

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0152302
(43) 공개일자 2024년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4439 (2006.01) **A61K 47/18** (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 31/4439 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2024-7024600
 (22) 출원일자(국제) 2022년12월22일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2024년07월22일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2022/082290
 (87) 국제공개번호 WO 2023/122759
 국제공개일자 2023년06월29일
 (30) 우선권주장
 63/292,899 2021년12월22일 미국(US)

(71) 출원인
아카제라 메디신즈, 인크.
 미국 매사추세츠 01921 박스포드 에섹스 스트리트 5
 (72) 발명자
키르포틴 드미트리 비.
 미국 캘리포니아주 94121 샌프란시스코 에이퍼티. #406 포인트 로보스 애버뉴 101
코슈카르에브 알렉산더
 미국 매사추세츠주 02459 뉴턴 클라크 스트리트 15
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
강명구

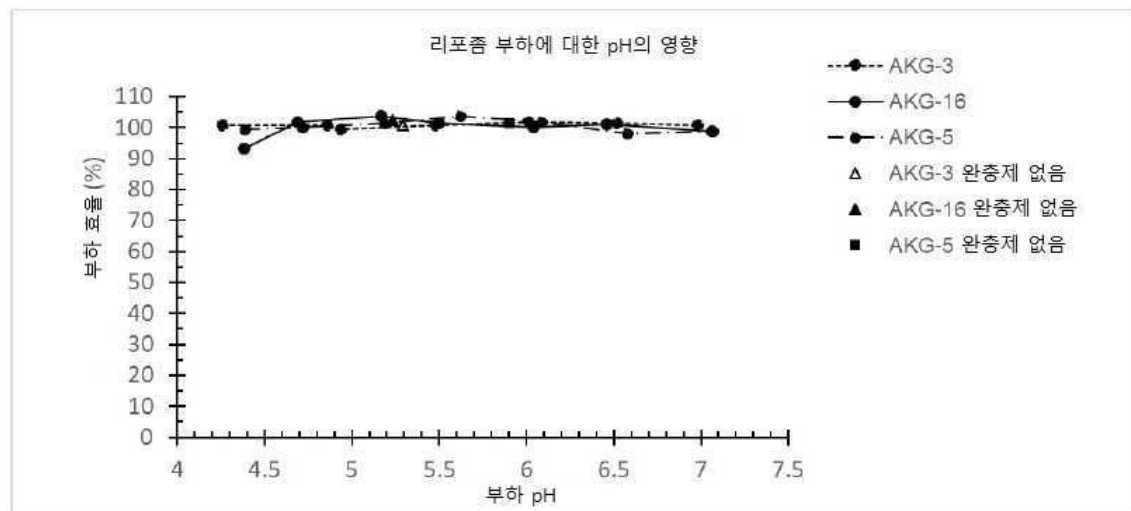
전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 발명의 명칭 **옥사졸리디논 리포솜 조성물**

(57) 요약

본 개시의 측면은 옥사졸리디논 화합물의 다양한 리포솜 조성물, 및 옥사졸리디논 리포솜 조성물을 제조하고 사용하는 관련 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 성분 분해와 관련하여 향상된 저장 안정성을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/1271 (2013.01)

A61K 9/1278 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

(72) 발명자

노블 찰스 오.

미국 캘리포니아주 04107 샌프란시스코 캐롤리나
스트리트 990

드러몬드 다릴 씨.

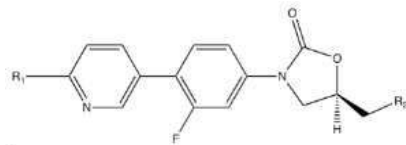
미국 매사추세츠주 01773 링컨 브룩스 로드 1

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 리포솜 조성물,



식 (I)

여기서

R₁는 위치 2'에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 링이고;

R₂는 아민 또는 아세트아미드이고;

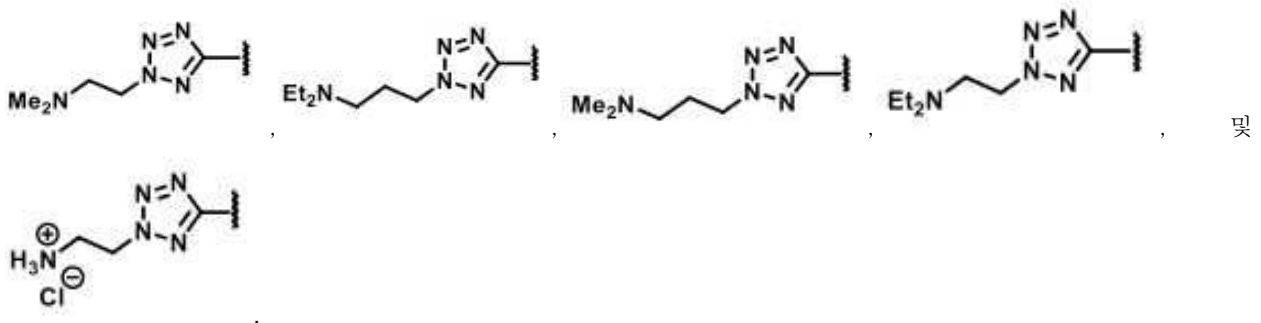
화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 6.7 초과와 pH를 갖는 수성 매질 중 리포솜에 캡슐화되고; 리포솜은 리포솜 내 콜레스테롤과 비-페길화된 인지질의 합에 대해 50-65 mol% 콜레스테롤을 갖는 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 중합체-접합 지질을 포함함.

청구항 2

제 1항에 있어서, R₂는 아세트아미드 (NHCOCH₃)인 리포솜 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, R₁는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 리포솜 조성물:



청구항 4

제 3항에 있어서 PEG 중합체-접합 지질은 포스파티딜콜린에 대해 5 mol%의 양으로 존재하는 리포솜 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 화학식 I의 화합물의 황산염은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 중합체-접합 지질을 45:55:2.25 몰비로 포함하는 리포솜 내에 캡슐화되는 리포솜 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 포스파티딜콜린은 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC) 또는 수소화 대두 포스파티딜콜린 (HSPC)인 리포솜 조성물.

청구항 7

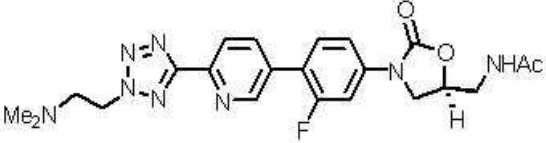
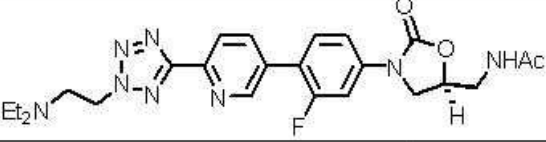
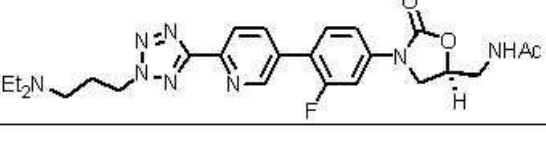
제 6항에 있어서, PEG 중합체-접합된 지질은 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일글리세롤 (PEG-DSG) 또는 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (PEG-DSPE)인 리포솜 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 리포솜 조성물은 데페록사민(DFO) 및 EDTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 추가로 포함하며, 여기서 킬레이트제는 0.1-1 mM의 농도로 존재하는 리포솜 조성물.

청구항 9

제 1-8항 중 어느 한항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 AKG-38, AKG-39 및 AKG-40로부터 선택된 화합물:

AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염인 리포솜 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 화학식 I의 화합물은 AKG-38의 황산염인 리포솜 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 리포솜 조성물의 pH는 7을 초과하고 8 이하인 리포솜 조성물.

청구항 12

제 10항에 있어서, 리포솜 조성물의 pH는 7.3 - 7.7인 리포솜 조성물.

청구항 13

제 10항에 있어서, 리포솜 조성물의 pH는 7.5 인 리포솜 조성물.

청구항 14

제 1항에 있어서, 화학식 I의 화합물은 AKG-38의 황산염인 리포솜 조성물



AKG-38

여기서 화합물은 pH 7.3-7.7의 수성 매질에서 HSPC(수소화 대두 포스파티딜콜린), 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE(45:55:2.25 몰비)로부터 형성된 리포솜에 캡슐화되어 있음.

청구항 15

제 14항에 있어서, 리포솜 조성물은 킬레이트제를 추가로 포함하며, 여기서 킬레이트제는 데페록사민(DFO)이고 킬레이트제는 0.1-1 mM의 농도로 존재하는 리포솜 조성물.

청구항 16

제 14 항 또는 15항에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-650 g/mol인 조성물.

청구항 17

제 14 항 또는 15항에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 600 g/mol인 리포솜 조성물.

청구항 18

제 14 항 또는 15항에 있어서

- 리포솜 조성물은 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고; 및
- 리포솜 조성물은 0.15 미만의 다분산 지수를 가지는 리포솜 조성물.

청구항 19

제 14 항 또는 15항에 있어서, 리포솜 조성물은 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율이 적어도 90%인 리포솜 조성물.

청구항 20

제 14 항 또는 15항에 있어서, 수성 매질은 염화나트륨을 추가로 포함하는 리포솜 조성물

청구항 21

제 20항에 있어서,

- 수성 매질은 270-330 mOsmol/kg의 삼투압 농도를 가지고;
- 염화나트륨은 130-150 mM의 농도이고; 및
- 킬레이트제는 0.5 mM의 농도인 리포솜 조성물.

청구항 22

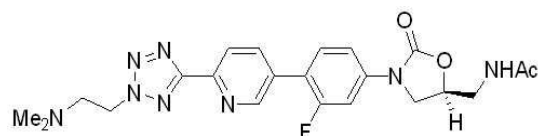
제 20항에 있어서, 수성 매질은 20-60mM 농도의 암모늄 이온을 포함하고, 염화나트륨은 50-80mM 농도로 존재하는 리포솜 조성물.

청구항 23

제 21항 또는 22항에 있어서, HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 리포솜 조성물.

청구항 24

pH가 7.0 이상 8.0 이하인 AKG-38 리포솜 조성물로서, 리포솜 조성물은 45:55: 2.25 또는 5:3:1의 질량비의 물비로 지질 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE 와 AKG-38의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 리포솜 조성물



AKG-38

여기서 리포좀 조성물은 다음 특성 중 하나 이상을 추가로 특징으로 함:

- f. 리포좀 조성물은 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고; 또는 리포좀 조성물은 100-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고;
- g. 리포좀 조성물은 0.15미만의 다분산 지수를 가지고; 또는 리포좀 조성물은 0.10 미만의 다분산 지수를 가지고;
- h. 리포좀 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-480 g/mol, 또는 리포좀 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 500-650 g/mol; 또는 리포좀 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-650 g/mol; 또는 리포좀 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 450 g/mol; 또는 리포좀 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 450 g/mol; 또는 리포좀 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 600 g/mol; 또는 리포좀 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 600 g/mol;
- i. 리포좀 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 12-25 mg/mL, 또는 리포좀 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 13.5-16.5 mg/mL, 또는 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 15 mg/mL, 또는 리포좀 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 16 mg/mL (10-ml 바이알 내 160 mg);
- j. 리포좀 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 90%, 또는 리포좀 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 95%, 또는 리포좀 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 97%, 또는 리포좀 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 98%;
- k. 리포좀 조성물은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 암모늄 이온을 포함하는 수성 매질을 포함하고;
- l. 수성 매질의 삼투압농도는 270~330mOsmol/kg이거나, 수성 매질의 삼투압농도는 270~310mOsmol/kg이고;
- m. 수성 매질은 20-60 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 50-80 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 0.5 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 1 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 1-10 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고;
- n. 수성 매질은 130-150 mM의 농도로 염화나트륨을 포함하고;
- o. 수성 매질은 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 7.3-7.7의 pH에서; 또는 7.5의 pH에서 리포좀 조성물을 완충하고;
- p. 수성 매질은 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 5-50 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고;
- q. 수성 매질은 킬레이트제를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 0.1-1 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 0.1-1 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고;
- r. 리포좀 조성물은 저장 안정성; 또는
- s. AKG-38은 AKG-38의 황산염으로 리포좀 내에 캡슐화됨.

청구항 25

데페록사민(데스페리옥사민, Desferal), 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA), 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌글리콜-0, 0'-비스(2-아미노에틸)-N, N, N', N'-테트라아세트산(EGTA), N-(2-히드록시에틸)에틸렌디아민-N, N', N'-트리아세트산(HEDTA) 및 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)로 이루어진 군으로부터 선택된 킬레이트제를 포함하는 수성 매질 내에서 수소화된 대두 포스포티딜콜린(HSPC), 콜레스테롤 및 (PEG(몰 중량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민, PEG-DSPE)(PEG(2000)-DSPE)를 포함하는 리포좀에 캡슐화된 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-

2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염으로 제제화된 등장성 AKG-38 리포솜 분산액.

청구항 26

제 25항에 있어서, 6.7 초과 8.0 이하의 pH를 갖는 등장성 AKG-38 리포솜 분산액.

청구항 27

제 26항에 있어서,

t. 등장성 AKG-38 리포솜 분산액의 pH는 7.5이고;

u. 리포솜은 45:55:2.25의 몰비인 수소화된 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로부터 형성되고;

킬레이트제는 데페록사민인 등장성 AKG-38 리포솜 분산액.

청구항 28

제 25항 또는 26항에 있어서, 리포솜 분산액은 포스파티딜콜린, 55몰% 콜레스테롤 및 5몰% PEG-DSG 또는 5몰% 또는 PEG-DSPE를 포함하는 조성물로부터 형성된 지질 소포를 포함하는 등장성 AKG-38 리포솜 분산액.

청구항 29

메티실린 내성 황색 포도상구균(MRSA) 박테리아 감염 박테리아 감염을 치료하는 방법으로서 제 1-28항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 30

압출된 지질 현탁액을 제조하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 리포솜 조성물의 제조 방법:

(a) 하나 이상의 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질 유도체를 에탄올에 용해시켜 지질 용액을 얻는 단계;

(b) 단계 (a)의 지질 용액을 포획제 용액과 조합하여 원하는 인지질 농도를 갖는 균일한 지질 현탁액을 얻는 단계;

(c) 단계 (b)의 지질 현탁액을 공칭 기공 크기가 50-200 nm인 폴리카보네이트 트랙 에칭(PTCE) 막과 같은 정된 기공 크기를 갖는 막을 통해 압출하는 단계;

(d) 압출된 지질 현탁액 내의 리포솜 외 포획제로부터 리포솜을 정제하여 정제된 압출 리포솜 제제를 얻는 단계;

(e) 리포솜을 수성 매질에서 화학식 I의 화합물과 접촉시켜 리포솜에 화합물을 캡슐화시키는 단계;

(f) 임의로 비캡슐화 화합물을 제거하는 단계;

(g) 비경구 사용에 적합한 생리학적으로 허용가능한 매질에 리포솜을 제공하는 단계;

여기서 단계 (b)의 포획제 용액은 0.25M 초과 농도의 황산암모늄 수용액을 포함하고, 단계 (g)의 생리학적으로 허용가능한 매질은 킬레이트제를 포함함.

청구항 31

제 30항에 있어서, 단계 (b)의 포획제 용액은 0.5M 농도의 황산암모늄을 포함하는 방법.

청구항 32

제 30항에 있어서 킬레이트제는 데페록사민인 방법.

청구항 33

제 30항에 있어서, 단계 (c)에서 압출된 리포솜은 z-평균 직경이 90-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포인

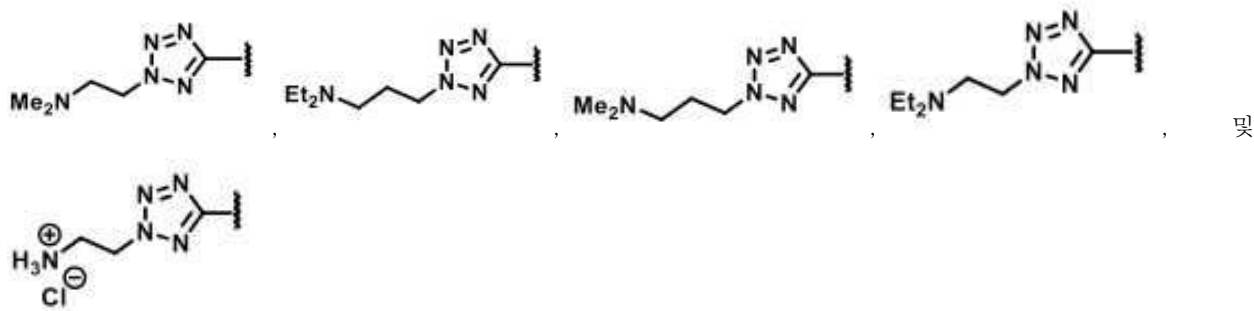
방법.

청구항 34

제 1항에 있어서, R_2 는 아민 (NH_2)인 리포솜 조성물.

청구항 35

제 34항에 있어서, R_1 는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 리포솜 조성물:



청구항 36

제 34항에 있어서 PEG 중합체-접합 지질은 포스파티딜콜린에 대해 5 mol%의 양으로 존재하는 리포솜 조성물.

청구항 37

제 36항에 있어서,

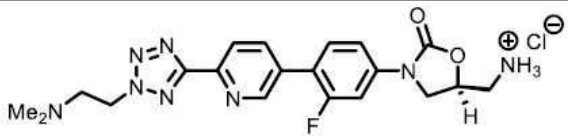
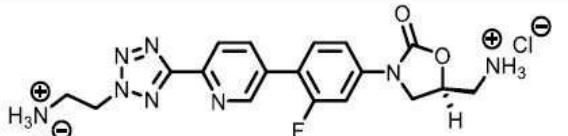
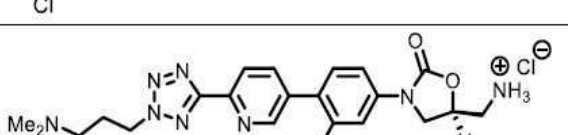
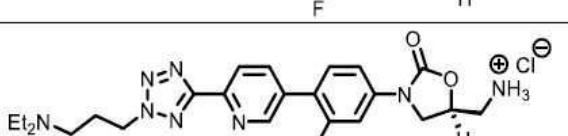
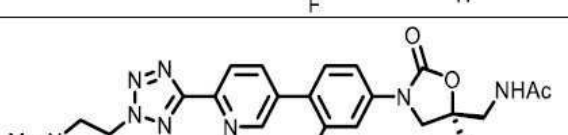
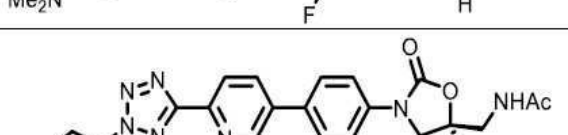
- 화학식 I의 화합물의 황산염은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 중합체-접합 지질을 45:55:2.25 몰비로 포함하는 리포솜 내에 캡슐화되고;
- 포스파티딜콜린은 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC) 또는 수소화 대두 포스파티딜콜린 (HSPC)이고;
- PEG 중합체-접합된 지질은 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일글리세롤 (PEG-DSG) 또는 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (PEG-DSPE)인 리포솜 조성물.

청구항 38

제 34-37항 중 어느 한항에 있어서, 리포솜 조성물은 테페록사민(DFO) 및 EDTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 추가로 포함하며, 여기서 킬레이트제는 0.1-1 mM의 농도로 존재하는 리포솜 조성물.

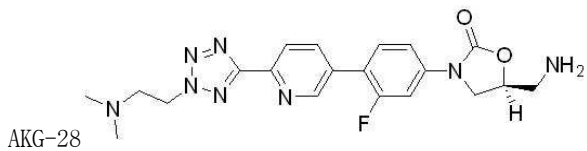
청구항 39

제 38항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 AKG-28, AKG-29, AKG-30, AKG-31, AKG-38 및 AKG-39로부터 선택된 화합물인 리포솜 조성물:

AKG-28	
AKG-29	
AKG-30	
AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	

청구항 40

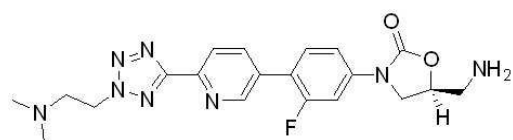
제 38항에 있어서, 화학식 I의 화합물은 AKG-28의 황산염인 리포솜 조성물



여기서 화합물은 pH 7.3-7.7의 수성 매질에서 HSPC(수소화 대두 포스파티딜콜린), 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE(45:55:2.25 몰비)로부터 형성된 리포솜에 캡슐화되어 있음.

청구항 41

리포솜 및 상기 리포솜에 캡슐화된 AKG-28의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 AKG-28 리포솜 조성물로서, 리포솜은 지질 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE를 45:55:2.25의 몰비 또는 5:3:1의 질량비로 포함하는 AKG-28 리포솜 조성물



AKG-28

여기서 리포솜 조성물은 다음 특성 중 하나 이상을 추가로 특징으로 함:

a. 리포솜 조성물은 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고; 또는 리포솜

조성물은 100-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고;

b. 리포솜 조성물은 0.15미만의 다분산 지수를 가지고; 또는 리포솜 조성물은 0.10 미만의 다분산 지수를 가지고;

c. 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 99-530 g/mol PhL, 또는 AKG-28 유리 염기 (F B)로서 85-456 g/mol; 99-470 g/mol PhL, 또는 AKG-28 유리 염기 (FB)로서 85-400 g/mol; AKG-28 유리 염기 (FB)로서 230-280 g/mol, 또는 190-240 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 290-360 g/mol, 또는 245-305 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 300-340 g/mol, 또는 256-290 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 250 g/mol, 또는 215 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 330 g/mol, 또는 280 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 330 g/mol, 또는 280 g/mol;

d. 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 FB로서 8-15 mg/mL, 또는 6.8 - 12.8 mg/mL; 또는 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 FB로서 9-11 mg/mL, 또는 7.6 - 9.4 mg/mL; 또는 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 FB로서 10 mg/mL, 또는 8.5 mg/mL; 또는 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 FB로서 10 mg/mL (10-ml 바이알 내 100 mg), 또는 8.5 mg/mL (10-ml 바이알 내 85 mg);

e. 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 90%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 95%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 97%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 98%;

f. 리포솜 조성물은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 암모늄 이온을 포함하는 수성 매질을 포함하고;

g. 수성 매질은 270-330 mOsmol/kg의 삼투압 농도를 가지고; 또는 수성 매질은 270-310 mOsmol/kg의 삼투압 농도를 가지고; 또는 수성 매질은 등장성이고;

h. 수성 매질은 20-60 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 50-80 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 0.5 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 1 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 1-10 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고; 또는 수성 매질은 130 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고;

i. 수성 매질은 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 7.3-7.7의 pH에서; 또는 7.5의 pH에서 리포솜 조성물을 완충하고;

j. 수성 매질은 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 5-50 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고, 또는 수성 매질은 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고;

k. 조성물에는 추가로 포함하는 킬레이트제; 또는 조성물은 0.1-1 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 0.1-1 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 또는 조성물은 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고; 또는

l. AKG-28은 AKG-28의 황산염으로 리포솜 내에 캡슐화됨.

청구항 42

압출된 지질 현탁액을 제조하는 것을 포함하는, 제34항 내지 제41항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 리포솜 조성물의 제조 방법:

(a) 하나 이상의 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질 유도체를 에탄올에 용해시켜 지질 용액을 얻는 단계;

(b) 단계 (a)의 지질 용액을 포획제 용액과 조합하여 원하는 인지질 농도를 갖는 균일한 지질 현탁액을 얻는 단계;

(c) 단계 (b)의 지질 현탁액을 공칭 기공 크기가 50-200 nm인 폴리카보네이트 트랙 에칭(PCTE) 막과 같은 정의

된 기공 크기를 갖는 막을 통해 압출하는 단계;

(d) 압출된 지질 현탁액 내의 리포솜 외 포획제로부터 리포솜을 정제하여 정제된 압출 리포솜 제제를 얻는 단계;

(e) 리포솜을 수성 매질에서 화학식 I의 화합물과 접촉시켜 리포솜에 화합물을 캡슐화시키는 단계;

(f) 임의로 비캡슐화 화합물을 제거하는 단계;

(g) 비경구 사용에 적합한 생리학적으로 허용가능한 매질에 리포솜을 제공하는 단계;

여기서 단계 (b)의 포획제 용액은 0.25M 초과 농도의 황산암모늄 수용액을 포함하고, 단계 (g)의 생리학적으로 허용가능한 매질은 킬레이트제를 포함함.

청구항 43

제42항에 있어서, 단계 (b)의 포획제 용액은 0.5M 농도의 황산암모늄을 포함하는 방법.

청구항 44

제 42항에 있어서 킬레이트제는 데페록사민인 방법.

청구항 45

제 42항에 있어서, 단계 (c)에서 압출된 리포솜은 z-평균 직경이 90-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포인 방법.

청구항 46

제 43항에 있어서, 킬레이트제는 데페록사민이고 단계 (c)에서 압출된 리포솜은 z-평균 직경이 90-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포인 방법.

청구항 47

마이코박테리아 감염 박테리아 감염을 치료하는 방법으로서, 이 방법은 제34-41항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 48

제 47항에 있어서, 마이코박테리아 감염은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의한 감염, 또는 결핵균의 다약제 내성(MDR) 균주에 의한 감염, 또는 결핵균의 극도의 약물 내성(XDR) 균주에 의한 감염인 방법.

청구항 49

메티실린 내성 황색 포도상구균(MRSA) 박테리아 감염 치료를 위한 제 1-28항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물의 용도.

청구항 50

마이코박테리아 감염 치료를 위한 제 34-41항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물의 용도.

청구항 51

제 1-28항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 메티실린 내성 황색 포도상구균(MRSA) 박테리아 감염 박테리아 감염을 치료하는 방법에서의 사용을 위한 제 1-28항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물.

청구항 52

리포솜 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에서의 사용을 위한 제 34-41항 중 어느 한 항의 리포솜 조성물.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

본 출원은 2021 년 12 월 22 일에 출원된 미국 가특허 출원 63/292,899호의 우선권의 이익을 주장하며 이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

기술분야

본 개시내용은 옥사졸리딘은 화합물을 포함하는 리포솜 조성물, 이의 제조 방법 및 마이코박테리움 투베르쿨로시스 및 기타 그람 양성 세균 감염의 치료에서의 아미노알킬 옥사졸리딘은 화합물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

리포솜 조성물은 치료 화합물의 전달에 유용하다. 리포솜 조성물은 지질에 의해 형성된 막에 의해 형성된 소포 내에 치료 화합물을 캡슐화하는 리포솜을 포함할 수 있다. 리포솜은 일반적으로 미세한 자루 또는 소포를 형성하는 하나 이상의 이중층 막에 의해 외부 매질로부터 격리된 내부 공간을 갖는 것이 특징이다.

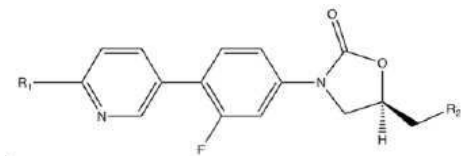
그러나, 치료 화합물을 캡슐화하는 리포솜은 저장 동안 및 치료 투여 전에 분해될 수 있다. 예를 들어, 리포솜 성분의 산화적 분해 및 리포솜 입자 크기 또는 다분산 지수(PDI)의 변화는 치료 화합물을 포함하는 리포솜 조성물의 저장 중에 발생할 수 있다. 저장 안정성이 개선되고, 저장 동안 리포솜 분해가 감소됨을 입증하는 치료제를 포함하는 리포솜 조성물에 대한 필요성이 남아있다.

발명의 내용

요약

메티실린 내성 황색포도상구균(*methicillin resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) 박테리아 감염을 치료하는 리포솜 조성물 및 방법이 본원에서 제공된다.

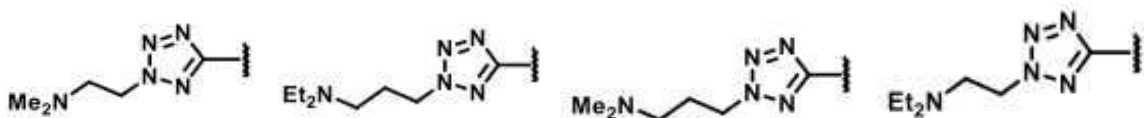
본 개시내용의 측면은 화학식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염의 리포솜 조성물에 관한 것이다.



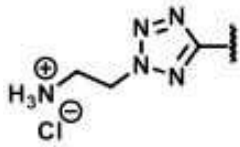
식 (I)

여기서 R_1 은 2' 위치에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 고리이고; R_2 는 아민 또는 아세트아미드이고; 여기서 화학식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 6.7 초과의 pH를 갖는 수성 매질 중 리포솜에 캡슐화되고; 리포솜은 리포솜 내 콜레스테롤과 비-페길화된 인지질의 합에 대해 50-65 mol% 콜레스테롤을 갖는 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 중합체-접합 지질을 포함한다.

일부 실시양태에서, R_2 는 아세트아미드 (NHCOCH_3)이다. 일부 실시양태에서, R_1 는 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:



및



[0015] 일부 실시양태에서, PEG 중합체-접합 지질은 포스파티딜콜린에 대해 5 mol%의 양으로 존재한다. 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물의 황산염은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 중합체-접합 지질을 45:55:2.25 몰비로 포함하는 리포솜 내에 캡슐화된다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜콜린은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC) 또는 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC)이다. 일부 실시양태에서, PEG 중합체-접합된 지질은 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일글리세롤(PEG-DSG) 또는 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민(PEG-DSPE)이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 테페록사민(DFO) 및 EDTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 추가로 포함하며, 여기서 킬레이트제는 0.1-1 mM의 농도로 존재한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 화학식 (I)의 화합물은 AKG-38, AKG-39 및 AKG-40 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로부터 선택된 화합물이다:

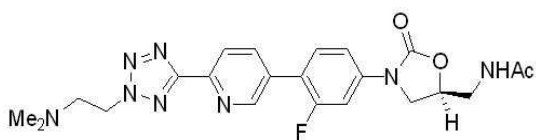
AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

[0017]

[0018] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 AKG-38의 황산염이다.

[0019] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물의 pH는 7을 초과하고 8 이하이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물의 pH는 7.3 - 7.7이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물의 pH는 7.5이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 AKG-38의 황산염이다.



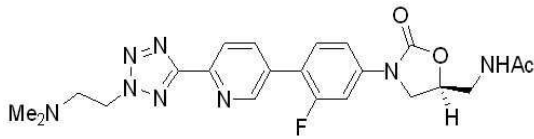
[0021]

[0022] AKG-38

[0023] 여기서 화합물은 pH 7.3-7.7의 수성 매질에서 HSPC(수소화 대두 포스파티딜콜린), 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE(45:55:2.25 몰비)로부터 형성된 리포솜에 캡슐화되어 있다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 킬레이트제를 추가로 포함하며, 여기서 킬레이트제는 테페록사민(DFO)이고 킬레이트제는 0.1-1 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-680 g/mol이다. 일부 실시양태에서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 600g/mol이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 z-평균 직경이 90-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고; 리포솜 조성물은 0.15 미만의 다분산 지수를 갖는다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율이 적어도 90%이다. 일부 실시양태에서, 수성 매질은 염화나트륨을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 수성 매질은 270-330 mOsmol/kg의 삼투압농도를 가지며; 염화나트륨의 농도는 130-150mM이고; 킬레이트제의 농도는 0.5 mM이다. 일부 실시양태에서, 수성 매질은 20-60mM 농도의 암모늄 이온을 포함하고, 염화나트륨은 50-80mM 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함한다.

[0024] 본 개시내용의 측면은 pH가 7.0 이상 8.0 이하인 AKG-38 리포솜 조성물에 관한 것이며, 리포솜 조성물은 45:55:2.25 또는 5:3:1의 질량비의 물비로 지질 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE 와 AKG-38의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함한다

[0025]



[0026]

AKG-38

[0027]

여기서 리포솜 조성물은 다음 특징 중 하나 이상을 추가로 특징으로 한다: (a) 리포솜 조성물은 z-평균 직경이 90-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하거나 리포솜 조성물은 z-평균 직경 100-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고; (b) 리포솜 조성물은 0.15 미만의 다분산 지수를 갖거나 리포솜 조성물은 0.10 미만의 다분산 지수를 가지며; (c) 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-480 g/mol, 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 500-650 g/mol; 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-650 g/mol; 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 450 g/mol; 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 450 g/mol; 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 600 g/mol; 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 600 g/mol이고; (d) 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 12-25 mg/mL, 또는 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 13.5-16.5 mg/mL, 또는 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 15 mg/mL, 또는 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 20 mg/mL (10-mL 바이알 내 200 mg); (e) 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 90%, 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 95%, 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 97%, 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 98%; (f) 리포솜 조성물은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 암모늄 이온을 포함하는 수성 매질을 포함하고; (g) 수성 매질의 삼투압농도는 270-330mOsmol/kg이거나, 수성 매질의 삼투압농도는 270-310mOsmol/kg이며; (h) 수성 매질은 20-60 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 50-80 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 0.5 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 1 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 1-10 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고; (i) 수성 매질은 130-150mM 농도의 염화나트륨을 포함하고; (j) 수성 매질은 완충제를 추가로 포함하며, 여기서 완충제는 pH 7.3-7.7 또는 pH 7.5에서 리포솜 조성물을 완충시키고; (k) 수성 매질은 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하거나, 수성 매질은 5-50mM 농도의 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하거나, 수성 매질은 20mM 농도의 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고; (l) 수성 매질은 킬레이트제를 추가로 포함하거나, 수성 매질은 0.1-1 mM 농도의 킬레이트제를 추가로 포함하거나, 수성 매질은 0.5 mM 농도의 킬레이트제를 추가로 포함하거나, 수성 매질은 데페록사민(DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하거나, 또는 수성 매질은 0.1-1 mM 농도의 데페록사민(DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하거나, 수성 매질은 0.5 mM 농도의 데페록사민(DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고; (m) 리포솜 조성물은 저장 안정성이 있고; 또는 (n) AKG-38은 AKG-38의 황산염으로서 리포솜에 캡슐화된다.

[0028]

본 개시내용의 측면은 데페록사민(데스페리옥사민, Desferal), 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA), 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌글리콜-0, 0'-비스(2-아미노에틸)-N, N, N', N'-테트라아세트산(EGTA), N-(2-히드록시에틸)에틸렌디아민-N, N', N'-트리아세트산(HEDTA) 및 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)로 이루어진 군으로부터 선택된 킬레이트제를 포함하는 수성 매질 내에서 수소화된 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 콜레스테롤 및 (PEG(몰 중량 2,000)-디스테아로일포스파티딜 에탄올아민, PEG-DSPE)(PEG(2000)-DSPE)를 포함하는 리포솜에 캡슐화된 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학 적으로 허용가능한 염으로 제제화된 등장성 AKG-38 리포솜 분산액에 관한 것이다.

[0029]

일부 실시양태에서, 등장성 AKG-38 리포솜 분산액은 6.7 초과 8.0 이하의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 등장성 AKG-38 리포솜 분산액의 pH는 7.5이다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 45:55:2.2의 물비인 수소화된 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로부터 형성된다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 데페록사민이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 분산액은 포스파티딜콜린, 55몰% 콜레스테롤 및 5몰% PEG-DSG 또는 5

몰% 또는 PEG-DSPE를 포함하는 조성물로부터 형성된 지질 소포를 포함한다.

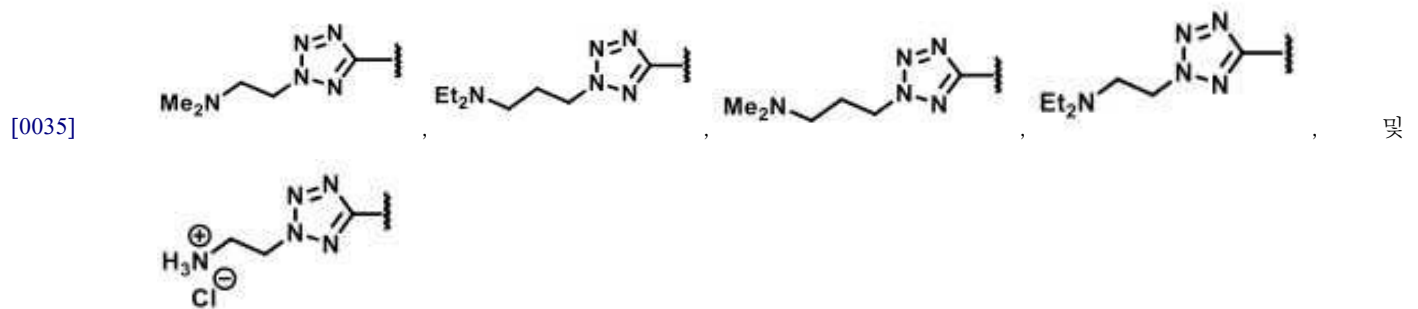
[0030] 본 개시내용의 측면은 본 개시내용의 측면은 메티실린 내성 황색 포도상구균(MRSA) 박테리아 감염 박테리아 감염을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 본원에 제공된 리포솜 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0031] 본 개시내용의 측면은 다음 단계를 포함하는 리포솜 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다: (a) 하나 이상의 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질 유도체를 에탄올에 용해시켜 지질 용액을 얻는 단계; (b) 단계 (a)의 지질 용액을 포획제 용액과 조합하여 원하는 인지질 농도를 갖는 균일한 지질 현탁액을 얻는 단계; (c) 단계 (b)의 지질 현탁액을 공칭 기공 크기가 50-200 nm인 폴리카보네이트 트랙 에칭(PCTE) 막과 같은 정의된 기공 크기를 갖는 막을 통해 압출하는 단계; (d) 압출된 지질 현탁액 내의 리포솜 외 포획제로부터 리포솜을 정제하여 정제된 압출 리포솜 제제를 얻는 단계; (e) 리포솜을 수성 매질에서 화학식 I의 화합물과 접촉시켜 리포솜에 화합물을 캡슐화시키는 단계; (f) 임의로 비캡슐화 화합물을 제거하는 단계; (g) 비경구 사용에 적합한 생리학적으로 허용가능한 매질에 리포솜을 제공하는 단계; 여기서 단계 (b)의 포획제 용액은 0.25M 초과 농도의 황산암모늄 수 용액을 포함하고, 단계 (g)의 생리학적으로 허용가능한 매질은 킬레이트제를 포함한다.

