

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 038989

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.11.18

(21) Номер заявки  
201991891

(22) Дата подачи заявки  
2018.02.16

(51) Int. Cl. C07D 519/00 (2006.01)  
A61K 31/437 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)

## (54) АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ АРИЛОКСАЗОЛИДИНОНА

(31) 17156728.2

(32) 2017.02.17

(33) EP

(43) 2020.02.29

(86) PCT/EP2018/053873

(87) WO 2018/149960 2018.08.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ИДОРСИЯ ФАРМАСЬЮТИКЛЗ ЛТД  
(CH)

(72) Изобретатель:

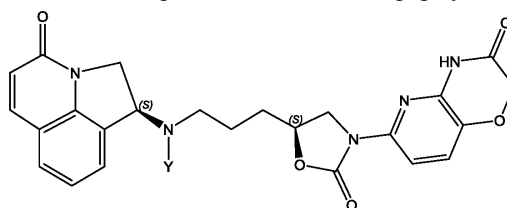
Риц Даниэль, Рюэди Георг, Цумбрунн  
Корнелия (CH)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(56) WO-A1-2010041194  
WO-A1-2014108832

(57) Изобретение относится к соединениям арилоксазолидинона формулы I



I,

где Y представляет собой водород или определенные химические группы. Эти соединения являются подходящими противомикробными веществами, эффективными против множества патогенных микроорганизмов, которые в том числе включают грамотрицательные аэробные и анаэробные бактерии.

B1

038989

038989

B1

Изобретение относится к новым арилоксазолидиноновым соединениям, к фармацевтическим композициям, содержащим их, и к применениям этих соединений при изготовлении лекарственных средств для лечения бактериальных инфекций. Эти соединения являются подходящими противомикробными веществами, которые являются эффективными против множества патогенных микроорганизмов у человека и животных, которые среди прочего включают грамположительные и грамотрицательные аэробные и анаэробные бактерии и, в частности, против резистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и энтеробактерий, таких как *Klebsiella pneumoniae*.

Интенсивное применение антибиотиков привело к резкому увеличению микроорганизмов с генетически обусловленными механизмами резистентности. Современная медицина и социально-экономическое поведение усугубляет проблему развития резистентности, посредством создания ситуаций медленного роста патогенных микробов, например, в искусственных составах, а также посредством поддержания долгосрочных резервуаров хозяина, например, у пациентов с ослабленным иммунитетом.

В больничных условиях все большее число штаммов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, видов *Enterococcus*, энтеробактерий и *Pseudomonas aeruginosa*, являющихся основными источниками инфекций, становятся резистентными ко многим лекарственным средствам и, вследствие этого, они сложно, если вообще возможно, поддаются лечению:

*S. aureus* является резистентным к  $\beta$  лактамам, хинолонам, и на сегодня даже к ванкомицину;

*S. pneumoniae* становится резистентным к пенициллину или к хинолоновым антибиотикам, и даже к новым макролидам;

*Enterococci* являются резистентными к хинолону и ванкомицину, и  $\beta$  лактамные антибиотики являются неэффективными против этих штаммов;

энтеробактерии являются резистентными к цефалоспоринолу и к хинолону, а карбапенемы теряют свою эффективность (например, резистентная к карбапенему *Klebsiella pneumoniae*);

*P. aeruginosa* является резистентной к  $\beta$  лактаму и хинолону.

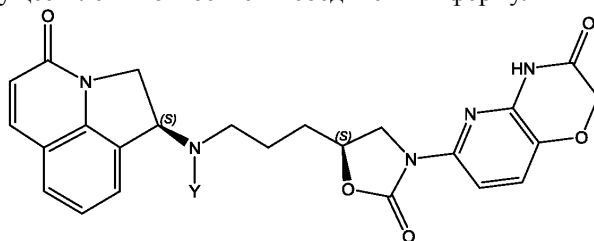
К тому же частота возникновения резистентных ко многим лекарственным средствам грамотрицательных штаммов, таких как энтеробактерии и *Pseudomonas aeruginosa*, неизменно растет, и вновь появляющиеся микроорганизмы, такие как виды *Acinetobacter* или *Clostridium difficile*, которые были выбраны для терапии с помощью применяемых в настоящее время антибиотиков, становятся реальной проблемой в больничных условиях (S.L. Solomon и др., *Antibiotic Resistance Threats in the United States: Stepping Back from the Brink*, Academy of Family Physician, страница 940, т. 89, номер 12, 15-е июня, 2014 г.). Вследствие этого в медицине существует большая потребность в новых антибактериальных веществах, которые преодолевают эти множественные лекарственные резистентности у бактерий, в частности у *Pseudomonas aeruginosa* и энтеробактерий, таких как *Klebsiella pneumoniae*.

Мы описали некоторые соединения арилоксазолидинона и их противомикробные свойства в WO 2010/041194 и WO 2014/108832.

Изобретение обеспечивает новые S,S-стереоизомеры арилоксазолидинона, которые обладают преимущественными фармакологическими свойствами.

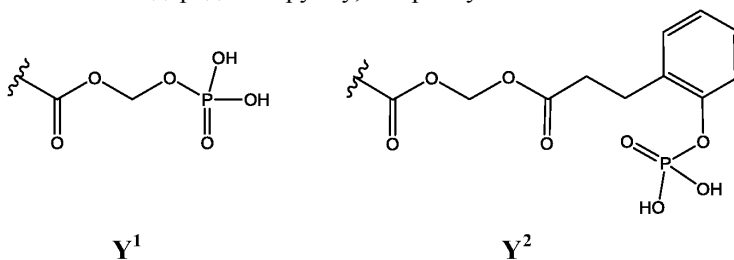
Различные варианты осуществления настоящего изобретения определены ниже.

