

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044846**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.05

(21) Номер заявки
202091255

(22) Дата подачи заявки
2018.12.07

(51) Int. Cl. *A61K 31/42* (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
C07D 247/02 (2006.01)
C07D 261/02 (2006.01)
C07D 261/06 (2006.01)

(54) **СОЕДИНЕНИЕ 3-(3-(4-((6-ФТОРПИРИДИН-2-ИЛ)ОКСИ)БЕНЗИЛ)ИЗОКСАЗОЛ-5-ИЛ)ПИРИДИН-2-АМИН, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

(31) **62/595,894; 62/649,225**

(32) **2017.12.07; 2018.03.28**

(33) **US**

(43) **2020.10.28**

(86) **PCT/US2018/064609**

(87) **WO 2019/113542 2019.06.13**

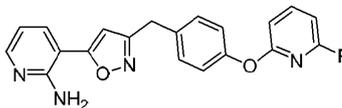
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АМПЛИКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Трзосс Майкл, Ковел Джонатан, Шоу
Карен Джой, Вебб Питер (US)**

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

(56) **US-A1-20060247237
US-A1-20100004235
US-A1-20100168173**

(57) Изобретение относится к соединению нижеуказанной формулы или его фармацевтически приемлемой соли, а также к фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль. Указанные соединение, его фармацевтически приемлемая соль и указанная фармацевтическая композиция применимы для лечения микоза. Изобретение также относится к способу лечения микоза у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества указанного соединения, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль.



044846
B1

044846
B1

Ссылка на родственные заявки

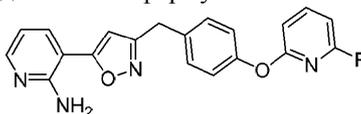
Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии предварительной заявкой на патент США № 62/595894, поданной 7 декабря 2017 г., и предварительной заявкой на патент США № 62/649225, поданной 28 марта 2018 г.; раскрытие каждой из предварительных заявок рассматривается как часть и включено при помощи ссылки в раскрытие настоящей заявки.

Предпосылки создания изобретения

В настоящей области техники существует необходимость в эффективном лечении микоза.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлено соединение 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин формулы



или его фармацевтически приемлемая соль и фармацевтическая композиция, содержащая указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль.

Фармацевтическая композиция содержит указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Заявленное соединение или его фармацевтически приемлемая соль и композиция применимы для лечения микоза.

В одном из вариантов осуществления изобретения микоз выбран из группы, состоящей из аспергиллеза, бластомикоза, кандидоза, кокцидиоидомикоза (калифорнийской лихорадки), криптококкоза, грибковой инфекции глаз, гистоплазмоза, мукоморикоза, пневмоцистной пневмонии (PCP), стригущего лишая, споротрихоза и таларомикоза.

В одном из вариантов осуществления изобретения микоз вызван видами грибов, выбранными из группы, состоящей из *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida rugosa*, *Candida auris*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Histoplasma capsulatum*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor indicus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia species*, *Saksenaia species*, *Rhizomucor pusillus*, *Entomophthora species*, *Conidiobolus species*, *Basidiobolus species*, *Sporothrix schenckii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Talaromyces marneffeii*, *Asclepias albicans*, *Fusarium solani*, *Scedosporium apiospermum* и *Rhizomucor pusillus*.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанное соединение, или его фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическую композицию, содержащую указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль, применяют для лечения микоза, вызванного *Cryptococcus neoformans* или *Cryptococcus gattii*.

Изобретение также относится к способу лечения микоза у нуждающегося в этом субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества указанного соединения, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана эффективность соединения настоящего изобретения (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (пример 2) относительно соединения водород(2-(2-амино-3-(3-(4-((пиридин-2-илокси)метил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)этил)фосфоната (соединение 1) и (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (пример 3) согласно настоящему раскрытию в модели криптококкового менингита на мышцах при введении дозы в присутствии пан-ингибитора CYP 1-аминобензотриазола (АВТ).

На фиг. 2 показано исследование зависимости эффективности от дозы с помощью (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (пример 2) и (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (пример 3).

На фиг. 3 показана эффективность (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (пример 2) и амфотерицина В (АМВ) в модели отсроченного лечения криптококкового менингита.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Уровень заболеваемости грибковыми инфекциями увеличился за последние несколько десятилетий. Такие инфекции возросли в последние несколько десятилетий отчасти из-за увеличения числа субъектов с ослабленным иммунитетом. Субъекты с ослабленным иммунитетом включают в себя, например, пожилых субъектов, субъектов с ВИЧ/СПИД или субъектов, проходящих курс химиотерапии или иммуносупрессивную терапию после трансплантации.

В современных противогрибковых видах лечения используют различия между клетками млекопитающих и грибковыми клетками для уничтожения грибов. Тем не менее, поскольку грибы и млекопитающие являются эукариотами, многие противогрибковые виды лечения вызывают побочные эффекты у

млекопитающих-хозяев. Кроме того, многие грибковые организмы приобрели устойчивость к противогрибковым видам лечения первой линии. Таким образом, существует потребность в новых композициях и способах лечения микозов.

Определения.

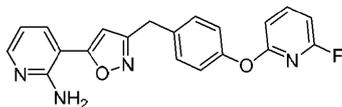
Используемые в настоящем описании и в приложенной формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если в контексте четко не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "средство" включает в себя множество таких средств и ссылка на "клетку" включает в себя ссылку на одну или несколько клеток (или на множество клеток) и их эквиваленты, известные специалистам в настоящей области техники и т.д. Если диапазоны использовали в настоящем описании для физических свойств, таких как молекулярная масса, или химических свойств, таких как химические формулы, предусмотрено, что включены все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Термин "приблизительно", если относится к числу или области числовых значений, означает, что число или область числовых значений упоминается как приближенное выражение в пределах колебаний показаний эксперимента (или в пределах статистической ошибки экспериментов) и, таким образом, число или область числовых значений в некоторых случаях будет варьировать от 1 до 15% указанного числа или области числовых значений. Не предусмотрено, что термин "содержащий" (и связанные термины, такие как "содержать", или "содержит", или "обладающий", или "включая в себя") исключает то, что в других определенных вариантах осуществления, например варианте осуществления любой композиции вещества, композиции, способа или процесса или т.п., описанных в настоящем изобретении, "состоит из" или "в основном состоит из" описанных признаков.

Как использовали в описании и приложенной формуле изобретении, если конкретно не указано иное, следующие термины обладали значением, указанным ниже. Термины "ингибировать", "блокировать", "подавлять" и их грамматические варианты используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому статистически значимому снижению биологической активности, включая в себя полное блокирование активности. Согласно некоторым вариантам осуществления "ингибирование" относится к уменьшению на 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или приблизительно 100% в отношении биологической активности.

Используемые в настоящем документе термины "лечение", или "осуществление лечения", или "временное облегчение", или "уменьшение интенсивности" используют взаимозаменяемо. Эти термины относятся к подходу для получения благоприятных или требуемых результатов, включая в себя без ограничения терапевтический эффект и/или профилактический эффект. Под "терапевтическим эффектом" понимают устранение или уменьшение интенсивности основного заболевания, подлежащего лечению. Кроме того, терапевтический эффект достигается за счет устранения или уменьшения интенсивности одного или нескольких физиологических симптомов, связанных с основным нарушением, так что у пациента наблюдается улучшение, несмотря на то что пациент все еще страдает основным нарушением. Для профилактического эффекта композиции согласно некоторым вариантам осуществления вводят пациенту с риском развития конкретного заболевания или пациенту, сообщающему об одном или нескольких физиологических симптомах заболевания, даже если диагноз этого заболевания не был установлен.

Соединение.

В настоящем изобретении описано соединение 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин формулы



Данное соединение или его фармацевтически приемлемая соль и композиция, содержащая это соединение, применимы для лечения микоза у людей и животных.

Пролекарства.

Под "пролекарством" подразумевается обозначение соединения, которое согласно некоторым вариантам осуществления превращено при физиологических условиях или методом сольволиза в описанное в настоящем изобретении биологически активное соединение. Таким образом, термин "пролекарство" относится к прекурзору биологически активного соединения, которое является фармацевтически приемлемым. Пролекарство является типично неактивным при введении субъекту, но превращается *in vivo* в активное соединение, например, гидролизом. Пролекарственное соединение часто предлагает преимущества в растворимости, тканевой совместимости или длительное высвобождение в организме млекопитающего (см., например, Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985), p. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam). Пролекарства доставляли при помощи любого из известных способов, описанных в настоящем изобретении, включая в себя без ограничения пероральный, внутривенный, внутривнутрибрюшинный или другой способ введения, известный специалистам настоящей области техники.

Обсуждение пролекарств представлено в Higuchi, T. et al., "Pro-drugs as Novel Delivery Systems",

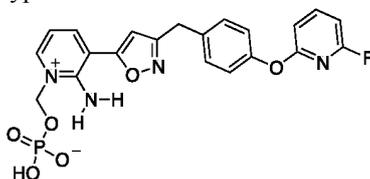
A.C.S. Symposium Series, vol. 14; и в *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. Под термином "пролекарство" также подразумевается включение любых ковалентно связанных носителей, которые высвобождают активное соединение *in vivo*, если такое пролекарство вводили субъекту-млекопитающему. Пролекарства активного соединения, как описано в настоящем изобретении, получали путем модификации функциональных групп, присутствующих в активном соединении, таким образом, что модификации расщеплялись или рутинной манипуляцией, или *in vivo* до исходного активного соединения. Пролекарства включают в себя соединения, в которых гидроксильная, амино или меркапто группа связана с любой группой, которая, если пролекарство активного соединения вводили субъекту-млекопитающему, отщепляется с образованием свободной гидроксильной, свободной амино или свободной меркапто группы соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарства включают в себя любую группу, связанную с гетероатомом, таким как азот пиридина, который отщепляется *in vivo* с образованием активного соединения или его метаболита. Примеры пролекарств включают в себя без ограничения ацетат, формиат фосфат и бензоатные производные спиртовых или аминовых функциональных групп в активных соединениях и т.п.

Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарством является соль. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарством является фосфатная соль. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарством является алкилфосфатная соль. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарством является алкилированная гетероароматическая соль. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарством является соль пиридиния. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарством является алкилфосфатная соль пиридиния. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарством является метилфосфатная соль пиридиния. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарство содержит алкилфосфат, связанный с гетероатомом. Согласно некоторым вариантам осуществления пролекарство содержит алкилфосфат, связанный с гетероатомом гетероцикла.

Фармацевтически приемлемые соли.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем изобретении соединение существует в виде их фармацевтически приемлемых солей. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем изобретении способы включают в себя способы лечения заболеваний путем введения таких фармацевтически приемлемых солей. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем изобретении способы включают в себя способы лечения заболеваний путем введения таких фармацевтически приемлемых солей в виде фармацевтических композиций. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем изобретении соединение содержит кислотные или основные группы и, таким образом, реагируют с любым количеством неорганических или органических оснований и неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления такие соли получали *in situ* в течение конечного выделения и очистки раскрытого в настоящем изобретении соединения или отдельным осуществлением взаимодействия очищенного соединения в его свободной форме с подходящей кислотой или основанием и выделением образованной таким образом соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают в себя такие соли, полученные путем осуществления взаимодействия описанного в настоящем изобретении соединения с неорганической, органической кислотой или неорганическим основанием, такие соли включали в себя ацетат, акрилат, адипат, альгинат, аспертат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бисульфит, бромид, бутират, бутин-1,4-диоат, камфорат, камфорсульфонат, капроат, каприлат, хлорбензоат, хлорид, цитрат, циклопентанпропионат, деканоат, диглюконат, дигидрофосфат, динитробензоат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептаноат, глицерофосфат, гликолят, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гексин-1,6-диоат, гидроксibenзоат, *у*-гидроксibuтират, гидрoхлорид, гидрoбромид, гидрoйодид, 2-гидроксietансульфонат, йодид, изобутират, лактат, малеат, малонат, метансульфонат, манделат метафосфат, метансульфонат, метоксибензоат, метилбензоат, моногидрофосфат, 1-нафталинсульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, пальмоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, пиросульфат, пирофосфат, пропиолят, фталат, фенилацетат, фенилбутират, пропансульфонат, салицилат, сукцинат, сульфат, сульфит, сукцинат, суберат, себацат, сульфонат, тартрат, тиоцианат, тозилатунлеконат и ксилолсульфонат. Кроме того, описанное в настоящем изобретении соединение может быть получено в виде фармацевтически приемлемых солей, образованных путем осуществления взаимодействия свободной основной формы соединения с фармацевтически приемлемой неорганической или органической кислотой, включая в себя без ограничения неорганические кислоты, такие как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, метафосфорная кислота и т.п.; и органические кислоты, такие как уксусная кислота, пропионовая кислота, гексановая кислота, циклопентанпропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, молочная кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, пара-толуолсульфоновая кислота, виннокаменная кислота, трифторуксусная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, 3-(4-гидроксibenзоил)бензойная кислота, коричная кислота, миндальная кислота, арилсульфоновая кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 1,2-этандисульфоновая кислота, 2-гидроксietансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, 2-нафталинсульфоновая кислота, 4-метилбцикло-[2.2.2]окт-2-ен-1-карбоновая кислота,

глюкогептоновая кислота, 4,4'-метиленис-(3-гидрокси-2-ен-1-карбоновая кислота), 3-фенилпропионовая кислота, триметилуксусная кислота, третичная бутилуксусная кислота, лаурилсерная кислота, глюконовая кислота, глутаминовая кислота, гидроксинафтойная кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота и муконовая кислота. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение представляет собой (2-амино-3-(3-(4-((фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)-пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат и характеризуется следующей структурой



Фармацевтические композиции.

Согласно определенным вариантам осуществления соединение, описанное в настоящем изобретении, вводили в виде чистого химического вещества. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение настоящего изобретения объединяли с фармацевтически подходящим или приемлемым носителем (также упоминаемым в настоящем описании как фармацевтически подходящее (или приемлемое) вспомогательное вещество, физиологически подходящее (или приемлемое) вспомогательное вещество или физиологически подходящий (или приемлемый) носитель), выбранным на основе выбранного пути введения и стандартной фармацевтической практики, как описано, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 21st ed., Mack Pub. Co., Easton, PA (2005)).

Соответствующим образом в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемую соль, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. Носитель(и) (или вспомогательное(ые) вещество(а)) являет(ют)ся приемлемым(и) или подходящим(и), если носитель совместим с другими ингредиентами композиции и не является вредным для реципиента (т.е. субъекта) композиции.

Один вариант осуществления относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и соединение настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно определенным вариантам осуществления соединение, представленное в настоящем изобретении, является в основном чистым, поскольку оно содержит менее чем приблизительно 5% или менее чем приблизительно 1% или менее чем приблизительно 0,1% других органических малых молекул, таких как непрореагировавшие промежуточные соединения, или побочных продуктов синтеза, которые были образованы, например, одной или несколькими стадиями способа синтеза.

Фармацевтические композиции вводили способом, который подходит заболеванию, которое лечили (или предупреждали). Соответствующая доза, подходящая длительность и частота введения будет определена такими факторами, как состояние пациента, тип и тяжесть заболевания пациента, конкретная форма активного ингредиента и способ введения. В общем подходящая доза и режим лечения обеспечивают композицию(и) в количестве, достаточном для обеспечения терапевтической и/или профилактической пользы (например, улучшенный исход болезни, такой как более частые полные или частичные ремиссии или более длительная без заболевания и/или общая выживаемость или уменьшение тяжести симптомов. Оптимальные дозы обычно определяли с применением экспериментальных моделей и/или клинических исследований. Оптимальная доза зависит от массы тела, веса, пола, возраста, состояния почек, состояния печени или объема крови пациента.