[0032] 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 포획제 용액은 0.5M 농도의 황산암모늄을 포함한다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 데페록사민이다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)에서 압출된 리포솜은 z-평균 직경이 90-130 nm인 단일 - 또는 올리고라멜라 소포이다.

[0033] 마이코박테리아 감염을 치료하는 리포솜 조성물 및 방법이 본원에서 제공된다.

[0034] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 R_2 가 아민(NH_2)인 화학식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 일부 실시양태에서, R_1 는 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

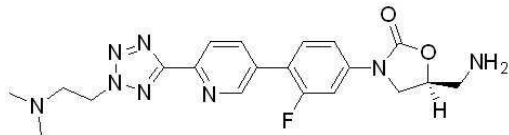


[0036] 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 6.7 초과의 pH를 갖는 수성 매질 중 리포솜에 캡슐화되고; 리포솜은 리포솜 내 콜레스테롤과 비-폐길화된 인지질의 합에 대해 50-65 mol% 콜레스테롤을 갖는 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 중합체-접합 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG 중합체-접합 지질은 포스파티딜콜린에 대해 5 mol%의 양으로 존재한다. 일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물의 황산염은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 중합체-접합 지질을 45:55:2.25 몰비로 포함하는 리포솜 내에 캡슐화된다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜콜린은 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC) 또는 수소화 대두 포스파티딜콜린 (HSPC)이다. 일부 실시양태에서, PEG 중합체-접합된 지질은 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일글리세롤 (PEG-DSG) 또는 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (PEG-DSPE)이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 데페록사민(DFO) 및 EDTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 추가로 포함하며, 여기서 킬레이트제는 0.1-1 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서,

[0037] 화학식 (I)의 화합물은 AKG-28, AKG-29, AKG-30, AKG-31, AKG-38 및 AKG-39 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로부터 선택된 화합물이다:

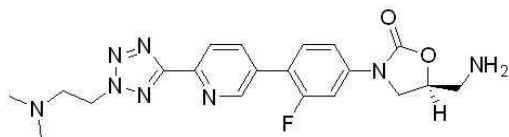
AKG-28	
AKG-29	
AKG-30	
AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	

일부 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 AKG-28의 황산염이고



(AKG-28), 화합물은 pH 7.3-7.7의 수성 매질에서 HSPC(수소화 대두 포스파티딜콜린), 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE(45:55:2.25 몰비)로부터 형성된 리포솜에 캡슐화되어 있다.

본 개시내용의 측면은 리포솜 및 상기 리포솜에 캡슐화된 AKG-28의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 AKG-28 리포솜 조성물에 관한 것이며, 리포솜은 지질 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE를 45:55:2.25의 몰비 또는 5:3:1의 질량비로 포함한다.



AKG-28

여기서 리포솜 조성물은 다음 특성 중 하나 이상을 추가로 특징으로 한다: (a) 리포솜 조성물은 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고, 또는 리포솜 조성물 은 100-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고; (b) 리포솜 조성물은 0.15 미만의 다분산 지수를 가지고, 또는 리포솜 조성물은 0.10 미만의 다분산 지수를 가지고; (c) 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 99-530 g/mol PhL, 또는 AKG-28 유리 염기 (FB)로서 85-456 g/mol; 99-470 g/mol PhL, 또는 AKG-28 유리 염기 (FB)로서 85-400 g/mol; AKG-28 유리 염기 (FB)로서 230-280 g/mol, 또는 190-240 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 290-360 g/mol, 또는 245-305 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 300-340 g/mol, 또는 256-290 g/mol; 또는

조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 250 g/mol, 또는 215 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 330 g/mol, 또는 280 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 FB로서 330 g/mol, 또는 280 g/mol; (d) 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 FB로서 8-15 mg/mL, 또는 6.8 - 12.8 mg/mL; 또는 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 FB로서 9-11 mg/mL, 또는 7.6 - 9.4 mg/mL; 또는 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 FB로서 10 mg/mL, 또는 8.5 mg/mL; 또는 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 FB로서 10 mg/mL (10-ml 바이알 내 100 mg), 또는 8.5 mg/mL (10-ml 바이알 내 85 mg); (e) 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 90%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 95%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 97%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 98%이고; (f) 리포솜 조성물은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 암모늄 이온을 포함하는 수성 매질을 포함하고; (g) 수성 매질은 270-330 mOsmol/kg의 삼투압 농도를 가지고; 또는 수성 매질은 270-310 mOsmol/kg의 삼투압 농도를 가지고; 또는 수성 매질은 등장성이고; (h) 수성 매질은 20-60 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 50-80 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 0.5 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 1 mM 미만 농도로 암모늄 이온을 포함하고, 또는 수성 매질은 1-10 mM 농도로 암모늄 이온을 포함하고; 또는 수성 매질은 130mM 미만 농도의 암모늄 이온을 포함하고; (i) 수성 매질은 완충제를 추가로 포함하며, 여기서 완충제는 pH 7.3-7.7 또는 pH 7.5에서 리포솜 조성물을 완충시키고; (j) 수성 매질은 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하거나, 수성 매질은 5-50mM 농도의 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하거나, 수성 매질은 20mM 농도의 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고; (k) 조성물은 킬레이트제를 추가로 포함하거나, 조성물은 0.1-1 mM 농도의 킬레이트제를 추가로 포함하거나, 조성물은 0.5 mM 농도의 킬레이트제를 추가로 포함하거나, 조성물은 데페록사민(DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하거나, 또는 조성물은 0.1-1 mM 농도의 데페록사민(DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하거나, 조성물은 0.5 mM 농도의 데페록사민(DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고; (l) AKG-28은 AKG-28의 황산염으로서 리포솜에 캡슐화된다.

[0046] 본 개시내용의 측면은 다음 단계를 포함하는 리포솜 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다: (a) 하나 이상의 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질 유도체를 에탄올에 용해시켜 지질 용액을 얻는 단계; (b) 단계 (a)의 지질 용액을 포획제 용액과 조합하여 원하는 인지질 농도를 갖는 균일한 지질 현탁액을 얻는 단계; (c) 단계 (b)의 지질 현탁액을 공칭 기공 크기가 50-200 nm인 폴리카보네이트 트랙 에칭(PTCE) 막과 같은 정의된 기공 크기를 갖는 막을 통해 압출하는 단계; (d) 압출된 지질 현탁액 내의 리포솜 외 포획제로부터 리포솜을 정제하여 정제된 압출 리포솜 제제를 얻는 단계; (e) 리포솜을 수성 매질에서 화학식 I의 화합물과 접촉시켜 리포솜에 화합물을 캡슐화시키는 단계; (f) 임의로 비캡슐화 화합물을 제거하는 단계; (g) 비경구 사용에 적합한 생리학적으로 허용가능한 매질에 리포솜을 제공하는 단계; 여기서 단계 (b)의 포획제 용액은 0.25M 초과 농도의 황산암모늄 수용액을 포함하고, 단계 (g)의 생리학적으로 허용가능한 매질은 킬레이트제를 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 포획제 용액은 0.5M 농도의 황산암모늄을 포함한다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 데페록사민이다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)에서 압출된 리포솜은 z-평균 직경이 90-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포이다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 데페록사민이고 단계 (c)에서 압출된 리포솜은 z-평균 직경이 90-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포이다.

[0048] 본 개시내용의 측면은 본 개시내용의 측면은 마이코박테리아 감염 박테리아 감염을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 본원에 제공된 리포솜 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이코박테리아 감염은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의한 감염, 또는 결핵균의 다약제 내성(MDR) 균주에 의한 감염, 또는 결핵균의 극도의 약물 내성(XDR) 균주에 의한 감염이다.

[0049] 마이코박테리아 감염을 치료하기 위한 리포솜 조성물의 용도가 본원에 제공된다.

[0050] 메티실린 내성 황색 포도상구균(MRSA) 박테리아 감염을 치료하기 위한 리포솜 조성물의 용도가 본원에 제공된다.

[0051] 일부 실시양태에서, 저장 안정성이 개선된 옥사졸리디논 화합물의 리포솜 제제가 제공된다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화된 인지질의 합에 대해 50 몰% 초과 콜레스테롤을 포함하고 pH가 7 이상인 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 놀랍게도 개선된 저장 안정성 특성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 데페록사민 또는 EDTA와 같은 킬레이트제를 첨가하면 옥사졸리디논 리포솜 조성물의 저장 동안 콜레스테롤의 산화 분해가 감소되었다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 약물 로딩(예를 들어, 로딩-후 완충제 교

환을 생략함으로써) 동안 황산암모늄 포획제를 포함하는 리포솜으로부터 치환된 암모늄을 포함하는 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 개선된 포스포타이드콜린 저장 안정성을 나타냈다.

- [0052] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 약 5:3:1의 질량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE로 구성된 지질로 구성된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 45:55:2.25의 몰비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE로 구성된 지질로 구성된다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 AKG-28 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 옥사졸리디논을 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 AKG-38 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 옥사졸리디논을 포함한다.
- [0053] 일부 실시양태에서, 리포솜 소포 및 옥사졸리디논을 포함하는 리포솜 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 설페이트를 캡슐화하는 리포솜 소포를 포함하는 옥사졸리디논 리포솜 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 리포솜 소포는 수성 매질 내에 있다.
- [0054] 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 화합물 및 그의 염은 리포솜 조성물을 제조하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 옥사졸리디논 리포솜을 형성하기에 효과적인 조건 하에서 옥사졸리디논 화합물을 정제된 압출 지질 현탁액과 조합하는 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어질 수 있다. 정제되고 압출된 지질 현탁액은 인지질, 콜레스테롤 및 임의의 수성 매질에 원하는 농도로 결합된 PEG-지질 유도체로 이루어진 지질 성분 및 황산암모늄(AS)과 같은 포획제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압출된 지질 현탁액의 지질 성분은 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성된다. 일부 실시양태에서, 압출된 지질 현탁액의 지질 성분은 HSPC와 콜레스테롤을 45:55의 몰비로 포함한다. 일부 실시양태에서, 압출된 지질 현탁액의 지질 성분은 5:3의 중량비로 HSPC와 콜레스테롤을 포함한다. 일부 실시양태에서, 압출된 지질 현탁액의 지질 성분은 45:55:2.25의 몰비의 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성된다. 일부 실시양태에서, 압출된 지질 현탁액의 지질 성분은 5:3:1의 중량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성된다.
- [0055] 일부 실시양태에서, 압출된 지질 현탁액은 다음 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어진다: (a) 하나 이상의 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질 유도체를 에탄올에 용해시켜 지질 용액을 얻는 단계; (b) 단계 (a)의 지질 용액을 포획제 용액(예를 들어, 0.5 M 황산암모늄)과 조합하여 원하는 인지질 농도(예를 들어, 60 mM 인지질)를 갖는 균일한 지질 현탁액을 얻는 단계; (c) 단계 (b)의 지질 현탁액을 공칭 기공 크기가 50-200 nm인 폴리카보네이트 트랙 에칭(PTCE) 막과 같은 정의된 기공 크기를 갖는 막을 통해 압출하는 단계; 및 (d) 압출된 지질 현탁액 내의 리포솜 외 포획제로부터 리포솜을 정제하여(예를 들어, 중공 섬유 카트리지 상의 접선 유동 여과에 의해) 정제된 압출 리포솜 제제를 얻는 단계. 일부 실시양태에서, 리포솜은 z-평균 직경이 90-130 nm 또는 100-130 nm인 단일- 또는 올리고라멜라 소포이다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 다분산 지수가 0.15 미만 또는 0.10 미만인 단일- 또는 올리고라멜라 소포이다.
- [0056] 정제된 압출 리포솜은 후속 약물 로딩 단계에서 옥사졸리디논 약물과 함께 로딩될 수 있다. 옥사졸리디논 약물 화합물 또는 그의 염의 약물 스톱 용액은 단계 (d)의 정제된 압출 지질 현탁액과 원하는 약물 대 인지질 농도로 조합되어 약물을 약물을 정제된 압출 리포솜 제제 내의 리포솜 내로 로딩하기에 효과적인 조건 하에 약물-리포솜 혼합물을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약물 로딩 단계는 리포솜 이중층 막을 가로질러 포획제 암모늄 양이온과 옥사졸리디논 화합물의 교환을 포함하며, 그 결과 약물 로딩 공정 동안 리포솜 내부로부터 대체된 약물-리포솜 혼합물에서 리포솜 외 암모늄이 생성된다.
- [0057] 약물 로딩 공정 후, 비캡슐화 약물 화합물은 약물-리포솜 혼합물로부터 정제될 수 있으며(예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피, SEC, 투석, 또는 접선유동여과와 같은 정용여과에 의해), 옥사졸리디논 약물을 포함하는 조성물 리포솜은 분리되어 저장될 수 있다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 상기 화합물은 포획제로 리포솜 소포 내에 포획되고, 그리고 여기서 포획제는 다중음이온을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포획제는 트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트 또는 황산암모늄이다. 일부 실시양태에서, 포획제는 트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트이다. 일부 실시양태에서, 포획제는 황산암모늄이다.
- [0059] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 화합물의 염을 포함하고, 상기 염은 설페이트, 시트레이트, 수크로소페이트, 인산화 또는 황산화 폴리올과의 염, 또는 인산화 또는 황산화 다중음이온성 중합체와의 염이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 상기 화합물의 황산염을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 화학식 I의 옥사졸리디논 화합물의 황산염 또는 황산수소염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물

은 (AKG-28)의 황산염 또는 황산수소염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 (AKG-38)의 황산염 또는 황산수소염을 포함한다.

- [0060] 일부 실시양태에서, 리포솜 소포 내 화합물은 1 mg/mL 미만의 수용해도를 가진다. 일부 실시양태에서, 리포솜 소포 내 화합물은 0.1 mg/mL 미만의 수용해도를 가진다.
- [0061] 일부 실시양태에서, 리포솜 소포는 포스파티딜콜린 및 콜레스테롤을 포함하는 막을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 소포는 포스파티딜콜린 및 콜레스테롤을 포함하는 막을 포함한다, 여기서 막은 리포솜 소포의 내부를 수성 매질로부터 분리한다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜콜린은 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC) 또는 수소화 대두 포스파티딜콜린 (HSPC)이다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 60:40 내지 35:65이다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 55:45 내지 약 35:65이다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 50:50 내지 약 40:60이다. 일부 실시양태에서, 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 50:50 내지 약 45:55이다. 일부 실시양태에서, 막은 중합체-접합된 지질을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 소포는 약 45:55:2.75 몰비로 HSPC, 콜레스테롤 및 중합체-접합된 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 소포는 45:55:2.25 몰비로 HSPC, 콜레스테롤 및 중합체-접합된 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체-접합된 지질은 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일글리세롤 (PEG-DSG) 또는 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (PEG-DSPE)이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 내 리포솜은 약 80 내지 약 130 nm Z-평균 입자 크기를 가진다.
- [0062] 일부 실시양태에서, 약물 리포솜은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 약물 로딩 과정 동안 리포솜으로부터 치환된 암모늄을 추가로 포함하는 수성 매질에 제공된다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 중 염화나트륨의 농도는 50-80 mM이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 수성 조성물 중 염화나트륨의 농도는 130-150 mM이다. 일부 실시양태에서, 약물 리포솜은 약물 로딩 과정 동안 리포솜으로부터 대체된 20-60 mM 암모늄을 포함하는 수성 매질에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 리포솜 수성 매질 중 암모늄의 농도는 0.5 mM 미만이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물의 수성 매질의 삼투압농도는 270-330 mOsmol/kg이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물의 수성 매질의 삼투압농도는 270-310 mOsmol/kg이다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 약 6.7 초과의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 7-8의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 리포솜 수성 매질의 pH를 약 7.3-7.7로 만들기 위한 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 리포솜 수성 매질의 pH를 약 7.5로 만들기 위한 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 HEPES 및 포스페이트로 구성된 그룹으로부터 선택되는 완충 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 HEPES 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 인산염 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 HEPES 및 인산염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충 물질을 5-50 mM 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 HEPES 및 인산염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충 물질을 20 mM 농도로 포함한다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 킬레이트제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 데페록사민(DFO) 및 EDTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 데페록사민(DFO) 및 EDTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 0.1-1 mM 농도로 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 데페록사민(DFO) 및 EDTA로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 0.5 mM 농도로 추가로 포함한다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 약물 화합물은 낮은 약물 대 지질 비율(실시예 53)을 갖는 리포솜의 혈액 PK 특성에 가까운 혈액 PK 특성으로 증가된 약물 대 지질 비율(실시예 51)로 압출된 리포솜에 효율적으로(>95%) 로딩되었다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 제제는 약물 로딩 과정 동안 리포솜 내의 포획제로부터 대체된 암모늄을 유지함으로써(예를 들어, 완충제 교환 단계를 생략함으로써) 안정화될 수 있다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 약물 화합물은 AKG-38이고, 리포솜 조성물은 약물 로딩 과정 동안 리포솜 내에 형성된 AKG-38의 황산염을 포함한다. 일부 실시양태에서, AKG-38 리포솜은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온(AKG-38)의 염 형태를 용해시켜 얻은 약물 스톱 용액을 사용하여 제조된다. 일부 실시양태에서, AKG-38의 염산염을 비롯한 AKG-38의 염이 제공된다. AKG-38의 염은 AKG-38 리포솜을 로딩하기 위한 약물 스톱 용액을 제조하는 데

유용하다. 일부 실시양태에서, AKG-38 이온은 리포솜 내의 황산암모늄 포획체로부터 대체된 암모늄과 교환되어 AKG-38 리포솜 내에 AKG-38 염을 형성한다.

화학적 구조	화합물	분자량
	AKG-28	분자량 499.4
	AKG-28 유리 염기	분자량 426.5
	AKG-28 이염산염 일수화물	분자량 517.4

[0068]

[0069]

일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜 조성물은 230-380 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-28을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜 조성물은 230-290 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-28을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜 조성물은 290-360 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-28을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜 조성물은 300-340 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-28을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜 조성물은 약 250 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-28을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜 조성물은 약 330 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-28을 갖는다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 중 AKG-28의 전체(또는 전체) 농도는 8-15 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 9-11 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28에 대한 캡슐화된 AKG-28의 비율은 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 98%이다.

[0070]

일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 약물 화합물은 AKG-38이고, 리포솜 조성물은 약물 로딩 과정 동안 리포솜 내에 형성된 AKG-38의 황산염을 포함한다. 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리딘일]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온(AKG-38)의 염 형태를 용해시켜 얻은 약물 스톱 용액을 사용하여 제조된다. 일부 실시양태에서, AKG-38의 염산염을 비롯한 AKG-38의 염이 제공된다. AKG-38의 염은 AKG-38 리포솜을 로딩하기 위한 약물 스톱 용액을 제조하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, AKG-38 이온은 리포솜 내의 황산암모늄 포획체로부터 대체된 암모늄과 교환되어 AKG-38 리포솜 내에 AKG-38 염을 형성한다.

화학적 구조	화합물	분자량
	AKG-38 염산	분자량 505.0
	AKG-38 (유리 염기)	분자량 468.5

[0071]

[0072]

일부 실시양태에서, AKG-38 리포솜 조성물은 430-680 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-38을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-38 리포솜 조성물은 500-650 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-38을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-38 리포솜 조성물은 550-650 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-38을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-38 리포솜 조성물은 약 450 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-38을 갖는다. 일부 실시양태에서, AKG-38 리포솜 조성물은 약 600 g/mol 총 인지질(PhL)의 약물/지질 비율로 AKG-38을 갖는다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 12-25 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 13.5-16.5 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 약 15 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 약 20

mg/ml이다. 일부 실시양태에서, AKG-38 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 98%이다.

[0073] 옥사졸리딘은 리포솜 제제의 가속 안정성 시험 동안 특정 AKG-28 및 AKG-38 리포솜 조성물에서 콜레스테롤 및 HSPC 분해가 관찰되었다(실시예 54, 65). 도 17은 두 가지 주요 콜레스테롤 산화 분해 산물인 7-하이드록시-콜레스테롤(알파- 및 베타-이성질체) 및 7-케토콜레스테롤을 보여주는 도식이다. 도 18은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC)이 리소포스파티딜콜린(lyso-PC) 및 스테아르산으로 분해되는 것을 보여주는 도식이다. 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC)은 1,2-디아실-sn-글리세로-포스포콜린이며, 여기서 1 및 2 아실 사슬 위치는 포화 지방산 C16-C22이며 주로 스테아르산(C18) 및 팔미트산(C16)이다. 디스테아로일포스파티딜콜린은 HSPC의 가장 큰 성분이다.

[0074] 그러나, 가속 안정성 연구에서, 완충제 교환 단계 없이 제조된 AKG-28의 특정 비정제 완충 리포솜 제제에서 HSPC 분해 산물인 리소-PC, 스테아르산 및 팔미트산의 형성은 완충제 교환-후 제제가 이미 HSPC 분해를 보여준 시점에서 검출되지 않았다(실시예 54). 이들 제제의 리포솜 외 매질은 약물 로딩 단계 이전에 리포솜 내부에 함유된 황산암모늄 포획제로부터 치환된 암모늄의 수준이 증가했다(치환된 암모늄). 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솜은 치환된 암모늄을 리포솜에 로딩된 AKG-28 약물의 물 당량 이상의 양으로 포함할 수 있다. 유사하게, HSPC의 분해는 약물 로딩-후 완충제 교환 없이 AKG-38 리포솜에서 가속 안정성 시험 동안 최소화되었다(실시예 55).

[0075] 콜레스테롤과 비-폐길화 인지질의 합계에 대해 50 mol% 초과 콜레스테롤을 포함하는 AKG-28 및 AKG-38 리포솜 조성물의 리포솜 부형제 완충제에 데페록사민 킬레이트제를 첨가하면 놀랍게도 37°C에서 가속 안정성 시험에서 적어도 3개월간을 통해 콜레스테롤의 분해가 방지되었다(실시예 56). 그러나, 약물 로딩 전에 약물 스톱 용액에 DFO, EDTA 및 DTP킬레이트제를 첨가하는 것은 HSPC, 및 콜레스테롤과 비-폐길화된 인지질의 합에 대해 50 mol% 초과 콜레스테롤을 포함하는 AKG-28 및 AKG-38 리포솜의 지질 분해로부터 보호하지 못했다(실시예 57). 킬레이트제(DFO 또는 EDTA)가 없으면 AKG-28 및 AKG-38 리포솜 제제에서 콜레스테롤의 산화 분해가 관찰되었다(실시예 58, 67).

[0076] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 리포솜 지질 성분의 분해에 대해 안정하고 pH > 7.0을 갖는다. 지질 분해 속도, 특히 콜레스테롤 분해 속도는 리포솜 제제 pH에 따라 달라지며 pH 7.0 이상에서 더 낮다는 것이 발견되었다(실시예 65). 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 pH가 적어도 7.1, 적어도 7.2, 또는 적어도 7.3이고, pH 8.0 이하, pH 7.7 이하, 또는 pH 7.6 이하이다. 일부 실시양태에서, 37°C에서 3개월 후 콜레스테롤 분해 정도는 총 콜레스테롤의 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태에서, 37°C에서 6주 후 인지질 분해 정도는 전체 인지질의 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 포스파티딜콜린이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 HSPC이고, pH는 pH 7.3-7.6이다.

[0077] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 콜레스테롤을 포함하고 콜레스테롤 분해에 안정성이고, 37°C에서 3개월 후 콜레스테롤 분해 정도는 총 콜레스테롤의 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만이다. 콜레스테롤 분해 생성물은 독성이 있고 혈관 내피 손상을 유발할 수 있기 때문에 콜레스테롤 분해를 피하는 것이 중요하다(Rong et al., Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1998, vol. 18, p.1885-1894; Sevanian et al., J Lipid Res, 1995, vol. 36, p.1971-1986). 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 킬레이트제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 인간에게 허용가능한 것으로 알려진 킬레이트제이다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 데페록사민(Desferal, DFO), 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA), 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌글리콜-O, O'-비스(2-아미노에틸)-N, N, N', N'-테트라아세트산(EGTA), N-(2-히드록시에틸)에틸렌디아민-N, N', N'-트리아세트산(HEDTA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)(약제학적으로 허용가능한 염 포함)이다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 적어도 0.01 mM, 적어도 0.05 mM, 적어도 0.1 mM, 적어도 0.2 mM, 또는 적어도 0.5 mM, 및 최대 1 mM, 최대 2 mM, 최대 5 mM, 또는 최대 10 mM의 농도에서 조성물 내 존재한다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 데페록사민 또는 데페록사민 메실레이트이고, 킬레이트제 농도는 약 0.5 mM이다.

[0078] 일부 실시양태에서 리포솜 조성물의 외부 매질은 0.5 mEq/L(리터당 밀리그램 등가) 미만의 암모늄 또는 치환된 암모늄을 갖는다. 일부 실시양태에서 리포솜 조성물은 적어도 10 mEq/L, 적어도 15 mEq/L, 또는 적어도 20 mEq/L, 및 최대 200 mEq/L, 최대 150 mEq/L, 최대 100 mEq/L, 최대 80 mEq/L, 또는 최대 60 mEq/L의 농도로 암모늄 또는 치환된 암모늄을 리포솜 외 매질 내에 함유한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 적어도 10 mEq/L, 적어도 15 mEq/L, 또는 적어도 20 mEq/L, 및 최대 200 mEq/L, 최대 150 mEq/L, 최대 100 mEq/L, 최대

80 mEq/L, 또는 최대 60 mEq/L의 농도로 암모늄 또는 치환된 암모늄을 리포솜 외 매질 내에 함유하고, 인지질 분해에 대해 안정성이고, 37° C에서 6주 후 인지질 분해 정도는 총 인지질의 10% 미만, 5% 미만 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 포스파티딜콜린이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 HSPC이고, 암모늄 염은 암모늄 농도가 10-80 mM, 또는 15-60 mM인 염화 암모늄, 황산 암모늄, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물의 외부 매질 중 암모늄의 정규도는 약물 로딩 단계에서 캡슐화된 약물의 정규도의 90-110% 이내이고, 정규도는 그램 당량/L(eq/L)로 표현되는 농도이다.

[0079] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 300-350 g/mol PhL의 약물/지질(DL) 비율로 캡슐화된 화학식 1b의 화합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 300-350 g/mol PhL의 DL 비율로 캡슐화된 화학식 1b의 화합물을 포함하고, CD-1 마우스의 혈액 내 생체내 약물 방출 반감기가 80 시간 초과, 200시간 초과, 300시간 초과인 것을 특징으로 한다.

[0080] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 500-650 g/mol PhL의 DL 비율로 캡슐화된 화학식 1c의 화합물을 포함한다.

[0081] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 수성 매질 중 리포솜을 포함하며, 리포솜은 45:55:2.25의 물비 또는 5:3:1의 질량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되고, 리포솜은 90-130 nm 또는 100-130 nm의 z-평균 직경 및 0.15 미만 또는 0.10 미만 다분산 지수를 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포이고, 리포솜은 230-280 g/mol 인지질 (PhL), 290-360 g/mol PhL, 300-340 g/mol PhL, 약 250 g/mol PhL, 또는 약 330 g/mol PhL의 약물/지질 (DL) 비율에서 캡슐화 화합물 AKG-28을 함유하고, 조성물 내 AKG-28의 전체 농도는 8-15 mg/ml 또는 9-11 mg/ml이고, 조성물 내 전체 AKG-28에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 98%이다. 일부 실시양태에서, 수성 매질은 염화나트륨 및 선택적으로 암모늄 이온을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수성 매질의 삼투압 농도는 270-330 mOsmol/kg 또는 270-310 mOsmol/kg이다. 일부 실시양태에서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 20-60 mM, 및 염화나트륨의 농도는 50-80 mM이다. 일부 실시양태에서 수성 매질 내 암모늄 농도는 0.5 mM 미만이고 염화나트륨의 농도는 130-150 mM이다. 일부 실시양태에서 조성물은 수성 매질 pH를 약 7.3-7.7, 또는 약 pH 7.5로 만드는 완충 물질을 또한 함유한다. 일부 실시양태에서, 완충 물질은 5-50 mM, 또는 약 20 mM의 농도에서 HEPES 또는 인산염이다. 조성물은 또한 킬레이트제를 함유할 수 있으며, 킬레이트제는 데페록사민(DFO) 또는 EDTA이며 농도는 0.1-1mM, 또는 약 0.5mM이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 저장-안정성이다.

[0082] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 수성 매질 중 리포솜을 포함하며, 리포솜은 45:55:2.25의 물비 또는 5:3:1의 질량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되고, 리포솜은 90-130 nm 또는 100-130 nm의 z-평균 직경 및 0.15 미만 또는 0.10 미만 다분산 지수를 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포이고, 리포솜은 430-480 g/mol 인지질 (PhL), 500-650 g/mol PhL, 550-650 g/mol PhL, 약 450 g/mol PhL, 또는 약 600 g/mol PhL의 약물/지질 (DL) 비율에서 캡슐화 화합물 AKG-38을 함유하고, 조성물 내 AKG-38의 전체 농도는 12-25 mg/ml, 13.5-16.5 mg/ml, 약 15 mg/ml, 또는 약 20 mg/ml 이고, 조성물 내 전체 AKG-28에 대한 캡슐화 AKG-38의 비율은 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 98%이다. 일부 실시양태에서, 수성 매질은 염화나트륨 및 선택적으로 암모늄 이온을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수성 매질의 삼투압 농도는 270-330 mOsmol/kg 또는 270-310 mOsmol/kg이다. 일부 실시양태에서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 20-60 mM이고, 염화나트륨의 농도는 50-80 mM이며, 일부 실시양태에서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 0.5 mM 미만이고 염화나트륨의 농도는 130-150 mM이다. 일부 실시양태에서 조성물은 매질 pH를 약 7.3-7.7, 또는 약 pH 7.5로 만드는 완충 물질을 또한 함유한다. 일부 실시양태에서, 완충 물질은 5-50 mM, 또는 약 20 mM의 농도에서 HEPES 또는 인산염이다. 조성물은 또한 킬레이트제를 함유할 수 있으며, 킬레이트제는 데페록사민(DFO) 또는 EDTA이며 농도는 0.1-1mM, 또는 약 0.5mM이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 저장-안정성이다.

[0083] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 저장 시 캡슐화된 화합물의 분해에 대해 안정하다. 일부 실시양태에서, 가속 분해 조건(37°C) 하에 저장 시 캡슐화된 화합물의 분해는 백분율 포인트로 표현되는 화합물 순도의 감소로 측정하여 3개월 저장 후 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 약 1% 이하이다. 일부 실시양태에서, 가속화된 분해 조건(37°C) 하에서 저장 시 캡슐화된 화합물의 분해는 리포솜 조성물 중 온전한 화합물의 전체 농도의 감소에 의해 측정된 바와 같이 3개월 저장 후 20% 미만, 10% 미만, 또는 5% 미만이다. 일부 실시양태에서, 캡슐화된 화합물은 AKG-28 또는 AKG-38이다. 따라서, 37°C에서 3개월 동안 저장된 AKG-38의 리포솜 조성물은 AKG-38 순도가 98.99%에서 98.07%(0.92% 포인트)로 현저히 낮은 감소를 보였고, 온전한 AKG-38 에서도 농도도 19.9mg/ml에서 19.06mg/ml(4.2% 감소)로 전체적으로 낮은 감소를 보였다(실시예 68).

도면의 간단한 설명

[0084]

도 1은 화합물 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16의 리포솜 로딩에 대한 pH의 영향을 나타내는 그래프이다.

도 2A 및 도 2B는 상이한 약물-대-지질(DL) 비율에서 TEA-SOS 포획제를 사용하여 화합물 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16의 리포솜으로의 캡슐화를 나타내는 그래프이다. 도 2A는 로딩-후 약물 대 지질 비율(DL)로 표현되는, 리포솜 페이로드에 대한, 리포솜 인지질(PhL) 1몰당 약물의 그램 단위로, 첨가된 약물 대 지질(DL0) 비율의 효과를 나타내는 그래프이다. 도 2B는 DL0에 대한 로딩-후 DL의 퍼센트로 계산된 리포솜 로딩 효율에 대한 DL0 비율(약물 대 지질 투입 비율)의 효과를 나타낸다.

도 3A, 도 3B, 도 3C, 및 도 3D는 화합물 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16을 포획제로서 0.5M 황산암모늄을 사용하여 상이한 DL 비율에서 리포솜으로 캡슐화하는 것을 나타내는 그래프이다. 도 3A는 AKG-5 및 AKG-16에 대한 리포솜 페이로드에 대한 DL0 비율의 효과를 나타낸다. 도 3B는 AKG-5 및 AKG-16에 대한 리포솜 로딩 효율에 대한 DL0 비율의 효과를 나타낸다. 도 3C는 AKG-3에 대한 리포솜 페이로드에 대한 DL0 비율의 효과를 나타낸다. 도 3D는 AKG-3에 대한 리포솜 로딩 효율에 대한 DL0 비율의 효과를 나타낸다.

도 4A 및 도 4B는 상이한 DL0 비율에서 포획제로서 TEA-SOS 및 황산암모늄을 사용한 AKG-28 및 AKG-38의 캡슐화를 나타내는 그래프이다. 도 4A는 리포솜 페이로드에 대한 DL0 비율의 효과를 나타낸다. 도 4B는 로딩 효율에 대한 DL0 비율의 효과를 나타낸다.

도 5A, 도 5B, 도 5C, 및 도 5D는 하기 실시예 19에 기재된 바와 같이 마우스 ("마우스"로 표시됨) 또는 인간 ("인간"으로 표시됨)의 혈장과 시험관내 접촉 시 화합물 AKG-28(도 5a, 도 5c) 및 AKG-38(도 5b, 도 5d)을 캡슐화하는 리포솜으로부터 빠른 약물 누출의 의존성을 나타내는 그래프이다. 리포솜은 5mol%의 PEG(2000)-DSPE("DSPE"로 표시) 또는 PEG-DSG("DSG"로 표시)를 함유했다. 포획제: 0.5M 암모늄 설페이트 (AS) (도 5A, 도 5B), 1N 트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트 (TEA-SOS) (도 5C, 도 5D).

도 6은 화학식 I의 화합물의 번호가 매겨진 고리 구조를 나타낸다.

도 7은 10mg/kg(다이아몬드), 20mg/kg(정사각형), 및 40mg/kg(원)에서 Ls-AKG28의 단일 정맥내 용량(IV x 1)을 투여한 후 Sprague-Dawley 래트에서 전체 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로필을 나타내는 그래프이다. 5% 메틸 셀룰로오스(pH 3-4) 내 50 mg/kg(단일 경구 용량, PO x 1)에서 리네졸리드의 혈장 농도 대 시간 프로필도 비교를 위해 포함되었다. 평균 및 SD 농도는 각 시점에서 표시된다.

도 8은 20mg/kg(다이아몬드), 40mg/kg(정사각형), 및 80mg/kg(다이아몬드)에서 Ls-AKG38의 단일 정맥내 용량(IV x 1)을 투여한 후 Sprague-Dawley 래트에서 전체 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로필을 나타내는 그래프이다. 5% 메틸 셀룰로오스(pH 3-4) 내 50 mg/kg(단일 경구 용량, PO x 1)에서 리네졸리드의 혈장 농도 대 시간 프로필도 비교를 위해 포함되었다. 평균 및 SD 농도는 각 시점에서 표시된다.

도 9A, 도 9B, 및 도 9C는 1일(원), 15일(사각형), 29일(다이아몬드) 및 43일(삼각형)에 10mg/kg(도 9A), 20mg/kg(도 9B) 및 40mg/kg (도 9C), IV x 1에서 Ls-AKG28을 투여한 후 Sprague-Dawley 래트에서 전체 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로필을 보여주는 그래프이다. 평균 및 SD 농도는 각 시점에서 표시된다.

도 10A, 도 10B, 및 도 10C는 1일(원), 15일(사각형), 29일(다이아몬드) 및 43일(삼각형)에 Ls-AKG38을 20mg/kg(도 10A), 40mg/kg(도 10B) 및 80mg/kg (도 10C), IV x 1으로 투여한 후 Sprague-Dawley 래트에서 전체 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일을 나타내는 그래프이다. 평균 및 SD 농도는 각 시점에서 표시된다.

도 11A, 도 11B, 및 도 11C는 CD-1 마우스에서 단일 정맥 주사 후 CD-1 마우스에서 지질(교환불가능한 DiIC18(3)-DS 표지 사용), 리포솜 AKG-28(도 11A) 및 리포솜 AKG-38(도 11B)에 대한 약물의 혈장 농도 대 시간 프로파일, 및 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38(도 11C) 모두에 대한 리포솜으로부터의 약물 방출 속도의 척도인 혈장 약물 대 지질 비의 변화를 나타내는 그래프이다. 평균 및 SD는 각 시점에서 표시된다.

도 12는 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38에 대한 % 주사 용량으로 제시된 혈장 약물 농도를 나타내는 그래프이며, 제1 및 제4 주 용량 후 리포솜 AKG-28 및 리포솜 AKG-38의 다중 제형을 비교했다. 총 4회 주사 동안 주당 1회 지시된 용량 및 제제를 마우스에 주사했다.

도 13A는 시간 경과에 따른 암컷 CD-1 마우스 체중에 대한 Ls-AKG28 용량 증량의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 13B는 시간에 따른 마우스에서 암컷 CD-1 체중에 대한 Ls-AKG38 용량 증량의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 13C는 암컷 CD-1 마우스에서 혈액학(RBC, HTC, PLT, WBC) 및 혈액 생화학(ALT, AST) 매개변수에 대한 BP 또는 BPM과 조합된 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 13D는 암컷 CD-1 마우스에서 조직 병리학적 소견에 대한 단일요법 Ls-AKG28 또는 Ls-AKG38의 효과를 보여주는 열 지도이다.

