

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293301 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.06.28(51) Int. Cl. A61K 31/422 (2006.01)  
A61K 31/4439 (2006.01)  
C07D 263/20 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2021.06.18

## (54) СОЕДИНЕНИЯ ОКСАЗОЛИДИНОНА, ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ ОКСАЗОЛИДИНОНА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/040,810; 17/351,631

(32) 2020.06.18; 2021.06.18

(33) US

(86) PCT/US2021/038131

(87) WO 2021/258013 2021.12.23

(71) Заявитель:

АКАГЕРА МЕДИСИНС, ИНК. (US)

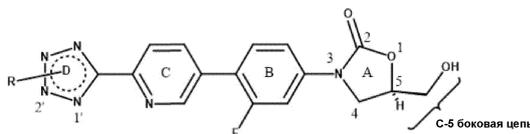
(72) Изобретатель:

Драммонд Дэрил К., Типпараджу  
Суреш К., Нобл Чарльз О., Кошкарёв  
Александр, Кирпотин Дмитрий Б.  
(US)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены композиции и способы лечения туберкулеза, а также других микобактериальных и грамположительных бактериальных инфекций. Эти композиции содержат высокоактивный и селективный оксазолидинон, инкапсулированный с высокой эффективностью для максимизации эффективности дозирования низкотоксичных лекарственных средств, и являются стабильными в присутствии плазмы. Композиции циркулируют в кровотоке длительное время и удерживают инкапсулированное лекарственное средство во время циркуляции после внутривенного введения, что обеспечивает эффективное накопление в месте бактериальной или микобактериальной инфекции. Высокие дозы, которые могут быть достигнуты, в сочетании со свойствами длительной циркуляции и высокостабильным удерживанием лекарственного средства позволяют снизить частоту введения по сравнению с ежедневным или дважды в сутки введением других лекарственных средств, обычно применяемых для лечения этих инфекций.



A1

202293301

202293301

A1

# **СОЕДИНЕНИЯ ОКСАЗОЛИДИНОНА, ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ ОКСАЗОЛИДИНОНА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

## **РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/040,810, поданной 18 июня 2020 г., и заявке на патент США на полезную модель № 17/351,631, поданной 18 июня 2021 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[0002] Настоящее изобретение относится к новым аминоалкилоксазолидиноновым соединениям, липосомальным композициям, содержащим новые аминоалкилоксазолидиноновые соединения, и применению аминоалкилоксазолидиноновых соединений для лечения инфекций *Mycobacterium tuberculosis* и других инфекций, вызываемых грамположительными бактериями.

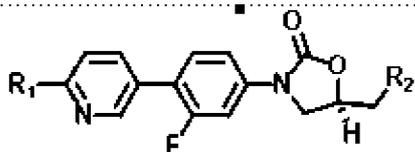
## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Микобактерии представляют собой вид бактерий, вызывающих туберкулез (ТВ). По данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире туберкулез является одной из 10 основных причин смерти и ведущей причиной смерти от одного инфекционного агента. Рифампицин представляет собой наиболее эффективное лекарственное средство первой линии для лечения туберкулеза. Однако растет число случаев инфицирования микобактериями туберкулеза, резистентными к рифампицину. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (MDR-TB) представляет собой форму туберкулеза, вызываемого бактериями, которые не реагируют на изониазид и рифампицин.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0004] Предложены композиции и способы лечения туберкулеза, а также других микобактериальных и грамположительных бактериальных инфекций.

[0005] Один аспект изобретения относится к соединению Формулы I или его фармацевтически приемлемым солям:



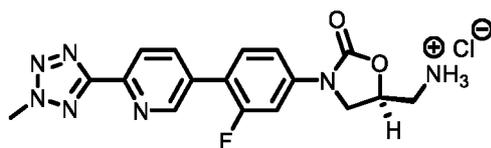
Формула I,

где R<sub>2</sub> представляет собой амин (NH<sub>2</sub>) или ацетамид (NHCOCH<sub>3</sub>), и

где R<sub>1</sub> представляет собой тетразольное кольцо, замещенное аминоалкилом в положении 2'.

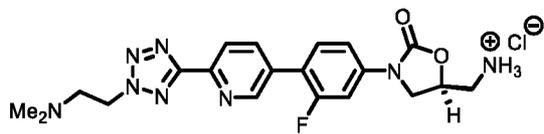
[0006] В некоторых вариантах реализации аминоалкил представляет собой диметиламиноалкил. В некоторых вариантах реализации аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений включают либо аминую, либо ацетамидную группу в положениях R<sub>2</sub> оксазолидинонового кольца и диметиламиноэтильную группу в тетразольном кольце.

[0007] В некоторых вариантах реализации предложено соединение Формулы 1a:



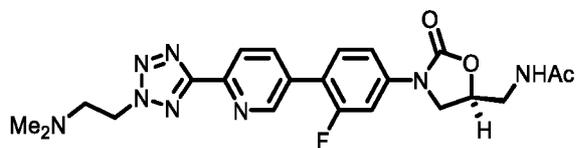
Формула 1a.

[0008] В некоторых вариантах реализации предложено соединение Формулы 1b:



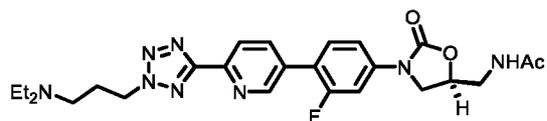
Формула 1b.

[0009] В некоторых вариантах реализации предложено соединение Формулы 1c или его фармацевтически приемлемые соли:



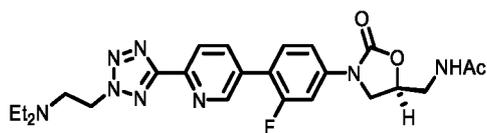
Формула 1c.

[0010] В некоторых вариантах реализации предложено соединение Формулы 1d или его фармацевтически приемлемые соли:



Формула 1d.

[0011] В некоторых вариантах реализации предложено соединение Формулы 1e:



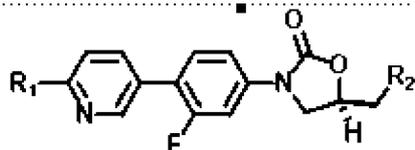
Формула 1e

[0012] В некоторых вариантах реализации соединения имеет индекс селективности (SI) для Erd/НepG2 и H37Rv/НepG2, составляющий от 100 до 1700.

[0013] В некоторых вариантах реализации соединения имеет SI для Erd/НepG2 и H37Rv/НepG2, составляющий от 200 до 1700.

[0014] В некоторых вариантах реализации соединения имеет SI для Erd/НepG2 и H37Rv/НepG2, составляющий от 300 до 1700.

[0015] В другом аспекте настоящего изобретения предложена липосомальная композиция, содержащая липосомальные везикулы, при этом липосомальные везикулы содержат соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемые соли



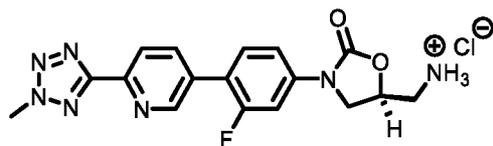
Формула I,

где R<sub>2</sub> представляет собой амин (NH<sub>2</sub>) или ацетамид (NHCOCH<sub>3</sub>), и

где R<sub>1</sub> представляет собой тетразольное кольцо, замещенное аминоалкилом в положении 2'.

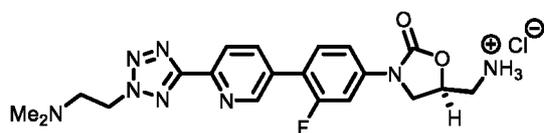
[0016] В некоторых вариантах реализации аминоалкил представляет собой диметиламиноалкил. В некоторых вариантах реализации аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений включают либо аминую, либо ацетамидную группу в положениях R<sub>2</sub> оксазолидинонового кольца и диметиламиноэтильную группу в тетразольном кольце.

[0017] В некоторых вариантах реализации предложена липосомальная композиция, содержащая липосомальные везикулы, при этом липосомальные везикулы содержат соединение Формулы 1a:



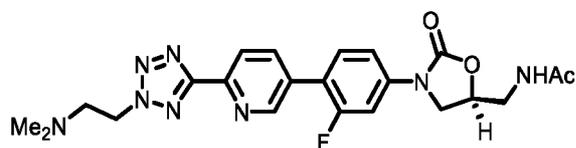
Формула 1a.

[0018] В некоторых вариантах реализации предложена липосомальная композиция, содержащая липосомальные везикулы, при этом липосомальные везикулы содержат соединение Формулы 1b:



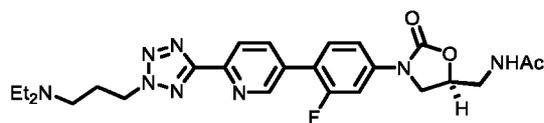
Формула 1b.

[0019] В некоторых вариантах реализации предложена липосомальная композиция, содержащая липосомальные везикулы, при этом липосомальные везикулы содержат соединение Формулы 1с или его фармацевтически приемлемую соль:



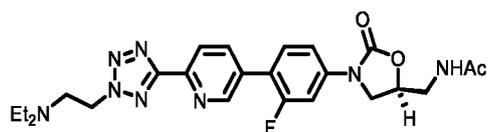
Формула 1с.

[0020] В некоторых вариантах реализации предложена липосомальная композиция, содержащая липосомальные везикулы, при этом липосомальные везикулы содержат соединение Формулы 1d:



Формула 1d.

[0021] В некоторых вариантах реализации предложена липосомальная композиция, содержащая липосомальные везикулы, при этом липосомальные везикулы содержат соединение Формулы 1e:



Формула 1e.

[0022] В некоторых вариантах реализации липосомальные везикулы находятся в водной среде.

[0023] В некоторых вариантах реализации соединение заключено в липосомальную везикулу с помощью захватывающего агента, содержащего полианион. В некоторых вариантах реализации захватывающий агент представляет собой триэтиламмония сахарозы октасульфат или сульфат аммония. В некоторых вариантах реализации захватывающий агент представляет собой триэтиламмония сахарозы октасульфат. В некоторых вариантах реализации захватывающий агент представляет собой сульфат аммония.

[0024] В некоторых вариантах реализации липосомальная композиция содержит соль соединения, представляющую собой сульфат, цитрат, сукрозофат, соль с фосфорилированным или сульфатированным полиолом или соль с фосфорилированным или сульфатированным полианионным полимером. В некоторых вариантах реализации липосомальная композиция содержит сульфатную соль соединения.

[0025] В некоторых вариантах реализации соединение в липосомальной везикуле имеет растворимость в воде менее 1 мг/мл. В некоторых вариантах реализации соединение в липосомальной везикуле имеет растворимость в воде менее 0,1 мг/мл.

[0026] В некоторых вариантах реализации липосомальная везикула содержит мембрану, содержащую фосфатидилхолин и холестерин. В некоторых вариантах реализации липосомальная везикула содержит мембрану, содержащую фосфатидилхолин и холестерин, где мембрана отделяет внутреннюю часть липосомальных везикул от водной среды. В некоторых вариантах реализации фосфатидилхолин представляет собой дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) или гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC). В некоторых вариантах реализации молярное соотношение фосфатидилхолина к холестерину составляет от примерно 60:40 до 35:65. В некоторых вариантах реализации молярное соотношение фосфатидилхолина к холестерину составляет от примерно 55:45 до примерно 35:65. В некоторых вариантах реализации молярное соотношение фосфатидилхолина к холестерину составляет от примерно 50:50 до примерно 40:60.

[0027] В некоторых вариантах реализации молярное соотношение фосфатидилхолина к холестерину составляет от примерно 50:50 до примерно 45:55.

[0028] В некоторых вариантах реализации мембрана дополнительно содержит липид, конъюгированный с полимером.

[0029] В некоторых вариантах реализации липосомальная везикула содержит HSPC, холестерин и липид, конъюгированный с полимером, в молярном соотношении примерно 55:45:2,75.

[0030] В некоторых вариантах реализации липид, конъюгированный с полимером, представляет собой PEG(мол. масса 2000)-дистеароилглицерин (PEG-DSG) или PEG(мол. масса 2000)-дистеароилфосфатидилэтаноламин (PEG-DSPE).

[0031] В некоторых вариантах реализации липосомы в липосомальной композиции имеют Z-средний размер частиц от примерно 80 до примерно 130 нм.

[0032] В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой жидкий

фармацевтический состав для парентерального введения.

[0033] Другие аспекты изобретения относятся к способу лечения бактериальной инфекции, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества липосомальной композиции, представленной в настоящем документе.

[0034] В некоторых вариантах реализации бактериальная инфекция представляет собой инфекцию *Mycobacterium tuberculosis*. В некоторых вариантах реализации соединение в липосомальной везикуле имеет минимальную ингибирующую концентрацию (МИС) в пределах от примерно 0,01 мкг/мл до примерно 0,25 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации соединение в липосомальной везикуле имеет минимальную ингибирующую концентрацию (МИС) в пределах от примерно 0,01 мкг/мл до примерно 0,1 мкг/мл.

[0035] В некоторых вариантах реализации липосомальную композицию вводят парентерально.

[0036] В некоторых вариантах реализации способ включает введение одновременно или последовательно одного или более дополнительного активного агента. В некоторых вариантах реализации один или более активных агентов включают бедаквилин, претоманид, пиразинамид, моксифлоксацин, их фармацевтически приемлемую соль или их комбинацию.

[0037] В некоторых вариантах реализации липосомальную композицию вводят от одного раза в неделю до одного раза каждые шесть недель.

[0038] В некоторых вариантах реализации процентное содержание соединения, остающегося в крови, превышает 20% введенного количества через 6 часов после введения субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах реализации процентное содержание соединения, остающегося в крови, превышает 10% от введенного количества.

[0039] Аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения липосомальной композиции, включающему стадии: (i) получение липосом, содержащих фосфолипид, холестерин и PEG-липид, и имеющих внутреннюю полость, содержащее захватывающий агент, в среде, практически не содержащей захватывающий агент; (ii) приведение липосом в контакт с соединением по любому из п.п. 1-8 в водной среде для инкапсулирования указанного соединения в липосомы; (iii) удаление неинкапсулированного соединения; и (iv) получение липосом в физиологически приемлемой среде, подходящей для парентерального применения.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0040] На Фиг. 1 представлен график, показывающий влияние pH на загрузку липосом соединениями AKG-3, AKG-5 и AKG-16.

[0041] На Фиг. 2А и Фиг. 2В представлены графики, показывающие инкапсуляцию соединений AKG-3, AKG-5 и AKG-16 в липосомы с захватывающим агентом TEA-SOS при различных соотношениях лекарственного средства к липиду (DL). На Фиг. 2А показано влияние соотношения добавленного лекарственного средства к липиду (DL<sub>0</sub>) в граммах лекарственного средства на моль липосомального фосфолипида (PhL) на загрузку липосомы, выраженное как отношение лекарственного средства к липиду (DL) после загрузки. На Фиг. 2В показано влияние соотношения DL<sub>0</sub> (соотношение количества введенного лекарственного средства к липиду) на эффективность липосомальной загрузки, рассчитанное как процент DL после загрузки относительно DL<sub>0</sub>.

[0042] На Фиг. 3А, Фиг. 3В, Фиг. 3С и Фиг. 3D представлены графики, показывающие инкапсуляцию соединений AKG-3, AKG-5 и AKG-16 в липосомы с 0,5 М сульфата аммония в качестве захватывающего агента при различных соотношениях DL. На Фиг. 3А показано влияние соотношения DL<sub>0</sub> на загрузку липосом для AKG-5 и AKG-16. На Фиг. 3В показано влияние соотношения DL<sub>0</sub> на эффективность загрузки липосом для AKG-5 и AKG-16. На Фиг. 3С показано влияние соотношения DL<sub>0</sub> на загрузку липосом для AKG-3. На Фиг. 3D показано влияние соотношения DL<sub>0</sub> на эффективность загрузки липосом для AKG-3.

[0043] На Фиг. 4А и Фиг. 4В представлены графики, показывающие инкапсуляцию AKG-28 и AKG-38 с TEA-SOS и сульфатом аммония в качестве захватывающих агентов при различных соотношениях DL<sub>0</sub>. На Фиг. 4А показано влияние соотношения DL<sub>0</sub> на загрузку липосом. На Фиг. 4В показано влияние соотношения DL<sub>0</sub> на эффективность загрузки.

[0044] На Фиг. 5А, Фиг. 5В, Фиг. 5С и Фиг. 5D представлены графики, показывающие зависимость быстрой утечки лекарственного средства из липосом, инкапсулирующих соединения AKG-28 (Фиг. 5А, Фиг. 5С) и AKG-38 (Фиг. 5В, Фиг. 5D), в результате контакта *in vitro* с плазмой крови мыши (обозначено как «мышь») или человека (обозначено как «человек»), как описано в Примере 19 ниже. Липосомы содержали 5 моль% PEG(2000)-DSPE (обозначено как «DSPE») или PEG-DSG (обозначено как «DSG»). Захватывающие агенты: 0,5 М сульфата аммония (AS) (Фиг. 5А, Фиг. 5В), 1 н. триэтиламмония сахарозы октасульфат (TEA-SOS) (Фиг. 5С, Фиг. 5D).

[0045] На Фиг. 6 представлена пронумерованная кольцевая структура соединения Формулы I.

[0046] На Фиг. 7 представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства у крыс Sprague-Dawley после введения однократной внутривенной дозы (IV x 1) Ls-АКG28 в количестве 10 мг/кг (ромбы), 20 мг/кг (квадраты) и 40 мг/кг (кружки). Для сравнения также была включена кривая зависимости концентрации в плазме от времени для линезолида в дозе 50 мг/кг (однократная пероральная доза, PO x 1) в 5% метилцеллюлозе (рН 3-4). Среднее значение и концентрация SD представлены для каждой временной точки.

[0047] На Фиг. 8 представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства у крыс Sprague-Dawley после введения однократной внутривенной дозы (IV x 1) Ls-АКG38 в количестве 20 мг/кг (ромбы), 40 мг/кг (квадраты) и 80 мг/кг (кружки). Для сравнения также была включена кривая зависимости концентрации в плазме от времени для линезолида в дозе 50 мг/кг (однократная пероральная доза, PO x 1) в 5% метилцеллюлозе (рН 3-4). Среднее значение и концентрация SD представлены для каждой временной точки.

[0048] На Фиг. 9А, Фиг. 9В и Фиг. 9С представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства у крыс Sprague-Dawley после введения Ls-АКG28 в дозе 10 мг/кг (Фиг. 9А), 20 мг/кг (Фиг. 9В) и 40 мг/кг (Фиг. 9С), IV x 1, в 1 день (кружки), 15 день (квадраты), 29 день (ромбы) и 43 день (треугольники). Среднее значение и концентрация SD представлены для каждой временной точки.

[0049] На Фиг. 10А, Фиг. 10В и Фиг. 10С представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства у крыс Sprague-Dawley после введения Ls-АКG38 в дозе 20 мг/кг (Фиг. 10А), 40 мг/кг (Фиг. 10В) и 80 мг/кг (Фиг. 10С), IV x 1, в 1 день (кружки), 15 день (квадраты), 29 день (ромбы) и 43 день (треугольники). Среднее значение и концентрация SD представлены для каждой временной точки.

[0050] На Фиг. 11А, Фиг. 11В и Фиг. 11С представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени как липида (с применением необменной метки DiC18(3)-DS), лекарственного средства для липосомального АКG-28 (Фиг. 11А) и липосомального АКG-38 (Фиг. 11В), так и изменения соотношения лекарственного средства к липиду в плазме, показатель скорости высвобождения лекарственного средства из липосом как для Ls-АКG28, так и для Ls-АКG38 (Фиг. 11С) у мышей CD-1 после однократной внутривенной инъекции мышам CD-1. Среднее значение и SD представлены для каждой временной точки.

[0051] Фиг. 12 представляет собой график, показывающий концентрацию лекарственного средства в плазме, представленную в виде % вводимой дозы для Ls-AKG28 и Ls-AKG38, при сравнении нескольких составов липосомального АКГ-28 и липосомального АКГ-38 после первой и четвертой еженедельных доз. Мышам вводили указанную дозу и состав один раз в неделю, всего 4 инъекции.

[0052] На Фиг. 13А представлены кривые, показывающие влияние увеличения дозы Ls-AKG28 на массу тела у самок мышей CD-1 с течением времени.

[0053] На Фиг. 13В представлены кривые, показывающие влияние увеличения дозы Ls-AKG38 на массу тела у самок мышей CD-1 с течением времени.

[0054] На Фиг. 13С представлены графики, показывающие влияние Ls-AKG28 и Ls-AKG38 в комбинации с ВР или ВРМ на гематологические (RBC, HTC, PLT, WBC) и биохимические параметры крови (ALT, AST) у самок мышей CD-1.

[0055] На Фиг. 13D представлена тепловая карта, показывающая влияние монотерапии Ls-AKG28 или Ls-AKG38 на патологические изменения в тканях у самок мышей CD-1.

[0056] На Фиг. 14А представлены кривые, показывающие влияние Ls-AKG28 в комбинации с бедаквилином и претоманидом (ВР) или бедаквилином, претоманидом и моксифлоксацином (ВРМ) на массу тела у самок мышей CD-1 с течением времени.

[0057] На Фиг. 14В представлены кривые, показывающие влияние Ls-AKG38 в комбинации с ВР или ВРМ на массу тела у самок мышей CD-1 с течением времени.

[0058] На Фиг. 14С представлены графики, показывающие влияние Ls-AKG28 и Ls-AKG38 в комбинации с ВР или ВРМ на гематологические (RBC, HTC, PLT, WBC) и биохимические параметры крови (ALT, AST) у самок мышей CD-1.

[0059] На Фиг. 14D представлена тепловая карта, показывающая влияние Ls-AKG28 и Ls-AKG38 в комбинации с ВР или ВРМ на патологические изменения в тканях у самок мышей CD-1.

[0060] На Фиг. 15А представлены графики, показывающие изменение массы тела у самок мышей CD-1, получавших Ls-AKG28 два раза в неделю (2qw) в дозе 50 мг/кг или один раз в неделю (1qw) в дозе 100 мг/кг отдельно или в комбинации с ВР, с течением времени.

[0061] На Фиг. 15В представлены графики, показывающие изменение массы тела у самок мышей CD-1, получавших Ls-AKG38 2 раза в неделю в дозе 100 мг/кг или 1 раз в неделю в дозе 200 мг/кг отдельно или в комбинации с ВР.

[0062] На Фиг. 15С представлены графики, показывающие гематологические и биохимические параметры крови у самок мышей CD-1, получавших Ls-АКG28 (2 раза в неделю в дозе 50 мг/кг или 1 раз в неделю в дозе 100 мг/кг) или Ls-АКG28 (2 раза в неделю в дозе 100 мг/кг или 1 раз в неделю в дозе 200 мг/кг) отдельно или в комбинации с ВР.

[0063] На Фиг. 15D представлена тепловая карта, показывающая результаты патогистологического исследования у самок мышей CD-1, получавших Ls-АКG28 (2 раза в неделю в дозе 50 мг/кг или 1 раз в неделю в дозе 100 мг/кг) или Ls-АКG28 (2 раза в неделю в дозе 100 мг/кг или 1 раз в неделю в дозе 200 мг/кг) отдельно или в комбинации с ВР.

[0064] На Фиг. 16А представлен график, показывающий влияние Ls-АКG28 на массу тела у самцов крыс Sprague-Dawley, получавших постоянное лечение в течение в общей сложности восьми недель, с течением времени.

[0065] На Фиг. 16В представлен график, показывающий влияние Ls-АКG38 на массу тела у самцов крыс Sprague-Dawley, получавших постоянное лечение в течение в общей сложности восьми недель, с течением времени.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0066] Следует понимать, что как предшествующее краткое описание, так и последующее подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают композиции и способы согласно настоящему изобретению.

[0067] В настоящем документе раскрыты соединения, композиции и способы, относящиеся к лечению бактериальных инфекций. В контексте настоящего изобретения термины «соединение» и «лекарственное средство» применяются взаимозаменяемо. Некоторые аспекты изобретения относятся к новым аминоалкильным производным оксазолидинонов. Некоторые аспекты изобретения относятся к способу синтеза новых аминоалкильных производных оксазолидиноновых соединений. Другие аспекты относятся к композициям, содержащим аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений в липосомах. Другие аспекты изобретения относятся к применению аминоалкильных производных оксазолидиноновых соединений или липосомальных композиций, содержащих аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений, при лечении бактериальных инфекций. В некоторых вариантах реализации соединения и композиции, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения инфекций, вызванных микобактериями и грамположительными бактериями. В некоторых вариантах реализации бактериальная

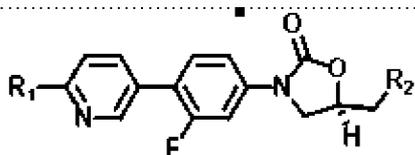
инфекция вызвана микобактерией туберкулеза. В некоторых вариантах реализации соединения и композиции, описанные в настоящем документе, ингибируют рост микобактерий и грамположительных бактерий. Они включают, но не ограничиваются ими, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium mucogenicum*, стрептококки, ванкомицин-резистентные энтерококки (VRE), метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, стрептококки группы viridans, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia* и *Corynebacterium*.

[0068] В некоторых вариантах реализации аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений, описанные в настоящем документе, являются селективно активными в отношении микобактерий туберкулеза по сравнению с клетками млекопитающего, такими как клетки почки или гепатоциты человека. В некоторых вариантах реализации аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений, описанные в настоящем документе, проявляют неожиданно высокую селективность, по меньшей мере 1000-кратную по отношению к микобактериям туберкулеза по сравнению с клетками млекопитающего, такими как клетки почки или гепатоциты млекопитающего. В некоторых вариантах реализации аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений, описанные в настоящем документе, проявляют неожиданно высокую селективность, по меньшей мере 100-кратную. В некоторых вариантах реализации аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений, описанные в настоящем документе, проявляют неожиданно высокую селективность от 100 до 6500-кратную, от 100 до 6000-кратную, от 100 до 5500-кратную, от 100 до 5000-кратную, от 100 до 4500-кратную, от 100 до 4000-кратную, от 100 до 3500-кратную, от 100 до 3000-кратную, от 100 до 2500-кратную, от 100 до 2000-кратную, от 100 до 1500-кратную, от 100 до 1000-кратную, от 500 до 6500-кратную, от 500 до 6000-кратную, от 500 до 5500-кратную, от 500 до 5000-кратную, от 500 до 4500-кратную, от 500 до 4000-кратную, от 500 до 3500-кратную, от 500 до 3000-кратную, от 500 до 2500-кратную, от 500 до 2000-кратную, от 500 до 1500-кратную, от 500 до 1000-кратную, от 1000 до 6500-кратную, от 1000 до 6000-кратную, от 1000 до 5500-кратную, от 1000 до 5000-кратную, от 1000 до 4500-кратную, от 1000 до 4000-кратную, от 1000 до 3500-кратную, от 1000 до 3000-кратную, от 1000 до 2500-кратную, от 1000 до 2000-кратную, от 1000 до 1500-кратную по отношению к микобактериям туберкулеза по

сравнению с клетками млекопитающего, такими как клетки почки или гепатоциты млекопитающего.

[0069] В некоторых вариантах реализации соединения и композиции, описанные в настоящем документе, могут способствовать избирательному поглощению макрофагами, находящимися в микобактериях, в печени, селезенке или легких, помогая обеспечить эффективное внутриклеточное уничтожение. Макрофаги отвечают за удаление чужеродных частиц посредством фагоцитоза, включая как чужеродные инфекционные агенты, такие как микобактерии, так и наночастицы лабораторного происхождения, такие как липосомы. Это приводит к возможности совместной локализации обоих в одном и том же биологическом резервуаре, что способствует эффективному концентрированию активного агента в важном депо в случае заболевания.

[0070] Аспекты изобретения относятся к соединениям, которые представляют собой аминоалкильные производные оксазолидинонов (см. **Фиг. 6**). В некоторых вариантах реализации соединения, имеющие следующую химическую **Формулу I**, и их фармацевтически приемлемые соли:

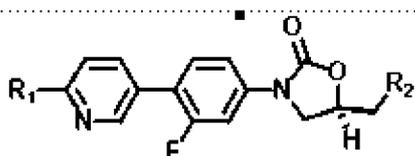


**Формула I,**

где  $R_2$  представляет собой амин ( $NH_2$ ) или ацетамид ( $NHCOCH_3$ ), и

где  $R_1$  представляет собой тетразольное кольцо, замещенное аминоалкилом в положении 2'.

[0071] В других вариантах реализации соединения, имеющие следующую химическую **Формулу I**, и их фармацевтически приемлемые соли:



**Формула I,**

где  $R_2$  представляет собой амин ( $NH_2$ ) или ацетамид ( $NHCOCH_3$ ), и

где  $R_1$  представляет собой тетразольное кольцо, замещенное аминоалкильной группой в положении 1'.

[0072] В некоторых вариантах реализации аминоалкил представляет собой

диметиламиноалкил. В некоторых вариантах реализации аминокильные производные оксазолидиноновых соединений включают либо аминую, либо ацетамидную группу в положениях R<sub>2</sub> оксазолидинонового кольца и диметиламиноэтильную группу в тетразольном кольце.

[0073] Настоящее изобретение демонстрирует конкретную взаимосвязь структура-активность (SAR) для аминокильных производных оксазолидиноновых соединений, описанных в настоящем документе, которые содержат либо аминую, либо ацетамидную группу в положениях R<sub>2</sub> оксазолидинонового кольца и диметиламиноэтильную группу в тетразольном кольце. Эти соединения являются (1) высокоселективными в отношении микобактерий туберкулеза по сравнению с активностью в клетках млекопитающего (например, в клетках почек или гепатоцитах человека), (2) высокоактивными в отношении микобактерий туберкулеза и (3) эффективно загружаются в липосомы.

[0074] В некоторых вариантах реализации аминокильные производные оксазолидинонов, описанные в настоящем документе, загружают в липосомы с эффективностью 85% или выше с применением способов загрузки лекарственного средства на основе градиента. В некоторых вариантах реализации эффективность загрузки этих производных составляет 90% или более. В некоторых вариантах загрузка этих производных составляет 95% или более или даже является количественной. В некоторых вариантах реализации описаны способы загрузки аминокильных производных оксазолидинонов в липосомы. В некоторых вариантах реализации в способах загрузки применяются трансмембранные градиенты и захватывающие агенты для эффективной загрузки и последующей стабилизации слабоосновных амфипатических лекарственных средств во внутренней водной полости липосом. Градиенты могут включать (1) простые градиенты pH, образованные, например, с применением растворов лимонной кислоты, (2) градиенты ионов аммония с применением цитратных или сульфатно-аммониевых солей, (3) алкильные, диалкильные или триалкиламмониевые соли, (4) градиенты переходных металлов (Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) или даже (5) трансмембранные градиенты растворимости лекарственных средств. См. патенты США № 5,316,771, 5,800,833, 8,147,867, 7,744,921, 8,349,360, 6,110,491, публикацию заявки на патент США № 20180369143A1 и публикацию Международной заявки на патент № WO199001405, содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. См. также Allen et al. (1995) *Int J Cancer* 62:199-204. Не ограничиваясь теорией, катион, содержащийся внутри липосомы, играет роль в установлении градиента pH через мембрану, что способствует накоплению

слабоосновных лекарственных средств внутри липосомы, или непосредственно обменивается с молекулой лекарственного средства. Это приводит в некоторых вариантах реализации к количественной загрузке лекарственного средства ниже общего потенциала градиента. Противоион может играть важную роль в стабилизации состава для предотвращения преждевременного просачивания в кровоток или во время хранения путем образования стабильных комплексов с лекарственными средствами внутри липосомы (см. Drummond et al. (2008) J. Pharm Sci 97, 4696-4740).

### **Определения**

[0075] Для удобства здесь собраны некоторые термины, применяемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[0076] В контексте настоящего изобретения следующие термины и фразы имеют следующие значения:

[0077] В контексте настоящего изобретения форма единственного числа «элемент» означает один элемент или более, чем один элемент (то есть по меньшей мере один).

[0078] В контексте настоящего изобретения термин «содержащий» или «содержит» применяется в отношении композиций, способов и их соответствующего компонента (компонентов), которые присутствуют в данном варианте реализации, но в то же время допускают включение неуказанных элементов.

[0079] В контексте настоящего изобретения термин «состоящий по существу из» относится к тем элементам, которые требуются для данного варианта осуществления. Термин допускает наличие дополнительных элементов, которые существенно не влияют на основную и новую или функциональную характеристику (характеристики) этого варианта осуществления изобретения.

[0080] Термин «состоящий из» относится к композициям, способам и их соответствующим компонентам, как описано в настоящем документе, которые исключают любой элемент, не упомянутый в этом описании варианта осуществления.

[0081] Термин «содержащий», применяемый в описании, включает «состоящий из» и «состоящий по существу из».

[0082] Если в описании указано «как упомянуто выше» или «упомянуто выше», «выше», это относится к любому из признаков, описанных в рамках описания на любой из предыдущих страниц.

[0083] Если в описании указано «как упомянуто в настоящем документе», «описано в настоящем документе», «представлено в настоящем документе» или «как упомянуто в настоящем тексте» или «указано в настоящем документе», это относится к любому из признаков, описанных в рамках описания на любой из предыдущих или последующих страниц.

[0084] В контексте настоящего изобретения термин «примерно» означает допустимые отклонения в пределах 20%, в пределах 10% и в пределах 5% от определенного значения. В некоторых вариантах реализации «примерно» может означать изменение +/-1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% или 20%.

[0085] Термин «эффективное количество» в контексте настоящего изобретения в отношении соединения или композиции означает количество активного соединения (также именуемого в настоящем документе как активный агент или лекарственное средство), достаточное для оказания бактерицидного или бактериостатического действия. В одном варианте реализации эффективное количество представляет собой «терапевтически эффективное количество», означающее количество активного соединения, достаточное для облегчения симптомов бактериальной инфекции, подлежащей лечению.

[0086] Термин «субъект» (или, альтернативно, «пациент») в контексте настоящего изобретения относится к животному, предпочтительно, млекопитающему, наиболее предпочтительно, человеку, которое получает либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[0087] Термин «введение» или «применение» в контексте настоящего изобретения включает все способы введения соединений или фармацевтических композиций субъекту, нуждающемуся в этом, включая, но не ограничиваясь ими, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутривентрикулярный, подкожный, трансдермальный, ингаляционный, трансбуккальный, глазной, подъязычный, вагинальный, ректальный и тому подобное. Введение соединения или композиции подходящим образом является парентеральным. Например, соединения или композиция могут предпочтительно быть введены внутривенно, но также могут быть введены внутривентрикулярно или путем ингаляции, как это применяется в настоящее время в клинической практике для липосомального амикацина при лечении

*Mycobacterium avium* (см. Shirley et al., Amikacin Liposome Inhalation Suspension: A Review in *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *Drugs*. 2019 Apr; 79(5):555-562).

[0088] Термины «лечить», «лечение» и «терапия» в контексте настоящего изобретения относятся к терапевтическим или профилактическим мерам, таким как описанные в настоящем документе.

[0089] Термины «синергизм» и «синергический» в контексте настоящего изобретения означают, что эффект, достигаемый при совместном применении соединений, больше, чем сумма эффектов, возникающих при применении соединений по отдельности, то есть, больше, чем можно было бы предположить, исходя из обоих активных ингредиентов, вводимых по отдельности.

[0090] Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к относительно нетоксичной, неорганической или органической соли присоединения кислоты соединения согласно настоящему изобретению, которая обладает целевой фармакологической активностью.

[0091] Термин «алкил» означает насыщенные углеродные цепи, которые могут быть линейными или разветвленными или их комбинациями, если углеродная цепь не определена иначе. Примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, втор- и трет-бутил, пентил, гексил, гептил, октил и тому подобное.

[0092] Термин «аминоалкил» означает алкил, в котором по меньшей мере один атом углерода алкильной углеродной цепи образует связь с аминогруппой, где указанная аминогруппа представляет собой первичную аминогруппу, моноалкилзамещенную (вторичную) аминогруппу, диалкилзамещенную (третичную) аминогруппу или алкилзамещенную аминогруппу, где атом азота амина и алкильная цепь, замещающая атомы водорода амина, образуют гетероцикл.

[0093] Термин «липосомы» означает везикулы, состоящие из бислоя (моноламеллярные) и/или концентрических рядов множественных бислоев (мультиламеллярные), разделенных водными промежутками, образованными амфипатическими молекулами, такими как фосфолипиды, которые окружают центральный водный компартмент. В липосомальном лекарственном средстве лекарственное вещество обычно содержится в липосомах. Как правило, водорастворимые лекарственные средства содержатся в водной (водных) полости (полостях), и гидрофобные лекарственные средства содержатся в липидном бислое (бислоях) липосом. Высвобождение лекарственных средств из липосомальных составов, помимо других характеристик, таких как липосомальный клиренс и период полувыведения из кровотока,

может быть модифицировано присутствием в липосоме полиэтиленгликоля и/или холестерина или других потенциальных добавок.

[0094] «Моноламеллярные липосомы», также называемые «моноламеллярными везикулами», представляют собой липосомы, которые включают одну бислойную липидную мембрану, которая образует один замкнутый водный промежуток. Бислойная мембрана включает два слоя липидов; внутренний слой и внешний слой (листок). Молекулы липидов во внешнем слое ориентированы своими гидрофильными («головными») частями по направлению к внешней водной среде и своими гидрофобными («хвостовыми») частями направлены вниз, внутрь липосомы. Внутренний слой липидов лежит непосредственно под внешним слоем, липиды ориентированы своими головками к водной внутренней части липосомы и хвостами по направлению к хвостам внешнего слоя липидов.

[0095] «Мультиламеллярные липосомы», также называемые «мультиламеллярными везикулами» или «многослойными ламеллярными везикулами», включают более одной липидной бислойной мембраны, при этом мембраны образуют более одного закрытого водного промежутка. Мембраны расположены концентрически таким образом, что различные мембраны разделены водными промежутками.

[0096] Термины «инкапсуляция» и «захватывающий» в контексте настоящего изобретения относятся к включению или ассоциации оксазолидинонового фармацевтического агента в липосому или с ней.

[0097] Термины «DL», «соотношение DL», «D/L» или «соотношение D/L» применяются взаимозаменяемо и относятся к отношению лекарственного средства к липиду липосом. Если не указано иное, его выражают в граммах лекарственного средства на моль липосомального фосфолипида (PhL).

[0098] Термин «моль%» в отношении холестерина относится к молярному количеству холестерина по отношению к сумме молярных количеств холестерина и непегилированного фосфолипида, выраженному в процентах. Например, «55 моль% холестерина» в липосоме, содержащей холестерин и HSPC, относится к составу 55 мольных частей холестерина на 45 мольных частей HSPC.

[0099] Термин «моль%» в отношении PEG-липидов относится к соотношению молярного количества PEG-липидов и непегилированного фосфолипида, выраженному в процентах. Например, «5 моль% PEG-DSPE» в липосоме, содержащей HSPC и PEG-DSPE, относится к композиции, содержащей 5 мольных частей PEG-DSPE на 100 мольных частей HSPC.

[00100] Термины «октасульфат сахарозы», «сукрозофат» и «сукрооктасульфат» относятся к одному и тому же соединению, сахарозооктасерной кислоте или ее аниону, и применяются в данном документе взаимозаменяемо.

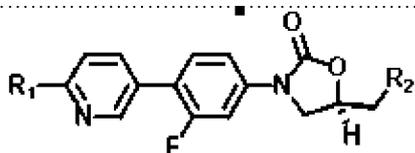
[00101] Символы «Ac», «Me» и «Et», встречающиеся в химических формулах, относятся к ацетильной группе (CH<sub>3</sub>CO), метильной группе (CH<sub>3</sub>) и этильной группе (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) соответственно.

[00102] Различные аспекты и варианты осуществления описаны более подробно в следующих подразделах.

### **Соединения**

[00103] Оксазолидиноны представляют собой синтетические антибиотики, которые осуществляют свою функцию путем ингибирования синтеза белка. Линезолид (LZD) представляет собой оксазолидиноновое соединение, которое проявляет бактериостатическую активность в отношении *M. tuberculosis*. Однако введение LZD может вызвать серьезные побочные эффекты, такие как анемия, тромбоцитопения и периферическая нейропатия. Тедизолид представляет собой оксазолидиноновое соединение, которое, как было показано, ингибирует грамположительные бактерии. Побочные эффекты тедизолида фосфата аналогичны, но, как правило, менее серьезны, чем наблюдаемые для линезолида, хотя опыт длительного применения тедизолида фосфата, например, необходимого для лечения туберкулеза, ограничен по сравнению с обширным опытом применения линезолида.

[00104] Аспекты изобретения относятся к соединениям, которые представляют собой аминоалкильные производные оксазолидинона (см. **Фиг. 6**). В некоторых вариантах реализации соединения, имеющие следующую химическую Формулу I, и их фармацевтически приемлемые соли:



Формула I

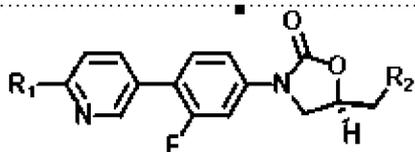
где R<sub>2</sub> представляет собой амин (NH<sub>2</sub>) или ацетамид (NHCOCH<sub>3</sub>),

где R<sub>1</sub> представляет собой тетразольное кольцо, замещенное аминоалкилом в положении 2'.

[00105] В некоторых вариантах реализации аминоалкил представляет собой диметиламиноалкил. В некоторых вариантах реализации аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений включают либо аминную, либо ацетамидную группу в

положениях  $R_2$  оксазолидинонового кольца и диметиламиноэтильную группу в тетразольном кольце.

[00106] В других вариантах реализации соединения, имеющие следующую химическую Формулу I, и их фармацевтически приемлемые соли:



Формула I

где  $R_2$  представляет собой амин ( $NH_2$ ) или ацетамид ( $NHCOCH_3$ ), и

где  $R_1$  представляет собой тетразольное кольцо, замещенное аминоалкилом в положении 1'.

[00107] Аминоалкильные производные оксазолидиноновых соединений, имеющие химическую структуру из Таблицы 1 ниже, были синтезированы, как описано в Примере 1.

[00108] Соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в свободной форме, например, в виде свободного основания, или в виде свободной кислоты, или в виде цвиттер-иона, или могут существовать в форме соли. Указанная соль может представлять собой любую соль, либо органическую, либо неорганическую соль присоединения или сокристалл, в частности, любую фармацевтически приемлемую органическую или неорганическую соль присоединения или сокристалл, обычно применяемые в фармации. Следует понимать, что химическая формула, представляющая соединение в форме конкретной соли или ионной форме, также раскрывает это соединение в его недиссоциированной форме свободного основания (или свободной кислоты).

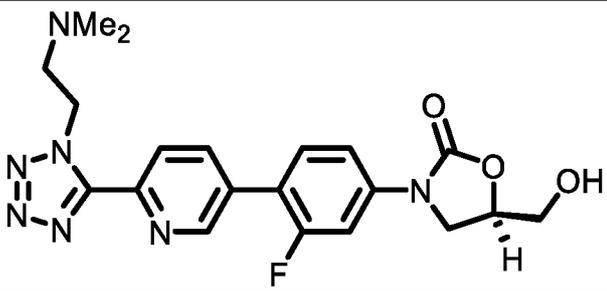
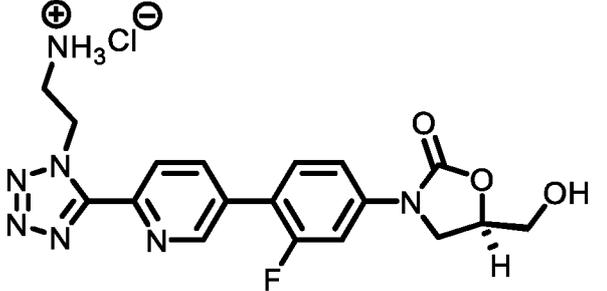
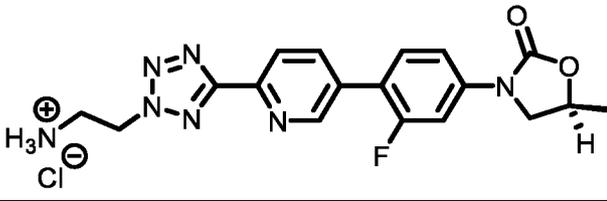
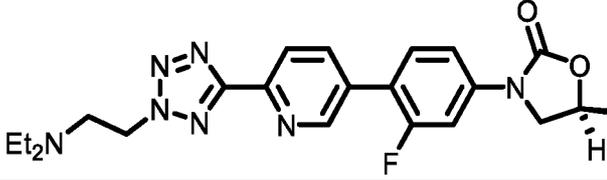
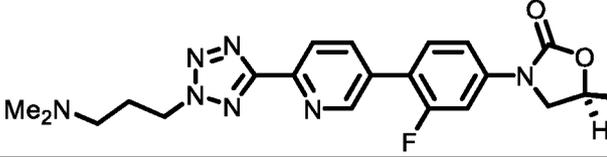
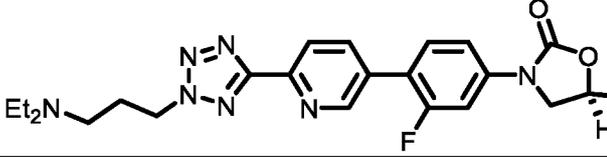
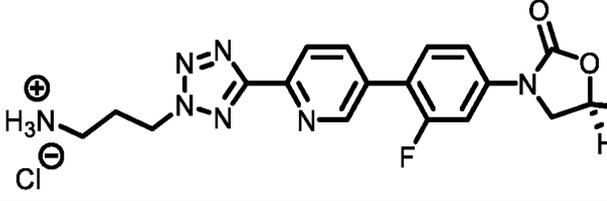
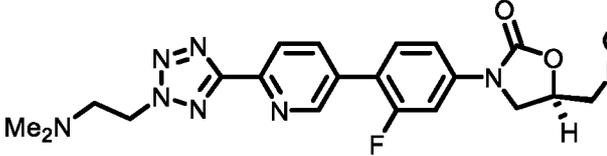
[00109] Настоящее изобретение охватывает все стереоизомерные формы соединений. В некоторых вариантах реализации соединения из Таблицы 1 ниже являются практически чистыми (то есть по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, например 100%).

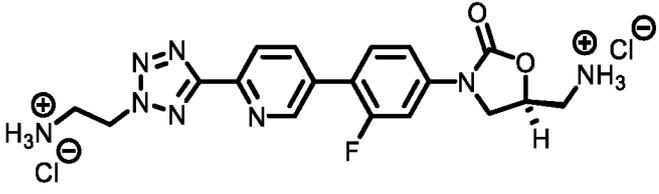
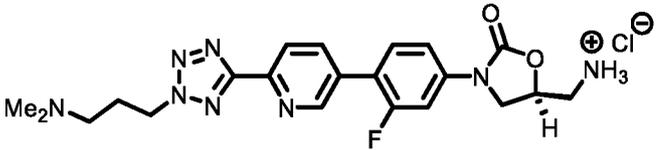
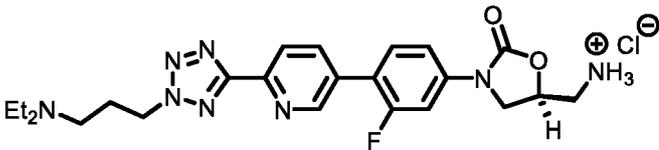
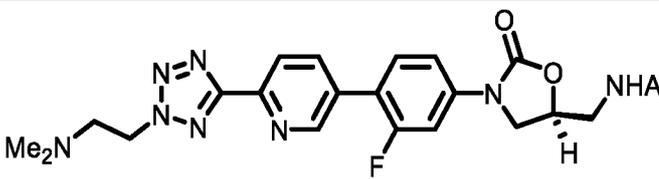
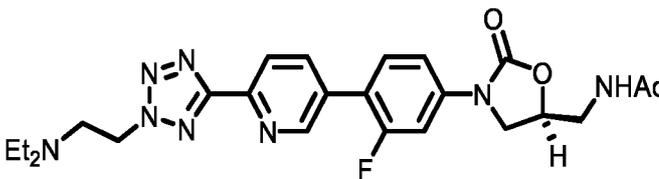
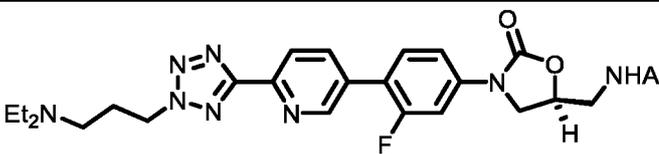
Таблица 1

Наименование	Структура
AKG-1	

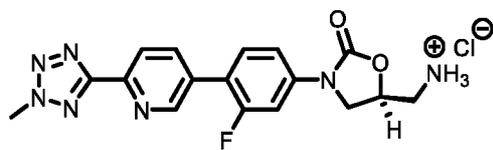
AKG-2	
AKG-3	
AKG-5	
AKG-6	
AKG-7	
AKG-8	
AKG-9	
AKG-11	
AKG-12	

AKG-13	
AKG-14	
AKG-15	
AKG-16	
AKG-17	
AKG-18	
AKG-19	
AKG-20	

AKG-21	
AKG-22	
AKG-23	
AKG-24	
AKG-25	
AKG-26	
AKG-27	
AKG-28	

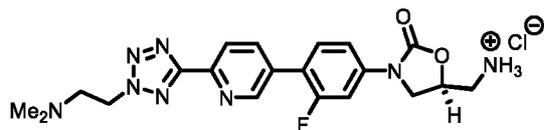
AKG-29	
AKG-30	
AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

[00110] В некоторых вариантах реализации соединения имеет следующую химическую формулу:



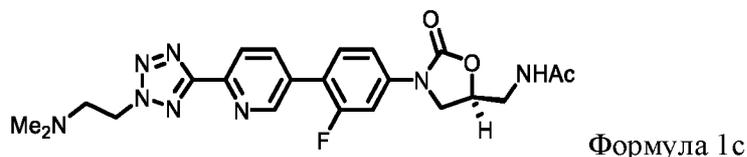
Формула 1a

[00111] В некоторых вариантах реализации соединения имеет следующую химическую формулу:

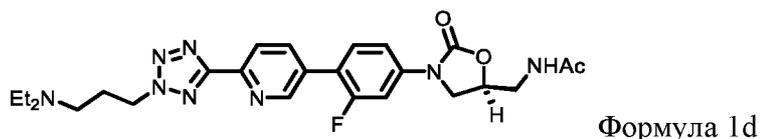


Формула 1b

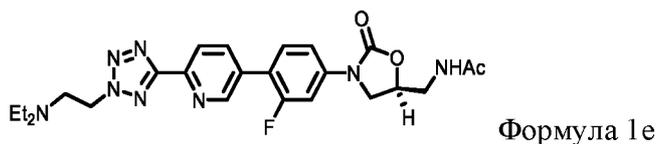
[00112] В некоторых вариантах реализации соединения имеет следующую химическую формулу:



[00113] В некоторых вариантах реализации соединения имеет следующую химическую формулу:



[00114] В некоторых вариантах реализации соединения имеет следующую химическую формулу:



[00115] В настоящем документе описаны соединения Формулы I или их фармацевтически приемлемые соли, которые являются полезными для лечения микобактериальных инфекций. В некоторых вариантах реализации соединения имеют химическую формулу 1a, 1b, 1c, 1d или 1e. В некоторых вариантах реализации соединения имеют химическую формулу 1b. В некоторых вариантах соединения Формулы I имеют минимальную ингибирующую концентрацию (МИС), например, в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, в пределах от 0,1 мкг/мл до 1 мкг/мл, от 0,25 мкг/мл до 1 мкг/мл, от 0,5 мкг/мл до 1 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до 0,25 мкг/мл, от 0,1 мкг/мл до 0,5 мкг/мл, от 0,25 мкг/мл до 0,5 мкг/мл, от 0,01 мкг/мл до 1 мкг/мл, от 0,01 мкг/мл до 0,25 мкг/мл, от 0,01 мкг/мл до 0,5 мкг/мл, от 0,01 мкг/мл до 0,1 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации соединения Формулы I имеют минимальную ингибирующую концентрацию (МИС), например, в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, менее 1 мкг/мл, менее 0,25 мкг/мл или менее 0,1 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации соединения Формулы I имеют МИС в пределах от 0,01 мкг/мл до 0,25 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации соединения Формулы I имеет МИС в пределах от 0,01 мкг/мл до 0,1 мкг/мл. Следует принять во внимание, что значения МИС могут быть ниже, чем диапазоны, представленные в настоящем документе, в зависимости от бактерий.

[00116] В некоторых вариантах реализации для лечения инфекции, вызванной микобактериями, например, *M. tuberculosis*, соединение (AKG-28 или AKG-38) имеет MIC ниже 0,1 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации для лечения инфекции, вызванной микобактериями, например, *M. tuberculosis*, соединение имеет индекс селективности (SI) для уничтожения *M. tuberculosis* по сравнению с клетками почки человека (VERO) по меньшей мере 1000. В некоторых вариантах реализации для лечения инфекции, вызванной микобактериями, например, *M. tuberculosis*, соединение имеет MIC ниже 0,1 мкг/мл и индекс селективности (SI) для уничтожения *M. tuberculosis* против клеток почки человека (VERO) по меньшей мере 1000. В некоторых вариантах реализации соединение имеет структуру AKG-28 (Формула 1b) или AKG-38 (Формула 1c). В некоторых вариантах реализации MIC составляет менее 0,05 мкг/мл, и индекс селективности для MIC у *M. tuberculosis* по отношению к ингибированию синтеза митохондриального белка (SI-MPS) превышает 20, в частности для AKG-28.

[00117] В некоторых вариантах реализации соединения, описанные в настоящем документе, имеют от 2 до 20-кратное увеличение (примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 16, примерно 17, примерно 18, примерно 19, примерно 20) эффективности скорректированной дозы по сравнению с линезолидом для *M. tuberculosis*.

[00118] В некоторых вариантах реализации для лечения инфекции, вызванной метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA), соединение имеет MIC против штаммов MRSA менее 2 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации для лечения инфекции, вызванной метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA), соединение имеет IC<sub>50</sub> более 100 мкг/мл против клеток почки человека VERO. В некоторых вариантах реализации для лечения инфекции, вызванной метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA), соединение имеет MIC против штаммов MRSA менее 2 мкг/мл и IC<sub>50</sub> более 100 мкг/мл против клеток почки человека VERO. В некоторых вариантах реализации соединение имеет структуру AKG-38 (Формула 1c), AKG-39 (Формула 1e) и AKG-40 (Формула 1d).

#### ***Растворимость в воде***

[00119] В некоторых вариантах реализации соединения находятся в форме солей, например, гидрохлоридной или мезилатной соли, и растворимы в воде при концентрации более 1 мг/мл, и, предпочтительно, более 10 мг/мл (и до 1 г/мл) перед инкапсуляцией в

липосомы. Дополнительные соли перед инкапсуляцией могут включать, но не ограничиваются ими, безилат, битартрат, карбонат, цитрат, эзилат, глюконат, глутамат, гликолят, лактат, малат, малеат, манделат, метилсульфат, напсилат, фосфат, пропионат, салицилат, сукцинат, тартрат и тозилат. В некоторых вариантах реализации соединения находятся в форме гидрата, или сольвата, или сокристалла перед инкапсуляцией в липосомы.

[00120] В некоторых вариантах реализации лекарственное средство заключено внутри липосом в форме другой соли с пониженной растворимостью в воде, например, менее 1 мг/мл и, предпочтительно, менее 0,1 мг/мл (0,1-0,001 мг/мл). Соль соединения, захваченная липосомами, включает, но не ограничивается ими, сульфат, цитрат, фосфат, сукрозофат или различные фосфорилированные или сульфатированные полиолы или полианионные полимеры. Примеры полиолов включают, но не ограничиваются ими, сахарозу, эритрит, маннит, ксилит, сорбит, инозитол и их комбинации. Примеры полианионных полимеров включают, но не ограничиваются ими, поливинилсульфонат, поливинилсульфат, полифосфат, сополимеры акриловой кислоты и сульфата винилового спирта и их комбинации.

[00121] Рабочие растворы соединений готовили следующим образом: к аликвоте соединения (свободного основания) в порошкообразной форме добавляли 1-1,5 эквивалента HCl в виде 1 н. водного раствора, и смесь перемешивали на вортексе (вихревым способом) до гомогенности. К полученному в результате осадку или сиропу, как правило, добавляли воду до конечной концентрации 10 мг/мл и наблюдали полное растворение. В некоторых случаях к лекарственному средству в форме свободного основания добавляли 0,95 эквивалента HCl и получали исходный раствор с концентрацией 20 мг/мл.

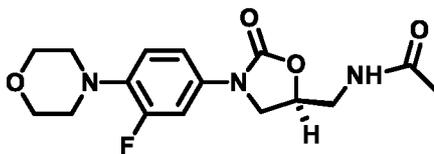
[00122] Растворимость в воде соединений согласно настоящему изобретению иллюстрируется следующими наблюдениями за получением визуально прозрачных растворов:

Соединение	Количество, мг	Объем добавленной 1 н. HCl, мл	Объем добавленной воды, мл	Концентрация свободного основания, % (об./об.)
AKG-16 (свободное основание)	22,3	0,052	-	30,0
AKG-28 (2HCl)	32,5	-	0,35	7,3

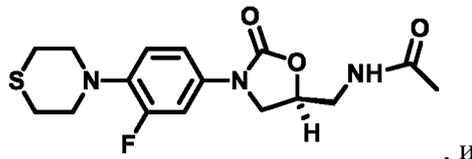
AKG-38 (свободное основание)	31,7	0,067	0,35	7,1
------------------------------------	------	-------	------	-----

[00123] Эти результаты показывают, что соединения, представленные в настоящем документе, имеют растворимость в воде, которая выше, чем известные растворимости в воде:

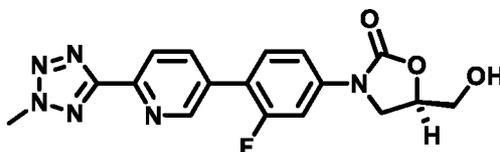
- линезолид (3 мг/мл) ([www.drugbank.ca/drugs/DB00601](http://www.drugbank.ca/drugs/DB00601))



- сутезолид (0,237 мг/мл) ([www.drugbank.ca/drugs/DB11905](http://www.drugbank.ca/drugs/DB11905))



- тедизолид (0,382 мг/мл) ([www.drugbank.ca/drugs/DB14569](http://www.drugbank.ca/drugs/DB14569))



[00124] В некоторых вариантах реализации растворимость в воде соединений, описанных в настоящем документе, перед инкапсуляцией в липосомы по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз или по меньшей мере в 40 раз превышает растворимость вышеуказанных оксазолидинонов.

[00125] Превосходная растворимость в воде соединений, описанных в настоящем документе, и их свойства амфифильных слабых оснований позволяют эффективно применять подход на основе трансмембранного градиента и внутрилипосомального комплексообразования (активная загрузка) для создания инкапсулированных в липосомы форм этих соединений с высоким соотношением лекарственное средство/носитель (лекарственное средство/липид) и фармакокинетическими свойствами, благоприятными для доставки инкапсулированного лекарственного средства в инфицированные ткани после системного введения лекарственного средства. В контексте настоящего изобретения амфифильное слабое основание имеет рКа от 7 до 12 и logP от 1 до 6.

### ***Параметры липосомальной загрузки и антимикобактериальная активность***

[00126] Важным отличительным признаком соединений, описанных в настоящем документе, является их свойство слабого амфифильного основания, которое облегчает трансмембранную градиентную загрузку этих соединений в липосомы. В некоторых вариантах реализации слабоосновное свойство соединений согласно настоящему изобретению характеризуется константой электролитической диссоциации  $pK_a$  в диапазоне 7,0-12,0, 7,5-11,0, 7,8-10,5 или 8,0-10,0. В некоторых вариантах реализации амфифильное свойство описанных здесь соединений характеризуется параметром  $\log P$  в диапазоне 0,5-5,0, 1,0-4,0, 1,0-3,5 или 1,0-3,0. Неожиданно было обнаружено, что некоторые варианты осуществления соединений, обладающих такими благоприятными свойствами в отношении загрузки липосом, также обладают превосходной активностью против микобактерий, которая соответствует или превосходит активность аналогичных соединений того же класса лекарственных средств, чьи свойства менее благоприятны для эффективной и стабильной инкапсуляции в липосомы.

### **Липосомальные композиции**

[00127] Описаны композиции и применение этих композиций для лечения туберкулеза, а также других микобактериальных и грамположительных бактериальных инфекций. Эти композиции, представленные в настоящем документе, содержат высокоактивный и селективный оксазолидинон, инкапсулированный с высокой эффективностью для максимизации потенциала дозирования низкотоксичных лекарственных средств, и стабильны в присутствии плазмы. В некоторых вариантах реализации композиции являются долго циркулирующими и сохраняют свое инкапсулированное лекарственное средство во время циркуляции после внутривенного введения, чтобы обеспечить эффективное накопление в месте бактериальной или микобактериальной инфекции. В некоторых вариантах реализации высокие дозы, которые могут быть достигнуты в сочетании со свойствами длительной циркуляции и высокостабильным захватом лекарственного средства, позволяют снизить частоту введения по сравнению с ежедневными или дважды в день введениями других лекарственных средств, обычно применяемых для лечения этих инфекций.

[00128] В настоящем документе описаны фармацевтические композиции для лечения бактериальных инфекций, в частности, инфекции *Mycobacterium tuberculosis*. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция представляет собой липосомальную

композицию, содержащую полианион или сульфатсодержащий полианион и соединение аминоклилоксазолидинона.

[00129] В некоторых вариантах реализации композиция содержит липосомы в среде, где внутренняя полость липосом содержит водную фазу с полианионом и соединение Формулы I. В некоторых вариантах реализации композиция содержит липосомы в среде, где внутренняя полость липосом содержит полианион или сульфатсодержащий полианион и соединение АКГ-16, АКГ-28 или АКГ-38. В некоторых вариантах реализации среда представляет собой водную среду, где основная композиция в этой среде представляет собой соединение Формулы I и соответствующий захватывающий агент.

[00130] Соединение Формулы I может быть инкапсулировано в липосому с помощью подходящего полианиона, такого как октасульфат сахарозы (например, полученный из триэтиламмония сахарозы октасульфата, градиенты (TEA-SOS)) или сульфат (например, полученный из градиентов сульфата аммония). Дополнительные полианионные захватывающие агенты включают, но не ограничиваются ими, инозитолгексафосфат, инозитолгексасульфат, поливинилсульфонат, декстрансульфат, цитрат, полифосфат и сурамин.

[00131] Внешняя водная среда обычно состоит из подходящего буфера и изотонического агента. Подходящие буферы могут включать гистидин, цитрат, HEPES, MOPS, MES, TRIS, фосфат, глицин, имидазол, борат, карбонат и сукцинат. Изотонические агенты могут включать соли, такие как хлорид натрия, хлорид калия, сахароза, глицерин, декстроза или маннит.

[00132] В некоторых вариантах реализации композиция содержит соединение Формулы I или Формулы 1a, 1b, 1c или 1d или его фармацевтически приемлемую соль, инкапсулированное с полианионом в преимущественно моноламеллярной везикуле, образованной из одного или более фосфолипида, стерола и необязательно липида, конъюгированного с гидрофильным полимером (полимер-конъюгированный липид). В некоторых вариантах реализации композиция может содержать соединение Формулы I или Формулы 1a, 1b, 1c или 1d или его фармацевтически приемлемую соль, инкапсулированное с полианионом в моноламеллярных и мультламеллярных везикулах (например, имеющих два или три слоя). Следует понимать, что мультламеллярные везикулы могут быть быстрее выведены из кровотока, чем моноламеллярные везикулы. В некоторых вариантах реализации фосфолипид представляет собой гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC),

дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) или яичный сфингомиелин (ESM). Термин «фосфолипид» в контексте настоящего документа относится к любому фосфолипиду или комбинации фосфолипидов, способных образовывать липосомы. Нейтральные фосфолипиды могут включать диацилфосфатидилхолины, диалкилфосфатидилхолины, сфингомиелины и диацилфосфатидилэтаноламины. Фосфатидилхолины (PC), в том числе полученные из яиц, соевых бобов или других растительных источников, или которые являются частично или полностью синтетическими, или с переменной длиной липидной цепи и ненасыщенностью, являются подходящими для применения в настоящих композициях. Синтетические, полусинтетические и натуральные фосфатидилхолины, включающие, но не ограничивающиеся ими, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC), соевый фосфатидилхолин (соевый PC), яичный фосфатидилхолин (яичный PC), гидрогенизированный яичный фосфатидилхолин (HEPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) и димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) являются подходящими фосфатидилхолинами для применения в настоящем изобретении. Заряженные фосфолипиды могут включать фосфатидилсерины, фосфатидные кислоты, фосфатидилинозитолы, фосфатидилглицерины, кардиолипины или липиды с модифицированной головной группой, такие как N-сукцинилфосфатидилэтаноламины, N-глутарилфосфатидилэтаноламины и PEG-производные фосфатидилэтаноламинов.

