用残余未氘代溶剂 作为参考,除非另有说明,样品在 $\text{DMSO}-d_6$ 中进行。

[0174] 4-(4-(4-(4-羟基-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸乙酯



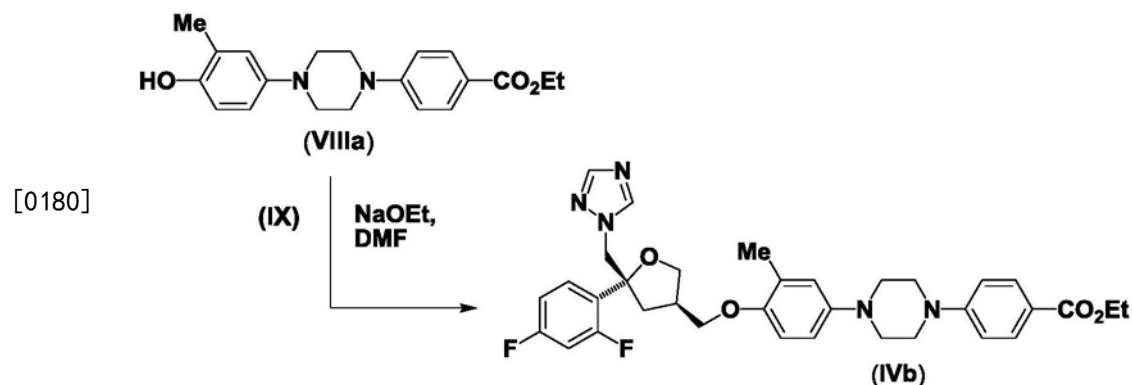
[0176] 4-(1-哌嗪基)苯甲酸乙酯(Xa) (500g, 2.13mol) 和4-溴-2-甲基苯酚(479g, 2.56mol) 在无水DMF (5.0L) 中的溶液,通过将该混合物交替地置于真空和 充入氮气三次进行脱气。然后将该混合物用RuPhos G3 (35.7g, 0.043mol) 和LiHMDS溶液 (1.0M在THF中的溶

液, 2560mL, 2.56mol) 处理, 但保持 内部温度低于35℃ (水浴冷却)。然后将LiHMDS (1.0M在THF中的溶液) 溶液于20-35℃下在两分钟间隔以十四等份 (14x213mL, 共2.98L, 2.98mol) 加入。将所得溶液在18-25℃搅拌30分钟, 然后用HPLC分析, 显示0.6%的4-(1-哌嗪基) 苯甲酸乙酯剩余, 认为反应完成。

[0177] 通过加入2M盐酸 (5.50L) 将反应混合物调至pH7.6, 但保持温度低于 40℃, 然后加入EtOAc (3.00L), 并分离所得相。将水相用EtOAc萃取 (2x 3.00L, 然后2x2.00L), 并将合并的有机物用饱和盐水洗涤 (8x1.00L), 用 MgSO₄干燥, 并随后真空蒸发, 得到浅褐色油状固体。将粗产物在IPA (2.50 L) 中于20-25℃下浆化30分钟, 并将所得固体经过滤收集。将滤饼用IPA 洗涤 (2x500mL), 抽干, 并随后将该固体在50℃真空干燥, 得到标题化合物, 中间体 (VIIIa), 为浅褐色固体 (380.0g, 52%, HPLC纯度97.2%); R^t 11.01min; m/z 341.3 (M+H)⁺ (ES⁺)。

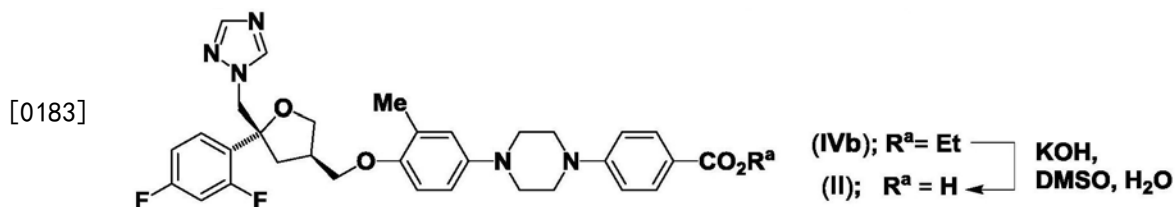
[0178] 为了控制钯残留量, 将几批产品合并 (1900g, 残留Pd 108ppm), 溶于 THF (19.0L), 并用MP-TMT树脂 (250g) 在18-25℃处理。将该混合物在此温度下搅拌24小时, 并随后将树脂经过滤除去, 并用THF (3.49L) 洗涤。将滤液真空蒸发至干, 并将所得固体在IPA (4.75L) 中于18-25℃浆化1 小时, 并经过滤收集。将滤饼用IPA (500mL) 洗涤, 抽干, 并随后在50℃真空干燥, 得到标题化合物, 中间体 (VIIIa), 为灰白色固体 (1789g, 94%, 残留Pd 17ppm)。

[0179] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)-四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸乙酯



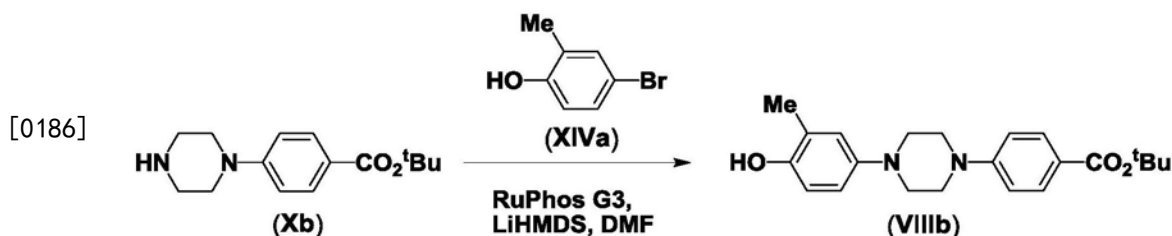
[0181] 在15-25℃下向中间体 (VIIIa) (1780g, 5.23mol) 在无水DMF (17.8L) 的 溶液中加入乙醇钠 (391g, 5.75mol)。45分钟后, 一次加入甲苯磺酸酯 (IX) (2586g, 5.75mol), 并在60-65℃继续搅拌5小时。经HPLC分析显示 该反应基本上完全 (剩余1.67%起始原料)。将该混合物冷却至18-25℃, 将 所得混悬液用水 (18.0L) 处理, 但保持温度低于30℃。冷却至15-25℃持续 45分钟后, 经过滤收集该固体, 并用水洗涤 (2x7.14L)。将该潮湿滤饼在 乙醇 (8.92L) 中回流浆化2小时, 然后将该混合物冷却至15-25℃, 并搅拌 18小时。经过滤收集所得固体, 用乙醇洗涤 (2x1.78L), 并随后在50℃真 空干燥, 得到标题化合物, 中间体 (IVb), 为灰白色固体 (2855g, 88%, HPLC 纯度95.97%); R^t 14.99min; m/z 618.5 (M+H)⁺ (ES⁺)。

[0182] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)-四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸单盐酸化物



