

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 032454

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.05.31

(21) Номер заявки
201792558

(22) Дата подачи заявки
2016.05.20

(51) Int. Cl. C07D 405/06 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(54) ПРОТИВОГРИБКОВЫЙ 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-ТРИАЗОЛ-1-ИЛ)МЕТИЛ)-5-(2,4-ДИФТОРФЕНИЛ)ТЕТРАГИДРОФУРАН-3-ИЛ)МЕТОКСИ)-3-МЕТИЛФЕНИЛ)ПИПЕРАЗИН-1-ИЛ)-N-(2-ГИДРОКСИЦИКЛОГЕКСИЛ)БЕНЗАМИД ИЛИ ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМАЯ СОЛЬ

(31) 15168637.5

(32) 2015.05.21

(33) EP

(43) 2018.05.31

(86) PCT/GB2016/051467

(87) WO 2016/185225 2016.11.24

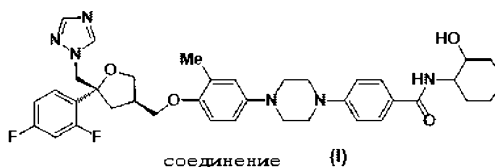
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПАЛМОСАЙД ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Колли Томас Кристофер, Ито
Кадзухиро, Стронг Питер, Суносе
Михиро, МакКонвилл Мэттью (GB)

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

(56) EP-A1-0957101
WO-A1-9517407
US-A-5039676
WO-A1-2013036866

(57) Изобретение относится к соединениям, как определено в описании, полезным при лечении микозов, к композициям, содержащим их, и их использованию в терапии.



B1

032454

032454

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Это изобретение относится к соединениям, полезным при лечении микозов, содержащим их композиции и их применению в терапии.

Уровень техники изобретения

За последние два десятилетия заболеваемость грибковыми инфекциями значительно возросла, а инвазивные формы являются ведущими причинами заболеваемости и смертности, особенно среди пациентов с ослабленным иммунитетом или иммуносупрессией. Диссеминированный кандидоз, аспергиллез легких и возникающие оппортунистические грибы являются наиболее распространенными агентами, вызывающими эти серьезные микозы. Особенностью грибов является то, что они способны генерировать внеклеточный матрикс (ЕСМ), который связывает их вместе и позволяет им прикрепляться к их субстратам *in vitro* или *in vivo*. Эти биопленки служат для их защиты от враждебных сред иммунной системы хозяина и для сопротивления антимикробному уничтожению (Kaur and Singh, 2013).

Аспергиллез легких может быть разделен на аспергиллез у пациентов, страдающих неинвазивным заболеванием в противоположность пациентам с инвазивным патологическим состоянием. Дополнительное подразделение используется для характеристики пациентов, которые демонстрируют аллергический компонент на аспергиллез (известный как АВРА; аллергический бронхоаспергиллез легких) по сравнению с пациентами, которые не демонстрируют. Факторы, провоцирующие аспергиллез легких, могут быть острыми, такими как воздействие высоких доз иммуносупрессивных лекарств или интубация в отделении интенсивной терапии. В качестве альтернативы, они могут быть хроническими, такие как предшествующая инфекция ТВ (Denning et al. 2011a). Хронические аспергилловые легочные инфекции могут оставлять пациентов с обширным и долговременным повреждением легких, требуя лечения пероральными азоловыми лекарственными препаратами на протяжении всей жизни (Limper et al. 2011).

Растущий объем исследований показывает, что аспергиллез может играть важную роль в клинической астме (Chishimba et al. 2012; Pasqualotto et al. 2009). Более того, недавно опубликованная работа скоррелировала аспергиллез с более неблагоприятными клиническими исходами у пациентов с ХОБЛ (Bafadhel et al. 2013). Аналогичным образом поперечные исследования показали связь между наличием *Aspergillus* spp. и *Candida* spp. в мокроте и ухудшением функции легких (Chotirmall et al. 2010; Agbetile et al. 2012).

Инвазивный аспергиллез (IA) демонстрирует высокую смертность у пациентов с ослабленным иммунитетом, например, у тех, кто подвергается трансплантации аллогенных стволовых клеток или трансплантации паренхиматозных органов (такой как трансплантация легких). Первый случай IA, зарегистрированный у пациента с ослабленным иммунитетом, произошел в 1953 году. Это событие произошло одновременно с введением в схемы лечения кортикостероидов и цитотоксической химиотерапии (Rankin, 1953). Инвазивный аспергиллез является основной причиной для серьезной обеспокоенности при лечении лейкоза и других гематологических злокачественных заболеваний, учитывая высокую заболеваемость и связанную с ним смертность. Смертность обычно превышает 50% (Lin et al. 2001), а долгосрочные показатели могут достигать 90% у реципиентов трансплантированных аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, несмотря на доступность пероральных лекарственных препаратов триазолового ряда (Salmeron et al. 2012). У пациентов, перенесших трансплантацию паренхиматозных органов (особенно легких), использование высоких доз стероидов делает пациентов уязвимыми к инфекции (Thompson и Patterson, 2008), что является серьезной проблемой. Заболевание также возникает в популяциях пациентов с менее тяжело ослабленным иммунитетом. К ним относятся пациенты, страдающие основной ХОБЛ или циррозом, пациенты, получающие высокие дозы стероидов, и лица с центральными венозными катетерами или поддерживаемые аппаратной вентиляцией легких (Dimopoulos et al. 2012).

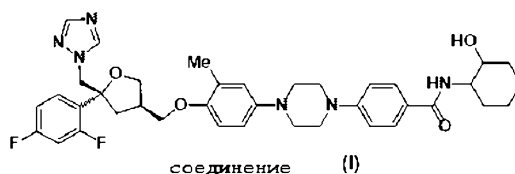
Существующие противогрибковые лекарства преимущественно вводят в виде доз либо перорально, либо системно. Эти обычно используемые пути доставки недостаточны для лечения инфекций легких и дыхательных путей, поскольку концентрации лекарств, достигаемые в зоне инфекции, как правило, ниже, чем в органах. Это особенно важно для печени, которая представляет собой зону токсического действия: вплоть до 15% пациентов, лечимых вориконазолом, страдают повышенными уровнями трансаминаз (Levin et al. 2007; Lat и Thompson, 2011). Воздействие на печень также приводит к значительным лекарственным взаимодействиям, возникающим в результате ингибирования печеночных ферментов P450 (Jeong, et al. 2009; Wexler et al. 2004).

Более того, широкое использование триазолов как в медицине, так и в сельском хозяйстве привело к растущему и проблематичному появлению резистентных микозов в некоторых локализациях (Denning et al. 2011b; Bowyer и Denning, 2014).

Очевидно, что существует срочная медицинская потребность в новых противогрибковых лекарственных препаратах, которые обеспечивают улучшенную эффективность и лучшие профили общей переносимости.

Сущность изобретения

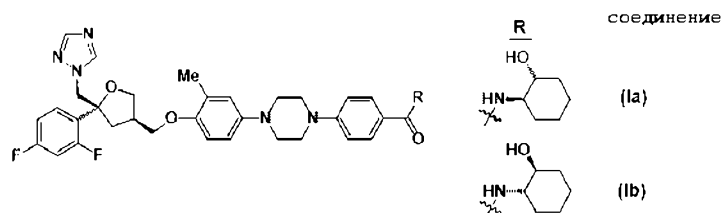
В первом аспекте изобретение предоставляет соединение (I)



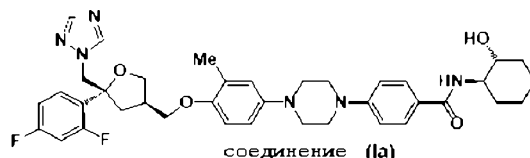
которое представляет собой 4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифтор-фенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-(2-гидроксициклогексил)-бензамид, или его фармацевтически приемлемую соль ("соединение изобретения").

Соединение (I) содержит два стереогенных центра в пределах 2-аминоциклогексанолевого радикала и предоставлено в виде любого из его четырех возможных стереоизомеров, либо в виде единственного стереоизомера, либо в виде смеси стереоизомеров в любом соотношении (включая рацемические смеси).

В предпочтительном аспекте изобретение предоставляет соединение (I) в виде стереоизомера, выбранного из соединений (Ia) и (Ib), проиллюстрированных ниже, которые представляют собой два стереоизомера, полученных из энантиомеров транс-2-аминоциклогексанола, и его фармацевтически приемлемых солей



В более предпочтительном аспекте изобретение предоставляет соединение (Ia), изображенное ниже



которое представляет собой 4-(4-4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифтор-фенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-((1R,2R)-2-гидроксициклогексил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль.

Соответственно, соединение (I), такое как соединение (Ia), предоставлено в виде единственного стереоизомера.

Биологические данные, раскрытые в данном документе ниже, показывают, что соединение (I) и его стереоизомерное соединение (Ia), в частности, являются мощными ингибиторами роста *Aspergillus fumigatus* в анализах *in vitro*. У мышей с иммуносупрессией соединение (Ia) продемонстрировало мощное подавление инфекций, вызванных *Aspergillus fumigatus*.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 демонстрирует действие терапевтической обработки соединением (Ia) на CFU в легких мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*.

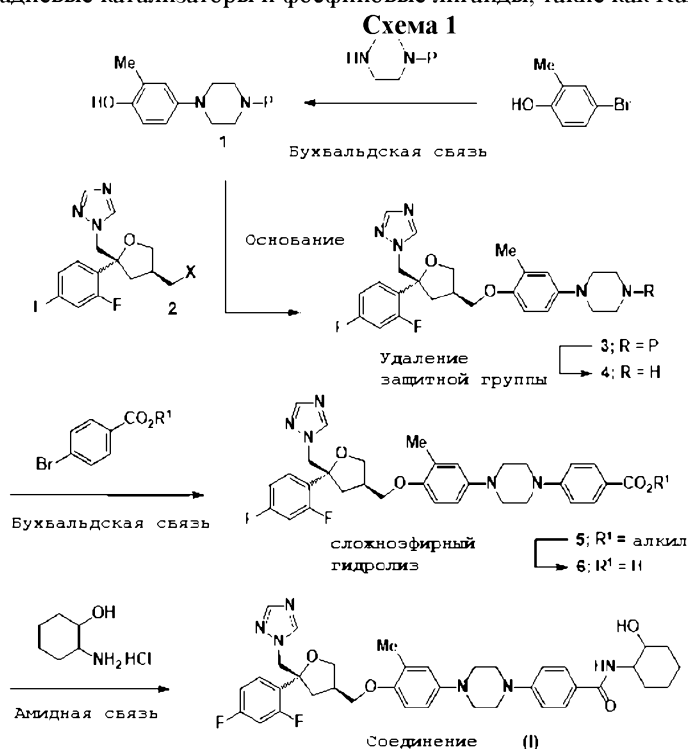
Фиг. 2 показывает действие терапевтической обработки соединением (Ia) на концентрации галактоманна в сыворотке у мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*.