1) Первый вариант осуществления относится к соединениям формулы I



I,

где Y представляет собой водород или группу, выбранную из Y<sup>1</sup> и Y<sup>2</sup>



Y<sup>1</sup>

Y<sup>2</sup>

или их соль.

2) Другой вариант осуществления относится к соединению варианта осуществления 1), где Y представляет собой водород.

3) Другой вариант осуществления относится к соединению варианта осуществления 1), где Y представляет собой Y<sup>1</sup>.

4) Другой вариант осуществления относится к соединению варианта осуществления 1), где Y представляет собой Y<sup>2</sup>.

Соединения в соответствии с вариантами осуществления 3) и 4) проявляют антибактериальное действие в биологически релевантной среде (т.е. в присутствии фосфатазы, эстеразы, сульфатазы или любого их подходящего эквивалента, способного удалять группу Y<sup>1</sup> или Y<sup>2</sup>). В указанной среде указанные соединения обычно превращаются в соединение варианта осуществления 1).

Соединения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1)-4) являются, в частности, активными против бактерий и подобных бактериям микроорганизмов. Соответственно, они могут быть особенно подходящими для применения в лекарственном средстве, применяемом для людей и животных для профилактики и химиотерапии местных и системных инфекций, вызываемых этими патогенными микроорганизмами, а также нарушений, связанных с бактериальными инфекциями, которые включают пневмонию, воспаление среднего уха, синусит, бронхит, воспаление миндалин, и мастоидит, связанные с заражением *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, или видами *Peptostreptococcus*; фарингит, ревматическую атаку, а также гломерулонефрит, связанные с заражением *Streptococcus pyogenes*, стрептококками групп C и G, *Corynebacterium diphtheriae*, или *Actinobacillus haemolyticus*; инфекции дыхательных путей, связанные с заражением *Legionella pneumophila*, *S.pneumoniae* или *Chlamydia pneumoniae*; инфекции крови и тканей, которые включают эндокардит и остеомиелит, вызываемые *S.aureus*, *S.haemolyticus*, которые включают штаммы, резистентные к известным антибактериальным средствам, таким, но не ограничивающиеся ими, как β лактамы, ванкомицин, аминогликозиды, хинолоны, хлорамфеникол, тетрациклины и макролиды; неосложненные инфекции кожи и мягких тканей и нагноения, а также пуперпальную лихорадку, связанные с заражением *S.aureus*, коагулазонегативными стафилококками (т.е. *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* и т.п.), *S.pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, стрептококковыми группами C-F (стрептококки небольшой колонии), стрептококками группы вириданс, *Corynebacterium minutissimum*, видами *Clostridium*, или *Bartonella henselae*; неосложненные острые инфекции мочевых путей, связанные с заражением *S.aureus* или коагулазонегативными стафилококковыми видами; уретрит и цервицит; заболевания, передающиеся половым путем, связанные с заражением *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, или *Neisseria gonorrhoeae*; токсико-инфекционные заболевания, связанные с заражением *S.aureus* (пищевое отравление и синдром токсического шока), или стрептококками групп A, B и C; конъюнктивит, кератит, и дакриоцистит, связанные с заражением *C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae*, *S.aureus*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes* или видам *Listeria*. Приведенные выше перечни инфекций и патогенных микроорганизмов следует интерпретировать только в качестве примеров, и никоим образом в качестве ограничивающих.

Соединения в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) могут применяться для изготовления лекарственного средства и являются подходящими для профилактики или лечения бактериальной инфекции, выбранной из группы, состоящей из инфекций дыхательных путей, воспаления среднего уха, менингита, инфекций кожи и мягких тканей (как осложненных, так и неосложненных), пневмонии (включая внутрибольничную пневмонию), бактериемии, эндокардита, инфекций брюшной полости, желудочно-кишечных инфекций, инфекций мочевых путей, инфекций, передающихся половым путем, инфекций, обусловленных инородным телом, остеомиелита, болезни Лайма, местных инфекций, или офтальмологических инфекций, и, в частности, для профилактики или лечения бактериальной инфекции, выбранной из группы, состоящей из инфекций дыхательных путей, воспаления среднего уха, менингита, инфекций кожи и мягких тканей (как осложненных, так и неосложненных), пневмонии (включая внутрибольничную пневмонию) и бактериемии.

Кроме того, соединения в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) могут быть подходящими для изготовления лекарственного средства и являются подходящими для лечения инфекций, которые вызываются грамположительными бактериями (такими как *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, видами *Corynebacterium* и *Propionibacterium acnes*), в частности грамположительными бактериями, выбранными из группы, состоящей из *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* и *Propionibacterium acnes*. В частности, соединения в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) могут применяться для изготовления лекарственного средства и являются подходящими для лечения бактериальной инфекции, которая вызывается *Staphylococcus aureus* (в частности, резистентными к хинолону бактериями *Staphylococcus aureus*).

Соединения в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) могут, кроме того, быть подходящими для изготовления лекарственного средства и являются подходящими для лечения инфекций, которые вызываются грамотрицательными бактериями (такими как *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* и другими энтеробактериями, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* и видами бактериоидов), в частности грамотрицательными бактериями, выбранными из группы, состоящей из *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Moraxella catarrhalis* и *Neisseria meningitidis*. В частности, соединения формулы I в соот-

ветствии с любым из вариантов осуществления 1)-4), и их фармацевтически приемлемые соли, могут применяться для изготовления лекарственного средства и являются подходящими для лечения бактериальной инфекции, которая вызывается бактериями *Klebsiella pneumoniae* (в частности, резистентными к различным лекарственным средствам или резистентными к хинолону бактериями *Klebsiella pneumoniae*) и *Pseudomonas aeruginosa*.

Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к применению соединений в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения бактериальной инфекции (в частности, одной из упомянутых выше инфекций, которые вызываются грамотрицательными бактериями, или одной из упомянутых выше инфекций, которые вызываются грамположительными бактериями).

