

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991927 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.15

(22) Дата подачи заявки
2018.02.22

(51) Int. Cl. C07H 17/08 (2006.01)
A61K 31/7052 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(54) НОВЫЙ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЙ МАКРОЛИД

(31) 17157393.4

(32) 2017.02.22

(33) EP

(86) PCT/EP2018/054336

(87) WO 2018/153954 2018.08.30

(71) Заявитель:

ИМЬЮН СИСТЕМ РЕГУЛЕИШН
ХОЛДИНГ АБ (SE)

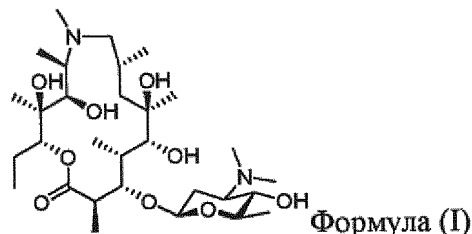
(72) Изобретатель:

Винквист Ола, Валлин Роберт, Линдх
Эмма (SE), Грегори Мэт, Мосс Стивен
(GB)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение обеспечивает имму-
ностимулирующий макролид. Макролид пригоден
при лечении вирусных заболеваний и рака.



A1

201991927

201991927

A1

НОВЫЙ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЙ МАКРОЛИД

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение обеспечивает новое макролидное соединение, способное стимулировать иммунную систему. Настоящее изобретение относится к новому соединению для применения в медицине, в частности, для лечения вирусных заболеваний, таких как ВИЧ, и для лечения хронических воспалительных заболеваний и онкологических заболеваний, при которых стимулирование иммунной системы является благоприятным. Соединение также может быть использовано в качестве иммуномодулирующего адъюванта при вакцинации. Новый макролид максимизирует модулирующие эффекты иммунной системы, сводя к минимуму терапевтически нежелательные прямые антибактериальные эффекты. Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения соединения по изобретению и применения этого соединения в медицине.

Предшествующий уровень техники

Макролиды, такие как эритромицин и азитромицин, годами использовались при лечении бактериальных инфекций. Эритромицин представляет собой поликетидный макролидный натуральный продукт, получаемый путем ферментации актиномицетов *Saccharopolyspora erythraea*. Азитромицин - это полусинтетическое азалидное производное эритромицина. Существует много ссылок, описывающих антибактериальную активность макролидов, таких как эритромицин. Этот антибактериальный механизм достигается за счет связывания молекулы с Р-сайтом бактериальной 50S рибосомы, что препятствует связыванию тРНК.

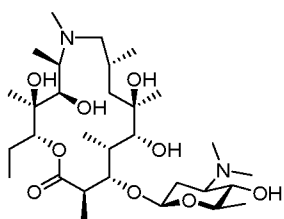
Многие ссылки описывают генерацию аналогов эритромицина посредством полусинтетических способов и биосинтетической инженерии. В частности, были описаны способы полусинтетического удаления гликозильных групп на эритромицине, дезозамине и микарозе. Были описаны другие способы биотрансформации для добавления альтернативных гликозильных групп к агликону эритромицина (например, см. Gaisser et al., 2000, Schell et al., 2008 и WO2001079520). Однако основное внимание в этой опубликованной работе было уделено созданию антибактериальных аналогов эритромицина.

Описание изобретения

Ранее не сообщалось об иммуностимулирующей активности макролидов, у которых отсутствует прямая антибактериальная активность. Неожиданно мы обнаружили,

что соединение по изобретению (соединение 1, фиг. 1) оказывало сильное иммуностимулирующее действие на несколько типов клеток иммунной системы. После 24-48 часов стимуляции *in vitro* мононуклеарных клеток периферической крови (МНКПК) 1 мкМ соединения 1 (фиг. 1) маркер активации CD69 подвергался повышающей регуляции на CD4 Т-клетках и В-клетках (фиг. 2). Мы также наблюдали повышающую регуляцию молекулы МНС класса I (HLA-ABC) на Т- и В-клетках (фиг. 3), что указывает на эффект антигенной презентации вирусных антигенов. Стимуляция моноцитов в популяции МНКПК соединением 1 приводила к повышающей регуляции ко-стимулирующей молекулы CD80, а также антигенпрезентирующей молекулы МНС класса II (HLA-DR) (фиг. 4). Моноциты, дифференцированные в макрофаги, также активировали CD80 в ответ на стимуляцию соединением 1 (фиг. 5). Кроме того, МНКПК, стимулированные соединением 1, экспрессировали измененный профиль цитокинов с повышенной продукцией иммуносупрессивного цитокина ИЛ-10, что указывает на иммуноингибирующий эффект при определенных условиях. Дальнейший анализ иммунологического эффекта соединения 1 выявил измененный цитокин-управляемый профиль пролиферации Т-клеток после шестидневной стимуляции, измеренный с помощью проточной цитометрии (фиг. 7). Кроме того, соединение 1 влияло на вирус-специфическую пролиферацию Т-клеток. МНКПК от инфицированных цитомегаловирусом (ЦМВ) доноров, культивированные в присутствии антигена ЦМВ и соединения 1, проявляли измененный фенотип активированных ЦМВ-специфических CD8⁺ Т-клеток с повышенной экспрессией рецептора ИЛ-7-альфа (CD127) (фиг. 8). CD127 имеет решающее значение для гомеостаза, дифференцировки и функции Т-клеток, а сниженная экспрессия коррелирует с тяжестью заболевания при ВИЧ и других хронических вирусных заболеваниях (Crawley et al. *Sem Imm* 2012). Таким образом, соединение 1 обладает удивительной способностью специфически активировать и модифицировать иммунный ответ путем воздействия на презентацию антигена, ко-стимуляцию, и активацию и пролиферацию Т-клеток. Во многих из этих исследований было включено соединение 2, другой родственный аналог макролида эритромицина с измененным гликозилированием, ранее опубликованный в Schell et al, 2008 (как соединение 20), так как он показал небольшую активность или ее отсутствие в анализах.

Таким образом, в одном аспекте изобретения предложен не-антибактериальный иммуностимулирующий макролид Формулы (I), соединение 1:

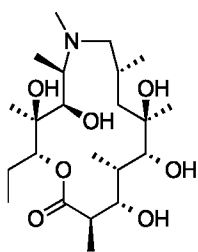


Формула 1

В объем настоящего изобретения входят также соединения Формулы (I) или их фармацевтически приемлемая соль, гидрат, сольват, таутомер, энантиомер или диастереомер.

Соединение не обладает значительной антибактериальной активностью, как определено в настоящей заявке.

В другом аспекте изобретения предложен способ получения соединения формулы (I), включающий добавление агликона формулы II к культуре биотрансформационного штамма, обеспечивающего гликозилирование в 3-гидроксильном положении.



Формула II

В предпочтительном варианте осуществления этого изобретения биотрансформационный штамм экспрессирует гликозилтрансферазы с 70% или более гомологией с AngMII (SEQ ID № 1) или AngMIII, или с 95% или более гомологией, такой как 100% гомология.

Гомология между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя последовательностями нуклеиновых кислот описывается параметром «идентичность». Выравнивание последовательностей и вычисление оценок гомологии может быть выполнено с использованием, например, полного выравнивания Смита-Уотермана, пригодного как для выравнивания белков, так и для ДНК. Матрица оценки по умолчанию BLOSUM50 и матрица идентичности используются для выравнивания белков и ДНК, соответственно. Штраф за первый остаток в гэпе составляет -12 для белков и -16 для ДНК, тогда как штраф за дополнительные остатки в гэпе составляет -2 для белков и -4 для ДНК. Выравнивание может быть выполнено с версией пакета FASTA v20u6. Множественные выравнивания белковых последовательностей могут быть выполнены с использованием «ClustalW». Множественное выравнивание последовательностей ДНК может быть выполнено с использованием белкового выравнивания в качестве матрицы, с заменой аминокислоты соответствующим кодоном из последовательности ДНК. Альтернативно, для выравнивания аминокислотных последовательностей и

последовательностей ДНК может использоваться разное программное обеспечение. Выравнивание двух аминокислотных последовательностей, например, выполняют с помощью программы Needle из пакета EMBOSS (<http://emboss.org>) версии 2.8.0. Используемая матрица замещения - BLOSUM62, штраф за открытие гэпа - 10, штраф за продление гэпа - 0,5.

Методы общей химии

Специалисту в данной области техники понятно, что соединение по изобретению может быть получено известным способом различными путями. Указанные ниже пути являются просто иллюстрацией некоторых способов, которые можно использовать для синтеза соединений формулы (I).

В одном общем способе эритромицин А подвергают полусинтетическим манипуляциям с получением азитромицина. Способы этого превращения известны (US 3478014; US 4328334; US 4474768, Glansdorp et al., 2008), хотя варианты этих или других способов могут быть использованы для той же цели. Микарозу/кладинозу и/или дезозамин удаляют другими химическими способами, такими как расщепление гликозида. Вкратце, в одном способе можно удалить сахара обработкой кислотой. Чтобы облегчить удаление аминсахара, сначала необходимо окислить диметиламин с образованием N-оксида, который затем удаляют пиролизом. Полученный 5-О сахар и 3-О сахар могут затем быть удалены кислотной деградацией. Подходящий способ описан LeMahieu (1974) и Djokic S., et al., 1988. Наконец, соединение подвергают биотрансформации с использованием бактериального штамма, который добавляет аминсахар.

Общее использование соединений по изобретению

Описанное в настоящей заявке соединение может быть использовано в медицине, медицинских исследованиях или при изготовлении композиции для такого применения. Соответственно, когда в дальнейшем термин «соединение по изобретению» используется в связи с медицинским применением или фармацевтической композицией, подразумевается, что этот термин также включает соединение формулы 1 при условии, что это соединение не было известно для такого применения.

Соединение по изобретению разработано для того, чтобы минимизировать прямые антибактериальные эффекты, а скорее сосредоточиться на иммуностимулирующих свойствах. При добавлении соединения 1 к культурам бактерий *E. coli*, *S. salivarius*, *L. casei*, *B. longum* или *M. luteus* антибактериальный эффект не обнаруживается или является минимальным. Преимущество наличия соединения с изолированными иммуностимулирующими свойствами, которые воздействуют на клетки-хозяева, состоит в том, что предотвращается развитие резистентности бактерий. Кроме того,

предотвращается известный побочный эффект макролидов, влияющих на микробиоту кишечника, с риском чрезмерного роста *Clostridium difficile*, что вызывает диарею и псевдомембранозный колит. Многие вирусы и злокачественные новообразования разработали механизмы, позволяющие избежать иммунного распознавания, то есть путем подавления экспрессии HLA они избегают обнаружения Т-клетками. Механизм терапевтического соединения основан на активации и повышенной экспрессии молекул HLA на инфицированных клетках. Молекулы HLA загружают и презентуют пептиды, полученные из внутриклеточных инфекционных агентов, чтобы предоставить сигнал распознавания для Т-клеток, позволяющий элиминировать инфицированные клетки.

Раскрытое в настоящей заявке соединение по изобретению может быть использовано для лечения заболеваний, расстройств, состояний и симптомов, где полезна стимуляция иммунного ответа, таких как лечение пациентов, инфицированных вирусными агентами или страдающих заболеваниями, вызванными вирусами, такими как ВИЧ, аденовирус, альфа-вирус, арбовирус, вирус болезни Борна, буньявирус, калицивирус, остроконечная кондилома, коронавирус, вирус Коксаки, цитомегаловирус, вирус лихорадки Денге, контагиозная эктима, вирус Эпштейна-Барр, инфекционная эритема, хантавирус, вирусная геморрагическая лихорадка, вирусный гепатит, вирус простого герпеса, вирус опоясывающего герпеса, инфекционный мононуклеоз, грипп, вирус лихорадки Ласса, корь, паротит, контагиозный моллюск, парамиксовирус, флеботомная лихорадка, вирус полиомы, лихорадка долины Рифт, краснуха, медленная вирусная инфекция, оспа, подострый склерозирующий панэнцефалит, опухолевые вирусные инфекции, вирус Западного Нила, вирус желтой лихорадки, вирус бешенства и респираторный синцитиальный вирус. В частности, соединения по изобретению могут быть использованы для лечения ВИЧ/СПИДа.

Кроме того, предполагается, что соединение пригодно для применения при лечении рака, в частности, такого как рак надпочечников, анальный рак, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, опухоли головного мозга/ЦНС, рак молочной железы, болезнь Кастлемана, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаза, рак желчного пузыря, карциноидные опухоли ЖКТ, желудочно-кишечные стромальные опухоли (GIST), гестационная трофобластическая болезнь, болезнь Ходжкина, саркома Капоши, рак почки, рак гортани и гипофарингеальный рак, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, карциноидная опухоль легкого, лимфома, злокачественная мезотелиома,

множественная миелома, миелодиспластический синдром, рак полости носа и параназального синуса, рак носоглотки, нейробластома, не-Ходжкинская лимфома, рак полости рта и ротоглотки, остеосаркома, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак полового члена, опухоли гипофиза, рак простаты, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак слюнной железы, базально-клеточный и плоскоклеточный рак кожи, меланома, рак кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, рак желудка, рак яичка, рак тимуса, рак щитовидной железы, саркома матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемия Вальденстрема, опухоль Вильмса.

