

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033736**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.20

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

(21) Номер заявки
201791174

(22) Дата подачи заявки
2015.12.04

(54) АНТИМИКОТИЧЕСКОЕ СОЕДИНЕНИЕ

(31) **14196662.2**

(32) **2014.12.05**

(33) **EP**

(43) **2017.10.31**

(86) **PCT/GB2015/053731**

(87) **WO 2016/087878 2016.06.09**

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

(72) Изобретатель:
**Суносе Михиро, Колли Томас
Кристофер, Ито Кадзухиро, Рейппорт
Гарт, Стронг Питер (GB)**

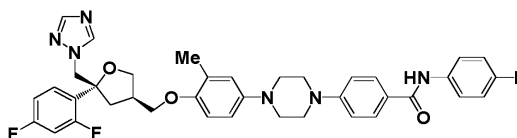
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) HEPERLE M. ET AL.: "Mono N-arylation of piperazine(III): metal-catalyzed N-arylation and its application to the novel preparations of the antifungal posaconazole and its advanced intermediate", TETRAHEDRON LETTERS, PERGAMON, GB, vol. 43, no. 18, 29 April 2002 (2002-04-29), pages 3359-3363, XP004349385, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/S0040-4039(02)00556-7 figure 1; compounds 1-2,28

SAKSENA A. K. ET AL.: "Stereoselective Grignard additions to N-formyl hydrazone: a concise synthesis of Noxafil<R> side chain and a synthesis of Noxafil<R>", TETRAHEDRON LETTERS, PERGAMON, GB, vol. 45, no. 44, 25 October 2004 (2004-10-25), pages 8249-8251, XP004591093, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/J.TETLET.2004.09.028 Scheme 4; compounds 13-14

PAUL BOWYER ET AL.: "Environmental fungicides and triazole resistance in Aspergillus", PEST MANAGEMENT SCIENCE, vol. 70, no. 2, 5 February 2014 (2014-02-05), pages 173-178, XP055169575, ISSN: 1526-498X, DOI: 10.1002/ps.3567 cited in the application compound Posaconazole

(57) Изобретение относится к соединению формулы (I), представленному ниже, фармацевтической композиции, содержащей его, его применению для лечения микозов или для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами, а также к способам его получения и промежуточным соединениям, используемым в данных способах.



033736 B1

033736 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к соединению, фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение, и его применению для лечения микозов или для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами.

Уровень техники

Количество случаев грибковых инфекций значительно увеличивается последние два десятилетия, и инвазивные формы являются ведущими причинами заболеваемости и смертности, особенно среди пациентов с ослабленным иммунитетом и после курса иммуносупрессивной терапии. Диссеминированный кандидоз, легочный аспергиллез и новые условно-патогенные грибы являются наиболее частыми агентами, вызывающими такие серьезные микозы. Отличительной чертой грибов является то, что они способны создавать внеклеточную матрицу (ВКМ), которая связывает их вместе и позволяет им прилипать к их *in vitro* или *in vivo* субстратам. Такие биопленки служат для защиты их от неблагоприятных условий окружающей среды иммунной системы хозяина, и для того, чтобы противостоять воздействию противомикробных препаратов (Kaur and Singh, 2013).

Легочный аспергиллез может быть разделен по пациентам, страдающим неинвазивным заболеванием и тем, которые имеют инвазивное состояние. Другой принцип деления используют для характеристики пациентов, которые имеют аллергический компонент к аспергиллезу (известный как АБРА; аллергический бронхолегочный аспергиллез), по сравнению с теми, которые не имеют. Факторы, провоцирующие легочный аспергиллез, могут включать острые, такие как воздействие высоких доз иммуносупрессивных лекарственных средств или интубирование в блоке интенсивной терапии. Альтернативно, они могут включать хронические, такие как предыдущая инфекция с туберкулезом (ТБ) (Denning et al., 2011a). Хронические инфекции легких аспергиллами могут вызывать у пациентов обширное и постоянное повреждение легких, которое требует пожизненного лечения пероральными азольными лекарственными средствами (Limper et al., 2011).

Растущее число исследований позволяет предположить, что заражение аспергиллами может играть важную роль в клинической астме (Chishimba et al., 2012; Pasqualotto et al., 2009). Более того, опубликованная работа связывает заражение аспергиллами с ухудшенными клиническими результатами у пациентов с ХОБЛ (Bafadhel et al., 2013). Подобные одновременные поперечные углубленные исследования показали связь между присутствием *Aspergillus* spp. и *Candida* spp. в мокроте и ухудшенной функцией легких (Chotirmall et al., 2010; Agbetile et al., 2012).

Инвазивный аспергиллез (ИА) демонстрирует повышенную смертность у пациентов с ослабленным иммунитетом, например, тех, которым были трансплантированы аллогенные стволовые клетки, или имеющим трансплантаты цельных органов (такие как трансплантаты легких). Первый случай ИА у пациента с ослабленным иммунитетом зафиксирован в 1953. Это событие произошло одновременно с введением кортикостероидов и цитотоксической химиотерапии в режимы лечения (Rankin, 1953). Инвазивный аспергиллез является серьезной проблемой при лечении лейкоза и других гематологических злокачественных опухолей, с учетом высокой степени заболеваемости и связанной с этим смертности. Доля смертей обычно превышает 50% (Lin et al., 2001), и долговременная доля может достигать 90% у пациентов с трансплантатами аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, несмотря на доступность пероральных триазольных лекарственных средств (Salmeron et al., 2012). У пациентов, перенесших трансплантацию цельного органа (в частности, легкого), применение высоких доз стероидов приводит к тому, что пациенты становятся восприимчивы к инфекции (Thompson and Patterson, 2008), что является серьезной проблемой. Заболевание также возникает у пациентов с менее тяжелым ослаблением иммунитета. Они включают пациентов, страдающих первопричинным ХОБЛ или циррозом, пациентов, получающих высокие дозы стероидов, и пациентов, которым вставлены центральные венозные катетеры или жизнь которых поддерживается искусственной вентиляцией легких (Dimopoulos et al., 2012).

Существующие противогрибковые лекарственные средства преимущественно вводят либо перорально, либо системно. Такие широко применяемые способы доставки не подходят для лечения инфекций дыхательных путей, так как концентрации лекарственного средства, достигаемые в месте заражения, как правило, меньше, чем концентрации в органах. Это особенно актуально для печени, которая является органом, аккумулирующим токсичность: вплоть до 15% пациентов, леченных вориконазолом, имеют повышенные уровни трансаминазы (Levin et al., 2007; Lat and Thompson, 2011). Воздействие на печень также приводит к значительному взаимодействию лекарств, возникающему при ингибировании печеночных ферментов P450 (Jeong, et al., 2009; Wexler et al., 2004).

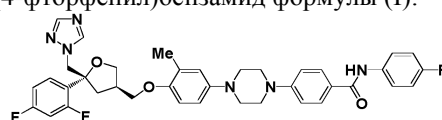
Более того, широкое применение триазолов в клинике и в сельском хозяйстве, привело к росту и проблематичному появлению резистентных микозов в некоторых очагах (Denning et al., 2011b; Bowyer and Denning, 2014).

Очевидно, что существует острая медицинская необходимость в новых противогрибковых лекарственных средствах, которые обладают улучшенной эффективностью и лучшими профилями переносимости лекарственного препарата.

Сущность изобретения

В первом аспекте данное изобретение предоставляет соединение, 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-(4-фторфенил)бензамид формулы (I):



Соединение (I)

и его фармацевтически приемлемые соли (далее в некоторых случаях названное "соединение в соответствии с данным изобретением").

Биологические данные, описанные ниже, показывают, что соединение в соответствии с данным изобретением, соединение формулы (I), является мощным ингибитором роста *Aspergillus fumigatus* в *in vitro* анализах. У мышей с подавленным иммунитетом соединение (I) демонстрирует эффективное ингибирование заражения *Aspergillus fumigatus*. Другие желательные свойства соединения (I) описаны в настоящем документе.

Во втором аспекте данное изобретение относится к применению соединения в соответствии с данным изобретением в качестве лекарственного средства для лечения микозов или для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами, где указанные микозы вызваны заражением грибом, выбранным из *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Rhizopus spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Chaetomium spp.*, *Penicillium spp.* и *Trichophyton spp.*

В еще одном аспекте данное изобретение относится к применению соединения в соответствии с данным изобретением в качестве лекарственного средства для лечения микозов или для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами, где указанные микозы вызваны заражением грибом, выбранным из *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Rhizopus spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Chaetomium spp.*, *Penicillium spp.* и *Trichophyton spp.* в комбинации со вторым или последующим активным ингредиентом, выбранным из противогрибковых агентов, амфотерицина В, эхинокандина и ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуктазы.

В другом аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество соединения в соответствии с данным изобретением и один или более фармацевтически приемлемых разбавителей или носителей.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к указанной фармацевтической композиции, дополнительно содержащей второй или последующий активный ингредиент, выбранный из противогрибковых агентов, амфотерицина В, эхинокандина и ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуктазы.

В дополнительных аспектах данное изобретение относится к способам получения соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли, а также к промежуточным соединениям, используемым в этих способах.

Краткое описание чертежей

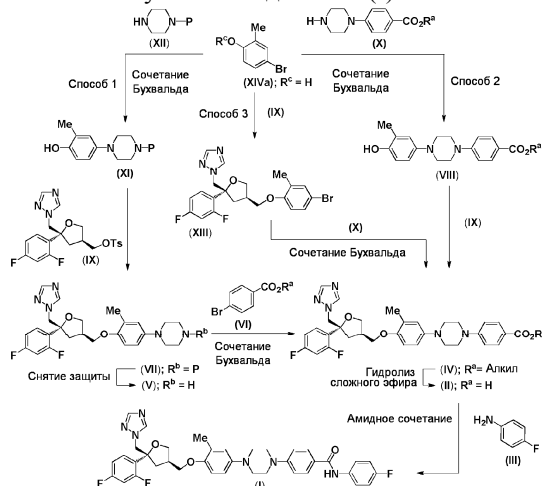
На фиг. 1 представлено действие профилактического и терапевтического лечения соединением (I) на КОЕ в легком, зараженном *Aspergillus fumigatus*, у нейтропенических мышей с ослабленным иммунитетом.

На фиг. 2 и фиг. 3 показано действие профилактического и терапевтического лечения соединением (I) на концентрации галактоманна в ЖБАЛ и сыворотке, соответственно, у зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с ослабленным иммунитетом.

На фиг. 1-3 символ *** означает значение с $P < 0,001$.

Подробное описание изобретения

Схема 1. Получение соединения (I) способами 1-3



Три альтернативных сходящихся способа, которые были разработаны для получения соединения (I) из коммерчески доступных исходных материалов, изображены выше (схема 1). Эти методы синтеза отличаются тем, каким способом получают перспективные промежуточные соединения сложного эфира бензойной кислоты формулы (IV).

Способ 1.

Сочетание Бухвальда подходящим образом защищенного производного пиперазина (XII) с 4-бром-2-метилфенолом (XIVa) в условиях, обычно применяемых для таких реакций, дает моно N-арилированный пиперазин (XI). Подходящей защитной группой азота для таких превращений является уретан, с применением Вос группы ($P=CO_2^tBu$). Специалист в данной области техники поймет, что множество условий может применяться для проведения превращений такого типа. В частности, палладиевые катализаторы и фосфиновые лиганды, такие как RuPhosG3 и RuPhos, обычно применяют в присутствии основания, например, карбоната цезия или гексаметилдисилазида лития. Алкилирование полученного фенола (XI) в щелочных условиях с тозилатом (IX) дает простой эфир (VII). Тозилат (IX) является конфигурационно стабильным не летучим (твердым) реагентом, который широко доступен, с высокой энантиомерной чистотой, из коммерческих источников; хотя другие электрофильные производные, такие как соответствующие производные мезилата, а также галометила (например, хлорметила и бромметила), могут быть предложены в качестве подходящих альтернатив для таких превращений. Удаление азотной защитной группы дает монозамещенный пиперазин (V). В случае Вос производного ($R^b=CO_2^tBu$), стадию снятия защиты с амина обычно проводят обработкой карбамата сильной минеральной кислотой или сильной органической кислотой, такой как ТФК, либо чистой, либо в присутствии растворителя, такого как ДХМ. Второе сочетание Бухвальда амина (V) с алкил-4-бромбензоатом (VI), в щелочных условиях и под влиянием катализатора, дает N,N'-бисарилированный продукт (IV), в котором R^a представляет низший алкил, такой как C_{1-5} алкил, например, метил или этил, или также трет-бутил.

Способ 2.

Промежуточные соединения сложного эфира бензойной кислоты (IV), могут быть получены альтернативным способом, в котором требуется только одно медиированное палладием сочетание. Реакция бромфенола (XIVa) с моно N-арилированным производным пиперазина [(X), R^a =низший алкил, такой как C_{1-5} алкил, например, метил или этил, или также трет-бутил], в стандартных условиях сочетания Бухвальда, дает 1,4-бисарилпиперазин (VIII). О-алкилирование этого фенольного продукта с тозилатом (IX), как описано выше, дает продукты простого эфира (IV) сразу, за две стадии, из коммерчески доступных исходных материалов.

Способ 3.

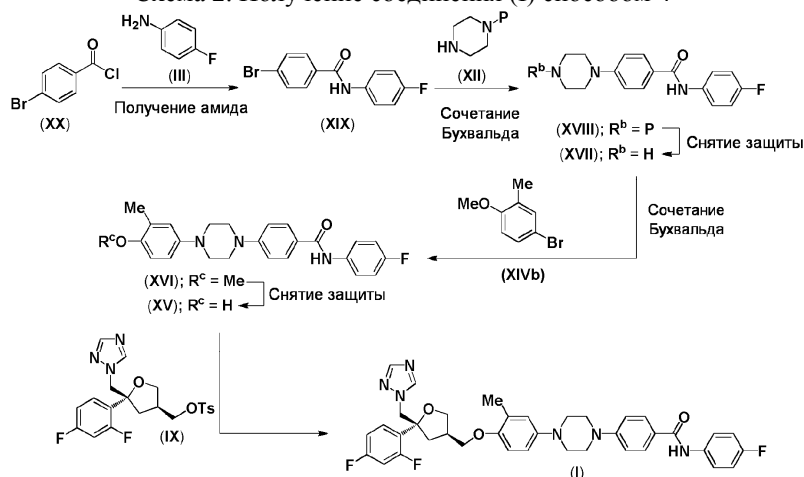
Из представленных выше способов получения (схема 1) должно быть понятно, что в некоторых случаях предпочтительно проводить такие же или похожие синтетические превращения в другом порядке, так, чтобы улучшить общую эффективность способов и/или качества полученных из них материалов. Например, бромфенол (XIVa) может быть превращен в соединения формулы (IV) проведением двух стадий, описанных выше, в обратном порядке. Таким образом, обработка указанного фенола тозилатом (IX) дает производные простого эфира формулы (XIII). Такой арилбромидный субстрат может быть подвергнут взаимодействию с N-арилпиперазином формулы (X) в условиях сочетания Бухвальда, как описано выше, с получением промежуточных соединений формулы (IV).

Получение соединения (I) из промежуточного соединения (IV)

В некоторых случаях, например, таких, где R^a является метилом или этилом, получение свободной бензойной кислоты (II) подходящим образом проводят обработкой сложного эфира (IV) с основанием в присутствии воды. Типовые условия включают обработку гидроксидом щелочного металла, такого как гидроксид лития, в смеси воды и подходящего смешиваемого с водой растворителя. В других случаях, как в случае трет-бутилового эфира, может быть предпочтительным проводить стадию гидролиза в кислых условиях. Обычные реагенты для таких взаимных превращений включают сильные неорганические кислоты, например, хлористо-водородную кислоту, в присутствии смешиваемого с водой органического растворителя, такого как ИПС.

Обработка продукта бензойной кислоты (II) 4-фторанилином в стандартных условиях сочетания, широко доступных в данной области техники, дает соединение в соответствии с данным изобретением, соединение (I). Например, реакция может проводиться смешиванием кислоты (II) и 4-фторанилина с сочетающимися агентами, такими как ГОБт и EDCI в полярном, не протонном растворителе, таком как ДМФ, в присутствии не нуклеофильного органического основания, обычно ДИПЭА и подобные.