Фиг. 3 показывает действие терапевтической обработки соединением (Ia) на содержание ДНК *Aspergillus fumigatus* в легких мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*.

Подробное описание изобретения

Соединение изобретения может быть получено из коммерчески доступных исходных материалов посредством методики синтеза, представленной ниже (схема 1). Бухвальдская связь защищенного подходящим образом производного пиперазина с 4-бром-2-метилфенолом в условиях, обычно используемых для таких реакций, обеспечивает N-арилированный продукт 1. Подходящая аминозащитная группа (P) для таких трансформаций представляет собой уретановую группу, такую как Вос группа (P=CO₂^tBu). Специалистам в данной области должно быть ясно, что для воздействия на трансформации такого рода могут быть использованы самые разнообразные условия. В частности,

обычно в присутствии основания, например карбоната цезия или гексаметилдисилазида лития, используют палладиевые катализаторы и фосфиновые лиганды, такие как RuPhosG3 и RuPhos.



Реакция полученного в результате фенола 1 с соответствующим электронакцепторным производным ((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метанола (2, X=OH) в щелочных условиях приводит к образованию эфира 3. Примером такого соединения является соответствующий тозилат (2, X=OTs), который легко доступен с высокой энантиомерной чистотой из коммерческих источников. Хотя тозилат является иллюстративным, X также может быть альтернативной уходящей группой, такой как галоген, обычно хлор. Селективное удаление аминозащитной группы открывает монозамещенный пиперазин 4. В случае производного Boc (R=CO²tBu), стадию снятия защиты обычно проводят путем воздействия карбамата на сильную минеральную кислоту или сильную органическую кислоту, такую как TFA, либо неразбавленную, либо в присутствии растворителя, такого как DCM.

Вторая Бухвальдская связь амина 4 с алкил 4-бромбензоатом в щелочных условиях и содействии катализатора приводит к образованию N, N'-бисариллированного продукта 5, в котором R' представляет низший алкил, такой как алкил C₁₋₅, например, метил или этил. Омыление эфира 5 обычно проводят путем обработки основанием, таким как гидроксид щелочного металла, в смеси воды и подходящего смешивающегося с водой растворителя. Реакция кислотного продукта 6 с 2-аминоциклогексаноном в стандартных условиях соединения амидов, широко доступных в данной области, предоставляет соединение (I). Каждый из четырех отдельных стереоизомеров соединения (I) может быть получен с использованием соответствующего единственного стереоизомера 2-аминоциклогексанола. Каждый из соответствующих стереоизомеров 2-аминоциклогексанола коммерчески доступен с высокой стереоизомерной чистотой.

Защитные группы и средства для их удаления описаны в "Protective Groups in Organic Synthesis" Theodora W. Greene и Peter G. M. Wuts, опубликованной John Wiley & Sons Inc; 4th Rev Ed. 2006, ISBN-10: 0471697540. Обзор методологий получения амидов описан в "Amide bond formation and peptide coupling" Montalbetti, C.A.G.N. и Falque, V. Tetrahedron, 2005, 61, 10827-10852.

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) включают, в частности, фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот указанных соединений. Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот соединений формулы (I) включают терапевтически активные нетоксичные соли присоединения кислот, которые могут образовывать соединения формулы (I). Эти фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот могут быть легко получены путем обработки формы свободного основания такими подходящими кислотами в подходящем растворителе или смеси растворителей. Соответствующие кислоты включают, например, неорганические кислоты, такие как галогеноводородные кислоты, например, соляная или бромистоводородная кислота, серная, азотная, фосфорная кислоты и т.п.; или органические кислоты, такие как, например, уксусная, пропановая, гидроксипропановая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, малеиновая, фумаровая, яблочная,

винная, лимонная, метансульфоновая, этансульфоновая, бензолсульфоновая, п-толуолсульфоновая, цикламвая, салициловая, п-аминосалициловая, павовая кислота и т.п.

И наоборот, указанные солевые формы могут быть превращены путем обработки подходящим основанием в форму свободного основания.

Определение соединения (I) подразумевает включение всех таутомеров указанного соединения.

Как термин используется в данном документе, "единственный стереоизомер" соединения (I) представляет собой стереоизомер, предоставленный в форме как высокой диастереомерной, так и высокой энантиомерной чистоты, т.е. по существу не содержащий другие три стереоизомера соединения (I), которые возникают в результате присутствия в них 2-аминоциклогексанолового радикала. Обычно единственный стереоизомер составляет по меньшей мере 98, 99, 99,5 или 99,9% м/м содержания соединения (I) (т.е. другие стереоизомеры составляют менее чем 2, 1, 0,5 или 0,1% м/м содержания соединения (I)).

Определение соединения (I) имеет в виду, что оно включает все сольваты указанного соединения (включая сольваты солей указанного соединения) если контекст конкретно не указывает на иное. Примеры сольватов включают гидраты.

Соединение раскрытия включает варианты осуществления, в которых один или более определенных атомов являются изотопами природного происхождения или неприродного происхождения. В одном варианте осуществления изотоп представляет собой стабильный изотоп. Таким образом, соединения раскрытия включают, например, содержащие дейтерий соединения и т.п.

Раскрытие также распространяется на все полиморфные формы соединения, определенного в данном документе.

Новые промежуточные продукты, как описано в данном документе, такие как соединения формулы (3), (4), (5) и (6) и их соли, составляют дополнительный аспект изобретения. Соли включают фармацевтически приемлемые соли (такие как соли, упомянутые выше) и соли, не являющиеся фармацевтически приемлемыми. Соли кислот (например, карбоновых кислот) включают соли металлов первой и второй группы, включая соли натрия, калия, магния и кальция.

В варианте осуществления предоставлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение изобретения необязательно в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

Соответственно соединение изобретения вводят местно в легкие или нос, в частности местно в легкие. Таким образом, в варианте осуществления предоставлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение изобретения необязательно в комбинации с одним или более местно приемлемыми разбавителями или носителями.

Подходящие композиции для легочного или интраназального введения включают порошки, жидкие растворы, жидкие суспензии, капли в нос, содержащие растворы или суспензии или аэрозоли под давлением или не под давлением.

Композиции можно удобно вводить в стандартной лекарственной форме и можно получать любыми способами, хорошо известными в фармацевтической области, например, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA. (1985). Композиции также можно удобно вводить в лекарственной форме со структурно обособленными единицами.

Местное введение в нос или в легкие можно обеспечить посредством использования готовой формы не под давлением, такой как водный раствор или суспензия. Такие готовые формы можно вводить посредством небулайзера, например небулайзера, который может быть переносным и портативным или для применения дома или в больнице (т.е. непортативным). Примером устройства является ингалятор RESPIMAT. Готовая форма может содержать эксципиенты, такие как вода, буферы, регулирующие тоничность агенты, регулирующие pH агенты, модификаторы вязкости, поверхностно-активные вещества и соразтворители (такие как этанол). Суспензионные жидкие и аэрозольные готовые формы (под давлением ли или не под давлением) будут обычно содержать соединение изобретения в мелко измельченной форме, например с D_{50} , составляющим 0,5-10 мкм, например приблизительно 1-5 мкм. Распределение частиц по размеру может быть представлено с применением значений D_{10} , D_{50} и D_{90} . Срединное значение распределения частиц по размеру D_{50} определяется как размер частиц в микрометрах, который делит распределение пополам. Измерение, полученное с помощью лазерной дифракции, более точно описывается как распределение объема и, следовательно, значение D_{50} , полученное с использованием этой процедуры, более содержательно называется значение Dv_{50} (срединное для объема распределения). Как используется в данном документе, значения Dv относятся к распределению частиц по размеру, измеренному с применением лазерной дифракции. Аналогичным образом, значения D_{10} и D_{90} , используемые в контексте лазерной дифракции, взяты для обозначения значений Dv_{10} и Dv_{90} и относятся к размеру частиц, когда 10% распределения лежит ниже значения D_{10} , и 90% распределения лежит ниже значения D_{90} соответственно.

Согласно одному конкретному аспекту изобретения, предоставлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение изобретения в форме частиц, суспендированных в водной среде. Водная среда обычно содержит воду и один или более эксципиентов, выбранных из буферов, регулирующих

тоничность агентов, регулирующих pH агентов, модификаторов вязкости и поверхностно-активных веществ.

Местное введение в нос или легкие также можно обеспечить посредством использования аэрозольной готовой формы. Аэрозольные готовые формы обычно содержат активный ингредиент, суспендированный или растворенный в подходящем аэрозольном пропелленте, таком как хлорфторуглерод (CFC) или гидрофторуглерод (HFC). Подходящие CFC пропелленты включают трихлормонофторметан (пропеллент 11), дихлортетрафторметан (пропеллент 114) и дихлордифторметан (пропеллент 12). Подходящие HFC пропелленты включают тетрафторэтан (HFC-134a) и гептафторпропан (HFC-227). Пропеллент обычно составляет 40-99,5%, например 40-90% от веса общей композиции для ингаляций. Готовая форма может содержать эксципиенты, включая сорастворители (например, этанол) и поверхностно-активные вещества (например, лецитин, сорбитан триолеат и т.п.). Другие возможные эксципиенты включают полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глицерин и т.п. Аэрозольные готовые формы упаковываются в канистры, и подходящая доза доставляется с помощью дозирующего клапана (например, как поставляется Bepak, Valois или 3M или в качестве альтернативы Aptar, Coster или Vari).

Местное введение в легкие также можно обеспечить посредством использования готовой формы в виде сухого порошка. Готовая форма в виде сухого порошка будет содержать соединение раскрытия в мелко измельченной форме, обычно с MMD, составляющим 1-10 мкм или D₅₀, составляющим 0,5-10 мкм, например приблизительно 1-5 мкм. Порошки соединения изобретения в мелко измельченной форме могут быть получены посредством способа микронизации или аналогичным способом уменьшения размера. Микронизация может быть выполнена с применением струйной мельницы, такой как струйная мельница, произведенная Hosokawa Alpine. Полученное в итоге распределение частиц по размерам может быть измерено с применением лазерной дифракции (например, инструментом Malvern Mastersizer 2000S). Готовая форма будет обычно содержать приемлемый в большинстве случаев разбавитель, такой как лактоза, глюкоза или маннитол (предпочтительно лактоза), обычно со сравнительно большим размером частиц, например, MMD, составляющим 50 мкм или более, например, 100 мкм или более или D₅₀, составляющим 40-150 мкм. Как используется в данном документе, термин "лактоза" относится к содержащему лактозу компоненту, включая моногидрат α -лактозы, моногидрат β -лактозы, безводную α -лактозу, безводную β -лактозу и аморфную лактозу. Компоненты лактозы могут быть обработаны посредством микронизации, просеивания, размалывания, прессования, агломерирования или сушки распылением. Коммерчески доступные формы лактозы в различных формах также включают, например, продукты Lactohale® (лактоза категории для ингаляций; DFE Pharma), InhaLac®70 (просеянная лактоза для ингалятора сухого порошка; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) и Respitose® (просеянная лактоза категории для ингаляций; DFE Pharma). В одном варианте осуществления лактозный компонент выбирают из группы, состоящей из моногидрата α -лактозы, безводной α -лактозы и аморфной лактозы. Предпочтительно, лактоза представляет собой моногидрат α -лактозы.