도 14A는 시간에 따른 암컷 CD-1 마우스 체중에 대한 베다퀼린 및 프레토마니드(BP) 또는 베다퀼린, 프레토마니드 및 목시플록사신(BPM)과 조합된 Ls-AKG28의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 14B는 시간에 따른 암컷 CD-1 마우스 체중에 대한 BP 또는 BPM과 조합된 Ls-AKG38의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 14C는 암컷 CD-1 마우스에서 혈액학(RBC, HTC, PLT, WBC) 및 혈액 생화학(ALT, AST) 매개변수에 대한 BP 또는 BPM과 조합된 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 14D는 암컷 CD-1 마우스에서 조직 병리 소견에 대한 BP 또는 BPM과 조합된 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 효과를 나타내는 열 지도이다.

도 15A는 Ls-AKG28을 주 2회(2qw) 50 mg/kg 또는 주 1회(1qw) 100 mg/kg 단독 또는 BP와 병용하여 주사한 암컷 CD-1 마우스의 시간 경과에 따른 체중 변화를 나타내는 그래프이다.

도 15B는 Ls-AKG38을 100mg/kg에서 2qw 주사하거나 200mg/kg에서 1qw 단독 또는 BP와 병용하여 주사한 암컷 CD-1 마우스의 체중 변화를 나타내는 그래프이다.

도 15C는 Ls-AKG28(50 mg/kg에서 2qw 또는 100 mg/kg에서 1qw) 또는 Ls-AKG28(100 mg/kg에서 2qw 또는 200 mg/kg) 단독 또는 BP와 병용하여 처리된 암컷 CD-1 마우스에서 혈액학 및 혈액 생화학 매개변수를 보여주는 그래프이다.

도 15D는 Ls-AKG28(50mg/kg에서 2qw 또는 100mg/kg에서 1qw) 또는 Ls-AKG28(100mg/kg에서 2qw 또는 200mg/kg에서 1qw)단독 또는 BP와 병용하여 처리된 암컷 CD-1 마우스의 조직병리학 결과를 나타내는 열 지도이다.

도 16A는 시간 경과에 따라 총 8주 동안 만성적으로 처리된 수컷 Sprague-Dawley 래트의 체중에 대한 Ls-AKG28의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 16B는 시간 경과에 따라 총 8주 동안 만성적으로 처리된 수컷 Sprague-Dawley 래트의 체중에 대한 Ls-AKG38의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 17은 두 가지 주요 콜레스테롤 산화 분해 산물인 7-하이드록시-콜레스테롤(알파- 및 베타-이성질체) 및 7-케토콜레스테롤을 보여주는 도식이다.

도 18은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC)이 리소포스파티딜콜린 및 스테아르산으로 분해되는 것을 보여주는 도식이다. 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC)은 1,2-디아실-sn-글리세로-포스포콜린이며, 여기서 1 및 2 아실 사슬 위치는 포화 지방산 C16-C22이며 주로 스테아르산(C18) 및 팔미트산(C16)이다. 디스테아로일포스파티딜콜린은 HSPC의 가장 큰 성분이다.

도 19A는 실온에서 12주 동안 AKG-38 리포솜 조성물의 콜레스테롤 분해에 대한 데이터를 보여주는 그래프이다.

도 19B는 실온에서 12주 동안 AKG-28 리포솜 조성물의 콜레스테롤 분해에 대한 데이터를 보여주는 그래프이다.

도 20A, 도 20B 및 도 20C는 CD-1 마우스에 단일 정맥 주사 후의 AKG-28 약물의 혈장 농도 대 시간 프로파일, 리포솜 지질(비교환성 DiIC18(3)-DS 라벨 사용) 및 리포솜 AKG-28 로트 Ls-338(샘플 71), Ls-339(샘플 74) 및 Ls-340S(샘플 76)에 대한 AKG-28 약물, 혈장 약물 대 지질 비율을 보여주는 그래프이다. 리포솜 특성은 실시예 59에 제시되어 있다. 데이터 포인트는 3마리 동물의 평균이다.

도 21은 다양한 농도의 테페록사민 존재 하에 37°C에서 저장 시 AKG-38 리포솜 조성물 로트 Ls-371(실시예 67)의 콜레스테롤 분해에 대한 데이터를 보여주는 그래프이다.

도 22는 다양한 농도의 테페록사민 존재 하에 37°C에서 저장 시 AKG-38 리포솜 조성물 로트 Ls-371(실시예 67)의 HSPC 분해에 대한 데이터를 보여주는 그래프이다.

도 23은 다양한 농도의 테페록사민 존재 하에 37°C에서 저장 시 AKG-38 리포솜 조성물 로트 Ls-371(실시예 67)

의 pH 변화를 보여주는 그래프이다.

도 24는 본 개시내용의 실시양태에 따른 합성 반응식-1을 보여준다.

도 24는 본 개시내용의 실시양태에 따른 합성 반응식-2을 보여준다.

도 26은 본 개시내용의 실시양태에 따른 합성 반응식-3을 보여준다.

도 27은 본 개시내용의 실시양태에 따른 합성 반응식-4를 보여준다.

도 28은 본 개시내용의 실시양태에 따른 합성 반응식-5를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085]

본 개시내용은 옥사졸리딘은 리포좀 조성물을 기술한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 지질 소포에 캡슐화된 화학식 I의 화합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 약제학적으로 허용가능한 염으로서의 옥사졸리딘 화합물, 및 인지질과 콜레스테롤을 포함하는 지질 소포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 옥사졸리딘 화합물, 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 50 몰% 초과와 콜레스테롤과 인지질을 포함하는 지질 소포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 옥사졸리딘 화합물, 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 약 50 몰% 초과와 콜레스테롤과 인지질을 포함하는 지질 소포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 옥사졸리딘 화합물, 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 50-65 몰%의 콜레스테롤과 인지질을 포함하는 지질 소포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 옥사졸리딘 화합물, 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 50-60 몰%의 콜레스테롤과 인지질을 포함하는 지질 소포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 옥사졸리딘 화합물, 및 인지질 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 50-55 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 지질 소포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 옥사졸리딘 화합물, 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 약 50 몰%의 콜레스테롤과 인지질을 포함하는 지질 소포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 조성물은 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 옥사졸리딘 화합물, 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 약 55 몰%의 콜레스테롤과 인지질을 포함하는 지질 소포를 포함한다.

[0086]

일부 실시양태에서 저장 동안 인지질 또는 콜레스테롤 분해의 감소된 양을 특징으로 하는 옥사졸리딘은 리포좀 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리딘은 리포좀 조성물은 pH가 약 7 이상(예를 들어, 7-8)이고 인지질 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 페길화되지 않은 인지질의 합에 대해 50 mol% 초과와 콜레스테롤(예를 들어, 50-65 mol%, 50-60 mol%, 50-55 mol%, 약 50 mol%, 또는 약 55 mol%)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리딘은 리포좀 조성물은 인지질 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화된 인지질의 합에 대해 50 몰% 초과와 콜레스테롤과 조합된 DFO 또는 EDTA와 같은 킬레이트제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, pH 7-8(7-7.7, 7.1-7.7, 7.3-7.7 및 약 7.5 포함)을 갖는 옥사졸리딘은 리포좀 조성물은 인지질 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화된 인지질의 합에 대해 50 몰% 초과와 콜레스테롤과 조합된 DFO 또는 EDTA와 같은 킬레이트제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리딘은 리포좀 조성물은 인지질 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화된 인지질의 합에 대해 50 몰% 초과와 콜레스테롤을 포함하는 소포와 조합된 리포좀 외 암모늄을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리딘은 리포좀 조성물은 인지질 및 리포좀 조성물 중 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 50 몰% 초과와 콜레스테롤을 포함하는 리포좀 소포 내로의 옥사졸리딘의 약물 로딩 동안 생성된 리포좀 외 암모늄을 추가로 포함한다.

[0087]

진술한 일반적인 설명 및 다음의 상세한 설명은 모두 예시적이고 설명을 위한 것이며 본 발명의 조성물 및 방법을 제한하지 않는다는 것을 이해해야 한다.

[0088]

정의

[0089]

편의상, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용된 특정 용어를 여기에 모아두었다. 다르게 정의되지 않는다면, 여기서 사용된 모든 기술적 과학적 용어는 본발명이 속하는 분야에서의 숙련자에게 흔히 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0090]

여기서 사용된 이후의 용어 및 구문은 다음 의미를 갖도록 의도된다.

- [0091] 관사 "a" 및 "an"은 본원에서 하나 또는 하나 초과(즉 적어도 하나)의 관사의 문법적 대상을 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.
- [0092] 본원에서 사용되는 용어 "포함하는" 또는 "포함하다"는 주어진 실시예에 존재하지만 아직 불특정 요소를 포함할 수 있는 조성물, 방법 및 이들의 각각의 구성요소(들)와 관련하여 사용된다.
- [0093] 본원에서 사용되는 "본질적으로 이루어진"이라는 용어는 주어진 실시예에 필요한 요소를 의미한다. 이 용어는 본 발명의 해당 실시예의 기본적이고 새로운 또는 기능적 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 추가 요소의 존재를 허용한다.
- [0094] 용어 "이루어지는"은 본 명세서에 기술된 조성물, 방법 및 이들의 각각의 구성요소를 말하며, 이는 실시양태의 설명에 언급되지 않은 임의의 요소를 배제한다.
- [0095] 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함하는"은 "구성되는" 및 "본질적으로 구성되는"을 포함한다.
- [0096] "위에서 언급한 바와 같이" 또는 "위에서 언급한"으로 언급되는 경우, 설명 내에서 "상기"는 임의의 이전 페이지의 명세서 내에서 이루어진 임의의 개시를 지칭한다.
- [0097] 설명 내에서 "본원에 언급된 바와 같이", "본원에 기술된", "본원에 제공된" 또는 "본 명세서에 언급된 바와 같은" 또는 "본원에 언급된"으로 언급되는 경우, 이는 명세서 내 이전 또는 이후 페이지에서 작성된 임의의 개시 내용을 지칭한다.
- [0098] 본원에서 사용되는 용어 "약"은 명시된 값의 20% 이내, 10% 이내 및 5% 이내의 허용 가능한 변화를 의미한다. 특정 실시양태에서, "약"은 $\pm$ 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% 또는 20%의 변동을 의미할 수 있다.
- [0099] 화합물 또는 조성물과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "유효량"은 살균 또는 정균 효과를 유발하기에 충분한 활성 화합물(또한 본원에서 활성제 또는 약물로 지칭됨)의 양을 의미한다. 한 실시양태에서, 유효량은 치료되는 세균 감염의 증상을 완화하기에 충분한 활성 화합물의 양을 의미하는 "치료 유효량"이다.
- [0100] 본원에서 사용되는 용어 "대상체"(또는 대안적으로 "환자")는 예방적 또는 치료적 치료를 받는 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간을 지칭한다.
- [0101] 본원에서 사용되는 용어 "투여" 또는 "투여하는"은 경구, 정맥내, 근육내, 복강내, 피하, 경피, 흡입, 협측, 안구, 설하, 질, 직장 등을 포함하나 이에 제한되지 않는, 화합물 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 도입하는 모든 수단을 포함한다. 화합물 또는 조성물의 투여는 적합하게는 비경구적이다. 예를 들어, 화합물 또는 조성물은 우선적으로 정맥내 투여될 수 있지만, 마이코박테리움 아비움(*mycobacterium avium*)의 치료에서 리포좀 아미카신에 대해 임상에서 현재 사용되는 것과 같이 복강내 또는 흡입을 통해 투여될 수도 있다 (Shirley et al., Amikacin Liposome Inhalation Suspension: A Review in *Mycobacterium avium* Complex Lung Disease. *Drugs*. 2019 Apr; 79(5):555-562 참조)
- [0102] 본원에서 사용되는 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 본원에 기재된 것과 같은 치료 또는 예방 조치를 의미한다.
- [0103] 본원에서 사용된 용어 "상승작용" 및 "상승작용적"은 함께 사용된 화합물로 달성된 효과가 화합물을 개별적으로 사용하여 얻은 효과의 합보다 더 크다, 즉 별도로 투여되는 두 가지 활성 성분에 기초하여 예상되는 것보다 더 크다는 것을 의미한다.
- [0104] 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 원하는 약리학적 활성을 갖는 본 발명의 화합물의 상대적으로 무독성인 무기 또는 유기 산 부가 염을 지칭한다.
- [0105] 용어 "알킬"은 탄소 사슬이 달리 정의되지 않는 한 선형 또는 분지형 또는 이들의 조합일 수 있는 포화 탄소 사슬을 의미한다. 알킬 기의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, sec- 및 tert-부틸, 헵틸, 헥실, 헵틸, 옥틸 등을 포함한다.
- [0106] 용어 "아미노알킬"은 알킬 탄소 사슬의 적어도 하나의 탄소가 아미노기와 결합을 형성하는 알킬을 의미하며, 여기서 상기 아미노기는 1차 아미노기, 모노-알킬-치환된(2차) 아미노기, 디 - 알킬-치환된 (3급) 아미노기, 또는 아민 질소 원자 및 아민 수소를 치환하는 알킬 사슬이 헤테로사이클을 형성하는 알킬-치환된 아미노기이다.
- [0107] 용어 "리포좀"은 중앙 수성 구획을 둘러싸는 인지질과 같은 양친매성 분자에 의해 형성된 수성 구획에 의해 분리된 이중층(단일라멜라) 및/또는 동심원 시리즈의 다중 이중층(다중라멜라)으로 구성된 소포를 의미한다. 리

리포솜 약물 제형에서 약물 물질은 일반적으로 리포솜에 함유되어 있다. 전형적으로, 수용성 약물은 수성 구획(들)에 포함되고 소수성 약물은 리포솜의 지질 이중층(들)에 포함된다. 리포솜 청소율 및 순환 반감기와 같은 다른 특성 중에서 리포솜 제제로부터 약물의 방출은 리포솜에 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 콜레스테롤 또는 다른 잠재적인 첨가제의 존재에 의해 변경될 수 있다.

[0108] "단일라멜라 소포"라고도 하는 "단일라멜라 리포솜"은 단일 폐쇄 수성 구획을 한정하는 하나의 지질 이중층 막을 포함하는 리포솜이다. 이중층 막은 두 층의 지질; 내부 층 및 외부 층(전단)을 포함한다. 외부 층의 지질 분자는 친수성("머리") 부분이 외부 수성 환경을 향하고 소수성("꼬리") 부분이 리포솜 내부를 향하여 아래쪽을 향하도록 배향된다. 지질의 내부층은 외부층 바로 아래에 놓여 있으며, 지질은 머리가 리포솜의 수성 내부를 향하고 꼬리가 지질 외부층의 꼬리를 향하도록 배향된다.

[0109] "다중라멜라 소포" 또는 "다중라멜라 소포"로도 지칭되는 "다중라멜라 리포솜"은 하나 초과와 지질 이중층 막을 포함하며, 이 막은 하나 초과와 폐쇄된 수성 구획을 정의한다. 막은 서로 다른 막이 수성 구획에 의해 분리되도록 동심원으로 배열된다.

[0110] 본원에 사용된 용어 "캡슐화" 및 "포획된"은 옥사졸리디논 약제를 리포솜에 또는 리포솜과 결합 또는 결합시키는 것을 의미한다.

[0111] 용어 "DL", "DL 비율", "D/L" 또는 "D/L 비율"은 상호교환적으로 사용되며 리포솜 지질에 대한 약물의 비율을 지칭한다. 달리 표시되지 않는 한, 리포솜 인지질(PhL) 1몰당 약물의 그램으로 표시된다.

[0112] 콜레스테롤에 관한 용어 "몰%"는 백분율 포인트로 표현된 콜레스테롤 및 비폐쇄화된 인지질의 몰량의 합에 대한 콜레스테롤의 몰량을 의미한다. 예를 들어, 콜레스테롤 및 HSPC를 함유하는 리포솜에서 "55몰% 콜레스테롤"은 HSPC 45몰부당 콜레스테롤 55몰부의 조성을 지칭한다.

[0113] PEG-지질에 관한 용어 "몰%"는 백분율 포인트로 표현된 PEG-지질 및 비-PEG화 인지질의 몰량의 비율을 의미한다. 예를 들어, "5 mol.% PEG-DSPE"는 HSPC 및 PEG-DSPE를 함유하는 리포솜은 HSPC 100몰부당 5몰부의 PEG-DSPE를 갖는 조성물을 말한다.

[0114] 용어 "수크로스 옥타설페이트", "수크로스페이트" 및 "수크로옥타설페이트"는 동일한 화합물, 수크로스 옥타산 또는 이의 음이온을 지칭하고, 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0115] 화학식에서 발견되는 기호 "Ac", "Me" 및 "Et"는 각각 아세틸 기 (CH_3CO), 메틸 기 (CH_3), 및 에틸 기 (C_2H_5)을 나타낸다.

[0116] "유리 염기 농도" 또는 "FB 농도"라는 용어는 유리 염기 형태의 염 형성 화합물의 질량 농도를 표현하는 데 사용된다. 기본적으로 염 형태(예: 이염산염의 염산염)로 합성 및 분리된 화합물의 경우 질량 기반 농도 또는 비율(예: mg/ml 또는 g/mol 인지질)은 이 염 형태의 농도 또는 비율로 표현된다. 그러나 언급된 경우 염(예: AKG-28 이염산염) 형태로 분리된 화합물의 농도는 무수 유리 염기와 동등한 화합물의 농도(FB 농도)로도 표현된다. FB 농도를 얻으려면 유리 염기 형태의 화합물의 계산된 분자량을 염 형태의 계산된 분자량으로 나누고 농도에 이 인자를 곱한다. 예를 들어, 유리 염기로서의 AKG-28의 분자량은 426.46이고, 이염산염 형태(이 화합물이 분리된 형태)의 분자량은 499.37이다. 따라서 AKG-28의 농도를 FB 기준으로 계산하는 인자는 $426.46/499.37=0.854$ 이므로, 예를 들어 AKG-28 이염산염 10mg/ml의 FB 농도는 8.54mg/ml가 된다. 화합물이 알려진 양의 물(예: AKG-28 이염산염 일수화물)을 추가로 포함하는 경우 알려진 수분 함량에 대한 수정도 이루어진다. 유리 염기(예: AKG-38)로 분리된 화합물의 질량 농도는 항상 FB 농도로 표시된다.

[0117] 본원에 개시된 질량 농도 및 비율은 화합물의 염 형태에 따라 다르지만, 화합물의 농도 및 비율은 염 형태와 관계없이 몰 단위로 표현될 수 있다. 예를 들어 이염산염의 단리된 합성 생성물 형태를 기준으로 본원에 인용된 AKG-28의 질량 농도 또는 양을 몰 농도로 변환하기 위해, 질량 농도 또는 양을 AKG-28 이염산염의 분자량 499.4g/mol로 나눈다. 따라서, 본원에서 330 g/mol PhL로 인용된 리포솜 조성물 중 AKG-28의 DL 비율은 $330/499.4 = 0.661 \text{ mol/mol PhL}$ 로 표현되며; 10 mg/mL로 언급된 AKG-28의 농도는 $10/499.4 = 20.0 \text{ mM}$ 로 표시된다. 화합물 유리 염기 기준으로 농도가 언급되는 경우, 질량량과 농도는 화합물 유리 염기의 분자량으로 나누어진다. 따라서, 본원에서 600 g/mol PhL로 언급된 리포솜 조성물 중 AKG-38의 DL 비율은 $600/468.5 = 1.281 \text{ mol/mol PhL}$ 로 표현되며, AKG-38은 468.5 분자량을 갖는 유리 염기 형태로 합성으로부터 단리된다. 따라서, 언급된 AKG-38의 20 mg/mL 농도는 $20/468.5 = 42.7 \text{ mM}$ 로 몰 단위로 표현된다.

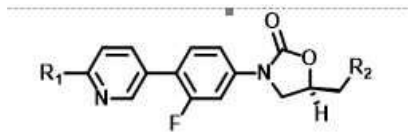
[0118] **화합물**

[0119] 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 화합물을 포함하는 리포솜 조성물이 제공된다.

[0120] 다양한 양태 및 실시양태가 다음 하위 섹션에서 더 상세히 설명된다.

[0121] 옥사졸리디논은 단백질 합성을 억제함으로써 기능을 발휘하는 합성 항생제이다. 리네졸리드 (LZD)는 M. 투베르쿨로시스에 대해 정균 활성을 나타내는 옥사졸리디논 화합물이다. 그러나 LZD 투여는 빈혈, 혈소판감소증, 말초신경병증과 같은 심각한 부작용을 일으킬 수 있다. 테디졸리드는 그람양성균을 억제하는 것으로 밝혀진 옥사졸리디논 화합물이다. 테디졸리드 포스페이트의 부작용은 비슷하지만 일반적으로 리네졸리드에서 관찰된 것보다 덜 심각하지만, 결핵 치료에 필요한 것과 같은 장기간 투여 경험은 리네졸리드의 광범위한 경험에 비해 테디졸리드 포스페이트의 경우 제한적이었다.

[0122] 본 개시내용의 양태는 옥사졸리디논의 아미노알킬 유도체인 화합물에 관한 것이다(도 6 참조). 일부 실시양태에서, 하기 화학식 I을 갖는 화합물 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염:



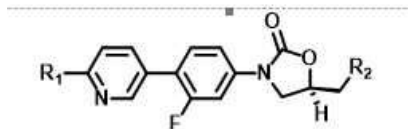
[0123] 식 (I)

[0124] 여기서 R₂는 아민 (NH₂) 또는 아세트아미드 (NHCOCH₃)이고,

[0125] 여기서 R₁는 위치 2'에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 링임.

[0126] 일부 실시양태에서, 아미노알킬은 디메틸아미노알킬이다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체는 옥사졸리디논 링의 R₂ 위치에서 아민 또는 아세트아미드 기 및 테트라졸 링 상 디메틸아미노에틸기를 포함한다.

[0127] 다른 실시양태에서, 하기 화학식 I을 갖는 화합물 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염:



[0128] 식 (I)

[0129] 여기서 R₂는 아민 (NH₂) 또는 아세트아미드 (NHCOCH₃)이고, 그리고

[0130] 여기서 R₁는 위치 1'에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 링임.

[0131] 하기 표 1의 화학 구조를 갖는 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체를 실시예 1에 기재된 바와 같이 합성했다.

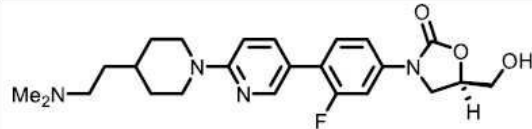
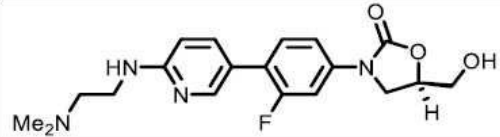
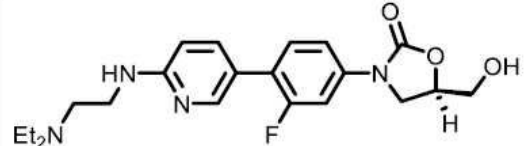
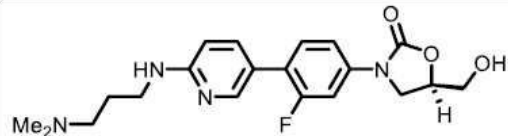
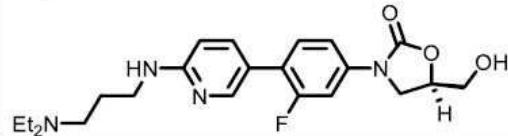
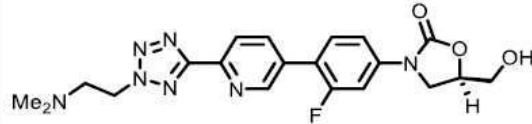
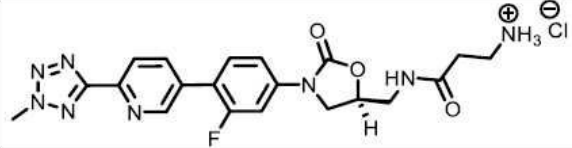
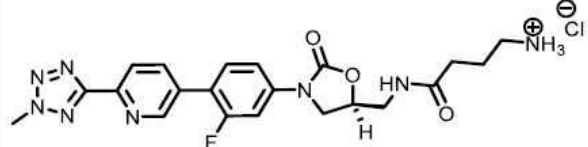
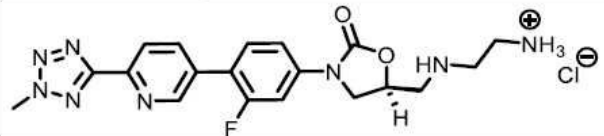
[0132] 본 발명의 화합물은 유리 형태, 예를 들어 유리 염기, 유리 산 또는 양성 이온으로, 또는 염의 형태로 존재할 수 있다. 상기 염은 염의 염, 유기 또는 무기 부가염 또는 공결정, 특히 약제학에서 통상적으로 사용되는 염의 약제학적으로 허용가능한 유기 또는 무기 부가염 또는 공결정일 수 있다. 특정 염 형태 또는 이온 형태의 화합물을 나타내는 화학식은 또한 해리되지 않은 유리 염기(또는 유리 산) 형태의 이 화합물을 개시하는 것으로 이해된다.

[0133] 본 발명은 화합물의 모든 입체이성질체 형태를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하기 표 1의 화합물은 실질적으로 순수하다(즉, 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 예를 들어 100%)

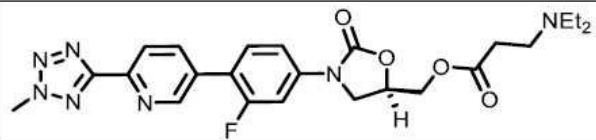
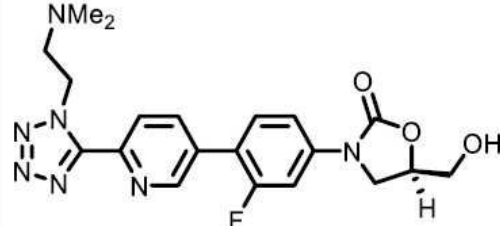
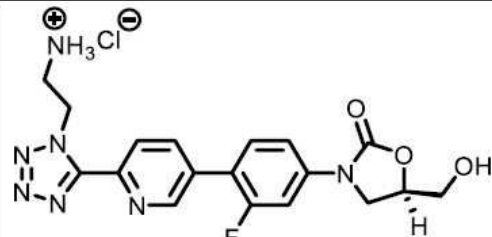
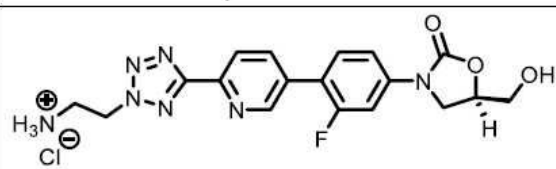
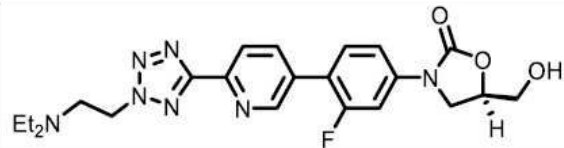
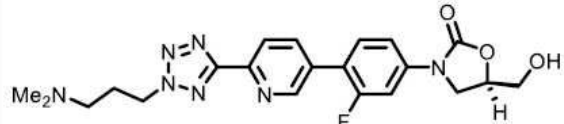
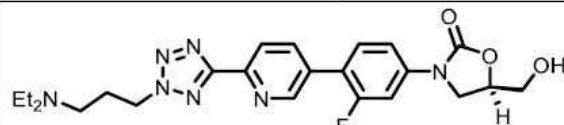
표 1

명칭	구조
AKG-1	
AKG-2	
AKG-3	
AKG-5	
AKG-6	
AKG-7	
AKG-8	
AKG-9	

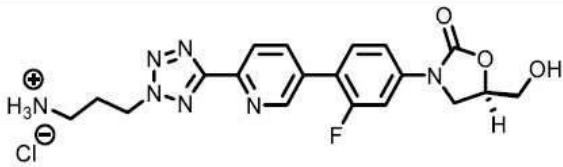
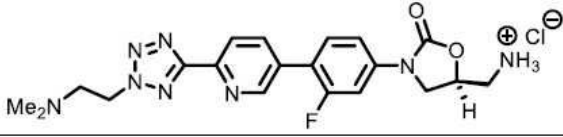
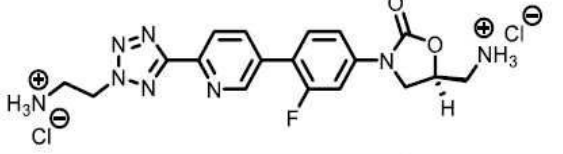
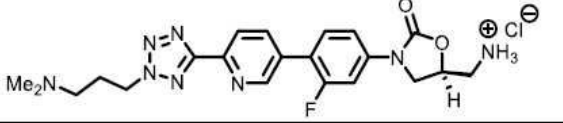
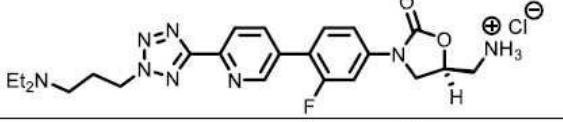
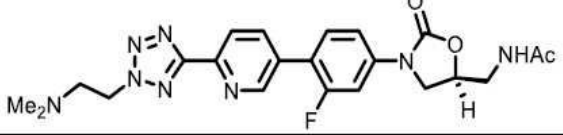
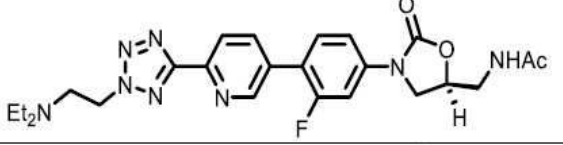
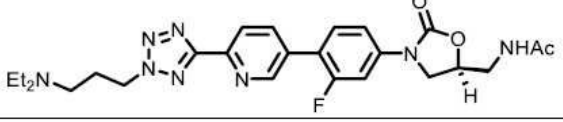
[0134]

AKG-11	
AKG-12	
AKG-13	
AKG-14	
AKG-15	
AKG-16	
AKG-17	
AKG-18	
AKG-19	

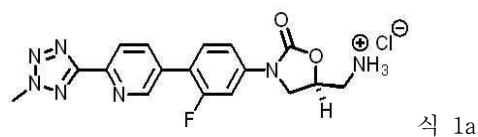
[0135]

AKG-20	
AKG-21	
AKG-22	
AKG-23	
AKG-24	
AKG-25	
AKG-26	

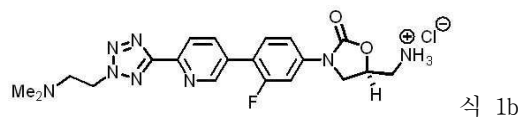
[0136]

AKG-27	
AKG-28	
AKG-29	
AKG-30	
AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

일부 실시양태에서, 상기 화합물은 다음 화학식을 가진다:

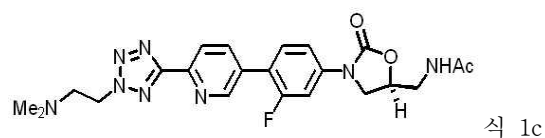


일부 실시양태에서, 상기 화합물은 다음 화학식을 가진다:

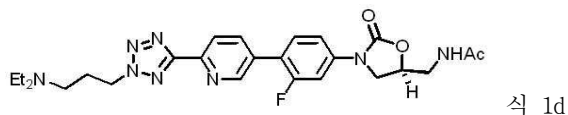


일부 실시양태에서, 화학식 1b의 화합물은 수성 에탄올로부터 결정화된다. 일부 실시양태에서 화학식 1b의 화합물은 이염산염 또는 이염산염 일수화물의 형태이다.

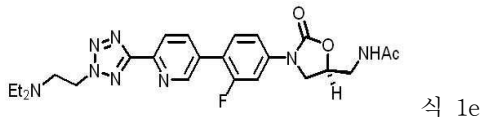
일부 실시양태에서, 상기 화합물은 다음 화학식을 가진다:



[0145] 일부 실시양태에서, 상기 화합물은 다음 화학식을 가진다:



[0147] 일부 실시양태에서, 상기 화합물은 다음 화학식을 가진다:



[0149] 마이코박테리움 감염의 치료에 유용한 화학식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 상기 화합물은 화학식 1a, 1b, 1c, 1d 또는 1e를 가진다. 일부 실시양태에서, 상기 화합물은 화학식 1b를 가진다. 일부 실시양태에서, 식 (I)의 화합물은 예를 들어 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 내지 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 내지 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 마이코박테리움 투베르쿨로시스에 대한 최소 억제 농도 (MIC)를 가진다. 일부 실시양태에서, 식 (I)의 화합물 1 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 미만, 또는 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 마이코박테리움 투베르쿨로시스에 대한 최소 억제 농도 (MIC)를 가진다. 일부 실시양태에서, 식 (I)의 화합물은 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 MIC를 가진다. 일부 실시양태에서, 식 (I)의 화합물은 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 MIC를 가진다. MIC 값은 박테리아에 따라 여기에 제공된 범위보다 낮거나 낮을 수 있음을 이해해야 한다.

[0150] 마이코박테리움, 예를 들어 M. 투베르쿨로시스의 치료를 위한 일부 실시양태에서, 화합물은 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 미만의 MIC를 갖는다. 마이코박테리움, 예를 들어 M. 투베르쿨로시스의 치료를 위한 일부 실시양태에서, 화합물은 적어도 1,000의 마이코박테리움 투베르쿨로시스 대 인간 신장 세포(VERO) 사멸에 대한 선택성 지수(SI)를 갖는다. 마이코박테리움, 예를 들어 M. 투베르쿨로시스의 치료를 위한 일부 실시양태에서, 화합물은 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 미만의 MIC 및 적어도 1,000의 마이코박테리움 투베르쿨로시스 대 인간 신장 세포(VERO) 사멸에 대한 선택성 지수(SI)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 화합물은 AKG-28(화학식 1b) 또는 AKG-38(화학식 1c)의 구조를 갖는다. 일부 실시양태에서, MIC는 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 미만이고 미토콘드리아 단백질 합성 억제(SI-MPS)에 대한 M. 투베르쿨로시스의 MIC에 대한 선택성 지수는 예를 들어 AKG-28에 대해 20보다 크다.

[0151] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 화합물은 M. 투베르쿨로시스에 대한 리네졸리드와 비교하여 역가 조절 용량에서 2 내지 20배 증가(약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20)를 가진다.

[0152] 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)의 치료를 위한 일부 실시양태에서, 화합물은 2 $\mu\text{g/mL}$ 미만의 MRSA 균주에 대한 MIC를 갖는다. 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)의 치료를 위한 일부 실시양태에서, 화합물은 인간 VERO 신장 세포에 대해 100 $\mu\text{g/mL}$ 초과 IC50을 갖는다. 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)의 치료를 위한 일부 실시양태에서, 화합물은 2 $\mu\text{g/mL}$ 미만의 MRSA 균주에 대한 MIC 및 인간 VERO 신장 세포에 대해 100 $\mu\text{g/mL}$ 초과 IC50을 갖는다. 일부 실시양태에서, 화합물은 AKG-38(화학식 1c), AKG-39(화학식 1e) 및 AKG-40(화학식 1d)의 구조를 갖는다.

[0153] 수용해도

[0154] 일부 실시양태에서, 화합물은 염의 형태, 예를 들어 염산염 또는 메실레이트 염의 형태이고 리포솜에 캡슐화되기 전에 물에 1 mg/ml 초과, 바람직하게는 10 mg/ml 초과(및 1 g/ml 이하)로 가용성이다. 캡슐화 전의 추가 염은 비제한적으로, 베실레이트, 바이타르트레이트, 카보네이트, 시트레이트, 에실레이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리콜레이트, 락테이트, 말레이트, 말레이트, 만델레이트, 메틸설페이트, 나프실레이트, 포스페이트, 프로피오네이트, 살리실레이트, 숙시네이트, 타르타르산염, 토실산염을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물은 리포솜에 캡슐화되기 전에 수화물 또는 용매화물 또는 공결정의 형태이다.

[0155] 일부 실시양태에서, 약물은 수용해도가 감소된 상이한 염 형태, 예를 들어 1 mg/mL 미만, 바람직하게는 0.1 mg/mL 미만(0.1 - 0.001 mg/mL)으로 리포솜의 내부에 포획된다. 일단 리포솜에 포획된 화합물의 염은 설페이트, 시트레이트, 포스페이트, 수크로소페이트, 또는 다양한 인산화 또는 황산화 폴리올 또는 다중음이온성 중합체를

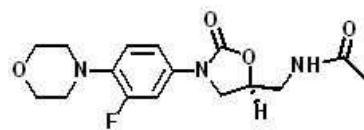
포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 폴리올은 수크로스, 에리트리톨, 만니톨, 자일리톨, 소르비톨, 이노시톨 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 다중음이온성 중합체는 폴리비닐설포네이트, 폴리비닐설페이트, 폴리포스페이트, 아크릴산과 비닐알코올 설페이트의 공중합체, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0156] 화합물의 작업 스톱을 다음과 같이 제조했다: 분말 형태의 화합물(유리 염기)의 분취량에 1 N 수용액 형태의 HCl 1-1.5 당량을 첨가하고, 혼합물을 균질시까지 와동시켰다. 생성된 케이크 또는 시럽에 물을 전형적으로 최종 10 mg/ml로 첨가하고 완전한 용해를 관찰했다. 어떤 경우에는 0.95당량의 HCl을 유리 염기 형태의 약물에 첨가하고 20mg/ml 스톱 용액을 제조했다.