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению по меньшей мере одного из соединений в соответствии с вариантами осуществления 1)-4) в качестве лекарственного средства.

Еще один дополнительный аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей по меньшей мере одно из соединений в соответствии с вариантами осуществления 1)-4) и дополнительно по меньшей мере один терапевтически инертный наполнитель.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере одно из соединений в соответствии с вариантами осуществления 1)-4) в качестве действующего вещества и необязательно носители и/или разбавители и/или адъюванты, и также может содержать дополнительные известные антибиотики.

Изготовление фармацевтических композиций может осуществляться способом, который известен любому специалисту в данной области (см., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21-е издание (2005 г.), часть 5, "Pharmaceutical Manufacturing" [опубликовано Lippincott Williams & Wilkins]) посредством приведения описанных соединений формулы I или их фармацевтически приемлемых солей, необязательно в комбинации с другими терапевтически полезными веществами, в галеновую лекарственную форму вместе с подходящими, нетоксичными, инертными, терапевтически совместимыми твердыми или жидкими материалами носителя и, если это является желательным, обычными фармацевтическими адъювантами.

Соединениями в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) можно лечить такие виды животных, как свиньи, жвачные, лошади, собаки, коты и сельскохозяйственная птица.

Любую ссылку на соединение в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) в этом тексте следует понимать как относящуюся также к солям (и, в частности, к фармацевтически приемлемым солям) таких соединений.

Соединения в соответствии с вариантами осуществления 1)-4) могут применяться в качестве лекарственных средств, например в виде фармацевтических композиций для энтерального или, в частности, для парентерального введения (в частности, для внутривенного применения).

Другой аспект изобретения относится к способу профилактики или лечения, предпочтительно лечения, бактериальной инфекции у пациента, содержащему введение указанному пациенту фармацевтически активного количества соединения формулы I в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) или его фармацевтически приемлемой соли. Соответственно, изобретение обеспечивает способ профилактики или лечения у пациента бактериальной инфекции, которая вызывается грамотрицательными бактериями (в частности, бактериальной инфекции, которая вызывается бактериями *Klebsiella pneumoniae*, и, в частности, резистентными к различным лекарственным средствам или резистентными к хинолону бактериями *Klebsiella pneumoniae* и бактериями *Pseudomonas aeruginosa*), содержащий введение указанному пациенту фармацевтически активного количества соединения формулы I в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) или его фармацевтически приемлемой соли. Кроме того, изобретение обеспечивает способ профилактики или лечения у пациента, предпочтительно лечения, бактериальной инфекции, которая вызывается грамположительными бактериями (в частности, бактериальной инфекции, которая вызывается бактериями *Staphylococcus aureus*, в частности резистентными к хинолону бактериями *Staphylococcus aureus*), содержащий введение указанному пациенту фармацевтически активного количества соединения формулы I в соответствии с одним из вариантов осуществления 1)-4) или его фармацевтически приемлемой соли.

Соединения формулы I в соответствии с настоящим изобретением также могут применяться для целей очистки, например для удаления патогенных микробов и бактерий из хирургических инструментов, катетеров и искусственных имплантатов; с тем чтобы сделать поверхность, помещение или площадь стерильными. Для таких целей соединения формулы I могут содержаться в препарате в виде раствора, суспензии/эмульсии, спрея, геля и/или сухого порошка.

Соединения в соответствии с вариантами осуществления 1)-4) также могут применяться в ветеринарии, например, в качестве лечения инфекций у сельскохозяйственных животных и домашних животных. Кроме того, они могут составлять вещества для защиты при хранении неорганических и органических материалов, в частности всех типов органических материалов, например полимеров, смазочных материалов, красочных составов, волокон, кожи, бумаги и дерева.

Соединения в соответствии с любым из вариантов осуществления 1)-4) являются подходящими для

применения в качестве активных химиотерапевтических соединений в лекарственном средстве для людей и животных и в качестве вещества для защиты при хранении неорганических и органических материалов, в частности, всех типов органических материалов, например полимеров, смазочных материалов, красочных составов, волокон, кожи, бумаги и дерева.

Настоящее изобретение также включает соединения формулы (I), меченые изотопом, в частности меченые  $^2\text{H}$  (дейтерием), причем указанные соединения являются идентичными соединениям формулы (I), за исключением того, что один или большее количество атомов, каждый, были заменены посредством атома, который имеет то же атомный номер, но атомная масса отличается от атомной массы, которая обычно встречается в природе. Меченые изотопом, в частности меченые  $^2\text{H}$  (дейтерием), соединения формулы (I) и их соли находятся в пределах объема настоящего изобретения. Замещение водорода более тяжелым изотопом  $^2\text{H}$  (дейтерием) может приводить к более высокой устойчивости к инактивации в процессе метаболизма, что приводит, например, к увеличенному периоду полувыведения *in vivo* или к уменьшению необходимых дозировок, или же может приводить к уменьшению ингибирования ферментов цитохрома P450, что, в свою очередь, например, приводит к улучшенному профилю безопасности препаратов. В одном варианте осуществления изобретения, соединения формулы (I) не мечены изотопами, или они мечены только одним или большим количеством атомов дейтерия. В подварианте осуществления, соединения формулы (I) не мечены изотопом вообще. Меченые изотопом соединения формулы (I) могут быть получены по аналогии со способами, которые описаны далее, но применяя при этом соответствующие изотопные варианты подходящих реагентов или исходных материалов.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к солям, которые сохраняют желательное биологическое действие целевого соединения и проявляют минимальные нежелательные токсические воздействия. Такие соли включают соли присоединения неорганической или органической кислоты и/или соли присоединения основания, в зависимости от присутствия в целевом соединении основных и/или кислотных групп. Для справки см., например, "Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use", P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (ред.), Wiley-VCH, 2008, и "Pharmaceutical Salts and Co-crystals", Johan Wouters и Luc Quééré (Ред.), издание RSC, 2012.

