

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037569**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.15

(21) Номер заявки
201890771

(22) Дата подачи заявки
2016.09.20

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

(54) СОЛИ МОНОБАКТАМНОГО АНТИБИОТИКА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/222,430

(32) 2015.09.23

(33) US

(43) 2018.09.28

(86) PCT/CN2016/099482

(87) WO 2017/050218 2017.03.30

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

(72) Изобретатель:
Аубин Эрик (CH), Казаре Энтони (US), Фиш Андреас (CH), Ли Цзайсин (CN), Линдвалль Мика, Моузер Хейнц Эрнст (US), Мутц Михаэль (CH), Рек Фолькерт (US), Рибезель Бернд Ульрих, Шенхентц Марк (CH), Сетураман Виджай, Симмонс Роберт Лоуэлл (US)

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

(56) WO-A1-2015148379
EP-A2-0093376
WO-A1-2010070523
WO-A1-2012073138
WO-A1-2013110643

(57) Изобретение относится к динатриевой и к двойной соли (L)-аргинина 1-(((Z)-(1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)окси)циклопропанкарбоновой кислоты (обозначаемой в настоящем документе как соединение X), а также к фармацевтическим композициям, содержащим эти вещества, и их применению для лечения инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями.

B1**037569****037569****B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к динатриевой и к двойной соли (L)-аргинина 1-(((Z)-(1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)окси)циклопропанкарбоновой кислоты, а также к фармацевтическим композициям, содержащим эти вещества, и их применению в терапии.

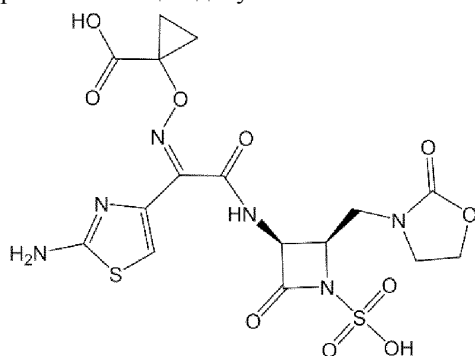
Предшествующий уровень техники

В течение последних нескольких десятилетий частота устойчивости к противомикробным препаратам и ее ассоциация с тяжелыми инфекционными заболеваниями увеличивались с пугающими скоростями. Особенно огорчает возрастающая распространенность устойчивости у нозокомиальных патогенных микроорганизмов. Из более чем 2 млн случаев нозокомиальной (полученной в медицинском учреждении) инфекции, происходящих каждый год в Соединенных Штатах Америки, от 50 до 60% вызваны устойчивыми к противомикробным препаратам штаммами бактерий. Высокая степень устойчивости к широкоиспользуемым противобактериальным средствам увеличивает заболеваемость, смертность и затраты, связанные с нозокомиальными инфекциями. Полагают, что в Соединенных Штатах Америки нозокомиальные инфекции способствуют или являются причиной более 77000 смертельных исходов в год, а ежегодные затраты составляют приблизительно от 5 до 10 миллиардов долларов.

Значимые причины устойчивости грамотрицательных бактерий включают β -лактамазы расширенного спектра действия (ESBL), сериновые карбапенемазы (KPC) и металло- β -лактамазы (например, NDM-1) у *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*, высокоуровневую обусловленную β -лактамазой (AmpC) устойчивость к цефалоспорином третьего поколения у видов *Enterobacter* и *Citrobacter freundii* и гены множественной лекарственной устойчивости, выявленные у *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Stenotrophomonas*. Проблема противобактериальной устойчивости осложняется существованием бактериальных штаммов, устойчивых к нескольким противобактериальным препаратам. Например, *Klebsiella pneumoniae*, несущая ген металло- β -лактамазы NDM-1, на той же плазмиде, которая несет NDM-1, часто несет дополнительные сериновые β -лактамазы.

Таким образом, существует необходимость в новых противобактериальных соединениях, в частности в противобактериальных соединениях, которые эффективны против существующих устойчивых к лекарственным средствам микроорганизмов или менее предрасположены к развитию новой бактериальной устойчивости. По настоящему изобретению предоставлены твердые формы таких соединений, которые особенно хорошо подходят для промышленного производства вследствие их пригодности к обработке в подходящих для производства рабочих условиях.

В неопубликованной патентной заявке номер PCT/US 2015/022011 описаны определенные монобактамные антибиотики. В этой заявке одним из соединений, которое демонстрирует высокую активность против грамотрицательных бактерий, включая штаммы, которые демонстрируют устойчивость к другим монобактамам, является 1-(((Z)-(1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)окси)циклопропанкарбоновая кислота, которое в настоящем документе обозначают как соединение X



(Соединение X) .

Для производства фармацевтических соединений и их составов важно, чтобы активное соединение находилось в форме, с которой можно подходящим образом обращаться и которую можно подходящим образом обрабатывать с получением рентабельного, надежного и воспроизводимого производственного процесса. Соединение X и многие из его солей являются твердыми при комнатной температуре, и их можно получать в различных твердых формах в зависимости от условий, используемых для получения, очистки или кристаллизации вещества. Существование нескольких твердых форм, часто обозначаемых как полиморфные формы, хорошо известно для твердых фармацевтических соединений, и химическая и физическая стабильность таких соединений, а также их пригодность к обработке часто зависит от того, какую твердую форму используют. Таким образом, выбор конкретной твердой формы активного лекарственного вещества (например, формы соли, гидратированной или сольватированной формы или полиморфной формы) при разработке надежного и воспроизводимого способа получения и при хранении, обработке и распространении безопасной и эффективной формы лекарственного вещества часто является

очень важным.

В основном выявлено, что существуют преимущества при производстве конкретной твердой формы фармацевтического ингредиента, и они описаны в "Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection and Use", P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.) (Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich). Способы производства твердых форм также описаны в "Practical Process Research and Development", Neal G. Anderson (Academic Press, San Diego) и "Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry", Rolf Hilfiker (Ed) (Wiley VCH).

Авторы настоящего изобретения выявили определенные соли соединения X, которые особенно пригодны для использования при производстве, хранении или введении соединения X, как описано в настоящем документе.

Для лекарственного продукта важно, чтобы он был достаточно стабилен, чтобы избежать значительного разрушения при транспортировке и хранении в коммерчески приемлемых условиях. Авторы изобретения выявили, что соединение X в растворе для максимальной стабильности во влажных условиях предпочтительно использовать и хранить при pH от 4 до 6, предпочтительно от 4,0 до 5,5. Оптимальная стабильность раствора достигается при pH приблизительно от 4,0 до 5,5.