Пероральные дозировки типично находятся в диапазоне от приблизительно 1,0 мг до приблизительно 1000 мг от одного до четырех раз или более в сутки или от одного до четырех раз в неделю.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение, предусмотренное настоящим раскрытием, может быть введено (например, перорально) с уровнями дозировки от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 1000 мг/кг или от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг от массы тела субъекта в сутки, один, два, три, четыре или более раз в сутки с получением требуемого терапевтического эффекта. Для введения перорального средства композиции могут быть обеспечены в форме таблеток, капсул и т.п., содержащих от 0,05 до 1000 мг активного ингредиента, в частности 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 125,0, 150,0, 175,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 и 1000,0 мг активного ингредиента. Фармацевтически приемлемый(ые) носитель(и), разбавитель(и) и/или вспомогательное(ые) средство(а) может(могут) присутствовать в количестве от приблизительно 0,1 г до приблизительно 2,0 г.

Способы лечения.

Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем документе раскрыты способы лечения микоза у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения с частотой и продолжительностью, достаточными для обеспечения благоприятного действия для субъекта.

Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем документе раскрыты способы лечения микоза у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение настоящего изобретения и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, с частотой и продолжительностью, достаточными для обеспечения благоприятного действия для субъекта.

Микозы.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз выбран из группы, состоящей из следующего: аспергиллез, бластомикоз, кандидоз, кокцидиоидомикоз (калифорнийская лихорадка), криптококкоз, грибковая инфекция глаз, гистоплазмоз, муколомикоз, пневмоцистная пневмония (PCP), стригущий лишай, споротрихоз и таларомикоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой аспергиллез. Согласно некоторым вариантам осуществления аспергиллез представляет собой аллергический бронхолегочный аспергиллез (абра), аллергический аспергиллезный синусит, хронический легочный аспергиллез, инвазивный аспергиллез или кожный аспергиллез (кожи). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется наличием аспергилломы.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой бластомикоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой кандидоз. Согласно некоторым вариантам осуществления кандидоз представляет собой следующее: орофарингеальный кандидоз (молочница), вульвовагинальный кандидоз (вагинальный кандидоз), фунгемия или инвазивный кандидоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой кокцидиоидомикоз (калифорнийская лихорадка). Согласно некоторым вариантам осуществления кокцидиоидомикоз представляет собой острый кокцидиоидомикоз (первичный легочный кокцидиоидомикоз), хронический кокцидиоидомикоз или диссеминированный кокцидиоидомикоз, включая в себя первичный кожный кокцидиоидомикоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой криптококкоз. Согласно некоторым вариантам осуществления криптококкоз представляет собой раневой или кожный криптококкоз, легочный криптококкоз или криптококковый менингит.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой грибковую инфекцию глаз. Согласно некоторым вариантам осуществления грибковая инфекция глаз представляет собой грибковый кератит, грибковый экзогенный эндофтальмит или грибковый эндогенный эндофтальмит.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой гистоплазмоз. Согласно некоторым вариантам осуществления гистоплазмоз представляет собой острый гистоплазмоз. Согласно некоторым вариантам осуществления гистоплазмоз представляет собой хронический гистоплазмоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой муколомикоз. Согласно некоторым вариантам осуществления муколомикоз представляет собой риноцеребральный муколомикоз (синусов и головного мозга), легочный муколомикоз (легких), желудочно-кишечный муколомикоз, кожный муколомикоз (кожи) или диссеминированный муколомикоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой пневмоцистную пневмонию (PCP).

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой стригущий лишай. Согласно некоторым вариантам осуществления стригущий лишай представляет собой следующее: дерматофития стоп, паховая дерматофития, дерматофития волосистой части головы, дерматофития бороды и усов, дерматофития кистей, дерматофитный онихомикоз или дерматофития гладкой кожи туловища. Согласно некоторым вариантам осуществления стригущий лишай вызван типом грибов, включая в себя *Trichophyton*, *Microsporum* или *Epidermophyton*.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой споротрихоз. Согласно некоторым вариантам осуществления споротрихоз представляет собой кожный споротрихоз (кожи), легочный споротрихоз (легких) или диссеминированный споротрихоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз представляет собой таларомикоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления микоз вызван видами грибов, включая в себя без ограничения следующие: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida auris*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Histoplasma capsulatum*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor indicus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia species*, *Saksenaia species*, *Rhizomucor pusillus*, *Entomophthora species*, *Conidiobolus species*, *Basidiobolus species*, *Sporothrix schenckii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Talaromyces marneffeii*, *Asclepias albicans*, *Fusarium solani*, *Scedosporium apiospermum* и *Rhizomucor pusillus*. Согласно некоторым вариантам осуществления микоз вызван видом грибов *Aspergillus fumigatus*. Согласно некоторым вариантам осуществления микоз вызван видом грибов *Candida albicans*. Согласно некоторым вариантам осуществления микоз вызван видом грибов *Fusarium solani*. Согласно некоторым вариантам осуществления микоз вызван видом грибов *Mucor indicus*. Согласно некоторым

вариантам осуществления микоз вызван видом грибов *Scedosporium apiospermum*. Согласно некоторым вариантам осуществления микоз вызван видом грибов *Cryptococcus neoformans*. Согласно некоторым вариантам осуществления микоз вызван видом грибов *Cryptococcus gattii*. Согласно некоторым вариантам осуществления микоз вызван видом грибов *Candida auris*.

Согласно предусмотренному в настоящем документе аспекту раскрыт способ лечения микоза у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения. Согласно предусмотренному в настоящем документе аспекту раскрыт способ лечения микоза у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение настоящего изобретения и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, микоз выбран из группы, состоящей из следующего: аспергиллез, бластомикоз, кандидоз, кокцидиоидомикоз (калифорнийская лихорадка), криптококкоз, грибковая инфекция глаз, гистоплазмоз, мукомормикоз, пневмоцистная пневмония (PCP), стригущий лишай, споротрихоз и таларомикоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, микоз вызван видом грибов, выбранным из группы, состоящей из следующего: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida rugosa*, *Candida auris*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Histoplasma capsulatum*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor indicus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia species*, *Saksenaea species*, *Rhizomucor pusillus*, *Entomophthora species*, *Conidiobolus species*, *Basidiobolus species*, *Sporothrix schenckii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Talaromyces marneffeii*, *Asclepias albicans*, *Fusarium solani*, *Scedosporium apiospermum* и *Rhizomucor pusillus*.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, субъект характеризуется ослабленным иммунитетом.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, субъект получил химиотерапевтическое лечение.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, субъект инфицирован ВИЧ/СПИД.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, микоз вызван *Cryptococcus neoformans* или *Cryptococcus gattii*. Согласно некоторым вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение является активным в отношении грибкового белка Gwt1. Этот консервативный фермент катализирует посттрансляционную модификацию гликозилфосфатидилинозитола (GPI), который прикрепляет белки клеточной поверхности эукариот к клеточной мембране. У дрожжей GPI опосредует сшивание маннопротеинов клеточной стенки с β -1,6-глюканом. Было показано, что ингибирование этого фермента как у *Candida albicans*, так и у *Saccharomyces cerevisiae* приводит к ингибированию созревания и локализации GPI-закоренных маннопротеинов, таким образом демонстрируя плейотропные эффекты, которые включают в себя ингибирование грибковой адгезии к поверхностям, ингибирование образования биопленки, ингибирование образования зародышевых трубок, серьезные дефекты роста или летальность.

Субъекты.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется ослабленным иммунитетом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой субъекта-человека с ослабленным иммунитетом. Согласно некоторым вариантам осуществления возраст субъекта-человека до 1 года. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект-человек представляет собой ребенка в возрасте до 1 месяца. Согласно некоторым вариантам осуществления возраст субъекта-человека старше 70 лет. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект инфицирован ВИЧ/СПИД. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергается или подвергся противораковому химиотерапевтическому лечению. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергается или подвергся лечению кортикостероидами. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергается или подвергся лечению ингибитором TNF. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой реципиента трансплантата. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой реципиента трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, трансплантата костного мозга, трансплантата легкого, трансплантата печени, трансплантата сердца, трансплантата почки, трансплантата поджелудочной железы или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой реципиента трансплантата гемопоэтических стволовых клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой реципиента трансплантата костного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой реципиента трансплантата легкого. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой реципиента трансплантата печени. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой реципиента трансплантата сердца. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой реципиента трансплантата почки. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект пред-

ставляет собой реципиента трансплантата поджелудочной железы.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой позвоночное животное. Согласно некоторым вариантам осуществления позвоночное животное представляет собой рыбу, амфибию, рептилию, птицу, сумчатое животное или млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой рыбу. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее представляет собой собаку. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее представляет собой кошку. Согласно некоторым вариантам осуществления млекопитающее представляет собой сельскохозяйственное животное. Согласно некоторым вариантам осуществления сельскохозяйственное животное выбрано из группы, состоящей из крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, домашней птицы, коров и лошадей. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой беспозвоночное животное. Согласно некоторым вариантам осуществления беспозвоночное животное представляет собой насекомое. Согласно некоторым вариантам осуществления беспозвоночное животное представляет собой растение. Следует понимать, что схема введения доз для лечения, профилактики или улучшения состояния(й), для которого требуется облегчение, изменяется в соответствии с различными факторами (например, заболевание, нарушение или состояние, от которого страдает субъект; возраст, масса тела, пол, диета и состояние здоровья субъекта). Таким образом, в некоторых случаях фактически используемая схема введения доз варьируется и согласно некоторым вариантам осуществления отклоняется от схем введения доз, изложенных в настоящем документе.

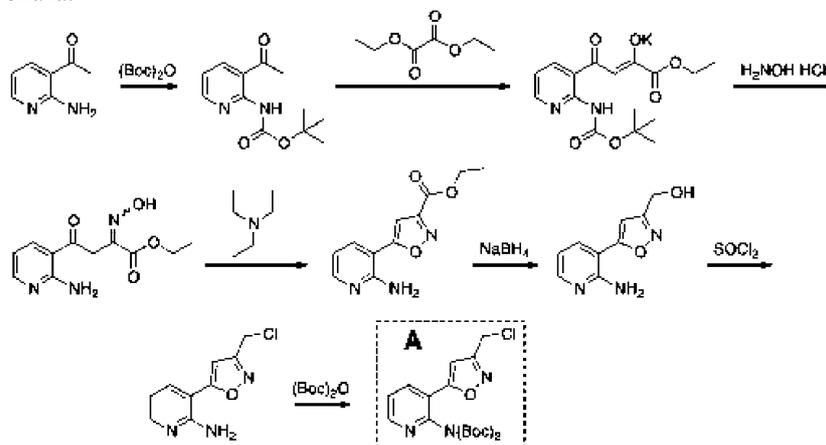
Соединение настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемую соль вводят до, во время или после возникновения заболевания или состояния, и сроки введения композиции, содержащей соединение, варьируются. Таким образом, согласно одному варианту осуществления соединение, описанное в настоящем документе, используют в качестве профилактического средства и вводят непрерывно субъектам, склонным к развитию состояний или заболеваний, чтобы предотвратить возникновение заболевания или состояния. Согласно другому варианту осуществления соединение и композиции вводят субъекту во время или как можно скорее после появления симптомов. Согласно конкретным вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение вводят, как только это становится практически возможным после того, как начало заболевания или состояния обнаружено или заподозрено, и в течение периода времени, необходимого для лечения заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления продолжительность, необходимая для лечения, варьируется, и продолжительность лечения регулируют в соответствии с конкретными потребностями каждого субъекта. Например, согласно конкретным вариантам осуществления описанное в настоящем документе соединение или состав, содержащий соединение, вводят в течение по меньшей мере 2 недель, от приблизительно 1 месяца до приблизительно 5 лет.

Примеры

Пример I. Химический синтез.

Если не указано иное, то реагенты и растворители использовали в полученном виде от коммерческих поставщиков. Для синтетических преобразований, чувствительных к влаге и/или кислороду, использовали безводные растворители и высушенную в печи стеклянную лабораторную посуду. Выходы не подвергались оптимизации. Значения времени реакции являются приблизительными и не подвергались оптимизации. Если не указано иное, то колоночную хроматографию и тонкослойную хроматографию (TLC) проводили на силикагеле.

Промежуточное соединение A: синтез ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидокарбоната.



Стадия 1: трет-бутил-(3-ацетилпиридин-2-ил)карбамат.

1-(2-Аминопиридин-3-ил)этан-1-он (5 г, 37 ммоль) растворяли в трет-бутиловом спирте (20 мл), а

затем добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (12 г). Смесь нагревали до 90°C в течение 3 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали в условиях пониженного давления с получением темно-рыжевато-го твердого вещества. Неочищенное вещество промывали смесью гептана и гексана, а затем фильтровали. Твердое вещество измельчали вручную и снова промывали гептаном и гексаном. Твердое вещество сушили на воздухе, а затем тщательно сушили в условиях вакуума с получением указанного в заголовке соединения в виде рыжевато-го твердого вещества (7,8 г, 90%). Полученное вещество использовали далее без дополнительной очистки.

Стадия 2: этил-5-(2-аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-карбоксилат.

К раствору трет-бутил-(3-ацетилпиридин-2-ил)карбамата (7,7 г, 33 ммоль) и диэтилоксалата (8,9 мл, 65 ммоль) в толуоле (65 мл) при комнатной температуре порциями добавляли трет-бутоксид калия (7,3 г, 65 ммоль). Темно-пурпурную гетерогенную смесь перемешивали в атмосфере азота, и начинал формироваться плотный осадок. Дополнительно добавляли 65 мл толуола и перемешивали смесь дополнительно в течение 2 ч, после чего добавляли дополнительно 3,7 г трет-бутоксид калия. После перемешивания дополнительно в течение 1 ч добавляли этанол (130 мл), а затем гидроксиламина гидрохлорид (6,8 г, 98 ммоль). Полученную желтовато-красную смесь перемешивали в течение 2 ч, а затем добавляли воду (13 мл). Раствор на некоторое время становился до некоторой степени прозрачным, а затем приобретал густой карамельный цвет. Смесь перемешивали в течение 16 ч, и она постепенно приобретала желтоватое окрашивание. Дополнительно добавляли 400 мл воды и 500 мл этилацетата. Слои разделяли. Органическую фазу промывали водой (2×150 мл). Объединенную водную фазу экстрагировали этилацетатом (2×250 мл). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и упаривали в условиях пониженного давления с получением оранжевого твердого вещества. К твердому продукту добавляли DMF (65 мл) и триэтиламин (4,5 мл, 33 ммоль). Раствор перемешивали при 80°C в течение 6 ч, а затем оставляли постепенно достигать комнатной температуры в течение ночи. Добавляли воду (300 мл), раствор экстрагировали этилацетатом, а затем упаривали с получением оранжевого маслянистого твердого вещества. Неочищенное вещество обрабатывали теплой смесью гексан/ацетон (15:1), что приводило к получению темно-оранжевого раствора поверх твердого вещества. Твердое вещество собирали путем фильтрования через стеклокерамическую воронку и промывали большими объемами гексана. Тем самым получали указанное в заголовке соединения в виде легкосыпучего рыжевато-бледно-оранжевого твердого вещества (4 г, 53%), которое использовали далее без дополнительной очистки.