Таким образом, преимущественные свойства соединения изобретения по сравнению с макролидами предшествующего уровня техники могут включать одно или несколько из следующего:

- сниженная прямая антибактериальная активность
- улучшенная стимуляция МНС класса I
- улучшенная иммуномодуляция
- улучшенная активация антигенпрезентирующих клеток
- улучшенный Т-клеточный ответ
- улучшенная противовирусная активность
- улучшенная презентация антигена МНС класса II.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение по изобретению

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по изобретению вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями. Аналогичным образом, настоящее изобретение также относится к фармацевтическому набору, включающему по меньшей мере одну фармацевтическую композицию, содержащую соединение по изобретению вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Настоящее изобретение также относится к косметическим или ветеринарным композициям, содержащим соединение по изобретению вместе с одним или несколькими косметически или ветеринарно приемлемыми вспомогательными веществами.

Соединение по изобретению или фармацевтические, косметические или ветеринарные композиции, содержащие соединение по изобретению, можно вводить любым обычным путем, например, его можно вводить парентерально, перорально, местно или через слизистую оболочку (включая буккальное, сублингвальное, трансдермальное, вагинальное, ректальное, назальное, глазное введение и т.д.), с помощью медицинского устройства (например, стента) или путем ингаляции, но не ограничиваясь этим. Лечение

может состоять из одного введения или множества введений в течение периода времени.

Лечение можно проводить путем введения один раз в день, два раза в день, три раза в день, четыре раза в день и т.д., в зависимости от конкретного заболевания, подлежащего лечению, и массы тела и возраста пациента, подлежащего лечению. Лечение также может быть непрерывным введением, таким как, например, внутривенное введение путем капельной инфузии.

Хотя соединение по настоящему изобретению можно вводить как таковое, предпочтительно представлять его в виде фармацевтической композиции вместе с одним или несколькими приемлемыми носителями. Носитель(и) должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с соединением по изобретению и не наносить вреда его реципиентам. Примеры подходящих носителей описаны более подробно ниже.

Композиции могут быть удобно представлены в подходящей лекарственной форме, включая стандартную лекарственную форму, и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармацевтики. Такие способы включают стадию объединения активного ингредиента (соединения по изобретению) с носителем, который составляет один или несколько дополнительных ингредиентов. Как правило, составы готовят путем равномерного и тесного объединения активного ингредиента с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или теми и другими, а затем, если необходимо, придания формы продукту.

Соединение по изобретению обычно вводят любым удобным путем введения, обычно пероральным или любым парентеральным путем, в форме фармацевтической композиции, содержащей активный ингредиент, при необходимости в форме нетоксичной соли присоединения органической или неорганической кислоты или основания, в фармацевтически приемлемой лекарственной форме. В зависимости от заболевания и пациента, получающего лечение, а также пути введения, композиции могут вводиться в различных дозах и/или с разной частотой.

Фармацевтические композиции должны быть стабильными в условиях производства и хранения; таким образом, при необходимости их следует оберегать от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. В случае жидких составов, таких как растворы, дисперсии, эмульсии и суспензии, носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), растительные масла и их подходящие смеси.

Например, соединение по изобретению можно вводить перорально, буккально или сублингвально в форме таблеток, капсул, пленок, овул, эликсиров, растворов, эмульсий

или суспензий, которые могут содержать ароматизаторы или красители.

Составы в соответствии с настоящим изобретением, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде отдельных единиц, таких как капсулы, саше или таблетки, каждая из которых содержит заранее определенное количество активного ингредиента, таких как множественные формы, например, в форме таблетки или капсулы: в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной жидкости или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или жидкой эмульсии вода-в-масле. Активный ингредиент также может быть представлен в виде болюса, электуария или пасты.

Растворы или суспензии соединения по изобретению, подходящие для перорального введения, могут также содержать один или несколько растворителей, включая воду, спирт, полиол и т.д., а также одно или несколько вспомогательных веществ, таких как агент, регулирующий pH, стабилизирующие агенты, сурфактанты, солюбилизаторы, диспергирующие агенты, консерванты, ароматизаторы и т.д. Конкретные примеры включают, например, N,N-диметилацетамид, диспергаторы, например, полисорбат 80, сурфактанты и солюбилизаторы, например, полиэтиленгликоль, Phosal 50 PG (который состоит из фосфатидилхолина, соевых жирных кислот, этанола, моно/диглицеридов, пропиленгликоля и аскорбилпальмитата). Составы согласно настоящему изобретению также могут быть в форме эмульсий, где соединение согласно формуле (I) может присутствовать в эмульсии, такой как эмульсия масло-в-воде или эмульсия вода-в-масле. Масло может быть натуральным или синтетическим маслом, или любым маслоподобным веществом, таким как, например, соевое масло или сафлоровое масло, или их комбинации.

Таблетки могут содержать наполнители, такие как микрокристаллическая целлюлоза, лактоза (например, моногидрат лактозы или безводная лактоза), цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция и глицин, бутилированный гидрокситолуол (E321), кросповидон, гипромеллоза; дезинтегранты, такие как крахмал (предпочтительно кукурузный, картофельный крахмал или крахмал тапиоки), натрия крахмал гликолят, кроскармеллоза натрия и некоторые комплексные силикаты; и гранулирующие связующие агенты, такие как поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ), макрогол 8000, сахароза, желатин и аравийская камедь. Кроме того, могут быть включены смазки, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, глицерил бегенат и тальк.

Таблетка может быть изготовлена прессованием или формовкой, при необходимости с одним или несколькими дополнительными ингредиентами.

Прессованные таблетки могут быть приготовлены путем прессования в подходящем устройстве активного ингредиента в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, при необходимости смешанные со связующим веществом (например, повидоном, желатином, гидроксипропилметилцеллюлозой), смазочным, инертным разбавителем, консервантом, дезинтегрантом (например, крахмалгликолятом натрия, сшитым повидоном, сшитой натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активным или диспергирующим агентом. Формованные таблетки могут быть получены путем формования в подходящем аппарате смеси порошкообразного соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем. Таблетки могут быть при необходимости покрыты оболочкой или снабжены линией разлома, и могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение содержащегося в них активного ингредиента с использованием, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для обеспечения необходимого профиля высвобождения.

Твердые композиции подобного типа также могут быть использованы в качестве наполнителей в желатиновых капсулах. Предпочтительные вспомогательные вещества в этом отношении включают лактозу, крахмал, целлюлозу, молочный сахар или полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой. Для водных суспензий и/или эликсиров соединения по изобретению можно комбинировать с различными подсластителями или ароматизаторами, красителями или пигментами, с эмульгирующими и/или суспендирующими агентами и с разбавителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин, и их комбинации.

Композиции, пригодные для местного применения в полости рта, включают леденцы, содержащие активный ингредиент на ароматизированной основе, обычно сахарозу и аравийскую камедь или камедь трагаканта; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин, или сахароза и аравийская камедь; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Фармацевтические композиции, адаптированные для местного применения, могут быть приготовлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, пропитанных повязок, спреев, аэрозолей или масел, трансдермальных устройств, присыпок и тому подобного. Эти композиции могут быть получены обычными способами, включающими активный агент. Таким образом, они могут также включать совместимые обычные носители и добавки, такие как консерванты, растворители, способствующие проникновению лекарств, смягчающие средства в кремах или мазях и этанол или олеиловый спирт для лосьонов. Такие носители могут присутствовать в

количестве примерно от 1% до 98% от композиции. Чаще всего они будут составлять примерно до 80% композиции. Только в качестве иллюстрации, крем или мазь готовят путем смешивания достаточных количеств гидрофильного материала и воды, содержащих от 5 до 10 масс.% соединения, в достаточных количествах для получения крема или мази, имеющих необходимую консистенцию.

Фармацевтические композиции, адаптированные для трансдермального введения, могут быть представлены в виде дискретных пластырей, предназначенных для того, чтобы оставаться в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Например, активный агент может быть доставлен из пластыря с помощью ионтофореза.

Для нанесения на внешние ткани, например, на полость рта и кожу, композиции предпочтительно наносят в виде мази или крема для местного применения. При изготовлении в виде мази активный агент можно применять с парафиновой или смешивающейся с водой основной мази.

Альтернативно, активный агент может быть составлен в виде крема с основной крема масло-в-воде или вода-в-масле.

Для парентерального введения жидкие стандартные лекарственные формы готовят с использованием активного ингредиента и стерильного носителя, например, с водой, спиртами, полиолами, глицерином и растительными маслами, но не ограничиваясь ими, причем вода является предпочтительной. Активный ингредиент, в зависимости от используемого носителя и концентрации, может быть коллоидным, суспендированным или растворенным в носителе. При приготовлении растворов активный ингредиент может быть растворен в воде для инъекций и стерилизован фильтрацией перед розливом в подходящий флакон или ампулу, и герметизацией.

Предпочтительно такие агенты, как местные анестетики, консерванты и буферные агенты, могут быть растворены в носителе. Для повышения стабильности композиция может быть заморожена после розлива во флакон, а вода удалена под вакуумом. Сухой лиофилизированный порошок затем герметизируют во флаконе, и может быть обеспечен сопутствующий флакон с водой для инъекций для восстановления жидкости перед использованием.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии. Кроме того, композиции могут быть в форме стерильных порошков для немедленного приготовления таких стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях готовая инъекционная форма должна быть стерильной и должна быть эффективно

жидкой для легкого введения посредством шприца.

Парентеральные суспензии готовят по существу таким же образом, как и растворы, за исключением того, что активный ингредиент суспендируют в носителе, а не растворяют, и стерилизация не может быть выполнена путем фильтрации. Активный ингредиент можно стерилизовать путем обработки окисью этилена перед суспендированием в стерильном носителе. Предпочтительно, сурфактант или смачивающий агент включают в композицию для облегчения равномерного распределения активного ингредиента.

Следует понимать, что в дополнение к ингредиентам, в частности упомянутым выше, составы по данному изобретению могут включать другие агенты, общепринятые в данной области техники, с учетом типа рассматриваемого состава, например, те составы, которые подходят для перорального применения, могут включать ароматизаторы. Специалист в данной области техники будет знать, как выбрать подходящую композицию и как ее приготовить (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 18 Ed. или более позднюю версию). Специалист в данной области также знает, как выбрать подходящий способ введения и дозировку.

Специалист в данной области поймет, что оптимальное количество и интервал между отдельными дозами соединения по изобретению будут определяться природой и степенью заболевания, подлежащего лечению, формой, путем и местом применения, а также возрастом и состоянием конкретного субъекта, подлежащего лечению, и то, что врач в конечном итоге определит подходящие дозы, которые будут использоваться. Это введение лекарства может повторяться так часто, как это необходимо. В случае развития побочных эффектов количество и/или частота введения лекарства могут быть изменены или уменьшены в соответствии с обычной клинической практикой.

Все значения в процентах упомянутые в настоящей заявке, являются массовыми процентами, если контекст не требует иного.

Определения

Формы единственного числа используются в данном документе для обозначения одного или более чем одного (то есть, по меньшей мере одного) грамматического объекта. В качестве примера «аналог» означает один аналог или более чем один аналог.

Используемый в настоящей заявке термин «соединение(я) по изобретению» используется взаимозаменяемо и относится к соединениям формулы (I).

Используемый в настоящей заявке термин «прямой антибактериальный эффект» относится к антибактериальной активности эритромицина и аналогов, осуществляемой в результате связывания с комплексом бактериальной рРНК. Этот эффект не требует

присутствия каких-либо компонентов иммунной системы хозяина и поэтому проявляется в стандартных антибактериальных анализах, таких как анализы минимальной ингибирующей концентрации (MIC) *in vitro* и дисковые анализы ингибирования.

Используемый в настоящей заявке термин «без значительной антибактериальной активности» предназначен для обозначения того, что соединение по изобретению имеет значение MIC > 64 мкг/мл при тестировании в соответствии с Примером 2, приведенным в настоящем документе, на его антибактериальную активность в отношении *E. coli*, *S. salivarius*, *L. casei* и *B. longum*.

Фармацевтически приемлемые соли соединения по изобретению включают обычные соли, образованные из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот или оснований, а также четвертичные аммонийные соли добавления кислоты. Более конкретные примеры подходящих кислот для солей включают соляную, бромистоводородную, серную, фосфорную, азотную, перхлорную, фумаровую, уксусную, пропионовую, янтарную, гликолевую, муравьиную, молочную, малеиновую, винную, лимонную, памоевую, малоновую, гидроксималеиновую, фенилуксусную, глутаминовую, бензойную, салициловую, толуолсульфоновую, метансульфоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую, гидроксинафтойную, иодистоводородную, яблочную, стеариновую, дубильную и тому подобные. Другие кислоты, такие как щавелевая кислота, хотя сами по себе они не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть пригодны при получении солей, полезных в качестве промежуточных соединений при получении соединений по изобретению и их фармацевтически приемлемых солей. Более конкретные примеры подходящих основных солей включают соли натрия, лития, калия, магния, алюминия, кальция, цинка, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, холина, диэтанолamina, этилендиамина, N-метилглюкамина и прокаина.

Подписи к чертежам

Фиг. 1. Структуры макролидов эритромицина А, соединения 1, соединения 2, соединения 3 и EM703.

Фиг. 2. Повышающая регуляция CD69 на Т- и В-клетках. МНКПК обрабатывали в течение 24 часов соединением 1, соединением 2 и контролями активации ЛПС и ИФН-гамма. Экспрессию маркера ранней активации CD69 измеряли на популяции CD4⁺ Т-клеток (слева) и CD19⁺ В-клеток (справа) с помощью проточной цитометрии. Значения представляют среднюю интенсивность флуоресценции, MFI, а планки погрешностей показывают стандартное отклонение в трех образцах.

Фиг. 3. Повышающая регуляция HLA-A, В, С на Т- и В-клетках. МНКПК обрабатывали в течение 24 часов соединениями 1 или 2 и контролями активации ЛПС и

ИФН- γ . Экспрессию HLA-A, B, C измеряли на популяции CD4⁺ Т-клеток (слева) и CD19⁺ В-клеток (справа) с помощью проточной цитометрии. Значения представляют среднюю интенсивность флуоресценции, MFI, а планки погрешностей показывают стандартное отклонение в трех образцах.

