

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046194**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.15**

(21) Номер заявки  
**202190974**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.10.22**

(51) Int. Cl. **A61K 31/4985** (2006.01)  
**A61K 31/5365** (2006.01)  
**C07D 471/14** (2006.01)  
**C07D 498/14** (2006.01)

(54) **ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ПРОЛЕКАРСТВА И ИХ НАНОСОСТАВЫ**(31) **62/748,798**(32) **2018.10.22**(33) **US**(43) **2022.02.02**(86) **PCT/US2019/057406**(87) **WO 2020/086555 2020.04.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БОРД ОФ РИДЖЕНТС ОФ ЗЭ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ НЕБРАСКА (US)**

(72) Изобретатель:  
**Генделман Говард Е., Эдагва Бенсон  
(US)**

(74) Представитель:  
**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,  
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,  
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,  
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

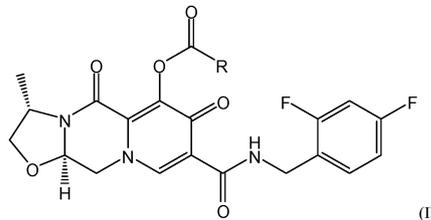
(56) ZHOU, "Next Generation of Translational Long-Acting Cabotegravir", A Dissertation Presented to the Faculty of the Graduate School in the University of Nebraska Medical Center in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy, May 2018, pages 1-139. pg 28, para 1; pg 30, Figure 2.1; pg 57, para 1; pg 60, Figure 3.1; pg 69, Figure 3.7; pg 70, para 2, Table 3.1; pg 117, para 2  
WO-A1-2010011814

ZHOU et al. "Creation of a nanoformulated cabotegravir prodrug with improved antiretroviral profiles", Biomaterials, January 2018, Vol. 151, p. 53-65. DOI: 10.1016/j.biomaterials, 2017.10.023. Entire Document

SILLMAN et al. "Creation of a long-acting nanoformulated dolutegravir", Nature Communications, 06 February 2018, Vol. 9, Article 443, pages 1-14; DOI: 10.1038/s41467-018-02885-x, pg 2, Fig 1a

US-B2-9758515  
US-A1-20170326103  
US-A1-20150050241

(57) Изобретение, в целом, относится к доставке терапевтических средств. Более конкретно, изобретение относится к соединениям формулы (I), наночастицам и композициям, их содержащим, и способам лечения ВИЧ-инфекции у субъекта.



**046194 B1**

**046194 B1**

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет согласно §119(e) статьи 35 U.S.C. (Свод законов США) по предварительной заявке на патент США № 62/748798, поданной 22 октября 2018 г.. Вышеуказанная заявка включена в данный документ посредством ссылки.

Настоящее изобретение было выполнено при правительственной поддержке по грантам с номерами R01 MH104147, P01 DA028555, R01 NS036126, P01 NS031492, R01 NS034239, P01 MH064570, P30 MH062261, P30 AI078498, R01 AG043540 и R56 AI138613, выданным Национальными институтами здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

#### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее изобретение, в целом, относится к доставке терапевтических средств. Более конкретно, настоящее изобретение относится к композициям и способам для доставки терапевтических средств пациенту для лечения заболевания или нарушения.

#### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Значительный прогресс был достигнут в разработке эффективных диагностических средств и лечебных средств против вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1). Антиретровирусная терапия (ART) значительно снизила частоту ассоциированных с заболеванием клинических проявлений и смертность, что обеспечивает практически нормальное качество жизни у инфицированных людей (Vittinghoff, et al. (1999), *J. Infect Dis.*, 179(3):717-720; Lewden, et al. (2007), *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 46(1):72-77). Тем не менее при ART требуется пожизненное лечение с целью подавления репликации вируса и предупреждения появления СПИД. Более того, эффективности ART может препятствовать устойчивость ВИЧ-1, токсичность лекарственных средств и плохое соблюдение пациентом предписанного режима лечения (Wensing, et al. (2014), *Top. Antivir. Med.*, 22(3):642-650; Siliciano, et al. (2013), *Curr. Opin. Virol.*, 3(5):487-494; Prosperi, et al. (2012), *BMC Infect. Dis.*, 12:296-296; Van den Berk, et al. (2016), тезисы с номером 948, на Конференции по ретровирусным и оппортунистическим инфекциям (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections), 22-25; Siefried, et al. (2017), *PLoS One* 12(4):e0174613). Усталость от лечения, недостаточность финансовой и социальной поддержки, сопутствующие психиатрические симптомы и/или злоупотребление различными веществами могут приводить в результате к неспособности соблюдать критически важные схемы ART (Tucker, et al. (2017), *EBioMedicine*, 17:163-171).

Антиретровирусные лекарственные средства длительного действия (LAP) характеризуются улучшенным соблюдением режима лечения (Spreen, et al. (2013), *Curr. Opin. HIV AIDS*, 8(6):565-571). Сокращение схемы лечения с ежесуточного до ежемесячного или даже менее частого введения обеспечивает возможность большей конфиденциальности для пациента и его удовлетворения, а также улучшает соблюдение режима лечения (Sangaramoorthy, et al. (2017), *J. Assoc. Nurses AIDS Care*, 28(4):518-531; Carrasco, et al. (2017), *Afr. J. AIDS Res.* 16(1):11-18; Williams, et al. (2013), *Nanomed. Lond.* 8(11):1807-1813). Тем не менее успешно была осуществлена переработка рецептуры составов в LAP лишь для нескольких антиретровирусных лекарственных средств.

Кабогравир (СAB) представляет собой ингибитор интегразы или ингибитор переноса цепи интегразой (INSTI) с низкой растворимостью в воде, высокой температурой плавления, высокой активностью, длительным периодом полувыведения и медленным метаболическим клиренсом (Karmon, et al. (2015), *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 68(3):39-41; Trezza, et al. (2015), *Curr. Opin. HIV AIDS*, 10(4):239-245). Эти свойства обеспечивают возможность составления СAB в суспензию с концентрацией 200 мг/мл (LAP СAB) и ежемесячного или даже менее частого внутримышечного введения (Margolis, et al. (2017), *Lancet*, 390(10101):1499-1510; Spreen, W.W. (2014), *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 67(5):481-486). Примечательно, СAB в сочетании с рилпивиринем (RPV) представляет собой первую комбинированную схему ART длительного действия, при которой вводимые ежемесячно или раз в два месяца LAP составы СAB и RPV продемонстрировали антиретровирусную активность, сравнимую с перорально вводимыми ежесуточно комбинациями из трех лекарственных средств в случае поддерживающей терапии (Margolis, et al. (2017), *Lancet*, 390(10101):1499-1510).

Преимущественно СAB в основном метаболизируется уридиндифосфат-глюкуронозилтрансферазой (UGT) 1A1 и имеет низкий потенциал к взаимодействию с другими антиретровирусными лекарственными средствами (Trezza, et al. (2015), *Curr. Opin. HIV AIDS*, 10(4):239-245; Bowers, et al. (2016), *Xenobiotica*, 46(2):147-162). LAP СAB обеспечивает высокую защиту от ректальной, вагинальной и внутривенной передачи вируса иммунодефицита обезьян/человека (SHIV) у отличных от человека приматов, и он приступил к клиническим испытаниям для предупреждения ВИЧ (NCT02720094) (Andrews, et al. (2014), *Science*, 343(6175):1151-1154; Andrews, et al. (2015), *Sci. Transl. Med.*, 7(270):270ra4; Radzio, et al. (2015), *Sci. Transl. Med.*, 7(270): 270ra5-270ra5; Andrews, et al. (2016), *AIDS*, 2016:461-467). Тем не менее схема дозирования LAP СAB имеет ограничения. В частности, требуются дробные инъекции, которые выполняют в объемах 2 мл, что приводит к прекращению лечения вследствие непереносимых реакций в месте инъекции (Margolis, et al. (2017), *Lancet* 390(10101):1499-510; Markowitz, et al. (2017), *Lancet HIV*, 4(8):331-340). Более того, максимальный интервал между введениями доз составляет только 8 недель. Недавно исследовали введение LAP СAB каждые 12 недель с целью поддержания концентраций СAB в плазме крови на уровне выше 4-кратного значения концентрации, обеспечивающей 90% ингибирование

и скорректированной с учетом связывания с белками ( $4 \times \text{PA-IC}_{90}$ , 660 нг/мл), причем эта концентрация, как продемонстрировано, обеспечивает защиту от новых инфекций у макаков (Spreen, W.W. (2014), *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 67(5):481-486; Andrews, et al. (2014), *Science*, 343(6175):1151-1154; Andrews, et al. (2015), *Sci. Transl. Med.*, 7(270):270ra4; Radzio, et al. (2015), *Sci. Transl. Med.*, 7(270):270ra5-270ra5; Andrews, et al. (2016), *AIDS*, 2016:461-467; Markowitz, et al. (2017), *Lancet HIV*, 4(8):331-340; Spreen, et al. (2014), *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 67(5):487-492). Тем не менее две трети участников имели более быструю абсорбцию лекарственного средства, чем ожидаемая, что приводит к концентрациям лекарственного средства в плазме крови, которые ниже целевой эффективной концентрации  $4 \times \text{PA-IC}_{90}$  через 12 недель. Таким образом, существует значительная потребность в способах увеличения интервала между приемами доз свыше 8 недель и снижения объемов инъекций для улучшения соблюдения режима лечения (Boyd, et al. (2017), *Lancet*, 390(10101):1468-1470).

#### **Сущность настоящего изобретения**

В соответствии с настоящим изобретением обеспечены пролекарства ингибиторов интегразы. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство содержит ингибитор интегразы, модифицированный сложным эфиром, содержащим алифатическую или алкильную группу (например, алифатическую или алкильную группу, содержащую от приблизительно 3 до приблизительно 30 углеродов). В соответствии с конкретным вариантом осуществления алифатическая или алкильная группа представляет собой алкильную цепь жирной кислоты или насыщенную линейную алифатическую цепь, необязательно замещенную по меньшей мере одним гетероатомом. В соответствии с конкретным вариантом осуществления ингибитор интегразы выбран из группы, состоящей из каботегавира (CAB), ралтегавира (RAL), элвитегавира (EVG), долутегавира (DTG) и биктегавира (BIC). В данное изобретение также включены композиции, содержащие по меньшей мере одно пролекарство согласно настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предусмотрены наночастицы, содержащие по меньшей мере одно пролекарство согласно настоящему изобретению и по меньшей мере один полимер или поверхностно-активное вещество. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство является кристаллическим. В соответствии с конкретным вариантом осуществления полимер или поверхностно-активное вещество представляет собой амфифильный блок-сополимер, такой как амфифильный блок-сополимер, содержащий по меньшей мере один блок поли(оксиэтилена) и по меньшей мере один поли(оксипропилена) (например, поллоксамер 407). Наночастица может содержать полимер или поверхностно-активное вещество, связанное по меньшей мере с одним нацеливающим лигандом. Отдельная наночастица может содержать обеспечивающие нацеливание и не обеспечивающие нацеливание поверхностно-активные вещества. В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы имеют диаметр, составляющий приблизительно от 100 нм до 1 мкм. В настоящее изобретение также включены композиции, содержащие по меньшей мере одну наночастицу согласно настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предусмотрены способы лечения, подавления и/или предупреждения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом. Способы предусматривают введение субъекту по меньшей мере одного пролекарства или наночастицы согласно настоящему изобретению, необязательно, в композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель. В соответствии с конкретным вариантом осуществления заболевания или нарушения представляет собой вирусную инфекцию (например, ретровирусную инфекцию). В соответствии с конкретным вариантом осуществления способ дополнительно предусматривает введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства или назначение метода терапии для заболевания или нарушения, например по меньшей мере одного дополнительного соединения, противодействующего ВИЧ.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1А представлены изображения наночастиц NM2CAB (сверху) и NCAB (снизу), которые определены с помощью сканирующей электронной микроскопии.

На фиг. 1В представлены графики стабильности наночастиц NM2CAB при 25°C в течение указанных периодов времени. В частности, дзета-потенциал (сверху), коэффициент полидисперсности (посередине) и диаметр частиц (снизу) для наночастиц определяли с помощью динамического светорассеяния.

На фиг. 2А представлен график (сверху) поглощения лекарственного средства, которое измерено с помощью UPLC-UV/Vis (сверхэффективная жидкостная хроматография с детектированием в ультрафиолете/видимой области спектра), человеческими макрофагами, полученными из моноцитов, (MDM) и график (снизу) удержания лекарственного средства MDM, собранными в указанные моменты времени для анализа уровня лекарственного средства внутри клеток.

На фиг. 2В представлен график (сверху) активности обратной транскриптазы ВИЧ-1 при указанной концентрации лекарственного средства и график (снизу) активности обратной транскриптазы ВИЧ-1 в MDM, обработанных лекарственным средством, подвергнутых контрольному заражению HIV-1<sub>ADA</sub> и измеренных в указанные моменты времени после обработки.

На фиг. 2С представлены изображения окрашенных р24 MDM клеток после контрольного заражения.

На фиг. 3А представлен график уровней САВ в плазме крови после однократной внутримышечной (ИМ) дозы NCAB, NMCAB или NM2CAB у самок NSG (NOD scid gamma мышь) мышей. Вводимая доза составляла 45 мг САВ-эквивалентов (экв.)/кг. Верхней штриховой жирной линией указано значение  $4 \times \text{PA-IC}_{90}$  САВ в плазме крови, составляющее 664 нг/мл, и нижняя пунктирная линия показывает  $1 \times \text{PA-IC}_{90}$  САВ в плазме крови, составляющую 166 нг/мл.

На фиг. 3В представлен график уровней САВ в плазме крови после однократной внутримышечной (ИМ) дозы NM3CAB у самок NSG (NOD scid gamma мышь) мышей. Вводимая доза составляла 45 мг САВ-эквивалентов (экв.)/кг. Верхней штриховой жирной линией указано значение  $4 \times \text{PA-IC}_{90}$  САВ в плазме крови, составляющее 664 нг/мл, и нижняя пунктирная линия показывает  $1 \times \text{PA-IC}_{90}$  САВ в плазме крови, составляющую 166 нг/мл.

На фиг. 4 представлены изображения антитретровирусного дозозависимого эффекта NM2CAB в концентрации 10, 50 или 100 мкМ, полученные с помощью иммуноцитохимического окрашивания в отношении антигена р24 ВИЧ-1.

На фиг. 5 представлены графики уровней пролекарства. Биораспределение пролекарств (MCAB или M2CAB) в тканях и крови оценивали через 14, 28, 42 и 364 суток после однократной ИМ инъекции NMCAB или NM2CAB. Уровни пролекарств измеряли в селезенке, печени, кишечнике, легком, головном мозге, ткани прямой кишки, почках, тканях, анатомически ассоциированных с лимфатическими узлами, и в крови. Уровни пролекарств определяли с помощью LC-MS/MS (жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией). Данные выражены в виде среднего значения  $\pm$  SEM. Для групп в день 14, 28 и 42 количества животных в каждой группе составляли N=5, а для группы в день 364 количества животных составляли N=3 (NMCAB), N=4 (NM2CAB). Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим апостериорным критерием Тьюки использовали для сравнения уровней лекарственного средства в тканях между тремя обработками (\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001).

На фиг. 6А и 6В представлены графики фармакокинетических параметров и биораспределения NM2CAB у макаков-резусов. Четырем макакам-резусам вводили дозу 45 мг/кг САВ-эквивалента NM2CAB с помощью однократной ИМ инъекции. Образцы плазмы крови собирали и подвергали анализу в отношении уровней САВ (верхние линии) и M2CAB (нижние линии) в течение периода до дня 393 (фиг. 6А). Биоптаты ткани прямой кишки, лимфатических узлов и жировой ткани собирали в день 204 после введения лекарственного средства и подвергали анализу в отношении концентраций как САВ (сверху), так и M2CAB (снизу) (фиг. 6В). Концентрации лекарственного средства как в плазме крови, так и в тканях определяли с помощью LCMS/MS.

#### **Подробное описание настоящего изобретения**

Максимальное ограничение вирусной нагрузки в тканях пораженных инфекцией участков могут способствовать стратегиям уничтожения вируса. Это может быть достигнуто с помощью образования нанокристаллов активного липофильного и гидрофобного антитретровирусного пролекарства, стабилизированных поверхностно-активными веществами. Показатели гидрофобности, скорости гидролиза лекарственного средства и антитретровирусных активностей должны быть сбалансированы для оптимального терапевтического эффекта. В данном документе продемонстрировано, что манипуляция с длиной гидрофобной и липофильной углеродной цепи пролекарства может оптимизировать терапевтическую эффективность, в особенности в случае антитретровирусной терапии с медленным эффективным высвобождением и длительным действием (LASER ART). LASER ART относится к антитретровирусному лекарственному средству длительного действия, образованному из нанокристаллов пролекарства с липидным хвостом. Нанокристалл микростойлированного пролекарства САВ обеспечивает устойчивые концентрации САВ в плазме крови в  $\text{PA-IC}_{90}$  в течение 4 месяцев у макаков-резусов после однократной дозы 45 мг/кг САВ-эквивалента, вводимой посредством внутримышечной инъекции. В данном документе показано, что дополнительные химические модификации, неожиданно, служат для усиления липофильности и гидрофобности САВ, улучшения активности лекарственного средства и замедления гидролиза пролекарства, тем самым значительно продлевая период полувыведения исходного лекарственного средства. Новые пролекарства каботегавира (M2CAB) усиливают инкапсуляцию лекарственного средства с соответствующими вспомогательными веществами и стабилизаторами, такими как полоксамер 407 (P407).

Наносоставы M2CAB (NM2CAB) обеспечивают замедленное высвобождение лекарственного средства и сайт-специфическую доставку антитретровирусного лекарственного средства. Пролекарства содержат нативное лекарственное средство, конъюгированное с гидрофобными фрагментами через подающиеся гидролизу ковалентные связи. Наносоставы NM2CAB быстро поглощались человеческими макрофагами, полученными из моноцитов, (MDM) с устойчивым удержанием лекарственного средства в течение 30 суток *in vitro*; в то время как наносостав исходного лекарственного средства (NCAB) или микростойлированный каботегавир первого поколения (NMCAB) демонстрировали прорыв ВИЧ-1 в MDM в пределах одних или 20 суток обработки соответственно. Примечательно, что MDM, обработанные NM2CAB, демонстрировали устойчивые антитретровирусные активности после контрольного заражения

ВИЧ-1 в течение периода до 30 суток после однократной обработки лекарственным средством. р24 ВИЧ-1 не выявлялся в группе, получавшей обработку NM2CAB, при измерении в день 5 и в последующие моменты времени с пошаговым приращением на 5 суток в течение периода до 30 суток или дольше. Кроме того, однократная внутримышечная (IM) инъекция NM2CAB в дозе 45 мг САВ-экв./кг самкам NSG (NOD scid gamma мышь) мышей демонстрировала кинетику контролируемого высвобождения нулевого порядка для активного САВ и обеспечивала уровни лекарственного средства, приблизительно соответствующие или превышающие 4-кратное значение  $PA-IC_{90}$ , в течение более чем 5 месяцев. Наносоставы NM2CAB, представленные в данном документе, обеспечивают улучшения при современных комбинированных схемах ART, которые требуют нескольких суточных введений, посредством снижения количества принимаемых пациентом единиц дозирования препаратов, снижения риска возврата вирусной нагрузки, ограничения токсичностей и/или обеспечения возможности проникновения лекарственного средства в вирусные резервуары. Важно, что NM2CAB также обеспечивает интервал между приемами лекарственного средства, составляющий один раз в шесть месяцев (или даже менее часто), для максимального повышения эффективности доконтактной профилактики или схем лечения.

Составы для ART с длительным действием и замедленным высвобождением (LASER ART) могут продлевать интервалы между приемами доз, снижать системную токсичность и улучшать фармакокинетические (PK) и фармакодинамические (PD) профили (Sillman, et al., *Nat. Commun.* (2018), 9:443; Zhou, et al., *Biomaterials* (2018), 151:53-65; McMillan, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (2018), 62:e01316-17). В данном документе также предусмотрены новые пролекарства ингибиторов интегразы, их составы с замедленным высвобождением и длительным действием и способы их синтеза и применения. Ингибиторы интегразы (ингибиторы переноса цепи интегразой (INSTI)) представляют собой класс антиретровирусных лекарственных средств, предназначенных для блокирования действия интегразы (например, интегразы ВИЧ), вирусного фермента, который встраивает вирусный геном в ДНК клетки-хозяина. Примеры ингибиторов интегразы включают в себя, без ограничения, каботегравир (CAB, GSK1265744), ралтегравир (RAL), элвитегравир (EVG), долутегравир (DTG, GSK1349572), биктегравир (BIC, GS-9883), BI 224436 (Boehringer Ingelheim, Ингельхайм, Германия) и МК-2048 (Merck, Кенилворт, Нью-Джерси, США). Гидрофобные и липофильные пролекарства и их составы с замедленным эффективным высвобождением демонстрируют повышенную активность и эффективность, повышенное проникновение в клетки и ткани, а также продленные периоды полувыведения по сравнению с исходным ингибитором интегразы. Пролекарства и их составы согласно настоящему изобретению, а также их комбинации можно применять в контроле вирусных (например, ретровирусных) инфекций.

Средства для лечения вирусных инфекций, в частности ВИЧ-инфекций, которые являются доступными на данный момент, включают в себя ингибиторы проникновения вируса, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы интегразы и протеазы. Устойчивость связана с коротким периодом полувыведения лекарственного средства, жизненным циклом вируса и быстрыми мутациями, приводящими в результате к высокой генетической изменчивости. Особое внимание заслужили методы комплексной терапии, например, методы антиретровирусной терапии (ART), которые рассматриваются как терапия "коктейлем" лекарственных средств. Благоприятные воздействия включают в себя пониженную устойчивость вируса, ограниченные токсичности, улучшенное соблюдение режимов терапевтических схем и устойчивую антиретровирусную эффективность. Методы комплексной терапии сводят к минимуму возможную устойчивость к лекарственным средствам посредством подавления репликации вируса (например, ВИЧ), тем самым сокращая число спонтанно возникающих устойчивых мутантов. Неэффективность лечения связана, отчасти, с короткими периодами полувыведения лекарственного средства. Более того, неэффективность также может быть связана, отчасти, с ограниченным доступом лекарственного средства к ткани и клеточным вирусным резервуарам, тем самым препятствуя попыткам уничтожения вируса. В связи с этим разработка платформ на основе содержащихся в наносоставах пролекарств (наночастиц), нацеленных на клетку и ткань, представляет значительный интерес для контроля вирусных (например, ВИЧ) инфекций. Доконтактная профилактика (PrEP) представляет собой другую стратегию, применяемую в контроле передачи вируса (например, ВИЧ). Например, TRUVADA® (тенофовир/эмтрицитабин) был одобрен для доконтактной профилактики ВИЧ-инфекции. Кроме того, комбинацию ламивудина и зидовудина (COMBIVIR®) применяли в качестве доконтактной профилактики и постконтактной профилактики.