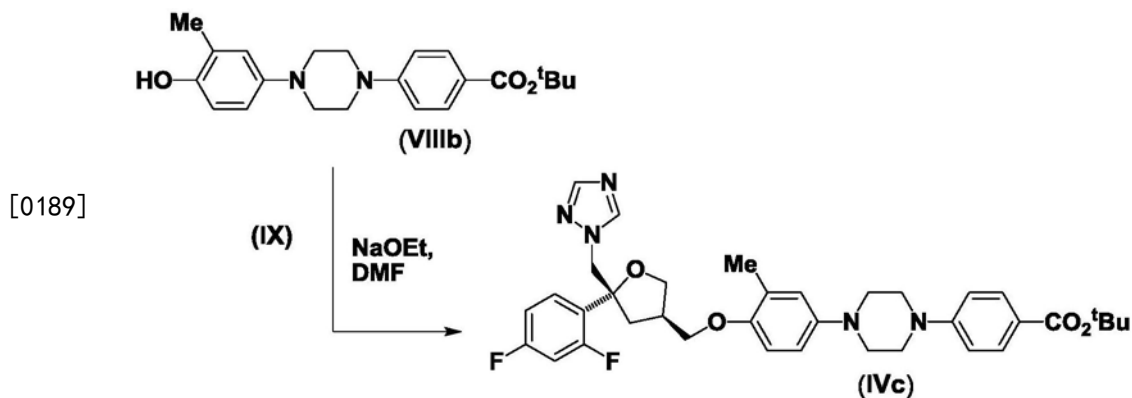
[0184] 18-25℃下向中间体 (IVb) (1467g, 2.38mol) 在DMSO (1.45L) 和水 (5.90L) 的混合物的混悬液中加入50%w/w KOH水溶液 (2.93L)。将该混悬液在90-95℃加热18小时, 然后HPLC分析显示反应完全 (剩余0.16% 起始原料, 97.9% 产物)。将反应混合物冷却至40-50℃, 并加入IPA (14.9L) 和水 (4.42L) 的混合物。冷却至15-25℃后, 通过加入浓盐酸 (3.12L) 将pH 调至1-2, 但保持内部温度低于40℃。将所得混悬液冷却至15-25℃, 并经过滤收集固体, 抽干, 并随后在水 (7.40L) 中于90-95℃浆化30分钟。冷却至15-25℃后, 经过滤收集固体, 用水洗涤 (2x1.48L) 并抽干。在50℃进一步真空干燥, 得到标题化合物, 中间体 (II), 为白色固体 (1329g, 89%, HPLC纯度99.0%; 氯含量: 6.61w/w% [理论值5.66w/w%]; R^t 12.92 min; m/z 590.4 (M+H)⁺ (ES⁺)。

[0185] 4-(4-(4-羟基-3-甲基苯基)哌嗪-1-基) 苯甲酸叔丁酯



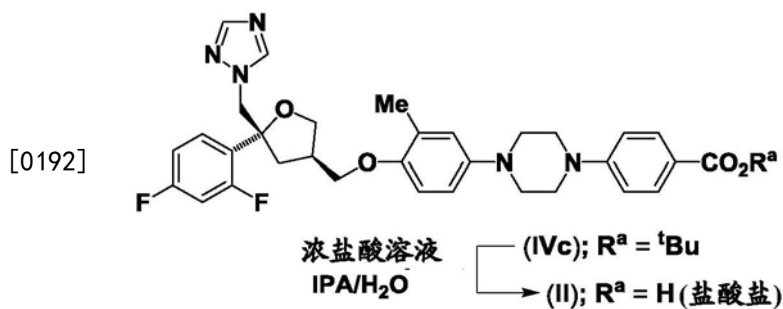
[0187] 4-(哌嗪-1-基) 苯甲酸叔丁酯 (Xb) (100g, 381mmol) (500g, 2.13mol) 和4-溴-2-甲基苯酚 (85.5g, 457mmol) 在无水DMF (1.00L) 中的溶液, 通过将该混合物交替地置于真空下和充入氮气三次进行脱气。该操作后, 在15-25℃ 加入RuPhos G3 (6.38g, 7.62mmol), 然后历经5分钟加入LiHMDS在THF 中的溶液 (1.06M, 432.mL, 457mmol), 但保持温度在15-30℃内 (水浴冷却)。搅拌5分钟后, 向反应混合物中以2分钟间隔以十四等份 (14x36mL, 共504mL, 533mmol) 加入另外等份的LiHMDS溶液 (1.06M在THF中的 溶液), 导致16℃-21℃的放热。将反应物在15-25℃搅拌过夜 (此处HPLC 显示形成72.%所需产物), 并通过加入2M盐酸 (~900mL) 将该混合物的pH 调至7.3。分离水相, 并用EtOAc重复萃取 (1.0L, 500mL和2x250mL)。将合并的有机物用盐水洗涤 (6x400mL), 用MgSO₄干燥, 并真空浓缩, 得到粘性黄色固体。将所得固体悬浮于IPA (500mL) 中, 并在15-25℃搅拌1小时。过滤该混悬液, 将滤饼用IPA (250mL, 200mL) 洗涤, 并抽干。将产物进一步在50℃真空干燥, 得到标题化合物, 中间体 (VIIIb), 为灰白色固体 (105.6g, 75%, HPLC纯度97.1%); R^t 12.23min; m/z 369.3 (M+H)⁺ (ES⁺)

[0188] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)-四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基) 苯甲酸叔丁酯



[0190] 在氮气中向中间体(VIIIb) (100g, 271mmol) 在DMF (500mL) 的溶液 中加入乙醇钠 (22.2g, 325mmol), 导致温和放热(从20-22.0℃)。在15-25℃ 搅拌45min, 将该反应混合物用甲苯磺酸酯(IX) (146.4g, 325mmol) 处理, 并随后在60-65℃加热2小时。将所得混合物经HPLC分析显示反应基本上完全(剩余4.4%苯酚, 14.6%甲苯磺酸酯, 77.6%产物), 并将该混合物冷却至40-45℃, 并加入IPA (800mL)。然后在40-45℃下逐滴加入水, 直至持续轻微浑浊(需要500mL), 此时加入少量产物样品(100mg, 0.15mmol) 作为种子, 并将该混合物在40-45℃搅拌10分钟, 以确保开始沉淀。在40-45℃下逐滴加入水(500mL), 并随后将该混悬液冷却至15-25℃。将所得固体经过滤收集, 用水洗涤(3x200mL), 并最后在50℃下真空干燥, 得到粗产物, 为灰白色固体(155.9g, 89%, HPLC纯度94.8%)。将部分该物质(85.0g)溶于IPA (510mL) 中, 在65-75℃下加热直至溶解完全。然后将该溶液冷却至15-25℃, 并搅拌30分钟。将所得固体经过滤收集, 用IPA 洗涤(2x85mL), 并在50℃真空干燥, 得到标题化合物, 中间体(IVc), 为白色固体(83.4g, 87%总产率, HPLC纯度98.2%); R^t 15.74min; m/z 646.6 ($M+H$)⁺ (ES^+)

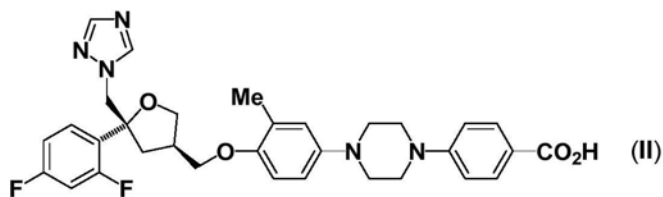
[0191] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)-四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)苯甲酸单盐酸化物



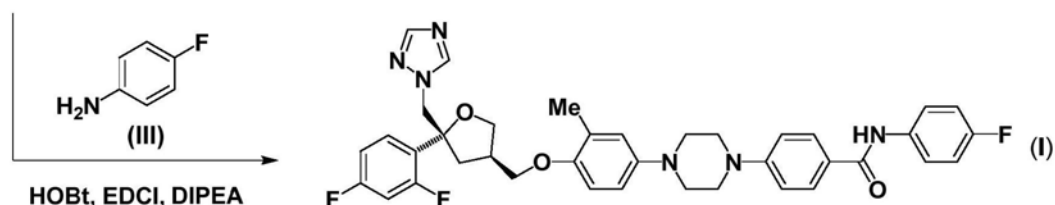
[0193] 向苯甲酸叔丁酯(IVc) (83.4g, 129mmol) 在水(250mL) 和IPA (417mL) 的混合物的混悬液中加入浓盐酸(167mL) 在水(167mL) 中的溶液, 但保持 内部温度低于35℃。然后将所得溶液在35℃保持24小时(2-3小时后观察到固体形成), 此时HPLC分析显示反应基本完全(剩余0.6%酯, 98.1%产物)。将该混合物冷却至15-25℃, 加入IPA (417mL), 并通过在<40℃ 加入NaOH水溶液(10M, 200mL) 将pH调至~10得到溶液。然后通过<40℃ 加入浓盐酸(25mL) 将pH再次调至1-2。将所得混悬液冷却至15-25℃, 并经过滤收集固体。将滤饼再次悬浮于水(834mL) 中, 加热至80-85℃, 然后搅拌30分钟。随后将该混悬液冷却至15-25℃, 并经过滤收集该固体, 用水洗涤(2x83mL), 并在50℃真空干燥, 得到标题化合物, 中间体(II) (为单盐酸盐), 为白色固体(64.6g, 80%, HPLC纯度97.6%); R^t 12.92min; m/z