Термин "профилактика" следует понимать в качестве эквивалента термину "предупреждение".

Кроме того, термин "комнатная температура", как его используют в этой заявке, относится к температуре, составляющей  $25^\circ\text{C}$ .

Соединения формулы I могут быть получены в соответствии с настоящим изобретением посредством применения процедур, описанных ниже.

Получение соединений формулы I.

В тексте описания и в примерах использованы следующие сокращения:

Ac	ацетил
водн.	водный
Woc	<i>трет</i> -бутоксикарбонил
СНО	яичник китайского хомячка
КХ	колоночная хроматография
ДМД	диодно-матричное детектирование
ДХМ	дихлорметан
ДМЭ	1,2-диметоксиэтан
ДМФ	<i>N,N</i> -диметилформамид
ДМАП	4-Диметиламинопиридин
DMPK	фармакокинетика метаболизма лекарственных средств
DMCO-d6	дейтерированный диметилсульфоксид
ЭА	этилацетат
ELSD	испарительный детектор по светорассеянию
ИЭР	ионизация распылением электронов (электрораспылением)
Et	этил
Прим.	пример
Непт	гептан
ЖХВД	жидкостная хроматография высокого давления
ВВ	условия высокого вакуума

ЖХ	жидкостная хроматография
мин	минута(ы)
сек	секунды
Me	метил
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
МС	масс-спектрометрия
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
орг.	органический
преп-ЖХВД	препаративная жидкостная хроматография высокого давления
кт	комнатная температура
насыщ.	насыщенный
ТБМЭ	<i>трет</i> -бутилметилловый эфир
ТФК	трифторуксусная кислота
ТГФ	тетрагидрофуран
ТСХ	тонкослойная хроматография
t <sub>R</sub>	время удерживания (жидкостная хроматография)
УФ	ультрафиолетовое излучение

Все температуры указаны в °С. Пока не будет указано иное, реакции протекают при кт.

Применяемые аналитические методы.

Исследования аналитической ТСХ осуществляли с использованием пластин 0,2 мм: компания Merck, силикагель 60 F<sub>254</sub>. Элюирование осуществляют с использованием ЭА, Hept, ДХМ, MeOH или их смесей. Детектирование проводили с использованием УФ или с использованием раствора KMnO<sub>4</sub> (10 г), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 г) и H<sub>2</sub>O (1 л) с последующим нагреванием.

Колоночную хроматографию (КХ) осуществляли с применением силикагеля Brunschwig 60A (0,032-0,63 мм), или применяя систему ISCO CombiFlash и предварительно укомплектованные SiO<sub>2</sub> картриджи, элюирование при этом проводят либо с использованием смесей Hept-ЭА, либо смесей ДХМ-MeOH с соответствующим градиентом.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, Bruker Avance 400 или 500 МГц, криогенный зонд Bruker Avance 500) применяли для того, чтобы охарактеризовать соединения. Химические сдвиги δ приведены в м.д. относительно применяемого растворителя; мультиплетность: s - синглет, d - дублет, t - триплет, q - квадруплет, p - пентуплет, hex - гексет, hept - гептет, m - мультиплет, br. - уширенный; константы взаимодействия J приведены в Гц.

ЖХ-МС применяли для того, чтобы альтернативно охарактеризовать соединения (Thermo Finnigan MSQPlus с использованием Agilent G4220A). Аналитические данные ЖХ-МС были получены посредством применения следующих соответствующих условий.

Данные МС1.

Колонка: Zorbax SB-Aq, 3,5 мкм, 4,6×50 мм; объем вводимой пробы: 1 мкл; температура термостата колонок: 40°C; Насос: Dionex HPG-3200RS; подпиточный насос: Dionex ISO-3100SD; ДМД: Dionex DAD-30000RS; МС: Thermo MSQ Plus; ELSD: Sedere Sedex 85; детектирование: УФ 210 нм, ELSD и МС; режим ионизации МС: ИЭР+; элюенты: А: H<sub>2</sub>O + 0,04 % ТФК; и Б: MeCN; линейная скорость потока: 4,5 мл/мин; градиент: 5% Б (0,00-0,01 мин), 5% Б - 95% Б (0,01-1,00 мин), 95% Б (1,00-1,45 мин).

Данные МС2.

Колонка: Zorbax RRHD SB-Aq, 3,0×50 мм, 1,8 мкм; объем вводимой пробы: 0,30 мкл; температура термостата колонок: 40°C; насос: насос для двухкомпонентных смесей Agilent G4220A; подпиточный насос: отсутствует; ДМД: Agilent G4212A; МС: Thermo MSQ Plus; ELSD: Sedere Sedex 90; детектирование: УФ 210 нм, ELSD и МС; режим ионизации МС: ИЭР+; элюенты: А: H<sub>2</sub>O + 0,04% ТФК; и Б: MeCN; линейная скорость потока элюента: 0,8 мл/мин; градиент: 5% Б - 95% Б (0,0-1,20 мин), 95% Б (1,20-1,90 мин).

Данные МС3.

колонка: Waters VEN C18, 3,0×50 мм, 2,5 мкм; элюенты: А: H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> (с(NH<sub>3</sub>) = 13 ммоль/л; и Б: MeCN; в остальном те же параметры, что и для получения данных МС1. Количество десятичных знаков после запятой, приведенных для соответствующего(их) пика(ов) [M+H<sup>+</sup>], а также время удерживания (t<sub>R</sub>) каждого исследуемого соединения зависит от точности фактически применяемого устройства ЖХ-МС.

Применяемые биологические методы.