Схема 2. Получение соединения (I) способом 4

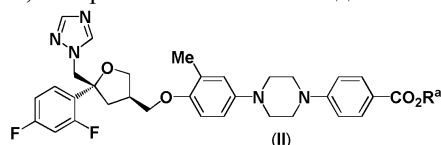


Способ 4

Соединение в соответствии с данным изобретением также может быть получено с применением еще одного варианта методики получения, описанного здесь (схема 2). В этом альтернативном способе (способ 4) образование амидной связи происходит на первой стадии, и образование простой эфирной связи составляет последнее синтетическое превращение. Ацилирование 4-фторанилина (III) 4-бромбензоилхлоридом (XX) дает фрагмент анилида (XIX). Как уже отмечено, такие амидные продукты могут быть получены непосредственно из соответствующего амина и бензойной кислоты с применением множества активирующих агентов, включая агенты пептидного сочетания, множество которых доступно в данной области техники. Помещение продукта арилбромида в условия сочетания Бухвальда с подходящим монозащищенным пиперазином (XII) под воздействием катализатора с применением указанной выше методики дает промежуточные соединения формулы (XVIII). В случае Вос защитной группы [$P=CO_2^tBu$], желаемый N-арилпиперазин (XVII) легко получают кратковременной обработкой сильной кислотой, например, обработкой ТФК, которую затем удобным образом удаляют из реакционной среды выпариванием при пониженном давлении. Фенольный предшественник соединения (I) [(XV); $R^c=H$] затем превращают за две стадии с применением сочетания Бухвальда с броманизолом (XIVb) с получением промежуточного соединения метилового эфира [(XVI) $R^c=Me$], с последующим O-деалкилированием с трибромидом бора. Фенол (XV) затем превращают в соединение (I) повторным алкилированием с тозилатным реагентом (IX) с применением описанной выше методики.

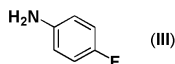
Защитные группы и способы их удаления описаны в "Protective Groups in Organic Synthesis", by Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, опубликованной John Wiley & Sons Inc; 4th Rev Ed., 2006, ISBN-10: 0471697540. Обзор методик получения амидов представлен в: "Amide bond formation and peptide coupling"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

Таким образом, в данном изобретении также представлен способ получения соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли, который включает взаимодействие соединения формулы (II):



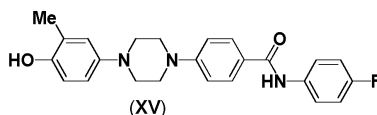
где R^a является водородом;

или его активированного производного (такого как галогенангидрид, например, хлорид кислоты, ангидрид кислоты или сложный эфир); или его соли;
с соединением формулы (III):



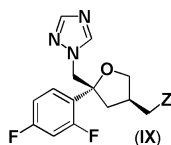
или его солью.

В изобретении также представлен способ получения соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли, который включает взаимодействие соединения формулы (XV):



или его соли;

с соединением формулы (IX):



где Z является уходящей группой, такой как p -толил SO_2O ; или его солью.

Фармацевтически приемлемые соли соединений формулы (I) включают, в частности, фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли указанных соединений. Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли соединений формулы (I) включают терапевтически активные не токсичные кислотно-аддитивные соли, которые способны образовывать соединения формулы (I). Эти фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли успешно могут быть получены обработкой свободного основания такими подходящими кислотами в подходящем растворителе или смеси растворителей. Подходящие кислоты включают, например, неорганические кислоты, такие как галогеноводородные кислоты, например, хлористоводородная или бромистоводородная кислота, серная, азотная, фосфорная кислоты и подобные; или органические кислоты, такие как, например, уксусная, пропановая, гидроксипропановая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, малеиновая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, метансульфоновая, этансульфоновая, бензолсульфоновая, p -толуолсульфоновая, цикламическая, салициловая, p -аминосалициловая, палмовая кислота и подобные.

В свою очередь, указанные соли могут быть превращены обработкой подходящим основанием в свободное основание.

Новые промежуточные соединения, описанные здесь, имеющие формулы (II), (IV), (V), (VII), (VIII), (XIII) и (XV) и их соли, являются другим аспектом данного изобретения. Соли включают фармацевтически приемлемые соли (такие, как указаны выше) и фармацевтически неприемлемые соли. Соли кислот (например, карбоновых кислот) включают соли металлов первой и второй группы, включая соли натрия, калия, магния и кальция.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение в соответствии с данным изобретением в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

Подходящим образом, соединение в соответствии с данным изобретением вводят местно в легкие или нос, в частности, местно в легкие. Таким образом, представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение в соответствии с данным изобретением в сочетании с одним или более приемлемыми для местного нанесения разбавителями или носителями.

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

Композиции успешно могут вводить в стандартной лекарственной форме, и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармацевтики, например, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Композиции также могут успешно вводиться в виде дозированной лекарственной формы, образованной множеством структурно обособленных единиц.

Местное введение в нос или легкие может быть достигнуто применением не находящейся под давлением композиции, такой как водный раствор или суспензия. Такие композиции могут вводиться с помощью распылителя, например, такого, который может быть ручным и портативным или может применяться дома или в больнице (то есть не является портативным). Типовым прибором является ингалятор RESPIMAT. Композиция может содержать наполнители, такие как вода, буферы, агенты, корректирующие тоничность, агенты, корректирующие pH, модификаторы вязкости, поверхностно-активные вещества и соразтворители (такие как этанол). Суспендированные жидкие и аэрозольные композиции (под давлением или не под давлением) обычно содержат соединение в соответствии с данным изобретением в тонкоизмельченной форме, например, с D_{50} 0,5-10 мкм, например, около 1-5 мкм. Распределение частиц по размеру может быть представлено с помощью значений D_{10} , D_{50} и D_{90} . Среднее значение D_{50} для распределения частиц по размеру определено как размер частицы в микронах, который делит распределение пополам. Измерение, получаемое лазерной дифракцией, более точно описывается как объемное распределение и, следовательно, значение D_{50} , полученное с применением этого метода, более достоверно может быть описано как значение Dv_{50} (среднее для объемного распределения). В данном описании значения Dv относятся к распределениям частиц по размеру, измеренным с применением лазерной дифракции. Так же, значения D_{10} и D_{90} , применяемые в контексте лазерной дифракции, являются значениями Dv_{10} и Dv_{90} и относятся к размеру частиц, который на 10% от распределения находится ниже значения D_{10} , и на 90% от распределения находится ниже значения D_{90} , соответственно.

Согласно одному конкретному аспекту данного изобретения, здесь представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение в соответствии с данным изобретением в виде частиц, суспендированных в водной среде. Водная среда обычно содержит воду и один или более наполнителей, выбранных

из буферов, агентов, корректирующих тоничность, агентов, корректирующих pH, модификаторов вязкости и поверхностно-активных агентов.

Местное введение в нос или легкое может быть достигнуто применением аэрозольной композиции. Аэрозольные композиции обычно включают активный ингредиент, суспендированный или растворенный в подходящем аэрозольном газе-вытеснителе, таком как хлорфторуглерод (ХФУ) или гидрофторуглерод (ГФУ). Подходящие ХФУ газы-вытеснители включают трихлормонофторметан (газ-вытеснитель 11), дихлортетрафторметан (газ-вытеснитель 114) и дихлордифторметан (газ-вытеснитель 12). Подходящие ГФУ газы-вытеснители включают тетрафторэтан (ГФУ-4а) и гептафторпропан (ГФУ-227). Газ-вытеснитель обычно составляет 40%-99,5%, например, 40%-90% массовых общей массы композиции для ингаляций. Композиция может содержать наполнители, включая сорастворители (например, этанол) и поверхностно-активные вещества (например, лецитин, сорбитан триолеат и подобные). Другие возможные наполнители включают полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глицерин и подобные. Аэрозольные композиции упакованы в баллончики, и подходящая доза доставляется с помощью мерного клапана (например, выпускаемого Bepak, Valois или 3М или, альтернативно, Aptar, Coster или Vari).

Местное введение в легкие также может быть достигнуто с применением сухой порошковой композиции. Сухая порошковая композиция содержит соединение в соответствии с данным изобретением в тонкоизмельченной форме, обычно с ММД 1-10 мкм или D_{50} 0,5-10 мкм, например, около 1-5 мкм. Порошки соединения в соответствии с данным изобретением в тонкоизмельченной форме могут быть получены способом микронизации или подобными способами снижения размера. Микронизация может проводиться с помощью струной мельницы, например, такой, как производится Hosokawa Alpine. Полученное распределение частиц по размеру может быть измерено с применением лазерной дифракции (например, с применением инструмента Malvern Mastersizer 2000S). Композиция обычно содержит приемлемый для местного введения разбавитель, такой как лактоза, глюкоза или манит (предпочтительно, лактоза), обычно с относительно большим размером частиц, например, ММД 50 мкм или более, например, 100 мкм или более, или D_{50} 40-150 мкм. В данном описании термин "лактоза" относится к содержащему лактозу компоненту, включая моногидрат α -лактозы, моногидрат β -лактозы, безводную α -лактозу, безводную β -лактозу и аморфную лактозу. Лактозные компоненты могут быть обработаны микронизацией, просеиванием, измельчением, прессованием, агломерацией или сушкой распылением. Коммерчески доступные формы лактозы в различных формах также включают, например, продукты Lactohale® (лактоза для ингаляций; DFE Pharma), InhaLac®70 (просеянная лактоза для сухого порошкового ингалятора; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) и Respitose® (просеянная лактоза для ингаляций; DFE Pharma). В одном варианте, лактозный компонент выбирают из группы, включающей моногидрат α -лактозы, безводную α -лактозу и аморфную лактозу. Предпочтительно, лактозой является моногидрат α -лактозы.

Сухие порошковые композиции также могут содержать другие наполнители, такие как стеарат натрия, стеарат кальция или стеарат магния.

Сухую порошковую композицию обычно доставляют с применением устройства ингалятор сухого порошка (ИСП). Примеры систем ингаляторов сухого порошка включают SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, SKYHALER, ACCUHALER и CLICKHALER. Другие примеры систем доставки сухого порошка включают ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, ORIEL ингалятор сухого порошка, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR и PROHALER.

Соединение в соответствии с данным изобретением также может вводиться местно на другие внутренние или внешние поверхности (например, слизистую поверхность кожи) или вводиться перорально.

Соединение в соответствии с данным изобретением может быть подходящим образом составлено для таких способов введения.

Соединение в соответствии с данным изобретением применяют для лечения микозов и для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами.

В одном аспекте данного изобретения представлено применение соединения в соответствии с данным изобретением в качестве лекарственного средства для лечения микозов или для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами.

Микозы, в частности, могут быть вызваны заражением грибом, выбранным из *Aspergillus* spp., таким как *Aspergillus fumigatus* или *Aspergillus pullulans*, в частности, *Aspergillus fumigatus*. Микозы также могут быть вызваны *Candida* spp., например, *Candida albicans* или *Candida glabrata*, *Rhizopus* spp., например, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus* spp., например, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium* spp., например, *Chaetomium globosum*, *Penicillium* spp., например, *Penicillium chrysogenum* и *Trichophyton* spp., например, *Trichophyton rubrum*.

Заболеванием, связанным с микозом, является, например, легочный аспергиллез.

Соединение в соответствии с данным изобретением может применяться в профилактических схемах посредством введения указанного соединения до наступления микоза.

Пациенты включают человека и животных, в частности, человека.

Соединение в соответствии с данным изобретением особенно полезно для лечения микозов, таких как инфекция *Aspergillus fumigatus*, и для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами, такими как инфекция *Aspergillus fumigatus*, у пациентов, находящихся в зоне риска. Пациенты, находящиеся в зоне риска, включают недоношенных детей, детей с врожденными патологиями легких или сердца, пациентов с ослабленным иммунитетом (например, страдающих ВИЧ инфекцией), астматиков, пациентов с кистозным фиброзом, пожилых пациентов и пациентов, страдающих хроническими заболеваниями, поражающими сердце или легкие (например, застойной сердечной недостаточностью или хроническим обструктивным заболеванием легких).

Соединение в соответствии с данным изобретением также полезно для лечения резистентных к азолу микозов, таких как резистентная к азолу инфекция *Aspergillus fumigatus*, в частности, в сочетании с позаконазолом.

Соединение в соответствии с данным изобретением может вводиться в комбинации со вторым или последующим активным ингредиентом. Второй или последующие активные ингредиенты, например, могут быть выбраны из других противогрибковых агентов (таких как вориконазол или позаконазол), амфотерицина В, эхинокандина (такого как каспофунгин) и ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-СoA редуктазы (такого как ловастатин, правастатин или флувастатин).

Второй или последующие активные ингредиенты включают активные ингредиенты, подходящие для лечения или профилактики микозов, таких как инфекция *Aspergillus fumigatus*, или заболевания, связанного с микозом, таким как инфекция *Aspergillus fumigatus*, или состояний, сопутствующих микозу, такому как инфекция *Aspergillus fumigatus*.

Соединение в соответствии с данным изобретением может быть составлено совместно со вторым или последующим активным ингредиентом, или второй или последующий активный ингредиент может быть составлен так, чтобы вводиться отдельно тем же или другим способом.

Например, соединение в соответствии с данным изобретением может вводиться пациентам, которых уже лечат системно противогрибковым агентом, таким как вориконазол или позаконазол.

Например, соединение в соответствии с данным изобретением может вводиться совместно, например, может быть составлено совместно с одним или более агентами, выбранными из амфотерицина В, эхинокандина, такого как каспофунгин, и ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-СoA редуктазы, такого как правастатин или флувастатин.

Соединение в соответствии с данным изобретением альтернативно (или дополнительно) может вводиться совместно, например, быть составлено совместно с одним или более агентами, выбранными из кандицидина, филипина, гамицина, натамицина, нистатина, римоцидина, бифоназола, бутконазола, клотримазола, эконазола, фентиконазола, изоконазола, кетоконазола, луликоназола, миконазола, омоконазола, оксиконазола, сертаконазола, сульконазола, тиокконазола, альбаконазола, эфинаконазола, эпоксиконазола, флуконазола, изавуконазола, итраконазола, пропиконазола, равуконазола, терконазола, абафунгина, аморолфина, бутенафина, нафтифина, тербинафина, анидулафунгина, микафунгина, бензойной кислоты, циклопирокса, флуцитозина (5-фторцитозина), гризеофульвина, толнафтата и ундециленовой кислоты.

Предпочтительные партнеры для сочетания включают интраконазол, вориконазол, каспофунгин и позаконазол.

Соединение в соответствии с данным изобретением может вводиться с подходящим интервалом, например, один раз в сутки, два раза в сутки, три раза в сутки или четыре раза в сутки.

Подходящая доза для человека со средней массой тела (50-70 кг), как ожидается, составляет от около 50 мкг до 10 мг/сутки, например, от 500 мкг до 5 мг/сутки, хотя точная вводимая доза должна определяться специалистом.

Ожидается, что соединение в соответствии с данным изобретением обладает одной или более из представленных ниже благоприятных характеристик:

мощное противогрибковое действие, в частности, против *Aspergillus spp.*, таких как *Aspergillus fumigatus* или действие против *Candida spp.*, например, *Candida albicans* или *Candida glabrata*, *Rhizopus spp.*, например, *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus spp.*, например, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium spp.*, например, *Chaetomium globosum*, *Penicillium spp.*, например, *Penicillium chrysogenum*, или *Trichophyton spp.*, например, *Trichophyton rubrum*, особенно после местного введения в легкие или нос; длительное действие в легких, предпочтительно, совместимое с введением один раз в сутки; низкое системное воздействие после местного введения в легкие или нос; и приемлемый профиль безопасности, особенно после местного введения в легкие или нос.

Экспериментальный раздел

Применяемые здесь аббревиатуры определены ниже (табл. 1). Любые аббревиатуры, не определенные здесь, рассматриваются как принимающих их общепринятое значение.