Таким образом, изобретение относится к двойной соли (L)-аргинина 1-(((Z)-(1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)окси)циклопропанкарбоновой кислоты.

В другом варианте изобретение относится к динатриевой соли 1-(((Z)-(1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)окси)циклопропанкарбоновой кислоты.

В ещё одном варианте изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения инфекции грамотрицательных бактерий, содержащей любую из предложенных выше солей и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В ещё одном варианте изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения инфекции грамотрицательных бактерий, содержащей предложенную выше соль аргинина, где композиция дополнительно содержит водный фармацевтически приемлемый носитель и находится при pH приблизительно 5,0.

Ещё одним объектом изобретения является применение предложенных выше солей для лечения инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями.

Ещё одним объектом изобретения является применение предложенных выше солей в производстве лекарственного средства для лечения инфекции грамотрицательных бактерий.

Ещё одним объектом изобретения является способ лечения инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества любого из предложенных выше соединений или предложенной фармацевтической композиции.

В контексте настоящего изобретения указания в настоящем документе на "лечения", включают указания на приводящее к выздоровлению паллиативное и профилактическое лечение, если конкретно не указано противоположное. Термины "терапия", "терапевтический" и "терапевтически" следует трактовать подобным образом.

Как правило, предложенные соединения вводят посредством инъекции или инфузии. Предложенные соединения можно растворять в подходящем количестве воды или водного раствора, такого как раствор декстрозы или солевой раствор, например изотонический раствор декстрозы или соли. Необязательно сформулированная композиция также может включать модификатор pH, такой как гидроксид натрия, бикарбонат натрия, карбонат натрия, гидроксид калия, карбонат калия, гидроксид кальция, гидроксид магния, меглумин, TRIS или аминокислота (например, лизин, гистидин или аргинин) в количестве, достаточном для обеспечения требуемого pH, такого как pH от 4 до 6. Хотя аминокислоты, используемые в примерах, представляли собой (L)-аминокислоты, вместо них можно использовать (D)-аминокислоты или рацемические смеси.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение X в растворе, как правило, доводят до pH от 4,5 до 5,5, часто или приблизительно при pH 5, например, от pH 4,8 до 5,2.

Предложенные соединения можно формулировать с модификатором pH в водном растворе и затем лиофилизировать в твердую форму для хранения и распространения. Для введения можно восстанавливать лиофилизированный лекарственный продукт, добавляя водный носитель, как правило, стерильный водный носитель, такой как вода или изотонический раствор декстрозы или соли или другой в/в раствор, такой как раствор Рингера, лактат Рингера или раствор Хартмана. В одном из вариантов осуществления получают раствор соединения X и аргинина (два эквивалента), и pH доводят до pH от 4,8 до 5,2 с использованием, например, гидроксида натрия или соляной кислоты по мере необходимости. Затем раствор лиофилизируют до белого или желтоватого твердого вещества, которое стабильно при хранении и которое можно легко восстанавливать подходящим стерильным водным раствором для внутривенного введения.

В другом варианте осуществления получают раствор соединения X, сахарозы и аргинина (два экви-

валента) в воде, подходящей для инъекции, и pH доводят до pH от 4,8 до 5,2 с использованием, например, гидроксида натрия или соляной кислоты по мере необходимости. Затем раствор лиофилизируют до белого или желтоватого твердого вещества, которое стабильно при хранении и которое можно легко восстанавливать подходящим стерильным водным раствором для внутривенного введения.

Соли по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами. Как правило, их вводят в виде состава в ассоциации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Термин "эксципиент" используют в настоящем документе для описания любого ингредиента, отличного от соединения(ий) по изобретению, который может придавать составам функциональные (т.е. контроль скорости высвобождения лекарственного средства) и/или нефункциональные (т.е. технологическая добавка или разбавитель) характеристики. Выбор эксципиента в большой степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, действие эксципиента на растворимость и стабильность и характер лекарственной формы. Фармацевтические композиции также могут содержать носитель, который, по существу, представляет собой инертный материал, часто жидкость, используемый для растворения активного ингредиента(ов). Подходящие носители известны в данной области и включают, например, стерильную воду и стерильные растворы солей или декстрозы.

Фармацевтические композиции, содержащие предложенные соли, подходящие для доставки твердых форм соединения X, и способы их получения очевидны специалистам в данной области. Такие композиции и способы их получения можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company, 1995).

Как правило, для введения пациентам-людям общая суточная доза соли или кристаллической формы находится в диапазоне от 1000 до 10000 мг, или от 2000 до 8000 мг, или от 3000 до 8000 мг, или от 4000 до 6000 мг в зависимости от состояния индивидуума и таких параметров, как масса тела, возраст и пол индивидуума. Общую суточную дозу можно вводить в однократной дозе или ее можно делить на две или более доз, и она по решению врача может находиться вне типичного диапазона, приводимого в настоящем документе. Как правило, суточную дозу доставляют посредством внутривенной инъекции или инфузии, и ее можно вводить в одной, двух, трех или четыре дозах, которые суммарно обеспечивают требуемую общую суточную дозу. Инфузия может быть быстрой, или ее можно проводить в течение периода продолжительностью приблизительно от 15 мин до 4 ч, как правило, в течение периода продолжительностью 1-3 ч. Типичная схема дозирования предусматривает три или четыре инфузии ежедневно, где каждая длится 0,25-2 ч или 0,25-3 ч с доставкой от 1 до 2 или от 1 до 2,5 г соединения X на дозу, а типичная общая суточная доза составляет 3-8 г. Например, по схеме дозирования можно доставлять 2 г соединения X на инфузию с тремя часовыми инфузиями в сутки. Альтернативно можно использовать одну инфузию 2-6 г или 3-5 г в течение 1, или 1,5, или 2, или 2,5, или 3 ч. Приведенные выше дозы основаны на среднем индивидууме-человеке с массой приблизительно от 60 до 70 кг, и их можно соответствующим образом масштабировать для других индивидуумов. Лечащий врач может легко определить дозы для индивидуумов, масса которых находится вне этого диапазона, например грудного ребенка и пожилого человека.

Общие экспериментальные характеристики.