Пролекарства и содержащиеся в наносоставах пролекарства (наночастицы), представленные в данном документе, неожиданно продлевают период полувыведения лекарственного средства, повышают гидрофобность и липофильность и улучшают антиретровирусную эффективность. Это будет оказывать благоприятное воздействие на людей, которые должны получать высокие дозы ежедневно или даже по несколько доз в сутки, поскольку более низкая дозировка с меньшей частотой приема доз не только снизят побочные эффекты, но также будут удобны для пациентов. Пролекарства и содержащиеся в наносоставах пролекарства (наночастицы), представленные в данном документе, также можно применять в качестве постконтактного лечения и/или доконтактной профилактики (например, для людей, которые имеют высокий риск заражения ВИЧ-1). Иными словами, пролекарства и наночастицы согласно настоящему

изобретению, а также их комбинацию можно применять для предупреждения вирусной инфекции (например, ВИЧ-инфекции) и/или лечения или подавления острой или хронической вирусной инфекции (например, ВИЧ-инфекции). Несмотря на то что пролекарства и наночастицы согласно настоящему изобретению, в целом, описаны как средства, противодействующие ВИЧ, пролекарства и наносоставы согласно настоящему изобретению также являются эффективными против других вирусных инфекций, в том числе, без ограничения: ретровирусов (например, лентивирусов), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV) и вирусов Т-клеточного лейкоза человека (HTLV), в особенности ретровирусов.

В настоящем изобретении описаны новые, активные пролекарства широкого спектра действия с улучшенной биологической активностью по сравнению с исходными лекарственными средствами. Также предусмотрены способы инкапсулирования пролекарств в эффективные составы замедленного длительного действия для эффективной внутриклеточной доставки и доставки в ткани и продленных периодов полувыведения лекарственного средства. Композиции с длительным действием и замедленным высвобождением (LASER), описанные в данном документе, демонстрируют повышенную активность, и их можно применять в качестве эффективных терапевтических или профилактических вмешательств против вирусных инфекций (например, ретровирусных инфекций).

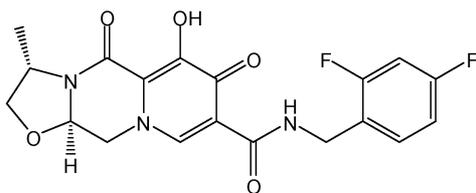
Пролекарства согласно настоящему изобретению обеспечивают возможность эффективной внутриклеточной доставки ингибиторов интегразы. В данном документе представлены пролекарства, которые представляют собой производные ингибиторов интегразы, в которых химический фрагмент, в частности кислородсодержащий фрагмент, такой как гидроксильная группа, был заменен на сложноэфирный фрагмент, содержащий гидрофобный и липофильный расщепляемый фрагмент (например, терапевтические жирные спирты). Гидрофобный и липофильный расщепляемый фрагмент (например, терапевтические жирные спирты) может демонстрировать противовирусную активность в отношении оболочечных вирусов (Katz, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* (1994), 724:472-88). Примечательно, что синергические взаимодействия между терапевтическими жирными спиртами и нуклеозидными аналогами могут существенно усиливать противовирусную активность нуклеозидов (Marcelletti, et al., *Antiviral Res.* (2002), 56:153-66).

Как описано в данном документе, пролекарства могут содержать лабильные терапевтические жирные спирты для улучшения активности лекарственного средства, ускорения проникновения внутрь клеток и в ткани, связывания с белками и биологической доступности. Гидрофобная природа синтезированных пролекарств облегчает инкапсулирование в нанокристаллы лекарственного средства с замедленным высвобождением и длительным действием с улучшенными биофармацевтическими свойствами. Наносоставы согласно настоящему изобретению могут состоять из частиц пролекарства, диспергированных в стерильных водных суспензиях и стабилизированных полимерными вспомогательными веществами, липидами и/или поверхностно-активными веществами или полимерами. Не вдаваясь в теорию, механизм высвобождения лекарственного средства включает растворение пролекарства из наночастицы с последующим эффективным расщеплением с образованием двух биологически активных средств, т.е. ингибитора интегразы и противовирусных жирных спиртов широкого спектра действия.

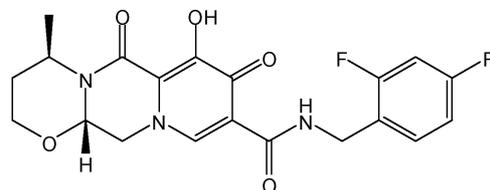
Преимущества системы, описанной в данном документе, включают в себя, без ограничения, улучшенную активность лекарственного средства, биологическую доступность и продленный период полувыведения для удобства пациента. Действительно, наносоставы, описанные в настоящем изобретении, демонстрировали существенное повышение поглощения лекарственного средства макрофагами, полученными из моноцитов (MDM). Модифицированное лекарственное средство и наночастицы также демонстрировали повышенную активность вследствие повышенного и длительного подавления вирусной репликации. Таким образом, наносоставы согласно настоящему изобретению обеспечивают возможность усиления противовирусной активности и ускоренной доставки лекарственного средства в анатомические резервуары инфекции.

В соответствии с настоящим изобретением обеспечены пролекарства ингибиторов интегразы. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство содержит ингибитор интегразы, в котором химический фрагмент, такой как гидроксильная группа, заменен на сложный эфир, содержащий необязательно замещенную алифатическую или алкильную группу. В соответствии с конкретным вариантом осуществления сложный эфир содержит углеводородную цепь, в частности углеводородную цепь длиной 16-20 атомов углерода или длиной 18 атомов углерода (нумерация в данном случае включает углерод в C=O сложного эфира).

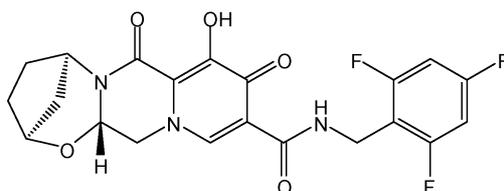
В соответствии с конкретным вариантом осуществления ингибитор интегразы выбран из группы, состоящей из каботегавира (CAB), ралтегавира (RAL), элвитегавира (EVG), долутегавира (DTG), биктегавира (BIC), BI 224436 и МК-2048. В соответствии с конкретным вариантом осуществления ингибитор интегразы выбран из группы, состоящей из каботегавира (CAB), ралтегавира (RAL), элвитегавира (EVG), долутегавира (DTG) и биктегавира (BIC). Примерами химических структур этих ингибиторов интегразы являются:



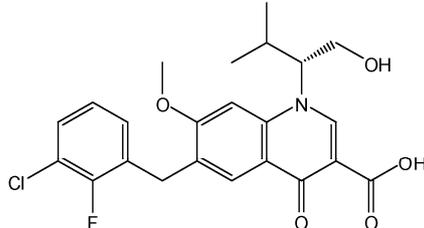
каботегравир (CAB),



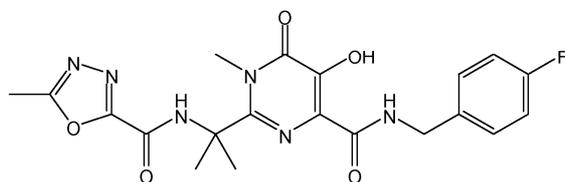
долутегравир (DTG),



биктеgravир (BIC),

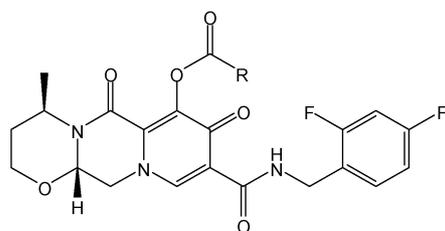
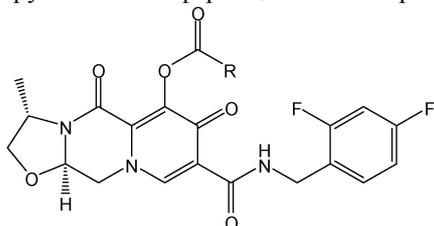


эlvитегравир (EVG) и



ралтеgravир (RAL).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство согласно настоящему изобретению выбрано из следующей группы или их фармацевтически приемлемой соли:

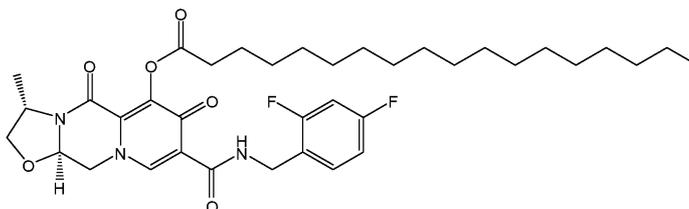




жирной кислоты (насыщенной или ненасыщенной), в частности, C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> жирной кислоты, C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub> жирной кислоты, C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> жирной кислоты, C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub> жирной кислоты, C<sub>18</sub>-C<sub>20</sub> жирной кислоты или C<sub>18</sub> жирной кислоты (нумерация в данном случае включает углерод в С=О сложного эфира).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления R представляет собой насыщенную линейную алифатическую цепь или углеводородную цепь длиной по меньшей мере 14 углеродов (например, длиной 14-21 углерод в цепи, длиной 14-19 углеродов в цепи, длиной 14-17 углеродов в цепи, длиной 15-21 углеродов в цепи, длиной 15-19 углеродов в цепи, длиной 15-17 углеродов в цепи или длиной 17 углеродов в цепи). В соответствии с конкретным вариантом осуществления R представляет собой насыщенную линейную алифатическую цепь или углеводородную цепь длиной 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 углерод, в частности длиной 14, 15, 16, 17, 18 или 19 углеродов, длиной 15, 16 или 17 углеродов или длиной 17 углеродов. В соответствии с конкретным вариантом осуществления R представляет собой насыщенную линейную алифатическую цепь или углеводородную цепь длиной 17 углеродов.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство согласно настоящему изобретению представляет собой:



(M2СAВ) или его фармацевтически приемлемую соль.

В настоящее изобретение также включены наночастицы (иногда называемые в данном документе наносоставами), содержащие пролекарство согласно настоящему изобретению. Наночастицы можно применять для доставки соединений в клетку или хозяину (например, *in vitro* или *in vivo*). В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицу применяют для доставки субъекту антиретровирусного терапевтического средства. Наночастицы согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно пролекарство и по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или полимер. В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы характеризуются определяемым с помощью спектроскопии соотношением поверхностно-активное вещество/полимер лекарственное средство, которое поддерживает оптимальное нацеливание наночастицы с лекарственным средством для сохранения в макрофагальном депо. Эти компоненты наночастицы вместе с другими необязательными компонентами описаны в данном документе ниже.

Способы синтеза наночастиц согласно настоящему изобретению являются известными в уровне техники. В соответствии с конкретным вариантом осуществления в способах образуют наночастицы, содержащие пролекарство (например, кристаллическое или аморфное), покрытые (либо частично, либо полностью) полимером и/или поверхностно-активным веществом. Примеры способов синтеза включают в себя, без ограничения, размол (например, влажный размол), гомогенизацию (например, гомогенизацию высокого давления), технологию репликации частиц в несмачиваемых матрицах (PRINT) и/или методики ультразвуковой обработки. Например, в публикации заявки на патент США № 2013/0236553, включенной в данный документ посредством ссылки, представлены способы, подходящие для синтеза наночастиц согласно настоящему изобретению. В соответствии с конкретным вариантом осуществления полимеры или поверхностно-активные вещества вначале подвергают химической модификации с помощью нацеливающих лигандов, а затем применяют непосредственно или смешивают с не обеспечивающими нацеливание полимерами или поверхностно-активными веществами в определенных молярных соотношениях с целью создания покрытия на поверхности суспензий пролекарства, например, посредством применения процесса синтеза наночастиц (например, процесса синтеза кристаллических наночастиц), такого как размол (например, влажный размол), гомогенизация (например, гомогенизация высокого давления), технология репликации частиц в несмачиваемых матрицах (PRINT) и/или методики ультразвуковой обработки, таким образом получая нацеленные наносоставы. Наночастицы можно применять с дополнительной очисткой или без нее, хотя избежание дополнительной очистки является желательным для более быстрого получения наночастиц. В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы синтезируют с применением размола и/или гомогенизации. Нацеленные наночастицы (например, с применением лигандов (необязательно с высокой молекулярной массой)) можно разрабатывать посредством либо физического, либо химического нанесения покрытия и/или связывания на поверхности полимеров или поверхностно-активных веществ и/или наносуспензий лекарственного средства.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы согласно настоящему изобретению синтезируют посредством добавления пролекарства (например, кристаллов) к раствору полимера или поверхностно-активного вещества, а затем образования наночастиц (например, посредством влажного размола или гомогенизации высокого давления). Пролекарство и раствор полимера или поверхностно-активного вещества можно подвергать встряхиванию перед влажным размолом или гомогенизацией высокого давления.

Наночастицы согласно настоящему изобретению можно применять для доставки по меньшей мере одного пролекарства согласно настоящему изобретению в клетку или субъекту (в том числе отличным от человека животным). Наночастицы согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать по меньшей мере одно другое средство или соединение, в частности биологически активное средство, в частности терапевтическое средство (например, противовирусное соединение), или диагностическое средство, в частности по меньшей мере одно противовирусное или антиретровирусное средство. В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере два терапевтических средства, в частности, при этом по меньшей мере одно представляет собой пролекарство согласно настоящему изобретению. Например, наночастица может содержать пролекарство ингибитора интегразы согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одно другое терапевтическое средство (например, средство, противодействующее ВИЧ).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы согласно настоящему изобретению представляют собой субмикронную коллоидную дисперсию наноразмерных кристаллов пролекарства, стабилизированных полимерами или поверхностно-активными веществами (например, покрытые поверхностно-активным веществом кристаллы лекарственного средства; наносостав). В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство может являться кристаллическим (твердые вещества, имеющие характеристики кристаллов), аморфным или оно представляет собой находящиеся в твердом состоянии наночастицы пролекарства, которые образованы в виде кристалла, который объединяет лекарственное средство и полимер или поверхностно-активное вещество. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство является кристаллическим. Используемый в контексте данного документа термин "кристаллический" относится к упорядоченному состоянию (т.е. отличному от аморфного) и/или веществу, демонстрирующему дальний порядок в трех измерениях. В соответствии с конкретным вариантом осуществления большая часть (например, по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95% или больше) пролекарства и, необязательно, гидрофобная часть поверхностно-активного вещества являются кристаллическими.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастица согласно настоящему изобретению имеет диаметр, составляющий приблизительно до 2 или 3 мкм (например, z-средний диаметр), или ее наибольший линейный размер, в частности, составляет приблизительно до 1 мкм (например, от приблизительно 100 нм до приблизительно 1 мкм). Например, диаметр или наибольший линейный размер наночастицы может составлять от приблизительно 50 до приблизительно 800 нм. В соответствии с конкретным вариантом осуществления диаметр или наибольший линейный размер наночастицы составляет от приблизительно 50 до приблизительно 750 нм, от приблизительно 50 до приблизительно 500 нм, от приблизительно 200 до приблизительно 500 нм, от приблизительно 200 до приблизительно 400 нм или от приблизительно 250 до приблизительно 350 нм. Например, наночастицы могут иметь форму стержней, вытянутых стержней, неправильную или круглую форму. Наночастицы согласно настоящему изобретению могут являться нейтральными или заряженными. Наночастицы могут являться положительно или отрицательно заряженными.

Как указано выше в данном документе, наночастицы согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере один полимер или поверхностно-активное вещество. "Поверхностно-активное вещество" относится к поверхностно-активному средству, включающему в себя вещества, которые обычно называются смачивающими средствами, детергентами, диспергирующими средствами или эмульгирующими средствами. Поверхностно-активные вещества обычно представляют собой органические соединения, которые являются амфифильными.

Примеры полимеров или поверхностно-активных веществ включают в себя, без ограничения, синтетические или натуральные фосфолипиды, пегилированные липиды (например, пегилированный фосфолипид), производные липидов, полисорбаты, амфифильные сополимеры, амфифильные блок-сополимеры, сополимеры поли(этиленгликоля) и сополимера лактида и гликолида (PEG-PLGA), их производные, конъюгированные с лигандом производные и их комбинации. В настоящем изобретении также можно применять другие полимеры или поверхностно-активные вещества и их комбинации, которые могут образовывать стабильные наносuspензии и/или могут химически/физически связываться с нацеливающими лигандами для восприимчивых к ВИЧ-инфекции/ВИЧ-инфицированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, макрофагов и дендритных клеток. Дополнительные примеры полимеров или поверхностно-активных веществ включают в себя, без ограничения, 1) неионные поверхностно-активные вещества (например, пегилированные и/или конъюгированные с полисахаридами сложные полиэферы и другие гидрофобные полимерные блоки, такие как сополимер лактида и гликолида (PLGA), полимолочная кислота (PLA), поликапролактон (PCL), другие сложные полиэферы, поли(пропиленоксид), поли(1,2-бутиленоксид), поли(н-бутиленоксид), поли(тетрагидрофуран) и поли(стирол); глицериловые сложные эфиры, полиоксиэтиленовые простые эфиры жирных спиртов, полиоксиэтиленсорбитановые сложные эфиры жирных кислот, полиоксиэтиленовые сложные эфиры жирных кислот, сорбитановые сложные эфиры, глицеринмоностеарат, полиэтиленгликоли, полипропиленгликоли, цетиловый спирт, цетостеариловый спирт, стеариловый спирт, арилалкил полиэфирные спирты, сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена, полоксамины, целлюлоза, метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гид-

роксипропилметилцеллюлоза, полисахариды, крахмал и их производные, гидроксипропилкрахмал, поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон и их комбинация); и 2) ионные поверхностно-активные вещества (например, фосфолипиды, амфифильные липиды, 1,2-диалкилглицеро-3-алкилфосфохолины, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин-N-карбоксии(полиэтиленгликоль) (DSPE-PEG), диметиламиноэтанкарбамоил-холестерин (DC-Chol), N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний (DOTAP), галогениды алкилпиридиния, соединения четвертичного аммония, лауридиметилбензиламмоний, гидрохлориды ацилкарнитина, диметилдиоктадециламмоний (DDAB), n-октиламины, олеиламины, бензалконий, цетилтриметиламмоний, хитозан, соли хитозана, поли(этиленимин) (PEI), поли(N-изопропилакриламид) (PNIPAM) и поли(аллиламин) (PAH), поли(диметилдиаллиламмония хлорид) (PDDA), алкилсульфонаты, алкилфосфаты, алкилфосфонаты, лаурат калия, триэтаноламинстеарат, лаурилсульфат натрия, додецилсульфат натрия, алкилполиоксиэтиленсульфаты, альгиновая кислота, соли альгиновой кислоты, гиалуроновая кислота, соли гиалуроновой кислоты, желатины, сульфосукцинат диоктилнатрия, карбоксиметилцеллюлоза натрия, сульфат целлюлозы, декстран-сульфат и карбоксиметилцеллюлоза, хондроитин-сульфат, гепарин, синтетическая поли(акриловая кислота) (PAA), поли(метакриловая кислота) (PMA), поли(винилсульфат) (PVS), поли(стирол-сульфонат) (PSS), желчные кислоты и их соли, холевая кислота, дезоксихолевая кислота, гликохолевая кислота, таурохолевая кислота, гликодезоксихолевая кислота, их производные и их комбинации).

Полимер или поверхностно-активное вещество согласно настоящему изобретению могут являться заряженными или нейтральными. В соответствии с конкретным вариантом осуществления полимер или поверхностно-активное вещество является нейтральным или отрицательно заряженным (например, поллоксамеры, полисорбаты, фосфолипиды и их производные).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления полимер или поверхностно-активное вещество представляет собой амфифильный блок-сополимер или производное липида. В соответствии с конкретным вариантом осуществления по меньшей мере один полимер или поверхностно-активное вещество в наночастице представляет собой амфифильный блок-сополимер, в частности, сополимер, содержащий по меньшей мере один блок поли(оксиэтилена) и по меньшей мере один блок поли(оксипропилена). В соответствии с конкретным вариантом осуществления полимер или поверхностно-активное вещество представляет собой амфифильный триблок-сополимер. В соответствии с конкретным вариантом осуществления полимер или поверхностно-активное вещество представляет собой амфифильный триблок-сополимер, содержащий центральный гидрофобный блок пропиленгликоля с примыкающими с боков двумя гидрофильными блоками полиэтиленгликоля. В соответствии с конкретным вариантом осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой поллоксамер 407.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления амфифильный блок-сополимер представляет собой сополимер, содержащий по меньшей мере один блок поли(оксиэтилена) и по меньшей мере один блок поли(оксипропилена). В соответствии с конкретным вариантом осуществления амфифильный блок-сополимер представляет собой поллоксамер. Примеры поллоксамеров включают в себя, без ограничения, Pluronic® L31, L35, F38, L42, L43, L44, L61, L62, L63, L64, P65, F68, L72, P75, F77, L81, P84, P85, F87, F88, L92, F98, L101, P103, P104, P105, F108, L121, L122, L123, F127, 10R5, 10R8, 12R3, 17R1, 17R2, 17R4, 17R8, 22R4, 25R1, 25R2, 25R4, 25R5, 25R8, 31R1, 31R2 и 31R4. В соответствии с конкретным вариантом осуществления поллоксамер представляет собой поллоксамер 407 (Pluronic® F127).