Фиг. 4. Повышающая регуляция CD80 и HLA-DR на моноцитах крови. МНКПК обрабатывали в течение 24 часов соединениями 1 или 2, а также контролями активации ЛПС и ИФН-гамма. Экспрессию CD80 и HLA-DR измеряли на популяции моноцитов с помощью проточной цитометрии. Значения представляют среднюю интенсивность флуоресценции, MFI, а планки погрешностей показывают стандартное отклонение в трех образцах.

Фиг. 5. Повышающая регуляция CD80 на моноцитах крови. МНКПК обрабатывали в течение 24 часов соединениями 1 или 2, а также контролем активации ИФН-гамма. Экспрессию CD80 измеряли на популяции моноцитов с помощью проточной цитометрии. Значения представляют среднюю интенсивность флуоресценции, MFI, а планки погрешностей показывают стандартное отклонение в трех образцах.

Фиг. 6. Продукция ИЛ-10 из МНКПК после стимуляции соединением 1 в течение 48 часов или 1 недели, измеренная с помощью ИФА.

Фиг. 7. Пролиферация CD4 Т-клеток после 6-дневной стимуляции соединением 1, измеренная с помощью пролиферативного красителя CellTrace™ фиолетового (Invitrogen) и проточной цитометрии. Необработанные клетки (UNT) или соединение 2 использовали в качестве контроля.

Фиг. 8. Повышающая регуляция рецептора ИЛ-7 α (CD127) на ЦМВ-специфичных CD8 Т-клетках после инкубации с соединением 1, измеренная с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 9. Секреция интерферона-гамма (измеренная с помощью цитометрического анализа на гранулах) из МНКПК (от донора ЦМВ⁺), выращенных с ЦМВ пептидами в присутствии или при отсутствии соединения 1 или 2 в течение 5 дней.

Фиг. 10. Секреция интерферона-гамма (измеренная с помощью цитометрического анализа на гранулах) от макрофагов, стимулированных указанным соединением в течение 48 часов.

Фиг. 11. Секреция хемокина RANTES (по данным цитометрического анализа на гранулах) от МНКПК или макрофагов, стимулированных указанным соединением в течение 48 часов.

Фиг. 12. Секреция IL12p70 (измеренная с помощью цитометрического анализа на гранулах) от МНКПК или макрофагов, стимулированных указанным соединением в

течение 48 часов.

Фиг. 13. Секретия ИЛ-1b (измеренная с помощью цитометрического анализа на гранулах) МНКПК, макрофагами или CD4 Т-клетками, стимулированными указанным соединением в течение 48 часов.

Фиг. 14. Процент клеток с высоким содержанием CD25 в крови мышей C57bl/6, которым 24 часа ранее вводили указанную дозу соединения 1. Экспрессию CD25 измеряли проточной цитометрией.

Фиг. 15. Процент CD11b⁺ клеток с высоким уровнем МНС класса I в селезенке 3 отдельных мышей C57bl/6, которым вводили 24 часа ранее указанное соединение. Экспрессию МНС класса I и CD11b измеряли проточной цитометрией.

Описание экспериментов

Материалы

Если не указано иное, все реагенты, используемые в приведенных ниже примерах, получены из коммерческих источников.

Антитела

Анти-CD80 V450, анти-CD69 PE, анти-HLA-DR APC-R700, анти-CD127-APC и анти-HLA-A, B, C FITC были получены от BD Biosciences. CellTrace™ фиолетовый для анализа пролиферации Т-клеток был получен от Invitrogen. Антитела для ИФА были получены от BD Biosciences.

Среда

RPMI-1640 (Invitrogen) с добавлением 25 mM HEPES, L-глутамина, натрия пирувата, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco), 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Общие биологические методы

Влияние соединений по изобретению на иммуностимуляцию можно проверить с использованием одного или нескольких способов, описанных ниже.

Общий способ для соединений

Анализ соединений - растворимость и стабильность в растворе.

Анализ ферментационных бульонов и соединений

Аликвоту ферментационного бульона, полученного, как описано ниже, энергично встряхивали в течение 30 минут с равным объемом этилацетата, а затем разделяли центрифугированием, или уже выделенные соединения растворяли в смеси метанол: вода (9:1; 0,1 мг/мл), а затем разделяли центрифугированием. Надосадочную жидкость анализировали с помощью ЖХ-МС и ЖХ-МС/МС, и хроматографию проводили на дезактивированном основанием кремнеземе Luna C18 с обращенной фазой (размер частиц

5 микрон), используя колонку ВЭЖХ Luna (250 × 4,6 мм; Phenomenex (Макклсфилд, Великобритания)), нагретой до 40°C. Система ВЭЖХ Agilent 1100 состояла из насоса для четырехкомпонентных смесей, автоматического пробоотборника, колоночной печи и детектора с диодной матрицей, соединенного с ионной ловушкой Bruker Esquire MS.

Подвижная фаза А = 0,1% муравьиная кислота в воде

Подвижная фаза В = 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле

Градиент: Т = 0 мин, В = 50%; Т = 4,5 мин, В = 50%; Т = 7 мин, В = 100%; Т = 10,5 мин, В = 100%; Т = 10,75 мин, В = 50%; Т = 13 мин, В = 50%.

Соединения были идентифицированы с помощью ЖХ-МС и ЖХ-МС/МС и количественно определены с помощью ЖХ-МС/МС по внутреннему стандарту.

Анализ маркера экспрессии методом проточной цитометрии

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МНКПК) от здоровых доноров выделяли центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640 (Invitrogen) с добавлением 25 мМ HEPES, L-глутамина, пирувата натрия (Sigma), 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Nyclyone) в течение 24-72 часов при 37°C, 5% CO₂, и стимулировали повышающимися концентрациями соединений 1 и 2. Затем клетки промывали в ФБР и окрашивали моноклональными антителами, специфичными для маркеров клеточной поверхности (BD Pharmingen), и анализировали в проточном цитометре BD FACS Canto II. Все образцы были проверены в двух экземплярах.

Цитомегаловирусные (ЦМВ) культуры

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МНКПК) выделяли у здоровых ЦМВ-положительных доноров центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque. МНКПК метили 5 мкМ CellTrace™ фиолетового (Invitrogen) в ФБР в течение 15 минут, и затем промывали полной средой для культивирования клеток. Меченые МНКПК культивировали в присутствии пептидной библиотеки, охватывающей белок ЦМВ pp65 (1 мкг пептида/мл, JPT) в среде AIM-V (Invitrogen), с добавлением L-глутамина, пирувата натрия (Sigma), 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Nyclyone) в течение 6-8 дней при 37°C, 5% CO₂. Пролиферацию клеток оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием проточного цитометра BD FACS Canto II.

ИФА

ИЛ-10 в надосадочной жидкости измеряли с помощью стандартного сэндвич-ИФА (все антитела от BD Biosciences) после 48 часов и 7 дней инкубации с 2,5 мкМ соединения 1 и 100 ед./мл ИЛ-2 (Miltenyi Biotechnologies) в полной среде RPMI, 37°C, 5% CO₂.

Анализ TLR2

Образцы и контроли тестировали в двух экземплярах на рекомбинантных клеточных линиях HEK-293-TLR с использованием анализа клеточного репортера от Invivogen с использованием стандартных условий анализа, указанных производителем. Эти клеточные линии функционально сверхэкспрессируют человеческий белок TLR2, а также репортерный ген, который является секретируемой щелочной фосфатазой (SEAP). Продукция этого репортерного гена управляется индуцируемым NFκB промотором. Результаты активации репортерных клеточных линий TLR приведены в виде значений оптической плотности (ОП).

20 мкл каждого испытуемого образца использовали для стимуляции клеточных линий с репортером hTLR2 в 200 мкл конечного реакционного объема. Образцы тестировали в двух экземплярах, по меньшей мере с двумя аналитическими концентрациями - 20 мкМ и 10 мкМ.

Оценка проницаемости клеток (двунаправленная)

10 мкМ испытуемого образца добавляли к апикальной (А) поверхности монослоев клеток Сасо-2 (в буфере HBSS с 0,3% ДМСО и 5 мкМ LY при 37°C) и измеряли проникновение соединения в базолатеральный (В) компартмент после 90-минутной инкубации. Это также выполняли в обратном направлении (от базолатерального к апикальному) для исследования активного транспорта. ЖХ-МС/МС использовали для количественного определения уровней как тестируемых, так и стандартных контрольных соединений. Коэффициент эффлюкса рассчитывали путем деления проницаемости от А к В на проницаемость В к А.

Проницаемость лекарства: $P_{app} = (VA / (\text{Площадь} \times \text{время})) \times ([\text{лекарство}]_{\text{акцептор}} / ([\text{лекарство}]_{\text{исходное, донор}} \times \text{коэффициент разбавления}))$.

Оценка метаболической стабильности (анализ стабильности микросом)

Скорость метаболизма в микросомах оценивали следующим образом.

Микросомы печени человека разбавляли буфером С (0,1 М калий-фосфатный буфер, 1,0 мМ ЭДТА, pH 7,4) до концентрации 2,5 мг/мл. Исследования микросомальной стабильности проводили путем добавления 30 мкл раствора с добавкой 1,5 мкМ соединения в лунки (1,5 мкл 500 мкМ раствора с добавкой (10 мкл 10 мМ исходного раствора ДМСО в 190 мкл ACN для равномерного получения конечной концентрации испытуемого раствора 1 мкМ) и 18,75 мкл 20 мг/мл микросом печени в 479,75 мкл буфера С). Все образцы предварительно инкубировали в течение приблизительно 15 минут при 37°C. После этого реакцию инициировали добавлением 15 мкл раствора НАДФН (6 мМ) при осторожном перемешивании. Аликвоты (40 мкл) извлекали через 0, 5, 15, 30 и 45

минут и гасили АСН, содержащим внутренний стандарт (135 мкл). Белок извлекали центрифугированием (4000 об./мин, 15 мин), и планшет для образцов анализировали на концентрацию соединения с помощью ЖХ-МС/МС. Затем рассчитывали периоды полураспада по стандартным методам, сравнивая концентрацию анализируемого вещества с первоначально присутствующим количеством.

Примеры

Пример 1. Получение соединения 1

Получение аз-АГ

Агликон азитромицина был получен с использованием методов, описанных в литературе (Djokic, S., et al., 1988). Вкратце, азитромицин превращается в агликон азитромицина путем кислотного удаления сахаров 3-О и 5-О. Аминосахар 5-О сначала окисляют и подвергают пиролизу для облегчения расщепления.

Получение биотрансформационных штаммов, способных гликозилировать агликоны эритромицина (эритронолиды)

Получение *S. erythraea* 18A1 (pAES52)

pAES52, экспрессионную плазмиду, содержащую angAI, angAII, angCVI, ang-orf14, angMIII, angB, angMI и angMII вместе с системой экспрессии actII-ORF4 pactI/III (Rowe et al., 1998), получали следующим образом.

Гены биосинтеза сахара анголамицина амплифицировали из космидной библиотеки штамма *Saccharopolyspora erythraea* ATCC23956, полученной из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния, США). Последовательность кластера биосинтетических генов была депонирована в GenBank на <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> под номерами EU038272.1, EU220288.1 и EU232693.1 (Schell, 2008).

Биосинтетическая генная кассета была собрана в векторе pSG144, как описано ранее (Schell, 2008, ESI), с добавлением последовательных генов до тех пор, пока не были получены 8, необходимые для биосинтеза сахара, создавая плазмиду pAES52.

pAES52 трансформировали в штамм 18A1 (WO2005054265).

Трансформация pAES52 в *S. erythraea* 18A1

pAES52 трансформировали протопластом в *S. erythraea* 18A1 с использованием стандартных методов (Kieser et al. 2000, Gaisser et al. 1997). Полученный штамм был обозначен как ISOM-4522, который депонирован в NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Баксберн, Абердин, AB21 9YA, Великобритания 24 января 2017 года с номером доступа: NCIMB 42718.

Получение *S. erythraea* SGT2 (pAES54)

pAES54, экспрессионная плаزمида, содержащая angAI, angAII, angCVI, ang-orf14, angMIII, angB, angMI и angMII вместе с системой экспрессии actII-ORF4 pactI/III (Rowe et al., 1998), была получена следующим образом.

Гены биосинтеза сахара анголамицина амплифицировали из космидной библиотеки штамма *S. erythraeus* ATCC23956, полученной из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния, США). Последовательность кластера биосинтетического гена была депонирована как EU038272, EU220288 и EU232693 (Schell, 2008).

Биосинтетическая генная кассета была собрана в векторе pSG144, как описано ранее (Schell, 2008, ESI), с добавлением последовательных генов до тех пор, пока не были получены 8, необходимые для биосинтеза сахара, с получением плазмиды pAES52.

Плазмида pAES54 была получена путем лигирования фрагмента SpeI-NheI 11,541 п.о., содержащего промоторную систему actII-ORF4 pactI/III, и гены 8 ang были вырезаны из pAES52 с помощью фрагмента XbaI-SpeI 5,087 п.о. из pGP9, содержащего ген устойчивости к апрамицину oriC, oriT для переноса в стрептомицеты, и phiBT1 интегразу с сайтом attP для интегративной трансформации. (Совместимые сайты NheI и XbaI были удалены во время лигирования).

Затем pAES54 трансформировали в *S. erythraea* SGT2 (Gaisser et al. 2000, WO2005054265).