[00133] Конъюгированные с полимером липиды могут включать поли(этиленгликоль)-конъюгированные (пегилированные) фосфолипиды (PEG-липиды), такие как PEG(мол. масса 2000)-метокси(полиэтиленгликоль)-1,2-дистеароил-sn-глицерин (PEG(2000)-дистеароилглицерин, PEG-DSG), PEG(мол. масса 2000)-1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG(мол. масса 2000)-дистеароилфосфатидилэтаноламин, PEG-DSPE) или PEG(мол. масса 2000)-N-пальмитоилсфингозин-1-{сукцинил[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]} (PEG-церамид). Молекулярная масса доли PEG в PEG-липидном компоненте также может варьироваться от 500 до 10000 г/моль, от 1500 до 6000 г/моль, но предпочтительно составляет примерно 2000. Другие полимеры, применяемые для конъюгации с липидами, могут включать поли(2-метил-2-оксазолин) (PMOZ), поли(2-этил-2-оксазолин) (PEOZ), поли-N-винилпирролидон (PVP), полиглицерин, поли(гидроксиэтил-L-аспарагин) (PHEA) и поли(гидроксиэтил-L-глутамин) (PHEG).

[00134] В некоторых вариантах реализации стерол представляет собой холестерин. Другие иллюстративные стеролы включают, но не ограничиваются ими, эргостерол, фитостеролы, такие как  $\beta$ -ситостерол, и гопаноиды. В некоторых вариантах реализации соотношение фосфолипида(ов) и холестерина выбрано для обеспечения целевой величины жесткости липосомальной мембраны при сохранении достаточно уменьшенного количества утечки соединения Формулы I из липосомы. В некоторых вариантах реализации может быть добавлен необязательный липид, конъюгированный с полимером, для уменьшения тенденции к агрегации липосом. Тип и количество липида, конъюгированного с полимером, может быть выбран для обеспечения целевых уровней связывания с белком, липосомальной стабильности и времени циркуляции в крови. Например, липосомальная везикула содержит фосфатидилхолин (например, DSPC или HSPC) и холестерин в молярном соотношении примерно 45:55. Молярные соотношения фосфатидилхолина к холестерину могут варьироваться от примерно 60:40 до 35:65, от примерно 50:50 до 35:65, от примерно 50:50 до примерно 45:55. В частности, липосома может содержать везикулу, состоящую из HSPC, холестерина и липида, конъюгированного с полимером (PEG-DSG или PEG-DSPE), в молярном соотношении примерно 55:45:2,75, что соответствует концентрации PEG-липидов 5 моль% относительно концентрации фосфолипида. Концентрация PEG-липидов может варьироваться от 0,5 до 10 моль% относительно неPEG-липидов, с предпочтительным соотношением 3-10 моль% и еще более предпочтительным соотношением 4-8 моль%.

[00135] В некоторых вариантах реализации липосомальные композиции обеспечивают целевые фармакокинетические свойства, такие как увеличенный период полураспада в плазме, измеряемый как процентное содержание инъекционной дозы (ID) (или инъекционного количества), оставшейся в крови через 6 или через 24 часа после инъекции внутривенно у иммунокомпетентных мышей, и стабильная инкапсуляция лекарственного средства в течение 24 часов в плазме, определяемая изменениями в соотношении лекарственного средства к липиду (соотношение DL) после введения внутривенно у мышей. В некоторых вариантах реализации процентное содержание лекарственного средства, оставшегося в крови, превышает 20%, предпочтительно превышает 30%, и наиболее предпочтительно превышает 40% инъекционной дозы через 6 часов. Процентное содержание, сохраняющееся в крови через 24 часа, предпочтительно превышает 10% и, более предпочтительно, превышает 20% введенной дозы. Соотношение DL превышает 20% через 24 часа, предпочтительно, превышает

50% и, наиболее предпочтительно, превышает 80% от первоначально введенного липосомального лекарственного средства. Целевые липосомальные композиции также демонстрируют стабильную инкапсуляцию в присутствии плазмы человека *in vitro* с применением методики «взрывного» высвобождения, при этом липосомы сохраняют более 50% лекарственного средства в течение 20 минут, более 60%, более 70%, предпочтительно, более 80% и, наиболее предпочтительно, более 90% инкапсулированного лекарственного средства в течение 20 минут.

[00136] Липосомы согласно настоящему изобретению могут быть получены любым способом, известным в данной области техники. См., например, G. Gregoriadis (editor), *Liposome Technology*, vol. 1-3, 1st edition, 1983; 2nd edition, 1993; 3rd edition, 2006; CRC Press, Boca Raton, Fla. Примеры способов, подходящих для получения липосомальной композиции согласно настоящему изобретению, включают мембранную экструзию, обращенно-фазовое выпаривание, соникацию, инъекцию растворителя (например, этанола) (включая смешивание с помощью микрофлюидного устройства с Y- и T-образным соединением), микрофлюидизацию, детергентный диализ, инъекцию простого эфира и дегидратацию/регидратацию. Размер липосом можно контролировать путем контроля размера пор мембран, применяемых для экструзии, или давления и количества проходов, применяемых при микрофлюидизации или любых других подходящих способах. В некоторых вариантах реализации целевые липиды сначала гидратируют путем тонкопленочной гидратации или инъекции этанола, и затем определяют размер путем экструзии через мембраны с определенным размером пор, таким как 50 нм, 80 нм, 100 нм или 200 нм или их комбинации, получая липосомы со средним размером в диапазоне 70-150 нм или 80-130 нм и коэффициентом полидисперсности 0,1 или менее. Лекарственное соединение, которое необходимо инкапсулировать, может быть добавлено в липиды липосом до образования липосом, растворено в водной среде, в которой образуются липосомы, указанными выше способами, в результате чего лекарственное средство изолируется внутри липосом. В некоторых вариантах реализации лекарственное средство инкапсулировано в липосомы с применением захватывающего агента, включенного во внутреннюю полость липосом (см. Drummond, D.C., et al. (2006) in: *Liposome Technology*, Third Edition (Ed. Gregoriadis, G.) Volume 2, p.149-168).

[00137] В некоторых вариантах реализации способ получения липосомальной композиции согласно настоящему изобретению включает стадии: (i) получение липосом,

содержащих фосфолипид, холестерин и PEG-липид, и имеющих внутреннюю полость, содержащее захватывающий агент, в среде, по существу свободной от указанного захватывающего агента; (ii) приведение указанных липосом в контакт с соединением согласно настоящему изобретению в водной среде для осуществления инкапсуляции соединения в липосомы; (iii) удаление неинкапсулированного соединения; и (iv) получение липосом в физиологически приемлемой среде, подходящей для парентерального применения. В некоторых вариантах реализации способ получения липосом с содержащимся в них соединением включает стадии (a) получение липосомы, содержащей захватывающий агент, состоящий из аммониевой или замещенной аммониевой соли полианиона, (b) последующее удаление внелипосомального захватывающего агента для образования электрохимических градиентов через мембрану и (c) приведение липосомы в контакт с соединением в условиях, эффективных для проникновения соединения в липосому и обеспечения выхода соответствующего количества аммиака или замещенного аммиака из липосомы (тем самым истощая или уменьшая градиент pH в полученной липосоме). Липосомальные композиции, содержащие захватывающий агент внутри липосомы, могут быть получены путем образования липосом в растворе захватывающего агента. Трансмембранный градиент концентрации захватывающего агента может быть образован через липосому путем удаления захватывающего агента снаружи или разбавления липосом либо после образования липосомы, либо до загрузки (захвата) лекарственного средства.

[00138] В некоторых вариантах реализации указанное взаимодействие включает инкубацию липосом с лекарственным средством в водной среде при температуре выше температуры окружающей среды и ниже температуры кипения воды, предпочтительно от 30°C до 90°C, от 40°C до 80°C, от 50°C до 80°C или от 60°C до 75°C. В некоторых вариантах реализации инкубацию проводят при ионной силе, меньшей, чем эквивалентна 50 мМ NaCl, или, более предпочтительно, меньше, чем эквивалентна 30 мМ NaCl. После инкубации может быть добавлен концентрированный раствор соли, например, NaCl, для повышения ионной силы до уровня, превышающего 50 мМ NaCl или примерно 100 мМ NaCl. Увеличение ионной силы после стадии инкубации с загрузкой лекарственного средства способствовало уменьшению агрегации липосом после загрузки. Время инкубации может варьироваться от нескольких минут до нескольких часов. В некоторых вариантах реализации время инкубации составляет от 5 до 40 минут, от 10 до 30 минут или от 15 до 25 минут. После инкубации липосомы охлаждают и затем оставляют их до достижения температуры окружающей среды.

В некоторых вариантах реализации липосомы охлаждают до 2-15°C. В некоторых вариантах реализации липосомы охлаждают до 4-10°C. После стадии охлаждения может быть добавлен концентрированный раствор соли, например, NaCl, для повышения ионной силы до уровня, превышающего 50 mM NaCl или примерно 100 mM NaCl. Увеличение ионной силы после стадии инкубации с загрузкой лекарственного средства способствовало уменьшению агрегации липосом после загрузки.

[00139] В некоторых вариантах реализации указанное взаимодействие также включает инкубацию липосом с лекарственным средством в водной среде в присутствии агента, регулирующего осмотическое равновесие (тоничность). В некоторых вариантах реализации агент, регулирующий осмотическое равновесие (осмотический агент) представляет собой неионогенный агент. Примеры неионогенных осмотических агентов включают, но не ограничиваются ими, декстрозу (глюкозу), сахарозу, трегалозу, лактозу, маннит, сорбит и поливинилпирролидон. В некоторых вариантах реализации концентрация осмотического агента представляет собой осмотическую концентрацию (выраженную как осмолярность или осмоляльность), равную осмотической концентрации раствора захватывающего агента во внутренней полости липосом до загрузки лекарственного средства. Осмотическая концентрация раствора захватывающего агента может быть измерена любым известным способом до того, как раствор объединен с липидами с образованием липосом. В другом варианте реализации концентрация осмотического агента обеспечивает осмотическую концентрацию, которая ниже, чем осмотическая концентрация раствора захватывающего агента, и составляет менее чем примерно 90%, менее чем примерно 80%, менее чем примерно 70%, менее чем примерно 60%, менее чем примерно 50%, менее чем примерно 40%, менее чем примерно 30%, менее чем примерно 20% или менее чем примерно 10% осмотической концентрации раствора захватывающего агента. В еще одном варианте реализации концентрация осмотического агента во время процесса загрузки лекарственного средства находится в диапазоне 200-400 ммоль/кг, предпочтительно, 250-350 ммоль/кг. В еще одном варианте реализации осмотический агент представляет собой декстрозу, и концентрация составляет 45 г/л. В еще одном варианте реализации осмотический агент не применяется во время инкубации липосом с лекарственным средством. В еще одном варианте реализации указанную инкубацию проводят в присутствии агента, регулирующего ионную силу. Пример агента, регулирующего ионную силу, представляет собой хлорид натрия, добавляемый к раствору липосомы-лекарственного средства, например, в концентрации от 5 до 50 mM, от 10

до 20 мМ или примерно 10 мМ. Вопреки правилам в области липосом, соединения согласно настоящему изобретению, например, АКГ-28 и АКГ-38, загружают в липосомы согласно настоящему изобретению стабильным и высокоэффективным способом, даже если во время стадии приведения лекарственного средства в контакт с липосомой количество осмотического агента обеспечивает более низкую осмотическую концентрацию, чем осмотическая концентрация раствора захватываемого агента (осмотически несбалансированные липосомы), вплоть до полного отсутствия добавляемого осмотического агента.

### **Способы применения**

[00140] В настоящем документе описаны способы ингибирования роста микобактерий, таких как *Mycobacterium tuberculosis*, или грамположительных бактерий, таких как метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA). Дополнительные микобактерии и грамположительные бактерии включают, но не ограничиваются ими, комплекс *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium mucogenicum*, стрептококки, ванкомицин-резистентные энтерококки (VRE), *Staphylococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, стрептококки группы viridans, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia* и *Corynebacterium*. В некоторых вариантах реализации соединения и композиции, представленные в настоящем документе, ингибируют рост устойчивых к лекарственным средствам штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. В некоторых вариантах реализации предложены способы лечения микобактериальных инфекций. В некоторых вариантах реализации соединения и композиции, представленные в настоящем документе, могут применяться для лечения инфекций, вызванных нетуберкулезными микобактериями. В некоторых вариантах реализации способ включает введение терапевтически эффективного количества аминоалкилоксазолидинона согласно настоящему изобретению и/или его фармацевтически приемлемой соли субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах реализации способ включает введение терапевтически эффективного количества липосомальной композиции, содержащей соединение аминоалкилоксазолидинона согласно настоящему изобретению и/или его фармацевтически приемлемую соль, субъекту, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой жидкий фармацевтический состав для парентерального введения. В некоторых вариантах реализации жидкий фармацевтический состав представляет собой липосомальный состав, содержащий

подходящее количество оксазолидинонового соединения, описанного в настоящем документе, где оксазолидиноновое соединение инкапсулировано внутри липосом. В другом варианте реализации это соединение находится в солевой форме внутри липосомы с полианионом, таким как сульфат, цитрат, октасульфат сахарозы, инозитол гексафосфат. В некоторых вариантах реализации соединение представляет собой осажденную или желатинированную соль с сульфатом внутри липосомы, состоящей из нескольких липидных вспомогательных веществ, включая, но не ограничиваясь ими, фосфатидилхолин, холестерин и пегилированный фосфатидилэтаноламин. Липосомы согласно настоящему изобретению демонстрируют эффективность включения более 85%, более 90% и более 95%. В некоторых вариантах реализации остаточное количество незахваченного лекарственного средства удаляют из липосомальной композиции. Это может быть достигнуто различными способами, такими как эксклюзионная хроматография, ионный обмен, диализ, ультрафильтрация, тангенциальная поточная фильтрация, адсорбция или осаждение. Во время или после стадии удаления незахваченного лекарственного средства липосомы могут быть помещены в желаемый фармацевтически приемлемый носитель, например, в физиологический раствор, изотонический раствор декстрозы, изотонический раствор сахарозы, раствор Рингера или раствор Хэнкса. Буферное вещество может быть добавлено для обеспечения целевого физиологически приемлемого рН. Липосомальная композиция может быть скорректирована до целевой концентрации лекарственного средства и стерилизована, например, путем стерилизующей фильтрации через фильтры 0,2-0,22 мкм. В некоторых вариантах реализации концентрация соединения в липосомальной композиции находится в диапазоне 1-50 мг/мл, 3-30 мг/мл или 5-25 мг/мл.

[00141] В некоторых вариантах реализации липосомы смешивают с одним или более дополнительными вспомогательными веществами для изотоничности или контроля рН. В некоторых вариантах реализации вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются ими, хлорид натрия, буфер Нерес, фосфатный буфер и гистидиновый буфер.

[00142] В других вариантах реализации композиция представляет собой пероральный состав. В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой жидкий состав. В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой твердый состав (например, таблетку, капсулу, пилюлю, драже, каплеты и т.д.). Для перорального применения, например, могут быть приготовлены таблетки, пастилки, леденцы, водные или масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, сиропы или

эликсиры (Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Композиции, предназначенные для перорального применения, могут быть приготовлены любым способом, известным в данной области техники для получения фармацевтических композиций. Композиции могут содержать один или более агентов, включая антиоксиданты, подсластители, вкусовые агенты, красители и консерванты, чтобы обеспечить приятное на вкус лекарственное средство. Приемлемыми являются таблетки, содержащие активный ингредиент в смеси с нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или вспомогательными агентами, подходящими для получения таблеток. Подходящие вспомогательные вещества или вспомогательные агенты включают, но не ограничиваются ими, инертные разбавители, солюбилизаторы, суспендирующие агенты, адъюванты, смачивающие агенты, подсластители, отдушки или вкусовые вещества, изотонические вещества, коллоидные диспергирующие агенты и поверхностно-активные вещества.

[00143] Подходящими фармацевтическими композициями могут быть таблетки, драже, капсулы, пилюли, гранулы, суппозитории, растворы, суспензии и эмульсии, пасты, мази, гели, кремы, лосьоны, порошки и спреи.

[00144] Соединение или композиция может быть введено местно, перорально, парентерально, внутривенно и/или ректально.

[00145] Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального целевого ответа (например, терапевтического ответа). Например, одна или более доз может быть введена с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от остроты терапевтической ситуации.

[00146] Доза соединений и/или их фармацевтически приемлемых солей или липосом, содержащих соединения и/или их фармацевтически приемлемые соли, может варьироваться в широких пределах и, естественно, должна регулироваться в каждом конкретном случае в соответствии с индивидуальными условиями и патогенным агентом, подлежащим контролю.

[00147] В некоторых вариантах реализации для применения при лечении бактериальных инфекций соединение или фармацевтическую липосомальную композицию вводят субъекту, нуждающемуся в этом, один раз каждые 7 дней (то есть, один раз в неделю), один раз каждые 14 дней (то есть, один раз каждые две недели), один раз каждые 21 день (то есть, один раз в три недели), один раз каждые 28 дней (то есть, один раз в четыре недели) и один раз каждые 42 дня (то есть, один раз в шесть недель). В некоторых вариантах реализации средняя

недельная доза составляет от примерно 1 мг до примерно 1500 мг, от примерно 10 до примерно 700 мг, от примерно 25 до примерно 500 мг или от примерно 70 до примерно 250 мг. В некоторых вариантах реализации средняя недельная доза составляет от примерно 1 мг до примерно 10 мг, от примерно 10 мг до примерно 25 мг, от примерно 25 мг до примерно 50 мг, от примерно 50 мг до примерно 100 мг, от примерно 100 мг до примерно 200 мг, от примерно 200 мг до примерно 300 мг, от примерно 300 мг до примерно 400 мг, от примерно 400 мг до примерно 500 мг, от примерно 500 мг до примерно 600 мг, от примерно 600 мг до примерно 700 мг, от примерно 700 мг до примерно 800 мг, от примерно 800 мг до примерно 900 мг, от примерно 900 мг до примерно 1000 мг, от примерно 1000 мг до примерно 1100 мг, от примерно 1100 мг до примерно 1200 мг, от примерно 1200 мг до примерно 1300 мг, от примерно 1300 мг до примерно 1400 мг, от примерно 1400 мг до примерно 1500 мг. В некоторых вариантах реализации соединение или композицию вводят на срок до одного месяца, до двух месяцев, до трех месяцев, до четырех месяцев или более. Конкретное терапевтически эффективное количество будет зависеть от множества факторов, включая бактериальную инфекцию, подлежащую лечению, активность конкретного вводимого соединения, применяемую фармацевтическую композицию, возраст, массу тела, пол и т.д. субъекта, способ введения, степень тяжести бактериальной инфекции, необязательные лекарственные средства/активные агенты, применяемые в комбинации (последовательно или одновременно) с конкретным соединением, и подобные факторы, известные врачу-специалисту средней квалификации. В некоторых вариантах реализации соединения или композиция могут применяться для лечения туберкулеза или других инфекций, вызванных микобактериями. В некоторых вариантах реализации соединение может применяться в качестве монотерапии. В некоторых вариантах реализации лечение может включать одновременное и/или последовательное введение эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе, и эффективного количества одного или более дополнительных активных агентов для лечения заболевания, вызванного *Mycobacterium tuberculosis*, и других грамположительных бактериальных инфекций. В некоторых вариантах реализации лечение может включать одновременное и/или последовательное введение эффективного количества соединения, описанного в настоящем документе, и эффективного количества двух или более дополнительных активных агентов (двух, трех, четырех и т.д.) для лечения заболевания, вызванного *Mycobacterium tuberculosis*, и других грамположительных бактериальных инфекций. Синергический антибактериальный эффект означает антибактериальный эффект, превышающий спрогнозированные чисто

аддитивные эффекты отдельных соединений комбинации. При одновременном введении соединение и активный агент могут содержаться в одной и той же композиции или в отдельных композициях. При последовательном введении композиция, содержащая соединение, и композиция, содержащая дополнительный активный агент, могут быть введены с временным интервалом (например, 20 минут, 40 минут, 60 минут или более). В некоторых вариантах реализации дополнительные активные агенты могут быть введены с применением другого пути введения или с помощью различных инъекций. Например, соединения согласно настоящему изобретению могут быть введены внутривенно, и один или более дополнительных агентов может быть введен перорально.

[00148] В некоторых вариантах реализации введение соединений с одним или более (например, одним, двумя, тремя или четырьмя) дополнительными активными агентами может привести к сокращению продолжительности лечения. Например, введение соединений с одним или более (например, одним, двумя, тремя или четырьмя) дополнительными активными агентами может привести к сокращению продолжительности лечения по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в 1,5 раза по сравнению с лечением только одним активным агентом. В некоторых вариантах реализации дополнительный агент(ы) представляет собой антибактериальный агент. В некоторых вариантах реализации дополнительный активный агент может включать, но не ограничивается ими, фторхинолины, такие как моксифлоксацин, гатифлоксацин или левофлоксацин, бедаквилин и другие аналоги диарилхинолина (например, TBAJ-587 и TBAJ-876), деламанид, претоманид, изониазид, рифампицин, рифапентин, пипразинамид, клофазимин, спектинамид, этамбутол, стрептомицин, канамицин, капреомицин, амикацин, ингибитор лейцил-tРНК-синтетазы (LeuRS) GSK3036656, ингибитор триптофансинтазы GSK839, ингибиторы DprE1 OPC-167832 и макозинон (Macozinone, PBTZ-169), телацибек (Telacebec), GSK-656, TBA-7371 и амоксициллин плюс клавуланат, фармацевтически приемлемую соль каждого из них и любые их комбинации. Для лечения грамположительных бактериальных инфекций дополнительный активный агент может включать, но не ограничивается ими, ванкомицин, гентамицин, даптомицин, тейкопланин, цефтаролин, цефтобипрол, телаванцин, далбаванцин, оритаванцин, фторхинолины (например, делафлоксацин), тетрациклины (например, эравациклин и омадациклин), сульфонамиды (например, сульфаметоксазол), триметоприм, лефамулин и любые их комбинации. В некоторых вариантах реализации лечение может включать одновременное и/или последовательное введение эффективного количества соединения,

описанного в настоящем документе, и эффективного количества бедаквилаина, претоманида, пипразинамида, моксифлоксацина или фармацевтически приемлемой соли каждого из них или их комбинации.

[00149] Фактические уровни дозировок активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, эффективного для достижения целевого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента.

[00150] Термин «парентеральный», применяемый в контексте введения, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутрипозвоночную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

[00151] Фразы «парентеральное введение» и «введение парентерально» в контексте настоящего документа относятся к способам введения, отличным от энтерального (то есть, через пищеварительный тракт) и местного введения, обычно путем инъекции или инфузии, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, ингаляционную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутрипозвоночную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию. Внутривенную инъекцию и инфузию часто (но не исключительно) применяют для введения липосомальных лекарственных средств.

[00152] В некоторых вариантах реализации жидкую композицию вводят внутривенно. В некоторых вариантах реализации соединение или фармацевтическую композицию вводят субъекту, нуждающемуся в этом, один раз каждые 7 дней (то есть, один раз в неделю), один раз каждые 14 дней (то есть, один раз каждые две недели), один раз каждые 21 день (то есть, один раз каждые три недели), один раз каждые 28 дней (то есть, один раз каждые четыре недели) и один раз каждые 42 дня (то есть, один раз каждые шесть недель). В некоторых вариантах реализации средняя недельная доза составляет от примерно 1 мг до примерно 1500 мг, от примерно 10 до примерно 700 мг, от примерно 25 до примерно 500 мг или от примерно

70 до примерно 250 мг. В некоторых вариантах реализации средняя недельная доза составляет от примерно 1 мг до примерно 10 мг, от примерно 10 мг до примерно 25 мг, от примерно 25 мг до примерно 50 мг, от примерно 50 мг до примерно 100 мг, от примерно 100 мг до примерно 200 мг, от примерно 200 мг до примерно 300 мг, от примерно 300 мг до примерно 400 мг, от примерно 400 мг до примерно 500 мг, от примерно 500 мг до примерно 600 мг, от примерно 600 мг до примерно 700 мг, от примерно 700 мг до примерно 800 мг, от примерно 800 мг до примерно 900 мг, от примерно 900 мг до примерно 1000 мг, от примерно 1000 мг до примерно 1100 мг, от примерно 1100 мг до примерно 1200 мг, от примерно 1200 мг до примерно 1300 мг, от примерно 1300 мг до примерно 1400 мг, от примерно 1400 мг до примерно 1500 мг. Конкретное терапевтически эффективное количество будет зависеть от множества факторов, включая бактериальную инфекцию, подлежащую лечению, активность конкретного вводимого соединения, применяемую фармацевтическую композицию, возраст, массу тела, пол и т.д. субъекта, путь введения, степень тяжести бактериальной инфекции, необязательные лекарственные средства/активные агенты, применяемые в комбинации (последовательно или одновременно) с конкретным соединением, и подобные факторы, известные врачу-специалисту средней квалификации в данной области.

[00153] В некоторых вариантах реализации для лечения бактериальных инфекций соединение или фармацевтическую композицию для перорального применения вводят один или два раза в день. Конкретное терапевтически эффективное количество будет зависеть от множества факторов, включая бактериальную инфекцию, подлежащую лечению, активность конкретного вводимого соединения, применяемую фармацевтическую композицию, возраст, массу тела, пол и т.д. субъекта, путь введения, степень тяжести бактериальной инфекции, необязательные лекарственные средства/активные агенты, применяемые в комбинации (последовательно или одновременно) с конкретным соединением, и подобные факторы, известные врачу-специалисту средней квалификации.

## **ПРИМЕРЫ**

[00154] Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, представлены только в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

### **Пример 1. Синтез производных оксазолидинона**

[00155] Соединения АКГ-1, АКГ-2, АКГ-6, АКГ-8, АКГ-9 и АКГ-19 синтезировали путем реакции мезилата тедизолида (тедизолид-Мs) с соответствующими аминами при 60°C в N-метил-2-пирролидоне (NMP) в качестве растворителя (Схема 1). Тедизолид-Мs получали путем мезилирования 1 гидроксильной группы тедизолида с помощью метансульфонилхлорида в присутствии основания при комнатной температуре (RT). Путем обработки тедизолида-Мs азидом натрия с последующим восстановлением полученного азида (АКГ-3-А) получали либо Промежуточное соединение 1 в виде свободного основания, либо АКГ-3 в виде хлористоводородной соли в зависимости от элюента, выбранного для очистки. Путем амидирования Промежуточного соединения 1 соответствующей кислотой с последующим образованием хлористоводородной соли с применением HCl/EtOAc получали в результате соединения АКГ-17 и АКГ-18. Взаимодействие тедизолида с соответствующей диалкиламинокислотой в стандартных условиях этерификации приводило к получению соединений АКГ-5 и АКГ-20. *O*-алкилированием тедизолида с помощью 2-хлор-*N,N*-диэтиламиноэтиламина с применением гидроксида натрия в качестве основания получали соединения АКГ-7.

[00156] Промежуточное соединение 2 синтезировали путем борирования коммерчески доступного арилбромидом с применением бис(пиноколато)диборона (Схема 2). Путем сочетания Сузуки Промежуточного соединения 2 с легкодоступным 5-бром-2-фторпиридином получали Промежуточное соединение 3, которое нагревали в NMP в герметично закрытой пробирке с соответствующим амином с получением соединений от АКГ-11 до АКГ-15.

[00157] Соединения АКГ-16, от АКГ-21 до АКГ-27 получали с помощью конвергентного синтеза, начиная с Промежуточного соединения 4 (Схемы 3 и 4). Путем клик-химии, применяя азид натрия с 5-бром-2-циано-пиридином, получали Промежуточное соединение 4. *N*-алкилирование тетразола в Промежуточном соединении 4 приводило к получению Промежуточных соединений 5 и 6 в соотношении 3:1. Структура этих промежуточных соединений была выведена из анализа НМВС. Были синтезированы Промежуточные соединения 7-12, и региоизомеры были получены аналогичным образом (на Схеме 4 показаны только целевые изомеры). Путем сочетания Сузуки Промежуточных соединений 5-12 с Промежуточным соединением 2 и снятия защиты с аминогруппы, где это применимо, получали соединения АКГ-16, от АКГ-21 до АКГ-27.

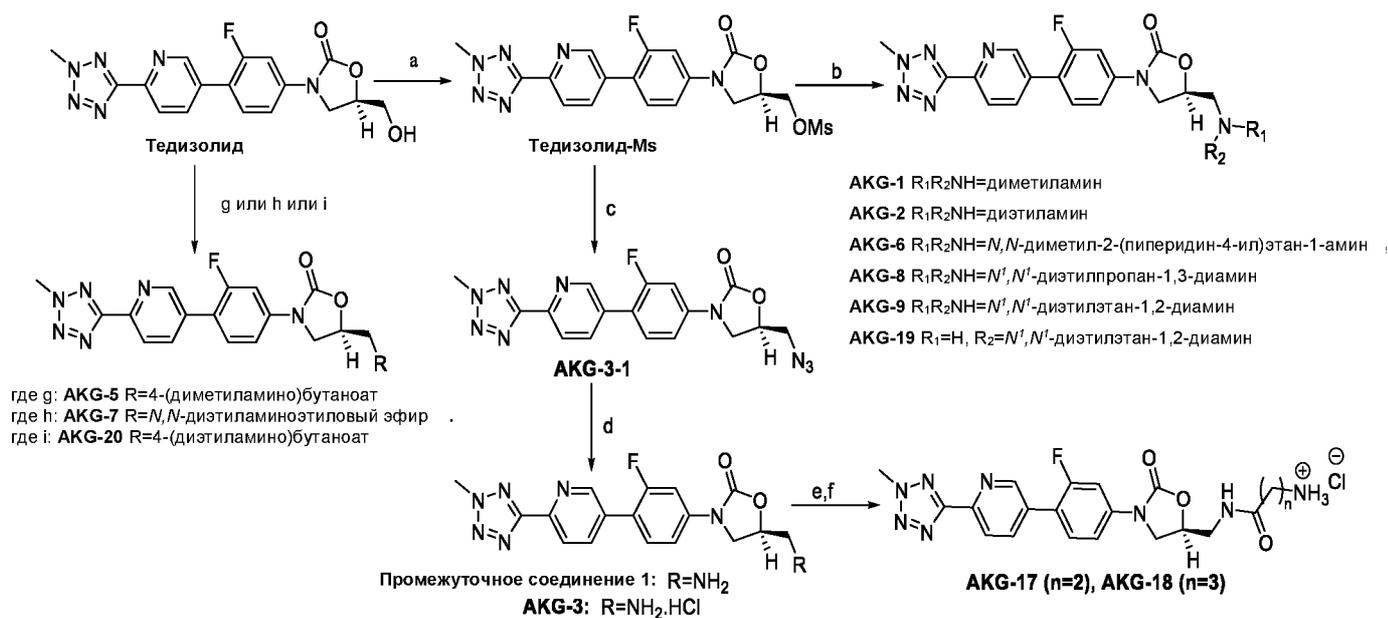
[00158] Промежуточное соединение 13 синтезировали путем мезилирования легкодоступного арилбромидом. Промежуточное соединение 15 получали восстановлением

Промежуточного соединения 14 гидразином (Схема 5). С помощью Вос-защиты или ацелирования первичного амина в Промежуточном соединении 15 с последующим борированием получали Промежуточные соединения 18 и 19, соответственно. Путем сочетания Сузуки (публикация заявки на патент США № 20100022772, публикация Международной заявки РСТ № WO 2013044845, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки) боронатных промежуточных соединений с соответствующими арилбромидными промежуточными соединениями и снятия защиты с аминогруппы, где это применимо, получали соединения от АКГ-28 до АКГ-31 и от АКГ-38 до АКГ-40.

### Схемы синтеза

[00159] Для синтеза Промежуточного соединения 19 смотри публикацию заявки на патент США 20100022772, публикацию Международной заявки РСТ № 2013044845, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

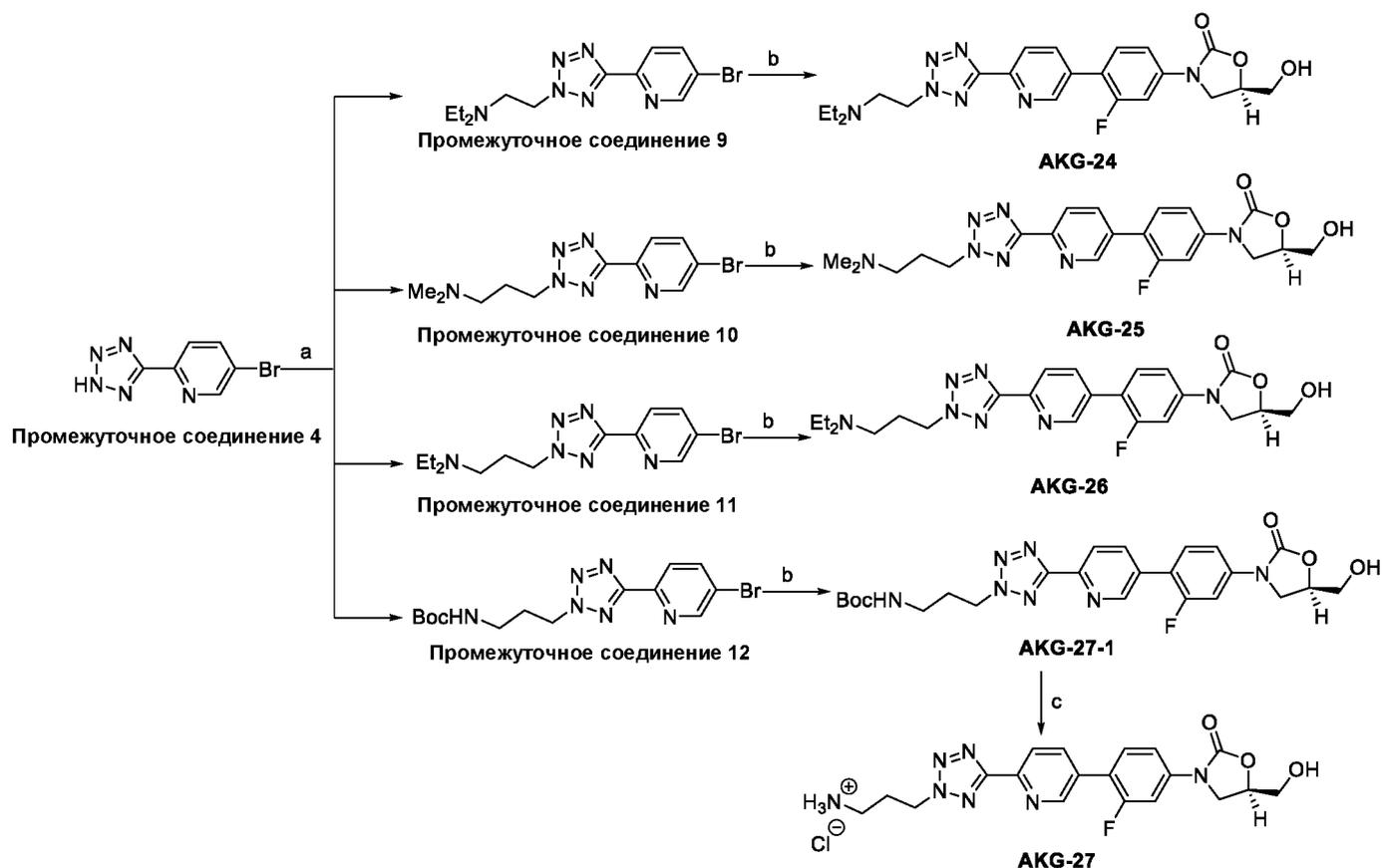
Схема 1



Условия: (a)  $CH_2Cl_2$ , MsCl, TEA, RT, 2 ч; (b)  $R_1R_2NH$ , NMP, 60°C, 16 ч; (c)  $NaN_3$ , DMF, 90°C, 3 ч; (d)  $Ph_3P$ , THF/ $H_2O$ , нагрев с обратным холодильником 1 ч; (e) HATU, кислота, DMF; (f) HCl/EtOAc; (g) DCC, DMF, TEA, DMAP, 4-(диметиламино)бутановой кислоты гидрохлорид, RT, 16 ч; (h) NaN, DMF, 2-хлор- $N,N$ -диэтилэтан-1-амин, 0°C, RT, 3 ч; (i) DCC, DMF, DMAP, 4-(диэтиламино)бутановой кислоты гидрохлорид, RT, 16 ч.

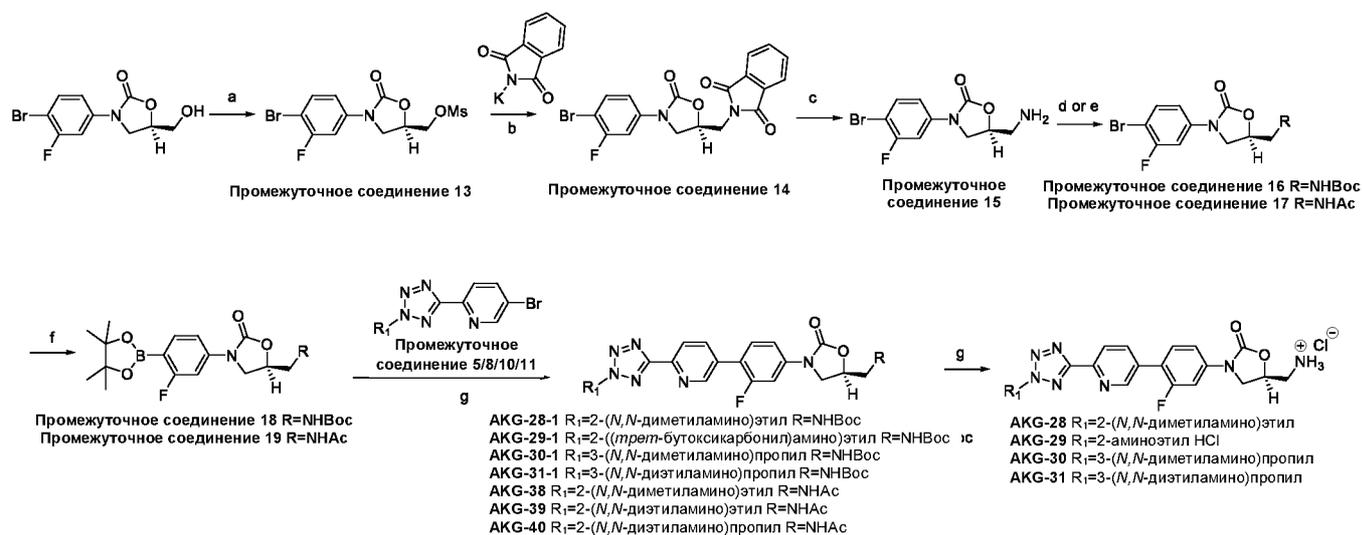
Схема 2





Условия: (a) амин, Са(OH)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O/DMF, 80°C, 24 ч; (b) Промежуточное соединение 2, (dppf)PdCl<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, диоксан, 90°C, 16 ч; (c) HCl/диоксан, RT, 5 ч.

Схема 5



Условия: (a) MsCl, TEA, DCM, RT, 2 ч; (b) DMF, 80°C, 16 ч; (c) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, EtOH, 80°C; (d) ВosO, THF/H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, RT; (e) AcCl, TEA, DCM, RT; (f) бис(пинаколато)диборон, KOAc, (Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub>, диоксан, 90°C; (g) K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, (dppf)PdCl<sub>2</sub>, диоксан/H<sub>2</sub>O, 90°C, 16 ч; (h) HCl в EtOAc, DCM, RT, 2 ч

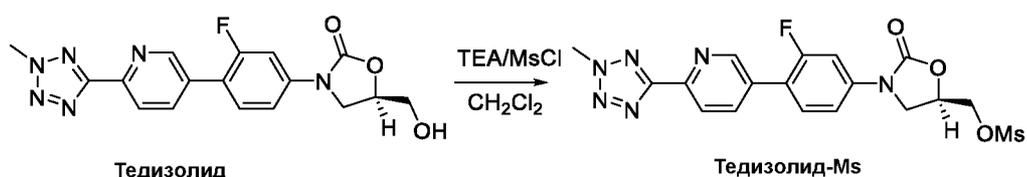
## Синтез

*Материалы и методы*

[00160] Тедизолид, (R)-3-(4-бром-3-фторфенил)-5-(гидроксиметил)оксазолидин-2-он были приобретены у Skychemical, и диметил-(2-пипердин-4-ил-этил)-амин был приобретен у Enamine, остальные реагенты и растворители были приобретены у Adams и применялись в готовом виде. Химическую структуру конечных продуктов охарактеризовывали с помощью спектров ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$  ЯМР,  $^{13}\text{C}$  ЯМР), определенных на ЯМР-спектрометре Bruker (500 МГц или 400 МГц). Спектры  $^{13}\text{C}$  ЯМР были полностью разрешены. Химические сдвиги были выражены в частях на миллион (ppm), применяя пик дейтерированного растворителя или тетраметилсилана (внутренний) в качестве внутренних стандартов. Данные  $^1\text{H}$  ЯМР записывали следующим образом: химический сдвиг (d, ppm), мультиплетность (s, синглет, br s, уширенный синглет, d, дублет, t, триплет, m, мультиплет), интегрирование, константа связи (Гц). Данные  $^{13}\text{C}$  ЯМР записывали в единицах химического сдвига (d, ppm).

[00161] Чистоту конечных продуктов ( $\geq 95\%$ ) подтверждали с помощью аналитической ВЭЖХ. Аналитическую ВЭЖХ выполняли на системе аналитической ВЭЖХ Agilent с применением колонки Sunfire, 3,5 мкм (150 см x 4,6 мм) и градиентной системы (вода (0,01% TFA)/ACN (0,01% TFA)) при скорости потока 1 мл/мин с детектированием при 254 и 214 нм. Очистку с помощью флэш-хроматографии (FC) проводили с применением силикагеля 60 от Santai Technologies (0,04-0,063 мм; 230-400 меш).

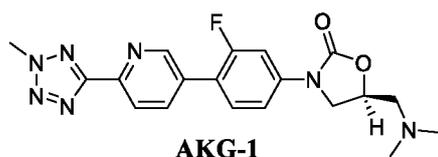
[00162] *Способ А.* Реакционную смесь тедизолида-*Ms* (1,0 экв.),  $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$  (4,0 экв.) в NMP (10 мл) нагревали до  $60^\circ\text{C}$  в течение 15 ч в герметично закрытой пробирке. По завершении (ЖХ-МС) реакционную смесь разбавляли  $\text{H}_2\text{O}$  (40 мл) и экстрагировали EtOAc (2 x 50 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным рассолом, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и фильтровали. Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью FC с получением продукта с чистотой  $>95\%$ .

*1. Синтез Тедизолида-*Ms**

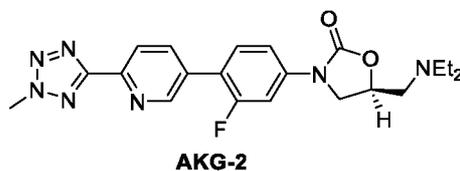
[00163] К раствору тедизолида (7,00 г, 18,90 ммоль) и триэтиламина (3,83 г, 37,80 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) при  $0^\circ\text{C}$  добавляли по каплям метансульфонилхлорид (3,25 г, 28,36 ммоль) при  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере Ar. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 часов

реакционную смесь выливали в воду и экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Органический слой промывали рассолом, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и отбирали фильтрованием. Растворитель удаляли под вакуумом с получением чистого продукта тедизолид-Мс (7,0 г, выход 82,6%) в виде твердого вещества желтого цвета.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,31 – 8,14 (m, 2H), 7,88 – 7,65 (m, 2H), 7,53 (d,  $J = 8,6$  Гц, 1H), 5,14 – 4,96 (m, 1H), 4,59-4,39 (m, 5H), 4,28 (t,  $J = 9,4$  Гц, 1H), 3,92 (dd,  $J = 9,2, 6,3$  Гц, 1H), 3,28 (s, 3H). MS (ESI+)  $m/z$  449,1 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).

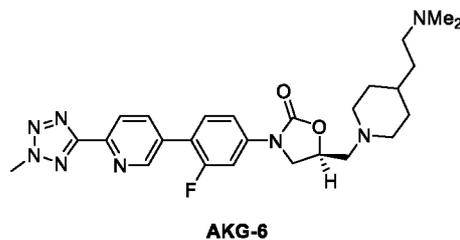
## 2. Синтез АКГ-1, 2, 6, 8, 9 и 19



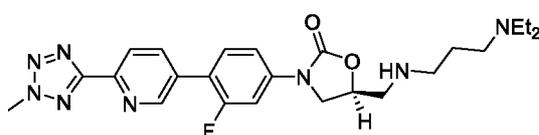
[00164] Применяя способ А, АКГ-1 получали из тедизолида-Мс и диметиламина в виде белого твердого вещества (0,5 г, 56,4% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,94 (s, 1H), 8,32 – 8,13 (m, 2H), 7,83 – 7,64 (m, 2H), 7,54 (d,  $J = 7,6$  Гц, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,21 (t,  $J = 8,6$  Гц, 1H), 3,84 (t,  $J = 7,4$  Гц, 1H), 2,62 (s, 2H), 2,25 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,3, 161,0, 158,6, 154,6, 149,9, 145,5, 140,9, 137,6, 132,1, 131,4, 122,6, 119,1, 114,6, 106,0, 72,0, 62,1, 48,7, 46,4, 40,2. MS (ESI+)  $m/z$  398,2 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).



[00165] Применяя способ А, АКГ-2 получали из тедизолида-Мс и диэтиламина в виде белого твердого вещества (0,52 г, 54,8% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,94 (s, 1H), 8,29 – 8,11 (m, 2H), 7,81 – 7,65 (m, 2H), 7,52 (dd,  $J = 8,6, 1,8$  Гц, 1H), 4,89 – 4,73 (m, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,19 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 3,82 (dd,  $J = 8,7, 7,0$  Гц, 1H), 2,75 (dd,  $J = 5,1, 3,7$  Гц, 2H), 2,57 (q,  $J = 6,9$  Гц, 4H), 0,97 (t,  $J = 7,1$  Гц, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,3, 161,0, 158,6, 154,7, 149,9, 145,5, 141,0, 137,6, 132,1, 131,3, 122,5, 119,1, 114,6, 106,1, 72,6, 56,1, 48,6, 47,7, 40,3, 12,3. MS (ESI+)  $m/z$  426,3 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).

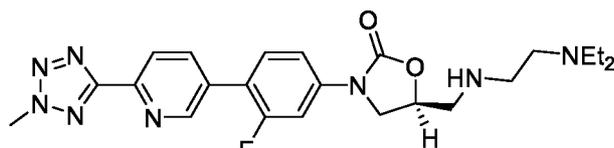


[00166] Применяя способ А, АКГ-6 получали из тедизолида-Мс и *N,N*-диметил-2-(пиперидин-4-ил)этан-1-амина в виде белого твердого вещества (0,66 г, 58,2% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,93 (s, 1H), 8,30 (dd,  $J = 8,1, 2,4$  Гц, 1H), 8,05 (d,  $J = 7,8$  Гц, 1H), 7,62 (d,  $J = 12,9$  Гц, 1H), 7,56 – 7,47 (m, 1H), 7,45 – 7,37 (m, 1H), 4,89 – 4,74 (m, 1H), 4,48 (s, 3H), 4,11 (t,  $J = 8,6$  Гц, 1H), 3,86 (t,  $J = 7,8$  Гц, 1H), 2,93 (dd,  $J = 28,8, 10,9$  Гц, 2H), 2,80 – 2,64 (m, 2H), 2,50 – 2,04 (m, 11H), 1,69 (d,  $J = 10,8$  Гц, 2H), 1,48 (d,  $J = 7,1$  Гц, 2H), 1,37 – 1,19 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164,7, 161,3, 158,8, 154,3, 149,9, 145,4, 140,2, 137,0, 132,3, 130,5, 122,0, 120,0, 113,8, 106,4, 71,5, 61,4, 57,0, 55,3, 54,3, 48,9, 45,0, 39,7, 33,6, 32,4. MS (ESI+)  $m/z$  509,2 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).



АКГ-6

[00167] Применяя способ А, АКГ-8 получали из тедизолида-Мс и *N,N'*-диэтилпропан-1,3-диамина в виде белого твердого вещества (0,62 г, 57,6% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,94 (s, 1H), 8,34 – 8,11 (m, 2H), 7,84 – 7,59 (m, 2H), 7,52 (dd,  $J = 8,6, 2,0$  Гц, 1H), 4,80 (dd,  $J = 8,3, 5,7$  Гц, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,18 (t,  $J = 8,9$  Гц, 1H), 3,90 (dd,  $J = 8,8, 6,5$  Гц, 1H), 2,94 – 2,77 (m, 2H), 2,66 – 2,53 (m, 7H), 1,65 – 1,51 (m, 2H), 0,99 (t,  $J = 7,1$  Гц, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,3, 161,0, 158,6, 154,6, 149,9, 145,5, 141,0, 137,6, 132,1, 131,4, 122,6, 119,1, 114,6, 106,1, 73,2, 52,1, 50,7, 48,2, 48,0, 46,7, 40,3, 26,4, 11,4.  $m/z$  483,2 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).

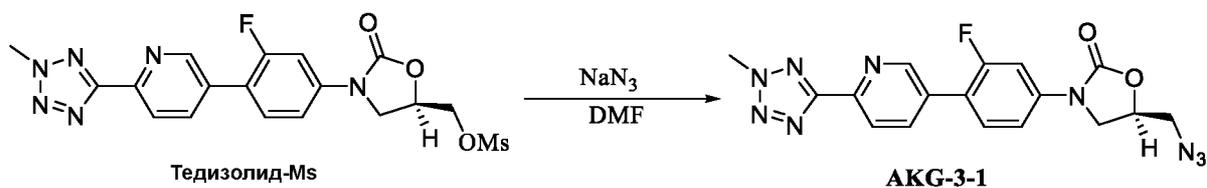


АКГ-8

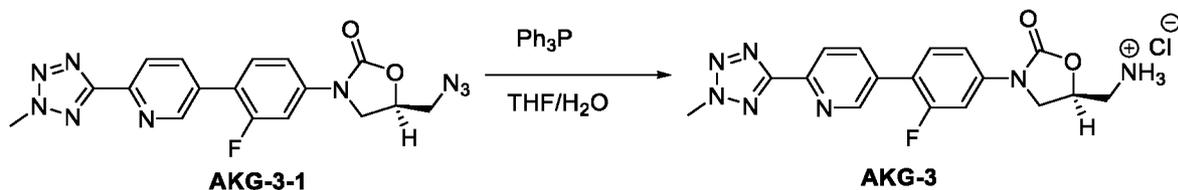
[00168] Применяя способ А, АКГ-9 получали из тедизолида-Мс и *N,N'*-диэтилэтан-1,2-диамина в виде белого твердого вещества (0,36 г, 34,4% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,94 (s, 1H), 8,26 – 8,16 (m, 2H), 7,78 – 7,66 (m, 2H), 7,53 (d,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 4,85 – 4,73 (m, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,18 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 3,90 (t,  $J = 7,5$  Гц, 1H), 2,88 (t,  $J = 5,4$  Гц, 2H), 2,65 (t,  $J = 6,1$  Гц, 2H), 0,95 (t,  $J = 7,0$  Гц, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,3, 161,0, 158,6, 154,7, 149,9, 145,5, 141,0, 137,6, 132,1, 131,4, 122,6, 119,1, 114,6, 106,1, 73,3, 52,6, 52,2, 48,1, 47,6, 47,1, 40,3, 12,0.  $m/z$  469,3 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).

[00169] Применяя способ А, АКГ-19 получали из тедизолида-Мс и этан-1,2-диамина в виде белого твердого вещества (0,60 г, 55% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10,33 (s, 1H), 9,89 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,58 (s, 3H), 8,23 (q,  $J = 8,3$  Гц, 2H), 7,79 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,69 (d,  $J = 13,5$  Гц, 1H), 7,49 (d,  $J = 8,7$  Гц, 1H), 5,25 – 5,19 (m, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,33 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 4,05 (dd,  $J = 9,1, 6,7$  Гц, 1H), 3,52 (s, 2H), 3,43 – 3,23 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,26, 160,94, 158,50, 153,79, 149,84, 145,51, 140,58, 137,78, 132,04, 131,42, 122,61, 119,50, 114,94, 106,46, 69,38, 49,59, 47,87, 45,16, 40,34, 35,58.

### 3. Синтез АКГ-3



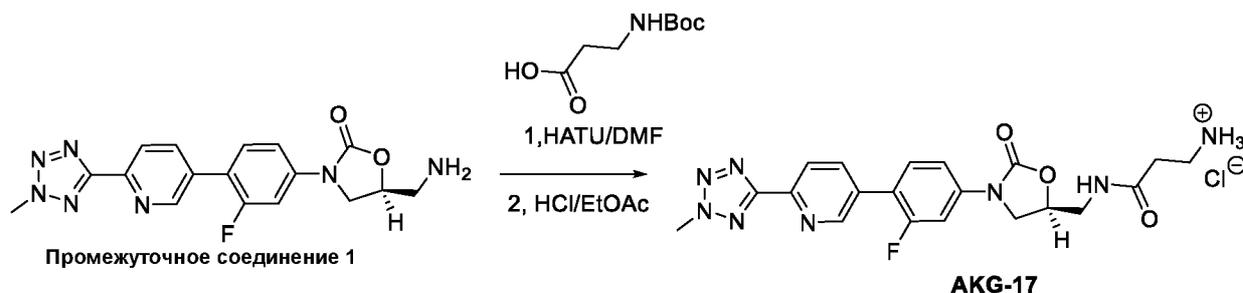
[00170] К раствору тедизолида-Мс (1,00 г, 2,23 ммоль) в DMF (20 мл) добавляли  $\text{NaN}_3$  (0,44 г, 6,69 ммоль). После перемешивания при  $90^\circ\text{C}$  в течение 3 ч реакционную смесь выливали в воду и экстрагировали  $\text{EtOAc}$ . Органический слой промывали рассолом, высушивали над безводным  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали под вакуумом. Остаток дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии с получением указанного в заголовке соединения АКГ-3-1 (0,7 г, 79,4% выход) в виде белого твердого вещества.



[00171] Реакционную смесь АКГ-3-1 (0,7 г, 1,77 ммоль) и  $\text{Ph}_3\text{P}$  (1,39 г, 5,31 ммоль) в  $\text{H}_2\text{O}$  (2 мл) и THF (20 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч. После завершения (ЖХ-МС) реакционную смесь концентрировали под вакуумом и очищали с применением FC с обращенной фазой. В то время как путем очистки с применением  $\text{MeOH}$  в 0-10% DCM в качестве элюента и сушки вымораживанием получали Промежуточное соединение 1 в виде свободного основания (2,5 г, 76,5% выход) в виде желтого твердого вещества, очисткой с помощью FC с  $\text{MeCN}$  в 0,006 М  $\text{HCl}$  в  $\text{H}_2\text{O}/0-30\%$  в качестве элюента после сушки вымораживанием получали хлористоводородную соль АКГ-3 (0,35 г, 48,8% выход) в виде желтого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,61 (s, 3H), 8,28 – 8,18 (m, 2H), 7,79 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,69 (dd,  $J = 13,5, 2,1$  Гц, 1H), 7,48 (dd,  $J = 8,6,$

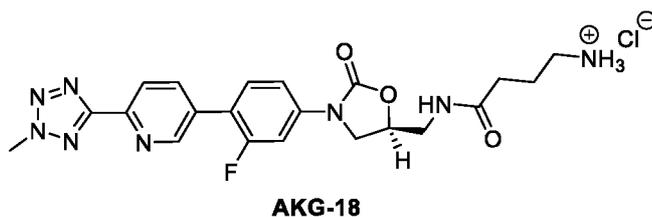
2,1 Гц, 1H), 5,13 – 5,00 (m, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,29 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 4,02 (dd,  $J = 9,3$ , 6,6 Гц, 1H), 3,34 – 3,23 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  163,8, 160,4, 158,0, 153,4, 149,4, 145,1, 140,2, 137,2, 131,5, 130,9, 122,1, 118,9, 114,3, 105,9, 69,8, 47,1, 41,4, 39,8.  $m/z$  370,3 ( $[\text{M} - \text{HCl} + 1]^+$ ).

#### 4. Синтез АКГ-17



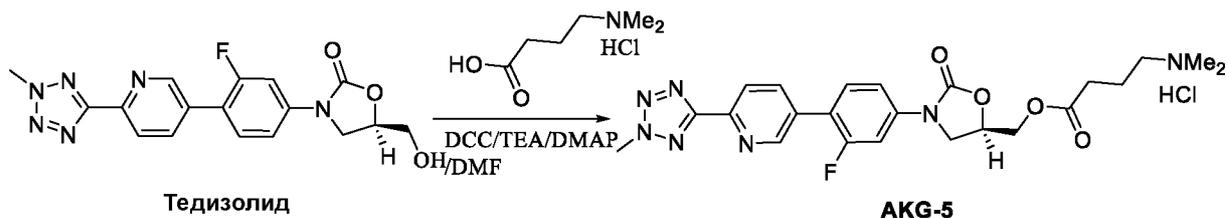
[00172] К раствору 3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропановой кислоты (0,62 г, 3,25 ммоль, 1,2 экв.) и ТЕА (0,63 г, 6,25 ммоль, 2,5 экв.) в DMF (10 мл) добавляли HATU (1,44 г, 3,78 ммоль, 1,4 экв.) при комнатной температуре в атмосфере Ar. Смесь перемешивали в течение 0,5 ч, и затем добавляли Промежуточное соединение 1 (1,0 г, 2,70 ммоль, 1,0 экв.). Всю смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ-МС показала, что реакция завершена, смесь выливали в  $\text{H}_2\text{O}$ , и твердое вещество собирали фильтрованием и промывали  $\text{H}_2\text{O}$ . Твердое вещество высушивали под вакуумом, и остаток применяли непосредственно на следующей стадии путем растворения его в EtOAc, и затем добавляли HCl/EtOAc (4 М, 20 мл). Всю смесь перемешивали в течение 16 ч, и растворитель удаляли с помощью  $\text{N}_2$ . Остаток очищали с помощью FC с обращенной фазой (элюент с MeCN в 0,006 М HCl в  $\text{H}_2\text{O}/0-30\%$ ) с получением после сушки вымораживанием АКГ-17 (0,5 г, 39,5% выход) в виде твердого желтого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,23 (q,  $J = 8,3$  Гц, 2H), 8,14 (s, 3H), 7,77 (t,  $J = 8,6$  Гц, 1H), 7,69 (d,  $J = 13,5$  Гц, 1H), 7,50 (d,  $J = 8,6$  Гц, 1H), 4,87 – 4,78 (m, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,22 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 3,89 (dd,  $J = 9,0$ , 6,5 Гц, 1H), 3,50 (t,  $J = 5,3$  Гц, 2H), 2,98 (dd,  $J = 12,5$ , 6,4 Гц, 2H), 2,58 (t,  $J = 7,1$  Гц, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  170,60, 164,22, 160,97, 158,53, 154,42, 149,78, 145,42, 140,89, 137,79, 132,11, 131,41, 122,61, 119,19, 114,72, 106,23, 105,95, 72,13, 47,77, 40,33, 35,58, 32,58.

#### 5. Синтез АКГ-18



[00173] Применяя способ для АКГ-17, АКГ-18 получали из Промежуточного соединения 1 и 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутановой кислоты в виде желтого твердого вещества (0,5 г, 37,6% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,52 (t,  $J = 5,7$  Гц, 1H), 8,29 – 8,08 (m, 5H), 7,77 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,69 (d,  $J = 13,6$  Гц, 1H), 7,50 (d,  $J = 8,7$  Гц, 1H), 4,87 – 4,76 (m, 1H), 4,50 (s, 3H), 4,22 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 3,93 – 3,83 (m, 1H), 3,49 (t,  $J = 5,3$  Гц, 2H), 2,83 – 2,72 (m, 2H), 2,28 (t,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 1,88 – 1,75 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  172,59, 164,23, 160,96, 158,52, 154,44, 149,00, 145,39, 140,88, 137,78, 132,10, 131,40, 122,61, 119,17, 114,70, 106,21, 72,17, 47,78, 41,88, 40,37, 38,78, 32,44, 23,60.

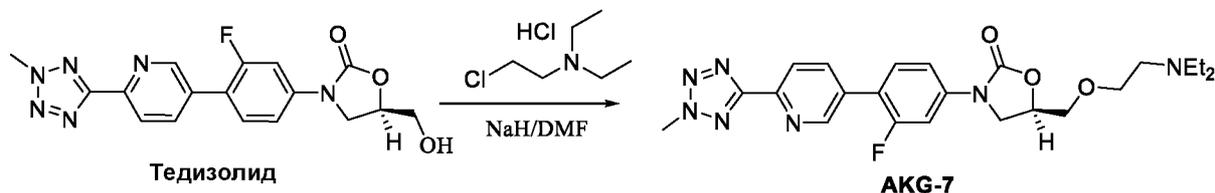
#### 6. Синтез АКГ-5



[00174] К смеси тедизолида (1,0 г, 2,70 ммоль), гидрохлорида 4-(диметиламино)бутановой кислоты (0,57 г, 3,37 ммоль) и TEA (0,27 г, 2,70 ммоль) добавляли каталитическое количество DMAP в DMF (20 мл), DCC (0,84 г, 4,05 ммоль) в атмосфере  $\text{N}_2$ . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. По завершении реакции (ЖХ-МС) смесь разбавляли  $\text{H}_2\text{O}$  (100 мл) и фильтровали. Фильтрат подкисляли 0,02 М  $\text{HCl}$  до  $\text{pH}=5-6$  и затем очищали с применением RP-FC (элюент  $\text{MeCN}$  в 0,5% муравьиной кислоте/ $\text{H}_2\text{O}$ ) с получением после сушки вымораживанием АКГ-5 в виде соли муравьиной кислоты. Продукт повторно растворяли в  $\text{H}_2\text{O}$ , и добавляли 1 экв.  $\text{HCl}$  (0,02 М). Путем сушки вымораживанием этого продукта получали АКГ-5 в виде соли  $\text{HCl}$  (600 мг, 42,7% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10,40 (br, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,23 (q,  $J = 8,5$  Гц, 2H), 7,78 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,71 (dd,  $J = 13,6, 2,1$  Гц, 1H), 7,53 (dd,  $J = 8,6, 2,1$  Гц, 1H), 5,03 (dd,  $J = 5,6, 3,1$  Гц, 1H), 4,48 (s, 3H), 4,36 (qd,  $J = 12,4, 4,2$  Гц, 2H), 4,26 (t,  $J = 9,3$  Гц, 1H), 3,95 (dd,  $J = 9,2, 6,2$  Гц, 1H), 2,99 – 2,86 (m, 2H), 2,64 (s, 6H), 2,45 (t,  $J = 7,3$  Гц, 2H), 1,87 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{DMSO-}$

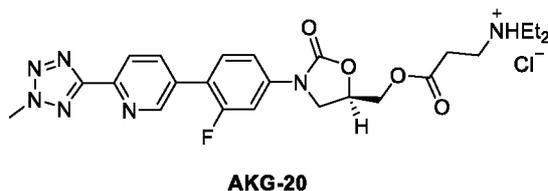
$d_6$ )  $\delta$  172,3, 164,3, 158,8, 154,3, 149,9, 145,6, 140,8, 137,7, 132,0, 131,5, 122,6, 119,4, 114,7, 106,2, 71,1, 64,8, 56,3, 46,7, 40,3, 30,9, 19,9.  $m/z$  469,3 ( $[M + 1]^+$ ).  $m/z$  484,1 ( $[M - HCl + 1]^+$ ).

### 7. Синтез АКГ-7



[00175] К смеси тедизолида (1,0 г, 2,70 ммоль в DMF (20 мл)) добавляли NaH (0,13 г, 60%, 5,40 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере  $N_2$ . Смесь перемешивали при  $0^\circ C$  в течение 0,5 ч, и затем добавляли 2-диэтиламиноэтилхлорид гидрохлорид (930 мг, 5,40 ммоль) одной порцией. Всю смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. ЖХ-МС показала завершение реакции. Реакционную смесь осторожно выливали в смесь лед/ $H_2O$  (20 мл) и экстрагировали DCM (2 x 50 мл). Объединенные органические экстракты промывали насыщенным раствором с последующей сушкой над  $Na_2SO_4$ . Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью FC (элюент MeOH в DCM 0-15%) с получением АКГ-7 в виде белого твердого вещества (0,5 г, 39,4% выход).  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,93 (s, 1H), 8,30 (d,  $J = 8,2$  Гц, 1H), 8,05 (d,  $J = 8,2$  Гц, 1H), 7,72 (d,  $J = 12,9$  Гц, 1H), 7,53 (t,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 7,42 (d,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 4,88 (d,  $J = 3,5$  Гц, 1H), 4,48 (s, 3H), 4,34 – 4,26 (m, 1H), 4,18 – 4,08 (m, 2H), 4,00 – 3,93 (m, 1H), 3,87 (qd,  $J = 10,8, 2,9$  Гц, 2H), 3,19 – 3,11 (m, 2H), 3,06 (q,  $J = 7,1$  Гц, 4H), 1,26 (t,  $J = 7,2$  Гц, 6H).  $^{13}C$  ЯМР (126 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  164,7, 161,1, 159,1, 154,3, 149,8, 145,5, 140,0, 137,0, 132,2, 130,6, 122,0, 120,1, 113,8, 106,3, 71,3, 71,3, 66,9, 51,9, 48,2, 46,6, 39,7, 8,9.  $m/z$  470,3 ( $[M + 1]^+$ ).