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения полимер или поверхностно-активное вещество присутствует в наночастице и/или растворе для синтеза наночастицы (как описано в данном документе) в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 10 или 15% по массе. В соответствии с конкретным вариантом осуществления концентрация полимера или поверхностно-активного вещества находится в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 15%, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10%, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10% или от приблизительно 0,1 до приблизительно 6% по массе. В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастица содержит по меньшей мере приблизительно 50, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% или больше по массе терапевтического средства (пролекарства). В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы характеризуются определенным соотношением лекарственное средство:полимер/поверхностно-активное вещество. В соответствии с конкретным вариантом осуществления соотношение лекарственное средство:полимер/поверхностно-активное вещество (например, по массе) составляет от приблизительно 10:6 до приблизительно 1000:6, от приблизительно 20:6 до приблизительно 500:6, от приблизительно 50:6 до приблизительно 200:6 или приблизительно 100:6.

Как указано выше в данном документе, полимер или поверхностно-активное вещество согласно настоящему изобретению могут быть связаны с нацеливающим лигандом. Нацеливание наночастиц (например, на макрофаг) может обеспечивать лучшее целенаправленное воздействие, пониженные скорости экскреции, пониженную токсичность и продленный период полувыведения по сравнению с несвязанным лекарственным средством или ненацеленными наночастицами. Нацеливающий лиганд представляет со-

бой соединение, которое специфически связывается с конкретным типом ткани или типом клеток (например, в желаемом соотношении мишень:клетка). Например, нацеливающий лиганд можно применять для захвата или связывания с поверхностным маркером или рецептором клетки-мишени (например, макрофага), что может облегчать его поглощение в клетку (например, внутрь защищенной субклеточной органеллы, которая свободна от метаболического разрушения). В соответствии с конкретным вариантом осуществления нацеливающий лиганд представляет собой лиганд для маркера/рецептора клеточной поверхности. Нацеливающий лиганд может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, иммунологически специфичные в отношении маркера клеточной поверхности (например, белка или углевода), преимущественно или исключительно экспрессирующегося на целевой ткани или типе клеток. Нацеливающий лиганд может быть связан с полимером или поверхностно-активным веществом непосредственно или посредством линкера. Обычно линкер представляет собой химический фрагмент, содержащий ковалентную связь или цепь из атомов, которая ковалентно прикрепляет лиганд к полимеру или поверхностно-активному веществу. Линкер может быть связан с любым реализуемым с помощью синтеза положением в лиганде и полимере или поверхностно-активном веществе. Иллюстративные линкеры могут содержать по меньшей мере одну необязательно замещенную; насыщенную или ненасыщенную; линейную, разветвленную или циклическую алифатическую группу, алкильную группу или необязательно замещенную арильную группу. Линкер может представлять собой низший алкил или алифатическую группу. Линкер также может представлять собой полипептид (например, полипептид из аминокислот в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 10, в частности, от приблизительно 1 до приблизительно 5). В соответствии с конкретным вариантом осуществления нацеливающий фрагмент связан с одним из концов или с обоими концами полимера или поверхностно-активного вещества. Линкер может являться неразлагающимся и может представлять собой ковалентную связь или любую другую химическую структуру, которая не может подвергаться значительному расщеплению или полному расщеплению в физиологических средах или при физиологических условиях.

Наночастицы/наносоставы согласно настоящему изобретению могут содержать обеспечивающие нацеливание и/или не обеспечивающие нацеливание полимеры или поверхностно-активные вещества. В соответствии с конкретным вариантом осуществления молярное отношение обеспечивающих нацеливание и не обеспечивающих нацеливание полимеров или поверхностно-активных веществ в наночастицах/наносоставах согласно настоящему изобретению составляет от приблизительно 0,001 до 100%, от приблизительно 1 до приблизительно 99%, от приблизительно 5 до приблизительно 95%, от приблизительно 10 до приблизительно 90%, от приблизительно 25 до приблизительно 75%, от приблизительно 30 до приблизительно 60% или приблизительно 40%. В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастица содержит только обеспечивающие нацеливание полимеры или поверхностно-активные вещества. В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы/наносоставы согласно настоящему изобретению содержат обеспечивающий нацеливание с помощью фолата полимер или поверхностно-активное вещество и не обеспечивающий нацеливание вариант полимера или поверхностно-активного вещества. В соответствии с конкретным вариантом осуществления наночастицы/наносоставы согласно настоящему изобретению содержат фолат-полоксамер 407 (FA-P407) и/или полоксамер 407.

Примеры нацеливающих лигандов включают в себя, без ограничения, лиганды для нацеливания на макрофаги, лиганды для нацеливания на CD4<sup>+</sup> Т-клетки, лиганды для нацеливания на дендритные клетки и лиганды для нацеливания на опухоли. В соответствии с конкретным вариантом осуществления нацеливающий лиганд представляет собой лиганд для нацеливания на макрофаги. Нацеленные наносоставы согласно настоящему изобретению могут содержать нацеливающий лиганд для направления наночастиц в недостижимые для действия лекарственных средств ткани и клетки/тканевые и клеточные резервуары ВИЧ (например, центральная нервная система, ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань (GALT), CD4<sup>+</sup> Т-клетки, макрофаги, дендритные клетки и т.д.). Лиганды для нацеливания на макрофаги включают в себя, без ограничения, лиганды фолатного рецептора (например, фолат (фолиевую кислоту) и антитела к фолатному рецептору и их фрагменты (см., например, Sudimack et al. (2000), Adv. Drug Del. Rev., 41:147-162)), лиганды маннозного рецептора (например, маннозу), лиганды формилпептидного рецептора (FPR) (например, N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF)) и тафтсин (тетрапептид Thr-Lys-Pro-Arg). Другие нацеливающие лиганды включают в себя, без ограничения, гиалуроновую кислоту, gp120 и его пептидные фрагменты, а также лиганды или антитела, специфичные в отношении CD4, CCR5, CXCR4, CD7, CD111, CD204, CD49a, CD29, CD19, CD20, CD22, CD171, CD33, Leis-Y, WT-1, R0R1, MUC16, MUC1, MUC4, эстрогенового рецептора, трансферриновых рецепторов, рецепторов EGF (например, HER2), фолатного рецептора, рецептора VEGF, рецептора FGF, андрогенового рецептора, NGR, интегринов и GD2. В соответствии с конкретным вариантом осуществления нацеливающий лиганд представляет собой фолиевую кислоту.

Как указано выше в данном документе, наночастицы согласно настоящему изобретению может содержать дополнительное терапевтическое средство. Настоящее изобретение также включает терапевтические способы, при которых пролекарство и/или наночастицы согласно настоящему изобретению вводятся совместно с другим терапевтическим средством. В соответствии с конкретным вариантом осуществ-

ления терапевтическое средство является гидрофобным, представляет собой нерастворимое в воде соединение или слабо растворимое в воде соединение, в частности, будучи включенным в наночастицу. Например, терапевтическое средство может иметь растворимость, составляющую менее чем приблизительно 10 мг/мл, менее чем 1 мг/мл, более конкретно, менее чем приблизительно 100 мкг/мл и, более конкретно, менее чем приблизительно 25 мкг/мл в воде или водной среде в диапазоне pH 0-14, предпочтительно, pH от 4 до 10, в частности, при 20°C.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления терапевтическое средство представляет собой противовирусное или антиретровирусное средство. Антиретровирусное средство может являться эффективным против лентивирусов или специфическим в их отношении. Лентивирусы включают в себя, без ограничения, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (например, ВИЧ-1, ВИЧ-2), вирус бычьего иммунодефицита (BIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита обезьян (SIV) и вирус инфекционной анемии у лошадей (EIA). В соответствии с конкретным вариантом осуществления терапевтическое средство представляет собой средство, противодействующее ВИЧ. Соединение, противодействующее ВИЧ, или средство, противодействующее ВИЧ, представляет собой соединение, которое подавляет ВИЧ (например, подавляет репликацию и/или инфицирование ВИЧ). Примеры средств, противодействующих ВИЧ, включают в себя, без ограничения:

(I) Ингибиторы обратной транскриптазы-нуклеозидные аналоги (NRTI). NRTI относятся к нуклеозидам и нуклеотидам и их аналогам, которые ингибируют активность обратной транскриптазы, в частности обратной транскриптазы ВИЧ-1. NRTI содержат сахар и основание. Примеры ингибиторов обратной транскриптазы-нуклеозидных аналогов включают в себя, без ограничения, адефовир дипивоксил, адефовир, ламивудин, телбивудин, энтекавир, тенофовир, ставудин, абакавир, диданозин, эмтрицитабин, залцитабин и зидовудин.

(II) Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI). NNRTI представляют собой аллостерические ингибиторы, которые обратимо связываются в сайте, отличном от сайта связывания субстрата, на обратной транскриптазе, в частности на обратной транскриптазе ВИЧ, таким образом изменяя форму активного центра или блокируя активность полимеразы. Примеры NNRTI включают в себя, без ограничения, делавирдин (DLV, BHAP, U-90152; Rescriptor®), эфавиренз (EFV, DMP-266, SUSTIVA®), невирапин (NVP, Viramune®), PNU-142721, каправирин (S-1153, AG-1549), эмвирин (+)-каланолит А (NSC-675451) и В, этавирин (ETR, TMC-125, Intelence®), рилпивирин (RPV, TMC278, Edurant™), DAPY (TMC120), доравирин (Pifeltro™), BILR-355 BS, PHI-236 и PHI-443 (TMC-278).

(III) Ингибиторы протеазы (PI). Ингибиторы протеазы представляют собой ингибиторы вирусной протеазы, в частности протеазы ВИЧ-1. Примеры ингибиторов протеазы включают в себя, без ограничения, дарунавир, ампренавир (141W94, AGENERASE®), типранавир (PNU-140690, APTIVUS®), индинавир (MK-639; CRDQVAN®), саквинавир (INVIRASE®, FORTOVASE®), фосампренавир (LEXIVA®), лопинавир (ABT-378), ритонавир (ABT-538, NORVIR®), атазанавир (REYATAZ®), нелфинавир (AG-1343, VIRACEPT®), ласинавир (BMS-234475/CGP-61755), BMS-2322623, GW-640385X (VX-385), AG-001859 и SM-309515.

(IV) Ингибиторы слияния или проникновения. Ингибиторы слияния или проникновения представляют собой соединения, такие как пептиды, которые блокируют попадание ВИЧ в клетку (например, посредством связывания с белком оболочки ВИЧ и блокирования структурных изменений, необходимых для слияния вируса с клеткой-хозяином). Примеры ингибиторов слияния включают в себя, без ограничения, антагонисты рецептора CCR5 (например, маравирик (Selzentry®, Celsentri)), энфувиртид (INN, FUZEON®), T-20 (DP-178, FUZEON®) и T-1249.

(V) Ингибиторы интегразы (помимо пролекарства согласно настоящему изобретению). Ингибиторы интегразы представляют собой класс антиретровирусных лекарственных средств, предназначенных для блокирования действия интегразы (например, интегразы ВИЧ), вирусного фермента, который встраивает вирусный геном в ДНК клетки-хозяина. Примеры ингибиторов интегразы включают в себя, без ограничения, ралтегравир, элвитегравир, GSK1265744 (каботегравир), GSK1349572 (долутегравир), GS-9883 (биктегравир) и MK-2048.

Соединения, противодействующие ВИЧ, также включают в себя ингибиторы созревания (например, бевиримат). Ингибиторы созревания, как правило, представляют собой соединения, которые связываются с gag ВИЧ и нарушают его процессинг в ходе созревания вируса. Соединения, противодействующие ВИЧ, также включают в себя вакцины против ВИЧ, такие как, без ограничения, ALVAC® HIV (vCP1521), AIDSVAX®B/E (gp120) и их комбинации. Соединения, противодействующие ВИЧ, также включают в себя антитела к ВИЧ (например, антитела к gp120 или gp41), в частности нейтрализующие антитела широкого спектра действия.

Можно применять более чем одно средство, противодействующее ВИЧ, в частности, в случае, когда средства имеют отличающиеся механизмы действия (как обозначено выше). Например, средства, противодействующие ВИЧ, которые не представляют собой NNRTI, можно комбинировать с пролекарствами NNRTI согласно настоящему изобретению. В соответствии с конкретным вариантом осуществления терапия против ВИЧ представляет собой высокоактивную антиретровирусную терапию (HAART).

Настоящее изобретение включает композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие по меньшей мере одно пролекарство и/или наночастицу согласно настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Как указано выше в данном документе, наночастица может содержать более чем одно терапевтическое средство. В соответствии с конкретным вариантом осуществления фармацевтическая композиция содержит первую наночастицу, содержащую первое пролекарство, и вторую наночастицу, содержащую второе пролекарство, причем первое и второе пролекарства отличаются. В соответствии с конкретным вариантом осуществления первое пролекарство представляет собой пролекарство согласно настоящему изобретению и второе пролекарство представляет собой пролекарство нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (NNRTI), в частности рилпивирин (RPV). Композиции (например, фармацевтические композиции) согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие терапевтические средства (например, другие соединения, противодействующие ВИЧ, (например, описанные в данном документе)).

Настоящее изобретение также включает способы предупреждения, подавления и/или лечения заболевания или нарушения. Способы предусматривают введение пролекарства и/или наночастицы согласно настоящему изобретению (необязательно, в композиции) субъекту, нуждающемуся в этом. В соответствии с конкретным вариантом осуществления заболевание или нарушение представляет собой вирусную инфекцию (например, ретровирусную инфекцию). Примеры вирусных инфекций включают в себя, без ограничения, ВИЧ, гепатит В, гепатит С и HTLV. В соответствии с конкретным вариантом осуществления вирусная инфекция представляет собой ретровирусную или лентивирусную инфекцию, в частности, ВИЧ-инфекцию (например, ВИЧ-1). Пролекарства и/или наночастицы согласно настоящему изобретению (необязательно, в композиции) можно вводить животному, в частности млекопитающему, более конкретно, человеку, с целью лечения/подавления/предупреждения заболевания или нарушения (например, ретровирусной инфекции, такой как ВИЧ-инфекция). Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также могут содержать по меньшей мере одно другое терапевтическое средство, такое как противовирусное средство, в особенности, по меньшей мере одно соединение, противодействующее ВИЧ/средство, противодействующее ВИЧ. Дополнительное соединение, противодействующее ВИЧ, также можно вводить в отдельной фармацевтической композиции относительно пролекарства или композиций согласно настоящему изобретению. Фармацевтические композиции можно вводить одновременно или в разные моменты времени (например, последовательно).

Диапазоны дозировок для введения пролекарств, наночастиц и/или композиций согласно настоящему изобретению являются достаточно большими, чтобы обеспечивать желаемый эффект (например, излечение, облегчение, лечение и/или предупреждение заболевания или нарушения (например, ВИЧ-инфекции), их симптомов (например, СПИД, ARC (СПИД-ассоциированный комплекс)) или предрасположенности к ним). В соответствии с конкретным вариантом осуществления фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту в количестве от приблизительно 5 мкг/кг до приблизительно 500 мг/кг. В соответствии с конкретным вариантом осуществления фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту в количестве, большем чем приблизительно 5 мкг/кг, большем чем приблизительно 50 мкг/кг, большем чем приблизительно 0,1 мг/кг, большем чем приблизительно 0,5 мг/кг, большем чем приблизительно 1 мг/кг или большем чем приблизительно 5 мг/кг. В соответствии с конкретным вариантом осуществления фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту в количестве от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 100 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 50 мг/кг. Дозировка не должна быть столь большой, чтобы вызвать значительные неблагоприятные побочные эффекты, такие как нежелательные перекрестные реакции, анафилактические реакции и т.п. Обычно дозировка будет варьировать с возрастом, состоянием, полом и степенью тяжести заболевания у пациента, и она может быть определена специалистом в данной области техники. Дозировка может быть скорректирована конкретным врачом в случае любых противопоказаний.

Пролекарства и наночастицы, описанные в данном документе, обычно будут вводить пациенту в виде фармацевтической композиции. Используемый в контексте данного документа термин "пациент" относится к субъектам-людям или субъектам-животным. Данные пролекарства и наночастицы можно использовать в терапевтических целях под руководством врача.

Фармацевтические композиции, содержащие пролекарства и/или наночастицы согласно настоящему изобретению, можно удобным образом составить для введения с любым(любыми) фармацевтически приемлемым(приемлемыми) носителем(носителями). Например, комплексы могут быть составлены с приемлемой средой, такой как вода, буферный солевой раствор, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), диметилсульфоксид (DMSO), масла, детергенты, суспендирующие средства или их подходящие смеси, в частности водный раствор. Концентрацию пролекарств и/или наночастиц в выбранной среде можно варьировать, и среда может быть выбрана, исходя из желаемого пути введения фармацевтической композиции. За исключением тех случаев, когда любая общепринятая среда или средство являются несовместимыми с наночастицами, подлежащими введению, предполагается их применение в фармацевтической композиции.

Доза и схема дозирования пролекарств и/или наночастиц согласно настоящему изобретению, кото-

рые являются подходящими для введения конкретному пациенту, могут быть определены врачом, исходя из возраста, пола, массы, общего состояния здоровья пациента и конкретного состояния, для лечения которого вводят наночастицы, и его тяжести. Врач также может принимать во внимание путь введения, фармацевтический носитель и биологическую активность наночастицы.

Выбор подходящей фармацевтической композиции также будет зависеть от выбранного способа введения. Например, наночастицы согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью прямой инъекции или внутривенно. В этом случае фармацевтическая композиция содержит пролекарство и/или наночастицу, диспергированную в среде, которая является совместимой с местом инъекции.

Пролекарства и/или наночастицы согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью любого способа. Например, пролекарства и/или наночастицы согласно настоящему изобретению можно вводить, без ограничения, парентерально, подкожно, перорально, местно, легочно, ректально, вагинально, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, интратекально, интрацеребрально, эпидурально, внутримышечно, интрадермально или интракаротидно. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство и/или наночастицу вводят парентерально. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство и/или наночастицу вводят перорально, внутримышечно, подкожно или в кровотоки (например, внутривенно). В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарство и/или наночастицу вводят внутримышечно или подкожно. Фармацевтические композиции для инъекции являются известными в уровне техники. Если в качестве способа введения пролекарства и/или наночастицы выбрана инъекция, должны быть осуществлены стадии для обеспечения того, чтобы достаточные количества молекул или клеток достигали своих клеток-мишеней для проявления биологического эффекта. Лекарственные формы для перорального введения включают в себя, без ограничения, таблетки (например, покрытые и без покрытия, жевательные), желатиновые капсулы (например, мягкие или твердые), пастилки для рассасывания, драже, растворы, эмульсии, суспензии, сиропы, эликсиры, порошки/гранулы (например, ресуспендируемые или диспергируемые), жевательные резинки и шипучие таблетки. Лекарственные формы для парентерального введения включают в себя, без ограничения, растворы, эмульсии, суспензии, дисперсии и порошки/гранулы для ресуспендирования. Лекарственные формы для местного применения включают в себя, без ограничения, кремы, гели, мази, бальзамы, пластыри и системы для трансдермальной доставки.

Фармацевтические композиции, содержащие пролекарство и/или наночастицу согласно настоящему изобретению в качестве активного ингредиента в однородной смеси с фармацевтически приемлемым носителем, можно получать в соответствии с общепринятыми методиками приготовления фармацевтических составов. Носитель может принимать широкий круг форм в зависимости от формы фармацевтической композиции, желательной для введения, например, внутривенного, перорального, прямой инъекции, внутривитреального и интравитреального.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно составлять в единичной лекарственной форме для упрощения введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма в контексте данного документа относится к физически дискретной единице фармацевтической композиции, подходящей для пациента, подвергающегося лечению. Каждая доза должна содержать количество активного ингредиента, рассчитанное для получения желаемого эффекта, в сочетании с выбранным фармацевтическим носителем. Процедуры по определению соответствующей единицы дозирования являются хорошо известными специалистам в данной области техники. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарства и/или наночастицы согласно настоящему изобретению вследствие их терапевтического эффекта длительного действия можно вводить раз в 1-12 месяцев или реже. Например, наносоставы согласно настоящему изобретению можно вводить раз в 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24 месяца или реже. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарства и/или наночастицы согласно настоящему изобретению вводят реже чем раз в два месяца. В соответствии с конкретным вариантом осуществления пролекарства и/или наносоставы пролекарств вводят раз в месяц, раз в два месяца, в частности, раз в три месяца, раз в четыре месяца, раз в пять месяцев, раз в шесть месяцев, раз в семь месяцев, раз в восемь месяцев, раз в девять месяцев, раз в десять месяцев, раз в одиннадцать месяцев, раз в двенадцать месяцев или реже.

Единицы дозирования можно пропорционально увеличивать или снижать, исходя из массы пациента. Подходящие концентрации для облегчения конкретного патологического состояния можно определять с помощью расчетов на основании кривой зависимости концентрации от дозы, как известно в уровне техники.

В соответствии с настоящим изобретением подходящую единицу дозирования для введения наночастиц можно определить посредством оценки токсичности молекул или клеток в моделях на животных. Различные концентрации наночастиц в фармацевтической композиции можно вводить мышам, и минимальные и максимальные дозировки можно определить на основании благоприятных результатов и побочных эффектов, наблюдаемых в результате лечения. Подходящую единицу дозирования также можно определить посредством оценки эффективности лечения наночастицами в комбинации с другими стандартными лекарственными средствами. Единицы дозирования наночастиц можно определить отдельно или в комбинации с каждым лечебным средством в соответствии с выявленным эффектом.

Фармацевтическую композицию, содержащую наночастицы, можно вводить с соответствующими интервалами до уменьшения или облегчения патологических симптомов, после чего дозировку можно уменьшить до поддерживающего уровня. Подходящий интервал в конкретном случае обычно будет зависеть от состояния пациента.

Настоящее изобретение включает способы лечения заболевания/нарушения, предусматривающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей пролекарство и/или наночастицу согласно настоящему изобретению и, предпочтительно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Настоящее изобретение также включает способы, при которых субъект получает лечение посредством *ex vivo* терапии. В частности, способ предусматривает удаление клеток из субъекта, воздействие на клетки/обеспечение контакта клеток *in vitro* с наночастицами согласно настоящему изобретению и возвращение клеток субъекту. В соответствии с конкретным вариантом осуществления клетки содержат макрофаги. Другие способы лечения заболевания или нарушения можно комбинировать со способами согласно настоящему изобретению, при этом можно осуществлять совместное введение с фармацевтическими композициями согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также включает доставку наночастицы согласно настоящему изобретению в клетку *in vitro* (например, в культуре). Наночастицу можно доставлять в клетку по меньшей мере в одном носителе.