Все исходные вещества, составляющие блоки, реагенты, кислоты, основания, дегидратирующие средства, растворители и катализаторы, используемые для синтеза соединения по настоящему изобретению, являются коммерчески доступными, или их можно получать способами органического синтеза, известными специалисту в данной области (Houben-Weyl 4th Ed. 1952, Methods of Organic Synthesis, Thieme, Volume 21).

Общие условия.

Масс-спектры получали на системах LC-MS, SFC-MS или GC-MS с использованием способов ионизации электрораспылением, химического способа и способа электронного удара на ряде устройств со следующими конфигурациями: система СЭЖХ Waters ACQUITY и оборудованная системой ZQ 2000 или SQD MS, где (M+1) относится к протонированному молекулярному иону химической молекулы, (M+) относится к непротонированному четвертичному аммонийному катиону, (M+Na) относится к иону с присоединенным натрием и (M-1) относится к депротонированному молекулярному иону химической молекулы.

Спектры ЯМР получали на спектрометрах ЯМР Bruker AVANCE 500 MHz или Varian 400 MHz с использованием ICON-ЯМР, под контролем программы TopSpin. Спектры определяли при 298 K, если не указано иначе, и соотносили с резонансом растворителя.

Оборудование.

Способы MS: с использованием систем ВЭЖХ Agilent 1100 с масс-спектрометром Agilent 6110.

Способ 2m_acidic:

колонка Kinetex C18 50×2,1 мм, 2,6 мкм,

температура колонки 50°C,

элюенты A: H₂O, B: ацетонитрил, оба содержат 0,1% TFA,

скорость потока 1,2 мл/мин,

градиент от 2 до 88% В в течение 1,30 мин, 0,15 мин 95% В.

Способ 2m_acidic_polar:

Колонка Kinetex C18 50×2,1 мм, 2,6 мкм,

температура колонки 50°C,

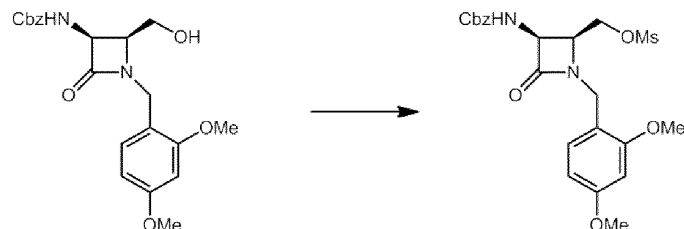
элюенты А: H₂O, В: ацетонитрил, оба содержат 0,1% TFA,

скорость потока 1,2 мл/мин,

градиент от 1 до 30% В в течение 1,30 мин, 0,15 мин 98% В.

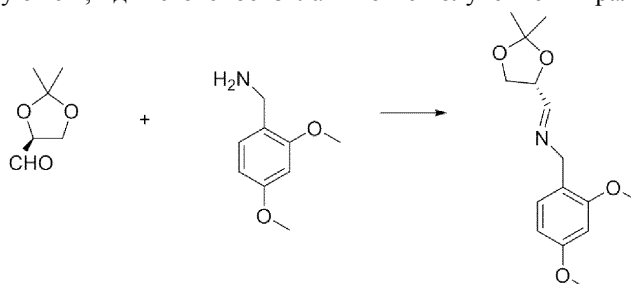
Получение соединения X.

Промежуточное соединение А: ((2S,3S)-3-(((бензилокси)карбонил)амино)-1-(2,4-диметоксибензил)-4-оксоазетидин-2-ил)метилметансульфонат

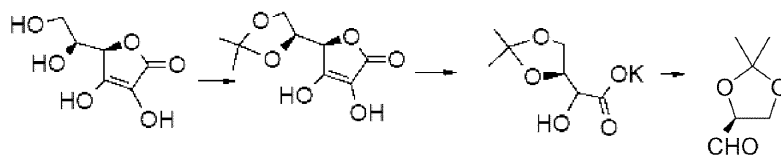


К раствору бензил-((2S,3S)-1-(2,4-диметоксибензил)-2-(гидроксиметил)-4-оксоазетидин-3-ил)карбамата (5,37 г, 13,41 ммоль) и TEA (3,72 мл, 26,8 ммоль) в DCM при 0°C добавляли метансульфонилхлорид (MsCl) (1,15 мл, 14,75 ммоль). После перемешивания при 0°C в течение 1 ч смесь разбавляли водой/DCM и разделяли слои. Водный слой экстрагировали DCM (2×) и объединенные органические слои отмывали насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Затем неочищенный остаток растворяли в толуоле и концентрировали (2×), получая указанное в заголовке соединение в виде почти белого твердого вещества. В таком виде его использовали в последующих реакциях. LCMS: R_t=0,86 мин, масса/заряд=479,2 (M+1) способ 2m_acidic.

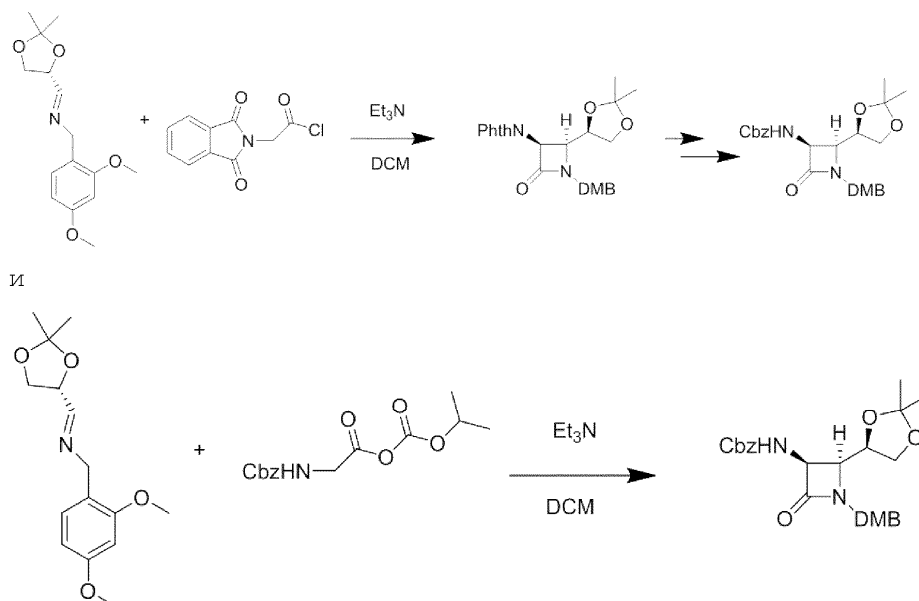
Исходное вещество для этого этапа можно получать с использованием приводимых ниже подходов или определенной комбинации этапов на основе этих подходов. В первом подходе защищенный хиральный альдегид конденсируют с 2,4-диметоксибензиламином с получением хирального имина.