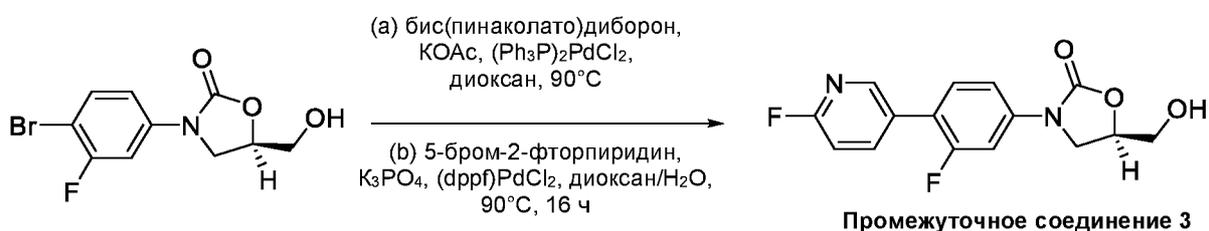
### 8. Синтез АКГ-20



[00176] К реакционной смеси тедизолида (1,0 г, 2,70 ммоль), гидрохлорида 4-(диэтиламино)бутановой кислоты (0,61 г, 3,37 ммоль) и DMAP (0,05 г) в DMF (20 мл) добавляли DCC (0,84 г, 4,05 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере  $N_2$ . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. По завершении (ЖХ-МС) реакционную смесь разбавляли  $H_2O$  (100 мл) и фильтровали. Фильтрат подкисляли 0,02 М HCl

до pH=5-6 и затем очищали с помощью RP-FC (элюент MeCN в 0,5% FA/H<sub>2</sub>O) с получением после сушки вымораживанием продукта в виде соли муравьиной кислоты. Затем соль повторно растворяли в H<sub>2</sub>O, и добавляли 1 экв. HCl (0,02 M), после сушки вымораживанием получали АКГ-20 в виде соли HCl (0,61 г, 42% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,94 (s, 1H), 8,28 – 8,14 (m, 2H), 7,82 – 7,66 (m, 2H), 7,53 (d, *J* = 8,7 Гц, 1H), 5,11 – 4,97 (m, 1H), 4,49 (s, 3H), 4,43 – 4,33 (m, 2H), 4,27 (t, *J* = 9,3 Гц, 1H), 4,01 – 3,91 (m, 1H), 3,08 – 2,99 (m, 2H), 2,90 – 2,69 (m, 6H), 1,08 (t, *J* = 7,2 Гц, 6H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171,00, 164,33, 158,55, 154,32, 149,90, 145,58, 140,71, 137,63, 132,02, 131,45, 122,58, 119,33, 114,69, 106,21, 71,01, 65,04, 46,86, 46,63, 40,31, 29,99, 9,95(s).

### 9. Синтез Промежуточного соединения 3



[00177] Смесь (R)-3-(4-бром-3-фторфенил)-5-(гидроксиметил)оксазолидин-2-она (9,0 г, 31,02 ммоль), бис(пинаколато)диборона (11,88 г, 46,54 ммоль) и КОАс (4,56 г, 46,54 ммоль) в диоксане (200 мл) продували Ar в течение 10 мин и затем добавляли (Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub> (1,09 г, 1,55 ммоль). После повторной продувки смеси Ar ее нагревали до 90°С в течение 15 ч. ЖХ-МС показала завершение реакции. Смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через целит с получением Промежуточного соединения 2 в виде фильтрата. К фильтрату добавляли 5-бром-2-фторпиридин (6,55 г, 37,22 ммоль), К<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> (14,47 г, 6,80 ммоль) и Н<sub>2</sub>О (20 мл). Смесь продували Ar в течение 10 мин и добавляли (dppf)PdCl<sub>2</sub> (2,27 г, 3,10 ммоль). Смесь снова продували Ar. Затем смесь нагревали до 90°С в течение 15 ч. Реакцию контролировали с помощью ЖХ-МС. По завершении реакции смесь концентрировали под вакуумом, остаток разбавляли Н<sub>2</sub>О (200 мл) и экстрагировали EtOAc (2 x 200 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным раствором с последующей сушкой над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Путем фильтрования и удаления растворителя под вакуумом в результате получали остаток, который очищали с помощью FC (элюент MeOH в DCM 0-15%) с получением Промежуточного соединения 3 (6,8 г, выход 71,6% за две стадии) в виде желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,43 (s, 1H), 8,23 – 8,14 (m, 1H), 7,72 – 7,61 (m, 2H), 7,49 (dd, *J* = 8,6, 2,2 Гц, 1H), 7,32 (dd,

$J = 8,6, 2,7$  Гц, 1H), 5,27 (t,  $J = 5,6$  Гц, 1H), 4,80 – 4,71 (m, 1H), 4,15 (t,  $J = 9,1$  Гц, 1H), 3,90 (dd,  $J = 8,9, 6,1$  Гц, 1H), 3,75 – 3,67 (m, 1H), 3,63 – 3,55 (m, 1H). MS (ESI+)  $m/z$  307 ( $[M + 1]^+$ ).

#### 10. Синтез АКГ-11, 12, 13, 14, 15

[00178] *Способ В.* Смесь Промежуточного соединения 3 (1,0 экв.),  $R_1R_2NH$  (4,0 экв.) и каталитического количества DMAP в NMP (10 мл) нагревали до 100°C в течение 16 ч в герметично закрытой пробирке. По завершении реакции (ЖХ-МС) смесь разбавляли  $H_2O$  (50 мл) и экстрагировали EtOAc (2 x 50 мл). Объединенные органические экстракты промывали насыщенным раствором с последующей сушкой над  $Na_2SO_4$  и фильтрованием. Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью RP-FC (элюент с MeCN в 0,1%  $NH_4HCO_3/H_2O$ , 0-40%, C18) с получением продукта.

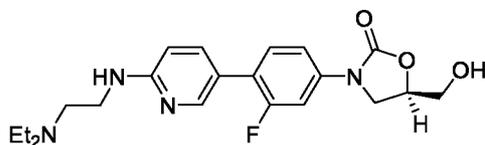


[00179] Применяя *способ В*, АКГ-11 получали из Промежуточного соединения 3 и *N,N*-диметил-2-(пиперидин-4-ил)этан-1-амин в виде белого твердого вещества (0,40 г, 30,1% выход).  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8,28 (s, 1H), 7,73 – 7,65 (m, 1H), 7,60 (dd,  $J = 13,6, 2,1$  Гц, 1H), 7,54 (t,  $J = 8,9$  Гц, 1H), 7,41 (dd,  $J = 8,6, 2,1$  Гц, 1H), 6,89 (d,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 5,25 (t,  $J = 5,6$  Гц, 1H), 4,78 – 4,68 (m, 1H), 4,33 (d,  $J = 13,0$  Гц, 2H), 4,12 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 3,87 (dd,  $J = 8,9, 6,2$  Гц, 1H), 3,74 – 3,64 (m, 1H), 3,62 – 3,52 (m, 1H), 2,87 – 2,71 (m, 2H), 2,23 (t,  $J = 7,3$  Гц, 2H), 2,11 (s, 6H), 1,72 (d,  $J = 11,5$  Гц, 2H), 1,64 – 1,49 (m, 1H), 1,34 (dd,  $J = 14,3, 7,0$  Гц, 2H), 1,18 – 1,04 (m, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (101 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  160,68, 158,33, 154,81, 147,54, 139,15, 137,82, 130,32, 120,72, 119,11, 114,35, 106,97, 106,03, 105,74, 73,82, 62,09, 56,98, 46,45, 45,73, 45,39, 34,29, 34,15, 31,94. MS (ESI+)  $m/z$  443,1 ( $[M + 1]^+$ ).



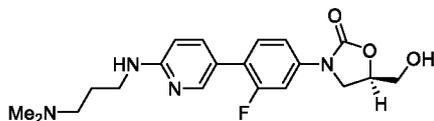
[00180] Применяя *способ В*, АКГ-12 получали из Промежуточного соединения 3 и *N,N'*-диметилэтан-1,2-диамина в виде белого твердого вещества (0,52 г, 42,6% выход).  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8,16 (s, 1H), 7,64 – 7,46 (m, 3H), 7,39 (dd,  $J = 8,6, 2,2$  Гц, 1H), 6,58 (dd,  $J = 9,9, 5,6$  Гц, 2H), 5,25 (t,  $J = 5,6$  Гц, 1H), 4,80 – 4,66 (m, 1H), 4,11 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 3,86 (dd,  $J = 8,9, 6,2$  Гц, 1H), 3,76 – 3,65 (m, 1H), 3,61 – 3,49 (m, 1H), 3,37 (dd,  $J = 12,3, 6,5$  Гц, 2H),

2,42 (t,  $J = 6,6$  Гц, 2H), 2,18 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  160,60, 158,48, 158,19, 154,82, 147,57, 138,92, 137,10, 130,22, 121,18, 118,53, 114,30, 108,37, 106,02, 105,74, 73,81, 62,10, 58,76, 46,45, 45,76, 39,21. MS (ESI+)  $m/z$  375,1 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).



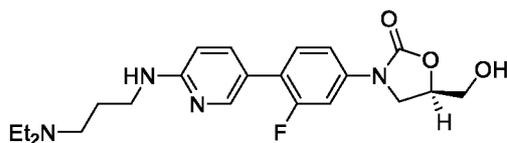
**AKG-13**

[00181] Применяя способ B, АКГ-13 получали из Промежуточного соединения 3 и  $N^1, N^1$ -диэтилэтан-1,2-диамина в виде белого твердого вещества (0,68 г, 51,9% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,17 (s, 1H), 7,67 – 7,46 (m, 3H), 7,39 (dd,  $J = 8,6, 2,1$  Гц, 1H), 6,63 – 6,44 (m, 2H), 5,25 (s, 1H), 4,74 (dd,  $J = 9,2, 5,8$  Гц, 1H), 4,12 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 3,87 (dd,  $J = 8,9, 6,2$  Гц, 1H), 3,76 – 3,65 (m, 1H), 3,63 – 3,52 (m, 1H), 3,34 (dd,  $J = 13,2, 6,2$  Гц, 2H), 2,60 – 2,55 (m, 2H), 2,54 – 2,50 (m, 4H), 0,97 (t,  $J = 7,1$  Гц, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  160,60, 158,53, 158,18, 154,81, 147,62, 138,91, 137,13, 130,20, 121,16, 118,54, 114,29, 108,24, 105,87, 73,80, 62,10, 52,19, 47,13, 46,45, 39,48, 12,31. MS (ESI+)  $m/z$  417,1 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).



**AKG-14**

[00182] Применяя способ B, АКГ-14 получали из Промежуточного соединения 3 и  $N^1, N^1$ -диметилпропан-1,3-диамина в виде белого твердого вещества (0,6 г, 47,3% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,16 (s, 1H), 7,63 – 7,54 (m, 2H), 7,50 (t,  $J = 8,9$  Гц, 1H), 7,39 (dd,  $J = 8,6, 2,2$  Гц, 1H), 6,73 (t,  $J = 5,6$  Гц, 1H), 6,54 (d,  $J = 8,7$  Гц, 1H), 5,25 (t,  $J = 5,5$  Гц, 1H), 4,78 – 4,68 (m, 1H), 4,11 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 3,87 (dd,  $J = 8,9, 6,2$  Гц, 1H), 3,75 – 3,66 (m, 1H), 3,64 – 3,53 (m, 1H), 3,33 – 3,23 (m, 2H), 2,28 (t,  $J = 7,1$  Гц, 2H), 2,13 (s, 6H), 1,72 – 1,62 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  160,60, 158,62, 158,18, 154,81, 147,62, 138,89, 137,08, 130,19, 121,21, 118,39, 114,29, 108,10, 106,02, 105,74, 73,81, 62,10, 57,44, 46,45, 45,72, 39,58, 27,54. MS (ESI+)  $m/z$  389,1 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).

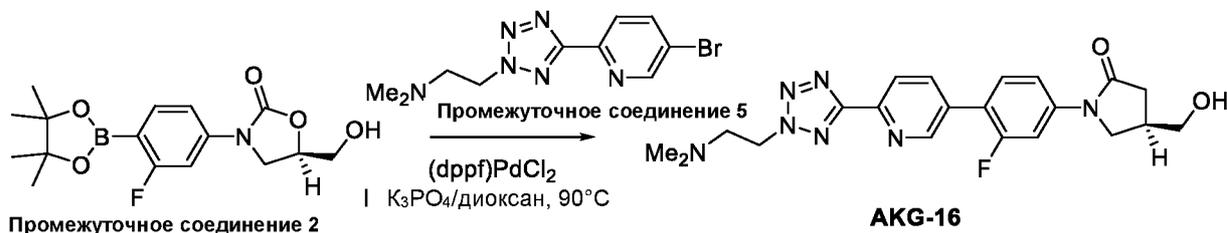


**AKG-15**



течение 0,5 ч и затем добавляли (2-бромэтил)диметиламин гидробромид (25,0 г, 107,3 ммоль). Смесь нагревали при 80°C в течение 24 ч. ЖХ-МС показала смесь 3:1 Промежуточных соединений 5 и 6, соответственно. Смесь разбавляли H<sub>2</sub>O (40 мл) и экстрагировали EtOAc (2 x 50 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным рассолом, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и фильтровали. Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью FC (элюент с MeOH в DCM 0-15%) с получением неочищенного вещества. Неочищенное вещество далее очищали с помощью RP-FC (MeCN в 0,1% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O 0-30%, C18, Промежуточное соединение 5 элюировали первым, а затем Промежуточное соединение 6) с получением Промежуточного соединения 5 (0,74 г, 5,6% выход) в виде белого твердого вещества и Промежуточного соединения 6 (0,25 г) в виде светло-желтого твердого вещества.

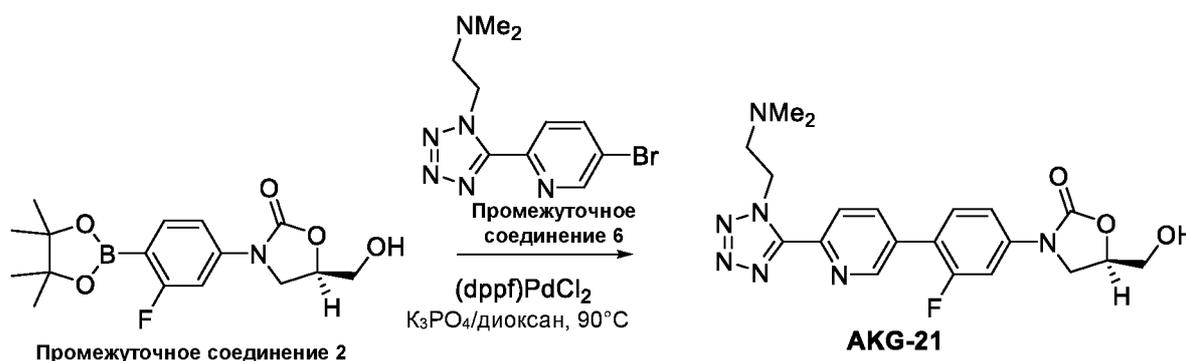
[00186] Промежуточное соединение 5: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,89 (dd, *J* = 2,3, 0,6 Гц, 1H), 8,27 (dd, *J* = 8,4, 2,4 Гц, 1H), 8,10 (dd, *J* = 8,4, 0,6 Гц, 1H), 4,87 (t, *J* = 6,1 Гц, 2H), 2,87 (t, *J* = 6,1 Гц, 2H), 2,17 (s, 6H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 163,74, 151,48, 145,51, 140,81, 124,40, 122,21, 57,73, 51,54, 45,29. MS (ESI+) *m/z* 297,1, 299,1 ([*M* + 1]<sup>+</sup>). Промежуточное соединение 6: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,98 (s, 1H), 8,38 (dd, *J* = 8,4, 2 Гц, 1H), 8,20 (d, *J* = 8,4 Гц, 1H), 5,00 (t, *J* = 6,4 Гц, 2H), 2,75 (t, *J* = 6 Гц, 2H), 2,10 (s, 6H), MS (ESI+) *m/z* 297,1, 299,1 ([*M* + 1]<sup>+</sup>).



[00187] Смесь свежеприготовленного Промежуточного соединения 2 (1,68 г, 4,98 ммоль) (из 1,44 г (R)-3-(4-бром-3-фторфенил)-5-(гидроксиметил)оксазолидин-2-она, применяя способ для Промежуточного соединения 3), Промежуточного соединения 5 (740 мг, 2,49 ммоль) и K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1,16 г, 5,48 ммоль) в диоксане (50 мл) и H<sub>2</sub>O (5 мл) продували Ar в течение 10 мин. К этой смеси добавляли (dppf)PdCl<sub>2</sub> (182 мг, 0,25 ммоль). Смесь снова продували Ar. Затем реакционную смесь нагревали до 90°C в течение 15 ч. ЖХ-МС показала завершение реакции. Смесь концентрировали под вакуумом, остаток разбавляли H<sub>2</sub>O (200 мл) и экстрагировали EtOAc (2 x 200 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным рассолом, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и фильтровали. Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью RPFC (элюент с MeCN в H<sub>2</sub>O, 0-40%) с получением АКГ-16 (520

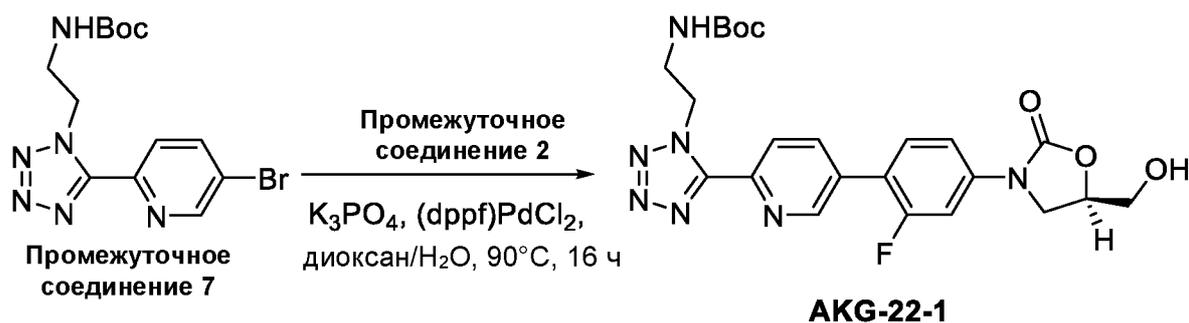
мг, 49,0% выход) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,23 (dd,  $J = 18,3, 8,2$  Гц, 2H), 7,82 – 7,66 (m, 2H), 7,54 (dd,  $J = 8,6, 2,1$  Гц, 1H), 5,28 (s, 1H), 4,89 (t,  $J = 6,1$  Гц, 2H), 4,82 – 4,71 (m, 1H), 4,17 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 3,98 – 3,87 (m, 1H), 3,77 – 3,65 (m, 1H), 3,64 – 3,53 (m, 1H), 2,90 (t,  $J = 6,1$  Гц, 2H), 2,19 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,17, 161,02, 158,58, 154,81, 149,91, 145,59, 141,03, 137,63, 132,10, 131,39, 122,59, 119,05, 114,47, 105,97, 105,69, 73,95, 62,07, 57,72, 51,46, 46,46, 45,26. MS (ESI+)  $m/z$  428,1 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).

### 12. Синтез АКГ-21

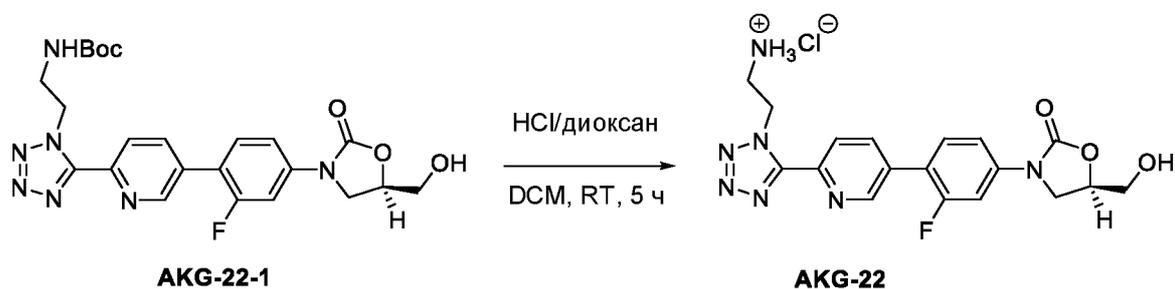


[00188] Раствор Промежуточного соединения 2 (1,5 г, 4,5 ммоль), Промежуточного соединения 6 (0,9 г, 3 ммоль),  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (247 мг, 0,3 ммоль) и  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (1,3 г, 6 ммоль) в диоксане (30 мл) и  $\text{H}_2\text{O}$  (5 мл) продували  $\text{Ar}$  в течение 10 мин и нагревали до  $100^\circ\text{C}$  в течение 15 ч. По завершении реакции (ЖХ-МС) смесь концентрировали под вакуумом, остаток разбавляли  $\text{H}_2\text{O}$  (100 мл) и экстрагировали  $\text{EtOAc}$  (2 x 50 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным раствором, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и фильтровали. Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью FC (элюент с  $\text{MeOH}$  в  $\text{DCM}$  (10%  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) от 0 до 10%) с получением АКГ-21 (450 мг, 35% выход) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9,01 (s, 1H), 8,36 (d,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 8,30 (d,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 7,81 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,74 (dd,  $J = 13,6, 2,0$  Гц, 1H), 7,55 (dd,  $J = 8,4, 2,0$  Гц, 1H), 5,26 (t,  $J = 5,6$  Гц, 1H), 5,08 (t,  $J = 6,4$  Гц, 2H), 4,79 – 4,75 (m, 1H), 4,18 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 3,93 – 3,89 (m, 1H), 3,74 – 3,68 (m, 1H), 3,62 – 3,56 (m, 1H), 2,80 (t,  $J = 6,4$  Гц, 2H), 2,13 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  161,09, 158,64, 154,80, 152,10, (149,45, 149,40), 143,46, (141,35, 141,23), (138,19, 138,15), (132,77, 132,76), (131,53, 131,48), 124,58, (118,69, 118,56), (114,51, 114,49), (105,97, 105,68), 73,96, 62,06, 58,38, 47,26, 46,47, 45,42.

### 13. Синтез АКГ-22

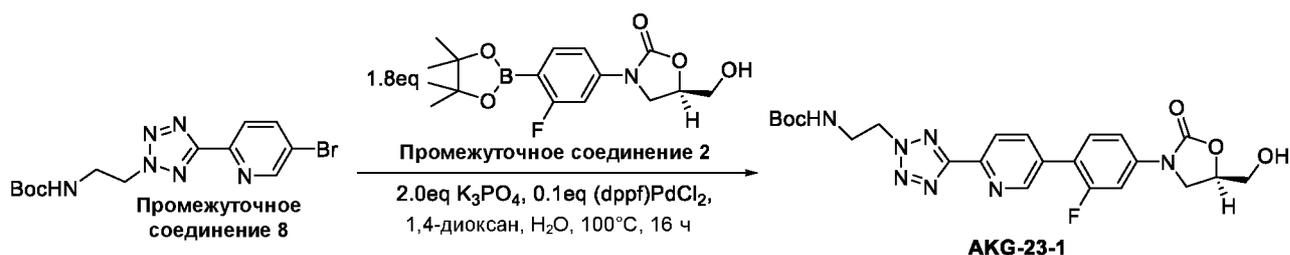


[00189] К смеси Промежуточного соединения 7 (500 мг, 1,354 ммоль) в  $\text{H}_2\text{O}$  (2 мл) и диоксана (8 мл) добавляли Промежуточное соединение 2 (685 мг, 2,03 ммоль),  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (862 мг, 4,06 ммоль) и  $(\text{dppf})\text{PdCl}_2$  (99 мг, 0,135 ммоль). Колбу вакуумировали и снова заполняли  $\text{Ar}$ . Затем смесь перемешивали при  $90^\circ\text{C}$  в течение 16 ч. Добавляли воду (20 мл), экстрагировали  $\text{EtOAc}$  (2 x 20 мл). Органическую фазу промывали рассолом, высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (Biotage, колонка с силикагелем 40 г, 30 мл/мин, элюирование 0-100%  $\text{EtOAc}$  в петролейном эфире) с получением целевого продукта АКГ-22-1 (450 мг, 66% выход) в виде серого твердого вещества.

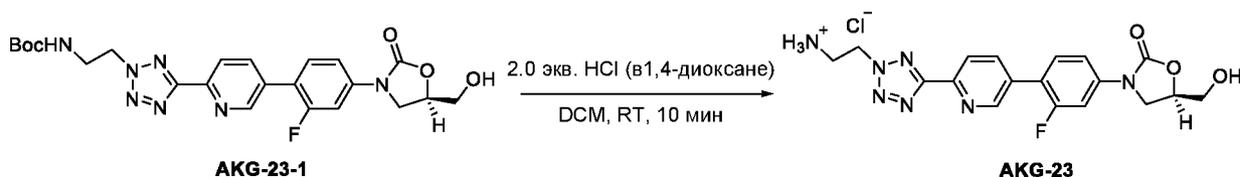


[00190] К смеси АКГ-22-1 (450 мг, 0,9 ммоль) в  $\text{DCM}$  (8 мл) добавляли 4 М  $\text{HCl}$ /диоксан (2 мл). Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Растворитель удаляли под вакуумом с получением целевого соединения АКГ-22 (390 мг, 99% выход) в виде серого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  9,03 (s, 1H), 8,39 (d,  $J = 8,0$  Гц, 1H), 8,32 (d,  $J = 8,0$  Гц, 1H), 8,19 (brs, 3H), 7,82 – 7,70 (m, 2H), 7,57 (dd,  $J = 8,8, 2,0$  Гц, 1H), 5,18 (t,  $J = 5,8$  Гц, 2H), 4,81 – 4,74 (m, 1H), 4,17 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 3,93 (dd,  $J = 9,2, 6,4$  Гц, 1H), 3,71 (dd,  $J = 12,4, 3,2$  Гц, 1H), 3,59 (dd,  $J = 12,4, 4,0$  Гц, 1H), 3,53 – 3,47 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (161,07, 158,63), 154,82, 152,52, 149,54, 143,25, (141,39, 141,28), 138,24, 124,54, (118,66, 118,53), 114,60, (106,01, 105,73), 73,97, 62,02, 47,37, 46,48, 38,84.

#### 14. Синтез АКГ-23

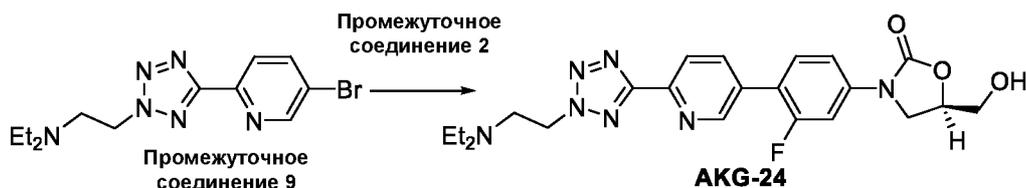


[00191] К Промежуточному соединению 8 (1,0 г, 2,71 ммоль) в 20 мл 1,4-диоксана и 5 мл  $H_2O$  добавляли Промежуточное соединение 2 (4,86 ммоль, 1,63 г),  $K_3PO_4$  (1,14 г, 5,42 ммоль) и  $(dppf)PdCl_2$  (0,23 г, 0,27 ммоль), и смесь перемешивали при  $100^\circ C$  в течение 16 ч. После израсходования исходного материала добавляли 100 мл насыщенного раствора  $NaHCO_3$ . Водную фазу экстрагировали  $EtOAc$  (3 x 30 мл), объединенные органические экстракты промывали  $H_2O$ , концентрировали под вакуумом и очищали с помощью FC с получением целевого соединения AKG-23-1 (1,0 г, 70% выход).



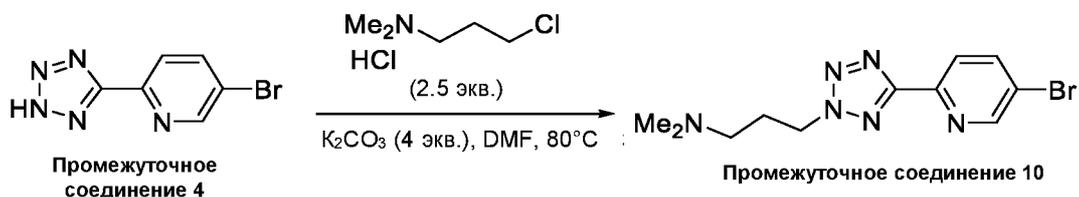
[00192] К AKG-23-1 (1,0 г, 2 ммоль) в 30 мл DCM добавляли 1 мл  $HCl$  (4 М в 1,4-диоксане), и смесь оставляли перемешиваться в течение 1 ч. После израсходования исходного материала смесь взбалтывали с получением неочищенного вещества. Неочищенное вещество перемешивали в 3 мл  $MeOH$  в течение 1 ч, взбалтывали с получением целевого соединения AKG-23 в виде белого твердого вещества (0,53 г, 63% выход).  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8,97 (s, 1H), 8,26 (m, 5H), 7,83–7,64 (m, 2H), 7,54 (dd,  $J = 8,6, 1,9$  Гц, 1H), 5,09 (s, 2H), 4,77 (m, 1H), 4,16 (t,  $J = 9,1$  Гц, 1H), 3,92 (dd,  $J = 8,8, 6,2$  Гц, 1H), 3,71 (dd,  $J = 12,3, 3,2$  Гц, 1H), 3,61–3,57 (dd,  $J = 12,3, 3,2$  Гц, 1H), 3,53 (m, 3H).  $^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  38,31, 46,49, 50,86, 62,01, 73,96, [105,69, 105,97], 114,46, [118,90, 119,03], 122,73, [131,37, 131,47], 132,21, [137,66, 137,70], [140,99, 141,10], 145,42, 149,86, 154,82, [158,57, 161,02], 164,50.

### 15. Синтез AKG-24

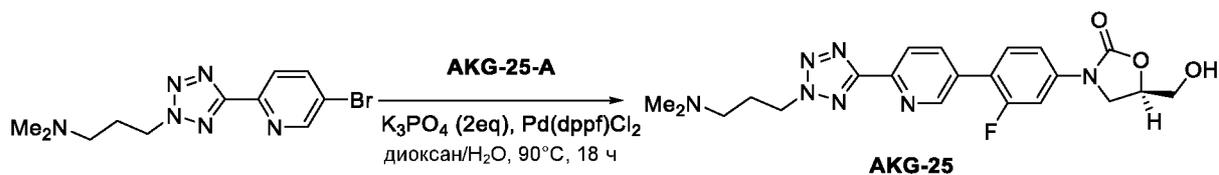


[00193] Смесь Промежуточного соединения 2 (1,66 г, 4,98 ммоль), Промежуточного соединения 9 (800 мг, 2,49 ммоль) и  $K_3PO_4$  (1,16 г, 5,48 ммоль) в диоксане (50 мл) и  $H_2O$  (5 мл) продували  $Ar$  в течение 10 мин и добавляли  $(dppf)PdCl_2$  (182 мг, 0,25 ммоль). Смесь снова продували  $Ar$ . Затем смесь нагревали до  $90^\circ C$  в течение 15 ч. ЖХ-МС показала завершение реакции; смесь концентрировали под вакуумом, остаток разбавляли  $H_2O$  (200 мл) и экстрагировали  $EtOAc$  (2 x 200 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным рассолом с последующей сушкой над  $Na_2SO_4$  и фильтровали. Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью RPFC (элюент с  $MeCN$  в  $H_2O$ , 0-40%) с получением соединения АКГ-24 (440 мг, 39,0% выход) в виде белого твердого вещества.  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,28 – 8,16 (m, 2H), 7,81 – 7,67 (m, 2H), 7,54 (dd,  $J = 8,6, 2,1$  Гц, 1H), 5,27 (t,  $J = 5,6$  Гц, 1H), 4,93 – 4,70 (m, 3H), 4,17 (t,  $J = 9,1$  Гц, 1H), 3,92 (dd,  $J = 8,9, 6,1$  Гц, 1H), 3,72 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,04 (s, 2H), 0,87 (t,  $J = 6,9$  Гц, 6H).  $^{13}C$  ЯМР (101 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  164,13, 161,03, 158,59, 154,81, 149,94, 149,90, 145,66, 141,09, 140,98, 137,66, 137,62, 132,10, 132,08, 131,41, 131,37, 122,54, 119,15, 119,02, 114,50, 114,47, 105,99, 105,71, 73,95, 62,08, 52,09, 51,60, 46,85, 46,48, 12,26. MS (ESI+)  $m/z$  456 ( $[M + H]^+$ ).

#### 16. Синтез АКГ-25

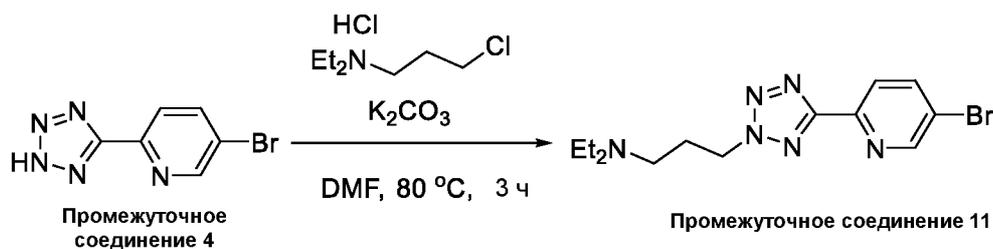


[00194] К смеси Промежуточного соединения 4 (2,25 г, 10 ммоль) и  $K_2CO_3$  (5,52 г, 40 ммоль) в  $DMF$  (20 мл) добавляли 3-хлор-N,N-диметилпропан-1-амин гидрохлорид (3,95 г, 25 ммоль), и смесь нагревали до  $80^\circ C$  в течение 4 ч. Смесь разбавляли  $H_2O$  (40 мл) и экстрагировали  $EtOAc$  (2 x 100 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным рассолом с последующей сушкой над  $Na_2SO_4$  и фильтровали. Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток указывал на наличие двух региоизомеров в результате  $N$ -алкилирования. Изомеры разделяли с помощью FC (элюент с  $MeOH$  в  $DCM$  0-15%) с получением Промежуточного соединения 10 (0,98 г, выход 31,6%) в виде белого твердого вещества.  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,83 (dd,  $J = 2,4, 0,8$  Гц, 1H), 8,16 (dd,  $J = 8,0, 0,4$  Гц, 1H), 8,01 (dd,  $J = 8,4, 2,4$  Гц, 1H), 4,78 (t,  $J = 6,8$  Гц, 2H), 2,38 (t,  $J = 3,2$  Гц, 2H), 2,27-2,22 (m, 8H). MS (ESI+)  $m/z$  311,1, 313,1 ( $[M + 1]^+$ ).



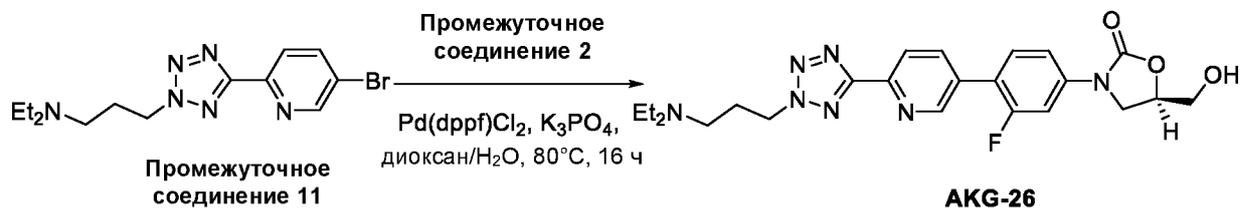
[00195] Смесь Промежуточного соединения 10 (0,74 г, 2,4 ммоль), Промежуточного соединения 2 (1,62 г, 4,8 ммоль) и  $K_3PO_4$  (1 г, 4,8 ммоль) в диоксане (30 мл) и  $H_2O$  (5 мл) продували  $Ar$  в течение 10 мин и добавляли  $Pd(dppf)Cl_2$  (175 мг, 0,24 ммоль). Смесь снова продували  $Ar$  и нагревали до  $90^\circ C$  в течение 15 ч. Смесь концентрировали под вакуумом, остаток разбавляли  $H_2O$  (80 мл) и экстрагировали  $EtOAc$  (2 x 100 мл). Объединенные экстракты промывали насыщенным рассолом с последующей сушкой над  $Na_2SO_4$  и фильтровали. Растворитель удаляли под вакуумом, и остаток очищали с помощью  $FC$  (элюент с  $MeOH$  в  $DCM$  0-15%) с получением соединения  $AKG-25$  (0,73 г, 69,5% выход) в виде серого твердого вещества.  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  8,94 (s, 1H), 8,24-8,26 (m, 1H), 8,19-8,21 (m, 1H), 7,78-7,70 (m, 2 H), 7,54 (dd,  $J = 8,4, 2,0$  Гц, 1H), 5,27 (t,  $J = 5,6$  Гц, 1H), 4,80 (t,  $J = 6,8$  Гц, 2H), 4,77-4,75 (m, 1H), 4,16 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 3,92 (dd,  $J = 8,8$  Гц, 6,0 Гц, 1H), 3,74 – 3,69 (m, 1H), 3,63 – 3,58 (m, 1H), 2,28 (t,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 2,10 - 2,17 (m, 8H).  $^{13}C$  ЯМР (101 МГц,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  164,26, 161,03, 158,58, 154,81, 149,92, 145,58, 141,09, 137,65, 132,10, 131,37, 122,60, 119,12, 118,99, 114,46, 105,98, 105,70, 73,95, 62,07, 55,96, 51,65, 46,47, 45,53, 27,21. MS (ESI+)  $m/z$  442,1 ( $[M + 1]^+$ ).

#### 17. Синтез $AKG-26$



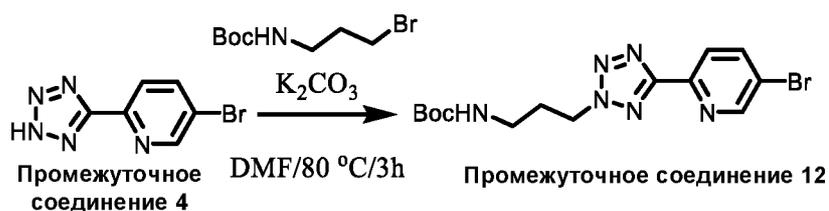
[00196] К раствору Промежуточного соединения 4 (5,0 г, 22,12 ммоль) в  $DMF$  (30 мл) добавляли (3-хлорпропил)диэтиламин гидрохлорид (8,23 г, 55,30 ммоль) и  $K_2CO_3$  (9,17 г, 66,36 ммоль) при  $80^\circ C$  в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали, выливали на баню с ледяной водой и экстрагировали  $EA$  (2 x 200 мл). Объединенные органические фазы промывали рассолом (2 x 50 мл) и высушивали над  $Na_2SO_4$ . После удаления растворителя неочищенное вещество с региоизомерами  $N$ -алкилирования очищали с помощью  $FC$  ( $PE/EA = 1:10$ ) с получением Промежуточного соединения 11 (1,70 г, 22,65%) в виде белого твердого вещества.  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,34 (d,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 8,15 (d,  $J = 8,0$  Гц, 1H), 8,00 (dd,  $J = 8,0, 2,0$

Гц, 2H), 4,77 (t,  $J = 7,0$  Гц, 2H), 2,53-2,49 (m, 6H), 2,26-2,20 (m, 2H), 0,99 (t,  $J = 7,5$  Гц, 6H). MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  339,1, 341,1 ([M + 1]<sup>+</sup>).



[00197] Смесь Промежуточного соединения 11 (0,68 г, 2,00 ммоль), Промежуточного соединения 2 (1,07 г, 3,99 ммоль), трикалийфосфата (0,85 г, 3,985 ммоль) и Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0,15 г, 0,20 ммоль) суспендировали в смеси 1,4-диоксан:вода (12 мл, 6:1). Реакционную смесь перемешивали при температуре кипения с обратным холодильником в течение 16 ч. Смесь разделяли между EtOAc (2 x 100 мл) и водой, промывали рассолом, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и фильтровали. До удаления растворителя остаток, содержащий региоизомеры, очищали с помощью FC, элюируя смесью (DCM/MeOH = 20/1), с получением АКГ-26 (0,54 г, 56,04%) в виде серого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,95 (s, 1H), 8,26-8,19 (m, 2H), 7,78-7,70 (m, 2H), 7,53 (dd,  $J = 10,5, 2,5$  Гц, 1H), 5,27 (d,  $J = 7,5$  Гц, 1H), 4,83-4,75 (m, 2H), 4,17 (t,  $J = 11,5$  Гц, 1H), 3,92 (dd,  $J = 11,0, 7,5$  Гц, 1H), 3,74-3,69 (m, 1H), 3,62-3,58 (m, 1H), 3,51-3,28 (m, 8H), 2,14 (t,  $J = 8,0$  Гц, 2H), 0,93 (t,  $J = 8,5$  Гц, 6H). <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164,24, 161,03, 158,59, 154,52, 149,91, (d,  $J = 3,2$  Гц), 145,59, 141,03 (d,  $J = 11,8$  Гц), 137,64 (d,  $J = 3,2$  Гц), 132,12, 131,40 (d,  $J = 4,5$  Гц), 122,57, 119,06 (d,  $J = 12,8$  Гц), 114,47 (d,  $J = 2,8$  Гц), 105,97, 105,70, 73,96, 62,07, 51,70, 49,19, 46,75, 46,48. MS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  470,1 ([M + 1]<sup>+</sup>).

#### 18. Синтез АКГ-27



[00198] К раствору Промежуточного соединения 4 (6,3 г, 27,87 ммоль) в DMF (42 мл) добавляли BocNH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Br (16,6 г, 69,71 ммоль) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (11,1 г, 80,02 ммоль) при 80°C в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали, выливали на баню с ледяной водой и экстрагировали EtOAc (2 x 200 мл). Органическую фазу промывали рассолом (2 x 50 мл), высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и фильтровали, выпаривая растворитель при пониженном давлении. Неочищенное вещество с региоизомерами N-алкилирования очищали с помощью FC (PE/EA = 2:1) с получением Промежуточного соединения 12 (14 г, 13,1%) в виде желтого твердого



*19. Синтез от AKG-28 до AKG-31*

[00201] К раствору (R)-3-(4-бром-3-фторфенил)-5-(гидроксиметил)оксазолидин-2-она (9 г, 31 ммоль) в DCM (100 мл) добавляли (3,92 г, 34 ммоль) и TEA (3,76 г, 37 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Смесь промывали водой (2 x 30 мл) и рассолом (2 x 30 мл), высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением Промежуточного соединения 13 (11,4 г, выход 99%). MS (ESI+) m/z 368 ([M + 1]<sup>+</sup>).

[00202] К раствору Промежуточного соединения 13 (11,4 г, 31 ммоль) в DMF (200 мл) добавляли 1,3-диоксоизоиндолин-2-ид калия (6,02 г, 32 ммоль). Смесь перемешивали при 90°C в течение ночи. Смесь охлаждали, выливали в воду (1000 мл) и перемешивали в течение 0,5 ч. Осадок собирали и высушивали под вакуумом с получением Промежуточного соединения 14 (11 г, выход 85%). MS (ESI+) m/z 419 ([M + 1]<sup>+</sup>).

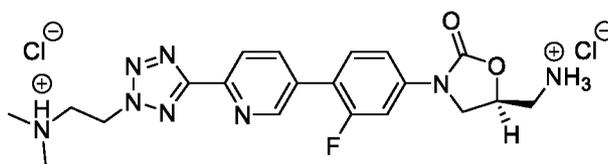
[00203] К раствору Промежуточного соединения 14 (11 г, 26,3 ммоль) в EtOH (150 мл) добавляли NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O (85%, 7,7 г, 131 ммоль). Смесь перемешивали при 90°C в течение ночи. Смесь фильтровали и промывали EtOH (2 x 50 мл). Фильтрат концентрировали с получением Промежуточного соединения 15 (7,6 г, выход 100%). MS (ESI+) m/z 289 ([M + 1]<sup>+</sup>).

[00204] К раствору Промежуточного соединения 15 (7,6 г, 26,4 ммоль) в THF (50 мл) и воде (50 мл) добавляли (Boc)<sub>2</sub>O (6,9 г, 32 ммоль) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,29 г, 52,8 ммоль), и смесь перемешивали в течение 2 ч. Смесь разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали EtOAc (3 x 50 мл). Объединенный органический экстракт промывали рассолом (2 x 50 мл), высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью FC (Biotage, колонка с силикагелем 80 г, 65 мл/мин, элюирование 0-60% EtOAc в петролейном эфире в течение 30 мин) с получением Промежуточного соединения 16 (7,8 г, выход 75%). MS (ESI+) m/z 411 ([M + 23]<sup>+</sup>).

[00205] Смесь Промежуточного соединения 16 (7,8 г, 20 ммоль), бис(пинаколато)диборона (6,54 г, 30 ммоль) и KOAc (2,94 г, 30 ммоль) в диоксане (100 мл) продували Ar в течение 10 мин и затем добавляли (Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub> (1,06 г, 1,5 ммоль). Смесь снова продували Ar и перемешивали при 90°C в течение ночи. Смесь охлаждали и разбавляли водой (300 мл), экстрагировали EtOAc (3 x 100 мл). Объединенный экстракт промывали рассолом (2 x 50 мл), высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью FC (Biotage, колонка с силикагелем 80 г, 65 мл/мин, элюирование 0-60% EtOAc в петролейном эфире в течение 30 мин) с получением Промежуточного соединения 18 (6,2 г, выход 70%). MS (ESI+) m/z 459 ([M + 23]<sup>+</sup>).

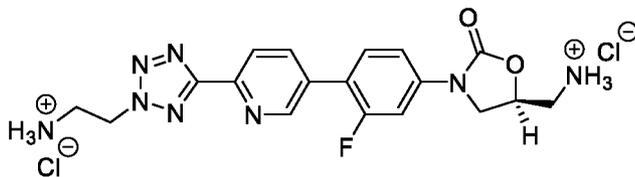
[00206] *Способ С*: Смесь одного из Промежуточных соединений 5/8/9/10/11 (1,0 экв.), одного из Промежуточных соединений 18/19 (1,5 экв.), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> DCM (0,1 экв.) и K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2,0 экв.) в смеси диоксан/Н<sub>2</sub>O (10:1, 0,06 М) продували N<sub>2</sub> и перемешивали при 90°C в течение ночи. Смесь разбавляли EtOAc, промывали водой и рассолом, высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью FC с получением одного из соединений АКГ-28-1/АКГ-29-1/АКГ-30-1/АКГ-31-1/АКГ-38/АКГ-39/АКГ-40.

[00207] К раствору одного из соединений АКГ-28-1/АКГ-29-1/АКГ-30-1/АКГ-31-1 в DCM (1 мл/100 мг) добавляли 3 н. HCl в EtOAc (20 экв.). Смесь перемешивали в течение 2 ч и затем фильтровали. Твердое вещество высушивали под вакуумом или лиофилизировали с получением одного из конечных соединений АКГ-28/АКГ-29/АКГ-30/АКГ-31 (выход 35~44% за две стадии).



АКГ-28

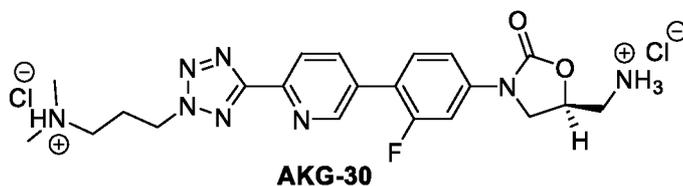
[00208] Применяя *способ С*. Это соединение получали из Промежуточного соединения 5 и Промежуточного соединения 18 в виде белого твердого вещества (0,35 г, 35% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,53 (s, 1H), 8,97 (s, 1H), 8,37 (s, 3H), 8,29 (d, *J* = 8,5 Гц, 1H), 8,24 (d, *J* = 8,5 Гц, 1H), 7,80 (t, *J* = 8,5 Гц, 1H), 7,69 (dd, *J* = 13,5, 2,0 Гц, 1H), 7,50 (dd, *J* = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 5,31 (t, *J* = 6,0 Гц, 2H), 5,04-4,99 (m, 1H), 4,28 (t, *J* = 9,0 Гц, 1H), 3,96 (dd, *J* = 9,0, 6,5 Гц, 1H), 3,84 (s, 2H), 3,28 (s, 2H), 2,87 (s, 6H) ppm. <sup>13</sup>C ЯМР (126 МГц, D<sub>2</sub>O) δ 163,90 (s), 160,30 (s), 158,33 (s), 154,86 (s), 148,55 (s), 142,64 (s), 138,93 (d, *J* = 11,0 Гц), 137,74 (s), 132,43 (s), 130,39 (s), 122,46 (s), 119,03 (s), 114,36 (s), 106,41 (s), 106,18 (s), 70,31 (s), 55,23 (s), 48,07 (s), 47,69 (s), 43,29 (s), 42,19 (s) ppm. MS (ESI+) *m/z* 427,1 ([M + 1]<sup>+</sup>).



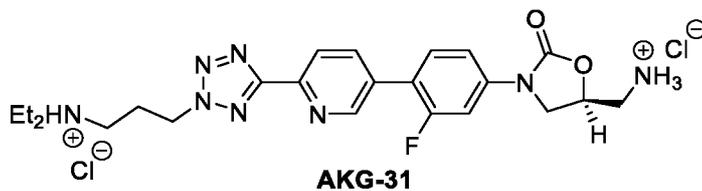
АКГ-29

[00209] Применяя *способ С*. Это соединение получали из Промежуточного соединения 8 и Промежуточного соединения 18 в виде белого твердого вещества (0,4 г, 44% выход). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,97 (s, 1H), 8,57-8,41 (m, 6H), 8,29-8,13 (m, 2H), 7,80 (t, *J* = 9,0 Гц,

1H), 7,69 (dd,  $J = 13,5, 2,5$  Гц, 1H), 7,49 (dd,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 5,12 - 5,03 (m, 3H), 4,28 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 4,02-3,98 (m, 1H), 3,54-3,51 (m, 2H), 3,33-3,26 (m, 2H), 8,28 (s, 1H), 7,73 - 7,65 (m, 1H), 7,60 (dd,  $J = 13,6, 2,1$  Гц, 1H), 7,54 (t,  $J = 8,9$  Гц, 1H), 7,41 (dd,  $J = 8,6, 2,1$  Гц, 1H), 6,89 (d,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 5,25 (t,  $J = 5,6$  Гц, 1H), 4,78 - 4,68 (m, 1H), 4,33 (d,  $J = 13,0$  Гц, 2H), 4,12 (t,  $J = 9,0$  Гц, 1H), 3,87 (dd,  $J = 8,9, 6,2$  Гц, 1H), 3,74 - 3,64 (m, 1H), 3,62 - 3,52 (m, 1H), 2,87 - 2,71 (m, 2H), 2,23 (t,  $J = 7,3$  Гц, 2H), 2,11 (s, 6H), 1,72 (d,  $J = 11,5$  Гц, 2H), 1,64 - 1,49 (m, 1H), 1,34 (dd,  $J = 14,3, 7,0$  Гц, 2H), 1,18 - 1,04 (m, 2H) ppm.  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  161,52, 160,59, 158,12, 154,86, 145,70, 141,05, 140,16, 139,65, 133,57, 130,44, 123,64, 117,70, 114,54, 106,50, 106,22, 70,34, 50,81, 47,68 ppm. MS (ESI+)  $m/z$  399,2 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).



[00210] Применяя способ С. Это соединение получали из Промежуточного соединения 10 и Промежуточного соединения 18 в виде белого твердого вещества (0,36 г, 40% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10,94 (s, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,52 (s, 3H), 8,28-8,22 (m, 2H), 7,79 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,69 (dd,  $J = 13,6, 2,0$  Гц, 1H), 7,49 (dd,  $J = 8,8, 2,0$  Гц, 1H), 5,08-5,01 (m, 1H), 4,93 (t,  $J = 6,8$  Гц, 2H), 4,28 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 4,00 (dd,  $J = 9,2, 6,8$  Гц, 1H), 3,29 - 3,26 (m, 2H), 3,21-3,16 (m, 2H), 2,75 (d,  $J = 4,8$  Гц, 6H), 2,49-2,43 (m, 2H) ppm.  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  162,39 (s), 160,58 (s), 158,11 (s), 154,88 (s), 147,20 (s), 141,66 (s), 139,28 (d,  $J = 11,3$  Гц), 132,86 (s), 130,45 (s), 122,90 (s), 118,44 (d,  $J = 12,0$  Гц), 114,44 (s), 106,46 (s), 106,17 (s), 70,30 (s), 54,56 (s), 50,62 (s), 47,68 (s), 42,89 (s), 42,16 (s), 23,74 (s) ppm. MS (ESI+)  $m/z$  441 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).



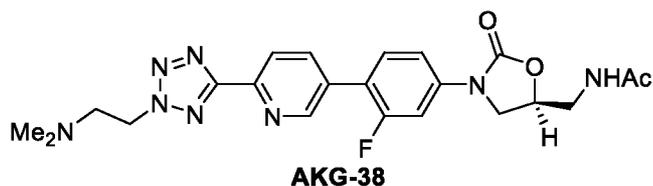
[00211] Применяя способ С. Это соединение получали из Промежуточного соединения 11 и Промежуточного соединения 18 в виде белого твердого вещества (0,36 г, 42% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10,10 (s, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,390-8,21 (m, 5H), 7,80 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,69 (dd,  $J = 13,6, 2,0$  Гц, 1H), 7,50 (dd,  $J = 8,8, 2,0$  Гц, 1H), 5,04-4,97 (m, 1H), 4,94 (t,  $J = 6,8$  Гц, 2H), 4,28 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 3,94 (dd,  $J = 9,6, 6,4$  Гц, 1H), 3,31-3,26 (m, 2H), 3,21-3,17 (m, 2H), 3,15-3,12 (m, 4H), 2,46-2,42 (m, 2H), 1,21 (t,  $J = 7,2$  Гц, 6H) ppm.  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )

$\delta$  163,04 (s), 160,53 (s), 158,07 (s), 154,84 (s), 147,95 (d,  $J = 5,4$  Гц), 142,36 (s), 139,05 (d,  $J = 11,3$  Гц), 138,32 (s), 132,44 (s), 130,38 (d,  $J = 4,0$  Гц), 122,50 (s), 118,72 (d,  $J = 12,8$  Гц), 114,35 (s), 106,37 (s), 106,09 (s), 70,29 (s), 50,65 (s), 48,55 (s), 47,64 (d,  $J = 7,4$  Гц), 42,17 (s), 23,05 (s), 8,24 (s) ppm. MS (ESI+)  $m/z$  469 ( $[M + 1]^+$ ).

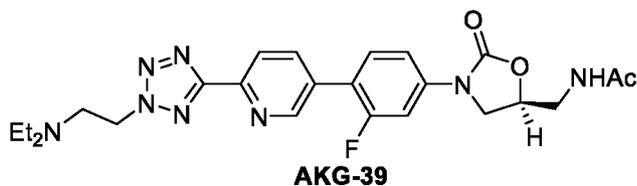
[00212] К раствору Промежуточного соединения 15 (7,6 г, 26,4 ммоль) в DCM (150 мл) добавляли триэтиламин (TEA, 4,57 г, 6,27 мл, 52,77 ммоль, 2,0 экв.) с последующим добавлением ацетилхлорида (AcCl, 2,6 г, 2,74 мл, 39,58 ммоль, 1,5 экв.) и 4-N,N-диметиламинопиридина (DMAP, 0,028 г, 2,64 ммоль, 0,01 экв.) при 0 - 5°C в атмосфере N<sub>2</sub>. Полученную реакционную смесь затем перемешивали при 0 - 5°C в течение 2 ч. Когда TLC и ЖХ-МС показали завершение реакции, реакционную смесь гасили H<sub>2</sub>O (100 мл). Два слоя разделяли, затем водный слой экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 50 мл), объединенные органические экстракты промывали H<sub>2</sub>O (2 x 100 мл) и насыщенным водным раствором NaCl (100 мл), высушивали над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали с помощью FC (Biotage, колонка с силикагелем 80 г, 65 мл/мин, элюирование 0-60% EtOAc в петролейном эфире в течение 30 мин) с получением Промежуточного соединения 17 (6,5 г, выход 75%). MS (ESI+)  $m/z$  332 ( $[M + 1]^+$ ).

[00213] К раствору Промежуточного соединения 17 (6,5 г, 19,7 ммоль) в 1,4-диоксане (100 мл) добавляли комплекс 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен-палладий (II) дихлорид дихлорметан (1,61 г, 1,97 ммоль), бис(пинаколато)диборон (10 г, 39,39 ммоль) и KOAc (4,83 г, 49,24 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при 90°C в течение 4 ч. Когда TLC и ЖХ-МС показали завершение реакции, реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры перед обработкой водой (100 мл) и EtOAc (100 мл). Два слоя разделяли, и водный слой экстрагировали EtOAc (2 x 50 мл). Объединенные органические экстракты промывали водой (2 x 50 мл) и насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), высушивали над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали под вакуумом. Остаточное коричневое масло очищали с помощью FC (Biotage, колонка с силикагелем 80 г, 60 мл/мин, элюирование 0-100% EtOAc в петролейном эфире в течение 30 мин) с получением Промежуточного соединения 19 (6,6 г, выход 88,7%). MS (ESI+)  $m/z$  379 ( $[M + 1]^+$ ).

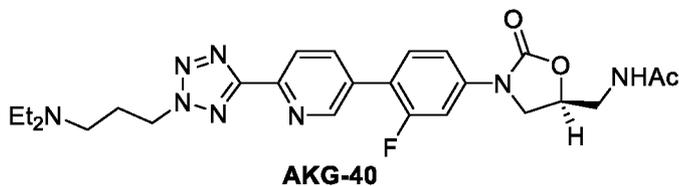
20. Синтез от AKG-38 до AKG-40



[00214] Применяя способ С. Это соединение получали из Промежуточного соединения 5 и Промежуточного соединения 19 в виде белого твердого вещества (0,48 г, 60% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO)  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,29-8,19 (m, 3H), 7,77 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,69 (dd,  $J = 13,6, 2,0$  Гц, 1H), 7,50 (dd,  $J = 8,8, 2,0$  Гц, 1H), 4,89 (t,  $J = 6,0$  Гц, 2H), 4,81-4,76 (m, 1H), 4,20 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 3,82 (dd,  $J = 9,2, 6,8$  Гц, 1H), 3,45 (t,  $J = 5,6$  Гц, 2H), 2,90 (t,  $J = 6,0$  Гц, 2H), 2,19 (s, 6H), 1,85 (s, 3H) ppm.  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170,51, 164,17, 154,46, 149,94, 145,62, 140,90, 137,63, 132,07, 131,39, 122,59, 119,25, 114,66, 106,18, 105,90, 72,34, 57,71, 51,45, 47,67, 45,25, 41,87, 22,92 ppm. MS (ESI+)  $m/z$  469,2 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).



[00215] Применяя способ С. Это соединение получали из Промежуточного соединения 9 и Промежуточного соединения 19 в виде белого твердого вещества (0,35 г, 40% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO)  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,29-8,19 (m, 3H), 7,76 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,69 (dd,  $J = 13,6, 2,0$  Гц, 1H), 7,50 (dd,  $J = 8,8, 2,0$  Гц, 1H), 4,84-4,76 (m, 3H), 4,21 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 3,82 (dd,  $J = 9,2, 6,4$  Гц, 1H), 3,46 (t,  $J = 5,6$  Гц, 2H), 3,04 (t,  $J = 5,6$  Гц, 2H), 2,50-2,47 (m, 4H), 1,85 (s, 3H), 0,87 (t,  $J = 7,2$  Гц, 6H) ppm.  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170,50, 164,11, 154,46, 149,91, 145,68, 137,68, 132,04, 131,40, 122,53, 119,27 (d,  $J = 13,3$  Гц), 114,65, 106,18, 105,90, 72,34, 52,11, 51,61, 47,67, 46,83, 41,87, 40,63, 40,42, 40,22, 40,01, 39,80, 39,59, 39,38, 22,92, 12,28 ppm. MS (ESI+)  $m/z$  497 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).



[00216] Применяя способ С. Это соединение получали из Промежуточного соединения 11 и Промежуточного соединения 19 в виде белого твердого вещества (0,36 г, 50% выход).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,95 (s, 1H), 8,31 – 8,18 (m, 3H), 7,77 (t,  $J = 8,8$  Гц, 1H), 7,69 (dd,  $J$

= 13,6, 2,0 Гц, 1H), 7,50 (dd,  $J = 8,8, 2,0$  Гц, 1H), 4,88 – 4,71 (m, 3H), 4,20 (t,  $J = 9,2$  Гц, 1H), 3,81 (dd,  $J = 9,2, 6,4$  Гц, 1H), 3,45 (t,  $J = 5,6$  Гц, 2H), 2,45 (s, 6H), 2,14 (s, 2H), 1,85 (s, 3H), 0,93 (s, 6H) ppm.  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  137,70, 131,45, 114,69, 46,79, 41,86, 40,64, 40,43, 40,22, 40,01, 39,80, 39,59, 39,38 ppm. MS (ESI+)  $m/z$  511 ( $[\text{M} + 1]^+$ ).

## **Пример 2. Анализ активности *in vitro* в отношении *Mycobacterium tuberculosis***

[00217] Применяемая методика микроразведений в бульоне МИС описана в Collins et al., 1997 и Gruppo et al., 2006. MIC or the minimum inhibitory concentration of the chemical compound which prevents visible growth of a bacteria after overnight incubation.

[00218] Вкратце, минимальные ингибирующие концентрации МИС определяли с помощью анализа микроразведений в бульоне с конечной точкой аламарового синего (Alamar blue) (МАВА), как описано у Collins et al., 1997 (Collins L, Franzblau SG (1997). Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. AAC. 41(5):1004–1009) и Gruppo et al., 2006 (Gruppo V, Johnson CM, Marietta KS, Scherman H, Zink EE, Crick DC, Adams LB, Orme IM, Lenaerts AJ. (2006) Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. AAC 50:1245-1250). МАВА представляет собой 96-луночный колориметрический анализ, в котором окислительно-восстановительный индикатор аламаровый синий меняет цвет с синего на розовый в присутствии активности роста микобактерий в бульонной среде.

[00219] Вкратце, полную среду 7H9 готовили путем добавления 4,7 г порошка бульона Middlebrook 7H9 (Millipore Sigma, номер по каталогу M0178), 2 мл глицерина и очищенной на картридже 898 воды в 1-литровую колбу при перемешивании до растворения и последующего добавления 100 мл раствора ADC (6 г бычьего сывороточного альбумина, 2 г декстрозы и 3 мг каталазы, растворенные в 100 мл воды) в ту же колбу объемом 1 л. Соединения доводили до концентрации 10 мг/мл в DMSO, и затем дополнительно разбавляли DMSO до 80 мкг/мл, что в сорок раз превышает целевую исходную концентрацию 2 мкг/мл. Серию из девяти разведений 1:2 готовили путем добавления 50 мкл раствора лекарственного средства в первой лунке к 50 мкл DMSO в последующей лунке и переноса этого действия на следующие восемь лунок планшета для приготовления лекарственного средства. Исходные растворы штаммов *M. tuberculosis* (M. tb) H34Rv и M. tb Erdman разбавляли средой от их начальной концентрации 3-

$4 \times 10^7$  КОЕ/мл до конечной концентрации  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл, тщательно перемешивали в пипетке с многоканальным дозатором.

[00220] Планшеты для анализа готовили путем переноса 100 мкл инокулированной среды  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл во все лунки. Затем 2,5 мкл каждого разведения лекарственного средства из планшета для приготовления лекарственного средства переносили в соответствующую лунку планшета для анализа. Затем планшеты для анализа помещали в пакеты с замком «ziplock» и помещали в инкубатор, где их инкубировали при 37°C. Затем планшеты считывали при OD600 нм на планшет-ридере на 3 и 10 день. После считывания при OD600 на десятый день в каждую аналитическую лунку добавляли 10 мкл красителя аламаровый синий. На 12-й день все планшеты для анализа сканировали на планшетном цветном сканере. Самая низкая последовательная противомикробная концентрация (обычно двукратные серийные разведения), которая не вызывает видимого изменения цвета с синего на розовый при применении аламарового синего и/или показывает снижение OD600 на  $\geq 80\%$  по сравнению с контрольными лунками без лекарственного средства, рассматривалась как МІС для этих соединений.