Трансформация pAES54 в *S. erythraea* SGT2

pAES54 переносили путем конъюгации в *S. erythraea* SGT2 с использованием стандартных методов. Вкратце, *E. coli* ET12567 pUZ8002 трансформировали pAES54 с помощью стандартных процедур и распределяли на 2TY с отбором с использованием апрамицина (50 мкг/мл), канамицина (50 мкг/мл) и хлорамфеникола (33 мкг/мл). Этот планшет инкубировали при 37°C в течение ночи. Колонии из этого использовали для создания свежих жидких культур 2TY, которые инкубировали при 37°C до достижения поздней логарифмической фазы. Клетки собирали, промывали, смешивали со спорами *S. erythraea* SGT2, распределяли по чашкам R6 и инкубировали при 28°C. Через 24 часа эти планшеты покрывали 1 мл стерильной воды, содержащей 3 мг апрамицина и 2,5 мг налидиксовой кислоты, и инкубировали при 28°C в течение еще 5-7 дней. Экзонъюганты на этом планшете переносили на свежие планшеты с R6, содержащие апрамицин (100 мкг/мл).

Альтернативный биотрансформационный штамм

Альтернативно, BIOT-2945 (Schell et al., 2008) может использоваться в качестве штамма для биотрансформации, поскольку это также добавляет анголозамин к

эритронолидам.

Биотрансформация Азитромицина агликона

Колбы Эрленмейера (250 мл), содержащие среду SV2 (40 мл) и 8 мкл тиострептона (25 мг/мл), инокулировали 0,2 мл исходного раствора спор штамма ISOM-4522 и инкубировали при 30°C, и встряхивали при 300 об./мин с 2,5 см амплитудой в течение 48 часов.

Среда SV2

Ингредиент	Количество
Глицерин	15 г
Глюкоза	15 г
Соевый пептон A3SC	15 г
NaCl	3 г
CaCO ₃	1 г
Вода, очищенная обратным осмосом	До конечного объема 1 л
Значение pH до стерилизации доводили до 7,0 с 10 М HCl. Стерилизовали в автоклаве при 121°C, 30 минут	

Готовили стерильные пробирки Falcon® с пробками (50 мл), содержащие среду EryPP (7 мл), и инокулировали культурой из посевной колбы (0,5 мл на пробирку Falcon®) без антибиотиков. Пробирки инкубировали при 30°C и встряхивали при 300 об./мин с амплитудой 2,5 см в течение 24 часов.

Среда ERYPP

Ингредиент	Количество
Жареная соевая мука (Nutrisoy)	30 г
Глюкоза	50 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 г
NaCl	5 г
CaCO ₃	6 г
Вода, очищенная обратным осмосом	До конечного объема 1 л
Значение pH до стерилизации доводили до 7,0 с 10 М HCl. Стерилизовали на месте в автоклаве при 121°C, 30 минут. После стерилизации добавляли 10 мл/л пропан-1-ола.	

Через 24 часа в каждую пробирку Falcon® добавляли азитромицин агликон (0,5 мМ в ДМСО, 50 мкл) и инкубацию продолжали при 300 об./мин с амплитудой 2,5 см в течение еще 6 дней.

Выделение соединения 1

Неразбавленный бульон доводили до pH 9,5 и дважды экстрагировали одним объемом этилацетата. Органические слои собирали аспирацией после центрифугирования (3500 об./мин, 25 минут). Органические слои объединяли и выпаривали в вакууме, получая коричневую смолу, которая содержала соединение 1. Этот экстракт распределяли между этилацетатом (200 мл) и водным раствором хлорида аммония (20 мл 50% концентрированного раствора). После отделения органический слой экстрагировали дополнительным объемом (200 мл) водного раствора хлорида аммония. Объединенные

водные слои затем доводили до pH 9,0 водным гидроксидом натрия и затем дважды экстрагировали одним объемным эквивалентом этилацетата. Органические слои объединяли и выпаривали в вакууме до коричневого твердого вещества. Затем этот экстракт наносили на колонку с диоксидом кремния и элюировали поэтапно (партиями по 500 мл):

Растворитель	Гексаны	EtOAc	MeOH	Вода, NH ₄ OH
A	0,499	0,499	0	0,002
B	0,250	0,748	0	0,002
C	0	0,998	0	0,002
D	0	0,988	0,01	0,002
E	0	0,978	0,02	0,002
F	0	0,968	0,03	0,002
G	0	0,958	0,04	0,002

Соединение 1 находилось преимущественно в F и G. Эти растворители объединяли и выпаривали в вакууме с получением коричневого твердого вещества, содержащего соединение 1. Затем этот материал очищали препаративной ВЭЖХ (колонка C18 Gemini NX, Phenomenex с 20 mM ацетатом аммония и ацетонитрилом в качестве растворителя). Фракцию, содержащую целевое соединение, объединяли и сушили с последующим обессоливанием на картридже C18 SPE.

Пример 2. Оценка прямой антибактериальной активности

Биологическую активность макролидных соединений против 4 штаммов распространенных кишечных бактерий (*Escherichia coli*, *Streptococcus salivarius subsp. Salivarius*, *Lactobacillus casei* и *Bifidobacterium longum subsp. Infantis*) и обычного изолята кожи млекопитающих *Micrococcus luteus* оценивали с использованием анализа минимальной ингибирующей концентрации (MIC). Бактериальные штаммы были получены в DSMZ (Брауншвейг, Германия), за исключением *M. luteus*, который был получен от NCIMB; и их хранили в 20% глицерине при -80°C. Исходные растворы (100% ДМСО) положительных контролей (азитромицин и эритромицин) и тестируемых соединений 1 и 2 разбавляли в бульоне до рабочих концентраций исходного сырья 256 мкг/мл (конечный диапазон концентраций для тестирования при анализе от 128 мкг/мл до 0,00391 мкг/мл). Исходные растворы всех других соединений разводили в бульоне до рабочих концентраций исходного раствора 128 мкг/мл (конечный диапазон концентраций при тестировании от 64 мкг/мл до 0,00195 мкг/мл). Бактериальные штаммы культивировали в соответствующем бульоне в анаэробной камере при 37°C, за исключением *M. luteus*, который инкубировали аэробно при 37°C. 18-часовые культуры разбавляли в бульоне до ОП₅₉₅ 0,1, а затем дополнительно разбавляли 1:10. В 96-луночных планшетах в двух экземплярах 200 мкл рабочего раствора тестируемого соединения переносили в лунку 1 и последовательно разводили (1:2) в бульоне. 100 мкл

бактериальной суспензии добавляли в каждую лунку и тщательно перемешивали. Добавляли соответствующие контроли стерильности, и планшеты инкубировали в анаэробной камере или аэробно (*M. luteus*) при 37°C в течение 18 часов. МИС определяли как концентрацию тестируемого соединения в первой лунке без видимого роста.

Таблица 1

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Азитромицин	<8 мкг/мл	<0,5 мкг/мл	<1,0 мкг/мл	>64 мкг/мл	0,125 мкг/мл
Эритромицин	>64 мкг/мл	<0,06 мкг/мл	<0,25 мкг/мл	>64 мкг/мл	<0,0625 мкг/мл
Соединение 1	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>256 мкг/мл
ЕМ703					64-128 мкг/мл

Как можно видеть из данных, представленных в таблице 1, соединение 1 не проявляет антибактериальной активности в отношении какого-либо из протестированных бактериальных штаммов, тогда как эритромицин и азитромицин проявляют сильную активность в отношении ряда штаммов.

Пример 3. Оценка иммуностимулирующей активности

Мононуклеарные клетки периферической крови человека от здоровых доноров (МНКПК) выделяли центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640 (Invitrogen) с добавлением 25 мМ HEPES, L-глутамина, пирувата натрия (Sigma), 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Nyclose). Клетки стимулировали в течение 24 часов (исследование 1-4) или от 48 часов до 1 недели (исследование 5) при 37°C, 5% CO₂ с повышением концентрации соединения 1 и 2 в планшетах для тканевых культур. Клетки извлекали из планшета, промывали в ФБР и анализировали на экспрессию клеточных специфических поверхностных маркеров и МНС класса I с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных антител от BD Pharmingen и проточного цитометра FACS Canto II.

ИЛ-10 в надосадочной жидкости измеряли с помощью стандартного сэндвич-ИФА (все антитела от BD Biosciences) после 48 часов и 7 дней инкубации с 2,5 мкМ соединения 1 и 100 ед./мл ИЛ-2 (Miltenyi Biotechnologies) в полной среде RPMI, 37°C, 5% CO₂.

Исследование 1: После 24 ч стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (МНКПК) *in vitro* 1 мкМ соединения 1 (фиг. 1) маркер активации CD69 подвергался повышающей регуляции на CD4⁺ Т-клетках и В-клетках (фиг. 2).

Исследование 2: Мы также наблюдали повышающую регуляцию молекулы МНС класса I (HLA-ABC) на Т- и В-клетках (фиг. 3), что свидетельствует о влиянии на презентацию вирусных антигенов.

Исследование 3: Стимуляция МНКПК соединением 1 привела к повышающей

регуляции ко-стимулирующей молекулы CD80, а также антигенпрезентирующей молекулы МНС класса II (HLA-DR) на моноцитах (фиг. 4).

Исследование 4: моноциты, дифференцированные в макрофаги, также активировали CD80 в ответ на стимуляцию соединением 1 (фиг. 5).

Исследование 5: МНКПК, стимулированные соединением 1 в течение 48 часов и 7 дней, экспрессировали измененный профиль цитокинов с повышенной продукцией иммуносупрессивного цитокина ИЛ-10, измеренного с помощью сэндвич-ИФА. Это указывает на иммуноингибирующий эффект при определенных условиях (фиг. 6).

Исследование 6: МНКПК стимулировали соединением 1 и культивировали в среде RPMI в течение 6 дней в присутствии ИЛ-2 (Miltenyi Biotechnologies) и красителя CellTrace™ фиолетового (Invitrogen). Пролиферацию измеряли проточной цитометрией. Анализ иммунологического эффекта соединения 1 выявил измененный цитокин-управляемый профиль пролиферации Т-клеток (фиг. 7).

Исследование 7. Соединение 1 также влияло на пролиферацию вирус-специфических Т-клеток. МНКПК от доноров, инфицированных цитомегаловирусом (ЦМВ), культивированные в присутствии ЦМВ антигена и соединения 1 в течение 6 дней, показали измененный фенотип активированных ЦМВ-специфических CD8⁺ Т-клеток с повышенной экспрессией рецептора ИЛ-7 (CD127), измеренной с помощью проточной цитометрии (фиг. 7). CD127 имеет решающее значение для гомеостаза, дифференцировки и функции Т-клеток, а сниженная экспрессия коррелирует с тяжестью заболевания при ВИЧ и других хронических вирусных заболеваниях (Crawley et al. *Sem Imm* 2012).

Как можно видеть, соединение 1 обладает неожиданной способностью специфически активировать и модифицировать иммунный ответ путем влияния на презентацию антигена, ко-стимуляцию, активацию и пролиферацию Т-клеток. Во многих из этих исследований было включено соединение 2, другой родственный аналог макролида эритромицина с измененным гликозилированием, ранее опубликованное в Schell et al, 2008 (как соединение 20), и показало небольшую активность или отсутствие активности в анализах.

Исследование 8: МНКПК от доноров, инфицированных ЦМВ, культивировали в присутствии ЦМВ антигена, либо без обработки, либо при воздействии соединения 1 или соединения 2 в течение 3 дней. Воздействие соединения 1 индуцировало секрецию высоких уровней ИФН-гамма, тогда как культура антигена в отдельности или антиген вместе с соединением 2 не индуцировали секрецию ИФН-гамма (фиг. 9).

Исследование 9: Макрофаги от здоровых доноров подвергали воздействию соединений 1 или 2 в течение 48 часов. Только макрофаги, подвергшиеся воздействию

соединения 1, секретировали ИФН-гамма, тогда как необработанные макрофаги и макрофаги, подвергшиеся воздействию соединения 2, не секретировали ИФН-гамма (фиг. 10). Следовательно, соединение 1 способно индуцировать секрецию ИФН-гамма в макрофагах от здоровых доноров.

Исследование 10: МНКПК и макрофаги подвергали воздействию соединений 1 или 2 в течение 2 дней (фиг. 11). Соединение 2 не влияло на базовую экспрессию RANTES в МНКПК, тогда как соединение 1 вызывало двукратное усиление экспрессии. Экспрессия RANTES была минимальной в макрофагах, и соединение 1 индуцировало высокую экспрессию.

Исследование 11: МНКПК и макрофаги подвергали воздействию соединений 1 и 2 в течение 2 дней. МНКПК и макрофаги секретировали IL-12p70 в ответ на соединение 1, тогда как соединение 2 не вызывало секрецию в необработанных клетках (фиг. 12).

Исследование 12: МНКПК, макрофаги и CD4+ Т-клетки подвергали воздействию соединений 1 и 2 в течение 2 дней. Секреция ИЛ-1-бета была увеличена соединением 1 в макрофагах и незначительно в МНКПК, в то время как секреция ИЛ-1-бета не индуцировалась в CD4 + Т-клетках (фиг. 13).

Исследование 13: Соединение 1 вводили внутривенно мышам C57bl/6 в дозах от 0,165 до 5 мг/кг. Количество CD25+ клеток было увеличено у животных, получавших наивысшую дозу 5 мг/кг (фиг. 14), как и масса тела в той же группе (не показано).

Исследование 14: Соединение 1 или 2 вводили внутривенно мышам C57bl/6. Через 24 часа удаляли селезенку, и оценивали экспрессию МНС класса I на спленоцитах CD11b+. Соединение 1 индуцировало увеличение спленоцитов с высокой экспрессией МНС I, тогда как в спленоцитах мышей, которым вводили соединение 2, эффекта не наблюдалось.