590.4 (M+H)⁺ (ES⁺)。

[0194] 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-三唑-1-基)甲基)-5-(2,4-二氟苯基)-四氢呋喃-3-基)甲氧基)-3-甲基苯基)哌嗪-1-基)-N-(4-氟苯基)苯甲酰胺



[0195]



[0196] 在<40℃下向苯甲酸(II)的单盐酸盐(1001g,1.60mol)和HOBt·H₂O (216.g, 1.41mol)在DMF(5020mL)的搅拌过的混悬液中加入DIPEA(840 mL,4.823mol),然后加入4-氟苯胺(181mL,1.91mol),并随后加入 EDCI·HCl(368g,1.92mol)。将该混合物在60-65℃加热17小时,此时经 HPLC分析显示反应完全(未检测出起始原料或反应中间体,82.63%产物)。将所得溶液冷却至15-25℃,并用水(15.2L)在<35℃猝灭,然后再次冷却至15-25℃,并搅拌1小时。将所得固体经过滤收集,用水洗涤(2x2.00L)并抽干。将滤饼在水(5.00L)中于15-25℃再次浆化45分钟,并经过滤收集固体,用水洗涤(2x2.00L),真空干燥,得到标题化合物,化合物(I),为灰白色固体(1101g,~100%,HPLC纯度95.8%);R^t 14.46min;m/z 683.5 (M+H)⁺ (ES⁺);¹H NMRδ:2.10(3H,s),2.16(1H,dd),2.37-2.43(1H,m),2.50-2.58(1H,m),3.13-3.15(4H,m),3.41-3.44(4H,m),3.67(1H,dd),3.74-3.78(2H,m),4.05(1H,t),4.55(1H,d),4.61(1H,d),6.76(2H,s),6.86(1H,s),7.00(1H,d,t),7.08(2H,d),7.17(2H,t),7.26-7.35(2H,m),7.76-7.80(2H,m),7.77(1H,s),7.89(2H,d),8.35(1H,s),10.02(1H,S)。

[0197] 生物测试:实验方法

[0198] 浮游真菌生长评估

[0199] a. 刃天青-微量滴定法

[0200] 该测定使用改良的公开方法进行(Monteiro等人,2012)。烟曲霉(NCPF2010, Public Health England,Wiltshire)的孢子在Sabouraud葡萄糖琼脂中培养3天。通过用PBS-吐温(10mL;含有0.05%吐温-20、100U/mL青霉素和100U/mL链霉素的PBS)洗涤,从Sabouraud葡萄糖琼脂培养物制备储备孢子悬浮液。使用Neubauer血细胞计数器评估孢子计数,并使用PBS调节至10⁶个孢子/mL。在过滤灭菌的MOPS RPMI-1640(50mL;含有2mM L-谷氨酰胺、2%葡萄糖和0.165M MOPS的RPMI-1640,用NaOH缓冲至pH7)中制备孢子的工作悬浮液(10⁴个孢子/mL)。将刃天青钠盐(100μL 1%溶液;Sigma-Aldrich,Dorset,UK)加入到孢子悬浮液中并充分混合。将孢子混悬液-刃天青混合物(100μL/孔)加入384孔平板(目录号353962,BD Falcon,Oxford,UK)中。同时,用Integra VIAFLO 96(Integra,Zizers,瑞士)将试验化合物(0.5μL DMSO溶液)一式四份加入100μL的孢子-刃天青混合物中,得到最终的0.5%的DMSO溶液。对于无孢子的对照孔,加入MOPS-RPMI-刃天青溶液(100μL)来代

替孢子-刃天青混合物。将该平板用Breathe Easier膜(目录号Z763624, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 覆盖, 并孵育 (35°C, 5%CO₂) 直到接种的孔中的荧光是对照孔的两倍(约24 小时)。每个孔的荧光(545nm(激发)/590nm(发射), 增益800, 焦点高度 5.5mm) 使用多扫描仪 (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, UK) 检测。计算 每个孔的抑制百分比, 并从每个测试化合物产生的浓度-响应曲线计算 MIC₅₀、MIC₇₅和MIC₉₀值。

[0201] b. 培养基微量稀释试验

[0202] 该测定使用由EUCAST (Rodriguez-Tudela等人, 2008) 公布的改良方 法进行。将烟曲霉的孢子 (NCPF2010、NCPF7010 (甲硫氨酸220突变体)、NCPF7099 (甘氨酸G54突变体), 获自Public Health England, Wiltshire; TR34/L98H突变体获自St Louis Hospital, 法国巴黎) 在Sabouraud葡萄糖 琼脂中培养3天。通过用PBS-吐温 (10mL; 含有0.05%吐温-20、100U/mL 青霉素和100U/mL链霉素的PBS) 洗涤, 从Sabouraud葡萄糖琼脂培养物 制备储备孢子悬浮液。使用Neubauer血细胞计数器评估孢子计数, 并使 用PBS调节至10⁶孢子/mL。在过滤灭菌的BSA MOPS RPMI-1640 (50mL; 含有2mM L-谷氨酰胺、0.5%BSA、2%葡萄糖、0.165M MOPS的 RPMI-1640, 用NaOH缓冲至pH7) 中制备孢子的工作悬浮液 (2x10⁵孢子 / mL)。对于该测定, 首先将BSA MOPS RPMI-1640 (50μL/孔) 加入到384 孔板中(目录号 353962, BD Falcon, Oxford, UK)。然后用Integra VIAFLO 96 (Integra, Zizers, 瑞士) 将试验化合物 (0.5μL DMSO溶液) 一式四份加 入, 并用平板混合器充分混合。随后将50μL如上文制备的工作孢子悬浮 液加入除不含孢子的对照孔以外的全部孔中。对于不含孢子的对照孔, 加 入BSA MOPS-RPMI溶液 (50μL/孔) 代替。将板子用塑料盖覆盖, 并孵育 (35°C, 与环境空气一起) 48小时。使用多扫描仪 (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, UK) 测定530nm处的每个孔的OD。计算每个孔的抑制 百分比, 并从每个测试化合物产生的浓度-响应曲线计算 MIC₅₀、MIC₇₅和 MIC₉₀值。

[0203] 真菌组筛选由Eurofins Panlabs Inc. 进行。测试制品的MIC和MIC₅₀值按照临床和实验室标准研究所的指南对酵母 (CLSI M27-A2) (CLSI, 2002) 和丝状真菌 (CLSI M38-A) (CLSI, 2008) 的培养基微量稀释方法测定。

[0204] 支气管上皮细胞的烟曲霉感染

[0205] 将BEAS2B细胞接种于96-孔板 (100μL; 30,000细胞/孔; 目录号3596, Sigma Aldrich, Dorset, UK) 上的10%FBS RPMI-1640中, 随后在试验前 孵育 (37°C, 5%CO₂) 一天。向每孔中加入试验化合物 (0.5μL DMSO溶液) 或溶媒 (DMSO), 得到5%的DMSO最终浓度。将 BEAS2B细胞用试验化 合物孵育1小时 (35°C, 5%CO₂), 然后用烟曲霉 (20μL; Public Health England) 分生孢子混悬液 (0.5x10⁵/ml, 在10%FBS RPMI-1640中) 感染。将平板孵育24小时 (35°C, 5%CO₂)。收集上清 (50μL), 并转移至PCR平 板 (目录号L1402-9700, Starlab, Milton Keynes, UK), 将其冷冻 (-20°C) 直至 使用。融化后, 将上清 (5μL) 通过加入R7-PBS溶液 (95μL; 1:4R7:PBS; Bio-Rad实验室, Redmond, WA, USA) 1:20稀释。这些样品 (50μL) 中的GM 水平用Platelia GM-EIA试剂盒 (Bio-Rad实验室, Redmond, WA, USA) 检 测。计算每个孔的抑制百分比, 并根据每个试验化合物产生的浓度-响应曲 线计算IC₅₀值。