[00221] Анализы проводили с применением двух уникальных лекарственно чувствительных штаммов (*M. tb* Erdman и *M. tb* H37Rv). Анализы МІС также могут быть проведены в присутствии 4% (масс./об.) сывороточного альбумина человека (huSA) (Sigma # A1653) для оценки потенциального связывания с белком (анализ сдвига в сыворотке). Как правило, сдвиг МІС двух лунок (4-кратный сдвиг МІС) считался значительным. Для РА-824 (положительный контроль) следовало ожидать 4-кратного сдвига МІС.

[00222] МІС измеряли по показаниям аламарового синего (МАВА) или по показаниям оптической плотности (OD600), которые совпадали или отличались только на одно 2-кратное разведение, что находится в пределах анализа. Все протестированные соединения показали непротиворечивость значений МІС как против *M. tb* Erdman, так и против *M. tb* H37Rv, или находились в пределах одного 2-кратного разведения, за исключением одного соединения АКГ-40, которое показало более высокое значение МІС 1-2 мкг/мл против *M. tb* Erdman и МІС 0,5 против *M. tb* H37Rv. Это несоответствие может быть связано с более медленным ростом (более низкими показаниями OD) на планшете с *M. tb* Erdman.

[00223] Линезолид показал ожидаемое значение МІС 2 мкг/мл, тедизолид 0,25 мкг/мл и бедаквилин 0,125 мкг/мл. Эти значения согласуются с прошлыми данными МІС и опубликованными значениями (Ruiz et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2019, Mar 27;63(4),

pii: e01939-18, Reddy et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jul; 54(7):2840-6, Torrea et al. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Aug; 70(8):2300-5). АКГ-28 показал МИС 0,03-0,015 мкг/мл, что является значительно большей активностью, чем у тедизолида. Из аналогов оксазолидинона, содержащих ацетамидную группу, АКГ-39 показал МИС 0,5 мкг/мл, и АКГ-40 показал МИС 1-0,5 мкг/мл. АКГ-38 с МИС 0,06 мкг/мл также показал в несколько раз большую активность, чем тедизолид.

[00224] Молекулы с аминогруппой или ацетамидной группой в положении С5 оксазолидинона были более активными (АКГ-3 по сравнению с тедизолидом, АКГ-28 или АКГ-38 по сравнению с АКГ-16, АКГ-39 по сравнению с АКГ-24, АКГ-40 по сравнению с АКГ-26), и соединения с аминоалкильной боковой цепью на тетразоле показали предпочтительную активность. Замена трет-бутоксикарбониламиногруппы (Вос-NH) в положении С5 оксазолидинона на первичный амин (АКГ-28-1 по сравнению с АКГ-28) или ацетамид (АКГ-28-1 по сравнению с АКГ-38) приводила к снижению активности. Соединения, содержащие диметиламиноалкильную боковую цепь, были, в частности, лучше по сравнению с аналогами аминоэтила или диэтиламиноэтила (АКГ-16 по сравнению с АКГ-24, АКГ-28 по сравнению с АКГ-29, АКГ-30 по сравнению с АКГ-31). Аналогичным образом, более короткие диалкиламиноалкильные боковые цепи (такие как этилен по сравнению с пропиленом) в тетразольном кольце показали большую активность (АКГ-16 по сравнению с АКГ-25, АКГ-24 по сравнению с АКГ-26, АКГ-28 по сравнению с АКГ-30). Аналоги с заменами в положении 2' тетразола были более активны, чем аналоги с заменами в положении 1' (АКГ-16 по сравнению с АКГ-21, АКГ-23 по сравнению с АКГ-22).

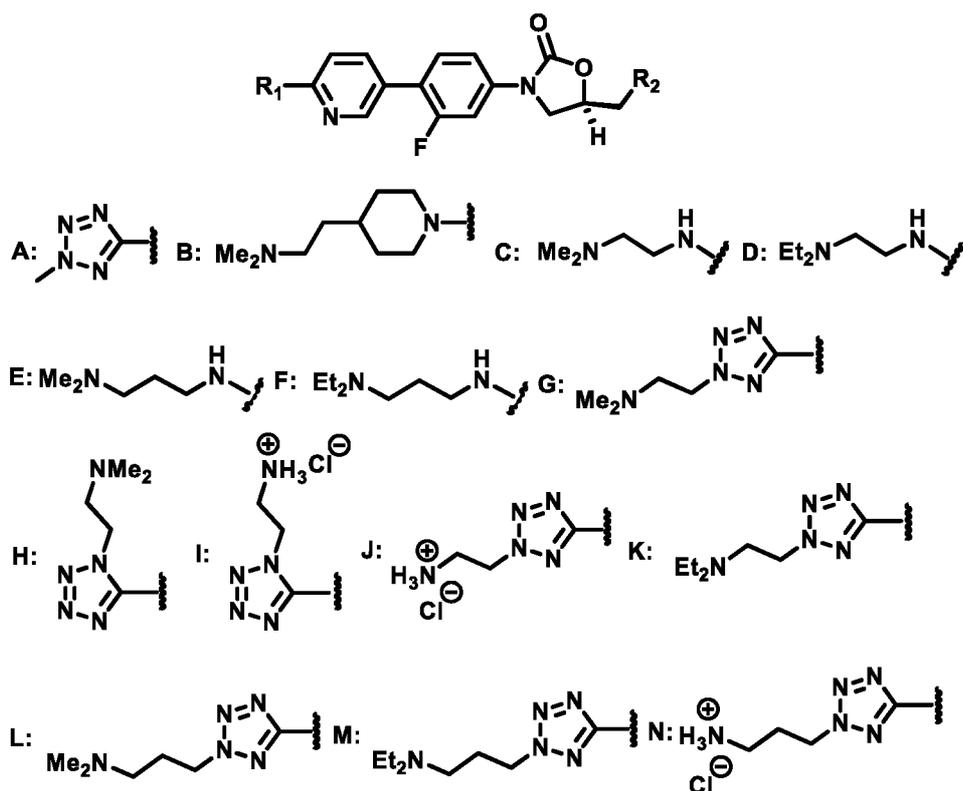


Таблица 2

Соединение, ID	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> MIC (мкг/мл)	
			Erdman	H37Rv
Линезолид		-NHCOMe	1	1
Сутезолид		-NHCOMe	0,5	0,5
Тедизолид		-OH	0,25	0,25
AKG-1	A	-NMe <sub>2</sub>	>8	>8
AKG-2	A	-NEt <sub>2</sub>	>8	>8
AKG-3	A	-NH <sub>2</sub> .HCl	0,125	0,06
AKG-5	A	-OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NMe <sub>2</sub>	1	1
AKG-6	A	B	>8	>8
AKG-7	A	-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NEt <sub>2</sub>	>8	>8
AKG-8	A	-N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NEt <sub>2</sub>	>8	>8
AKG-9	A	D	>8	>8
AKG-11	B	-OH	4	4
AKG-12	C	-OH	4	4
AKG-13	D	-OH	>8	>8
AKG-14	E	-OH	8	8
AKG-15	F	-OH	>8	>8
AKG-16	G	-OH	0,25	0,25
AKG-17	A	-NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> .HCl	2	2
AKG-18	A	-NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> .HCl	2	2

AKG-19	A	-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> .HCl	>8	>8
AKG-20	A	-OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NEt <sub>2</sub>	0,5	0,5
AKG-21	H	-OH	>8	>8
AKG-22	I	-OH	1	0,5
AKG-23	J	-OH	0,25	0,25
AKG-24	K	-OH	1	1
AKG-25	L	-OH	1	1
AKG-26	M	-OH	2	2
AKG-27	N	-OH	0,5	0,5
AKG-28	G	-NH <sub>2</sub> .HCl	0,03	0,015
AKG-28-1	G	-NHCOOMe <sub>3</sub>	0,25	0,125
AKG-29	J	-NH <sub>2</sub> .HCl	0,25	0,125
AKG-30	L	-NH <sub>2</sub> .HCl	0,125	0,125
AKG-31	M	-NH <sub>2</sub> .HCl	0,5	0,5
AKG-38	G	-NHCOMe	0,06	0,06
AKG-39	K	-NHCOMe	0,5	0,5
AKG-40	M	-NHCOMe	1	0,5

**Пример 3. Анализ *in vitro* цитотоксичности в отношении клеток почки человека и гепатоцитов человека**

[00225] Соединения тестировали *in vitro* в сериях из 10 разведений для определения IC<sub>50</sub> в клетках почки африканской зеленой мартышки (Vero; ATCC # CCL81) или гепатоцитах/клетках печени человека (HepG2; ATCC # HB8065). Поскольку обычно предполагается, что эти молекулы нетоксичны, во все исследования включен доксорубин в качестве положительного контроля. Данные представлены в виде полной кривой жизнеспособности клеток, а также расчета фактического значения IC<sub>50</sub> для каждого соединения.

[00226] Адгезивные клетки выращивали до достижения ~80% конfluence. Клетки трипсинизировали путем добавления 0,25% трипсин-EDTA (Gibco # 25200-072), и затем клетки центрифугировали и добавляли 5 мл среды для выращивания клеток (среда MEM; Corning # 10010 CM) для диспергирования клеток. Плотность клеток определяли с помощью гемоцитометра. К клеткам добавляли среду для выращивания (среда MEM, содержащая 10% FBS; Corning # 35015 CV) для доведения концентрации клеток до необходимой. Затем 200 мкл клеток (5000 клеток/лунку) вносили в 96-луночный прозрачный плоскодонный планшет (Costar # 9804) и инкубировали в планшете при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч.

[00227] Готовили серийные разведения тестируемых соединений, применяя среду для выращивания клеток в качестве растворителя (Таблица 2). Эти соединения предоставлялись в

виде стерильных водных растворов солей HCl с концентрацией 5 мг/мл. Для приготовления разведений каждый исходный раствор лекарственного средства нагревали до комнатной температуры, перемешивали вихревым способом и визуально проверяли на наличие осадка. Если присутствовало твердое лекарственное средство, исходный раствор нагревали на водяной бане при 60°C и затем оставляли охлаждаться почти до комнатной температуры. На основе концентраций при обработке, 20-кратные рабочие растворы готовили путем серийного разбавления. Их дополнительно разбавляли до 1х средой для выращивания до самой высокой протестированной концентрации лекарственного средства 250 мкг/мл.

[00228] Соединения добавляли в лунки в серии разведений 1:2 от начальной концентрации 250 мкг/мл для каждого соединения путем аспирации старой среды и замены ее 200 мкл среды, содержащей лекарственное средство. Планшеты инкубировали при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч. В конце периода инкубации соединений в каждой лунке заменяли среду на 100 мкл 1х PrestoBlue Cell Viability Reagent (ThermoFisher # A13261). Планшет инкубировали при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> от 30 мин до 2 ч. Показания снимали через 30, 60 и 120 мин. Считывали флуоресценцию при возбуждении 560 нм и эмиссии 590 нм с помощью планшет-ридера SpectraMax M5 (Molecular Devices). Корректировали фон, вычитая RFU контроля, содержащего только культуральную среду (лунка фонового контроля), из показаний всех образцов. Рассчитывали процент цитотоксичности с помощью следующей формулы:

$$\text{Цитотоксичность, \%} = [(RFU_{\text{среда}} - RFU_{\text{обработан.}}) / RFU_{\text{среда}}] \times 100\%$$

[00229] IC<sub>50</sub> определяли с помощью GraphPad Prism по следующей формуле:

$$Y = 100 / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))})$$

Таблица 3

Соединение, ID	Жизнеспособность клеток IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	
	<b>VERO</b>	<b>HepG2</b>
AKG-1	112,6	116,0
AKG-2	67,9	24,5
AKG-3	17,8	21,2
AKG-5	32,5	30,8
AKG-6	27,4	15,5
AKG-7	103,6	11,2
AKG-9	139,3	28,1
AKG-11	31,9	42,8
AKG-12	89,1	67,6

AKG-13	93,9	31,8
AKG-14	155,8	45,6
AKG-15	156,2	35,6
AKG-16	97	91
AKG-17	>250	37,3
AKG-18	>250	9,5
AKG-19	>250	42,2
AKG-20	>250	15,1
AKG-21	>250	156,3
AKG-22	57,7	17,2
AKG-23	>250	7,3
AKG-24	31,3	11,4
AKG-25	182	9,4
AKG-26	128,5	9,0
AKG-27	5,6	9,0
AKG-28	83,0	13,4
AKG-29	109,9	74,4
AKG-30	110,5	18,9
AKG-31	111,5	13,2
AKG-38	395	97
AKG-39	201	70
AKG-40	>250	113

[00230] Неожиданно, большинство аналогов, содержащих гидроксильную группу на боковой цепи в положении C5 оксазолидинонового кольца, которая имитирует заместитель активного метаболита тедизолида вместо тедизолида фосфата, оказались наиболее гепатотоксичными, демонстрируя однозначное число IC<sub>50</sub> для клеточной линии гепатоцитов HepG2. Тедизолид является наиболее активным оксазолидиноном, одобренным в настоящее время для лечения MRSA, и имеет структурное сходство с описанными здесь соединениями в тетразольном D-кольце, пиридиальном C-кольце и арильном B-кольце (см. **Фиг. 6**). Однако, здесь повышенная токсичность по отношению к гепатоцитам приводит к сравнительно низкому индексу селективности для оксазолидинонов с гидроксильной группой на боковой цепи C5 (AKG-23, AKG-25, AKG-26 и AKG-27) по сравнению с таковыми с аминогруппой или ацетамидной группой в том же положении на боковой цепи C5 (AKG28-31, AKG38-40 и AKG-3).

#### **Пример 4. Определение индекса селективности**

[00231] Индекс селективности (SI) рассчитывали для определения относительной ингибирующей активности соединений в отношении двух штаммов *Mycobacterium*

*tuberculosis*, Erdman и H37Rv, по сравнению с активностью в отношении клеток млекопитающих, а именно клеток почки африканской зеленой мартышки (VERO) или клеток, полученных из гепатоцитов человека (HepG2), как описано в экспериментальных Примерах 2 и 3, соответственно. Высокий SI является предпочтительным, так как он указывает на предпочтительное уничтожение штаммов бактерии туберкулеза при концентрациях лекарственного средства, которые менее токсичны для нормальных клеток в организме. Индекс селективности рассчитывали по следующей формуле ниже:

$$SI = IC_{50, \text{млекопитающее}} / MIC_{\text{бактерия}}$$

где бактерии представляют собой *M. tuberculosis* штаммов либо Erdman, либо H37Rv, и клетки млекопитающего представляют собой клеточные линии VERO или HepG2.

[00232] Если IC<sub>50</sub> была выше, чем самое высокое значение, определенное для клеток VERO или HepG2, SI показан как большее, чем (>) отношение, рассчитанное с применением этой самой высокой концентрации. Аналогичным образом, если MIC для штаммов Erdman или H37Rv больше, чем самая высокая концентрация протестированного лекарственного средства (8 мкг/мл), то SI показан как меньшее, чем (<) отношение, рассчитанное с применением этой самой высокой концентрации. Расчеты, в которых оба числа превышают самые высокие определенные концентрации, показаны как неопределенные (nd). Результаты представлены в Таблице 4. SI не коррелировал напрямую с активностью молекул ни в микобактериальных штаммах, ни в клеточных линиях млекопитающих, и повышенная активность в микобактериальных штаммах не коррелировала напрямую с повышенной токсичностью в отношении клеточных линий млекопитающих. Например, АКГ-38 продемонстрировал наномолярную MIC в отношении обоих штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, тогда как он был относительно неактивен в отношении клеточных линий VERO и HepG2 по сравнению с другими молекулами в панели, что дает ему высокий SI. То же самое наблюдалось для АКГ-28. Примечательно, что обе молекулы, АКГ-28 и АКГ-38, имели диметиламиноэтиловый заместитель в положении 2' тетразольного кольца.

Таблица 4

Соединение, ID	Индекс селективности (SI)			
	Erd/VERO	Erd/HepG2	H37Rv/VERO	H37Rv/HepG2
АКГ-1	<14,1	<14,5	<14,1	14,5
АКГ-2	<8,5	<3,1	<8,5	3,1

AKG-3	142,4	169,6	296,7	353,3
AKG-5	32,5	30,8	32,5	30,8
AKG-6	3,4	<1,9	<3,4	1,9
AKG-7	13,0	<1,4	<13,0	1,4
AKG-9	<17,4	<3,5	<17,4	3,5
AKG-11	8,0	10,7	8,0	10,7
AKG-12	22,3	16,9	22,3	16,9
AKG-13	<11,7	<4,0	<11,7	<4,0
AKG-14	19,5	5,7	19,5	5,7
AKG-15	<19,5	<4,5	<19,5	<4,5
AKG-16	388,0	364,0	388,0	364,0
AKG-17	>125	18,7	>125	18,7
AKG-18	>125	4,8	>125	4,8
AKG-19	>31,3	5,3	>31,3	5,3
AKG-20	>500	30,2	>500	30,2
AKG-21	nd	<19,5	nd	<19,5
AKG-22	57,7	17,2	115,4	34,4
AKG-23	>1000	29,2	>1000	29,2
AKG-24	31,3	11,4	31,3	11,4
AKG-25	182,0	9,4	182,0	9,4
AKG-26	64,3	4,5	64,3	4,5
AKG-27	11,2	18,0	11,2	18,0
AKG-28	2766,7	446,7	5533,3	893,3
AKG-29	439,6	297,6	879,2	595,2
AKG-30	884,0	151,2	884,0	151,2
AKG-31	223,0	26,4	223,0	26,4
AKG-38	6583,3	1616,7	6583,3	1616,7
AKG-39	402,0	140,0	402,0	140,0
AKG-40	>250,0	113,0	>500,0	226,0

[00233] В некоторых вариантах реализации исследуемые соединения имели индекс SI для Erd/HerG2 и H37Rv/HerG2 превышающий 100, превышающий 200, превышающий 300,

превышающий 400, превышающий 500, превышающий 1000, превышающий 1500, превышающий 2000, превышающий 2500, превышающий 3000, превышающий 3500, превышающий 4000, превышающий 4500, превышающий 5000, превышающий 5500, превышающий 6000, превышающий 6500, от 100 до 7000, от 100 до 6000, от 100 до 5000, от 100 до 4000, от 100 до 3000, от 100 до 2000, от 100 до 1000, от 100 до 900, от 100 до 800, от 100 до 700, от 100 до 600, от 100 до 500, от 100 до 400, от 100 до 300, от 100 до 200, от 200 до 7000, от 200 до 6000, от 200 до 5000, от 200 до 4000, от 200 до 3000, от 200 до 2000, от 200 до 1000, от 200 до 900, от 200 до 800, от 200 до 700, от 200 до 600, от 200 до 500, от 200 до 400, от 200 до 300, от 300 до 7000, от 300 до 6000, от 300 до 5000, от 300 до 4000, от 300 до 3000, от 300 до 2000, от 300 до 1000, от 300 до 900, от 300 до 800, от 300 до 700, от 300 до 600, от 300 до 500, от 300 до 400. В некоторых вариантах реализации исследуемые соединения имели SI для Erd/НерG2 и H37Rv/НерG2 в диапазоне от 100 до 1700, от 200 до 1700, от 300 до 1700.

[00234] Соединения с аминогруппой или ацетамидной группой в боковой цепи C5 оксазолидинонового кольца и аминоалкильной группой в положении 2' тетразольного кольца демонстрировали сравнительно более высокий SI по сравнению с соединениями с гидроксильной группой в боковой цепи C5. Кроме того, специфическая замена тетразолом также повысила SI с заменой диметиламиноэтилом в положении 2' тетразольного кольца, которая была предпочтительнее (AKG-28 и AKG-38) по сравнению с заменами метилом, диэтиламиноэтилом, аминоэтилом или диметиламинопропилом в том же положении. Перемещение диметиламиноэтильной группы в положение 1' тетразольного кольца (соединение AKG-21 по сравнению с AKG-28) неожиданно привело к резкой потере активности против *Mycobacterium tuberculosis*.

**Пример 5. Анализ активности *in vitro* в отношении метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

[00235] Активность ингибиторов прототипа оксазолидинона измеряли, чтобы продемонстрировать достаточную активность в отношении грамположительной бактерии метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), чтобы обосновать их последующую доставку в форме липосом для лечения заболевания, вызванного такими бактериями. В некоторых вариантах реализации MIC в двух из трех оцениваемых штаммов составляла менее 6 мкг/мл. В некоторых вариантах реализации MIC в двух из трех

оцениваемых штаммов составляла менее 2 мкг/мл, более предпочтительным является менее 2 мкг/мл.

[00236] Три штамма *S. aureus* выращивали в течение ночи при 37°C в атмосфере окружающей среды в чашках с триптиказо-соевым агаром, дополненным 5% клеток овечьей крови. Культуры забирали тампоном в асептических условиях и переносили в пробирки со стерильной водой, и оптическую плотность доводили до 0,5 при 600 нм. Затем культуры разбавляли 1:100 для получения приблизительно  $5 \times 10^5$  клеток на лунку в 120 мкл. После инкубации МІС тестируемого соединения определяли по наличию/отсутствию роста в каждой лунке. Анализы МІС проводили в трех параллельных испытаниях.

[00237] Тедизолид показал МІС 0,206-0,617 мкг/мл, аналогично 0,5 мкг/мл, как описано в патенте США № 7,816,379. Интересно, что все молекулы (АКГ-3, АКГ-28, АКГ-29 и АКГ-30) с модификацией первичного амина в R<sub>2</sub> оксазолидинонового кольца показали незначительную активность против всех трех штаммов MRSA (>50 мкг/мл). Молекулы с ацетамидной группой в том же положении (АКГ-38, АКГ-39 и АКГ-40) были в 3-9 раз менее активны, чем сам тедизолид, против трех штаммов MRSA.

Таблица 5

Соединение, ID	Метициллин-резистентный <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) МІС (мкг/мл)			
	штамм	АТСС ВАА-1556	АТСС 43300	880 NR-49120
Тедизолид		0,617	0,617	0,206
АКГ-3		50	50	50
АКГ-16		1,85	1,85	1,85
АКГ-22		1,85-5,55	16,67	5,55
АКГ-28		>50	>50	>50
АКГ-29		50	>50	50
АКГ-30		>50	>50	>50
АКГ-38		1,85	1,85	0,617
АКГ-39		1,85	1,85	1,85
АКГ-40		1,85	5,55	1,85

### Пример 6. Липосомальные композиции

*Общие способы.*

[00238] 1. Липидные компоненты (фосфолипид (PhL), холестерин и, необязательно, производное PEG-липиды и/или липидную флуоресцентную метку) объединяли в количестве 100% этанола, равном одной десятой объема (V) в расчете на получение липидной суспензии с примерно 60 мМ фосфолипиды, и перемешивали при температуре 65-68°C до полного растворения липидов.

[00239] Нейтральные фосфолипиды могут включать диацилфосфатидилхолины, диалкилфосфатидилхолины, сфингомиелины и диацилфосфатидилэтаноламины. Гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин и яичный сфингомиелин являются одними из предпочтительных фосфолипидов.

[00240] PEG-липидные компоненты могут включать PEG(мол. масса 2000)-дистеароилглицерин (PEG-DSG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG-DSPE) или N-пальмитоил-сфингозин-1-{сукцинил[метокси(полиэтиленгликоль)2000]} (PEG-церамид). Молекулярная масса PEG-липидного компонента также может варьироваться от 1500 до 6000 г/моль, но предпочтительно составляла примерно 2000.

[00241] Липидные флуоресцентные метки могут включать 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин-5,5'-дисульфоновую кислоту (DiIC18(3)-DS), 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндодикарбоцианин-5,5'-дисульфоновую кислоту (DiIC8(5)-DS), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(цианин 7) (18:0 Cy7 PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000]-N-(цианин 7) (DSPE PEG(2000)-N-Cy7), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(цианин 5) (18:0 Cy5 PE), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000]-N-(цианин 5) (DSPE PEG(2000)-N-Cy5), 1-олеоил-2-[12-[(7-нитро-2-1,3-бензоксадиазол-4-ил)амино]додеканоил]-sn-глицеро-3-фосфохолин (18:1-12:0 NBD PC).

[00242] 2. Этанольный раствор липиды объединяли с объемом V раствора захватывающего агента (0,25-0,5 М сульфата аммония или 1 н. триэтиламмония сахарозы октасульфат) с перемешиванием при 65-68°C до получения однородной суспензии.

[00243] Потенциальные захватывающие агенты могут включать, но не ограничиваются ими, диэтиламмониевые или триэтиламмониевые соли октасульфата сахарозы, сульфат аммония, цитрат аммония, лимонную кислоту, декстрансульфат, поливинилсульфонат или аммониевые соли инозитол гексафосфата в концентрациях 0,1-2 грамм-эквивалентов/л (0,1-2

н.), предпочтительно, 0,2-1,5 н. Обычно применяют соли аммония, которые могут включать сам аммоний, моноалкил-, диалкил- или триалкиламмониевые соли.

[00244] 3. Суспензию липидов экструдировали по меньшей мере три раза через ряд трековых поликарбонатных мембран, как правило, две или четыре мембраны с номинальным размером пор 100 нм и одну с номинальным размером пор 200 нм (Whatman Nuclepore, USA), применяя экструдер типа Thermobarrel (Lipex, Canada) при температуре 65-68°C, давлении 400-450 psi. Когда в экструдере Lipex объемом 100 мл применяли две мембраны 100 нм, давление экструзии обычно составляло 260-300 psi. Полученные липосомы имеют Z-средний размер частиц (диаметр)  $X_z$  от примерно 80 до примерно 130 нм и PDI менее 0,1.

[00245] 4. Экструдированную липидную суспензию (известно, что она содержала моноламеллярные и/или олиголамеллярные липосомы) охлаждали в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2-микронный мембранный фильтр из полиэфирсульфона (PES) при положительном давлении.

[00246] 5. Аликвоту полученной таким образом экструдированной, отфильтрованной суспензии липосом хроматографировали на эксклюзионной колонке с Sepharose CL-4B с гравитационной подачей (элюент - вода Типа 1) для очистки липосом от внелипосомального захватывающего агента. Очищенные липосомы собирали примерно доли свободного объема колонки. Для исследований в увеличенном масштабе эту стадию выполняли с применением фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) на картридже с полыми волокнами (мембрана Repligen Spectrum MicroKros PS или mPES с MWCO 500 кДа), производя 8-10 замен объема (или до тех пор, пока проводимость суспензии липосом снижалась ниже 200 мкСм/см) с водой, не содержащей эндотоксинов, Типа 1 или USP «Вода для инъекций».

[00247] 6. Концентрацию липидов в очищенной экструдированной липосомальной субстанции определяли с помощью ВЭЖХ с УФ-детектированием путем измерения концентрации холестерина и поправки на известное молярное соотношение фосфолипид/холестерин. В качестве альтернативы, для прямого количественного определения содержания фосфолипидов применяли спектрофотометрический способ с фосфорномолибденовым синим.

[00248] 7. Лекарственное средство растворяли в чистой воде Типа 1 или не содержащей эндотоксинов в форме соли хлористоводородной кислоты (например, АКГ-3 и АКГ-5 применяли в виде моногидрохлорида, АКГ-28 и АКГ-29 применяли в виде дигидрохлорида) в концентрации 5-20 мг/мл лекарственного средства. К лекарственному средству,

полученному в форме свободного основания (например, АКГ-16, АКГ-38) добавляли эквивалентное количество HCl. При необходимости pH раствора доводили до 2,5-5,5 с помощью 1 н. NaOH, HCl или раствора трис(гидроксиметил)аминометанового (Трис)-основания, и раствор фильтровали через 0,2-микронный фильтр PES при положительном давлении. При необходимости концентрацию лекарственного средства в приготовленном таким образом исходном растворе проверяли с помощью ВЭЖХ с УФ-детектированием при 305 нм.

[00249] 8. Очищенные липосомы со стадии 5 и исходный раствор лекарственного средства объединяли в присутствии осмотического агента (обычно декстрозы) и воды в количествах, необходимых для обеспечения целевого соотношения лекарственного средства к фосфолипиду (DL), концентрации лекарственного средства в диапазоне 1,5-3,3 мг/мл при осмоляльности, равной измеренной осмоляльности раствора захватывающего агента на стадии 2. Необязательно добавляли буфер с целевым значением pH (обычно от pH 4 до pH 7). В некоторых случаях количество добавленного осмотического агента (например, декстрозы в количестве примерно 45 г/л) обеспечивало осмоляльность меньше, чем измеренная осмоляльность раствора захватывающего агента, и загрузка осуществлялась при 6-8 мг/мл лекарственного средства.

[00250] 9. Смесь лекарственное средство-липосомы инкубировали с постоянным перемешиванием при 65-68°C в течение примерно 15-20 мин и быстро охлаждали на льду. Через 5-10 мин смесь оставляли охлаждаться до температуры окружающей среды и доводили до 0,1 М NaCl путем добавления расчетного количества 3 М исходного раствора NaCl.

[00251] 10. Нагруженные лекарственным средством липосомы очищали от неинкапсулированного лекарственного средства с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке с гравитационной подачей с Sepharose CL-4B, элюент - 10 mM HEPES-буфер pH 7,0 в 140-144 mM NaCl (HBS-7). Фракции липосом собирали примерно доли свободного объема колонки. Для исследований в увеличенном масштабе очистку и замену буфера проводили с применением TFF, как описано в пункте 5 выше, применяя 10 замен объема буфера HBS-7. В расширенном способе обычно применяли примерно 8 замен объема. Необязательно очищенные липосомы концентрировали, продолжая процесс TFF без подачи буфера. Очищенные нагруженные лекарственным средством липосомы асептически фильтровали через 0,2-микронный стерильный фильтр PES при положительном давлении и хранили в холодильнике (2-8°C).

[00252] 11. Концентрации лекарственного средства и липидов в очищенных липосомальных композициях, нагруженных лекарственным средством, определяли с помощью ВЭЖХ. В качестве альтернативы, для количественного определения фосфолипидов использовали спектрофотометрический способ (синий, фосфолибдат), и количество лекарственного средства определяли с помощью УФ-поглощения (302-305 нм) в образце липосом, солюбилизованных в 70% изопропанол - 0,1 н. HCl в присутствии 6,5 мг/мл додецилсульфата натрия. Эффективность инкапсуляции определяли как:

$$EE, \% = DL/DL0 * 100\%$$

где DL0 представляет собой отношение лекарственного средства к фосфолипидам в смеси для загрузки липосом перед очисткой путем SEC или TFF, и DL представляет собой отношение лекарственного средства к фосфолипидам в липосомах, нагруженных лекарственным средством, после очистки (стадия 10).

[00253] 12. Средний размер липосом (Z-средний диаметр, Xz) и индекс полидисперсности (PDI) определяли с применением динамического рассеяния лазерного излучения методом кумулянтов на Zetasizer mu-V, Zetasizer Nano или Zetasizer Pro (Malvern Panalytical, USA).

### **Пример 7. Стабильность *in vivo* и клиренс липосом из кровотока**

[00254] Стабильность инкапсуляции лекарственного средства и скорость выведения из кровотока липосом, которые инкапсулируют соединения согласно настоящему изобретению, изучали на мышах в соответствии со следующим общим протоколом. Мышам данной лабораторной линии (самки C3H или самцы CD-1) в группах по три особи вводили нагруженные лекарственным средством липосомы через хвостовую вену в дозе 9 мг лекарственного средства на кг массы тела. В моменты времени 1 и 2 брали пробы крови из ретроорбитального синуса, и животных умерщвляли. Как правило, временные точки отбора проб крови включали 5 минут, 1 час, 6 часов и 24 часа после инъекции. Плазму отделяли путем центрифугирования, экстрагировали подкисленным изопропанолом, необязательно содержащим солюбилизирующий агент (октансульфонат натрия), и анализировали на наличие лекарственного средства и липида (когда в липосомы была включена липидная метка, DiIC18(3)-DS) с помощью ВЭЖХ. Выведение (клиренс) липосомального лекарственного средства из кровотока выражали в процентах от инъецированной дозы, оставшейся в данный момент времени. Стабильность инкапсулированного лекарственного средства *in vivo*

оценивали по процентному изменению (уменьшению) отношения DL в плазме в данный момент времени по сравнению со значением DL до инъекции.

### **Пример 8. Загрузка АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16 в липосомы при различных рН**

[00255] Раствор захватывающего агента триметиламмония сахарозы октасульфата готовили путем пропускания раствора коммерческого калия сахарозы октасульфата гептагидрата (40,2 г в 145 мл воды) через 500 мл ионообменную колонку Dowex 50Wx8 100-200 меш в водородной форме и титрования полученной свободной кислотной формы сахарозы октасульфата чистым триэтиламином до рН 6,2. Концентрацию триэтиламмония сахарозы октасульфата (TEA-SOS) (1 н., что соответствует 0,125 М сахарозы октасульфата) оценивали по количеству триэтиламина, израсходованного при титровании. Остаточный калий определяли с помощью измерителя калия Horiba LAQUATwin K-11 методом добавок, и он составлял менее 0,1% от исходного количества калия.

[00256] Липосомы, состоящие из гидрированного соевого фосфатидилхолина (HSPC) (Lipoid, Germany), холестерина (молярное соотношение 3:2) и метоксиполиэтиленгликолевого эфира 1,2-дистеароилглицерина (PEG-DSG, PEG мол. масса 2000, NOF, Japan) (0,5 моль% HSPC) с 1 н. триметиламмония сахарозы октасульфатом (TEA-SOS) в качестве захватывающего агента получали по существу согласно вышеописанному общему способу. Стадию загрузки лекарственным средством проводили при соотношении DL (DL0) 500 г/моль PhL в присутствии буфера 16 мМ морфолиноэтансульфоновой кислоты (MES) - 4 мМ цитрата натрия с рН в диапазоне 4,3-7,1, а также без добавление любого буферного вещества (рН 5,2-5,9). Все лекарственные средства были инкапсулированы в липосомы с высокой эффективностью (более 98%, за исключением АКГ-16 при рН 4,38, которое загружалось с эффективностью 93,3%) во всем исследованном диапазоне рН (**Фиг. 1**). Для эффективной инкапсуляции добавление буферного вещества не требовалось.

### **Пример 9. Инкапсуляция АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16 в липосомы с захватывающим агентом TEA-SOS при различных соотношениях DL**

[00257] Липосомы, состоящие из HSPC, холестерина (молярное соотношение 3:2) и PEG-DSG (0,5 моль% HSPC) с 1 н. TEA-SOS в качестве захватывающего агента, получали по существу согласно вышеописанному общему способу (Пример 6). Стадию загрузки лекарственным средством проводили при соотношениях DL в диапазоне 750-1500 г/моль PhL

без добавления буферного вещества (pH 4,98-6,22). Максимальные загрузки лекарственного средства для соединений 3, 5 и 16 наблюдались в диапазоне 900-930 г/моль PhL, 982-1197 г/моль PhL и 938-951 г/моль PhL, соответственно, и степени загрузки при максимальных или близких к ней загрузках лекарственным средством составляли по меньшей мере 97,6%, 96,0% или 85,2%, соответственно (**Фиг. 2А** и **Фиг. 2В**).

**Пример 10. Инкапсуляция АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16 в липосомы с более высокой степенью пегилирования или с 0,25 М сульфата аммония (AS) в качестве захватывающего агента**

[00258] Липосомы, состоящие из HSPC и холестерина (молярное соотношение 3:2), имеющие различное содержание PEG-DSG и захватывающих агентов, получали в соответствии с Общим способом и загружены соединениями АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16, как в Примере 9 при соотношениях DL0 250 или 500 г/моль PhL. Все три соединения были загружены в липосомы с высокой эффективностью, как показано в Таблице 6 ниже:

Таблица 6.

PEG-DSG, PhL, моль%	Захватывающий агент	Соотношение DL0 PhL, г/моль	Эффективность загрузки лекарственного средства		
			АКГ-3	АКГ-5	АКГ-16
0,5*	1 н. TEA-SOS	500	100,8	101,3	102,6
5	1 н. TEA-SOS	500	107,4	99,3	104,8
0,5	0,25 М AS	250	100,4	98,5	90,6
0,5	0,25 М AS	500	80,3	97,7	82,9

\* Данные для этой строки взяты из Примера 8, загрузка «без добавления буфера».

[00259] Таким образом, соединения АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16 были эффективно загружены в фосфолипид-холестериновые липосомы с повышенным уровнем пегилирования и с сульфатом аммония в качестве внутрилипосомального захватывающего лекарственное средство агента. Однако эффективность загрузки была снижена у двух из трех оксазолидинонов (АКГ-3 и АКГ-16) при загрузке с более высоким соотношением лекарственного средства и липидов, равном 500 г лекарственного средства/моль PhL, с применением 0,25 М сульфата аммония в качестве захватывающего агента.

**Пример 11. Загрузка соединений АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16 в липосомы с применением 0,5 М АS в качестве захватывающего агента**

[00260] Липосомы, состоящие из HSPC и холестерина (молярное соотношение 3:2), содержащие 0,5 моль% или 5 моль% PEG-DSG (относительно PhL) и 0,5 М сульфата аммония (AS) в качестве захватывающего агента, получали в соответствии с Общим способом и загружали соединениями АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16, как в Примере 8, при соотношениях DL0 в диапазоне 500-1500 г/моль PhL. Результаты показаны на **Фиг. 3А**, **Фиг. 3В**, **Фиг. 3С** и **Фиг. 3Д**. Все три соединения загружали в обе липосомы до соотношения DL 420-450 г/моль PhL с эффективностью инкапсуляции 93-100%; максимальные загрузки лекарственного средства представляли собой следующие:

Таблица 7

Лекарственное средство	Максимальная загрузка инкапсулированного лекарственного средства, г/моль PhL	
	0,5 моль% PEG	5 моль % PEG
АКГ-3	590	600-606
АКГ-5	627	nd
АКГ-16	668-675	614-619

[00261] Все три исследованных соединения были загружены в липосомы с 0,5 М сульфата аммония при концентрации более 500 г лекарственного средства/моль PhL в композициях с 0,5 моль% PEG-DSG и для соединений АКГ-3 и АКГ-16, для составов, содержащих 5 моль% PEG-DSG. Эти высокие уровни загрузки важны для достижения достаточных доз вводимого лекарственного средства для лечения заболевания. Загрузка была значительно улучшена по сравнению с Примером 10, где эффективность загрузки была ниже при применении 0,25 М сульфата аммония, демонстрируя, что более высокая концентрация сульфата аммония 0,5 М, несмотря на более высокую осмолярность и возможность осмотического повреждения, скорректирована по отношению к количеству лекарственного средства, которое может быть загружено на моль фосфолипида, и предпочтительна для противомикробных средств, где низкая токсичность и высокая дозировка могут привести к улучшению результатов.

**Пример 12. Загрузка соединений АКГ-3, АКГ-5, АКГ-16 и АКГ-28 в липосомы различного состава, включая флуоресцентную липидную метку**

[00262] Липосомы, состоящие из HSPC и холестерина (молярное соотношение 60:40), содержащие 0,5 моль% PEG-DSG (относительно PhL), 0,15 моль% липидов с флуоресцентной меткой DiIC18(3)-DS (ThermoFisher, USA) и 0,5 сульфата аммония (AS) или 1 н. TEA-SOS в качестве захватывающих агентов, готовили в соответствии с Общим способом и нагружали соединениями АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16, как в Примере 11, при pH 4,7-5,8 (без добавления буферного вещества). Липосомы имели следующие характеристики:

Таблица 8.

Серия, ID	Соединение	Захватывающий агент	DL0, г/моль PhL	Инкапсулированное лекарственное средство, г/моль PhL	z-средний размер липосомы, нм	PDI липосом
76	АКГ-3	1 н. TEA-SOS	500	497,0	112,7	0,008
85	АКГ-3	1 н. TEA-SOS	1000	830,7	104,3	0,111
78	АКГ-3	0,5 М AS	693	632,9	104,9	0,013
79	АКГ-5	1 н. TEA-SOS	500	515,6	114,3	0,124
80	АКГ-5	1 н. TEA-SOS	1000	1003,2	110,5	0,071
81	АКГ-5	0,5 М AS	693	709,3	111,4	0,060
82	АКГ-16	1 н. TEA-SOS	500	489,2	114,8	0,046
86	АКГ-16	1 н. TEA-SOS	1000	854,2	107,6	0,097
84	АКГ-16	0,5 М AS	693	708,0	112,6	0,092

[00263] Все три лекарственных средства были эффективно загружены в липосомы. Деградация АКГ-5 во время загрузки липосомом была обнаружена по появлению второго пика при ВЭЖХ.

[00264] Липосомы, состоящие из различных фосфолипидов (HSPC, дистеароилфосфатидилхолина (DSPC, Avanti Polar Lipids, USA) или яичного сфингомиелина (ESM, Lipoid, Germany) и холестерина (молярное соотношение 60:40)), содержащие различные количества PEG-DSG или N-метоксиполи(этиленгликоль)оксикарбонил-1,2-дистеароилфосфатидилэтаноламина (PEG-DSPE, PEG мол. масса 2000, Lipoid, Germany) и липидную флуоресцентную метку DiIC18(3)-DS (0,15 моль% относительно PhL), готовили с различной степенью включения в соответствии с тем же Общим способом и нагружали АКГ-16 аналогичным образом. При наличии показаний стадию экструзии липосомом по Общему протоколу дополняли экструзией через две сложенные поликарбонатные мембраны с размером пор 50 нм. Липосомы имели следующие характеристики:

Таблица 9.

Серия, ID	Фосфолипид	Экструзия, 50 нм	PEG-липид (моль%)	Захватывающий агент	Соотношение DL0 г/моль PhL	Загрузка лекарственного средства, г/моль PhL	Z-средний размер липосомы нм	PDI
88	HSPC	нет	PEG-DSG (0,5)	1 н. TEA-SOS	500	547,0		
90	DSPC	да	PEG-DSG (0,5)	1 н. TEA-SOS	500	514,0	83,3	0,182
91	DSPC	да	PEG-DSG (0,5)	1 н. TEA-SOS	1000	599		
93	HSPC	нет	PEG-DSG (5)	1 н. TEA-SOS	500	490,2	108,6	0,046

94	DSPC	нет	PEG-DSG (0,5)	1 н. TEA- SOS	500	504,0	112,7	0,081
95	ESM	нет	PEG-DSG (0,5)	1 н. TEA- SOS	500	539,9	101,3	0,074
97	HSPC	да	PEG-DSPE (9,2)	0,25 М AS	150	128,2	81,5	0,073

[00265] Липосомы, состоящие из HSPC и холестерина (молярное соотношение 3:2), содержащие 9,2 моль% PEG-DSPE (относительно PhL), 0,15 моль% липидной метки DiIC18(3)-DS и 0,25 М сульфата аммония (AS) в качестве захватывающего агента, готовили в соответствии с Общим способом и Примером 12 с дополнительной экструзией 50 нм и нагружали АКГ-28 при соотношении лекарственное средство-липид (DL0) 150 г/моль PhL. Липосомы (серия 98) имеют соотношение DL 73,8 г/моль PhL, Z-средний размер липосом 77,8 нм и индекс полидисперсности (PDI) 0,090.

[00266] Эти исследования демонстрируют, что АКГ-3, АКГ-5 и АКГ-16 могут быть эффективно загружены в липосомы с рядом липидных композиций, включая HSPC, DSPC или ESM в качестве нейтрального фосфолипидного компонента, или низкое (0,5 моль%) или высокое (5 моль%) содержание PEG-липидов. Однако эффективность была значительно снижена от примерно 500 г АКГ-16/моль PhL до 128 г АКГ-16/моль PhL при применении 0,25 М AS по сравнению с 1 н. TEA-SOS. Аналогичная низкая эффективность загрузки (то есть, 73,8 г/моль PhL) наблюдалась при загрузке АКГ-28 с 0,25 М AS. Это говорит о том, что либо TEA-SOS, либо более высокие концентрации AS могут быть предпочтительными для загрузки в липосомы соединений с высокими концентрациями.

### **Пример 13. Устойчивость в кровотоке и стабильность инкапсуляции *in vivo* липосом Примера 12 у мышей**

[00267] Исследование проводили на самцах мышей линии CD-1, как описано в Общем способе выше.

Таблица 10.

Серия, ID	% ID в плазме (липид липосомы)		Начальное соотношение DL, %	
	5 мин	6 ч	5 мин	6 ч
88	82,4 ± 9,8	30,6 ± 7,0	89,2 ± 0,6	75,6 ± 2,7
90	84,7 ± 1,2	35,2 ± 5,1	95,9 ± 0,2	81,0 ± 2,5
93	85,4 ± 3,5	38,2 ± 1,4	94,5 ± 0,5	82,9 ± 1,1
94	83,1 ± 6,1	23,9 ± 1,2	97,7 ± 0,5	89,2 ± 0,0
95	79,3 ± 3,5	36,7 ± 2,0	97,9 ± 0,8	101,9 ± 8,8
96	80,2 ± 4,3	39,7 ± 7,0	102,8 ± 1,7	99,2 ± 2,8
97	83,5 ± 6,9	34,4 ± 2,8	88,7 ± 10,8	3,7 ± 0,3
98	80,3 ± 6,6	43,7 ± 4,7	100,2 ± 2,8	86,7 ± 1,1

[00268] Эти исследования демонстрируют, что липосомы, состоящие из различных нейтральных фосфолипидных компонентов (HSPC, DSPC или SM) и нагруженные АКГ-16 с применением захватывающего агента TEA-SOS, выводятся медленно, при этом более 30% введенной дозы остается в плазме через 6 ч для большинства составов. Кроме того, большинство составов показали хорошее удерживание лекарственного средства, за исключением серии липосом ID 97, которая включает АКГ-16, загруженное с применением 0,25 М AS, что позволяет предположить, что загрузка лекарственного средства с применением 0,25 М сульфата аммония приводит не только к низкой эффективности загрузки, как показано в Таблице 9, но также и к низкому соотношению DL (3,7%) через 6 часов из-за значительной утечки из липосом в этом составе.

**Пример 14. Инкапсуляция соединений АКГ-28 и АКГ-38 в липосомы с различными захватывающими агентами при разных соотношениях DL**

[00269] Липосомы, состоящие из HSPC и холестерина (молярное соотношение 3:2), содержащие 0,5 моль% PEG-DSG (относительно PhL), 0,15 моль% липидной метки DiIC18(3)-DS и 0,5 М сульфата аммония (AS) или 1 н TEA-SOS в качестве захватывающих агентов, готовили в соответствии с Общим способом и нагружали соединениями АКГ-28 и АКГ-38, как в Примере 8, при pH 4,95-5,17 (без добавления буферного вещества) и соотношениях DL0 в диапазоне 300-1050 г/моль PhL (АКГ-28) или 400-1400 г/моль PhL (АКГ-38). При применении 0,5 М AS максимальные лекарственные нагрузки для соединений АКГ-28 и АКГ-

38 находились в диапазоне 404-424 г/моль PhL и 818-842 г/моль PhL, соответственно, и эффективность загрузки составляла более 95% при лекарственной нагрузке 302 г/моль PhL (количественная нагрузка) и 387-764 г/моль PhL (95,5-96,7% загрузки), соответственно. При применении 1 н. TEA-SOS максимальные лекарственные нагрузки для соединений АКГ-28 и АКГ-38 находились в диапазоне 315-328 г/моль PhL и 989 г/моль PhL, соответственно, и максимальная эффективность загрузки составляла 83,5% при лекарственной нагрузке 250 г/моль PhL и 400-777 г/моль PhL (более 97,2% загрузки), соответственно (**Фиг. 4А** и **Фиг. 4В**). [00270] АКГ-38 показало почти количественную нагрузку между 400 и 800 г АКГ-38/моль PhL, в то время как итоговое отношение лекарственного средства к липиду оставалось постоянным для АКГ-28 в диапазоне 250-1000 г АКГ-28/моль PhL, что свидетельствует о более низкой максимальной лекарственной нагрузке для АКГ-28, чем для АКГ-38. Следует учесть, что более высокая активность, ранее продемонстрированная для АКГ-28, позволит липосомальным составам АКГ-28 быть эффективными для лечения инфекционных заболеваний, таких как туберкулез.

**Пример 15. Инкапсуляция соединений АКГ-28 и АКГ-38 в липосомы с различным фосфолипидным составом, степенью пегилирования и захватывающими агентами**

[00271] Липосомы, состоящие из фосфолипида (PhL) и холестерина (молярное соотношение 3:2), PEG-DSG и DiIC18(3)-DS (0,15 моль% PhL) с 0,5 М AS или 1 н. TEA-SOS в качестве захватывающих агентов готовили в соответствии с Общим способом и нагружали соединениями АКГ-28 и АКГ-38 (без добавления буферного вещества) при соотношениях DL0, выбранных для оптимизации лекарственной нагрузки и эффективности инкапсуляции (EE). Результаты представлены в Таблицах 10 и 11 ниже.

Таблица 11. Инкапсуляция соединения АКГ-28

Серия, ID	PhL	PEG-DSG, моль% PhL	Захватывающий агент	Соотношение DL0 г/моль PhL	Загрузка лекарственного средства, г/моль PhL	EE, %	Z-средний размер липосомы, нм	PDI липосом
128	HSPC	0,5	0,5 М AS	300	265,9	88,6	116,7	0,031

129	HSPC	0,5	1 н. TEA-SOS	300	273,9	91,3	115,2	0,038
130	HSPC	5	1 н. TEA-SOS	300	260,4	86,8	109,2	0,031
131	ESM	0,5	1 н. TEA-SOS	300	109,4	36,5	109,8	0,054
138	HSPC	0,5	0,5 М AS	400	260,4	65,1		
139	HSPC	0,5	0,5 М AS	400	232,2	58,1		

Таблица 12. Инкапсуляция соединения АКГ-38

Серия, ID	PhL	PEG-DSG, моль% PhL	Захватывающий агент	Соотношение DL0 г/моль PhL	Загрузка лекарственного средства, г/моль PhL	ЕЕ, %	Z-средний размер липосомы, нм	PDI липосом
132	HSPC	0,5	0,5 М AS	600	532,1	88,7	127	0,023
133	HSPC	0,5	1 н. TEA-SOS	600	590,7	98,5	115,1	0,019
134	HSPC	5	1 н. TEA-SOS	600	565,6	94,3	110,6	0,074
135	ESM	0,5	1 н. TEA-SOS	600	529,3	88,2	106,7	0,049
140	HSPC	0,5	0,5 М AS	800	739,5	92,4		
141	HSPC	0,5	1 н. TEA-SOS	800	864,0	108,0		

[00272] Этот пример показывает, что АКГ-28 может быть эффективно загружено в липосомы, состоящие из HSPC, с применением либо 0,5 М AS, либо 1 н. TEA-SOS в качестве захватывающего агента с максимальной лекарственной нагрузкой между 230-275 г АКГ-28/моль PhL. Однако составы, содержащие сфингомиелин в качестве нейтрального

фосфолипида для этого соединения, показали сравнительно более низкую загрузку с максимальным значением всего примерно 110 г АКГ-28/моль PhL.

[00273] Соединение АКГ-38 загружали до значительно более высоких соотношений D/L, между 525-600 г/моль, с применением 0,5 М AS или 1 н. TEA-SOS, когда лекарственное средство добавляли в количестве 600 г АКГ-38/моль PhL или более, чем 735 г/моль при добавлении 800 г АКГ-38/моль PhL. Загрузка соединения АКГ-38 была менее чувствительна к присутствию сфингомиелина, чем АКГ-28.

**Пример 16. Инкапсуляция соединений АКГ-16, АКГ-28, АКГ-29 и АКГ-38 в липосомы с повышенным пегилированием и 0,5 М сульфата аммония в качестве захватывающего агента**

[00274] Липосомы, состоящие из HSPC и холестерина (молярное соотношение 3:2), PEG-DSG (5 моль%) и DiIC18(3)-DS (0,15 моль%) с 0,5 М сульфата аммония в качестве захватывающего агента готовили в соответствии с Общим способом и нагружали соединениями АКГ-16, АКГ-28, АКГ-29 или АКГ-38 (без добавления буферного вещества) при соотношениях DL0, подобранных для оптимизации лекарственной нагрузки и эффективности инкапсуляции (EE). Результаты представлены в Таблице 13 ниже.

Таблица 13.

Серия, ID	Соединение	Соотношение DL0, г/моль PhL	Лекарственная нагрузка, г/моль PhL	EE, %
145	АКГ-16	600	598,9	99,8
142	АКГ-28	300	292,3	97,4
143	АКГ-29	300	43,6	14,5
144	АКГ-38	600	506,2	84,4

[00275] Эти данные показывают, что все соединения, содержащие диметиламиноэтиловый заместитель в положении 2 тетразольного кольца, были эффективно загружены в липосомы на уровне более 80%, в то время как АКГ-29 с аминоэтильным заместителем в том же положении очень плохо загружался в липосомы с эффективностью 14,5% и конечной лекарственной нагрузкой 43,6 г АКГ-29/моль PhL. Это показывает, что, несмотря на присутствие титруемых аминов во всех протестированных соединениях,

соединения с замещенным аммонием (например, N,N-диметиламиноэтильная группа) в тетразольном кольце неожиданно обеспечивают более эффективную загрузку лекарственного средства, чем соединения с первичным амином (аминоэтильная группа) в том же положении.

**Пример 17. Устойчивость в кровотоке и стабильность инкапсуляции *in vivo* липосом Примеров 15 и 16 у мышей**

[00276] Исследование проводили на самцах мышей линии CD-1, как описано в Общем способе выше.

Таблица 14.

Серия, ID	% ID в плазме (липид липосомы)		Начальное соотношение DL, %	
	5 мин	6 ч	5 мин	6 ч
128	80,6 ± 1,3	34,9 ± 0,8	75,2 ± 1,1	67,9 ± 4,0
129	83,6 ± 0,6	42,2 ± 3,4	95,7 ± 0,9	88,7 ± 3,1
130	83,4 ± 11,9	54,6 ± 3,8	94,4 ± 4,0	93,2 ± 1,1
132	83,2 ± 8,3	42,4 ± 1,7	48,6 ± 0,2	29,5 ± 0,5
133	71,3 ± 6,0	21,9 ± 8,1	97,3 ± 2,6	93,2 ± 4,3
134	78,8 ± 2,3	46,5 ± 3,2	93,8 ± 2,6	83,3 ± 4,7
135	77,9 ± 3,6	38,7 ± 2,9	102,6 ± 2,5	102,3 ± 1,8
142	80,9 ± 2,9	48,9 ± 2,8	52,9 ± 1,1	40,0 ± 0,3
144	83,3 ± 5,6	42,0 ± 4,4	50,4 ± 1,1	24,0 ± 0,5
145	80,6 ± 1,3	40,3 ± 0,1	41,4 ± 1,7	13,1 ± 0,0

[00277] Данные показали, что лекарственное средство в сериях липосом с ID 128, 132, 142, 144 и 145, все из которых содержали 0,5 М AS в качестве захватывающего агента, потеряло 25-60% инкапсулированного лекарственного средства почти сразу после контакта с кровью, как видно из низкого соотношения DL через 5 мин и дальнейшего снижения соотношения DL через 6 часов, особенно выраженных для липосом, нагруженных АКГ-38 и АКГ-16. Таким образом, состав с 0,5 моль% или 5 моль% PEG-DSG и 40 моль% холестерина, 0,5 М AS (в качестве захватывающего агента) не был способен удерживать лекарственное средство так же эффективно, как составы, в которых применялся 1 н. TEA-SOS (серии липосом

с ID 129, 130, 133-135), где % начального соотношения DL как через 5 мин, так и через 6 часов превышал 80%.

**Пример 18. Получение и загрузка АКГ-28 и АКГ-38 в пегилированные липосомы с различными соотношениями фосфолипид-холестерин**

[00278] Липосомы, содержащие 5 моль% PEG-DSG или PEG-DSPE (относительно PhL), 0,15 моль% липидной метки DiIC18(3)-DS и 0,5 М сульфата аммония (AS) или 1 н. TEA-SOS в качестве захватывающих агентов, готовили в соответствии с Общим способом и нагружали соединениями АКГ-28 и АКГ-38, как в Примере 8, при pH 5,07-5,82 (без добавления буферного вещества).

[00279] В попытке стабилизировать липосомы, содержащие 0,5 М AS в качестве захватывающего агента, в целях предотвращения быстрого высвобождения лекарственного средства при контакте с кровью (как описано в Примере 17), липосомы, содержащие DSPC (общеизвестно, что такие липосомы более устойчивы к утечке лекарственного средства по сравнению с HSPC) и пониженную долю холестерина (Chol), получали и нагружали АКГ-28 при DL 0 250 г/моль PhL или АКГ-38 при 600 г/моль PhL (Таблица 15). Вопреки ожиданиям, снижение содержания холестерина от 40 моль% до 10 моль% привело к резкому снижению эффективности инкапсуляции как для АКГ-28, так и для АКГ-38. Более низкий уровень холестерина также дестабилизировал липосомы против агрегации. При 30 моль% холестерина (молярное соотношение PhL-холестерин 70:30) липосомы, содержащие АКГ-28, полученные с применением 1 н. TEA-SOS и 5 моль% либо PEG-DSG, либо PEG-DSPE, необратимо агрегировались во время загрузки лекарственного средства, как и состав АКГ-38, содержащий 30 моль% холестерина, 5 моль% PEG-DSPE, в то время как состав АКГ-38 с 5 моль% PEG-DSG и 30 моль% холестерина показал снижение эффективности загрузки на 77,1%, или 462,4 г/моль PhL.

Таблица 15.

Серия, ID	Соединение	PEG-липид (липидная часть)	Захватывающий агент	Холестерин (моль%)	Лекарственная нагрузка, (г/моль PhL)	ЕЕ, (%)
158	АКГ-28	DSG	0,5 М AS	40	231,2	92,5
159	АКГ-28	DSG	0,5 М AS	30	173,5	69,4

160	AKG-28	DSG	0,5 M AS	20	116,4	46,6
161	AKG-28	DSG	0,5 M AS	10	92,4	36,9
162	AKG-28	DSPE	0,5 M AS	30	130,5	52,2
166	AKG-38	DSG	0,5 M AS	40	462,8	77,1
167	AKG-38	DSG	0,5 M AS	30	280,2	46,7
168	AKG-38	DSG	0,5 M AS	20	120,0	20,0
169	AKG-38	DSG	0,5 M AS	10	69,8	11,6
170	AKG-38	DSPE	0,5 M AS	30	114,9	19,1

[00280] Напротив, липосомы, полученные с применением HPSC и содержащие 40 моль% или более холестерина, вплоть до 65 моль% холестерина (максимальное исследуемое значение), продемонстрировали превосходную эффективность инкапсуляции более 87% и отсутствие агрегации липосом как для AKG-28 (DL0 250 г/моль PhL), так и для AKG-38 (DL0 500 г/моль PhL), с PEG-липидами (PEG-DSG и PEG-DSPE) и захватывающими агентами (AS или TEA-SOS) (Таблица 16).

[00281] Кроме того, оценивали эффективность оптимизированного состава для загрузки лекарственного средства этого класса современного стандартного лечения, линезолида, в составах как с 0,5 M AS, так и с 1 н. TEA-SOS. Тедизолид не был достаточно растворим в воде для осуществления загрузки в липосомы с трансмембранным градиентом в соответствии с Общим способом Примера 6. В обоих случаях с линезолидом эффективность инкапсуляции была менее 5%, демонстрируя, что эти липосомальные составы AKG-28 и AKG-38 значительно превосходили по своей способности стабильно инкапсулировать лекарственное средство по сравнению с линезолидом.

[00282] Z-средний размер ( $x_z$ ) и индекс полидисперсности (PDI) липосом определяли путем динамического рассеяния лазерного излучения (DLS) методом кумулянтов с помощью Malvern Zetasizer Pro (Malvern Panalytical) под углом измерения 173°.

Таблица 16.

Серия, ID	Соединение	PEG-липид (липидная часть)	Захватывающий агент	Холестерин (моль%)	Лекарственная нагрузка, (г/моль PhL)	Средний размер липосом $x_z$ , нм	Индекс полидисперсности	ЕЕ, (%)
-----------	------------	----------------------------	---------------------	--------------------	--------------------------------------	-----------------------------------	-------------------------	---------

174	AKG-28	DSG	0,5 M AS	40	249,8			99,9
175	AKG-28	DSG	0,5 M AS	45	253,9			101,6
176	AKG-28	DSG	0,5 M AS	50	252,6			101,0
201	AKG-28	DSG	0,5 M AS	55	228,2	107,2	0,0495	91,3
202	AKG-28	DSG	0,5 M AS	60	233,0	109,4	0,0333	93,2
203	AKG-28	DSG	0,5 M AS	65	235,3	111,0	0,0359	94,1
177	AKG-28	DSG	1 н. TEA-SOS	40	223,5			89,4
178	AKG-28	DSG	1 н. TEA-SOS	45	258,7			103,5
179	AKG-28	DSG	1 н. TEA-SOS	50	259,5			103,8
180	AKG-38	DSG	0,5 M AS	40	440,4			88,1
181	AKG-38	DSG	0,5 M AS	45	488,7			97,7
182	AKG-38	DSG	0,5 M AS	50	468,4			93,7
207	AKG-38	DSG	0,5 M AS	55	460,7	109,2	0,0034	92,1
208	AKG-38	DSG	0,5 M AS	60	475,1	111,3	0,0201	95,0
209	AKG-38	DSG	0,5 M AS	65	475,3	111,9	0,0118	95,1
183	AKG-38	DSG	1 н. TEA-SOS	40	505,4			101,1
184	AKG-38	DSG	1 н. TEA-SOS	45	495,8			99,2
185	AKG-38	DSG	1 н. TEA-SOS	50	489,4			97,9
186	AKG-28	DSPE	0,5 M AS	40	244,4	108,9	0,0250	97,8
187	AKG-28	DSPE	0,5 M AS	45	241,6	107,8	0,002	96,6
188	AKG-28	DSPE	0,5 M AS	50	250,4	109,1	0,0076	100,1
204	AKG-28	DSPE	0,5 M AS	55	223,5	117,0	0,0037	89,4
205	AKG-28	DSPE	0,5 M AS	60	237,8	114,8	0,0113	95,1
206	AKG-28	DSPE	0,5 M AS	65	233,0	115,1	0,0266	93,2
189	AKG-28	DSPE	1 н. TEA-SOS	40	244,6	109,3	0,0480	97,8
190	AKG-28	DSPE	1 н. TEA-SOS	45	245,6	107,7	0,0165	98,2

191	AKG-28	DSPE	1 н. TEA-SOS	50	245,0	107,9	0,0221	98,0
192	AKG-38	DSPE	0,5 М AS	40	434,8	115,1	0,0040	87,0
193	AKG-38	DSPE	0,5 М AS	45	462,7	112,9	0,0202	92,5
194	AKG-38	DSPE	0,5 М AS	50	467,0	109,4	0,0323	93,4
210	AKG-38	DSPE	0,5 М AS	55	463,3	114,5	0,0183	92,7
211	AKG-38	DSPE	0,5 М AS	60	479,6	114,9	0,0020	95,9
212	AKG-38	DSPE	0,5 М AS	65	475,0	114,2	0,0511	95,0
195	AKG-38	DSPE	1 н. TEA-SOS	40	503,6	109,1	0,002	100,7
196	AKG-38	DSPE	1 н. TEA-SOS	45	489,8	108,5	0,0298	98,0
197	AKG-38	DSPE	1 н. TEA-SOS	50	481,4	107,3	0,0395	96,3
229	Линезолид	DSPE	0,5 М AS	55	21,0			4,2
230	Линезолид	DSPE	1 н. TEA-SOS	55	19,7			3,9

**Пример 19. «Взрывное» высвобождение *in vitro* пегилированных липосом, содержащих АКГ-28 или АКГ-38 и различные соотношения фосфолипидов к холестерину, в присутствии плазмы**

[00283] Стабильность *in vitro* липосомальных составов АКГ-28 и АКГ-38, содержащих 5 моль% PEG-DSPE или PEG-DSG и различные соотношения HSPC-холестерин (40-65 моль% холестерина), оценивали в присутствии плазмы мышей линии CD-1 или объединенной плазмы человека (стабилизированной литий-гепарином от Innovative Research). Плазму размораживали, при необходимости доводили до pH 7,4 с помощью 1 н. HCl и последовательно фильтровали через фильтры из микростекловолокна (GF/C), фильтры 1 мкм из полиэфирсульфона (PES) и фильтры PES 0,22 мкм. Плазму (80 мкл) смешивали с липосомальными лекарственными составами (20 мкл) в пробирке Эппендорфа на 0,5 мл. Смесь инкубировали в течение 20 мин при 37°C и затем помещали в охлажденную воду. Смесь (0,1 мл) сразу хроматографировали на колонке Sepharose CL-4B объемом 2 мл, элюировали забуференным Перес физиологическим раствором (pH 7,0), и 0,25 мл липосомального

лекарственного средства собирали в доле свободного объема. Затем лекарственное средство и липидную метку DiI(3)-DS анализировали с помощью ВЭЖХ, как описано в Примере 7, и определяли % оставшегося инкапсулированного лекарственного средства по следующей формуле:

$$(A_d/A_l)/(A_{d,0}/A_{l,0}) * 100 = \text{оставшееся инкапсулированное лекарственное средство, \%}$$

где  $A_d$  – площадь пика лекарственного средства,  $A_l$  – площадь пика липидной метки,  $A_{d,0}$  – площадь пика лекарственного средства до инкубации с плазмой, и  $A_{l,0}$  – площадь пика липидной метки до инкубации.