Таблица 1. Аббревиатуры

АБЛА	аллергический бронхолегочный аспергиллез
водн.	водный
АТСС	Американская коллекция типовых культур
ЖБАЛ	жидкость бронхоальвеолярного лаважа
BEAS2B	SV40-иммортилизованная колония клеток эпителия бронхов человека
Вос	трет-бутилоксикарбонил
ш	уширенный
АВС	альбумин бычьей сыворотки
CC ₅₀	концентрация цитотоксичности для 50% клеток
КОЕ	колониеобразующая единица (ы)
CLSI	Институт клинических и лабораторных стандартов
ИПЗ	индекс порогового значения
конц.	концентрация/концентрированный
д	дублет
ДХМ	дихлорметан
DFB ₅₀	дни, необходимые для достижения грибковой нагрузки на 50% от контроля
ДИПЭА	N,N-диизопропилэтиламин
ДМАП	4-диметиламинопиридин
DMEM	Модифицированная по Дульбекко среда Игла
ДМФ	N,N-диметилформамид
ДМСО	диметилсульфоксид
ДСН	декстрансульфат натрия
ЭМС	эндотелиальная минимальная среда
ВКМ	внеклеточная матрица
EDCI.HCl	гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимида
СРЭК2	среда для роста эндотелиальных клеток 2
EUCAST	Европейский комитет по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам
(ИЭР ⁺)	ионизация электрораспылением, положительный режим
Et	этил
Et ₃ N	триэтиламин
EtOAc	этилацетат
ФБС	фетальная бычья сыворотка
ГМ	галактоманнан
КЭЛАЧ	клетки эндотелия легочной артерии человека
ГОБТ.Н ₂ O	моногидрат 1-гидроксibenзотриазола
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой
ч	час (ы)
ИА	инвазивный аспергиллез
и.н.	интраназально

ИПС	2-пропанол
и.т.	интратрахеальный
ЖХ-МС	жидкостная хроматография-масс спектрометрия
Li Нер	гепарин лития
LiHMDS	бис (триметилсилил) амид лития
м	мультиплет
(M+H) ⁺	протонированный молекулярный ион
МДА	малондиальдегид
Me	метил
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
МГц	мегагерц
МИК ₅₀	50% от минимальной ингибирующей концентрации
МИК ₇₅	75% от минимальной ингибирующей концентрации
МИК ₉₀	90% от минимальной ингибирующей концентрации
мин	минута (ы)
ММД	медианно-массовый диаметр
МЗ	множественность заражения
МОПС	3- (N-морфолино) пропансульфоновая кислота
m/z:	отношение масса/заряд
NCPP	Национальная коллекция патогенных грибов
ЯМР	ядерный магнитный резонанс (спектроскопия)
НТ	не тестировано
ОП	оптическая плотность
ФРФБ	физиологический раствор с фосфатным буфером
P	защитная группа
кв	квартет
КТ	комнатная температура
ОФ ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой
RPMI	среда Мемориального института Розуэлл Парк
RuPhos	2-дициклогексилфосфино-2', 6'-диизопропоксибифенил
RuPhosG3	метансульфонат (2-дициклогексилфосфино-2', 6'-диизопропоксибифенил) [2- (2'-амино-1, 1'-бифенил)] палладия (II)
с	синглет
насыщ.	насыщенный
пк	подкожно
ДСН	додецилсульфат натрия
т	триплет
ТФК	трифторуксусная кислота
ТГФ	тетрагидрофуран
TR34/L98	Штамм <i>Aspergillus fumigates</i> , содержащий замещение лейцина на
Н	гистидин на кодоне 98 и повтор 34-бр тандема

Общие методики

Все исходные материалы и растворители получают либо из коммерческих источников, либо получают, как описано в литературе. Если не указано иначе, все реакционные смеси перемешивают. Органические растворы обычно сушат над безводным сульфатом магния.

Методы анализа

Методы ВЭЖХ с обращенной фазой.

Колонка Waters Xselect CSH C18 XP, 2,5 мкм (4,6×30 мм) при 40°C; скорость потока 2,5-4,5 мл мин⁻¹,

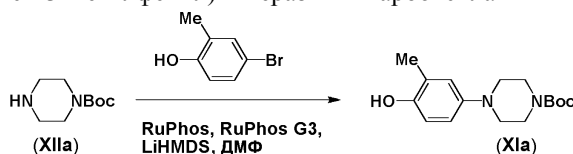
элюируют H₂O-MeCN градиентом, содержащим либо 0,1% об./об. муравьиной кислоты (способ а), либо 10 мМ NH₄HCO₃ в воде (способ б) в течение более 4 мин с применением УФ определения при 254 нм. Информация по градиенту: 0-3,00 мин, изменяется от 95% H₂O-5% MeCN до 5% H₂O-95% MeCN; 3,00-3,01 мин, поддерживается на уровне 5% H₂O-95% MeCN, скорость потока увеличивается до 4,5 мл мин⁻¹; 3,01-3,50 мин, поддерживается на уровне 5% H₂O-95% MeCN; 3,50-3,60 мин, возвращается к 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока снижается до 3,50 мл мин⁻¹; 3,60-3,90 мин, поддерживается на уровне 95% H₂O-5% MeCN; 3,90-4,00 мин, поддерживается на уровне 95% H₂O-5% MeCN, скорость потока снижается до 2,5 мл мин⁻¹.

¹H ЯМР спектроскопия.

¹H ЯМР спектр получают на спектрометре Bruker Advance III при 400 МГц с применением остаточного недеирированного растворителя в качестве референтного значения и, если не указано иначе, проводят в DMSO-d₆.

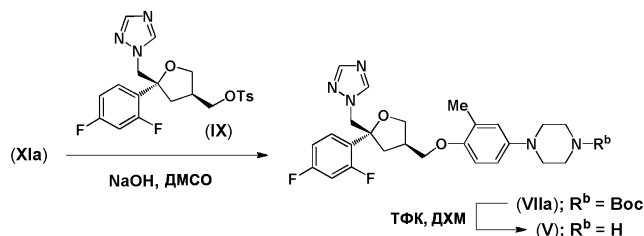
Способы синтеза для получения соединения (I)

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



Колбу, в которую загружены трет-бутилпиперазин-1-карбоксилат (XIIa) (7,44 г, 40,0 ммоль), 4-бром-2-метилфенол (6,23 г, 33,3 ммоль), RuPhos (311 мг, 0,67 ммоль) и RuPhos G3 (557 мг, 0,67 ммоль) вакуумируют и повторно заполняют азотом три раза. Добавляют Раствор LiHMDS (1М в ТГФ, 100 мл, 100 ммоль), и реакционную смесь нагревают при 70°C в течение 3 ч. После охлаждения до КТ смесь гасят добавлением 1М хлористо-водородной кислоты (100 мл) и затем нейтрализуют 1М водн. NaHCO₃ (100 мл). Водный слой экстрагируют EtOAc (3×100 мл), и объединенные органические экстракты сушат. Летучие соединения удаляют в вакууме с получением неочищенного продукта, который очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 120 г, 0-100% EtOAc в изогексане, градиентное элюирование) с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (XIa), в виде светло-коричневого твердого вещества (7,80 г, 78%); R^t 2,07 мин (способ б); m/z 293 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 1,41 (9H, с), 2,07 (3H, с), 2,86-2,88 (4H, м), 3,41-3,43 (4H, м), 6,58-6,65 (2H, м), 6,71 (1H, д) и 8,72 (1H, с).

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

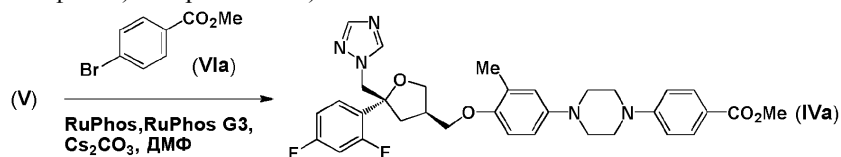


К раствору промежуточного соединения (XIa) (7,80 г, 25,1 ммоль) в DMSO (60 мл) добавляют водн. гидроксид натрия (3,0 мл, 12,5 М, 37,6 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 10 мин и затем обрабатывают порциями ((3S,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метил-4-метилбензолсульфонатом (IX) (бывш. APIChem, каталожный №: AC-8330, 12,4 г, 27,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 30°C в течение 18 ч, охлаждают до КТ и добавляют воду (200 мл).

Полученную смесь экстрагируют EtOAc (3×200 мл), и объединенные органические экстракты промывают насыщенным раствором соли (2×200 мл) и затем сушат и выпаривают в вакууме с получением коричневого масла. Анализ неочищенного, Вос-защищенного продукта (VIIa) ¹H ЯМР показал, что он содержит ~10% алкена: (R)-1-((2-(2,4-дифторфенил)-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метил)-1H-1,2,4-триазола, образовавшегося в виде выводимого побочного продукта. Неочищенный уретан (VIIa) помещают в ДХМ (150 мл) и обрабатывают ТФК (39,0 мл, 502 ммоль). Через 2 ч при КТ реакционную смесь концентрируют в вакууме для удаления большей части летучих соединений и затем разбавляют EtOAc (200 мл) и промывают водн. NaOH (2М, 200 мл). Водную фазу отделяют и экстрагируют EtOAc (2×200 мл). Объединенные органические экстракты промывают насыщенным раствором соли (2×200 мл) и затем сушат и выпаривают в вакууме с получением светло-коричневого масла. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 80 г, 0-10% 0,7М NH₃/MeOH в ДХМ, градиентное элюирование) с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (V), в виде вязкого, светло-коричневого масла (9,46 г, 80%); R^t 1,91 мин (способ б); m/z 470 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 2,07 (3H, с), 2,15 (1H, дд), 2,36-2,42 (1H, м), 2,52-2,56 (1H, м), 2,79-2,81 (4H, м), 2,87-2,90 (4H, м), 3,66 (1H, дд), 3,73-3,77 (2H, м), 4,04 (1H, т), 4,57 (2H, дд), 6,64 (1H, дд), 6,70-6,75 (2H, м), 6,99 (1H, тд), 7,25-7,34 (2H,

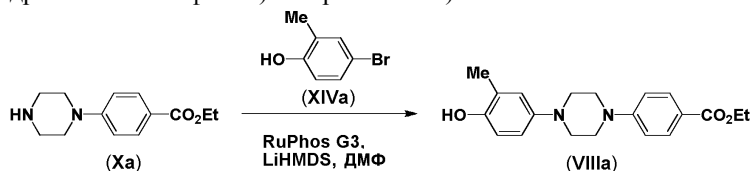
м), 7,76 (1H, с) и 8,34 (1H, с).

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



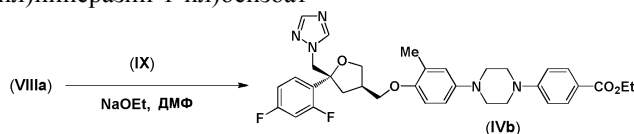
Колбу, в которую загружены промежуточное соединение (V) (9,00 г, 19,2 ммоль), метил-4-бромбензоат (VIa) (4,95 г, 23,0 ммоль), RuPhos (0,18 г, 0,38 ммоль, 2 мол.%), RuPhosG3 (0,32 г, 0,38 ммоль, 2 мол.%) и карбонат цезия (9,99 г, 30,7 ммоль), вакуумируют и повторно заполняют азотом три раза, затем добавляют ДМФ (150 мл). Смесь нагревают при 80°C в течение 22 ч и затем, пока смесь остается горячей, выливают в воду (150 мл) с получением коричневой смолы. Добавляют еще воду (300 мл) добавляют, и водн. фазу экстрагируют ДХМ (2×200 мл). Органические экстракты объединяют и концентрируют в вакууме с получением коричневого масла, которое выливают в воду (100 мл). Полученный осадок собирают фильтрацией и затем повторно суспендируют при ТГФ (100 мл). Смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 1 ч, во время чего образуется кремовая суспензия. Смесь охлаждают до КТ, и полученный осадок собирают фильтрацией, промывают ТГФ (2×50 мл) и затем сушат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (IVa), в виде светло-желтого твердого вещества (9,48 г, 79%); R^t 2,79 мин (Способ b); m/z 604 ($M+H$)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ : 2,09 (3H, с), 2,16 (1H, дд), 2,37-2,43 (1H, м), 2,52-2,58 (1H, м), 3,11-3,14 (4H, м), 3,43-3,46 (4H, м), 3,68 (1H, дд), 3,74-3,79 (5H, с перекрывает м), 4,05 (1H, дд), 4,58 (2H, дд), 6,75 (2H, шс), 6,85 (1H, шд), 7,00 (1H, тд), 7,04 (2H, д), 7,25-7,34 (2H, м), 7,76 (1H, с), 7,81 (2H, д) и 8,34 (1H, с).

Этил-4-(4-(4-гидрокси-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензоат



Колбу, в которую загружены раствор этил-4-(пиперазин-1-ил)бензоата (Xa) (20,0 г, 85,0 ммоль) и 4-бром-2-метилфенола (19,2 г, 102 ммоль) в ДМФ (213 мл) вакуумируют и повторно заполняют азотом три раза. Добавляют RuPhos G3 (1,43 г, 1,71 ммоль), и колбу вакуумируют и повторно заполняют азотом. Реакционную смесь охлаждают до 0°C и добавляют LiHMDS (17,1 г, 102 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при КТ в течение 10 мин, затем охлаждают на ледяной бане и добавляют LiHMDS (20,0 г, 120 ммоль) равными порциями (7×2,85 г) с интервалом 5 мин. Полученный раствор перемешивают при КТ в течение 30 мин и затем охлаждают до 0°C и обрабатывают 2М хлористо-водородной кислотой (200 мл) с получением pH 6-7. Смесь перемешивают в течение 15 мин при КТ и затем экстрагируют EtOAc (220 мл). Водный слой отделяют и экстрагируют EtOAc (4×50 мл), и объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли (6×50 мл), и затем сушат и выпаривают в вакууме с получением кремового твердого вещества. Добавляют смесь изогексана и ИПС (1:1, 150 мл), и суспензию перемешивают при КТ в течение 30 мин. Твердое вещество собирают фильтрацией, и фильтровальную лещуку промывают смесью изогексана и ИПС (1:1, 2×10 мл), затем изогексаном (4×10 мл) и сушат в вакууме при 40°C в течение 18 ч с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (VIIIa), в виде кремового твердого вещества (15,3 г, 50%); R^t 2,29 мин (способ b); m/z 341 ($M+H$)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ : 1,29 (3H, т), 2,09 (3H, с), 3,06-3,09 (4H, м), 3,42-3,44 (4H, м), 4,24 (2H, дд), 6,66 (2H, шс), 6,76 (1H, шс), 7,03 (2H, д), 7,80 (2H, д), 8,72 (1H, с).

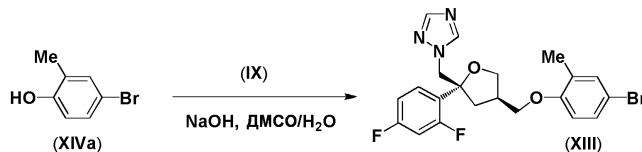
Этил-4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензоат



К раствору промежуточного соединения (VIIIa) (15,3 г, 44,9 ммоль) в ДМФ (110 мл) охлаждают до 0°C, добавляют этюксид натрия (3,13 г, 46,1 ммоль), и смесь перемешивают при 0°C в течение 10 мин и затем обрабатывают тозилатом (IX) (20,2 г, 44,9 ммоль). Реакционную смесь нагревают до КТ, нагревают до 50°C в течение 1 ч и затем охлаждают до КТ. Добавляют хлористо-водородную кислоту (1M, 60 мл) и воду (200 мл), и смесь перемешивают в течение 30 мин при КТ и затем экстрагируют ДХМ (150 мл). Водный слой отделяют и экстрагируют ДХМ (2×50 мл), и объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли (4×30 мл) и затем сушат и выпаривают в вакууме с получением кремового твердого вещества. Твердое вещество суспендируют в равной смеси изогексана и ИПС (80 мл) и пере-

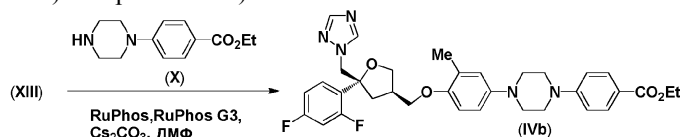
мешивают при КТ в течение 1 ч. Твердое вещество собирают фильтрацией, промывают 1:1 смесью изогексана и ИПС (3×20 мл) и затем сушат в вакууме при 40°C в течение 18 ч с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (IVb) в виде белого твердого вещества (16,4 г, 56%); R^t 2,92 мин (Способ b); m/z 618 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 1,29 (3H, т), 2,10 (3H, с), 2,16 (1H, дд), 2,37-2,42 (1H, м), 2,52-2,58 (1H, м), 3,12-3,14 (4H, м), 3,43-3,46 (4H, м), 3,68 (1H, дд), 3,74-3,79 (2H, м), 4,05 (1H, дд), 4,24 (2H, дд), 4,58 (2H, дд), 6,76 (2H, шс), 6,86 (1H, шс), 6,98-7,05 (3H, м), 7,26-7,34 (2H, м), 7,77 (1H, с), 7,81 (2H, д), 8,34 (1H, с).

1-((2R,AR)-4-((4-бром-2-метилфенокси)метил)-2-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-2-ил)метил)-1H-1,2,4-триазол



К раствору 4-бром-2-метилфенола (920 мг, 4,89 ммоль) в ДМСО (10 мл) добавляют водн. гидроксид натрия (0,39 мл, 12,5 М, 4,89 ммоль), и смесь перемешивают при КТ в течение 10 мин и затем обрабатывают тозилатом (IX) (2,00 г, 4,45 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 60°C в течение 72 ч, затем охлаждают до КТ и разделяют между водой (25 мл) и EtOAc (20 мл). Органическую фазу отделяют и сохраняют, и водный слой экстрагируют EtOAc (3×25 мл). Объединенные органические экстракты промывают насыщенным раствором соли (3×15 мл) и затем сушат и выпаривают в вакууме. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 12 г, 0-30% EtOAc в ДХМ, градиентное элюирование) с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (XIII), в виде бесцветного масла (1,84 г, 86%); R^t 2,78 мин (способ a); m/z 464 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 2,09 (3H, с), 2,17 (1H, дд), 2,37-2,43 (1H, м), 2,52-2,60 (1H, м), 3,72-3,78 (2H, м), 3,82 (1H, дд), 4,00-4,06 (1H, м), 4,57 (2H, дд), 6,82 (1H, д), 7,00 (1H, тд), 7,25-7,34 (4H, м), 7,76 (1H, с), 8,34 (1H, с).