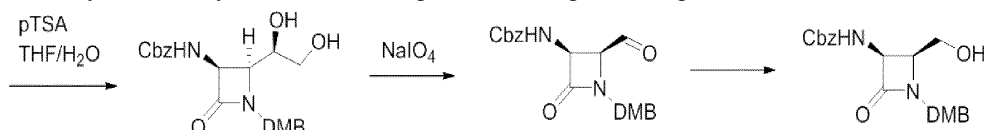
Хиральный альдегид известен, и его можно получать из лимонной кислоты



Хиральный имин можно подвергать реакции с защищенными формами глицина, такими как эти

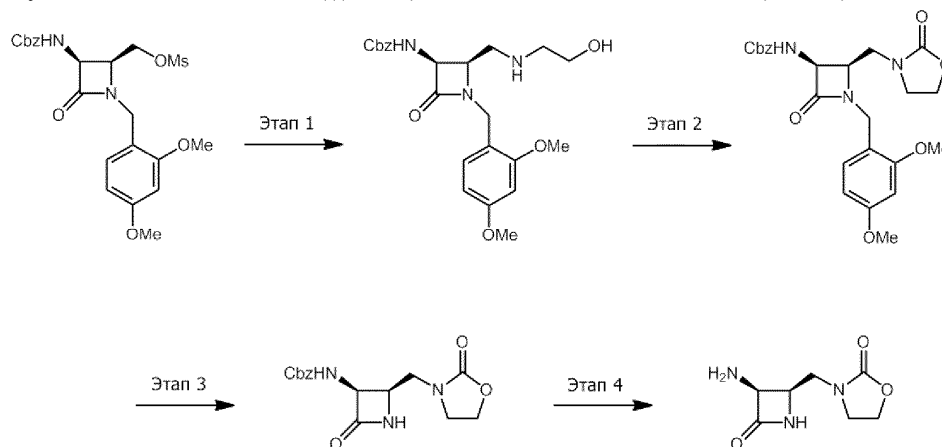


Требуемый смешанный ангидрид для второго варианта можно получать из защищенного CBZ глицина и изопропилхлорформиата в дихлорметане. (DMB относится к 2,4-диметоксибензильной группе). Затем диоксолан этого защищенного промежуточного соединения гидролизуют в умеренных кислых условиях и окисляют до альдегида, который затем можно легко восстанавливать, например, борогидридом натрия с получением двузащищенного первичного спирта, как представлено.



Первичный спирт этого промежуточного соединения можно преобразовывать в уходящую группу, например, обрабатывая йодом и трифенилфосфином, с получением первичного йодида, или обрабатывая основанием и сульфонилхлоридом, с получением, например, мезилата или тозилата. Это активированное промежуточное соединение легко реагирует с гидроксиэтиламином, как приведено на этапе 1 ниже.

Промежуточное соединение В: 3-(((2R,3S)-3-амино-4-оксазетидин-2-ил)метил)оксазолидин-2-он



Этап 1. Бензил-((2R,3S)-1-(2,4-диметоксибензил)-2-(((2-гидроксиэтил)амино)метил)-4-оксазетидин-3-ил)карбамат.

К раствору ((2S,3S)-3-(((бензилокси)карбонил)амино)-1-(2,4-диметоксибензил)-4-оксазетидин-2-ил)метилметансульфоната (6,43 г, 13,4 ммоль) в ацетонитриле (44,8 мл) добавляли этаноламин (8,13 мл, 134 ммоль) с последующим DIEA (7,0 мл, 40 ммоль). Раствор нагревали до 80°C в течение 20 ч, после чего его охлаждали до комнатной температуры, разбавляли EtOAc, промывали водой, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (4,47 г, 75%) в виде белого твердого вещества. LCMS: R_t=0,60 мин, масса/заряд=444,2 (M+1).

Этап 2. Бензил-((3S,4R)-1-(2,4-диметоксибензил)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)азетидин-3-ил)карбамат.

К раствору бензил-((2R,3S)-1-(2,4-диметоксибензил)-2-(((2-гидроксиэтил)амино)метил)-4-оксазетидин-3-ил)карбамата (4,47 г, 10,08 ммоль) в хлороформе (50 мл) добавляли карбонилдиимидазол (CDI) (4,90 г, 30,2 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 мин реакци-

онную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (MeOH-DCM, 0-5%) с получением указанного в заголовке соединения (3,84 г, 81%) в виде белой пены. LCMS: $R_t=0,76$ мин, масса/заряд=470,1 (M+1).

Этап 3. Бензил-((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)азетидин-3-ил)карбамат.

Получали аналогично получению в Mastalerz et al. J. Med. Chem. 1988, 31, 1190 с использованием бензил-((3S,4R)-1-(2,4-диметоксибензил)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)азетидин-3-ил)карбамата (3,84 г, 8,18 ммоль), $K_2S_2O_8$ (3,10 г, 11,5 ммоль) и K_2HPO_4 (1,852 г, 10,6 ммоль) в ACN:вода (2:1, 136 мл) и нагревая в течение 40 мин при 90°C. Добавляли еще $K_2S_2O_8$ (663 г, 2,45 ммоль) и K_2HPO_4 (370 мг, 2,13 ммоль) и смесь нагревали в течение дополнительных 3 ч. Добавляли еще $K_2S_2O_8$ (332 мг, 1,23 ммоль) и K_2HPO_4 (185 мг, 1,06 ммоль) и ее нагревали в течение дополнительных 2 ч, после чего ее концентрировали при пониженном давлении, удаляя большинство ACN. Смесь разбавляли насыщенным соевым раствором/EtOAc и слои разделяли. Водный слой экстрагировали EtOAc (3×) и объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 . Неочищенный остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (EtOAc-гептан, 0-100% затем MeOH-DCM, 10%) с получением указанного в заголовке соединения (1,61 г, 62%) в виде бежевой пены. LCMS: $R_t=0,51$ мин, масса/заряд=320,0 (M+1) Способ 2m_acidic.

Этап 4. 3-(((2R,3S)-3-амино-4-оксоазетидин-2-ил)метил)оксазолидин-2-он.