Стадия 3: (5-(2-Аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метанол.

К суспензии этил-5-(2-аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-карбоксилата (0,50 г, 2,1 ммоль) в смеси ТНФ/этанол (1:1, 10 мл) при 0°C порциями добавляли боргидрид натрия (0,24 г, 6,4 ммоль). Охлаждающую баню удаляли и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 19 ч с эпизодическим мониторингом методом TLC. К смеси дополнительно добавляли 0,5 эквивалента боргидрида натрия (0,040 г, 1,0 ммоль). После краткого перемешивания смесь гасили путем выливания на лед, а затем медленно осторожно добавляли 5 н. водный раствор HCl (2 мл) - бурная реакция. Кислый раствор (рН 3) перемешивали в течение 10 мин, а затем подщелачивали до рН 9 добавлением 5 н. водного раствора NaOH. Щелочную смесь трижды экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и упаривали в условиях пониженного давления с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (0,32 г, 77%). Полученное вещество использовали далее без дополнительной очистки.

Стадия 4: 3-(3-(хлорметил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин.

К смеси (5-(2-аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метанола (0,31 г, 1,6 ммоль) в N,N-диметилацетамиде (1,6 мл) при 0°C добавляли холодную смесь тионилхлорида (0,24 мл, 3,3 ммоль) и бензотриазола (0,43 г, 3,6 ммоль) в тетрагидрофуране. Охлаждающую баню удаляли и перемешивали смесь при комнатной температуре. Спустя 30 мин методом TLC обнаруживали завершение реакции. Смесь гасили путем выливания на лед, а затем подщелачивали до рН 8 добавлением 5 н. водного раствора NaOH. Затем смесь трижды экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и упаривали в условиях пониженного давления с получением указанного в заголовке соединения в виде масла, которое использовали далее без дополнительной очистки.

Стадия 5: ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидодикарбонат.

К раствору 3-(3-(хлорметил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амина (0,34 г, 1,6 ммоль, исходя из теоретического выхода в предыдущей реакции) в тетрагидрофуране добавляли N,N-диметиламинопиридин (0,020 г, 0,16 ммоль) и ди-трет-бутилдикарбонат (0,75 г, 3,4 ммоль). Гомогенный раствор перемешивали при комнатной температуре, и он постепенно менял окрашивание с оранжевого на красный. Спустя 2 ч анализ методами LCMS и TLC свидетельствовал лишь о частичном завершении преобразования с незначительным улучшением спустя 19 ч. Дополнительно добавляли 0,6 эквивалента ди-трет-бутилдикарбоната (0,20 г, 0,92 ммоль), и перемешивали смесь дополнительно в течение 2 ч. Реакционную смесь гасили добавлением воды и трижды экстрагировали толуолом. Объединенную органическую фазу промывали разбавленным солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и упаривали в условиях пониженного

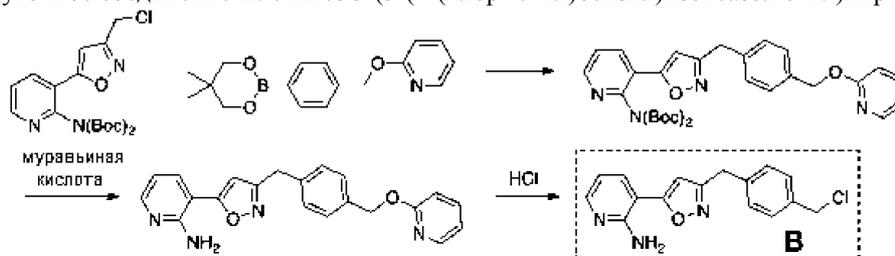
давления с получением красного масла. Полученное масло дополнительно очищали методом прямофазной флэш-хроматографии Biotage (50 г SNAP Ultra, 2-40% этилацетат в гексанах). Целевые фракции объединяли и упаривали с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (0,53 г, выход 80% после двух стадий).

400 МГц ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 8,50 (дд, $J=4,8, 1,8$ Гц, 1H), 8,18 (дд, $J=7,9, 1,8$ Гц, 1H), 7,36 (дд, $J=7,9, 4,8$ Гц, 1H), 6,56 (с, 1H), 4,52 (с, 2H), 1,21 (с, 18H);

125 МГц ^{13}C -ЯМР (CDCl_3) δ 165,7, 161,6, 150,2, 150,0, 148,5, 136,6, 123,6, 121,5, 102,4, 83,5, 35,2, 27,6 м.д.

MS: 410,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение В: синтез 3-(3-(4-(хлорметил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амина.

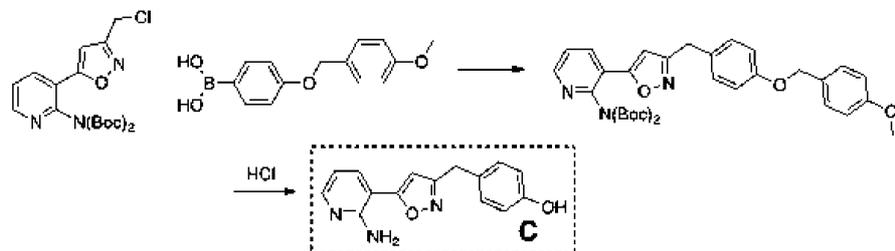


Ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидодикарбонат (промежуточное соединение А, 1,00 г, 2,44 ммоль) и 2-((4-(5,5-диметил-1,3,2-диоксаборинан-2-ил)бензил)окси)пиридин (0,87 г, 2,93 ммоль) смешивали в DME (15 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2 М раствор карбоната натрия в воде (2,81 мл, 5,62 ммоль) и тетраakis(трифенилфосфин)палладий (226 мг, 0,195 ммоль), герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 4 ч при 100°C. Охлажденную реакционную смесь вливали в этилацетат (400 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO_2 , гексан/этилацетат) с получением ди-Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания, к которому добавляли муравьиную кислоту (10 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 8 ч при 21-25°C для снятия ди-Вос-защиты. Смесь вливали в воду со льдом (150 мл), содержащую K_3PO_4 (37 г), а затем экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления с получением неочищенного остатка, содержащего 3-(3-(4-((пиридин-2-илокси)метил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин. Остаток растворяли в диоксане (10 мл), и добавляли концентрированную HCl (12 М, 1 мл, 12 ммоль). Смесь нагревали с обратным холодильником в течение 2 ч. Охлажденную смесь вливали в ледяной фосфатный буферный раствор (pH 7, 0,5 М, 100 мл), содержащий дополнительное количество NaOH (480 мг, 12 ммоль) для нейтрализации избытка HCl. Полученную смесь экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO_2 , гексан/этилацетат) с получением 3-(3-(4-(хлорметил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амина (280 мг, 0,93 ммоль, общий выход 38%) в виде белого твердого вещества.

400 МГц ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 8,13 (дд, $J=4,9, 1,8$ Гц, 1H), 7,70 (дд, $J=7,7, 1,8$ Гц, 1H), 7,40-7,32 (м, 2H), 7,32 - 7,25 (м, 2H), 6,70 (дд, $J=7,7, 4,9$ Гц, 1H), 6,25 (с, 1H), 5,44 (с, 3H), 4,57 (с, 2H), 4,06 (с, 2H).

MS: 300,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение С: синтез 4-((5-(2-аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метил)фенола.



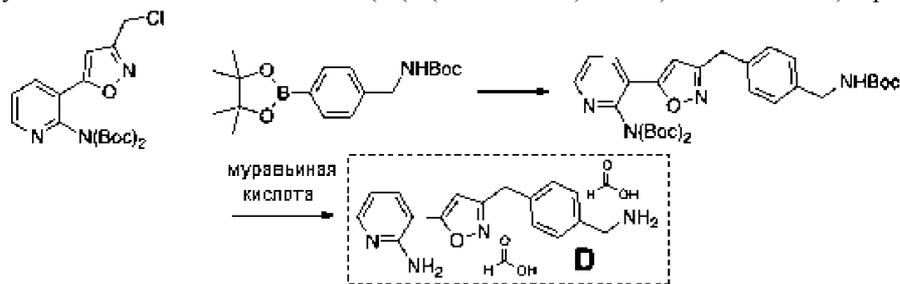
(4-((4-Метоксибензил)окси)фенил)бороновую кислоту (4,41 г, 17,08 ммоль) смешивали с DME (70 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2М раствор карбоната натрия в воде (14,64 мл, 29,28 ммоль), а затем раствор ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидодикарбоната (промежуточное соединение А, 5,00 г, 12,20 ммоль) в DME (10 мл). Добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (1,27 г, 1,10 ммоль), герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 3 ч при 90°C. Охлажденную реакционную смесь вливали в перемешиваемую смесь воды (300 мл) и теплого этилацетата (500 мл). Слои разделяли, и дополнительно экстрагировали водную фазу этилацетатом (3×100 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (50 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом

колоночной хроматографии (SiO_2 , гексан/этилацетат) с получением ди-Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания (6,00 г, 10,21 ммоль), который растворяли в диоксане (60 мл). К полученному раствору добавляли HCl (4 М, 10 мл, 40 ммоль) и перемешивали смесь в течение 3 ч при 50°C . Добавляли THF (100 мл) и толуол (100 мл) и корректировали до pH 6-7 добавлением водного раствора K_3PO_4 . Слои разделяли и дополнительно экстрагировали водную фазу смесью этилацетат/%ТНФ/толуол=1:1:1 (3×100 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO_2 , гексан/этилацетат) с получением 4-((5-(2-аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метил)фенола (2,30 г, 8,60 ммоль, 84%) в виде белого твердого вещества.

400 МГц ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ 9,30 (с, 1H), 8,08 (дд, $J=4,8, 1,8$ Гц, 1H), 7,86 (дд, $J=7,7, 1,9$ Гц, 1H), 7,15-7,07 (м, 2H), 6,80-6,65 (м, 4H), 6,26 (с, 2H), 3,90 (с, 2H).

MS: 268,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение D: синтез 3-(3-(4-(аминометил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин.

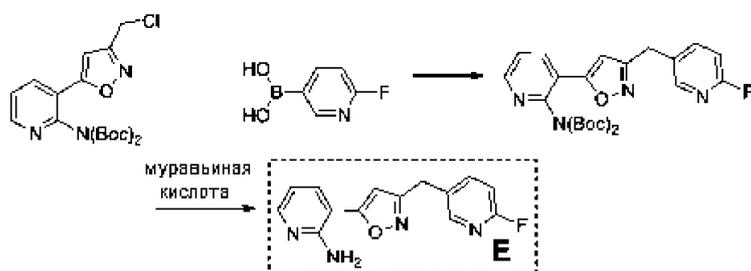


Ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидодикарбонат (промежуточное соединение А, 1,35 г, 3,30 ммоль) и трет-бутил-(4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бензил)карбамат (1,00 г, 3,00 ммоль) смешивали в DME (15 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2 М раствор карбоната натрия в воде (3,75 мл, 7,50 ммоль) и тетраakis(трифенилфосфин)палладий (277 мг, 0,240 ммоль), герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 4 ч при 100°C . Охлажденную реакционную смесь вливали в этилацетат (400 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO_2 , гексан/этилацетат) с получением Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания, к которому добавляли муравьиную кислоту (8 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 13 ч при $21-25^\circ\text{C}$ для полного снятия Вос-защиты, а затем по каплям добавляли к быстро перемешиваемой смеси диэтилового эфира и гексана. Выпавший в осадок продукт в форме его формиата собирали путем фильтрования и сушили в условиях вакуума с получением 3-(3-(4-(аминометил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-аминформиата (811 мг, 2,49 ммоль, 83%) в виде белого твердого вещества.

500 МГц ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ 8,32 (с, 2H), 8,09 (дд, $J=4,8, 1,8$ Гц, 1H), 7,86 (дд, $J=7,7, 1,8$ Гц, 1H), 7,44-7,34 (м, 4H), 6,81 (с, 1H), 6,70 (дд, $J=7,7, 4,8$ Гц, 1H), 6,26 (с, 2H), 4,05 (с, 2H), 3,96 (с, 2H).

MS: 281,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение E: синтез 3-(3-((6-фторпиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин.



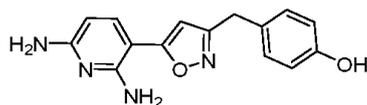
(6-Фторпиридин-3-ил)бороновую кислоту (1,90 г, 13,48 ммоль) смешивали с DME (50 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2 М раствор карбоната натрия в воде (11,24 мл, 22,48 ммоль), а затем раствор ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидодикарбоната (промежуточное соединение А, 3,68 г, 8,99 ммоль) в DME (6 мл). Добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0,935 г, 0,809 ммоль), герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 4 ч при 90°C . Охлажденную реакционную смесь вливали в этилацетат (500 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO_2 , гексан/этилацетат) с получением ди-Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания (2,10 г, 4,46 ммоль), к которому добавляли муравьиную кислоту (10 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 13 ч при $21-25^\circ\text{C}$ для снятия ди-Вос-защиты. Добавляли во-

ду со льдом (100 мл) и этилацетат (300 мл) и корректировали до pH 8-9 добавлением 5 н. водного NaOH. Слои разделяли и экстрагировали водную фазу этилацетатом (3×50 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток растворяли в этилацетате и осаждали продукт путем добавления гексана. Продукт фильтровали и сушили в условиях вакуума с получением 3-(3-((6-фторпиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (1,06 г, 3,92 ммоль, 44%) в виде белого твердого вещества.

500 МГц ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ 8,27-8,22 (м, 1H), 8,09 (дд, J=4,8, 1,9 Гц, 1H), 7,95 (тд, J=8,2, 2,6 Гц, 1H), 7,87 (дд, J=7,7, 1,8 Гц, 1H), 7,16 (дд, J=8,4, 2,9 Гц, 1H), 6,85 (с, 1H), 6,70 (дд, J=7,7, 4,8 Гц, 1H), 6,27 (с, 2H), 4,11 (с, 2H).

MS: 271,4 [M+H]⁺.

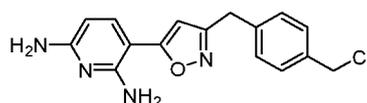
Промежуточное соединение F: синтез 4-((5-(2,6-диаминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метил)фенола.



К 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2,6-диамину (0,300 г, 0,806 ммоль) и TFA (4,96 мл, 64,4 ммоль) при комнатной температуре добавляли тиоанизол (0,381 мл, 3,22 ммоль) и перемешивали в течение 2 ч. К смеси добавляли насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия и экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле с получением 4-((5-(2,6-диаминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метил)фенола (0,170 г, 0,602 ммоль, выход 74,8%).

MS: 283,3 [M+H]⁺.

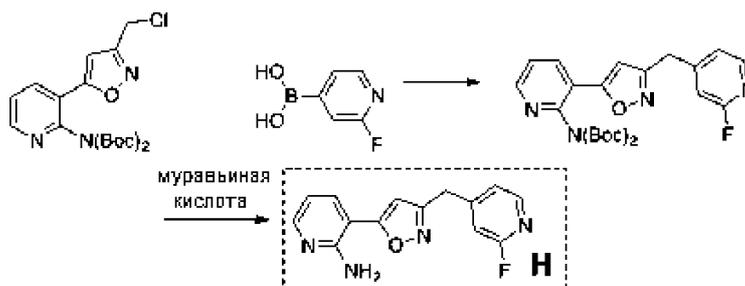
Промежуточное соединение G: синтез 3-(3-(4-(хлорметил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2,6-диамина.