Минимальные ингибирующие концентрации роста бактерий.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК; мг/л) определяли в бульоне Мюллера-Хинтона со стандартизованным содержанием катионов посредством метода микроразведения в соответствии с

описанием, приведенным в "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically", утвержденный стандарт, 7-е изд., Институт клинических и лабораторных стандартов/Clinical и Laboratory Standards Institute/(CLSI), документ M7-A7, Wayne, PA, USA (2006).

Генетико-токсикологическое исследование соединений, с тем чтобы оценить их способность вызывать повреждение ДНК, проводили во время исследования клеток млекопитающего (клетки CHO) *in vitro*. Образование микроядер, небольших окрашивающих ДНК частиц вне ядра, исследовали в одноядерных и двухъядерных клетках, которые обрабатывали возрастающими концентрациями исследуемого соединения на протяжении 24 ч. ДНК окрашивали Hoechst 33342 (Mutat Res. 630:1-13, 2007), считывали с помощью микроскопа с одновременным многопараметрическим анализом (Opera Phenix, компания Perkin Elmer) и оценивали с помощью оптимизированного алгоритма с использованием Harmony. Микроядра, связанные со здоровыми клетками, подсчитывали, и индукцию образования микроядер сводили в таблицу в виде пропорции по отношению к необработанным клеткам, если доля здоровых клеток составляла  $\geq 0,2$ .

Ингибирование цитохрома P450. Целью этого исследования *in vitro* была оценка потенциального ингибирования изоформ 3A4, 2C9 и 2D6 человеческого цитохрома P450 (CYP450), применяя микросомы печени человека и изоформ-специфические маркерные реакции. Эти данные (т.е. ИК50; полумаксимальная ингибирующая концентрация) позволяют оценить потенциал соединения в отношении межлекарственных взаимодействий с совместно вводимыми лекарственными средствами, которые метаболизируются посредством тех же изоформ цитохрома P450. Указанное может повлиять на концентрацию в плазме крови *in vivo*, и потенциально привести к побочным действиям лекарственного средства или к токсическому воздействию. В отношении применяемого метода специфический маркерный субстрат ферментов P450 инкубировали с микросомами печени человека в присутствии/отсутствии исследуемых соединений. Действие ингибирования исследуемого соединения в отношении маркерной реакции определяли во время инкубаций с содержанием 0-100 мкМ исследуемого соединения. Ингибирующее действие определяли посредством влияния различных концентраций соединения на образование метаболитов маркерной реакции. Образование метаболитов определяли посредством метода ЖХ-МС.

Устойчивость к инаktivации в процессе метаболизма. Субклеточные фракции печени и первичные гепатоциты разных видов применяли для определения собственного клиренса соединения у различных видов *in vitro*. Метод периода полувыведения в микросомах и гепатоцитах печени *in vitro* может быть подходящим методом для определения собственного клиренса *in vitro*, который можно масштабировать до ситуации *in vivo*, и применять для прогнозирования клиренса человека (Obach и др., 1997). Для осуществления указанного метода фракции печени инкубировали до 45 мин в субклеточных фракциях печени или 2 ч в первичных гепатоцитах с конечной концентрацией соединения, составляющей 1 мкМ. Исчезновение исходного соединения определяли посредством метода ЖХ-МС, и собственный клиренс определяли на основании падения исчезновения соединения соответственно.

Синтетическое получение.

Пример 1. (S)-1-{3-[(S)-2-Оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-б][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропиламино}-1,2-дигидропирроло[3,2,1-ij]хинолин-4-он.

Суспензию (S)-1-амино-1,2-дигидропирроло[3,2,1-ij]хинолин-4-она (3,00 г; полученного в соответствии с WO 2010/041194) и 3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-б][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропиональдегида (5,05 г; полученного в соответствии с WO 2010/041194) в ДХМ/MeOH (5-1, 50 мл) перемешивали при кт на протяжении 1 ч. Смесь охлаждали до 0°C, обрабатывали NaBH(OAc)<sub>3</sub> (5,05 г; доступный на рынке) и перемешивали при 0°C на протяжении 1 ч. Реакционную смесь гасили посредством добавления насыщ. раствора NH<sub>4</sub>Cl. Две фазы разделяли и водн. слой экстрагировали ДХМ/MeOH (9-1). Объединенные орг. слои сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворители удаляли в условиях пониженного давления и остаток очищали посредством КХ (ДХМ/MeOH 19:1 - 9:1), получая указанное в заголовке соединение (4,68 г; выход 63%). МС1 (ИЭР, m/z): 462,02 [M+H<sup>+</sup>]; t<sub>R</sub> = 0,54 мин. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11,21 (s, 1H), 7,92 (d, J = 9,4 Гц, 1H), 7,55-7,60 (m, 3H), 7,43 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 6,57 (d, J = 9,4 Гц, 1H), 4,71 (m, 2H), 4,61 (s, 2H), 4,39 (dd, J = 12,8, 8,4 Гц, 1H), 4,21 (m, 1H), 4,03 (dd, J = 12,8, 4,0 Гц, 1H), 3,71 (dd, J = 10,0, 7,1 Гц, 1H), 2,60-2,71 (m, 2H), 1,76-1,81 (m, 2H), 1,50-1,59 (m, 2H).

Пример 2. Сложный фосфоноксиметилловый эфир ((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло [3,2,1-ij]хинолин-1-ил)-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-б][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропил} карбаминовой кислоты.

2.1. Сложный хлорметилловый эфир ((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло [3,2,1-ij]хинолин-1-ил)-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-б][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропил} карбаминовой кислоты.

К суспензии соединения примера 1 (9 г) в ДХМ (80 мл) добавляли N,N,N',N'-тетраметил-1,8-нафталиндиамин (8,44 г; доступный на рынке) и хлорметилхлорформат (1,91 мл, полученный в соответствии с US 2004/0152911), и смесь перемешивали при кт на протяжении 90 мин. Добавляли 10%-ную лимонную кислоту, фазы разделяли и водн. слой экстрагировали ДХМ.