[0206] 烟曲霉感染人肺泡双层

[0207] 如以前所述 (Hope等人, 2007), 制备由人肺泡上皮细胞和内皮细胞的 双层组成的人肺泡的体外模型。该系统允许将试验化合物施用于上部 (“空 气”空间) 和/或下部 (“系

统”空间)隔室。已经开发了这种灵活性以通过将 化合物(I)给予上室和将泊沙康唑或其他抗真菌剂给予下室来研究组合治疗 的效果。收集原代人肺动脉内皮细胞(HPAEC),并在EGM-2培养基(Lonza, Basel, 瑞士)中稀释至 10^6 细胞/mL。将穿透小室(transwell)倒置,并将细胞悬浮液(100 μ L/孔)施加到每个穿透小室的底部。将倒置的穿透小室在室温下在流罩内孵育2小时,然后将其正放。将EGM-2培养基加入到下部(700 μ L/孔)和上部(100 μ L/孔)的隔室中,并将穿透小室孵育48小时(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。然后用新鲜的EGM-2培养基更换下室中的EGM-2培养基。收集A549细胞,并在10%EBM中稀释至 5×10^5 个细胞/mL,然后加入到所有穿透小室的上室(100 μ L/孔)中,并将该平板孵育72小时(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。烟曲霉分生孢子(伊曲康唑敏感菌株NCPF2010和伊曲康唑抗性菌株 TR34-L98H)分别在Sabouraud葡萄糖琼脂中培养3天。通过用PBS-吐温(10mL;含有0.05%吐温-20、100U/mL青霉素和100U/mL链霉素的PBS)洗涤,从Sabouraud葡萄糖琼脂培养物制备任一菌株的储备分生孢子悬浮液。使用Neubauer血细胞计数器评估分生孢子计数,并用PBS调节至 10^6 个分生孢子/mL。在使用前立即在EBM(浓度为 10^5 分生孢子/mL)中制备分生孢子的工作储备液。

[0208] 将试验和参考化合物(或作为溶媒的纯DMSO)加入到24孔板(3 μ L/孔, 含有600 μ L 2%FBS EBM)的适当孔中用于下部隔室处理和96孔板(1 μ L/孔, 含有200 μ L的2%FBS EBM)用于处理上部隔室,以提供0.5%的最终 DMSO浓度。吸入上部隔室中的培养基,加入含有适当试验和参考化合物 或溶媒的培养基(100 μ L/孔)。然后将穿透小室转移到含有试验和参考化合物或DMSO溶媒的24孔板中。孵育1小时(3 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)后,将分生孢子 悬浮液(10 μ L/孔)加入到每个穿透小室的上部隔室中。然后将平板孵育24 小时(35 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。收集每个隔室的上清液(5 μ L/室)并储存(-20 $^{\circ}$ C)。收集 上清液后每天更换培养基,如上所述,用试验和参考化合物或DMSO处理 所有孔3天。继续收集样品,直到所有穿透小室中的真菌生长肉眼可见。然后通过ELISA(BioRad, CA, USA)检测下部隔室的上清液中GM的水平 作为烟曲霉侵袭的指标。

[0209] 细胞活力:刃天青试验

[0210] 在实验前将BEAS2B细胞接种于384孔平板(100 μ L;3000/孔/;BD Falcon,目录号353962)中的RPMI-LHC8(RPMI-1640和LHC8等比例混合)中一天。对于不含细胞的对照孔,加入RPMI-LHC8(100 μ L)。用Integra VIAFLO 96(Integra, Zizers, 瑞士)加入试验化合物(0.5 μ L DMSO溶液),得到0.5%的DMSO终浓度。将BEAS2B细胞与各试验化合物一起孵育1天(37 $^{\circ}$ C/5%CO₂,在RPMI-LHC8中)。加完刃天青储备溶液(5 μ L, 0.04%)后,将该平板再孵育4小时(37 $^{\circ}$ C/5%CO₂)。每个孔的荧光在545nm(激发)和590nm(发射)下使用多扫描仪(Clariostar:BMG Labtech)检测。计算每个孔相对于溶媒(0.5%DMSO)处理的细胞存活率的百分比损失。在适当的情况下,根据每个试验化合物的浓度-响应曲线产生的浓度-响应曲线计算CC₅₀值。

[0211] 体内抗真菌活性

[0212] 将烟曲霉(ATCC 13073[菌株:NIH 5233], American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)在麦芽琼脂(Nissui Pharmaceutical, 日本东京)平板上在RT(24 \pm 1 $^{\circ}$ C)下生长6-7天。将孢子无菌地从琼脂平板上移出并悬浮于含有0.05%吐温80和0.1%琼脂的无菌蒸馏水中。感染当天,通过血细胞计数器评估孢子计数,调整接种物以获得 1.67×10^8 个孢子/mL 生理盐水的浓度。

[0213] 为了诱导免疫抑制和中性粒细胞减少症,A/J小鼠(雄性,5周龄)在感染前3、2和1天用氢化可的松(Sigma H4881;125mg/kg,sc)和在感染前2天用环磷酰胺(Sigma C0768;250mg/kg,ip)给药。在第0天,用孢子悬浮液(35 μ L,经鼻内)感染动物。

[0214] 在第0天感染前30分钟并随后在第1、2和3天(代表预防性处理)或仅在第1、2和3天(代表治疗),每日一次鼻内给药(35 μ L 0.08–2.00mg/mL 在生理盐水中的悬浮液)。对于延长的预防性处理,将试验化合物(35 μ L, 0.0032或0.016mg/mL的在生理盐水中的悬浮液)每天一次鼻内给药,持续七天;然后在第0天感染前30分钟以及随后在感染1、2和3天后,或仅在第0天进行给药。将这些治疗范例的效果与局限于接种前一天和接种前30分钟以及随后在感染后第1、2和3天治疗所得的结果进行比较;或进一步减少至仅与感染前一天和感染前30分钟进行比较。每天监测动物体重,与第0天的体重相比减少 $\geq 20\%$ 的动物剔除。

[0215] 最后一次给药6小时后,将动物麻醉,气管插管并收集BALF。如以前所报道(Kimura等人,2013),使用血细胞计数器测定肺泡细胞总数,分别使用抗小鼠MOMA2-FITC(巨噬细胞)或抗小鼠7/4(嗜中性粒细胞)通过FACS分析(**EPICS**[®] ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)确定肺泡巨噬细胞和嗜中性粒细胞数。分别使用**Quantikine**[®]小鼠IFN- γ 、IL-17、IL-6或TNF- α ELISA试剂盒(R&D系统, Inc., Minneapolis, MN, USA)来检测BALF中IFN- γ 和IL-17以及血清中IL-6和TNF α 中的水平。一种氧化应激标记物MDA通过使用**OxiSelect**[®] TBARS Assay试剂盒(MDA Quantitation; Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, USA)进行测定。血清中的曲霉菌GM使用Platelia GM-EIA试剂盒(Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA)进行检测。截止(cut-off)指数通过公式计算:截止指数=样品中的OD/试剂盒中提供的截止对照品的OD。对于组织真菌负载测定,无菌地移出100mg肺组织,并在无菌蒸馏水中的0.2mL 0.1%琼脂中匀浆化。将连续稀释的肺匀浆接种在麦芽琼脂平板(50 μ L/板)上,并在24 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下孵育72至96小时。对每个平板上烟曲霉的菌落进行计数,真菌滴度以每克肺组织的CFU表示。

[0216] 将感染前三天每日施用氢化可的松(Sigma H4881;125mg/kg,sc)以及在感染前两天施用环磷酰胺(Sigma C0768;250mg/kg,ip)的严重免疫抑制的中性粒细胞减少的A/J小鼠(雄性,5周龄)用于评价鼻内施用化合物(I)和口服施用泊沙康唑的组合治疗的效果。在第0天将动物用35 μ L烟曲霉(ATCC 13073[菌株:NIH 5233])的孢子混悬液(1.67×10^8 孢子/mL生理盐水)鼻内感染。将在等渗盐水(0.4mg/mL)中制备为混悬液的化合物(I)在感染后第1–6天通过鼻内注射(35 μ L/小鼠)每日一次进行给药。感染后1–6天每天一次口服施用泊沙康唑(1mg/kg)。每天监测体重和生存情况,直到第7天。