### Определения

Следующие определения представлены для облегчения понимания настоящего изобретения.

Формы единственного числа включают в себя соответствующие формы множественного числа, если контекст явно не предписывает иное.

Термин "фармацевтически приемлемый" указывает на одобрение регулирующим органом федерального правительства США или правительством штата или на присутствие в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей.

Термин "носитель" относится, например, к разбавителю, вспомогательному средству, консерванту (например, тимеросалу, бензиловому спирту), антиоксиданту (например, аскорбиновой кислоте, метабисульфиту натрия), солубилизатору (например, полисорбату 80), эмульгатору, буферу (например, Tris HCl, ацетатному, фосфатному), противомикробному средству, объемообразующему веществу (например, лактозе, манниту), вспомогательному веществу, вспомогательному средству или среде, с которыми вводят активное средство согласно настоящему изобретению. Фармацевтически приемлемые носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе маслам из нефти, животного, растительного или синтетического происхождения. Воду или водные солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина предпочтительно используют в качестве носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические носители описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" за авторством E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA); Gennaro, A.R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Lippincott, Williams and Wilkins); Liberman, et al., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y.; и в Kibbe, et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington.

Термин "пролекарство" относится к соединению, которое метаболизируется или иным образом превращается в биологически активное или более активное соединение или лекарственное средство, как правило, после введения. Пролекарство по сравнению с лекарственным средством является химически модифицированным таким образом, что эта модификация делает его менее активным, по существу, неактивным или неактивным по сравнению с лекарственным средством. Тем не менее химическая модификация является такой, чтобы соответствующее лекарственное средство образовывалось вследствие метаболических или других биологических процессов, как правило, после введения пролекарства.

Используемый в контексте данного документа термин "лечение" относится к любому типу лечения, который оказывает благоприятное воздействие на пациента, пораженного заболеванием, в том числе на улучшение состояния пациента (например, на один или несколько симптомов), задержку развития состояния и т.д. В соответствии с конкретным вариантом осуществления лечение ретровирусной инфекции приводит в результате по меньшей мере к подавлению/уменьшению количества инфицированных клеток и/или выявляемых уровней вируса.

Используемый в контексте данного документа термин "предупреждение" относится к профилактическому лечению субъекта, который имеет риск развития состояния (например, ВИЧ-инфекции), приводящему в результате к снижению вероятности того, что у субъекта будет развиваться состояние.

"Терапевтически эффективное количество" соединения или фармацевтической композиции относится к количеству, эффективному для предупреждения, подавления, лечения или уменьшения симптомов конкретного нарушения или заболевания. Лечение микробной инфекции (например, ВИЧ-инфекции) в данном документе может относиться к излечению, ослаблению и/или предупреждению микробной инфекции, ее симптома(симптомов) или предрасположенности к ней.

Используемый в контексте данного документа термин "терапевтическое средство" относится к химическому соединению или биологической молекуле, в том числе, без ограничения, к нуклеиновым кислотам, пептидам, белкам и антителам, которые можно применять для лечения состояния, заболевания

или нарушения или уменьшения симптомов состояния, заболевания или нарушения.

Используемый в контексте данного документа термин "малая молекула" относится к веществу или соединению, которое имеет относительно низкую молекулярную массу (например, менее чем 4000, менее чем 2000, в частности, менее чем 1 кДа или 800 Да). Как правило, малые молекулы являются органическими, но не являются белками, полипептидами или нуклеиновыми кислотами, хотя они могут представлять собой аминокислоты или дипептиды.

Используемый в контексте данного документа термин "противомикробные средства" означает вещество, которое уничтожает микроорганизмы или подавляет рост микроорганизмов, таких как бактерии, грибки, вирусы или простейшие.

Используемый в контексте данного документа термин "противовирусное средство" относится к веществу, которое разрушает вирус и/или подавляет репликацию (репродукцию) вируса. Например, противовирусное средство может подавлять и/или предупреждать продуцирование вирусных частиц, созревание вирусных частиц, прикрепление вируса, поглощение вируса в клетки, сборку вируса, выход/отпочковывание вируса, интеграцию вируса и т.д.

Используемый в контексте данного документа термин "высокоактивная антиретровирусная терапия" (HAART) относится к терапии против ВИЧ с различными комбинациями терапевтических средств, таких как нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы протеазы ВИЧ и ингибиторы слияния.

Используемый в контексте данного документа термин "амфифильный" относится к способности растворяться как в воде, так и в липидах/неполярных средах. Как правило, амфифильное соединение содержит гидрофильную часть и гидрофобную часть. Термин "гидрофобный" означает предпочтение к неполярным средам (например, гидрофобное вещество или фрагмент легче растворяется или смачивается неполярными растворителями, такими как углеводороды, чем водой). "Гидрофобные" соединения в большинстве своем являются нерастворимыми в воде. Используемый в контексте данного документа термин "гидрофильный" означает способность растворяться в воде.

Используемый в контексте данного документа термин "полимер" означает молекулы, образованные в результате химического объединения двух или более повторяющихся звеньев или мономеров. Термин "блок-сополимер" в наиболее простом понимании относится к конъюгатам по меньшей мере из двух отличающихся сегментов полимера, причем каждый сегмент полимера содержит два или больше смежных звеньев одного и того же вида.

"Антитело" или "молекула антитела" представляет собой любой иммуноглобулин, в том числе антитела и их фрагменты (например, scFv), которые связываются с конкретным антигеном. При использовании в контексте данного документа антитело или молекула антитела предусматривает интактные молекулы иммуноглобулинов, иммунологически активные части молекул иммуноглобулинов и гибридные белки с иммунологически активными частями молекул иммуноглобулинов.

Используемый в контексте данного документа термин "иммунологически специфичный" относится к белкам/полипептидам, в частности к антителам, которые связываются с одним несколькими эпитопами белка или соединения, представляющего интерес, но которые не распознают и не связываются в значительной степени с другими молекулами в образце, содержащем смешанную популяцию антигенных биологических молекул.

Используемый в контексте данного документа термин "нацеливающий лиганд" относится к любому соединению, которое специфично связывается с конкретным типом ткани или типом клеток, в частности, без существенного связывания с другими типами тканей или типами клеток. Примеры нацеливающих лигандов включают в себя, без ограничения, белки, полипептиды, пептиды, антитела, фрагменты антител, гормоны, лиганды, углеводы, стероиды, молекулы нуклеиновой кислоты и полинуклеотиды.

Термин "алифатический" относится к неароматическому углеводородному фрагменту. Алифатические соединения могут представлять собой ациклические (например, линейные или разветвленные) или циклические фрагменты (например, циклоалкил) и могут являться насыщенными или ненасыщенными (например, алкил, алкенил и алкинил). Алифатические соединения могут содержать преимущественно углеродную основную цепь (например, от 1 до приблизительно 30 углеродов) и могут содержать гетероатомы и/или заместители (см. ниже).

Термин "алкил", который используется в данном документе, включает в себя насыщенные или ненасыщенные углеводороды с линейной или разветвленной цепью, содержащей от 1 до приблизительно 30 углеродов в нормальной/основной цепи. Углеводородная цепь в алкильных группах может прерываться одним или несколькими гетероатомами (например, кислородом, азотом или серой). Алкильная (или алифатическая группа), необязательно, может являться замещенной (например, менее чем приблизительно 8, менее чем приблизительно 6 или от 1 до приблизительно 4 заместителями).

Термин "низший алкил" или "низшая алифатическая группа" относится к алкильной или алифатической группе соответственно, которая содержит от 1 до 3 углеродов в углеводородной цепи. Алкильные или алифатические заместители включают в себя, без ограничения, алкил (например, низший алкил), алкенил, галоген (такой как F, Cl, Br, I), галогеналкил (например, CCl<sub>3</sub> или CF<sub>3</sub>), алкоксил, алкилтио, гидроксид, метокси, карбоксил, оксо, эпокси, алкилоксикарбонил, алкилкарбонилокси, амина, карбамоил

(например,  $\text{NH}_2\text{C}(=\text{O})$ - или  $\text{NHRC}(=\text{O})$ -, где R представляет собой алкил), мочевины ( $-\text{NHCONH}_2$ ), алкил-мочевину, арил, простой эфир, сложный эфир, сложный тиоэфир, нитрил, нитро, амид, карбонил, карбоксилат и тиол. Алифатические и алкильные группы, имеющие по меньшей мере приблизительно 5 углеродов в основной цепи, обычно являются гидрофобными, у них отсутствуют большие замещения гидрофильными заместителями.

Термин "арил", который используется в данном документе, относится к моноциклическим и бициклическим ароматическим группам, содержащим 6-10 углеродов в кольцевой части. Примеры арильных групп включают в себя, без ограничения, фенил, или нафтил, такой как 1-нафтил и 2-нафтил, или инденил. Арильные группы необязательно могут включать в себя от одного до трех дополнительных колец, конденсированных с циклоалкильным кольцом или гетероциклическим кольцом. Арильные группы необязательно могут являться замещенными по доступным атомам углерода, например, 1, 2 или 3 группами, выбранными из водорода, галогена, алкила, полигалогеналкила, алкокси, алкенила, трифторметила, трифторметокси, алкинила, арила, гетероцикло, аралкила, арилокси, арилоксиалкила, аралкокси, арилтио, арилазо, гетероциклоокси, гидроксид, нитро, циано, сульфонила-аниона, амино или замещенного амина. Арильная группа может представлять собой гетероарил.

Термин "гетероарил" относится к необязательно замещенной моно-, ди-, три- или другой полициклической ароматической кольцевой системе, которая включает в себя по меньшей мере один и предпочтительно от 1 до приблизительно 4 гетероатомов серы, кислорода или азота, являющихся членами кольца. Например, гетероарильные группы могут иметь от приблизительно 3 до приблизительно 50 атомов углерода (и все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретных количеств атомов углерода в них), причем предпочтительным является количество от приблизительно 4 до приблизительно 10 атомов углерода.

В следующих примерах представлены иллюстративные способы практического осуществления настоящего осуществления, и не предполагается, что они каким-либо образом ограничивают объем настоящего изобретения.

### Примеры

#### Пример 1.

Максимальное снижение уровня остаточного ВИЧ-1 в недостижимых для действия лекарственных средств участках ткани, которые включают в себя головной мозг, лимфатические узлы, костный мозг, ассоциированную с кишечником лимфоидную ткань и половые пути, может быть достигнуто с помощью разработки нацеленных на резервуары лекарственных препаратов длительного действия. Помимо благоприятного воздействия от больших интервалов между приемами лекарственного средства инъекционные составы лекарственного средства с длительным действием могут быть сконструированы с использованием опосредованных рецепторами процессов для достижения улучшенного нацеливания на клетки, продленного периода полувыведения лекарственного средства и улучшенного биораспределения в тканях. CAB представляет собой высокоактивный ингибитор вирусной интегразы, и он был составлен в виде LAP (LAP CAB), который демонстрирует устойчивые уровни лекарственного средства в плазме крови у людей после однократной внутримышечной дозы. Инъекционные наносоставы длительного действия для рилпивирин и LAP CAB уже обеспечивают возможность инъекции один раз в месяц для подавления и предупреждения ВИЧ (Andrews, et al. (2014), *Science*, 343(6175):1151-1154; Cohen, J. (2014), *Science*, 343(6175):1067; Spreen, et al. (2013), *Curr. Opin. HIV AIDS*, 8(6):565-571). Основные ограничения существующих наносоставов включают в себя необходимость высоких доз и больших объемов инъекции. Для этой цели были разработаны средства для антиретровирусной терапии с медленным эффективным высвобождением и длительным действием (LASER ART) посредством синтеза нанокристаллов липофильного и гидрофобного пролекарства, которые позволяют быстрое проникновение лекарственного средства через физиологические барьеры. LASER ART максимально увеличивает содержание лекарственного средства при ограниченном применении вспомогательного вещества, при этом сохраняя возможность пропорционального изменения дозы и длительного хранения. Миристоилированные пролекарства были составлены с поверхностно-активными веществами-полоксамерами. Улучшенная активность, биологическая доступность и распределение CAB в тканях были продемонстрированы при повышении липофильности лекарственного средства, что поддерживало концентрации CAB в плазме крови на уровнях  $\text{PA-IC}_{90}$  в течение 4 месяцев у макаков-резусов после однократной внутримышечной инъекции 45 мг/кг CAB-эквивалента. В данном случае были синтезированы улучшенные пролекарства и наносоставы, которые снижают частоту приема доз при улучшении нацеливания на вирусный резервуар и активность лекарственного средства.

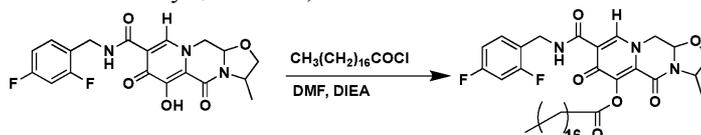
В данном документе представлено активное сложноэфирное пролекарство CAB, которое имеет физико-химические свойства, которые позволяют применение состава LASER ART для нечастого введения, как например, с интервалами между приемами доз, составляющими раз в шесть-двенадцать месяцев или реже. Критерии, оцениваемые при выборе оптимального кандидата для пролекарства CAB, включали активность лекарственного средства, профиль липофильности, эффективное превращение *in vivo* в CAB с минимальной системной циркуляцией пролекарства в кровотоке и устойчивые концентрации CAB, в четыре раза превышающие  $\text{PA-IC}_{90}$ , в течение периодов, составляющих шесть месяцев или дольше, после

однократной внутримышечной инъекции состава пролекарства. Неожиданно, настоящее изобретение продемонстрировало, что изменение длины углеводородной цепи у пролекарства в виде эфира жирной кислоты значительно улучшает высвобождение активного лекарственного средства и его удержание. Это завершилось идентификацией M2CAB, пролекарства CAB в виде сложного эфира жирной кислоты с 18 атомами углерода, с неожиданно лучшими кинетическими характеристиками контролируемого высвобождения CAB по сравнению с MCAB или другими длинами углеводородной цепи жирной кислоты.

Пролекарства согласно настоящему изобретению представляют собой производные ингибитора интегразы, такого как CAB, конъюгированные с гидрофобными расщепляемыми фрагментами. Таким образом, гидрофобное исходное соединение превращается в более гидрофобное сложноэфирное производное. Это достигается посредством прикрепления фрагмента жирной кислоты, что может улучшать связывание лекарственного средства с белками и его биологическую доступность. Сложноэфирная связь между ингибитором интегразы (например, CAB) и дериватирующими фрагментами склонна к ферментативному или гидролитическому расщеплению. Механизм высвобождения лекарственного средства из частицы включает растворение пролекарства из вспомогательного средства с последующим эффективным расщеплением сложного эфира с образованием активного исходного соединения. Разработанный NM2CAB существенно улучшал поглощение лекарственного средства MDM с устойчивым удержанием лекарственного средства в течение 30-суточного периода наблюдения; тогда как составы NCAB или NMCAV выделялись из макрофагов спустя одни сутки или 20 суток обработки, соответственно. Аналогично, MDM, обработанные NM2CAB, демонстрировали повышенные и устойчивые антиретровирусные активности по сравнению с NCAB или NMCAV при контрольном заражении ВИЧ-1 в течение периода вплоть до 30 суток после однократной обработки лекарственным средством. p24 ВИЧ-1 не выявлялся в группе, получавшей обработку NM2CAB, в любой из этих моментов времени. Преимущества данной системы включают в себя неожиданно улучшенную биологическую доступность и продленный период полувыведения лекарственного средства. Пролонгируемые NM2CAB концентрации CAB в плазме крови и ткани демонстрируют, что может быть достигнут эффективный интервал между приемами доз, составляющий раз в шесть месяцев.

Синтез M2CAB.

Синтез пролекарств M2CAB осуществляли, как описано:



Кратко, получение пролекарства M2CAB осуществляли посредством 1) депротонирования фенольной функциональной группы с использованием подходящего основания, такого как N,N-диизопропилэтиламин; и 2) реакции либо с хлорангидридом карбоновой кислоты, либо с активированной карбоновой кислотой в алкил-жирной кислоте.

Обе стадии 1) и 2) осуществляли в одном сосуде. В частности, гидроксильную группу депротонировали с применением соответствующего реактива. Спиртовой анион затем связывался с хлорангидридом жирной кислоты или активированной карбоновой кислотой с образованием пролекарств. Примеры связующих реактивов, которые можно применять для активации карбоновой кислоты, включают в себя, без ограничения, соли урана, карбодиимидные реактивы и соли фосфония. Примером основания, который можно применять в реакции связывания, является, без ограничения, N,N-диизопропилэтиламин (DIEA). Примеры полярных апротонных растворителей, которые можно применять, включают в себя, без ограничения, N,N-диметилформамид (DMF), тетрагидрофуран (THF) и ацетонитрил. Реактивы смешивали при 0°C и постепенно подогрели до температуры более 12-24 ч. Конечные соединения очищали с помощью хроматографии на колонке с диоксидом кремния и характеризовали с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса и высокоэффективной жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией.

Депротонирование гидроксильной группы и связывание с жирной кислотой.

Раствор CAB (2 г, 4,93 моль, 1,0 экв.) в безводном диметилформамиде (20 мл) охлаждали до 0°C в атмосфере аргона. N,N-Диизопропилэтиламин (1,7 мл, 9,86 моль, 2,0 экв.) затем добавляли по каплям к предварительно охлажденному раствору лекарственного средства. Стеароилхлорид (3,3 мл, 9,86 ммоль, 2,0 экв.) затем добавляли к депротонированному раствору фенола. Смесь постепенно подогрели до комнатной температуры при перемешивании в течение 16 ч, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии с элюированием смесью EtOAc/Hex с градиентом с 80 до 90%, получая пролекарство с выходом химической реакции, составляющим 90%. <sup>1</sup>H-ЯМР спектр M2CAB демонстрирует присутствие широкого пика в 1,20-1,50 ppm и пиков, соответствующих алифатическим протонам на фрагменте жирной кислоты.

Синтез состава.

Нанокристаллы M2CAB покрывали полоксамером 407 (P407), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолином (DSPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанол-амин-N-карбоксо(полиэтилен-

гликолем)-2000 (DSPE-PEG) и/или поливиниловым спиртом (PVA). Нанокристаллы также можно стабилизировать с использованием поверхностно-активных веществ в виде полисорбата и полиэтиленгликоля. Исходя из данных ЯМР-спектроскопии протонов соотношение лекарственного средства и поверхностно-активного вещества 100:6 по массе применяли для производства содержащихся в наносоставе M2CAB, MCAB и CAB. Кратко, 1-5% (мас./об.) M2CAB, MCAB или CAB и 0,06-0,3% (мас./об.) P407 смешивали в не содержащей эндотоксинов воде. Составы из предварительно смешанных суспензиями получали посредством влажного размола или гомогенизации высокого давления при давлении 20000 фунтов/кв. дюйм до тех пор, пока не были достигнуты желаемый размер и коэффициент полидисперсности (PDI). Наносоставы подвергали характеристике в отношении размера частиц, коэффициента полидисперсности (PDI) и дзета-потенциала с помощью динамического светорассеяния (фиг. 1). Ее выполняли с применением инструмента Malvern Zetasizer, Nano Series Nano-ZS (Malvern Instruments Inc, Вестборо, Массачусетс, США). Морфологию наночастиц определяли с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM). Для количественного определения лекарственного средства применяли UPLC MS/MS (сверхэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией).

Поглощение и удержание в макрофагах.

Человеческие моноциты получали с помощью лейкофереза от серонегативных по ВИЧ-1/2 и гепатиту В доноров, а затем очищали с помощью противоточного элютриационного центрифугирования (Balkundi et al., *Intl. J. Nanomed.* (2011), 6:3393-3404; Nowacek et al., *Nanomed.* (2009), 4(8):903-917). Человеческие моноциты высевали в 12-луночный планшет с плотностью, составляющей  $1,0 \times 10^6$  клеток/луночку, с применением DMEM, дополненной 10% инактивированной нагреванием объединенной человеческой сыворотки, 1% глутамина, 10 мкг/мл ципрофлоксацина и 50 мкг/мл гентамицина. Клетки поддерживали при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. После 7-10 суток дифференцировки в присутствии 1000 Ед./мл рекомбинантного человеческого макрофагального колониестимулирующего фактора (MCSF) MDM подвергали обработке рядом наносоставов и нативных лекарственных средств. Поглощение лекарственного средства оценивали с помощью измерений внутриклеточных концентраций лекарственного средства в различные моменты времени после обработки. Для исследований удержания лекарственного средства клетки подвергали обработке в течение 8 суток, затем промывали PBS и поддерживали с использованием замены половины объема среды раз в двое суток до сбора в указанные моменты времени. Для обоих исследований прикрепленные MDM промывали PBS (3×1 мл), затем соскабливали в 1 мл свежего PBS и подсчитывали в указанные моменты времени с применением автоматизированного счетчика клеток Countess™ (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Клетки осаждали посредством центрифугирования при 950×g в течение 8 мин при 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл метанола с классом чистоты, подходящим для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), и подвергали ультразвуковой обработке при использовании зонда с последующим центрифугированием при 20000×g в течение 20 мин. Супернатант подвергали анализу в отношении содержания лекарственного средства с применением HPLC.

Как видно на фиг. 2A, NM2CAB поглощался MDM на более высоких уровнях, чем NMCAB, при статистической значимости отличий. Более того, MDM удерживали NM2CAB на более высоких уровнях и в течение более длительных периодов времени, чем NMCAB, при статистической значимости отличий (фиг. 2A).

Антиретровирусные активности.