Объединенные орг. слои промывали водой и рассолом и сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворители удаляли

в условиях пониженного давления и остаток очищали посредством КХ (ДХМ/MeOH 19:1), получая указанное в заголовке соединение в виде бесцветного твердого вещества (10,09 г; выход 93%). МС1 (ИЭР, m/z): 553,95 [M+H<sup>+</sup>]; t<sub>R</sub> = 0,79 мин.

2.II. Сложный трет-бутиловый эфир 6-((S)-5-{3-[хлорметоксикарбонил-((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-1-ил)амино]пропил}-2-оксооксазолидин-3-ил)-3-оксо-2,3-дигидропиридо[3,2-b][1,4]оксазин-4-карбоновой кислоты.

Раствор промежуточного соединения 2.1 (4,55 г) в ДХМ (32 мл) обрабатывали Woc<sub>2</sub>O (1,88 г) и ДМАП (50 мг) и смесь перемешивали при кт на протяжении 90 мин. Раствор разбавляли ДХМ и добавляли воду, фазы разделяли и водн. слой экстрагировали ДХМ. Объединенные орг. слои промывали водой и рассолом и сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворители удаляли в условиях пониженного давления и остаток очищали посредством КХ (ДХМ/MeOH 1:0 - 9:1), получая указанное в заголовке соединение в виде бесцветного твердого вещества (4,1 г; выход 76%). МС2 (ИЭР, m/z): 653,91 [M+H<sup>+</sup>]; t<sub>R</sub> = 1,04 мин.

2.III. Сложный трет-бутиловый эфир 6-((S)-5-{3-[(ди-трет-бутоксифосфорил)оксиметоксикарбонил-((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-1-ил)амино]пропил}-2-оксо-оксазолидин-3-ил)-3-оксо-2,3-дигидропиридо[3,2-b][1,4]оксазин-4-карбоновой кислоты.

Раствор промежуточного соединения 2.II (5,0 г) в ДМЭ (76 мл) и ди-трет-бутилфосфат тетрабутиламмония (4,1 г; доступный на рынке) нагревали при 55°C на протяжении 2 ч. После охлаждения до кт, добавляли ЭА и воду и фазы разделяли. Водн. слой экстрагировали ЭА и объединенные орг. слои промывали водой, насыщ. NaHCO<sub>3</sub> и рассолом и сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворители удаляли в условиях пониженного давления и остаток очищали посредством КХ (ЭА/MeOH 1:0 - 9:1), получая указанное в заголовке соединение в виде бесцветного твердого вещества (4,7 г; выход 74%). МС2 (ИЭР, m/z): 828,42 [M+H<sup>+</sup>]; t<sub>R</sub> = 1,09 мин.

2.IV. Сложный фосфоноксиметилловый эфир ((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-1-ил)-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-b][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропил} карбаминовой кислоты:

Раствор промежуточного соединения 2.III (414 мг) в ДХМ (5 мл) охлаждали до 0°C и обрабатывали ТФК (0,77 мл). Смесь перемешивали при 0°C на протяжении 2 ч. Добавляли ТБМЭ (5 мл) и полученную суспензию перемешивали при 0 °C на протяжении 15 мин, фильтровали и сушили при ВВ. Полученное твердое вещество растворяли в MeCN/воде (1:1, 12 мл) и лиофилизировали, с тем, чтобы получить указанное в заголовке соединение в виде бесцветного лиофилизата (276 мг; выход 90%).

<sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 11,22 (s, 1H), 7,93 (d, J = 9,4 Гц, 1H), 7,66-7,40 (m, 4H), 7,20 (m, 1H), 6,60 (d, J = 9,4 Гц, 1H), 6,15-5,37 (m, 2H), 4,67-4,45 (m, 4H), 4,25-4,05 (m, 2H), 3,74-2,92 (m, 4H), 1,75-1,41 (m, 4H). МС3 (ИЭР, m/z): 615,92 [M+H<sup>+</sup>]; t<sub>R</sub> = 0,42 мин.

Пример 3. Сложный (((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-1-ил)-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-b][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропил} карбамоилокси)метилловый эфир 3-(2-фосфонокси-фенил)-пропионовой кислоты.

3.I. Сложный метилловый эфир 3-[2-(ди-трет-бутоксифосфорил)окси]фенил]пропионовой кислоты.

К раствору метил 3-(2-гидроксифенил)пропионата (7,5 г; доступный на рынке) в ТГФ (250 мл) при 0°C добавляли тетразол (0,45М в MeCN, 138 мл, доступный на рынке) и ди-трет-бутил N,N-диизопропилфосфорамидит (17,3 мл, доступный на рынке) и раствор перемешивали при кт на протяжении 2 ч. Добавляли дополнительный ди-трет-бутил N,N-диизопропилфосфорамидит (6,63 мл, доступный на рынке) и тетразол (0,45М в MeCN, 18,5 мл; доступный на рынке) и полученную смесь перемешивали при кт на протяжении 3,5 ч. Смесь охлаждали до 0°C и добавляли капля по капле 30%-ный водн. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (41 мл). Смесь перемешивали при 0°C на протяжении 0,75 ч. В смесь добавляли воду и водн. слой экстрагировали ЭА. Объединенные орг. слои промывали водой и рассолом и сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворители удаляли в условиях пониженного давления и остаток очищали посредством КХ (Hept/ЭА 99:1 - 0:1), получая указанное в заголовке соединение в виде желтой жидкости (9,05 г; выход 58%). МС1 (ИЭР, m/z): 372,96 [M+H<sup>+</sup>]; t<sub>R</sub> = 0,91 мин. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,53 (s, 18H), 2,67 (m, 2H), 3,03 (m, 2H), 3,69 (s, 3H), 7,08 (t, J = 7,5 Гц, 1H), 7,20 (m, 2H), 7,42 (d, J = 8,2 Гц, 1H).