Готовые формы в виде сухого порошка также могут содержать другие эксципиенты, такие как стеарат натрия, стеарат кальция или стеарат магния.

Готовая форма в виде сухого порошка обычно доставляется с применением устройства ингалятора сухого порошка (DPI). Иллюстративные системы доставки сухого порошка включают SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, SKYHALER, ACCUHALER и CLICKHALER. Дополнительные примеры систем доставки сухого порошка включают ECLIPSE, ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, ингалятор сухого порошка ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR и PROHALER.

Соединение изобретения полезно при лечении микозов и для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с микозами.

В аспекте изобретения предоставлено применение соединения изобретения в производстве лекарственного средства для лечения микозов и для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с микозами.

В другом аспекте изобретения предоставлен способ лечения пациента с микозом, который включает введение указанному пациенту эффективного количества соединения изобретения.

В другом аспекте изобретения предоставлен способ предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с микозами, у больного, который включает введение указанному пациенту эффективного количества соединения изобретения.

В частности, микозы могут быть вызваны *Aspergillus* spp., такими как *Aspergillus fumigatus*.

Заболеванием, ассоциированным с микозом, является, например, аспергиллез легких.

Соединение изобретения можно использовать с профилактической целью посредством введения указанного соединения до начала микоза.

Больные включают больных людей и животных, главным образом больных людей.

Соединение изобретения особенно полезно для лечения микозов, таких как инфекция *Aspergillus fumigatus*, и для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с микозами, такого как инфекция *Aspergillus fumigatus* у людей с риском развития. Люди с риском развития включают недоношенных новорожденных, детей с врожденными пороками развития легких или сердца, людей с ослабленным иммунитетом (например, людей, страдающих ВИЧ-инфекцией), астматиков, людей с кистозным фиброзом, пожилых людей и людей, страдающих от хронических сердечных патологических состояний, поражающих сердце или легкие (например, застойную сердечную недостаточность или хроническое обструктивное заболевание легких).

Соединение изобретения полезно для лечения других микозов (и предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с ними), включая микозы, вызванные *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Cladosporium herbarum*, *Trichophyton rubrum*, *Candida* spp., например, *Candida albicans*, *Candida glabrata* и *Candida krusei* и другими *Aspergillus* spp. напр., *Aspergillus flavus*.

Ожидается, что соединение изобретения будет полезно при лечении азолорезистентных микозов (и профилактики или лечения ассоциированных с ним заболеваний), например, вызванных азолорезистентными *Aspergillus* spp. напр., *Aspergillus fumigatus*.

Соединение изобретения можно вводить в комбинации со вторым или дополнительным активным ингредиентом. Второй или дополнительные активные ингредиенты могут, например, быть выбраны из других противогрибковых агентов, включая азоловые противогрибковые агенты (такие как вориконазол или позаконазол), амфотерицин В, эхинокандин (такой как каспофунгин) и ингибитор 3-гидрокси-3-метил-глутарил-СоА редуктазы (такой как ловастатин, правастатин или флувастатин). Другие примеры подходящих азоловых противогрибковых агентов включают итраконазол и изавуконазол.

Второй или дополнительно активный ингредиент, например, может быть выбран из вориконазола, позаконазола, итраконазола и каспофунгина.

Второй или дополнительные активные ингредиенты включают активные ингредиенты, подходящие для лечения или предотвращения микоза, такого как инфекция *Aspergillus fumigatus* или заболевание, ассоциированное с микозом, такое как инфекция *Aspergillus fumigatus* или состояния, сопутствующие микозу, такому как инфекция *Aspergillus fumigatus*.

Соединение изобретения может быть составлено совместно со вторым или дополнительным активным ингредиентом, или второй или дополнительный активный ингредиент может быть составлен для раздельного введения одним или различными путями.

Например, соединение изобретения можно вводить пациентам, уже системно лечившимся противогрибковым препаратом, таким как вориконазол или позаконазол или, в качестве альтернативы, итраконазол или изавуконазол.

Например, соединение изобретения может быть составлено совместно с одним или более агентами, выбранными из амфотерицина В, эхинокандина, такими как каспофунгин, и ингибитором 3-гидрокси-3-метил-глутарил-СоА редуктазы, таким как ловастатин, правастатин или флувастатин.

Согласно аспекту изобретения, предоставлен набор частей, содержащий (a) фармацевтическую композицию, содержащую соединение изобретения необязательно в комбинации с одним или более разбавителями или носителями; (b) фармацевтическую композицию, содержащую второй активный ингредиент необязательно в комбинации с одним или более разбавителями или носителями; (c) необязательно одну или более дополнительных фармацевтических композиций, каждая из которых содержит третий или дополнительный активный ингредиент необязательно в комбинации с одним или более разбавителями или носителями; и (d) инструкции для введения фармацевтических композиций нуждающемуся в них пациенту. Нуждающийся в них пациент может страдать или у него может подозреваться микоз, такой как инфекция *Aspergillus fumigatus*.

Соединение изобретения можно вводить с подходящим интервалом, например один раз в день, дважды в день, три раза в день или в четыре раза в день.

Ожидается, что подходящая величина дозы для человека среднего веса (50-70 кг) составляет приблизительно от 50 мкг до 10 мг/день, например от 500 мкг до 5 мг/день, хотя точную дозу, подлежащую введению, может определить специалист в данной области.

Ожидается, что соединение изобретения имеет один или более из следующих благоприятных качеств:

мощная противогрибковая активность, особенно активность против *Aspergillus* spp., например, *Aspergillus fumigatus*, особенно после местного введения в легкие или нос;

большая продолжительность действия в легких, предпочтительно соответствующая одному введению дозы в сутки;

незначительное системное воздействие после местного введения в легкие или нос; и

приемлемый профиль безопасности, особенно после местного введения в легкие или нос.

Экспериментальный раздел

Сокращения, используемые в данном документе, определены ниже (табл. 1). Любые не определенные сокращения предназначены для передачи их общепринятого значения.

Таблица 1

Сокращения	
ABPA	аллергический бронхоаспергиллез легких
aq	водный
ATCC	американская коллекция типовых культур
BALF	бронхоальвеолярная промывная жидкость
BEAS2B	эпителий бронхов+гибрид аденовируса 12-SV40, линия 2B
Boc	трет-бутилоксикарбонил
br	широкий
BSA	бычий сывороточный альбумин
CC ₅₀	концентрация цитотоксичности 50% клеток
CFU	колониеобразующая единица (единицы)
CLSI	Институт клинических и лабораторных стандартов
COI	индекс отсечки
conc	концентрация
d	двойная частица
DCM	дихлорметан
DMAP	4-диметиламинопиридин
DMEM	среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко
DMF	N,N-диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
DNA	дезоксирибонуклеиновая кислота
DSS	декстрансульфат натрия
EBM	базовая среда для эндотелиальных клеток
ECM	экстрацеллюлярный матрикс
EDCI	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид
ee	энантиомерный избыток
EGM	ростовая среда для эндотелиальных клеток
EUCAST	Европейский комитет по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам
(ES ⁺)	электрораспылительная ионизация, положительный режим
EtOAc	этилацетат
FAM	6-флуоресцеин амидит
FBS	фетальная бычья сыворотка
GM	галактоманнан
ч	час (часы)

HPAEC	первичные эндотелиальные клетки легочной артерии человека
IA	инвазивный аспергиллез
i.n.	интраназальный
i.t.	интратрахеальный
LC-MS/MS	жидкостная хроматография-масс-спектрометрия
Li Hep	литий-гепарин
LiHMDS	бис-(триметилсилил)амид лития
(M+H) ⁺	протонированный молекулярный ион
MDA	малондиальдегид
Me	метил
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
MHz	мегагерц
MIC ₅₀	50% минимальной подавляющей концентрации
MIC ₇₅	75% минимальной подавляющей концентрации
MIC ₉₀	90% минимальной подавляющей концентрации
мин	минута (минуты)
MMD	средний массовый диаметр
MOI	множественное заражение
MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота
m/z	отношение массы к заряду
NCPF	национальная коллекция патогенных грибов
ЯМР	ядерно-магнитный резонанс (спектроскопия)
NT	не протестирован
OD	оптическая плотность
PBS	фосфатно-буферный солевой раствор
PCR	полимеразная цепная реакция
P	защитная группа
q	квартет
RT	комнатная температура
RP HPLC	обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
RPMI	среда Roswell Park Memorial Institute
RuPhos	2-дициклогексилфосфино-2',6'-диизопропоксибифенил
RuPhosG 3	(2-дициклогексилфосфино-2',6'-диизопропоксибифенил) [2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]-палладий (II) метансульфонат
s	синглет
sat	насыщенный

sc	подкожный
SDS	додецилсульфат натрия
t	триплет
TAMRA	тетраметил-6-карбоксиродамин
TE	трис-EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)
TFA	трифторуксусная кислота
THF	тетрагидрофуран
TR34/L 98H	штамм <i>A. fumigatus</i> , содержащий замещение лейцина на гистидин в кодоне 98 и 34- bp tandemных повторов
TR46/Y 121F/T 289A	штамм <i>A. fumigatus</i> , содержащий замещение тирозина на фенилаланин в кодоне 121, замещение треонина на аланин в кодоне 289 и tandemных повторов 46 пар оснований
vol	объем (объемы)

Общие процедуры

Все реагенты и растворители были получены либо из коммерческих источников, либо получены согласно литературным ссылкам. Если не указано иное, все реакции проходили при перемешивании. Органические растворы обычно сушили над безводным сульфатом магния.

Аналитические методы

Методы обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Колонку Waters Xselect CSH C18 XP, 2,5 мкм (4,6×30 мм) при 40°C; скорость потока 2,5-4,5 мл·мин⁻¹ элюировали с градиентом H₂O-MeCN, содержащим либо 0,1% о/о муравьиной кислоты, (способ 1a), либо 10 mM NH₄HCO₃ в воде (способ 1b) в течение 4 мин с использованием УФ-детектирования при 254 нм. Информация о градиенте: 0-3,00 мин, линейно изменялся от 95% H₂O-5% MeCN до 5% H₂O-95% MeCN; 3,00-3,01 мин, сохранялся при 5% H₂O-95% MeCN, скорость потока увеличивалась до 4,5 мл·мин⁻¹; 3,01-3,50 мин, сохранялся при 5% H₂O-95% MeCN; 3,50-3,60 мин, возвращался к 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока снизилась до 3,50 мл·мин⁻¹; 3,60-3,90 мин, сохранялся при 95% H₂O-5% MeCN; 3,90-4,00 мин, сохранялся при 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока снизилась до 2,5 мл·мин⁻¹.

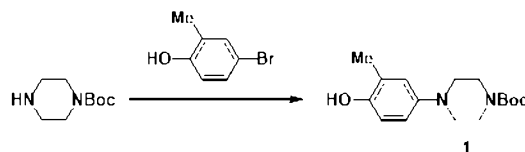
¹H ЯМР-спектроскопия.