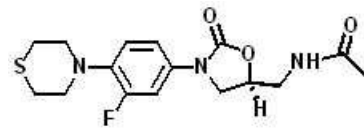
[0157] 본 개시내용의 화합물의 수용해도는 육안으로 투명한 용액을 얻는 다음의 관찰에 의해 예시된다:

화합물	양, mg	첨가된 1N HCl 의 부피, ml	첨가된 물의 부피, ml	유리 염기의 농도 %(w/w)
AKG-16 (유리 염기)	22.3	0.052	-	30.0
AKG-28 (2HCl)	32.5	-	0.35	7.3
AKG-38 (유리 염기)	31.7	0.067	0.35	7.1

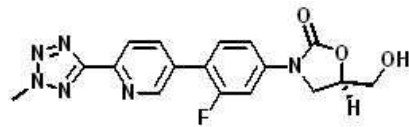
[0158] 이들 결과는 본원에 제공된 화합물이 하기의 공지된 수용해도보다 더 높은 수용해도를 가짐을 나타낸다:
 [0159] - 리네졸리드 (3 mg/ml) (www.drugbank.ca/drugs/DB00601)



[0161] ,
 [0162] - 수테졸리드 (0.237 mg/ml) (www.drugbank.ca/drugs/DB11905)



[0163] , 및
 [0164] - 테디졸리드 (0.382 mg/ml) (www.drugbank.ca/drugs/DB14569)



[0165] 일부 실시양태에서, 리포솜으로의 캡슐화 전에 본원에 기술된 화합물의 수용해도는 위의 옥사졸리디논의 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배 또는 적어도 40배이다.
 [0166]

[0167] 본원에 기술된 화합물의 우수한 수용해도 및 그의 양친매성 약염기의 특성은 약물의 전신 투여 후 감염된 조직으로의 캡슐화된 약물 전달에 유리한 높은 담체(약물/지질) 비율 및 약동학적 특성을 갖는 이들 화합물의 리포솜-캡슐화 형태를 생성하기 위한 막-구배-기반 및 리포솜내 복합화(능동 로딩) 접근법의 효율적인 사용을 가능하게 한다. 본원에 사용된 양친매성 약염기는 pKa가 7 내지 12이고 logP가 1 내지 6이다.

[0168] **리포솜 로딩 특성 및 항마이코박테리아 활성.**

[0169] 본원에 기술된 화합물의 중요한 특징은 이들 화합물의 리포솜으로의 막횡단 구배-구동 로딩을 용이하게 하는 약한 양친매성 염기 특성이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 화합물의 약염기 특성은 pKa 범위 7.0-12.0, 7.5-

11.0, 7.8-10.5 또는 8.0-10.0의 전해 해리 상수를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 화합물의 양친매성 특성은 0.5-5.0, 1.0-4.0, 1.0-3.5 또는 1.0-3.0 범위의 logP 매개변수를 특징으로 한다. 리포솜 로딩과 관련하여 이러한 유리한 특성을 갖는 특정 실시양태는 또한 그 특성이 효율적이고 안정한 리포솜 캡슐화에 덜 유리한 약물의 동일한 부류에서 유사한 화합물의 활성과 일치하거나 이를 증가하는 마이코박테리아에 대한 우수한 활성을 갖는다는 것이 예기치 않게 발견되었다.

[0170] **리포솜 조성물**

[0171] 결핵뿐만 아니라 다른 마이코박테리아 및 그람 양성 세균 감염의 치료를 위한 조성물 및 조성물의 용도가 개시되어 있다. 본원에서 제공되는 이들 조성물은 독성이 낮은 약물의 투여 가능성을 최대화하기 위해 고효율로 캡슐화된 매우 강력하고 선택적인 옥사졸리디논을 함유하고, 혈장의 존재 하에서 안정하다. 일부 실시양태에서, 조성물은 장기간 순환하며 박테리아 또는 마이코박테리아 감염 부위에서 효율적인 축적을 가능하게 하기 위해 정맥내 투여 후 순환하는 동안 캡슐화된 약물을 보유한다. 일부 실시양태에서, 장기 순환 특성 및 약물의 매우 안정적인 보유와 결합될 때 달성될 수 있는 고용량은 이러한 감염을 치료하기 위해 일반적으로 사용되는 다른 약물의 1일 또는 1일 2회 투여와 비교할 때 감소된 투여 빈도를 허용한다.

[0172] 세균 감염, 특히 마이코박테리움 투베르쿨로시스 감염을 치료하기 위한 약제학적 조성물이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 다중음이온 또는 황산염 함유 다중음이온 및 아미노알킬 옥사졸리디논 화합물을 포함하는 리포솜 조성물이다.

[0173] 본 개시내용의 다른 양태는 박테리아 감염을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 본원에 제공된 리포솜 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 세균 감염은 마이코박테리움 투베르쿨로시스 감염이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 소포 내 화합물은 약 0.01 µg/ml 내지 약 0.25 µg/ml 범위의 최소 억제 농도 (MIC)을 가진다. 일부 실시양태에서, 리포솜 소포 내 화합물은 약 0.01 µg/ml 내지 약 0.25 µg/ml 범위의 최소 억제 농도 (MIC)을 가진다.

[0175] 일부 실시양태에서, 조성물은 매질 중에 리포솜을 포함하고, 여기서 리포솜내 공간은 다중음이온 및 화학식 I의 화합물을 갖는 수성상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 매질 중에 리포솜을 포함하고, 여기서 리포솜내 공간은 다중음이온 또는 황산염 함유 다중음이온 및 화합물 AKG-16, AKG-28 또는 AKG-38을 포함한다. 일부 실시양태에서, 매질은 수성 매질이고, 여기서 그 매질의 1차 조성물은 화학식 I의 화합물 및 상응하는 포획제이다.

[0176] 화학식 I의 화합물은 수크로스 옥타설페이트(예를 들어 트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트(TEA-SOS) 구배로부터 유도됨) 또는 설페이트(예를 들어 황산암모늄 구배로부터 유도됨)와 같은 적합한 다중음이온으로 리포솜내에 포획될 수 있다. 추가적인 다중음이온 포획제는 이노시톨 헥사포스페이트, 이노시톨 헥사설페이트, 폴리비닐설포네이트, 텍스트란 설페이트, 시트레이트, 폴리포스페이트 및 수라민을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0177] 외부 수성 매질은 전형적으로 적합한 완충제 및 등장화제로 구성된다. 적합한 완충제는 히스티딘, 시트레이트, HEPES, MOPS, MES, TRIS, 포스페이트, 글리신 및 이미다졸, 보레이트, 카보네이트 및 숙시네이트를 포함할 수 있다. 등장화제는 염화나트륨, 염화칼륨, 수크로스, 글리세린, 텍스트로스 또는 만니톨과 같은 염을 포함할 수 있다.

[0178] 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 인지질, 스테롤 및 임의로 친수성 중합체에 결합된 지질(중합체-접합된 지질)로 형성된 주로 단일라멜라 소포에서 다중음이온으로 캡슐화된 화학식 I 또는 화학식 1a, 1b, 1c 또는 1d의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 단일라멜라 및 다중라멜라 소포(예를 들어, 2개 또는 3개의 층을 가짐)에서 다중음이온으로 캡슐화된 화학식 I 또는 화학식 1a, 1b, 1c 또는 1d의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 다중라멜라 소포는 단일라멜라 소포보다 순환에서 더 빨리 제거될 수 있음을 이해해야 한다. 일부 실시양태에서, 인지질은 수소화 대두 포스파티딜 콜린(HSPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC) 또는 계란 스팅고미엘린(ESM)이다. 본원에서 사용되는 용어 "인지질"은 리포솜을 형성할 수 있는 임의의 하나의 인지질 또는 인지질의 조합을 의미한다. 중성 인지질은 디아실포스파티딜콜린, 디알킬포스파티딜콜린, 스팅고미엘린 및 디아실포스파티딜에탄올아민을 포함할 수 있다. 계란, 대두 또는 기타 식물 공급원에서 얻은 것 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성된 것, 또는 가변 지질 사슬 길이 및 불포화를 포함하는 포스파티딜콜린(PC)이 본 조성물에 사용하기에 적합하다. 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC), 대두 포스파티딜콜린(대두 PC),

계란 포스파티딜콜린(계란 PC), 수소화 계란 포스파티딜콜린(HEPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC) 및 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC)을 포함하되 이에 제한되지 않는 합성, 반합성 및 천연 제품 포스파티딜콜린은 본 발명에 사용하기에 적합한 포스파티딜콜린이다. 하전된 인지질은 포스파티딜세린, 포스파티딘산, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤, 카디오리핀, 또는 N-숙시닐-포스파티딜에탄올아민, N-글루타릴-포스파티딜에탄올아민 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민과 같은 헤드그룹 변형 지질을 포함할 수 있다.

[0179] 중합체-접합된 지질은 폴리(에틸렌 글리콜)-접합된 (폐길화)인지질 (PEG-지질) 가령 PEG(분자량 2,000) 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)-1,2-디스테아로일-sn-글리세롤 (PEG(2000)-디스테아로일글리세롤, PEG-DSG), PEG(분자량 2,000) 1,2-디스테아로일-sn-글리세롤-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000] (PEG(분자량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민, PEG-DSPE), 또는 PEG(분자량 2,000) N-팔미토일-스핑고신-1-{숙시닐[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000]} (PEG-세라마이드)을 포함할 수 있다. PEG-지질 성분에서 PEG 부분의 분자량은 또한 500-10,000g/mol, 1,500-6000g/mol로 다양할 수 있지만, 바람직하게는 약 2,000MW이다. 지질 앵커에 대한 접합에 사용되는 다른 중합체는 폴리(2-메틸-2-옥사졸린)(PMOZ), 폴리(2-에틸-2-옥사졸린)(PEOZ), 폴리-N-비닐피롤리돈(PVP), 폴리글리세롤, 폴리(하이드록시에틸 L-아스파라긴)(PHEA) 및 폴리(하이드록시에틸 L-글루타민)(PHEG)을 포함할 수 있다.

[0180] 일부 실시양태에서, 스테롤은 콜레스테롤이다. 다른 예시적인 스테롤은 에르고스테롤, β -시토스테롤과 같은 파이토스테롤 및 호파노이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 인지질(들) 및 콜레스테롤의 비율은 리포솜으로부터 화학식 I의 화합물의 누출량을 충분히 감소시키면서 원하는 양의 리포솜 막 강성을 제공하도록 선택된다. 일부 실시양태에서, 리포솜이 응집하는 경향을 감소시키기 위해 임의적 중합체-접합된 지질이 첨가될 수 있다. 중합체-접합된 지질의 유형 및 양은 바람직한 수준의 단백질 결합, 리포솜 안정성 및 혈류에서의 순환 시간을 제공하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 리포솜 소포는 포스파티딜콜린(예를 들어 DSPC 또는 HSPC)과 콜레스테롤을 약 45:55 몰비로 포함한다. 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 60:40 내지 35:65, 약 50:50 내지 35:65, 약 50:50 내지 약 45:55로 변할 수 있다. 특히, 리포솜은 인지질의 농도에 대해 5mol%의 PEG-지질 농도에 상응하는 약 55:45:2.75 몰비의 HSPC, 콜레스테롤 및 중합체-접합된 지질(PEG-DSG 또는 PEG-DSPE)로 구성된 소포를 포함할 수 있다. PEG-지질의 농도는 (PEG화되지 않은) 인지질에 비해 0.5-10 mol%로 다양할 수 있으며, 바람직한 비율은 3-10 mol%이고 더욱 바람직한 비율은 4-8 mol%이다.

[0181] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 면역적격 마우스에 정맥내 주사한 후 6 또는 24시간 후에 혈액에 남아 있는 주사된 용량(ID)(또는 주사된 양)의 백분율로 측정된 연장된 혈장 반감기, 및 마우스에서 iv 투여 후 약물 대 지질 비율(DL 비율)의 변화에 의해 결정된 바와 같이, 혈장에서 24시간 동안 약물의 안정한 캡슐화와 같은 바람직한 약동학적 특성을 제공한다. 일부 실시양태에서, 혈액에 남아있는 약물의 백분율은 6시간에 주사된 용량의 20% 초과, 바람직하게는 30% 초과, 가장 바람직하게는 40% 초과이다. 24시간 후 혈액에 남아 있는 백분율은 바람직하게는 주사된 용량의 10%보다 크고, 더 바람직하게는 20%보다 크다. DL 비율은 24시간에서 원래 주사된 리포솜 약물의 20% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 80% 이상이다. 바람직한 리포솜 조성물은 또한 버스트 방출 방법을 사용하여 시험관내 인간 혈장의 존재 하에 안정한 캡슐화를 나타내고, 리포솜은 20분에 걸쳐 약물의 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 바람직하게는 80% 초과, 가장 바람직하게는 20분에 걸쳐 캡슐화된 약물의 90%초과의 약물을 보유한다.

[0182] 본 개시내용의 리포솜은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, G. Gregoriadis (editor), Liposome Technology, vol. 1-3, 1st edition, 1983; 2nd edition, 1993; 3rd edition, 2006; CRC Press, Boca Raton, Fla 참조. 본 개시내용의 리포솜 조성물을 제조하기에 적합한 방법의 예는 막 압출, 역상 증발, 초음파처리, 용매(예를 들어, 에탄올) 주입(미세유체, Y-접합 및 T-접합 혼합 포함), 미세 유동화, 세제 투석, 에테르 주입 및 탈수/재수화를 포함한다. 리포솜의 크기는 압출에 사용되는 막의 기공 크기 또는 미세유동화 또는 임의의 다른 적합한 방법에 사용되는 통과의 압력 및 횡수를 제어함으로써 제어될 수 있다. 일부 실시양태에서, 소정의 지질은 먼저 박막 수화 또는 에탄올 주입에 의해 수화되고, 이어서 50 nm, 80 nm, 100 nm 또는 200 nm 또는 이들의 조합과 같은 정의된 공극 크기의 막을 통한 압출에 의해 크기가 조정되어, 평균 크기가 70-150 nm 또는 80-130 nm 범위이고 다분산 지수가 0.1 이하인 리포솜을 생성한다. 캡슐화될 약물 화합물은 리포솜 형성 이전에 리포솜 지질에 첨가될 수 있고, 리포솜이 상기 방법에 의해 형성되는 수성 매질에 용해되어 약물이 리포솜 내에 격리된다. 일부 실시양태에서, 약물 화합물은 리포솜의 내부 공간에 혼입된 포획제를 사용하여 리포솜에 캡슐화된다 (Drummond, D.C., et al. (2006) 내: Liposome Technology, Third Edition (Ed. Gregoriadis, G.) Volume 2, p.149-168 참조).

- [0183] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 리포솜 조성물을 제조하는 방법은 다음 단계를 포함한다: (i) 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질을 포함하고 포획제가 실질적으로 없는 매질에서 포획제를 포함하는 내부 공간을 갖는 리포솜을 제조하는 단계; (ii) 리포솜을 수성 매질에서 본 개시내용의 화합물과 접촉시켜 리포솜 내 화합물의 캡슐화를 수행하는 단계; (iii) 비캡슐화 화합물을 제거하는 단계; 및 (iv) 비경구적 사용에 적합한 생리학적으로 허용가능한 매질에 리포솜을 제공하는 단계. 일부 실시양태에서, 단계 (ii)의 캡슐화 효율이 충분히 높은 경우, 일반적으로 >95%, >97% 또는 >99%, 비캡슐화 화합물을 제거하는 단계 (iii)가 생략된다.
- [0184] 일부 실시양태에서, 화합물을 함유하는 리포솜을 생성하는 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 암모늄 또는 다중음이온의 치환된 암모늄 염으로 구성된 포획제를 함유하는 리포솜을 제조하는 단계, (b) 후속적으로 리포솜 외 포획제를 제거하여 막을 가로지르는 전기화학적 구배를 형성하는 단계, (c) 화합물이 리포솜에 들어가고 상응하는 양의 암모니아 또는 치환된 암모니아가 리포솜을 떠나도록(이에 의해 생성된 리포솜 전체의 pH 구배를 소진시키거나 감소시킴) 하기에 효과적인 조건 하에서 리포솜을 화합물과 접촉시키는 단계. 리포솜 내부에 포획제를 함유하는 리포솜 조성물은 포획제의 용액에서 리포솜을 형성함으로써 제조될 수 있다. 포획제의 막형성 농도 구배는 리포솜 형성 후 또는 약물의 로딩(포획) 전에 리포솜 외의 포획제의 제거 또는 리포솜의 회석에 의해 리포솜을 가로질러 형성될 수 있다.
- [0185] 일부 실시양태에서 상기 접촉 단계는 주위 온도 초과 및 물의 끓는점 미만, 바람직하게는 30℃ 내지 90℃, 40℃ 내지 80℃, 50℃ C~80℃ C 또는 60℃ C~75℃ C의 온도에서 수성 매질에서 약물과 함께 리포솜의 배양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 배양은 50mM NaCl에 해당하는 것 미만, 또는 보다 바람직하게는 30mM NaCl에 해당하는 것 미만의 이온 강도에서 수행된다. 배양 후, 농축 염, 예를 들어 NaCl 용액을 첨가하여 이온 강도를 50mM NaCl 또는 약 100mM NaCl보다 높게 높일 수 있다. 약물 로딩 배양 단계 후 이온 강도의 증가는 리포솜의 로딩-후 응집을 감소시키는 데 도움이 되었다. 배양 시간은 몇 분에서 몇 시간까지 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서, 배양 시간은 5분 내지 40분, 10분 내지 30분, 또는 15분 내지 25분이다. 배양 후 리포솜을 식힌 다음 주변 온도에 도달하도록 한다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 2-15℃로 냉각된다. 일부 실시양태에서, 리포솜은 4-10℃로 냉각된다. 냉각 단계 후에, 농축 염, 예를 들어 NaCl 용액을 첨가하여 이온 강도를 50mM NaCl 또는 약 100mM NaCl보다 높게 높일 수 있다. 약물 로딩 배양 단계 후 이온 강도의 증가는 리포솜의 로딩-후 응집을 감소시키는 데 도움이 되었다.
- [0186] 다른 실시예에서, 로딩은 20-350mEq/L, 20-100mEq/L 또는 50-80mEq/L에서의 NaCl, KCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, K₂SO₄, 또는 (NH₄)₂SO₄와 같은 이온성 제제의 존재 하에 수행된다. 낮은 이온 강도(낮은 염 농도)라는 분야의 관례와는 반대로, 본 발명의 화합물, 특히 AKG-28을 리포솜에 로딩하는 것은 특히 더 높은 농도의 약물에서 로딩이 수행된 경우 NaCl과 같은 상대적으로 높은 이온 강화제의 존재 하에 더 효율적이라는 것이 밝혀졌다. 따라서, 리포솜 로딩 혼합물 중 10-12 mg/ml의 AKG-28에서, 0-20 mM NaCl에서의 로딩은 약 90-94%의 캡슐화 효율을 가져온 반면, 약 80-360 mM NaCl에서는 로딩 효율이 >97%였다(실시예 62). 따라서, 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 화합물의 로딩은 20-350 mEq/L, 20-100 mEq/L, 또는 50-80 mEq/L의 이온 강화제에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 이온제는 NaCl이다. 일부 실시양태에서, 첨가된 이온 강화제의 농도는 로딩-후 리포솜이 등장성(삼투압농도 280-310mOsmol/L, 또는 삼투압농도 270-310mOsmol/kg)이 되도록 선택된다. 일부 실시양태에서, 약물은 AKG-28이고, 이온강화제는 NaCl이고, 로딩은 약물의 약 12-13 mg/ml 및 NaCl 농도 50-80 mM에서 수행된다. 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상의 캡슐화 효율을 달성할 수 있다.
- [0187] 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 또한 삼투(장성) 균형제의 존재 하에 수성 매질에서 약물과 리포솜의 배양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 삼투 균형제(삼투압제로도 언급됨)는 비이온성 제제이다. 예시적인 비이온성 삼투압제는 텍스트로스(글루코스), 수크로스, 트레할로스, 락토스, 만니톨, 소르비톨 및 폴리비닐피롤리돈을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 삼투압제의 농도는 약물 로딩 전에 리포솜의 내부 공간에서 포획제 용액의 삼투 농도와 동일한 삼투 농도(삼투압 또는 삼투압으로 표현됨)를 갖는다. 포획제 용액의 삼투압 농도는 용액이 리포솜을 형성하기 위해 지질과 결합되기 전에 임의의 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 다른 실시양태에서, 삼투압제의 농도는 포획제 용액의 삼투압 농도보다 낮은 삼투압 농도를 제공하고, 약 90% 미만, 약 80% 미만, 약 70% 미만, 약 60% 미만, 포획제 용액의 삼투 농도의 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 또는 약 10% 미만인 삼투압 농도를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 약물 로딩 과정 동안 삼투압제의 농도는 200-400mmol/kg, 바람직하게는 250-350mmol/kg의 범위이다. 또 다른 실시예에서, 삼투압제는 텍스트로스와는 다른 농도는 45g/L이다. 또 다른 실시예에서, 리포솜과 약물의 배양 동안 삼투압제는 사용되지 않는다. 또 다른 실시예에서, 상기 배양은 이온 강도 조절제의 존재 하에 수행된다. 이온 강도 조절제의 비제한

적 예는 염화나트륨이며, 예를 들어 5 내지 50mM, 10 내지 20mM, 또는 약 10mM의 농도로 리포솜-약물 용액에 첨가된다. 리포솜 분야의 관례와는 달리, 본 발명의 화합물, 예를 들어 AKG-28 및 AKG-38은 약물-리포솜 접촉 단계 동안, 삼투압제의 양이 첨가된 삼투압제가 완전히 없을 때까지 포획제 용액의 삼투압 농도보다 낮은 삼투압 농도를 제공(삼투압적으로 불균형한 리포솜)할 경우에도, 본 발명의 리포솜에 안정적이고 매우 효율적인 방식으로 로딩된다.

[0188] 화합물 AKG-28 및 AKG-38의 경우, 놀랍게도 로딩은 달성 가능한 DL 비율(AKG-28, 300-350 g/mol PhL; AKG-38, 500-600 g/mol PhL)의 더 높은 말단 및 및 리포솜-약물 로딩 혼합물 내 약물의 고농도 (AKG-38의 경우 16 mg/ml 이상, AKG-28의 경우 12 mg/ml)에서도 매우 효과적인 것으로 나타났다(>95% 로딩, >97% 로딩 및 >98% 로딩)(>95% 로딩, >97% 로딩 및 >98% 로딩). 전형적으로, 일부 실시양태에서, AKG-28의 리포솜 로딩은 300-350 g/mol PhL 및 약물 농도 6 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 또는 적어도 12 mg/ml에서 수행되고; AKG-38의 리포솜 로딩은 약물의 500-650mg/ml 또는 500-600mg/ml, 약물 농도 8mg/ml 이상, 적어도 12mg/ml 또는 적어도 16mg/ml에서 수행되고 그리고 최소 95% 로딩, 최소 97% 로딩 또는 최소 98% 로딩 효율이 달성된다.

[0189] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 화합물은 pH 4.5-7과 같은 광범위한 pH에서 리포솜에 로딩된다. AKG-28의 경우 pH 5.5-7.0 범위에서 95% 이상, 즉 97% 이상의 최적 로딩효율을 달성했다(실시예 62). 로딩 pH는 pH 5.3-7.0 범위에서 선택된 약물 수용액 스톱 용액(40mg/ml)의 pH로 정의된다. 일부 실시양태에서, 40 mg/ml AKG-28 스톱 용액의 pH는 NaOH로 조정된 pH 5.7-6.9 범위이다.

[0190] 리포솜 및 다른 지질 나노입자 조성물은 저장 중에 그의 약제학적 품질에 바람직하지 않은 영향을 미치는 지질 성분의 분해에 민감하다. 지질의 분해는 리포솜 샘플을 제안된 저장 온도보다 높은 온도에서 저장하여 분해가 더 빨리 일어나고; 일반적으로 아레니우스 법칙(Arrhenius Law)을 따르는 것으로 가정되는 가속 안정성 연구 형식으로 연구될 수 있다. 예를 들어, PC 및 콜레스테롤의 지질 조성물 내 화합물 AKG-28 및 AKG-38을 함유하는 본 개시내용의 리포솜은 콜레스테롤 산화 분해 생성물(도 17) 및 포스파티딜콜린 가수분해 생성물(도 18)을 모두 축적하는 것으로 밝혀졌다. 일반적으로 불포화 탄화수소 사슬이 있는 지질에서는 산화 분해가 관찰되지만, 콜레스테롤의 산화 분해는 특이한 현상이다. 본원에 기술된 캡슐화된 화합물을 사용한 리포솜의 안정화는 킬레이트제의 혼입에 의해 달성될 수 있다. 킬레이트제는 금속 및 배위 결합을 포함하는 하나 이상의 안정한 헤테로고리 기를 형성하여 금속 이온을 결합하는 분자이다. 예시적 킬레이트제는 데페록사민(Desferal, DFO로 축약됨), 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA), 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌글리콜-0, 0'-비스(2-아미노에틸)-N, N, N', N'-테트라아세트산(EGTA), N-(2-히드록시에틸)에틸렌디아민-N, N', N'-트리아세트산(HEDTA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 콜레스테롤을 포함하고 콜레스테롤 분해에 안정성이고, 37°C에서 3개월 후 콜레스테롤 분해 정도는 총 콜레스테롤의 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 킬레이트제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 데페록사민(Desferal, DFO), 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA), 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌글리콜-0, 0'-비스(2-아미노에틸)-N, N, N', N'-테트라아세트산(EGTA), N-(2-히드록시에틸)에틸렌디아민-N, N', N'-트리아세트산(HEDTA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)(약제학적으로 허용가능한 염 포함)이다. 킬레이트제는 적어도 0.01 mM, 적어도 0.05 mM, 적어도 0.1 mM, 적어도 0.2 mM, 또는 적어도 0.5 mM, 및 최대 1 mM, 최대 2 mM, 최대 5 mM, 또는 최대 10 mM의 농도에서 조성물 내 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 킬레이트제는 데페록사민 또는 데페록사민 메실레이트이고, 킬레이트제 농도는 약 0.5 mM이다. 데페록사민은 본 개시내용의 리포솜에서 콜레스테롤 분해를 예방하는데 특히 효과적인 것으로 밝혀졌다. 본 개시내용의 캡슐화된 화합물, 특히 AKG-28 및 AKG-38을 갖는 지질의 안정성은 리포솜 외 매질의 pH에 의해 영향을 받았다. 해당 분야의 일반적인 교시는 리포솜 내 지질의 최적 안정성이 약 pH 6.5에서 달성되는 반면, 본 개시내용의 리포솜에 대해 콜레스테롤 및 PC 성분 모두에 대한 최적 지질 안정성은 pH 7.0 초과에서 달성된다는 것이 발견되었다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 pH가 적어도 7.1, 적어도 7.2, 또는 적어도 7.3이고, pH 8.0 이하, pH 7.7 이하, 또는 pH 7.6 이하이다. 일부 실시양태에서, 37°C에서 3개월 후 콜레스테롤 분해 정도는 총 콜레스테롤의 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태에서, 37°C에서 6주 후 인지질 분해 정도는 전체 인지질의 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 포스파티딜콜린이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 HSPC이고, pH는 pH 7.3-7.6이다.

[0191] 본 개시내용의 리포솜 내 지질 안정성에 예상치 못한 영향을 미친 또 다른 요인은 외부 매질 내 암모늄 또는 치환된 암모늄의 존재였다. 일부 실시양태에서, 암모늄 염은 AKG-28 또는 AKG-38과 같은 본원에 기술된 화합물을 리포솜에 로딩하는 것을 실행하는 포획제로서 사용된다. 따라서, 리포솜 내부에 들어가는 약물의 각 분자에 대

해, 1개 또는 2개의 암모니아 분자가 리포솜 내부를 떠나 리포솜 외 매질에 축적되며, 이는 이후 로딩-후 완충제 교환/ 접선 유동 여과, 투석 또는 크기 배제 크로마토그래피와 같은 비캡슐화 약물 제거 단계에서 축적된 암모늄으로부터 제거된다. 놀랍게도, 완충제 교환을 거치지 않은 로딩-후 리포솜 제제의 가속화된 저장 안정성 연구에서 인지질은 완충제-교환된 제제보다 분해에 대해 더 안정적이었다. 완충제 교환 유무에 따른 로딩-후 리포솜의 암모늄 분석은 완충제-교환된 리포솜이 실제로 리포솜 외 매질에서 상당히 낮은 수준의 암모늄을 가지고 있음을 보여주었다. 따라서, 약물 로딩 단계 동안 암모늄-약물 막힘단 교환으로 인해 발생하는 양의, 리포솜 외 매질 내 암모늄("교환된 암모늄")의 존재는 지질의 저장 관련 분해를 줄이는 데 유리하다. 우리는 놀랍게도 외부(리포솜 외) 암모늄의 1.7mEq/L와 같은 상대적으로 적은 양조차도 리포솜 지질의 현저한 안정화 효과를 갖는다는 것을 발견했다(실시예 71). (편의상, 암모늄의 염 형태가 정의되지 않은 경우 mEq/L 단위로 NH_4^+ 의 농도를 지정하기 위해 용어 "mM"을 사용한다.) 일부 실시양태에서 리포솜 조성물의 외부 매질은 0.5 mEq/L 미만의 암모늄 또는 치환된 암모늄을 갖는다. 일부 실시양태에서 리포솜 조성물은 적어도 1 mEq/L, 적어도 2 mEq/L, 적어도 5 mEq/L, 적어도 10 mEq/L, 적어도 15 mEq/L, 또는 적어도 20 mEq/L, 및 최대 200 mEq/L, 최대 150 mEq/L, 최대 100 mEq/L, 최대 80 mEq/L, 또는 최대 60 mEq/L의 농도로 암모늄 또는 치환된 암모늄을 리포솜 외 매질 내에 함유한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 적어도 10 mEq/L, 적어도 15 mEq/L, 또는 적어도 20 mEq/L, 및 최대 200 mEq/L, 최대 150 mEq/L, 최대 100 mEq/L, 최대 80 mEq/L, 또는 최대 60 mEq/L의 농도로 암모늄 또는 치환된 암모늄을 리포솜 외 매질 내에 함유하고, 인지질 분해에 대해 안정성이고, 37° C에서 6주 후 인지질 분해 정도는 총 인지질의 10% 미만, 5% 미만 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 적어도 10 mEq/L, 적어도 15 mEq/L, 또는 적어도 20 mEq/L, 및 최대 200 mEq/L, 최대 150 mEq/L, 최대 100 mEq/L, 최대 80 mEq/L, 또는 최대 60 mEq/L의 농도로 암모늄 또는 치환된 암모늄을 리포솜 외 매질 내에 함유하고, 인지질 분해에 대해 안정성이고, 37° C에서 3개월 인지질 분해 정도는 총 인지질의 7% 미만, 5% 미만 또는 4% 미만이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 포스파티딜콜린이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 HSPC이고, 암모늄 염은 암모늄 농도가 10-80 mM, 또는 15-60 mM인 염화 암모늄, 황산 암모늄, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시양태에서, 인지질은 HSPC이고, 암모늄 염은 암모늄 농도가 1-10 mM, 또는 2-5 mM인 염화 암모늄, 황산 암모늄, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물의 외부 매질 중 암모늄의 정규도는 약물 로딩 단계에서 캡슐화된 약물의 정규도의 90-110% 이내이고, 정규도는 그램 당량/L(eq/L)로 표현되는 농도이다.

[0192] 리포솜 외 매질 내 원하는 암모늄 농도는 위에서 설명된 바와 같이 암모늄(포획제의 일부로 사용됨)이 리포솜 내부로부터 빠져나가는 대신 약물 로딩 단계 동안 리포솜 외 암모늄을 축적함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 리포솜 외 암모늄의 원하는 수준은 약물 로딩 이전에 리포솜 외 암모늄을 제거한 후 리포솜에 남아 있는 리포솜 외 암모늄에 의해 달성되거나, 염화암모늄 또는 황산암모늄과 같은 암모늄 염을 리포솜 제제의 외부 매질에 첨가하여 달성된다. 후자의 경우, 비캡슐화 물질로부터 리포솜의 로딩-후 정제가 필요한 경우, 암모늄 염을 로딩-후 완충제 교환/비캡슐화 약물 제거 단계 후에 리포솜 제제에 첨가하거나 교환 완충제에 첨가할 수 있다.

[0193] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 리포솜 조성물은 리포솜 제제 내에, 친유성 자유 라디칼 제거제, 예컨대 알파-토코페롤을 추가로 포함할 수 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 약 5:3:1의 질량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 약 45:55:2.25의 몰비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE를 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 AKG-28 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 옥사졸리디논을 포함한다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 리포솜 조성물은 AKG-38 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 옥사졸리디논을 포함한다.

[0195] 사용방법

[0196] 결핵균과 같은 마이코박테리아, 또는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)과 같은 그람 양성 박테리아의 성장을 억제하는 방법이 본원에 개시되어 있다. 추가적인 마이코박테리아 및 그람 양성 박테리아는, 비제한적으로, 마이코박테리움 아비움 복합체, 마이코박테리움 레프라에, 마이코박테리움 고르도나에, 마이코박테리움 압세수스, 마이코박테리움 압세수스, 마이코박테리움 뮤코제니쿰, 스트렙토코커스, 반코마이신-내성 엔테로코커스 (VRE), 스테필로코커스 뉴모니아에, 엔테로코커스 파에시움, 스트렙토코커스 아갈락티아에, 스트렙토코커스 뉴모니아에, 스트렙토코커스 피오게네스, 비리단스 그룹 스트렙토코커스, 리스테리아 모노사이토게네스, 노카르디아, 및 코리네박테리움을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 화합물 및 조성물은 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 약물 내성 균주의 성장을 억제한다. 일부 실시양태에서, 마이코박테리아 감염을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 화합물 및 조성물은 비결핵 마이코박테리아 감염을 치료하

기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본 발명의 아미노알킬 옥사졸리디논 및/또는 약제학적으로 허용가능한 이의 염의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 본 개시내용의 아미노알킬 옥사졸리디논 화합물 및/또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 리포솜 조성물의 치료 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0197] 마이코박테리아는 결핵(TB)을 일으키는 박테리아의 속이다. 세계보건기구(WHO)에 따르면 전 세계적으로 결핵은 상위 10대 사망 원인 중 하나이며 단일 감염원으로 인한 주요 사망 원인이다. 리팜피신은 결핵을 치료하는 가장 효과적인 1차 약물이다. 그러나 리팜피신에 내성이 있는 결핵균에 감염되는 사례가 증가하고 있다. 다제내성결핵(MDR-TB)은 이소니아지드와 리팜피신에 반응하지 않는 박테리아에 의해 발생하는 결핵의 한 형태이다.

[0198] 일부 실시양태에서, 조성물은 비경구 투여용 액체 약제학적 제제이다. 일부 실시양태에서, 액체 약제학적 제제는 적합한 양의 본원에 기재된 옥사졸리디논 화합물을 함유하는 리포솜 제제이며, 여기서 옥사졸리디논 화합물은 리포솜의 내부에 캡슐화된다. 또 다른 실시양태에서, 그 화합물은 황산염, 구연산염, 수크로오스 옥타황산염, 이노시톨 헥사포스페이트와 같은 다중음이온과 함께 리포솜 내부에 염 형태로 존재한다. 일부 실시양태에서, 화합물은 포스포타디콜린, 콜레스테롤 및 폐결화된 포스포타디콜린에탄올아민을 포함하나 이에 제한되지 않는 다중 지질 부형제로 구성된 리포솜 내부에 황산염을 갖는 침전되거나 겔화된 염이다. 본 발명의 리포솜은 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상의 포획 효율을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 포획되지 않은 약물의 잔류량은 리포솜 조성물로부터 제거된다. 이는 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환, 투석, 한외여과, 집진 흐름 여과, 흡착 또는 침전과 같은 다양한 수단에 의해 달성될 수 있다. 포획되지 않은 약물 제거 단계 동안 또는 그 후에, 리포솜은 원하는 약제학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 생리 식염수, 등장 텍스트로스, 등장 수크로스, 링거 용액 또는 헵스 용액에 들어갈 수 있다. 원하는 생리학적으로 허용가능한 pH를 제공하기 위해 완충 물질을 첨가할 수 있다. 리포솜 조성물은 원하는 약물 농도로 조정될 수 있고, 예를 들어 0.2-0.22 μ m 필터를 통한 무균 여과에 의해 멸균될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물 내의 화합물 농도는 1-50 mg/ml, 3-30 mg/ml, 또는 5-25 mg/ml 범위이다.

[0199] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 리포솜 조성물을 포함하는 약제학적 제제는 통상적이고 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 이어서, 수용액은 사용을 위해 포장되거나 무균 조건 하에서 여과되고 동결건조될 수 있으며, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수용액과 조합된다. 조성물은 예를 들어 아세트산나트륨, 젯산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 등과 같은 pH 조절제 및 완충제, 등장성 조절제 등, 생리학적 조건을 근사화하는 데 필요한 약제학적으로 허용가능한 보조 물질을 함유할 수 있다. 추가로, 지질 현탁액은 저장 시 자유라디칼 및 지질 과산화 손상으로부터 지질을 보호하는 지질 보호제를 포함할 수 있다. 알파-토코페롤과 같은 친유성 자유라디칼 소광제가 적합하다.

[0200] 일부 실시양태에서, 리포솜은 등장성 또는 pH 조절을 위해 하나 이상의 추가 부형제와 혼합된다. 일부 실시양태에서, 부형제는 염화나트륨, Hepes 완충제, 인산염 완충제 및 히스티딘 완충제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0201] 조성물은 예를 들어 아세트산나트륨, 젯산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 등과 같은 pH 조절제 및 완충제, 등장성 조절제 등, 생리학적 조건을 근사화하는 데 필요한 다른 약제학적으로 허용가능한 물질을 함유할 수 있다. 추가로, 리포솜 현탁액은 저장 시 자유 라디칼 및 지질 과산화 손상으로부터 지질을 보호하는 지질 보호제를 포함할 수 있다. 알파-토코페롤과 같은 친유성 자유라디칼 소광제가 적합하다.