Получали по Malmström et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012, 22, 5293 с использованием бензил-((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)азетидин-3-ил)карбамата (96 мг, 0,30 ммоль) и Pd/C 10% Degussa типа 101 (10%, 64 мг) и водорода в EtOH:MeOH (4:1, 1,5 мл) в течение 1 ч. Неочищенный остаток в таком виде использовали на следующем этапе. LCMS: $R_t=0,11$ мин, масса/заряд=186,0 (M+1). Способ 2m_acidic.

Соединение X. 1-(((Z)-1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)оксициклопропанкарбоновая кислота.

Этап 1. Бензгидрил-1-(((Z)-1-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)тиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)азетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)оксициклопропанкарбоксилат.

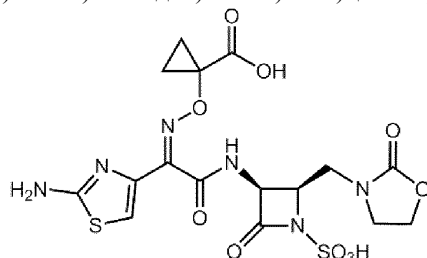
К раствору (Z)-2-((1-((бензгидрилокси)карбонил)циклопропокси)имино)-2-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)тиазол-4-ил)уксусной кислоты (854 мг, 1,59 ммоль), полученному по опубликованной патентной заявке US 2011/0190254, промежуточному соединению В (324 мг, 1,75 ммоль) и HATU (785 мг, 2,07 ммоль) в DMF (7,9 мл) добавляли DIPEA (832 мкл, 4,77 ммоль). Через 1 ч перемешивания смесь выливали в воду и экстрагировали EtOAc. В водный слой добавляли насыщенный солевой раствор и его дополнительно экстрагировали этилацетатом (EtOAc) (3×). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (0-10% MeOH-DCM) с получением указанного в заголовке соединения (1,09 г, 97%) в виде бежевой пены. LCMS: $R_t=0,97$ мин, масса/заряд=705,3 (M+1). Способ 2m_acidic.

Вместо HATU можно использовать ряд других связывающих реагентов, таких как любой из типичных карбодиимидов или CDMT (2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазин) и N-метилморфолин с формированием амидной связи, получаемой на этапе 1.

Этап 2. (3S,4R)-3-((Z)-2-((1-((бензгидрилокси)карбонил)циклопропокси)имино)-2-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)тиазол-4-ил)ацетамидо)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)азетидин-1-сульфо-новая кислота.

Бензгидрил-1-(((Z)-1-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)тиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)азетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)оксициклопропанкарбоксилат (1,00 г, 1,42 ммоль) в DMF (7,0 мл) при 0°C обрабатывали SO_3 -DMF (448 мг, 2,84 ммоль). Через 2 ч перемешивания при комнатной температуре раствор выливали в ледяной насыщенный солевой раствор и экстрагировали EtOAc (3×). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (условно количественно) в виде белого твердого вещества. LCMS: $R_t=0,90$ мин, масса/заряд=785,2 (M+1). Способ 2m_acidic.

Этап 3. 1-(((Z)-1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)оксициклопропанкарбоновая кислота.



К раствору (3S,4R)-3-((Z)-2-((1-((бензгидрилокси)карбонил)циклопропокси)имино)-2-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)тиазол-4-ил)ацетамидо)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)азетидин-1-

сульфоновой кислоты (1,10 г, 1,40 ммоль) в DCM (1,5 мл) при 0°C добавляли TFA (5,39 мл, 70,0 ммоль) и после 10 мин ледяную баню удаляли. Через 1 ч при комнатной температуре добавляли дополнительный TFA (3,24 мл, 42,0 ммоль) и раствор разбавляли DCM и после дополнительных 30 мин концентрировали при пониженном давлении. Необязательно для реакции с TFA можно добавлять анизол для помощи в уменьшении образования побочного продукта, что может увеличить выход требуемого продукта на этом этапе. Неочищенный остаток очищали посредством препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой (XSelect CSH, 30×100 мм, 5 мкм, колонка C18; ACN-вода с модификатором 0,1% муравьиной кислотой, 60 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (178 мг, 23%) в виде белого порошка. LCMS: $R_t=0,30$ мин, масса/заряд=518,9 (M+1). Способ 2m_acidic;

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 9,27 (д, $J=9,0$ Гц, 1H), 6,92 (с, 1H), 5,23 (дд, $J=9,1, 5,7$ Гц, 1H), 4,12-4,23 (м, 3H), 3,72-3,62 (м, предположительно 2H; замаскированный водой), 3,61-3,52 (м, предположительно 1H; замаскированный водой), 3,26 (дд, $J=14,5, 5,9$ Гц, 1H), 1,36 (с, 4H).

^1H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 7,23 (с, 1H), 5,48 (д, $J=5,8$ Гц, 1H), 4,71-4,65 (м, 1H), 4,44 (т, $J=8,2$ Гц, 2H), 3,89-3,73 (м, 3H), 3,54 (дд, $J=14,9, 4,9$ Гц, 1H), 1,65-1,56 (м, 2H), 1,56-1,46 (м, 2H).

Продукт этого процесса является аморфным. Соединение X в дополнение к растворителям, описанным ниже, можно кристаллизовать из ацетона, этанола, цитратного буфера при pH 3 (50 mM) или ацетатного буфера при pH 4,5 (50 mM).

Фармацевтические композиции соединения X.

Соединение X (500 мг) и L-аргинин (332,5 мг) комбинируют во флаконе. Добавляют сахарозу (кристаллическую, не содержащую пирогенов сахарозу: 1000 мг) вместе с водой, подходящей для инъекции (8,00 мл). Если необходимо, pH раствора доводят с использованием 1,0N HCl или 1,0N NaOH с получением pH $5,0\pm0,5$, предпочтительно pH $5,0\pm0,2$. Это приводит к получению раствора, содержащего приблизительно 62,5 мг/мл соединения X в виде аргининовой соли. Если необходимо, этот раствор можно фильтровать и можно лиофилизировать с получением белого или почти белого твердого вещества (лиофилизата). Лиофилизированное твердое вещество можно восстанавливать стерильной водой или фармацевтически приемлемым водным носителем, таким как изотонический солевой раствор или декстроза с получением раствора, подходящего для внутривенного введения. Лиофилизат следует хранить в контейнере, который исключает воздействие света, для защиты лиофилизата от фотодеструкции. Этот процесс можно проводить в увеличенном или уменьшенном масштабе с получением единиц дозирования для хранения и распространения, или большого количества вещества, которое можно дополнительно обрабатывать, как требуется. Для проведения в увеличенном масштабе важен контроль температуры: соединение X в растворе перед добавлением аргинина или другого основания следует поддерживать при температуре ниже 10°C, предпочтительно от 0 до 8°C и более предпочтительно от 2 до 8°C, так как соединение подвержено гидролитическому разрушению в воде в отсутствие основания или вне диапазона pH 4-6.