¹H Спектры ЯМР были получены на спектрометре Bruker Advance III при 400 МГц с использованием в качестве эталона остаточного недеиетеринизированного растворителя и, если не указано иное, проводили в DMSO-d₆.

Получение соединений (1a-d): стереоизомеры соединения (1).

Ранее сообщалось о синтезах оптически чистых цис- и транс-2-аминогексинолов (Jacobsen et al. 1997). Эти материалы доступны в высокой энантиомерной чистоте из многочисленных коммерческих источников и используются в поставляемом виде.

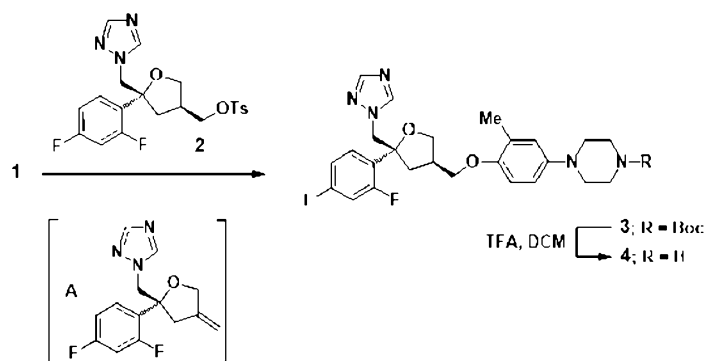
трет-Бутил 4-(4-гидрокси-3-метилфенил)пиперазин-1-карбоксилат.



Колбу, наполненную трет-бутилпиперазин-1-карбоксилатом (19,1 г, 103 ммоль), 4-бром-2-метилфенол (16,0 г, 86,0 ммоль), RuPhos (798 мг, 1,71 ммоль) и RuPhos G3 (1,43 г, 1,71 ммоль) три раза опорожняли и вновь заполняли азотом. Через канюлю добавляли раствор LiHMDS (1 M в THF, 257 мл, 257 ммоль) и реакционную смесь нагревали при 70°C в течение 3 ч. После охлаждения до RT реакцию в смеси останавливали посредством добавления 1 M водного раствора соляной кислоты (400 мл) при 0°C, а затем нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (400 мл). Слой аq экстрагировали EtOAc (1×400 мл, затем 2×200 мл) и объединенные органические экстракты промывали солевым раствором (500 мл) и сушили. Летучие вещества удаляли в вакууме с получением неочищенного продукта, который растирали в диэтиловом эфире: гексане (2:1) (750 мл) и собирали посредством фильтрования с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения 1, в виде розового твердого вещества (20,7 г, 76%); R_t 2,07 мин (способ 1b); m/z 293 (M+H)⁺ (ES⁺);

^1H ЯМР δ : 1,41 (9H, s), 2,07 (3H, s), 2,86-2,88 (4H, m), 3,41-3,43 (4H, m), 6,58-6,66 (2H, m), 6,71 (1H, d) и 8,73 (1H, s).

1-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-Триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин.

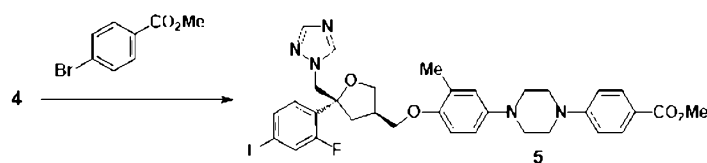


К раствору промежуточного соединения 1 (21,5 г, 66,1 ммоль) в DMSO (408 мл) добавляли водный раствор гидроксида натрия (28,3 мл, 3,5 М, 99,0 ммоль). Смесь перемешивали при RT в течение 30 мин, а затем частями обрабатывали ((3S,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метил-4-метилбензолсульфонатом 2 (ex APiChem, номер по каталогу: AC-8330, 32,7 г, 72,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 18 ч, охлаждали до RT и добавляли воду (600 мл). Полученную в результате смесь экстрагировали EtOAc (3×500 мл) и объединенные органические экстракты промывали sat aq NaHCO₃ (2×500 мл) и соевым раствором (500 мл), а затем сушили и выпаривали в вакууме, получая коричневое масло (приблизительно 41 г). Анализ неочищенного, N-Boc-защитенного продукта 3 с помощью ^1H ЯМР показал, что он содержит приблизительно 10 мол.% продукта элиминирования алкена: (R)-1-((2-(2,4-дифторфенил)-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метил)-1H-1,2,4-триазол [A], вместе с некоторыми не участвовавшими в реакции исходными материалами. Этот неочищенный продукт использовали в последующей стадии без очистки.

Неочищенный уретан 3 переносили в DCM (260 мл) и обрабатывали TFA (76,0 мл, 991 ммоль). Через 2 ч при RT реакционную смесь концентрировали в вакууме для удаления большей части летучих веществ, а затем разбавляли DCM (200 мл) и тщательно нейтрализовали sat aq NaHCO₃ (500 мл) до pH 7, что приводило к образованию эмульсии. Смесь подкисляли до pH 1 добавлением 1 М хлористоводородной кислоты (250 мл) и добавляли DCM (350 мл) с образованием двухфазной смеси (два слоя). aq фазу отделяли и сохраняли, а органическую фазу экстрагировали 1 М соляной кислотой (800 мл). Объединенные aq слои подщелачивали добавлением 2 М водного раствора гидроксида натрия (500 мл) до pH 14, а затем экстрагировали EtOAc (3×500 мл). Объединенные органические экстракты промывали соевым раствором (2000 мл), а затем сушили и выпаривали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения 4 в виде вязкого коричневого масла (24,6 г, 78%); R^t 1,46 мин (способ 1a); m/z 470 (M+H)⁺ (ES⁺);

^1H ЯМР 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), 7,25-7,33 (2H, m), 7,76 (1H, s) и 8,34 (1H, s).

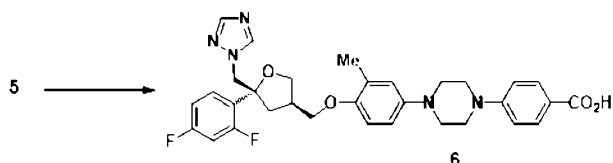
Метил 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензоат.



Колбу, наполненную промежуточным соединением 4 (19,1 г, 40,7 ммоль), метил-4-бромбензоатом (10,5 г, 48,8 ммоль), RuPhos (0,38 г, 0,81 ммоль, 2 моль%), RuPhosG3 (0,68 г, 0,81 ммоль, 2 моль%) и карбонатом цезия (21,2 г, 65,1 ммоль), три раза опорожняли и вновь заполняли азотом перед добавлением DMF (500 мл). Смесь нагревали при 90°C в течение 18 ч, охлаждали до RT и вливали в воду (300 мл). Полученное в результате твердое вещество собирали посредством фильтрования и промывали водой (3×100 мл) и этиловым эфиром (3×75 мл), а затем сушили в вакууме при 50°C для получения указанного в заголовке соединения 5 в виде твердого вещества бежевого цвета (22,8 г, 89%); R^t 2,56 мин (способ 1a); m/z 604 (M+H)⁺ (ES⁺);

^1H ЯМР δ : 2,09 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,36-2,42 (1H, m), 2,53-2,57 (1H, m), 3,11-3,13 (4H, m), 3,43-3,46 (4H, m), 3,67 (1H, dd), 3,74-3,79 (5H, s наложение на m), 4,04 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br d), 7,00 (1H, td), 7,04 (2H, d), 7,27-7,34 (2H, m), 7,77 (1H, s), 7,81 (2H, d) и 8,35 (1H, s).

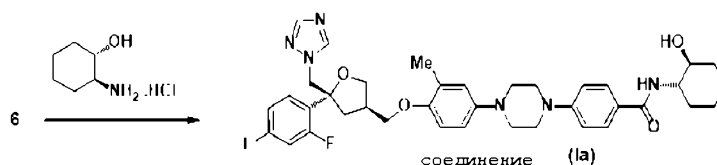
4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-Триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензойная кислота.



К суспензии промежуточного соединения 5 (22,8 г, 37,8 ммоль) в DMSO (1000 мл) добавляли раствор гидроксида лития (4,52 г, 188 ммоль) в воде (100 мл). Смесь нагревали при 70°C в течение 22 ч, а затем охлаждали до RT, вливали в воду (1000 мл) и подкисляли до pH 2 посредством добавления 1 М соляной кислоты (300 мл). Смесь охлаждали в ванной со льдом в течение 2 ч, а полученный в результате осадок собирали посредством фильтрации. Отфильтрованный осадок промывали водой (2×200 мл) и диэтиловым эфиром (4×200 мл). Неочищенное твердое вещество растирали с THF (150 мл), собирали посредством фильтрования, а затем промывали диэтиловым эфиром (3×100 мл) и сушили в вакууме при 50°C для получения указанного в заголовке соединения 6 в виде почти белого твердого вещества (19,7 г, 88%); R^1 2,28 мин (способ 1a); m/z 590 ($M+H$)⁺ (ES^+);

^1H ЯМР δ : 2,09 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,36-2,42 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,11-3,14 (4H, m), 3,41-3,44 (4H, m), 3,67 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,04 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br d), 6,97-7,03 (3H, m), 7,26-7,34 (2H, m), 7,77-7,80 (3H, m), 8,34 (1H, s) и 12,32 (1H, s).

Соединение (1a): 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-((1S,2S)-2-гидроксициклогексил)бензамид.



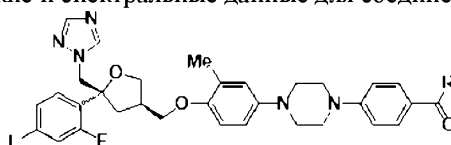
К смеси промежуточного соединения 6 (100 мг, 0,17 ммоль), EDCI (65 мг, 0,34 ммоль) и DMAP (2,07 мг, 0,017 ммоль) в пиридине (1,0 мл) добавляли (1S,2S)-2-аминоциклогексанола гидрохлорид (51,4 мг, 0,34 ммоль). Реакционную смесь взбалтывали при комнатной температуре в течение 16 ч, а затем разбавляли DCM (8,0 мл) и промывали 1 М соляной кислотой (2,0 мл). Смесь пропускали через фазовый сепаратор и органические вещества выпаривали в вакууме. Полученный таким образом неочищенный продукт очищали посредством колоночной флэш-хроматографии (SiO_2 , 12 г, 0-5% MeOH в EtOAc, градиентное элюирование) с получением указанного в заголовке соединения (1a) в виде белого твердого вещества (75 мг, 64%).

Получение соединений (1b-1d).

Остальные примеры соединений изобретения получали аналогичным образом путем соединения промежуточного соединения 6 бензойной кислоты с соответствующим единственным стереоизомером 2-аминоциклогексанола. Эти соединения легко доступны из коммерческих источников. Материалы, полученные от Sigma Aldrich, поставлялись в виде гидрохлоридных солей, для которых были указаны следующие энантиомеры: (1S,2S) транс-изомер, >98% ee; (1R,2R) транс-изомер, >98% ee; (1R,2S) цис-изомер >97% ee; (1S,2R) цис-изомер, >97% ee.