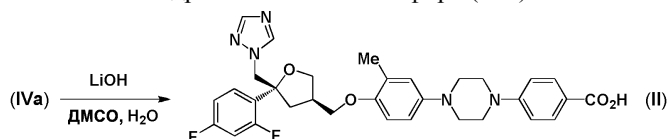
Этил-4-(4-((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензоат



Пробирку, в которую загружены этил-4-(пиперазин-1-ил)бензоат (X) (103 мг, 0,44 ммоль), промежуточное соединение (XIII) (170 мг, 0,37 ммоль), RuPhos (8,5 мг, 18 мкмоль), RuPhos G3 (14,2 мг, 18 мкмоль) и карбонат цезия (191 мг, 0,59 ммоль) вакуумируют и повторно заполняют азотом три раза, затем добавляют ДМФ (3,0 мл). Смесь нагревают при 80°C в течение 18 ч и затем при 100°C в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждают до КТ и разделяют между водой (10 мл) и EtOAc (10 мл). Органическую фазу отделяют и сохраняют, и водный слой экстрагируют EtOAc (3×10 мл). Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли (3×10 мл) и затем сушат и выпаривают в вакууме. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 12 г, 0-100% EtOAc в изогексане, градиентное элюирование) с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (IVb), в виде белого твердого вещества (100 мг, 43%).

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.

Гидролиз метилового эфира (IVa)

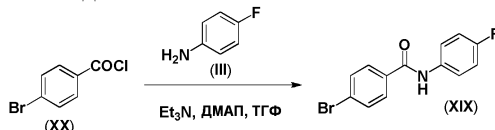


К суспензии промежуточного соединения (IVa) (9,00 г, 14,9 ммоль) в ДМСО (370 мл) добавляют раствор гидроксида лития (1,79 г, 74,5 ммоль) в воде (37,0 мл). Смесь нагревают при 70°C в течение 22 ч и затем охлаждают до КТ, разбавляют водой (1000 мл) и подкисляют (до pH 2) добавлением 1М водной хлористо-водородной кислоты (80 мл). Смесь охлаждают на ледяной бане в течение 2 ч, и полученный осадок собирают фильтрацией. Фильтровальную лепешку промывают водой (3×80 мл) и сушат в вакууме при 50°C с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (II) в виде белого твердого вещества (4,66 г, 54%); R^t 2,21 мин (способ 1a); m/z 590 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 2,10 (3H, с), 2,16 (1H, дд), 2,37-2,43 (1H, м), 2,52-2,58 (1H, м), 3,12-3,14 (4H, м), 3,42-3,45 (4H, м), 3,68 (1H, дд), 3,74-3,79 (2H, м), 4,05 (1H, дд), 4,58 (2H, дд), 6,76 (2H, шс), 6,86 (1H, шд), 6,97-7,03 (3H, м), 7,25-7,34 (2H, м), 7,77-7,80 (3H, м), 8,34 (1H, с) и 12,31 (1H, с).

Гидролиз этилового эфира (IVb)

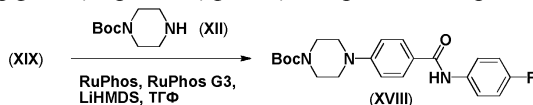
К суспензии промежуточного соединения (IVb) (16,4 г, 26,6 ммоль) в ДМСО (375 мл) добавляют раствор гидроксид лития (3,18 г, 74,5 ммоль) в воде (50 мл). Смесь нагревают при 70°C в течение 22 ч и затем охлаждают до КТ, выливают в воду (500 мл) и подкисляют (до pH 5-6) добавлением 2М хлористоводородной кислоты (70 мл). Смесь перемешивают при КТ в течение 30 мин, и полученное твердое вещество собирают фильтрацией и промывают водой (2×20 мл) и диэтиловым эфиром (3×30 мл) и затем сушат в вакууме при 40°C в течение 18 ч с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (II) в виде рыжевато-коричневого твердого вещества (14,2 г, 84%); R^t 2,26 мин (способ 1a); m/z 590 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ : 2,09 (3H, с), 2,16 (1H, дд), 2,37-2,42 (1H, м), 2,52-2,58 (1H, м), 3,12-3,14 (4H, м), 3,42-3,44 (4H, м), 3,68 (1H, дд), 3,74-3,79 (2H, м), 4,05 (1H, дд), 4,58 (2H, дд), 6,75 (2H, шс), 6,86 (1H, шс), 6,97-7,03 (3H, м), 7,26-7,34 (2H, м), 7,77-7,80 (3H, м), 8,34 (1H, с), 12,31 (1H, шс).

4-Бром-N-(4-фторфенил)бензамид



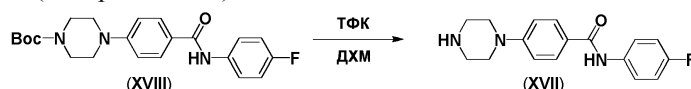
К раствору 4-фторанилина (III) (0,85 мл, 9,00 ммоль), триэтиламина (1,88 мл, 13,5 ммоль) и ДМАП (0,11 г, 0,90 ммоль) в ТГФ (15 мл) добавляют 4-бромбензоилхлорид (XX) (2,37 г, 10,8 ммоль). Реакционную смесь выдерживают при КТ в течение 1 ч и затем разделяют между EtOAc (100 мл) и 1М хлористоводородной кислотой (100 мл). Органическую фазу отделяют и промывают последовательно 1М хлористоводородной кислотой (100 мл), насыщ. водн. NaHCO₃ (100 мл) и насыщенным раствором соли (100 мл) и затем сушат и выпаривают в вакууме. Неочищенный остаток растирают из теплого ДХМ (100 мл), и смесь нагревают при кипении с обратным холодильником с получением белой суспензии, которую охлаждают до КТ. Полученный осадок собирают фильтрацией с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (XIX), в виде белого твердого вещества (1,81 г, 65%); R^t 2,23 мин; m/z 294/296 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ : 7,20 (2H, т), 7,74-7,79 (4H, м), 7,90 (2H, д) и 10,36 (1H, с).

трет-Бутил-4-(4-((4-фторфенил)карбамил)фенил)пиперазине-1-карбоксилат



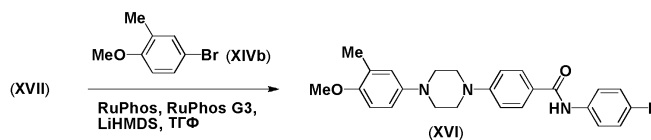
Колбу, в которую загружены трет-бутилпиперазин-1-карбоксилат (XII) (4,00 г, 21,5 ммоль), промежуточное соединение (XIX) (6,63 г, 22,6 ммоль), RuPhos (100 мг, 0,215 ммоль) и RuPhos G3 (180 мг, 0,215 ммоль), вакуумируют и повторно заполняют азотом три раза. Добавляют раствор LiHMDS (1М в ТГФ, 75,0 мл, 75,0 ммоль), и реакционную смесь нагревают при 70°C в течение 5 ч. После охлаждения до КТ смесь разделяют между EtOAc (150 мл) и 1М хлористоводородной кислотой (150 мл). Органическую фазу отделяют и сохраняют, и водную фазу экстрагируют EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические слои сушат и концентрируют в вакууме с получением коричневого твердого вещества, которое растирают в смеси изогексана и диэтилового эфира (1:1, 100 мл). Полученный продукт собирают фильтрацией, промывают смесью изогексана и диэтилового эфира (1:1, 25 мл) и затем сушат в вакууме при 40°C с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (XVIII) в виде рыжевато-коричневого твердого вещества (6,44 г, 85%); R^t 2,40 мин (способ а); m/z 400 (M+H)⁺; ¹H ЯМР δ : 1,43 (9H, с), 3,27-3,30 (4H, м), 3,45-3,48 (4H, м), 7,03 (2H, д), 7,14-7,18 (2H, м), 7,74-7,79 (2H, м), 7,88 (2H, д), 9,99 (1H, с).

N-(4-фторфенил)-4-(пиперазин-1-ил)бензамид.



К раствору промежуточного соединения (XVIII) (6,44 г, 16,1 ммоль) в ДХМ (200 мл) добавляют ТФК (24,7 мл, 322 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при КТ в течение 2 ч и затем выпаривают в вакууме. Добавляют толуол (5,0 мл), и смесь снова выпаривают в вакууме. Полученное масло помещают в смесь ДХМ (90 мл) и метанола (10 мл) и затем экстрагируют смесью воды (50 мл) и насыщ. водн. NaHCO₃ (50 мл). Органическую фазу отделяют и сохраняют, и водный слой экстрагируют смесью ДХМ и метанола (9:1, 3×100 мл). Объединенные органические слои сушат и концентрируют в вакууме с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (XVII), в виде коричневого твердого вещества (3,74 г, 70%); R^t 1,02 мин (способ а); m/z 300 (M+H)⁺; ¹H ЯМР δ : 2,81-2,83 (4H, м), 3,18-3,20 (4H, м), 6,99 (2H, д), 7,14-7,18 (2H, м), 7,74-7,80 (2H, м), 7,85 (2H, д), 9,99 (1H, с).

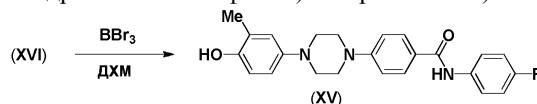
N-(4-Фторфенил)-4-(4-(4-метокси-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензамид



Колбу, в которую загружены 4-бром-1-метокси-2-метилбензол (XIVb) (406 мг, 2,02 ммоль), промежуточное соединение (XVII) (550 мг, 1,84 ммоль), RuPhos (43 мг, 0,092 ммоль) и RuPhos G3 (77 мг, 0,092 ммоль) вакуумируют и повторно заполняют азотом три раза. Добавляют раствор LiHMDS (9,2 мл, 1М в THF, 9,2 ммоль), и реакционную смесь нагревают при 70°C в течение 8 ч. После охлаждения до КТ смесь гасят добавлением 1М водн. хлористо-водородной кислоты (9,0 мл) и затем разделяют между водой (15 мл) и EtOAc (15 мл). Органический слой отделяют и сохраняют, и водный слой экстрагируют EtOAc (2×15 мл).

Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли (20 мл) и затем сушат и выпаривают в вакууме. Полученный неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 12 г, 0-100% EtOAc в изогексане, градиентное элюирование) с получением желтого твердого вещества. Этот продукт повторно очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 4 г, 0-10% EtOAc в ДХМ, градиентное элюирование) с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (XVI), в виде беловатого твердого вещества (83 мг, 11%); R^t 2,27 мин (способ а); m/z 420 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 2,13 (3H, с), 3,13-3,16 (4H, м), 3,42-3,45 (4H, м), 3,72 (3H, с), 6,77-6,88 (3H, м), 7,08 (2H, д), 7,17 (2H, т), 7,75-7,80 (2H, м), 7,89 (2H, д), 10,02 (1H, с).

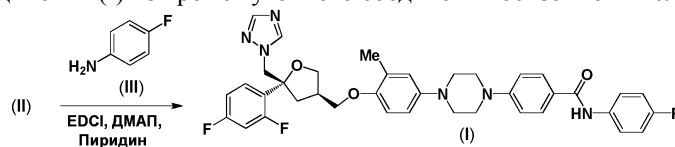
N-(4-Фторфенил)-4-(4-(4-гидрокси-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензамид



К суспензии промежуточного соединения (XVI) (83 мг, 0,20 ммоль) в ДХМ (5,0 мл) при 0°C добавляют раствор трибромида бора (0,59 мл, 1М в ДХМ, 0,59 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 30 мин, нагревают до КТ в течение 8 ч и затем разделяют между водой (15 мл) и ДХМ (10 мл). Органический слой отделяют и сохраняют, и водный слой экстрагируют смесью ДХМ и MeOH (90:10, 5×15 мл). Объединенные органические слои сушат и выпаривают в вакууме с получением неочищенного продукта, который очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 4,0 г, 0-3% MeOH в ДХМ, градиентное элюирование) с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (XV), в виде бежевого твердого вещества (61 мг, 72%); R^t 1,73 мин (способ а); m/z 406 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 2,10 (3H, с), 3,08-3,11 (4H, м), 3,41-3,43 (4H, м), 6,67 (2H, шс), 6,77 (1H, шс), 7,07 (2H, д), 7,17 (2H, т), 7,76-7,80 (2H, м), 7,89 (2H, д), 8,73 (1H, с), 10,01 (1H, с).

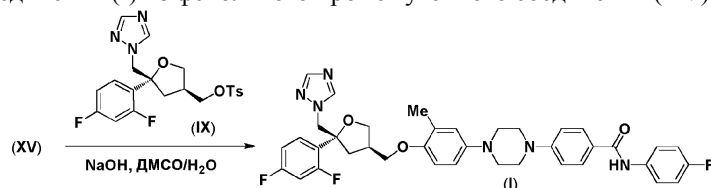
4-(4-(4-((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-Триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)-N-(4-фторфенил)бензамид.

1. Получение соединения (I) из промежуточного соединения бензойной кислоты (II)



К суспензии промежуточного соединения (II) (2,50 г, 4,24 ммоль), EDCI (1,63 г, 8,48 ммоль) и DMAP (30 мг, 0,21 ммоль) в пиридине (30 мл) добавляют 4-фторанилин (0,41 мл, 4,3 ммоль), и реакционную смесь нагревают при 60°C в течение 2 ч и затем охлаждают до КТ. Разбавление смеси водой (60 мл) и перемешивание в течение 5 мин дает твердое вещество, которое собирают фильтрацией и затем промывают водой (3×10 мл) и диэтиловым эфиром (2×15 мл) с получением рыжевато-коричневого порошка. Полученный неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 40 г, 0-3% MeOH в ДХМ, градиентное элюирование) с получением соединения (I) в виде желтого твердого вещества (2,47 г, 85%); R^t 2,60 мин (способ а); m/z 683 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 2,10 (3H, с), 2,15 (1H, дд), 2,37-2,43 (1H, м), 2,53-2,58 (1H, м), 3,13-3,16 (4H, м), 3,42-3,44 (4H, м), 3,68 (1H, дд), 3,74-3,79 (2H, м), 4,05 (1H, дд), 4,58 (2H, дд), 6,76 (2H, шс), 6,86 (1H, шс), 6,99 (1H, тд), 7,08 (2H, д), 7,16 (2H, т), 7,25-7,35 (2H, м), 7,76-7,80 (3H, м), 7,89 (2H, д), 8,34 (1H, с) и 10,00 (1H, с).

2. Получение соединения (I) из фенольного промежуточного соединения (XV)



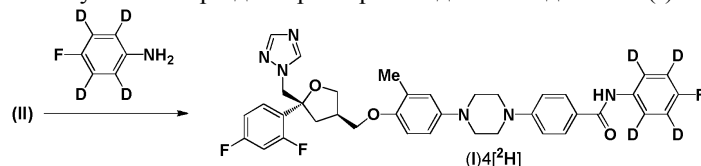
К раствору промежуточного соединения (XV) (19 мг, 0,047 ммоль) в ДМСО (1,5 мл) добавляют

водн. гидроксид натрия (1М, 98 мкл, 0,098 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 10 мин и затем обрабатывают раствором тозилата (IX) (бывш. APiChem, каталожный номер: AC-8330, 2 3,2 мг, 0,052 ммоль) в ДМСО (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивают при 60°C в течение 2 ч, охлаждают до КТ и добавляют воду (10 мл). Полученную смесь экстрагируют EtOAc (3×10 мл), и объединенные органические экстракты сушат и выпаривают в вакууме с получением коричневого масла. Полученный неочищенный продукт очищают флэш-

хроматографией на колонке (SiO₂, 4 г, 0-2% MeOH в ДХМ, градиентное элюирование) с получением бежевого твердого вещества (23 мг). Продукт повторно очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 4,0 г, 0-50% EtOAc в ДХМ, градиентное элюирование) с получением соединения (I) в виде беловатого твердого вещества (14 мг, 42%); R^t 2,60 мин (Способ а); m/z 683 (M+H)⁺ (ИЭР⁺).

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- (4-фторфенил-2,3,5,6-d₄) бензамид.