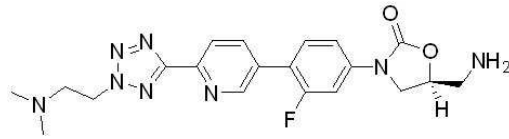
[0202] 다른 실시양태에서, 조성물은 경구 제제이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 액체 제제이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 고체 제제(예를 들어 정제, 캡슐, 알약, 당의정, 당의정 등)이다. 경구용으로 사용되는 경우, 예를 들어, 정제, 트로키제, 로젠지, 수성 또는 오일 현탁액, 분산성 분말 또는 과립, 에멀전, 경질 또는 연질 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르가 제조될 수 있다 (Remington's 약제학적 Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). 경구용 조성물은 약제학적 조성물의 제조에 대해 당업계에 공지된 임의의 방법에 따라 제조될 수 있다. 조성물은 입맛에 맞는 제제를 제공하기 위해 향산화제, 감미제, 향미제, 착색제 및 보존제를 포함하는 하나 이상의 제제를 함유할 수 있다. 정제 제조에 적합한 약제학적으로 허용 가능한 무독성 부형제 또는 보조제와 혼합된 활성 성분을 함유하는 정제가 허용된다. 적합한 부형제 또는 보조제는 비제한적으로 예를 들어 불활성 희석제, 가용화제, 현탁제, 보조제, 습윤제, 감미료, 향료 또는 향미 물질, 등장성 물질, 콜로이드 분산제 및 계면활성제를 포함한다.

[0203] 정제, 당의정, 캡슐, 알약, 과립, 좌약, 용액, 현탁액 및 에멀전, 페이스트, 연고, 젤, 크림, 로션, 분말 및 스프레이가 적합한 약제학적 조성물일 수 있다.

- [0204] 화합물 또는 조성물은 국소적으로, 경구적으로, 비경구적으로, 복강내로 및/또는 직장으로 투여될 수 있다.
- [0205] 최적의 원하는 반응(예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 투여 요법을 조정한다. 예를 들어, 하나 이상의 용량이 시간에 따라 투여될 수 있거나 용량이 치료 상황의 긴급성에 의해 지시된 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다.
- [0206] 화합물 및/또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 화합물 및/또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 리포솜의 투여량은 넓은 범위 내에서 변할 수 있고 자연적으로 각 특정 경우에 개별 조건 및 제어할 병원에 맞게 조정되어야 한다.
- [0207] 일부 실시양태에서, 박테리아 감염의 치료에 사용하기 위해, 화합물 또는 약제학적 리포솜 조성물은 필요로 하는 대상체에게 7일마다 1회(즉, 매주 1회), 14일마다 1회(즉, 2주마다 1회), 21일에 1회(즉, 3주에 1회), 28일에 1회(즉, 4주에 1회), 42일에 1회(즉, 6주에 1회) 투여된다. 일부 실시양태에서, 평균 주당 투여량은 약 1 mg 내지 약 1500 mg, 약 10 내지 약 700 mg, 약 25 내지 약 500 mg, 또는 약 70 내지 약 250 mg이다. 일부 실시양태에서, 평균 주당 투여량은 약 1 mg 내지 약 10 mg, 약 10 mg 내지 약 25 mg, 약 25 mg 내지 약 50 mg, 약 50 mg 내지 약 100 mg, 약 100 mg 내지 약 200 mg, 약 200 mg 내지 약 300 mg, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 약 400 mg 내지 약 500 mg, 약 500 mg 내지 약 600 mg, 약 600 mg 내지 약 700 mg, 약 700 mg 내지 약 800 mg, 약 800 mg 내지 약 900 mg, 약 900 mg 내지 약 1000 mg, 약 1000 mg 내지 약 1100 mg, 약 1100 mg 내지 약 1200 mg, 약 1200 mg 내지 약 1300 mg, 약 1300 mg 내지 약 1400 mg, 약 1400 mg 내지 약 1500 mg이다. 일부 실시양태에서, 화합물 또는 조성물은 최대 1개월, 최대 2개월, 최대 3개월, 최대 4개월 또는 그 이상 동안 투여된다. 특정 치료적 유효량은 치료되는 세균 감염, 투여되는 특정 화합물의 활성, 사용되는 약제학적 조성물, 대상체의 연령, 체격, 성별 등, 투여 경로, 세균 감염의 중증도, 특정 화합물과 조합하여(순차적으로 또는 동시에) 사용되는 임의적 약물/활성물질, 및 통상의 지식을 가진 의사에게 공지된 유사 요인을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 일부 실시양태에서, 화합물 또는 조성물은 결핵 또는 다른 미코박테리움 감염의 치료를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물은 단일요법으로 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 마이코박테리움 투베르쿨로시스 및 기타 그람 양성 세균 감염을 치료하기 위해 유효량의 본원에 기술된 화합물 및 유효량의 하나 이상의 추가 활성제를 동시에 및/또는 순차적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 마이코박테리움 투베르쿨로시스 및 기타 그람 양성 세균 감염을 치료하기 위해 유효량의 본원에 기술된 화합물 및 유효량의 둘 이상(2, 3, 4 등)의 추가 활성제를 동시에 및/또는 순차적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상승적 항균 효과는 조합의 개별 화합물의 예측된 순전히 부가적인 효과보다 더 큰 항균 효과를 나타낸다. 동시에 투여되는 경우, 화합물 및 활성제는 동일한 조성물 또는 별도의 조성물에 함유될 수 있다. 순차적으로 투여되는 경우, 화합물을 포함하는 조성물 및 추가 활성물질을 포함하는 조성물은 시간 간격(예를 들어, 20분, 40분, 60분 이상)으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가 활성제는 상이한 투여 경로를 사용하거나 상이한 주사에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 화합물은 정맥내로 투여될 수 있고 하나 이상의 추가 물질이 경구로 투여될 수 있다.
- [0208] 일부 실시양태에서, 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 추가 활성제와 함께 화합물의 투여는 치료 기간의 길이를 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 화합물을 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개)의 추가 활성제와 함께 투여하면 단 하나의 활성제를 사용한 치료와 비교하여 치료 기간이 3배 이상, 2배 이상, 1.5배 이상 단축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가 활성제는 항균제이다. 일부 실시양태에서, 추가 활성제는 플루오로퀴놀론, 예를 들어 목시플록사신, 가티플록사신 또는 레보플록사신, 베다퀼린 및 기타 디아릴 퀴놀린 유사체(예를 들어 TBAJ-587 및 TBAJ-876), 텔라마니드, 프레토마니드, 이소니아지드, 리팜피신, 리파펜틴, 피라진아미드, 클로파지민, 스펙티아미드, 에탐부톨, 스트렙토마이신, 카나마이신, 카프레오마이신, 아미카신, 류실-tRNA 합성효소(LeuRS) 억제제 GSK 3036656, 트립토판 합성효소 억제제 GSK839, DprE1 억제제 OPC-167832 및 마코지논(PBTZ-169), Telacebec, GSK-656, TBA-7371, 및 아목시실린 + 클라불라네이트, 이들 각각의 약제학적으로 허용가능한 염 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 그람 양성 세균 감염의 치료를 위한 추가 활성제는 반코마이신, 젠타마이신, 님포마이신, 테이코플라닌, 세프트라롤린, 세프트로비프롤, 텔라반신, 달바반신, 오리타반신, 플루오로퀴놀론(예를 들어 텔라플록사신), 테트라사이클린(예를 들어 에라바사이클린) 및 오마다사이클린, 숄폰아미드(예를 들어 숄파메톡사졸), 트리메트로프림, 레파몰린 및 이들의 조합을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 치료는 유효량의 본원에 기술된 화합물 및 유효량의 베다퀼린, 프레토마니드, 피라진아미드, 목시플록사신 또는 이들 각각의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 이들의 조합을 동시에 및/또는 순차적으로 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0209] 본원에서 개시된 약제학적 조성물에서 활성 성분의 실제의 투약량 수준은 특정 환자에 대한 원하는 치료적 반응

을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양, 환자에 대해 독성이 없는 조성, 및 투여 방식을 얻기 위해 다변할 수 있다.

- [0210] 투여의 면에서 "비경구"는 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 일반적으로 주사에 의한 투여를 의미하고, 비제한적으로, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 관절내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막밑, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0211] 본원에서 사용되는 "비경구 투여" 및 "비경구 투여"라는 어구는 일반적으로 주사 또는 주입에 의한 장관(즉, 소화관을 통한) 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 지칭하며, 제한 없이 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 캡슐내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관내, 피하, 피하, 관절내, 흡입, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 정맥 주사 및 주입은 리포솜 약물 투여에 종종(배타적이지는 않지만) 사용된다.
- [0212] 일부 실시양태에서, 액체 조성물은 정맥 주사된다. 일부 실시양태에서, 화합물 또는 약제학적 조성물은 필요로 하는 대상체에게 7일마다 1회(즉, 매주 1회), 14일마다 1회(즉, 2주마다 1회), 21일에 1회(즉, 3주에 1회), 28일에 1회(즉, 4주에 1회), 42일에 1회(즉, 6주에 1회) 투여된다. 일부 실시양태에서, 평균 주당 투여량은 약 1 mg 내지 약 1500 mg, 약 10 내지 약 700 mg, 약 25 내지 약 500 mg, 또는 약 70 내지 약 250 mg이다. 일부 실시양태에서, 평균 주당 투여량은 약 1 mg 내지 약 10 mg, 약 10 mg 내지 약 25 mg, 약 25 mg 내지 약 50 mg, 약 50 mg 내지 약 100 mg, 약 100 mg 내지 약 200 mg, 약 200 mg 내지 약 300 mg, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 약 400 mg 내지 약 500 mg, 약 500 mg 내지 약 600 mg, 약 600 mg 내지 약 700 mg, 약 700 mg 내지 약 800 mg, 약 800 mg 내지 약 900 mg, 약 900 mg 내지 약 1000 mg, 약 1000 mg 내지 약 1100 mg, 약 1100 mg 내지 약 1200 mg, 약 1200 mg 내지 약 1300 mg, 약 1300 mg 내지 약 1400 mg, 약 1400 mg 내지 약 1500 mg이다. 특정 치료적 유효량은 치료되는 세균 감염, 투여되는 특정 화합물의 활성, 사용되는 약제학적 조성물, 대상체의 연령, 체격, 성별 등, 투여 경로, 세균 감염의 중증도, 특정 화합물과 조합하여(순차적으로 또는 동시에) 사용되는 임의적 약물/활성물질, 및 업계에서 통상의 지식을 가진 의사에게 공지된 유사 요인을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다.
- [0213] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 비경구적으로 투여된다.
- [0214] 일부 실시양태에서, 방법은 하나 이상의 추가 활성제를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 활성제는 베다퀼린, 프레토마니드, 피라진아미드, 목시플록사신, 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 이의 조합을 포함한다.
- [0215] 일부 실시양태에서, 리포솜 조성물은 매주 1회 내지 6주마다 1회 투여된다.
- [0216] 일부 실시양태에서, 혈액에 남아 있는 화합물의 백분율은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여한 후 6시간에 투여된 양의 20% 초과이다. 일부 실시양태에서, 혈액에 남아 있는 화합물의 백분율은 투여량의 10% 초과이다.
- [0217] 본 개시의 측면은 다음 단계를 포함하는 리포솜 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다: (i) 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질을 포함하고 포획제가 실질적으로 없는 매질에서 포획제를 포함하는 내부 공간을 갖는 리포솜을 제조하는 단계; (ii) 리포솜을 수성 매질에서 본 개시된 화합물과 접촉시켜 리포솜 내 화합물의 캡슐화를 수행하는 단계; (iii) 비캡슐화 화합물을 제거하는 단계; 및 (iv) 비경구적 사용에 적합한 생리학적으로 허용가능한 매질에 리포솜을 제공하는 단계.
- [0218] 일부 실시양태에서, 박테리아 감염의 치료에 사용하기 위해, 화합물 또는 약제학적 경구 조성물은 1일 1회 또는 2회 투여된다. 특정 치료적 유효량은 치료되는 세균 감염, 투여되는 특정 화합물의 활성, 사용되는 약제학적 조성물, 대상체의 연령, 체격, 성별 등, 투여 경로, 세균 감염의 중증도, 특정 화합물과 조합하여(순차적으로 또는 동시에) 사용되는 임의적 약물/활성물질, 및 통상의 지식을 가진 의사에게 공지된 유사 요인을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다.
- [0219] *부가적 실시양태*
- [0220] 다음의 부가적 실시양태가 예시의 목적으로 제공된다.
- [0221] 1. 45:55:2.25의 몰비 또는 5:3:1의 질량비로 지질 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE 및 AKG-28의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 AKG-28 리포솜 조성물



[0222]

[0223]

AKG-28

[0224]

2. 실시양태 1에 있어서, 리포솜 조성물은 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하는 조성물.

[0225]

3. 실시양태 2에 있어서, 단일- 또는 올리고라멜라 소포는 100-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 조성물.

[0226]

4. 실시양태 1에 있어서, 리포솜 조성물은 0.15 미만의 다분산 지수를 가지는 조성물.

[0227]

5. 실시양태 4에 있어서, 리포솜 조성물은 0.10 미만의 다분산 지수를 가지는 조성물.

[0228]

6. 실시양태 1에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-28의 약물/지질 비율은 230-290 g/mol인 조성물.

[0229]

7. 실시양태 1에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-28의 약물/지질 비율은 290-360 g/mol인 조성물.

[0230]

8. 실시양태 1에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-28의 약물/지질 비율은 300-340 g/mol인 조성물.

[0231]

9. 실시양태 1에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-28의 약물/지질 비율은 약 250 g/mol인 조성물.

[0232]

10. 실시양태 1에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-28의 약물/지질 비율은 약 330 g/mol인 조성물.

[0233]

11. 실시양태 1에 있어서, 조성물 내 AKG-28의 전체 농도는 8-15 mg/mL인 조성물.

[0234]

12. 실시양태 1에 있어서, 조성물 내 AKG-28의 전체 농도는 9-11 mg/mL인 조성물.

[0235]

13. 실시양태 1에 있어서, 조성물 내 전체 AKG-28에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 90%인 조성물.

[0236]

14. 실시양태 1에 있어서, 조성물 내 전체 AKG-28에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 95%인 조성물.

[0237]

15. 실시양태 1에 있어서, 조성물 내 전체 AKG-28에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 97%인 조성물.

[0238]

16. 실시양태 1에 있어서, 조성물 내 전체 AKG-28에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 98%인 조성물.

[0239]

17. 실시양태 1에 있어서, 조성물은 수성 매질 내 리포솜 소포를 포함하고, 수성 매질은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 암모늄 이온을 포함하는 조성물.

[0240]

18. 실시양태 17에 있어서, 수성 매질의 삼투압 농도는 70-330 mOsmol/kg인 조성물.

[0241]

19. 실시양태 17에 있어서, 수성 매질의 삼투압 농도는 70-310 mOsmol/kg인 조성물.

[0242]

20. 실시양태 17에 있어서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 20-60 mM인 조성물.

[0243]

21. 실시양태 17에 있어서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 50-80 mM인 조성물.

[0244]

22. 실시양태 17에 있어서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 0.5 mM 미만인 조성물.

[0245]

23. 실시양태 17에 있어서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 130-150 mM 미만인 조성물.

[0246]

24. 실시양태 1에 있어서, 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 7.3-7.7의 pH에서 조성물을 완충하는 조성물.

[0247]

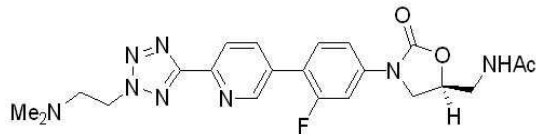
25. 실시양태 1에 있어서, 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 약 7.5의 pH에서 조성물을 완충하는 조성물.

[0248]

26. 실시양태 1에 있어서, 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 7.5의 pH에서 조성물을 완충하는

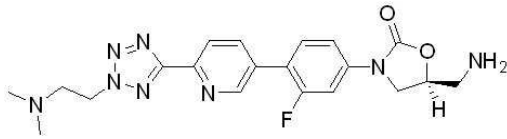
조성물.

- [0249] 27. 실시양태 1에 있어서, HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0250] 28. 실시양태 27에 있어서, 조성물은 5-50 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0251] 29. 실시양태 27에 있어서, 조성물은 약 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0252] 30. 실시양태 27에 있어서, 조성물은 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0253] 31. 실시양태 1에 있어서, 킬레이트제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0254] 32. 실시양태 1에 있어서, 0.1-1 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0255] 33. 실시양태 1에 있어서, 약 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0256] 34. 실시양태 1에 있어서, 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0257] 35. 실시양태 1에 있어서, 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하는 조성물.
- [0258] 36. 실시양태 1에 있어서, 0.1-1 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하는 조성물.
- [0259] 37. 실시양태 1에 있어서, 약 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하는 조성물.
- [0260] 38. 실시양태 1에 있어서, 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하는 조성물.
- [0261] 39. 실시양태 1에 있어서, 조성물은 저장 안정성인 조성물.
- [0262] 40. 실시양태 1-39 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 AKG-28의 황산염으로서 AKG-28을 포함하는 조성물.
- [0263] 41. 45:55:2.25의 몰비 또는 5:3:1의 질량비로 지질 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE 및 AKG-38의 약제학 적으로 허용가능한 염을 포함하는 AKG-38 리포솜 조성물



- [0264] AKG-38
- [0265] 42. 실시양태 41에 있어서, 리포솜 조성물은 90-130 nm의 z -평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하는 조성물.
- [0266] 43. 실시양태 42에 있어서, 단일- 또는 올리고라멜라 소포는 100-130 nm의 z -평균 직경을 갖는 조성물.
- [0267] 44. 실시양태 41에 있어서, 리포솜 조성물은 0.15 미만의 다분산 지수를 가지는 조성물.
- [0268] 45. 실시양태 44에 있어서, 리포솜 조성물은 0.10 미만의 다분산 지수를 가지는 조성물.
- [0270] 46. 실시양태 41에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-480 g/mol인 조성물.
- [0271] 47. 실시양태 41에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 500-650 g/mol인 조성물.
- [0272] 48. 실시양태 41에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-650 g/mol인 조성물.
- [0273] 49. 실시양태 41에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 약 450 g/mol인 조성물.
- [0274] 50. 실시양태 41에 있어서, 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 약 600 g/mol인 조성물.
- [0275] 51. 실시양태 41에 있어서, 조성물 내 AKG-38의 전체 농도는 12-25 mg/mL인 조성물.
- [0276] 52. 실시양태 41에 있어서, 조성물 내 AKG-38의 전체 농도는 13.5-16.5 mg/mL인 조성물.

- [0277] 53. 실시양태 41에 있어서, 조성물 내 AKG-38의 전체 농도는 약 15 mg/mL인 조성물.
- [0278] 54. 실시양태 41에 있어서, 조성물 내 AKG-38의 전체 농도는 약 20 mg/mL인 조성물.
- [0279] 55. 실시양태 41에 있어서, 조성물 내 전체 AKG-38에 대한 캡슐화 AKG-38의 비율은 적어도 90%인 조성물.
- [0280] 56. 실시양태 41에 있어서, 조성물 내 전체 AKG-38에 대한 캡슐화 AKG-38의 비율은 적어도 95%인 조성물.
- [0281] 57. 실시양태 41에 있어서, 조성물 내 전체 AKG-38에 대한 캡슐화 AKG-38의 비율은 적어도 97%인 조성물.
- [0282] 58. 실시양태 41에 있어서, 조성물 내 전체 AKG-38에 대한 캡슐화 AKG-38의 비율은 적어도 98%인 조성물.
- [0283] 59. 실시양태 41에 있어서, 조성물은 수성 매질 내 리포솜 소포를 포함하고, 수성 매질은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 암모늄 이온을 포함하는 조성물.
- [0284] 60. 실시양태 59에 있어서, 수성 매질의 삼투압 농도는 70-330 mOsmol/kg인 조성물.
- [0285] 61. 실시양태 59에 있어서, 수성 매질의 삼투압 농도는 70-310 mOsmol/kg인 조성물.
- [0286] 62. 실시양태 59에 있어서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 20-60 mM인 조성물.
- [0287] 63. 실시양태 59에 있어서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 50-80 mM인 조성물.
- [0288] 64. 실시양태 59에 있어서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 0.5 mM 미만인 조성물.
- [0289] 65. 실시양태 59에 있어서, 수성 매질 내 암모늄 농도는 약 0.5 mM 미만인 조성물.
- [0290] 66. 실시양태 59에 있어서, 염화나트륨의 농도는 130-150 mM인 조성물.
- [0291] 67. 실시양태 41에 있어서, 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 7.3-7.7의 pH에서 조성물을 완충하는 조성물.
- [0292] 68. 실시양태 41에 있어서, 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 약 7.5의 pH에서 조성물을 완충하는 조성물.
- [0293] 69. 실시양태 41에 있어서, 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 7.5의 pH에서 조성물을 완충하는 조성물.
- [0294] 70. 실시양태 41에 있어서, HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0295] 71. 실시양태 70에 있어서, 조성물은 5-50 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0296] 72. 실시양태 70에 있어서, 조성물은 약 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0297] 73. 실시양태 70에 있어서, 조성물은 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0298] 74. 실시양태 41에 있어서, 킬레이트제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0299] 75. 실시양태 41에 있어서, 0.1-1 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0300] 76. 실시양태 41에 있어서, 약 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0301] 77. 실시양태 41에 있어서, 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0302] 78. 실시양태 41에 있어서, 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하는 조성물.
- [0303] 79. 실시양태 41에 있어서, 0.1-1 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하는 조성물.
- [0304] 80. 실시양태 41에 있어서, 약 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하는 조성물.
- [0305] 81. 실시양태 41에 있어서, 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하는 조성물.
- [0306] 82. 실시양태 41에 있어서, 조성물은 저장 안정성인 조성물.
- [0307] 83. 실시양태 1-82 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 AKG-28의 황산염으로서 AKG-28을 포함하는 조성물.
- [0308] 84. 45:55:2.25의 몰비 또는 5:3:1의 질량비로 지질 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE 및 AKG-28의 약제학 적으로 허용가능한 염을 포함하는 AKG-28 리포솜 조성물



[0309]

[0310]

AKG-28

[0311]

여기서 리포솜 조성물은 다음 특성 중 하나 이상을 추가로 특징으로 함:

[0312]

a. 리포솜 조성물은 90-130 nm의 z -평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고; 또는 리포솜 조성물은 90-130 nm의 z -평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고; 또는 리포솜 조성물은 100-130 nm의 z -평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고;

[0313]

b. 리포솜 조성물은 0.15미만의 다분산 지수를 가지고; 또는 리포솜 조성물은 0.10 미만의 다분산 지수를 가지고;

[0314]

c. 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 230-280 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 290-360 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 300-340 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 약 250 g/mol; 또는 조성물 중 AKG-28 대 전체 인지질(PhL)의 약물/지질 비율은 약 330 g/mol;

[0315]

d. 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 8-15 mg/mL; 또는 조성물 중 AKG-28의 전체 농도는 9-11 mg/mL;

[0316]

e. 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 90%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 95%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 97%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-28 리포솜에 대한 캡슐화 AKG-28의 비율은 적어도 98%;

[0317]

f. 리포솜 조성물은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 암모늄 이온을 포함하는 수성 매질을 포함하고;

[0318]

g. 수성 매질의 삼투압 농도는 270-330 mOsmol/kg; 또는 수성 매질의 삼투압 농도는 270-310 mOsmol/kg;

[0319]

h. 수성 매질 내 암모늄 농도는 20-60 mM; 또는 수성 매질 내 암모늄 농도는 50-80 mM; 또는 수성 매질 내 암모늄 농도는 0.5 mM 미만; 또는 수성 매질 내 암모늄 농도는 0130-150mM 미만;

[0320]

i. 수성 매질은 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 7.3-7.7의 pH에서; 약 7.5의 pH에서; 또는 7.5의 pH에서 리포솜 조성물을 완충하고;

[0321]

j. 수성 매질은 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고; 또는 수성 매질은 5-50 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 포함하고; 또는 수성 매질은 약 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 포함하고; 또는 수성 매질은 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 포함하고;

[0322]

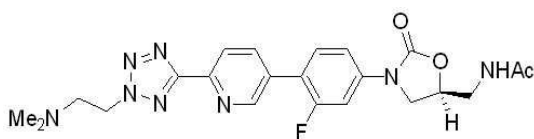
k. 조성물들을 추가로 포함하는 킬레이트제; 또는 조성물은 0.1-1 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고; 또는 조성물 약 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 0.1-1 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 약 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고; 또는 조성물은 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고;

[0323]

l. AKG-28은 AKG-28의 황산염으로 리포솜 내에 캡슐화됨.

[0324]

85. 45:55:2.25의 몰비 또는 5:3:1의 질량비로 지질 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE 및 AKG-38의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 AKG-38 리포솜 조성물



[0325]

[0326]

AKG-38

- [0327] 여기서 리포솜 조성물은 다음 특성 중 하나 이상을 추가로 특징으로 함:
- [0328] a. 리포솜 조성물은 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고;
- [0329] b. 리포솜 조성물은 100-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 단일- 또는 올리고라멜라 소포를 포함하고;
- [0330] c. 리포솜 조성물은 미만0.15의 다분산 지수를 가지고 또는
- [0331] 리포솜 조성물 은 0.10 미만의 다분산 지수를 가지고;
- [0332] d. 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-480 g/mol, 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 500-650 g/mol; 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 430-650 g/mol; 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 약 450 g/mol; 또는 리포솜 조성물 중 총 인지질(PhL)에 대한 AKG-38의 약물/지질 비율은 약 600 g/mol;
- [0333] e. 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 12-25 mg/mL; 또는
- [0334] 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 13.5-16.5 mg/mL; 또는 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 약 15 mg/mL; 또는 리포솜 조성물 중 AKG-38의 전체 농도는 약 20 mg/mL임.
- [0335] f. 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 90%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 95%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 97%; 또는 리포솜 조성물 중 전체 AKG-38에 대한 캡슐화된 AKG-38의 비율은 적어도 98%;
- [0336] g. 리포솜 조성물은 염화나트륨을 포함하고 선택적으로 암모늄 이온을 포함하는 수성 매질을 포함하고;
- [0337] h. 수성 매질의 삼투압 농도는 270-330 mOsmol/kg; 또는 수성 매질의 삼투압 농도는 270-310 mOsmol/kg;
- [0338] i. 수성 매질 내 암모늄 농도는 20-60 mM; 또는 수성 매질 내 암모늄 농도는 50-80 mM; 또는 수성 매질 내 암모늄 농도는 0.5 mM 미만; 또는 수성 매질 내 암모늄 농도는 0.5 mM 미만;
- [0339] j. 염화나트륨의 농도는 130-150 mM;
- [0340] k. 수성 매질은 완충제를 추가로 포함하고, 여기서 완충제는 7.3-7.7의 pH에서; 약 7.5의 pH에서; 또는 7.5의 pH에서 리포솜 조성물을 완충하고;
- [0341] l. 수성 매질은 HEPES 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하고; 또는 수성 매질은 5-50 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 포함하고; 또는 수성 매질은 약 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 포함하고; 또는 수성 매질은 20 mM의 농도로 HEPES 또는 인산염 완충제를 포함하고;
- [0342] m. 수성 매질은 킬레이트제를 추가로 포함하고; 또는 0.1-1 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고, 또는 약 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고, 또는 0.5 mM의 농도로 킬레이트제를 추가로 포함하고, 또는 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고, 또는 0.1-1 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고, 또는 약 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고, 또는 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA를 추가로 포함하고;
- [0343] n. 리포솜 조성물은 저장 안정성; 또는
- [0344] o. AKG-38은 AKG-38의 황산염으로 리포솜 내에 캡슐화됨.
- [0345] 86. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로 제제화된 AKG-28 리포솜 분산액.
- [0346] 87. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 2염산 일수화물로 제제화된 리포솜 분산액.
- [0347] 88. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 2염산 일수화물의 등장성 리포솜 분산액.
- [0348] 89. 실시양태 86-88 중 어느 하나에 있어서, 황산염으로서 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온을 함유하는 수성 공간을 캡슐화하는

단일라멜라 지질 이중층 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 분산액.

- [0349] 90. 실시양태 89 에 있어서 리포솜 소포는 수소화 대두 포스파티딜 콜린(HSPC), 콜레스테롤 및 (PEG(몰 중량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민, PEG-DSPE)(PEG(2000)-DSPE)로 구성된 리포솜 분산액.
- [0350] 91. 실시양태 90에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 45-65 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0351] 92. 실시양태 90에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 50-60 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0352] 93. 실시양태 90에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 약 50 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0353] 94. 실시양태 90에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 약 55 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0354] 95. 실시양태 90에 있어서, 리포솜 분산액 지질 함량 이 HSPC, 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되는 리포솜 분산액.
- [0355] 96. 실시양태 95에 있어서, 약 5:3의 중량비로 HSPC와 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0356] 97. 실시양태 95에 있어서, 약 45:55의 몰비로 HSPC와 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0357] 98. 실시양태 95에 있어서, 약 5:3:1의 중량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0358] 99. 실시양태 95에 있어서, 약 45:55:2.25의 몰비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0359] 100. 실시양태 87-99 중 어느 하나에 있어서, 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄술포산(HEPES) 완충제 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0360] 101. 실시양태 100에 있어서, 50-80 mM 농도의 염화나트륨을 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0361] 102. 실시양태 99-101 중 어느 하나에 있어서, 약물 로딩 공정 동안 20-60mM 농도로 치환된 암모늄을 더 포함하는 리포솜 분산액.
- [0362] 103. 실시양태 99-102 중 어느 하나에 있어서, 리포솜 소포는 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 리포솜 분산액.
- [0363] 104. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로 제제화된 AKG-38 리포솜 분산액.
- [0364] 105. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 염산으로 제제화된 리포솜 분산액.
- [0365] 106. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 염산의 등장성 리포솜 분산액.
- [0366] 107. 실시양태 104-106 중 어느 하나에 있어서, 황산염으로서 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온을 함유하는 수성 공간을 캡슐화하는 단일라멜라 지질 이중층 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0367] 108. 실시양태 107에 있어서 리포솜 소포는 수소화 대두 포스파티딜 콜린(HSPC), 콜레스테롤 및 (PEG(몰 중량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민, PEG-DSPE)(PEG(2000)-DSPE)로 구성된 리포솜 분산액.
- [0368] 109. 실시양태 108에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 50-65 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0369] 110. 실시양태 108에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 50-60 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0370] 111. 실시양태 108에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 합에 대해 약 50 몰%의 콜레스

테를 포함하는 리포솜 분산액.

- [0371] 112. 실시양태 108에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 함에 대해 약 55 몰%의 콜레스테를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0372] 113. 실시양태 108에 있어서, 리포솜 분산액 지질 함량이 HSPC, 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되는 리포솜 분산액.
- [0373] 114. 실시양태 113에 있어서, 약 5:3의 중량비로 HSPC와 콜레스테를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0374] 115. 실시양태 113에 있어서, 약 45:55의 몰비로 HSPC와 콜레스테를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0375] 116. 실시양태 113에 있어서, 약 5:3:1의 중량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0376] 117. 실시양태 113에 있어서, 약 45:55:2.25의 몰비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0377] 118. 실시양태 104-117 중 어느 하나에 있어서, 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄술포산(HEPES) 완충제 또는 인산염 완충제를 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0378] 119. 실시양태 118에 있어서, 50-80 mM 농도의 염화나트륨을 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0379] 120. 실시양태 118-119 중 어느 하나에 있어서, 약물 로딩 공정 동안 20-60mM 농도로 치환된 암모늄을 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0380] 121. 실시양태 118-120 중 어느 하나에 있어서, 리포솜은 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 리포솜 분산액.
- [0381] 122. 실시양태 99-102 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 90-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0382] 123. 실시양태 86-121 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 100-130 nm의 z-평균 직경을 갖는 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0383] 124. 실시양태 86-121 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 약 100 nm의 z-평균 직경을 갖는 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 분산액.
- [0384] 125. 실시양태 86-124 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 킬레이트제를 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0385] 126. 실시양태 86-124 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 데페록사민 (DFO) 및 EDTA로 구성된 그룹으로부터 선택된 킬레이트제를 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0386] 127. 실시양태 86-124 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 0.1-1 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 및 EDTA로 구성된 그룹으로부터 선택된 킬레이트제를 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0387] 128. 실시양태 86-124 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 0.5 mM의 농도로 데페록사민 (DFO) 및 EDTA로 구성된 그룹으로부터 선택된 킬레이트제를 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0388] 129. 실시양태 86-128 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 20-60 mM의 농도로 암모늄을 추가로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0389] 130. 실시양태 86-129 중 어느 하나에 있어서, 분산액은 50-80 mM의 농도로 염화나트륨을 추가로 포함하고인 리포솜 분산액.
- [0390] 131. pH가 7.0-8.0인 AKG-28 리포솜 분산액으로서, 리포솜 분산액은 다음을 포함하는 AKG-28 리포솜 분산액:
- [0391] a. 인지질과 50 몰% 이상의 콜레스테를 포함하는 단일라멜라 지질 이중층 소포; 및
- [0392] b. 황산염으로서 리포솜 소포 내에 형성된 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온.
- [0393] 132. 실시양태 131에 있어서, (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 염산으로 제제화된 리포솜 분산액.

- [0394] 133. 실시양태 132에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-폐길화 인지질의 합에 대해 45-65 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0395] 134. 실시양태 132에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-폐길화 인지질의 합에 대해 50-55 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0396] 135. 실시양태 132에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-폐길화 인지질의 합에 대해 약 50 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0397] 136. 실시양태 132에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-폐길화 인지질의 합에 대해 약 55 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0398] 137. 실시양태 132에 있어서, 리포솜 분산액은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 염산을 약물 로딩 용액 내에서 용해시키고 약물 로딩 용액을 황산암모늄 포획제를 포함하는 추출된 정제 리포솜 소포와 접촉시켜 AKG-28을 리포솜 소포에 로딩키는 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어지는 리포솜 분산액.
- [0399] 138. 실시양태 131-137 중 어느 하나에 있어서, 단일라멜라 지질 이중층 소포는 45:55의 몰비로 또는 5:3의 질량비로 HSPC 및 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0400] 139. 실시양태 138에 있어서, 단일라멜라 지질 이중층 소포는 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되는 리포솜 분산액.
- [0401] 140. 실시양태 139에 있어서, 단일라멜라 지질 이중층 소포는 45:55:2.25의 몰비로 또는 5:3:1의 질량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되는 리포솜 분산액.
- [0402] 141. 실시양태 131-140 중 어느 하나에 있어서, 7-7.7의 pH를 갖는 리포솜 분산액.
- [0403] 142. pH가 7.0-8.0인 AKG-28 리포솜 분산액으로서, 리포솜 분산액은 다음을 포함하는 AKG-28 리포솜 분산액:
- [0404] a. 인지질과 45 몰% 이상의 콜레스테롤을 포함하는 단일라멜라 지질 이중층 소포; 및
- [0405] b. 황산염으로서 리포솜 소포 내에 형성된 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온; 및
- [0406] c. 0.1-1 mM의 농도에서 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA로 구성된 그룹으로부터 선택된 킬레이트제.
- [0407] 143. pH가 7.0-8.0인 AKG-38 리포솜 분산액으로서, 리포솜 분산액은 다음을 포함하는 AKG-28 리포솜 분산액:
- [0408] a. 인지질과 40 몰% 이상의 콜레스테롤을 포함하는 단일라멜라 지질 이중층 리포솜 소포; 및
- [0409] b. 황산염으로서 리포솜 소포 내에 형성된 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온.
- [0410] 144. 인 리포솜 분산액에 있어서 실시양태 143,로 제제화된 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 염산.
- [0411] 145. 실시양태 143-144 중 어느 하나에 있어서, 리포솜 분산액은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 염산을 약물 로딩 용액 내에서 용해시키고 약물 로딩 용액을 황산암모늄 포획제를 포함하는 추출된 정제 리포솜 소포와 접촉시켜 AKG-38을 리포솜 소포에 로딩키는 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어지는 리포솜 분산액.
- [0412] 146. 실시양태 144-145 중 어느 하나에 있어서, 여기서 지질 소포는 45:55의 몰비로 또는 5:3의 질량비로 HSPC 및 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0413] 147. 실시양태 146에 있어서, 여기서 지질 소포는 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되는 리포솜 분산액.
- [0414] 148. 실시양태 147에 있어서, 지질 소포는 45:55:2.25의 몰비로 또는 5:3:1의 질량비로 HSPC, 콜레스테롤 및

PEG(2000)-DSPE로 구성되는 리포솜 분산액.