Спектральные данные LCMS и ^1H ЯМР для примеров соединений (1a-1d) представлены ниже (табл. 2).

Аналитические и спектральные данные для соединений изобретения



R	№ примера, наименование, данные LCMS и ЯМР
	<p>1a: 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-((1S,2S)-2-гидроксициклогексил)бензамид. R¹ 2,15 мин (способ 1a); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1,15-1,28 (4H, m), 1,61-1,65 (2H, m), 1,82-1,92 (2H, m), 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,15 (4H, m), 3,36-3,43 (5H, m), 3,55-3,62 (1H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,53-4,62 (3H, m), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br s), 6,97-7,02 (3H, m), 7,25-7,34 (2H, m), 7,76-7,82 (4H, m), 8,34 (1H, s).</p>
	<p>1b: 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-((1R,2R)-2-гидроксициклогексил)бензамид. R¹ 2,14 мин (способ 1a); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1,15-1,28 (4H, m), 1,61-1,65 (2H, m), 1,82-1,92 (2H, m), 2,10 (3H, s), 2,16 (1H, dd), 2,37-2,43 (1H, m), 2,52-2,58 (1H, m), 3,12-3,15 (4H, m), 3,36-3,43 (5H, m), 3,55-3,62 (1H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,79 (2H, m), 4,05 (1H, dd), 4,53-4,62 (3H, m), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br s), 6,97-7,02 (3H, m), 7,25-7,34 (2H, m), 7,76-7,82 (4H, m), 8,34 (1H, s).</p>
	<p>1c: 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-((1S,2R)-2-гидроксициклогексил)бензамид. R¹ 2,46 мин (способ 1b); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1,23-1,34 (2H, m), 1,41-1,74 (6H, m), 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), 3,36-3,38 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,82 (4H, m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 4,68 (1H, d), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br s), 6,98-7,02 (3H, m), 7,26-7,34 (2H, m), 7,51 (1H, d), 7,75-7,77 (3H, m), 8,34 (1H, s).</p>
	<p>1d: 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-((1R,2S)-2-гидроксициклогексил)бензамид. R¹ 2,46 мин (способ 1b); m/z 687 (M+H)⁺ (ES⁺); ¹H ЯМР δ: 1,23-1,34 (2H, m), 1,41-1,74 (6H, m), 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), 3,36-3,38 (4H, m), 3,68 (1H, dd), 3,74-3,82 (4H, m), 4,05 (1H, dd), 4,58 (2H, dd), 4,68 (1H, d), 6,75 (2H, br s), 6,85 (1H, br s), 6,97-7,02 (3H, m), 7,25-7,34 (2H, m), 7,50 (1H, d), 7,75-7,77 (3H, m), 8,34 (1H, s).</p>

Биологическое тестирование: экспериментальные методы

Оценка планктонного роста грибов: Анализ микроразведений в бульоне

Этот анализ проводили с применением модифицированного способа, опубликованного EUCAST (Rodriguez-Tudela, et al. 2008). Споры *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010, NCPF7010 [метионин 220 мутация], NCPF7099 [Глицин G54 мутация]) от Public Health England, Wiltshire; мутанты TR34/L98H от St Louis Hospital, Paris, France; мутанты TR46/Y121F/T289A от University of Delhi, Delhi, India) культивировали в сабуро-декстрозном агаре в течение 3 дней. Маточную суспензию спор получали из культуры сабуро-декстрозного агара путем промывания PBS-tween (10 мл; фосфатно-буферный солевой раствор, содержащий 0,05% Tween-20, 100 ЕД./мл пенициллина и 100 ЕД./мл стрептомицина). Количество спор оценивали с применением гемоцитометра Neubauer, а затем доводили до 10^6 спор/мл с помощью PBS. Рабочую суспензию спор (2×10^5 спор/мл) получали в стерилизованном посредством фильтрации, BSA MOPS RPMI-1640 (50 мл; RPMI-1640, содержащий 2 мм L-глутамин, 0,5% BSA, 2% глюкозы, 0,165 М MOPS, забуференного до pH 7 с NaOH).

Для анализа сперва BSA MOPS RPMI-1640 (50 мкл/лунку) добавляли по всему 384-луночному планшету (номер по каталогу 353962, BD Falcon, Oxford, UK). Затем тестируемые соединения (0,5 мкл DMSO раствор) добавляли в четырех повторениях с применением Integra VIAFLO 96 (Integra, Zizers, Switzerland) и тщательно смешивали с применением пластинчатого миксера. Впоследствии 50 мкл рабочей суспензии спор, приготовленной ранее, добавляли во все лунки за исключением контрольных лунок без спор. В контрольные лунки без спор вместо этого добавляли раствор BSA MOPS-RPMI (50 мкл/лунку). Планшет закрывали пластмассовой крышкой и инкубировали (35°C с атмосферным воздухом) в течение 48 ч. OD каждой лунки при 530 нм определяли с применением мультисканера (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, UK). Для каждой лунки рассчитывали процент ингибирования, а из кривой концентрация-ответ, созданной для каждого тестируемого соединения, рассчитывали значения MIC_{50} , MIC_{75} и MIC_{90} .

Скрининг панелей грибов проводили посредством Eurofins Panlabs Inc. Значения MIC и MIC_{50} испытываемых образцов определяли в соответствии с рекомендациями CLSI: способы микроразведения в бульоне для дрожжей (CLSI M27-A2), (CLSI, 2002) и для нитчатых грибов (CLSI M38-A), (CLSI, 2008).

Инфекция *Aspergillus fumigatus* эпителиальных клеток бронхов.

Клетки BEAS2B засеивали в 96-луночные планшеты (100 мкл; 3×10^4 клеток/лунку; Catalogue No 3596, Sigma Aldrich, Dorset, UK) в 10% FBS RPMI-1640, а затем инкубировали (37°C, 5% CO_2) в течение одного дня перед проведением эксперимента. В каждую лунку добавляли тестируемые соединения (0,5 мкл раствора DMSO) или несущую среду (DMSO), чтобы получить итоговую концентрацию DMSO, составляющую 0,5%. Клетки BEAS2B инкубировали с тестируемыми соединениями в течение 1 ч (35°C, 5% CO_2) до инфицирования суспензией конидий ($0,5 \times 10^5$ /мл в 10% FBS RPMI-1640) *Aspergillus fumigatus* (20 мкл; Public Health England). Планшет инкубировали в течение 24 ч (35°C, 5% CO_2). Супернатант (50 мкл) собирали и переносили на планшет для ПЦР (Catalogue No L1402-9700, Starlab, Milton Keynes, UK), который замораживали (-20°C) до использования. После оттаивания супернатант (5 мкл) разводили 1:20, добавляя раствор R7-PBS (95 мкл; 1:4 R7 к PBS; Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA). Уровни галактоманна в этих образцах (50 мкл) измеряли с применением наборов Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA). Для каждой лунки рассчитывали процент ингибирования, а значение IC_{50} рассчитывали из кривой концентрация-ответ, созданной для каждого тестируемого соединения.

Инфекция *Aspergillus fumigatus* бислов альвеол человека.

Модели альвеол человека *in vitro*, состоящие из бислоя альвеолярных эпителиальных клеток и эндотелиальных клеток человека, получали, как описано ранее (Hore et al. 2007). Эта система делает возможным введение тестируемого соединения в верхний ("воздушное" пространство) и/или нижний ("системное" пространство) отделы. Такую использовали гибкость в изучении действия комбинированной обработки путем дозирования в верхнюю камеру соединения (I), а в нижнюю камеру позаканозола или других противогрибковых агентов. Первичные эндотелиальные клетки легочной артерии человека (НРАЕС) собирали и разбавляли до 10^6 клеток/мл в средах EGM-2 (Lonza, Basel, Switzerland). Камеры Трансвелл переворачивали и на основание каждого трансвела наносили клеточную суспензию (100 мкл/лунку). Перевернутые камеры Трансвелл инкубировали при RT в шкафу в течение 2 ч, после чего их поворачивали вертикально. Среда EGM-2 добавляли в нижний (700 мкл/лунку) и верхний (100 мкл/лунку) отделы и камеры Трансвелл инкубировали в течение 48 ч (37°C, 5% CO_2). Затем среду EGM-2 в нижнем отделе заменяли на свежую среду EGM-2. Клетки A549 собирали и разбавляли до 5×10^5 клеток/мл в 10% EBM, затем добавляли в верхней отдел (100 мкл/лунку) всех камер Трансвелл и планшеты инкубировали в течение 72 ч (37°C, 5% CO_2). Конидии чувствительного к итраконазолу (NCPF2010) и резистентного к итраконазолу (TR34-L98H) штаммов *Aspergillus fumigatus* культивировали отдельно в сабуро-декстрозном агаре в течение 3 дней. Маточную суспензию конидий каждого штамма получали из культуры сабуро-декстрозного агара путем промывания PBS-tween (10 мл; PBS, содержащий 0,05% Tween-20, 100 ЕД./мл пенициллина и 100 ЕД./мл стрептомицина). Количество

конидий оценивали, используя гемоцитометр Neubauer, и доводили до 10^6 конидий/мл с помощью PBS. Рабочий запас конидий готовили в ЕВМ (10^5 конидий/мл) непосредственно перед использованием.

Тестируемые и эталонные соединения (или неразбавленный DMSO в качестве несущей среды) добавляли в соответствующие лунки 24-луночных планшетов (3 мкл/лунку, содержащую 600 мкл 2% FBS ЕВМ) для обработки нижнего отдела и 96-луночных планшетов (1 мкл/лунку, содержащую 200 мкл 2% FBS ЕВМ) для обработки верхнего отдела, чтобы обеспечить итоговую концентрацию DMSO, составляющую 0,5%. Среду в верхнем отделе аспирировали и добавляли среду, содержащую соответствующие тестируемые и эталонные соединения или несущую среду (100 мкл/лунку). Затем камеры Трансвелл переносили в 24-луночный планшет, содержащий тестируемые и эталонные соединения или несущую среду DMSO. После инкубации в течение 1 ч (35°C , 5% CO_2) в верхний отдел каждой камеры Трансвелл добавляли суспензию конидий (10 мкл/лунку). Затем планшеты инкубировали в течение 24 ч (35°C , 5% CO_2). Супернатанты из каждого отдела (5 мкл/отдел) собирали и хранили (-20°C). Среду заменяли ежедневно после сбора супернатантов и все лунки обрабатывали тестовыми и эталонными соединениями или ДМСО, как описано выше, в течение 3 дней. Образцы продолжали собирать до тех пор, пока рост грибов был заметен глазом во всех камерах Трансвелл. Уровни GM в супернатанте в нижнем отделе затем измеряли посредством ELISA (BioRad, CA, USA) в виде индекса внедрения *Aspergillus fumigatus*.

Жизнеспособность клеток: анализ с резазурином.