Пример 4. Оценка активности против TLR2

Соединения тестировали с использованием анализа репортера TLR2 (см. Общие методы), где определяли стимуляцию рецептора TLR2. Стимулирующий эффект измеряли как увеличение оптической плотности по сравнению с отрицательным контролем (ОП) вследствие высвобождения секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP), как показано в таблице 2.

Таблица 2

	ОП после добавления 20 мкМ испытуемого образца	ОП после добавления 10 мкМ испытуемого образца	ОП после добавления 5 мкМ испытуемого образца
Эритромицин А	0,045	0,065	0,035
Азитромицин	0,031	0,045	0,029
Соединение 2	0,044	0,010	0,046

Соединение 1	0,458	0,202	0,111
ЕМ703	-0,033	-0,024	-0,040
Соединение 3	-0,026	-0,015	-0,043

Как можно видеть, соединение 1 стимулировало TLR2 в концентрациях до 5 мкМ, тогда как эритромицин А, азитромицин, ЕМ703 (например, см. EP1350510) и соединения 2 и 3, родственные аналоги макролида эритромицина с измененным гликозилированием, ранее опубликованные в Schell et al, 2008 (как соединения 17 и 20), показали небольшую стимуляцию или ее отсутствие при концентрациях до 20 мкМ.

Пример 5. Оценка проницаемости Caco-2

Соединения тестировали с использованием стандартного двунаправленного анализа проницаемости Caco-2 (см. Общие методы). Полученные данные приведены в таблице 3.

Таблица 3

	Проницаемость от А до В ($P_{app} \times 10^6 / \text{см} \cdot \text{с}^{-1}$)	Коэффициент эффлюкса
Азитромицин	<0,14	>77,6
Соединение 1	0,32	63,4
ЕМ703	<0,15	>108

Как видно из данных в таблице 3, соединение 1 является лучшей проникающей способностью для клеток и имеет более низкий коэффициент эффлюкса, чем азитромицин и ЕМ703 (например, см. EP1350510).

Пример 6. Оценка метаболической стабильности

Метаболическую стабильность соединения по изобретению оценивали в стандартном анализе стабильности микросом человека (см. Общие методы). Ожидается, что соединения с более длительным периодом полужизни будут иметь более длительные периоды полужизни после введения лекарства, что может быть полезно для обеспечения менее частого введения лекарства. Соединения с более коротким периодом полужизни могут быть полезны для использования в качестве «мягких лекарств», когда активное вещество быстро разлагается после попадания в систему пациента. Период полужизни соединений оценивается в приведенной ниже таблице 4:

Таблица 4

	T1/2 (минуты)
Азитромицин	245
Эритромицин	31
Соединение 1	108
ЕМ703	97

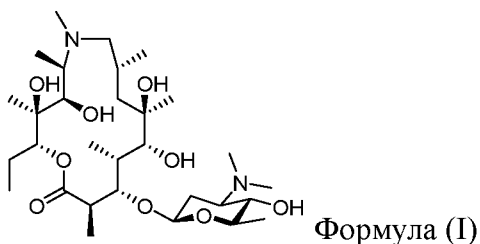
Ссылки

- Kieser et al 2000 Practical Streptomyces Genetics, Published by the John Innes Foundation
- Crawley et al. 2012 The influence of HIV on CD127 expression and its potential implications for IL-7 therapy. Semin Immunol. 2012 Jun;24(3):231-40. doi: 10.1016/j.smim.2012.02.006. Epub 2012 Mar 14.
- Gaisser et al., 1997 Analysis of seven genes from the eryAI-eryK region of the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. Mol Gen Genet., 1997 Oct;256(3):239-51.
- Gaisser et al., 2000 A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea* Mol. Micro., 2000; 36(2):391–401
- Schell et al., 2008 Engineered biosynthesis of hybrid macrolide polyketides containing D-angolosamine and D-mycaminose moieties Org. Biomol. Chem., 2008;6:3315-3327
- LeMahieu et al., 1974 Glycosidic Cleavage Reactions on Erythromycin A. Preparation of Erythronolide A, J. Med. Chem., 1974, 17(9):953-956
- Djokic, S., et al., Erythromycin Series. Part 13. Synthesis and Structure Elucidation of 10-Dihydro-10-deoxo-11-methyl-11-azaerythromycin A J. Chem. Res. (S), 1988; 5:152-153
- Glansdorp et al., 2008 Using Chemical Probes to Investigate the Sub-Inhibitory Effects of Azithromycin, Org. Biomol. Chem., 2008; 208(6): 4120-4124
- Rowe et al., 1998 Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes. Gene. 1998 Aug 17;216(1):215-23.
- Long et al. *Engineering specificity of starter unit selection by the erythromycin-producing polyketide synthase*. Mol. Microbiol. 2002 Mar;43(5):1215-25.

Все ссылки, упомянутые в настоящей заявке, включая патент и патентные заявки, включены в настоящий документ посредством ссылки в максимально возможной степени.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль.

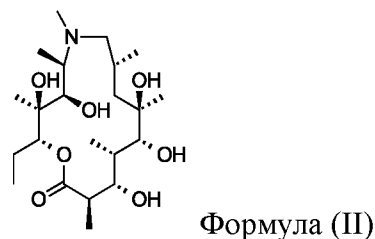
2. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 1 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

3. Соединение по п. 1 для применения в медицине.

4. Соединение по п. 1 для применения при лечении вирусных инфекций или рака.

5. Способ лечения или профилактики заболевания, вызванного вирусной инфекцией, включающий введение человеку или животному, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения по п. 1.

6. Способ получения соединения по п. 1, включающий добавление агликона Формулы (II)

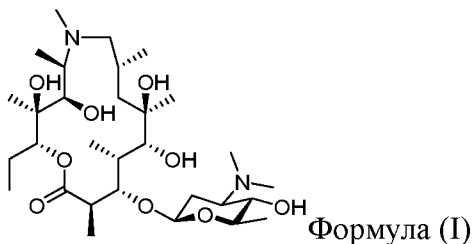


к культуре биотрансформационного штамма, осуществляющего гликозилирование в 3-гидроксильном положении.

7. Способ по п. 6, где биотрансформационный штамм экспрессирует гликозилтрансферазы с гомологией 70% или более с SEQ ID NO: 1 (AngMII) или SEQ ID NO: 2 (AngMIII).

ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ. 34 ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ

1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль.

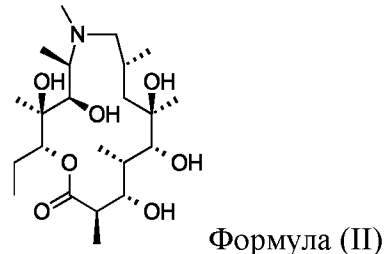
2. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 1 и одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

3. Соединение по п. 1 для применения в медицине.

4. Соединение по п. 1 для применения при лечении вирусных инфекций или рака.

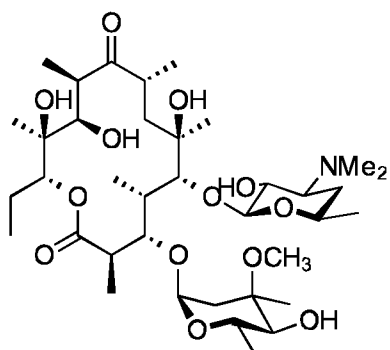
5. Способ лечения или профилактики заболевания, вызванного вирусной инфекцией, включающий введение человеку или животному, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения по п. 1.

6. Способ получения соединения по п. 1, включающий добавление агликона Формулы (II)

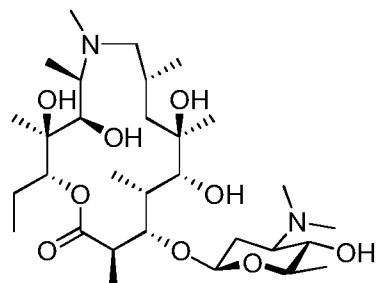


к культуре биотрансформационного штамма, осуществляющего гликозилирование в 3-гидроксильном положении, где биотрансформационный штамм экспрессирует гликозилтрансферазы с гомологией 70% или более с SEQ ID NO: 1 (AngMII) или SEQ ID NO: 2 (AngMIII).

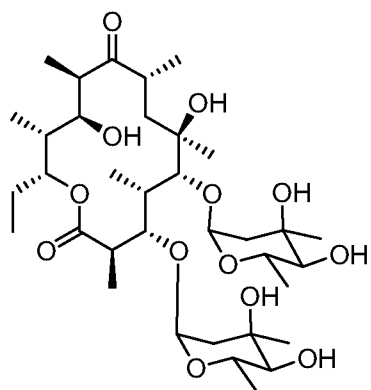
ЭРИТРОМИЦИН А



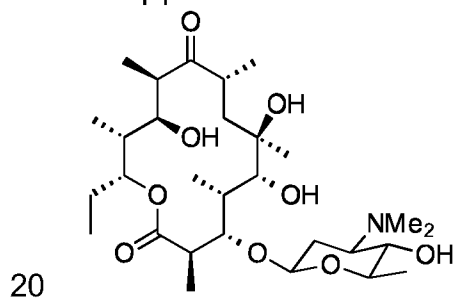
СОЕДИНЕНИЕ 1



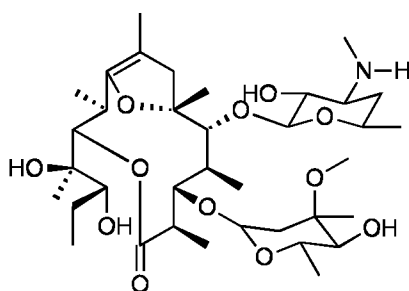
СОЕДИНЕНИЕ 2



СОЕДИНЕНИЕ 3

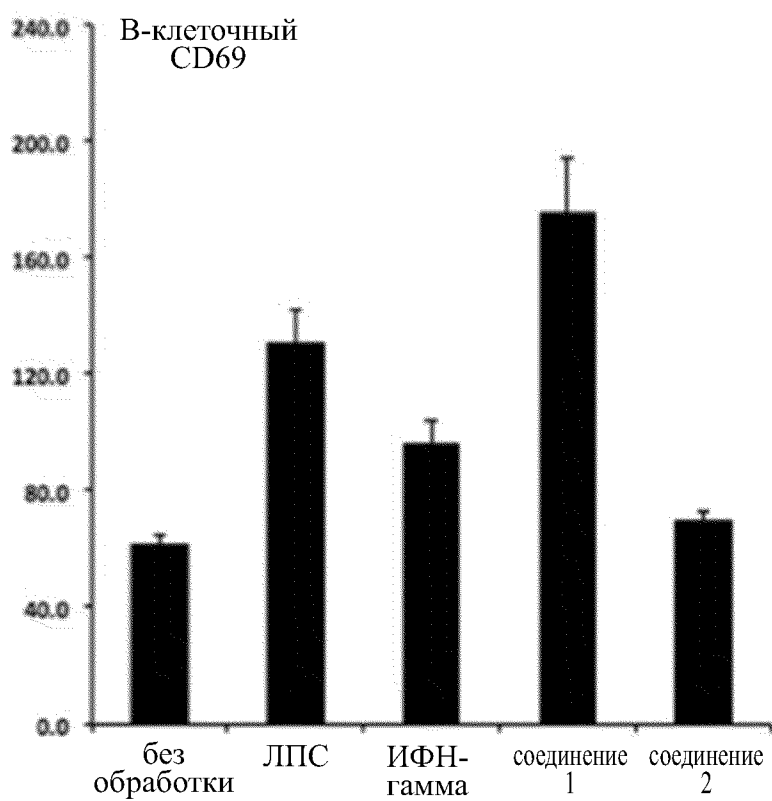
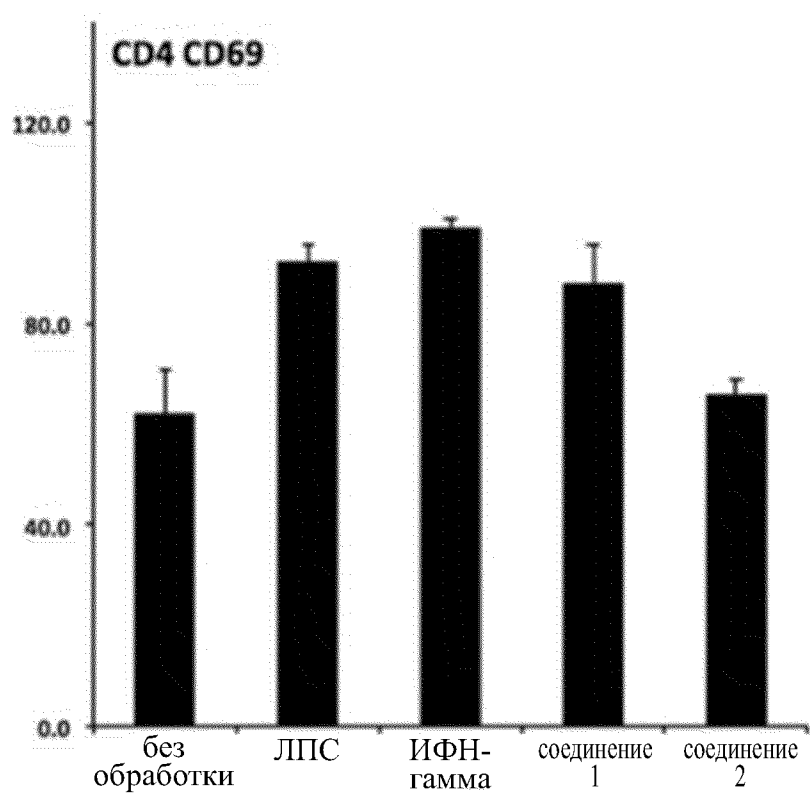