3.II. 3-[2-(ди-трет-Бутоксифосфорил)окси]фенил]пропиононовая кислота.

К раствору промежуточного соединения 3.1 (9 г) в смеси ТГФ (100 мл), MeOH (100 мл) и воды (50 мл) добавляли моногидрат гидроксида лития (4,1 г; доступный на рынке) и смесь перемешивали при кт на протяжении 1,5 ч. Большую часть растворителя выпаривали и остаточный водн. слой экстрагировали ТБМЭ. Водн. слой подкисляли 10%-ной лимонной кислотой до достижения pH 3 и затем экстрагировали ЭА. Объединенные орг. слои промывали водой и рассолом и сушили над MgSO<sub>4</sub>. Растворители удаляли в условиях пониженного давления, получая указанное в заголовке соединение в виде нестабильного желтого твердого вещества (7,95 г; выход 92%), которое применяли непосредственно на следующей стадии. МС1 (ИЭР, m/z): 359,22 [M+H<sup>+</sup>]; t<sub>R</sub> = 0,81 мин. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,53 (s, 18H), 2,71 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 7,11 (t, J = 7,4 Гц, 1H), 7,22 (m, 2H), 7,35 (d, J = 8,2 Гц, 1H).

3.III. Сложный (((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-1-ил)-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-b][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропил} карбамоилокси)метилловый



эфир 3-[2-(ди-трет-бутоксифосфорилокси)фенил]пропионовой кислоты.

К раствору промежуточного соединения 2.1 (2,49 г) в ДМФ (27 мл) добавляли промежуточное соединения 3.П (1,77 г) и  $K_2CO_3$  (1,37 г) и полученную суспензию перемешивали при 40°C на протяжении 2 ч. После охлаждения до кт добавляли ЭА и насыщ.  $NaHCO_3$  и фазы разделяли. Водн. слой экстрагировали ЭА и объединенные органические слои промывали водой и рассолом и сушили над  $MgSO_4$ . Растворители удаляли в условиях пониженного давления и остаток очищали посредством КХ (ДХМ/MeOH 1:0 к 19:1), получая указанное в заголовке соединение в виде бесцветного твердого вещества (2,17 г; выход 55%). МС1 (ИЭР, m/z): 876,54  $[M+H^+]$ ;  $t_R = 0,94$  мин.

3.IV. Сложный (((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-1-ил)-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-b][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропил}карбамоилокси)метиловый эфир 3-(2-фосфонооксифенил)пропионовой кислоты.

К раствору промежуточного соединения 3.П (2,16 г) в ДХМ (25 мл) добавляли ТФК (2,83 мл) при 0°C и раствор перемешивали при 0°C на протяжении 3 ч. При 0°C добавляли ТБМЭ (25 мл) и полученную суспензию перемешивали при этой температуре на протяжении 10 мин и затем фильтровали. Затем полученное бесцветное твердое вещество суспендировали в воде (100 мл). В условиях энергичного перемешивания медленно добавляли насыщ.  $NaHCO_3$ , до тех пор, пока не растворится твердое вещество (рН 8). Водн. раствор экстрагировали ЭА для удаления органических побочных продуктов. Водн. слои охлаждали до 0°C и затем подкисляли 1М HCl до достижения рН 1. Полученную суспензию фильтровали и твердое вещество сушили при ВВ. Полученное твердое вещество растворяли в MeCN/воде (1:1, 60 мл) и лиофилизировали, с тем, чтобы получить указанное в заголовке соединение в виде бесцветного лиофилизата (1,58 г; выход 84%).

МС1 (ПЭР, m/z): 764,18  $[M+H^+]$ ;  $t_R = 0,67$  мин.  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 7,90 (d, J = 9,4 Гц, 1H), 7,59 (d, J = 8,7 Гц, 2H), 7,38 (m, 3H), 7,16-7,22 (m, 3H), 7,04 (t, J = 7,4 Гц, 1H), 6,95-6,20 (m, 3H), 5,79-5,50 (m, 3H), 4,55-4,63 (m, 4H), 4,21 (m, 2H), 3,68 (m, 1H), 3,45-3,20 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 2,60 (m, 2H), 1,67 (s, 2H), 1,40-1,30 (m, 2H).

Фармакологические свойства.

Соединение примера 1 в соответствии с настоящим изобретением (изобр.) и эталонные соединения 4 (эталон.) - 9 (эталон.) исследовали в отношении некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий. *Staphylococcus aureus* A798 является штаммом с множественной резистентностью (в частности, является резистентным к хинолону), *Klebsiella pneumoniae* A-651 является штаммом с множественной резистентностью (в частности, является резистентным к хинолону), в то время как *E. coli* ATCC25922 и *P. aeruginosa* ATCC27853 являются штаммами, чувствительными к хинолону. Соответствующие результаты антибактериального исследования приведены в табл. 1 ниже (МИК в мг/л).

Таблица 1

Пример №	Ссылочный Пример, как опубликовано	МИК для <i>S. aureus</i> A798	МИК для <i>E. coli</i> ATCC25922	МИК для <i>K. pneumoniae</i> A-651	МИК для <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
1(изобр.)	-----	0,031	0,25	0,5	1
4 (эталон.)	прим. 189, WO2010/041194	$\leq 0,031$	0,25	0,5	1
5 (эталон.)	прим. 74, WO2010/041194	0,031	0,25	0,5	2
6 (эталон.)	прим. 135, WO2010/041194	0,063	0,25	1	2
7 (эталон.)	прим. 86, WO2010/041194	0,063	0,5	2	2
8 (эталон.)	прим. 136, WO2010/041194	$\leq 0,031$	0,125	0,25	1
9 (эталон.)	прим. 33, WO2014/108832	0,063	1	2	8

Соединения примеров 2 и 3 настоящего изобретения (изобр.) исследовали в отношении дикого типа *E. coli* A-1261 в присутствии алкалинфосфатазы (из слизистой оболочки кишечника крупного рогатого скота: Sigma P6774-2KU; Сер: SLBB1168) или эстеразы (из печени свиньи: Sigma E2884-5KU; Сер: 129K7010V), а также в отсутствие алкалинфосфатазы и эстеразы. Соответствующие результаты антибактериального исследования приведены в табл. 2 ниже (МИК в мг/л).