[00284] Результаты показаны на **Фиг. 5А**, **Фиг. 5В**, **Фиг. 5С** и **Фиг. 5D**. Для липосом с инкапсулированным АКГ-28 (**Фиг. 5А**) в плазме крови человека наблюдалось явление «взрывного» высвобождения (быстрое падение соотношения DL, свидетельствующее о высвобождении лекарственного средства из липосом) для составов, содержащих 40 моль% холестерина, но не для составов с содержанием 45 моль% или более холестерина. Для липосом с инкапсулированным АКГ-38 (**Фиг. 5В**) явление «взрывного» высвобождения наблюдалось в плазме как человека, так и мыши для составов с содержанием холестерина 40 моль% и 45 моль%, но не при содержании холестерина 50 моль% или более.

**Пример 20. Удаление из плазмы *in vitro* и фармакокинетика *in vivo* 5 моль% PEG-липидных липосом, содержащих АКГ-38 и 40 или 55 моль% холестерина**

[00285] Три липосомальных состава из Примера 18 с применением 0,5 М захватывающего агента AS, оценивали в фармакокинетическом исследовании с двумя временными точками на самках мышей линии CD-1, как описано в Примере 7, измеряя процент инъецированной дозы (% ID) липосомального липида, остающегося в кровотоке как через 5 минут, так и через 6 часов, и измеряя высвобождение лекарственного средства из липосом путем определения отношения лекарственного средства к липиду (DL). Хотя липосомы, содержащие либо 5 моль% PEG-DSG, либо 5 моль% PEG-DSPE и содержащие 55 моль% холестерина, показали более 95% соотношения D/L перед инъекцией через 5 минут и >85% через 6 часов, состав PEG-DSG, содержащий 40 моль% холестерина, показал резкое снижение соотношений DL как через 5 минут, так и через 6 часов, что согласуется с данными утечки лекарственного средства в присутствии плазмы *in vitro* (Таблица 17). Это наблюдение противоречило предшествующему опыту с липосомальными составами, нагруженными лекарственным средством, поскольку ряд высокостабильных липосомальных лекарственных

средств, одобренных для применения в клинической практике, таких как пегилированный липосомальный доксорубин и нанолипосомальный иринотекан, содержат холестерин в соотношении примерно 40 моль% (см. например, вкладыш в упаковку лекарственного средства Doxil©, обновленный 08/2019, и Drummond, D. C., et al. (2006). «Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy», *Cancer Res.* 66(6): 3271-3277).

Таблица 17.

Липосома, ID серии		180	207	210
Холестерин, моль% (Chol+PC)		40	55	55
PEG-липид		DSG	DSG	DSPE
Соотношение D/L после загрузки		440,4 ± 8,5	460,7 ± 16,2	463,3 ± 13,7
Эффективность инкапсуляции, %		88,1 ± 1,7	92,1 ± 3,2	92,7 ± 2,7
Стабильность в плазме, <i>in vitro</i> , 20 мин, 37°C (% лекарственного средства, оставшегося инкапсулированным)	Мышь CD1	54,6 ± 1,6	92,4 ± 0,7	95,0 ± 0,8
	Человек	55,9 ± 3,7	94,3 ± 0,6	96,8 ± 0,9
Двухточечные данные (мышь CD-1, 9 мг/кг, в/в):				
Липосомальный липид, % ID	5 мин	103,4 ± 11,7	114,9 ± 14,9	104,3 ± 5,6
	6 ч	51,1 ± 5,2	52,6 ± 3,6	50,3 ± 5,7
Соотношение D/L, значение перед инъекцией, %	5 мин	60,8 ± 1,2	95,1 ± 1,2	96,8 ± 0,2
	6 ч	30,9 ± 2,4	86,6 ± 5,7	90,0 ± 4,1

**Пример 21. Ингибирование синтеза митохондриального белка (MPS) AKG-3, AKG-16, AKG-22, AKG-28, AKG-29, AKG-30, AKG-38, AKG-39 и AKG-40 и селективность ингибирования в отношении *M. tuberculosis* (H37Rv) по сравнению с ингибированием MPS**

[00286] Ингибирование синтеза митохондриального белка определяли колориметрическим способом с помощью набора MitoBiogenesis™ In-cell ELISA от AbCam (номер по каталогу ab11021) в соответствии с инструкциями производителя. Ингибирование синтеза митохондриального белка соотносится с важными проявлениями токсичности линезолида и других оксазолидинонов, главным образом, с оптической и периферической нейропатией и лактатацидозом (Renslo (2010) *Expert Reve Anti Infect Ther* 8(5) 565-574; Flanagan et al. (2015) *Antimicrob Agents Chemother* 59(1) 178-185; Santini et al. (2017) *Expert*

Opin Drug Saf 16(7) 833-843). Уровни двух митохондриальных белков измеряли одновременно, включая кодируемую митохондриальной ДНК субъединицу I комплекса IV (COX-1) и кодируемую ядерной ДНК субъединицу с молекулярной массой 70 кДа комплекса II (SDH-A). В этих исследованиях применяли клеточную линию миобластов H9c2 сердца крысы BDIX в формате анализа на 384-луночном планшете. Клетки выращивали в среде DMEM с 10% FBS и 1 x глутамином при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки высевали с плотностью 1500 клеток/лунку в 384-луночные планшеты по 47,5 мкл/лунку. Десять концентраций каждого соединения, начиная с высокой концентрации 200 мкМ и включая девять 3-кратных разведений и одну репликацию на условие, добавляли к клеткам по 2,5 мкл и инкубировали с клетками в течение пяти дней при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Исследуемые соединения включали тедизолид и линезолид в качестве контроля, а также АКГ-3, АКГ-16, АКГ-22, АКГ-28, АКГ-29, АКГ-30, АКГ-38, АКГ-39 и АКГ-40.

[00287] Затем проводили исследование по протоколу MitoBiogenesis In-Cell Elisa в соответствии с инструкциями производителя (Abscamе, номер по каталогу ab11021) и щелочной фосфатазой (AP), разработанной для обнаружения SDH-1A при 405 нм в кинетической модели в течение 15 мин (интервал 20 с - 1 мин), и HRP, разработанной для обнаружения COX-1 при 600 нм в кинетическом режиме в течение 15 мин (интервал 20 с - 1 мин) в планшет-ридере. Сигналы COX-1 и SDH-A наносили на график как отношение COX-1/SDH-A к концентрации каждого соединения, и рассчитывали IC<sub>50</sub> для каждого из 9 исследуемых соединений и двух контролей.

[00288] Индекс селективности MPS (SI-MPS) определяли путем деления MPS IC<sub>50</sub> в мкг/мл на MIC в чувствительном к лекарственному средству штамме *M. tuberculosis* H37Rv, как определено в Примере 2. Два из протестированных соединений, АКГ-28 и АКГ-29, имели SI-MPS, который был более чем в десять раз выше, чем определенный для линезолида, и более чем в двадцать раз выше, чем определенный для тедизолида. Оба этих соединения содержали первичную аминогруппу в положении R<sub>2</sub> оксазолидинонового кольца. Благодаря своей высокой активности (MIC <0,1) и высокой селективности в отношении *M. tuberculosis* по сравнению с синтезом митохондриального белка АКГ-28 является отличным кандидатом для инкапсуляции в липосомы и лечения туберкулеза или других микобактериальных заболеваний.

Таблица 18.

Соединение	Положение в	R <sub>2</sub>	MIC	MPS	SI-MPS
------------	-------------	----------------	-----	-----	--------

	тетразольном кольце, R <sub>1</sub> (Формула I)	(Формула I)	(H37Rv) (мкг/мл)	IC50 (мкг/мл)	MPS/H37
Линезолид	нет данных	-NHCOCH <sub>3</sub>	1,00	2,157	2,16
Тедизолид	2', CH <sub>3</sub> -	-OH	0,25	0,143	0,57
AKG-3	2', CH <sub>3</sub> -	-NH <sub>2</sub>	0,06	0,115	1,91
AKG-16	2', (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	-OH	0,25	0,244	0,98
AKG-22	1', NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	-OH	0,5	1,184	2,37
AKG-28	2', (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	-NH <sub>2</sub>	0,015	0,411	27,41
AKG-29	2', NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	-NH <sub>2</sub>	0,125	4,11	32,80
AKG-30	2', (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	-NH <sub>2</sub>	0,125	0,252	2,02
AKG-38	2', (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	-NHCOCH <sub>3</sub>	0,06	0,041	0,69
AKG-39	2', (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	-NHCOCH <sub>3</sub>	0,5	0,060	0,12
AKG-40	2', (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -	-NHCOCH <sub>3</sub>	0,5	0,064	0,13

### Пример 22. Масштабированное получение липосомального АКГ-28, серия 275

[00289] Серия 267. Следовали Общему способу Примера 6. HSPC (Lipoid AG) 4,95 г (6,30 ммоль), холестерин (Dishman, High Purity) 2,98 г (7,71 ммоль) и PEG-DSPE (Lipoid AG) 850 мг (0,315 ммоль) (HSPC:Chol:PEG-DSPE молярное соотношение 45:55:2,25) объединяли с 9 мл абсолютного этанола (Sigma, E-7023) и нагревали при перемешивании на бане при 68°C до растворения всех липидов. В отдельной емкости 93,3 г 0,5 М водного сульфата аммония (отфильтрован через 0,2-микронный фильтр) предварительно нагревали на бане при 68°C и выливали с перемешиванием в горячий липидно-этанольный раствор. Полученную суспензию перемешивали на бане при 68°C в течение 20 мин и экструдировали восемь раз при 260-300 psi через сложенные вместе две поликарбонатные трековые мембраны с размером пор 47 мкм и 100 нм и одну с размером пор 200 нм (Whatman Nucleopore), применяя экструдер для липосом Thermobarrel (Northern Lipids, Inc.), нагреваемый циркулирующей водой с температурой 68°C. Полученные экструдированные липосомы выдерживали в течение ночи в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2 мкм фильтр из полиэфирсульфона (PES) под положительным давлением. Внелипосомальный захватывающий агент (сульфат аммония) удаляли путем замены буфера TFF на воду, свободную от эндотоксинов, в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом

отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость не упала до уровня менее 200 мкСм/см (143 мкСм/см после 5,2 замен объема). Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная способом с фосфомолибдатом, синим, составила 57,4 мМ.

[00290] 720 мг АКГ-28 (в виде дигидрохлоридной соли) в форме исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (доведенного до рН 5,03 с помощью NaOH) объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственное средство-фосфолипид (DL) 250 г/моль в присутствии 45 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-28 6 мг/мл. Смесь быстро нагревали до 60-63°C путем внешнего нагрева при постоянном перемешивании и продолжали инкубацию при перемешивании на бане с температурой 65°C. Через 20 мин инкубации смесь быстро охлаждали в ледяной воде до температуры менее 10°C и выдерживали при этой температуре в течение примерно 10 мин. После достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl, липосомы, нагруженные лекарственным средством, очищали с помощью TFF с применением полисульфонового картриджа с полыми волокнами с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 12 мг/мл АКГ-28 и очищали от внелипосомального лекарственного средства с помощью TFF в 10 мМ буфере HEPES-Na, рН 7,0, содержащем 0,144 М NaCl, приготовленном на воде, не содержащей эндотоксинов (буфер HBS-7), всего примерно 8 замен объема. Доля неинкапсулированного лекарственного средства перед очисткой была определена спектрофотометрически при 305 нм в предварительного концентрированном диафильтрате и составила примерно 0,9% (соответствует эффективности загрузки 99,1%). Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр с размером пор 0,2 мкм и анализировали на размер частиц с помощью DLS, а также концентрацию лекарственного средства и фосфолипидов путем спектрофотометрии. Эту методику исследования повторяли еще три раза (серии 269, 271, 273). Полученные липосомы имели характеристики, показанные в Таблице 19.

Таблица 19.

Серия, ID	Масса АКГ-28, мг	Соотношение DL г АКГ-28/моль PhL	Средний размер частиц Xz, нм	PDI
267	720	251,9	115,4	0,0248
269	750	248,7	112,6	0,0282

271	750	268,0	114,0	0,0482
273	766	244,9	114,7	0,0153

[00291] Эти серии объединяли для получения серии 275, содержащей 12,0 мг/мл АКГ-28 в липосомальной форме, размер частиц  $X_z$  113,7 нм, PDI 0,0417.

### Пример 23. Масштабированное получение липосомального АКГ-38, серия 276

[00292] Серия 268. Применяли способ Примера 22 со следующими отличиями: исходный водный раствор АКГ-38 (в виде свободного основания) готовили путем растворения лекарственного средства в эквивалентном количестве 1 н. HCl и доведения объема до получения 20 мг/мл АКГ-38 (в виде свободного основания), pH 5,08. Загрузочная смесь содержала 1300 мг АКГ-38 и была приготовлена при 8 мг/мл АКГ-38 и соотношении DL 450 г/моль фосфолипида и дополнительно содержала 10 мМ NaCl. Липосомы после загрузки предварительно концентрировали до примерно 22 мг/мл лекарственного средства; доля неинкапсулированного лекарственного средства до очистки оценивалась спектрофотометрически при 305 нм в предварительно концентрированном диафильtrate и составляла примерно 3,2% (соответствует эффективности загрузки 96,8%). Методику повторяли еще три раза (серии 270, 272, 274). Полученные липосомы имели характеристики, показанные в Таблице 20.

Таблица 20.

Серия, ID	Масса АКГ-38, мг	Соотношение DL г АКГ-38/моль PhL	Средний размер частиц $X_z$ , нм	PDI
268	1300	445,9	114,6	0,0419
270	1360	444,9	114,2	0,0456
272	1350	463,7	115,3	0,0245
274	1375	437,3	115,0	0,0349

[00293] Эти серии объединяли для получения серии 276, содержащей 22,3 мг/мл АКГ-38 в липосомальной форме, размер частиц  $X_z$  113,1 нм, PDI 0,0454.

### Пример 24. Получение “пустой липосомы”, серия 277

[00294] 2 ммоль HSPC, 2,444 ммоль холестерина и 0,1 ммоль PEG-DSPE (молярное соотношение HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2,25) растворяли в этаноле, превращали в суспензию липосом и экструдировали через поликарбонатные мембраны, как описано в Примере 22, за исключением того, что вместо 0,5 М сульфата аммония применяли сульфатную соль необменного катиона, 0,13 М сульфата натрия. Экструдированные липосомы очищали от внелипосомального сульфата натрия и переносили в буфер HBS-7 путем замены буфера TFF с применением полисульфонового картриджа с полыми волокнами с MWCO 500 кДа, всего 10 замен объема. Очищенные липосомы содержали 42,9 мМ фосфолипида, размер частиц  $X_z$  113,7 нм и PDI 0,0612. Их асептически пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм и доводили до 20 мМ фосфолипида с помощью стерильного HBS-7.

#### **Пример 25. Липосомальное АКГ-38, серия 279**

[00295] Следовали Общему способу Примера 6. HSPC (Lipoid AG) 13,102 г (16,67 ммоль), холестерин (Dishman, High Purity) 7,877 г (20,37 ммоль) и PEG-DSPE (Lipoid AG) 2,250 г (0,833 ммоль) (молярное соотношение HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2,25) объединяли с 25 мл абсолютного этанола (Sigma, E-7023) и нагревали при перемешивании на бане при 68°C до растворения всех липидов. В отдельной емкости 259,1 г (250 мл) 0,5 М водного сульфата аммония (отфильтрован через 0,2-микронный фильтр) предварительно нагревали на бане при температуре 70°C и выливали при перемешивании в горячий липидно-этанольный раствор. Полученную суспензию перемешивали на бане при 70°C в течение не менее 20 мин и разделяли на четыре части. Каждую порцию экструдировали пять раз при 280 psi через сложенные вместе две поликарбонатные трековые мембраны с размером пор 47 мкм и 100 нм и одну с размером пор 200 нм (Whatman Nucleopore), применяя экструдер для получения липосом Thermobarrel Lipex на 100 мл (Northern Lipids, Inc.), нагреваемый циркулирующей водой с температурой 70°C. Эти частично экструдированные порции липосом объединяли ( $X_z$  129,7 нм) и экструдировали вместе через тот же пакет мембран еще пять раз, в результате чего получали липосомы с размером  $X_z$  115,9 нм, PDI 0,0212. Липосомы выдерживали в течение ночи в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2-мкм фильтр из полиэфирсульфона (PES) под положительным давлением. Концентрация фосфолипидов составила  $60,22 \pm 0,34$  мМ. Внелипосомальный захватывающий агент (сульфат аммония) удаляли путем замены буфера TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа

(Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость не упала до 180 мкСм/см после 5,1 замен объема. Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная способом с фосфомолибдатом, синим, составила  $54,97 \pm 0,32$  мМ.

[00296] АКГ-38 (свободное основание) смешивали с 0,95 эквивалента 1 н. HCl и разбавляли водой, не содержащей эндотоксинов, с получением исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (pH 5,16). Раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, и количество фильтрата, содержащего 3958 мг лекарственного средства, объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 450 г/моль в присутствии 44,5 мг/мл декстрозы, 10 мМ NaCl и концентрации АКГ-38, равной 8 мг/мл, pH 5,54. Смесь нагревали до 61°C с помощью внешнего источника нагрева при постоянном перемешивании в течение 5 мин и продолжали инкубацию при перемешивании на бане с температурой 65°C еще 22 мин. Затем смесь переносили на баню с ледяной водой, перемешивали в течение 7 минут до снижения температуры до 10°C и выдерживали на бане с ледяной водой еще 8 минут. После извлечения из ледяной бани, достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl путем добавления 3 М исходного раствора NaCl, липосомы, нагруженные лекарственным средством (pH 6,53), очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кД. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 22 мг/мл АКГ-38 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего 8 замен объема. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через 0,2-мкм стерильный PES фильтр с высокой пропускной способностью и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-38  $21,1 \pm 0,19$  мг/мл, соотношение DL  $454 \pm 4,7$  г/моль фосфолипида,  $X_z$  116,4 нм, PDI 0,0231. Выход лекарственного средства составил 3834 мг (96,9%).

#### **Пример 26. Липосомальное АКГ-28, серия 281**

[00297] Следовали Общему способу Примера 6. Экструдированные липосомы, состоящие из HSPC, холестерина и PEG-DSPE в молярном соотношении 45:55:2,25, содержащие 0,5 М сульфата аммония, готовили, как описано в Примере 25.

Внелипосомальный захватывающий агент (сульфат аммония) удаляли путем замены TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость не упала до 150 мкСм/см (4,1 замен объема). Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная способом с фосфомолибдатом, синим, составила 55,4 мМ.

[00298] 969,5 мг АКГ-28 (в виде дигидрохлоридной соли) в форме исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (доведенного до pH 5,24 с помощью NaOH) объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси с соотношением лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 250 г/моль в присутствии 44,5 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-28, равной 6 мг/мл. Смесь нагревали до 65,4°C за 2,5 мин с помощью внешнего источника нагрева при постоянном перемешивании и продолжали инкубацию при перемешивании на бане с температурой 65°C. Через 20 мин инкубации смесь охлаждали в ледяной воде до 9,3°C за 2,75 мин и выдерживали на бане с ледяной водой в течение примерно 10 мин. Затем смесь оставляли нагреваться до температуры окружающей среды и доводили до 0,1 М NaCl; pH 6,43. 133,4 г загрузочной смеси подвергали очистке с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 12 мг/мл АКГ-28 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего 8,1 замен объема. Доля неинкапсулированного лекарственного средства перед очисткой была определена спектрофотометрически при 302 нм в предварительного концентрированном диафильтрате и составила примерно 0,7% (соответствует эффективности загрузки 99,3%). Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-28  $13,26 \pm 0,21$  мг/мл, соотношение DL  $258,2 \pm 3,7$  г/моль фосфолипида,  $X_z$  117,3 нм, PDI 0,0421.

### **Пример 27. Липосомальное АКГ-38, серия 285**

[00299] Следовали Общему способу Примера 6. Экструдированные липосомы, состоящие из HSPC, холестерина и PEG-DSPE в молярном соотношении 45:55:2,25,

содержащие 0,5 М сульфата аммония, получали по существу в соответствии с Примером 25. Внелипосомальный захватывающий агент (сульфат аммония) удаляли путем замены TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость не упала до 138 мкСм/см (5,6 замен объема). Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная способом с фосфомолибдатом, синим, составила 53,1 мМ.

[00300] АКГ-38 (свободное основание) смешивали с 0,95 эквивалента 1 н. HCl и разбавляли водой, не содержащей эндотоксинов, с получением исходного водного раствора с концентрацией 19,9 мг/мл (рН 5,13). Раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, и количество фильтрата, содержащего 1400 мг лекарственного средства, объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 450 г/моль в присутствии 44,5 мг/мл декстрозы, 10 мМ NaCl и концентрации АКГ-38, равной 8 мг/мл, рН 5,58. Смесь нагревали до 63°C с помощью внешнего источника нагрева при постоянном перемешивании в течение 2,25 мин и продолжали инкубацию при перемешивании на бане с температурой 65°C еще 21 мин. Затем смесь переносили на баню с ледяной водой, перемешивали в течение 3 минут до снижения температуры до 10,3°C и выдерживали на бане с ледяной водой в течение еще 7 мин. После извлечения из ледяной бани, достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl путем добавления 3 М исходного раствора NaCl, липосомы, нагруженные лекарственным средством (рН 6,70), очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кД. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 22 мг/мл АКГ-38 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего 7,7 замен объема. Концентрированные, очищенные липосомы имели концентрацию АКГ-38, равную 23,1 мг/мл. Концентрацию лекарственного средства доводили до 20 мг/мл с помощью буфера HBS-7, липосомы в асептических условиях пропускали через 0,2-мкм стерильный PES фильтр с высокой пропускной способностью и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-38  $20,35 \pm 0,26$  мг/мл, соотношение DL  $437,8 \pm 6,5$  г/моль фосфолипида,  $X_z$  121,1 нм, PDI 0,0200. Выход лекарственного средства составил 1355 мг (96,8%).

**Пример 28. Липосомальное АКГ-28, серия 286**

[00301] Экструдированные липосомы (молярное соотношение HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2,25), содержащие 0,5 М сульфата аммония, свободные от внелипосомального захватывающего агента, получали, как в Примере 27. 600 мг АКГ-28 (в виде дигидрохлоридной соли) в форме исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (доведенного до pH 5,18 с помощью NaOH) объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси с соотношением лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 250 г/моль в присутствии 44,5 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-28, равной 6 мг/мл. Смесь помещали на водяную баню с температурой 65°C при перемешивании и доводили до 60°C за 4,5 мин. Инкубацию продолжали при перемешивании в течение 20 мин, смесь охлаждали в ледяной воде до 10,0°C в течение 2 мин и выдерживали на бане с ледяной водой в течение примерно 10 мин. Затем смесь оставляли нагреваться до температуры окружающей среды и доводили до 0,1 М NaCl; pH 6,23. 104,6 г загрузочной смеси подвергали очистке с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 12 мг/мл АКГ-28 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего 8,3 замен объема. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм (с буфером HBS-7) и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-28  $12,05 \pm 0,13$  мг/мл, соотношение DL 239,4 г/моль фосфолипида,  $X_z$  120,1 нм, PDI 0,0294. Выход лекарственного средства составил 555,5 мг (92,6%).

**Пример 29. Липосомальное АКГ-38, серия 292**

[00302] Серия 288. Следовали Общему способу Примера 6. HSPC (Lipoid AG) 9,17 г (11,67 ммоль), холестерин (Dishman, High Purity) 5,51 г (14,26 ммоль) и PEG-DSPE (Lipoid AG) 1,575 г (0,583 ммоль) объединяли с 17,5 мл абсолютного этанола (Sigma, E-7023) и нагревали с перемешиванием на бане при 69-70°C до растворения всех липидов. В отдельной емкости 181,4 г (175 мл) 0,5 М водного сульфата аммония (отфильтрован через 0,2-микронный фильтр) предварительно нагревали на бане при температуре 70°C и выливали при перемешивании в

горячий липидно-этанольный раствор. Полученную суспензию перемешивали на бане при 70°C в течение не менее 20 мин и разделяли на три части. Каждую порцию экструдировали пять раз при 280 psi через сложенные вместе две поликарбонатные трековые мембраны с размером пор 47 мм и 100 нм и одну с размером пор 200 нм (Whatman Nucleopore), применяя экструдер для получения липосом Thermobarrel Lipex на 100 мл (Northern Lipids, Inc.), нагреваемый циркулирующей водой с температурой 70°C. Эти частично экструдированные порции липосом объединяли (Xz 126,7 нм) и экструдировали вместе через тот же пакет мембран еще четыре раза, в результате чего получали липосомы с размером Xz 119,2 нм, PDI 0,0385. Липосомы выдерживали в течение ночи в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2 мкм фильтр из полиэфирсульфона (PES) под положительным давлением. Концентрация фосфолипидов составила  $59,08 \pm 0,44$  мМ. Внелипосомальный захватывающий агент (сульфат аммония) удаляли путем замены буфера TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость не упала до 152 мкСм/см после 5,4 замен объема. Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная способом с фосфолибдатом, синим, составила  $57,76 \pm 0,53$  мМ.

[00303] АКГ-38 (свободное основание) смешивали с 0,95 эквивалента 1 н. HCl и разбавляли водой, не содержащей эндотоксинов, с получением исходного водного раствора с концентрацией 19,7 мг/мл (рН 5,11). Раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, и количество фильтрата, содержащего 3509 мг лекарственного средства, объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 450 г/моль в присутствии 44,5 мг/мл декстрозы, 10 мМ NaCl и концентрации АКГ-38, равной 8 мг/мл, рН 5,50. Смесь нагревали до 61,6°C с помощью внешнего источника нагрева при постоянном перемешивании в течение 5 мин и продолжали инкубацию при перемешивании на бане с температурой 65°C в течение еще 20 мин. Затем смесь переносили на баню с ледяной водой, перемешивали в течение 7 мин до снижения температуры до 10°C и выдерживали на бане с ледяной водой в течение еще 8 мин. После извлечения из ледяной бани, достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl путем добавления 3 М исходного раствора NaCl, липосомы, нагруженные лекарственным средством, очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кД.

Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 22 мг/мл АКГ-38 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего 7,8 замен объема. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через 0,2-мкм стерильный PES фильтр с высокой пропускной способностью и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-38  $22,47 \pm 0,38$  мг/мл, соотношение DL 441,6 г/моль фосфолипида,  $X_z$  121,3 нм, PDI 0,0465. Выход лекарственного средства составил 3375 мг (96,2%).

[00304] Серия 289. Способ Ls-288 повторяли с применением 1506 мг АКГ-38 (как полученный аналогичным образом исходный водный раствор с концентрацией 20,0 мг/мл, pH 5,15). Раствор объединяли с той же суспензией экструдированных липосом после TFF с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 450 г/моль в присутствии 44,5 мг/мл декстрозы, 10 mM NaCl и концентрации АКГ-38, равной 8 мг/мл, pH 5,53. Смесь нагревали до 64,3°C с помощью внешнего источника нагрева при постоянном перемешивании в течение 2 мин и продолжали инкубацию при перемешивании на бане с температурой 65°C в течение еще 20 мин. Затем смесь переносили на баню с ледяной водой, перемешивали в течение 2,75 минут до снижения температуры до 9,6°C и выдерживали на бане с ледяной водой в течение еще 14 мин. После извлечения из ледяной бани, загрузочную смесь оставляли нагреваться до температуры окружающей среды и доводили до 0,1 M NaCl с помощью 3 M исходного раствора NaCl, pH 6,54. Липосомы, нагруженные лекарственным средством, очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кД. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 22 мг/мл АКГ-38 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего 8,1 замен объема. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через 0,2-мкм стерильный PES фильтр с высокой пропускной способностью и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-38  $22,84 \pm 0,41$  мг/мл, соотношение DL 452,7 г/моль фосфолипида,  $X_z$  120,3 нм, PDI 0,0522. Выход лекарственного средства составил 1407 мг (93,4%).

[00305] Серия 290. Следовали Общему способу Примера 6. HSPC (Lipoid AG) 7,86 г (10,00 ммоль), холестерин (Dishman, High Purity) 4,73 г (12,22 ммоль) и PEG-DSPE (Lipoid AG) 1,35 г (0,50 ммоль) (молярное соотношение HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2,25) объединяли с 15 мл абсолютного этанола (Sigma, E-7023) и нагревали с перемешиванием на бане при 69-70°C до растворения всех липидов. В отдельной емкости 155,5 г (150 мл) 0,5 М водного сульфата аммония (отфильтрован через 0,2-микронный фильтр) предварительно нагревали на бане при температуре 70°C и выливали при перемешивании в горячий липидно-этанольный раствор. Полученную суспензию перемешивали на бане при 70°C в течение по меньшей мере 20 мин и разделяли на две части. Каждую порцию экструдировали четыре раза при 280 psi через сложенные вместе две поликарбонатные трековые мембраны с размером пор 47 мкм и 100 нм и одну с размером пор 200 нм (Whatman Nucleopore), применяя экструдер для получения липосом Thermobarrel Lipex на 100 мл (Northern Lipids, Inc.), нагреваемый циркулирующей водой с температурой 70°C. Эти частично экструдированные порции липосом объединяли (Xz 131,5 нм) и экструдировали вместе через тот же пакет мембран еще четыре раза, в результате чего получали липосомы с размером Xz 122,7 нм, PDI 0,0215. Липосомы выдерживали в течение ночи в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2 мкм фильтр из полиэфирсульфона (PES) под положительным давлением. Концентрация фосфолипидов составила  $58,99 \pm 0,22$  мМ. Внелипосомальный захватывающий агент (сульфат аммония) удаляли путем замены буфера TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость не упала до 146 мкСм/см после 5,5 замен объема. Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная способом с фосфомолибдатом, синим, составила  $56,94 \pm 0,41$  мМ.

[00306] АКГ-38 (свободное основание) смешивали с 0,95 эквивалента 1 н. HCl и разбавляли водой, не содержащей эндотоксинов, с получением исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (pH 5,15). Раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, и количество фильтрата, содержащего 2315 мг лекарственного средства, объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 450 г/моль в присутствии 44,5 мг/мл декстрозы, 10 мМ NaCl и концентрации АКГ-38, равной 8,02 мг/мл, pH 5,52. Смесь нагревали до 64,4°C с помощью внешнего источника нагрева при постоянном перемешивании в течение 3,25 мин и

продолжали инкубацию при перемешивании на бане с температурой 65°C в течение еще 17 мин. Затем смесь переносили на баню с ледяной водой, перемешивали до снижения температуры ниже 10°C, выдерживали на бане с ледяной водой в течение 10 мин, оставляли нагреваться до температуры окружающей среды и доводили до 0,1 М NaCl путем добавления 3 М исходного раствора NaCl, pH 6,63. Липосомы, нагруженные лекарственным средством, очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кД. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 22 мг/мл АКГ-38 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего 8,0 замен объема. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через 0,2-мкм стерильный PES фильтр с высокой пропускной способностью и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-38  $22,07 \pm 0,23$  мг/мл, соотношение DL 441,6 г/моль фосфолипида,  $X_z$  120,4 нм, PDI 0,0395. Выход лекарственного средства составил 2141 мг (92,5%).

[00307] Серия 292. Серии 288 (150,3 г), 289 (61,2 г) и 290 (19,5 г) объединяли с получением 278,4 г серии 292 с концентрацией 22,5 мг/мл липосомального состава АКГ-38. Все липосомальные составы хранили при температуре 2-8°C.

### **Пример 30. Получение липосомального АКГ-28, серия 235**

[00308] Следовали Общему способу Примера 6. HSPC (Lipoid AG) 940 мг (1,20 ммоль), холестерин (Dishman, High Purity) 568 мг (1,47 ммоль), PEG-DSPE (Lipoid AG) 163 мг (0,06 ммоль) и 0,0018 ммоль липофильной флуоресцентной метки DiIC<sub>18</sub>(3)-DS (AAT Bioquest, USA) (молярное соотношение HSPC:Chol:PEG-DSPE:DiIC<sub>18</sub>(3)-DS 45:55:2,25:0,0675, 0,15 моль% DiI3-DS относительно HSPC) объединяли с 2 мл абсолютного этанола (Sigma, E-7023) и нагревали с перемешиванием на бане при 68°C до растворения всех липидов. В отдельной емкости 20 мл 0,5 М водного раствора сульфата аммония (отфильтрован через 0,2-микронный фильтр) предварительно нагревали на бане при температуре 68°C и выливали при перемешивании в горячий липидно-этанольный раствор. Полученную суспензию перемешивали на бане при 68°C в течение 20 мин и экструдировали восемь раз при 300 psi через сложенные вместе две поликарбонатные трековые мембраны с размером пор 47 мкм и 100 нм и одну с размером пор 200 нм (Whatman Nucleopore), применяя экструдер для

получения липосом Thermobarrel Lipex на 100 мл (Northern Lipids, Inc.), нагревающийся циркулирующей водой с температурой 68°C. Полученные в результате экструдированные липосомы выдерживали в течение ночи в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2 мкм фильтр из полиэфирсульфона (PES) под положительным давлением. Внелипосомальный захватывающий агент (сульфат аммония) удаляли путем замены буфера TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость концентрата не упала до 60 мкСм/см (10 замен объема). Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная способом с фосфомолибдатом, синим, составила  $37,56 \pm 0,62$  мМ.

[00309] 50 мг АКГ-28 (в виде дигидрохлоридной соли) в форме исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (доведенного до pH 4,99 с помощью NaOH) объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси с соотношением лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 250 г/моль в присутствии 140 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-28, равной 3 мг/мл. Смесь (pH 5,53) инкубировали с перемешиванием на бане с температурой 65°C в течение 20 мин, быстро охлаждали в ледяной воде и выдерживали на бане с ледяной водой в течение примерно 10 мин. После достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl с помощью 3 М исходного раствора NaCl, значение pH составило 5,80. Нагруженные лекарственным средством липосомы очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 5 мг/мл АКГ-28 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего примерно 10 замен объема. Очищенные липосомы дополнительно концентрировали в два раза с помощью TFF с применением шприцевого картриджа с мембраной на полых волокнах, 500 кДа (MicroKros, Spectrum). Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-28  $8,22 \pm 0,16$  мг/мл, соотношение DL  $257,3 \pm 10,3$  г/моль фосфолипида, размер липосомы  $X_z$  118,2 нм, PDI 0,0188. Выход лекарственного средства составил 41,4 мг (82,8%).

**Пример 31. Получение липосомального АКГ-38, серия 236**

[00310] Применяли экструдированные липосомы после TFF, содержащие 0,5 М сульфата аммония из Примера 30. АКГ-38 (свободное основание) смешивали с 0,95 эквивалента 1 н. HCl и разбавляли водой, не содержащей эндотоксинов, с получением исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (pH 5,11). Раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, и количество фильтрата, содержащего 70 мг лекарственного средства, объединяли с суспензией липосом после TFF (Пример 30) с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 450 г/моль в присутствии 140 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-38, равной 3 мг/мл. Смесь инкубировали с перемешиванием на бане с температурой 65°C в течение 20 мин, быстро охлаждали в ледяной воде и выдерживали на бане с ледяной водой в течение примерно 10 мин. После достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl с помощью 3 М исходного раствора NaCl, значение pH составило 6,33. Нагруженные лекарственным средством липосомы очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 6 мг/мл АКГ-38 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего примерно 10 замен объема. Очищенные липосомы дополнительно концентрировали в два раза с помощью TFF с применением шприцевого картриджа с мембраной на полых волокнах, 500 кДа (MicroKros, Spectrum). Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-38  $9,04 \pm 0,16$  мг/мл, соотношение DL  $463,9 \pm 19,8$  г/моль фосфолипида, размер липосомы  $Xz$  119,3 нм, PDI 0,0267. Выход лекарственного средства составил 56 мг (80%).

**Пример 32. Удерживание *in vitro* инкапсулированных лекарственных средств в липосомах серий 235 и 236 в присутствии плазмы**

[00311] Удерживание инкапсулированного лекарственного средства в липосомах в присутствии 80% плазмы крови мыши и человека при 37°C определяли, как описано в Примере 19 в настоящем документе. Время инкубации составляло 20 мин.

Таблица 21.

Липосома, серия ID	235	236
Плазма мыши	100,2 ± 4,3	91,0 ± 2,5
Плазма человека	99,6 ± 3,9	94,8 ± 2,6

[00312] Эти липосомы были устойчивы к «взрывному» высвобождению лекарственного средства при контакте с плазмой крови.

**Пример 33. Получение липосомальных АКГ-28 и АКГ-38, серии 231, 232 (молярное соотношение HSPC:cholesterol:PEG-DSPE 45:55:2,25, захватывающий агент 0,5 М сульфата аммония)**

[00313] Следовали Общему способу Примера 6. HSPC (Lipoid AG) 4,255 г (5,41 ммоль), холестерин (Dishman, High Purity) 2,56 г (6,62 ммоль) и PEG-DSPE (Lipoid AG) 729 мг (0,27 ммоль) (молярное соотношение HSPC:холестерин:PEG-DSPE 45:55:2,25) объединяли в 9 мл абсолютного этанола (Sigma, E-7023) и нагревали с перемешиванием на бане при 70°C до растворения всех липидов. В отдельной емкости 90 мл 0,5 М водного раствора сульфата аммония (отфильтрован через 0,2-микронный фильтр) предварительно нагревали на бане при температуре 70°C и выливали при перемешивании в горячий липидно-этанольный раствор. Полученную суспензию перемешивали на бане при 70°C в течение 25 мин и экструдировали восемь раз при 260 psi через сложенные вместе две поликарбонатные трековые мембраны с размером пор 47 мм и 100 нм и одну с размером пор 200 нм (Whatman Nucleopore), применяя экструдер для получения липосом Thermobarrel Lipex на 100 мл (Northern Lipids, Inc.), нагреваемый циркулирующей водой с температурой 70°C. Полученные в результате экструдированные липосомы выдерживали в течение ночи в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2 мкм фильтр из полиэфирсульфона (PES) под положительным давлением. Внелипосомальный захватывающий агент (сульфат аммония) удаляли путем замены буфера TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость концентрата не упала до 60 мкСм/см (10 замен объема). Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная спектрофотометрическим способом с фосфомолибдатом, синим, составила 46,97 ± 0,80 мМ.

[00314] Серия 231. 350 мг АКГ-28 (в виде дигидрохлоридной соли) в форме исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (доведенного до pH 5,02 с помощью NaOH) объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси с соотношением лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 250 г/моль в присутствии 137,6 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-28, равной 2,53 мг/мл. Смесь (pH 5,60) инкубировали с перемешиванием на бане с температурой 65°C в течение 20 мин, быстро охлаждали в ледяной воде и выдерживали на бане с ледяной водой в течение примерно 10 мин. После достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl с помощью 3 М исходного раствора NaCl, значение pH составило 5,68. Нагруженные лекарственным средством липосомы очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых порых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 9 мг/мл АКГ-28 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего примерно 10,9 замен объема. Очищенные липосомы дополнительно концентрировали до примерно 12 мг/мл лекарственного средства, продолжая диафильтрацию TFF без подачи буфера. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-28  $11,42 \pm 0,09$  мг/мл, соотношение DL  $247,7 \pm 7,1$  г/моль фосфолипида, размер липосомы  $X_z$  116,5 нм, PDI 0,0511. Выход лекарственного средства составил 322,7 мг (92,2%).

[00315] Серия 232. АКГ-38 (свободное основание) смешивали с 0,95 эквивалента 1 н. HCl и разбавляли водой, не содержащей эндотоксинов, с получением исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (pH 5,09). Раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, и количество фильтрата, содержащего 580 мг лекарственного средства, объединяли с суспензией липосом этого Примера после TFF с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 500 г/моль в присутствии 137,6 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-38, равной 2,53 мг/мл, pH 5,72. Смесь инкубировали с перемешиванием на бане с температурой 65°C в течение 20 мин, быстро охлаждали в ледяной воде и выдерживали на бане с ледяной водой в течение примерно 10 мин. После достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl с помощью 3 М исходного раствора NaCl, значение pH составило 6,40. Нагруженные лекарственным средством

липосомы очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 12 мг/мл АКГ-38 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего примерно 8,5 замен объема. Очищенные липосомы дополнительно концентрировали в два раза, продолжая диафильтрацию TFF без подачи буфера. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-38  $16,03 \pm 0,07$  мг/мл, соотношение DL  $487,3 \pm 13,9$  г/моль фосфолипида, размер липосомы  $Xz$  120,0 нм, PDI 0,0069. Выход лекарственного средства составил 538,9 мг (92,9%).

**Пример 34. Получение липосомального АКГ-28, серия 233 (молярное соотношение, HSPC:холестерин:PEG-DSG 60:40:3, захватывающий агент 1 н. сукрооктасульфат триэтиламмония)**

[00316] Следовали Общему способу Примера 6. HSPC (Lipoid AG) 1,88 г (2,4 ммоль), холестерин (Dishman, High Purity) 619 мг (1,6 ммоль) и PEG-DSPE (Sunbright GS-020, NOF, Japan) 312 мг (0,12 ммоль) объединяли в 3 мл абсолютного этанола и нагревали с перемешиванием на бане при 67°C до растворения всех липидов. В отдельной емкости 31,5 г (30 мл) 1 М водного раствора сукрооктасульфата триэтиламмония (отфильтрован через 0,2-микронный фильтр, pH 6,20, см. Пример 8) предварительно нагревали на бане при температуре 65°C и выливали при перемешивании в горячий липидно-этанольный раствор. Полученную суспензию перемешивали на бане при 65°C в течение 5 мин и экструдировали три раза при 400 psi через сложенные вместе четыре поликарбонатные трековые мембраны с размером пор 47 мм и 100 нм и одну с размером пор 200 нм (Whatman Nucleopore), применяя экструдер для получения липосом Thermobarrel Lipex на 100 мл (Northern Lipids, Inc.), нагреваемый циркулирующей водой с температурой 65°C. Полученные в результате экструдированные липосомы выдерживали в течение ночи в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2 мкм фильтр из полиэфирсульфона (PES) под положительным давлением. 9,2 г экструдированных липосом очищали от внелипосомального захватывающего агента (TEA-SOS) путем замены буфера TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением

картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость концентрата не упала до 21 мкСм/см (14,5 замен объема). Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная спектрофотометрическим способом с фосфомолибдатом, синим, составила  $31,32 \pm 0,85$  мМ.

[00317] 140 мг АКГ-28 (в виде дигидрохлоридной соли) в форме исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (доведенного до pH 5,02 с помощью NaOH) объединяли с суспензией липосом после TFF с образованием загрузочной смеси с соотношением лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 250 г/моль в присутствии 116,1 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-28, равной 2,52 мг/мл. Смесь (pH 5,43) инкубировали с перемешиванием на бане с температурой 65°C в течение 20 мин, быстро охлаждали в ледяной воде и выдерживали на бане с ледяной водой в течение примерно 10 мин. После достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl с помощью 3 М исходного раствора NaCl, значение pH составило 5,80. Нагруженные лекарственным средством липосомы очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 9 мг/мл АКГ-28 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего примерно 10,9 замен объема. Очищенные липосомы дополнительно концентрировали до примерно 12 мг/мл лекарственного средства, продолжая диафильтрацию TFF без подачи буфера. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм (с буфером HBS-7) и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-28  $10,64 \pm 0,20$  мг/мл, соотношение DL  $246,8 \pm 11,7$  г/моль фосфолипида, размер липосомы  $X_z$  116,3 нм, PDI 0,0022. Выход лекарственного средства составил 118,2 мг (84,4%).

**Пример 35. Получение липосомального АКГ-38, серия 234 (молярное соотношение HSPC:холестерин:PEG-DSPE 45:55:2,25, захватывающий агент 1 н. сукрооктасульфат триэтиламмония)**

[00318] Следовали Общему способу Примера 6. HSPC (Lipoid AG) 3,30 г (4,20 ммоль), холестерин (Dishman, High Purity) 1,985 г (5,13 ммоль) и PEG-DSPE (Lipoid AG) 567 мг (0,21

ммоль) (молярное соотношение HSPC:холестерин:PEG-DSPE 45:55:2,25) объединяли в 7 мл абсолютного этанола (Sigma, E-7023) и нагревали с перемешиванием на бане при 70°C до растворения всех липидов. В отдельной емкости 10 мл 1 н. водного раствора сукрооктасульфата триэтиламония (TEA-SOS) (отфильтрован через 0,2-микронный фильтр) предварительно нагревали на бане при температуре 70°C и выливали при перемешивании в горячий липидно-этанольный раствор. Полученную суспензию перемешивали на бане при 70°C в течение 10 мин и экструдировали восемь раз при 260 psi через сложенные вместе две поликарбонатные трековые мембраны с размером пор 47 мм и 100 нм и одну с размером пор 200 нм (Whatman Nucleopore), применяя экструдер для получения липосом Thermobarrel Lipex на 100 мл (Northern Lipids, Inc.), нагреваемый циркулирующей водой с температурой 70°C. Полученные в результате экструдированные липосомы выдерживали в течение ночи в холодильнике (2-8°C) и фильтровали через 0,2 мкм фильтр из полиэфирсульфона (PES) под положительным давлением. Концентрация фосфолипидов составила 54,6 мМ. 11,33 г экструдированных липосом очищали от внелипосомального захватывающего агента (TEA-SOS) путем замены буфера TFF на свободную от эндотоксинов воду в системе KrosFlo TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа (Spectrum Laboratories) до тех пор, пока остаточная проводимость концентрата не упала до 64 мкСм/см (13,8 замен объема). Концентрация фосфолипидов в суспензии липосом после TFF, определенная спектрофотометрическим способом с фосфомолибдатом, синим, составила  $28,67 \pm 1,01$  мМ.

[00319] АКГ-38 (свободное основание) смешивали с 0,95 эквивалента 1 н. HCl и разбавляли водой, не содержащей эндотоксинов, с получением исходного водного раствора с концентрацией 20 мг/мл (pH 5,09). Раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, и количество фильтрата, содержащего 250 мг лекарственного средства, объединяли с суспензией липосом этого Примера после TFF с образованием загрузочной смеси при соотношении лекарственного средства к фосфолипиду (DL) 500 г/моль в присутствии 116,4 мг/мл декстрозы и концентрации АКГ-38, равной 2,53 мг/мл, pH 5,24. Смесь инкубировали с перемешиванием на бане с температурой 65°C в течение 20 мин, быстро охлаждали в ледяной воде и выдерживали на бане с ледяной водой в течение примерно 10 мин. После достижения температуры окружающей среды и доведения до 0,1 М NaCl с помощью 3 М исходного раствора NaCl, значение pH составило 6,60. Нагруженные лекарственным средством липосомы очищали с помощью TFF с применением картриджа на основе полисульфоновых полых волокон с

порогом отсечения по молекулярной массе 500 кДа. Липосомы предварительно концентрировали путем диафильтрации до примерно 10 мг/мл АКГ-38 и очищали от любого внелипосомального лекарственного средства путем обмена TFF в буфере HBS-7, всего примерно 8,0 замен объема. Очищенные липосомы дополнительно концентрировали приблизительно в два раза, продолжая диафильтрацию TFF без подачи буфера. Концентрированные очищенные липосомы в асептических условиях пропускали через стерильный фильтр 0,2 мкм и анализировали размер частиц с помощью DLS и концентрацию лекарственного средства и фосфолипида с помощью спектрофотометрии. Липосомы имели следующие характеристики: АКГ-38  $15,71 \pm 0,33$  мг/мл, соотношение DL  $518,6 \pm 18,4$  г/моль фосфолипида, размер липосомы  $X_z$  114,3 нм, PDI 0,0284. Выход лекарственного средства составил 235,7 мг (94,3%).

**Пример 36. Влияние концентрации осмотического агента на эффективность загрузки АКГ-28 и АКГ-38 в липосомы и удержание лекарственного средства липосомами в плазме**

[00320] Следовали Общему способу Примера 6. Экструдированные липосомы, содержащие 0,5 М сульфата аммония и липидную композицию HPSC, холестерин, PEG-DSPE и DiIC18(3)-DS (флуоресцентная липидная метка) в молярном соотношении 45:55:2,25:0,0675, получали, как описано в Примере 30. Липосомы очищали от внелипосомального сульфата аммония путем замены TFF на свободную от эндотоксинов воду качества «вода для инъекций» (WFI) (Nucclone) с применением шприцевого картриджа MicroKros с мембраной из полисульфона с полыми волокнами (MWCO 500 кДа, Spectrum Laboratories) (13,8 замен объема, остаточная проводимость 88 мкСм/см, концентрация фосфолипидов 55,4 мМ). Липосомы нагружали АКГ-28 или АКГ-38 путем инкубации лекарственных средств (приготовленных в виде водных исходных растворов с концентрацией 20 мг/мл, как описано в Примерах 30 и 31) с очищенными экструдированными липосомами в водном растворе на водяной бане при 70°C в течение 20 мин в присутствии осмотического агента (декстрозы) с различными концентрациями, при концентрации лекарственного средства 2,22 мг/мл и соотношении DL 250 г/моль фосфолипида (АКГ-28) или 450 г/моль фосфолипида (АКГ-38). Некапсулированное лекарственное средство удаляли путем эксклюзионной хроматографии с сорбентом Sepharose CL-4B, элюент - буфер HBS-7, и эффективность загрузки (инкапсуляции) определяли по результатам анализа лекарственного средства и фосфолипида. Концентрацию

осмотического агента выражали как в абсолютных значениях, так и в процентах от концентрации декстрозы 168 мг/мл, которая, как определено, является изоосмотической по отношению к 0,5 М раствору сульфата аммония, применяемому для образования липосом. Вопреки ожиданиям общего мнения в области липосом, лекарственные средства были эффективно загружены в липосомы по изобретению (эффективность инкапсуляции более 85%, главным образом, более 90%) даже в гипоосмотических условиях (то есть, при осмоляльности внелипосомального раствора ниже, чем осмоляльность внутрелипосомального раствора захватывающего агента), вплоть до полного отсутствия добавленного агента осмотического баланса (декстрозы) (Таблица 22). Более того, при воздействии плазмы крови в условиях *in vitro* анализа высвобождения в плазме, описанного в Примере 19, инкапсуляция лекарственного средства в липосомах, загруженных при самых низких концентрациях осмотического агента, была по меньшей мере столь же стабильной, как и в липосомах, загруженных при почти полном (86,3%) осмотическом равновесии.

[00321] Результаты показывают, что липосомы с 55 моль% холестерина, 45 моль% PC, PEG-DSPE при 5 моль% HSPC и 0,5 М захватывающего агента AS загружают как АКГ-28 (Таблица 22), так и АКГ-38 (Таблица 23) при 250 или 500 г/моль PhL с эффективностью >85%, преимущественно, >90%, в гипоосмотических условиях до 0% декстрозы, и нагруженные в гипоосмотических условиях липосомы эффективно удерживают лекарственное средство в присутствии плазмы крови.

Таблица 22.

Серия, ID	Декстроза, г/л	Осмотический баланс с 0,5 М AS, %	Соотношение DL, г/моль PhL	Эффективность инкапсуляции, %	Лекарственное средство, удержанное в липосомах, %, 80% плазма, 20 мин, 37°C	
					Мышь	Человек
237	144,9	86,3	243,1 ± 7,5	97,2 ± 3,0	98,8 ± 4,6	98,0 ± 4,0
238	130,4	77,6	243,1 ± 4,9	97,2 ± 2,0		
239	115,9	69,0	253,1 ± 5,2	101,2 ± 2,1		
240	86,9	51,8	246,1 ± 3,5	98,4 ± 1,4		
241	58,0	34,5	253,7 ± 8,1	101,5 ± 3,3		
242	29,0	17,3	246,5 ± 5,4	98,6 ± 2,2	99,4 ± 4,3	100,3 ± 4,9

243	0	0	249,2 ± 5,4	99,7 ± 2,2	100,6 ± 4,3	102,2 ± 4,8
-----	---	---	-------------	------------	-------------	-------------

Таблица 23.

Серия, ID	Декстроза, г/л	Осмотический баланс с 0,5 М AS, %	Соотношение DL, г/моль PhL	Эффективность инкапсуляции, %	Лекарственное средство, удержанное в липосомах, %, 80% плазма, 20 мин, 37°C	
					Мышь	Человек
244	144,9	86,3	464,9 ± 14,6	93,0 ± 2,9	82,0 ± 2,4	86,8 ± 2,8
245	130,4	77,6	463,5 ± 18,2	92,7 ± 3,6		
246	115,9	69,0	453,2 ± 8,7	90,6 ± 1,7		
247	86,9	51,8	459,8 ± 13,8	92,0 ± 2,8		
248	58,0	34,5	466,1 ± 14,5	93,2 ± 2,9	85,0 ± 3,3	89,6 ± 3,7
249	29,0	17,3	455,8 ± 12,9	91,2 ± 2,6	89,7 ± 3,1	92,8 ± 3,0
250	0	0	433,1 ± 17,7	86,6 ± 3,5	93,8 ± 3,5	91,2 ± 3,2

**Пример 37. Фармакокинетические исследования с однократным введением общей формы (инкапсулированное + высвобожденное лекарственное средство) Ls-АКG28 и Ls-АКG38 на крысах**

[00322] Это исследование проводили для оценки фармакокинетики АКG28 и АКG 38, вводимых крысам в виде однократной дозы Ls-АКG28 и Ls-АКG38. Исследование проводили на самцах крыс линии Sprague-Dawley, применяя внутривенное введение липосомального АКG-38 (Ls-АКG38) в дозе 20, 40 или 80 мг на кг массы тела или липосомального АКG-28 (Ls-АКG28) в дозе 10, 20 и 40 мг на кг массы тела. Ls-АКG28 (серия 275) и Ls-АКG38 (серия 276) получали, как описано в Примерах 22 и 23, соответственно. Для сравнения, линезолид в дозе 50 мг/кг массы тела вводили перорально через желудочный зонд, с 0,5% метилцеллюлозы, и подкисленный до pH 3-4 (Sigma M0430) при концентрации 20 мг/мл. Для измерения содержания лекарственного средства в плазме 0,5 мл крови собирали в пробирки с литий-гепарином через 5 мин, 15 мин, 1 ч, 3 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч. Образцы центрифугировали, и полученную плазму отделяли и переносили в одинаковые прозрачные

полипропиленовые пробирки, немедленно замораживали над сухим льдом и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа. Концентрацию в плазме крыс определяли с помощью ВЭЖХ. Некомпаратментный ФК-анализ проводили с применением Phoenix WinNonlin (версия 7.0). Для Ls-AKG28 и Ls-AKG38 это программное обеспечение для анализа данных ФК применяли для оценки максимальной концентрации в плазме ( $C_{\max}$ ), максимальной концентрации в плазме, деленной на дозу ( $C_{\max}/\text{доза}$ ), времени достижения  $C_{\max}$  ( $T_{\max}$ ), последней измеренной концентрации ( $C_{\text{last}}$ ), времени последней измеренной концентрации ( $T_{\text{last}}$ ), площади под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 ч до последней временной точки ( $AUC_{0-\text{last}}$ ) и от 0 ч до предельного значения шкалы ( $AUC_{0-\text{inf}}$ ),  $AUC_{0-\text{last}}$ , деленной на дозу ( $AUC_{0-\text{last}}/\text{доза}$ ), клиренса (CL), объема распределения (Vd) и периода полувыведения ( $T_{1/2}$ ). Для линезолида это программное обеспечение для анализа данных ФК применяли для оценки тех же фармакокинетических параметров, за исключением кажущегося клиренса (CL/F) и кажущегося объема распределения (Vd/F).

[00323] Кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства после введения Ls-AKG28 в однократной внутривенной дозе 10, 20 и 40 мг/кг (IV x 1) представлены на **Фиг. 7**. Обобщенные значения ФК параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после введения IV x 1 Ls-AKG28 в дозах 10, 20 и 40 мг/кг представлены в Таблице 24.

[00324] При всех дозах кривые зависимости концентрации в плазме от времени для Ls-AKG28 были определяемы от 5 мин до 72 ч. Исходя из результатов  $C_{\max}/\text{доза}$  и  $AUC/\text{доза}$ , фармакокинетика Ls-AKG28 в плазме является линейной (пропорциональной дозе) после введения 10, 20 и 40 мг/кг. При всех дозах плазменный клиренс (CL) Ls-AKG38 (~2,59 мл/ч/кг) был выше, чем Ls-AKG28 (~1,67 мл/ч/кг). При той же дозе (20 или 40 мг/кг) Vd для Ls-AKG28 был больше, чем для Ls-AKG38.

Таблица 24. Обобщенные значения ФК параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после IV введения Ls-AKG28 при 10, 20 и 40 мг/кг

Фармакокинетический параметр Общее количество АКГ28	Линезолид	Ls-AKG28		
	50 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг	40 мг/кг
$C_{\max}$ [мкг/мл]	26,73	272,23	413,83	577,70
$C_{\max} / \text{доза}$ [мкг/мл]/[мг/кг]	0,53	27,22	20,69	14,44
$T_{\max}$ [ч]	1,0	0,083	0,083	0,083

$C_{last}$ [мкг/мл]	5,35	8,95	31,05	94,89
$T_{last}$ [ч]	24,0	72	72	72
$AUC_{0-last}$ [ч*мкг/мл]	282,01	5,565,17	11,287,31	20,712,25
$AUC_{0-last}$ / доза [ч*мкг/мл]/[мг/кг]	5,64	556,52	564,37	517,81
$AUC_{0-inf}$ [ч*мкг/мл]	373,53	5,764,67	12,143,11	24,218,25
Клиренс [мл/ч/кг]	133,86	1,73	1,64	1,65
$Vd$ [мл/кг]	2,291,26	38,66	45,40	61,03
$T_{1/2}$ [ч]	11,86	15,45	19,11	25,61

[00325] Кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства после введения Ls-AKG38 в дозах 20, 40 и 80 мг/кг IV х 1 представлены на **Фиг. 8**.

[00326] Обобщенные значения фармакокинетических параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после введения Ls-AKG38 в дозах 20, 40 и 80 мг/кг IV х 1 представлены в Таблице 25.

[00327] При всех дозах кривые зависимости концентрации в плазме от времени для Ls-AKG38 были определяемы от 5 мин до 72 ч. Исходя из результатов  $C_{max}/доза$  и  $AUC/доза$ , фармакокинетика Ls-AKG38 в плазме является линейной (пропорциональной дозе) после введения 20, 40 и 80 мг/кг. При всех дозах плазменный клиренс (CL) Ls-AKG38 (~2,59 мл/ч/кг) был выше, чем Ls-AKG28 (~1,67 мл/ч/кг). При той же дозе (20 или 40 мг/кг)  $Vd$  для Ls-AKG28 был больше, чем для Ls-AKG38.

Таблица 25. Обобщенные значения фармакокинетических параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после IV введения Ls-AKG38 в дозах 20, 40 и 80 мг/кг

Фармакокинетический параметр Общее количество АКГ38	Линезолид	Доза Ls-AKG38		
	50 мг/кг	20 мг/кг	40 мг/кг	80 мг/кг
$C_{max}$ [мкг/мл]	26,73	452,84	856,42	1,555,85
$C_{max}$ / доза [мкг/мл]/[мг/кг]	0,53	22,64	21,41	19,44
$T_{max}$ [ч]	1,0	0,083	0,083	0,083
$C_{last}$ [мкг/мл]	5,35	1,29	5,29	27,14

$T_{last}$ [ч]	24,0	72	72	72
$AUC_{0-last}$ [ч*мкг/мл]	282,01	7,532,62	15,402,45	31,313,26
$AUC_{0-last}$ / доза [ч*мкг/мл]/[мг/кг]	5,64	376,63	385,06	391,42
$AUC_{0-inf}$ [ч*мкг/мл]	373,53	7,548,80	15,468,95	31,784,91
Клиренс [мл/ч/кг]	133,86	2,65	2,59	2,52
$Vd$ [мл/кг]	2,291,26	33,26	32,48	43,74
$T_{1/2}$ [ч]	11,86	8,70	8,71	12,05

[00328] Кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства после введения Ls-AKG28 в дозах 10, 20 и 40 мг/кг IV x 1 и Ls-AKG38 в дозах 20, 40 и 80 мг/кг IV x 1 представлены на **Фиг. 7** и **Фиг. 8**, соответственно. В исследованиях с однократным внутривенным введением при всех дозах кривые зависимости концентрации в плазме от времени для Ls-AKG28 и Ls-AKG38 были определяемы от 5 мин до 72 ч. Фармакокинетика Ls-AKG28 в плазме является линейной (пропорциональной дозе) после введения 10, 20 и 40 мг/кг. Фармакокинетика Ls-AKG38 в плазме является линейной (пропорциональной дозе) после введения 20, 40 и 80 мг/кг. При всех дозах плазменный клиренс (CL) Ls-AKG38 (~2,59 мл/ч/кг) был выше, чем Ls-AKG28 (~1,67 мл/ч/кг). При той же дозе (20 или 40 мг/кг)  $Vd$  для Ls-AKG28 был больше, чем для Ls-AKG38. Общее РК содержание в плазме Ls-AKG28 в дозе 40 мг/кг и Ls-AKG38 было в ~73 раза и в ~110 раз выше, чем фармакокинетика линезолида в плазме (применяя AUC от 0 до конечного значения).

[00329] AUC в плазме и устойчивость лекарственного средства в кровотоке были намного выше для обоих липосомальных составов по сравнению с линезолидом. ФК обоих липосомальных составов имеет линейную зависимость от дозы, что видно по значениям AUC/доза, очень схожим для Ls-AKG28 и Ls-AKG38.

**Пример 38. Фармакокинетика (ФК) общей формы (инкапсулированное + высвобожденное лекарственное средство) Ls-AKG28 и Ls-AKG38 в плазме после многократного внутривенного введения крысам Sprague-Dawley**

[00330] Это исследование проводили для оценки фармакокинетических параметров АКГ28 и АКГ38, вводимых крысам в увеличивающихся дозах Ls-AKG28 и Ls-AKG38 еженедельно в течение восьми недель. Исследование проводили на крысах Sprague-Dawley,

применяя внутривенное введение. Ls-АКG28 (серия 275) и Ls-АКG38 (серия 276) получали, как описано в Примерах 22 и 23, соответственно. Концентрацию в плазме крыс определяли с помощью ВЭЖХ. Кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства после введения Ls-АКG28 в дозах 10, 20 и 40 мг/кг IV x 1 в дни 1, 15, 29 и 43, представлены в Таблице 26 и на **Фиг. 9А**, **Фиг. 9В** и **Фиг. 9С**. Обобщенные значения фармакокинетических параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после введения Ls-АКG28 в дозах 10, 20 и 40 мг/кг IV x 1 в дни 1, 15, 29 и 43, представлены в Таблице 26. Все данные на **Фиг. 9А**, **Фиг. 9В** и **Фиг. 9С** применяли для получения значений фармакокинетических параметров в Таблице 26.

[00331] В фармакокинетических исследованиях с однократным и многократным введением фармакокинетика Ls-АКG28 в плазме была сходной после первой дозы. Для Ls-АКG28 в дозе 10 мг/кг  $C_{max}$  и AUC в плазме были одинаковыми в 1, 15, 29 и 43 дни. Для Ls-АКG28 в дозе 20 мг/кг  $C_{max}$  и AUC в плазме увеличивались в 29 и 43 дни. Для Ls-АКG28 в дозе 40 мг/кг  $C_{max}$  и AUC в плазме увеличивались после введения доз в дни с 1 по 43.

[00332] Кривые зависимости концентрации в плазме от времени для общего количества лекарственного средства после введения Ls-АКG38 в дозах 20, 40 и 80 мг/кг IV x 1 в дни 1, 15, 29 и 43 представлены в Таблице 27 и на **Фиг. 10А**, **Фиг. 10В** и **Фиг. 10С**. Обобщенные значения фармакокинетических параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после введения Ls-АКG38 в дозах 20, 40 и 80 мг/кг IV x 1 в дни 1, 15, 29 и 43 представлены в Таблице 27. В фармакокинетических исследованиях с однократным и многократным введением фармакокинетика Ls-АКG38 в плазме была сходной после первой дозы. Для Ls-АКG38 в дозе 20, 40 и 80 мг/кг  $C_{max}$  и AUC в плазме увеличивались с 1-го по 43-й день. При наличии согласия по поводу ускоренного клиренса из кровотока (ABC) для пегилированных липосом, содержащих нецитотоксические лекарственные вещества, отсутствие повышенного клиренса на более поздних циклах было неожиданным, и предполагает, что липосомы, содержащие АКG-28 или АКG-38, могут длительно вводиться млекопитающим.