Антиретровирусную эффективность определяли посредством измерений активности обратной транскриптазы (RT) ВИЧ (фиг. 2B и 2C). Для оценки антиретровирусной эффективности MDM подвергали обработке 100 мкМ любого из CAB-LAP, NMCAB или NM2CAB в течение 8 ч. После обработки клетки промывали PBS для удаления избытка несвязанного лекарственного средства и наночастицы и клетки культивировали со свежей средой с заменой половины объема среды раз в двое суток. MDM подвергали контрольному заражению ВИЧ-1<sub>ADA</sub> с показателем MOI (множественность инфицирования), составляющим 0,01 инфекционных вирусных частиц/клетка, в течение периода до 30 суток. Продукция вирионов-потомков измеряли с помощью активности RT в среде культивирования (Kalter, et al. (1992), *J. Clin. Microbiol.*, 30(4):993-995). Оценивали экспрессию антигенов белка p24 ВИЧ-1 (Guo, et al. (2014), *J. Virol.*, 88(17):9504-9513). MDM промывали PBS и фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки блокировали с использованием 10% BSA, содержащей 1% Triton X-100, в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. После блокирования клетки инкубировали с мышиными моноклональными антителами к p24 ВИЧ-1 (1:50; Dako, Карпинтерия, Калифорния, США) в течение ночи при 4°C с последующим инкубированием в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавляли меченое HRP полимером вторичное антитело к мышиному антителу (Dako EnVision® System) (одна капля/луночка). Гематоксилин добавляли для контрастного окрашивания ядер и изображения получали с применением микроскопа Nikon TE300 с 20-кратным объективом. Как видно на фиг. 2B и 2C, неожиданно лучшую антиретровирусную эффективность наблюдали для содержащегося в наносоставе M2CAB по сравнению с содержащимися в наносоставе CAB или MCAB.

Исследование фармакокинетических параметров/биораспределения.

Самкам NSG мышей вводили однократную IM дозу 45 мг/кг САВ-эквивалента NM2САВ, NМСАВ или NСАВ. Уровни лекарственного средства для плазмы крови и тканей анализировали с помощью UPLC-MS/MS. Уровни лекарственного средства в плазме крови отслеживали еженедельно. Однократная IM инъекция NM2САВ демонстрирует кинетику контролируемого высвобождения нулевого порядка для активного САВ, концентрация которого сохраняется на уровне в четыре раза выше PA-IC<sub>90</sub> по сравнению с NМСАВ или NСАВ (фиг. 3). В день 364 после инъекции уровни САВ в плазме крови составляли 345,2 нг/мл для NM2САВ, 8,5 нг/мл для NМСАВ и невыявляемые значения для NСАВ (предел выявления составляет 0,5 нг/мл).

Мышам также вводили однократную IM дозу 45 мг/кг САВ-эквивалента NM3САВ (C22). Уровни лекарственного средства в плазме крови отслеживали еженедельно. В день 28 после инъекции уровни САВ в плазме крови составляли 233,2 нг/мл (фиг. 3В). Соответственно, ясно, что NM2САВ (C18) проявлял себя лучше в отношении поддержания долговременного эффективного высвобождения лекарственного средства по сравнению с более коротким NМСАВ (C14) и более длинным NM3САВ (C22) при статистической значимости отличий.

Гидрофобность САВ значительно улучшалась после дериватизации в пролекарство M2САВ. Улучшенная гидрофобность M2САВ облегчала получение стабильных составов с высокой емкостью лекарственного средства. Более того, превращение САВ в более гидрофобный M2САВ и образование наночастиц существенно улучшало внутриклеточное накопление лекарственного средства по сравнению с содержащимися в наносоставе САВ или MСАВ. Существенные улучшения удержания в MDM и антиретровирусной эффективности также наблюдали для содержащегося в наносоставе M2САВ по сравнению с содержащимися в наносоставе САВ или MСАВ. Однократная IM инъекция NM2САВ в дозе 45 мг САВ-эквивалентов/кг самкам NSG мышей также неожиданно демонстрировала концентрации САВ в плазме крови, в четыре раза превышающие PA-IC<sub>90</sub>, в течение более чем пяти месяцев, что значительно дольше, чем у содержащихся в наносоставе САВ или MСАВ.

Пример 2.

Современные терапевтические схемы с введением антиретровирусных средств (ARV), которые являются как активными, так и хорошо переносимыми, обеспечивают устойчивое пожизненное подавление вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) (Fauci, et al., JAMA (2019), 321:844-845). Тем не менее такой контроль вирусной репликации должен быть связан с соблюдением режима лечения, на что, в свою очередь, оказывает воздействие сопутствующие заболевания, социальная стигматизация, поведение, одновременное применение запрещенных наркотических средств и расходы (Fauci, et al., JAMA (2019), 321:844-845). Тем не менее даже четкое соблюдение ежесуточного приема доз лекарственного средства зачастую приводит к токсичностям лекарственных средств, межлекарственным взаимодействиям и возникновению устойчивости вируса к лекарственному средству. Все схемы применения лекарственных средств не обеспечивают устранения вируса (Dash, et al., Nat. Commun. (2019), 10:2753). Это подчеркивает тот факт, что все методы терапии требуют пожизненного соблюдения режима лечения для устойчивого подавления ВИЧ-1 и ослабления заболевания. Это привело ученых к разработке терапевтических подходов длительного действия (LA). Все они концентрируются на улучшении соблюдения режима лечения и активности лекарственного средства (Gendelman, et al., Trends Microbiol. (2019), 27:593-606). Два наиболее активных и приближающихся к клинической апробации Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration USA) представляют собой инъекционные LA ARV составы, тогда как имплантируемые устройства с лекарственным средством все еще остаются в процессе разработки (Margolis, et al., Lancet (2017), 390:1499-1510; Taylor, et al., Topics Antiviral Med. (2019), 27:50-68).

Осуществленные исследования на данный момент показали многообещающие перспективы инъекционного LA состава для широкого применения у людей (Margolis, et al., Lancet (2017), 390:1499-1510; Taylor, et al., Topics Antiviral Med. (2019), 27:50-68; Kerrigan, et al., PloS One (2018), 13:e0190487). Как результат, инъекционные LA наносоставы каботегривира (САВ) и рилпивирин (RPV) в виде комбинации из двух лекарственных средств получают одобрение для ежемесячного введения, вероятно, к концу 2019 года (Margolis, et al., Lancet (2017), 390:1499-1510; Taylor, et al., Topics Antiviral Med. (2019), 27:50-68; Kerrigan, et al., PloS One (2018), 13:e0190487). Обе из стратегий "антиретровирусной терапии в качестве длительно действующего подавления" ("Antiretroviral Therapy as Long-Acting Suppression") (ATLAS) и "первой инъекционной схемы длительного действия" ("First Long-Acting Injectable Regimen") (FLAIR) продемонстрировали многообещающую безопасность, эффективность и переносимость (Taylor, et al., Topics Antiviral Med. (2019), 27:50-68). Комплексное лечение подтвердило не меньшую эффективность при сравнении лечения со стандартными схемами с приемом трех пероральных лекарственных средств (Taylor, et al., Topics Antiviral Med. (2019), 27:50-68). Подобным образом, имплантаты с лекарственным средством также продемонстрировали перспективность (Kovarova, et al., Nat. Commun. (2018), 9:4156; Gunawardana, et al., Antimicrob. Agents Chemother. (2015), 59:3913-3919; Flexner, C., Curr. Opin. HIV AIDS (2018), 13:374-380; Barrett, et al., Antimicrob. Agents Chemother. (2018), 62(10):e01058-18.). Тем не менее для обоих подходов существует большое количество ограничений, включающих в себя реакции в месте

инъекции, большие объемы, вводимые инъекцией, частота приема доз, ограниченное проникновение в резервуары вируса (Margolis, et al., *Lancet* (2017), 390:1499-1510; Markowitz, et al., *Lancet HIV* (2017), 4:e331-e340; Zhou, et al., *Biomaterials* (2018), 151:53-65). Более того, эти более новые терапевтические подходы требуют более частого получения услуг медицинского работника либо вследствие обеспечения самих инъекций, либо для осуществления процедур по введению и удалению имплантата. Результаты измерения уровней лекарственного средства в ткани и плазме крови коррелируют с эффективностью LA ARV, которая включает проникновение лекарственного средства в ткани слизистых оболочек, лимфоидные ткани и центральную нервную систему, а также долговременную безопасность. Исходя из степени влияния этих неизвестных факторов, существует неотложная потребность в дополнительных улучшениях в схемах с LA ARV. Любые будущие LA ARV необходимо будет вводить в уменьшенных объемах без системной токсичности. Если это будет достигнуто, схемы с ARV также могут обеспечивать свойства, аналогичные миметикам ARV вакцин. Успех будет обеспечивать предупреждение новых инфекций и снижает новую передачу, и такие свойства могут обеспечивать функциональное излечение ВИЧ-1.

С этой целью были созданы библиотеки LA ARV для спектра антиретровирусных средств (Zhou, et al., *Biomaterials* (2018), 151:53-65; Hilaire, et al., *J. Control Release* (2019), 311-312:201-211; Ibrahim, et al., *Int. J. Nanomedicine* (2019), 14:6231-6247; Lin, et al., *Chem. Commun. (Camb)* (2018), 54:8371-8374; McMillan, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (2017), 62:e01316-17; McMillan, et al., *AIDS* (2019), 33:585-588; Sillman, et al., *Nat. Commun.* (2018), 9:443; Smith, et al., *Biomaterials* (2019), 223:119476; Soni, et al., *Biomaterials* (2019), 222:119441). В данном документе пролекарства САВ создавали с целью продления кажущегося периода полувыведения и антиретровирусных активностей, при этом обеспечивая жесткий контроль гидролиза. Представлен синтез и исчерпывающая физико-химическая характеристика трех пролекарств САВ с линкером с цепью из 14, 18 и 22 углеродов (МСАВ, М2САВ и М3САВ соответственно) с полной оценкой соответствующих наносоставов с ними (NMСАВ, NM2САВ и NM3САВ). Эти анализы продолжали предшествующее исследование пролекарства САВ первого поколения - МСАВ (Zhou, et al., *Biomaterials* (2018), 151:53-65; McMillan, et al., *AIDS* (2019), 33:585-588). Наносостав с С18, NM2САВ, усиливал поглощение и удержание САВ в моноцитах-макрофагах и демонстрировал при ежемесячном введении долговременную защиту против контрольного заражения ВИЧ-1. NM2САВ обеспечивало концентрации САВ в плазме крови выше концентрации, обеспечивающей 90% ингибирование с учетом связывания с белками (РА-IC<sub>90</sub>), составляющей 166 нг/мл, в течение 52 недель. Это коррелировало с существенными уровнями биораспределения в лимфоидной ткани, ткани слизистых оболочек и кишечника после однократной парентеральной инъекции. Не фиксировали системные неблагоприятные явления. Параллельно измеряемые концентрации лекарственного средства в плазме крови у получавших инъекции лекарственного средства нормальных и иммунодефицитных мышей и макаков-резусов подтверждали устойчивое в течение длительного периода времени высвобождение лекарственного средства в случае профилактических и терапевтических схем. В совокупности результаты указывают на то, что пролекарства можно применять с той же целью, что и профилактическую вакцину против ВИЧ-1.

Материалы и методы.

Реактивы.

САВ приобретали у VOC sciences (Ширли, Нью-Йорк, США). Пиридин, диметилформамид (DMF), N,N-диизопропилэтиламин (DIEA), миристоилхлорид, стеароилхлорид, бегеновую кислоту, полоксамер 407 (P407), ципрофлоксацин, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ), диметилсульфоксид (DMSO), параформальдегид (PFA) и 3,3'-диаминобензидин (DAB) приобретали у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури). Диэтиловый эфир, этилацетат, гексаны, ацетонитрил (ACN), метанол, воду с классом чистоты, подходящим для LC-MS, воду с классом чистоты, подходящим для культивирования клеток (не содержащую эндотоксинов), гентамицин, одноосновный фосфат калия (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), бычий сывороточный альбумин (BSA), Triton™ X-100 и реактив TRIzol® приобретали у Fisher Scientific (Хамптон, Нью-Гемпшир, США). Моноклональное мышинное антитело к человеческому белку p24 ВИЧ-1 (клон Kal-1) и конъюгированное с HRP на основе полимера вторичное антитело к мышинному антителу EnVision™<sup>+</sup> приобретали у Dako (Карпинтерия, Калифорния, США). Инактивированную нагреванием объединенную человеческую сыворотку приобретали у Innovative Biologies (Херндон, Виргиния, США). Среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) приобретали у Corning Life Sciences (Тьюксбери, Массачусетс, США).

Синтез и характеристика пролекарств САВ.

Серию из трех пролекарств синтезировали посредством эстерификации по 10-гидроксильной группе на САВ с получением на выходе липофильных пролекарств с линкерами из 14, 18 и 22 углеродов, названных МСАВ, М2САВ и М3САВ. Вначале САВ высушивали от безводного пиридина, а затем суспендировали в безводном DMF. Смесь охлаждали до 0°C в атмосфере аргона. DIEA (2 эквивалента) применяли для депротонирования 10-гидроксильной группы САВ, который в дальнейшем подвергали реакции с 2 экв. миристоилхлорида или стеароилхлорида в течение 24 ч с получением МСАВ или М2САВ соответственно. Синтез М3САВ представлял собой двухстадийный процесс. На первой стадии бегенилхло-

рид синтезировали посредством хлорирования карбоксильной группы бегеновой кислоты в безводном хлороформе с применением 4 экв. тионилхлорида. САВ, высушенный от безводного пиридина и ресуспендированный в безводном DMF в присутствии 4 экв. триэтиламина, в дальнейшем добавляли к бегенилхлориду в DMF при температуре 0°C в атмосфере аргона с последующим нагреванием реакционной смеси до 50°C в течение 24 ч. Все получаемые в результате пролекарства подвергали очистке с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением первоначальной подвижной фазы в виде смеси этилацетат:гексаны в соотношении 4:1 для первоначальных фракций, а затем с применением смеси этилацетат:гексаны в соотношении 9:1 для остальной части. Наконец, пролекарства осаждали и промывали в диэтиловом эфире, сушили в вакууме с получением белого порошка со средним выходом, составляющим 85-95%. Успешный синтез пролекарств подтверждали по спектрам ядерного магнитного резонанса протонов и углерода ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР), которые записывали с помощью инструмента Bruker Avance-III HD (Биллерика, Массачусетс, США), работающего при 500 МГц, напряженности магнитного поля 11,7 Тл. Анализ с преобразованием Фурье в инфракрасной области (FT-IR) осуществляли с помощью универсального метода спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (UATR) на Spectrum Two (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США). Сравнительные кристаллографические анализы САВ и пролекарств с помощью порошковой рентгеновской дифракции (XRD) осуществляли в диапазоне углов  $2\theta$  2-70° со скоростью 1°/с с применением дифрактометра PANalytical Empyrean (PANalytical Inc., Вестборо, Массачусетс, США) с использованием Cu-K $\alpha$  излучения (1,5418 Å) с настройками напряжения 40 кВ, силы тока 45 мА. Молекулярную массу определяли посредством прямого вливания в масс-спектрометр Waters TQD.

Количественное определение САВ, МСАВ, М2САВ и М3САВ с помощью UPLC-UV/Vis.

Систему для сверхэффективной жидкостной хроматографии Waters ACQUITY (UPLC) H-Class с TUV детектором и программное обеспечение Empower 3 (Милфорд, Массачусетс, США) применяли для измерения концентраций лекарственных средств. Образцы САВ, МСАВ, М2САВ и М3САВ разделяли на 5 мкм C18 колонке Phenomenex Kinetex (150×4,6 мм) (Торранс, Калифорния, США). САВ выявляли при длине волны 254 нм с применением подвижной фазы, состоящей из 65% 50 мМ одноосновного фосфата калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 3,2, и 35% ацетонитрила (ACN), и при скорости потока, составляющей 1,0 мл/мин. МСАВ, М2САВ и М3САВ выявляли при длине волны 230 нм с применением подвижной фазы, состоящей из 90% ACN и 10% воды, 95% ACN и 5% воды, 98% ACN и 2% воды, соответственно, и при скорости потока, составляющей 1,0 мл/мин. Содержание лекарственного средства определяли относительно площадей пиков у стандартов лекарственных средств (0,05-50 мкг/мл) в метаноле.

Измерения растворимости состава лекарственного средства в воде.

Растворимость САВ, МСАВ, М2САВ и М3САВ в воде класса ортима определяли посредством добавления избытка порошка лекарственного средства или пролекарства в 1 мл воды с получением насыщенного водного раствора. Смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. В дальнейшем раствор центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин для осаждения нерастворенного порошка. Супернатант собирали, лиофилизировали и растворяли в метаноле для анализа содержания лекарственного средства с помощью UPLC UV/Vis.

Химическая стабильность.

Определяли стабильность МСАВ, М2САВ и М3САВ в кислых (pH 1), основных (pH 11) и нейтральных (pH 7) условиях при комнатной температуре и повышенной температуре (37°C). Маточный раствор каждого пролекарства готовили в DMSO в концентрации 1 мг/мл. Для анализов в кислых, основных и нейтральных условиях 100 мкл маточного раствора каждого пролекарства добавляли к 1900 мкл 0,1 М HCl, 0,1 М NaOH или воды класса ортима (pH доводили до 7), соответственно. Образцы затем инкубировали в условиях комнатной температуры и при температуре 40°C при встряхивании (шейкер-инкубатор innova® 42, 150 об/мин). Образцы извлекали через 0, 2, 4, 8 и 24 ч и хранили при температуре -80°C. Затем образцы анализировали в отношении содержания лекарственного средства с помощью UPLC-UV/Vis.

Кинетические характеристики гидролитического расщепления лекарственного средства в плазме крови.

Кинетические характеристики гидролиза МСАВ, М2САВ и М3САВ и соответствующее высвобождение активного лекарственного средства определяли в плазме крови от различных видов (мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака и человек). МСАВ, М2САВ или М3САВ (1 мкМ) инкубировали в 100 мкл плазмы крови при 37°C. В различные моменты времени 1 мл подкисленного метанола (0,1% муравьиной кислотой и 25 мМ формиатом аммония во избежание дополнительного гидролиза пролекарства) добавляли к каждому образцу и перемешивали на вихревой мешалке в течение 3 мин для остановки реакции. В момент времени 0 мин в 100 мкл ледяной плазмы крови вносили маточный раствор пролекарства и немедленно добавляли 1 мл ледяного подкисленного метанола. После добавления метанола образцы центрифугировали при 15000×g в течение 10 мин и собранный супернатант анализировали в отношении содержания лекарственного средства с помощью UPLC-MS/MS (Waters Xevo TQ-XS).

Синтез и характеристика наночастиц.

Наносоставы исходного САВ (NCAB) и его пролекарств (NMCAB, NM2CAB и NM3CAB) получали с помощью гомогенизации высокого давления с применением поверхностно-активного вещества полоксамера 407 (P407). Лекарственное средство/пролекарство и P407 предварительно смешивали (10:1 мас./мас.) в не содержащей эндотоксины воде в течение 24 ч в диапазоне концентраций 2-20% (мас./об.) лекарственного средства/пролекарства и 0,2-2 мас./об. P407. Предварительную смесь подвергали дополнительной гомогенизации с применением гомогенизатора высокого давления Avestin EmulsiFlex-C3 (Оттава, Онтарио, Канада) при ~18000 фунтов/кв. дюйм с получением однородных нанокристаллов с желаемым размером частиц. Наночастицы подвергали характеристике в отношении размера частиц (Deff), коэффициента полидисперсности (PDI) и дзета-потенциала с помощью динамического светорассеяния (DLS) с применением инструмента Malvern Nano-ZS (Вустершир, Великобритания). Стабильность наносоставов отслеживали при температуре 4, 25 и 37°C в течение 3 месяцев. Содержание лекарственного средства/пролекарства в наносоставе измеряли посредством растворения наносостава в метаноле (диапазон кратности разведения: 1000-10000) и подвергали анализу с помощью UPLC UV/Vis. Следующее уравнение применяли для расчета эффективности инкапсулирования:

$$\text{Эффективность инкапсулирования (\%)} = \frac{\text{масса лекарственного средства в составе/исходная масса добавленного лекарственного средства}}{\text{масса лекарственного средства в составе/исходная масса}} \times 100.$$

Морфологию наночастиц оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM). Наночастицы фиксировали в растворе 2% глутарового альдегида, 2% параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере Соренсена (pH 7,2) при температуре 4°C в течение 24 ч и подвергали обработке для визуализации. Кратко, наносуспензии сушили на воздухе на покровном стекле, смонтированном на столике для SEM-образца и методом напыления покрывали примерно 50 нм сплава золота/палладия. Образцы анализировали с применением сканирующего электронного микроскопа FEI Quanta 200 (Хиллсборо, Орегон, США), который работал при напряжении 5,0 кВ (Sillman, et al., Nat. Commun. (2018), 9:443).

Человеческие макрофаги, полученные из моноцитов (MDM).

Человеческие моноциты получали посредством лейкофереза от серонегативных по ВИЧ-1/2 и гепатиту В доноров, а затем очищали с помощью противоточного элютриационного центрифугирования (Gendelman, et al., J. Exper. Med. (1988), 167:1428-1441). Моноциты культивировали в среде DMEM, содержащей 4,5 г/л глюкозы, L-глутамин и пируват натрия и дополненной 10% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина и 10 мкг/мл ципрофлоксацина. Клетки поддерживали при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Рекомбинантный человеческий макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF, 1000 Ед./мл) добавляли в среду культивирования в течение первых 7 суток для облегчения дифференцировки макрофагов, полученных из моноцитов (MDM). Половину объема среды культивирования заменяли на свежую среду раз в двое суток. После дифференцировки MDM использовали для следующих *in vitro* анализов.

Анализ цитотоксичности.

Жизнеспособность клеток после обработки наночастицами оценивали посредством осуществления МТТ анализа. Человеческие MDM, высевные на 96-луночные планшеты с плотностью  $0,08 \times 10^6$  клеток на лунку, подвергали обработке 10, 25, 50, 100, 200 или 400 мкМ NCAB, NMCAB, NM2CAB или NM3CAB в течение 24 ч. Необработанные клетки использовали в качестве контролей. Для каждой группы образцы присутствовали в трех параллелях. Клетки промывали PBS и инкубировали с раствором МТТ (5 мг/мл) в количестве 100 мкл/лунка в течение 45 мин при 37°C. После инкубирования раствор МТТ удаляли и клетки промывали PBS. Затем 200 мкл DMSO добавляли в каждую лунку, и спектральную поглощающую способность измеряли при длине волны 490 нм на планшет-ридере Molecular Devices SpectraMax® M3 с использованием программного обеспечения SoftMax Pro 6.2 (Саннивейл, Калифорния, США).