В одном из вариантов осуществления смесь по приводимому выше примеру получают, как описано, с использованием тригидрата (формы 5) соединения X в количестве, которое составляет приблизительно 500 мг безводного соединения X и лиофилизируют во флакон, которые затем герметизируют для хранения и распространения предпочтительно с использованием пробки из бутилрезины (например, пробки D777), где лиофилизат в каждом флаконе содержит приблизительно 500 мг соединения X. Флаконы с лиофилизатом до использования хранят при комнатной температуре или ниже.

Альтернативный состав, подходящий для в/в инъекции, содержит соединение X (100 мг) и 0,5N бикарбонат натрия (0,75 мл) и, если необходимо, регулятор pH (1N NaOH или 1N HCl по мере необходимости) с доведением pH приблизительно до 5,5 (от pH 5 до pH 6) с определенным количеством воды для инъекций, достаточным для получения конечной концентрации 100 мг/мл.

Стабильность соединения X.

Соединение X является стабильным в твердой форме, но соли соединения X в растворе являются более стабильными, чем форма свободной кислоты; таким образом, важно определить подходящие фармацевтически приемлемые соли для использования для введения. Соли соединения X получали, добавляя основание (1,0 или 2,0 экв.) к соединению X в воде и лиофилизируя раствор. Полученные, таким образом, твердые вещества по данным XRPD являются аморфными. Таким образом, формирование солей соединения X пытались проводить с использованием гидроксида натрия, (L)-лизина, (L)-аргинина, гидроксида кальция, меглумина и гидроксида магния. Выявлено, что натриевые соли и аргининовые соли являются особенно стабильными и, таким образом, желательными в качестве форм для введения в водных средах, как правило, используемых для внутривенных инъекций и инфузий.

Образцы динамической соли и двойной соли (L)-аргинина в виде твердых веществ подвергали тестам стабильности при 25 и 40°C. Исходно образец натриевой соли по данным ВЭЖХ являлся на 97,2% чистым, и через 6 недель при 25°C он все еще был на 96,2% чистым.

То же вещество, хранимое при 40°C, через 3 недели было на 94,8% чистым и через 6 недель на 93,6% чистым. Значимые примеси, которые появляются или увеличиваются в количестве при исследовании, выявляют с относительным временем удержания (RRT) 0,34 и 1,11 (с соединением X, определенным как RRT=1).

Исходно аргининовая соль по данным ВЭЖХ была на 97,3% чистой, и через 6 недель при 25°C была чистой на 96,3%. При 40°C ее чистота падала до 95,1% через 3 недели и до 94,2% через 6 недель. Значимые примеси, которые появляются или увеличиваются в количестве в течение этого исследования, выявляют с относительным временем удержания (RRT) 1,09, 1,11 и 1,13 (с соединением X, определенным как RRT=1).

Условия ВЭЖХ для исследований стабильности:

система Agilent 1290 с УФ-детектором при 260 нм,

колонка Acquity HSS T3, с ID 100 мм×2,1 мм; размер частиц 1,8 мкм (поставляемая Waters),

температура колонки: 40°C,

подвижные фазы

A: 0,05% TFA в воде,

B: 0,05% TFA в метаноле,

скорость потока: 0,45 мл/мин,

градиент (отношение A/B): 97:3 в течение 8 мин; 75:25 в течение 3 мин; 0:100 в течение 1 мин.

Также выявлено, что соединение X подвержено фотохимическому разрушению; таким образом, соединение X для наилучшего срока хранения следует хранить в темных или непрозрачных контейнерах. В одном из вариантов осуществления изобретения соединение X упаковывают в контейнере, который в значительной степени уменьшает воздействие света, предпочтительно в атмосфере при относительной влажности 25-50% и более предпочтительно при относительной влажности 30-40% или 30-45%.

Биологическая активность

Скрининг и культуры бактерий.

Бактериальные изоляты культивировали из замороженных при -70°C хранимых культур посредством двух последовательных пересевов ночных культур при 35°C в воздухе окружающей среды на 5% кровяном агаре (Remel, Lenexa, Kans.). Контроль качества и *P. aeruginosa* ATCC 27853) получали в American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, Md.), а PAO1 получали у Dr. K. Poole.

Конструирование изогенных штаммов *Escherichia coli* штаммов NB27273-CDY0026 (исходный), NB27273-CDY0033 (KPC2) и NB27273-CDY0030 (SHV12).

Штамм NB27273 (BW25113 *pspB*::Km^r) получали из коллекции вставок транспозонов Keio. Штамм содержал ген *pspB*, замененный маркером устойчивости к канамицину (BW25113 *pspB*::Km^r). Этот штамм избавляли от транспозона *pspB* посредством рекомбиназы FLP по опубликованной методологии. Полученный штамм, BW25113 *pspB*, использовали в качестве хозяина для мультикопийных векторов, экспрессирующих ключевые β-лактамазы. Мультикопийные плазмиды, обуславливающие конститутивную экспрессию β-лактамаз, получали следующим образом: синтетические, гены с оптимизированными кодонами, кодирующие β-лактамазы KPC2 и SHV12 were *E. coli* получали посредством DNA2.0 (Palo Alto, CA). Каждый из синтетических фрагментов конструировали так, чтобы он содержал участки рестрикции NotI и NcoI на своих концах, обеспечивая лигирование в расщепленное NotI/NcoI производное pET28a(+) для экспрессии белка. Вставки в эти векторы служили матричной ДНК для амплификации посредством ПЦР гена, кодирующего KPC2 и SHV12, с использованием пар праймеров

E225 (tcgcCTCGAGgcgactgcgctgacgaatttg) (SEQ ID NO: 1),

E202 (aatcGAATTCttactgaccattaacgccaagc) (SEQ ID NO: 2),

E227 (tcgcCTCGAGgcgagcccgcaaccgctgga) (SEQ ID NO: 3) и

E204 (aatcGAATTCttaacgctgccagtgtcaatc) (SEQ ID NO: 4) соответственно.