Получение тетра-дейтерио производного соединения (I)



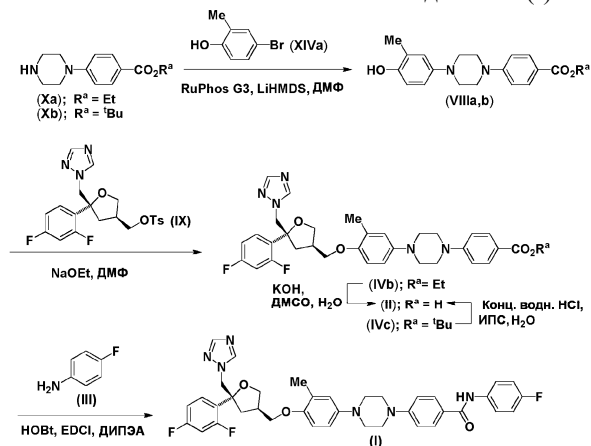
К суспензии промежуточного соединения (II) (200 мг, 0,34 ммоль), EDCI (130 мг, 0,68 ммоль) и ДМАП (2,1 мг, 0,02 ммоль) в пиридине (1,5 мл) добавляют раствор 4-фторанилин-2,3,5,6-d₄ (43 мг, 0,37 ммоль) в пиридине (0,5 мл), и реакционную смесь нагревают при 60°C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждают до КТ, разбавляют водой (10 мл) и перемешивают в течение 5 мин, что дает осадок. Твердое вещество собирают фильтрацией, промывают водой (3×2,0 мл) и затем помещают в смесь ДХМ и MeOH (9:1, 5,0 мл). Смесь пропускают через фазовый разделитель, и органический раствор выпаривают в вакууме с получением рыжевато-коричневого твердого вещества (200 мг). Полученный неочищенный продукт дважды очищают флэш-хроматографией на колонке (SiO₂, 12 г, 0-2% MeOH в ДХМ, градиентное элюирование; SiO₂, 40 г, 0-2,5% MeOH в ДХМ, градиентное элюирование) с получением беловатого порошка.

Твердое вещество суспендируют в ДМСО (0,75 мл) и нагревают до 60°C в течение 5 мин до полного растворения. Полученный раствор охлаждают до КТ и обрабатывают водой (1,0 мл), что дает осадок. Суспензию перемешивают при КТ в течение 20 мин, и твердое вещество собирают фильтрацией, промывают водой (3×0,5 мл) и сушат в вакууме при 50°C или три дня) с получением указанного в заголовке соединения, (I) 4 [2H] в виде белого твердого вещества (147 мг, 62%); R^t 2,59 мин (способ 1a); m/z 687 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 2,10 (3H, с), 2,16 (1H, дд), 2,37-2,43 (1H, м), 2,52-2,60 (1H, м), 3,13-3,16 (4H, м), 3,42-3,44 (4H, м), 3,68 (1H, дд), 3,74-3,79 (2H, м), 4,05 (1H, дд), 4,58 (2H, дд), 6,76 (2H, шс), 6,86 (1H, шс), 7,00 (1H, тд), 7,08 (2H, д), 7,25-7,35 (2H, м), 7,77 (1H, с), 7,89 (2H, д), 8,34 (1H, с) и 10,01 (1H, с).

Масштабное получение соединения (I) способом 2.

Метод синтеза, описанный выше для способа 2 (схема 1), успешно применяют для получения соединения в соответствии с данным изобретением в масштабе более 1,0 кг АФИ (схема 3). Два варианта методики было разработано, в которых бензоат 4-пиперазина [промежуточное соединение (VIII)] содержит либо этиловый эфир (VIIIa), либо соответствующий трет-бутиловый эфир (VIIIb). Оба эти соединения могут быть сопряжены с тозилатом (IX) с получением соответствующих сложных эфирных предшественников бензойной кислоты (II). При присутствии этилового эфира, свободную кислоту получают омылением, в то время как трет-бутилпроизводное деэстерифицируют ацидолизом. Методики, адаптированные для этого синтеза, изображены ниже и описаны здесь.

Схема 3. Масштабный синтез соединения (I)



Методы анализа и спектроскопии

Методы анализа и спектроскопии, относящиеся к этому экспериментальному разделу, представлены ниже.

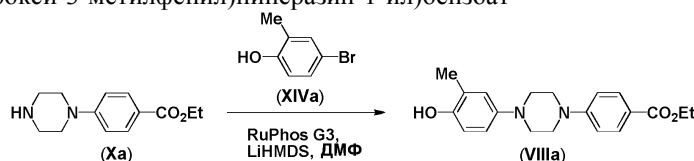
Условия ВЭЖХ с обращенной фазой для ЖХМС анализа.

Колонка XBridge ВЕН Phenyl 4,6×150 мм; 2,5 мкм (бывш. Waters #186006720) при 40°C; скорость потока 1,0 мл.мин⁻¹, элюируют градиентом очищенная H₂O-MeCN, содержащим 0,1% муравьиной кислоты в течение более 25 мин с применением УФ определения при 300 нм. Объем впрыска 5 мкл. Информация по градиенту: 0-2 мин, поддерживается на уровне 95% H₂O-5% MeCN; 2-15 мин, изменяется от 95% H₂O-5% MeCN до 10% H₂O-90% MeCN; 15-25 мин, поддерживается на уровне 10% H₂O-90% MeCN.

¹H ЯМР спектроскопия.

¹H ЯМР спектр получают с применением спектрометра JOEL ECX 400МГц. Остаточный не дейтерированный растворитель используют в качестве ссылки и, если не указано иначе, образцы обрабатывают в DMSO-d₆.

Этил-4-(4-(4-гидрокси-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензоат

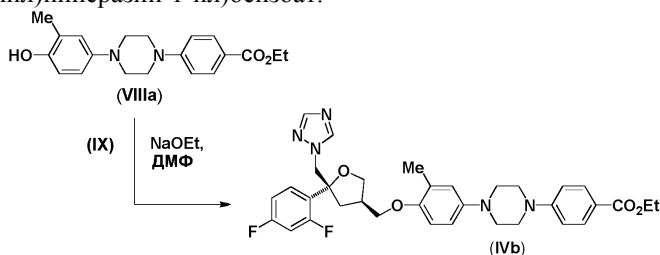


Раствор этил-4-(1-пиперазинил)бензоата (Xa) (500 г, 2,13 моль) и 4-бром-2-метилфенола (479 г, 2,56 моль) в безводном ДМФ (5,0 л) дегазируют помещением смеси попеременно в вакуум и затем в атмосферу азота три раза. Затем смесь обрабатывают RuPhos G3 (35,7 г, 0,043 моль) и раствором LiHMDS (1,0М в ТГФ, 2560 мл, 2,56 моль), сохраняя внутреннюю температуру ниже 35°C (охлаждение на водяной бане). Затем добавляют раствор LiHMDS (1,0М в ТГФ) четырнадцатью равными частями с интервалом две минуты (14×213 мл, всего 2,98 л, 2,98 моль) при 20-35°C. Полученный раствор перемешивают при 18-25°C в течение 30 мин, после чего анализ ВЭЖХ показывает 0,6% этил-4-(1-пиперазинил)бензоата, оставшегося после того, как реакцию сочли завершённой.

Реакционную смесь доводят до pH 7,6 добавлением 2М хлористо-водородной кислоты (5,50 л), сохраняя температуру ниже 40°C, после чего добавляют EtOAc (3,00 л) и полученные фазы разделяют. Водную фазу экстрагируют EtOAc (2×3,00 л и затем 2×2,00 л), и объединенные органические слои промывают насыщ. раствором соли (8×1,00 л), сушат над MgSO₄ и затем выпаривают в вакууме с получением светло-коричневого маслянистого твердого вещества. Неочищенный продукт суспендируют в ИПС (2,50 л) при 20-25°C в течение 30 мин, и полученное твердое вещество собирают фильтрацией. Фильтровальную лепешку промывают ИПС (2×500 мл) и вынимают сухой, и твердое вещество затем сушат в вакууме при 50°C с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (VIIIa), в виде светло-рыжевато-коричневого твердого вещества (380,0 г, 52%, ВЭЖХ чистота 97,2%); R^t 11,01 мин; m/z 341, 3 (M+H)⁺ (ИЭР⁺).

Для контроля уровня палладиевых остатков продукты из нескольких партий объединяют (1900 г, остаточный Pd 108 ч./млн.), помещают в ТГФ (19,0 л) и обрабатывают МР-ТМТ полимером (250 г) при 18-25°C. Смесь перемешивают при этой температуре в течение 24 ч, и полимер затем удаляют фильтрацией и промывают ТГФ (3,49 л). Фильтрат выпаривают досуха в вакууме, и полученное твердое вещество суспендируют в ИПС (4,75 л) при 18-25°C в течение 1 ч и собирают фильтрацией. Фильтровальную лепешку промывают ИПС (500 мл), вынимают сухой и затем сушат в вакууме при 50°C с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (VIIIa), в виде беловатого твердого вещества (1789 г, 94%, остаточный Pd 17 ч./млн.).

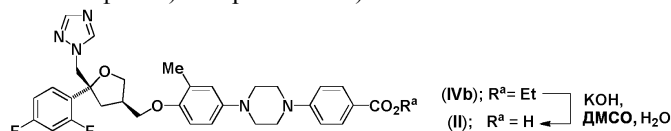
Этил-4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)-тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензоат.



К раствору промежуточного соединения (VIIIa) (1780 г, 5,23 моль) в безводном ДМФ (17,8 л) при 15-25°C добавляют этюксид натрия (391 г, 5,75 моль). Через 45 мин тозилат (IX) (2586 г, 5,75 моль) добавляют одной порцией и перемешивание продолжают при 60-65°C в течение 5 ч. Анализ ВЭЖХ показал, что реакция практически завершена (осталось 1,67% исходного материала). Смесь охлаждают до 18-25°C, и полученную суспензию обрабатывают водой (18,0 л), сохраняя температуру ниже 30°C. После

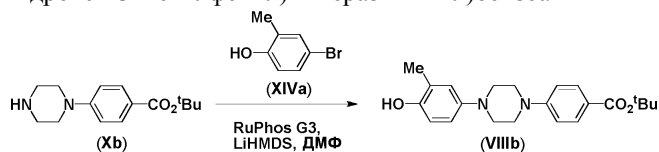
охлаждения до 15-25°C в течение 45 мин, твердое вещество собирают фильтрацией и промывают водой (2×7,14 л). Влажную фильтровальную лепешку суспендируют в этаноле (8,92 л) при температуре кипения с обратным холодильником в течение 2 ч, и смесь затем охлаждают до 15-25°C и перемешивают в течение 18 ч. Полученные твердые вещества собирают фильтрацией, промывают этанолом (2×1,78 л) и затем сушат в вакууме при 50°C с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (IVb), в виде беловатого твердого вещества (2855 г, 88%, ВЭЖХ чистота 95,97%); R^t 14,99 мин; m/z 618,5 ($M+H$)⁺ (ИЭР⁺).

Моногидрохлорид 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)бензойной кислоты



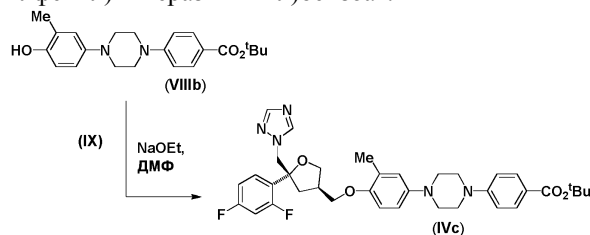
К суспензии промежуточного соединения (IVb) (1467 г, 2,38 моль) в смеси ДМСО (1,45 л) и воды (5,90 л) при 18-25°C добавляют 50% об./об. раствор КОН в воде (2,93 л). Суспензию нагревают при 90-95°C в течение 18 ч, после чего анализ ВЭЖХ показывает, что реакция завершена (осталось 0,16% исходного материала, 97,9% продукта). Реакционную смесь охлаждают до 40-50°C и добавляют смесь ИПС (14,9 л) и воды (4,42 л). После охлаждения до 15-25°C pH доводят до 1-2 добавлением концентрированной хлористо-водородной кислоты (3,12 л), сохраняя внутреннюю температуру ниже 40°C. Полученную суспензию охлаждают до 15-25°C, и твердые вещества собирают фильтрацией, вынимают сухой и затем суспендируют в воде (7,40 л) при 90-95°C в течение 30 мин. После охлаждения до 15-25°C твердые вещества собирают фильтрацией, промывают водой (2×1,48 л) и вынимают сухой. Дальнейшая сушка в вакууме при 50°C дает указанное в заголовке соединение, промежуточное соединение (II), в виде белого твердого вещества (1329 г, 89%, ВЭЖХ чистота 99,0%; содержание хлора: 6,61% об./об. [теория 5,66% об./об.]; R^t 12,92 мин; m/z 590,4 ($M+H$)⁺ (ИЭР⁺).

трет-Бутил-4-(4-(4-гидрокси-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензоат



Раствор трет-бутил-4-(пиперазин-1-ил)бензоата (Xb) (100 г, 381 ммоль) и 4-бром-2-метилфенола (85,5 г, 457 ммоль) в безводном ДМФ (1,00 л) дегазируют помещением смеси попеременно в вакуум и затем в атмосферу азота три раза. После этой процедуры добавляют RuPhos G3 (6,38 г, 7,62 ммоль) при 15-25°C, затем добавляют раствор LiHMDS в ТГФ (1,06М, 432 мл, 457 ммоль) в течение более 5 мин, сохраняя температуру в пределах 15-30°C, (охлаждение на водяной бане). После перемешивания в течение 5 мин дополнительные аликвоты раствора LiHMDS (1,06М в ТГФ) добавляют к реакционной смеси четырнадцатью равными порциями (14×36 мл, всего 504 мл, 533 ммоль) с интервалами 2 мин, что дает экзотермию от 16°C-21°C. Реакционную смесь перемешивают при 15-25°C в течение ночи (в этот момент ВЭЖХ показывает образование 72% желаемого продукта), и pH смеси доводят до 7,3 добавлением 2М хлористоводородной кислоты (~900 мл). Водную фазу отделяют и экстрагируют несколько раз EtOAc (1,0 л, 500 мл и 2×250 мл). Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли (6×400 мл), сушат над MgSO₄ и концентрируют в вакууме с получением липкого желтого твердого вещества. Полученное твердое вещество суспендируют в ИПС (500 мл) и перемешивают при 15-25°C в течение 1 ч. Суспензию фильтруют, и фильтровальную лепешку промывают ИПС (250 мл, 200 мл) и вынимают сухой. Дальнейшая сушка продукта в вакууме при 50°C дает указанное в заголовке соединение, промежуточное соединение (VIIIb) в виде беловатого твердого вещества (105,6 г, 75%, ВЭЖХ чистота 97,1%); R^t 12,23 мин; m/z 369,3 ($M+H$)⁺ (ИЭР⁺).

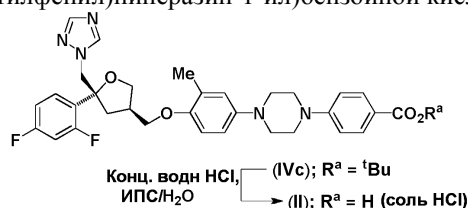
трет-Бутил-4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-триазол-1-ил)метил)-5-(2,4-дифторфенил)тетрагидрофуран-3-ил)метокси)-3-метилфенил)пиперазин-1-ил)бензоат.



К раствору промежуточного соединения (VIIIb) (100 г, 271 ммоль) в ДМФ (500 мл) в атмосфере азота добавляют этноксид натрия (22,2 г, 325 ммоль), что вызывает умеренную экзотермию (от 20 до

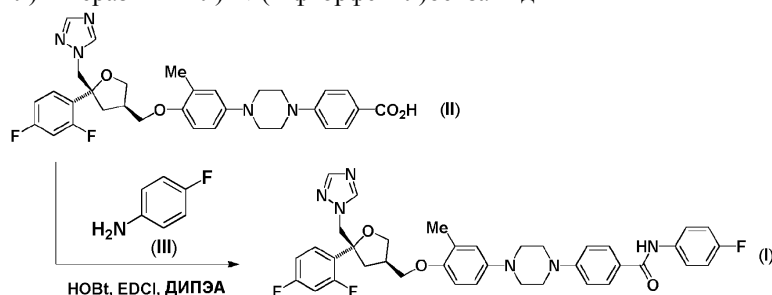
22,0°C). После перемешивания при 15-25°C в течение 45 мин реакционную смесь обрабатывают тозилатом (IX) (146,4 г, 325 ммоль) и затем нагревают при 60-65°C в течение 2 ч. Анализ полученной смеси ВЭЖХ показал, что реакция практически завершена (остаток 4,4% фенола, 14,6% тозилата, 11,6% продукта), и смесь охлаждают до 40-45°C и добавляют ИПС (800 мл). Затем по каплям добавляют воду при 40-45°C до появления легкой мутности (требуется 500 мл), в этот момент небольшой образец продукта (100 мг, 0,15 ммоль) добавляют в качестве затравки и смесь перемешивают в течение 10 мин при 40-45°C для того, чтобы началось выпадение осадка. По каплям добавляют воду (500 мл) при 40-45°C, и суспензию затем охлаждают до 15-25°C. Полученное твердое вещество собирают фильтрацией, промывают водой (3×200 мл) и затем сушат в вакууме при 50°C с получением неочищенного продукта в виде беловатого твердого вещества (155,9 г, 89%, ВЭЖХ чистота 94,8%). Часть этого продукта (85,0 г) помещают в ИПС (510 мл) при нагревании при 65-75°C до полного растворения. Затем раствор охлаждают до 15-25°C и перемешивают в течение 30 мин. Полученное твердое вещество собирают фильтрацией, промывают ИПС (2×85 мл) и сушат в вакууме при 50°C с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (IVc) в виде белого твердого вещества (83,4 г, 87% общий выход, ВЭЖХ чистота 98,2%); R^t 15,74 мин; m/z 646,6 (M+H)⁺ (ИЭР⁺).