EM703

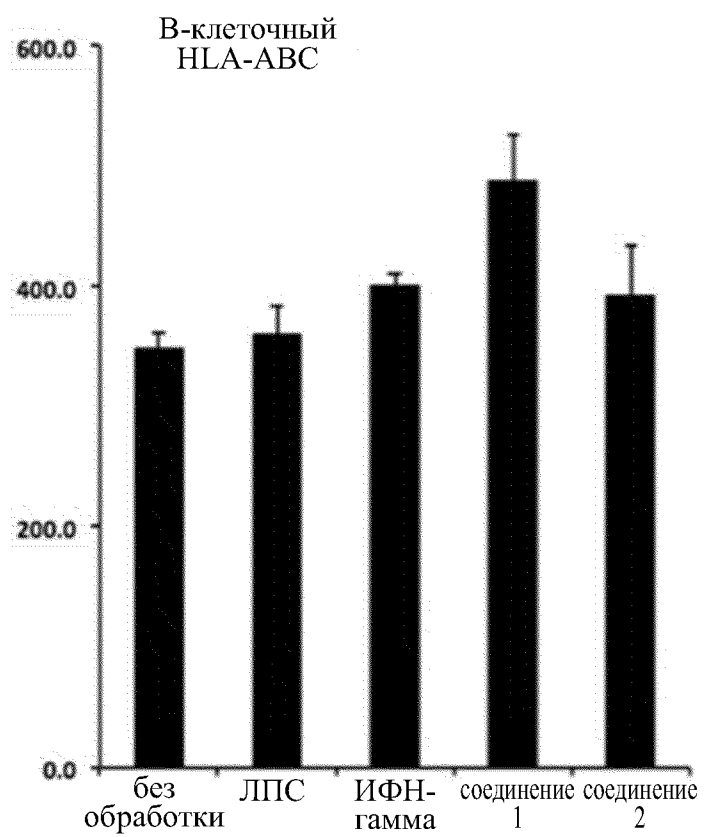
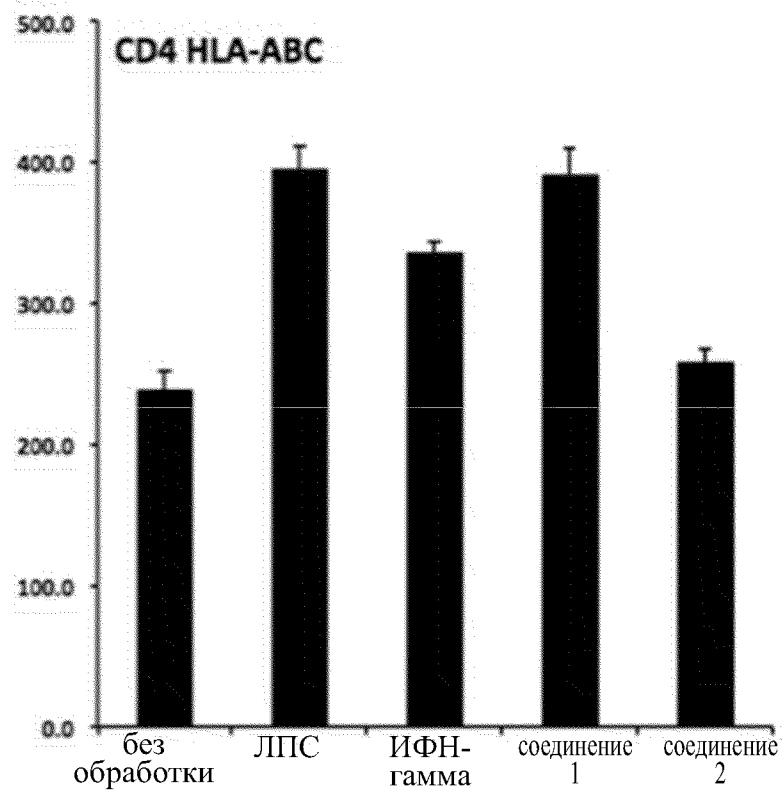