Нуклеотидные последовательности с оптимизированными кодонами и соответствующая информация для распознавания праймеров, приведены ниже

SHV12

atgggccatcatcatcatcatcacagcagcgccctggaagtctgttccaggggcccgc
gagcccgcaaccgctggagcagatcaagcagctctgagagccagctgagcggcctgtgggtatg
atcgagatggatctggcttccggccgtacgctgacggcatggcgtgccgacgaacgtttccga
tgatgtcgacctttaagttgttctgtgtggtgcggtcttggcacgtgtagacgggtgacga
acaactggagcgcaagatccattaccgccaacaggacttggtcgactacagcccggttagcgaa
aagcacctggcggatggcatgaccgtgggtgaattgtgcgccgctgcgattaccatgagcgaca
atagcgcggcctaactctgctgttggcgaccgttgggtggcccagcgggcttgaccgcatttctgcg
tcaaatcggcgataatgttacgctctggatcgctgggaaacggagctgaacgagggcactgccc
ggtgatgcccgatgataccacgactcctgctagcatggcagcgaccctgcgtaaactgtgacca
gccagcgtctgagcgacgtagccaacgccagctgctgcaatggatggtggatgaccgcgtggc
gggtccgctgatccgctccgtcctgccagcaggctggttcattgcggacaaaactggtgcctct
aagcgtggtgcgctggtatcgtcgcgctgctgggtccgaacaacaaagccgaacgtattgtgg
ttatctatctgcgcgacaccccgcaagcatggccgagcgcaaccagcaaattgcgggcattgg
tgccgcactgattgagcactggcagcggttaaCGCCGGCG (SEQ ID NO:5)

E227 tcgcCTCAGGgagcagcccgcaaccgctgga (SEQ ID NO:6)

E204 aatcGAATTCttaacgctgccagtgctcaatc (SEQ ID NO:7)

Обратная комплементарная последовательность E204
gatttgagcactggcagcggttaaGAATTCgatt (SEQ ID NO:8)

KPC2

ATGGGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCGC
GACTGCGCTGA

CGAATTTGGTGGCCGAGCCGTTTCGCGAAATTGGAGCAAGATTTTGGTGGTTCGATCGGT
GTCTACGCGAT

GGACACCGGTAGCGGTGCCACCGTGAGCTACCGTGCCGAAGAGCGTTTCCGCTGTGTA
GCTCTTTCAAG

GGTTTTCTGGCCCGAGCCGTGCTGGCACGCAGCCAACAGCAAGCGGGCCTGCTGGACAC
CCCGATCCGTT

ACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGAGCCGATTAGCGAAAAGTACCTGACCACCGGC
ATGACGGTGGC

GGAGTTGAGCGCTGCGGCGGTTTCACTATTCGATAACGCTGCGGCAAACTCTGCTGCTGA
AAGAACTGGGC

GGTCCAGCGGGTCTGACGGCTTTCATGCGTTCTATTGGCGACACCCTTTCGCTTGA
CCGCTGGGAGC

TGGAGCTGAACAGCGCGATTCCGGGCGACGCACGTGATACGAGCAGCCCGCTGCAGTG
ACCGAGAGCCT

GCAGAAGCTGACCCTGGGCGAGCGCACTGGCCGACCGCAGCGCCAACAGTTTCGTCGATT
GGCTGAAGGGT

AACACCACCGGTAACCATCGTATTCGCGCAGCGGTCCCGGCTGATTGGGCAGTTGGTGA
CAAGACTGGTA

CGTGCGGCGTTTATGGTACGGCGAATGACTACGCGGTTGTTTGGCCTACGGGTCGTGCG
CCGATCGTCCT

GGCGGTGTATACCGGTGCTCCGAACAAAGACGATAAACTCCGAAGCGGTATCGCCG
CAGCAGCGCGT

CTGGCCCTGGAAGGCTTGGGCGTTAATGGTCAGTAAAGCCGGCG (SEQ ID NO:9)

E225 tcgcCTCAGGgagcactgcgctgacgaatttgg (SEQ ID NO:10)

E202 aatcGAATTCttactgaccattaacgccaagc (SEQ ID NO:11)

Обратная комплементарная последовательность E202
gcttggcgcttaatggtcagtaaGAATTCgatt (SEQ ID NO:12)

ПОДЧЕРКНУТО=ДНК, кодирующая BL

Затем продукты ПЦР расщепляли XhoI и EcoRI и лигировали в расщепленную подобным образом плазмиду pАН63-pstS (BlaP). Плазмида pАН63-pstS (BlaP) представляет собой производное плазмиды pАН63 (J. Bacteriol. 183(21): 6384-6393), полученное клонированием кодирующей промотор и сигнальный пептид TEM-1 (bla) области плазмиды pBAD (J. Bacteriol. 1995 Jul. 177 (14): 4121-30) в плазмиду

рАН63. Этот фрагмент клонировали посредством ПЦР с рBAD с использованием пары праймеров

E192 (ttcaCTGCAGtgaacgttgcaagcaacggC) (SEQ ID NO: 13) и

E194 (TCGAggatcctcgagagcaaaaacaggaaggcaaaatgccg) (SEQ ID NO: 14), расщепляли PstI и BamHI и вставляли в расщепленную подобным образом плазмиду рАН63. Таким образом, экспрессия β-лактамаз с основанных на рАН63-pstS (BlaP) конструкций является конститутивной, и добавлена сигнальная последовательность для направления этих белков в периплазму. Основанные на плазмиде рАН63 векторы используют для вставки в геном одной копии, однако для обеспечения более высоких уровней экспрессии для обеспечения более чувствительной детекции восприимчивости соединений к β-лактамазам, экспрессионные вставки, содержащиеся в этих векторах, перемещали в репликационный мультикопийный вектор рBAD-Kan (J. Bacteriol. 1995 Jul. 177(14):4121-30). Для осуществления этого вставки, содержащие гены β-лактамаз с ассоциированным промотором и сигнальными последовательностями TEM, амплифицировали посредством ПЦР с их соответствующих векторов с использованием праймеров

E269 (ccgTCTAGAcggatggccttttgcgttc) (SEQ ID NO:15) и E202 (aatcGAATTCTtactgaccattaacgccaagc) (SEQ ID NO: 16) для конструкции KPC2 и E204 (aatcGAATTCTtaacgtgccagtgetcaatc) (SEQ ID NO: 17) для конструкции SHV12. Затем эти фрагменты расщепляли XbaI и EcoRI и каждый вставляли в рBAD18-kan, которую расщепляли теми же ферментами с получением пары мультикопийных векторов, экспрессирующих KPC2 и SHV12 соответственно. Эти векторы трансформировали в BW25113 pspB с получением штаммов NB27273-CDY0033 (экспрессирующего KPC2) и NB27273-CDY0030 (экспрессирующего SHV12). Вектор рBAD18-kan также содержит промоторную область и сигнальную последовательность TEM, (но в нем отсутствуют любые интактные гены β-лактамаз), и его трансформировали в BW25113 pspB с использованием стандартных протоколов с получением контрольного штамма NB27273-CDY0026. Экспрессию β-лактамаз подтверждали проверкой сниженной чувствительности к тестовым антибиотикам примера, которые являются известными субстратами KPC2 или SHV12.