Моногидрохлорид 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)бензойной кислоты



К суспензии трет-бутилбензоата (IVc) (83,4 г, 129 ммоль) в смеси воды (250 мл) и ИПС (417 мл) добавляют раствор конц. хлористоводородной кислоты (167 мл) в воде (167 мл), сохраняя внутреннюю температуру ниже 35°C. Полученный раствор затем выдерживают при 35°C в течение 24 ч (образование твердого вещества наблюдают через 2-3 ч), в этот момент анализ ВЭЖХ показывает, что реакция практически завершена (осталось 0,6% сложного эфира, 98,1% продукта). Смесь охлаждают до 15-25°C, добавляют ИПС (417 мл) и pH доводят ~10 добавлением водн. NaOH (10M, 200 мл) при <40°C с получением раствора. Затем pH повторно доводят до 1-2 добавлением конц. Хлористо-водородной кислоты (25 мл) при <40°C. Полученную суспензию охлаждают до 15-25°C, и твердые вещества собирают фильтрацией. Фильтровальную лепешку повторно суспендируют в воде (834 мл), нагревают до 80-85°C и затем перемешивают в течение 30 мин. Затем суспензию охлаждают до 15-25°C, и твердые вещества собирают фильтрацией, промывают водой (2×83 мл) и сушат в вакууме при 50°C с получением указанного в заголовке соединения, промежуточного соединения (II), (в виде моно-гидрохлорида) в виде белого твердого вещества (64,6 г, 80%, ВЭЖХ чистота 97,6%); R^t 12,92 мин; m/z 590,4 (M+H)⁺ (ИЭР⁺).

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-(4-фторфенил)бензамид



К перемешиваемой суспензии бензойной кислоты (II) в виде моно-гидрохлорида (1001 г, 1,60 моль) и ГОБт.Н₂O (216 г, 1,41 моль) в ДМФ (5020 мл) при <40°C добавляют ДИПЭА (840 мл, 4,823 моль), затем 4-фторанилин (181 мл, 1,91 моль), и затем EDCI.HCl (368 г, 1,92 моль). Смесь нагревают при 60-65°C в течение 17 ч, в это время анализ ВЭЖХ показывает завершение реакции (исходный материал или промежуточное соединение реакции не определяются, 82,63% продукта). Полученный раствор охлаждают до 15-25°C и гасят водой (15,2 л) при <35°C, затем снова охлаждают до 15-25°C и перемешивают в течение 1 ч. Полученное твердое вещество собирают фильтрацией, промывают водой (2×2,00 л) и вынимают сухой. Фильтровальную лепешку повторно суспендируют в воде (5,00 л) при 15-25°C в течение 45 мин, и твердые вещества собирают фильтрацией, промывают водой (2×2,00 л) и сушат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения, соединения (I), в виде беловатого твердого вещества (1101 г, ~100%, ВЭЖХ чистота 95,8%); R^t 14,46 мин; m/z 683,5 (M+H)⁺ (ИЭР⁺); ¹H ЯМР δ: 2,10 (3H, с), 2,16 (1H, дд), 2,37-2,43 (1H, м), 2,50-2,58 (1H, м), 3,13-3,15 (4H, м), 3,41-3,44 (4H, м), 3,67 (1H, дд), 3,74-3,78 (2H, м),

4,05 (1Н, т), 4,55 (1Н, д), 4,61 (1Н, д), 6,76 (2Н, с), 6,86 (1Н, с), 7,00 (1Н, д,т), 7,08 (2Н, д), 7,17 (2Н, т), 7,26-7,35 (2Н, м), 7,76-7,80 (2Н, м), 7,77 (1Н, с), 7,89 (2Н, д), 8,35 (1Н, с) и 10,02 (1Н, с).

Биологическое тестирование: методики экспериментов

Оценка роста планктонных грибов.

а. Резазурин-анализ с определением микротитров Этот анализ проводят с применением модифицированного опубликованного метода (Monteiro et al., 2012). Споры *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010, Public Health England, Wiltshire) культивируют в декстрозном агаре Сабуро в течение 3 дней. Исходную суспензию спор получают из культуры в декстрозном агаре Сабуро промыванием ФРФБ-Tween (10 мл; ФРФБ, содержащего 0,05% Tween-20, 100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина). Подсчет спор оценивают с применением гемоцитометра Neubauer и, с помощью ФРФБ, доводят до 10^6 спор/мл. Рабочую суспензию спор (10^4 спор/мл) получают в стерилизованной на фильтре МОПС RPMI-1640 (50 мл; RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин, 2% глюкозы и 0,165 M МОПС, буферированной до pH 7 добавлением NaOH). Натриевую соль резазурина (100 мкл 1% раствора; Sigma-Aldrich, Dorset, UK) добавляют к суспензии спор и тщательно смешивают. Смесь суспензия спор-резазурин (100 мкл/лунку) добавляют в 384-луночные планшеты (номер по каталогу 353962, BD Falcon, Oxford, UK). Одновременно, тестируемые соединения (0,5 мкл ДМСО раствор) добавляют к 100 мкл смеси споры-резазурин в четырех параллельных опытах с получением конечного раствора ДМСО 0,5% с применением Integra VIAFLO 96 (Integra, Zizers, Switzerland). Для не содержащих споры контрольных лунок, МОПС-RPMI-резазурин раствор (100 мкл) добавляют вместо смеси споры-резазурин. Планшет накрывают мембраной Breathe Easier (каталожный № Z763624, Sigma-Aldrich, Dorset, UK) и инкубируют (35°C, 5% CO₂) до тех пор, пока флуоресценция в инокулированных лунках не удвоится по сравнению с контрольными лунками (около 24 ч). Флуоресценцию каждой лунки (545 нм (возбуждение)/590 нм (испускание), увеличение 800, фокальная высота 5,5 мм) определяют с применением мультисканера (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, UK). Рассчитывают процент ингибирования для каждой лунки, и значения МИК₅₀, МИК₇₅ и МИК₉₀ рассчитывают из кривой концентрация-ответ, построенной для каждого тестируемого соединения.

б. Анализ микроразведения в бульоне.

Этот анализ проводят 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; TR34/L98H мутанты от St Louis Hospital, Paris, France) культивируют в декстрозном агаре Сабуро в течение 3 дней. Исходную суспензию спор получают из культуры в декстрозном агаре Сабуро промыванием ФРФБ-Tween (10 мл; ФРФБ, содержащего 0,05% Tween-20, 100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина). Подсчет спор оценивают с применением гемоцитометра Neubauer и затем доводят до 10^6 спор/мл с помощью ФРФБ. Рабочую суспензию спор (2×10^5 спор/мл) получают в стерилизованной на фильтре АБС МОПС RPMI-1640 (50 мл; RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин, 0,5% АБС, 2% глюкозы, 0,165 M МОПС, буферированной до pH 7 добавлением NaOH). Для анализа сначала АБС МОПС RPMI-1640 (50 мкл/лунку) добавляют в 384-луночный планшет (каталожный номер 353962, BD Falcon, Oxford, UK). Тестируемые соединения (0,5 мкл ДМСО раствор) затем добавляют в четырех параллельных опытах с применением Integra VIAFLO 96 (Integra, Zizers, Switzerland) и тщательно смешивают с применением планшетного миксера. Затем 50 мкл рабочей суспензии спор, приготовленной выше, добавляют во все лунки за исключением не содержащих споры контрольных лунок. В не содержащих споры лунки вместо этого добавляют АБС МОПС-RPMI раствор (50 мкл/лунку). Планшет закрывают пластиковой крышкой и инкубируют (35°C в воздушной окружающей среде) в течение 48 ч. ОП в каждой лунке при 530 нм определяют с применением мультисканера (Clariostar: BMG, Buckinghamshire, UK). Рассчитывают процент ингибирования для каждой лунки, и значения МИК₅₀, МИК₇₅ и МИК₉₀ рассчитывают из кривой концентрация-ответ, построенной для каждого тестируемого соединения.

Панель для скрининг-диагностики грибов проводят в Eurofins Panlabs Inc. Значения МИК и МИК₅₀ для тестируемых изделий определяют в соответствии с инструкциями Института клинических и лабораторных стандартов (США), методы микроразведения в бульоне для дрожжей (CLSI M27-A2), (CLSI, 2002) и для мицелиальных грибов (CLSI M38-A), (CLSI, 2008).

Заражение *Aspergillus fumigatus* клеток эпителия бронхов.

Клетки BEAS2B засевают в 96-луночные планшеты (100 мкл; 30000 клеток/лунку; каталожный № 3596, Sigma Aldrich, Dorset, UK) в 10% ФБС RPMI-1640 и затем инкубируют (37°C, 5% CO₂) в течение одного дня перед началом эксперимента. Тестируемые соединения (0,5 мкл ДМСО раствор) или носитель (ДМСО) добавляют в каждую лунку с получением конечной концентрации в ДМСО 0,5%. Клетки BEAS2B инкубируют с тестируемыми соединениями в течение 1 ч (35°C, 5% CO₂), затем заражают суспензией клеток-спор *Aspergillus fumigatus* (20 мкл; Public Health England) ($0,5 \times 10^5$ /мл в 10% ФБС RPMI-1640). Планшет инкубируют в течение 24 ч (35°C, 5% CO₂). Надосадочную жидкость (50 мкл) собирают и переносят в планшет ПЦР (каталожный № L1402-9700, Starlab, Milton Keynes, UK), который замораживают (-20°C) до применения. После оттаивания надосадочную жидкость (5 мкл) разводят 1:20 добавлением раствора R7-ФРФБ (95 мкл; 1:4 R7 к ФРФБ; Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA). Уровни ГМ

в этих образцах (50 мкл) измеряют с помощью наборов Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA). Рассчитывают процент ингибирования для каждой лунки, и значение IC_{50} рассчитывают из кривой концентрация-ответ, построенной для каждого тестируемого соединения.

Заражение *Aspergillus fumigatus* двухслойных структур альвеол человека.

In vitro модели альвеол человека, состоящие из двойного слоя клеток эпителия и клеток эндотелия альвеол человека, получают, как описано ранее (Hope et al., 2007). Эта система позволяет вводить тестируемое соединение в верхний ("воздушное" пространство) и/или нижний ("системное" пространство) отделы. Такая гибкость используется для того, чтобы исследовать действие комбинированного лечения введением соединения (I) в верхнюю камеру и позаконазола или другого противогрибкового агента в нижнюю камеру. Первичные клетки эндотелия легочной артерии человека (КЭЛАЧ) собирают и разводят до 10^6 клеток/мл в среде СРЭК-2 (Lonza, Basel, Switzerland). Трансвеллы инвертируют, и суспензию клеток (100 мкл/лунку) наносят на основание каждого трансвелла. Инвертированные трансвеллы инкубируют при КТ в колпаке-уловителе воздуха в течение 2 ч, после чего их поворачивают вертикально. Среду СРЭК-2 добавляют в нижний (700 мкл/лунку) и верхний (100 мкл/лунку) отделы, и трансвеллы инкубируют в течение 48 ч ($37^{\circ}C$, 5% CO_2). Затем среду СРЭК-2 в нижнем отделе заменяют свежей средой СРЭК-2. Клетки A549 собирают и разводят до 5×10^5 клеток/мл в 10% ЭМС, затем добавляют в верхний отдел (100 мкл/лунку) всех трансвеллов, и планшеты инкубируют в течение 72 ч ($37^{\circ}C$, 5% CO_2). Клетки-споры *Aspergillus fumigatus* (чувствительный к итраконазолу штамм NCPF2010 и резистентный к итраконазолу штамм TR34-L98H) культивируют отдельно в декстрозном агаре Сабуру в течение 3 дней. Исходную суспензию клеток-спор каждого штамма получают из культуры в декстрозном агаре Сабуру промыванием ФРФБ-Tween (10 мл; ФРФБ содержащий 0,05% Tween-20, 100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина). Подсчет клеток-спор оценивают с применением гемоцитометра Neubauer и доводят до 10^6 клеток-спор/мл добавлением ФРФБ. Рабочий исходный раствор клеток-спор готовят в ЭМС (конц. 10^5 клеток-спор/мл) непосредственно перед применением.

Тестируемые и сылочные соединения (или чистый ДМСО в качестве носителя) добавляют в соответствующие лунки 24-луночных планшетов (3 мкл/лунку, содержащую 600 мкл 2% ФБС ЭМС) для обработки нижнего отдела, и в 96-луночные планшеты (1 мкл/лунку, содержащую 200 мкл 2% ФБС ЭМС) для обработки верхнего отдела, с получением конечной концентрации в ДМСО 0,5%. Среду в верхнем отделе отсасывают, и добавляют среду, содержащую соответствующие тестируемые и сылочные соединения, или носитель (100 мкл/лунку). Затем трансвеллы переносят в 24-луночный планшет, содержащий тестируемые и сылочные соединения или ДМСО носитель. После инкубирования в течение 1 ч ($35^{\circ}C$, 5% CO_2) суспензию клеток-спор (10 мкл/лунку) добавляют в верхний отдел каждого трансвелла. Затем планшеты инкубируют в течение 24 ч ($35^{\circ}C$, 5% CO_2). Надосадочные жидкости из каждого отдела (5 мкл/отдел) собирают и хранят ($-20^{\circ}C$). Срезу заменяют ежедневно после сбора надосадочных жидкостей, и все лунки обрабатывают тестируемыми и сылочными соединениями или ДМСО, как описано выше, в течение 3 дней. Образцы продолжают собирать до тех пор, пока рост грибов не станет виден невооруженным глазом во всех трансвеллах. Уровни ГМ в надосадочной жидкости в нижнем отделе затем измеряют с помощью ELISA (BioRad, CA, USA) как показатель инвазии *Aspergillus fumigatus*.

Жизнеспособность клеток: анализ в резазурине.

Клетки BEAS2B засевают в 384-луночные планшеты (100 мкл; 3000/лунку; BD Falcon, каталожный № 353962) в RPMI-LHC8 (RPMI-1640 и LHC8 среды, объединенные в равных пропорциях) за день до начала эксперимента. В не содержащие клетки контрольные лунки добавляют RPMI-LHC8 (100 мкл) добавляют. Добавляют тестируемые соединения (0,5 мкл ДМСО раствора) с получением конечной концентрации в ДМСО 0,5% с применением Integra VIAFLO 96 (Integra, Zizers, Switzerland). Клетки BEAS2B инкубируют с каждым тестируемым соединением в течение 1 дня ($37^{\circ}C/5\% CO_2$ в RPMI-LHC8). После добавления исходного раствора резазурина (5 мкл, 0,04%) планшеты инкубируют в течение еще 4 ч ($37^{\circ}C/5\% CO_2$). Флуоресценцию каждой лунки при 545 нм (возбуждение) и 590 нм (испускание) определяют с применением мультисканера (Clariostar: BMG Labtech). Процент потери жизнеспособности клеток рассчитывают для каждой лунки относительно носителя (0,5% ДМСО). Где это применимо, значение CC_{50} рассчитывают из кривой концентрация-ответ, построенной для каждого тестируемого соединения.

Противогрибковое действие In Vivo.

Aspergillus fumigatus (ATCC 13073 [штамм: NIH 5233], American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) выращивают в солодовом агаре (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) в планшетах в течение 6-7 дней при КТ ($24 \pm 1^{\circ}C$). Споры асептически перемещают из агаровых планшетов и суспендируют в стерильной дистиллированной воде с 0,05% Tween 80 и 0,1% агара. В день заражения количество спор определяют гемоцитометром, и инокулят доводят с получением концентрации $1,67 \times 10^8$ спор $мл^{-1}$ в физиологическом растворе.

Для того чтобы вызвать подавление иммунитета и нейтропению, мышам A/J (самцы, возраст 5 недель) вводят гидрокортизон (Sigma H4881; 125 мг/кг, п.к.) за 3, 2 и 1 день до заражения, и циклофосфамид (Sigma C0768; 250 мг/кг, в.б.) за 2 дня до заражения. В 0 день животных заражают суспензией спор (35 мкл интраназально).