Таблица 26. Обобщенные значения фармакокинетических параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после IV x 1 введения Ls-АКG28 в дозах 10, 20 и 40 мг/кг в дни 1, 15, 29 и 43

	$C_{max}$ [мкг/мл]	AUC <sub>0-last</sub> [ч*мкг/мл]	Клиренс [мл/ч/кг]	Vd [мл/кг]	T <sub>1/2</sub> [ч]

Ls-AKG28 (10 мг/кг) – d1	271,28	7,766,70	0,92	36,01	27,27
Ls-AKG28 (10 мг/кг) – d15	270,78	6,093,17	1,36	36,94	18,83
Ls-AKG28 (10 мг/кг) – d29	277,67	6,807,48	1,19	34,84	20,23
Ls-AKG28 (10 мг/кг) – d43	292,14	7,780,12	0,93	34,37	25,48
Ls-AKG28 (20 мг/кг) – d1	423,81	11,133,88	1,49	42,87	19,99
Ls-AKG28 (20 мг/кг) – d15	514,07	11,757,75	1,36	39,97	20,41
Ls-AKG28 (20 мг/кг) – d29	560,15	14,997,08	1,00	35,06	24,31
Ls-AKG28 (20 мг/кг) – d43	561,51	15,702,04	0,91	35,13	26,73
Ls-AKG28 (40 мг/кг) – d1	596,89	19,970,35	1,63	53,70	22,88
Ls-AKG28 (40 мг/кг) – d15	1,018,25	26,606,26	1,07	40,29	26,02
Ls-AKG28 (40 мг/кг) – d29	1,163,03	33,635,70	0,81	34,14	29,19
Ls-AKG28 (40 мг/кг) – d43	1,269,07	37,580,42	0,73	30,78	29,17

Таблица 27. Обобщенные значения фармакокинетических параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после IV x 1 введения Ls-AKG38 в дозах 20, 40 и 80 мг/кг в дни 1, 15, 29 и 43

	$C_{\max}$ [мкг/мл]	$AUC_{0-last}$ [ч*мкг/мл]	Клиренс [мл/ч/кг]	Vd [мл/кг]	$T_{1/2}$ [ч]
Ls-AKG38 (10 мг/кг) – d1	485,39	7,702,72	2,49	38,12	10,61
Ls-AKG38 (10 мг/кг) – d15	529,93	8,792,21	2,16	35,41	11,36
Ls-AKG38 (10 мг/кг) – d29	576,14	9,875,80	1,89	34,05	12,52
Ls-AKG38 (10 мг/кг) – d43	639,70	12,053,96	1,53	29,59	13,43
Ls-AKG38 (20 мг/кг) – d1	880,03	15,364,53	2,50	38,91	10,78
Ls-AKG38 (20 мг/кг) – d15	1,011,05	18,314,30	2,07	35,16	11,78
Ls-AKG38 (20 мг/кг) – d29	1,017,30	21,373,77	1,69	35,96	14,74
Ls-AKG38 (20 мг/кг) – d43	1,013,54	23,414,28	1,51	35,57	16,38
Ls-AKG38 (40 мг/кг) – d1	1,648,38	31,180,74	2,41	43,10	12,40
Ls-AKG38 (40 мг/кг) – d15	2,025,67	38,874,97	1,90	36,31	13,21
Ls-AKG38 (40 мг/кг) – d29	2,231,92	45,921,63	1,62	31,15	13,36
Ls-AKG38 (40 мг/кг) – d43	2,428,35	50,694,28	1,45	29,22	13,99

**Пример 39. Фармакокинетические исследования лекарственного средства и липосомального липида Ls-АКG28 и Ls-АКG38 на мышях CD-1**

[00333] Это исследование было разработано для определения *in vivo* фармакокинетических параметров в крови как для лекарственного средства, так и для липосомального липида, и стабильности удерживания лекарственного средства в липосомах липосомальных составов АКG-28 и АКG-38 в плазме крови. Исследование проводили на самцах мышей CD-1 (20-22 г), как описано в Общем способе выше в Примере 7 (5 мышей на момент времени). Ls-АКG28 (серия 235) и Ls-АКG38 (серия 236) получали, как описано в Примерах 30 и 31, соответственно. Липосомы в дозе 50 мг/кг (Ls-АКG28) или 90 мг/кг (Ls-АКG38) вводили в латеральную хвостовую вену в момент времени 0, и образцы крови брали в моменты времени 0,083, 1, 3, 6, 24 и 48 часов после инъекции. Концентрацию АКG-28, АКG-38 и флуоресцентной липидной метки (DiIC<sub>18</sub>(3)-DS) в плазме определяли с помощью ВЭЖХ. Концентрацию липосомального фосфолипиды в плазме рассчитывали по количественному определению флуоресцентной метки с применением серий липосом 235 и 236 в качестве стандартов. Поскольку ожидается, что сродство к тканям неинкапсулированных оксазолидиноновых лекарственных средств будет во много раз выше, чем у инкапсулированных в липосомы (что подтверждается, например, значением Vd 2291,26 мл/кг для неинкапсулированного оксазолидинона, линезолида, по сравнению со значением Vd 33,27-43,74 мл/кг для инкапсулированного в липосомы АКG-28 у крыс, см. Пример 37), концентрация лекарственного средства в плазме может относиться в основном к липосомально-ассоциированному лекарственному средству, и соотношение лекарственного средства в плазме к липосомальному липиду (DL), нормированное к начальному (до инъекции) значению DL, принимали за показатель удерживания лекарственного средства липосомами. Некомпаратментный ФК-анализ проводили с применением Summit Research Services, PK Solutions 2.0. Для Ls-АКG28 и Ls-АКG38 это программное обеспечение для анализа данных ФК применяли для оценки максимальной концентрации в плазме ( $C_{max}$ ), максимальной концентрации в плазме, деленной на дозу ( $C_{max}/\text{доза}$ ), времени достижения  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), последней измеренной концентрации ( $C_{last}$ ), времени последней измеренной концентрации ( $T_{last}$ ), площади под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 ч до последней временной точки ( $AUC_{0-last}$ ) и от 0 ч до предельного значения шкалы ( $AUC_{0-inf}$ ),  $AUC_{0-last}$ , деленной на дозу ( $AUC_{0-last} / \text{доза}$ ), клиренса (CL), объема распределения (Vd) и периода полувыведения ( $T_{1/2}$ ).

[00334] Представлены кривые зависимости концентрации в плазме от времени для лекарственного средства после введения Ls-AKG28 (**Фиг. 11А**) и Ls-AKG38 (**Фиг. 11В**). Обобщенные значения ФК параметров в плазме для лекарственного средства Ls-AKG28 и Ls-AKG38 представлены в Таблице 28, и для липосомального фосфолипида представлены в Таблице 29. Динамика соотношения DL, свидетельствующая о стабильности *in vivo* инкапсуляции лекарственного средства, представлена на **Фиг. 11С** и в Таблице 30.

[00335] Ls-AKG28 обладает почти идеальной стабильностью *in vivo* с необнаружимой потерей лекарственного средства до 48 часов после внутривенной инъекции у мышей. Период полувыведения лекарственного средства для Ls-AKG28 составляет 866,3 ч согласно моноэкспоненциальному уравнению ( $R^2=0,822$ ). Ls-AKG28 имеет более высокую скорость высвобождения лекарственного средства. Период полувыведения лекарственного средства для Ls-AKG38 составляет 22,9 ч согласно моноэкспоненциальному уравнению ( $R^2=0,950$ ).

Таблица 28. Обобщенные значения фармакокинетических параметров в плазме для общего количества лекарственного средства после введения Ls-AKG28 и Ls-AKG38

<b>Фармакокинетический параметр</b>	<b>Ls-AKG28</b>	<b>Ls-AKG38</b>
$C_{\max}$ [мг/л]	1261,1	2320,3
$C_{\max}$ / доза [мг/л]/[мг/кг]	25,22	25,78
$T_{\max}$ [ч]	0,083	0,083
$C_{\text{last}}$ [мг/л]	81,17	41,48
$T_{\text{last}}$ [ч]	48	48
$AUC_{0-\text{last}}$ [ч*мг/л]	19,820	30,346
$AUC_{0-\text{last}}$ / доза [ч*мг/л]/[мг/кг]	396,4	337,2
$AUC_{0-\text{inf}}$ [ч*мг/л]	21,156	45,114
Клиренс [мл/ч/кг]	2,35	2,93
Vd [мл/кг]	42,13	30,12
$T_{1/2}$ [ч]	12,42	7,14

Таблица 29. Обобщенные значения фармакокинетических параметров в плазме для липосомального фосфолипида после введения Ls-AKG28 и Ls-AKG38

Фармакокинетический параметр	Ls-АКГ28	Ls-АКГ38
$C_{\max}$ [моль/л]	0,00485	0,00493
$C_{\max}$ / доза [моль/л]/[моль/кг]	24,87	25,54
$T_{\max}$ [ч]	0,083	0,083
$C_{\text{last}}$ [моль/л]	0,00033	0,00041
$T_{\text{last}}$ [ч]	48	48
$AUC_{0-\text{last}}$ [ч*моль/л]	0,0769	0,0817
$AUC_{0-\text{last}}$ / доза [ч*моль/л]/[моль/кг]	394,3	421,1
$AUC_{0-\text{inf}}$ [ч*моль/л]	0,0826	0,0979
Клиренс [мл/ч/кг]	2,34	2,17
$V_d$ [мл/кг]	43,3	41,0
$T_{1/2}$ [ч]	12,82	13,09

Таблица 30. Соотношение лекарственного средства Ls-АКГ28 и Ls-АКГ38 и липосомального фосфолипида в плазме после IV введения у мышей

Время (ч)	Соотношение лекарственного средства Ls-АКГ28 и фосфолипида		Соотношение лекарственного средства Ls-АКГ38 и фосфолипида	
	(%) от начального	Стандартное отклонение	(%) от начального	Стандартное отклонение
0,083	101,1	1,75	101,7	4,29
1	102,4	2,10	97,6	1,56
3	101,9	1,27	94,2	4,20
6	101,2	0,89	97,4	2,08
24	98,7	1,92	63,3	2,36
48	98,4	2,54	22,7	1,75

**Пример 40. Фармакокинетические исследования лекарственного средства Ls-АКГ28 и Ls-АКГ38 на мышах после многократного введения липосом, наличие АВС-феномена**

[00336] Было показано, что образование антител против PEG вызывает более быстрый клиренс липосом, содержащих конъюгаты PEG-липид (пегилированные липосомы), после

повторных множественных инъекций (Ishida et al. Journal of Controlled Release 105 (2005) 305-317; Laverman et al., JPET 298 (2001) 607–612), явление, известное как эффект ускоренного выведения из кровотока (ABC). Это исследование проводили для определения наличия ABC-феномена после многократного повторного введения различных доз Ls-AKG28 и Ls-AKG38, имеющих различные составы. Липосомы получали в соответствии с Примерами 33-35, серии 231, 232, 233 и 234. Это исследование проводили на самцах мышей CD-1, как в общем описано в Примере 7. В каждой группе использовали пять мышей. Концентрацию АКГ-28 и АКГ-38 в плазме мышей определяли с помощью ВЭЖХ. Мышам вводили указанную дозу и состав один раз в неделю, всего 4 инъекции. Содержание лекарственного средства в плазме измеряли через 6 ч после введения 1-й и 4-й доз (Фиг. 12). Ни в одной из исследованных групп не было значительно ускоренного клиренса после 4-й инъекции (двухвыборочный t-критерий с неравной дисперсией, все значения  $p > 0,05$ ). Эти данные подтверждают, что эти липосомальные оксазолидиноны могут вводиться постоянно в течение нескольких недельных циклов без значительного негативного влияния на время воздействия лекарственного средства.

Таблица 31. Концентрация лекарственного средства в плазме для Ls-AKG28 и Ls-AKG38 для липосомального фосфолипида после введения Ls-AKG28 и Ls-AKG38. Сокращения: SOS, 1 н. TEA-SOS; AS, 0,5 М сульфата аммония; холестерин, содержание холестерина в моль% от суммы холестерина и HSPC; DL - соотношение лекарственного средства к липиду, г/моль липосомального фосфолипида; % ID - процент введенной дозы, в среднем по группе; SD - стандартное отклонение.

Группа	Лекарственное средство	Захваты вающий агент	Холестерин (моль%)	Соотношение DL	Введенная доза (мг/кг)	1-ая доза		4-ая доза	
						% ID	SD	% ID	SD
1	AKG-28	SOS	40	266,9	65	61,99	7,20	55,71	13,88
2	AKG-28	SOS	40	266,9	90	55,74	6,73	63,23	11,07
3	AKG-28	AS	55	252,5	65	56,15	18,3	70,17	3,91
4	AKG-28	AS	55	252,5	90	62,90	3,41	67,11	7,67
5	AKG-38	SOS	55	538,1	90	54,67	6,49	51,57	8,55
6	AKG-38	SOS	55	538,1	120	58,53	9,52	56,79	6,29
7	AKG-38	AS	55	524,5	90	53,57	1,20	44,25	8,66
8	AKG-38	AS	55	524,5	120	55,39	7,99	48,95	8,66

[00337] Эти данные показывают, что после четырех циклов лечения скорость выведения из кровотока липосомального АКГ-28 или липосомального АКГ-38 согласно настоящему

изобретению не увеличивалась, в отличие от того, о чем сообщалось ранее для других пегилированных липосом, не содержащих цитотоксическое лекарственное средство, связанное с липосомой.

**Пример 41. Дозозависимая переносимость липосомального АКГ-28 и липосомального АКГ-38 у мышей CD-1**

[00338] Целью этих исследований была оценка переносимости Ls-AKG28 и Ls-AKG38, введенных мышам в виде одного агента в различных дозах. Самкам мышей CD-1 весом 20-22 г (по 5 в каждой группе) вводили Ls-AKG28 (50, 65, 90 или 100 мг/кг/доза) или Ls-AKG38 (50, 90, 120 или 200 мг/кг/доза) путем внутривенной инъекции (в хвостовую вену) один раз в неделю в течение 4 недель. Липосомальные составы (Ls-AKG28, серия 231 и Ls-AKG38, серия 232) готовили, как описано ранее в Примере 33. Контрольной группе вводили один раз в неделю в течение 4 недель равный объем забуференного HEPES физиологического раствора (HBS, pH 7). Массу тела измеряли 3 раза в неделю на протяжении всего исследования, и данные представляли в виде выраженного в процентах изменения массы тела по отношению к массе тела, измеренной в нулевой день.

[00339] Животных подвергали эвтаназии с соблюдением правил ветеринарной этики в конце исследования (через 72 часа после последней обработки) с помощью ингаляции CO<sub>2</sub>. Образцы крови собирали путем пункции сердца и переносили в предварительно заполненные EDTA микроконтейнеры для гематологического анализа (гематологический анализатор ADVIA 120/2120i) и в микроконтейнеры, предварительно заполненные литий-гепарином, для отделения плазмы. Плазму отделяли от клеточной фракции путем центрифугирования при 10000 об/мин в течение 5 мин и применяли для биохимического анализа (анализатор Cobas 6000). Образцы тканей (печень, селезенка, почки, легкие, сердце, тонкая и толстая кишка) собирали в пробирки объемом 50 мл, предварительно заполненные 10% забуференным формалином, который через 24 часа заменяли 70% этанолом. Ткани заливали в парафин, делали срезы, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и оценивали на гистопатологию с помощью сертифицированного ветеринарного врача-патологоанатома.

[00340] Как показано на **Фиг. 13А** и **Фиг. 13В**, не отмечалось значительного влияния на массу тела мышей, наблюдаемого как для Ls-AKG28, так и для Ls-AKG38, при лечении в общей сложности четырьмя еженедельными введениями в дозах до 90 мг/кг для Ls-AKG28 и

200 мг/кг для Ls-AKG38 по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор.

[00341] По сравнению с контрольной группой у мышей, получавших высокие дозы Ls-AKG38 (90, 120 и 200 мг/кг), не наблюдалось значительного снижения количества эритроцитов и гематокрита (**Фиг. 13С**) по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор. У мышей, получавших Ls-AKG28, такого эффекта не наблюдалось. Значительное снижение числа тромбоцитов по сравнению с контрольной группой было обнаружено у мышей, получавших Ls-AKG28 в самой высокой дозе 90 мг/кг (**Фиг. 13С**), но все же снижение менее чем на 25% по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор. Лечение или Ls-AKG28, или Ls-AKG38 не оказывало существенного влияния на количество лейкоцитов (WBC) или ферментов печени (ALT и AST).

[00342] Гистопатологический анализ не показал результатов, связанных с исследуемым лекарственным средством, у животных, которые получали 50 и 65 мг/кг Ls-AKG28 (**Фиг. 13D**). Были обнаружены результаты, связанные с исследуемым лекарственным средством, которые заключались в минимальной вакуолизации цитоплазмы макрофагов (включая клетки Купфера) в печени, селезенке и почках животных, получавших 90 мг/кг Ls-AKG28. Лечение Ls-AKG38 ассоциировалось с результатами, связанными с исследуемым лекарственным средством, в печени и селезенке при дозах 90 мг/кг и 120 мг/кг. В печени наблюдались вакуолизация и гипертрофия клеток Купфера от минимальной до легкой при дозах 50 и 90 мг/кг, умеренная вакуолизация и гипертрофия клеток Купфера при дозах 50 и 120 мг/кг и минимальная множественная агрегация вакуолизированных макрофагов при дозах 90 мг/кг и 120 мг/кг.

[00343] Лечение максимальными дозами Ls-AKG38 (200 мг/кг) было связано с минимально повышенным экстрамедуллярным гемопоэзом (ЕМН) в печени и селезенке, от минимально до слабо выраженными множественными клеточными инфильтратами смешанного характера и минимальным единичным гепатоцеллюлярным некрозом в печени и минимальным очаговым гепатоцеллюлярным некрозом (**Фиг. 13D**). Эти изменения, обнаруженные при исследовании под микроскопом, не считались связанными с исследуемым лекарственным средством из-за того, что они часто встречались в качестве фоновых находок у этого вида.

[00344] В целом, монотерапия как Ls-AKG28, так и Ls-AKG38 демонстрирует хорошую переносимость *in vivo* у мышей, даже когда липосомальные лекарственные средства вводили

в самой высокой оцениваемой дозе для каждого, 90 и 200 мг/кг для Ls-AKG28 и Ls-AKG38, соответственно.

**Пример 42. Переносимость *in vivo* Ls-AKG28 и Ls-AKG38 в комбинации с BDQ/PMD или BDQ/PMD/MOX у мышей**

[00345] В этом Примере оценивали *in vivo* переносимость липосомальных оксазолидинонов в комбинации с терапевтически значимыми противотуберкулезными лекарственными средствами. Три схемы приема лекарственного средства бедаквилина, претоманида и линезолида (BDQ/PMD/LNZ или BPL) или бедаквилина, претоманида и моксифлоксацина (BDQ/PMD/MOX или BPM) показали высокую эффективность в клинической практике при лечении туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (Conradie et al (2020) N Engl J Med 382(10) 893-902 и Tweed et al. (2019) Lancet Respir Med 7(12)1048-1058), хотя режим BPL был ограничен токсичностью, в первую очередь, связанной с добавлением линезолида (Conradie et al (2020) N Engl J Med 382(10) 893-902). В настоящем изобретении авторы оценивали безопасность и переносимость двух липосомальных оксазолидинонов, Ls-AKG28 и Ls-AKG38, при применении в составе обеих схем либо путем замены линезолида в схеме BPL, либо путем добавления к схеме BPM. Мышей линии CD-1 (по 5 в каждой группе) лечили либо Ls-AKG28 (серия 231), либо Ls-AKG38 (серия 232) отдельно или вместе с комбинацией бедаквилина (BDQ) и претоманида (PMD). Ls-AKG28 (серия 231) и Ls-AKG38 (серия 232) получали, как описано в Примере 33. Кроме того, мышей совместно лечили тройной комбинацией BDQ, PMD и моксифлоксацина (MOX) и липосомальными оксазолидинонами.

[00346] Ls-AKG28 (50 мг/кг/доза) и Ls-AKG38 (90 мг/кг/доза) вводили путем внутривенной инъекции через хвостовую вену один раз в неделю в течение 4 недель. Комбинацию BDQ, PMD и MOX (25/100/100 мг/кг/доза, соответственно) вводили перорально через зонд ежедневно пять раз в неделю в течение 4 недель. В качестве дополнительного контроля мыши получали только BDQ/PMD/MOX или BDQ/PMD (25/100 мг/кг/доза, соответственно) плюс линезолид (LNZ), вводимый перорально в дозе 100 мг/кг/доза ежедневно, пять раз в неделю в течение 4 недель. Измерения массы тела, сбор тканей и анализ проводили, как описано ранее в Примере 41.

[00347] Как показано на **Фиг. 14А** и **Фиг. 14В**, в ходе исследования не наблюдалось значительного влияния либо Ls-AKG28, либо Ls-AKG38, применяемых при совместном

лечении в комбинации с BDQ/PMD (BP) или BDQ/PMD/MOX (BPM), на массу тела мышей. Как Ls-AKG28, так и Ls-AKG38 продемонстрировали хорошую переносимость в комбинации с BDQ/PMD или BDQ/PMD/MOX и не влияли на гематологию или биохимию крови у мышей, получавших лекарственное средство (Фиг. 14С).

[00348] Данные гистопатологии (Фиг. 14D) не показали изменений, связанных с лечением, в случае Ls-AKG28 в комбинации с BDQ/PMD. Комбинация Ls-AKG28 + BDQ/PMD/MOX показала минимальные явления, связанные со смешанной клеточной и мононуклеарной клеточной инфильтрацией в легком и сердце. Лечение Ls-AKG38 в качестве монотерапии было сопряжено с минимальными изменениями в печени, связанными с исследуемым лекарственным средством (воспалительная инфильтрация и гепатоцеллюлярный некроз). Введение Ls-AKG38 + BDQ/PMD не показало каких-либо изменений, связанных с лечением, и комбинация Ls-AKG38 + BDQ/PMD/MOX была связана с минимальной смешанной клеточной инфильтрацией в легком. У животных, которых лечили комбинацией BDQ/PMD/LNZ, были обнаружены связанные с лечением воспалительная инфильтрация в печени, минимальный гепатоцеллюлярный некроз и инфильтрация вакуолизированными макрофагами в легком. Следовательно, как Ls-AKG28 (50 мг/кг/у, так и Ls-AKG38 (90 мг/кг/доза), вводимые один раз в неделю в течение 4 недель, показали хорошую переносимость у мышей в комбинации с BDQ/PMD или BDQ/PMD/MOX.

**Пример 43. Влияние схемы дозирования на переносимость Ls-AKG28 и Ls-AKG38 в комбинации с BDQ/PMD у мышей**

[00349] В этом исследовании *in vivo* переносимость Ls-AKG28 (50 мг/кг/доза) или Ls-AKG38 (100 мг/кг/доза), вводимых два раза в неделю, сравнивали с Ls-AKG28 (100 мг/кг/доза) или Ls-AKG38 (200 мг/кг/доза), вводимыми один раз в неделю. Липосомы получали в соответствии с Примером 25 (Ls-AKG38, серия 279) и Примером 26 (Ls-AKG28, серия 281). Оба липосомальных лекарственных средства вводили самкам мышей CD-1 (по 5 в каждой группе) отдельно или в комбинации с BDQ/PMD (BP). BDQ/PMD (25 и 100 мг/кг/доза, соответственно) вводили через желудочный зонд ежедневно, пять раз в неделю в течение 4 недель. Контрольной группе вводили забуференный HEPES физиологический раствор (HBS, pH 7) один раз в неделю в течение 4 недель. Образцы крови и тканей собирали и анализировали, как описано выше в Примерах 41 и 42.

[00350] Как монотерапия, так и комбинированное лечение мышей с помощью Ls-AKG28 или Ls-AKG38, вводимых два раза в неделю или один раз в неделю в более высокой дозе, не влияли ни на массу тела (**Фиг. 15А** и **Фиг. 15В**), ни на общий анализ крови и биохимию (**Фиг. 15С**).

[00351] Гистопатологический анализ собранных тканей (**Фиг. 15D**) показал минимальные интерстициальные смешанные клеточные инфильтраты, состоящие из макрофагов и нейтрофилов, у 2 из 5 мышей, которые получали Ls-AKG28 в дозе 50 мг/кг (2 раза в неделю), и умеренные интерстициальные смешанные клеточные инфильтраты у 1 из 5 животных, которые получали Ls-AKG28 в дозе 100 мг/кг (1 раз в неделю).

[00352] В легких мышей, получавших Ls-AKG28 + BP в дозе 50 мг/кг (1 раз в неделю), наблюдались минимальные интерстициальные инфильтраты, состоящие из макрофагов (1 из 5 животных) или смешанных (макрофаги и нейтрофилы) воспалительных клеток (3 из 5 мышей). У мышей, получавших Ls-AKG28 + BP в дозе 100 мг/кг (1 раз в неделю), у 4 из 5 животных наблюдались минимальные интерстициальные смешанные клеточные инфильтраты. Кроме того, у 2 из 5 животных, получавших Ls-AKG28 + BP в дозе 100 мг/кг (1 раз в неделю), наблюдались минимальные многоочаговые гранулемы инородного тела, связанные с бледноокрашенным базофильным инородным материалом. Эти данные микроскопического исследования не считались связанными с исследуемым лекарственным средством из-за их частого возникновения, поскольку фоновая патология у этого вида включала минимальные многоочаговые смешанные клеточные инфильтраты и минимальный

единичный гепатоцеллюлярный некроз в печени у 1 из 5 животных, получавших Ls-AKG28 + ВР в дозе 50 мг/кг (2 раза в неделю).

[00353] Сходные данные микроскопического исследования, связанные с лечением Ls-AKG38 (отдельно или в комбинации), не считались относящимися к исследуемому лекарственному средству, включая минимальное увеличение экстрамедуллярного гемопоэза (ЕМН) в печени и селезенке, множественные смешанные клеточные инфильтраты от минимальных до умеренных и минимальный единичный гепатоцеллюлярный некроз в печени, минимальный очаговый гепатоцеллюлярный некроз, минимальную очаговую гранулему инородного тела (связанную с бледноокрашенным базофильным инородным материалом) в легком и минимальные смешанные клеточные инфильтраты в легком. Из-за их минимального или легкого проявления, единичной частоты встречаемости, присутствия в контрольной группе, получавшей физиологический раствор, и появления в качестве общих фоновых патологий у этого вида, эти отклонения не считались связанными с лечением.

[00354] Таким образом, как Ls-AKG28, так и Ls-AKG38 (отдельно или в комбинации с BDQ/PMD), вводимые два раза в неделю в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг, соответственно, или в удвоенных дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг один раз в неделю хорошо переносились мышами и не влияли на массу тела, гематологию или гистопатологию обработанных животных.

#### **Пример 44. Переносимость *in vivo* Ls-AKG28 и Ls-AKG38 на крысах**

[00355] Цели данного исследования заключались в определении потенциальной токсичности Ls-AKG28 (серия 275) и Ls-AKG38 (серия 276) на крысах. Ls-AKG28 (серия 275) и Ls-AKG38 (серия 276) получали, как описано в Примерах 22 и 23, соответственно. Самцам крыс линии Sprague-Dawley вводили Ls-AKG28 (10, 20 или 40 мг/кг/доза) или Ls-AKG-38 (20, 40 или 80 мг/кг/доза) путем внутривенной инъекции (в хвостовую вену) один раз в неделю в течение 8 недель. Контрольной группе вводили равный объем забуференного HEPES физиологического раствора (HBS, pH 7) один раз в неделю в течение 8 недель. Перед конечной точкой исследования животных подвергали эвтаназии с соблюдением правил ветеринарной этики путем обескровливания из брюшной аорты после анестезии изофлураном. Образцы крови и тканей собирали для оценки параметров клинической патологии. Репрезентативные образцы тканей собирали и сохраняли в 10% нейтральном буфере, заливали парафином, делали срезы, помещали на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином и оценивали на гистопатологию с помощью сертифицированного ветеринарного врача-

патологоанатома. Гематологический анализ крови выполняли с помощью гематологического анализатора ADVIA 120/2120i, и биохимический анализ крови выполняли с помощью анализатора Cobas 6000.

[00356] Также оценивали следующие параметры и конечные точки: проверка летальности и состояния агонии, клинические наблюдения, масса тела, потребление пищи, скорость нервной проводимости (NCV) и мышечный потенциал действия (MAP), батарея стандартных тестов поведенческого фенотипирования (FOB).

[00357] Скорость нервной проводимости (NCV) и мышечный потенциал действия (MAP) определяли на 8 неделе. Во время регистрации показателей животных анестезировали изофлураном. NCV каудального нерва определяет скорость проводимости в каудальном нерве, который проходит вдоль центральной кости хвоста. Этот нерв приблизительно на 50% длиннее, чем любой другой нерв у крысы и особенно уязвим для зависящей от длины дистальной аксонопатии. NCV измеряли на расстоянии 50 мм, и она зависит от узловых и трансмембранных токов, структуры и среднего поперечного диаметра отвечающих на раздражение аксонов и целостности связанных с ними миелиновых оболочек. Амплитуда вызванного потенциала отражает количество и синхронность активированных волокон. Данные записывали с помощью активного регистрирующего электрода, расположенного приблизительно на 10 мм ниже линии роста волос на хвосте (определяется визуально), и стимулирующий катод располагали на 50 мм дистальнее. Регистрировали амплитуду и латентный период начала сигнала, и скорость рассчитывали путем деления расстояния между стимулирующим катодом и активным электродом на абсолютную латентность начального деполяризирующего тока.

[00358] NCV пальцевого нерва измеряет скорость проводимости сенсорного пальцевого нерва. Пальцевой нерв является дистальным концом седалищного нерва, иннервирующим дорсальную поверхность задней лапы. Скорость нервной проводимости зависит от узловых и трансмембранных токов, структуры и среднего поперечного диаметра отвечающих на раздражение аксонов и целостности связанных с ними миелиновых оболочек. Данные записывали с помощью активного регистрирующего электрода, расположенного на голеностопе за латеральной лодыжкой, и стимулирующего катода у основания второго пальца задней лапы. Регистрировали амплитуду и латентный период начала сигнала, и скорость рассчитывали путем деления расстояния между стимулирующим катодом и активным электродом на абсолютную латентность начального деполяризирующего тока.

[00359] Моторная проводимость тибиального нерва (латентность начала сигнала) определяет свойства отклика внутренних мышц задней лапы крысы после стимуляции двигательных нервных волокон в дистальной части тибиального нерва. Данные регистрировали с помощью активного электрода, расположенного в латеральной дорсальной мышце задней лапы (эквивалентной короткому разгибателю пальцев стопы у человека), и стимулирующий катод располагали проксимальнее по отношению к голеностопу, за латеральной лодыжкой. Скорость нервной проводимости в двигательных аксонах оценивали по латентному периоду начала индуцированного суммарного потенциала действия мышцы (СМАР). Амплитуду СМАР определяли на пике ответа после супрамаксимальной стимуляции ассоциированного нерва.

[00360] Связанных с Ls-AKG28, Ls-AKG38 непредвиденных смертей, клинических наблюдений или влияний на массу тела (**Фиг. 16А** и **Фиг. 16В**), NCV и MAP (Таблица 34), FOB (Таблица 35), потребления пищи, параметров коагуляции, массы органов или макроскопических нарушений (данные не показаны) не обнаружено. Наибольшее снижение скорости нервной проводимости для каудального или левого пальцевого нервов в любой группе лечения липосомами составляло менее 5%, несмотря на 16,5-кратное увеличение содержания действующего вещества в индивидуально подобранной дозе (исходя из активности свободного лекарственного средства против штамма *M. tuberculosis* Erdmann в Примере 2) для Ls-AKG28 или Ls-AKG38 по сравнению с линезолидом.

[00361] Введение Ls-AKG28 и Ls-AKG38 в дозах  $\geq 20$  мг/кг приводило к статистически значимому снижению количества тромбоцитов (разница до 20% по сравнению с контрольной группой). Дополнительных воздействий на другие гематологические и биохимические показатели крови не наблюдалось (Таблица 32, Таблица 33).

[00362] Введение Ls-AKG28 путем внутривенной инъекции самцам крыс Sprague-Dawley один раз в неделю в течение 8 недель в дозах  $\geq 10$  мг/кг/доза приводило к обнаруженным при микроскопическом исследовании изменениям в селезенке, почках и печени (Таблица 36). В селезенке присутствовала от минимальной до умеренной вакуолизация цитоплазмы макрофагов с базофильными гранулами и от минимального до умеренного накопление базофильного материала у крыс, получавших 20 или 40 мг/кг/доза. В почках крыс, получавших 40 мг/кг/доза, наблюдалась минимальная вакуолизация гломерулярных мезангиальных клеток. В печени наблюдался минимальный центрлобулярный некроз

отдельных клеток и от минимальной до легкой центрилобулярная гепатоцеллюлярная дегенерация при всех дозах.

Таблица 32. Влияние липосомальных АКГ-28 и АКГ-38 на уровень ферментов печени в крови после введения восьми еженедельных доз самцам крыс Sprague Dawley

Группа	ALT (ед./л)	AST (ед./л)
Физиологический раствор	105,7 ± 23,0	52,2 ± 9,2
Ls-AKG28 (10 мг/кг)	89,5 ± 16,5	37,7 ± 9,4
Ls-AKG28 (20 мг/кг)	97,5 ± 20,3	38,0 ± 8,1
Ls-AKG28 (40 мг/кг)	98,5 ± 10,5	56,3 ± 16,8
Ls-AKG38 (10 мг/кг)	98,7 ± 14,0	38,8 ± 10,2
Ls-AKG38 (20 мг/кг)	92,0 ± 23,6	38,2 ± 8,1
Ls-AKG38 (40 мг/кг)	93,3 ± 9,4	45,8 ± 10,1

Таблица 33. Влияние липосомальных АКГ-28 и АКГ-38 на общий анализ крови и гематокрит (HCT) после введения восьми еженедельных доз самцам крыс Sprague Dawley

Группа	RBC (10 <sup>6</sup> /мкл)	HCT (%)	WBC (10 <sup>3</sup> /мкл)	PLT (10 <sup>3</sup> /мкл)
Физиологический раствор	52,2 ± 9,2	8,11 ± 0,48	9,92 ± 3,13	1234 ± 113
Ls-AKG28 (10 мг/кг)	37,7 ± 9,4	8,13 ± 0,26	9,26 ± 1,10	1143 ± 88
Ls-AKG28 (20 мг/кг)	38,0 ± 8,1	8,26 ± 0,35	8,83 ± 1,30	1089 ± 118
Ls-AKG28 (40 мг/кг)	56,3 ± 16,8	8,15 ± 0,34	8,79 ± 2,44	973 ± 66
Ls-AKG38 (10 мг/кг)	38,8 ± 10,2	7,74 ± 0,41	10,46 ± 1,62	1090 ± 50
Ls-AKG38 (20 мг/кг)	38,2 ± 8,1	7,90 ± 0,39	7,23 ± 1,18	1039 ± 75
Ls-AKG38 (40 мг/кг)	45,8 ± 10,1	7,65 ± 0,43	9,37 ± 3,56	984 ± 74

Таблица 34. Влияние липосомальных АКГ-28 и АКГ-38 на нервную проводимость после введения восьми еженедельных доз самцам крыс Sprague Dawley

Группа	NCV каудального нерва (м/с)	NCV левого пальцевого нерва (м/с)	MAP левого тиббиального нерва (м/с)
Физиологический раствор	48,7 ± 2,7	31,5 ± 1,8	1,675 ± 0,099

Ls-AKG28 (10 мг/кг)	49,6 ± 1,9	32,6 ± 2,3	1,678 ± 0,092
Ls-AKG28 (20 мг/кг)	49,1 ± 2,3	32,3 ± 4,6	1,707 ± 0,124
Ls-AKG28 (40 мг/кг)	46,8 ± 3,4	33,9 ± 2,2	1,667 ± 0,078
Ls-AKG38 (10 мг/кг)	47,6 ± 1,8	32,7 ± 1,8	1,680 ± 0,055
Ls-AKG38 (20 мг/кг)	45,6 ± 2,6	32,9 ± 3,2	1,752 ± 0,084
Ls-AKG38 (40 мг/кг)	48,6 ± 4,8	31,0 ± 1,7	1,717 ± 0,153

Таблица 35. Влияние липосомальных АКГ-28 и АКГ-38 на батарею стандартных неврологических тестов поведенческого фенотипирования после введения восьми еженедельных доз самцам крыс Sprague Dawley

Группа	Разведение задних конечностей (см)	Среднее значение силы хвата задних конечностей (г)	Среднее значение силы хвата передних конечностей (г)
Физиологический раствор	11,10 ± 1,50	670,2 ± 68,9	1274,8 ± 132,9
Ls-AKG28 (10 мг/кг)	11,20 ± 2,00	715,9 ± 50,9	1335,2 ± 153,0
Ls-AKG28 (20 мг/кг)	12,20 ± 1,50	695,7 ± 125,9	1331,9 ± 117,1
Ls-AKG28 (40 мг/кг)	11,50 ± 1,60	709,9 ± 61,9	1140,2 ± 169,9
Ls-AKG38 (10 мг/кг)	12,10 ± 1,30	741,5 ± 92,9	1373,6 ± 107,2
Ls-AKG38 (20 мг/кг)	11,70 ± 2,70	740,9 ± 74,6	1281,6 ± 114,8
Ls-AKG38 (40 мг/кг)	11,40 ± 2,60	737,6 ± 75,7	1350,1 ± 147,7

Таблица 36. Сводная таблица изменений, обнаруженных при микроскопическом исследовании, в тканях после лечения восемью еженедельными дозами липосомальных АКГ-28 и АКГ-38 у самцов крыс Sprague Dawley

Группа	1	2	3	4	5	6	7	8
	линезолид		Ls-AKG28		Ls-AKG38			
Исследуемое соединение	0	50	10	20	40	20	40	80
Доза (мг/кг/доза)	0	50	10	20	40	20	40	80
Количество животных в группе	6	6	6	6	6	6	6	6
Печень (количество обследованных)	6	6	6	6	6	6	6	6
Дегенерация, гепатоцеллюлярная, центрилобулярная	(0) <sup>a</sup>	(0)	(1)	(3)	(6)	(1)	(4)	(6)
Минимальная	0	0	1	3	2	1	3	1

Легкая	0	0	0	0	4	0	1	5
Некроз единичных клеток, центролобулярный	(0)	(2)	(3)	(4)	(6)	(4)	(5)	(6)
Минимальный	0	2	3	4	6	4	5	6
<b>Селезенка (количество обследованных)</b>	6	6	6	6	6	6	6	6
Вакуолизация, макрофаги	(0)	(0)	(0)	(6)	(6)	(0)	(0)	(0)
Минимальная	0	0	0	1	0	0	0	0
Легкая	0	0	0	2	0	0	0	0
Средняя	0	0	0	3	6	0	0	0
Накопление, базофильный материал	(0)	(0)	(0)	(4)	(6)	(0)	(0)	(0)
Минимальная	0	0	0	1	0	0	0	0
Легкая	0	0	0	3	6	0	0	0
<b>Почка (количество обследованных)</b>	6	6	6	6	6	6	6	6
Вакуолизация, мезангиальная клетка, гломерулярная	(0)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
Минимальная	0	0	0	0	6	0	0	0

<sup>a</sup> Цифры в скобках обозначают количество животных с изменениями

[00363] Введение Ls-AKG38 в дозах  $\geq 20$  мг/кг/доза приводило к изменениям в печени, обнаруженным при микроскопическом исследовании, с минимальным центролобулярным некрозом единичных клеток и центрилобулярной гепатоцеллюлярной дегенерацией от минимальной до легкой при всех дозах.

[00364] Для сравнения, у крыс, получавших дозы Ls-AKG28 и Ls-AKG38, наблюдалась повышенная частота некроза единичных клеток печени при всех дозах по сравнению с крысами, которым вводили линезолид. Печень крыс, получавших дозы Ls-AKG28 и Ls-AKG38, имела одинаковую частоту и тяжесть центрилобулярной гепатоцеллюлярной дегенерации при всех дозах. У крыс, получавших дозы Ls-AKG28, также наблюдались вакуолизованные макрофаги и базофильный материал в селезенке при дозе 20 или 40 мг/кг/доза и вакуолизация гломерулярных мезангиальных клеток в почках при дозе 40 мг/кг/доза.

[00365] В заключение, введение Ls-AKG28 в виде многократных внутривенных инъекций в течение 8 недель хорошо переносилось крысами при уровнях 10, 20 и 40 мг/кг/доза. Введение Ls-AKG38 в виде многократных внутривенных инъекций в течение 8 недель хорошо переносилось крысами в дозах 20, 40 и 80 мг/кг/доза. Пример 2 показал, что АКГ-28 в 33 раза более эффективен, и АКГ-38 в 17 раз более эффективен *in vitro* в уничтожении *M. tuberculosis* (штамм Erdmann), чем линезолид. Таким образом, с поправкой

на эффективность, у крыс не наблюдалось значительной невропатии (изменения скорости нервной проводимости), повышения уровня ферментов печени, снижения количества эритроцитов или гематокрита или снижения массы тела при дозах, эквивалентных линезолиду, 1320-1336 мг/кг, что в 16,5 раз превышает клинически значимую дозу линезолида 80 мг/кг.

**Пример 45. Эффективность липосомальных АКГ-28 и АКГ-38 в комбинации с бедаквилином и претоманидом или с бедаквилином (В), претоманидом (Ра) и моксифлоксацином (М) на Kramnik (легочная инфекция, вызванная *M. tuberculosis*, на мышинной модели С3НеВ/FeJ)**

[00366] Модель инфекции на мышах С3НеВ/FeJ (Kramnik) демонстрирует расширенные, гипоксические, казеозные гранулемы в легких после инфицирования туберкулезом (Driver E., et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, vol. 56, p. 3181-3195). Патология легких, наблюдаемая у мышей С3НеВ/FeJ, больше напоминает гетерогенность патологии поражений и бактериальных популяций, наблюдаемую у больных туберкулезом, и применялась для оценки эффективности липосомальных АКГ-28 и АКГ-38 в средних еженедельных дозах 50 и 90 мг/кг. Ls-AKG28 (серия 275) и Ls-AKG38 (серия 276) получали, как описано в Примерах 22 и 23, соответственно. Патология легких у мышей С3НеВ/FeJ демонстрирует три различных типа поражений, которые были классифицированы как казеозно-некротические поражения, ограниченные концентрически расположенными коллагеновыми волокнами (тип I), фульминантный нейтрофильный альвеолит (тип II) и клеточные поражения (тип III) (см. Irwin et al. (2015) *Dis Model Mech* 8, 591-602). Самок мышей С3НеВ/FeJ в возрасте 8-10 недель заражали путем LDA (инфекция с аэрозольным механизмом передачи в малых дозах). Камеру Glas-Col Inhalation Exposure System применяли для заражения мышей с плановым значением ~50-75 бацилл/мышь (штамм Erdman). На 1-й день после инфицирования пять мышей на каждое действие аэрозоля умерщвляли для определения бактериального поглощения.

[00367] Через 8 недель после инфицирования 8 мышей умерщвляли для определения бактериальной нагрузки в легких и селезенке в начале терапии. Мышей взвешивали перед умерщвлением. Проводили макропатологические исследования легких и селезенки. Целые легкие и селезенки извлекали и замораживали при -80°C. Ранее замороженные ткани извлекали и гомогенизировали в 1 x PBS с применением гомогенизатора Precellys. Гомогенаты легких и селезенки высевали на четырехсекционные чашки с агаром 7H11. Подсчет КОЕ

производили через 3-5 недель инкубации при 37°C в суховоздушном инкубаторе. Лекарственное средство вводили через желудочный зонд или внутривентриально (i.p.), начиная с 8-й недели после заражения и продолжая в течение 4-6 недель подряд (понедельник-пятница для введения через желудочный зонд, один раз в неделю для внутривентриальной инъекции). Бедаквилин (В), претоманид (Ра), моксифлоксацин (М) и линезолид (L) вводили 5 дней в неделю в течение 4 или 6 недель, в общей сложности по 200 мкл/дозу через желудочный зонд. Сначала вводили бедаквилин (25 мг/кг), затем претоманид (100 мг/кг) не менее чем через час. Моксифлоксацин (100 мг/кг) или линезолид (100 мг/кг) вводили на 4 часа позже, чем дозу претоманида. Липосомальные композиции вводили один раз в неделю в течение 4 или 6 недель в общей сложности.

[00368] Ежедневные наблюдения за мышами проводили во время введения доз, и массу измеряли по меньшей мере один раз в неделю. Умерщвление происходило через 2 недели после завершения четырех- или шестинедельного лечения. Перед умерщвлением взвешивали восемь мышей на группу лечения. Целые легкие и селезенки собирали в асептических условиях для всех групп лечения. Данные макропатологических исследований легких и селезенки были представлены в виде диаграммы. Легкие фотографировали для анализа макроскопических поражений. Целые легкие и селезенки замораживали при -80°C. Ранее замороженные ткани извлекали и гомогенизировали либо в 1 x PBS, либо в 10% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 1 x PBS (во избежание переноса лекарственного средства, \*см. объяснение ниже) с применением гомогенизатора Precellys. Гомогенаты легких и селезенки высевали на четырехсекционные чашки, содержащие агар 7H11 или уголь, после гомогенизации и последовательно разбавляли в 1 x PBS или 10% BSA. Подсчет КОЕ производили через 5 недель инкубации при 37°C в суховоздушном инкубаторе.

[00369] Добавление Ls-AKG28 к лечению ВРаМ приводило к дальнейшему снижению на 0,64 log<sub>10</sub> КОЕ по сравнению с ВРаМ в легких, в то время как лечение ВРаМ + Ls-AKG38 давало дополнительное снижение log<sub>10</sub> КОЕ на 0,25 по сравнению с ВРаМ после 4 недель лечения. Замена линезолида (L) на Ls-AKG28 или Ls-AKG38 в схеме приема NIX (ВРаL) привела к повышению эффективности по сравнению с ВРаL через шесть недель лечения. Через 6 недель лечения замена Ls-AKG38 на линезолид в схеме приема ВРаL значительно улучшила эффективность по сравнению с группой, получавшей ВРаL. В частности, лечение ВРаL в течение 6 недель привело к снижению на 4,18 log<sub>10</sub> КОЕ, при этом на чашках у одного из 8 животных не было КОЕ. Лечение ВРа + Ls-AKG28 в течение 6 недель привело к снижению

на 4,68 log<sub>10</sub> КОЕ, что не было статистически значимым отличием от ВРaL. Лечение ВРa + Ls-АКG38 в течение 6 недель привело к снижению на 5,26 log<sub>10</sub> КОЕ, при этом на чашках у 2 из 8 животных не было КОЕ. Это было статистически значимое снижение по сравнению с ВРaL (p = 0,04, критерий Даннета).

[00370] В селезенке через 6 недель лечения замена липосомального состава на линезолид в схеме NIX приводила к небольшому улучшению эффективности легких по сравнению с группой, получавшей ВРaL. Лечение в течение 6 недель по схеме NIX привело к снижению на 3,56 log<sub>10</sub> КОЕ, при этом на чашках для 3 из 8 животных не было обнаружено КОЕ. Лечение в течение 6 недель ВРa + Ls-АКG28 привело к снижению на 4,18 log<sub>10</sub> КОЕ, при этом на чашках для 5 из 8 мышей не было обнаружено КОЕ. Лечение в течение 6 недель ВРa + Ls-АКG38 привело к снижению на 4,38 log<sub>10</sub> КОЕ, при этом на чашках для 6 из 8 мышей не было обнаружено КОЕ. Нагрузки КОЕ в селезенках мышей через 6 недель лечения лекарственным средством были низкими и приближались к нижнему пределу обнаружения 0,66 log<sub>10</sub> КОЕ.

Таблица 37. Значение Log CFU в легких

Терапия	Дозы	4 недели (Log CFU)	6 недель (Log CFU)
Без лечения		7,71 ± 0,65	
ВРaM	25/100/100 мг/кг	3,05 ± 0,31	
ВРaM+Ls-АКG28	25/100/100/50 мг/кг	2,41 ± 0,37	
ВРaM+Ls-АКG38	25/100/100/90 мг/кг	2,80 ± 0,57	
ВРaL	25/100/100 мг/кг		2,83 ± 1,28
ВРa + Ls-АКG28	25/100/100/50 мг/кг		2,33 ± 0,95
ВРa + Ls-АКG38	25/100/100/90 мг/кг		1,75 ± 0,59*

\*2/8 мышей не имели поддающихся измерению КОЕ; все мыши указаны с пределом обнаружения 0,96 log КОЕ.

Таблица 38. Значение Log CFU в селезенке

Терапия	Дозы	4 недели (Log CFU)	6 недель (Log CFU)
Без лечения		5,36 ± 0,48	
ВРaM	25/100/100 мг/кг	2,07 ± 0,65	
ВРaM+Ls-АКG28	25/100/100/50 мг/кг	1,15 ± 0,45	

ВРaМ+Ls-АКG38	25/100/100/90 мг/кг	1,85 ± 0,96	
ВРaL	25/100/100 мг/кг		1,56 ± 0,82*
ВРa + Ls-АКG28	25/100/100/50 мг/кг		0,94 ± 0,45**
ВРa + Ls-АКG38	25/100/100/90 мг/кг		0,74 ± 0,23***

\*3/8 мышей не имели поддающихся измерению КОЕ;

\*\*5/8 мышей не имели поддающихся измерению КОЕ;

\*\*\*6/8 мышей не имели поддающихся измерению КОЕ; все мыши указаны с пределом обнаружения 0,66 log КОЕ.

Все мыши, у которых не было поддающихся измерению КОЕ, были указаны с пределом обнаружения 0,66 log КОЕ. Это показывает, что Ls-АКG38 и Ls-АКG28 являются более активными, чем линезолид, в комбинации с бедаквилином и претоманидом в умеренной и хорошо переносимой дозе обоих лекарственных средств уже после шести недель лечения. Как показывают Примеры 42 и 43, как Ls-АКG28, так и Ls-АКG38 могут быть безопасно введены в эту комбинацию в дозах по меньшей мере вдвое превышающих дозы, применяемые в этом исследовании. Это также показывает, что при добавлении Ls-АКG28 к схеме лечения ВРaМ происходит дальнейшее снижение КОЕ в обоих легких и селезенке при той же самой хорошо переносимой дозе.

#### **Пример 46. Эффективность монотерапии липосомальным АКG-28 на модели Balb/c с легочной инфекцией, вызванной *Mycobacterium tuberculosis***

[00371] Схему и дозозависимую эффективность Ls-АКG28 определяли по сравнению со свободным линезолидом в клинически значимых дозах 50 и 100 мг/кг на модели хронического туберкулеза на мышах линии Balb/c. В хронической модели на мышах Balb/c бактериальная нагрузка в легких достигает устойчивого состояния через 4-5 недель после инфицирования *M. tuberculosis* (Lenaerts et al. (2005) AAC 49(6) 2294-2301). Ls-АКG28 (серия 286) получали, как описано в Примере 28. Самок мышей линии Balb/c в возрасте 6-8 недель получали от Jackson Laboratories, и мышей инфицировали LDA (заражение малыми дозами аэрозоля), применяя камеру Glas-Col Inhalation Exposure System, для заражения мышей ~50-100 бацилл/мышь *M. tuberculosis* Erdman.

[00372] Мышей (n=3) умерщвляли на 1-й день после инфицирования для определения бактериального накопления. Целые легкие в асептических условиях собирали в пробирки Precellys (Bertin, номер по каталогу KT03961-1-396.7) и гомогенизировали в 4 мл 1 x PBS с

применением гомогенизатора тканей Precellys. Неразбавленный гомогенат переносили на две большие чашки с агаром 7Н11 (150 x 15 мм), и чашки инкубировали в закрытых пакетах с замком zip при 37°C в суховоздушном инкубаторе в течение по меньшей мере 21 дня до того, пока колонии не могли быть подсчитаны. На 28-й день после аэрозольного инфицирования мышей (n=5) умерщвляли для определения бактериальной нагрузки в легких и селезенках в начале терапии. Мышей взвешивали перед умерщвлением. Проводили макропатологические исследования легких и селезенки. Легкие (разделенные на левую долю и верхнюю правую [краниальную] долю) + добавочная доля) и селезенки собирали в асептических условиях и замораживали при -80°C. Нижние доли правого легкого [каудальные] собирали в 4% параформальдегиде (PFA) для гистологии. Ранее замороженные ткани извлекали и гомогенизировали в 1 x PBS с применением гомогенизатора Precellys. Гомогенаты легких и селезенки высевали на четырехсекционные чашки с агаром 7Н11. Подсчет КОЕ проводили через 3-5 недель инкубации при 37°C в суховоздушном инкубаторе.

[00373] Линезолид в 5% PEG-200 (Sigma P3015, серия MKBW3119V)/95% (0,5%) метилцеллюлозы (Sigma M0430, серия 031M0051) вводили через желудочный зонд (200 мкл на мышшь), начиная на 28 день после инфицирования аэрозольным способом (понедельник), и продолжали в течение 2 - 8 недель 5-7 дней в неделю. Ls-АКГ28 вводили путем внутрибрюшинной инъекции один или два раза в неделю в дозах 50 или 100 мг/кг. Заключительное умерщвление происходило через 3 дня после последнего дня введения дозы для мышшей, получавших лекарственное средство в течение 2, 4 или 8 недель. Мышей взвешивали перед умерщвлением. Проводили макропатологические исследования легких и селезенки. Легкие (разделенные на левую долю, верхнюю правую долю + добавочную долю) и селезенки собирали в асептических условиях и замораживали при -80°C. Нижние доли правого легкого собирали в 4% PFA для гистологии. Предварительно замороженные ткани извлекали и гомогенизировали в 10% бычьим сывороточном альбумине (BSA) в 1 x PBS, чтобы избежать переноса лекарственного средства. После гомогенизации гомогенаты легких и селезенки серийно разбавляли в 1 x PBS и 10% BSA и затем высевали на четырехсекционные чашки, содержащие агар 7Н11 или уголь. Подсчет КОЕ производили через 3-5 недель инкубации при 37°C в суховоздушном инкубаторе.

[00374] Снижение количества КОЕ в легких показано в Таблице 39, и количества КОЕ в селезенке - в Таблице 40. Лечение с Ls-АКГ28 в дозе 50 мг/кг два раза в неделю или один раз в неделю в дозе 100 мг/кг приводило к снижению на 1,5 Log<sub>10</sub> КОЕ в легких всего через две

недели, по сравнению со снижением менее чем на 0,15 Log<sub>10</sub> КОЕ для линезолида в дозе 100 мг/кг (q1x5). Это снижение составило почти 3 Log<sub>10</sub> КОЕ в селезенке через две недели для Ls-AKG28. Через восемь недель все мыши, получавшие лечение с Ls-AKG28, были полностью стерильны (или ниже предела обнаружения 1,13 в легких и 0,66 в селезенке) по сравнению с 2,45 log<sub>10</sub> КОЕ в легких и 3,15 log<sub>10</sub> КОЕ в селезенке для линезолида при более высокой дозе линезолида 100 мг/кг. Эта монотерапевтическая активность явилась неожиданной в отношении оксазолидинона в отсутствие активного партнера для комбинирования, такого как бедаквилин, и относительно короткого периода времени, всего восемь недель. Например, через восемь недель лечения монотерапия линезолидом показала количество log<sub>10</sub> КОЕ в диапазоне 4-6 для мышей Balb/c и C3HeB/FeJ (Lanoix et al. (2015) Dis Models Mech. 8, 603-610), и активность оставалась умеренной даже при дозах до 1000 мг/кг/неделю при режиме приема в диапазоне от 3 до 14 доз/неделю (Bigelow et al (2021) J Infec. Dis. 223(11) 1855-1864).

Таблица 39. Значение Log CFU в легких

Терапия	Доза, режим	2 недели (Log CFU)	4 недели (Log CFU)	8 недель (Log CFU)
Без лечения		5,71 ± 0,15	5,47 ± 0,19	
Линезолид	50 мг/кг, q1x5		4,61 ± 0,31	
	100 мг/кг, q1x5	5,58 ± 0,10	4,17 ± 0,21	2,45 ± 0,37
Ls-AKG28	50 мг/кг		3,81 ± 0,33	
Ls-AKG28	50 мг/кг	4,01 ± 0,20	2,30 ± 0,57	
Ls-AKG28	100 мг/кг	4,09 ± 0,34	2,65 ± 0,70	1,13 ± 0,00*

\*6/6 мышей не имели поддающихся измерению КОЕ; все мыши указаны с пределом обнаружения 1,13 log КОЕ.

Таблица 40. Значение Log CFU в селезенке

Терапия	Доза, режим	2 недели (Log CFU)	4 недели (Log CFU)	8 недель (Log CFU)
Без лечения		5,08 ± 0,31	4,77 ± 0,21	
Линезолид	50 мг/кг, q1x5		4,32 ± 0,28	
	100 мг/кг, q1x5	4,53 ± 0,25	3,90 ± 0,28	3,15 ± 0,27
Ls-AKG28	50 мг/кг		1,74 ± 0,65	
Ls-AKG28	50 мг/кг	1,71 ± 0,59	0,67 ± 0,02*	

Ls-AKG28	100 мг/кг	2,25 ± 0,82	1,07 ± 0,93**	0,66 ± 0,00***
----------	-----------	-------------	---------------	----------------

\*4/5 мышей не имели поддающихся измерению КОЕ;

\*\*1/6 мышей не имели поддающихся измерению КОЕ;

\*\*\*6/6 мышей не имели поддающихся измерению КОЕ; все мыши указаны с пределом обнаружения 0,66 log КОЕ.

Все мыши, которые не имели поддающихся измерению КОЕ, указаны с пределом обнаружения 0,66 log КОЕ.

**Пример 47. Эффективность липосомального АКГ-38 в модели эндокардита у кроликов, вызванного метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

[00375] Инфекции *Staphylococcus aureus*, особенно поражающие эндоваскулярную систему (например, инфекционный эндокардит (IE); инфекции сердца и устройств для гемодиализа и т. д.), являются широко распространенными и связаны с неприемлемо высокой заболеваемостью, смертностью и частотой рецидивов после терапии. Это особенно актуально, когда такие инфекции вызываются штаммами MRSA с множественной лекарственной устойчивостью. Более того, даже когда штаммы MRSA имеют минимальные ингибирующие концентрации (MIC) для ванкомицина (агент «workhouse» против MRSA) в пределах принятого Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) диапазона «чувствительности» (т. е.,  $\leq 2$  мкг/мл), клинические результаты остаются субоптимальными.

[00376] Прототипическую модель эндоваскулярной биопленочной инфекции MRSA с высоким содержанием инокулята, IE левостороннего аортального клапана кролика, применяли у самок новозеландских белых кроликов в возрасте шести месяцев и весом 2,2-2,5 кг. Кроликов подвергали общей анестезии путем внутримышечной инъекции ксилазина и кетамина. Затем им выстригали мех над правой сонной артерией, чтобы обнажить кожу. Место разреза над правой сонной артерией местно анестезировали 1% раствором лидокаина. Затем выполняли разрез, чтобы обнажить правую сонную артерию. Артерию изолировали, проксимально лигировали, затем канюлировали ретроградно с помощью полиэтиленового катетера через аортальный клапан в левый желудочек, где его затем фиксировали на месте и оставляли живым на время исследования. Для левостороннего IE через 48 часов после установки катетера (для индуцирования стерильных аортальных клапанов и желудочковых вегетаций) у животных был IE, индуцированный внутривенным введением  $\sim 2 \times 10^5$  КОЕ штамма MW2. Применяемый штамм MRSA MW-2 (USA 400 - клональный комплекс [CC] 1):

i) получен клинически; ii) геном секвенирован; iii) представляет собой распространенные внутрибольничные клонотипы MRSA; iv) является вирулентным в экспериментальной модели IE; и v) является чувствительным *in vitro* к даптомицину (DAP). Инфекция распространялась от инфицированного вегетациями клапана сердца к почкам и селезенке.

[00377] Липосомальный АКГ-38 (Ls-AKG38) вводили отдельным группам животных либо один раз (в комбинированной терапии с DAP), либо дважды (один раз в комбинированной терапии с DAP; затем вторую инфузию во время умерщвления после лечения DAP в «группе животных с рецидивирующим течением», не получающих дальнейшей терапии DAP) в дозе 40 мг/кг/доза. Ls-AKG38 (серия 292) получали, как описано в Примере 29. Первые инфузии Ls-AKG38 будут следовать за первой внутривенной дозой DAP через ~1 час. DAP вводили в сублетальной дозе 2 мг/кг ежедневно в течение четырех дней либо отдельно, либо в комбинации с Ls-AKG38.

[00378] Животных подвергали эвтаназии с соблюдением правил ветеринарной этики, ключевые органы-мишени удаляли в стерильных условиях и количественно культивировали (кровь, сердечные вегетации; почки и селезенку при левостороннем IE) либо на 6-й день (только DAP, либо DAP + однократная доза Ls-AKG38), либо на 12-й день (DAP + две дозы Ls-AKG38 в 1-й и 6-й дни). Количественные культуры тканей-мишеней готовили путем стандартной подготовки стерильно удаленных органов путем взвешивания, гомогенизации, серийных разведений и культивирования на чашках. Аналогично проводили серийные разведения крови и количественных культур. Данные для культур крови и каждого органа-мишени для различных групп лечения рассчитывали как среднее значение и медиану  $\log_{10}$  КОЕ/мл или  $\log_{10}$  КОЕ/г ткани ( $\pm$  стандартное отклонение), соответственно.

[00379] Предварительные данные для модели эндокардита левого желудочка, вызванного MRSA, у кроликов показаны ниже в Таблице 41. Даптомицин отдельно или даптомицин с однократной дозой Ls-AKG38 не показали значительной эффективности на 6 день после инокуляции. Неожиданно вторая инъекция Ls-AKG38 привела к заметной эффективности на 12-й день, включая стерилизацию у 4/5 кроликов во всех пяти тканях, и снижение более чем на 6 Log КОЕ во многих органах. Эти данные свидетельствуют о том, что эндокардит можно эффективно лечить с помощью Ls-AKG38 после прекращения ежедневного приема даптомицина.

Таблица 41.

	Вегетации	Почки	Селезенка	Печень	Легкие
--	-----------	-------	-----------	--------	--------

Контроль (4)	7,45 ± 0,60	5,93 ± 0,54	5,71 ± 0,85	5,03 ± 0,51	4,73 ± 0,46
Даптомицин	8,13 ± 0,17	6,90 ± 0,61	7,43 ± 0,38	6,77 ± 0,90	6,37 ± 0,64
Даптомицин (рецидив)	9,18 ± 0,22	8,11 ± 0,49	7,91 ± 0,54	7,65 ± 0,26	8,00 ± 0,66
Даптомицин +Ls-AKG38 (1 доза)	8,26 ± 0,66	6,70 ± 0,83	5,65 ± 0,61	5,75 ± 0,83	5,97 ± 0,77
Даптомицин +Ls-AKG38 (2 дозы)	1,14 ± 0,97 (4/5 стерильные)	1,05 ± 0,69 (4/5 стерильные)	0,89 ± 0,08 (5/5 стерильные)	0,93 ± 0,46 (4/5 стерильные)	1,18 ± 0,61 (4/5 стерильные)

**Пример 48. Активность *in vitro* АКГ-28 и АКГ-38 в отношении различных видов негуберкулезных микобактерий**

[00380] Определение МИС проводили способом микроразведений в бульоне (Obregón-Henaо et al. (2015) Antimicrobial Agents Chemother 59, 6904-6912), применяя бульон Мюллера-Хинтона (МН) со стандартизированным содержанием катионов (Cation Adjusted) до концентрации ионов кальция и магния, рекомендованной в стандарте CLSI M7-A7 (Becton Dickinson). Определение МИС также проводили способом микроразведений в бульоне с применением бульона 7Н9 (Sigma-Aldrich) (Shang et al. (2011) PLoS One 6, e24726; Chan et al. (2010) Am J Respir Cell Mol Biol 43, 287-393). Цель состояла в оптимизации возможности обнаруживать больше соединений с активностью против НТМ, применяя различные бульоны в нашем способе микроразведений в бульоне. НТМ выращивали на чашках с агаром 7Н11 (Sigma-Aldrich) в течение 3-25 дней при температуре 35-37°C в воздушной окружающей среде (в зависимости от штамма бактерий). КОЕ брали с чашек с агаром и помещали в любой бульон МН с 0,05% Tween-80 и выращивали при 35-37°C в воздушной окружающей среде до тех пор, пока оптическая плотность (OD), измеренная через 7 дней роста, не станет равна (OD) 0,08–0,1 (0,5 по стандарту мутности МакФарланда). Суспензии бактериальных клеток затем подтверждали путем приготовления их в физиологическом растворе, сравнивая с (OD) 0,08–0,1 (0,5 по стандарту мутности МакФарланда).