3-(3-(4-((Пиридин-2-илокси)метил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2,6-диамин (0,100 г, 0,268 ммоль) растворяли в диоксане (1 мл) и добавляли HCl (0,098 мл, 3,21 ммоль). Смесь нагревали с обратным холодильником в течение 2 ч. Охлажденную смесь вливали в ледяной буфер с pH 7 и нейтрализовали добавлением NaOH, а затем экстрагировали EtOAc. Органические растворители удаляли в условиях пониженного давления и очищали остаток методом флэш-хроматографии с получением 3-(3-(4-(хлорметил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2,6-диамина (0,075 г, 0,238 ммоль, выход 89%).

MS: 315,7 [M+H]⁺.

Промежуточное соединение H: синтез 3-(3-((2-фторпиридин-4-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин.



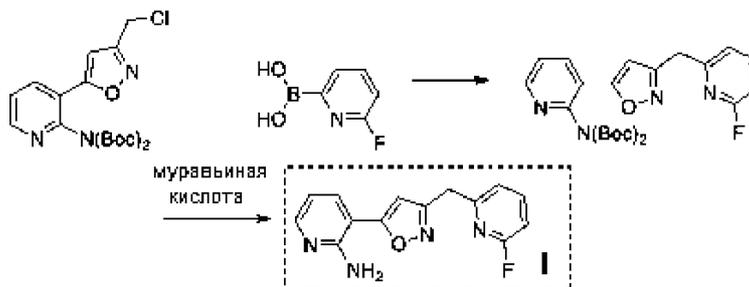
(2-Фторпиридин-4-ил)бороновую кислоту (0,894 г, 6,34 ммоль) смешивали с DME (25 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2 М раствор карбоната натрия в воде (7,32 мл, 14,64 ммоль), а затем раствор ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидодикарбоната (промежуточное соединение А, 2,00 г, 4,88 ммоль) в DME (4 мл). Добавляли тетракис(трифенилфосфин)палладий (0,395 г, 0,342 ммоль), герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 2 ч при 90°C. Охлажденную реакционную смесь вливали в этилацетат (200 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO₂, гексан/этилацетат) с получением ди-Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания (1,050 г, 2,232 ммоль), к которому добавляли муравьиную кислоту (6,1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 18 ч при 21-25°C для снятия ди-Вос-защиты. Добавляли воду со льдом (50 мл) и этилацетат (150 мл) и корректировали до pH 8-9 добавлением 5 н. водного NaOH. Слои разделяли и экстрагировали водную фазу этилацетатом (3×50 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток растворяли в этилацетате и осаждали продукт путем добавления гексана. Продукт фильтровали и сушили в условиях вакуума с получением 3-(3-((6-фторпиридин-3-

ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (0,515 г, 1,91 ммоль, 41%) в виде белого твердого вещества.

500 МГц ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ 8,19 (д, $J=5,1$ Гц, 1H), 8,10 (дд, $J=4,8, 1,8$ Гц, 1H), 7,87 (дд, $J=7,7, 1,8$ Гц, 1H), 7,32 (дт, $J=5,1, 1,7$ Гц, 1H), 7,17 (с, 1H), 6,87 (с, 1H), 6,71 (дд, $J=7,7, 4,8$ Гц, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,17 (с, 2H).

MS: 271,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

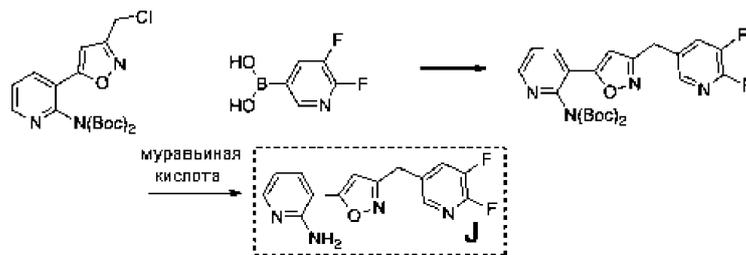
Промежуточное соединение I: синтез 3-(3-((6-фторпиридин-2-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин.



(6-Фторпиридин-2-ил)бороновую кислоту (0,670 г, 4,76 ммоль) смешивали с DME (20 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2 М раствор карбоната натрия в воде (5,49 мл, 10,98 ммоль), а затем раствор ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидодикарбоната (промежуточное соединение А, 1,500 г, 3,66 ммоль) в DME (2 мл). Добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0,296 г, 0,256 ммоль), герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 4 ч при 90°C. Охлажденную реакционную смесь вливали в этилацетат (200 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO_2 , гексан/этилацетат) с получением ди-Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания (0,900 г, 1,91 ммоль), к которому добавляли муравьиную кислоту (5,5 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 18 ч при 21-25°C для снятия ди-Вос-защиты. Добавляли воду со льдом (50 мл) и этилацетат (150 мл) и корректировали до pH 8-9 добавлением 5 н. водного NaOH. Слои разделяли и экстрагировали водную фазу этилацетатом (3×50 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (30 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток растворяли в этилацетате и осаждали продукт путем добавления гексана. Продукт фильтровали и сушили в условиях вакуума с получением 3-(3-((6-фторпиридин-2-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (0,440 г, 1,63 ммоль, 44%) в виде белого твердого вещества.

MS: 271,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение J: синтез 3-(3-((5,6-дифторпиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин.

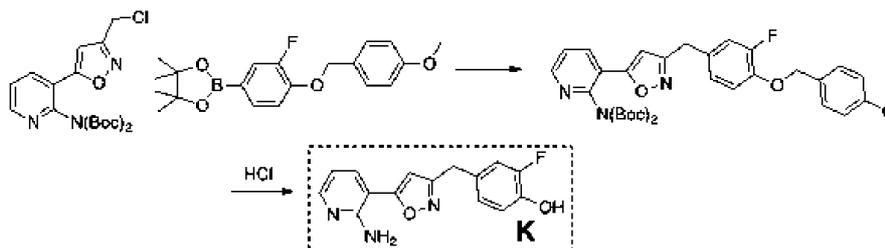


(5,6-Дифторпиридин-3-ил)бороновую кислоту (1,06 г, 6,65 ммоль) и ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]имидодикарбонат (промежуточное соединение А, 3,00 г, 7,32 ммоль) смешивали с DME (25 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2 М раствор карбоната натрия в воде (8,32 мл, 16,64 ммоль), а затем тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0,54 г, 0,47 ммоль). Герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 3 ч при 90°C. Охлажденную реакционную смесь вливали в этилацетат (500 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO_2 , гексан/этилацетат) с получением ди-Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания, к которому добавляли муравьиную кислоту (8 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 13 ч при 21-25°C для снятия ди-Вос-защиты. Добавляли толуол (100 мл) и ацетонитрил (50 мл) и удаляли все летучие вещества в условиях пониженного давления. Данную процедуру добавления/упаривания повторяли трижды для удаления муравьиной кислоты. Добавляли этилацетат и проводили осаждение продукта добавлением некоторого количества гексана. Продукт отфильтровывали и сушили в условиях вакуума с получением 3-(3-((5,6-дифторпиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (0,894 г, 3,10 ммоль, общий выход 47%) в виде белого твердого вещества.

500 МГц ^1H -ЯМР (DMSO-d_6) δ 8,12-8,01 (м, 3H), 7,86 (дд, $J=7,6, 1,9$ Гц, 1H), 6,87 (с, 1H), 6,70 (дд, $J=7,7, 4,7$ Гц, 1H), 6,28 (с, 2H), 4,15 (с, 2H).

MS: 289,4 [M+H]⁺.

Промежуточное соединение K: синтез 4-((5-(2-аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метил)-2-фторфенола.

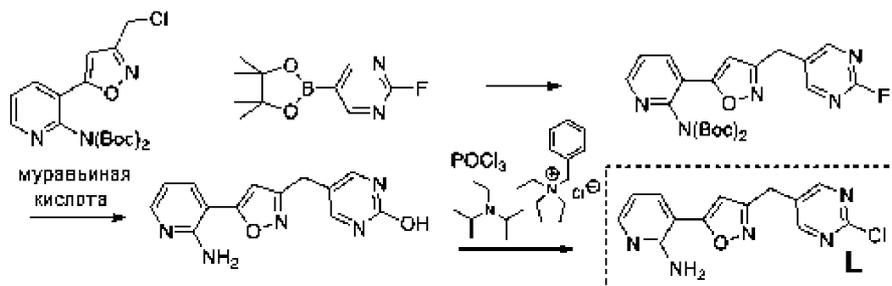


2-(3-Фтор-4-((4-метоксибензил)окси)фенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (6,29 г, 17,57 ммоль) и ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]иминодидикарбонат (промежуточное соединение А, 6,00 г, 14,64 ммоль) смешивали с DME (60 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2 М раствор карбоната натрия в воде (18,30 мл, 36,60 ммоль) и тетракис(трифенилфосфин)палладий (1,18 г, 1,03 ммоль), герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 2 ч при 90°C. Охлажденную реакционную смесь вливали в перемешиваемую смесь воды (300 мл) и теплого этилацетата (500 мл). Слои разделяли и дополнительно экстрагировали водную фазу этилацетатом (3×100 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (50 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO₂, гексан/этилацетат) с получением ди-Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания, который растворяли в диоксане (90 мл). К полученному раствору добавляли конц. HCl (12 М; 6,27 мл, 75 ммоль). Смесь перемешивали при 55°C в течение 2,5 ч, а затем вливали в перемешанную смесь раствора гидроксида натрия (2,82 г, 70,6 ммоль) в воде (200 мл) и EtOAc (300 мл). Слои разделяли, и экстрагировали водную фазу EtOAc (2×50 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и концентрировали в условиях пониженного давления. Перед полным высыханием, продукт начинал осаждаться. В этот момент добавляли эфир (100 мл) и собирали продукт путем фильтрования с получением 4-((5-(2-аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метил)-2-фторфенола (2,18 г, 7,64 ммоль, общий выход 52%) в виде белого порошка.

500 МГц ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ 9,72 (с, 1H), 8,09 (дд, J=4,8, 1,8 Гц, 1H), 7,87 (дд, J=7,7, 1,8 Гц, 1H), 7,11 (дд, J=12,2, 2,0 Гц, 1H), 6,96-6,85 (м, 2H), 6,79 (с, 1H), 6,69 (дд, J=7,7, 4,8 Гц, 1H), 6,26 (с, 2H), 3,92 (с, 2H).

MS: 286,4 [M+H]⁺.

Промежуточное соединение L: синтез 3-(3-((2-хлорпиримидин-5-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амина.



2-Фтор-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиримидин (1,00 г, 4,44 ммоль) и ди-трет-бутил-[3-(3-(хлорметил)-1,2-оксазол-5-ил)пиридин-2-ил]иминодидикарбонат (промежуточное соединение А, 2,00 г, 4,88 ммоль) смешивали с DME (15 мл) в герметизируемой пробирке. Добавляли 2 М раствор карбоната натрия в воде (5,55 мл, 11,09 ммоль) и тетракис(трифенилфосфин)палладий (0,36 г, 0,31 ммоль), герметизируемую пробирку продували аргоном и герметизировали. Смесь перемешивали в течение 2 ч при 95°C. Охлажденную реакционную смесь вливали в этилацетат (500 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом колоночной хроматографии (SiO₂, гексан/этилацетат) с получением ди-Вос-защищенного промежуточного продукта сочетания, к которому добавляли муравьиную кислоту (8 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 13 ч при 21-25°C для снятия ди-Вос-защиты. В ходе этой стадии фторпиримидин также полностью гидролизовался. Добавляли толуол (100 мл) и ацетонитрил (50 мл) и удаляли все летучие вещества в условиях пониженного давления. Данную процедуру добавления/упаривания повторяли трижды для полного удаления муравьиной кислоты с получением твердого остатка (5-(5-(2-аминопиридин-3-ил)изоксазол-3-ил)метил)-пиримидин-2-ола (570 мг, 2,12 ммоль). Остаток суспендировали в ацетонитриле (2 мл). Добавляли N-бензил-N,N-диэтилэтанаминия хлорид (237 мг, 1,04 ммоль) и фосфорилхлорид (0,58 мл, 6,24 ммоль), а затем добавляли N-этил-N-изопропилпропан-2-амин (0,71 мл, 4,16 ммоль). Смесь нагревали в герметизированной пробирке при 90°C в течение 20 ч, а затем медленно добавляли к перемешанному раствору

NaHCO₃ в воде. Добавляли некоторое количество льда для поддержания температуры около 30°C. После завершения гашения, смесь экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои сушили и концентрировали в условиях пониженного давления с получением неочищенного продукта, 3-(3-((2-хлорпиримидин-5-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (180 мг, 0,63 ммоль, общий выход 13%), в виде твердого вещества, которое использовали непосредственно в последующих экспериментах без дополнительной очистки.

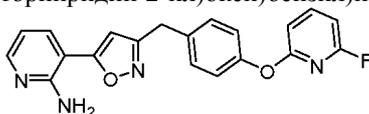
500 МГц ¹H-ЯМР (DMSO-d₆) δ 8,80 (с, 2H), 8,10 (дд, J=4,8, 1,9 Гц, 1H), 7,86 (дд, J=7,7, 1,9 Гц, 1H), 6,89 (с, 1H), 6,71 (дд, J=7,7, 4,8 Гц, 1H), 6,28 (с, 2H), 4,15 (с, 2H).

MS: 287,9 [M+H]⁺.

Примеры.

Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, представлены лишь с иллюстративными целями и что с их учетом специалистами в данной области техники могут быть предложены различные модификации и изменения, которые должны быть включены в настоящий документ в соответствии с духом и содержанием настоящей заявки и объемом прилагаемой формулы изобретения. Все процитированные в настоящем документе публикации, патенты и патентные заявки включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте во всех отношениях.

Пример 1. Синтез 3-(3-(4-((6-фторпиримидин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин.

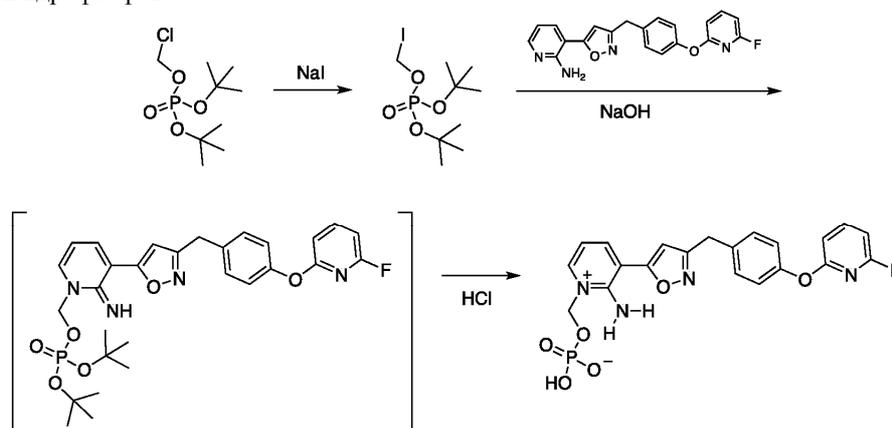


4-((5-(2-Аминопиримидин-3-ил)изоксазол-3-ил)метил)фенол (80 мг, 0,30 ммоль) растворяли в DMF (1 мл) и по каплям добавляли 2-метилпропан-2-олят калия (1 М в THF, 0,33 мл, 0,33 ммоль). Смесь перемешивали в течение 5 мин и добавляли раствор 2,6-дифторпиримидина (48,2 мг, 0,42 ммоль) в DMF (0,5 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 3 мин при 90°C и сразу очищали методом колоночной хроматографии (SiO₂, гексан/этилацетат). Содержащую продукт фракцию концентрировали в условиях пониженного давления и дополнительно очищали методом обращенно-фазовой флэш-хроматографии (C18, ацетонитрил/вода) с получением 3-(3-(4-((6-фторпиримидин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111) (65 мг, 0,18 ммоль, 60%) в виде белого твердого вещества.