Исследования поглощения, удержания и высвобождения частиц лекарственного средства из MDM.

Исследования поглощения и удержания MDM осуществляли в прозрачных плоскодонных 12-луночных планшетах с плотностью  $1,0 \times 10^6$  клеток/лунку, причем обработку в каждой группе осуществляли в трех параллелях. Для исследований клеточного поглощения MDM подвергали обработке 100 мкМ NCAB, NMCAB, NM2CAB или NM3CAB. MDM собирали через 2, 4, 8 и 24 ч после обработки для измерения внутриклеточных уровней лекарственного средства и пролекарства. Для исследований удержания MDM подвергали обработке 100 мкМ NCAB, NMCAB, NM2CAB или NM3CAB в течение 8 ч, а затем промывали дважды фосфатно-буферным солевым раствором (PBS). Добавляли свежую среду культивирования и половину объема среды заменяли раз в двое суток. MDM собирали через 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 суток для анализа внутриклеточных концентраций лекарственного средства и пролекарства. Для обоих исследований в начальные моменты времени прикрепленные MDM дважды промывали PBS. Затем клетки соскабливали в PBS и подсчитывали с применением автоматизированного счетчика клеток Invitrogen Countess™ (Карлсбад, Калифорния, США). Суспензию клеток в PBS центрифугировали при 3000 об/мин в течение 8 мин при температуре 4°C. Полученные клеточные осадки подвергали ультразвуковой обработке в 200 мкл метанола с применением зондового устройства для ультразвуковой обработки с це-

лю экстрагирования внутриклеточного лекарственного средства. Полученные в результате образцы центрифугировали при  $20000 \times g$  в течение 10 мин при температуре  $4^\circ\text{C}$  с целью отделения клеточного дебриса от содержащего лекарственное средство супернатанта. Образцы подвергали дальнейшему анализу в отношении содержания лекарственного средства и пролекарства с помощью UPLC-UV/Vis. Для исследований высвобождения среду культивирования в моменты времени, аналогичные используемым в исследовании удержания, собирали для количественного определения лекарственного средства и пролекарства, высвобождаемых MDM. Среду культивирования смешивали с метанолом для осаждения нерастворимых компонентов в среде культивирования и для экстрагирования лекарственного средства и пролекарства. Смесь центрифугировали при  $17000 \times g$  в течение 10 мин при температуре  $4^\circ\text{C}$  с целью отделения нерастворимого осадка. Супернатант переносили в новые пробирки с целью высушивания в центрифужном вакуумном концентраторе. Высушенное содержимое суспендировали в метаноле для дальнейшего анализа с помощью UPLC-UV/Vis.

Характеристика частиц с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ).

MDM обрабатывали NCAB, NMCAB, NM2CAB или NM3CAB в концентрации 100 мкМ в течение 8 ч, а затем дважды промывали PBS. Добавляли свежую среду культивирования и половину объема среды заменяли раз в двое суток. Жидкости супернатанта из культуры MDM собирали через 0, 15 и 30 суток после обработки частицами лекарственного средства и анализировали с помощью ТЕМ для визуализации внутриклеточных наночастиц. В день 0 клетки собирали сразу после обработки продолжительностью 8 ч. В указанные моменты времени клетки промывали, соскабливали в PBS, осаждали при 3000 об/мин в течение 8 мин при комнатной температуре и фиксировали в растворе 2% глутарового альдегида, 2% параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере Соренсена (pH 6,2). Каплю фиксированной клеточной суспензии помещали на медную сетку с размером ячеек 200 меш на формвар/монооксид кремния и им позволяли осесть в течение 2 мин. Избыточный раствор убирали тампоном и позволяли образцу высохнуть. Каплю ванадиевого красителя NanoVan для отрицательного окрашивания помещали на сетку в течение 1 мин, затем убирали тампоном и позволяли образцу высохнуть. Сетки оценивали на трансмиссионном электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit TWIN (Хиллсборо, Орегон, США), который работал при напряжении 80 кВ. Изображения получали в цифровом формате с использованием цифровой системы визуализации АМТ (Вуберн, Массачусетс, США) (Sillman, et al., Nat. Commun. (2018), 9:443).

Инфицирование ВИЧ-1 и измерение активности обратной транскриптазы (RT) в жидкостях от инфицированных клеток.

MDM высевали в прозрачные плоскодонные 24-луночные планшеты с плотностью, составляющей  $0,8 \times 10^6$  клеток/луночка. MDM обрабатывали 100 мкМ NCAB, NMCAB, NM2CAB или NM3CAB в течение 8 ч. После обработки клетки промывали PBS и культивировали в свежей среде культивирования с заменой половины объема среды раз в двое суток. Через 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 суток после обработки клетки инфицировали ВИЧ-1<sub>ADA</sub> (штамм вируса, проявляющий тропизм в отношении макрофагов) с показателем множественности инфицирования (МОИ) 0,1 инфекционных частиц на клетку в течение 16 ч. После периода инфицирования MDM промывали PBS и пополняли свежей средой. Клетки культивировали в течение следующих десяти суток с заменой половины объема среды раз в двое суток и полной заменой среды на 8-е сутки. Среду культивирования собирали на 10-е сутки после инфицирования для измерения активности RT ВИЧ-1 (Kalter, et al., J. Immunol. (1991), 146:3396-3404; Nowacek, et al., J. Neuroimmune Pharm. (2010), 5:592-601). Показатель инфицирования был выражен в виде процента от активности RT в инфицированных MDM, которые не подвергали обработке. Клетки фиксировали в 2% PFA и экспрессию антигена p24 ВИЧ-1 определяли с помощью иммуноцитохимического окрашивания (Nowacek, et al., J. Neuroimmune Pharm. (2010), 5:592-601).

Анализ полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ).

MDM высевали в прозрачные плоскодонные 96-луночные планшеты ( $0,08 \times 10^6$  клеток/луночка). Клетки подвергали обработке лекарственными средствами в диапазоне концентраций 0,01-1000 нМ САВ, МСАВ, М2САВ, М3САВ, NСАВ, NМСАВ, NM2САВ или NM3САВ в течение 1 ч перед инфицированием ВИЧ-1<sub>ADA</sub> (МОИ составляет 0,1 инфекционных частиц на клетку) в течение 4 ч. После 4 ч контрольного заражения вирусом клетки промывали и добавляли свежую среду, содержащую лекарственное средство (0,1-1000 нМ). Впоследствии клеточные супернатанты собирали спустя 10 суток и подвергали анализу в отношении активности RT ВИЧ-1, как описано выше.

Поглощение наночастиц в  $CD4^+$  Т-клетки при использовании СЕМ-ss клеток в качестве стандартов.

СЕМ-ss  $CD4^+$  Т-клетки суспендировали в RPMI, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 Ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клеточную суспензию (1 мл/луночка) добавляли в прозрачные плоскодонные 12-луночные планшеты, предварительно покрытые раствором поли-L-лизина (500 мкг/мл в дистиллированной воде) в течение 1 ч. После прикрепления к поверхности лунок клетки подвергали обработке 25 мкМ NCAB, NMCAB, NM2CAB или NM3CAB. Через 2, 4 и 8 ч клетки промывали и соскабливали в PBS. Клеточную суспензию центрифугировали при  $200 \times g$  в течение 5 мин и внутриклеточные концентрации лекарственного средства и пролекарства количественно определяли с помощью масс-спектрометра Waters TQD. Поглощение наночастиц в линию СЕМ-ss  $CD4^+$  Т-клеток подтвер-

ждали посредством визуализации с помощью ТЕМ после 8 ч обработки в концентрации 25 мкМ. Обработка образцов для визуализации с помощью ТЕМ описана выше.

Исследования фармакокинетических параметров (ПК) и биораспределения (BD) у мышей.

NSG мышам (самки, 6-8 недель, Jackson Labs, Бар-Харбор, Мэн, США) вводили 45 мг/кг САВ-эквивалентов NCAB, MCAB, M2CAB или M3CAB посредством однократной внутримышечной (ИМ, в задние мышцы бедра) инъекции в дозе 40 мкл/25 г мыш. После инъекции образцы крови собирали в гепаринизированные пробирки в день 1 после введения, а затем еженедельно в течение периода до дня 364 посредством прокола щеки (из подчелюстной вены, MEDPoint, Inc., Минеола, Нью-Йорк, США). Забранную кровь (25 мкл) немедленно разводили в 1 мл ACN и хранили при -80°C до измерений концентрации лекарственного средства. Остальные образцы крови центрифугировали при 2000×g в течение 8 мин с целью сбора плазмы крови. Плазму крови собирали и хранили при -80°C для анализа содержания лекарственного средства. В день 14, 28, 42 и 364 после введения животных подвергали гуманной эвтаназии посредством ингаляции изофлурана с последующим смещением шейных позвонков. Селезенку, лимфатические узлы, печень, легкое, кишечник, почку, головной мозг, вагинальную ткань и ткань прямой кишки собирали для количественного определения концентраций САВ и пролекарства. САВ, MCAB, M2CAB и M3CAB количественно определяли в плазме крови, крови и тканях мышей с помощью UPLC-MS/MS с применением инструмента Waters ACQUITY H-class UPLC (Waters, Милфорд, Массачусетс, США), соединенного с компактным масс-спектрометром Xevo TQ-S. Все растворители для обработки образца и анализа UPLC-MS/MS имели класс чистоты, подходящий для LCMS (Fisher). Для образцов плазмы крови и крови 25 мкл образца добавляли в 1 мл ацетонитрила (ACN), в который вносили 10 мкл внутреннего стандарта (IS). d3-долутегравир (d3-DTG), миристоилированный долутегравир (MDTG) и стеарилированный дарунавир (SDRV) в конечной концентрации, составляющей 200, 20 и 20 нг/мл соответственно, применяли в качестве IS для анализов САВ, MCAB и M2CAB/M3CAB соответственно. Образцы перемешивали на вихревой мешалке и центрифугировали при 17000×g в течение 10 мин при температуре 4°C. Супернатанты собирали и высушивали с применением SpeedVac® и ресуспендировали в 100 мкл 80% метанола; 10 мкл впрыскивали для анализа MCAB, M2CAB и M3CAB с помощью UPLC-MS/MS. Стандартные кривые получали в холостом образце плазмы крови/крови мышей в диапазоне концентраций 0,2-2000 нг/мл для САВ, MCAB, M2CAB и M3CAB. Для количественного определения лекарственного средства в тканях 3-200 мг образца гомогенизировали в 4-29 объемах 0,1% об./об. муравьиной кислоты и 2,5 мМ формиат аммония, содержащий 90% метанол. К 100 мкл гомогената ткани добавляли 280 мкл метанола, содержащего 0,1% муравьиной кислоты и 2,5 мМ формиат аммония, 80% метанол (10 мкл) и IS (10 мкл), с последующим перемешиванием на вихревой мешалке в течение 3 мин и центрифугированием при 17000×g в течение 15 мин. В случае анализов MCAB, M2CAB и M3CAB 85 мкл супернатанта смешивали с 15 мкл воды. В случае анализа САВ 20 мкл супернатанта смешивали с 80 мкл 50% ACN. Эти аликвоты перемешивали на вихревой мешалке, центрифугировали при 17000×g в течение 10 мин и 10 мкл супернатанта использовали для анализа с помощью LC-MS/MS. Стандарты готовили аналогичным образом с применением холостых образцов гомогенатов ткани с 10 мкл вносимого раствора (САВ/MCAB/M2CAB/M3CAB, 5-20000 нг/мл в 50% ACN). В случае количественного определения САВ хроматографическое разделение 10 мкл образца САВ осуществляли на колонке Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (1,7 мкм, 2,1×100 мм) с использованием 10-минутного градиента подвижной фазы А (7,5 мМ формиат аммония в воде, доведенный до pH 3 с использованием муравьиной кислоты) и подвижной фазы В (100% ACN) со скоростью потока, составляющей 0,25 мл/мин. В течение первых 3,5 мин в составе подвижной фазы содержалось 35% В, а затем его содержание повышали до 95% В за 0,5 мин и поддерживали постоянным в течение 1,5 мин. Содержание подвижной фазы В затем возвращали к 35% за 0,5 мин и колонку уравнивали в течение 1 мин перед следующим впрыскиванием. В случае количественного определения MCAB и M2CAB хроматографическое разделение осуществляли на более короткой 30 мм колонке (PN с использованием способа с 8-минутным градиентом со скоростью потока 0,28 мл/мин. Исходная подвижная фаза содержала 80% В в течение первых 2 мин, а затем его содержание повышали до 95% В за 4 мин, поддерживали постоянным в течение 0,75 мин, возвращали к 80% за 0,25 мин и колонку уравнивали в течение 1 мин перед следующим впрыскиванием. В случае количественного определения M3CAB хроматографическое разделение также осуществляли на более короткой 30 мм колонке с использованием способа 8-минутным градиентом со скоростью потока 0,35 мл/мин. Исходная подвижная фаза содержала 88% В в течение первых 5 мин, а затем его содержание повышали до 95% В за 0,25 мин, поддерживали постоянным в течение 1,5 мин, возвращали к 88% за 0,25 мин и колонку уравнивали в течение 1 мин перед следующим впрыскиванием. САВ, MCAB, M2CAB и M3CAB выявляли при значениях напряжения на конусе, составляющих 10, 24, 2 и 20 В соответственно, и энергии соударений, составляющей 24, 18, 24 и 26 В соответственно, в режиме регистрации положительных ионов. Переходы для мониторинга множественных реакций (MRM), используемые для САВ, MCAB, M2CAB, M3CAB, d3-DTG, MDTG и SDRV, представляли собой 406,04>126,93, 616,28>406,09, 672,34>406,07, 728,47>406,09, 422,84>129,99, 630,20>420,07 и 814,52>658,44 соответственно. Спектры анализировали и количественно выражали с помощью про-

граммного обеспечения MassLynx версии 4.1. Все количественные показатели определяли с использованием отношений площади пика для анализируемого вещества к площади пика для внутреннего стандарта. После анализа РК и BD у NSG мышей NM2CAB, лучший среди всех составов, опять оценивали в другой линии мышей, BALB/cJ. (самцы, 6-8 недель, Jackson Labs). NCAB использовали в качестве контроля. Мышей, которым вводили инъекцией NM2CAB, подвергали гуманной эвтаназии в день 280 после введения. Количественное определение лекарственного средства и пролекарства в собранной плазме крови и ткани было аналогичным указанному выше. РК анализ с помощью некомпартментной модели для CAB в плазме крови осуществляли с применением Phoenix WinNonlin-8.0 (Certara, Принстон, Нью-Джерси, США) в случае исследований у NSG мышей.

РК и BD у макаков-резусов (RM).

Четыре самца RM (4,4-6,7 кг; PrimeGen) получали анестезию кетаминном (10 мг/кг), а затем им вводили 45 мг/кг CAB-эквивалента NM2CAB и полученное в лаборатории пролекарство RPV посредством IM инъекции (в четырехглавую мышцу бедра, 0,5 мл/кг). Образцы крови собирали в покрытые калий-EDTA пробирки для клинического анализа крови (CBC) и определения метаболических профилей. Плазму крови отделяли для измерений концентраций лекарственного средства. Биоптаты тканей лимфатических узлов, жировой ткани и тканей прямой кишки собирали в день 204 после инъекции для количественного определения лекарственного средства. Способы количественного определения для лекарственного средства и пролекарства в плазме крови и тканях были аналогичными описанным выше в исследованиях на мышах.

Статистические анализы.

Статистический анализ выполняли с применением программного обеспечения GraphPad Prism 7.0 (Ла-Хойя, Калифорния, США). Данные из исследований *in vitro* выражали в виде среднего значения  $\pm$ SEM минимум для 3 биологических повторностей, тогда как результаты исследований *in vivo* выражали в виде среднего значения  $\pm$ SEM минимум для трех биологических повторностей. Для сравнений между двумя группами использовали t-критерий Стьюдента (двусторонний). Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим критерием Тьюки использовали для сравнения трех или более групп. Уровни статистической значимости различий определяли следующим образом: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Согласование исследований.

Все исследования на животных были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных медицинского центра университета Небраски (Medical Center Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) в соответствии со стандартами, включенными в Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных (Guide of the Care and Use of Laboratory Animals) (National Research Council of the National Academies, 2011). Человеческие моноциты выделяли посредством лейкофереза у серонегативных по ВИЧ-1/2 и гепатиту В доноров в соответствии с протоколом, одобренным экспертным советом UNMC.

Результаты.

Синтез и характеристика пролекарства.

CAB подвергали химической модификации посредством прикрепления цепей жирной кислоты с переменными значениями длины цепи 14, 18 и 22 атомов углерода, получая сложные эфиры MCAB, M2CAB и M3CAB соответственно. Пролекарства подвергали дополнительной характеристике с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для подтверждения синтеза.  $^1\text{H}$  ЯМР спектры для всех трех пролекарств показали триплеты в диапазоне 0,86-0,89, 1,77-1,78 и 2,66-2,70 ppm и широкий синглет в диапазоне 1,24-1,25 ppm, что соответствует концевому метилу и повторяющимся метиленовым протонам в алкильной цепи жирной кислоты. Исчезновение пика фенольного протона на 11,5 ppm подтверждало замещение гидроксильного протона CAB фрагментами жирной кислоты.  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр для каждого пролекарства подтверждал атомы углерода в конъюгированной алифатической цепи. Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ESI-MS) подтверждала молекулярные массы всех пролекарств. Вливание при ESI-MS в случае MCAB генерировало сильный сигнал при 616,28 m/z, вливание при ESI-MS в случае M2CAB генерировало сильный сигнал при 672,34 m/z, и вливание при ESI-MS в случае M3CAB генерировало сильный сигнал при 728,47 m/z. Характеристика пролекарства с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR) давала полосы, не наблюдаемые для CAB в диапазонах 2908-2935 и 1748-1775  $\text{cm}^{-1}$ . Они соответствуют C-H отрезкам в алифатических метиленовых группах и C=O отрезку, соответствующему карбоксильной группе в сложноэфирной связи соответственно. XRD спектры в диапазоне  $2\theta = 2-70^\circ$  демонстрировали кристаллический характер пролекарств MCAB, M2CAB и M3CAB. Наночастицы M2CAB сохраняли кристаллические свойства пролекарства. Наблюдали значительное последовательное снижение растворимости в воде у MCAB ( $2,83 \pm 1,37$  мкг/мл), M2CAB ( $1,91 \pm 0,23$  мкг/мл) и M3CAB ( $1,51 \pm 0,7$  мкг/мл) по сравнению с CAB ( $12,12 \pm 0,41$  мкг/мл). Более того, по сравнению с CAB ( $0,09 \pm 0,002$  мг/мл) наблюдали параллельное значительное повышение растворимости в 1-октанолу у MCAB ( $2,31 \pm 28,15$  мг/мл), M2CAB ( $2,64 \pm 0,02$  мг/мл) и M3CAB. Эти результаты подтверждали повышение гидрофобности и липофильности пролекарств по сравнению с CAB в резуль-

тате химических модификаций конъюгатами жирных кислот.

Пролекарства представляют собой фармакологически неактивные соединения, которые требуют ферментативной или гидролитической активации для биологического преобразования в активные лекарственные средства при физиологических условиях. Таким образом, кинетические характеристики гидролиза МСАВ, М2САВ и М3САВ и последующего образования САВ оценивали в плазме крови от различных видов (мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака и человек). При инкубировании в плазме крови от всех исследуемых видов МСАВ демонстрировал более чем 85% расщепление в пределах 30 мин, М2САВ демонстрировал в среднем 75% расщепление через 2 ч и 80% расщепление через 6 ч. М3САВ демонстрировал наименьшую скорость расщепления, причем около 50% пролекарства оставалось после 24 ч инкубирования в плазме крови. Эти исследования показали, что МСАВ быстро превращался в САВ, в то время как М3САВ демонстрировал меньшее превращение в САВ. Образование САВ в результате гидролиза М2САВ составляло в среднем 71,1% через 6 ч, это означает, что М2САВ является оптимальным пролекарством с точки зрения стабильности и образования активного лекарственного средства в физиологических условиях. Присутствовали некоторые отличия в скоростях гидролиза пролекарства в плазме крови у различных видов животных. Колебания концентраций САВ в плазме крови у исследуемых видов могут являться результатом различий в распределении жира в организме, мышечной массы, физической активности и различий в ферментах-холинэстеразах плазмы крови, задействованных в гидролизе пролекарства (Trezza, et al., *Curr. Opin. HIV AIDS* (2015), 10:239-245; Bahar, et al. (2012), *J. Pharm. Sci.* (2012), 101:3979-3988; Wang, et al., *Acta Pharmaceutica Sinica. B* (2018), 8:699-712). Более того, химическую стабильность М2САВ определяли при комнатной температуре и при повышенной температуре (37°C) в кислых (рН 1), нейтральных (рН 7) и основных условиях (рН 11) в течение 24 ч для определения долговременной стабильности наносоставов пролекарства при различных условиях хранения. При комнатной температуре через 24 ч определяли 19% гидролиз в кислых условиях и 24% гидролиз в нейтральных условиях. Тем не менее в основных условиях М2САВ подвергался полному гидролизу и не выявлялся. При 37°C через 24 ч около >95% пролекарства гидролизировались в кислых условиях и 28% пролекарства гидролизировались в нейтральных условиях. В то же время в основных условиях М2САВ подвергался полному гидролизу в течение 2 ч. Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC<sub>50</sub>) для пролекарств, МСАВ, М2САВ и М3САВ, сравнивали с САВ для определения изменений антиретровирусной активности вследствие химической модификации, если они присутствуют. Измерения активности RT ВИЧ-1 в среде культивирования MDM, инфицированных ВИЧ-1<sub>ADA</sub>, демонстрировали, что значения EC<sub>50</sub> для САВ (28,39 нМ), МСАВ (34,19 нМ), М2САВ (44,71 нМ) и М3САВ (51,15 нМ) являлись сравнимыми, указывая на отсутствие значительного воздействия на активность лекарственного средства.

Получение и характеристика наносостава.