[0217] 筛选结果概述

[0218] 化合物(I)显示出对唑类敏感的烟曲霉真菌生长(如通过刃天青试验法所评估)和支气管上皮细胞真菌感染的有效抑制活性(表2)。在这些试验系统中,化合物(I)显示出比伏立康唑和两性霉素B更高的效力以及与托替卡唑类似的效力。在最多、至少10 μM 浓度下用化合物(I)孵育对BEAS2B支气管上皮细胞的活力没有影响或影响很小。

[0219] 表2用伏立康唑、泊沙康唑、两性霉素B和化合物(I)处理对烟曲霉(NCPF2010)浮游真菌生长、对BEAS2B支气管上皮细胞的真菌感染和BEAS2B细胞活力的影响。

在所述测试系统中的 MIC ₅₀ / MIC ₇₅ / CC ₅₀ (nM)				
处理 (试验化合物)	浮游真菌生长 ¹		BEAS2B 细胞 感染 ²	BEAS2B 细胞活力 ³
	MIC ₅₀	MIC ₇₅	MIC ₅₀	CC ₅₀
[0220] 伏立康唑	90.8	168	154	>28600
泊沙康唑	3.64	6.94	4.48	>14300
两性霉素 B	28.5	64.4	nt	977
化合物(I)	1.98	5.02	5.43	>12200
化合物(I).4[² H]	nt	nt	3.15	>14600

[0221] 表格脚注:1. 刃天青-微量滴定法;2. 支气管上皮细胞;3. n=1-5;

[0222] 如培养基微量稀释试验所评估,化合物(I)还显示出对浮游真菌生长有效的抑制活性(表3)。在该试验中,与泊沙康唑、伏立康唑和两性霉素B相比,化合物(I)显示出对泊沙康唑抗性菌株(NCPF7099、NCPF7100和 TR34/L98H)和泊沙康唑敏感株(NCPF2010)二者都显著更高的效能。

[0223] 表3伏立康唑、泊沙康唑、两性霉素B和化合物(I)对烟曲霉分离株的浮游真菌生长的影响。

处理 (试验化合物)	对抗指定烟曲霉分离株的 MIC ₇₅ 值(nM) ¹			
	NCPF2010	NCPF7099	NCPF7100	L98H
伏立康唑	496	96.7	596	>2860
[0224] 泊沙康唑	15.3	112	71.5	150
两性霉素 B	382	365	>1080	209
化合物(I)	13.6	16.5	19.7	56.7
化合物(I).4[² H]	14.7	13.7	28.6	70.0

[0225] 表格脚注:1. 培养基微量稀释法, n=1-3

[0226] 使用CLSI培养基微量稀释法评估化合物(I)对较大范围真菌病原体生长的影响。发现化合物(I)是米根霉(Rhizopus oryzae)、新生隐球菌(Cryptococcus neoformans)、球毛壳菌(Chaetomium globosum)、产黄青霉(Penicillium chrysogenum)和红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)以及一些假丝酵母属物种(Candida Spp)的有效生长抑制剂(表4)。

[0227] 表4化合物(I)对一系列真菌菌种生长的影响。

[0228]

真菌剂	菌株	化合物(I)		伏立康唑		泊沙康唑	
		MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₁₀₀	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₁₀₀	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₁₀₀
黄曲霉	ATCC204304	1.0	>8.0	1.0	2.0	0.063	0.13
出芽曲霉	ATCC9348	>8.0	>8.0	>8.0	>8.0	0.25	1.0
白色假丝酵母	20240.047	0.031	>8.0	0.031	>8.0	0.031	>8.0
	ATCC10231	0.13	>8.0	0.25	>8.0	0.13	>8.0
	20183.073	0.5	>8.0	4.0	>8.0	0.25	>8.0
	20186.025	>8.0	>8.0	>8.0	>8.0	>8.0	>8.0
	ATCC36583	0.5	>8.0	0.25	>8.0	0.5	>8.0
光滑假丝酵母	R363	0.5	>8.0	>8.0	>8.0	0.5	>8.0
米根霉	ATCC11145	0.063	2.0	8.0	>8.0	0.13	>8.0
新生隐球菌	ATCC24067	0.008	1.0	0.016	1.0	0.016	0.25
球毛壳菌	ATCC44699	0.063	>8.0	0.5	1.0	0.13	0.25
产黄青霉	ATCC9480	0.031	>8.0	1.0	2.0	0.063	0.13
红色毛癣菌	ATCC10218	<0.008	0.031	<0.008	0.063	<0.008	0.031

[0229] 表格脚注：MIC₅₀/MIC₁₀₀＝通过目视检查对真菌生长抑制50％和100％所需的浓度 (CLSI)

[0230] 使用化合物 (I) (0.1μg/mL, 在上部隔室) 或泊沙康唑 (0.01μg/mL, 在下 室隔室) 的单一疗法在第1天抑制人肺泡双层中GM的产生。然而, 这些治 疗的抑制作用在此之后迅速消失 (表5)。相反, 化合物 (I) 与泊沙康唑的组合 治疗显示出对感染后侵袭的持续抑制。因此, 组合治疗的DFB₅₀为5.48天, 比使用单一化合物的值长得多。当化合物 (I) 与伊曲康唑、伏立康唑或卡泊 芬净组合治疗时, 组合治疗的这种协同作用或叠加效应也得到证实 (结果未 显示)。

[0231] 表5: 化合物 (I)、泊沙康唑和治疗组合对烟曲霉 (NCPF 2010) 侵入人肺 泡双层的下部隔室 (穿透小室) 的影响。

所述治疗的下部隔室中 GM 水平				
OD 值(相比对照的抑制%)				
治疗日	溶媒	化合物(I) ¹ 上部隔室	泊沙康唑 ² 下部隔室	组合治疗
0	0	0	0	0
1	0.68	0.091 (86)	0.064 (91)	0.007 (99)
2	1.19	1.15 (3.4)	1.01 (15)	0.011 (99)
3	1.19	1.14 (3.7)	1.14 (4.1)	0.025 (98)
4	1.18	1.13 (4.5)	1.17 (1.1)	0.11 (91)
5	1.18	1.18 (0.3)	1.18 (-0.6)	0.42 (64)
6	1.18	1.18 (-0.3)	1.19 (-1.1)	0.73 (38)
7	1.18	1.16 (0.9)	1.17 (0.3)	1.15 (2.0)
8	1.16	1.13 (2.8)	1.15 (0.8)	1.12 (3.7)
所述治疗的 DFB ₅₀ 值		1.13	1.45	5.48

[0233] 表格脚注:1.以0.1μg/mL给药;2.以0.01μg/mL给药;DFB₅₀:达到50%的对照的真菌负载的天数

[0234] 此外,这种组合治疗已经在感染烟曲霉的唑类抗性菌株TR34-L98H 的双层中进行了测试。(表6)在上部隔室用化合物(I) (1μg/mL)或在下部隔室用泊沙康唑(0.1μg/mL)的单一疗法显示有限的益处。相反,化合物(I)和泊沙康唑的组合对真菌侵入下部隔室显示出显著的抑制作用。在感染后第1天观察到组合治疗的有益效果,但在第2天后消失。

[0235] 表6化合物(I)、泊沙康唑和治疗组合对烟曲霉(TR34-L98H菌株)侵入人肺泡双层细胞系统(穿透小室)下部隔室的影响。

所述治疗的下部隔室中 GM 水平			
OD 值(相比对照的抑制%)			
治疗日	化合物(I) ¹ 上部隔室	泊沙康唑 ² 下部隔室	组合治疗
0	0	0	0
1	0.35	0.039 (88)	0.013 (96)
2	0.99	1.02 (-2.7)	0.082 (92)
3	0.99	0.97 (1.7)	0.54 (45)
4	1.01	1.02 (-1.4)	1.09 (-8.8)
所述治疗的 DFB ₅₀ 值	1.10	1.64	2.93