Тестируемые соединения вводят интраназально (35 мкл суспензии 0,08-2,00 мг/мл в физиологическом растворе) один раз в сутки, за 30 мин до заражения в 0 день и затем в 1, 2 и 3 дни (в качестве профилактического лечения) или только в 1, 2 и 3 дни (в качестве терапевтического лечения). Для длительного профилактического лечения, тестируемые соединения (35 мкл суспензии 0,0032 или 0,016 мг/мл в физиологическом растворе) вводят интраназально один раз в сутки в течение семи дней; затем за 30 мин до заражения в 0 день, и затем либо в 1, 2 и 3 дни после заражения, либо только в 0 день. Эффект этих стандартных методов лечения сравнивают с результатами лечения, ограниченного одним днем и 30 мин до инокуляции и затем на 1, 2 и 3 дни после заражения; или еще сокращенного только до одного дня и 30 мин до заражения. Массу тела животных отслеживают ежедневно, и тех, которые показали снижение $\geq 20\%$, по сравнению с их массой тела в 0 день, выбраковывают.

Через шесть часов после последней дозы животных анестезируют, трахею канюлируют и собирают ЖВАЛ. Общее количество альвеолярных клеток определяют с помощью гемоцитометра, и количество альвеолярных макрофагов и нейтрофилов определяют анализом FACS (EPICS® ALTRA II, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) с применением анти-мышинного MOMA2-FITC (макрофага) или анти-мышинного 7/4 (нейтрофила), соответственно, как описано ранее (Kimura et al., 2013). Уровни ИФН- γ и ИЛ-17 в ЖВАЛ, и ИЛ-6 и ФНО α в сыворотке определяют с применением набора ELISA Quantikine® для мышиных ИФН- γ , ИЛ-17, ИЛ-6 или ФНО- α (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), соответственно. МДА, маркер окислительного стресса, оценивают с применением аналитических наборов OxiSelect® TBARS (количественная оценка МДА; Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, USA). Aspergillus ГМ в сыворотке определяют с применением наборов Platelia GM-EIA (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA). Индекс порогового значения рассчитывают по формуле: индекс порогового значения = ОП в образце / ОП в порошковом контроле, находящемся в наборе. Для анализа грибковой нагрузки в ткани 100 мг легочной ткани удаляют асептически и гомогенизируют в 0,2 мл 0,1% агара в стерильной дистиллированной воде. Серийно разведенные гомогенаты легких помещают в планшеты с солодовым агаром (50 мкл/планшет) и инкубируют при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение от 72 до 96 ч. Колонии *A. fumigatus* в каждом планшете подсчитывают, и грибковый титр представляют как КОЕ на грамм легочной ткани.

Нейтропенических мышей A/J с сильно угнетенным иммунитетом (самцы, возраст 5 недель), которым вводили гидрокортизон (Sigma H4881; 125 мг/кг, п.к.) ежедневно в течение трех дней до заражения, и циклофосамид (Sigma C0768; 250 мг/кг в.б.) за два дня до заражения, применяют для оценки действия комбинированного лечения соединением (I), вводимым интраназально, и позаконазолом, вводимым перорально. В 0 день животных заражают интраназально 35 мкл суспензии спор ($1,67 \times 10^8$ спор/мл в физиологическом растворе) *Aspergillus fumigatus* (ATCC 13073 [штамм: NIH 5233]). Соединение (I), полученное в виде суспензии в изотоническом солевом растворе (0,4 мг/мл), вводят один раз в сутки интраназальной инъекцией (35 мкл/мышь) в 1-6 дни после заражения. Позаконазол (1 мг/кг) дают перорально один раз в сутки в 1-6 дни после заражения. Массу тела и выживание отслеживают ежедневно вплоть до 7 дня.

Сводные результаты скрининга

Соединение (I) демонстрирует сильное ингибирующее действие в отношении роста чувствительных к азолу грибов *Aspergillus fumigatus*, по оценке анализа в резазурине, и грибковой инфекции клеток эпителия бронхов (табл. 2). В этих аналитических системах соединение (I) показало значительно большую эффективность, чем вориконазол и амфотерицин В, и похожую эффективность с позаконазолом. Инкубирование соединением (I) не оказывает или оказывает незначительное действие на жизнеспособность клеток эпителия бронхов BEAS2B в концентрациях вплоть до, по крайней мере, 10 мкМ.

Таблица 2. Действие лечения вориконазолом, позаконазолом, амфотерицином В и соединением (I) на рост планктонных грибов *Aspergillus fumigatus* (NCPF2010), на грибковую инфекцию клеток эпителия бронхов BEAS2B и на жизнеспособность клеток BEAS2B

Лечение (тестируемое соединение)	Значения МИК ₅₀ /МИК ₇₅ /CC ₅₀ в указанных аналитических системах (нМ)				
	Рост планктонных грибов ¹		Инфекция клеток BEAS2B ²	Жизнеспособность клеток BEAS2B ³	
	МИК ₅₀	МИК ₇₅		МИК ₅₀	CC ₅₀
Вориконазол	90,8	168	154		>28600
Позаконазол	3,64	6,94	4,48		>14300
Амфотерицин В	28,5	64,4	нТ		977
Соединение (I)	1,98	5,02	5,43		>12200
Соединение (I), 4 [²H]	нТ	нТ	3,15		>14600

Примечания к табл.:

1. Резаурин-анализ с определением микротитров.

2. Клетки эпителия бронхов; 3. n=1-5.

Соединение (I) также демонстрирует сильное ингибирующее действие против роста планктонных грибов по оценке анализа микроразведения в бульоне (табл. 3). В этом анализе, соединение (I) показало значительно большую эффективность против резистентных к позаконазолу штаммов (NCPF7099, NCPF7100 и TR34/L98H) и чувствительных к позаконазолу штаммов (NCPF2010) по сравнению с позаконазолом, вориконазолом и амфотерицином В.

Таблица 3. Действие лечения вориконазолом, позаконазолом, амфотерицином В и соединением (I) на рост планктонных грибов изолятов *Aspergillus fumigatus*

Лечение (тестируемое соединение)	Значения МИК ₇₅ (нМ) против исследуемых изолятов <i>Aspergillus fumigatus</i> ¹					
	NCPF2010		NCPF7099		NCPF7100	L98H
Вориконазол	496		96,7		596	>2860
Позаконазол	15,3		112		71,5	150
Амфотерицин В	382		365		>1080	209
Соединение (I)	13,6		16,5		19,7	56,7
Соединение (I), 4 [2H]	14,7		13,7		28,6	70,0

Примечания к табл.:

1. Анализ микроразведения в бульоне, n=1-3.

Действие соединения (I) на рост широкого спектра грибковых патогенов оценивают с применением методов микроразведения в бульоне CLSI. Было обнаружено, что соединение (I) является эффективным ингибитором роста *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum* и *Trichophyton rubrum*, а также некоторых видов *Candida* Spp (табл. 4).

Таблица 4. Действие соединения (I) на рост широкого спектра грибов

Грибок	Штамм	Соединение (I)		Вориконазол		Позаконазол	
		МИК ₅₀	МИК ₁₀₀	МИК ₅₀	МИК ₁₀₀	МИК ₅₀	МИК ₁₀₀
		(мкг/мл)	(мкг/мл)	(мкг/мл)	(мкг/мл)	(мкг/мл)	(мкг/мл)
<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC204304	1,0	>8,0	1,0	2,0	0,063	0,13
<i>Aspergillus pullulans</i>	ATCC9348	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	0,25	1,0
<i>Candida albicans</i>	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
<i>Candida glabrata</i>	ATCC36583	0,5	>8,0	0,25	>8,0	0,5	>8,0
	R363	0,5	>8,0	>8,0	>8,0	0,5	>8,0
<i>Rhizopus oryzae</i>	ATCC11145	0,063	2,0	8,0	>8,0	0,13	>8,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC24067	0,008	1,0	0,016	1,0	0,016	0,25
<i>Chaetomium globosum</i>	ATCC44699	0,063	>8,0	0,5	1,0	0,13	0,25
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ATCC9480	0,031	>8,0	1,0	2,0	0,063	0,13
<i>Trichophyton rubrum</i>	ATCC10218	<0,008	0,031	<0,008	0,063	<0,008	0,031

Примечания к таблице: $МИК_{50}/МИК_{100}$ =концентрация, требуемая для 50 и 100% ингибирования роста грибов при визуальной проверке (CLSI).

Монотерапия соединением (I) (0,1 мкг/мл в верхней камере) или позаконазолом (0,01 мкг/мл в нижней камере) ингибирует образование ГМ в 1 день в бислоях альвеол человека. Однако ингибирующее действие этих терапий далее быстро теряется (табл. 5). Наоборот, комбинированное лечение соединением (I) с позаконазолом показало непрерывное ингибирование инвазии после заражения. Следовательно, DFB_{50} для комбинированного лечения составляет 5,48 дня, намного дольше, чем значения для любого соединения по отдельности. Такое синергетическое или аддитивное действие комбинированной терапии также подтверждается, когда лечение соединением (I) сочетают с лечением интраконазолом, вориконазолом или каспофунгином (результаты не показаны).

Таблица 5. Действие соединения (I), позаконазола и комбинированного лечения на инвазию *Aspergillus fumigatus* (NCPF2 010) в нижнюю камеру в бислоях альвеол человека (трансвеллах)

		Уровни ГМ в нижней камере для указанных методов лечения значение ОП (% ингибирования к контролю)1			
День лечения		Носитель	Соединение (I)1 Верхняя камера	Позаконазол2 Нижняя камера	Комбиниро- ванное лечение
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)
Значения DFB50 для указанного лечения			1,13	1,45	5,48

Примечания к табл.:

1. Доза 0,1 мкг/мл.

2. Доза 0,01 мкг/мл.

DFB_{50} : дни, необходимые для достижения грибковой нагрузки 50% от контроля.

Кроме того, такое комбинированное лечение тестируют в бислоях, зараженных резистентным к азолу штаммом *Aspergillus fumigatus*: TR34-L98H. (табл. 6). Монотерапия соединением (I) (1 мкг/мл) в верхней камере или позаконазолом (0,1 мкг/мл) в нижней камере показала ограниченную пользу. Наоборот, сочетание соединения (I) и позаконазола показало значительное ингибирующее действие на грибковую инвазию в нижней камере. Благоприятное действие комбинированной терапии наблюдается на 1 день после заражения, но исчезает на 2 день.

Таблица 6. Действие соединения (I), позаконазола и комбинированного лечения на инвазию *Aspergillus fumigatus* (штамм TR34-L98H) в нижнюю камеру в двуслойной клеточной системе альвеол (трансвеллах)

		Уровни ГМ в нижней камере для указанных методов лечения значение ОП (% ингибирования к контролю) 1				
День лечения		Соединение (I) ¹ Верхняя камера		Позаконазол ² Нижняя камера		Комбиниро- ванное лечение
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)
Значения DFB ₅₀ для указанного лечения		1,10		1,64		2,93

Примечания к табл.:

1. Доза 1 мкг/мл.

2. Доза 0,1 мкг/мл.

DFB₅₀: дни, необходимые для достижения грибковой нагрузки 50% от контроля.

При интраназальном введении нейтропеническим мышам с подавленным иммунитетом, на 0 и 1-3 дни после инокуляции (профилактическое лечение) при прямом сравнительном исследовании соединение (I) показало действие, превосходящее действие позаконазола на снижение потери массы тела, измеренной через 3 дня, вызванной заражением *Aspergillus fumigatus*. (табл. 7).

Таблица 7. Сравнение действия лечения соединением (I) и позаконазолом на потерю массы тела нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом вследствие заражения *Aspergillus fumigatus*

Лекарственное средство Лечение ¹	Потеря массы тела, вызванная заражением <i>A. fumigatus</i> ² (% ингибирование потери массы тела)			
	День 1	День 2	День 3	
Носитель плюс споры	9,2±1,5	14,3±1,9	19,3±1,4	
Позаконазол	7,3±2,0 (21)	13,4±1,9 (6)	18,1±2,0 (6)	
Соединение (I)	6,1±1,8 (34)	8,7±2,5 (39)	11,1±5,6 (42)	

Примечания к табл.:

1. Доза 0,4 мг/мл интраназально.

2. % потери массы тела по сравнению с массой тела животного в 0 день.

Далее, профилактическое и терапевтическое лечение соединением (I) показало действие, превосходящее действие позаконазола на грибковую нагрузку в легких, а также на концентрации ГМ в ЖБАЛ и сыворотке, после заражения. Данные для соединения (I), применяемого для профилактического и терапевтического дозирования, показаны в табл. 8 и на чертежах 1, 2 и 3 (значения ID₅₀ представлены в табл. 9).

Таблица 8. Действие профилактического и терапевтического лечения соединением (I) на КОЕ в легких и концентрации галактоманна в ЖБАЛ и сыворотке и зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом

Режим лечения	Конц. лекарственного средства (мг/мл)	% ингибирования реакции		
		КОЕ (/мг в легких)	ГМ в ЖБАЛ (ИПЗ)	ГМ в сыворотке (ИПЗ)
Носитель+споры	Нет	28,4±16,9	4,8±0,40	5,3±1,1
Соединение (I): Профилактическое лечение	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)
Соединение (I): Терапевтическое лечение	0,4	3,8±1,0 (87)	0,24±0,06 (95)	0,29±0,11 (95)
	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)

Примечания к таблице: данные грибковой нагрузки показаны как среднее±стандартная ошибка среднего (СОС; n=5-6).

Таблица 9. Значения ID₅₀ для профилактического лечения позаконазолом и соединением (I) для грибковой нагрузки в легких и на концентрации галактоманнана в ЖБАЛ и в сыворотке у зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом

Лекарственное вещество (профилактический режим)	Значения ID ₅₀ для указанной реакции (мг/мл)			
	Грибковая нагрузка в легких	ГМ в ЖБАЛ	ГМ в сыворотке	
Соединение (I)	0,086	<0,08	<0,08	
Позаконазол	0,24	1,3	0,47	

Профилактическое лечение соединением (I) ингибирует аккумуляцию воспалительных клеток в ЖБАЛ (табл. 10), так же, как и позаконазол. Кроме того, профилактическое лечение соединением (I) показало превосходное ингибирующее действие по сравнению с позаконазолом в отношении концентраций ИЛ-17, ИФН γ и МДА в ЖБАЛ, и сравнительные значения ID₅₀ для соединения (I) и для позаконазола в независимых экспериментах показаны в табл. 11.

Таблица 10. Действие профилактического и терапевтического лечения соединением (I) на аккумуляцию макрофагов и нейтрофилов в ЖБАЛ зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом

Лечение	Конц. лекарственного средства (мг/мл)	Количество клеток в BALx10 ⁵ /мл (% ингибирования)	
		Макрофаги	Нейтрофилы
Носитель+споры		0,65±0,14	0,49±0,09
Соединение (I) Профилактическое лечение	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)
Соединение (I) Терапевтическое лечение	0,4	0,43±0,05 (34)	0,38±0,04 (22)
	2	0,40±0,11 (38)	0,34±0,05 (31)
	10	0,32±0,07 (51)	0,27±0,08 (45)

Примечания к таблице: данные количества клеток показаны как среднее±стандартная ошибка среднего (СОС), N=5-6.

Таблица 11. Значения ID₅₀ для профилактического лечения позаконазолом и соединением (I) на уровни ИЛ-17, ИФН γ и МДА в ЖБАЛ у зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом

Лекарственное вещество (профилактический режим)	Значения ID ₅₀ для указанных биомаркеров (мг/мл)			
	ИЛ-17	ИФН γ	МДА	
Соединение (I)	0,074	<0,08	0,11	
Позаконазол	0,61	0,22	0,69	

Далее, показывающие действие соединения (I) на уровни ИЛ-17, ИФН γ и МДА в ЖБАЛ при профилактическом или терапевтическом лечении показаны в табл. 12, и действие на сыворотку, ИЛ-6 и ФНО α показаны в табл. 13.

Таблица 12. Действие профилактического и терапевтического лечения соединением (I) на уровни ИФН γ , ИЛ-17 и МДА в ЖБАЛ у зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом

Режим лечения	Конц. лекарственно го средства (мг/мл)	Концентрации биомаркера в ЖБАЛ (% ингибирования)		
		ИФН γ (пг/мл)	ИЛ-17 (пг/мл)	МДА (мкг/мл)
Носитель+споры		9,2 $\pm$ 1,0	19,8 $\pm$ 3,6	1,8 $\pm$ 0,2
Соединение (I) профилактическое	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)
Соединение (I) терапевтическое	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)

Примечания к таблице: данные концентрация биомаркеров показаны как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС), N=5-6.

Таблица 13. Действие профилактического и терапевтического лечения соединением (I) на уровни ИЛ-6 и ФНО α в сыворотке зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом

Режим лечения	Конц. лекарственно го средства (мг/мл)	Конц. биомаркеров (пг/мл) (% ингибирования)	
		ИЛ-6	ФНО α
Носитель+споры		284 $\pm$ 112	25,6 $\pm$ 8,0
Соединение (I) Профилактическое лечение	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)
Соединение (I) Терапевтическое лечение	0,4	51,7 $\pm$ 16,8 (82)	6,2 $\pm$ 0,5 (76)
	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)

Примечания к таблице: данные концентрация биомаркеров показаны как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (СОС), N=5-6.