Наносоставы САВ (NCAB), МСАВ (NMCAB), М2САВ (NM2САВ) и М3САВ (NM3САВ) получали с помощью синтеза типа "сверху-вниз" с использованием гомогенизации высокого давления. Эффективность инкапсулирования лекарственного средства или любого из пролекарства составляла >85%. Поверхностно-активное вещество полоксамер 407 (P407) обеспечивало поверхностную стабилизацию частицы. Размер наночастиц, коэффициент полидисперсности (PDI) и дзета-потенциал определяли с помощью DLS при комнатной температуре (RT), при температуре 4 и 37°C. Все составы оставались стабильными в течение периода до 98 суток, это означает, что эти составы могут сохранять свою физическую целостность при различных условиях хранения. Более того, колебания температуры не оказывали воздействие на физико-химические свойства любого состава в течение периода исследования. В день получения средний размер частиц, PDI и дзета-потенциал для NCAB составляли 294,5±1,8 нм, 0,23±0,01, -28,3±0,21 мВ; для NMCAB они составляли 302,1±10,8 нм, 0,23±0,01, -31,1±1,1 мВ; для NM2САВ они составляли 359,7±3,63 нм, 0,23±0,02, -31,3±0,1 мВ и для NM3САВ они составляли 268,47±6,9 нм, 0,23±0,03, -31,1±0,06 мВ. В день 98 после получения физико-химические параметры для NCAB составляли 327,5±4,9 нм, 0,21±0,04, -18,2±0,25 мВ; для NMCAB они составляли 388,7±6,4 нм, 0,22±0,03, -24,8±2,87 мВ; для NM2САВ они составляли 369,5±2,5 нм, 0,19±0,03, -19,6±0,53 мВ и для NM3САВ они составляли 245,6±2,6 нм, 0,27±0,06, -25,7±0,56 мВ. Полученные с помощью SEM изображения демонстрировали, что наночастицы NCAB, NMCAB, NM2САВ и NM3САВ имели однородную морфологию в форме стержня. Для подтверждения воспроизводимости состав NM2САВ получали в виде 11 отдельных партий (см. таблицу). Размеры наночастиц варьировали от 243,00±2,48 до 378,00±1,90 нм с узким PDI (от 0,18±0,03 до 0,33±0,03).

## Воспроизводимость синтеза NM2СAB

Производственная партия №	Размер±SEM (нм)	PdI±SEM
1	320,13±6,81	0,23±0,02
2	322,10±2,99	0,21±0,01
3	328,67±1,60	0,18±0,03
4	311,43±4,53	0,33±0,03
5	287,17±0,94	0,22±0,01
6	317,57±2,83	0,27±0,01
7	378,00±1,90	0,26±0,01
8	244,63±5,85	0,19±0,01
9	268,97±7,66	0,19±0,02
10	259,77±2,09	0,23±0,01
11	243,00±2,48	0,22±0,01

Определяли воздействие наносоставов на антиретровирусную активность пролекарств ( $EC_{50}$ ). Противовирусную активность NCAB, NMCAB, NM2СAB или NM3СAB определяли в MDM в диапазоне концентраций (0,01-1000 нМ) и измеряли с помощью активности обратной транскриптазы ВИЧ-1 после контрольного заражения вирусом ВИЧ-1<sub>ADA</sub> с показателем MOI, составляющим 0,1. Значения  $EC_{50}$  повышались по сравнению с не содержащимся в наносоставе лекарственным средством или не содержащимся в наносоставе пролекарствами, вероятно, вследствие растворения наночастиц, требующегося перед расщеплением пролекарств. Значения  $EC_{50}$  были сравнимыми у NCAB (39,83 нМ), NMCAB (89,67 нМ), NM2СAB (37,02 нМ). Тем не менее значение  $EC_{50}$  для NM3СAB значительно повышалось (~1,78E+06 нМ). Это может являться следствием более медленного расщепления пролекарства и последующего образования активного СAB, а также стабильностью наносоставов внутри клеток. Для дополнительной характеристики наносоставов пролекарств и определения обеспечивающих лечение концентраций в случае исследований *in vitro* жизнеспособность клеток оценивали в MDM и СЕМ-ss CD4<sup>+</sup> Т-клетках с помощью МТТ-анализа. В MDM не наблюдали токсичность в исследуемом диапазоне концентраций (10-400 мкМ) для всех наносоставов. В СЕМ-ss CD4<sup>+</sup> Т-клетках цитотоксичность определялась при концентрациях 50 мкМ и выше. Таким образом, обеспечивающие лечение концентрации для всех наносоставов составляли 100 мкМ для анализов в MDM и 25 мкМ для исследований в СЕМ-ss CD4<sup>+</sup> Т-клетках.

*In vitro* скрининг в MDM и СЕМ-ss CD4<sup>+</sup> Т-клетках.

Можно успешно использовать в качестве клеточных депо лекарственных средств и носителей. Вследствие их фагоцитарной природы и способности мигрировать по организму (Zhou, et al., *Biomaterials* (2018), 151:53-65; Darville, et al., *J. Pharm. Sci.* (2014), 103:2072-2087; Aderem, et al., *Ann. Rev. Immunol.* (1999), 17:593-623; Dou, et al., *Blood* (2006), 108:2827-2835), MDM могут служить в качестве систем для доставки лекарственных средств в резервуары вируса. Таким образом, MDM применяли в качестве *in vitro* системы для оценки наносоставов (Zhou, et al., *Biomaterials* (2018), 151:53-65; Hilaire, et al., *J. Control Release* (2019), 311-312:201-211; Ibrahim, et al., *Int. J. Nanomedicine* (2019), 14:6231-6247; Lin, et al., *Chem. Commun.* (2018), 54:8371-8374; Sillman, et al., *Nat. Commun.* (2018), 9:443; Smith, et al., *Biomaterials* (2019), 223:119476; Soni, et al., *Biomaterials* (2019), 222:119441).

Анализ поглощения осуществляли в MDM посредством измерения уровней лекарственного средства и пролекарства после обработки 100 мкМ NCAB, NMCAB, NM2СAB или NM3СAB в течение периода до 24 ч. Внутриклеточные уровни пролекарства, измеренные для NMCAB, NM2СAB и NM3СAB, составляли 61,69±0,78, 84,07±5,82 и 73,34±13,59 нмоль/10<sup>6</sup> клеток соответственно, через 24 ч; и внутриклеточные уровни СAB составляли 0,58±0,11, 12,31±0,46, 17,79±2,92 и 7,97±1,76 нмоль/10<sup>6</sup> клеток для NCAB, NMCAB, NM2СAB или NM3СAB соответственно. После этого способность макрофагов удерживать лекарственное средство и пролекарство внутри клеток оценивали в течение периода 30 суток после однократной обработки. MDM обрабатывали 100 мкМ NCAB, NMCAB, NM2СAB или NM3СAB в течение 8 ч. Внутриклеточные уровни пролекарства являлись устойчивыми в течение периода до 30 суток после однократной обработки. В частности, количество внутриклеточного пролекарства, измеренное в день 30 для NMCAB, NM2СAB и NM3СAB, составляло 0,41±0,09, 14,21±2,28 и 26,70±3,29 нмоль/10<sup>6</sup> клеток. Аналогично, внутриклеточные уровни СAB, образовавшегося в результате расщепления пролекарства, измеряли в течение периода до 30 суток. Значения уровня внутриклеточного СAB, измеренные в день 30 для NM2СAB и NM3СAB, составляли 1,71±0,35 и 2,05±0,10 нмоль/10<sup>6</sup> клеток. В то же время, внутриклеточные уровни СAB падали ниже предела количественного определения в течение 24 ч после обработки NCAB; и внутриклеточную концентрацию СAB после обработки NMCAB измеряли в течение периода до дня 25 (0,09±0,04 нмоль/10<sup>6</sup> клеток), и он не выявлялся в день 30. Параллельно

анализу удержания количество САВ, высвобождавшегося в культуральную жидкость, измеряли в течение 30 суток. NM2САВ демонстрировал наиболее устойчивое высвобождение САВ, причем уровни лекарственного средства составляют  $1,0 \pm 0,10$  нмоль/ $10^6$  клеток в день 30. САВ не выявлялся в случае обработки NCAB и NM3САВ. Пролекарства не выявлялись в среде культивирования в случае любой из обработок, что указывает на биологическое преобразование пролекарства.

Затем, полученные с помощью ТЕМ изображения MDM получали в день 0, 15, 30 после обработки наносоставами в течение 8 ч для оценки присутствия наночастиц в цитоплазматических пузырьках. Полученные с помощью ТЕМ изображения подтверждали присутствие наносоставов пролекарства (NM2САВ и NM3САВ) в течение периода до дня 30 в MDM, демонстрируя свойства MDM как депо лекарственного средства; и подтверждали результаты анализов поглощения, удержания и высвобождения. Поглощение NCAB, NMCAB, NM2САВ или NM3САВ определяли в  $CD4^+$  Т-клетках после обработки в концентрации 25 мкМ, отражая картину, наблюдаемую в MDM. Визуализация с помощью ТЕМ, осуществляемая на SEM-ss  $CD4^+$  Т-клетках после однократной обработки NCAB, NMCAB, NM2САВ или NM3САВ в течение 8 ч, подтверждала присутствие наночастиц в цитоплазматических компартментах.

Для оценки того, будет ли устойчивое удержание лекарственного средства в MDM обеспечивать защиту от инфекции ВИЧ-1, клетки подвергали контрольному заражению ВИЧ-1<sub>ADA</sub> в течение периода до 30 суток после 8-часовой обработки 100 мкМ NCAB, NMCAB или NM2САВ и подвергали количественному анализу в отношении активности RT ВИЧ-1, а также качественному определению экспрессии антигена р24 ВИЧ-1. NM3САВ не выбирали для этого исследования, поскольку он не демонстрировал существенную защиту с желаемым значением  $EC_{50}$ . Обработка NM2САВ подавляла активность RT ВИЧ-1 в течение периода до дня 30, и это подтверждалось отсутствием экспрессии р24 ВИЧ-1. Напротив, полный вирусный прорыв происходил в день 1 после обработки NCAB и в день 20 после обработки NMCAB. Таким образом, улучшенное удержание лекарственного средства MDM, демонстрируемое NM2САВ, обеспечивало лучшую защиту от контрольного заражения ВИЧ-1 по сравнению с NCAB и NMCAB. Кроме того, определяли дозозависимую антиретровирусную активность NM2САВ (фиг. 4). MDM обрабатывали 10, 50 или 100 мкМ NM2САВ в течение 8 ч и подвергали контрольному заражению ВИЧ-1<sub>ADA</sub>. Антиретровирусную активность определяли аналогичным образом в течение периода до 30 суток. Полное подавление вируса наблюдали при обработках 50 и 100 мкМ NM2САВ, в то время как 57% защиту наблюдали при обработке 10 мкМ спустя 30 суток, и это подтверждалось экспрессией р24 ВИЧ-1 (фиг. 4).

Фармакокинетические параметры (ПК) и биораспределение.

Для оценки профилей ПК и биораспределения самкам NSG мышей вводили инъекцией IM однократную дозу 45 мг/кг САВ-эквивалентов NCAB, или NMCAB, или NM2САВ. Самок иммунодефицитных NSG мышей использовали для оценки с целью имитации заболевания в виде патологии иммунокомпенсации и для оценки биораспределения в мочеполовых путях. NCAB представляет собой эффективный эквивалентный состав для САВ-LA, поскольку оба состава обеспечивали на выходе подобные уровни САВ в плазме крови в течение периода до дня 49 после введения BALB/cJ мышам.

В день 1 после инъекции обработка NCAB обеспечивала более высокие концентрации САВ в плазме крови по сравнению как с NMCAB, так и с NM2САВ и демонстрировала более быструю кинетику распада в течение периода исследования по сравнению с NM2САВ. В случае обработки NCAB концентрации САВ в плазме крови сохранялись на уровне, более чем четырехкратно превышающем концентрацию, обеспечивающую 90% ингибирование с учетом связывания с белками ( $4 \times PA-IC_{90}$ ; 664 нг/мл), в течение периода до дня 35 (792,7 нг/мл), затем быстро падали ниже  $PA-IC_{90}$  (166 нг/мл) ко дню 49 (75 нг/мл) перед тем, как упасть ниже предела количественного определения (0,5 нг/мл) ко дню 126. Обработка NMCAB демонстрировала более медленный распад и поддерживала уровни САВ в плазме крови выше  $4 \times PA-IC_{90}$  в течение периода до дня 91 (673,8 нг/мл) и выше  $PA-IC_{90}$  в течение периода до дня 168 (186,7 нг/мл). В день 364 после обработки NMCAB уровни САВ количественно определяли как 8,5 нг/мл. Разительно контрастируя, обработка NM2САВ обеспечивала более медленную кинетику распада в плазме крови по сравнению как с NCAB, так и с NMCAB в течение периода до дня 364, поддерживая устойчивую концентрацию САВ в плазме крови выше  $4 \times PA-IC_{90}$  в течение периода до дня 231 (702 нг/мл) и выше  $PA-IC_{90}$  в течение периода до дня 364 (354,2 нг/мл). Фармакокинетические параметры в плазме крови для САВ определяли с применением анализа с помощью некомпартментной модели для всех групп обработки. Количественное определение ПК параметров продемонстрировало, что кажущийся период полувыведения САВ после обработки NM2САВ (131,56 суток) был 17- и 3-кратно больше, чем таковой у NCAB (7,80 суток) и NMCAB (44,40 суток) соответственно. Аналогично, среднее время пребывания (MRT) САВ у NM2САВ было 21-кратно дольше, чем у NCAB (201,94 суток в сравнении с 9,79 суток соответственно) и 7-кратно дольше, чем у NMCAB (201,94 суток в сравнении 30,76 суток соответственно).

NM2САВ также приводил к значительно более высоким уровням САВ в ткани в течение периода до одного года. Биораспределение САВ в ткани оценивали в день 14, 28, 42 и 364 после однократной IM инъекции в вагинальной ткани, ткани прямой кишки, селезенке, печени, кишечнике, головном мозге,

почке, легком и тканях, анатомически ассоциированных с лимфатическими узлами. Уровни лекарственного средства в лимфатических узлах определяли в анатомических областях, ассоциированных с лимфатическими узлами, только в день 28 и 364 вследствие их незрелого состояния у иммунодефицитных NSG мышей. Примечательно, что уровни MСAB были ниже, чем M2СAB в день 14, 28 и 42, и не выявлялись в день 364. Для NM2СAB в день 364 уровни пролекарства составляли 3414,8 нг/г (селезенка), 909,8 нг/г (печень), 52,7 нг/г (легкое), 50,3 нг/г (головной мозг), 3,9 нг/г (почка) и 18710,1 нг/г (лимфатические узлы). В день 28 уровни САВ во всех тканях являлись сравнимыми у NСAB и NM2СAB. Тем не менее, ко дню 42 уровни САВ во всех исследуемых тканях после обработки NСAB были значительно ниже по сравнению с уровнями после обработки NM2СAB (вагинальная ткань, селезенка, кишечник, головной мозг, почки и легкие, ткани прямой кишки и головной мозг). В то же время, уровни САВ в тканях в течение периода до дня 42 после обработки NMСAB были значительно выше по сравнению с обработками NСAB и NM2СAB. В день 364 после обработки NM2СAB концентрации САВ были значительно выше во всех исследуемых тканях по сравнению с другими составами, и уровни САВ измеряли в концентрации 27 нг/г (вагинальная ткань), 19,7 нг/г (прямая кишка), 41,1 нг/г (селезенка), 67,62 нг/г (ткани, анатомически ассоциированные с лимфатическими узлами), 123,9 нг/г (печень), 10,3 нг/г (кишечник), 7,5 нг/г (головной мозг), 33,2 нг/г (почка) и 35,5 нг/г (легкое). Напротив, уровни САВ были значительно ниже или ниже предела количественного определения (0,5 нг/г) во всех тканях в день 364 после обработки NСAB или NMСAB.

Также исследовали концентрации пролекарства (MСAB или M2СAB) в крови и всех тканях (фиг. 5). Концентрации обоих пролекарств в крови были ниже в день 1 после инъекции, 22 нг/мл для MСAB и 31,3 нг/мл для M2СAB, и быстро опускались ниже предела количественного определения, что говорит о биологическом преобразовании пролекарств в активное исходное лекарственное средство. Все подвергающиеся скринингу ткани представляли собой значительные депо для M2СAB и имели устойчивые уровни M2СAB в течение периода исследования. Однократная ИМ инъекция NM3СAB (45 мг/кг САВ-эквивалентов) у самок NSG обеспечивала низкие уровни САВ в плазме крови (2248 нг/мл) в день 1 после введения по сравнению с NСAB (41237,6 нг/мл), NMСAB (30148,9 нг/мл) и NM2СAB (7076,1 нг/мл). Уровни САВ в плазме крови достигали значений около  $PA-IC_{90}$  (233,2 нг/мл) в течение 28 суток после обработки. Уровни САВ и M3СAB в плазме крови и ткани измеряли в день 28. Для подтверждения более медленного гидролиза M3СAB оценку РК повторяли у BALB/cJ мышей после однократной ИМ инъекции NM3СAB в той же дозе. Аналогично результатам РК у NSG мышей NM3СAB обеспечивал низкие уровни САВ в плазме крови в день 1 после введения (777,8 нг/мл); и уровни САВ в плазме крови падали ниже однократного значения  $PA-IC_{90}$  в течение 28 суток (98,9 нг/мл). Эти данные подтверждали более медленный гидролиз пролекарства M3СAB и последующее биологическое преобразование в САВ.

Улучшенные профили РК и BD NM2СAB у всех составов подтверждали в еще одной линии мышей BALB/cJ (самцы). В данном случае, мышей дикого типа применяли для подтверждения результатов от иммунодефицитных NSG мышей. Измерения РК и BD в плазме крови и тканях для NM2СAB проводили параллельно с измерениями у NSG мышей. В частности, концентрации САВ в плазме крови были выше  $PA-IC_{90}$  ко дню 231 (170,8 нг/мл) для NM2СAB, что подтверждает улучшение кажущегося периода полувыведения лекарственного средства. NСAB использовали в качестве контроля, в котором уровни САВ опускались ниже  $PA-IC_{90}$  ко дню 28 (12,28 нг/мл).

Для подтверждения результатов, наблюдаемых у грызунов, макакам-резусам вводили ИМ инъекцией однократную дозу 45 мг/кг САВ-эквивалентов NM2СAB. Уровни САВ и пролекарства (M2СAB) в плазме крови измеряли в течение периода до дня 393. Аналогично результатам у мышей обработка NM2СAB обеспечивала более медленную кинетику распада в плазме крови, поддерживая устойчивую концентрацию САВ в плазме крови в течение периода до дня 393. В день 393 измеренные уровни САВ составляли в среднем 56,1 нг/мл. Как ожидается, концентрации M2СAB в плазме крови были ниже в течение исследования по сравнению с уровнями САВ, что говорит о биологическом преобразовании пролекарства в его активное исходное лекарственное средство (фиг. 6А). Биоптаты ткани прямой кишки, лимфатических узлов и жировой ткани собирали в день 204 после введения NM2СAB и подвергали анализу в отношении уровней САВ и M2СAB. Концентрации САВ в тканях прямой кишки, лимфатических узлов и жировой ткани составляли 10,12 нг/г, 22,7 нг/г и 29,5 нг/г, соответственно (фиг. 6В). M2СAB присутствовал на высоких уровнях в ткани лимфатических узлов и жировой ткани (33,3 и 233,2 нг/г соответственно), при этом более низкие уровни наблюдали в ткани прямой кишки (1,7 нг/г) (фиг. 6С).

#### Оценка токсичности.

После введения NM2СAB токсикологические анализы проводили как на мышях, так и на макаках-резусах. Для оценки токсичности у NSG мышей массы животных записывали еженедельно в течение года; и при завершении исследования (день 364) плазму крови и ткани собирали для определения метаболических профилей и гистопатологических анализов, соответственно. В качестве контролей использовали не подвергавшихся обработке мышей соответствующего возраста. Не наблюдали различий в массе между животными из всех групп. Комплексный набор химических параметров сыворотки крови количественно определяли с применением диска для определения комплексного диагностического профиля

VetScan и инструмента VetScan VS-2. Оценивали следующие параметры: аланин-аминотрансфераза (ALT), альбумин (ALB), щелочная фосфатаза (ALP), амилаза (AMY), общий кальций ( $Ca^{++}$ ), креатинин (CRE), глобулин (GLOB), глюкоза (GLU), фосфор (PHOS), калий ( $K^+$ ), натрий ( $Na^+$ ), общий билирубин (TBIL), общий белок (TP) и азот мочевины (BUN). Отмечали отсутствие значимых различий между контролями и группами, получавшими обработку NM2CAB, указывающее на то, что NM2CAB не оказывал отрицательного воздействия на функции системных органов. Гистологическая оценка срезов тканей (печени, легкого, кишечника, селезенки, почки и головного мозга), окрашенных H&E, с участием дипломированного патоморфолога не выявила аномальной патологии у мышей, получавших обработку NM2CAB. Более того, состав хорошо переносился обеими линиями мышей (NSG и BALB/cJ), и не наблюдали реакций в месте инъекции и изменений в поведении или двигательной активности.

В случае оценки у макаков-резусов массы записывали, начиная с момента перед введением состава, и образцы плазмы крови и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) собирали для клинического анализа крови и определения метаболических профилей в течение периода до дня 393 после введения NM2CAB. Системную токсичность оценивали посредством измерения как гематологических (нейтрофилы, лимфоциты, моноциты), так и метаболических (ALT, щелочная фосфатаза, BUN/креатинин) профилей. Изменения массы у какого-либо из животных после инъекции не регистрировались. Первоначальное слабое покраснение, наблюдаемое в месте инъекции, сходило ко дню 3 у всех животных. Отмечали отсутствие воспаления или образования уплотнений через 3 суток после инъекции. Нейтрофилы, лимфоциты и моноциты подсчитывали до и после введения NM2CAB; и подсчитанные количества клеток крови соответствовали. В день 1 после инъекции регистрировали повышение подсчитанного количества нейтрофилов, и оно становилось нормальным в течение 2 недель у всех животных. Такое изменение может быть связано с инъекцией и может не быть связано с лекарственным средством. Метаболические профили для печени и почек оставались неизменными у всех животных после обработки. В целом, неблагоприятные явления не наблюдались после введения NM2CAB.