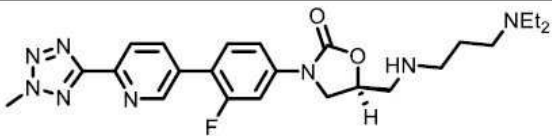
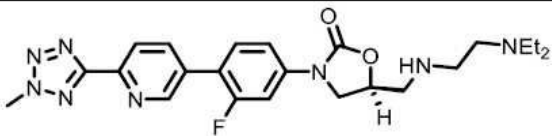
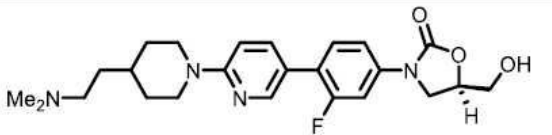
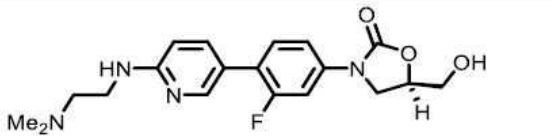
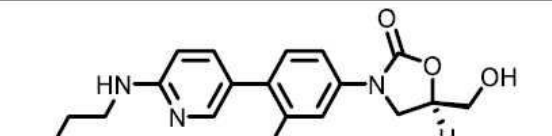
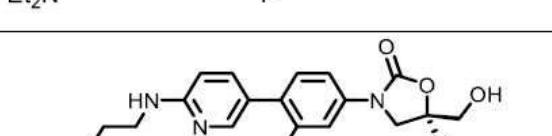
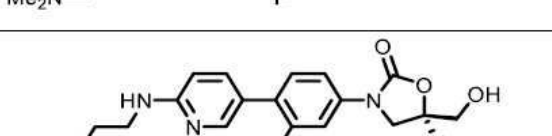
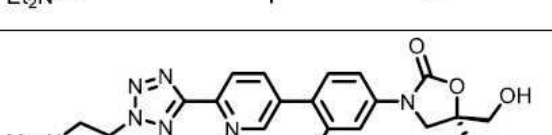
- [0415] 149. 실시양태 146-148 중 어느 하나에 있어서, 7-7.7의 pH를 갖는 리포솜 분산액.
- [0416] 150. pH가 7-8인 AKG-38 리포솜 분산액으로서, 리포솜 분산액은 다음을 포함하는 AKG-28 리포솜 분산액:
- [0417] a. 인지질과 50 몰% 이상의 콜레스테롤을 포함하는 단일라멜라 지질 이중층 소포; 및
- [0418] b. 황산염으로서 리포솜 소포 내에 형성된 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온; 및
- [0419] c. 0.1-1 mM의 농도에서 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA로 구성된 그룹으로부터 선택된 킬레이트제.
- [0420] 151. 실시양태 150에 있어서, (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 염산으로 제제화된 리포솜 분산액.
- [0421] 152. 실시양태 151에 있어서, 리포솜 분산액은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온의 염산염을 약물 로딩 용액 내에서 용해시키고 약물 로딩 용액을 황산암모늄 포획제를 포함하는 추출된 정제 리포솜과 접촉시켜 AKG-38을 리포솜 소포에 로딩시키는 단계를 포함하는 공정에 의해 얻어지는 리포솜 분산액.
- [0422] 153. 실시양태 150-152 중 어느 하나에 있어서, 여기서 단일라멜라 지질 이중층 소포는 45:55의 몰비로 또는 5:3의 질량비로 HSPC 및 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0423] 154. 실시양태 153에 있어서, 여기서 단일라멜라 지질 이중층 소포는 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되는 리포솜 분산액.
- [0424] 155. 실시양태 154에 있어서, 단일라멜라 지질 이중층 소포는 45:55:2.25의 몰비로 또는 5:3:1의 질량비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG(2000)-DSPE로 구성되는 리포솜 분산액.
- [0425] 156. 실시양태 150-155 중 어느 하나에 있어서, 7-7.7의 pH를 갖는 리포솜 분산액.
- [0426] 157. 실시양태 142-145 및 150-152 중 어느 하나에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 함에 대해 50-65 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0427] 158. 실시양태 142-145 및 150-152 중 어느 하나에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 함에 대해 50-55 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0428] 159. 실시양태 142-145 및 150-152 중 어느 하나에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 함에 대해 약 50 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0429] 160. 실시양태 142-145 및 150-152 중 어느 하나에 있어서, 리포솜 소포 내 콜레스테롤과 비-페길화 인지질의 함에 대해 약 55 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0430] 161. pH가 7-8인 옥사졸리딘은 리포솜 분산액으로서, 리포솜 분산액은 다음을 포함하는 옥사졸리딘은 리포솜 분산액:
- [0431] a. 인지질과 50 몰% 이상의 콜레스테롤을 포함하는 단일라멜라 지질 이중층 소포;
- [0432] b. 황산염으로서 리포솜 소포 내에 형성된 화학식 (I)의 옥사졸리딘은
- [0433] 식 (I)
- [0434] 여기서 R₁는 위치 2'에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 링이고;
- [0435] R₂는 아민 (NH₂) 또는 아세트아미드 (NHCOCH₃)이고;
- [0436] 및
- [0437] c. 0.1-1 mM의 농도에서 데페록사민 (DFO) 또는 EDTA로 구성된 그룹으로부터 선택된 킬레이트제.
- [0438] 162. 실시양태 161에 있어서, 인지질과 콜레스테롤을 약 5 대 3의 질량비로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0439] 163. 실시양태 161에 있어서 PEG-DSPE를 추가로 포함하는 리포솜 분산액.

- [0440] 164. 실시양태 163에 있어서, 리포솜 조성물은 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE를 약 5:3:2.25의 질량비로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0441] 165. 실시양태 164에 있어서, 리포솜 조성물은 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE 약 45:55:2.25 mol %의 몰비로 포함하는 리포솜 분산액.
- [0442] 166. 실시양태 161-165 중 어느 하나에 있어서, 인지질은 HSPC인 리포솜 분산액.
- [0443] 167. 실시양태 161-166 중 어느 하나에 있어서, 옥사졸리디논은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인 리포솜 분산액.
- [0444] 168. 실시양태 161-166 중 어느 하나에 있어서, 옥사졸리디논은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인 리포솜 분산액.
- [0445] 169. 실시양태 167-168 중 어느 하나에 있어서, 옥사졸리디논은 리포솜 분산액 내에 황산암모늄(AS) 포획제를 포함하는 리포솜 소포 내에 형성된 황산염인 리포솜 분산액.
- [0446] 170. 실시양태 161-169 중 어느 하나에 있어서, 단일라멜라 지질 이중층 소포는 리포솜 분산액 중 인지질의 총량에 대해 총 55 몰%의 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 분산액.
- [0447] 171. 실시양태 161-170 중 어느 하나에 있어서, 인지질은 리포솜 분산액 중 인지질의 총량에 대해 총 45 몰%의 콜레스테롤 내에 존재하는 리포솜 분산액.
- [0448] 172. 실시양태 161-171 중 어느 하나에 있어서, 인지질은 리포솜 분산액 중 인지질의 총량에 대해 총 45 몰%의 콜레스테롤 내에 존재하는 리포솜 분산액.
- [0449] 173. 실시양태 161-172 중 어느 하나에 있어서, 옥사졸리디논은 표 1로부터 선택된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인 리포솜 분산액:

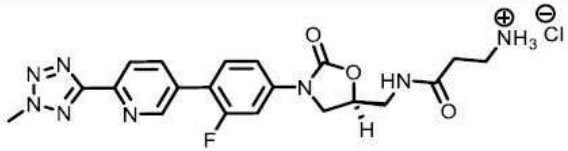
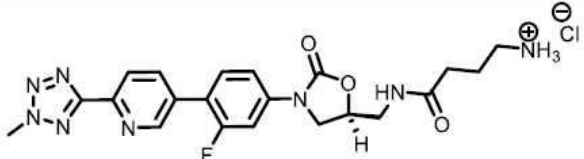
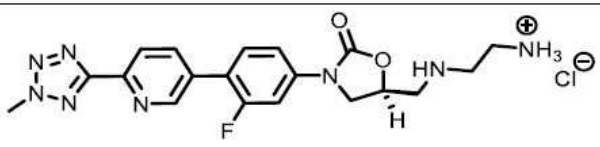
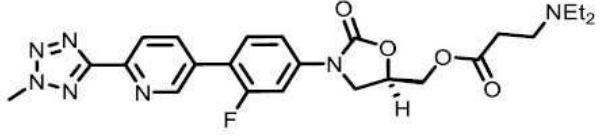
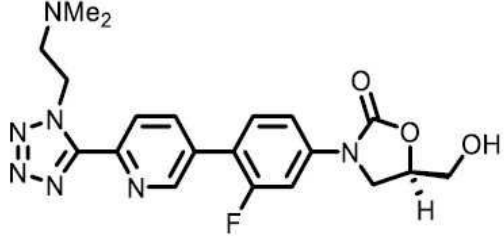
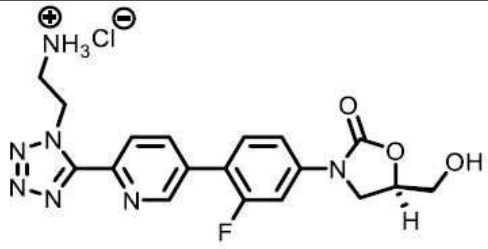
[0450] 표 1

명칭	구조
AKG-1	
AKG-2	
AKG-3	
AKG-5	
AKG-6	
AKG-7	

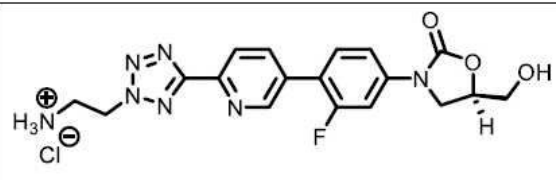
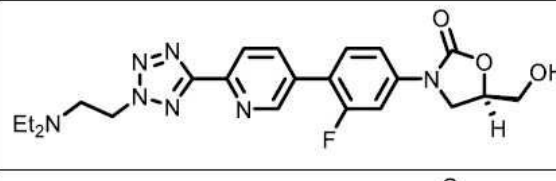
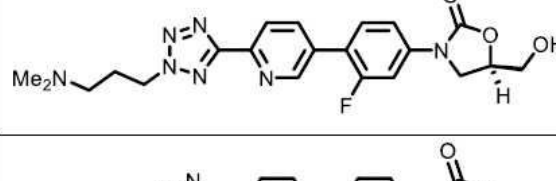
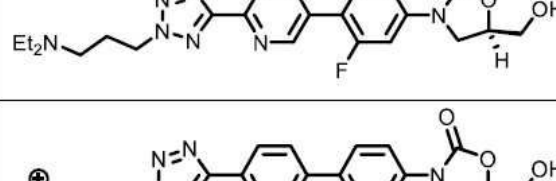
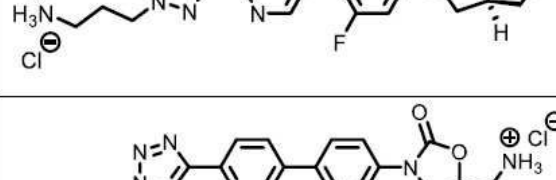
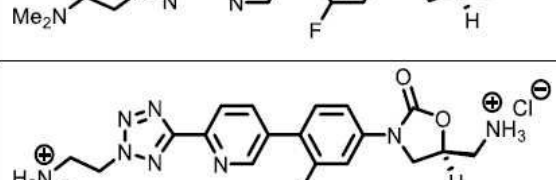
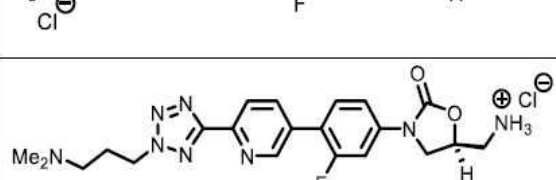
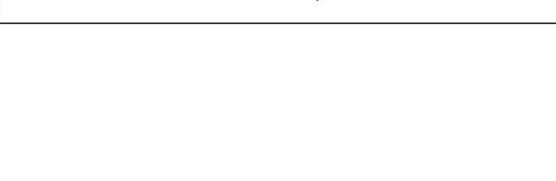
[0451]

AKG-8	
AKG-9	
AKG-11	
AKG-12	
AKG-13	
AKG-14	
AKG-15	
AKG-16	

[0452]

AKG-17	
AKG-18	
AKG-19	
AKG-20	
AKG-21	
AKG-22	

[0453]

AKG-23	
AKG-24	
AKG-25	
AKG-26	
AKG-27	
AKG-28	
AKG-29	
AKG-30	

[0454]

AKG-31	
AKG-38	
AKG-39	
AKG-40	

[0455]

[0456]

174. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 인지질, 55 mol% 콜레스테롤 및 5 mol% PEG-DSG로 형성된 지질 소포를 포함하는 리포솜 분산액.

[0457]

175. 7-8의 pH에서, (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및로 형성된 지질 소포 인지질 및 55 mol% 콜레스테롤로 형성된 지질 소포를 포함하는 리포솜 분산액.

[0458]

175. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 인지질 및 55 mol% 콜레스테롤; 및 킬레이트제로 형성된 지질 소포를 포함하는 리포솜 분산액.

[0459]

176. 실시양태 175에 있어서, 킬레이트제는 데페록사민(데스페리옥사민, Desferal), 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA), 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌글리콜-0, 0'-비스(2-아미노에틸)-N, N, N', N'-테트라아세트산(EGTA), N-(2-하이드록시에틸)에틸렌디아민-N, N', N'-트리아세트산(HEDTA) 및 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 리포솜 분산액.

[0460]

177. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 인지질, 55 mol% 콜레스테롤 및 5 mol% PEG-DSG로 형성된 지질 소포를 포함하는 리포솜 분산액.

[0461]

178. 7-8의 pH에서, (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 인지질 및 55 mol% 콜레스테롤로 형성된 지질 소포를 포함하는 리포솜 분산액.

[0462]

179. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 인지질 및 55 mol% 콜레스테롤로 형성된 지질 소포; 및 킬레이트제를 포함하는 리포솜 분산액.

[0463]

180. 실시양태 179에 있어서, 킬레이트제는 데페록사민(데스페리옥사민, Desferal), 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA), 니트릴로트리아세트산(NTA), 에틸렌글리콜-0, 0'-비스(2-아미노에틸)-N, N, N', N'-테트라아세트산(EGTA), N-(2-하이드록시에틸)에틸렌디아민-N, N', N'-트리아세트산(HEDTA) 및 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 리포솜 분산액.

[0464]

181. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트

아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 인지질, 55 mol% 콜레스테롤 및 5 mol% PEG-DSG로 형성된 지질 소포를 포함하는 리포솜 분산액.

[0465] 부가적 실시양태

[0466] 추가 실시양태

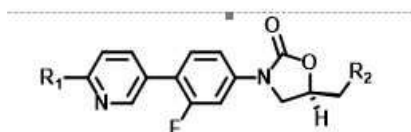
[0467] 다음의 부가적 실시양태가 예시의 목적으로 제공된다. 부가적 실시양태는 아래의 추가 실시양태에 기술된 옥사졸리딘은 리포솜 조성물, 및 거기에 언급된 특징의 다른 조합을 포함한다:

[0468] 1. 7.3-7.7의 pH를 갖고 다음을 포함하는 리포솜 약제학적 조성물:

[0469] a. DFO, EDTA 및 DTPA로 구성된 그룹으로부터 선택된 킬레이트제;

[0470] b. 인지질 및 리포솜 조성물 내 총 인지질에 대해 40 mol% 초과 콜레스테롤을 포함하는 리포솜 소포, 및

[0471] c. 리포솜 소포 내 캡슐화된 화학식 (I) 화합물의 황산염



[0472]

[0473] 식 (I)

[0474] 여기서 R₂는 아민 (NH₂) 또는 아세트아미드 (NHCOCH₃)이고, 그리고

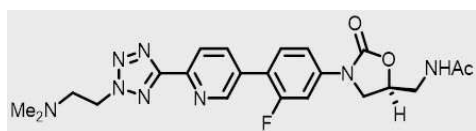
[0475] 여기서 R₁는 위치 2'에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 링임.

[0476] 2. 실시양태 1에 있어서, 아미노알킬은 디메틸아미노에틸인 리포솜 조성물.

[0477] 3. 실시양태 1에 있어서, 리포솜 소포는 식 1b의 화합물을 포함하는 리포솜 조성물:

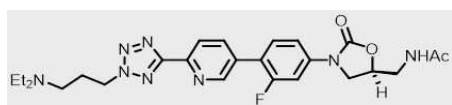
[0478] 식 1b

[0479] 4. 실시양태 1에 있어서, 리포솜 소포는 식 1c의 화합물을 포함하는 리포솜 조성물:

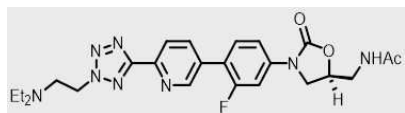


[0480] 식 1c

[0481] 5. 실시양태 1에 있어서, 리포솜 소포는 화학식 1d 또는 화학식 1e의 화합물을 포함하는 리포솜 조성물:



[0482] 식 1d



[0483] 식 1e.

[0484] 6. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 리포솜 소포는 수성 매질 내에 있는 리포솜 조성물.

[0485] 7. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 화합물은 포획제로 리포솜 소포 내에 포획되고, 그리고 여기서 포획제는 다중음이온을 포함하는 리포솜 조성물.

[0486] 8. 실시양태 7에 있어서, 포획제는 트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트 또는 황산암모늄인 리포솜 조성물.

[0487] 9. 실시양태 7에 있어서, 포획제는 트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트 인 리포솜 조성물.

[0488] 10. 실시양태 7에 있어서, 포획제는 트리에틸암모늄 수크로스 황산암모늄인 리포솜 조성물.

- [0489] 11. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 화합물의 염을 포함하고, 상기 염은 설페이트, 시트레이트, 수크로소페이트, 인산화 또는 황산화 폴리올과의 염, 또는 인산화 또는 황산화 다중음이온성 중합체와의 염인 리포좀 조성물.
- [0490] 12. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 화합물의 염을 포함하고, 상기 염은 설페이트인 화합물의 염을 포함하는 리포좀 조성물.
- [0491] 13. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 리포좀 소포 내의 화합물은 1 mg/mL 미만의 수용해도를 갖는 리포좀 조성물.
- [0492] 14. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 리포좀 소포 내의 화합물은 0.1 mg/mL 미만의 수용해도를 갖는 조성물.
- [0493] 15. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 리포좀 소포는 포스파티딜콜린 및 콜레스테롤을 포함하는 막을 포함하는 리포좀 조성물.
- [0494] 16. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 막은 리포좀 소포의 내부를 수성 매질로부터 분리하는 리포좀 조성물.
- [0495] 17. 실시양태 15에 있어서, 포스파티딜콜린은 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC) 또는 수소화 대두 포스파티딜콜린 (HSPC)인 리포좀 조성물.
- [0496] 18. 실시양태 15에 있어서, 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 60:40 내지 약 35:65인 리포좀 조성물.
- [0497] 19. 실시양태 15에 있어서, 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 55:45 내지 약 35:65인 리포좀 조성물.
- [0498] 20. 실시양태 15에 있어서, 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 50:50 내지 약 45:55인 리포좀 조성물.
- [0499] 21. 실시양태 15에 있어서, 포스파티딜콜린 대 콜레스테롤 몰비는 약 50:50 내지 약 40:60인 리포좀 조성물.
- [0500] 22. 실시양태 15 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 막은 중합체-접합된 지질을 추가로 포함하는 리포좀 조성물.
- [0501] 23. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 리포좀 소포는 약 55:45:2.75 몰비로 HSPC, 콜레스테롤 및 중합체-접합된 지질을 포함하는 리포좀 조성물.
- [0502] 24. 실시양태 22 또는 실시양태 23에 있어서, 중합체-접합된 지질은 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일글리세롤(PEG-DSG) 또는 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (PEG-DSPE)인 리포좀 조성물.
- [0503] 25. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 비경구 투여용 액체 약제학적 제제인 리포좀 조성물.
- [0504] 26. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 리포좀은 약 80 내지 약 130 nm 범위의 Z-평균 입자 크기를 가지는 리포좀 조성물.
- [0505] 27. 실시양태 1 내지 5 중 어느 하나의 리포좀 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 세균 감염의 치료 방법.
- [0506] 28. 실시양태 27에 있어서, 세균 감염이 마이코박테리움 투베르쿨로시스 감염인 방법.
- [0507] 29. 실시양태 27 또는 실시양태 28에 있어서, 리포좀 소포 내의 화합물이 약 0.01 µg/ml 내지 약 0.25 µg/ml 범위의 최소 억제 농도(MIC)를 갖는 방법.
- [0508] 30. 실시양태 27 또는 실시양태 28에 있어서, 리포좀 소포 내의 화합물이 약 0.01 µg/ml 내지 약 0.1 µg/ml 범위의 최소 억제 농도(MIC)를 갖는 방법.
- [0509] 31. 실시양태 27-30 중 어느 하나에 있어서, 리포좀 조성물을 비경구적으로 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0510] 32. 실시양태 31에 있어서, 하나 이상의 활성제를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0511] 33. 실시양태 32에 있어서, 하나 이상의 활성제가 베다퀼린, 프레토마니드, 피라진아미드, 목시플록사신, 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 이의 조합을 포함하는 방법.
- [0512] 34. 실시양태 31에 있어서, 상기 리포좀 조성물은 주 1회 내지 6주마다 1회 투여되는 방법.
- [0513] 35. 실시양태 31에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여한 후 혈액에 남아있는 화합물의 백분율이 6시간

에 투여된 양의 20%보다 큰 방법.

[0514] 36. 실시양태 31에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여한 후 혈액에 남아있는 화합물의 백분율이 6시간에 투여된 양의 10%보다 큰 방법.

[0515] 37. 하기 단계를 포함하는 리포솜 조성물의 제조 방법:

[0516] (i) 인지질, 콜레스테롤 및 PEG-지질을 포함하고 포획제가 실질적으로 없는 매질에서 포획제를 포함하는 내부 공간을 갖는 리포솜을 제조하는 단계;

[0517] (ii) 리포솜을 수성 매질에서 실시양태 1 내지 8 중 어느 하나의 화합물과 접촉시켜 리포솜 내 화합물의 캡슐화를 수행하는 단계;

[0518] (iii) 비캡슐화 화합물을 제거하는 단계; 그리고

[0519] (iv) 비경구적 사용에 적합한 생리학적으로 허용가능한 매질에 리포솜을 제공하는 단계.

[0520] 실시예

[0521] 수행된 실험 및 달성된 결과를 포함하는 하기 실시예는 예시 목적으로만 제공되며 개시 내용을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0522] 실시예 1- 옥사졸리딘은 유도체의 합성

[0523] 화합물 AKG-1, AKG-2, AKG-6, AKG-8, AKG-9 및 AKG-19는 테디졸리드 메실레이트(테디졸리드-MS)를 각각의 아민과 60°C에서 용매로서 N-메틸-2-피롤리돈(NMP) 중 반응시켜 합성했다(반응식-1). 테디졸리드-MS는 테디졸리드의 1° 하이드록실 기를 실온(RT)에서 염기의 존재 하에 메탄설폰닐 클로라이드로 메실화하여 얻었다. 테디졸리드-MS를 아지드화나트륨으로 처리한 후 생성된 아지드(AKG-3-A)를 환원시켜, 정제를 위해 선택한 용리액에 따라 유리 염기로서의 중간체-1 또는 염산염으로서의 AKG-3을 얻었다. 상응하는 산으로 중간체-1을 아미드화한 후 HCl/EtOAc를 사용하여 염산염을 형성하여 화합물 AKG-17 및 AKG-18을 생성했다. 표준 에스테르화 조건 하에서 테디졸리드를 상응하는 디알킬아미노산과 반응시켜 화합물 AKG-5 및 AKG-20을 생성했다. 수소화나트륨을 염기로 사용하여 2-클로로-N,N-디에틸아미노 에틸아민으로 테디졸리드를 O-알킬화하여 화합물 AKG-7을 얻었다.

[0524] 중간체-2는 비스(피노콜라토)디보론을 사용하여 시판되는 아릴 브로마이드의 붕소화에 의해 합성되었다(반응식-2). 쉽게 구할 수 있는 5-브로모-2-플루오로피리딘과 중간체-2의 스즈키 커플링으로 중간체-3을 생성하고, 이를 상응하는 아민과 함께 밀봉된 튜브에서 NMP에서 가열하여 화합물 AKG-11 내지 AKG-15를 얻었다.

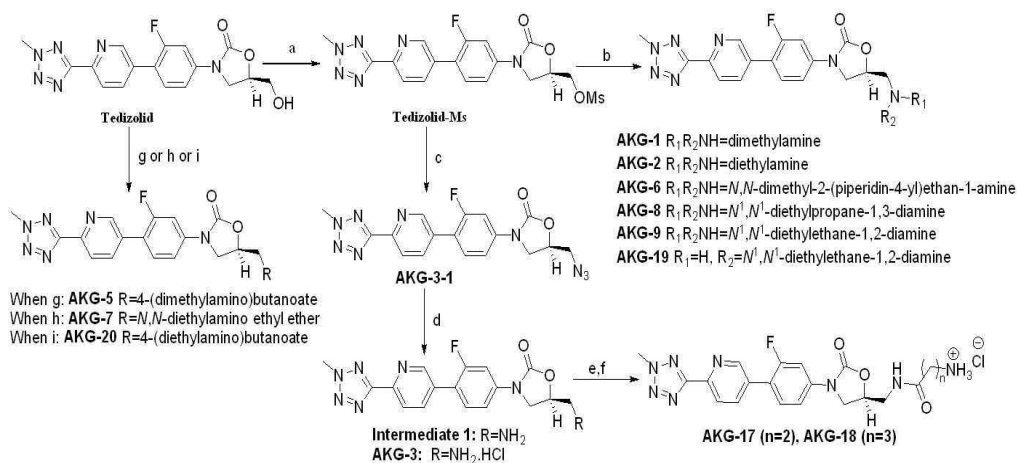
[0525] 화합물 AKG-16, AKG-21 내지 AKG-27은 중간체-4(도식 3 및 4)로부터 출발하는 수렴 합성으로 제조되었다. 5-브로모-2-시아노피리딘 상의 아지드화나트륨을 사용한 클릭 화학은 중간체-4를 제공했다. 중간체-4에서 테트라졸의 N-알킬화는 중간체 5 및 6을 3:1 비율로 생성했다. 이들 중간체의 구조는 HMBC 분석으로부터 추론되었다. 중간체 7 내지 12를 합성하고 유사한 방식으로 위치이성질체를 얻었다(원하는 이성질체만 반응식 4에 나타내었다). 중간체 5 내지 12와 중간체 2의 스즈키 커플링 및 적용 가능한 경우 아민 그룹의 탈보호는 화합물 AKG-16, AKG-21 내지 AKG-27을 생성했다.

[0526] 쉽게 입수가능한 아릴 브로마이드의 메실화에 의해 중간체-13을 합성했다. 중간체-14를 히드라진으로 환원시켜 중간체-15를 얻었다(반응식-5). 중간체-15에서 1차 아민의 Boc 보호 또는 아세틸화에 이은 붕소화로 각각 중간체-18 및 19가 생성되었다. 보로네이트 중간체와 상응하는 아릴 브로마이드 중간체의 스즈키(미국 특허 출원 공개 번호 20100022772, PCT 국제 출원 공개 번호 W02013044845, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨) 커플링 및 적용 가능한 경우 아민의 탈보호로 화합물 AKG-28 내지 AKG-31 및 AKG-38 내지 AKG-40가 생성되었다.

[0527] 합성 반응식

[0528] 중간체-19의 합성에 대해, 그 전체가 참고로서 본원에 포함된 미국특허출원공개 번호 20100022772, PCT 국제출원 번호 2013044845 참조.

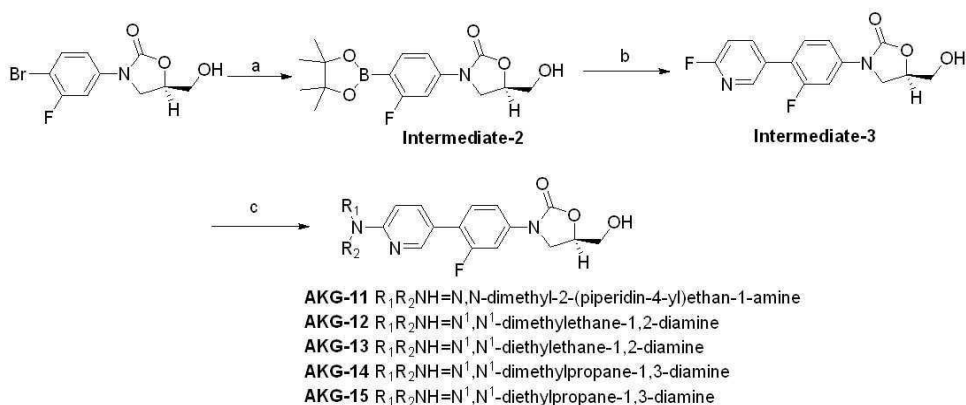
[0529] 반응식 1



Conditions: (a) CH₂Cl₂, MsCl, TEA, r.t. 2h; (b) R₁R₂NH, NMP, 60 °C 16 h; (c) NaN₃, DMF, 90 °C, 3 h; (d) Ph₃P, THF/H₂O, reflux 1 h; (e) HATU, acid, DMF; (f) HCl/EtOAc; (g) DCC, DMF, TEA, DMAP, 4-(dimethylamino)butanoic acid hydrogen chloride, r.t., 16 h; (h) NaH, DMF, 2-chloro-N,N-diethylethan-1-amine, 0 °C-r.t., 3 h; (i) DCC, DMF, DMAP, 4-(diethylamino)butanoic acid hydrogen chloride, r.t., 16 h.

[0530]

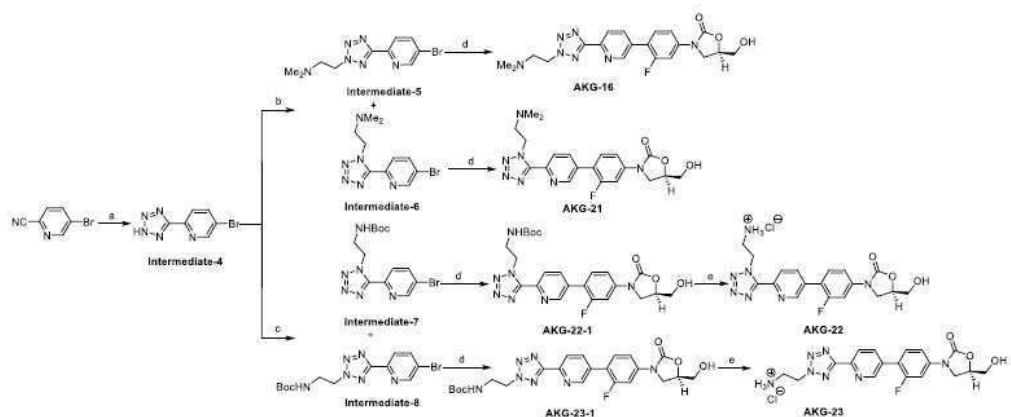
[0531] 반응식 2



Conditions: (a) Bis(pinacolato)diboron, KOAc, (Ph₃P)₂PdCl₂, dioxane, 90 °C; (b) 5-bromo-2-fluoropyridine, K₃PO₄, (dppf)PdCl₂, dioxane/H₂O, 90 °C, 16 h; (c) R₁R₂NH, DMAP, NMP, 100 °C, 16 h.

[0532]

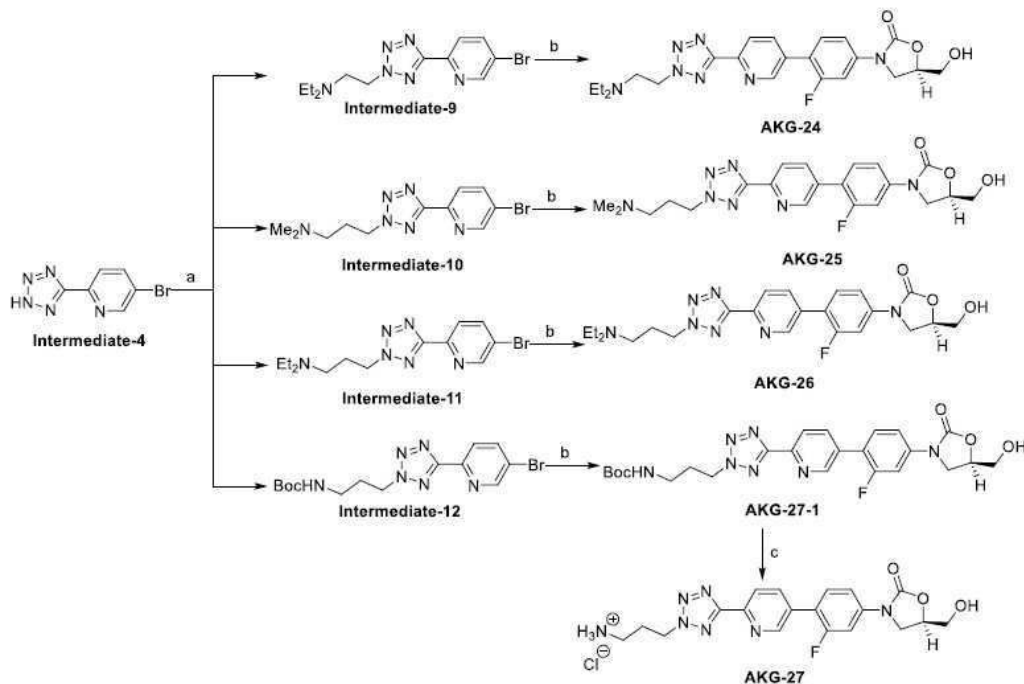
[0533] 반응식 3



Conditions: (a) NaH₂/ZnCl₂, pyridine, 120 °C, 2 h; (b) (2-Bromoethyl)dimethylamine hydrobromide, Ca(OH)₂, H₂O/DMF, 80 °C, 24 h; (c) NH₄Boc(CH₂)₂Br, Ca(OH)₂, H₂O/DMF, 80 °C, 24 h; (d) Intermediate-2, (dppf)PdCl₂, K₃PO₄, dioxane, 90 °C, 16 h; (e) HCl/Dioxane, r.t., 5 h.

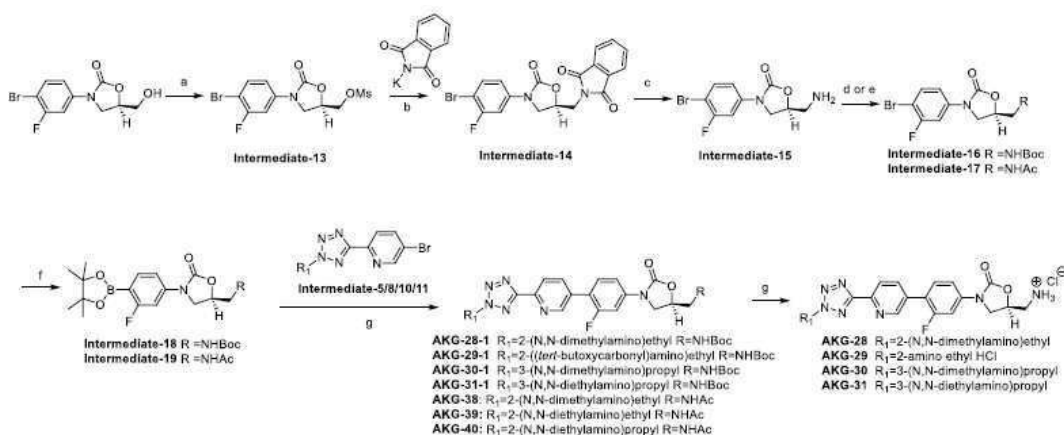
[0534]

[0535] 반응식 4



[0536] Conditions: (a) Amine, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$, 80 °C, 24 h; (b) Intermediate-2, $(\text{dppf})\text{PdCl}_2$, K_3PO_4 , dioxane, 90 °C, 16 h; (c) $\text{HCl}/\text{Dioxane}$, r.t., 5 h.

[0537] 반응식 5



[0538] Conditions: (a) MsCl , TEA, DCM, RT, 2h; (b) DMF , 80 °C, 16h; (c) NH_2NH_2 , EtOH , 80 °C; (d) Boc_2O , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , RT; (e) AcCl , TEA, DCM, RT; (f) $\text{Bis}(\text{pinacolato})\text{diboron}$, KOAc, $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, dioxane, 90 °C; (g) K_3PO_4 , $(\text{dppf})\text{PdCl}_2$, dioxane/ H_2O , 90 °C, 16 h; (h) HCl in EtOAc , DCM, RT, 2h.

[0539] 합성

[0540] 재료 & 방법

[0541] 테디졸리드, (R)-3-(4-브로모-3-플루오로페닐)-5-(히드록시메틸)옥사졸리딘-2-온을 Skychemical 에서 구입하고 디메틸-(2-피페리딘-4-일-에틸)-아민을 Enamine에서 구입하고, 다른 시약과 용매는 Adams에서 구입하여 받은 그대로 사용했다. 최종 제품의 화학 구조는 Bruker NMR 분광계(500MHz 또는 400MHz)에서 결정된 핵 자기 공명 스펙트럼(^1H NMR, ^{13}C NMR)으로 특성화되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 완전히 분리되었다. 내부 표준으로 중수소화된 용매 피크 또는 테트라메틸실란(내부)을 사용하여 화학적 이동은 백만분의 일(ppm) 단위였다. ^1H NMR에 대한 데이터는 다음과 같이 기록된다: 화학적 이동(d, ppm), 다중도(s, 단일선; br s, 넓은 단일선; d, 이중선; t, 삼중선; m, 다중선), 적분, 결합 상수(Hz). ^{13}C NMR에 대한 데이터는 화학적 이동(d, ppm)으로 기록된다.

[0542] 최종 생성물의 순도($\geq 95\%$)를 분석 HPLC로 확인했다. 분석 HPLC는 Agilent 분석 HPLC 시스템에서 Sunfire 컬럼, $3.5\text{ }\mu\text{m}$ (150cm $\times$ 4.6mm) 및 구배 시스템(물(0.01%TFA)/ACN(0.01%TFA)) 및 254 및 214 nm에서 검출 시 유

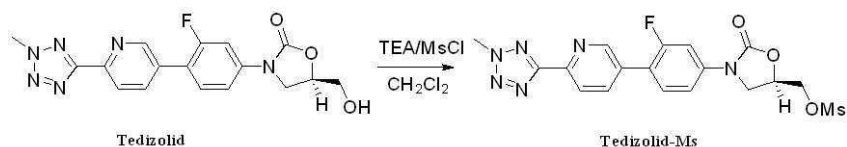
속 1 mL/min을 사용하여 수행되었다. 플래시 크로마토그래피(FC) 정제는 Santai Technologies의 Silica Gel 60(0.04-0.063 nm; 230-400 메쉬)으로 수행되었다.

[0543]

절차 A. NMP (10 mL) 내 테디졸리드-Ms (1.0 eq), R_1R_2NH (4.0 eq)의 반응 혼합물을 60 °C로 15 h 동안 밀봉 튜브 내에서 가열했다. 완료 후 (LCMS), 반응을 H_2O (40 mL)로 희석하고 EtOAc (2X50 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 포화 염수로 세척하고 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 여과했다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 FC를 사용하여 정제하여 >95% 순도로 생성물을 얻었다.