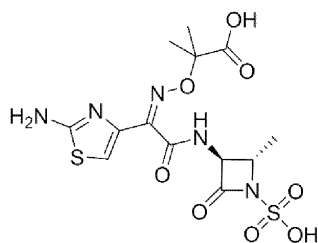
Тестирование чувствительности.

Минимальные ингибирующие концентрации (MIC) определяли способом микроразведений в бульоне по руководствам Clinical and Laboratories Institute (CLSI). В кратком изложении, свежие ночные бактериальные культуры суспендировали в стерильном солевом растворе и доводили до стандарта мутности по McFarland 0,5. Затем бактериальные суспензии разбавляли в бульоне Мюллера-Хинтона со стандартизированным содержанием катионов (MHB II; BBL) с получением конечного инокулята приблизительно 5×10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Получали основную панель антибиотиков с концентрацией, эквивалентной стократной наибольшей требуемой конечной концентрации в 100% диметилсульфоксиде (DMSO). Затем основную панель антибиотиков разбавляли посредством серийных двукратных разведений многоканальной пипеткой. Полученные серийные разведения соединений разбавляли 1:10 стерильной водой, что приводило к 10% конечной концентрации DMSO. Серийные разведения лекарственных средств в объеме 10 мкл переносили в 96-луночные планшеты для анализа. В планшеты для анализа инокулировали 90 мкл бактериальных суспензий и инкубировали при 35-37°C в течение 20 ч. Планшеты для анализа сканировали с использованием сканера для планшетов для микротитрования (Molecular Devices) при 600 нм, а также посредством визуального осмотра с использованием считывающего зеркала. Наименьшую концентрацию соединения, которая предотвращала видимый рост, регистрировали как MIC.

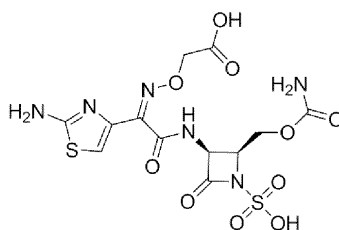
Производительность анализа контролировали посредством тестирования азтреонама по отношению к лабораторным штаммам контроля качества по руководствам CLSI.

Контрольные соединения: для сравнения по настоящему документу используют следующие моноклеточные соединения.

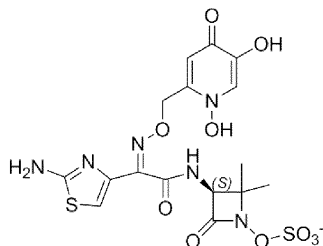
Контрольное соединение 1: азтреонам



Контрольное соединение 2: карумонам



Контрольное соединение 3: BAL30072



Контрольное соединение 4: айкурис WO 2013110643

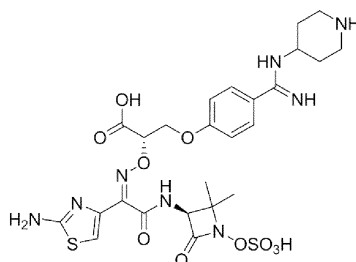


Таблица А

Минимальные ингибирующие концентрации (МИС) в отношении к изоженным штаммам
E. coli, несущим различные детерминанты устойчивости

Номер примера	МИС для штамма 1 (мкг/мл)	МИС для штамма 2 (мкг/мл)	МИС для штамма 3 (мкг/мл)
Контрольное соединение 1	0,125	>32	>32
Контрольное соединение 2	0,125	1	>32
Контрольное соединение 3	0,25	0,5	>32
Контрольное соединение 4	≤ 0,06	0,25	32
Соединение X	≤ 0,06	0,125	0,5

Штамм 1: NB27273-CDY0026 E.coli (исходный).

Штамм 2: NB27273-CDY0033 E.coli (KPC2).

Штамм 3: NB27273-CDY0030 E.coli (SHV12).

Данные в табл. А демонстрируют, что соединение X обладает хорошей противобактериальной активностью в отношении E. coli, включая штаммы, которые демонстрируют высокую устойчивость к различным известным монобактамным и сульфатамным антибиотикам.

В таблице ниже приведены дополнительные данные по активности соединения X. Соединение X тестировали на штамме E. coli 25922 и E. coli, содержащей KPC-2 (штамм 2 выше, который представляет собой известную карбапенемазу из Klebsiella pneumoniae), и приведены эти ингибирующие концентрации (МИС) в мг/мл.

Соединение X	Соль	Ec 25922	Ec KPC2 Iso
	нет	0,25	0,125

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двойная соль (L)-аргинина 1-(((Z)-(1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)окси)циклопропанкарбоновой кислоты.

2. Динатриевая соль 1-(((Z)-(1-(2-аминотиазол-4-ил)-2-оксо-2-(((3S,4R)-2-оксо-4-((2-оксооксазолидин-3-ил)метил)-1-сульфоазетидин-3-ил)амино)этилиден)амино)окси)циклопропанкарбоновой кислоты.
3. Фармацевтическая композиция для лечения инфекции грамотрицательных бактерий, содержащая соединение по п.1 или 2 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.
4. Фармацевтическая композиция для лечения инфекции грамотрицательных бактерий, содержащая соль аргинина по п.1, где композиция дополнительно содержит водный фармацевтически приемлемый носитель и находится при pH приблизительно 5,0.
5. Применение соединения по п.1 или 2 для лечения инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями.
6. Применение соединения по п.1 или 2 в производстве лекарственного средства для лечения инфекции грамотрицательных бактерий.
7. Способ лечения инфекции, вызванной грамотрицательными бактериями, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или 2 или фармацевтической композиции по п.4.