[0237] 表格脚注:1.以1 μ g/mL给药;2.以0.1 μ g/mL给药;DFB₅₀:达到50%的对照的真菌 负载的天数

[0238] 接种后第0天和第1-3天向免疫受损的中性粒细胞减少的小鼠鼻内给 药(预防性治疗)时,以头对头比较,在3天内检测的减少由烟曲霉感染引 起的体重减轻方面,化合物 (I) 显示比泊沙康唑更好的作用(表7)。

[0239] 表7:化合物 (I) 和泊沙康唑治疗对由烟曲霉感染引起的免疫受损的中 性粒细胞减少的小鼠的体重减轻的影响的比较。

由烟曲霉感染引起的体重减轻 ²			
药物治疗 ¹	(体重减轻的抑制%)		
	第 1 天	第 2 天	第 3 天
溶媒+孢子	9.2 \pm 1.5	14.3 \pm 1.9	19.3 \pm 1.4
泊沙康唑	7.3 \pm 2.0 (21)	13.4 \pm 1.9 (6)	18.1 \pm 2.0 (6)
化合物(I)	6.1 \pm 1.8 (34)	8.7 \pm 2.5 (39)	11.1 \pm 5.6 (42)

[0242] 表格脚注:1.以0.4mg/mL鼻内给药;2.与第0天的动物重量相比的体重减轻%。

[0243] 此外,用化合物 (I) 的预防和治疗性处理对于感染后肺部真菌负载以及 BALF和血清中的GM浓度都显示优于泊沙康唑的效果。用于预防和治疗 性给药方案的化合物 (I) 的数 据示于表8和图1、2和3 (ID₅₀值列于表9) 中。

[0244] 表8:化合物 (I) 预防和治疗性处理对烟曲霉感染的免疫受损的中性粒 细胞减少的小鼠肺中CFU以及BALF和血清中半乳甘露聚糖浓度的效果。

治疗方案	药物浓度 (mg/mL)	响应的抑制%		
		CFU (/mg 肺)	BALF 中的 GM(COI)	血清中的 GM (COI)
溶媒+孢子	无	28.4 ± 16.9	4.8 ± 0.40	5.3 ± 1.1
[0245] 化合物(I): 预防性处理	0.08	15.2 ± 13.7 (46)	0.70 ± 0.39 (85)	0.81 ± 0.52 (85)
	0.4	2.1 ± 1.6 (93)	0.37 ± 0.46 (92)	0.24 ± 0.18 (95)
	2	0.8 ± 0.7 (97)	0.13 ± 0.02 (97)	0.18 ± 0.07 (97)
	0.4	3.8 ± 1.0 (87)	0.24 ± 0.06 (95)	0.29 ± 0.11 (95)
化合物(I): 治疗性处理	2	1.9 ± 1.7 (93)	0.22 ± 0.14 (95)	0.25 ± 0.19 (95)
	10	0.5 ± 0.3 (98)	0.11 ± 0.05 (98)	0.24 ± 0.11 (95)

[0246] 表格脚注:真菌负载数据显示为平均值±标准误差(SEM;n=5-6)。

[0247] 表9:泊洛沙唑和化合物(I)的预防性处理对烟曲霉感染的免疫受损的嗜中性粒细胞减少的小鼠肺中真菌负载以及BALF和血清中半乳甘露聚糖浓度的ID₅₀值。

药物(预防性方案)	所述响应的 ID ₅₀ 值(mg/mL)		
	肺真菌负载	BALF 中的 GM	血清中的 GM
[0248] 化合物(I)	0.086	<0.08	<0.08
泊洛沙唑	0.24	1.3	0.47

[0249] 化合物(I)的预防性处理以类似于泊沙康唑的方式抑制BALF中的炎症细胞蓄积(表10)。此外,化合物(I)的预防性处理显示出比泊沙康唑对于BALF中的IL-17、IFN γ 和MDA浓度更好的抑制作用,并且在独立实验中化合物(I)和泊沙康唑的对比的ID₅₀值如表11中所示。

[0250] 表10:化合物(I)的预防和治疗性处理对巨噬细胞和嗜中性粒细胞在烟曲霉感染的免疫受损的中性粒细胞减少小鼠的BALF中蓄积的影响。

处理	药物浓度 (mg/mL)	BAL 中细胞数 $\times 10^5/\text{mL}$ (抑制%)	
		巨噬细胞	嗜中性粒细胞
溶媒+孢子		0.65 ± 0.14	0.49 ± 0.09
[0251] 化合物(I) 预防性处理	0.08	0.40 ± 0.15 (38)	0.37 ± 0.04 (24)
	0.4	0.32 ± 0.07 (51)	0.26 ± 0.12 (47)
	2	0.26 ± 0.05 (60)	0.22 ± 0.04 (55)
	0.4	0.43 ± 0.05 (34)	0.38 ± 0.04 (22)
	2	0.40 ± 0.11 (38)	0.34 ± 0.05 (31)
化合物(I) 治疗性处理	10	0.32 ± 0.07 (51)	0.27 ± 0.08 (45)

[0252] 表格脚注:细胞数的数据显示为平均值 \pm 标准误差 (SEM), N=5-6。

[0253] 表11:在烟曲霉感染的免疫受损的中性粒细胞减少小鼠中泊沙康唑和 化合物 (I) 的预防性处理对BALF中IL-17、IFN γ 和MDA水平的ID₅₀值。

药物(预防性方案)	对所述生物标志物的 ID ₅₀ 值(mg/mL)		
	IL-17	IFN γ	MDA
[0254] 化合物(I)	0.074	<0.08	0.11
泊沙康唑	0.61	0.22	0.69

[0255] 此外,当预防性或治疗性施用,显示化合物 (I) 对BALF中的IFN γ 、IL-17和MDA水平的影响的数据如表12中所示,并且对血清、IL-6和TNF α 的影响如表13中所述。

[0256] 表12:化合物 (I) 的预防和治疗性处理对烟曲霉感染的免疫受损的中性 粒细胞减少小鼠的BALF中的IFN γ 、IL-17和MDA水平的影响。

处理方案	药物浓度 (mg/mL)	BALF 中生物标志物浓度 (抑制%)		
		IFN γ (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)	MDA (μ g/mL)
溶媒+孢子		9.2 \pm 1.0	19.8 \pm 3.6	1.8 \pm 0.2
[0257] 化合物(I) 预防性	0.08	3.7 \pm 1.7 (60)	9.8 \pm 5.3 (51)	0.96 \pm 0.32 (47)
	0.4	3.0 \pm 0.8 (67)	6.7 \pm 4.9 (66)	0.57 \pm 0.22 (68)
	2	2.5 \pm 0.3 (73)	3.2 \pm 0.8 (84)	0.34 \pm 0.05 (81)
	0.4	4.3 \pm 2.2 (53)	8.5 \pm 2.9 (57)	0.45 \pm 0.10 (75)
	2	3.3 \pm 0.8 (64)	4.0 \pm 0.8 (80)	0.37 \pm 0.10 (79)
	10	2.1 \pm 0.3 (77)	2.9 \pm 0.7 (85)	0.25 \pm 0.05 (86)

[0258] 表格脚注:生物标志物浓度的数据显示为平均值 \pm 平均值的标准误差(SEM),N=5-6。

[0259] 表13:化合物(I)的预防和治疗性处理对烟曲霉感染的免疫受损的中性粒细胞减少小鼠的血清中IL-6和TNF α 水平的影响

处理方案	药物浓度 (mg/mL)	生物标志物浓度(pg/mL) (抑制%)	
		IL-6	TNF α
溶媒+孢子		284 \pm 112	25.6 \pm 8.0
[0260] 化合物(I) 预防性处理	0.08	159 \pm 73.3 (44)	11.8 \pm 5.9 (54)
	0.4	86.3 \pm 46.9 (70)	7.3 \pm 3.5 (71)
	2	44.5 \pm 12.2 (84)	4.7 \pm 0.4 (82)
	0.4	51.7 \pm 16.8 (82)	6.2 \pm 0.5 (76)
化合物(I) 治疗性处理	2	44.2 \pm 11.4 (84)	5.5 \pm 0.7 (79)
	10	35.9 \pm 10.4 (87)	4.9 \pm 0.6 (81)