[00381] 180 мкл бульона (МН) добавляли в первую колонку в 96-луночных планшетах. Затем 100 мкл бульона (МН) добавляли в другие колонки в 96-луночном планшете. Соединения готовили с применением 1,28 мг/мл в DMSO и сразу же применяли для тестирования в диапазоне 64-0,062 мкг/мл, 20 мкл соединения добавляли в первую колонку

лунок и 100 мкл серийно разбавляли. Наконец, 100 мкл клеточной суспензии NTM добавляли во все лунки, кроме контрольных лунок только со средой. Агенты для контроля качества, специфичные для каждого микроорганизма: 1) только бактерии, отрицательный контроль; 2) только среда, отрицательный контроль; 3) или тедизолид, положительный контроль лекарственного средства; 4) необязательный контроль *E. coli*.

[00382] RGM анализировали на OD на 3-й день. После этого планшет анализировали, применяя способ резазуринового микроанализа (Resazurin Microtiter Assay Plate) в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (Brown-Elliott et al. (2012) Clin Microbiol Rev vol. 25(3), p.545-582). Вкратце, в способе применяли добавление резазурина (7-гидрокси-3H-феноксазин-3-он 10-оксид) в 96-луночный планшет для анализа МИС. Резазурин представляет собой синий краситель, который сам по себе слабо флуоресцирует до тех пор, пока он необратимо не восстанавливается до розового и ярко-красного флуоресцентного резорурфина. Его применяют в качестве окислительно-восстановительного индикатора в анализах МИС жизнеспособности бактериальной клетки.

[00383] Результаты показывают, что как АКГ-28, так и АКГ-38 в целом были более эффективными, чем тедизолид, в отношении ряда различных видов и штаммов NTM. Они включают *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus* и *M. kansasii*. Только у *M. massiliense* тедизолид оказался более активным во всех трех оцениваемых штаммах.

Таблица 42.

Виды NTM	Штамм	АКГ-28 МИС (мкг/мл)	АКГ-38 МИС (мкг/мл)	Тедизолид МИС (мкг/мл)
<i>M. avium</i> sbsp. <i>avium</i>	2285 S	0,125	0,125	0,25
<i>M. avium</i> sbsp. <i>avium</i>	3993	0,125	0,125	0,25
<i>M. avium</i> sbsp. <i>avium</i>	2285 R	0,06	0,06	0,25
<i>M. chelonae</i>	49	0,06	0,06	0,25
<i>M. chelonae</i>	69	0,5	0,5	2
<i>M. chelonae</i>	35752	0,125	0,06	0,125
<i>M. abscessus</i> sbsp. <i>abscessus</i>	21	0,25	0,06	0,5
<i>M. abscessus</i> sbsp. <i>abscessus</i>	1948	0,125	0,06	0,5
<i>M. abscessus</i> sbsp. <i>abscessus</i>	1513	32	32	4

<i>M. massiliense</i>	CIP 108297	1	0,5	0,25
<i>M. massiliense</i>	CRM0019	0,25	0,25	0,06
<i>M. massiliense</i>	M154	0,25	0,25	0,06
<i>M. kansasii</i>	662	>32	>32	>32
<i>M. kansasii</i>	824	0,125	0,06	0,25
<i>M. kansasii</i>	732	0,125	0,03	0,25
<i>M. kansasii</i>	MK13D6	0,125	0,03	0,25
<i>M. kansasii</i>	WT171017	0,125	0,03	0,125

**Пример 49. Активность *in vitro* выбранных соединений против штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, резистентных к лекарственным средствам**

[00384] Соединения согласно настоящему изобретению, проявляющие активность против чувствительных к лекарственным средствам штаммов *M. tuberculosis*, дополнительно оценивали на активность против нескольких штаммов клинических изолятов, резистентных ко многим лекарственным средствам (MDR) M70, M28, M94, M14 (Cheng A.F., et al., 2004, Antimicrob. Agents Chemother. v. 48, p. 596-601) и TN5904 (Palanisamay G.S., et al., 2008, Tuberculosis (Edinb.) vol. 88 p. 295-306). Эти штаммы характеризуются следующими особенностями резистентности:

Таблица 43. Особенности резистентности к лекарственным средствам штаммов MDR *M. tuberculosis*, применяемых в исследовании. (Сокращения: R-резистентный; S-чувствительный; STR – стрептомицин, INH – изониазид; RIF – рифампин, EMB – этамбутол, PZA – пипразинамид)

Штамм\Лекарственное средство	STR	INH	RIF	EMB	PZA
M70	R	R	R	S	R
M28	S	R	R	R	R
M14	R	R	S	S	R
M94	R	R	S	S	S
TN5904	R	R	R	S	R

[00385] MIC тестируемых соединений, включая лекарственные средства сравнения/контроли устойчивости (RIF, INH, STR, моксифлоксацин (MOX) и линезолид

(LNZ)) определяли, применяя способ микроразведений в бульоне с конечной точкой аламарового синего (Alamar Blue (MABA)), по существу в соответствии с Примером 2, со следующими изменениями. Исследуемые соединения и препараты сравнения, серийно разбавленные DMSO в два раза, добавляли в лунки 96-луночного планшета для анализа, содержащего 100 мкл среды 7H9-глицерин с добавлением ADC. Соединения разводили в DMSO так, чтобы поддерживать концентрацию соединения в целевом диапазоне и конечную концентрацию DMSO в лунке на уровне 2% (M70, M28, M94) или 2,5% (M14, TN5904), за исключением того, что из-за низкой растворимости в DMSO, STR серийно разбавляли и добавляли в виде водного раствора. Исходные бактериальные штаммы MDR и чувствительный штамм H37Rv (положительный контроль) брали из холодильника, размораживали и разбавляли средой 7H9-ADC-глицерин с получением бактериальной плотности  $10^6$  КОЕ/мл (H37Rv, TN5904),  $2 \times 10^6$  КОЕ/мл (M70, M14) или  $3 \times 10^6$  КОЕ/мл (M28, M94), и 50 мкл разбавленных бактериальных растворов добавляли в среду, содержащую соединение, в лунках. Диапазоны конечных концентраций лекарственного средства в лунках показаны в Таблице ниже. Планшеты запечатывали в пакеты с замком Ziplock, инкубировали при 37°C и контролировали рост бактерий путем периодического измерения оптической плотности при 600 нм (OD600). На 14-й день (если OD600 достигала или превышала 0,40) или на 17-й день в лунки добавляли 15 мкл раствора Alamar Blue, инкубацию продолжали, и через три дня (семь дней в случае медленно растущего штамма M28) регистрировали окраску инкубационных смесей. Самая низкая противомикробная концентрация последовательных двукратных серийных разведений, которая не вызвала видимого изменения цвета с Alamar Blue по сравнению с контрольными лунками без лекарственного средства, рассматривалась как MIC для этих соединений. Определение MIC на основе OD600 (снижение OD600 на  $\geq 80\%$  по сравнению с контрольными лунками без лекарственного средства) согласовывалось с результатами MABA. Значимым считали сдвиг MIC двух лунок (в 4 раза). Результаты обобщены в Таблице 44 ниже.

Таблица 44. Минимальные ингибирующие концентрации (MIC) различных соединений *in vitro* у лекарственно-чувствительных и резистентных к лекарственным средствам штаммов *M. tuberculosis* (анализ MABA)

Соединение	Диапазон концентраций, мкг/мл	MIC, мкг/мл для штамма <i>M. tuberculosis</i>
------------	-------------------------------	--

		H37Rv	M70	M28	M94	M14	TN5904
RIF	8 - 0,03	0,06	>8	>8	0,125	0,06	>8
INH	2 - 0,008	0,06	>2	>2	>2	>2	2
MOX	8 - 0,03	0,125	1	2	0,125	0,125	0,125
STR	8 - 0,03	0,5	2	0,125	>8	>8	1
LNZ	8 - 0,03	2	0,5	0,5	0,5	0,5	1
AKG-3	4 - 0,015	0,125	≤0,015	0,06	0,06	0,03	0,06
AKG-16	8 - 0,03	0,25	0,125	0,25	0,06	0,06	0,06
AKG-28	1 - 0,004	0,03	≤0,004	0,015	0,015	0,015	0,015
AKG-29	8 - 0,03	0,25	≤0,03	0,125	0,125	0,06	0,06
AKG-38	4 - 0,015	0,03	≤≤0,015	0,03	0,03	0,03	0,03
AKG-39	8 - 0,03	0,5	0,125	0,5	1	0,5	0,25

[00386] Соединения сравнения/контроля RIF, INH, MOX и STR показали ожидаемую активность *in vitro* в отношении штаммов DR-TB/MDR-TB, а также H37Rv. В пределах допустимой дисперсии типичных анализов MIC все протестированные соединения согласно настоящему изобретению были по меньшей мере столь же активны в отношении штаммов MDR-TB, как и в отношении штамма H37Rv, чувствительного к лекарственным средствам. Наибольшую активность показал АКГ-28, за ним следуют АКГ-38 и АКГ-3. Соединения АКГ-28 и АКГ-38 выделялись как наиболее активные даже по сравнению со своими близкими по структуре аналогами.

[00387] Различные аспекты настоящего изобретения могут применяться по отдельности, в комбинации или в различных схемах, которые специально не обсуждались в вариантах реализации, описанных выше, и, следовательно, не ограничены в своем применении по отношению к деталям и вариантам компонентов, изложенным в вышеизложенном описании или проиллюстрированным на чертежах. Например, аспекты, описанные в одном варианте реализации, могут быть любым образом объединены с аспектами, описанными в других вариантах реализации.

[00388] Несмотря на то, что обсуждались конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным и не ограничительным. Многие варианты изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники после ознакомления с этим описанием. Полный объем изобретения должен

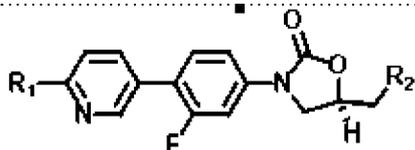
быть определен посредством ссылки на пункты формулы изобретения вместе с их полным объемом эквивалентов и описанием вместе с такими вариантами.

### **ВКЛЮЧЕНИЕ СВЕДЕНИЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

[00389] Все публикации, патенты и патентные заявки, на которые приводятся ссылки в настоящем описании, полностью включены в него посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно указаны как включенные таким образом посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль:



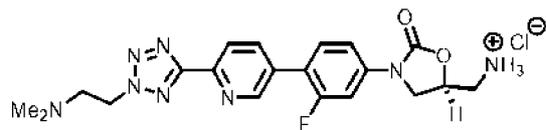
Формула I

где R<sub>2</sub> представляет собой амин (NH<sub>2</sub>) или ацетамид (NHCOCH<sub>3</sub>), и

где R<sub>1</sub> представляет собой тетразольное кольцо, замещенное аминоалкилом в положении 2'.

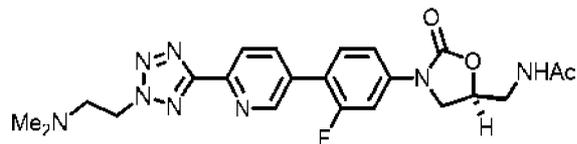
2. Соединение по п. 1, где аминоалкил представляет собой диметиламиноэтил.

3. Соединение по п. 1, имеющее Формулу 1b:



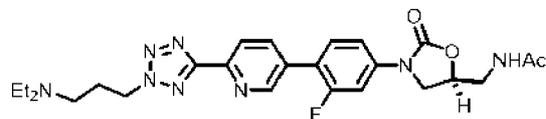
Формула 1b.

4. Соединение по п. 1, имеющее Формулу 1c, или его фармацевтически приемлемая соль:

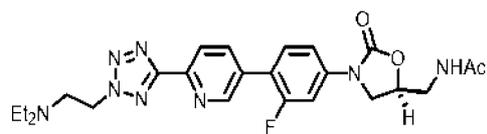


Формула 1c.

5. Соединение по п. 1, имеющее Формулу 1d или Формулу 1e:



Формула 1d,



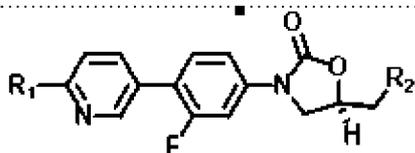
Формула 1e.

6. Соединение по любому из п.п. 1 - 5, где указанное соединение имеет индекс селективности (SI) для Erd/HerG2 и H37Rv/HerG2 в диапазоне от 100 до 1700.

7. Соединение по любому из п.п. 1 - 5, где указанное соединение имеет индекс SI для Erd/HepG2 и H37Rv/HepG2 в диапазоне от 200 до 1700.

8. Соединение по любому из п.п. 1 - 5, где указанное соединение имеет индекс SI для Erd/HepG2 и H37Rv/HepG2 в диапазоне от 300 до 1700.

9. Липосомальная композиция, содержащая липосомальные везикулы, при этом указанные липосомальные везикулы содержат соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль



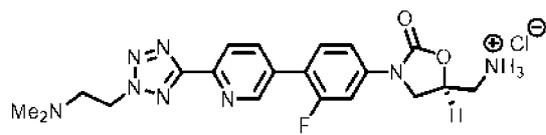
Формула I,

где R<sub>2</sub> представляет собой амин (NH<sub>2</sub>) или ацетамид (NHCOCH<sub>3</sub>), и

где R<sub>1</sub> представляет собой тетразольное кольцо, замещенное аминоалкилом в положении 2'.

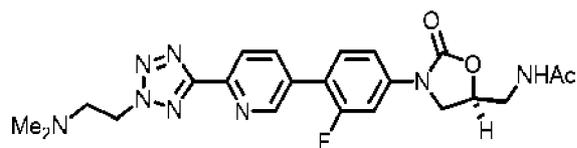
10. Липосомальная композиция по п. 9, где аминоалкил представляет собой диметиламиноэтил.

11. Липосомальная композиция по п. 9, где указанные липосомальные везикулы содержат соединение Формулы 1b



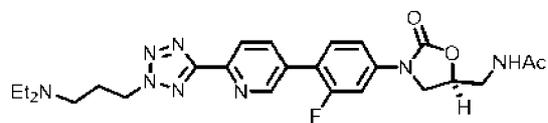
Формула 1b.

12. Липосомальная композиция по п. 9, где указанные липосомальные везикулы содержат соединение Формулы 1c

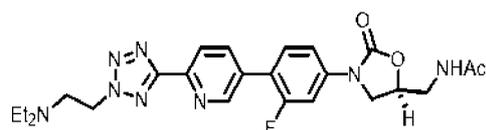


Формула 1c.

13. Липосомальная композиция по п. 9, где указанные липосомальные везикулы содержат соединение Формулы 1d или Формула 1e



Формула 1d,



Формула 1e.

14. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 - 13, где указанные липосомальные везикулы находятся в водной среде.

15. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 - 13, где указанное соединение захвачено в липосомальные везикулы с помощью захватывающего агента, и где указанный захватывающий агент включает полианион.

16. Липосомальная композиция по п. 15, где указанный захватывающий агент представляет собой триэтиламмония сахарозы октасульфат или сульфат аммония.

17. Липосомальная композиция по п. 15, где указанный захватывающий агент представляет собой триэтиламмония сахарозы октасульфат.

18. Липосомальная композиция по п. 15, где указанный захватывающий агент представляет собой сульфат аммония.

19. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 - 13, содержащая соль указанного соединения, где соль представляет собой сульфат, цитрат, сукрозофат, соль с фосфорилированным или сульфатированным полиолом или соль с фосфорилированным или сульфатированным полианионным полимером.

20. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 - 13, содержащая соль указанного соединения, где соль представляет собой сульфат.

21. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 - 13, где указанное соединение в липосомальных везикулах имеет растворимость в воде менее 1 мг/мл.
22. Композиция по любому из п.п. 9 - 13, где указанное соединение в липосомальных везикулах имеет растворимость в воде менее 0,1 мг/мл.
23. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 - 13, где указанные липосомальные везикулы включают мембрану, содержащую фосфатидилхолин и холестерин.
24. Липосомальная композиция по п. 23, где указанная мембрана отделяет внутреннюю часть липосомальных везикул от водной среды.
25. Липосомальная композиция по п. 23, где фосфатидилхолин представляет собой дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) или гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (HSPC).
26. Липосомальная композиция по п. 23, где молярное отношение фосфатидилхолина к холестерину составляет от примерно 60:40 до примерно 35:65.
27. Липосомальная композиция по п. 23, где молярное отношение фосфатидилхолина к холестерину составляет от примерно 55:45 до примерно 35:65.
28. Липосомальная композиция по п. 23, где молярное отношение фосфатидилхолина к холестерину составляет от примерно 50:50 до примерно 45:55.
29. Липосомальная композиция по п. 23, где молярное отношение фосфатидилхолина к холестерину составляет от примерно 50:50 до примерно 40:60.
30. Липосомальная композиция по любому из п.п. 23 - 29, где мембрана дополнительно содержит липид, конъюгированный с полимером.
31. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 - 13, где липосомальные везикулы

содержат HSPC, холестерин и липид, конъюгированный с полимером, в молярном соотношении примерно 55:45:2,75.

32. Липосомальная композиция по п. 30 или п. 31, где липид, конъюгированный с полимером, представляет собой PEG(мол. масса 2000)-дистеароилглицерин (PEG-DSG) или PEG(мол. масса 2000)-дистеароилфосфатидилэтаноламин (PEG-DSPE).

33. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 - 13, представляющая собой жидкий фармацевтический состав для парентерального введения.

34. Липосомальная композиция по любому из п.п. 9 – 13, где липосомы имеют Z-средний размер частиц в диапазоне от примерно 80 до примерно 130 нм.

35. Способ лечения бактериальной инфекции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества липосомальной композиции по любому из п.п. 9 - 13.

36. Способ по п. 35, где указанная бактериальная инфекция представляет собой инфекцию *Mycobacterium tuberculosis*.

37. Способ по п. 35 или п. 36, где соединение в липосомальных везикулах имеет минимальную ингибирующую концентрацию (МИС) в диапазоне от примерно 0,01 мкг/мл до примерно 0,25 мкг/мл.

38. Способ по п. 35 или п. 36, где соединение в липосомальных везикулах имеет минимальную ингибирующую концентрацию (МИС) в диапазоне от примерно 0,01 мкг/мл до примерно 0,1 мкг/мл.

39. Способ по любому из п.п. 35 - 38, включающий парентеральное введение указанной липосомальной композиции.

40. Способ по п. 39, включающий одновременное или последовательное введение одного или

более активных агентов.

41. Способ по п. 40, где указанные один или более активных агентов включают бедаквилин, претоманид, пипразинамид, моксифлоксацин, их фармацевтически приемлемую соль или их комбинацию.

42. Способ по п. 39, где липосомальную композицию вводят от одного раза в неделю до одного раза каждые шесть недель.

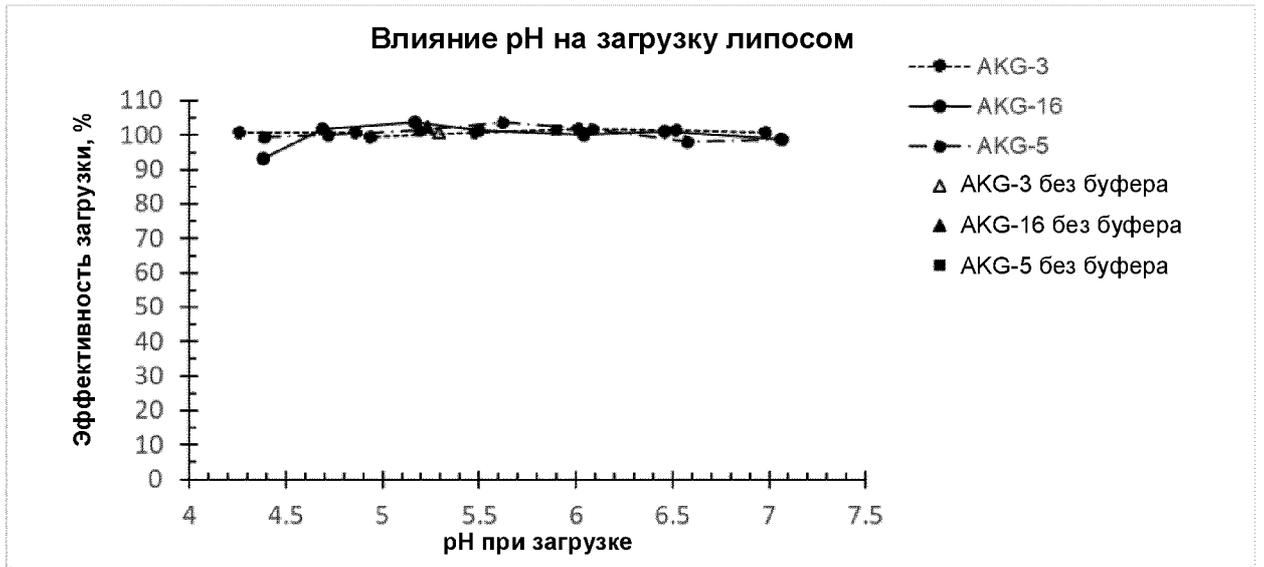
43. Способ по п. 39, отличающийся тем, что процентное содержание соединения, остающегося в кровотоке после введения субъекту, нуждающемуся в этом, превышает 20% от введенного количества спустя 6 часов.

44. Способ по п. 39, где процентное содержание соединения, остающегося в кровотоке после введения субъекту, нуждающемуся в этом, превышает 10% от введенного количества.

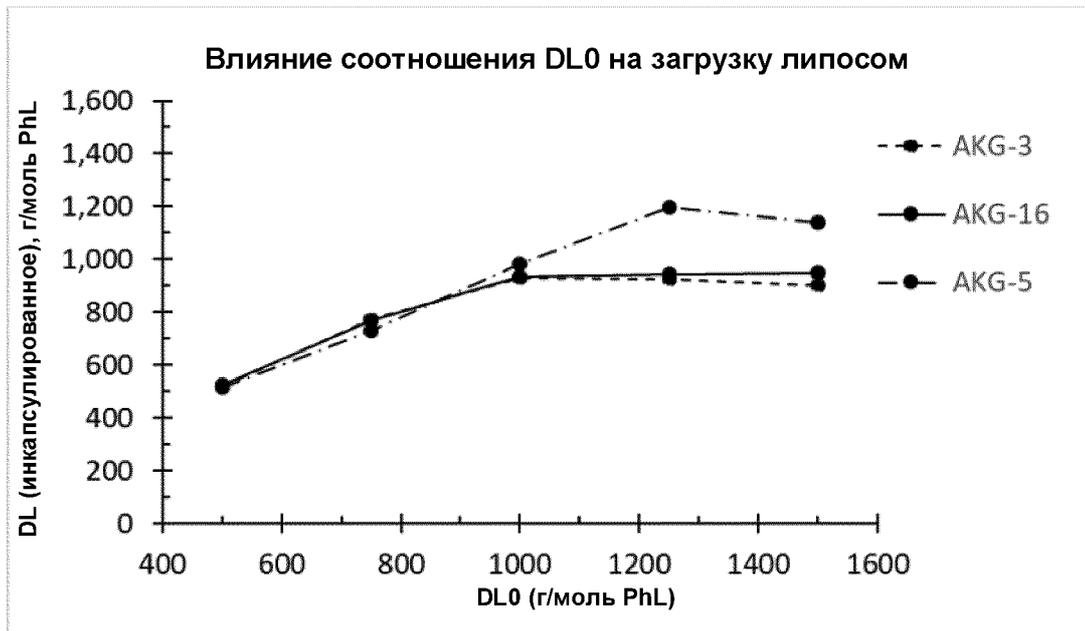
45. Способ получения липосомальной композиции, включающий следующие стадии:

- (i) получение липосом, содержащих фосфолипид, холестерин и PEG-липид и имеющих внутреннюю полость, содержащую захватывающий агент, в среде, по существу не содержащей захватывающий агент;
- (ii) приведение липосом в контакт с соединением по любому из п.п. 1-8 в водной среде для инкапсулирования указанного соединения в липосомы;
- (iii) удаление неинкапсулированного соединения; и
- (iv) обеспечение липосом в физиологически приемлемой среде, подходящей для парентерального применения.

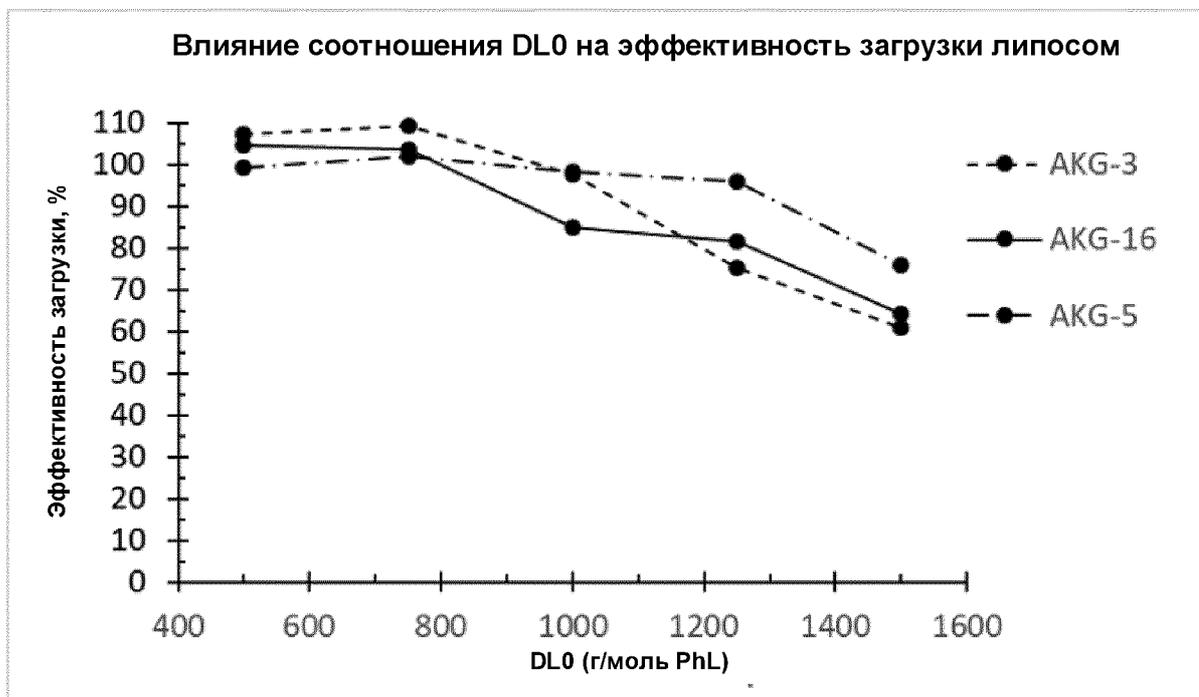
Фиг. 1



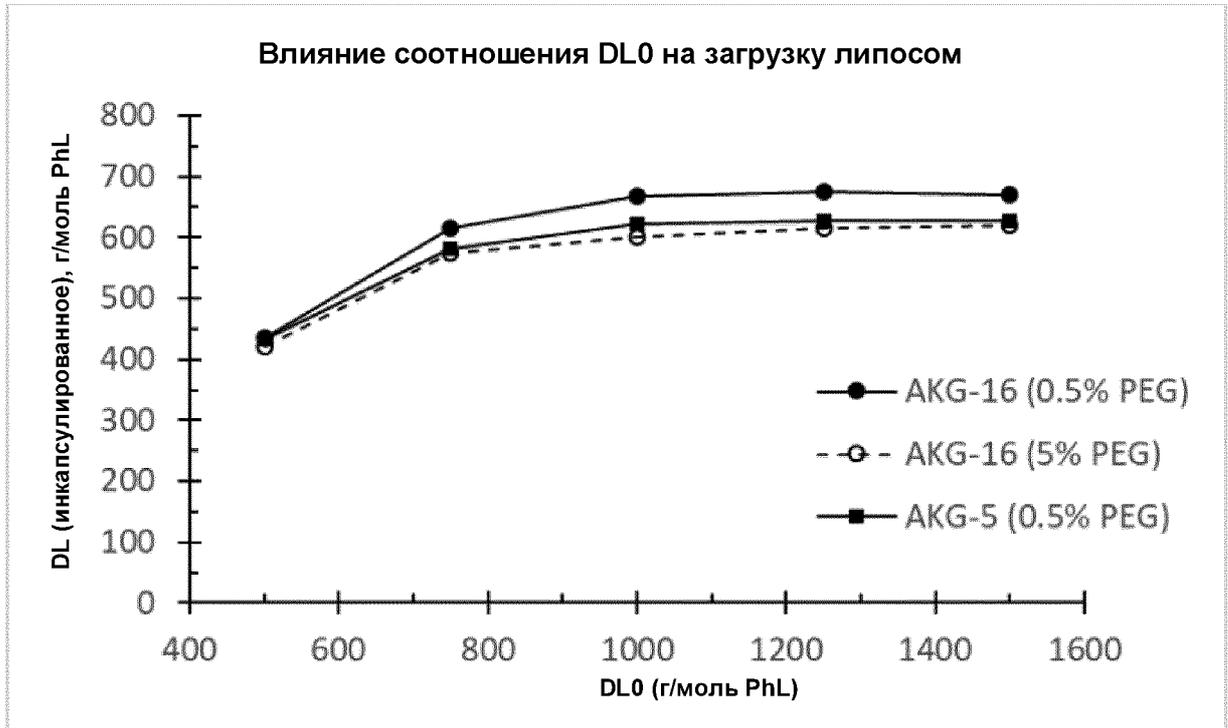
Фиг. 2А



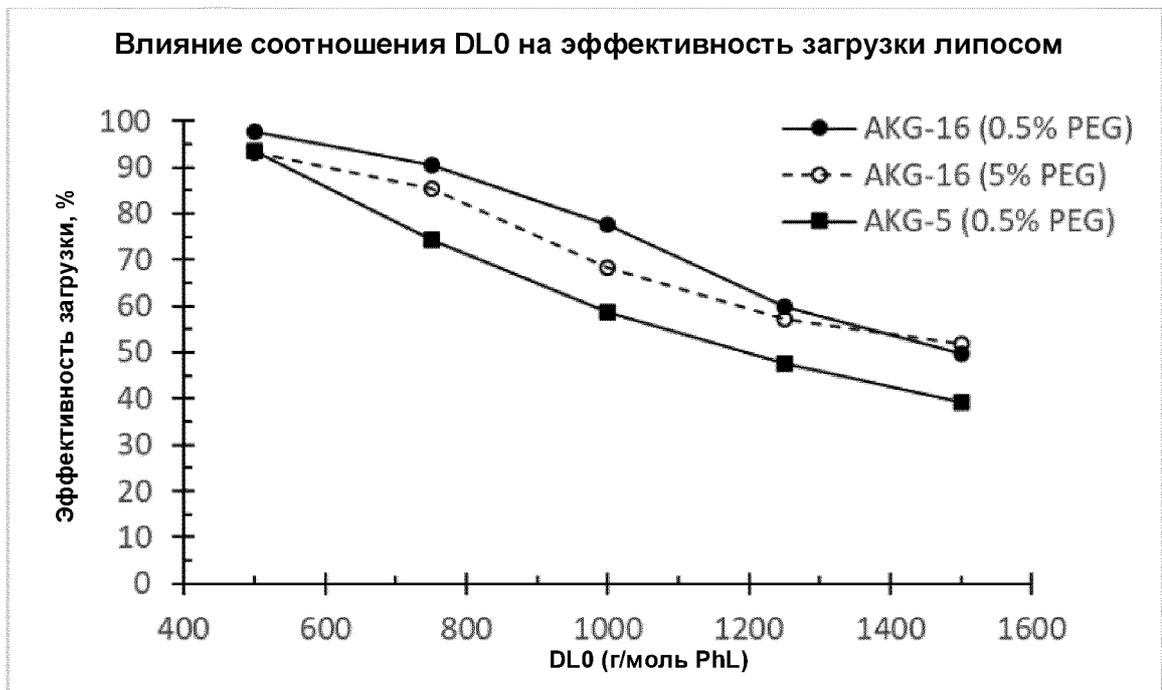
Фиг. 2В



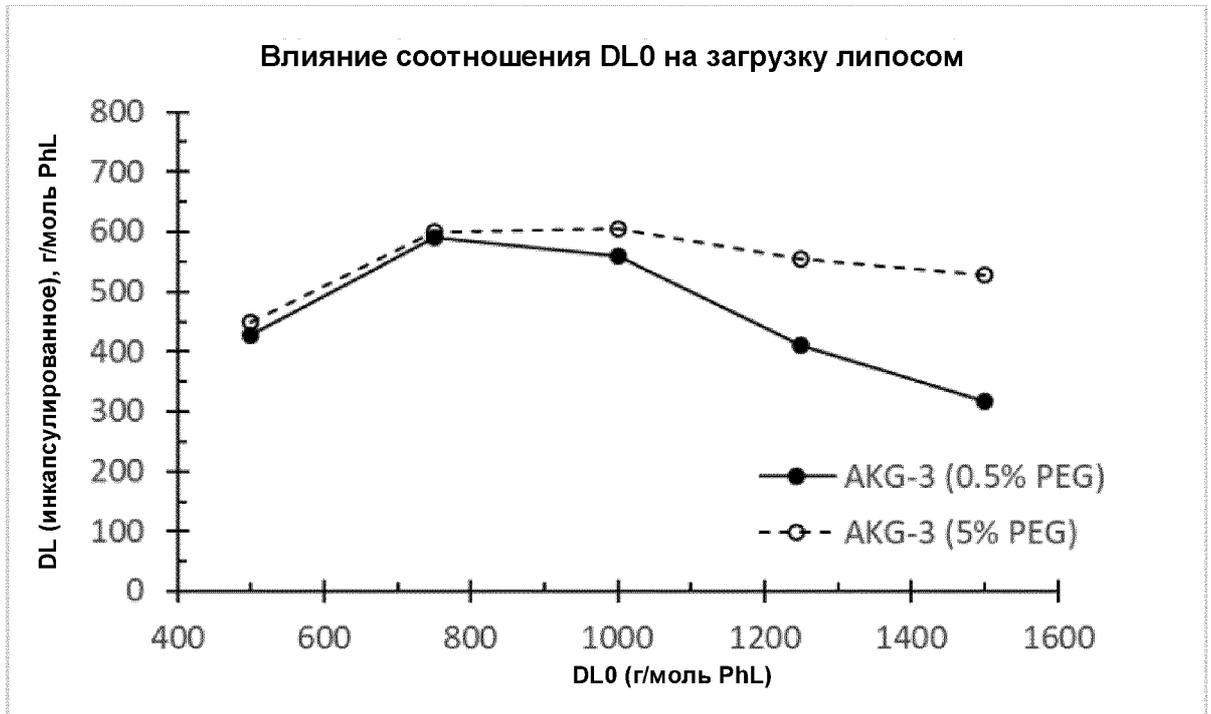
Фиг. 3А



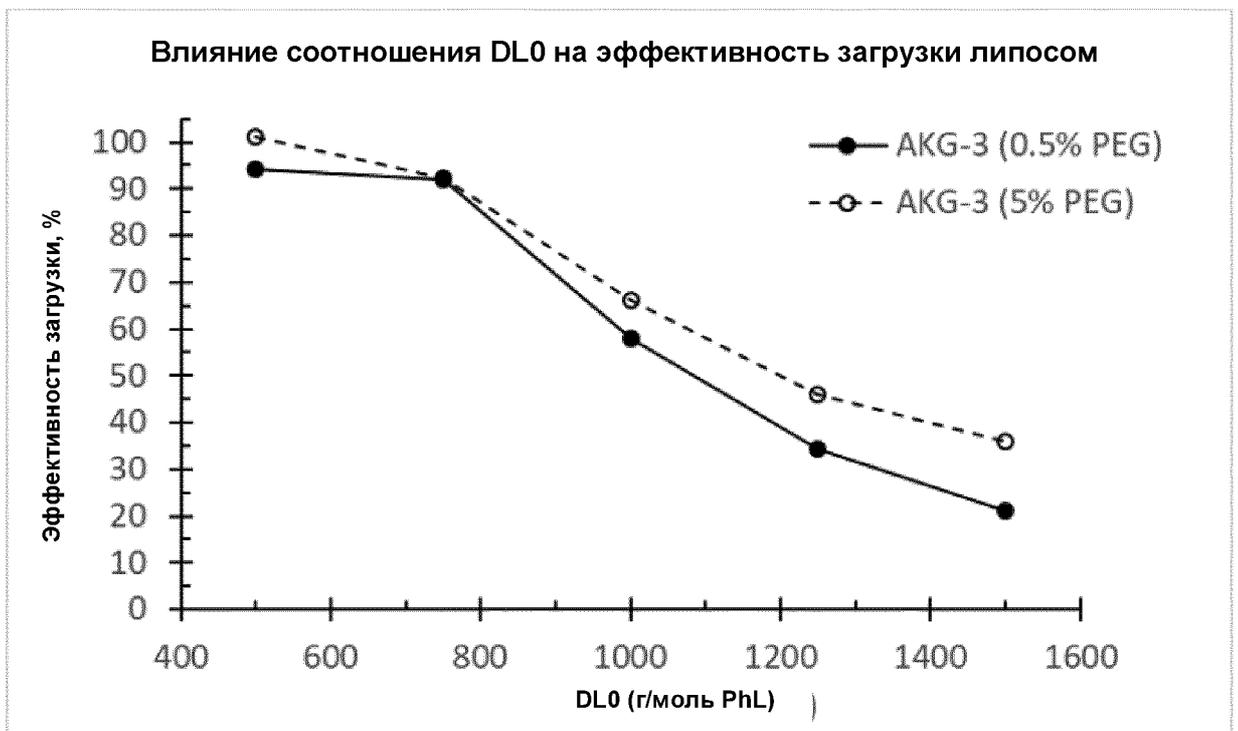
Фиг. 3В



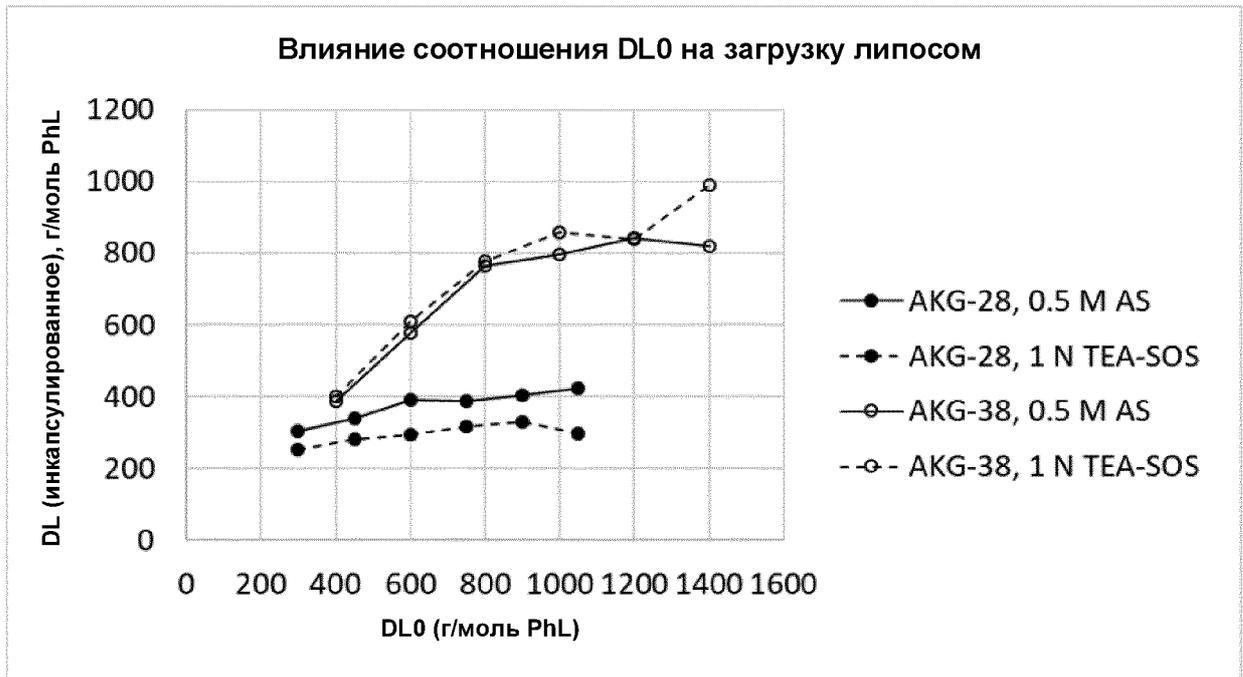
Фиг. 3С



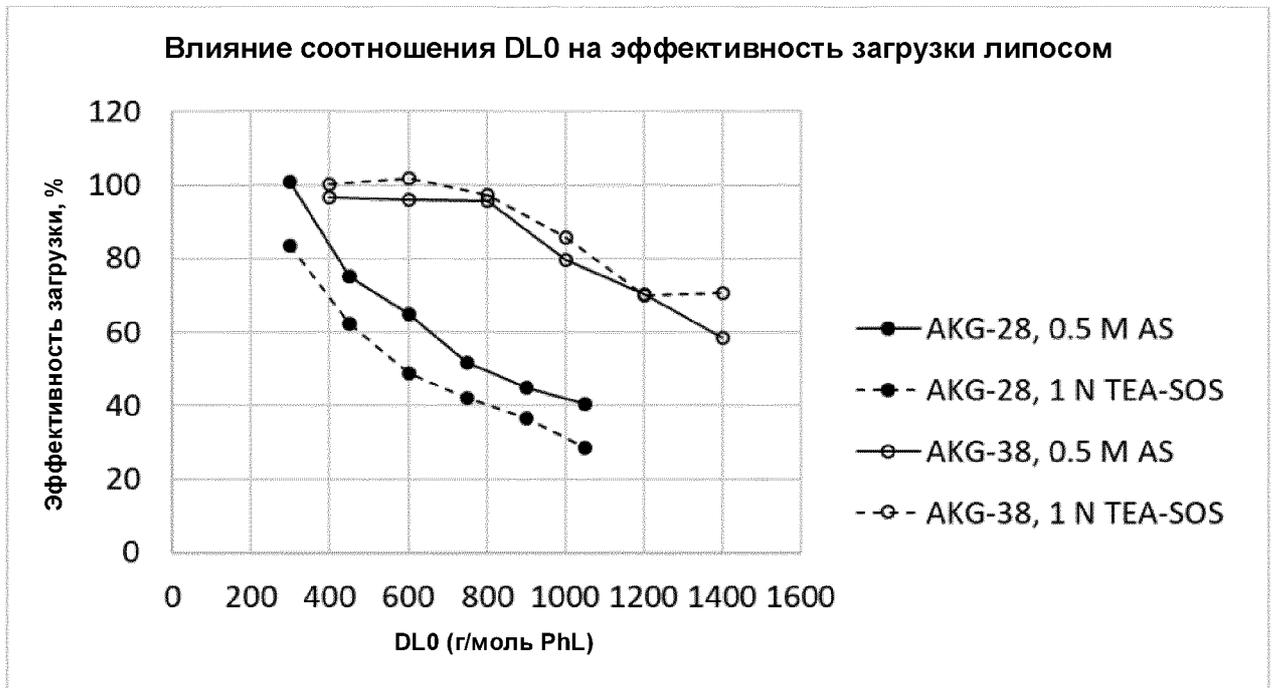
Фиг. 3D



Фиг. 4А

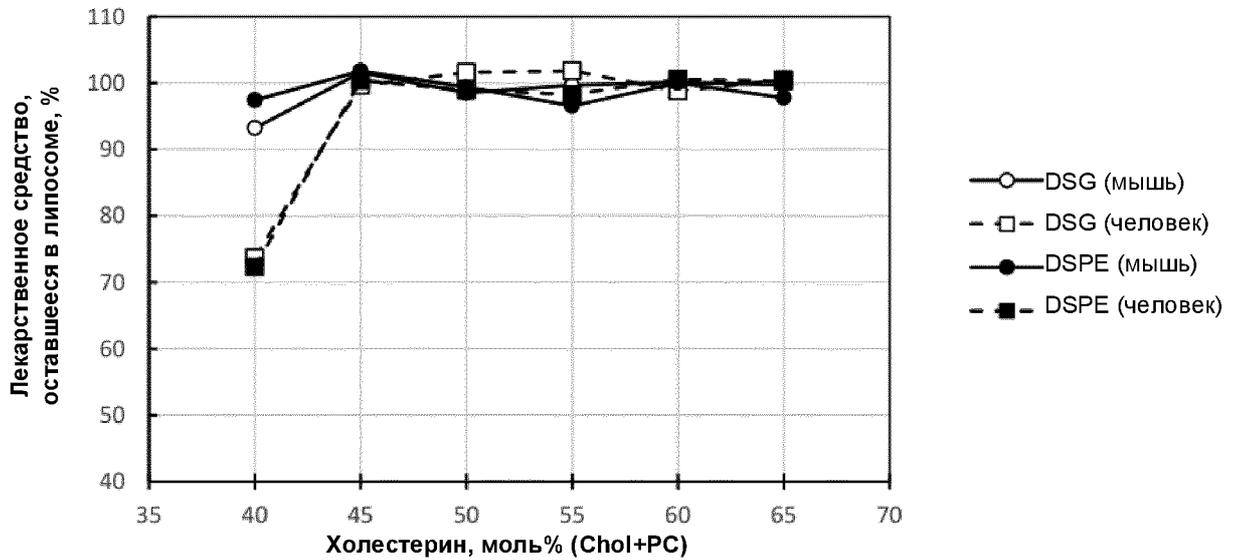


Фиг. 4В



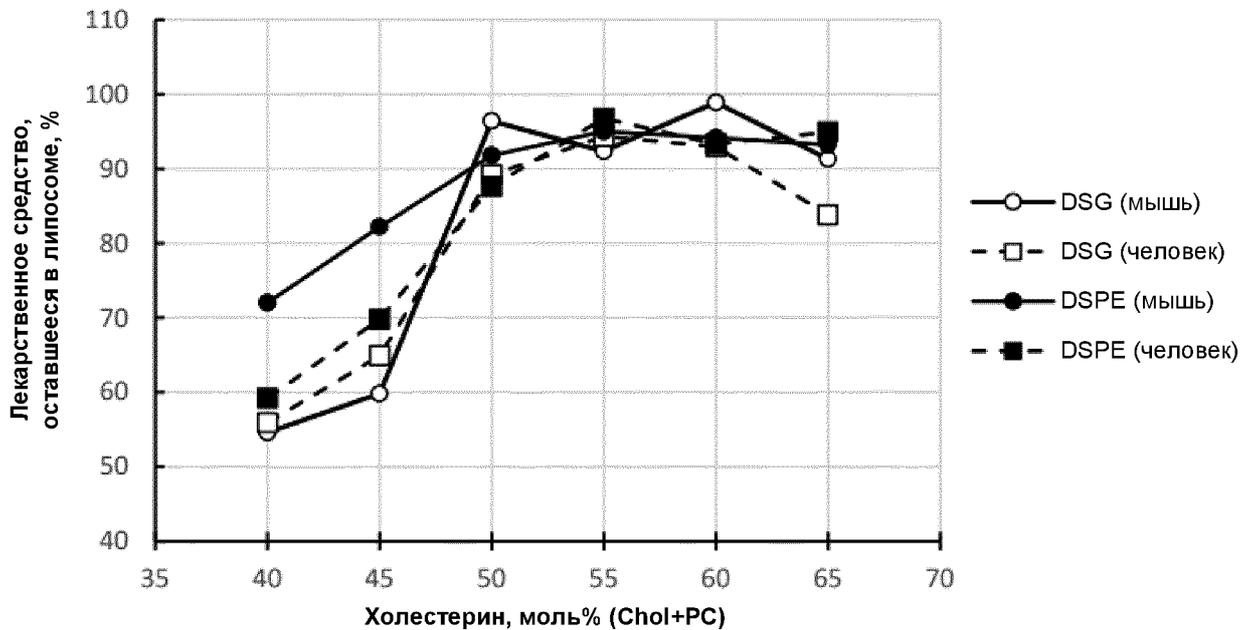
Фиг. 5А

Влияние содержания холестерина на утечку АКГ-28  
из липосом с 0,5 М AS в плазме



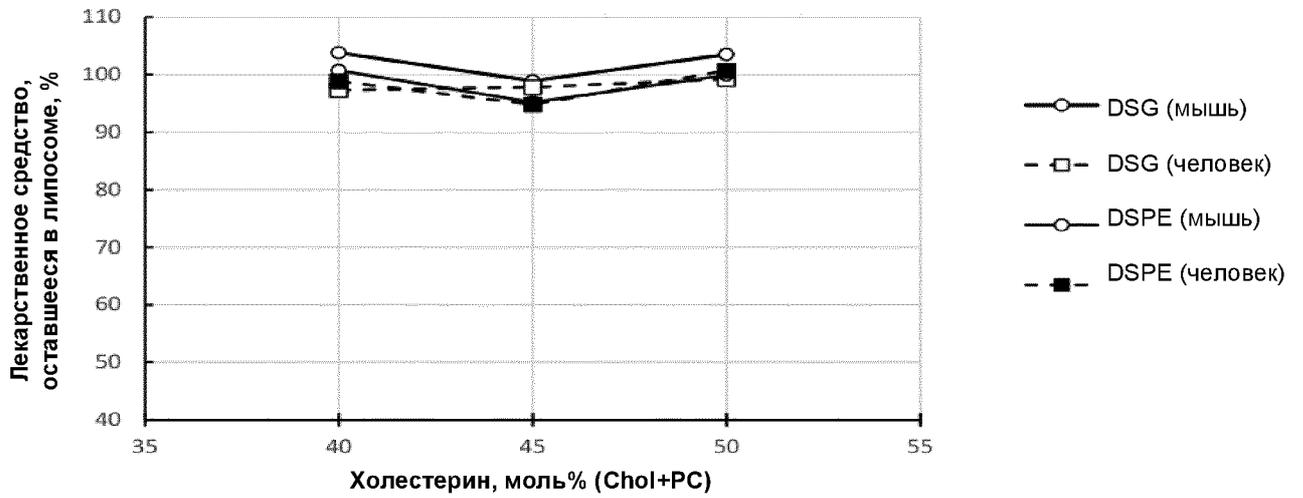
Фиг. 5В

Влияние содержания холестерина на утечку АКГ-38  
из липосом с 0,5 М AS в плазме



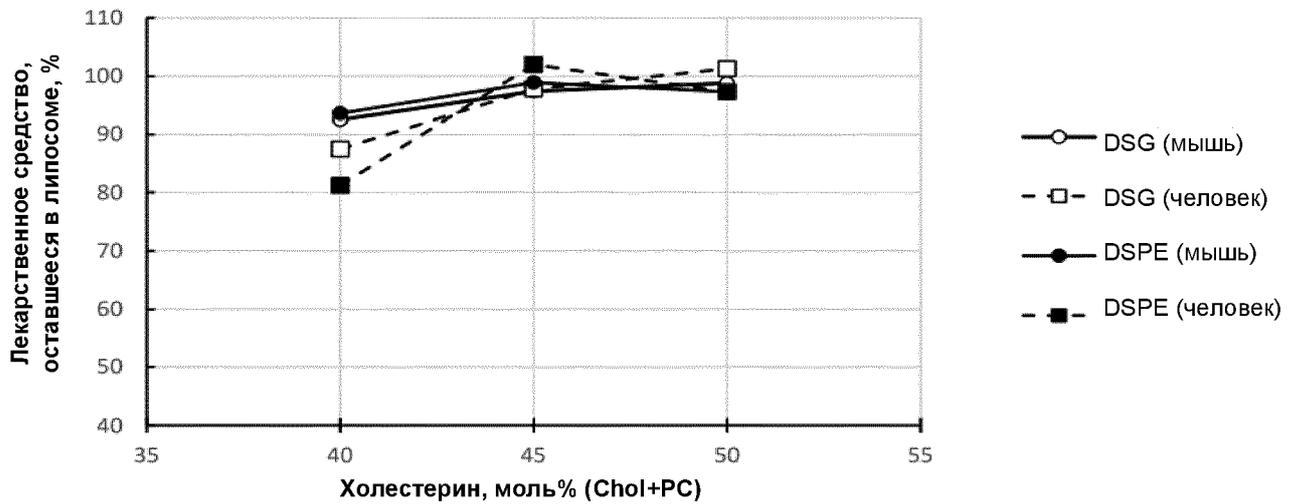
Фиг. 5С

Влияние содержания холестерина на утечку АКГ-28  
из липосом с 1 н. TEA-SOS в плазме

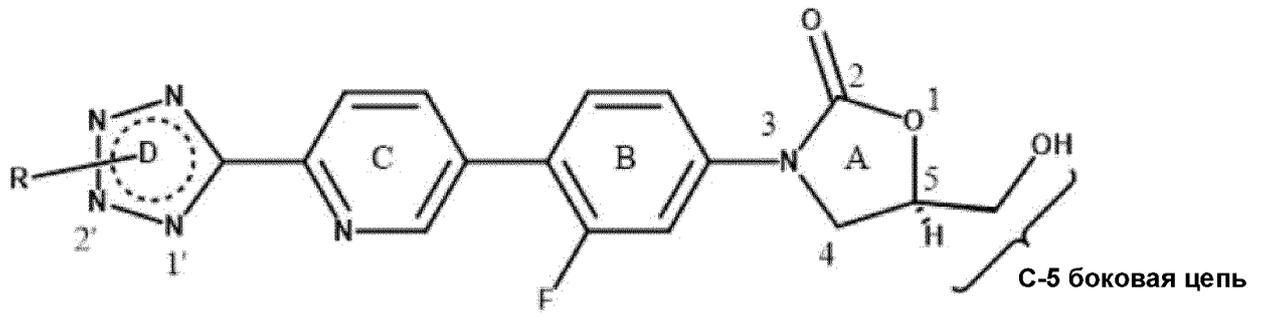


Фиг. 5D

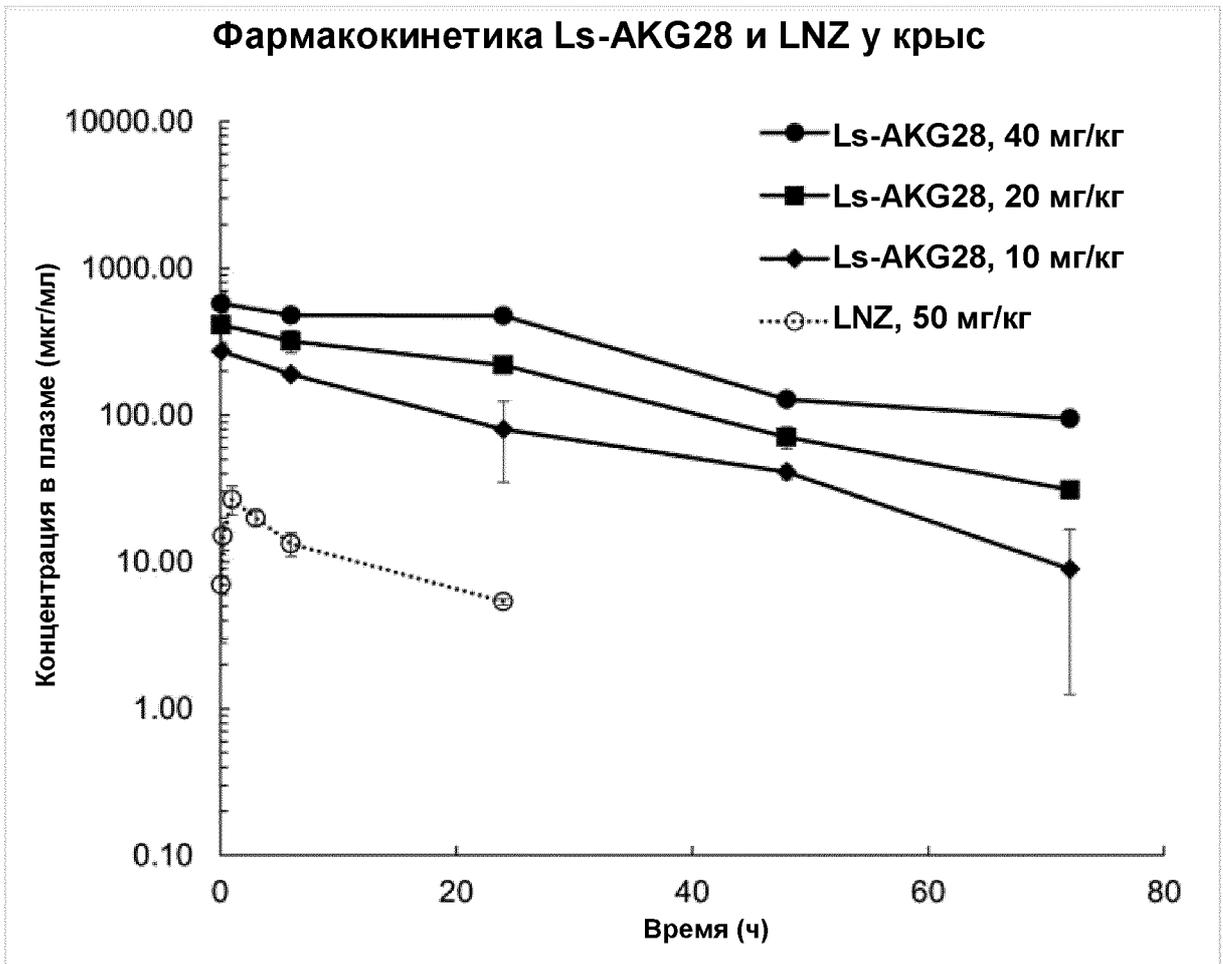
Влияние содержания холестерина на утечку АКГ-38  
из липосом с 1 н. TEA-SOS в плазме