[0544]

1. 테디졸리드-Ms의 합성



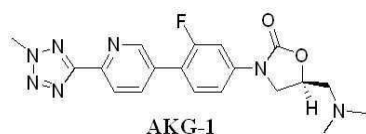
[0545]

[0546]

0 °C에서 CH_2Cl_2 (50 mL) 내 테디졸리드 (7.00 g, 18.90 mmol) 및 트리에틸아민 (3.83 g, 37.80 mmol)의 용액에 메탄설포닐 클로라이드 (3.25 g, 28.36 mmol)을 0 °C에서 Ar 하에서 한방울씩 추가했다. RT에서 2 h 동안 교반 후, 반응 혼합물을 물 내로 붓고 CH_2Cl_2 로 추출했다. 유기 층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고 여과로 수집했다. 용매를 진공에서 제거하고 순수한 생성물 테디졸리드-Ms (7.0 g, 82.6% 수율)를 황색 고체로 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.95 (s, 1H), 8.31 - 8.14 (m, 2H), 7.88 - 7.65 (m, 2H), 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.14 - 4.96 (m, 1H), 4.59 - 4.39 (m, 5H), 4.28 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 9.2, 6.3 Hz, 1H), 3.28 (s, 3H). MS (ESI+) m/z 449.1 ($[M + 1]^+$).

[0547]

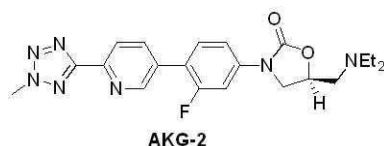
2. AKG-1, 2, 6, 8, 9 및 19의 합성



[0548]

[0549]

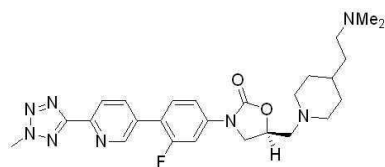
절차 A를 사용하여, AKG-1을 테디졸리드-Ms 및 디메틸아민으로부터 백색 고체로 수득했다 (0.5 g, 56.4% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.94 (s, 1H), 8.32 - 8.13 (m, 2H), 7.83 - 7.64 (m, 2H), 7.54 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.21 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 3.84 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 2.62 (s, 2H), 2.25 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 164.3, 161.0, 158.6, 154.6, 149.9, 145.5, 140.9, 137.6, 132.1, 131.4, 122.6, 119.1, 114.6, 106.0, 72.0, 62.1, 48.7, 46.4, 40.2. MS (ESI+) m/z 398.2 ($[M + 1]^+$).



[0550]

[0551]

절차 A를 사용하여, AKG-2을 테디졸리드-Ms 및 디에틸아민으로부터 백색 고체로 수득했다 (0.52 g, 54.8% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.94 (s, 1H), 8.29 - 8.11 (m, 2H), 7.81 - 7.65 (m, 2H), 7.52 (dd, J = 8.6, 1.8 Hz, 1H), 4.89 - 4.73 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.19 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 8.7, 7.0 Hz, 1H), 2.75 (dd, J = 5.1, 3.7 Hz, 2H), 2.57 (q, J = 6.9 Hz, 4H), 0.97 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 164.3, 161.0, 158.6, 154.7, 149.9, 145.5, 141.0, 137.6, 132.1, 131.3, 122.5, 119.1, 114.6, 106.1, 72.6, 56.1, 48.6, 47.7, 40.3, 12.3. MS (ESI+) m/z 426.3 ($[M + 1]^+$).

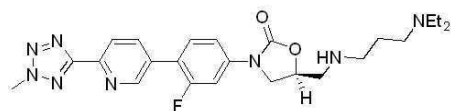


AKG-6

[0552]

[0553]

절차 A를 사용하여, AKG-6을 테디졸리드-Ms 및 N,N-디메틸-2-(피페리딘-4-일)에탄-1-아민으로부터 백색 고체로 수득했다 (0.66 g, 58.2% 수율). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.93 (s, 1H), 8.30 (dd, J = 8.1, 2.4 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 7.56 – 7.47 (m, 1H), 7.45 – 7.37 (m, 1H), 4.89 – 4.74 (m, 1H), 4.48 (s, 3H), 4.11 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 3.86 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 28.8, 10.9 Hz, 2H), 2.80 – 2.64 (m, 2H), 2.50 – 2.04 (m, 11H), 1.69 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 1.48 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 1.37 – 1.19 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 164.7, 161.3, 158.8, 154.3, 149.9, 145.4, 140.2, 137.0, 132.3, 130.5, 122.0, 120.0, 113.8, 106.4, 71.5, 61.4, 57.0, 55.3, 54.3, 48.9, 45.0, 39.7, 33.6, 32.4. MS (ESI+) m/z 509.2 ($[\text{M} + 1]^+$).



AKG-8

[0554]

[0555]

절차 A를 사용하여, AKG-8을 테디졸리드-Ms 및 N^1, N^1 -디에틸프로판-1,3-디아민으로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.62 g, 57.6% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.94 (s, 1H), 8.34 – 8.11 (m, 2H), 7.84 – 7.59 (m, 2H), 7.52 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H), 4.80 (dd, J = 8.3, 5.7 Hz, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.18 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 8.8, 6.5 Hz, 1H), 2.94 – 2.77 (m, 2H), 2.66 – 2.53 (m, 7H), 1.65 – 1.51 (m, 2H), 0.99 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.3, 161.0, 158.6, 154.6, 149.9, 145.5, 141.0, 137.6, 132.1, 131.4, 122.6, 119.1, 114.6, 106.1, 73.2, 52.1, 50.7, 48.2, 48.0, 46.7, 40.3, 26.4, 11.4. m/z 483.2 ($[\text{M} + 1]^+$).



AKG-9

[0556]

[0557]

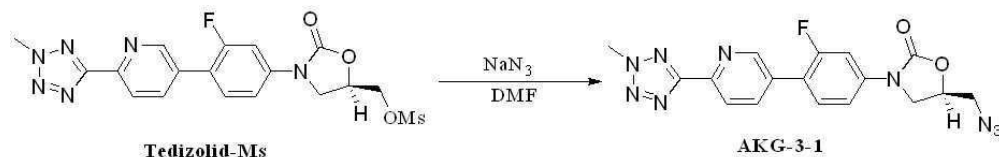
절차 A를 사용하여, AKG-9을 테디졸리드-Ms 및 N^1, N^1 -디에틸에탄-1,2-디아민으로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.36 g, 34.4% 수율). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.94 (s, 1H), 8.26 – 8.16 (m, 2H), 7.78 – 7.66 (m, 2H), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.85 – 4.73 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.18 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.90 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 2.88 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 2.65 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 0.95 (t, J = 7.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.3, 161.0, 158.6, 154.7, 149.9, 145.5, 141.0, 137.6, 132.1, 131.4, 122.6, 119.1, 114.6, 106.1, 73.3, 52.6, 52.2, 48.1, 47.6, 47.1, 40.3, 12.0. m/z 469.3 ($[\text{M} + 1]^+$).

[0558]

절차 A를 사용하여, AKG-19을 테디졸리드-Ms 및 에탄-1,2-디아민으로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.60 g, 55% 수율). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.33 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.58 (s, 3H), 8.23 (q, J = 8.3 Hz, 2H), 7.79 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.25 – 5.19 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.33 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 9.1, 6.7 Hz, 1H), 3.52 (s, 2H), 3.43 – 3.23 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.26, 160.94, 158.50, 153.79, 149.84, 145.51,

140.58, 137.78, 132.04, 131.42, 122.61, 119.50, 114.94, 106.46, 69.38, 49.59, 47.87, 45.16, 40.34, 35.58.

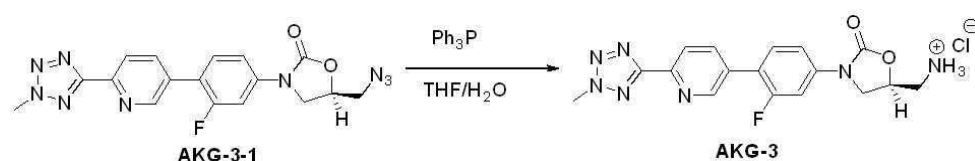
[0559] 3. AKG-3의 합성



[0560]

[0561]

DMF (20 mL) 내 테디졸리드-MS (1.00 g, 2.23 mmol)의 용액에 NaN₃ (0.44 g, 6.69 mmol)을 부가했다. 90 °C에 서 3 h 동안 교반 후, 반응 혼합물을 물 내로 붓고 EtOAc로 추출했다. 유기 층을 염수로 세척하고, 무수 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 진공에서 농축했다. 잔류물을 칼럼 크로마토그래피에 의해 추가로 정제하여 표제 화합물 AKG-3-1 (0.7 g, 79.4% 수율)를 백색 고체로서 수득했다.



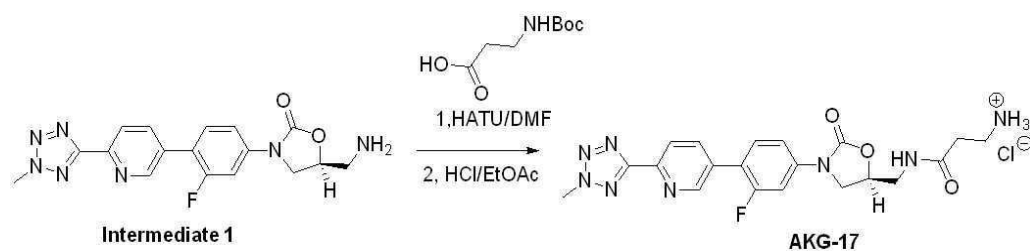
[0562]

[0563]

H₂O (2 mL) 및 THF (20 mL) 내 AKG-3-1 (0.7 g, 1.77 mmol) 및 Ph₃P (1.39 g, 5.31 mmol)의 반응 혼합물을 1 h 동안 환류 가열했다. 완료 후 (LCMS), 반응을 진공에서 농축하고 역상 FC를 사용하여 정제했다. 용리액로서 DCM 0-10% 내 MeOH를 사용하여 정제 및 동결건조하여 유리염기 중간체-1 (2.5 g, 76.5% 수율)를 황색 고체로서 얻었고, 용리액로서 H₂O/ 0-30% 내 0.006M HCl 내 MeCN으로 FC 정제하여 동결건조 후 염산염 AKG-3 (0.35 g, 48.8% 수율)를 황색 고체로서 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.95 (s, 1H), 8.61 (s, 3H), 8.28 - 8.18 (m, 2H), 7.79 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 13.5, 2.1 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 5.13 - 5.00 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.29 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.02 (dd, *J* = 9.3, 6.6 Hz, 1H), 3.34 - 3.23 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.8, 160.4, 158.0, 153.4, 149.4, 145.1, 140.2, 137.2, 131.5, 130.9, 122.1, 118.9, 114.3, 105.9, 69.8, 47.1, 41.4, 39.8. *m/z* 370.3 ([M -HCl + 1]⁺).

[0564]

4. AKG-17의 합성



[0565]

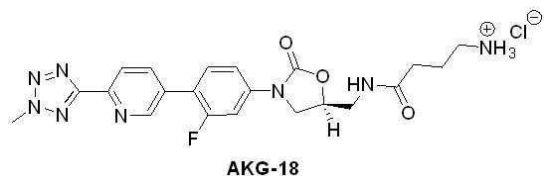
[0566]

DMF (10 mL) 내 3-((tert-부톡시카보닐)아미노)프로판산 (0.62 g, 3.25 mmol, 1.2 eq) 및 TEA (0.63 g, 6.25 mmol, 2.5 eq)의 용액에 HATU (1.44 g, 3.78 mmol, 1.4 eq)을 RT에서 Ar 하에서 부가했다. 혼합물을 0.5 h 동안 교반하고 이후 중간체 1 (1.0 g, 2.70 mmol, 1.0 eq)을 부가했다. 전체 혼합물을 RT에서 밤새 교반했다. LCMS는 반응 완료를 나타냈고, 이를 H₂O 내로 붓고 고체를 여과로 수집하고 H₂O로 세척했다. 고체를 진공에서 건조시키고 잔류물을 EtOAc 내로 용해시켜 직접 다음 단계에서 사용하고 이후 HCl/EtOAc (4 M, 20 mL)을 부가했다. 전체 혼합물을 16 h 동안 교반하고 용매를 N₂로 제거했다. 잔류물을 정제하여 역상 FC로 (H₂O/ 0-30% 내 0.006M HCl 내 MeCN로 용리) 생성물 AKG-17 (0.5 g, 39.5 % 수율)을 동결건조 후 황색 고체로서 얻었다. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.95 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.23 (q, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.14 (s, 3H), 7.77 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.87 - 4.78 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.22 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.89 (dd, *J* = 9.0, 6.5 Hz, 1H), 3.50 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.98 (dd, *J* =

12.5, 6.4 Hz, 2H), 2.58 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170.60, 164.22, 160.97, 158.53, 154.42, 149.78, 145.42, 140.89, 137.79, 132.11, 131.41, 122.61, 119.19, 114.72, 106.23, 105.95, 72.13, 47.77, 40.33, 35.58, 32.58.

[0567]

5. AKG-18의 합성



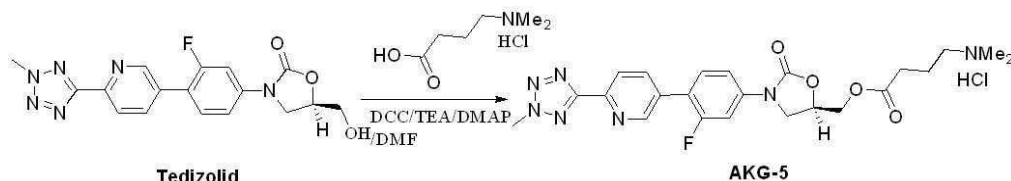
[0568]

[0569]

AKG-17의 절차를 사용하여, AKG-18을 중간체-1 및 4-((tert-부톡시카보닐)아미노)부탄산로부터 황색 고체로서 수득했다 (0.5 g, 37.6% 수율). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.52 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.29 - 8.08 (m, 5H), 7.77 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.87 - 4.76 (m, 1H), 4.50 (s, 3H), 4.22 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.93 - 3.83 (m, 1H), 3.49 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 2.83 - 2.72 (m, 2H), 2.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.88 - 1.75 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 172.59, 164.23, 160.96, 158.52, 154.44, 149.00, 145.39, 140.88, 137.78, 132.10, 131.40, 122.61, 119.17, 114.70, 106.21, 72.17, 47.78, 41.88, 40.37, 38.78, 32.44, 23.60.

[0570]

6. AKG-5의 합성



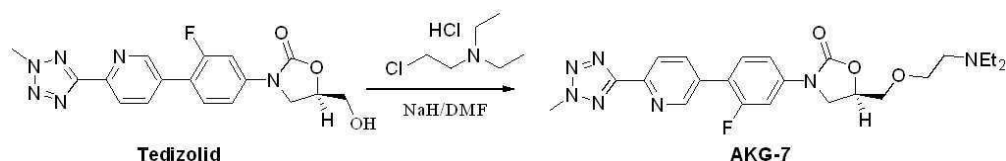
[0571]

[0572]

테디졸리드 (1.0 g, 2.70 mmol), 4-(디메틸아미노)부탄산 수소 클로라이드 (0.57 g, 3.37 mmol) 및 TEA (0.27 g, 2.70 mmol)의 혼합물에, 촉매량의 DMF (20 mL) 내 DMAP을 DCC (0.84 g, 4.05 mmol) N_2 하에서 추가했다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반했다. 반응이 완료되면(LCMS), H_2O (100mL)로 희석하고 여과했다. 여액을 0.02M HCl로 pH=5-6으로 산성화한 다음 RP-FC(0.5% 포름산/ H_2O 중 MeCN으로 용리)를 사용하여 정제하여 동결 건조 후 포름산 염으로서 생성물 AKG-5를 얻었다. 생성물을 H_2O 에 재용해시키고 1당량의 aq. HCl(0.02M)을 첨가했다. 생성물을 동결 건조시켜 HCl 염으로서 AKG-5를 얻었다(600 mg, 42.7% 수율). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.40 (br, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.23 (q, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.78 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.71 (dd, $J = 13.6, 2.1$ Hz, 1H), 7.53 (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, 1H), 5.03 (dd, $J = 5.6, 3.1$ Hz, 1H), 4.48 (s, 3H), 4.36 (qd, $J = 12.4, 4.2$ Hz, 2H), 4.26 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J = 9.2, 6.2$ Hz, 1H), 2.99 - 2.86 (m, 2H), 2.64 (s, 6H), 2.45 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.87 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 172.3, 164.3, 158.8, 154.3, 149.9, 145.6, 140.8, 137.7, 132.0, 131.5, 122.6, 119.4, 114.7, 106.2, 71.1, 64.8, 56.3, 46.7, 40.3, 30.9, 19.9. m/z 469.3 ($[\text{M} + 1]^+$). m/z 484.1 ($[\text{M} - \text{HCl} + 1]^+$).

[0573]

7. AKG-7의 합성



[0574]

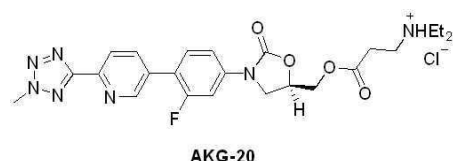
[0575]

테디졸리드 (DMF (20mL) 중 1.0g, 2.70mmol)의 혼합물에 NaH(0.13g, 60%, 5.40mmol)를 RT에서 N_2 하에 첨가했다. 혼합물을 0℃에서 0.5시간 동안 교반한 다음 2-디에틸아미노에틸클로라이드 하이드로클로라이드(930mg,

5.40mmol)를 한번에 첨가했다. 전체 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. LCMS는 반응의 완료를 표시했다. 반응물을 조심스럽게 얼음/H₂O(20mL)에 붓고 DCM(2X50 mL)으로 추출했다. 조합시킨 유기 추출물을 포화 염수로 세척한 다음 Na₂SO₄로 건조했다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 FC(DCM 0-15% 중 MeOH로 용리액)를 사용하여 정제하여 AKG-7를 백색 고체로서 얻었다 (0.5 g, 39.4% 수율). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.93 (s, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 7.53 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.48 (s, 3H), 4.34 - 4.26 (m, 1H), 4.18 - 4.08 (m, 2H), 4.00 - 3.93 (m, 1H), 3.87 (qd, *J* = 10.8, 2.9 Hz, 2H), 3.19 - 3.11 (m, 2H), 3.06 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 164.7, 161.1, 159.1, 154.3, 149.8, 145.5, 140.0, 137.0, 132.2, 130.6, 122.0, 120.1, 113.8, 106.3, 71.3, 71.3, 66.9, 51.9, 48.2, 46.6, 39.7, 8.9. *m/z* 470.3([M + 1]⁺).

[0576]

8. AKG-20의 합성



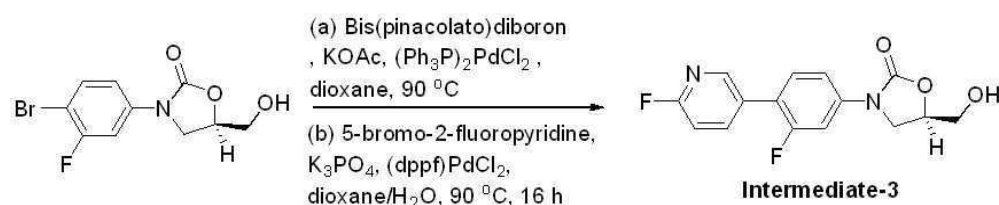
[0577]

[0578]

DMF (20 mL) 내 테디졸리드 (1.0 g, 2.70 mmol), 4-(디에틸아미노)부탄산 수소 클로라이드 (0.61 g, 3.37 mmol) 및 DMAP (0.05 g)의 반응 혼합물에 DCC (0.84 g, 4.05 mmol)을 RT에서 N₂ 하에서 부가했다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반했다. 완료 후 (LCMS), 반응을 H₂O (100 mL)로 희석하고 여과했다. 여액을 0.02M HCl로 pH=5-6으로 산성화한 다음 RP-FC(0.5% FA/H₂O 중 MeCN으로 용리)를 사용하여 정제하여 동결 건조 후 포름산 염으로서 생성물을 얻었다. 염을 이후 H₂O에 재용해시키고 및 1 eq의 HCl (0.02 M)을 부가하고, 동결건조 후 생성물 AKG-20을 HCl 염으로서 수득했다 (0.61 g, 42% 수율). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.94 (s, 1H), 8.28 - 8.14 (m, 2H), 7.82 - 7.66 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.11 - 4.97 (m, 1H), 4.49 (s, 3H), 4.43 - 4.33 (m, 2H), 4.27 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.01 - 3.91 (m, 1H), 3.08 - 2.99 (m, 2H), 2.90 - 2.69 (m, 6H), 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.00, 164.33, 158.55, 154.32, 149.90, 145.58, 140.71, 137.63, 132.02, 131.45, 122.58, 119.33, 114.69, 106.21, 71.01, 65.04, 46.86, 46.63, 40.31, 29.99, 9.95(s).

[0579]

9. 중간체-3의 합성



[0580]

[0581]

디옥산 (200 mL) 내 (R)-3-(4-브로모-3-플루오로페닐)-5-(히드록시메틸)옥사졸리딘-2-온 (9.0 g, 31.02 mmol), 비스(피나콜라토)디보론 (11.88 g, 46.54 mmol) 및 KOAc (4.56 g, 46.54 mmol)의 혼합물을 Ar로 10 min 동안 퍼징하고 이후 (Ph₃P)₂PdCl₂ (1.09 g, 1.55 mmol)을 부가했다. 다시 Ar로 혼합물을 퍼징한 후, 혼합물을 15 시간 동안 90 °C로 가열했다 LCMS는 반응의 완료를 표시했다. 실온으로 냉각하고 셀라이트로 여과하여 여액으로서 중간체-2를 얻었다. 여액에, 5-브로모-2-플루오로피리딘 (6.55 g, 37.22 mmol), K₃PO₄ (14.47 g, 6.80 mmol) 및 H₂O (20 mL)을 부가했다. 혼합물을 Ar로 10 min 동안 퍼징하고 (dppf) PdCl₂ (2.27 g, 3.10 mmol)을 부가했다. 혼합물을 Ar로 다시 퍼징했다. 그런 다음 15시간 동안 90 °C로 가열했다. 반응을 LCMS로 모니터링했다. 완료 후, 이를 진공에서 농축하고 잔류물을 H₂O (200 mL)로 희석하고 EtOAc (2X200 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 포화 염수로 세척한 다음 Na₂SO₄로 건조시켰다. 진공에서 여과 및 용매 제거로 잔류물을 생성하고 이를

FC(DCM 0-15% 중 MeOH를 사용한 용리액)를 사용하여 정제하여 황색 고체로서 생성물 중간체-3(6.8g, 2단계 동안 71.6% 수율)을 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.43 (s, 1H), 8.23 - 8.14 (m, 1H), 7.72 - 7.61 (m, 2H), 7.49 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 8.6, 2.7 Hz, 1H), 5.27 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.80 - 4.71 (m, 1H), 4.15 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 8.9, 6.1 Hz, 1H), 3.75 - 3.67 (m, 1H), 3.63 - 3.55 (m, 1H). MS (ESI+) m/z 307 ($[\text{M} + 1]^+$).

[0582]

10. AKG-11, 12, 13, 14, 15의 합성

[0583]

절차 B. NMP (10 mL) 내 중간체-3 (1.0 eq), $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$ (4.0 eq) 및 촉매량의 DMAP의 혼합물을 100°C 로 16 h 동안 밀봉 튜브 내에서 가열했다. 완료 후 (LCMS), 반응을 H_2O (50 mL)로 희석하고 EtOAc (2X50 mL)로 추출했다. 조합시킨 유기 추출물을 포화 염수로 세척한 다음 Na_2SO_4 로 건조하고 여과했다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 RPFC(0.1% $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{H}_2\text{O}$, 0-40%, C18 중 MeCN을 사용한 용리액)를 사용하여 정제하여 생성물을 얻었다.



[0584]

[0585]

절차 B를 사용하여. AKG-11을 중간체-3 및 N,N-디메틸-2-(피페리딘-4-일)에탄-1-아민으로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.40 g, 30.1% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.28 (s, 1H), 7.73 - 7.65 (m, 1H), 7.60 (dd, J = 13.6, 2.1 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.78 - 4.68 (m, 1H), 4.33 (d, J = 13.0 Hz, 2H), 4.12 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.74 - 3.64 (m, 1H), 3.62 - 3.52 (m, 1H), 2.87 - 2.71 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.11 (s, 6H), 1.72 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 1.64 - 1.49 (m, 1H), 1.34 (dd, J = 14.3, 7.0 Hz, 2H), 1.18 - 1.04 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.68, 158.33, 154.81, 147.54, 139.15, 137.82, 130.32, 120.72, 119.11, 114.35, 106.97, 106.03, 105.74, 73.82, 62.09, 56.98, 46.45, 45.73, 45.39, 34.29, 34.15, 31.94. MS (ESI+) m/z 443.1 ($[\text{M} + 1]^+$).



[0586]

[0587]

절차 B.를 사용하여 AKG-12을 중간체-3 및 N^1, N^1 -디메틸에탄-1,2-디아민으로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.52 g, 42.6% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.16 (s, 1H), 7.64 - 7.46 (m, 3H), 7.39 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 9.9, 5.6 Hz, 2H), 5.25 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.80 - 4.66 (m, 1H), 4.11 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.86 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.76 - 3.65 (m, 1H), 3.61 - 3.49 (m, 1H), 3.37 (dd, J = 12.3, 6.5 Hz, 2H), 2.42 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.18 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.60, 158.48, 158.19, 154.82, 147.57, 138.92, 137.10, 130.22, 121.18, 118.53, 114.30, 108.37, 106.02, 105.74, 73.81, 62.10, 58.76, 46.45, 45.76, 39.21. MS (ESI+) m/z 375.1 ($[\text{M} + 1]^+$).

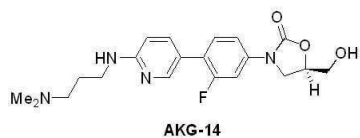


[0588]

[0589]

절차 B를 사용하여. AKG-13을 중간체-3 및 N^1, N^1 -디에틸에탄-1,2-디아민으로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.68

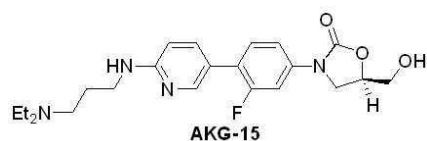
g, 51.9% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.17 (s, 1H), 7.67 – 7.46 (m, 3H), 7.39 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.63 – 6.44 (m, 2H), 5.25 (s, 1H), 4.74 (dd, J = 9.2, 5.8 Hz, 1H), 4.12 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.76 – 3.65 (m, 1H), 3.63 – 3.52 (m, 1H), 3.34 (dd, J = 13.2, 6.2 Hz, 2H), 2.60 – 2.55 (m, 2H), 2.54 – 2.50 (m, 4H), 0.97 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.60, 158.53, 158.18, 154.81, 147.62, 138.91, 137.13, 130.20, 121.16, 118.54, 114.29, 108.24, 105.87, 73.80, 62.10, 52.19, 47.13, 46.45, 39.48, 12.31. MS (ESI+) m/z 417.1 ($[\text{M} + 1]^+$).



[0590]

[0591]

절차 B를 사용하여, AKG-14을 중간체-3 및 N^1, N^1 -디메틸프로판-1,3-디아민으로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.6 g, 47.3% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.16 (s, 1H), 7.63 – 7.54 (m, 2H), 7.50 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.73 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.78 – 4.68 (m, 1H), 4.11 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.75 – 3.66 (m, 1H), 3.64 – 3.53 (m, 1H), 3.33 – 3.23 (m, 2H), 2.28 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H), 1.72 – 1.62 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.60, 158.62, 158.18, 154.81, 147.62, 138.89, 137.08, 130.19, 121.21, 118.39, 114.29, 108.10, 106.02, 105.74, 73.81, 62.10, 57.44, 46.45, 45.72, 39.58, 27.54. MS (ESI+) m/z 389.1 ($[\text{M} + 1]^+$).



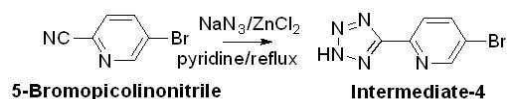
[0592]

[0593]

절차 B를 사용하여, AKG-15을 중간체-3 및 N^1, N^1 -디에틸프로판-1,3-디아민으로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.65 g, 48.0% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.16 (s, 1H), 7.63 – 7.54 (m, 2H), 7.50 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.75 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.79 – 4.68 (m, 1H), 4.12 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.75 – 3.66 (m, 1H), 3.63 – 3.54 (m, 1H), 3.32 – 3.23 (m, 2H), 2.49 – 2.40 (m, 6H), 1.70 – 1.61 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.60, 158.65, 158.18, 154.81, 147.64, 138.89, 137.05, 130.18, 121.21, 118.37, 114.29, 108.01, 106.02, 105.74, 73.80, 62.09, 50.81, 46.80, 46.45, 40.11, 27.10, 12.23. MS (ESI+) m/z 417.1 ($[\text{M} + 1]^+$).

[0594]

11. AKG-16의 합성

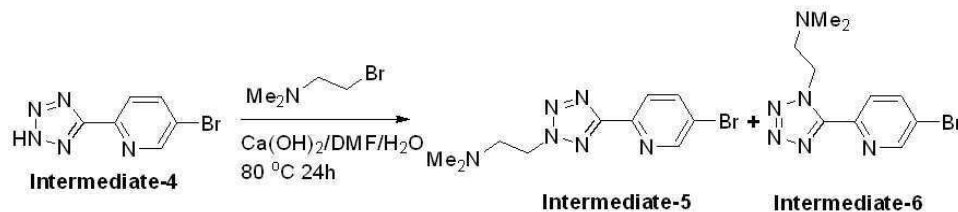


[0595]

[0596]

ZnCl_2 (11.2g, 81.9mmol)를 피리딘(40mL)에 조금씩 첨가한 다음 NaN_3 (8.90g, 137mmol) 및 5-브로모-2-시아노피리딘(10.0g, 54.6mmol)을 실온에서 첨가하고 반응 혼합물을 가열하여 120℃에서 2시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후, 이를 물(200mL)로 희석하고, 실온에서 1시간 동안 교반하고, 여과하고, 물(200mL)로 세척했다. 여과된 고체를 수집하고 실온에서 2시간 동안 HCl (200mL, 6M)에 현탁시켰다. 생성물을 여과로 수집하고 H_2O 로 세척했다. 이를 진공에서 건조시키고 중간체-4 (10.0 g, 81.3% 수율)를 백색 고체로서 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.96 (s, 1H), 8.36 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.4 Hz, 1H). MS

(ESI+) m/z 225.9 227.9 ($[M + 1]^+$).



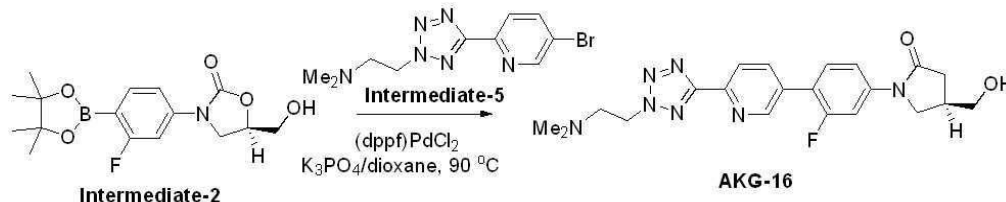
[0597]

[0598]

H₂O (150 mL) 및 DMF (20 mL) 내 중간체-4 (10.0 g, 44.25 mmol) 및 Ca(OH)₂ (7.20 g, 97.35 mmol)의 혼합물을 실온에서 0.5시간 동안 교반하고 이어서 (2-브로모에틸)디메틸아민 하이드로브로마이드(25.0g, 107.3mmol)를 첨가했다. 혼합물을 80 °C에서 24시간 동안 가열했다. LCMS는 각각 중간체 5 및 6의 3:1 혼합물을 나타내었다. 혼합물을 H₂O (40 mL)로 희석하고 EtOAc (2X50 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 포화 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 여과했다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 FC(DCM 0-15% 중 MeOH를 사용한 용리액)를 사용하여 정제하여 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 RPFC(0.1% NH₄HCO₃/H₂O 0-30% 중 MeCN, C18, 중간체-5가 먼저 용출된 후 중간체-6이 뒤따름)에 의해 추가로 정제하여 중간체-5(0.74g, 5.6% 수율)를 백색 고체로서 및 중간체-6(담황색 고체로서 0.25g)를 얻었다.

[0599]

중간체-5: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.89 (dd, *J* = 2.3, 0.6 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 8.4, 0.6 Hz, 1H), 4.87 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.87 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.17 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.74, 151.48, 145.51, 140.81, 124.40, 122.21, 57.73, 51.54, 45.29. MS (ESI+) m/z 297.1, 299.1 ($[M + 1]^+$). 중간체-6: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.98 (s, 1H), 8.38 (dd, *J* = 8.4, 2 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.00 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.75 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 2.10 (s, 6H), MS (ESI+) m/z 297.1, 299.1 ($[M + 1]^+$).

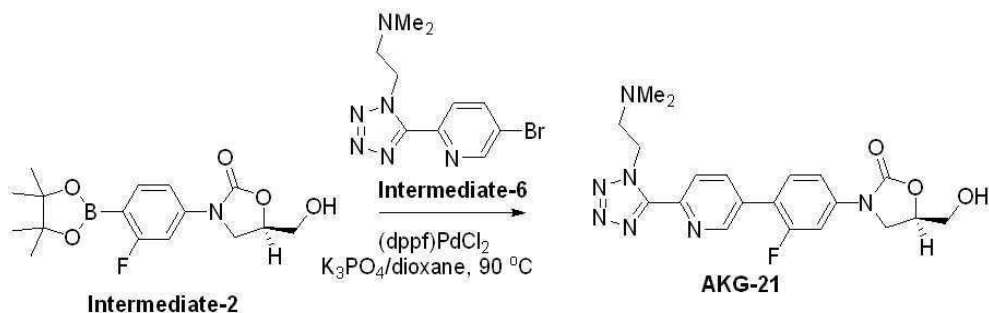


[0600]

[0601]

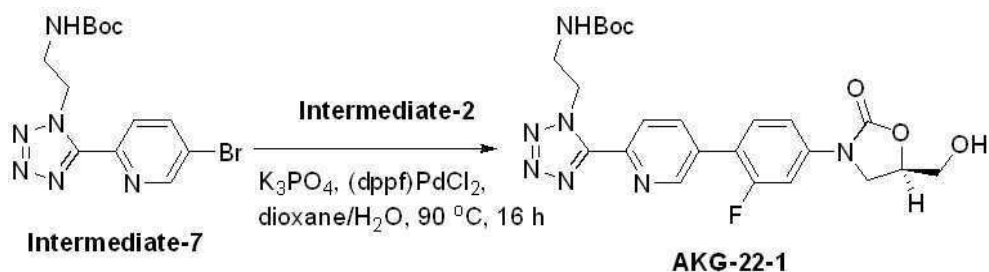
디옥산 (50 mL) 및 H₂O (5 mL) 내 새로 제조된 중간체-2 (1.68 g, 4.98 mmol) (중간체-3의 절차를 사용하여 1.44 g의 (R)-3-(4-브로모-3-플루오로페닐)-5-(히드록시메틸)옥사졸리딘-2-온으로부터), 중간체-5 (740 mg, 2.49 mmol) 및 K₃PO₄ (1.16 g, 5.48 mmol)의 혼합물을 Ar로 10 min 동안 퍼징했다. 여기에 (dppf)PdCl₂ (182 mg, 0.25 mmol)을 부가했다. 혼합물을 Ar로 다시 퍼징했다. 그런 다음 15시간 동안 90 °C로 가열했다. LCMS는 반응의 완료를 표시했다. 이를 진공에서 농축하고 잔류물을 H₂O (200 mL)로 희석하고 EtOAc (2X200 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 포화 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 여과했다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 RPFC를 사용하여 정제하여 (H₂O 내 MeCN, 0-40%를 사용한 용리액) 생성물AKG-16 (520 mg, 49.0% 수율)을 백색 고체로서 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.95 (s, 1H), 8.23 (dd, *J* = 18.3, 8.2 Hz, 2H), 7.82 - 7.66 (m, 2H), 7.54 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.89 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.82 - 4.71 (m, 1H), 4.17 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.98 - 3.87 (m, 1H), 3.77 - 3.65 (m, 1H), 3.64 - 3.53 (m, 1H), 2.90 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.17, 161.02, 158.58, 154.81, 149.91, 145.59, 141.03, 137.63, 132.10, 131.39, 122.59, 119.05, 114.47, 105.97, 105.69, 73.95, 62.07, 57.72, 51.46, 46.46, 45.26. MS (ESI+) m/z 428.1 ($[M + 1]^+$).

12. AKG-21의 합성

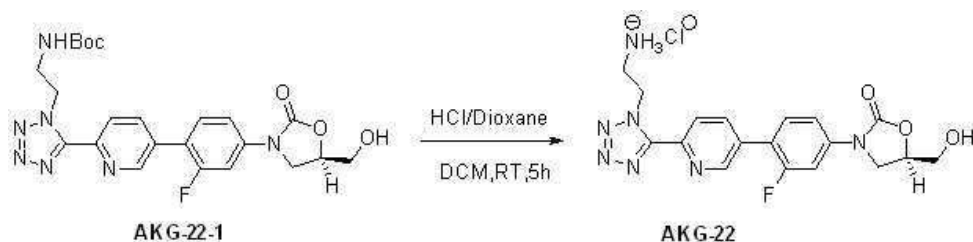


디옥산 (30 mL) 및 H₂O (5 mL) 내 중간체-2 (1.5 g, 4.5 mmol), 중간체-6 (0.9g, 3 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (247 mg, 0.3mmol) 및 K₃PO₄ (1.3 g, 6 mmol)의 용액을 Ar로 10 min 동안 퍼징하고 100 °C로 15 h 동안 가열했다. 반응 완료 후 (LCMS), 이를 진공에서 농축하고 잔류물을 H₂O (100 mL)로 희석하고 EtOAc (2X50 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 포화 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 여과했다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 FC를 사용하여 정제하여 (DCM 내 MeOH (of NH₄OH의 10%) 0 내지 10%를 사용한 용리액) AKG-21 (450 mg 백색 고체로서)를 35% 수율로 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.01 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.81 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 5.26 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.08 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.79 – 4.75 (m, 1H), 4.18 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.93 – 3.89 (m, 1H), 3.74 – 3.68 (m, 1H), 3.62 – 3.56 (m, 1H), 2.80 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.09, 158.64, 154.80, 152.10, (149.45, 149.40), 143.46, (141.35, 141.23), (138.19, 138.15), (132.77, 132.76), (131.53, 131.48), 124.58, (118.69, 118.56), (114.51, 114.49), (105.97, 105.68), 73.96, 62.06, 58.38, 47.26, 46.47, 45.42.