За один день перед проведением эксперимента клетки BEAS2B заселяли в 384-луночные планшеты (100 мкл; 3000/лунку; BD Falcon, Catalogue No 353962) в RPMI-LHC8 (среды RPMI-1640 и LHC8, объединенные в равных пропорциях). В контрольные лунки, не содержащие клетки, добавляли RPMI-LHC8 (100 мкл). Добавляли тестируемые соединения (0,5 мкл раствора DMSO), чтобы получить итоговую концентрацию DMSO, составляющую 0,5%, с применением Integra VIAFLO 96 (Integra, Zizers, Switzerland). Клетки BEAS2B инкубировали с каждым тестируемым соединением в течение 1 дня ($37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ в RPMI-LHC8). После добавления маточного раствора резазурина (5 мкл, 0,04%) планшеты дополнительно инкубировали в течение 4 ч ($37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$). Флуоресценцию каждой лунки при 545 нм (возбуждение) и 590 нм (эмиссия) определяли с применением мультисканера (Clariostar: BMG Labtech). Процент потери жизнеспособности клеток рассчитывали для каждой лунки относительно несущей среды (0,5% DMSO) обработки. При необходимости, значение CC_{50} рассчитывали из кривой концентрация-ответ, созданной для каждого тестируемого соединения.

Противогрибковая активность *in vivo*.

Aspergillus fumigatus (ATCC 13073 [штамм: NIH 5233], Американская коллекция типовых культур, Manassas, VA, USA) выращивали планшетах на солодовом агаре (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) в течение 6-7 дней при RT ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Споры асептически отделяли от агаровых планшетов и суспендировали в стерильной дистиллированной воде с 0,05% Tween 80 и 0,1% агаром. В день инфицирования количество спор оценивали с помощью гемоцитометра и инокулят доводили до получения концентрации $1,67 \times 10^8$ спор мл^{-1} физиологического солевого раствора. Для индуцирования иммуносупрессии и нейтропении A/J мышам (самцам, в возрасте 5 недель) ввели дозы гидрокортизона (Sigma H4881; 125 мг/кг, п/к) в дни 3, 2 и 1 до инфицирования и циклофосамида (Sigma C0768; 250 мг/кг, в/б) за 2 дня до инфицирования. В день 0 животных инфицировали суспензией спор (30 мкл интраназально).

Тестируемые вещества вводили интраназально (35 мкл суспензии (0,0032-10,0 мг/мл лекарственного вещества в физиологическом солевом растворе) один раз в сутки, только в дни 1, 2 и 3 (тем самым представляя схему терапевтической обработки). Для продолжительной профилактической обработки тестируемые соединения (35 мкл суспензии 0,0032 или 0,016 мг/мл в физиологическом солевом растворе) вводили интраназально один раз в сутки в течение семи дней. Одной группе дозу вводили за 30 мин до инфицирования на день 0, но не впоследствии, тогда как второй группе дозы дополнительно вводили в дни 1, 2 и 3 после инфицирования. Действие этих парадигм лечения сравнивали с результатами, полученными, когда лечение ограничивалось в других группах до одного дня или 30 минут до инокуляции, а затем в дни 1, 2 и 3 после инфицирования в обоих случаях. В последней группе введение дозы еще дополнительно ограничивали животными, которым дважды вводили дозу, только за один день и за 30 мин до инфицирования.

Массу тела животных контролировали ежедневно и через 6 ч после введения последней дозы лекарственного средства на день 3 животных анестезировали, канюлировали трахею и получали BALF, кровь и легочную ткань. Уровни IL-6 и TNF α в сыворотке определяли с применением набора для ELISA мышинных IL-6 или TNF- α Quantikine® (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) соответственно. GM *Aspergillus* в сыворотке определяли с применением наборов Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA). Индекс отсечки (COI) рассчитывали по формуле: индекс отсечки=OD образца/OD контроля отсечки, предоставленном в наборе. Для анализов микотической нагрузки на ткань 100 мг легочной ткани асептически извлекали и гомогенизировали в 0,2 мл 0,1% агара в стерильной дистиллированной воде. Серийно разведенные гомогенаты легких наносили на планшеты с солодовым

агаром (50 мкл/планшет) и инкубировали при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72-96 ч. На каждом планшете подсчитывали колонии *A. Fumigatus* и титр грибка представили в данном документе в виде CFU на грамм легочной ткани.

Для определения содержания ДНК *Aspergillus fumigatus*, ДНК экстрагировали либо из инфицированных легких, либо *Aspergillus fumigatus* с помощью Isoplant (Nippon Gene) согласно инструкции изготовителя. Ткани, срезанные до <3 мм любой длины, смешивали с раствором I (буфер для экстракции: 300 мкл). Затем к смесям добавляли раствор II (буфер для лизиса, бензилхлорид: 150 мкл) с последующим перемешиванием вихревым смесителем в течение 5 секунд. После инкубирования при 50°C в течение 15 мин добавляли раствор III (натрий ацетат, pH 5,2: 150 мкл), смеси интенсивно перемешивали в течение 1-3 секунд, а затем инкубировали на льду в течение 15 мин. После инкубирования смеси центрифугировали при 12000 г в течение 15 мин при 4°C . ДНК в верхних аq фазах супернатантов осаждали 100% этанолом (x 2,5 vol), промывали 70% этанолом и растворяли в 5-10 мкл буфера TE.

Аmplификацию ДНК проводили с помощью Premix Ex TaqTM (Takara Bio) на 96-луночном оптическом реакционном планшете. Фрагменты гена 18S рННК *Aspergillus fumigatus* амплифицировали с парой праймеров; 5'-GGCCCTTAA ATAGCCCGGT-3' (SEQ ID No. 1) и 5'-TGAGCCGATAGTCCCCCTAA-3' (SEQ ID No. 2) и гибридизационным зондом; 5'-FAM-AGCCAGCGGCCCGCAAATG-TAMRA-3' (SEQ ID No. 3). ПЦР в реальном времени проводили (25 мкл, содержащих 50 нг мышинной ДНК с 200 нм зонда) при следующих условиях: начальная инкубация в течение 2 мин при 50°C , начальная денатурация в течение 10 мин при 95°C , с последующими 55 циклами из 15 с при 95°C и 1 мин при 65°C . Количества ДНК *Aspergillus fumigatus* в 50 нг ДНК мышинных легких оценивали по стандартной кривой с 0,05-50000 пг ДНК *Aspergillus fumigatus*.

Краткое изложение результатов скрининга

Соединение (I) демонстрирует мощную ингибирующую активность на планктонный рост грибов, как оценено при анализе микроразведений в бульоне (табл. 3).

Таблица 3

Влияние обработки вориконазолом, позаконазолом, амфотерицином В и соединениями (Ia-d) на планктонный рост грибов изолятов *Aspergillus fumigatus*

Обработка (тестируемое соединение)	Значения MIC ₇₅ (нМ) против указанных изолятов <i>Aspergillus fumigatus</i> ¹				
	NCPF2010	L98H	TR46	NCPF7099	NCPF7100
Вориконазол	511	2585	>2860	113	543
Позаконазол	10,9	98,3	414	167	59,7
Амфотерицин В	407	195	187	248	523
Соединение (Ia)	2,81	12,7	93	10,0	12,7
Соединение (Ib)	8,02	303	334	86,2	87,3
Соединение (Ic)	2,27	54,9	164	11,5	10,9
Соединение (Id)	8,51	70,0	316	11,7	25,2

Примечания:

¹ Анализ микроразведений в бульоне; n=2-3.

В этих анализах соединение (Ia) особенно показало значительно большую мощность как в отношении резистентных к позаконазолу штаммов (NCPF7099, NCPF7100, TR34/L98H и TR46/Y121F/T289A), а также чувствительных к позаконазолу штаммов (NCPF2010), чем позаконазол, вориконазол и амфотерицин В.

Соединения (Ia и Ic) также демонстрируют мощную ингибирующую активность против грибковой инфекции эпителиальных клеток бронхов (табл. 4). В этой системе анализа соединения (Ia и Ic) показали значительно большую мощность, чем вориконазол, и большую мощность, чем позаконазол.

Инкубирование с соединениями (Ia, Ib, Ic и Id) не оказывало или оказывало небольшое влияние на жизнеспособность эпителиальных клеток бронхов BEAS2B при концентрациях, показанных ниже.

Таблица 4

Влияние обработки вориконазолом, позаконазолом, амфотерицином В и соединениями (Ia-d) на планктонный рост грибов *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010), на грибковую инфекцию эпителиальных клеток бронхов BEAS2B и на жизнеспособность клеток BEAS2B

Обработка (тестируемое соединение)	Значения MIC ₅₀ /CC ₅₀ для указанной обработки (нМ)	
	Инфекция клеток BEAS2B ¹	Жизнеспособность клеток BEAS2B ²
	MIC ₅₀	CC ₅₀
Вориконазол	154	>28600
Позаконазол	11,6	>14300
Амфотерицин В	nt	2343
Соединение (Ia)	6,35	>14600
Соединение (Ib)	nt	>14600
Соединение (Ic)	1,86	>14600
Соединение (Id)	nt	>14600

Примечание:

¹ Эпителиальные клетки бронхов; n=1-3;

² n=3;

nt: не протестированы.

Влияние соединения (I) на рост широкого диапазона грибковых патогенов оценили с применением способов микроразведения в бульоне CLSI. Было обнаружено, что соединение (Ia) является мощным ингибитором роста *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Cladosporium herbarum* и *Trichophyton rubrum*, а также некоторых *Candida* spp. (а именно *Candida albicans*, *Candida glabrata* и *Candida krusei*) и некоторых *Aspergillus* spp. (а именно *Aspergillus flavus*) (табл. 5).

Таблица 5

Ингибирующее действие соединения (Ia) на рост ряда видов грибов

Грибковый Агент	Штамм	Соединение (Ia)		Вориконазол		Позаконазол	
		MIC ₅₀	MIC ₁₀₀	MIC ₅₀	MIC ₁₀₀	MIC ₅₀	MIC ₁₀₀
		(мкг/мл)		(мкг/мл)		(мкг/мл)	
<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC204304	0,13	0,13	1,0	2,0	0,063	0,13
<i>Aureobasidium pullulans</i>	ATCC9348	0,25	1,0	>8,0	>8,0	0,25	1,0
<i>Candida albicans</i>	20240,047	0,016	>2,0	0,031	>8,0	0,031	>8,0
	ATCC10231	0,25	>2,0	0,25	>8,0	0,13	>8,0

	20183,073	0,125	>2,0	4,0	>8,0	0,25	>8,0
Candida glabrata	ATCC36583	0,25	>2,0	0,25	>8,0	0,5	>8,0
	20197,1	0,0078	>2,0	0,031	>8,0	0,031	>8,0
Candida krusei	ATCC6258	0,25	0,25	0,25	1,0	0,13	0,25
Rhizopus oryzae	ATCC11145	0,25	0,5	8,0	>8,0	0,13	>8,0
Cryptococcus neoformans	ATCC24067	0,016	0,063	0,016	1,0	0,016	0,25
Chaetomium globosum	ATCC44699	0,031	0,13	0,5	1,0	0,13	0,25
Fusarium graminearum	ATCC16106	0,13	0,5	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0
Penicillium chrysogenum	ATCC9480	0,063	0,13	1,0	2,0	0,063	0,13
Cladosporium herbarum	NCPF2564	0,016	0,016	ND	ND	ND	ND
Trichophyton rubrum	ATCC10218	ND	0,031	<0,008	0,063	<0,008	0,031

Примечания:

MIC₅₀/MIC₁₀₀=концентрация, требуемая для 50 и 100% торможения роста грибов путем визуального контроля (CLSI);

ND: не определено.