400 МГц ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 8,14 (с, 1H), 7,80-7,69 (м, 2H), 7,31 (д, J=8,5 Гц, 2H), 7,11 (д, J=8,5 Гц, 2H), 6,77-6,68 (м, 2H), 6,60 (дд, J=7,8, 2,6 Гц, 1H), 6,30 (с, 1H), 5,43 (с, 2H), 4,07 (с, 2H).

MS: 363,3 [M+H]⁺.

Пример 2. Синтез (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиримидин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата.



Йодид натрия (2,379 г, 15,87 ммоль) и N-этил-N-изопропилпропан-2-амин (0,205 г, 1,587 ммоль) добавляли к THF (7 мл). Добавляли ди-трет-бутил-(хлорметил)фосфат (2,463 г, 9,52 ммоль) и перемешивали смесь при 45°C в течение 1,5 ч. Добавляли 3-(3-(4-((6-фторпиримидин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (2,3 г, 6,35 ммоль) и толуол (7 мл), а затем добавляли гидроксид натрия (5 н., 7 мл, 35 ммоль). Смесь перемешивали при 45°C в течение 30 мин, а затем в течение 1 ч при 23°C. Дополнительно добавляли порцию свежеприготовленного йодметилфосфата (следуя той же методике, что и описанная выше, но с использованием 1,2 г йодида натрия, 0,1 г N-этил-N-изопропилпропан-2-амин и 1,25 г ди-трет-бутил-(хлорметил)фосфата в 4 мл THF) и перемешивали смесь при 23°C в течение 12 ч. Органический слой разделяли и трижды экстрагировали водный слой 5 мл смеси THF/толуол (1:1). Объединенные органические слои охлаждали до 0°C и добавляли 5 н. HCl (7 мл). Смесь перемешивали при 23°C в течение 2 ч. Добавляли воду, лед и EtOAc и корректировали водную фазу до pH 8-10. Водный слой трижды экстрагировали EtOAc, а затем корректировали приблизительно до pH 7-7,5. В ходе этого процесса смесь становилась слегка мутной, но значительного выпадения осадка не происходило. Тогда смесь

фильтровали через слой обращенно-фазового С18 силикагеля (или в качестве альтернативы через 0,45 мкм PTFE фильтр). Прозрачный фильтрат медленно корректировали до pH 4-5, в процессе чего происходило осаждение продукта. Смесь перемешивали приблизительно в течение 1,5 ч и собирали продукт путем фильтрования. Осадок на фильтре тщательно промывали водой и однократно небольшим количеством MeOH и в завершение сушили в условиях вакуума с получением (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) (1,45 г, 3,07 ммоль, выход 48%).

MS: 473,4 [M+H]⁺.

³¹P-ЯМР (200 МГц, DMSO-d₆/D₂O) δ 3,61.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆/D₂O) δ 7,83 (кв, J=8,1 Гц, 1H), 7,73 (д, J=7,0 Гц, 2H), 7,30 (м, 2H), 7,00 (м, 2H), 6,76 (с, 1H), 6,72 (м, 2H), 6,33 (т, J=7,0 Гц, 1H), 5,39 (д, J=7,4 Гц, 2H), 3,99 (с, 2H), сигналы для -NH₂ и -OH не наблюдали.

Пример 3. Синтез (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата.

Указанное в заголовке соединение получали в соответствии с методикой примера с использованием йодида натрия (944 мг, 6,3 ммоль), N-этил-N-изопропилпропан-2-амин (81 мг, 0,63 ммоль), ди-трет-бутил-(хлорметил)фосфата (977 мг, 3,78 ммоль), 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (900 мг, 2,52 ммоль) и гидроксида натрия (5 н., 2,77 мл, 13,85 ммоль) с получением (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) (390 мг, 0,83 ммоль, выход 33%).

³¹P-ЯМР (200 МГц, DMSO-d₆/D₂O) δ 3,21.

¹H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆/D₂O) δ 7,64-7,55 (м, 2H), 7,37-7,21 (м, 5H), 7,20-7,13 (м, 2H), 6,92-6,85 (м, 2H), 6,75-6,71 (м, 1H), 6,07 (т, J=7,0 Гц, 1H), 5,28 (д, J=6,9 Гц, 2H), 5,00 (с, 2H), 3,88 (с, 2H), сигналы для -NH₂ и -OH не наблюдали.

MS: 468,4 [M+H]⁺.

Пример 4. Синтез (2-амино-3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 174).

Указанное в заголовке соединение получали по аналогии с методикой примера с использованием йодида натрия (1,5 г, 9,8 ммоль), N-этил-N-изопропилпропан-2-амин (0,17 мл, 0,98 ммоль), ди-трет-бутил-(хлорметил)фосфата (1,4 мл, 5,9 ммоль), 3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (1,4 г, 3,9 ммоль) и гидроксида натрия (5 н., 4,4 мл, 22 ммоль) с получением (2-амино-3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 174) (0,58 г, 1,2 ммоль, выход 32%).

MS: 469,4 [M+H]⁺.

Пример 5. 3-(3-(4-(Бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185).

Соединение синтезировали из промежуточного соединения А и (4-(бензилокси)фенил)бороновой кислоты в соответствии со способами, описанными выше.

400 МГц ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 8,12 (дд, J=4,9, 1,8 Гц, 1H), 7,70 (дд, J=7,7, 1,8 Гц, 1H), 7,47-7,27 (м, 5H), 7,26-7,16 (м, 2H), 7,02-6,90 (м, 2H), 6,70 (дд, J=7,7, 4,9 Гц, 1H), 6,24 (с, 1H), 5,50 (с, 2H), 5,05 (с, 2H), 4,00 (с, 2H).

MS: 358,3 [M+H]⁺.

Пример 6. Оценка активности соединений в отношении изолятов *C. neoformans* и *C. gattii*.

В этом исследовании оценивали активность соединений в отношении изолятов *C. neoformans* и *C. gattii*. Синтезировали N-фосфоноксиметильные пролекарственные средства указанных молекул и два из этих пролекарственных средств оценивали в модели диссеминированной инфекции *C. neoformans*, где 100 мг/кг АВТ ввели перорально за 2 ч до терапии.

Криптококковый менингит (КМ), вызванный, главным образом, *Cryptococcus neoformans*, является всегда смертельным, если его не лечить. Варианты лечения ограничены, особенно в бедных географических регионах, и показатели смертности остаются высокими, несмотря на существующие методы лечения. В настоящем примере оценивали активность нескольких соединений *in vitro* и *in vivo*, включая в себя соединение 2 (3-(3-(4-((пиридин-2-илокси)метил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин) и его пролекарственное средство - соединение 1 (водород(2-(2-амино-3-(3-(4-((пиридин-2-илокси)метил)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)этил)фосфонат). Эти соединения нацелены на консервативный фермент Gwt1, который необходим для локализации маннопротеинов клеточной стенки, заякоренных гликозилфосфатидилинозитолом (GPI), у грибов.

Ингибиторы Gwt1 характеризовались низкими значениями MIC, находящимися в диапазоне от 0,004 до 0,5 мкг/мл, в отношении как *C. neoformans*, так и *C. gattii*. Соединение 2 и 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) продемонстрировало синергизм *in vitro* с флуконазолом (FICI 0,37). В модели СМ соединение 1 и флуконазол отдельно снижали log₁₀ колониеобразующих единиц (КОЕ)/г головного мозга (0,78 и 1,04 соответственно), тогда как комбинация приводила к снижению, составляющему 3,52 log₁₀ КОЕ/г головного мозга.

Эффективность, измеренную по снижению грибковой нагрузки в головном мозге и легких, наблюдалась также для другого пролекарственного средства ингибитора Gwt1, (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172), где дозозависимое снижение грибковой нагрузки находилось в диапазоне от 5,91 до 1,79 log₁₀ КОЕ/г легких и от 7,00 до 0,92 log₁₀ КОЕ/г головного мозга, что представляет почти полную или полную стерилизацию тканей легких и головного мозга при более высоких дозах. Эти данные подтверждают дальнейшую клиническую оценку этого нового класса противогрибковых средств при СМ.

In vitro активность ингибиторов Gwt1 в отношении *Cryptococcus*.

Профиль противогрибковой чувствительности.

Несколько соединений являлись очень активными в отношении всех 4 оцененных штаммов грибов (табл. 1), при этом значения МІС или МЕС варьировали от 0,004 до 0,25 мкг/мл против *C. neoformans*, *C. gattii*, *Candida albicans* и *Aspergillus fumigatus*. По сравнению со значениями МІС соединения 2 против *Cryptococcus*, 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) и 3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 142) продемонстрировали в 4-8 раз более низкие значения МІС, тогда как 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111) продемонстрировал в 32 раза более низкие значения МІС (табл. 1).

Таблица 1

In vitro профили чувствительности ингибиторов Gwt1

Соединение	Пролекарственное средство	МІС ² (мкг/мл)			МІС или МЕС ² (мкг/мл)
		<i>C. neoformans</i> H99	<i>C. gattii</i> WM276	<i>C. albicans</i> 90028	<i>A. fumigatus</i> MYA3626
Соединение 2	Соединение 1	0,25	0,125	0,008	0,008
Пр. 5 (соединение 185)	Пр. 3 (соединение 173)	0,031	0,031	0,016	0,016
Пр. 1 (соединение 111)	Пр. 2 (соединение 172)	0,008	0,004	0,031	0,063
Соединение 142	Пр. 4 (соединение 174)	0,031	0,016	0,031	0,008
AMB	--	0,25	0,25	1	1
FLC	--	2	1	0,5	>16
CAS	--	ND ¹	ND	0,5	0,25

Ингибиторы Gwt1 являются синергетическими с FLC.

Оценивали синергизм соединения 2 и 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) в комбинации с FLC с использованием стандартных методик разбавления с использованием микротитрования. Синергизм (значения FICI < 0,5) наблюдали для обоих соединений против *C. neoformans* H99: FLC/соединение 2 (0,37), FLC/3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) (0,37). Важно отметить, что антагонизма не наблюдалось.

Активность ингибиторов Gwt1 в отношении чувствительных и нечувствительных/устойчивых к FLC штаммов. Активности соединения 2, 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185), 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111), 3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 142), AMB и FLC исследовали в отношении коллекции чувствительных и нечувствительных/устойчивых к FLC (МІС ≥ 16 мкг/мл) штаммов *C. neoformans* и *C. gattii*. 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111) являлся наиболее активным исследованным соединением со значениями МІС, находящимися в диапазоне от 0,004 до 0,031 мкг/мл в отношении всех исследованных 18 штаммов, за ним следовал 3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 142) (диапазон 0,016-0,125 мкг/мл), 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-

амин (соединение 185) (диапазон 0,031-0,25 мкг/мл) и соединение 2 (диапазон 0,125-0,5 мкг/мл) (табл. 4). В соответствии с различными механизмами действия активность иллюстративных соединений, а также АМВ была неизменной для устойчивых к FLC штаммов DUMC118 и RSA-MW-3615 по сравнению с чувствительными штаммами (табл. 4). Устойчивый к FLC *S. neoformans* DUMC158.03 продемонстрировал несколько более высокие значения MIC для четырех иллюстративных соединений, а также АМВ, что позволяет предположить, что в этом штамме могут присутствовать дополнительные нецелевые мутации. *In vivo* активность ингибиторов Gwt1 в отношении *S. neoformans*.

Эффективность соединения 1 отдельно и в комбинации с FLC в модели криптококкового менингита на мышях. Эффективность соединения 1 и FLC оценивали в хорошо известной модели КМ на мышях. Поскольку криптококковые инфекции могут быть гематогенно диссеминированы на другие органы, оценивали КОЕ легких и головного мозга. Самцов мышей CD-1 инфицировали с помощью $5,9 \times 10^4$ КОЕ штамма *S. neoformans* H99 путем инъекции в боковую хвостовую вену. Мышей распределяли по четырем группам (n=10), состоящим из следующего:

- a) лечение соединением 1;
- b) лечение соединением 1 вместе с FLC;
- c) лечение FLC; или
- d) контроль - отсутствие лечения.

Лечение начинали в течение 1 ч после инфицирования. Соединение 1 вводили перорально через зонд в дозе 390 мг/кг трижды в день с интервалом, составляющим приблизительно 8 ч. АВТ не использовали в этой модели, поэтому дозировка TID (три раза в день) соединения 1 была необходима из-за короткого периода полувыведения соединения 2 у мышей (от 1,40 до 2,75 ч) (34). FLC (2 мг/мл, Sagent Pharmaceuticals, Schaumburg, IL) вводили в дозе 80 мг/кг/день внутривентриально (IP).

Среднее значение \log_{10} КОЕ/г головного мозга и легких у не получивших лечение контрольных мышей составляло $7,81 \pm 0,19$ и $5,97 \pm 0,47$ соответственно. Значимые различия ($P < 0,05$) в отношении легочной грибковой нагрузки наблюдали во всех группах лечения (соединение 1, FLC и соединение 1 вместе с FLC) по сравнению с не получившим лечение контролем. В легких снижение \log_{10} КОЕ/г грибковой нагрузки было одинаковым для всех трех групп лечения по сравнению с не получившим лечение контролем: соединение 1 (1,50), FLC (1,30) и комбинированная терапия (1,84) - без статистически значимых различий между группами лечения.

В головном мозге у мышей, получивших лечение соединением 1, наблюдали снижение грибковой нагрузки, составляющее $0,78 \log_{10}$ КОЕ/г, по сравнению с контрольной группой, которая существенно не отличалась. Однако значимое снижение \log_{10} КОЕ/г грибковой нагрузки по сравнению с контрольной группой наблюдали только для FLC отдельно (1,04) и комбинации соединения 1 и FLC (3,51) ($P < 0,01$ и $P < 0,001$ соответственно).

Эффект АВТ на фармакокинетические параметры иллюстративных соединений.

Фармакокинетику (PK) соединения 2, 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111), 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) и 3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 142) сравнивали у самцов мышей CD-1 после введения 26 мг/кг соответствующего пролекарственного средства (соединения 1), (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172), (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173), (2-амино-3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 174)) либо перорально, либо с помощью внутривентриальной (IP) инъекции (табл. 2). В половине когорт 100 мг/кг АВТ вводили за 2 ч до введения соединения. Хотя значения AUC анализов различались в 4 раза после перорального введения 4 пролекарственных средств, добавление АВТ приводило к сходным воздействиям соединения 2, 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) и 3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 142). Полученное в результате воздействие 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111) было приблизительно в 2 раза выше, чем у трех других оцениваемых соединений. Добавление АВТ приводило к увеличению воздействия в 8,6-15 раз после перорального введения пролекарственных средств.