Таблица 2

Пример №	Активный метаболит Пример №	МИК для <i>E. coli</i> A-1261		
		В отсутствие алкалинфосфатазы и эстеразы	В присутствии алкалинфосфатазы (2 МЕ/мл)	В присутствии эстеразы (10 МЕ/мл)
2 (изобр.)	1 (изобр.)	> 8	0,25	> 8
3 (изобр.)	1 (изобр.)	> 8	0,25	1

Оценивали генетико-токсикологический потенциал соединения примера 1 в соответствии с настоящим изобретением (изобр.) и эталонных соединений (эталон.) и соответствующие результаты исследования приведены в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Пример №	Ссылочный Пример, как опубликовано	Максимальная индукция образования микроядер, нормализованная относительно уровня техники
<b>1 (изобр.)</b>	-----	<b>2,5</b>
4 (эталон.)	прим. 189, WO2010/041194	7,0
5 (эталон.)	прим. 74, WO2010/041194	3,8
6 (эталон.)	прим. 135, WO2010/041194	3,1
7 (эталон.)	прим. 86, WO2010/041194	2,9
8 (эталон.)	прим. 136, WO2010/041194	4,1

Устойчивость к инактивации в процессе метаболизма соединений в соответствии с настоящим изобретением (изобр.) и эталонных соединений (эталон.) в микросомах печени человека и ингибирование изоформ 3A4, 2C9 и 2D6 человеческого цитохрома P450 (CYP450) приведены в табл. 4 ниже.

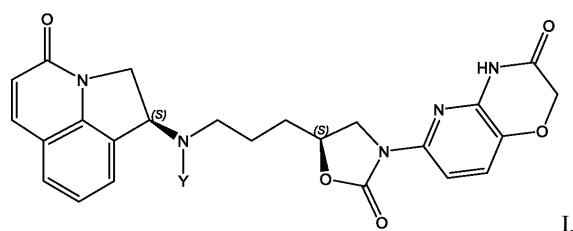
Таблица 4

Пример №	Ссылочный Пример, как Опубликовано	Самый низкий установленный ИК50 CYP450 изоферментов (мкМ)	Собственный клиренс в микросомах печени человека (мкл/мин*мг микросомального белка)
<b>1 (изобр.)</b>	-----	<b>&gt; 50</b>	<b>15</b>
4 (эталон.)	прим. 189, WO2010/041194	> 50	21
5 (эталон.)	прим. 74, WO2010/041194	23	35
6 (эталон.)	прим. 135, WO2010/041194	29	28
7 (эталон.)	прим. 86, WO2010/041194	28	38
8 (эталон.)	прим. 136, WO2010/041194	22	115

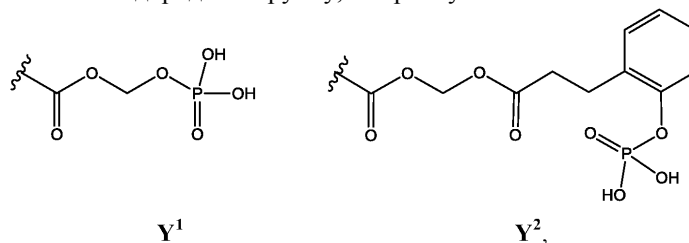
Неожиданно, соединение примера 1 в соответствии с настоящим изобретением не только показывает отличное противомикробное действие против некоторых бактериальных штаммов (табл. 1), оно также проявляет превосходные фармакологические свойства (табл. 3 и 4). Соединения в соответствии с примерами 2 и 3 проявляют противомикробное действие в биологически релевантной среде посредством образования соединения примера 1 (табл. 2).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### 1. Соединение формулы I



где Y представляет собой водород или группу, выбранную из Y<sup>1</sup> и Y<sup>2</sup>



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, которое представляет собой (S)-1-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-б][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропиламино}-1,2-дигидропирроло[3,2,1-ij]хинолин-4-он или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Соединение по п.1, которое представляет собой сложный фосфоноксиметилловый эфир ((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-1-ил)-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-б][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропил}карбаминовой кислоты или его фармацевтически приемлемую соль.

4. Соединение по п.1, которое представляет собой сложный (((S)-4-оксо-1,2-дигидро-4Н-пирроло[3,2,1-ij]хинолин-1-ил)-{3-[(S)-2-оксо-3-(3-оксо-3,4-дигидро-2Н-пиридо[3,2-б][1,4]оксазин-6-ил)оксазолидин-5-ил]пропил}карбамоилокси)метилловый эфир 3-(2-фосфоноксифенил)пропионовой кислоты или его фармацевтически приемлемую соль.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно из соединений по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемую соль, которая дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель.

6. Применение соединения по любому из пп.1-4 или композиции по п.5 в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения бактериальной инфекции.

7. Применение соединения по любому из пп.1-4 или композиции по п.5 для профилактики или лечения бактериальной инфекции.

8. Применение соединения формулы I по любому из пп.1-4 или композиции по п.5 для профилактики или лечения бактериальной инфекции, вызываемой грамотрицательными бактериями.

9. Применение соединения формулы I по любому из пп.1-4 или композиции по п.5 для профилактики или лечения бактериальной инфекции, вызываемой бактериями, выбранными из группы, содержащей *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*.