[0261] 表格脚注:生物标志物浓度的数据显示为平均值 \pm 平均值的标准误差(SEM),N=5-6。

[0262] 在烟曲霉感染的免疫受损的中性粒细胞减少小鼠中,化合物(I)的治疗性处理也被发现对肺真菌负载、血清半乳甘露聚糖水平和BALF细胞因子浓度维持有效的抑制作用。(表7、8、9和10以及图1、2和3)。

[0263] 还评估了化合物(I)的延长的预防性给药对烟曲霉感染的免疫受损的中性粒细

胞减少小鼠中生物标志物的影响。发现用比以前的生物标志物研究中使用的剂量低25倍的化合物(I)进行的延长预防可抑制肺中的真菌负载以及BALF和血清中的GM浓度(表14)。此外,数据表明,在重复给药情况下肺中抗真菌作用的积累,因为与预防性治疗只添加一天相比,7天的预防产生更高的抗真菌作用。发现从第-7天至第0天的治疗在第3天产生了比在第-1天和第0天治疗更好的抗真菌作用,表明该化合物在肺中的持续作用。然而,这种缩短的给药方案仍然是预防性的。

[0264] 表14:化合物(I)延长的预防给药在烟曲霉感染的免疫受损的中性粒细胞减少小鼠中对肺中真菌负载(CFU)和BALF和血清中GM浓度的影响。

	处理方案 ¹ (给药天数)	化合物(I)剂量 (μg/mL)	响应的值和抑制% ³		
			CFU (/mg 肺)	BALF 中的 GM (COI)	血清中的 GM(COI)
	溶媒+孢子 ²	无	34.7±10.7	5.1±0.9	4.3±1.0
	-7 至+3	3.2	8.3±2.0 (76)	2.6±0.36 (49)	1.8±0.43 (58)
[0265]	-1 至+3	3.2	9.5±3.3 (73)	2.8±0.71 (45)	2.2±0.69 (49)
	-7 至+3	16	5.0±2.3 (86)	1.7±0.39 (67)	1.4±0.20 (67)
	-1 至+3	16	6.1±2.8 (82)	2.2±0.61 (57)	1.6±0.41 (63)
	-7 至 0	16	6.7±1.7 (81)	2.3±0.52 (55)	1.7±0.59 (60)
	-1、0	16	13.1±2.6 (62)	4.5±0.50 (12)	4.0±0.88 (7)

[0266] 表格脚注:1.所有药物处理组的N值为6;2.溶媒处理组的N值为5;3.真菌负载和GM水平的数据显示为平均值±标准误差和相对于溶媒的抑制百分比。

[0267] 评估了在严重免疫受损的中性粒细胞减少小鼠中接种烟曲霉后局部施用化合物(I)与口服泊沙康唑的联合治疗对存活率的影响。用化合物(I)(0.4mg/mL,鼻内给药)或用泊沙康唑(1.0mg/kg,口服给药)的单一治疗显示出非常有限的治疗益处。相反,化合物(I)和泊沙康唑的组合显示在感染后的存活时间显著增加(表15)。

[0268] 表15:化合物(I)和泊沙康唑作为单一疗法或联合疗法对感染烟曲霉的严重免疫受损的中性粒细胞减少小鼠的存活的影响。

	处理方案	剂量 (途径)	第 7 天的存活者(%)	生存中值 (天)	生存的对数秩检验(相对于感染)
	溶媒	无	0/6 (0)	5	-
	化合物(I)	0.4 mg/mL (经鼻)	0/6 (0)	6	p<0.05
[0269]	泊沙康唑	1 mg/kg (口服)	0/6 (0)	6.5	不显著
	化合物(I)+泊沙康唑	0.4mg/mL (经鼻) 1mg/kg (口服)	5/6 (83)	未确定	p<0.001

[0270] 表格脚注:每组N=8。

[0271] 体内药物动力学

[0272] 对于肺部治疗剂来说,常规使用的方法是向动物(例如小鼠)的肺给药,并在给药后的不同时间点收集血浆,以表征所得到的对所施用化合物的全身接触的情况。可以在这样的体内系统中测试本发明的化合物。

[0273] 化合物(I)的生物学特性概述

[0274] 已发现化合物(I)是烟曲霉浮游生物生长和支气管上皮细胞感染的有效抑制剂。化合物(I)还抑制了对泊沙康唑耐药和伏立康唑耐药的烟曲霉分离株的生长,显示出比泊沙康唑、伏立康唑和伊曲康唑对这些菌株更大的效力。化合物(I)还被发现是米根霉、新生隐球菌、球毛壳菌、产黄青霉和红色毛癣菌以及一些假丝酵母物种生长的有效抑制剂。在肺泡的体外模型中,化合物(I)无论作为单一疗法还是与泊沙康唑组合使用都对曲霉菌侵袭显示出令人印象深刻的活性。在体内,在感染烟曲霉的免疫受损的中性粒细胞减少小鼠中,化合物(I)对烟曲霉感染以及相关的肺部免疫应答表现出强烈的抑制作用,无论是预防性还是治疗性给药都是如此。化合物(I)在减少感染依赖性的体重减轻方面也是非常有效的。这些抑制作用优于泊沙康唑。在预防和治疗背景中观察到化合物(I)的有益的抗真菌作用是显著的。

[0275] 参考文献:

[0276] Agbetile,J.,Fairs,A.,Desai,D.,Hargadon,B.,Bourne,M.,Mutalithas,K.,Edwards,R.,Morley, J.P.,Monteiro,W.R.,Kulkarni,N.S.,Green,RH,Pavord,I.D.,Bradding,P.,Brightling,C.E., Wardlaw,A.J.and Pashley,C.H.Isolation of filamentous fungi from sputum in asthma is associated with reduced post-bronchodilator FEV1.Clin.Exp.Allergy,2012,42,782-91.

[0277] Bafadhel M.,McKenna S.,Aqbetile J.,Fairs A.,Desai D.,Mistry V.,Morley J.P.,Pancholi M., Pavord I.D.,Wardlaw A.J.,Pashley C.H.and Brightling C.E.Aspergillus fumigatus during stable state and exacerbations of COPD.Eur.Respir.J.,2014,43,64-71.

[0278] Bowyer P.and Denning D.W.Environmental fungicides and triazole resistance in Aspergillus. Pest Management Science,2014,70,173-178.

- [0279] Chishimba L.,Niven R.M,Fom M.,Cooley J.and Denning D.W.Voriconazole and Posaconazole Improve Asthma Severity in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and Severe Asthma with Fungal Sensitization.Pharmacotherapy, 2012,49,423-433.
- [0280] Chotirmall S.H.,O'Donoghue E.,Bennett K.,Gunaratnam C.,O'Neill S.J.and McElvaney N.G. Sputum *Candida albicans* presages FEV₁ decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis.Chest,2010,138,1186-95.
- [0281] CLSI M27-A2:Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard,2nd ed,NCCLS document M27-A2,Clinical and Laboratory Standards Institute,Wayne,PA,2002.
- [0282] CLSI M38-A2:Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi;Approved standard,2nd ed,CLSI document M38-A2,Clinical and Laboratory Standards Institute,Wayne,PA,2008.
- [0283] Denning D.W.,Pleuvry A.and Cole D.C.Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis.Bulletin of the World Health Organization,2011a,89,864- 872.
- [0284] Denning D.W.,Park S.,Lass-Flori C.,Fraczek M.G.,Kirwan M.,Gore R.,Smith J.,Bueid A., Moore C.B.,Bowyer P.and Perlin D.S.High frequency triazole resistance found in nonculturable aspergillus fumigatus from lungs of patients with chronic fungal disease.Clin. Infect.Dis.,2011b,52,1123-1129.
- [0285] Dimopoulos G.,Frantzeskaki F.,Poulakou G.and Armaganidis A.Invasive aspergillosis in the intensive care unit.Ann.NY Acad.Sci.,2012,1272,31-39.
- [0286] Geist M.J.P.,Egerer G.,Burhenne J.,Riedel K-D.and Mikus G.Induction of voriconazole metabolism by rifampin in a patient with acute myeloid leukemia:importance of interdisciplinary communication to prevent treatment errors with complex medications. Antimicrob.Agents Chemother.,2007,51,3455-3456.
- [0287] Hope W.W.,Kruhlak M.J.,Lyman C.A.,Petraitiene R.,Petraitis V.,Francesconi A.,Kasai M., Mickiene D.,Sein T.,Peter J.,Kelaher A.M.,Hughes J.E.,Cotton M.P.,Cotten C.J.,Bacher J.,Tripathi S.,Bermudez L.,Maugel T.K.,Zerfas P.M.,Wingard J.R.,Drusano G.L.and Walsh T.J.Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis:implications for antifungal therapy.J.Infect. Dis.,2007,195(3),455-466.
- [0288] Jeong S.,Nguyen P.D.and Desta Z.Comprehensive in vitro analysis of voriconazole inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes:major effect on CYPs 2B6,2C9,2C 19,and 3A. Antimicrob.Agents Chemother.,2009,53,541-551.
- [0289] Kaur S.and Singh S.Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*.Med, Mycol.,2014,52,2-9.