Таблица 2

Воздействия ингибиторов Gwt1 после перорального или внутрибрюшинного введения доз пролекарственных средств в присутствии или при отсутствии предшествующего лечения с помощью 100 мг/кг АВТ

Пролекарственное средство	Аналит	Среднее значение AUC ¹ (мкг·ч/мл) в результате дозы 26 мг/кг				Отношение +АВТ/-АВТ (РО)	Отношение +АВТ/-АВТ (IP)
		РО	IP	РО + АВТ	IP + АВТ		
Соед. 1	Соед. 2	2,76	4,36	41,50	24,28	15,0	5,6
		± 0,23	± 0,11	± 8,09	± 17,74		
Пр. 2 (Соед. 172)	Пр. 1 (Соед. 111)	10,66	11,75	91,28	97,25	8,6	8,3
		± 0,48	± 1,83	± 20,75	± 12,61		
Пр. 3 (Соед. 173)	Пр. 5 (Соед. 185)	4,49	4,31	41,94	35,61	9,3	8,3
		± 2,32	± 0,96	± 6,41	± 28,22		
Пр. 4 (Соед. 174)	Соед. 142	3,49	4,68	49,92	72,62	14,3	15,5
		± 0,27	± 0,73	± 10,34	± 9,07		

Когда пролекарственные средства вводили внутрибрюшинно, сходные воздействия получали для аналитов: соединения 2, 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) и 3-(3-(6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 142), при этом 3-(3-(4-(6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111) демонстрировал приблизительно значение AUC в 2 раза выше, чем другие оцениваемые соединения (табл. 2). Добавление АВТ перед внутрибрюшинным введением лекарственного средства увеличивало воздействия в 5,6-15,5 раз. Введение доз внутрибрюшинно выбирали в качестве пути введения для соединения 1, (2-амино-3-(3-(4-(6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) и (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) в модели СМ.

Эффективность иллюстративных соединений в модели криптококкового менингита на мышах при введении доз в присутствии пан-ингибитора СУР АВТ.

В предварительном эксперименте эффективности соединения 1, (2-амино-3-(3-(4-(6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) и (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) оценивали в диссеминированной модели СМ (n=5 мышей/когорты). 100 мг/кг АВТ вводили перорально самцам мышей CD-1 за 2 ч до введения соединений. Мышам вводили инъекцию $6,9 \times 10^4$ CFU *S. neoformans* штамма Н99 каждой мыши через боковую хвостовую вену при T=0 ч. Лечение с помощью каждого пролекарственного средства начинали приблизительно через 1 ч после инфицирования с помощью внутрибрюшинного введения и продолжали ежедневно в течение 7 дней с 100 мг/кг АВТ, вводимого перорально за 2 ч перед каждой дозой соединения. Средние количества \log_{10} КОЕ/г головного мозга и легких у не получивших лечение контрольных мышей составляло $7,83 \pm 0,09$ и $4,67 \pm 0,88$ соответственно (фиг. 1).

В легком ни доза, составляющая 34 мг/кг, ни доза, составляющая 85 мг/кг, соединения 1 не достигала статистически значимого снижения в \log_{10} КОЕ/г ткани по сравнению с не получившим лечение контролем. Следует отметить, что 390 мг/кг соединения 1, вводимого перорально TID, приводит к более высоким значениям AUC, чем 85 мг/кг соединения 1, вводимого внутрибрюшинно QD с АВТ (фиг. 2); таким образом, лучшая эффективность в легком наблюдалась при монотерапии соединением 1. В легком введение 60 или 34 мг/кг (2-амино-3-(3-(4-(6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) снижало нагрузку в ткани ниже предела обнаружения (приблизительно $4,67 \log_{10}$ КОЕ/г ткани легкого). Для (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) снижение КОЕ в легком составляло $3,28 \log_{10}$ КОЕ/г (85 мг/кг QD) и $1,07 \log_{10}$ КОЕ/г (34 мг/кг QD).

В головном мозге введение 60 или 34 мг/кг (2-амино-3-(3-(4-(6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) приводило к

снижению, составляющему 7,13 и 7,05 \log_{10} КОЕ/г ткани головного мозга соответственно. Для (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) снижение КОЕ в головном мозге составляло 2,72 \log_{10} КОЕ/г (85 мг/кг QD) и 1,66 \log_{10} КОЕ/г (34 мг/кг QD). Введение 85 мг/кг соединения 1 демонстрировало умеренное снижение \log_{10} КОЕ/г (0,85), что тем не менее не достигло статистической значимости.

Исследование зависимости эффективности от дозы проводили с (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфатом (соединение 172) и (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфатом (соединение 173) для подтверждения наблюдаемой активности. В этом исследовании QD дозы, составляющие 7,5, 20 и 60 мг/кг, оценивали в сочетании с введением АВТ. Дозу QD, составляющую 60 мг/кг, без АВТ также оценивали в качестве контроля. Средние количества \log_{10} КОЕ/г ткани у не получивших лечение контрольных мышей составляли 7,83±0,07 (головной мозг) и 5,91±0,24 (легкое) (фиг. 2). Контрольные животные, которые получали ежедневные дозы, составляющие 100 мг/кг АВТ без соединения, характеризовались значениями \log_{10} КОЕ/г ткани, составляющими 8,07±0,28 (головной мозг) и 7,04±0,34 (легкое).

Как (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172), так и (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 173) демонстрировали дозозависимый эффект в снижении \log_{10} КОЕ/г ткани головного мозга и легкого при использовании АВТ. Когорты, которые получали 60 мг/кг/день иллюстративных соединений без АВТ, показали или численное, но незначимое снижение в легочной нагрузке, составляющее 0,74 \log_{10} КОЕ/г ((2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172)), или отсутствие снижения в \log_{10} КОЕ/г ткани мышцы, что согласуется с более коротким периодом полувыведения и более низким воздействием.

Для (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) с АВТ дозозависимые снижения в \log_{10} КОЕ/г находились в диапазоне от 5,91 до 1,79 для легкого и от 7,00 до 0,92 для головного мозга. Все когорты лечения с помощью АВТ вместе с (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфатом (соединение 172) демонстрировали снижения в грибковой нагрузке в легком, которые были статистически значимыми по сравнению с контрольной группой, которой вводили АВТ ($P \leq 0,05$). Два самых высоких уровня дозировки АВТ вместе с (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфатом (соединение 172) также показали снижения в грибковой нагрузке в головном мозге, находящиеся в диапазоне от 6,99 до 2,95 \log_{10} КОЕ/г ($P \leq 0,05$).

Для (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) дозозависимые изменения в \log_{10} КОЕ/г находились в диапазоне от снижения, составляющего 1,55 \log_{10} КОЕ/г, до увеличения, составляющего 1,20, для легкого и от снижения, составляющего 1,45, до увеличения, составляющего 0,24, для головного мозга. Тем не менее ни одно из указанных снижений не достигало статистической значимости по сравнению с контрольной группой, которой вводили АВТ. Статистическая значимость также не была достигнута, когда эти когорты оценивали по сравнению с контролем несущей средой при отсутствии АВТ. Результаты эксперимента по зависимости эффекта от дозы согласовались с предварительными данными о том, что (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172) демонстрировал почти полную или полную стерилизацию ткани легкого и головного мозга в дозах, составляющих 34 и 60 мг/кг (вместе с АВТ).

Анализ значений AUC по сравнению с изменением в \log_{10} КОЕ/г ткани.

Три соединения, оцененные в модели эффективности, характеризовались значениями MIC для заражающего штамма (*S. neoforgmans* H99), которые отличались в 8-32 раза: соединение 2 (0,25 мкг/мл), 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) (0,031 мкг/мл) и 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111) (0,008 мкг/мл). Данные в табл. 3 показывают, что значения AUC после введения внутривенно (вместе с АВТ) находились в диапазоне от 24,3 до 97,3 мкгч/мл, что представляет 4-кратную разницу. Чтобы понять влияние различий AUC по сравнению с MIC, оценивали величину изменений \log_{10} КОЕ/г ткани в трех экспериментах.

Значения AUC в трех экспериментах для соединения 1 (с или без АВТ) находились в диапазоне от 7,0 мкгч/мл (7,5 мг/кг соединения 1 QD вместе с АВТ) до 196,3 мкгч/мл (390 мг/кг T1D). При значении AUC, составляющем 196,3 мкгч/мл, наблюдали умеренное, но значимое снижение нагрузки в легком (1,5 \log_{10} КОЕ/г). Более низкие значения AUC не были эффективными. Значения AUC находились в диапазоне от 10,0 до 116,4 мкгч/мл для (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) и от 27 до 224,3 мкгч/мл для (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172). Сравнивали эффективность трех соединений в дозе, которая давала сходные значения AUC.

Значения AUC, составляющие приблизительно 80 мкг·ч/мл.

В присутствии АВТ дозы, составляющие 20 мг/кг (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172), 60 мг/кг (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) и 80 мг/кг соединения 1 приводили к очень сходным значениям AUC, составляющим 74,8, 82,1 и 79,4 мкгч/мл соответственно. Тем не менее снижения \log_{10} КОЕ/г головного мозга составляли 2,95, 1,45 и 0,85, соответственно, и снижения \log_{10} КОЕ/г легкого составляли 3,69, 1,55 и 0,9. Таким образом, несмотря на одинаковые значения AUC для 3-х соединений лучшая эффективность была связана с более низкими значениями MIC (0,008, 0,031 и 0,25 мкг/мл соответственно), что свидетельствует о том, что улучшенная микробиологическая активность в значительной степени объясняет улучшенную эффективность.

Эффективность (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) и АМВ в модели отсроченного лечения криптококкового менингита.

Модель с отсроченным лечением использовали для сравнения эффективности лечения один раз в день с использованием 60 мг/кг (IP) (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172), 3 мг/кг (IP) АМВ по сравнению с контролем несущей средой (внутрибрюшинно 5% декстроза). Как и в предыдущей модели на мышах, 100 мг/кг АВТ (перорально) вводили за 2 ч до каждой дозы (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) (n=5 мышей/когорты). Заражение начинали в день 1 и лечение начинали через 24 ч после этого (день 2), а не через 1 ч. Лечение вводили в течение 7 дней (последняя доза в день 8) и мышей умерщвляли в день 9 для подсчета КОЕ.

Средние количества \log_{10} КОЕ/г ткани у не получивших лечение контрольных мышей составляли $8,15 \pm 0,24$ (головной мозг) и $6,22 \pm 0,93$ (легкое) (фиг. 3). Как (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172), так и АМВ демонстрировали статистически значимое снижение \log_{10} КОЕ/г легкого (4,59 и 4,02 соответственно) по сравнению с не получившей лечение контрольной группой ($P \leq 0,05$). (2-Амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172) также показал снижение, составляющее 6,84 \log_{10} КОЕ/г головного мозга по сравнению с не получившим лечение контролем, которое являлось значимым ($P \leq 0,01$). Эти данные являются очень сходными со снижениями, наблюдаемыми в когорте, которой вводили 60 мг/кг (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172) вместе с АВТ, как показано на фиг. 2, демонстрируя воспроизводимость этих данных. Хотя АМВ демонстрировал снижение, составляющее 4,40 \log_{10} КОЕ/г головного мозга, это не соответствовало статистической значимости.

Два дополнительных соединения, 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) и 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111), демонстрировали улучшенную в 8-32 раза активность в отношении *S. neoformans* H99 со значениями MIC, составляющими 0,031 и 0,008 мкг/мл соответственно, по сравнению с соединением 2. Это различие в активности также наблюдали в отношении большей панели из 18 изолятов, где значения MIC₉₀ составляли 0,5 мкг/мл (соединение 2), 0,25 мкг/мл (3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин) (соединение 185) и 0,031 мкг/мл (3-(3-(4-(6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111)) (табл. 3). Эти значения выгодно отличаются от других лекарственных средств, применяемых в клинической практике для СМ. В глобальном исследовании, в котором оценивали противогрибковую активность в отношении 46 штаммов *S. neoformans*, значения MIC₉₀ для азолов находятся в диапазоне от 0,06 мкг/мл (изавуконазол) до 4 мкг/мл (FLC), тогда как эхинокандины являлись в основном неактивными со значениями MIC₉₀ ≥ 16 мкг/мл (35). Аналогично в исследовании изолятов в США значения MIC₉₀ в отношении *S. neoformans* составляли: АМВ (2 мкг/мл) и 5-флуцитозин (8 мкг/мл), и только итраконазол (0,125 мкг/мл) и кетоконазол (0,06 мкг/мл) демонстрировали низкие значения MIC₉₀.

Таблица 3

Активность ингибиторов Gwt1 в отношении чувствительных и нечувствительных/устойчивых к FLC штаммов *Cryptococcus*

Вид	Изолят	МИС (мкг/мл)				AMB	FLC
		001A	2020	2039	2041		
<i>C. neoformans</i>	H99	0,125	0,031	0,004	0,031	0,25	1
<i>C. neoformans</i>	DUMC 118.00	0,25	0,063	0,016	0,063	0,25	64
<i>C. neoformans</i>	DUMC 158.03	0,25	0,25	0,031	0,125	1	32
<i>C. neoformans</i>	MYA-4564	0,125	0,063	0,004	0,016	0,25	4
<i>C. neoformans</i>	MYA-4565	0,5	0,25	0,031	0,125	0,125	1
<i>C. neoformans</i>	MYA-4566	0,25	0,125	0,008	0,063	0,25	2
<i>C. neoformans</i>	MYA-4567	0,25	0,063	0,016	0,031	0,25	1
<i>C. neoformans</i>	14116	0,125	0,031	0,004	0,016	0,25	4
<i>C. neoformans</i>	76484	0,125	0,063	0,004	0,016	0,25	4
<i>C. gattii</i>	RSA-MW- 3615	0,125	0,031	0,004	0,016	0,25	64
<i>C. gattii</i>	MYA-4877	0,25	0,063	0,008	0,016	0,25	4
<i>C. gattii</i>	MYA-4093	0,5	0,125	0,016	0,125	0,25	2
<i>C. gattii</i>	MYA-4094	0,25	0,25	0,016	0,063	0,25	2
<i>C. gattii</i>	MYA-4560	0,25	0,063	0,008	0,016	0,063	1
<i>C. gattii</i>	MYA-4561	0,5	0,125	0,016	0,031	0,25	4
<i>C. gattii</i>	MYA-4562	0,25	0,125	0,016	0,031	0,25	2
<i>C. gattii</i>	MYA-4563	0,5	0,125	0,016	0,031	0,125	4
<i>C. gattii</i>	MYA-4560	0,25	0,063	0,008	0,016	0,063	1
GEOMEAN		0,241	0,085	0,010	0,034	0,215	3,564
MIC ₉₀		0,5	0,25	0,031	0,125	0,25	64

В этом исследовании изучали коллекцию клинически выделенных чувствительных к FLC и нечувствительных/устойчивых к FLC штаммов *C. neoformans* и *C. gattii*. В соответствии с другим механизмом действия активность четырех соединений Gwt1 относительно FLC сохранялась, хотя один штамм (DUMC 158.03) характеризовался более высокими значениями МИС для иллюстративных соединений, а также AMB, что позволяет предположить, что в этом штамме могут присутствовать дополнительные нецелевые мутации. Несмотря на повышенные значения МИС для этого штамма ожидается, что соответствующие клинические воздействия все еще могут быть достигнуты для охвата этих типов штаммов.