Ингибирующую активность на внедрение *Aspergillus fumigatus* в альвеолы (чувствительный к азолу штамм: NCPF2010; и резистентный к азолу штамм TR34/L98H) определяли посредством измерения галактоманнана (GM) в нижней камере бислов альвеол человека на 1 день после инфицирования. Введение соединения (Ia) в апикальную камеру вызывало зависимое от концентрации ингибирование уровней GM в нижней камере, с максимальным действием, превышающим 90% для обоих штаммов (табл. 6 и 7).

Таблица 6

Влияние соединения (Ia) и позаконазола на внедрение *Aspergillus fumigatus* (чувствительного к азолу штамма: NCPF2010) в нижнюю камеру бислов альвеол человека (камеры Трансвелл)

Значения MIC для указанной обработки (нМ)

Обработка (тестируемое соединение)	Значения MIC для указанной обработки (нМ)	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Позаконазол	155	212
Соединение (Ia)	154	185

Примечание: n=3.

Таблица 7

Влияние соединения (Ia) и позаконазола на внедрение *Aspergillus fumigatus* (резистентного к азолу штамма: TR34/L98H) в нижнюю камеру бислов альвеол человека (камеры Трансвелл)

Обработка	Значения MIC для указанной обработки (нМ)	
Тестируемое соединение	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Позаконазол	315	793
Соединение (Ia)	261	417

Примечание: n=1.

Когда проводили мониторинг ингибирующей активности в течение нескольких дней после инфицирования, были обнаружено, что раннее ингибирующее действие монотерапии либо соединением (Ia) (0,1 мкг/мл в верхней камере) или позаконазолом (0,01 мкг/мл в нижней камере) быстро исчезает (табл. 8). И наоборот, комбинированная обработка соединением (Ia) в верхней камере и позаконазолом в нижней камере (как приведено выше) привела к долговременному ингибированию внедрения после инфицирования. Вследствие этого, DFB₅₀ для комбинированной обработки составило 3,63 дней, гораздо дольше, чем значения для одного соединения (табл. 8). Это синергетическое или по меньшей мере аддитивное влияние комбинированной обработки также возникало, когда обработку соединением (Ia) комбинировали с обработкой итраконазолом, вориконазолом или каспофунгином (результаты не показаны).

Таблица 8

Влияние соединения (Ia), позаконазола и комбинированной обработки на внедрение *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010) в нижнюю камеру бислов альвеол человека (камеры Трансвелл)

Уровни GM в нижней камере для указанных видов обработки Значение OD (% ингибирования по сравнению с контролем)				
День обработки	Несущая среда	Соединение (Ia) ¹ Верхняя камера	Позаконазол ² Нижняя камера	Комбинированная обработка
0	0	0	0	0
1	0,73	0,24 (66)	0,074 (89)	0,019 (97)
2	1,73	1,71 (1,5)	1,71 (1,5)	0,11 (94)
3	1,82	1,67 (8,6)	1,70 (7,1)	0,18 (90)
4	1,65	1,68 (-1,6)	1,70 (-3,0)	1,34 (19)
5	1,64	1,63 (0,2)	1,69 (-3,6)	1,72 (-5,3)
6	1,55	1,57 (-1,8)	1,59 (-3,0)	1,62 (-4,6)
7	1,66	1,54 (7,1)	1,62 (2,5)	1,59 (4,4)
Значения DFB ₅₀ для указанных видов обработки		1,04	1,16	3,63

Примечания:

¹ Дозы вводили с 0,1 мкг/мл.

² Дозы вводили с 0,01 мкг/мл.

DFB₅₀: дни, взятые для достижения микотической нагрузки, составляющей 50% контроля.

В дополнение, эту комбинированную обработку протестировали в бислов, инфицированных резистентным к азолу штаммом *Aspergillus fumigatus*: TR34-L98H (табл. 9). Монотерапия соединением

(Ia) (0,3 мкг/мл) в верхней камере или позакназолом (0,1 мкг/мл) в нижней камере показала ограниченную пользу. В отличие от этого, комбинация соединения (Ia) и позакназола показала значительное ингибирующее действие на внедрение грибка в нижнюю камеру.

Таблица 9

Влияние соединения (Ia), позакназола и комбинированной обработки на внедрение *Aspergillus fumigatus* (резистентный к азолу штамм: TR34-L98H) в нижнюю камеру в альвеолярной двухслойной клеточной системе (камеры Трансвелл)

Уровни GM в нижней камере для указанных видов обработки
Значение OD (% ингибирования по сравнению с контролем несущей средой)

День обработки	Несущая среда	Соединение (I) ¹ Верхняя камера	Позакназол ² Нижняя камера	Комбинированная обработка
0	0	0	0	0
1	0,63	0,016 (98)	0,016 (98)	0,014 (98)
2	1,11	0,84 (24)	0,73 (35)	0,015 (99)
3	1,06	1,01 (4,6)	1,16 (-10)	0,020 (98)
Значения DFB ₅₀ для указанных видов обработки		1,53	1,94	> 3

Примечания:

¹ Вводили дозы с 0,3 мкг/мл.

² Вводили дозы с 0,1 мкг/мл.

DFB₅₀: дни, взятые для достижения микотической нагрузки, составляющей 50% контроля.

При интраназальном введении мышам в нейтропении с ослабленным иммунитетом, в дни 1, 2 и 3 после заражения (терапевтическая обработка), соединение (Ia) показало некоторую защиту от потери массы тела, измеренное в течение 3 дней, вызванное инфекцией *Aspergillus fumigatus* при более низких дозах, чем требовались для позакназола (табл. 10).

Таблица 10

Влияние обработки соединением (Ia) или позакназолом на потерю массы тела, вызванную инфекцией *A. fumigatus*, у мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом

Схема обработки ²	Концентрация лекарственного средства (мг/мл)	Потеря массы тела ^{1,2} (% торможения потери массы)	
		День 2	День 3
Несущая среда плюс споры	нет	5,5±1,5	10,7±1,8
	0,0032	4,2±1,2 (24)	9,7±2,1 (9)
Соединение (Ia)	0,016	3,6±1,2 (35)	9,7±3,2 (9)
	0,08	2,8±2,4 (49)	8,3±6,7 (22)
Несущая среда плюс споры	нет	4,7±2,1	9,3±2,7
	0,4	5,4±0,4 (-15)	9,2±4,0 (1)
Позакназол	2	3,9±1,3 (17)	7,1±1,9 (24)
	10	3,9±1,3 (17)	4,3±1,8 (54)

Примечание:

¹ % потеря массы, вызванная инфекцией *A. fumigatus* по сравнению с массой животного на день 1, когда началась обработка.

² Два проводимых отдельных исследования.

Более того, терапевтическая обработка соединением (Ia), показала влияние, превосходящее позаконазол, на микотическую нагрузку в легких, на концентрации галактоманнана в сыворотке и содержание ДНК *Aspergillus fumigatus* в легких. Эти данные для соединения (I) показаны в табл. 11 и фиг. 1-3.

Таблица 11

Действие профилактической и терапевтической обработки соединением (Ia) на CFU в легких, на концентрации галактоманнана в сыворотке и на ДНК *Aspergillus* в легких мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*

Схема обработки	Концентрация лекарственного средства (мкг/мл)	% ингибирования ответа		
		КОЕ (/мг легкого)	ГМ в сыворотке (СОП)	ДНК в легких (пг/50нг мышинной ДНК)
Несущая среда плюс споры	нет	31,7±17,4	3,38±2,02	70,7±41,3
	3,2	25,8±20,8 (19)	2,85±2,76 (16)	41,7±29,0 (41)
Соединение (Ia)	16	24,2±15,8 (24)	3,01±2,14 (11)	56,1±53,4 (21)
	80	9,30±5,20 (71)	0,53±0,38 (84)	4,10±4,60 (94)

Примечание: данные для микотической нагрузки показаны как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM; n=6).

Значения ID₅₀ для позаконазола и соединения (Ia), вводимого терапевтически в независимых экспериментах, также представлены ниже (табл. 12).

Таблица 12

Значения ID₅₀ для терапевтической обработки позаконазолом и соединением (Ia) по микотической нагрузке в легких по концентрации галактоманнана в сыворотке и по содержанию ДНК *Aspergillus fumigatus* в легочной ткани у мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*

Лекарственная субстанция (Терапевтическая схема)	Значения ID ₅₀ для указанного ответа (мг/мл)		
	Микотическая нагрузка на легкие	ГМ в сыворотке	ДНК <i>A. fumigatus</i> в легких
Соединение (Ia)	0,051	0,047	0,050
Позаконазол	0,39	0,59	Nt

Примечание: nt: не протестированы.

Также обнаружено, что терапевтическая обработка соединением (Ia) подавляет концентрации цитокинов в сыворотке у мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*. (табл. 13 и 14; фиг. 1, 2 и 3). Рассчитанные значения ID₅₀ для подавления уровней цитокинов сыворотки (табл. 14) весьма сходны со значениями, наблюдаемыми для микотической нагрузки на легкие, концентраций галактоманнана в сыворотке и для содержания ДНК *Aspergillus fumigatus* в легких (выше).

Таблица 13

Влияние терапевтической обработки соединением (Ia) на уровни IL-6 и TNFα в сыворотке мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*.

Схема обработки	Концентрация лекарственного средства (мкг/мл)	Концентрация биомаркеров (нг/мл) (% ингибирования)	
		IL-6	TNFα
Несущая среда плюс споры	нет	298±142	35,3±10,1

	3,2	247±185 (17)	28,1±13,8 (20)
Соединение (Ia)	16	262±185 (12)	21,8±14,6 (38)
	80	66,5±32,9 (78)	4,7±1,0 (87)

Примечания: данные для концентраций биомаркеров показаны как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM), N=6.

Таблица 14

Значения ID₅₀ для терапевтической обработки соединением (Ia) при уровнях IL-6 и TNF α в сыворотке у мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*

Лекарственная субстанция (Профилактическая схема)	Значения ID ₅₀ для указанных биомаркеров (мг/мл)	
	IL-6	TNF α
Соединение (Ia)	0,050	0,027

Также было оценено действие продолжительного профилактического введения доз соединения (Ia) у мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*. Было обнаружено, что продолжительная профилактика соединением (Ia) подавляет микотическую нагрузку в легких, а также концентрации GM как в BALF, так и в сыворотке, при дозах, в 25 раз более низких, чем дозы, используемые в предыдущем исследовании (табл. 15). Более того, данные свидетельствуют о накоплении противогрибкового действия в легких при повторном введении доз, поскольку семь дней профилактики вызвали более высокое противогрибковое действие, чем профилактическое лечение в течение одного дня. О стойкости действия соединения в легких свидетельствуют данные, что лечение в дни с -7 до дня 0 вызвало превосходное противогрибковое действие на день 3, чем противогрибковое действие, полученное в результате лечения только в дни -1 и 0.