Фиг. 1

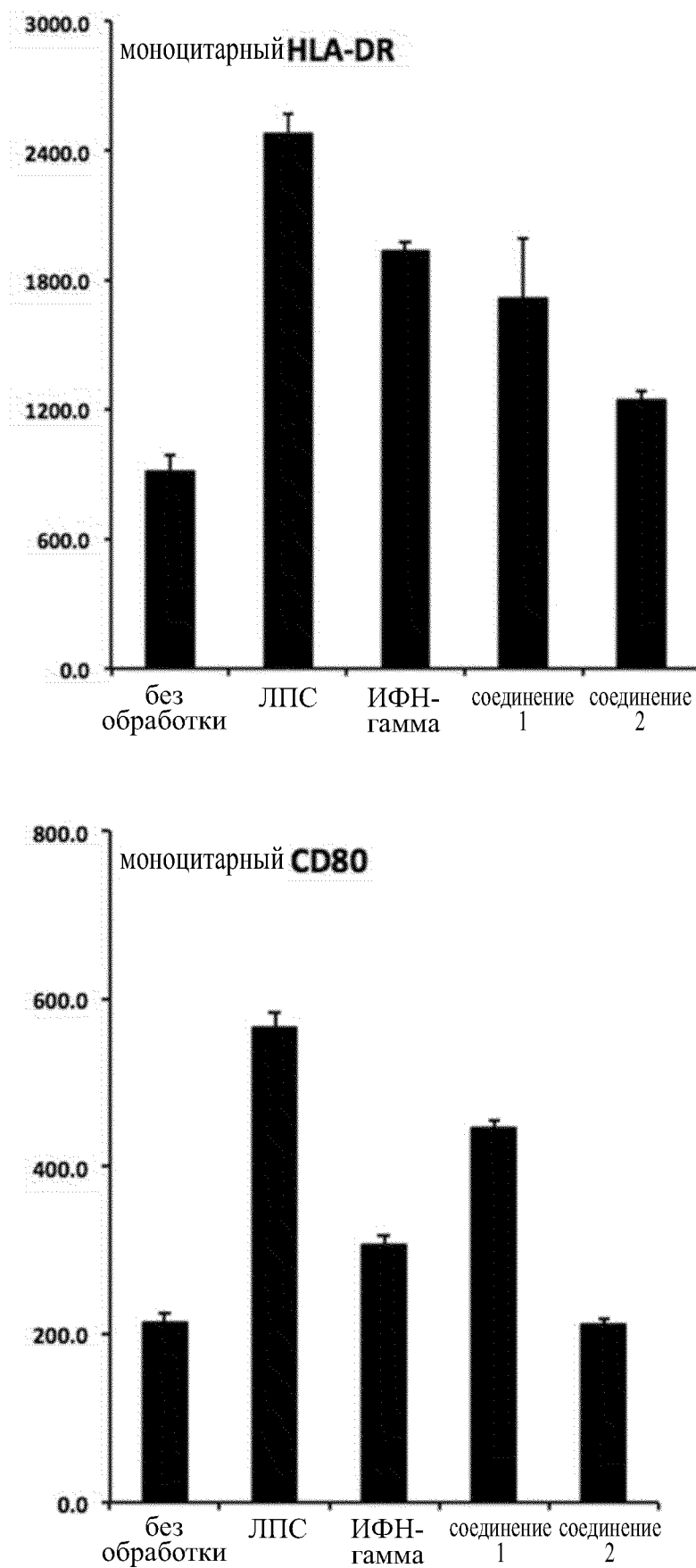
Фиг. 2



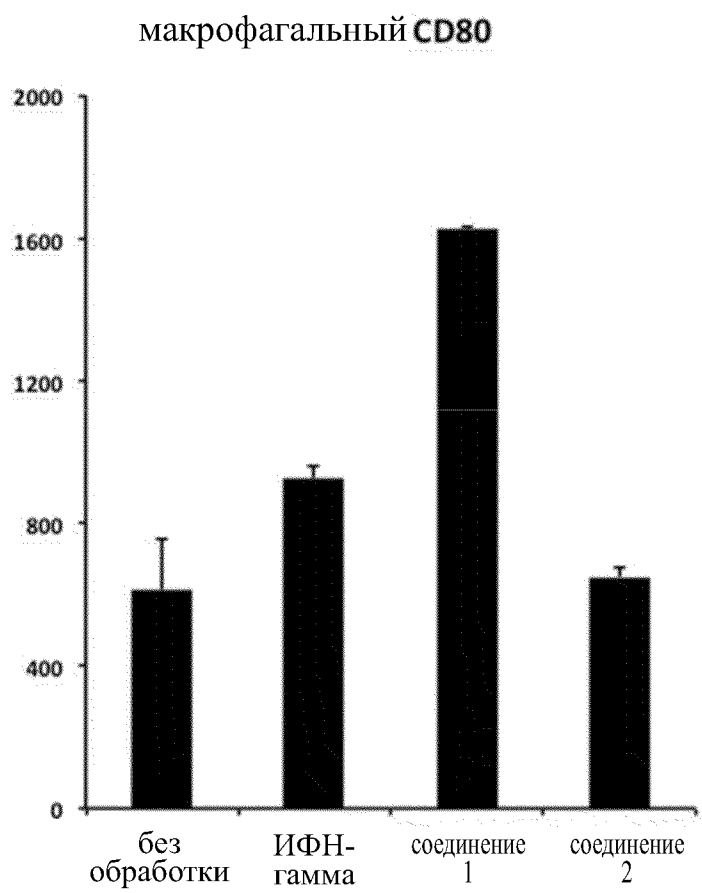
Фиг. 3



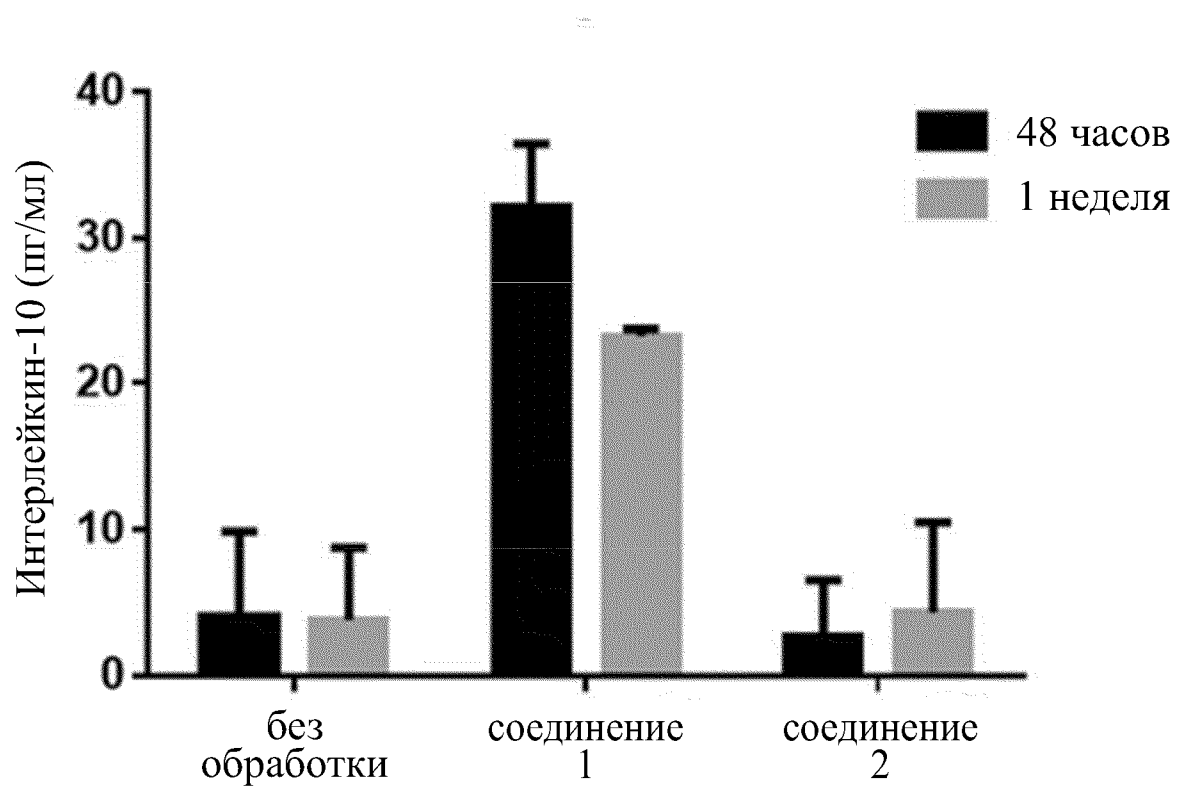
Фиг. 4



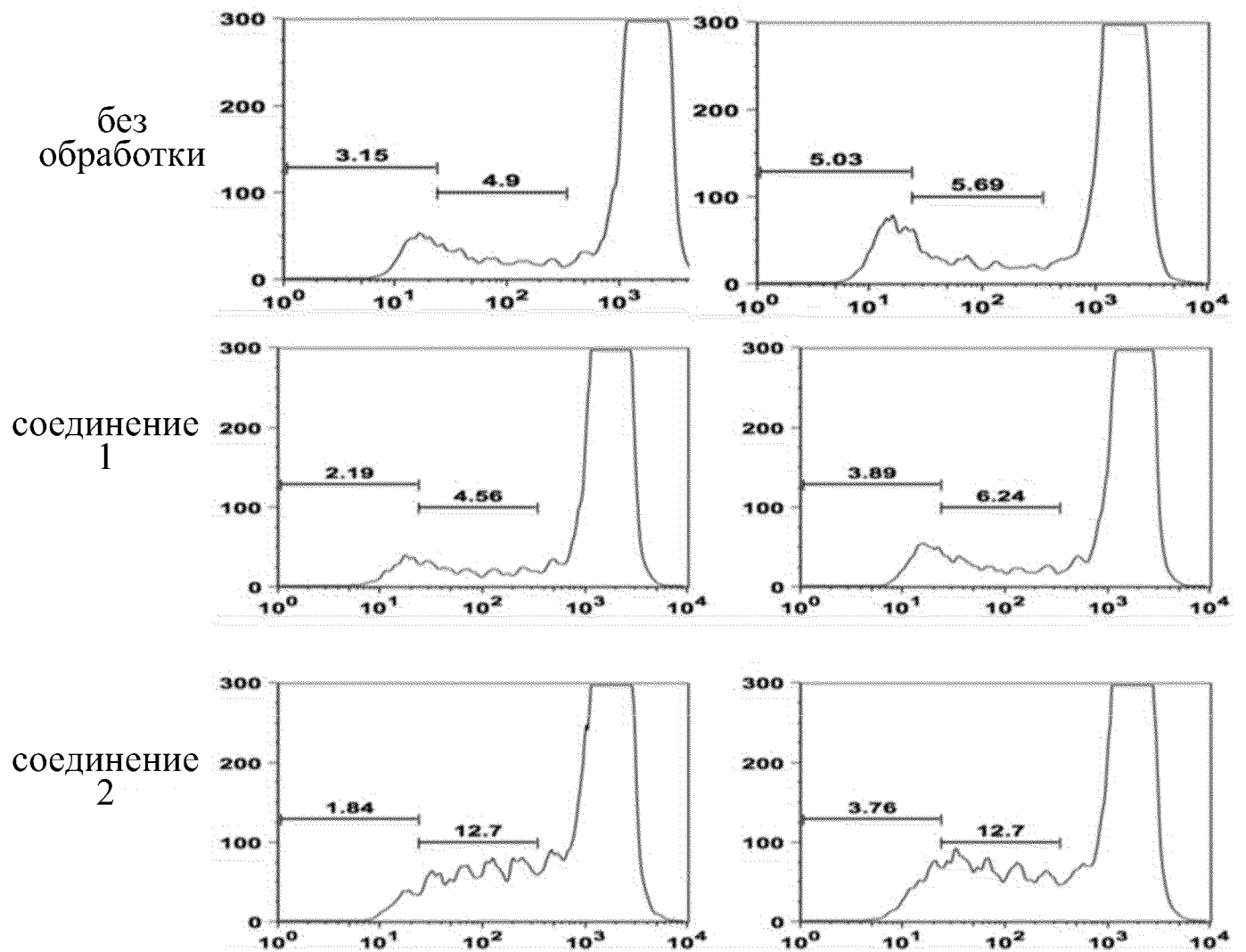
Фиг. 5



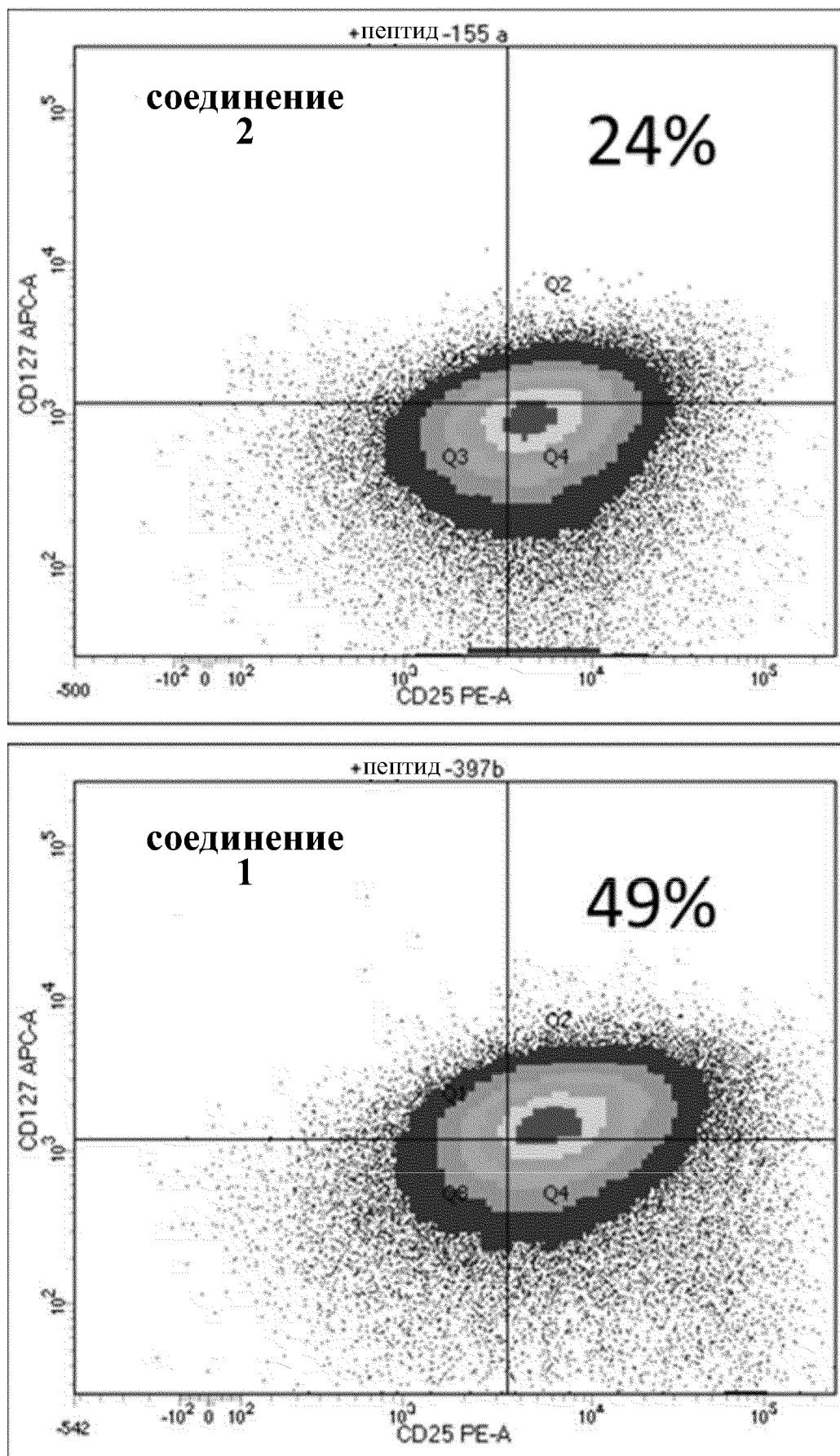
Фиг. 6



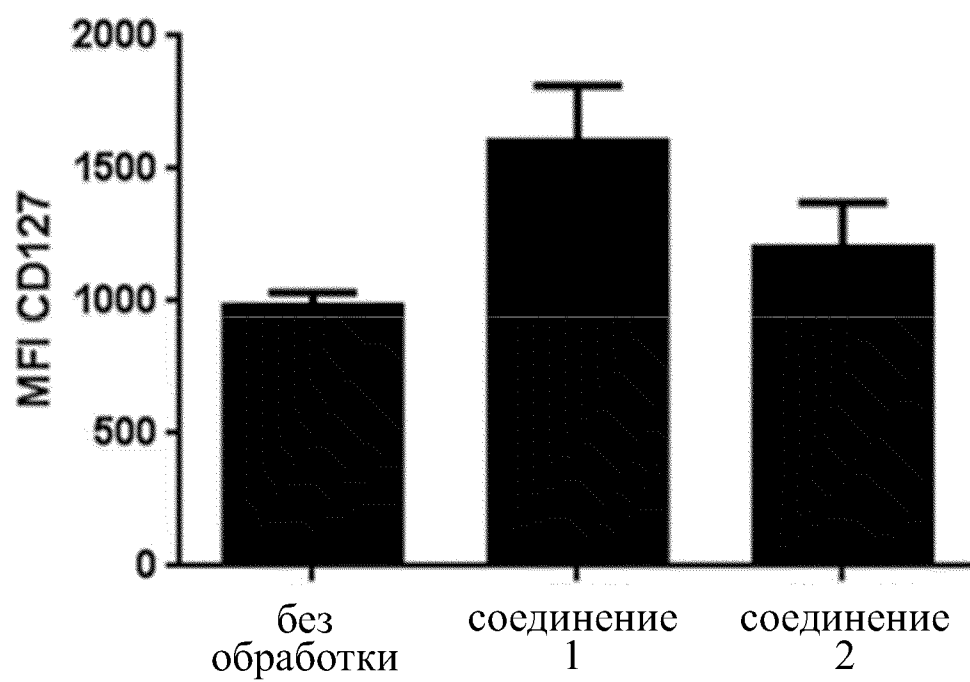
Фиг. 7



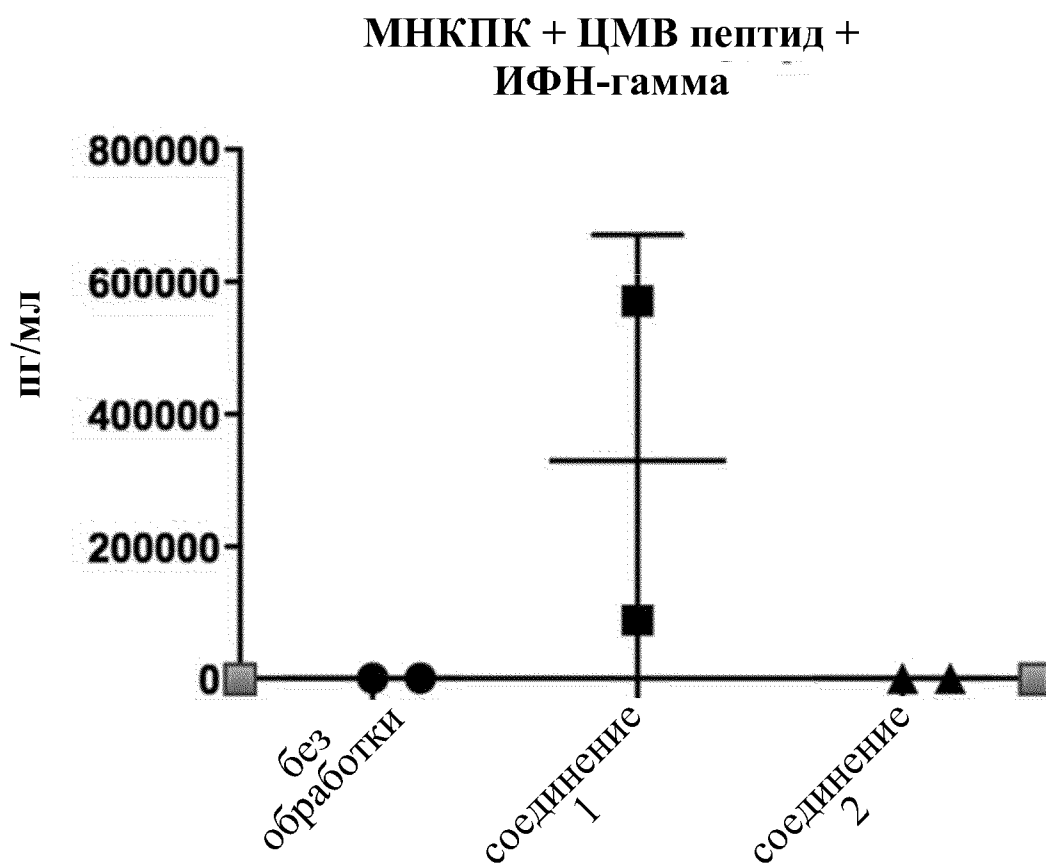
Фиг. 8



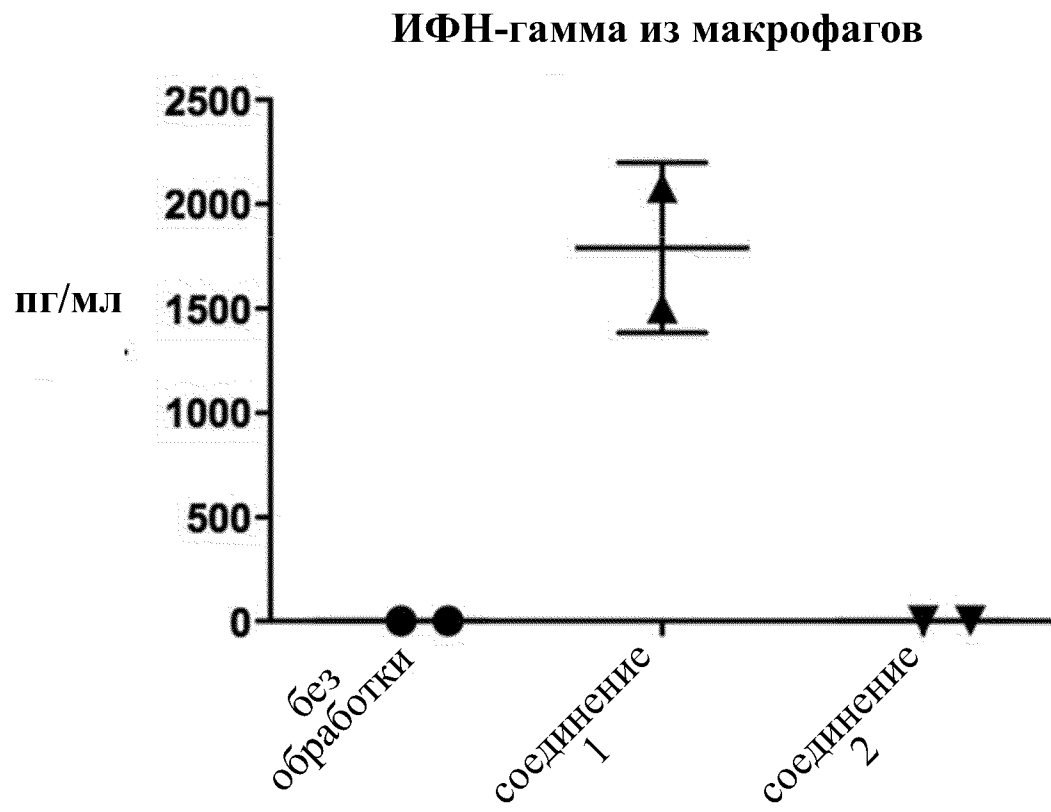
Фиг. 8
(продолжение)