Стандартные эксперименты по разведению с использованием микротитрования методом "шахматной доски" показали, что как соединение 2, так и 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиримидин-2-амин (соединение 185) являются синергетическими с FLC в отношении *C. neoformans* H99. Эти данные согласуются с предыдущими сообщениями о синергизме соединения 2 с FLC против 9 из 10 штаммов *Candida tropicalis* и 2 из 20 штаммов *C. albicans*. Важно отметить, что антагонизма не наблюдалось. Улучшение активности в комбинации с FLC также наблюдалось на модели СМ на мышах. Монотерапия соединением 1 или FLC приводила к снижению, составляющему 0,78 и 1,04 log₁₀ КОЕ/г ткани головного мозга по сравнению с не получившим лечение контролем, тогда как комбинация соединения 1 и FLC приводила к снижению, составляющему 3,52 log₁₀ КОЕ/г ткани головного мозга по сравнению с контролем. Эта комбинированная терапия являлась значительно более активной в снижении грибковой нагрузки в головном мозге, чем монотерапия соединением 1. АВТ использовали для увеличения воздействия лекарственных средств в других терапевтических моделях на животных; тем не менее использование АВТ для повышения эффективности в моделях инфекционных заболеваний не было широко распространено. Два исследования использовали АВТ в краткосрочных моделях, где log₁₀ КОЕ/г ткани исследовали через 24-48 ч. Антибактериальную эффективность экспериментальных аналогов аденозина, нацеленных на ДНК-лигазу, оценивали через 24 ч после инфицирования в модели на бедре, в которой мыши получали однократную дозу 100 мг/кг АВТ за 2 ч до инфицирования, чтобы уменьшить высокий клиренс в пе-

чени. Эффективность соединения 1 исследовали после введения АВТ в моделях с диссеминированной инфекцией *Candida*, где нагрузка *C. albicans* в почках была снижена до $6,0 \pm 0,1 \log_{10}$ КОЕ/г почки через 48 ч. Поскольку для моделей эффективности может потребоваться лечение продолжительностью 7 дней или более, очень важна способность поддерживать хорошее воздействие лекарственного средства путем введения АВТ в течение периода лечения. В одном исследовании изучали фармакокинетические параметры антипирина у мышей, которым вводили в течение 14 дней непрерывную инфузию 20 или 60 мг АВТ через осмотический насос ALZET. В этом исследовании значения AUC увеличивались в 3-4 раза, когда антипирин вводили внутривенно (в/в) и в 8-10 раз после перорального введения, что демонстрирует возможность длительного введения АВТ. В настоящем исследовании показано, что 7 дней ежедневного введения 100 мг/кг АВТ за 2 ч до лечения с помощью иллюстративных соединений резко повышало эффективность трех ингибиторов Gwt1. Фармакокинетические исследования показали, что АВТ увеличивал воздействия в 5,6-15,5 раз, когда иллюстративные молекулы вводили перорально, и в 8,6-15 раз, когда иллюстративные молекулы вводили внутривенно. Эти данные подтверждают использование АВТ в моделях инфекционных заболеваний на животных для анализа как клинических кандидатов, так и молекул раннего открытия, где требуются данные для подтверждения концепции.

Клинические исследования ясно показали, что быстрое уничтожение криптококковых клеток в ЦНС связано с улучшением исхода болезни хозяина. Данные, полученные модели с использованием животных, согласно настоящему раскрытию обеспечивают доказательство эффективного проникновения в головной мозг, один из ключевых факторов при выборе лекарственного средства для лечения СМ. Эти данные согласуются с исследованиями распределения ^{14}C -соединения 1, которые продемонстрировали значительную радиоактивность в тканях, связанных с инвазивными грибковыми инфекциями, включая в себя ткани головного мозга; тогда как плохое проникновение в ЦНС наблюдалось для эхинокандинов. Примечательно, что (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172) значительно снижал грибковую нагрузку в ткани легких и головного мозга в модели СМ на мышах, где в прошлом опыте только АМВ показал аналогичное снижение КОЕ в этой модели. В настоящем исследовании (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172) был по меньшей мере сопоставим или лучше, чем АМВ в модели с отсроченным лечением. Таким образом, значительный интерес представляет пероральное средство, способное быстро уничтожать дрожжи в ЦНС хозяина, такое как (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172). Дальнейшие фармакодинамические исследования будут выполнены после определения оптимального ингибитора Gwt1.

Пример 7. Материалы и методы.

Исследуемые изоляты.

Штаммы *C. neoformans* H99, DUMC 118.00, DUMC 158.03 и *C. gattii* штаммы R272 и RSA-MW-3515 получали из Университета Дьюка. *C. albicans* 90028, *A. fumigatus* MYA3626, *C. neoformans* 14116, *C. neoformans* 76484 и панель патогенных эталонных штаммов *Cryptococcus* (ATCC MP-11) получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Manassas, VA, USA). Панель MP-11 состоит из штаммов, представляющих восемь молекулярных типов и три подтипа *C. neoformans* и *C. gattii*.

Противогрибковые средства.

Все исходные растворы лекарственных средств получали в концентрации, составляющей 10 мг/мл в 100% диметилсульфоксиде (DMSO) и аликвоты хранили при -20°C : АМВ (VWR, Radnor, PA, USA), FLC, (Alfa Aesar, Tewksbury, MA, USA или Sagent Pharmaceuticals, Schaumburg, IL), каспофунгин (Sigma, St. Louis, MO, USA), соединение 2, 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185), 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111), 3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 142).

Для исследований фармакокинетики и эффективности использовали следующие пролекарственные средства: соединение 1, (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172), (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 173), (2-амино-3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 174). Соединение 1, N-фосфоноксиметильное пролекарственное средство, является растворимым в воде. При добавлении соединения 1 в воду pH составляет менее 7,0. Гидроксид натрия добавляли, чтобы вернуть pH к нейтральному диапазону, сохранить растворимость и обеспечить возможность дозирования составленного материала. Пролекарственные средства (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 172), (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 173) и (2-амино-3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфат (соединение 174) составляли аналогично для обеспечения возможности перорального и внутривенного введения доз соединений для исследований фармакокинетики и эффективности. Конечные растворы пролекарственных средств получали в 5% декстрозе и их вводили перорально (PO) или внутривенно (IP) из расчета на грамм ежедневно измеренной массы тела мыши.

10 мг/мл Раствора АВТ (Fisher Scientific, Hampton, NH) в воде вводили перорально за 2 ч до инфицирования в виде 10 мкл на г массы тела мыши, получая в результате дозу, составляющую 100 мг/кг.

Испытание противогрибковой чувствительности.

Для определения антимикробной активности проводили испытание на чувствительность методом микроразведения в бульоне в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) M27-A3 для дрожжей и M38-A2 для плесневых грибов. Соединение 2 и аналоги сначала разбавляли в DMSO для получения промежуточных разведений. Затем их разбавляли в микротитровальных планшетах до конечной концентрации от 2 до 0,002 мкг/мл. 1 мкл DMSO добавляли в контрольные лунки "без лекарственного средства". Растворы смешивали на планшетном шейкере в течение 10 мин и планшеты инкубировали при 35°C в течение 40-48 ч (*C. albicans*, *A. fumigatus*) и 72 ч (*C. neoformans*). Минимальную концентрацию, которая приводила к 50% снижению роста грибов по сравнению с контролем (с помощью зеркала для чтения), определяли как минимальную ингибирующую концентрацию (MIC) для *C. albicans* и *C. neoformans*. Минимальную концентрацию, которая приводила к укорочению гиф по сравнению с ростом гиф в контрольных лунках с DMSO, определяли как минимальную эффективную концентрацию (MEC) для *A. fumigatus* (как установлено для эхинокандинов). Использование конечных показателей MIC и MEC для соединения 2 против дрожжей и плесневых грибов, соответственно, было описано ранее. Для исследований синергизма криптококка значения MIC соединения и 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) считывали при 50% ингибирования.

Фармакокинетический анализ.

Однократные фармакокинетические эксперименты проводили на здоровых самцах мышей CD-1 после внутрибрюшинного или перорального введения 26 мг/кг пролекарственных средств соединения 1, (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172), (2-амино-3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 173) и (2-амино-3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 174). В половине когорт мышам вводили однократную пероральную дозу 100 мг/кг АВТ за 2 ч до введения пролекарственного средства. Плазму собирали через 0,083, 0,5, 2, 4, 8 и 24 ч после введения дозы (n=3 на каждый момент времени). AUC представляет собой площадь под кривой, рассчитанную от T=0 до последней измеряемой концентрации. Концентрации активного метаболита в плазме (соединение 2), 3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 111), 3-(3-(4-(бензилокси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 185) и 3-(3-((6-(бензилокси)пиридин-3-ил)метил)изоксазол-5-ил)пиридин-2-амин (соединение 142) определяли методом ЖХ-МС/МС. Фармакокинетические параметры определяли с использованием Phoenix WinNonlin (v7.0) и некомпартментной модели. Образцы, которые были ниже предела количественного определения (0,5 или 1 нг/мл), не использовали при расчете средних значений.

Модель криптококкового менингита.

Штамм *C. neoformans* H99 выращивали в бульоне YPD при 30°C на шейкере (220 об/мин) в течение 24 ч, центрифугировали (1980 gcf) и дважды промывали в PBS, ресуспендировали в PBS и количественно определяли гемцитометрическим методом. Самцов мышей CD-1 инфицировали $\sim 5 \times 10^4$ КОЕ на мышью через инъекцию 100 мкл в боковую хвостовую вену. Мышей взвешивали и лечение проводили в течение 1 ч после инфицирования. Лечение вводили ежедневно в течение семи дней. Мышей ежедневно взвешивали и наблюдали на наличие острых и хронических нежелательных симптомов. Мышей умерщвляли на 8 день и головной мозг и левое легкое гомогенизировали и культивировали для количественного определения нагрузки в ткани (КОЕ на грамм ткани). Ткани гомогенизировали в течение 25 с в 1 мл физиологического раствора с фосфатным буфером с использованием двух 6,5-миллиметровых стальных шариков и Mini-Beadbeater 16 (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) и серийно разводили в 10 раз. Аликвоты (100 мкл) гомогената высевали и инкубировали в течение 3-7 дней при 37°C. Данные по грибковой нагрузке преобразовывали в \log_{10} и оценивали с использованием критериев Краскела-Уоллиса с критерием множественным сравнения Данна для апостериорного анализа (Prism 5; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Значение $P \leq 0,05$ считается статистически значимым.

Модель отсроченного лечения.

Модель отсроченного лечения являлась аналогичной модели криптококкового менингита со следующими исключениями:

а) самцов мышей CD-1 инфицировали $5,4 \times 10^4$ КОЕ на мышью посредством инъекции в боковую хвостовую вену по 100 мкл;

б) лечение начинали через 24 ч после инфицирования и продолжали ежедневно в течение 7 дней с помощью 100 мг/кг АВТ (РО), вводимого за 2 ч до каждой дозы (2-амино-3-(3-(4-((6-фторпиридин-2-ил)окси)бензил)изоксазол-5-ил)пиридин-1-ий-1-ил)метилгидрофосфата (соединение 172);

в) мышью умерщвляли через 24 ч после последней дозы, а головной мозг и левое легкое гомогенизировали и культивировали для количественного определения нагрузки в ткани (КОЕ на грамм ткани).

Данные по грибковой нагрузке преобразовывали в \log_{10} и оценивали с использованием критериев

Краскела-Уоллиса с критерием множественным сравнения Данна для апостериорного анализа (Prism 5; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Значение $P \leq 0.05$ считается статистически значимым.

Пример II. Парентеральная фармацевтическая композиция.

Для получения парентеральной фармацевтической композиции, подходящей для введения путем инъекции (подкожной, внутривенной), 1-1000 мг описанного в настоящем изобретении соединения или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата растворяли в стерильной воде, а затем смешивали с 10 мл 0,9% стерильного солевого раствора. Подходящий буфер необязательно добавляли, а затем необязательную кислоту или основание для доведения значения pH. Смесь включали в единичную дозированную форму, подходящую для введения путем инъекции.

Пример III. Пероральный раствор.

Для получения фармацевтической композиции для пероральной доставки достаточное количество описанного в настоящем изобретении соединения или его фармацевтически приемлемой соли добавляли к воде (с необязательным(и) растворителем(ями), необязательным(и) буфером(ами) и вспомогательными веществами для маскировки вкуса) с получением 20 мг/мл раствора.

Пример IV. Пероральная таблетка.

Таблетку получали смешиванием 20-50% по массе описанного в настоящем изобретении соединения или его фармацевтически приемлемой соли, 20-50% по массе микрокристаллической целлюлозы, 1-10% по массе гидроксипропилцеллюлозы с низкой степенью замещения и 1-10% по массе стеарата магния или других соответствующих вспомогательных веществ. Таблетки получали прямым прессованием. Общую массу спрессованных таблеток сохраняли при 100-500 мг.

Пример V. Пероральная капсула.

Для получения фармацевтической композиции для пероральной доставки 10-500 мг описанного в настоящем изобретении соединения или его фармацевтически приемлемой соли смешивали с крахмалом или другой подходящей порошкообразной смесью. Смесь вводили в единицу дозирования, такую как твердая желатиновая капсула, которая подходит для перорального введения.

Согласно другому варианту осуществления 10-500 мг описанного в настоящем изобретении соединения или его фармацевтически приемлемой соли помещали в капсулу размером 4 или капсулу размером 1 (гипромеллоза или твердый желатин) и капсулу запаивали.

Пример VI. Гелевая композиция для местного нанесения.

Для получения фармацевтической гелевой композиции для местного нанесения описанное в настоящем изобретении соединение или его фармацевтически приемлемую соль смешивали с гидроксипропилцеллюлозой, пропиленгликолем, изопропилмиририлатом и очищенным спиртом USP. Полученную гелевую смесь затем вносили в контейнеры, такие как тубики, которые подходят для местного нанесения.

Пример VII. Ингаляционная композиция.

Для получения фармацевтической композиции для ингаляционной доставки описанное в настоящем изобретении соединение или его фармацевтически приемлемую соль смешивали с безводной лимонной кислотой и 0,9% раствором хлорида натрия. Смесь вносили в подающее устройство для ингаляции, такое как небулайзер, который подходит для ингаляционного введения.

Пример VIII. Композиция офтальмического раствора.

Для получения фармацевтической композиции в виде офтальмического раствора описанное в настоящем изобретении соединение или его фармацевтически приемлемую соль смешивали с 0,9 г NaCl в 100 мл очищенной воды и фильтровали с применением фильтра 0,2 микрона. Полученный изотонический раствор затем вносили в офтальмическое подающее устройство, такое как контейнеры для глазных капель, которое подходит для офтальмического введения.

Биологические примеры.

Пример IX. In vitro противогрибковый анализ.

Измерение противогрибковой активности.

Противогрибковую активность соединений оценивали в анализе с использованием микроразведения в бульоне в соответствии с методологией Института клинических и лабораторных стандартов для дрожжей (для *Candida* и *Cryptococcus*) (1) и плесневых грибов (для *Aspergillus* и *Rhizomucor*) (2). Штаммы *Candida albicans* 90028, *Aspergillus fumigatus* MYA3626, *Rhizomucor pusillus* 46342 и *Cryptococcus neoformans* H99 получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Получение грибковой суспензии.

Штаммы *C. albicans* 90028 и *C. neoformans* H99 наносили штриховыми движениями из замороженных образцов при -80°C на чашки с декстрозным агаром Сабуро (SDA). Им давали возможность расти в течение 24 ч (*C. albicans*) и 48 ч (*C. neoformans*) при 35°C , прежде чем использовать их в анализе. 5-6 отдельных колоний отбирали и разводили в стерильной воде для получения грибковой суспензии. Определяли плотность клеток в суспензии и разводили культуру средой RPMI1640 до получения грибковой суспензии $2,5 \times 10^3$ клеток/мл. Суспензию использовали при измерении MIC, как описано ниже.