Таблица 15

Действие продолжительного профилактического введения доз соединения (Ia) на микотическую нагрузку (КОЕ) в легких и на концентрации GM в BALF и сыворотке у мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*

Схема обработки ¹ (Дни введения доз)	Доза соединения (Ia) (мкг/мл)	Значения КОЕ, значения COI для GM в BALF и сыворотке и % ингибирования ответов ²		
		КОЕ (/мг легкого)	GM в BALF (COI)	GM в сыворотке (COI)
Несущая среда плюс споры	нет	9,2±4,9	4,1±0,7	3,9 ±0,7
с -7 до +3	0,64	2,0±3,6 (78)	3,1±0,85 (24)	2,6±0,82 (33)
с -1 до +3	0,64	4,0±5,2 (57)	3,9±0,59 (5)	3,6±0,52 (8)
с -7 до +3	3,2	0,04±0,08 (99,6)	1,5±0,59 (63)	1,5±0,85 (62)
с -1 до +3	3,2	1,0±1,4 (89)	3,4±0,46 (17)	2,8±0,24 (28)
с -7 до 0	3,2	0,9±1,1 (90)	2,9±0,97 (29)	2,6±0,48 (33)
-1, 0	3,2	20,4±15,7 (-222)	4,5±0,63 (-10)	4,7±0,65 (-21)

Примечания:

¹ Значение N составило пять для всех групп, обработанных несущей средой и лекарственным средством;

² Данные для микотической нагрузки и уровней GM показаны как среднее \pm стандартная ошибка среднего и процент ингибирования, по отношению к несущей среде.

Фармакокинетика in vivo

Это широко используемая процедура для легочных, терапевтических агентов, подлежащих введению в легкие животных, например, мышей. Для того чтобы охарактеризовать полученное в результате системное воздействие вводимого соединения, в разные моменты времени после введения дозы собирают плазму.

Соединение изобретения может быть протестировано в таких выше упомянутых системах in vivo.

Краткое изложение биологического профиля соединения (I)

Было обнаружено, что соединение (I) в виде всех четырех стереоизомеров является мощным ингибитором планктонного роста *Aspergillus fumigatus* и инфекции эпителиальных клеток бронхов. Соединение (Ia) ингибирует рост резистентных к позаконазолу и резистентных к вориконазолу изолятов *Aspergillus fumigatus*, демонстрируя большую мощност, чем позаконазол, вориконазол и амфотерицин В, по отношению к данным штаммам. Также было обнаружено, что к соединению (Ia) чувствителен широкий диапазон других патогенных грибов. Синергетическое или по меньшей мере аддитивное действие было продемонстрировано для соединения (Ia) в комбинации с позаконазолом, итраконазолом, вориконазолом и каспофунгином. In vivo, у мышей в нейтропении с ослабленным иммунитетом, инфицированных *Aspergillus fumigatus*, соединение (Ia), продемонстрировало мощное торможение инфекции *Aspergillus fumigatus*, а также ассоциированного иммунного ответа в легких при терапевтическом или профилактическом введении доз. Соединение (Ia) также было эффективно для уменьшения зависящей от инфекции потери массы тела. Эти ингибирующие влияния превосходили таковые позаконазола. Клинически важно, что благотворные противогрибковые эффекты соединения (I) наблюдаются с терапевтической целью.

Ссылки

Agbetile, J., Fairs, A., Desai, D., Hargadon, B., Bourne, M., Mutalithas, K., Edwards, R., Morley, J.P., Monteiro, W.R., Kulkarni, N.S., Green, R.H., 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.

Bafadhel M., McKenna S., Agbetile 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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

Denning D.W., Park S., Lass-Flori C., Fraczek M.G., Kirvan 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.

Dimopoulos G., Frantzeskaki F., Poulakou G. and Armaganidis A. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. Ann. NY Acad. Sci., 2012, 1272, 31-39.

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.

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., Mangel T.K., Zervas 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.

- 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, 2C19, and 3A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, 53, 541-551.
- Kaur S. and Singh S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.*, 2014, 52, 2-9.
- 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.
- Lat A. and Thompson G.R. Update on the optimal use of voriconazole for invasive fungal infections. *Infect. Drug Resist.*, 2011, 4, 43-53.
- 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., Perfect 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rankin, N. Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with granulocytosis and antibiotic therapy. *Br. Med. J.*, 1953, 183, 918-9.
- Rodriguez-Tudela J.L., Arendrup M.C., Arikan 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.
- 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.
- Shaus S.E., Larrow J.F. and Jacobsen E.N. Practical Synthesis of Enantiopure Cyclic 1,2-Amino Alcohols via Catalytic Asymmetric Ring Opening of Meso Epoxides. *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 4197-4199.
- Thompson G.R. and Patterson T.F. Pulmonary aspergillosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008, 29, 103-110.
- 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.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Pulmocide Limited

<120> Соединения

<130> PUL-P1873PCT

<140> EP15168637.5

<141> 2015-05-21

<160> 3

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 19

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первый праймер

<400> 1

ggcccttaaa tagcccggt

19

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Второй праймер

<400> 2

tgagccgata gtccccstaa

20

<210> 3

<211> 19

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Область ДНК гибридизационного зонда

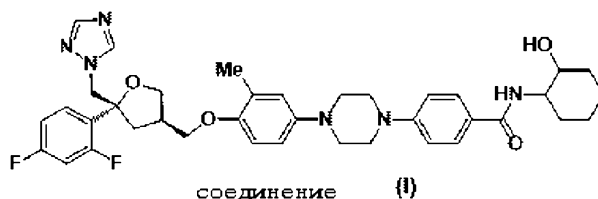
<400> 3

agccagcggc ccgcaaatg

19

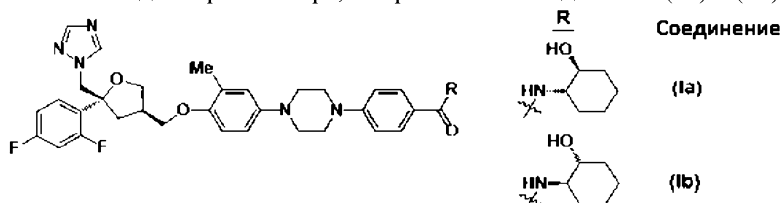
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



которое представляет собой 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-(2-гидроксициклогексил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль.

2. Соединение по п.1 в виде стереоизомера, выбранного из соединений (1a) и (1b)



или фармацевтически приемлемой соли любого одного из них.

3. Соединение по п.2, которое представляет собой соединение (1a)



представляющее собой 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-((1S,2S)-2-гидроксициклогексил)бензамид или его фармацевтически приемлемую соль.

4. Применение соединения по любому одному из пп.1-3 в производстве лекарственного средства для лечения микозов или для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с микозами.

5. Применение по п.4, где микоз вызван *Aspergillus* spp.

6. Применение по п.5, где *Aspergillus* spp. представляет собой *Aspergillus fumigatus* или *Aspergillus flavus*.

7. Применение по п.6, где *Aspergillus* spp. представляет собой *Aspergillus fumigatus*.

8. Применение по п.4, где микоз вызван *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Cladosporium herbarum*, *Trichophyton rubrum* или *Candida* spp.

9. Применение по п.8, где *Candida* spp. представляет собой *Candida albicans*, *Candida glabrata* или *Candida krusei*.

10. Применение по п.4, где микоз представляет собой азолорезистентный микоз.

11. Применение соединения по любому из пп.1-3 в качестве лекарственного препарата для лечения микозов или для предотвращения или лечения заболевания, ассоциированного с микозами в комбинации со вторым или дополнительным активным ингредиентом, где второй или дополнительный активный ингредиент представляет собой противогрибковый агент.

12. Применение по п.11, где противогрибковый агент представляет собой азоловый противогрибковый агент.

13. Применение по п.12, где азоловый противогрибковый агент представляет собой вориконазол, позаконазол, итраконазол или изавуконазол.

14. Применение по п.11, где противогрибковый агент выбирают из вориконазола, позаконазола, итраконазола и каспофунгина.

15. Фармацевтическая композиция, обладающая противогрибковой активностью, содержащая соединение по любому из пп.1-3 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, которая содержит второй или дополнительный активный ингредиент, где второй или дополнительный активный ингредиент представляет собой противогрибковый агент.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, где противогрибковый агент представляет собой азоловый противогрибковый агент.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, где азоловый противогрибковый агент представляет собой вориконазол, позаконазол, итраконазол или изавуконазол.

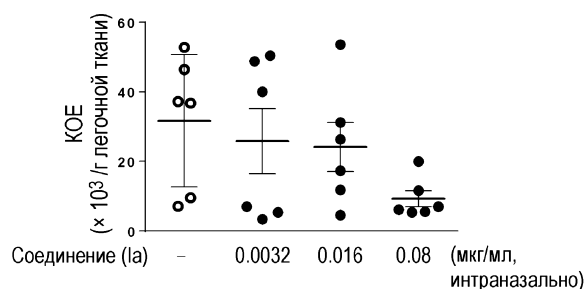
19. Фармацевтическая композиция по п.16, где второй или дополнительный активный ингредиент выбирают из вориконазола, позаконазола, итраконазола и каспофунгина.

20. Способ лечения пациента с микозом, который включает введение указанному пациенту эффективного количества соединения по любому одному из пп.1-3.

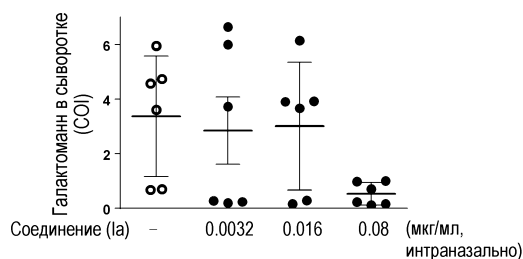
21. Способ по п.20, где микоз вызван *Aspergillus* spp.

22. Способ по п.20, где микоз вызван *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Cladosporium herbarum*, *Trichophyton rubrum* или *Candida* spp.

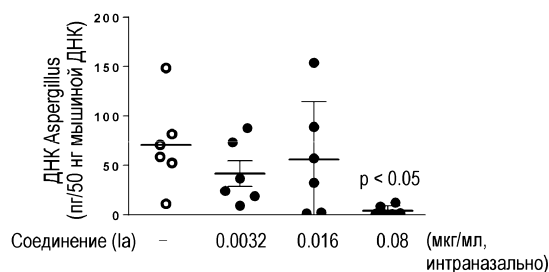
23. Способ по п.20, где микоз представляет собой азолорезистентный микоз.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2