#### Межлекарственные взаимодействия.

Оценивали межлекарственное взаимодействие между двумя наносоставами пролекарств (NM2CAB и NM3RPV) лекарственных средств разных классов: CAB (INSTI) и рилпивирин (RPV; NNRTI). Выбор RPV в качестве лекарственного средства вместе с CAB обусловлен проводимыми в настоящее время клиническими исследованиями комбинации наносоставов CAB и RPV длительного действия. NM3RPV представляет собой состав RPV длительного действия (Hilaire, et al., *J. Control Release* (2019), 311-312:201-211). BALB/cJ мыши получали IM обработку однократной дозой NM2CAB отдельно (45 мг/кг CAB-эквивалентов), NM3RPV отдельно (45 мг/кг RPV-эквивалентов) или посредством совместного введения наносоставов обоих пролекарств (NM2CAB и NM3RPV, 45 мг/кг эквивалентов лекарственных средств). Измеряли уровни CAB и RPV в плазме крови и не наблюдали отличий в уровнях активных лекарственных средств между животными, получавшими обработку составами отдельно или в комбинации, что говорит о применении комбинации нескольких наносоставов пролекарств для лечения или предупреждения.

Связи с неспособностью защитных вакцин и доконтактной профилактики (PrEP) ликвидировать ВИЧ-инфекцию у лиц, находящихся в группе риска, долговременная ART является единственным подходом, доступным для предупреждения заболевания и прекращения новых инфекций и передачи вируса. На это сделан акцент в концепции "лечения как профилактики" для людей, имеющих риск инфицирования. Внимание при разработке инъекционных LA ARV сосредоточивают на создании лекарственных средств с длительными периодами полувыведения. В случае PrEP требуется "охват" LA ARV для исключения инфекций после контактов с ВИЧ. Развитие вирусной инфекции должно прекращаться в течение периодов времени, когда обеспечивающие защиту уровни ARV выявляются в плазме крови. Лекарственные средства также нужно вводить без нежелательных побочных эффектов, которые включают в себя токсичность для желудочно-кишечного тракта и любые выраженные межлекарственные взаимодействия. В настоящее время LA средства вызывают энтузиазм среди потенциальных потребителей в связи с потенциальными преимуществами, заключающимися в устранении социальной стигматизации вирусных инфекций и отсутствии необходимости интервалов между приемами доз менее суток, некоторые из них можно дозировать реже чем раз в 2-3 месяца. LA ARV, вводимые посредством подкожного или внутримышечного путей, являются высокоэффективными и уже продемонстрировали улучшенное качество и продолжительность жизни (May, et al., *AIDS* (2014), 28:1193-1202; *Antiretroviral Therapy Cohort*, *Lancet* (2017), HIV 4:e349-e356). Они помогают обойти проблему недостаточного соблюдения режима лечения, которая остается ключевой сложностью при лечении (Shubber, et al., *PLoS Med.* (2016), 13:e1002183; Osterberg, et al., *New Eng. J. Med.* (2005), 353:487-497). Действительно, любое плохое соблюдение схем лечения ARV, приводящее в результате к неэффективности лечения, появлению мутаций, вызывающих устойчивость к лекарственному средству, и новым передачам вируса, можно исключить при использовании улучшенного соблюдения режима лечения. В попытках улучшить существующие платформы для LA ARV были разработаны пролекарства для антиретровирусной терапии с медленным эффективным высвобождением и длительным действием (LASER ART). Эти новые составы служат для снижения частоты инъекций, при этом поддерживая устойчивые терапевтические уровни ARV в течение более продолжи-

тельного периода (Edagwa, et al., *Exp. Opin. Drug Del.* (2017), 14:1281-1291). LASER ART предусматривает синтез пролекарства посредством химических модификаций существующих ARV для обеспечения медленного растворения нативных лекарственных средств, слабой растворимости в воде, усиленного проникновения через биологические мембраны клетки, а также в тканевые резервуары и ограниченных системных нецелевых токсичностей. Синтез пролекарства обеспечивает возможность образования нанокристаллов ARV, стабилизированных полимерными вспомогательными веществами. PK и эффективность (PD) составов для LASER ART установили для ряда ARV, в том числе, без ограничения, для долутегавира (DTG), САВ, абакавира (ABC), ламивудина (3TC) и эмтрицитабина (FTC) (Zhou, et al., *Biomaterials* (2018), 151:53-65; Hilaire, et al., *J. Control Release* (2019), 311-312:201-211; Ibrahim, et al., *Int. J. Nanomed.* (2019), 14:6231-6247; Lin, et al., *Chem. Commun.* (2018), 54:8371-8374; McMillan, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* (2018), 62:e01316-17; McMillan, et al., *AIDS* (2019), 33:585-588; Sillman, et al., *Nat. Commun.* (2018), 9:443; Smith, et al., *Biomaterials* (2019), 223:119476; Soni, et al., *Biomaterials* (2019), 222:119441).

САВ представляет собой ингибитор переноса цепи интегразой (INSTI) ВИЧ-1, и в настоящее время он находится в разработке как в виде перорального состава, так и инъекционного LA состава (McPherson, et al., *Expert Opin. Investig. Drugs* (2018), 27:413-420). Уникальные присущие ему свойства, такие как гидрофобная природа, длинный системный период полувыведения (примерно 40 ч после перорального введения), высокая активность, устойчивый профиль, низкие требования в отношении суточной пероральной дозы ( $\geq 30$  мг/сутки) и ограниченные межлекарственные взаимодействия, делают его привлекательным кандидатом для разработки в инъекционный LA состав (Trezza, et al., *Curr. Opin. HIV AIDS* (2015), 10:239-245). В данном документе продемонстрировано, что однократная инъекция NM2САВ обеспечивала неожиданно превосходные улучшения продолжительности действия лекарственного средства, что отражается устойчивыми концентрациями лекарственного средства в плазме крови и биораспределением в тканях по сравнению с любым из NCAB, NMCAВ или NM3САВ. NM2САВ обеспечивал устойчивый распад в плазме крови, при этом поддерживая уровни лекарственного средства выше  $PA-IC_{90}$  166 нг/мл в течение 364 суток после однократной инъекции.

LA САВ, в настоящее время приближающийся к одобрению для клинического применения, подвергали активному изучению у макаков-резусов, что подтверждало его способности к применению в качестве инъекционного ARV для исследований доконтактной профилактики (PrEP) (Edagwa, et al., *Exp. Opin. Drug Del.* (2017), 14:1281-1291; Stellbrink, et al., *Curr. Opin. HIV AIDS* (2018), 13:334-340). Эти исследования продемонстрировали, что LA САВ обеспечивал высокую степень защиты от вагинального, ректального, внутривенного и пениального контрольного заражения штаммами SHIV, обосновывая его будущее применение в качестве PrEP у тех людей, которые имеют высокий риск контакта с ВИЧ и для потребителей внутривенных наркотических средств. Уровни в плазме крови выше  $3 \times PA-IC_{90}$  обеспечивали 100% защиту, а концентрации выше  $PA-IC_{90}$  обеспечивали 97% защиту от контрольного заражения вирусом (Edagwa, et al., *Exp. Opin. Drug Del.* (2017), 14:1281-1291; Stellbrink, et al., *Curr. Opin. HIV AIDS* (2018), 13:334-340). В данном документе введение NM2САВ обеспечивало концентрации САВ в плазме крови выше  $PA-IC_{90}$  в течение более чем шести месяцев, что говорит о его превосходстве и его клинической эффективности в качестве PrEP.

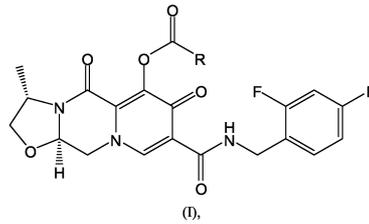
В целом, разработка эффективных мер по лечению и предупреждению у ВИЧ-1-инфицированных пациентов с помощью антиретровирусного лекарственного средства (ARV) изменила то, что раньше являлось неминуемой смертью, на поддающуюся контролю пожизненную хроническую болезнь. Потребность в контроле пандемии ВИЧ-1 сохраняется, поскольку согласно оценкам в мире инфицированными являются 37,9 млн. людей. Появление LA ARV безусловно расширит возможности для преодоления проблемы неоптимального соблюдения режима приема лекарственных средств и снижает нагрузку от ВИЧ-инфекции. На данный момент химиопрофилактика ВИЧ с применением антиретровирусных средств в наибольшей мере продемонстрирована при использовании соединений, содержащих тенофовир-диизопропилфумарат (TDF). Тем не менее, требующиеся уровни соблюдения режима лечения в виде ежесуточного или практически ежесуточного приема пероральных таблеток оказались проблемой. LA препараты предлагают большой выбор для достижения предупреждения с учетом понимания того, что безопасность, переносимость и эффективность продолжат оставаться частью оценок терапевтических результатов. LA ARV, которые можно вводить раз в месяц или реже улучшат соблюдение пациентом терапевтического режима лечения и расширят возможности PrEP.

Ряд публикаций и патентных документов процитированы в вышеприведенном описании с целью описания уровня техники, к которому относится настоящее изобретение. Полное раскрытие каждого из этих цитируемых источников включено в данный документ посредством ссылки.

Несмотря на то что определенные из предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения были описаны и специально проиллюстрированы примерами выше, не предполагается, что настоящее изобретение ограничено такими вариантами осуществления. Различные модификации могут быть выполнены в них без отступления от объема и идеи настоящего изобретения, которые изложены в следующих пунктах формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль,

при этом R представляет собой насыщенную линейную алифатическую цепь длиной 17 углеродов.

2. Наночастица, содержащая соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль и полимер или поверхностно-активное вещество, причем полимер или поверхностно-активное вещество представляют собой амфифильный блок-сополимер, содержащий блок поли(оксиэтилена) и блок поли(оксипропилена).

3. Наночастица по п.2, причем полимер или поверхностно-активное вещество представляют собой полксамер 407 (P407).

4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль или наночастицу по п.2 или 3 и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Способ лечения ВИЧ-инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ предусматривает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.4.

6. Способ по п.5, причем фармацевтическую композицию вводят путем инъекции.

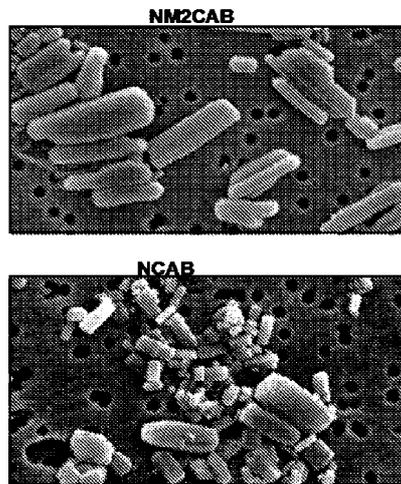
7. Способ по п.6, причем фармацевтическую композицию вводят один раз за 3-месячный период.

8. Способ по п.6, причем фармацевтическую композицию вводят один раз за 6-месячный период.

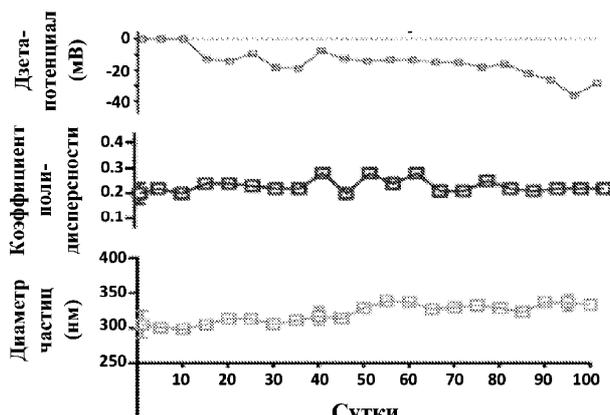
9. Способ по п.6, причем фармацевтическую композицию вводят один раз за 9-месячный период.

10. Способ по п.6, причем фармацевтическую композицию вводят один раз за 12-месячный период.

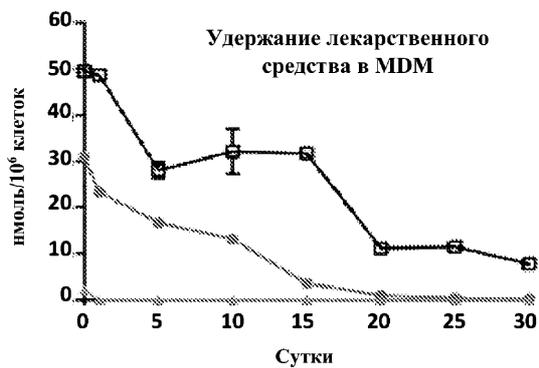
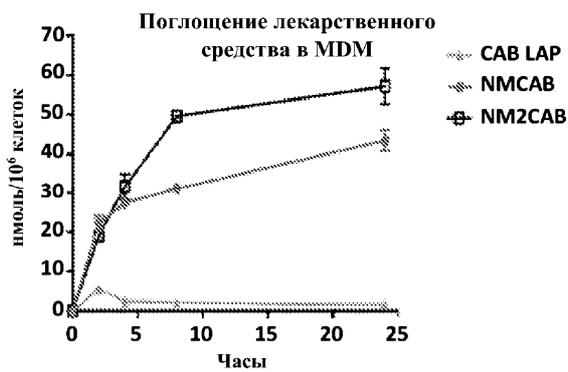
11. Способ по п.6, причем фармацевтическую композицию вводят один раз за 24-месячный период.



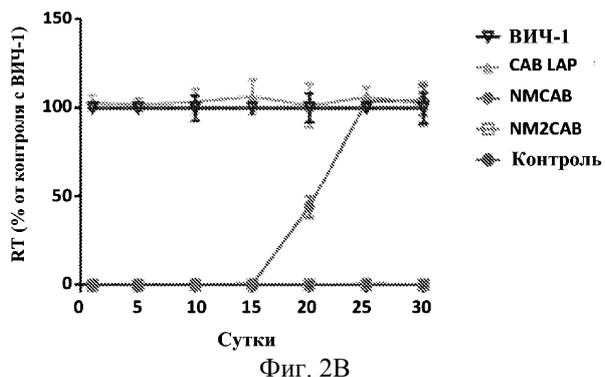
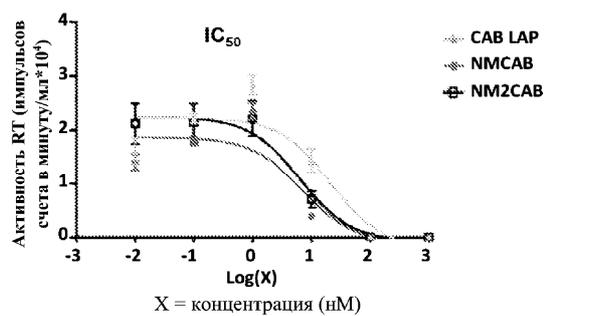
Фиг. 1А



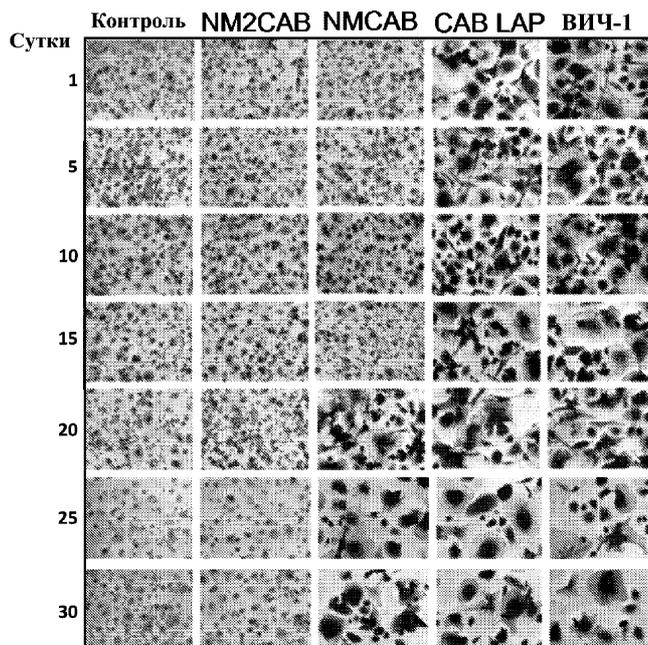
Фиг. 1В



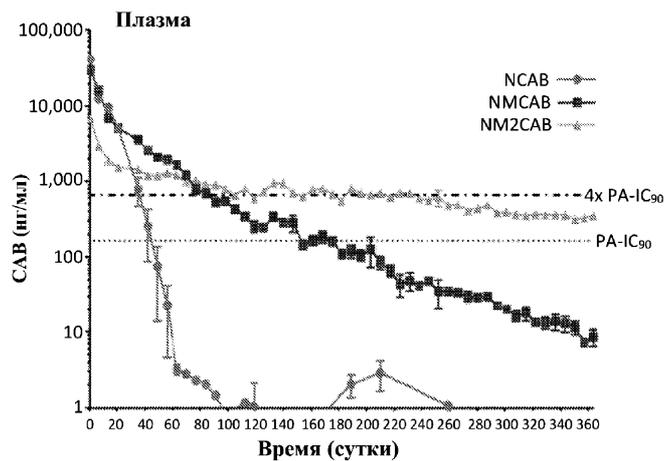
Фиг. 2А



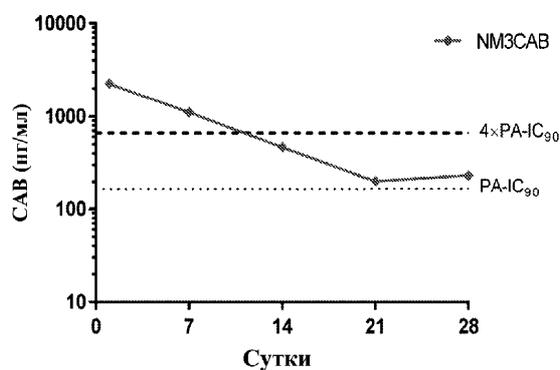
Фиг. 2В



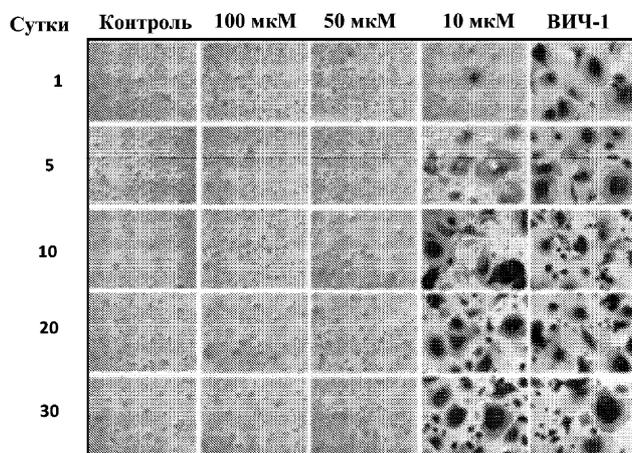
Фиг. 2С



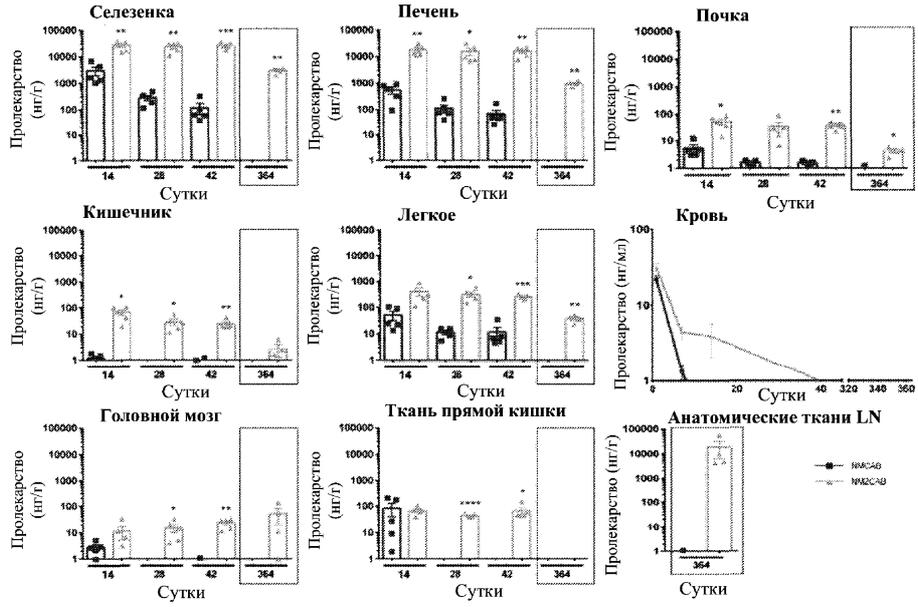
Фиг. 3А



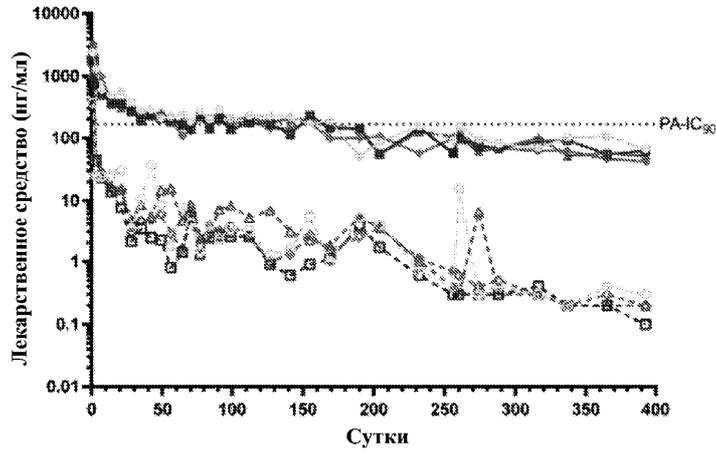
Фиг. 3В



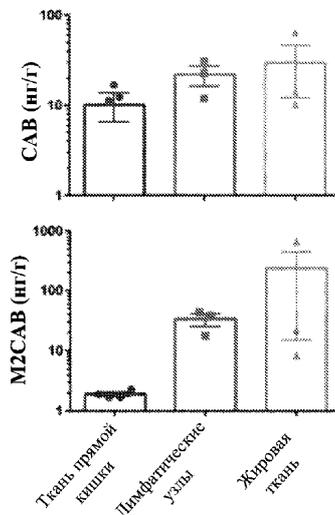
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В