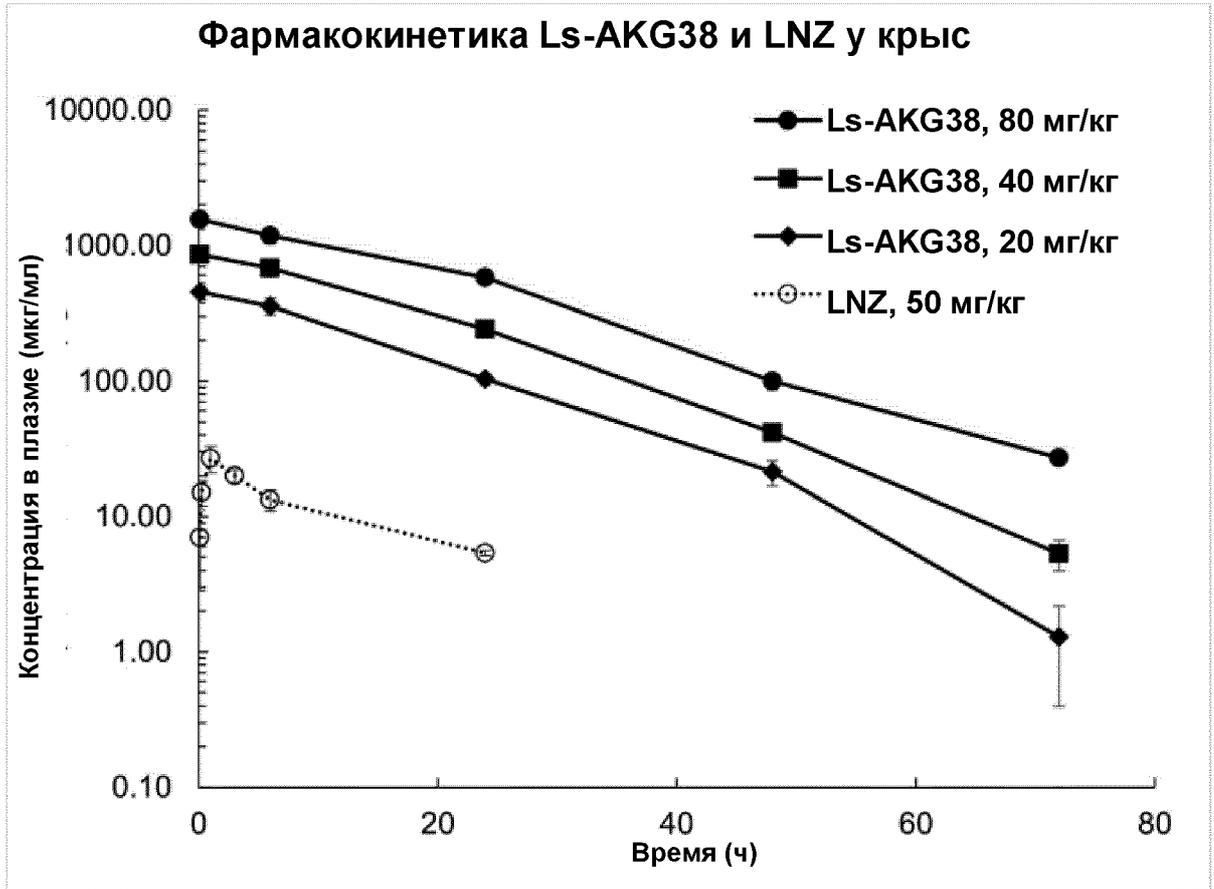
Фиг. 6



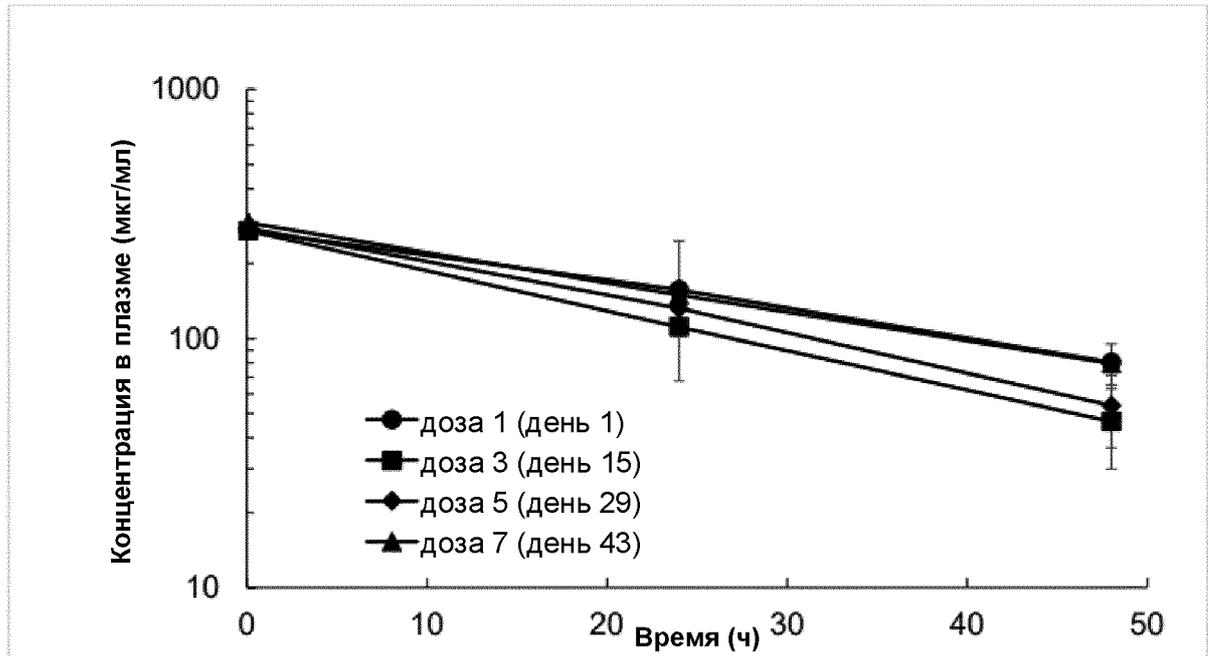
Фиг. 7



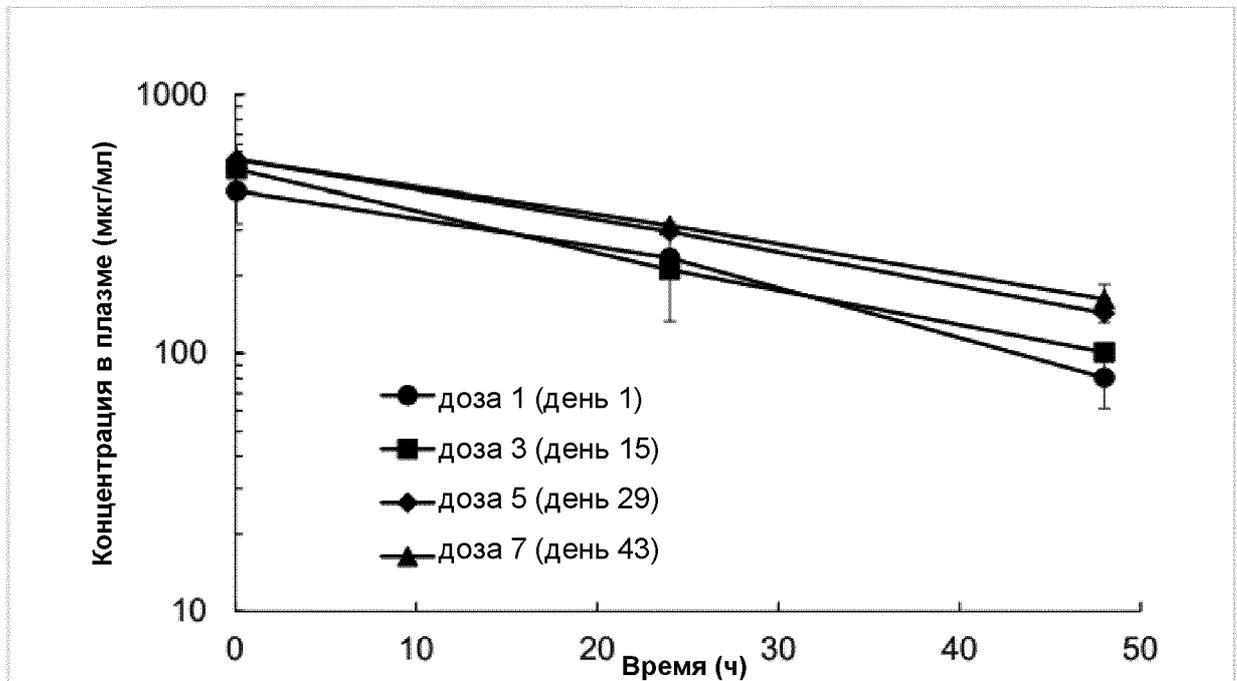
Фиг. 8



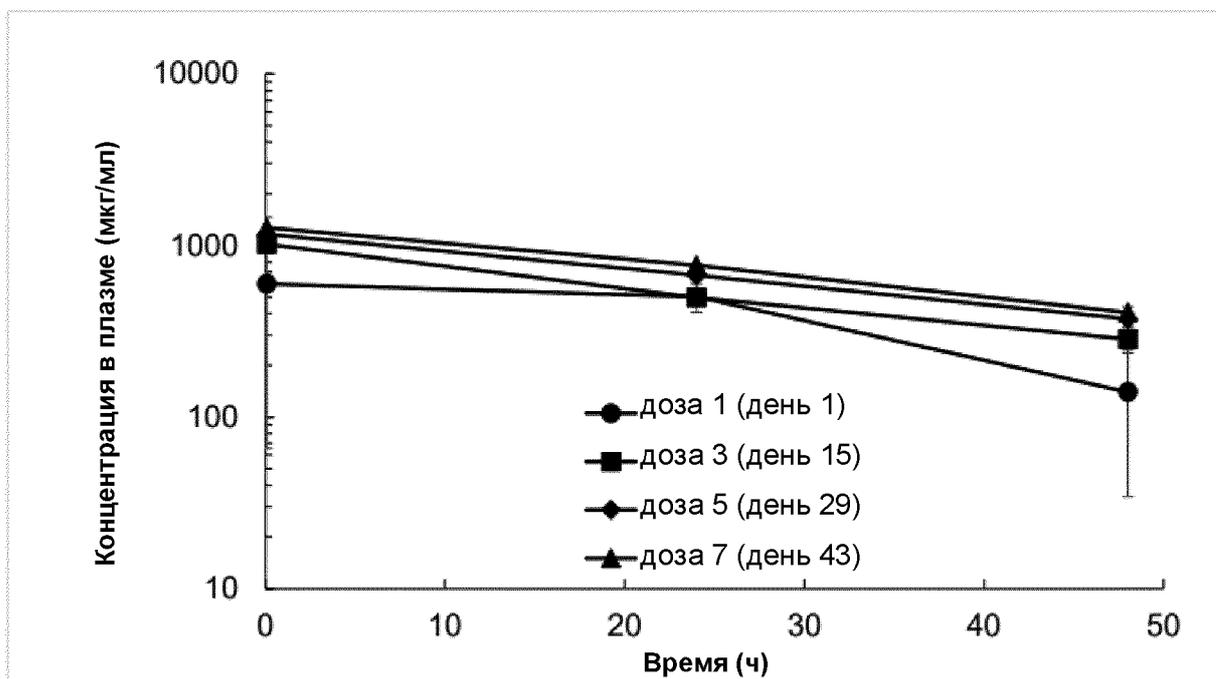
Фиг. 9А



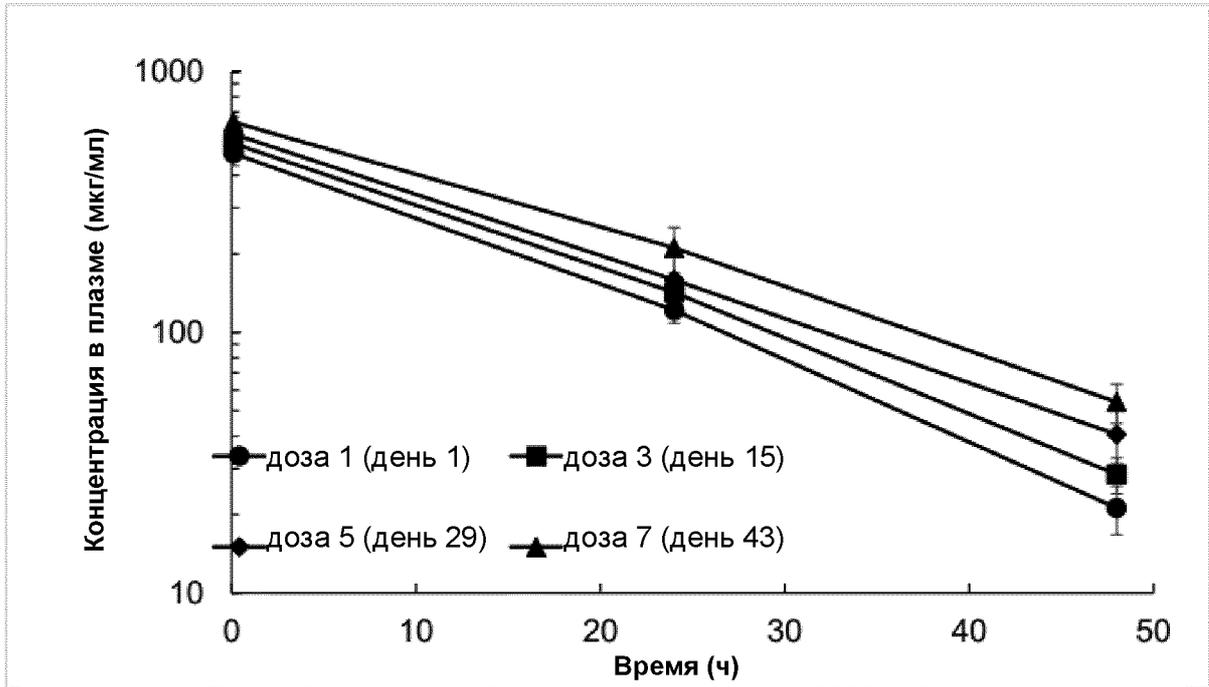
Фиг. 9В



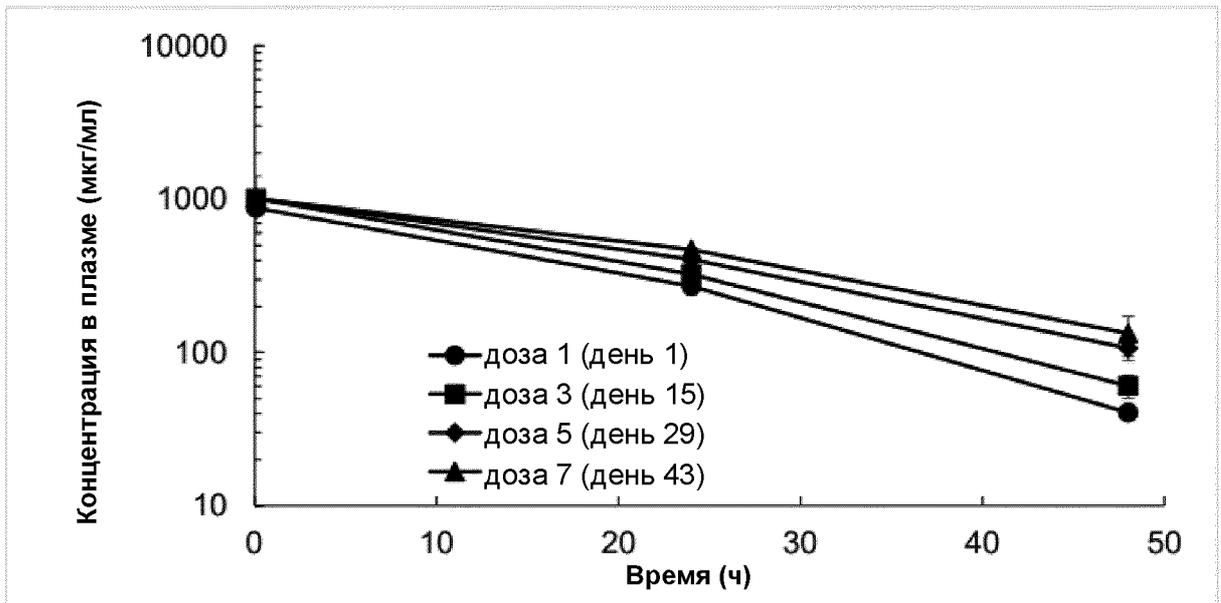
Фиг. 9С



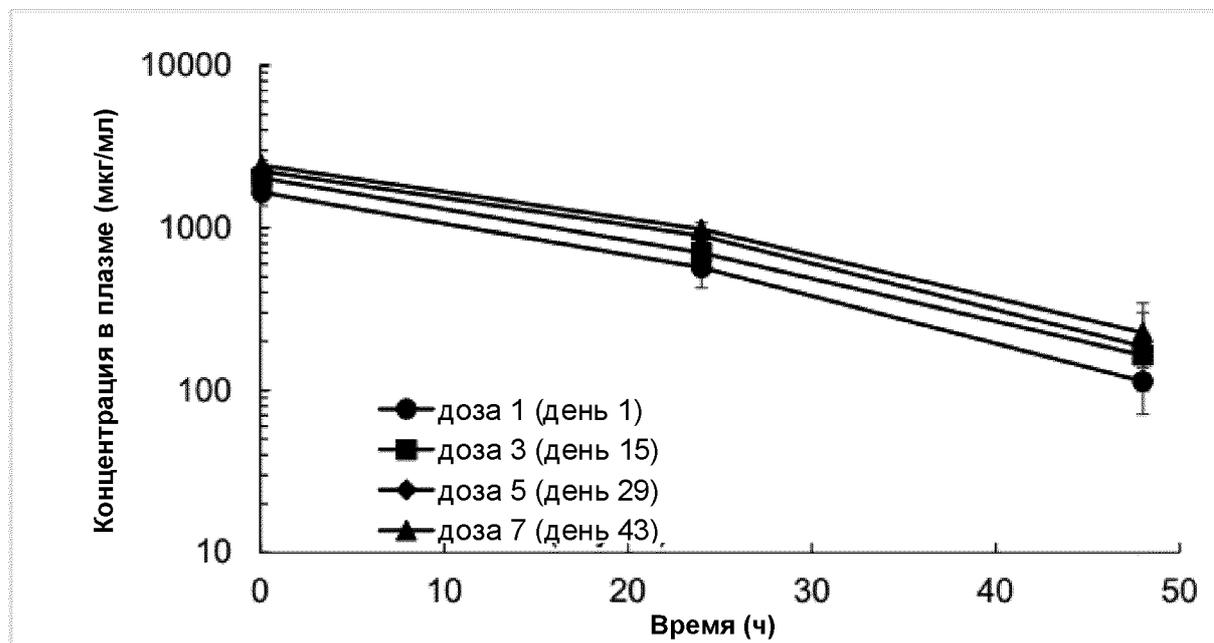
Фиг. 10А



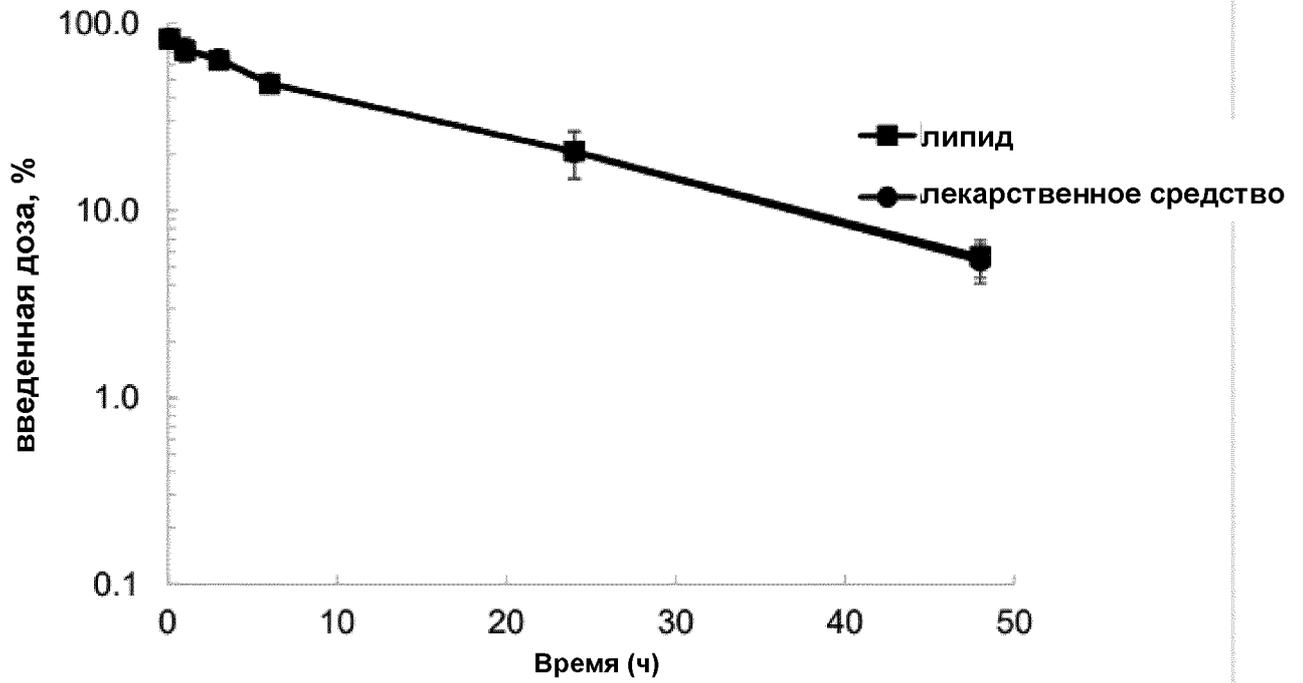
Фиг. 10В



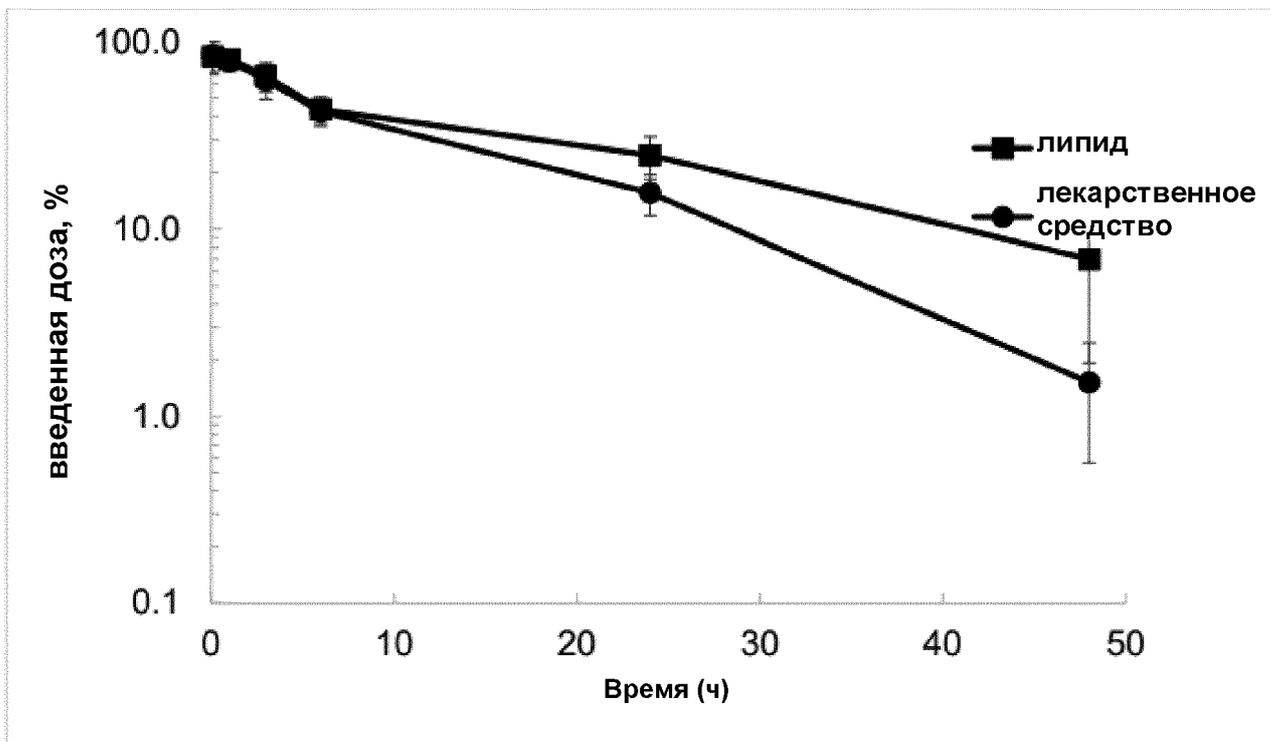
Фиг. 10С



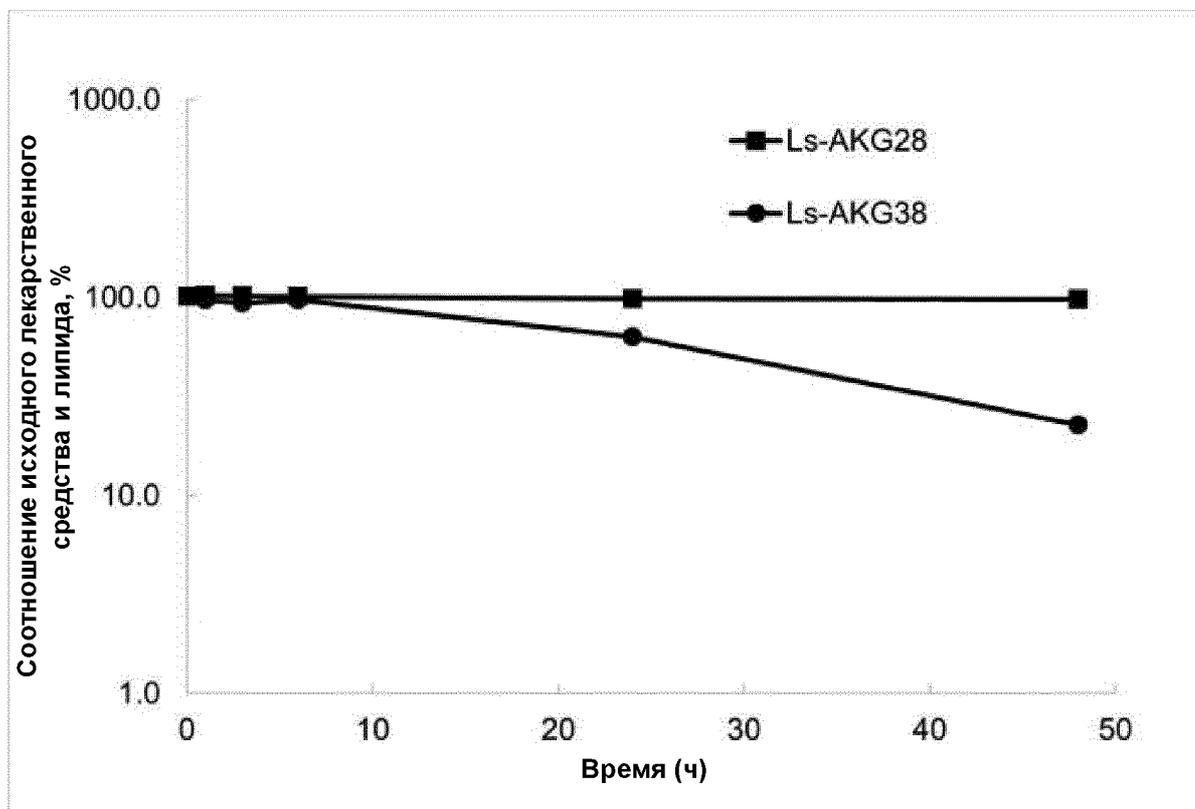
Фиг. 11А



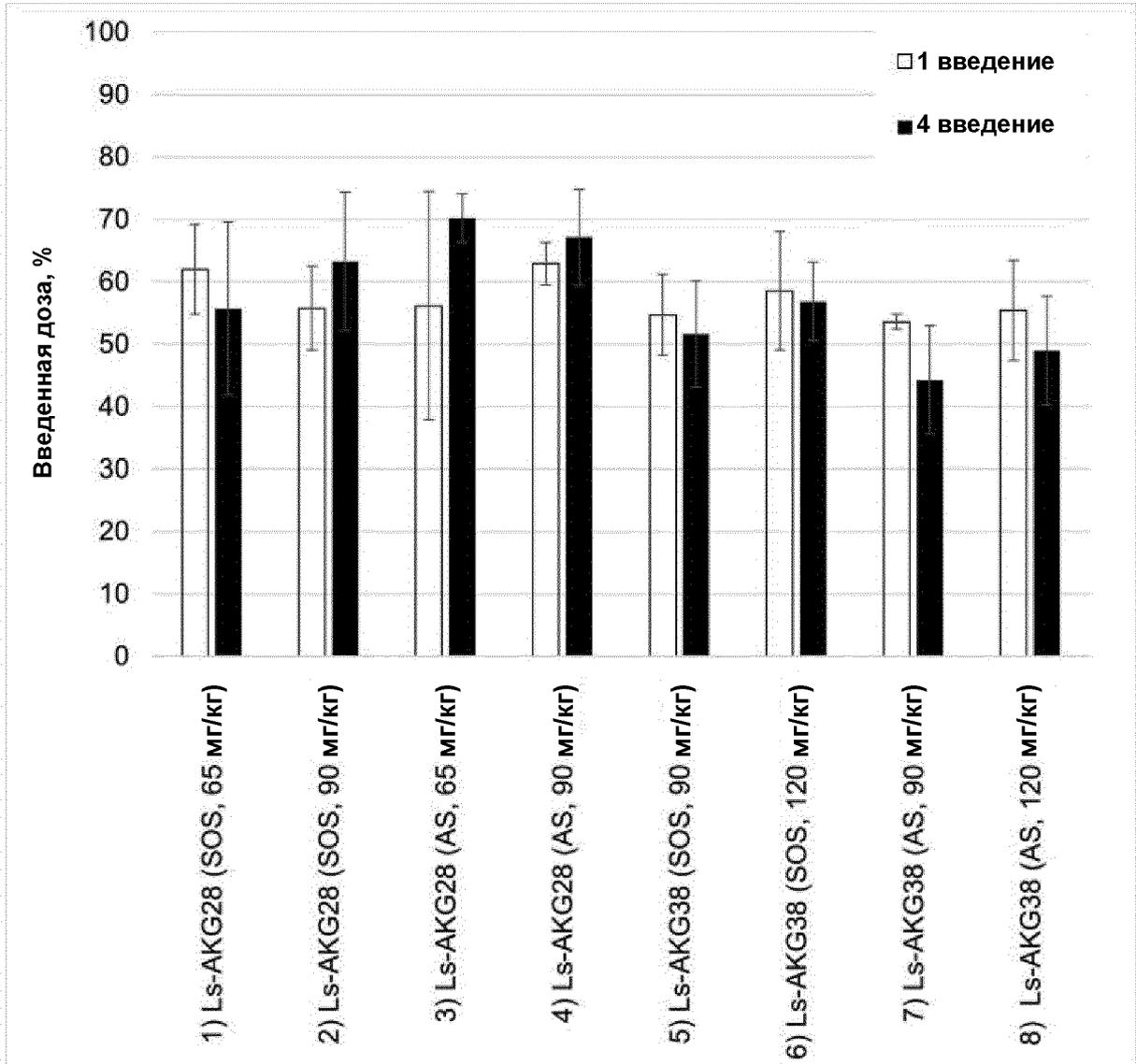
Фиг. 11В



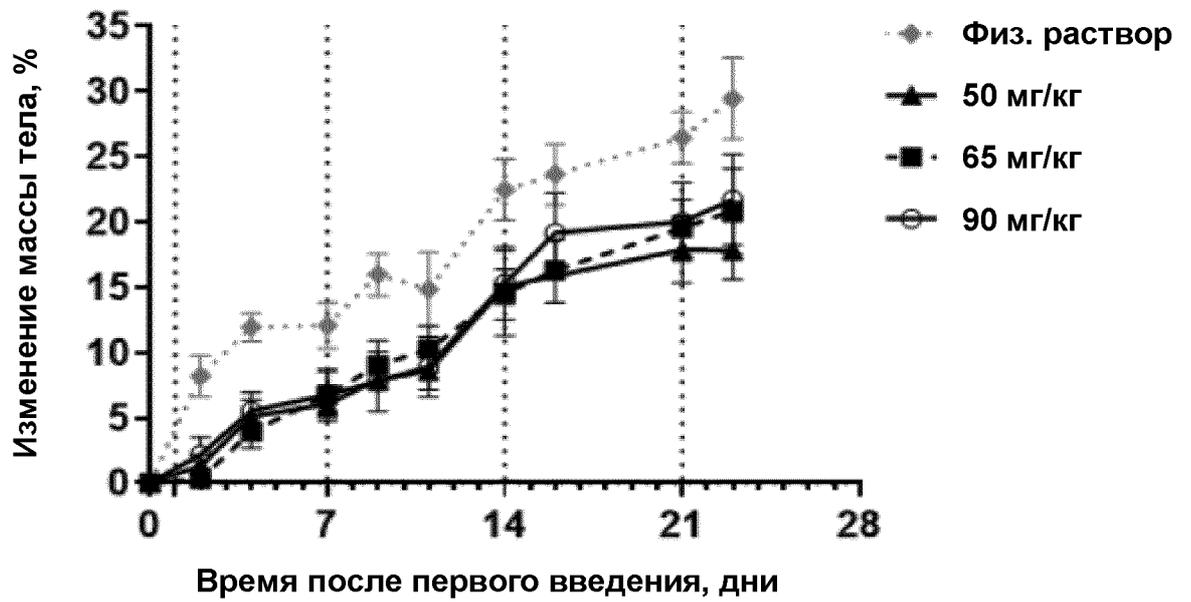
Фиг. 11С



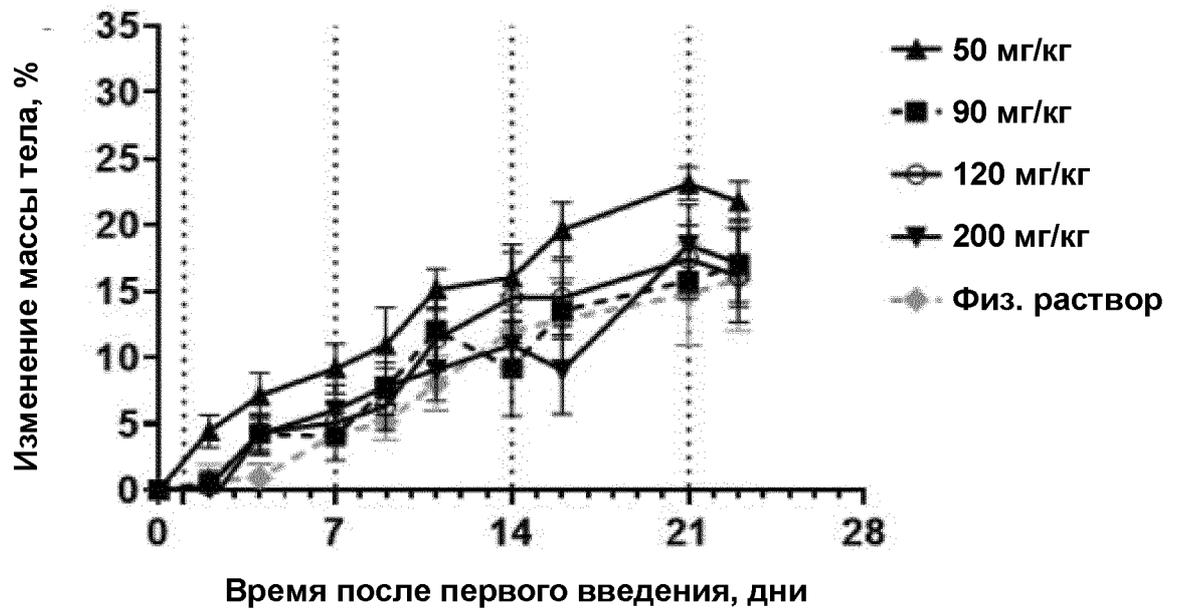
Фиг. 12



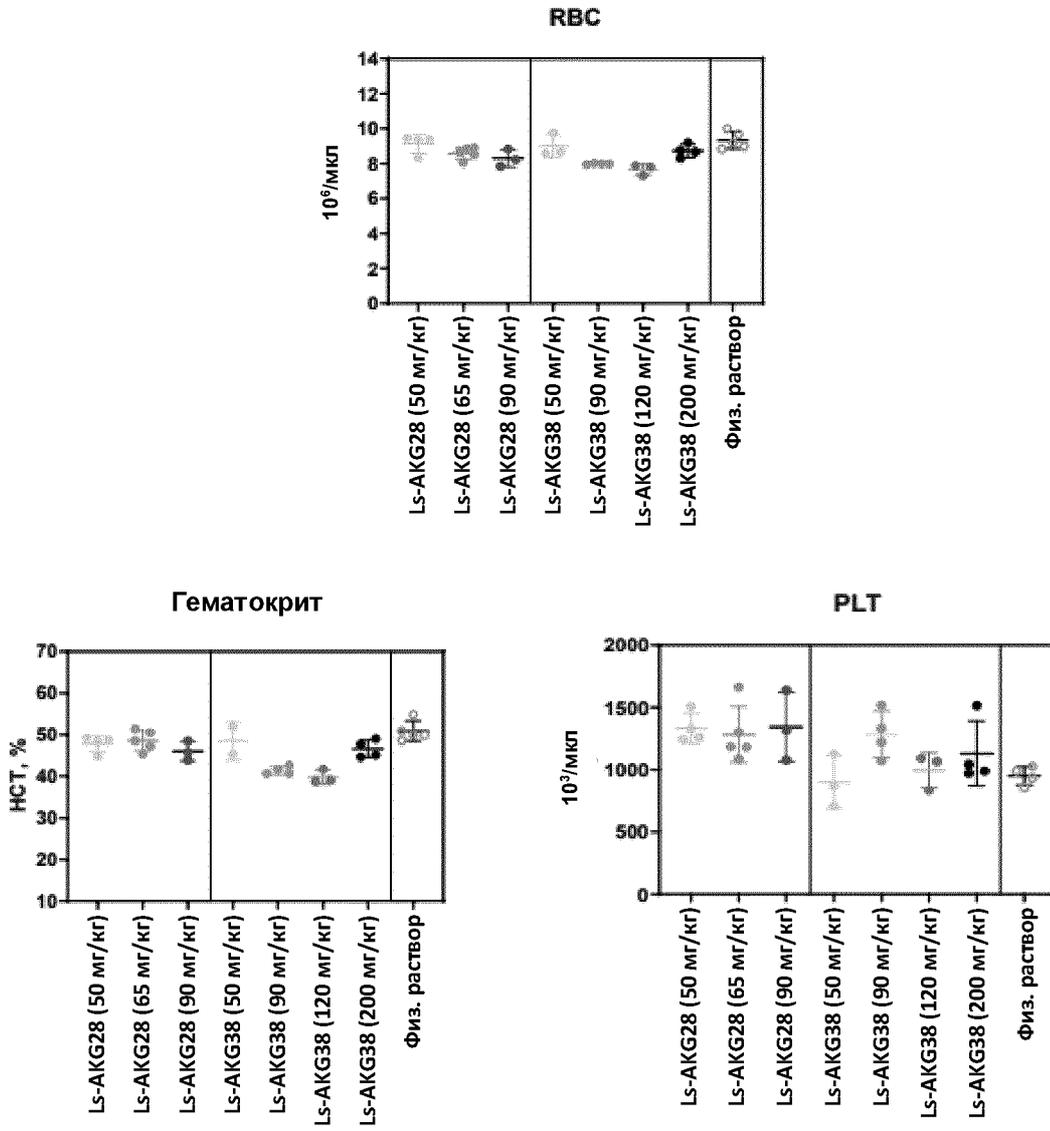
Фиг. 13А



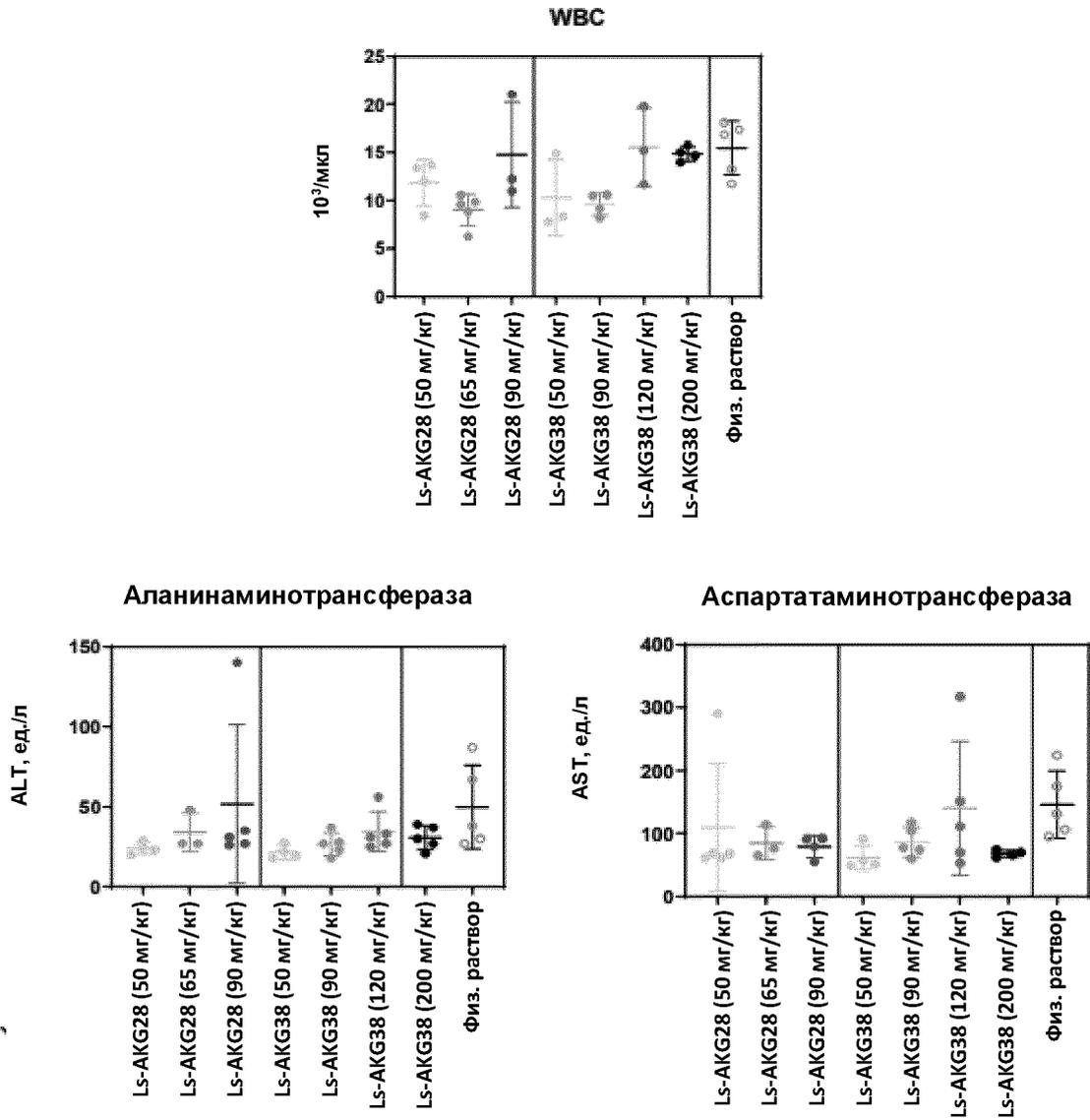
Фиг. 13В



Фиг. 13С



Фиг. 13С продолжение



Фиг. 13D

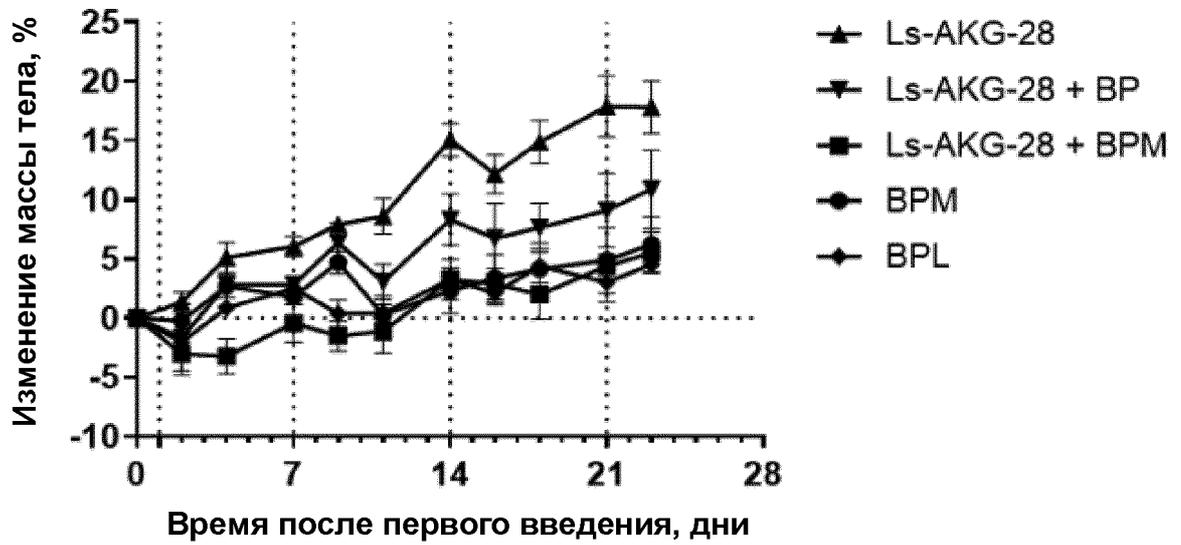
Физ. раствор	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ls-АКG28 (50 мг/кг)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ls-АКG28 (65 мг/кг)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ls-АКG28 (90 мг/кг)	0	0	1.0	0	0	0	0.2	0	0.2
Ls-АКG38 (50 мг/кг)	0	0.2	1.0	0	0	0.2	0	0	0
Ls-АКG38 (90 мг/кг)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ls-АКG38 (120 мг/кг)	0	0	0.2	0	0	0	0	0.4	0
Ls-АКG38 (200 мг/кг)	0.8	0.2	0	0.4	0.6	0	0	0	0
	Воспалительный инфильтрат в печени	Гепатоцеллюлярный некроз	Гипертрофия клеток Купфера	Повышенный EMH в печени	Повышенный EMH в селезенке	Вакуолизация макрофагов в селезенке	Макрофагальная инфильтрация в почках	Интерстициальный смешанный клеточный инфильтрат в легких	Инфильтрат мононуклеарных клеток в легких

Шкала оценки патологии

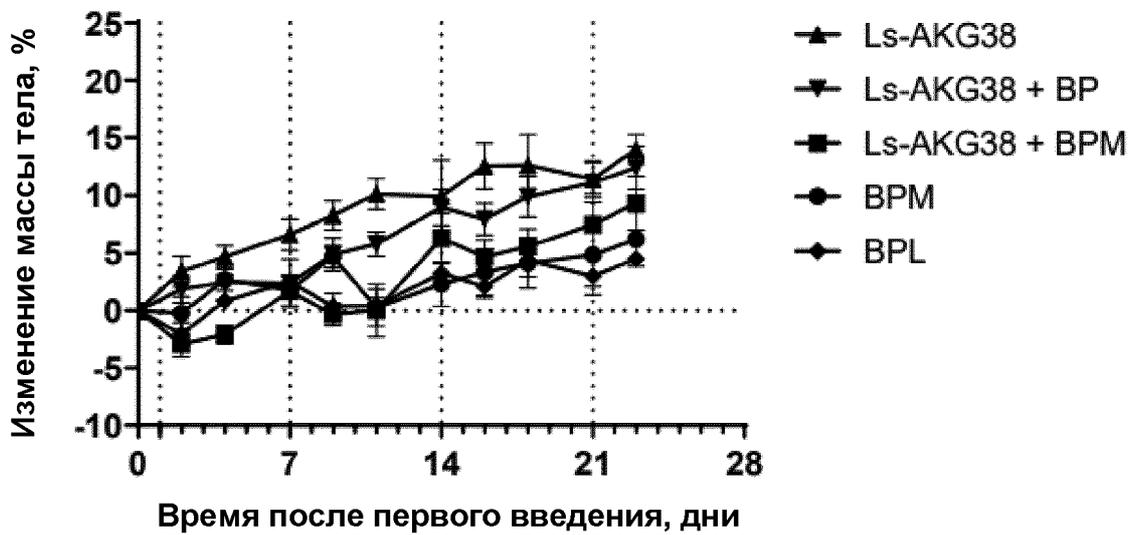
5  
4  
3  
2  
1  
0

1=минимальная  
2=легкая  
3=средняя  
4=выраженная  
5=тяжелая

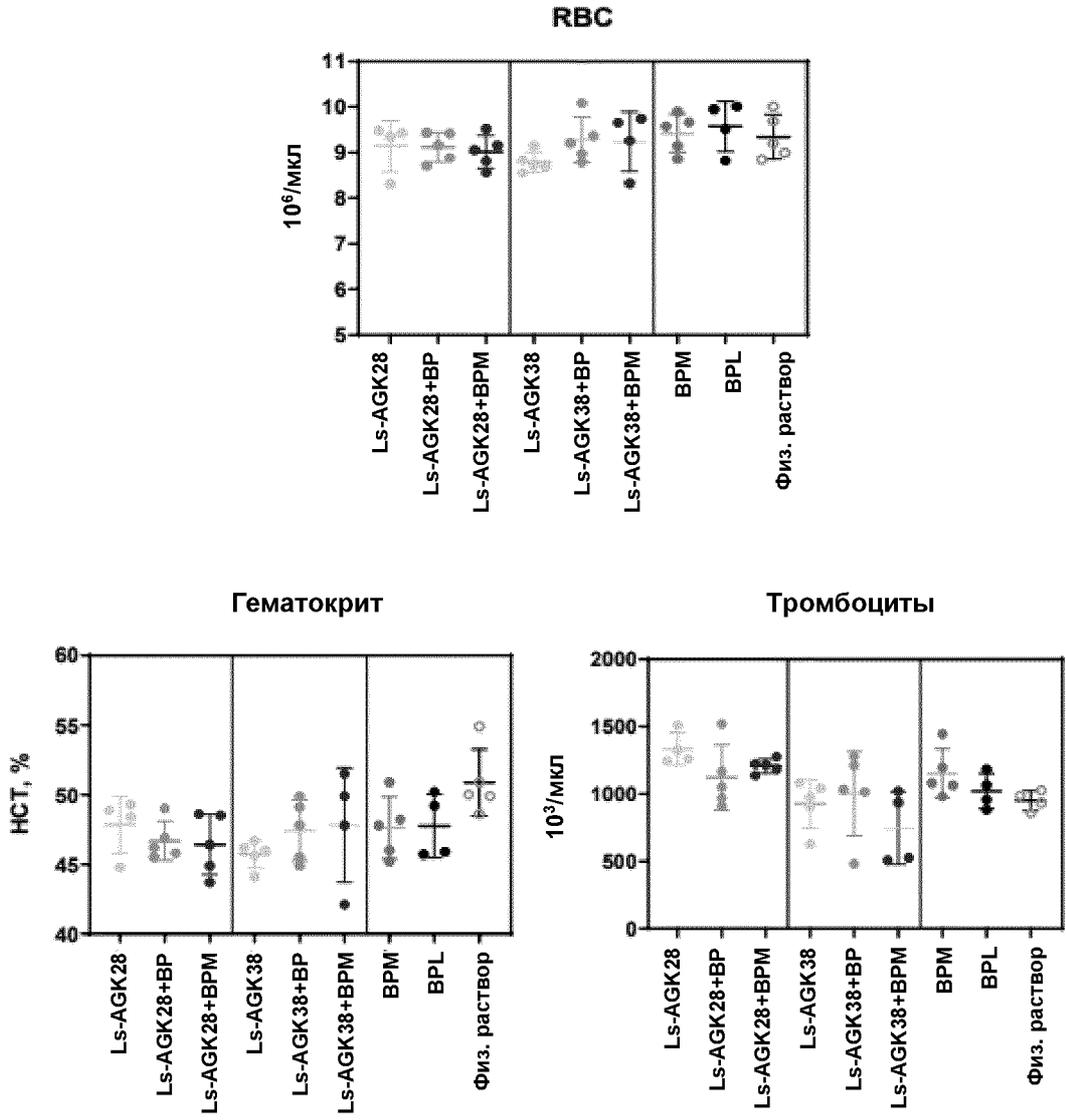
Фиг. 14А



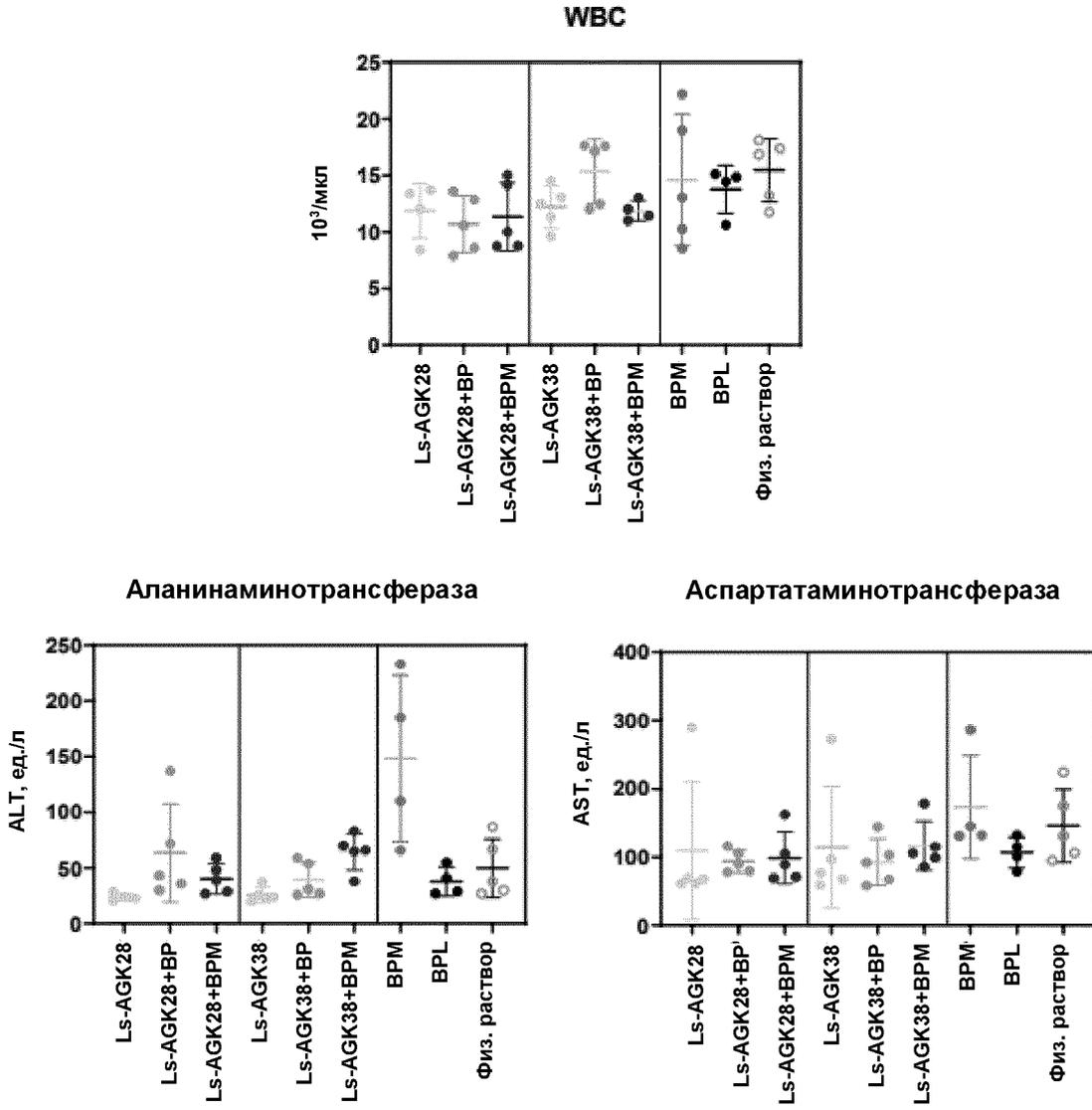
Фиг. 14В



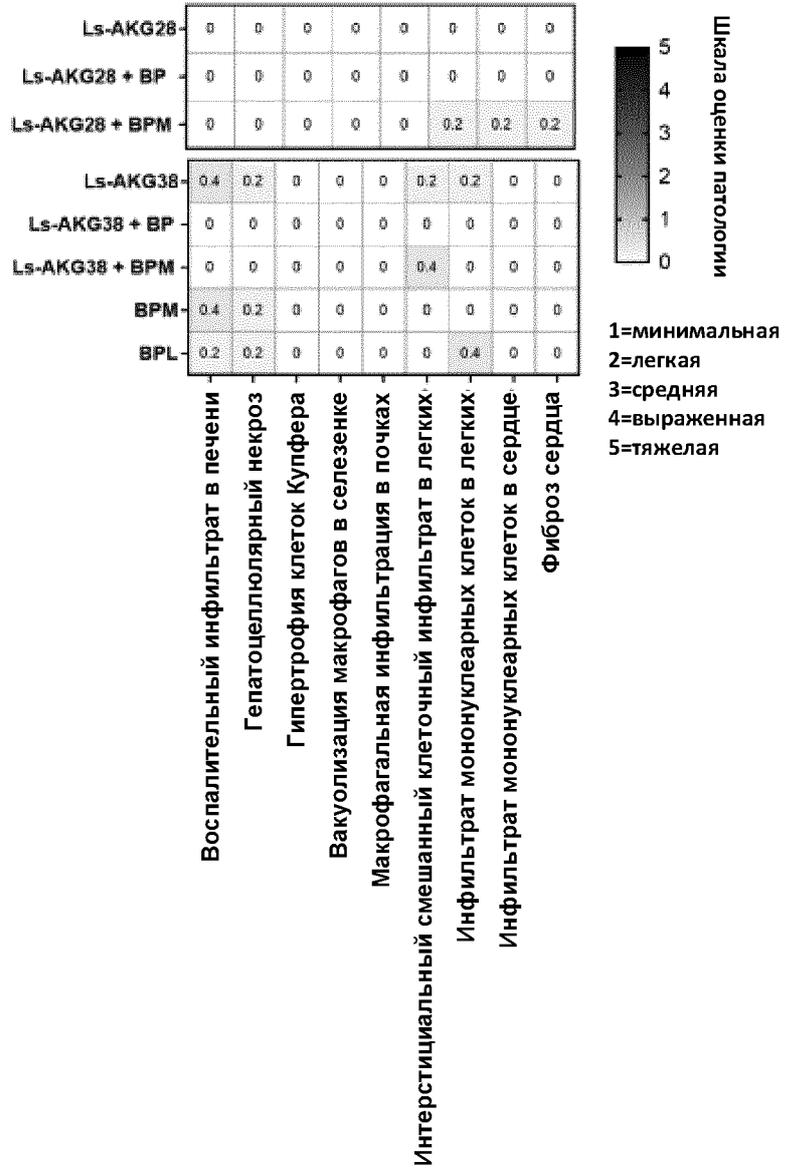
Фиг. 14С



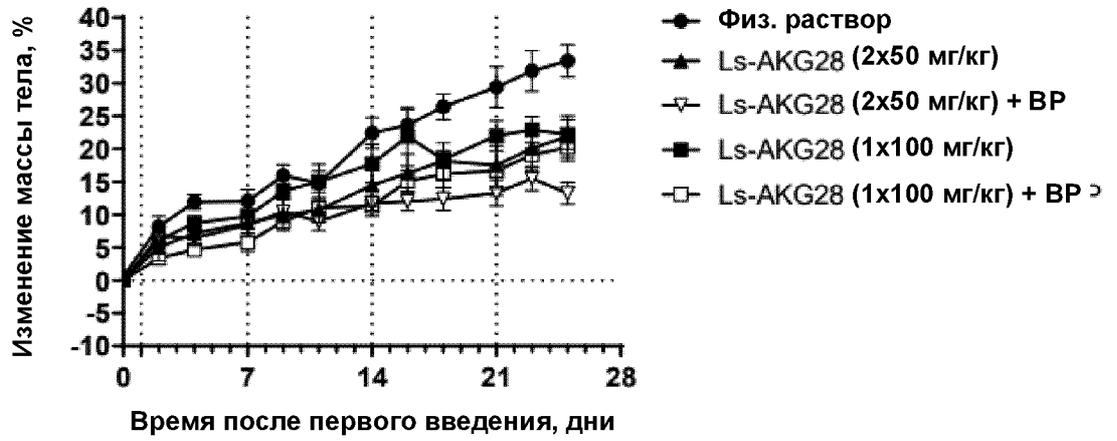
Фиг. 14С продолжение



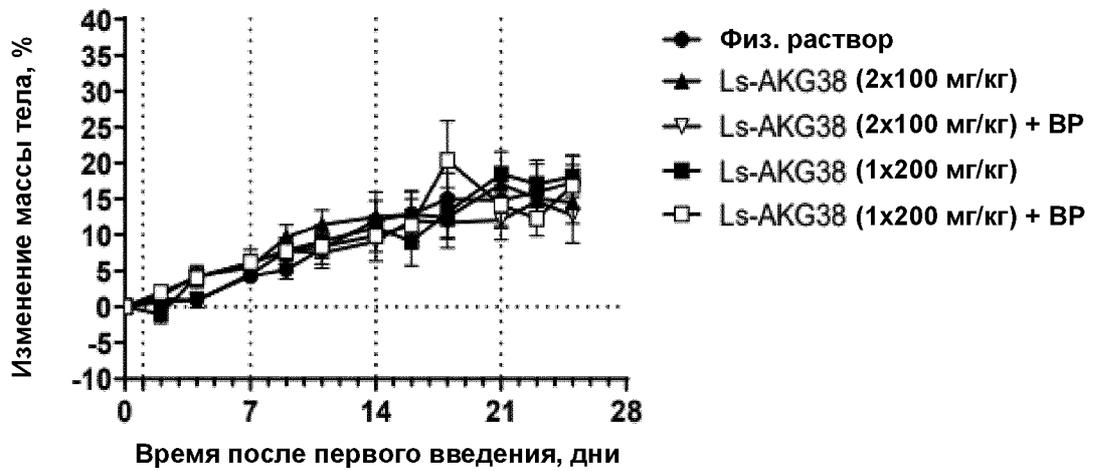
Фиг. 14D



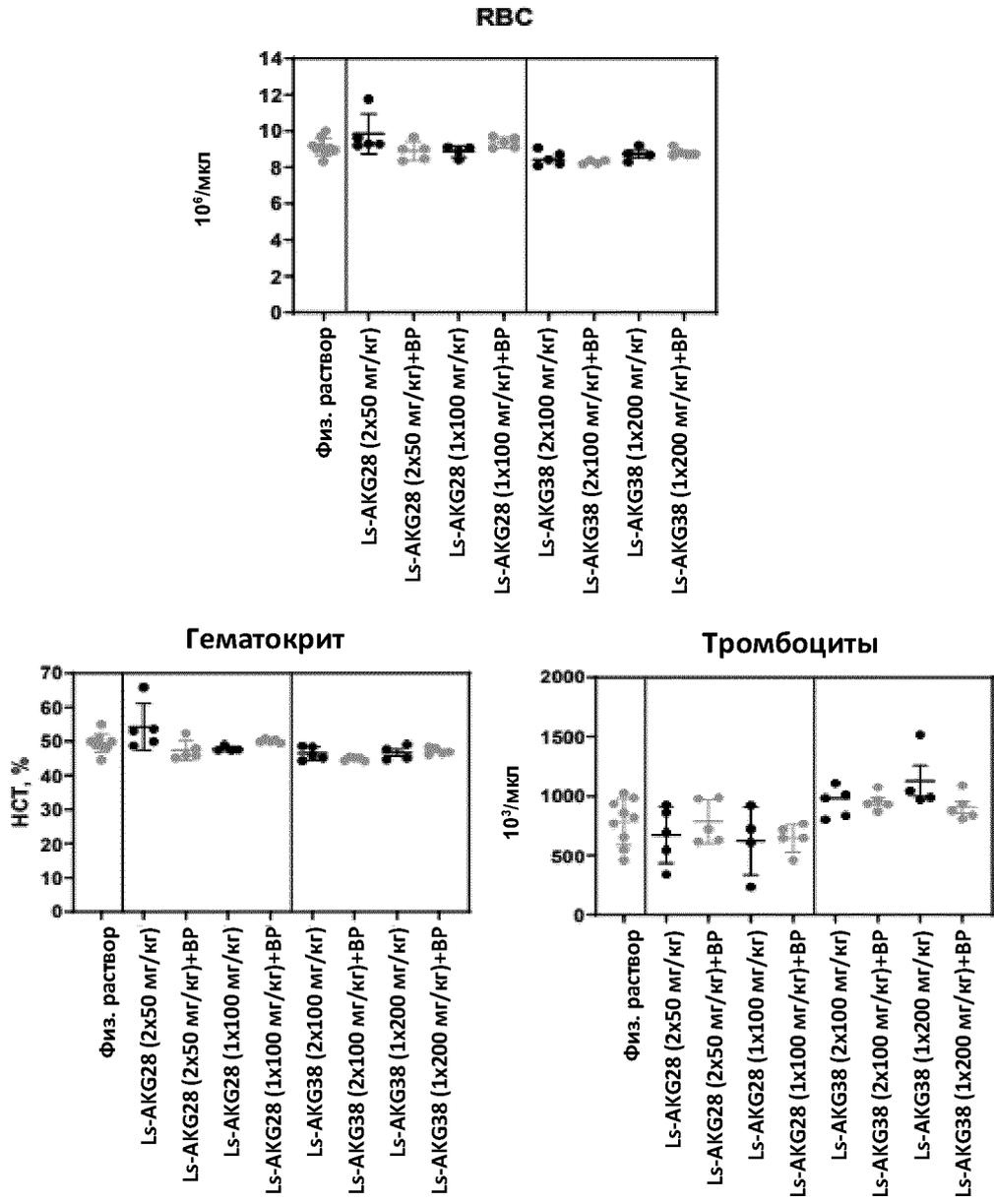
Фиг. 15А



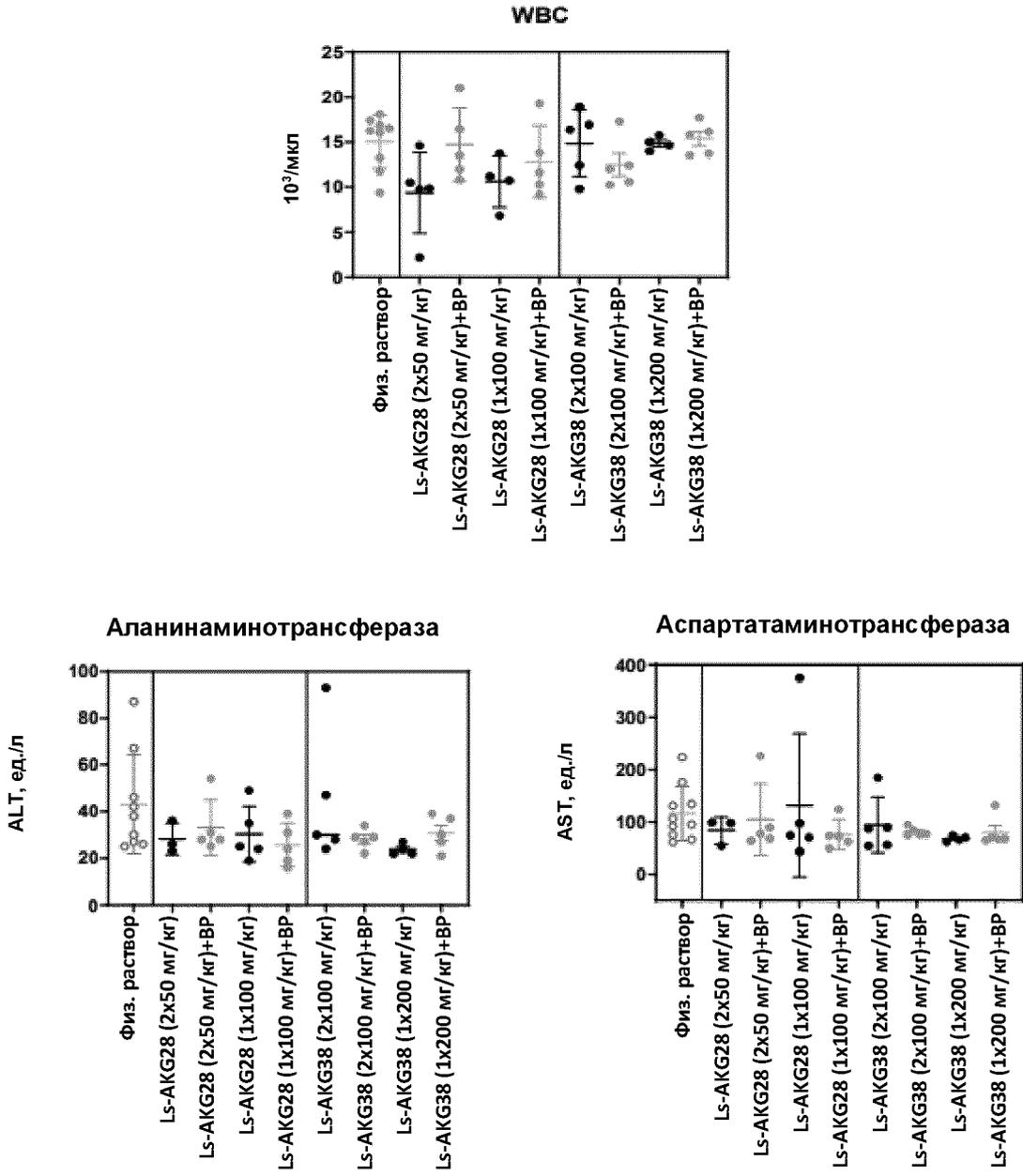
Фиг. 15В



Фиг. 15С



Фиг. 15С продолжение



Фиг. 15D

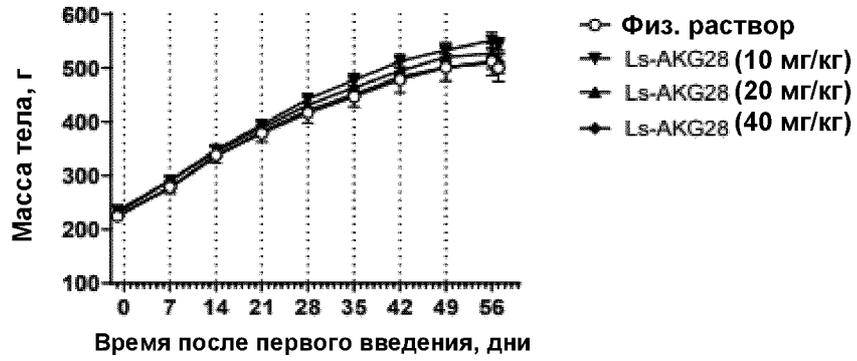
Физ. раствор	0	0	0	0	0	0	0
Ls-АКГ28 (2x50 мг/кг)	0	0	0	0	0.4	0	0
Ls-АКГ28 (2x50 мг/кг)+BP	0.2	0.2	0	0	0.6	0.2	0
Ls-АКГ28 (1x100 мг/кг)	0	0	0	0	0.4	0	0
Ls-АКГ28 (1x100 мг/кг)+BP	0	0	0	0	0.8	0	0.2
Ls-АКГ38 (2x100 мг/кг)	0.6	0.6	0	0.8	0.4	0	0
Ls-АКГ38 (2x100 мг/кг)+BP	0.8	0.4	0	0.4	0	0	0
Ls-АКГ38 (1x200 мг/кг)	0.8	0.2	0.4	0.6	0	0	0
Ls-АКГ38 (1x200 мг/кг)+BP	0.4	0.2	0.4	1.0	0	0	0
	Воспалительный инфильтрат в печени	Гепатоцеллюлярный некроз	Повышенный ЕМН в печени	Повышенный ЕМН в селезенке	Интерстициальный смешанный клеточный инфильтрат в легких	Легочный очаговый инфильтрат с макрофагами	Гранулема инородных тел в легких

Шкала оценки патологии

0 1 2 3 4 5

1=минимальная  
2=легкая  
3=средняя  
4=выраженная  
5=тяжелая

Фиг. 16А



Фиг. 16В