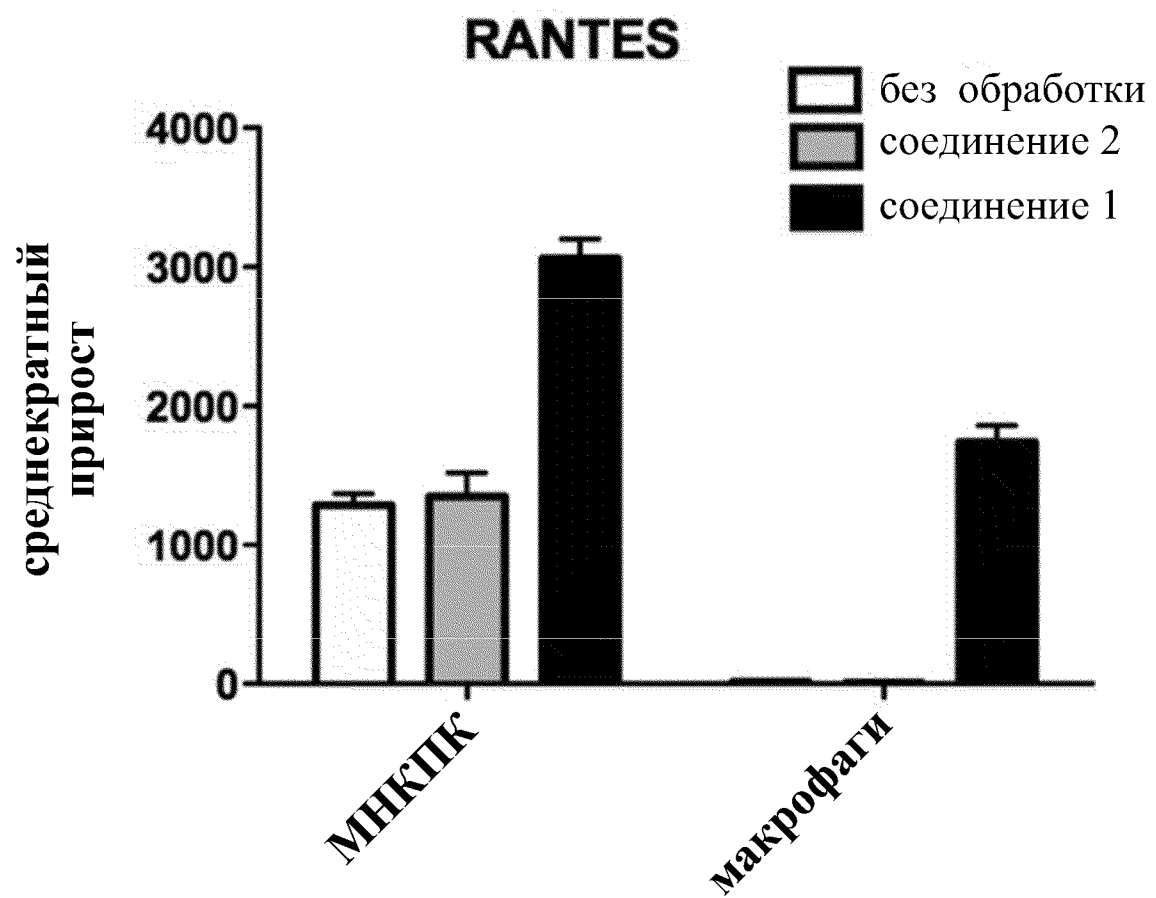
Фиг. 9



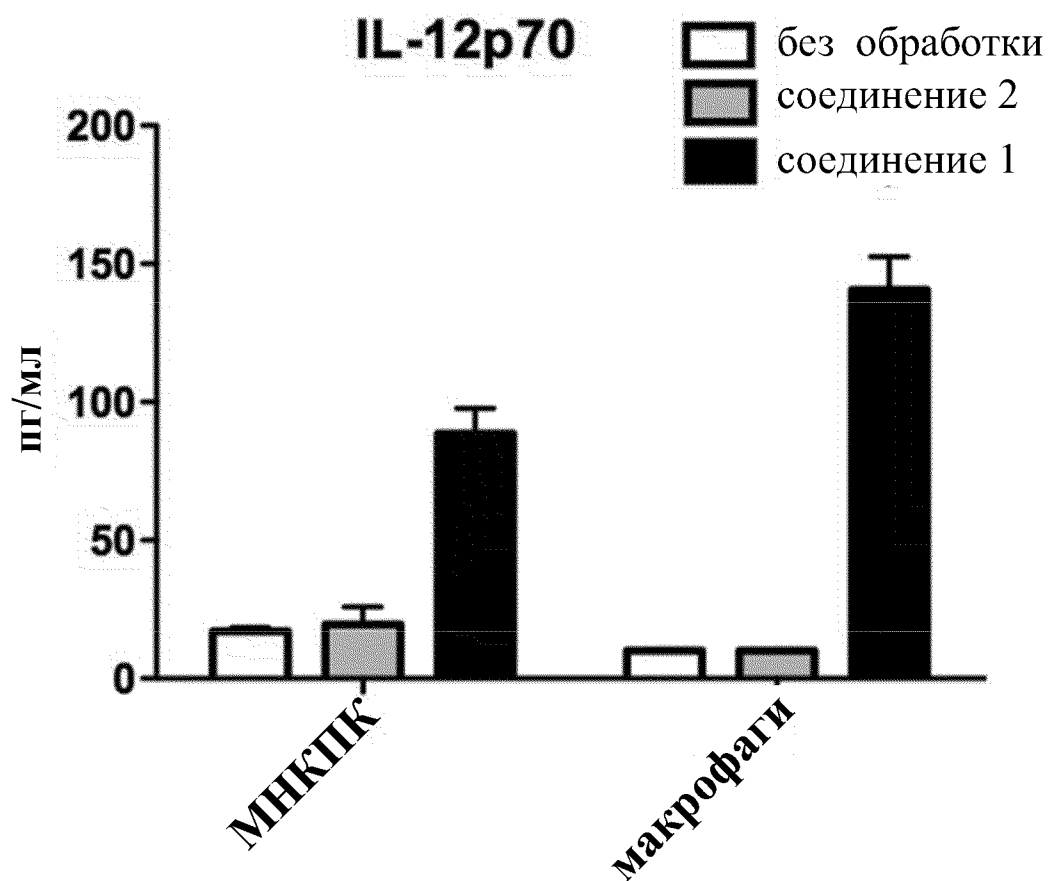
Фиг. 10



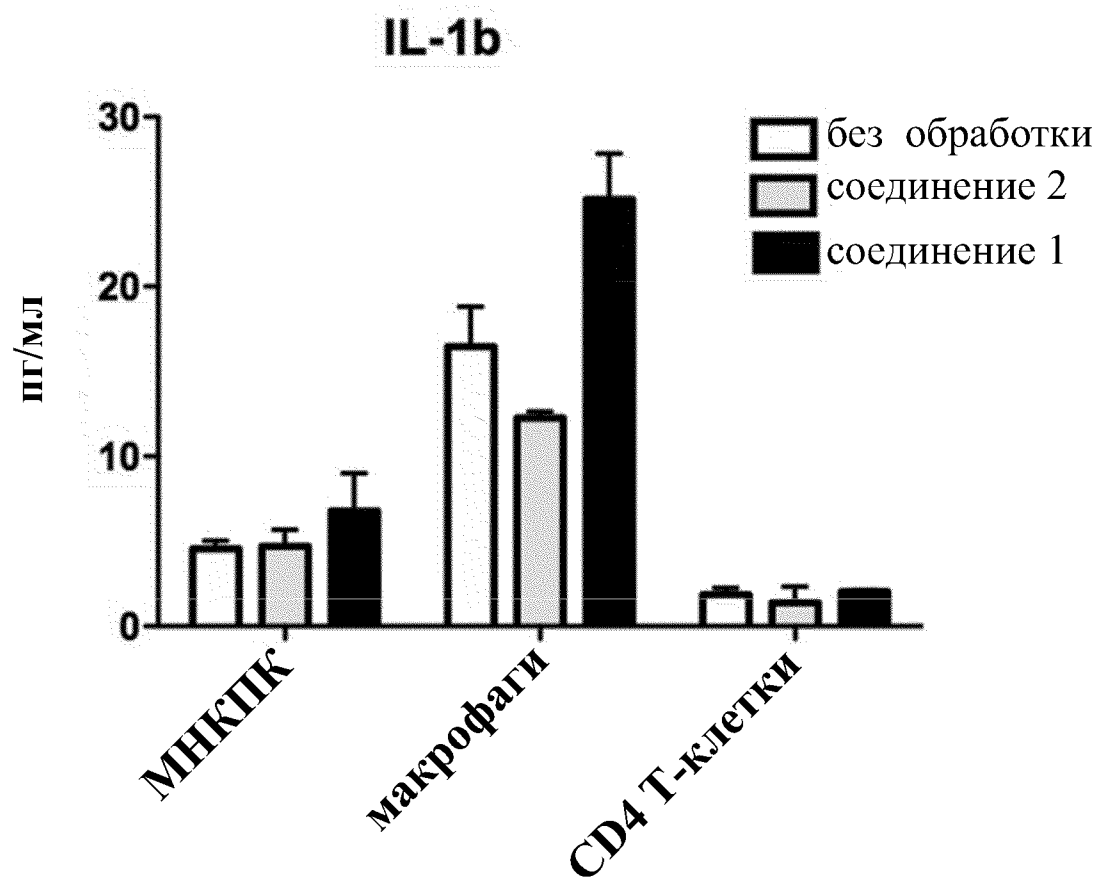
Фиг. 11



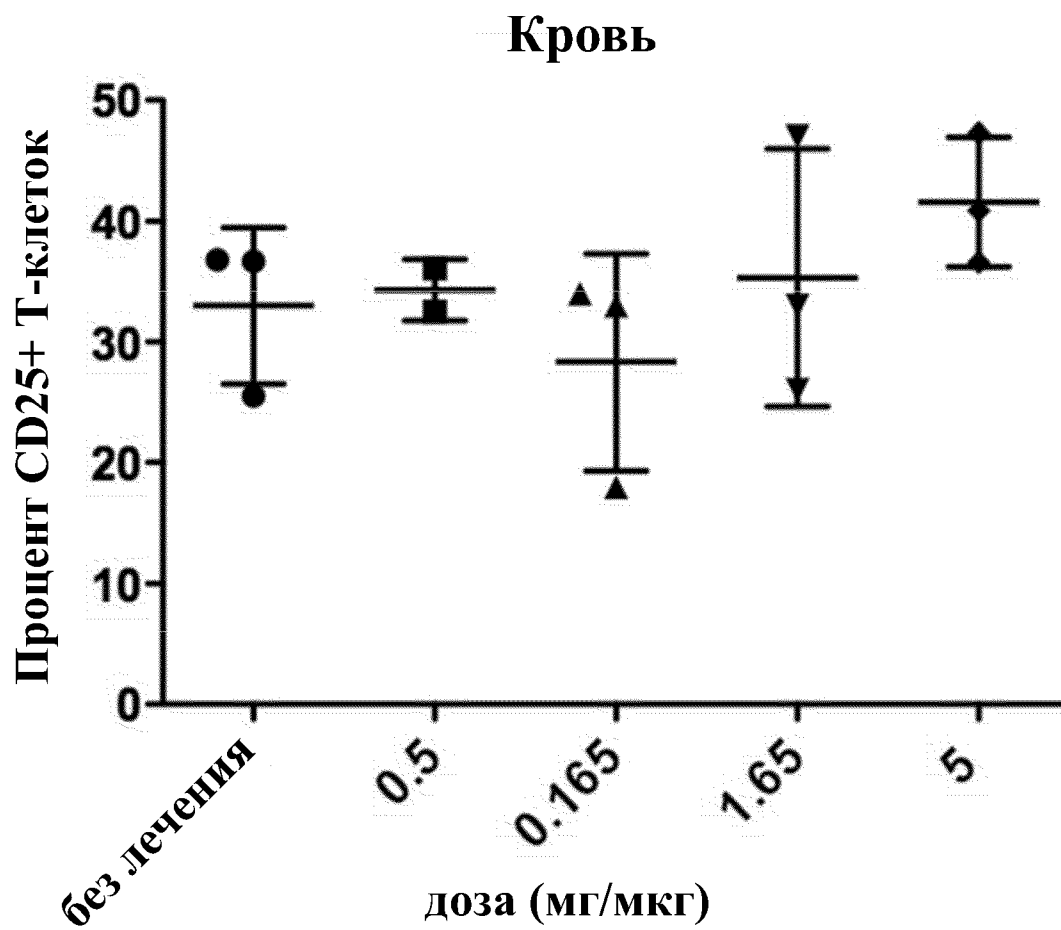
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