A. fumigatus и *R. pusillus* наносили на споры в чашках с картофельно-декстрозным агаром (PDA) из замороженных исходных материалов при -80°C и инкубировали в течение 3-6 дней при 30°C (*A. fumiga-*

tus) и 35°C (*R. pusillus*). Воду, содержащую 1% Tween, непосредственно добавляли в чашку с агаром и осторожно взбалтывали для увлажнения и удаления конидий *Aspergillus*. Для *R. pusillus* на поверхность добавляли воду и осторожно массировали, чтобы намочить и удалить споры. Для обоих видов собирали конидии или споры и фрагменты мицелия, после чего удаляли мицелий, конидиеносцы и крупные скопления конидий/спор. Полученную суспензию спор подсчитывали и разбавляли в среде RPMI1640 для доведения до конечной суспензии $1-2 \times 10^4$ спор/мл. Суспензию использовали при измерении МЕС, как описано ниже.

Получение исходных соединений и промежуточные разведения.

Взвешивали соединения и добавляли DMSO для получения исходного раствора 10 мг/мл. Растворы перемешивали встряхиванием и обработкой ультразвуком при 37°C в течение 5-10 мин. Полученные растворы стерильно фильтровали с использованием PTFE-фильтра, аликвотировали (12 мкл или по мере необходимости) и хранили при -20°C. Промежуточные разведения соединения получали в стерильных полипропиленовых пробирках в 100% DMSO. Исходный раствор соединения сначала разбавляли в DMSO до концентрации, составляющей 1600 мкг/мл. Его серийно разбавляли в 2 раза с получением серии разведений от 1600 до 0,19 мкг/мл.

Измерение MIC/МЕС.

99 мкл Грибковой суспензии в RPMI1640, полученной, как указано выше, добавляли в каждую лунку 96-луночного круглодонного аналитического планшета. 1 мкл Разведений промежуточного соединения (200-0,19 мкг/мл) добавляли в лунки планшета. Это привело к 100-кратному разбавлению промежуточных разведений, что привело к конечной концентрации соединения 2-0,0019 мкг/мл в планшете. 1 мкл DMSO добавляли в контрольные лунки "без лекарственного средства". Растворы перемешивали встряхиванием на планшетном шейкере в течение 10 мин и планшеты инкубировали при 35°C в течение 40-48 ч (*S. albicans*, *A. fumigatus*, *R. pusillus*) и 72 ч (*Cryptococcus*). Минимальная концентрация, которая явно ингибировала рост грибов ($\geq 50\%$ ингибирования) по сравнению с контролем при визуальном осмотре, была определена как минимальная ингибирующая концентрация (MIC) для *S. albicans* и *S. neoformans* (как указано для эхинокандинов). Это подтверждали тщательным перемешиванием и считыванием при 600 нм на считывающем устройстве для микропланшетов. Минимальная концентрация, которая привела к укорочению гиф по сравнению с ростом гиф в контрольных лунках с DMSO, была определена как минимальная эффективная концентрация (МЕС) для *A. fumigatus* и *R. pusillus* (как указано для эхинокандинов). Использование конечных показателей MIC и МЕС в отношении дрожжей и плесневых грибов было описано Pfaller M.A., Duncanson F., Messer S.A., Moet G.J., Jones R.N., Castanheira M., *Antimicrob Agents Chemother.*, 2011, 55(11):5155-8. In vitro активность нового противогрибкового средства широкого спектра действия E1210, протестированного в отношении видов *Aspergillus*, определяют с помощью способов с микроразведением в бульоне CLSI и EUCAST. Результаты показаны в табл. 4, и буквы указывают следующие диапазоны в мкг/мл: А: МЕС или MIC $\leq 0,010$; В: $0,010 < \text{МЕС}$ или MIC $\leq 0,10$; С: $0,10 < \text{МЕС}$ или MIC $\leq 1,0$; D: МЕС или MIC $> 1,0$; NT: не испытывали.

Таблица 4

Соединение	<i>Aspergillus fumigatus</i> МЕС	<i>Candida albicans</i> MIC	<i>Rhizomucor pusillus</i> МЕС	<i>Cryptococcus neoformans</i> MIC	<i>Cryptococcus gattii</i> MIC
111	В	В	С	А	А
142	А	В	С	В	В
172	NT	NT	NT	NT	NT
173	NT	NT	NT	NT	NT
174	NT	NT	NT	NT	NT
185	С	С	С	В	В

Пример X. Модель системной кандидозной инфекции у мышей.

Получение грибкового инокулянта *S. albicans* субкультивировали в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом и выращивали при 37°C в течение ночи. Клетки собирали центрифугированием и трижды промывали стерилизованным физиологическим раствором и подсчитывали гемцитометром. Суспензию доводили до 2×10^7 клеток/мл стерильным физиологическим раствором, чтобы она служила в качестве грибного инокулянта.

Инфицирование.

8-Недельных мышей BALB/c массой ~20 г делают нейтропеническими путем введения 150 мг/кг и 100 мг/кг циклофосамида путем внутривенной инъекции в день -4 и день -1 до инфицирования соответственно. Грибковый инокулят используют в количестве, составляющем 0,2 мл (4×10^6 клеток/мышь).

Лечение.

Через 0,5-1 ч после инокуляции грибом по 0,2 мл раствора средства, содержащего соединение, описанное в настоящем документе (растворенное или суспендированное в стерилизованном физиологическом растворе, содержащем 6,5% диметилсульфоксида и 3,5% Tween 80 или другую подходящую несущую среду) вводят перорально с использованием перорального зонда, 3 раза каждые 4 ч. Концентрация средства составляет от 1 до 500 мг/кг, а количество животных в одной группе составляет от 5 до 10 животных.

Определение эффектов.

Животных умерщвляют через 48 ч и собирают органы, такие как почки и головной мозг. Колониеобразующие единицы/грамм ткани определяют для оценки защитного эффекта соединения по сравнению с контролем без лекарственного средства (несущая среда).

Пример XI. Модель криптококкового менингита на мышах.

Получение грибкового инокулянта.

Штамм *Cryptococcus neoformans* H99 выращивали в бульоне YPD при 30°C на шейкере (220 об/мин) в течение 24 ч, центрифугировали (1980 gcf) и дважды промывали в PBS, ресуспендировали в PBS и количественно определяли с помощью гемцитометрического подсчета.

Инфицирование и лечение.

Самцов мышей CD-1 инфицируют с помощью $\sim 6 \times 10^4$ колониеобразующих единиц (КОЕ) на мышшь посредством инъекции 100 мкл в боковую хвостовую вену. Соединения вводят пероральным, внутривенным или внутривенным путем от 1 до 3 раз в день.

Лечение проводили в течение семи дней.

Определение эффектов.

Мышей умерщвляют на 8 день, а головной мозг и левое легкое гомогенизируют и культивируют для количественного определения нагрузки в ткани (КОЕ на грамм ткани).

Колониеобразующие единицы/грамм ткани определяют для оценки защитного эффекта соединения по сравнению с контролем без лекарственного средства (несущая среда).

Пример XII. Клиническое испытание описанного в настоящем документе соединения у пациентов с грибковой инфекцией.

Целью настоящего исследования является изучение того, можно ли с помощью соединения, описанного в настоящем документе, лечить пациентов с грибковыми инфекциями. Другая цель настоящего исследования - оценить безопасность, переносимость, фармакокинетику, биодоступность и влияние приема пищи для однократных доз соединения, описанного в настоящем документе, вводимого внутривенно и перорально, с последующей оценкой безопасности, переносимости, фармакокинетики и потенциала взаимодействия лекарственных средств для нескольких доз соединения, описанного в настоящем документе, которые вводят перорально.

Тип исследования: интервенционный.

Дизайн исследования.

Распределение: рандомизированное.

Интервенционная модель: перекрестное назначение.

Маскировка: двойное (участник/исследователь).

Основная цель: лечение.

Основные критерии эффективности.

Безопасность и переносимость однократных и многократных пероральных доз того или иного соединения, описанного в настоящем документе, при измерении по нежелательным эффектам (АЕ), медицинским осмотрам (РЕ), жизненным показателям (VS), лабораторным испытаниям безопасности, анализу мочи и электрокардиограмме с 12 отведениями (ЭКГ). Сроки: 21 день.

Второстепенные критерии эффективности.

Фармакокинетика однократных и многократных доз соединения, описанного в настоящем документе, при измерении по максимальной наблюдаемой концентрации (C_{max}). Сроки: 21 день.

Фармакокинетика однократной и многократной дозы соединения, описанного здесь, при измерении по площади под кривой (AUC). Сроки: 21 день.

Фармакокинетика однократных и многократных доз соединения, описанного в настоящем документе, при измерении по конечному периоду полу выведения (t_{1/2}). Сроки: 21 день.

Фармакокинетика однократных и многократных доз соединения, описанного в настоящем документе, при измерении по объему распределения (V_d). Сроки: 21 день.

Фармакокинетика однократных и многократных доз соединения, описанного в настоящем документе, при измерении по константе скорости элиминации (K_{el}). Сроки: 21 день.

Фармакокинетика однократных и многократных доз соединения, описанного в настоящем документе, при измерении по коэффициенту накопления. Сроки: 21 день.

Пригодность к участию в испытании.

Возраст, имеющий право на участие в испытании: от 18 до 55 лет (для взрослых).

Пол, имеющий право на участие в испытании: все.

Принимает здоровых добровольцев: да.

Критерии включения.

Женщины с детородным потенциалом должны согласиться избегать беременности во время исследования и использовать контрацепцию по меньшей мере за 2 недели до начала исследования и до 3 месяцев после последней дозы исследуемого лекарственного средства.

Мужчины с партнером(ами) с детородным потенциалом должны согласиться использовать соответствующую барьерную контрацепцию, начиная с периода скрининга до 3 месяцев после последней дозы исследуемого лекарственного средства.

Скрининг гематологии, клинической биохимии, коагуляции и анализа мочи согласуется с общим хорошим состоянием здоровья.

Нет значительных отклонений в результатах медицинского осмотра, ЭКГ и показателей жизненно важных функций.

Готовность и возможность предоставить письменное информированное согласие.

Критерии исключения.

Любое неконтролируемое или активное основное системное заболевание, включая в себя без ограничения: сердечно-сосудистое, легочное, желудочно-кишечное, метаболическое, мочеполовое, неврологическое, иммунологическое, психиатрическое или опухолевое нарушение с метастатическим потенциалом.

История или наличие злокачественного новообразования в течение прошлого года. Пациенты, которые были успешно вылечены без рецидива базальноклеточной карциномы кожи или карциномы шейки матки *in situ*, могут быть включены в исследование.

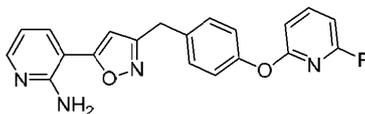
Использование рецептурных лекарственных средств в течение 14 дней до первой дозы исследуемого лекарственного средства и в течение всего исследования.

Использование безрецептурных или отпускаемых без рецепта лекарственных средств в течение 7 дней до приема первой дозы исследуемого лекарственного средства и в течение всего исследования.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на вышеприведенный пример, следует понимать, что модификации и варианты охватываются сущностью и объемом настоящего изобретения. Соответственно настоящее изобретение ограничено только следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

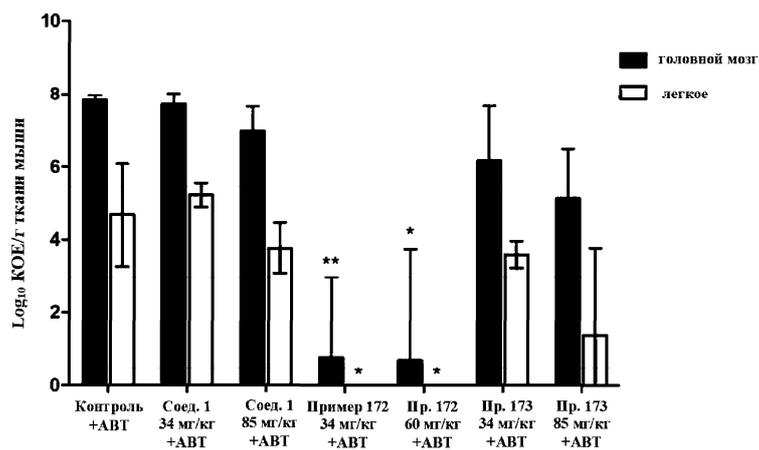
3. Применение соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п.2 для лечения микоза у субъекта.

4. Применение по п.3, при котором микоз выбран из группы, состоящей из аспергиллеза, бластомикоза, кандидоза, кокцидиоидомикоза (калифорнийской лихорадки), криптококкоза, грибковой инфекции глаз, гистоплазмоза, мукоромикоза, пневмоцистной пневмонии (PCP), стригущего лишая, споротрихоза и таларомикоза.

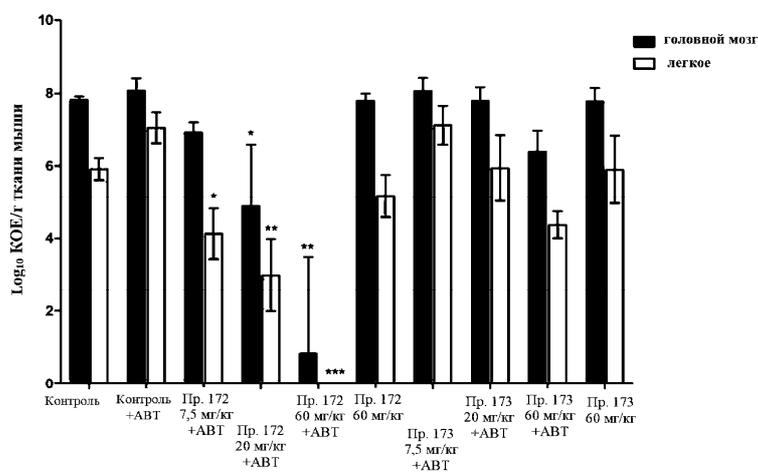
5. Применение по п.3, при котором микоз вызван видами грибов, выбранными из группы, состоящей из *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida rugosa*, *Candida auris*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Histoplasma capsulatum*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor indicus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Apophysomyces elegans*, *Absidia species*, *Saksenaea species*, *Rhizomucor pusillus*, *Entomophthora species*, *Conidiobolus species*, *Basidiobolus species*, *Sporothrix schenckii*, *Pneumocystis jirovecii*, *Talaromyces marneffeii*, *Asclepias albicans*, *Fusarium solani*, *Scedosporium apiospermum* и *Rhizomucor pusillus*.

6. Применение соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п.2 для лечения микоза, вызванного *Cryptococcus neoformans* или *Cryptococcus gattii*.

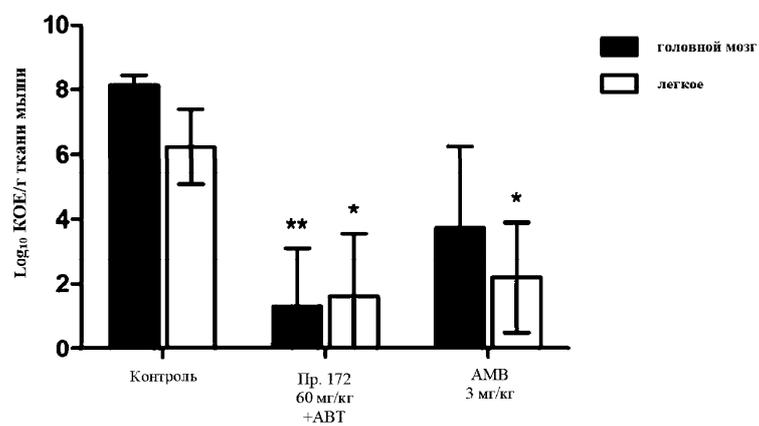
7. Способ лечения микоза у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п.2.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