Также было найдено, что терапевтическое лечение соединением (I) сохраняет способность к эффективному ингибированию грибковой нагрузки в легких, уровней галактоманнана в сыворотке и концентраций цитокинов в ЖБАЛ у зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом. (Таблицы 7, 8 9 и 10 и чертежи 1, 2 и 3).

Действие продолжительного профилактического введения соединения (I) на биомаркеры у зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом также оценивают. Было обнаружено, что продолжительная профилактика соединением (I) ингибирует грибковую нагрузку в легких, а также концентрации ГМ в ЖБАЛ и сыворотке, в дозах, которые в 25 раз ниже, чем применяемые в предыдущем исследовании биомаркера (табл. 14). Более того, данные позволяют предположить, что аккумуляция противогрибкового действия в легких при повторяющемся введении в течение семи дней профилактики дает большее противогрибковое действие, чем профилактическое лечение в течение одного дополнительного дня. Сохранение действия соединения в легком предполагается на основе открытия, что лечение в течение от -7 до 0 дня дает превосходное противогрибковое действие на 3 день по сравнению с действием лечения только в -1 и 0 дни. Тем не менее, этот сокращенный протокол введения все еще остается предохраняющим.

Таблица 14. Действие продолжительного профилактического введения соединения (I) на грибковую нагрузку (КОЕ) в легких и концентрации ГМ в ЖБАЛ и сыворотке у зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом

Режим лечения ¹ (дни введения)	Доза соединения (I) (мкг/мл)	Значения и % ингибирования реакции ³		
		КОЕ (/мг в легких)	ГМ в ЖБАЛ (ИПЗ)	ГМ в сыворотке (ИПЗ)
Носитель плюс споры ²	нет	34,7±10,7	5,1±0,9	4,3±1,0
-7 до +3	3,2	8,3±2,0 (76)	2,6±0,36 (49)	1,8±0,43 (58)
-1 до +3	3,2	9,5±3,3 (73)	2,8±0,71 (45)	2,2±0,69 (49)
-7 до +3	16	5,0±2,3 (86)	1,7±0,39 (67)	1,4±0,20 (67)
-1 до +3	16	6,1±2,8 (82)	2,2±0,61 (57)	1,6±0,41 (63)
-7 до 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)

Примечания к табл.:

1. Значение N равно шести для всех групп, леченных лекарственным средством.
2. Значение N равно пяти для группы, леченной носителем.
3. Данные грибковой нагрузки и уровней ГМ показаны как среднее±стандартная ошибка среднего и процент ингибирования, по отношению к носителю.

Влияние на выживаемость комбинированного лечения соединением (I), вводимым перорально, и позаконазолом, оценивают у нейтропенических мышей с сильно угнетенным иммунитетом после инокулирования *Aspergillus fumigatus*. Монотерапия соединением (I) (0,4 мг/мл, вводится интраназально) или позаконазолом (1,0 мг/кг, вводится перорально) показала только очень ограниченную терапевтическую пользу. Наоборот, сочетание соединения (I) и позаконазола демонстрирует значительное увеличение времени выживания после заражения (табл. 15).

Таблица 15. Действие соединения (I) и позаконазола в виде монотерапии или в сочетании на выживание нейтропенических мышей с сильно угнетенным иммунитетом, зараженных *Aspergillus fumigatus*

Режим лечения	Доза (способ)	К-во выживших на 7 день (%)	Средняя выживаемость (дни)	Лог-ранговый критерий для выживания (к заражению)
Носитель	нет	0/6 (0)	5	–
Соединение (I)	0,4 мг/мл (и.н.)	0/6 (0)	6	p<0,05
Позаконazol	1 мг/кг, (п.о.)	0/6 (0)	6,5	незначительно
Соединение (I) плюс позаконazol	0,4 мг/мл (и.н.) 1 мг/кг (п.о.)	5/6 (83)	не определено	p<0,001

Примечания к таблице: N=8 на группу.

Фармакокинетика In Vivo

Используют широко применяемую методику для легочных терапевтических агентов, вводимых в легкие животных, например, мышей, и плазму собирают в различные моменты времени после введения для того, чтобы получить характеристики полученного системного воздействия вводимого соединения. Соединение в соответствии с данным изобретением может быть тестировано в таких in vivo системах.

Краткое описание биологического профиля соединения (I)

Было обнаружено, что соединение (I) является эффективным ингибитором планктонного роста и заражения клеток эпителия бронхов *Aspergillus fumigatus*. Соединение (I) также ингибирует рост резистентных к позаконазолу и вориконазолу изолятов *Aspergillus fumigatus*, демонстрируя большую эффективность, чем позаконазол, вориконазол и интраконазол против этих штаммов. Также было обнаружено, что соединение (I) является эффективным ингибитором роста *Rhizopus oryzae*, *Cryptococcus neoformans*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum* и *Trichophyton rubrum*, а также некоторых *Candida Spp.* В in vitro модели альвеол соединение (I) показало впечатляющее действие против инвазии *Aspergillus*,

как в виде монотерапии, так и при введении в сочетании с позаконазолом. In vivo, у зараженных *Aspergillus fumigatus* нейтропенических мышей с подавленным иммунитетом соединение (I) демонстрирует эффективное ингибирование заражения *Aspergillus fumigatus*, а также связанной с этим иммунной реакции легких при профилактическом введении или в виде лечения. Соединение (I) также является высокоэффективным для снижения вызванной заражением потери массы тела. Указанное ингибирующее действие превосходит действие позаконазола. Важно, что благоприятное противогрибковое действие соединения (I) наблюдается при профилактическом и при терапевтическом введении.

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., 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.

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, Scrantz 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.

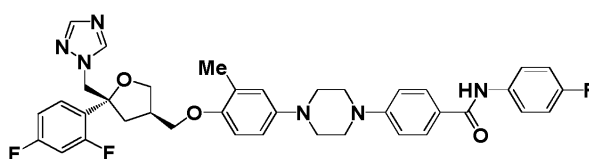
Thompson G.R. and Patterson T.F. Pulmonary aspergillosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008, **29**, 103-110.

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.

В данном описании и формуле изобретения, которая представлена ниже, если контекст не требует иного, слово 'содержать' и его варианты, такие как 'содержит' и 'содержащий', понимается как включающее указанное целое число, стадию, группу целых чисел или группу стадий, но не исключает любые другие целые числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, 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-(4-фторфенил)бензамид формулы (I)



Соединение (I)

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Применение соединения по п.1 в качестве лекарственного средства для лечения микозов или для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами, где указанные микозы вызваны заражением грибом, выбранным из *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Rhizopus* spp., *Cryptococcus* spp., *Chaetomium* spp., *Penicillium* spp. и *Trichophyton* spp.

3. Применение по п.2, где микоз вызван *Aspergillus* spp.

4. Применение по п.3, где *Aspergillus* spp. является *Aspergillus fumigatus* или *Aspergillus pullulans*, в частности *Aspergillus fumigatus*.

5. Применение по п.3, где *Aspergillus* spp. является резистентный к азолу *Aspergillus fumigatus*.

6. Применение по п.2, где микоз вызван *Candida* spp., *Rhizopus* spp., *Cryptococcus* spp., *Chaetomium* spp., *Penicillium* spp. или *Trichophyton* spp.

7. Применение соединения по п.1 в качестве лекарственного средства для лечения микозов или для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами, где указанные микозы вызваны заражением грибом, выбранным из *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Rhizopus* spp., *Cryptococcus* spp., *Chaetomium* spp., *Penicillium* spp. и *Trichophyton* spp. в комбинации со вторым или последующим активным ингредиентом, выбранным из противогрибковых агентов, амфотерицина В, эхинокандина и ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуктазы.

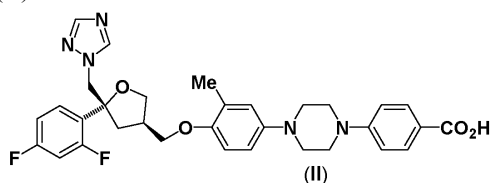
8. Фармацевтическая композиция для лечения микозов или для профилактики или лечения заболевания, связанного с микозами, где указанные микозы вызваны заражением грибом, выбранным из *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Rhizopus* spp., *Cryptococcus* spp., *Chaetomium* spp., *Penicillium* spp. и *Trichophyton* spp., содержащая эффективное количество соединения по п.1 и один или более фармацевтически приемлемых разбавителей или носителей.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, которая содержит второй или последующий активный ингредиент, выбранный из противогрибковых агентов, амфотерицина В, эхинокандина и ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуктазы.

10. Применение по п.7, где противогрибковый агент выбирают из кандидина, филипина, гамицина, натамицина, нистатина, римоцидина, бифоназола, бутконазола, клотримазола, эконазола, фентиконазола, изоконазола, кетоконазола, луликоназола, миконазола, омоконазола, оксиконазола, сертаконазола, сульконазола, тиокконазола, альбаконазола, эфинаконазола, эпоксиконазола, флуконазола, изавуконазола, итраконазола, пропиконазола, равуконазола, терконазола, абафунгина, аморолфина, бутенафина, нафтифина, тербинафина, анидулафунгина, микафунгина, бензойной кислоты, циклопирокса, флуцитозина (5-фторцитозина), гризеофульвина, толнафтата и ундециленовой кислоты; или противогрибковый агент выбирают из вориконазола и позаконазола, эхинокандин представляет собой каспофунгин и ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуктазы выбирают из ловастатина, правастатина и флувастатина.

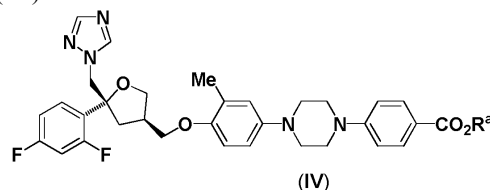
11. Фармацевтическая композиция по п.9, где противогрибковый агент выбирают из кандидина, филипина, гамицина, натамицина, нистатина, римоцидина, бифоназола, бутконазола, клотримазола, эконазола, фентиконазола, изоконазола, кетоконазола, луликоназола, миконазола, омоконазола, оксиконазола, сертаконазола, сульконазола, тиокконазола, альбаконазола, эфинаконазола, эпоксиконазола, флуконазола, изавуконазола, итраконазола, пропиконазола, равуконазола, терконазола, абафунгина, аморолфина, бутенафина, нафтифина, тербинафина, анидулафунгина, микафунгина, бензойной кислоты, циклопирокса, флуцитозина (5-фторцитозина), гризеофульвина, толнафтата и ундециленовой кислоты; или противогрибковый агент выбирают из вориконазола и позаконазола, эхинокандин представляет собой каспофунгин и ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA редуктазы выбирают из ловастатина, правастатина и флувастатина.

12. Соединение формулы (II)



или его соль.

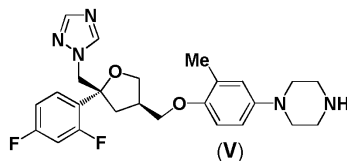
13. Соединение формулы (IV)



где R^a является C₁₋₅алкилом;

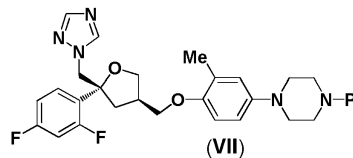
или его соль.

14. Соединение формулы (V)



или его соль.

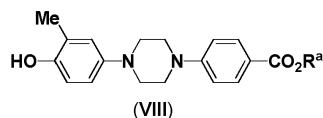
15. Соединение формулы (VII)



где Р представляет собой Вос;

или его соль.

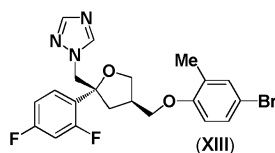
16. Соединение формулы (VIII)



где R^a является C₁₋₅алкилом;

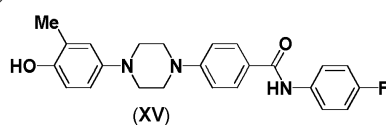
или его соль.

17. Соединение формулы (XIII)



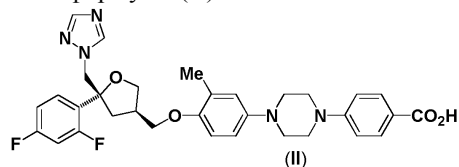
или его соль.

18. Соединение формулы (XV)



или его соль.

19. Способ получения соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли по п.1, который включает взаимодействие соединения формулы (II)



или его активированного производного;

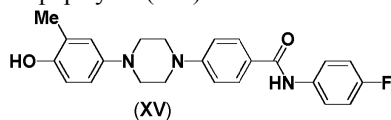
или его соли;

с 4-фторанилином;

или его солью;

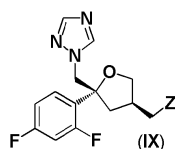
где активированное производное представляет собой галогенангидрид, ангидрид кислоты или сложный эфир.

20. Способ получения соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли по п.1, который включает взаимодействие соединения формулы (XV)



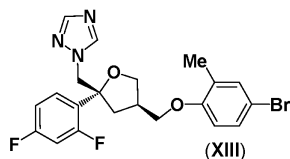
или его соли;

с соединением формулы (IX)

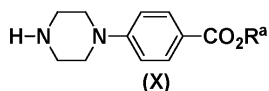


где Z представляет собой п-толил SO₂O;
или его солью.

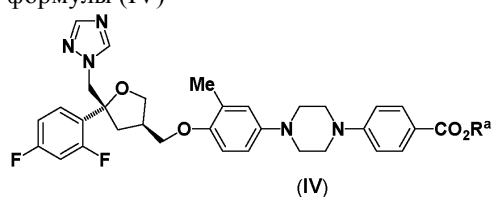
21. Способ получения соединения формулы (II) или его соли по п.12, который включает взаимодействие соединения формулы (XIII)



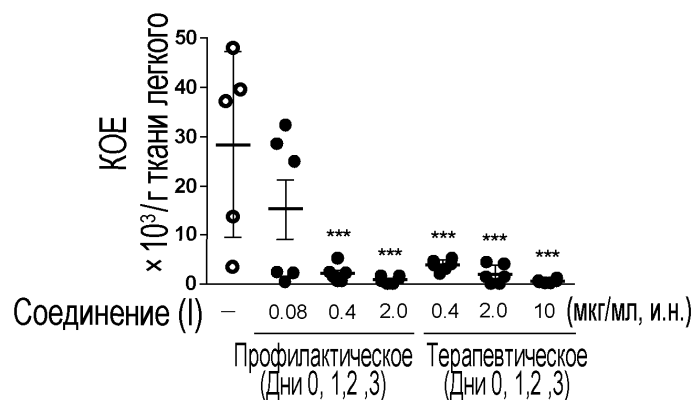
или его соли;
с соединением формулы (X)



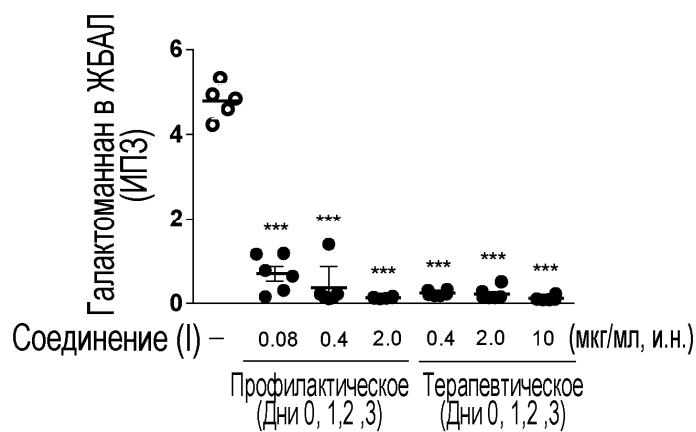
где R^a является C₁₋₅алкилом;
или его солью;
с получением соединения формулы (IV)



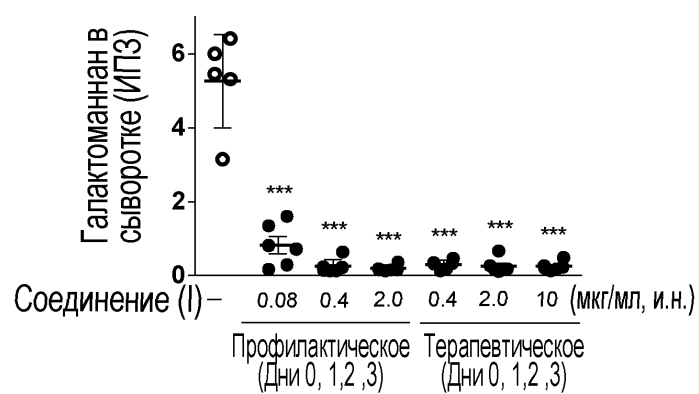
или его соли;
с последующим гидролизом соединения формулы (IV) с получением указанного соединения формулы (II) или его соли.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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