- [0290] Kimura G., Ueda K., Eto S., Watanabe Y., Masuko T., Kusama T., Barnes P.J., Ito K. and Kizawa Y. Toll-like receptor 3 stimulation causes corticosteroid-refractory airway neutrophilia and hyper-responsiveness in mice. *Chest*. 2013, 144, 99-105.
- [0291] Lat A. and Thompson G.R. Update on the optimal use of voriconazole for invasive fungal infections. *Infect. Drug Resist.*, 2011, 4, 43-53.
- [0292] Limper A.H., Knox K.S., Sarosi G.A., Ampel N.M., Bennett J.E., Catanzaro A., Davies S.F., Dismukes W.E., Hage C.A., Marr K.A., Mody C.H., Peffect J.R. and Stevens D.A. An Official American Thoracic Society Statement: Treatment of Fungal Infections in Adult Pulmonary and Critical Care Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, 183, 96-128.
- [0293] Levin M-D, den Hollander J.G., van der Holt B., Rijnders B.J., van Vliet M., Sonneveld P. and van Schaik R.H. Hepatotoxicity of oral and intravenous voriconazole in relation to cytochrome P450 polymorphisms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, 60, 1104-1107.
- [0294] Lin S-J, Scranz J and Teutsch S.M. *Aspergillus* case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 32, 358-366.
- [0295] Monteiro M.C., de la Cruz M, Cantizani J., Moreno C., Tormo J.R., Mellado E, De Lucas J.R., Asensio F., Valiente V., Brakhage A.A., Latgé JP, Genilloud O., Vicente F. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *J. Biomol. Screen.* 2012, 17, 542-549.
- [0296] Pasqualotto A.C., Powell G., Niven R. and Denning D.W. The effects of antifungal therapy on severe asthma with fungal sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respirology*, 2009, 14, 1121-127.
- [0297] Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L. Jr., Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.*, 2008, 3, 1494-500.
- [0298] Rankin, N. Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with granulocytosis and antibiotic therapy. *Br. Med. J.*, 1953, 183, 918-9.
- [0299] Rodriguez-Tudela J.L., Arendrup M.C., Arkan S., Barchiesi F., Bille J., Chyssanthou E., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Denning D.W., Donnelly J.P., Fegeler W., **Lass-Flörl** C., Moore C., Richardson M., Gaustad P., Schmalreck A., Velegraki A. and Verweij P. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST). EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. E.DEF 9.1 2008, 1-13.

[0300] Salmeron G., Porcher R., Bergeron A., Robin M., Peffault de Latour R., Ferry C., Rocha V., Petropoulou A., Xhaard A., Lacroix C., Sulahian A., Socié G., and Ribaud P. Persistent poor long-term prognosis of allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients surviving invasive aspergillosis. *Haematologica*, 2012, 97, 1357-1363.

[0301] Thompson G.R. and Patterson T.F. Pulmonary aspergillosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008, 29, 103-110.

[0302] Wexler D., Courtney R., Richards W., Banfield C., Lim J. and Laughlin M. Effect of posaconazole on cytochrome P450 enzymes: a randomized, open-label two-way crossover study. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, 21, 65-653.

[0303] 在整个说明书和所附权利要求中,除非上下文另有要求,单词“包括”和例如“包含”和“含有”之类的变体将被理解为意指包含所述整体、步骤、整体的组或步骤的组,但不排除任何其他整体、步骤、整体的组或步骤的组。

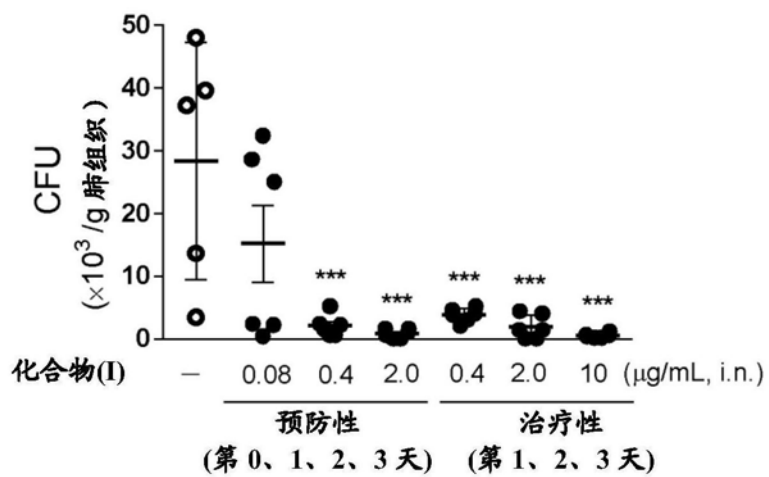


图1

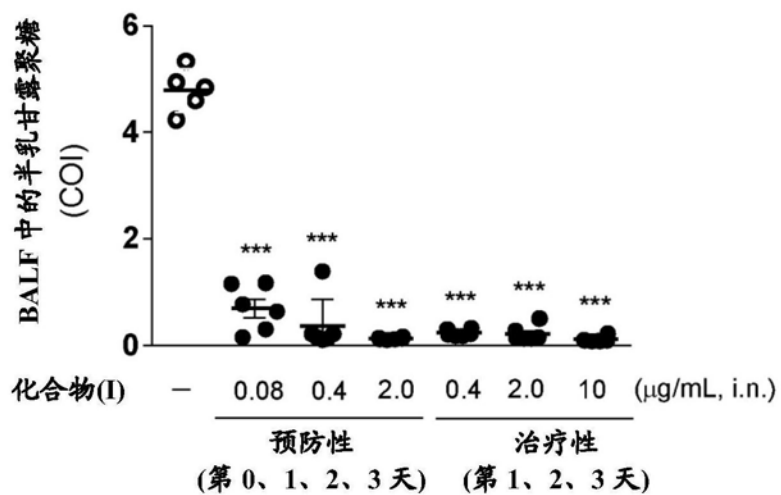


图2

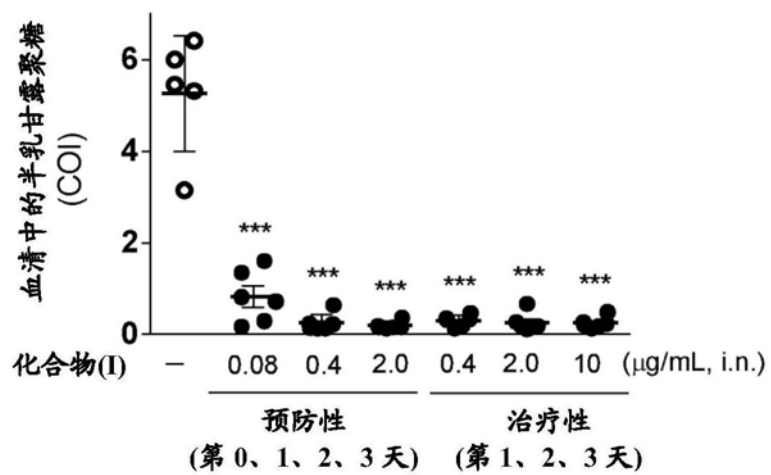


图3