13. AKG-22의 합성



H₂O (2 mL) 및 디옥산 (8 mL) 내 중간체-7 (500 mg, 1.354 mmol)의 혼합물에 중간체-2 (685 mg, 2.03 mmol), K₃PO₄ (862 mg, 4.06 mmol) 및 (dppf)PdCl₂ (99 mg, 0.135 mmol)을 추가했다. 플라스크를 비우고 Ar로 다시 채웠다. 그 다음 혼합물을 90°C에서 16시간 동안 교반했다. 물 (20 mL)을 추가하고, EtOAc(2X20 mL)로 추출했다. 유기 상을 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 농축했다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(Biotage, 40g 실리카 겔 컬럼 @30mL/분, 석유 에테르 중 0-100% EtOAc로 용리)로 정제하여 소정의 생성물 AKG-22-1(450mg, 수율: 66 %)를 회색 고체로서 얻었다.

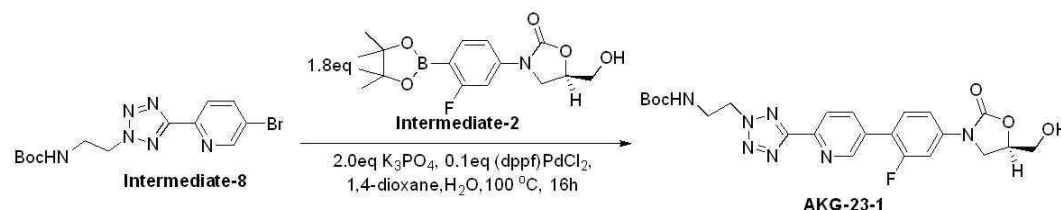


[0609]

DCM (8 mL) 내 AKG-22-1 (450 mg, 0.9 mmol)의 혼합물에 4M HCl/디옥산 (2 mL)을 부가했다. 이후 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반했다. 용매를 진공 하에서 제거하여 소정의 생성물 AKG-22(390mg, 수율: 99%)를 회색 고체로 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.03 (s, 1H), 8.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.19 (brs, 3H), 7.82 - 7.70 (m, 2H), 7.57 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 5.18 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.81 - 4.74 (m, 1H), 4.17 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 3.71 (dd, J = 12.4, 3.2 Hz, 1H), 3.59 (dd, J = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 3.53 - 3.47 (m, 2H). ^{13}C NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ (161.07, 158.63), 154.82, 152.52, 149.54, 143.25, (141.39, 141.28), 138.24, 124.54, (118.66, 118.53), 114.60, (106.01, 105.73), 73.97, 62.02, 47.37, 46.48, 38.84.

[0610]

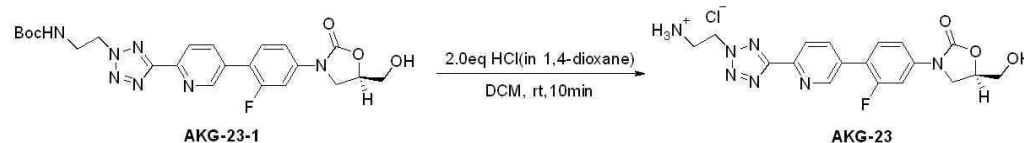
14. AKG-23의 합성



[0611]

[0612]

20 mL 1,4-디옥산 및 5 mL H₂O 내 중간체-8 (1.0 g, 2.71 mmol) 에 중간체-2 (4.86 mmol, 1.63 g), K₃PO₄(1.14 g, 5.42 mmol) 및 (dppf)PdCl₂(0.23 g, 0.27 mmol)을 부가하고 혼합물을 100 °C에서 16h 동안 교반했다. 출발 물질이 소모된 후, 포화 NaHCO₃ 100mL를 첨가했다. 수성 상을 EtOAc(3X30mL)로 추출하고, 조합시킨 유기 추출물을 H₂O로 세척하고, 진공에서 농축하고, FC로 정제하여 소정의 화합물 AKG-23-1(1.0g, 70% 수율)을 얻었다.



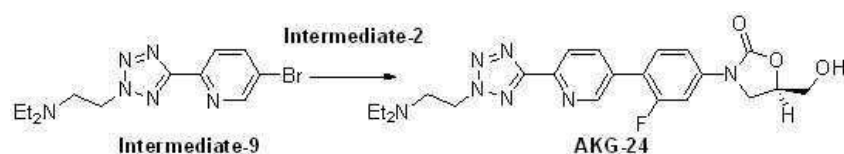
[0613]

[0614]

30mL DCM 중 AKG-23-1(1.0g, 2mmol)에 1mL HCl(1,4-디옥산 중 4M)을 첨가하고 혼합물을 1시간 동안 교반했다. 출발 물질이 소비된 후, 혼합물을 휘젓고 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 1시간 동안 3mL MeOH에서 교반하고, 휘저어서 소정의 생성물 AKG-23을 백색 고체로서 얻었다(0.53g, 63% 수율). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.97 (s, 1H), 8.26 (m, 5H), 7.83-7.64 (m, 2H), 7.54 (dd, J = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.77 (m, 1H), 4.16 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 8.8, 6.2 Hz, 1H), 3.71 (dd, J = 12.3, 3.2 Hz, 1H), 3.61-3.57 (dd, J = 12.3, 3.2 Hz, 1H), 3.53 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 38.31, 46.49, 50.86, 62.01, 73.96, [105.69, 105.97], 114.46, [118.90, 119.03], 122.73, [131.37, 131.47], 132.21, [137.66, 137.70], [140.99, 141.10], 145.42, 149.86, 154.82, [158.57, 161.02], 164.50.

[0615]

15. AKG-24의 합성



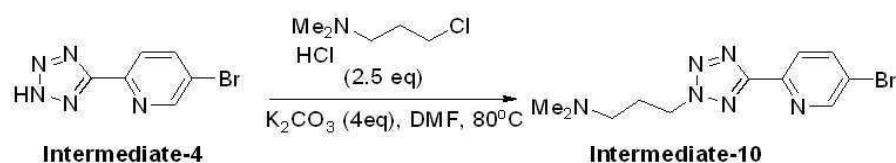
[0616]

[0617]

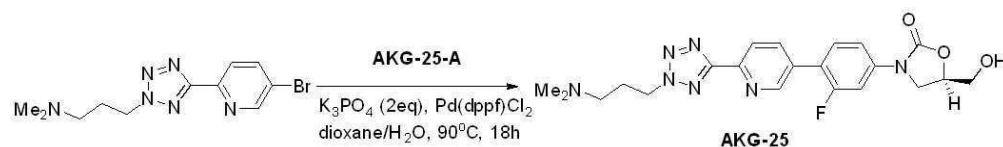
디옥산 (50 mL) 및 H₂O (5 mL) 내 중간체-2 (1.66 g, 4.98 mmol), 중간체-9 (800 mg, 2.49 mmol) 및 K₃PO₄ (1.16 g, 5.48 mmol)의 혼합물을 Ar로 10 min 동안 퍼징하고 (dppf)PdCl₂ (182 mg, 0.25 mmol)을 부가했다. 혼합물을 Ar로 다시 퍼징했다. 반응 혼합물을 이후 90 ° C까지 15 h 동안 가열했다. LCMS는 반응완료를 나타냈고; 이를 진공에서 농축하고 잔류물을 H₂O (200 mL)로 희석하고 및 EtOAc (2X200 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 포화 염수로 세척한 다음 Na₂SO₄로 건조시키고 여과했다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 RPFC를 사용하여 정제하여 (H₂O 내 MeCN, 0-40%을 사용한 용리액) 생성물AKG-24 (520 mg, 39.0% 수율)을 백색 고체로서 얻었다.

다. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.95 (s, 1H), 8.28 – 8.16 (m, 2H), 7.81 – 7.67 (m, 2H), 7.54 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 5.27 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.93 – 4.70 (m, 3H), 4.17 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 8.9, 6.1 Hz, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.04 (s, 2H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.13, 161.03, 158.59, 154.81, 149.94, 149.90, 145.66, 141.09, 140.98, 137.66, 137.62, 132.10, 132.08, 131.41, 131.37, 122.54, 119.15, 119.02, 114.50, 114.47, 105.99, 105.71, 73.95, 62.08, 52.09, 51.60, 46.85, 46.48, 12.26. MS (ESI+) m/z 456 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

[0618] 16. AKG-25의 합성

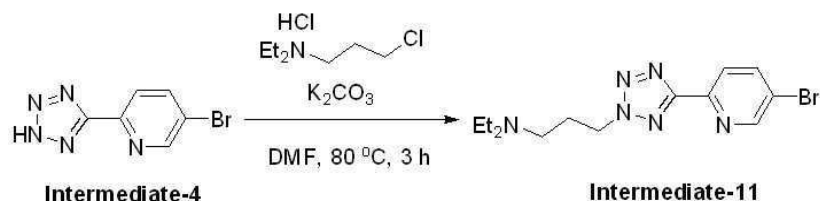


DMF (20 mL) 내 중간체-4 (2.25 g, 10 mmol) 및 K_2CO_3 (5.52 g, 40 mmol)의 혼합물에 3-클로로-N, N-디메틸프로판-1-아민 수소 클로라이드 (3.95 g, 25 mmol)을 부가하고 혼합물을 80 ° C로 4 h 동안 가열했다. 혼합물을 H_2O (40 mL)로 희석하고 EtOAc (2X100 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 포화 염수로 세척한 다음 Na_2SO_4 로 건조시키고 여과했다. 용매를 진공에서 제거하였고 잔류물은 N-알킬화의 2개의 위치이성질체의 존재를 나타내었다. 이성질체를 FC(DCM 내 MeOH 0-15%를 사용한 용리액)를 사용하여 분리하여 중간체-10(0.98g, 31.6% 수율)을 백색 고체로 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.83 (dd, J = 2.4, 0.8 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 8.0, 0.4 Hz, 1H), 8.01 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 4.78 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.38 (t, J = 3.2 Hz, 2H), 2.27-2.22 (m, 8H). MS (ESI+) m/z 311.1, 313.1 ($[\text{M} + 1]^+$).



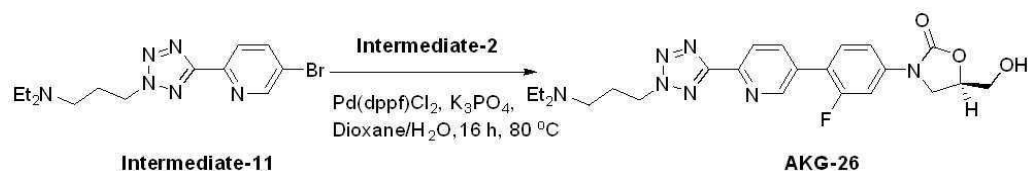
디옥산 (30 mL) 및 H_2O (5 mL) 내 중간체-10 (0.74 g, 2.4 mmol), 중간체-2 (1.62 g, 4.8 mmol) 및 K_3PO_4 (1 g, 4.8 mmol)의 혼합물을 Ar로 10 min 동안 퍼징하고 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (175 mg, 0.24 mmol)을 부가했다. 혼합물을 Ar로 다시 퍼징하고 90° C까지 15 h 동안 가열했다. 이를 진공에서 농축하고 잔류물을 H_2O (80 mL)로 희석하고 EtOAc (2X100 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 포화 염수로 세척한 다음 Na_2SO_4 로 건조시키고 여과했다. 용매를 진공에서 제거하고 잔류물을 FC를 사용하여 정제하여 (DCM 내 MeOH 0-15%를 사용한 용리액) 생성물 AKG-25 (0.73g, 69.5% 수율)을 회색 고체로서 얻었다. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.94 (s, 1H), 8.24-8.26 (m, 1H), 8.19-8.21 (m, 1H), 7.78-7.70 (m, 2 H), 7.54 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 5.27 (t, J =5.6 Hz, 1H), 4.80 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.77-4.75 (m, 1H), 4.16 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.92 (dd, J =8.8 Hz, 6.0 Hz, 1H), 3.74 – 3.69 (m, 1H), 3.63 – 3.58 (m, 1H), 2.28 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.10 – 2.17 (m, 8H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.26, 161.03, 158.58, 154.81, 149.92, 145.58, 141.09, 137.65, 132.10, 131.37, 122.60, 119.12, 118.99, 114.46, 105.98, 105.70, 73.95, 62.07, 55.96, 51.65, 46.47, 45.53, 27.21. MS (ESI+) m/z 442.1 ($[\text{M} + 1]^+$).

[0623] 17. AKG-26의 합성



[0624]

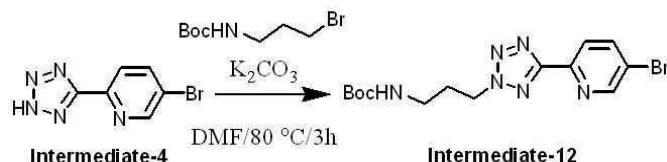
[0625] DMF (30 mL) 내 중간체-4 (5.0 g, 22.12 mmol)의 용액에 (3-클로로프로필)디에틸아민 하이드로클로라이드 (8.23 g, 55.30 mmol) 및 K₂CO₃ (9.17 g, 66.36 mmol)을 80 ° C에서 3 h 동안 부가했다. 반응물을 냉각시키고 빙수조에 붓고 EA(2X200 mL)로 추출했다. 조합시킨 유기 상을 염수로 세척하고 (2X50 mL), Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 용매 제거 후, N-알킬화 위치이성질체를 갖는 미정제 생성물을 FC(PE/EA=1:10)로 정제하여 중간체-11(1.70g, 22.65%)을 백색 고체로 얻었다. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.00 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 2H), 4.77 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.53-2.49 (m, 6H), 2.26-2.20 (m, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 6H). MS (ESI⁺) *m/z* 339.1, 341.1 ([*M* + 1]⁺).



[0626]

[0627] 중간체-11 (0.68 g, 2.00 mmol), 중간체-2 (1.07 g, 3.99 mmol), 트리포타슘 포스페이트 (0.85 g, 3.985 mmol) 및 Pd(dppf)Cl₂ (0.15 g, 0.20 mmol)의 혼합물을 1,4-디옥산:물 (12 mL, 6:1) 내에 현탁시켰다. 반응물을 환류에서 16시간 동안 교반했다. 혼합물을 EtOAc (2X100 mL) 및 물 사이에서 분배시키고, 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 여과했다. 용매를 제거 후, 위치이성질체를 함유하는 잔류물을 (DCM/MeOH=20/1)로 용리하는 FC를 사용하여 정제하여 AKG-26(0.54g, 56.04%)을 회색 고체로 얻었다. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.95 (s, 1H), 8.26-8.19 (m, 2H), 7.78-7.70 (m, 2H), 7.53 (dd, *J* = 10.5, 2.5 Hz, 1H), 5.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.83-4.75 (m, 2H), 4.17 (t, *J* = 11.5 Hz, 1H), 3.92 (dd, *J* = 11.0, 7.5 Hz, 1H), 3.74-3.69 (m, 1H), 3.62-3.58 (m, 1H), 3.51-3.28 (m, 8H), 2.14 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 0.93 (t, *J* = 8.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.24, 161.03, 158.59, 154.52, 149.91, (d, *J* = 3.2 Hz), 145.59, 141.03 (d, *J* = 11.8 Hz), 137.64 (d, *J* = 3.2Hz), 132.12, 131.40 (d, *J* = 4.5 Hz), 122.57, 119.06(d, *J* = 12.8 Hz), 114.47 (d, *J* = 2.8 Hz,), 105.97, 105.70, 73.96, 62.07, 51.70, 49.19, 46.75, 46.48. MS (ESI⁺) *m/z* 470.1 ([*M* + 1]⁺).

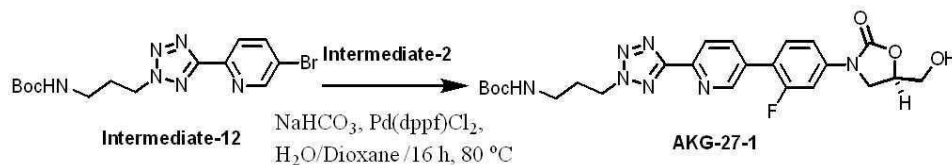
[0628] 18. AKG-27의 합성



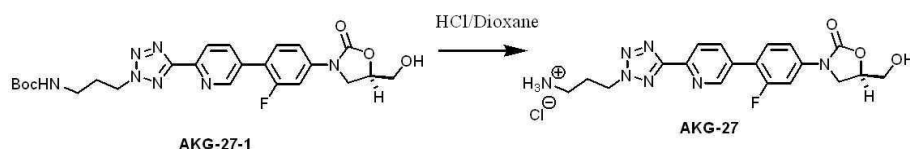
[0629]

[0630] DMF (42 mL) 내 중간체-4 (6.3 g, 27.87 mmol)의 용액에 BocNH(CH₂)₃Br (16.6 g, 69.71 mmol) 및 K₂CO₃ (11.1 g, 80.02 mmol)을 80 ° C에서 3 시간 동안 부가했다. 반응물을 냉각시키고 빙수조에 붓고 EtOAc(2X200mL)로 추출했다. 유기상을 염수(2X50mL)로 세척하고 Na₂SO₄로 건조시키고 여과하여 용매를 감압하에 증발시켰다. N-알킬화의 위치이성질체를 포함하는 조 생성물을 FC(PE/EA=2:1)로 정제하여 중간체-12(14g, 13.1%)를 황색 고체로 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.28 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.77 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.03 (q, *J* = 12.4 Hz, 2H), 2.15-2.08 (m, 2H),

1.37 (s, 9H) ppm. MS (ESI+) m/z 383.0 ([M + 1]⁺).



중간체-12 (0.83 g, 2.15 mmol), NaHCO₃ (0.36 g, 4.31 mmol) 및 중간체-2 (1.24 g, 3.68 mmol)의 용액에 1,4-디옥산 (32 mL) 및 물 (8 mL) 내에 현탁시켰다. 혼합물을 N₂로 5분 동안 버블링한 다음 Pd(dppf)Cl₂(0.078g, 0.095mmol)로 채웠다. 혼합물을 90℃에서 15시간 동안 교반한 다음 실온으로 냉각시켰다. 혼합물을 EtOAc(2X100mL)와 물 사이에 분배했다. 유기층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 여과하고 농축했다. 여액을 농축하고 실리카겔 상의 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(DCM/MeOH=20/1)로 정제하여 AKG-27-1(0.75g; 66.9%)을 백색 고체로 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.95 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.78-7.70 (m, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 5.26 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 4.80-4.75 (m, 3H), 4.17 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.91 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.71-3.69 (m, 1H), 3.60-3.59 (m, 1H), 3.06-3.03 (m, 2H), 2.15-2.12 (m, 2H), 1.37 (s, 9H) ppm. MS (ESI+) m/z 514.0 ([M + 1]⁺).



무수 DCM(16mL) 중 AKG-27-1(0.9g, 1.75mmol) 용액에 디옥산(4.0mL) 중 HCl을 실온에서 N₂ 분위기 하에 첨가했다. 반응 혼합물을 동일한 온도에서 6시간 동안 교반하고 RT로 냉각시켰다. 반응 혼합물을 감압하에 용매를 증발시켜 AKG-27(0.65g, 82.5%)을 얻은 노란색 고체로 얻었다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.95 (s, 1H), 8.26-8.20 (m, 5H), 7.77-7.70 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.77 (s, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.16 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.71 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 2.94 (s, 2H), 2.34 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H) ppm. MS (ESI+) m/z 414.0 ([M + 1]⁺).

19. AKG-28 내지 31의 합성

DCM (100 mL) 내 (R)-3-(4-브로모-3-플루오로페닐)-5-(히드록시메틸)옥사졸리딘-2-온 (9g, 31 mmol)의 용액에 (3.92 g, 34 mmol) 및 TEA (3.76 g, 37 mmol)을 부가했다. 혼합물을 RT에서 2 h 동안 교반했다. 혼합물을 물 (2X30 mL) 및 염수 (2X30 mL)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 농축하여 중간체-13 (11.4g, 수율 99%)를 얻었다. MS (ESI+) m/z 368 ([M + 1]⁺).

DMF(200mL) 중의 중간체-13(11.4g, 31mmol)의 용액에 칼륨 1,3-디옥소이소인돌린-2-이드(6.02g, 32mmol)를 첨가했다. 혼합물을 90℃에서 밤새 교반했다. 혼합물을 냉각시키고 물(1000mL)에 붓고 0.5시간 동안 교반했다. 침전물을 모아 진공건조하여 중간체-14(11g, 수율 85%)를 얻었다. MS (ESI+) m/z 419 ([M + 1]⁺).

EtOH (150 mL) 내 중간체-14 (11g, 26.3 mmol)의 용액에 NH₂NH₂·H₂O (85%, 7.7 g, 131 mmol)을 부가했다. 혼합물을 90℃에서 밤새 교반했다. 혼합물을 여과하고 EtOH (2X50 mL)로 행켰다. 여액을 농축하여 중간체-15 (7.6 g, 수율 100%)를 얻었다. MS (ESI+) m/z 289 ([M + 1]⁺).

THF (50 mL) 및 물 (50 mL) 내 중간체-15 (7.6 g, 26.4 mmol)의 용액에, (Boc)₂O (6.9 g, 32 mmol) 및 K₂CO₃ (7.29 g, 52.8 mmol)을 부가하고 혼합물을 2 h 동안 교반했다. 혼합물을 물 (100 mL)로 희석하고, EtOAc (3X50 mL)로 추출했다. 조합시킨 유기 추출물을 염수 (2X50 mL)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 농축했다. 잔류물을 FC(Biotage, 80g 실리카 겔 컬럼 @ 65mL/분, 석유 에테르 중 0-60% EtOAc로 30분 동안 용출)로

정제하여 중간체-16(7.8g, 수율 75%)을 얻었다. MS (ESI+) m/z 411 ($[M + 23]^+$).

[0640]

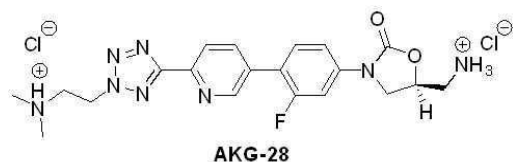
디옥산 (100 mL) 내 중간체-16 (7.8 g, 20 mmol), 비스(피나콜라토)디보론 (6.54 g, 30 mmol) 및 KOAc (2.94 g, 30 mmol)을 Ar로 10 min 동안 퍼징하고 이후 (Ph_3 의 혼합물 P) $_2PdCl_2$ (1.06 g, 1.5 mmol)을 추가했다. 혼합물을 Ar로 퍼징하고 다시 90 ° C에서 밤새 교반했다. 혼합물을 냉각시키고 물 (300 mL)로 희석하고, EtOAc (3X100 mL)로 추출했다. 조합시킨 추출물을 염수로 세척하고 (2X50 mL), Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 농축했다. 잔류물을 FC(Biotage, 80g 실리카 겔 컬럼 @ 65mL/분, 석유 에테르 중 0-60% EtOAc로 30분 동안 용출)로 정제하여 중간체-18(6.2 g, 수율 70%)을 얻었다. MS (ESI+) m/z 459 ($[M + 23]^+$).

[0641]

절차 C: 디옥산/ H_2O (10:1, 0.06M) 내 중간체-5/8/9/10/11(1.0eq) 중 하나, 중간체-18/19(1.5eq) 중 하나, $Pd(dppf)Cl_2$ DCM (0.1eq), 및 K_3PO_4 (2.0eq)의 혼합물을 N_2 로 퍼징하고 90° C에서 밤새 교반했다. 혼합물을 EtOAc로 희석하고 물 및 염수로 세척하고 무수 황산마그네슘으로 건조하고 여과하고 농축했다. 잔류물을 FC로 정제하여 화합물 AKG-28-1/AKG-29-1/AKG-30-1/AKG-31-1/AKG-38/AKG-39/AKG-40 중 하나를 얻었다.

[0642]

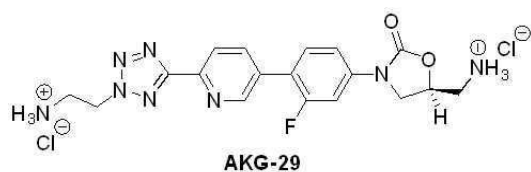
DCM(1mL/100mg) 중 화합물 AKG-28-1/ AKG-29-1/ AKG-30-1/ AKG-31-1 중 하나의 용액에 EtOAc 중 3N HCl(20당량)을 추가했다. 혼합물을 2시간 동안 교반한 다음 여과했다. 고체를 진공에서 건조하거나 동결건조하여 최종 화합물 AKG-28/ AKG-29/ AKG-30/ AKG-31 중 하나를 얻었다(두 단계에서 수율 35~44%).



[0643]

[0644]

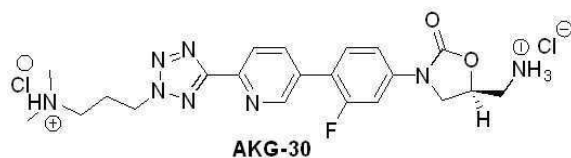
절차 C를 사용하여. 이 생성물을 중간체-5 및 중간체-18로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.35 g, 35% 수율). ^1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 10.53 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.37 (s, 3H), 8.29 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.80 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.5, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 5.31 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 5.04-4.99 (m, 1H), 4.28 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 9.0, 6.5 Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 2.87 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, D_2O) δ 163.90 (s), 160.30 (s), 158.33 (s), 154.86 (s), 148.55 (s), 142.64 (s), 138.93 (d, J = 11.0 Hz), 137.74 (s), 132.43 (s), 130.39 (s), 122.46 (s), 119.03 (s), 114.36 (s), 106.41 (s), 106.18 (s), 70.31 (s), 55.23 (s), 48.07 (s), 47.69 (s), 43.29 (s), 42.19 (s) ppm. MS (ESI+) m/z 427.1 ($[M + 1]^+$).



[0645]

[0646]

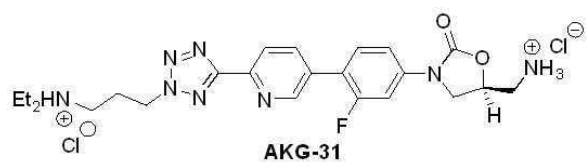
절차 C를 사용하여. 이 생성물을 중간체-8 및 중간체-18로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.4 g, 44% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.97 (s, 1H), 8.57-8.41 m, 6H), 8.29-8.13 (m, 2H), 7.80 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.5, 2.5 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 5.12 - 5.03 (m, 3H), 4.28 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 4.02-3.98 (m, 1H), 3.54-3.51 (m, 2H), 3.33-3.26 (m, 2H), 8.28 (s, 1H), 7.73 - 7.65 (m, 1H), 7.60 (dd, J = 13.6, 2.1 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 7.41 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.78 - 4.68 (m, 1H), 4.33 (d, J = 13.0 Hz, 2H), 4.12 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, J = 8.9, 6.2 Hz, 1H), 3.74 - 3.64 (m, 1H), 3.62 - 3.52 (m, 1H), 2.87 - 2.71 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.11 (s, 6H), 1.72 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 1.64 - 1.49 (m, 1H), 1.34 (dd, J = 14.3, 7.0 Hz, 2H), 1.18 - 1.04 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 161.52, 160.59, 158.12, 154.86, 145.70, 141.05, 140.16, 139.65, 133.57, 130.44, 123.64, 117.70, 114.54, 106.50, 106.22, 70.34, 50.81, 47.68 ppm. MS (ESI+) m/z 399.2 ($[M + 1]^+$).



[0647]

[0648]

절차 C를 사용하여. 이 생성물을 중간체-10 및 중간체-18로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.36 g, 40% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.94 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.52 (s, 3H), 8.28–8.22 (m, 2H), 7.79 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 5.08–5.01 (m, 1H), 4.93 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.28 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.00 (dd, J = 9.2, 6.8 Hz, 1H), 3.29 – 3.26 (m, 2H), 3.21–3.16 (m, 2H), 2.75 (d, J = 4.8 Hz, 6H), 2.49–2.43 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 162.39 (s), 160.58 (s), 158.11 (s), 154.88 (s), 147.20 (s), 141.66 (s), 139.28 (d, J = 11.3 Hz), 132.86 (s), 130.45 (s), 122.90 (s), 118.44 (d, J = 12.0 Hz), 114.44 (s), 106.46 (s), 106.17 (s), 70.30 (s), 54.56 (s), 50.62 (s), 47.68 (s), 42.89 (s), 42.16 (s), 23.74 (s) ppm. MS (ESI+) m/z 441 ($[\text{M} + 1]^+$).



[0649]

[0650]

절차 C를 사용하여. 이 생성물을 중간체-11 및 중간체-18로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.36 g, 42% 수율). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.10 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.390– 8.21 (m, 5H), 7.80 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 5.04–4.97 (m, 1H), 4.94 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.28 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.94 (dd, J = 9.6, 6.4 Hz, 1H), 3.31–3.26 (m, 2H), 3.21–3.17 (m, 2H), 3.15–3.12 (m, 4H), 2.46–2.42 (m, 2H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 163.04 (s), 160.53 (s), 158.07 (s), 154.84 (s), 147.95 (d, J = 5.4 Hz), 142.36 (s), 139.05 (d, J = 11.3 Hz), 138.32 (s), 132.44 (s), 130.38 (d, J = 4.0 Hz), 122.50 (s), 118.72 (d, J = 12.8 Hz), 114.35 (s), 106.37 (s), 106.09 (s), 70.29 (s), 50.65 (s), 48.55 (s), 47.64 (d, J = 7.4 Hz), 42.17 (s), 23.05 (s), 8.24 (s) ppm. MS (ESI+) m/z 469 ($[\text{M} + 1]^+$).

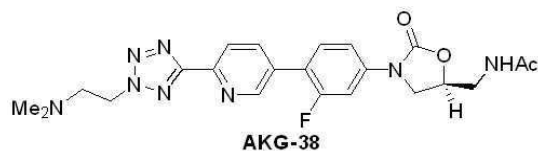
[0651]

DCM(150 mL) 내 중간체-15 (7.6 g, 26.4 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (TEA, 4.57 g, 6.27 mL, 52.77 mmol, 2.0 equiv) 이후 아세틸 클로라이드 (AcCl , 2.6 g, 2.74 mL, 39.58 mmol, 1.5 equiv) 및 4- N,N -디메틸아미노피리딘 (DMAP, 0.028 g, 2.64 mmol, 0.01 equiv)을 0 – 5 ° C에서 N_2 하에서 부가했다. 이어서 생성된 반응 혼합물을 0 – 5°C에서 2시간 동안 교반했다. TLC 및 LCMS에서 반응이 완료되었음을 나타내면 반응 혼합물을 H_2O (100mL)로 급냉시켰다. 두 층을 분리한 다음 수성층을 CH_2Cl_2 (2X50mL)로 추출하고 합한 유기 추출물을 H_2O (2X100mL) 및 포화 NaCl 수용액(100mL)으로 세척하고 MgSO_4 로 건조하고 진공에서 농축했다. 잔류물을 FC(Biotage, 80g 실리카 겔 컬럼 @ 65mL/분, 석유 에테르 중 0-60% EtOAc로 30분 동안 용출)로 정제하여 중간체-17 (6.5 g, 수율 75%)을 얻었다. MS (ESI+) m/z 332 ($[\text{M} + 1]^+$).

[0652]

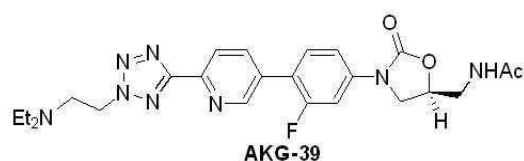
1,4-디옥산(100mL) 중 중간체-17(6.5g, 19.7mmol)의 용액에 1,1'-비스(디페닐포스포노)페로센-팔라듐(II)디클로라이드 디클로로메탄 착물(1.61g, 1.97mmol), 비스(피나콜라토) 디보론(10g, 39.39mmol) 및 KOAc(4.83g, 49.24mmol)을 첨가했다. 생성된 반응물을 90°C에서 4시간 동안 교반했다. TLC 및 LCMS에서 반응이 완료되었음을 나타내면 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후 물(100mL) 및 EtOAc(100mL)로 처리했다. 2개의 층을 분리하고, 수성 층을 EtOAc(2X50 mL)로 추출했다. 조합시킨 유기 추출물을 물 (2X50 mL) 및 포화 수성 NaCl (50 mL)로 세척하고, MgSO_4 상에서 건조시키고, 그리고 진공에서 농축했다. 잔류 갈색 오일을 FC(Biotage, 80g 실리카 겔 컬럼 @ 60mL/분, 석유 에테르 중 0-100% EtOAc로 30분 동안 용출)로 정제하여 중간체-19(6.6g, 수율 88.7%)를 얻었다. MS (ESI+) m/z 379 ($[\text{M} + 1]^+$).

[0653] 20. AKG-38 내지 40의 합성.



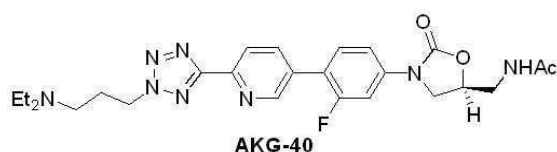
[0654]

[0655] 절차 C를 사용하여. 이 생성물을 중간체-5 및 중간체-19로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.48 g, 60% 수율). ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.95 (s, 1H), 8.29–8.19 (m, 3H), 7.77 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 4.89 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.81–4.76 (m, 1H), 4.20 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 9.2, 6.8 Hz, 1H), 3.45 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.90 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.19 (s, 6H), 1.85 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170.51, 164.17, 154.46, 149.94, 145.62, 140.90, 137.63, 132.07, 131.39, 122.59, 119.25, 114.66, 106.18, 105.90, 72.34, 57.71, 51.45, 47.67, 45.25, 41.87, 22.92 ppm. MS (ESI+) m/z 469.2 ($[\text{M} + 1]^+$).



[0656]

[0657] 절차 C를 사용하여. 이 생성물을 중간체-9 및 중간체-19로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.35 g, 40% 수율). ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.95 (s, 1H), 8.29–8.19 (m, 3H), 7.76 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 4.84–4.76 (m, 3H), 4.21 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.82 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 3.46 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.04 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.50–2.47 (m, 4H), 1.85 (s, 3H), 0.87 (t, J = 7.2 Hz, 6H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 170.50, 164.11, 154.46, 149.91, 145.68, 137.68, 132.04, 131.40, 122.53, 119.27 (d, J = 13.3 Hz), 114.65, 106.18, 105.90, 72.34, 52.11, 51.61, 47.67, 46.83, 41.87, 40.63, 40.42, 40.22, 40.01, 39.80, 39.59, 39.38, 22.92, 12.28 ppm. MS (ESI+) m/z 497 ($[\text{M} + 1]^+$).



[0658]

[0659] 절차 C를 사용하여. 이 생성물을 중간체-11 및 중간체-19로부터 백색 고체로서 수득했다 (0.36 g, 50% 수율). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.95 (s, 1H), 8.31 – 8.18 (m, 3H), 7.77 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 13.6, 2.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 4.88 – 4.71 (m, 3H), 4.20 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 9.2, 6.4 Hz, 1H), 3.45 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.45 (s, 6H), 2.14 (s, 2H), 1.85 (s, 3H), 0.93 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 137.70, 131.45, 114.69, 46.79, 41.86, 40.64, 40.43, 40.22, 40.01, 39.80, 39.59, 39.38 ppm. MS (ESI+) m/z 511 ($[\text{M} + 1]^+$).

[0660] **실시예 2. 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 시험관 내 활성 분석**

[0661] 사용된 브로츠 미세희석 MIC 방법은 Collins et al., 1997 및 Gruppo et al., 2006에 기술되어 있다. 밤새 배양 후 박테리아의 시각적 성장을 방지하는 화학적 화합물의 MIC 또는 최소 억제 농도.

[0662] 간략하게, MIC는 Collins et al., 1997(Collins L, Franzblau SG (1997))에 의해 기술된 바와 같이 Alamar blue endpoint(MABA)를 사용한 브로츠 미세희석 분석에 의해 결정되었다. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. AAC. 41(5):1004-1009) and Gruppo et al., 2006 (Gruppo V, Johnson CM, Marietta

KS, Scherman H, Zink EE, Crick DC, Adams LB, Orme IM, Lenaerts AJ. (2006) Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. AAC 50:1245-1250). MABA는 브로쓰 배지에서 마이코박테리아 성장 활동이 있을 때 산화환원 지시약 Alamar 이 파란색에서 분홍색으로 변하는 96-웰 비색 분석법이다.

[0663] 간략하게, Middlebrook 4.7g의 7H9 브로쓰 분말(Millipore Sigma Cat #M0178), 2mL 글리세롤 및 898 정제수를 1L 플라스크에 첨가하고 용해될 때까지 혼합하고, 이어서 100mL의 ADC 용액(소 혈청 알부민 6g, 덱스트로스 2g 및 카탈라아제 3mg을 물 100mL에 용해)을 동일한 1L 플라스크에 넣었다. 화합물을 DMSO에서 10 mg/mL의 농도로 만든 다음 DMSO로 추가로 80 μ g/mL 또는 원하는 시작 농도인 2 μ g/mL의 40배로 희석했다. 일련의 9개의 1:2 희석액은 첫 번째 웰에 50 μ L의 약물 용액을 다음 웰에 있는 50 μ L의 DMSO에 추가하고 이 과정을 약물 제조 플레이트의 다음 8개 웰로 전달하여 준비했다. M.투베르쿨로시스 (M.tb) H34Rv 및 M.tb Erdman 균주의 스톱을 배지를 사용하여 초기 농도 $3-4 \times 10^7$ CFU/mL에서 최종 농도 5×10^5 CFU/mL로 희석하고 다채널 피펫터로 위아래로 피펫팅하여 완전히 혼합했다.

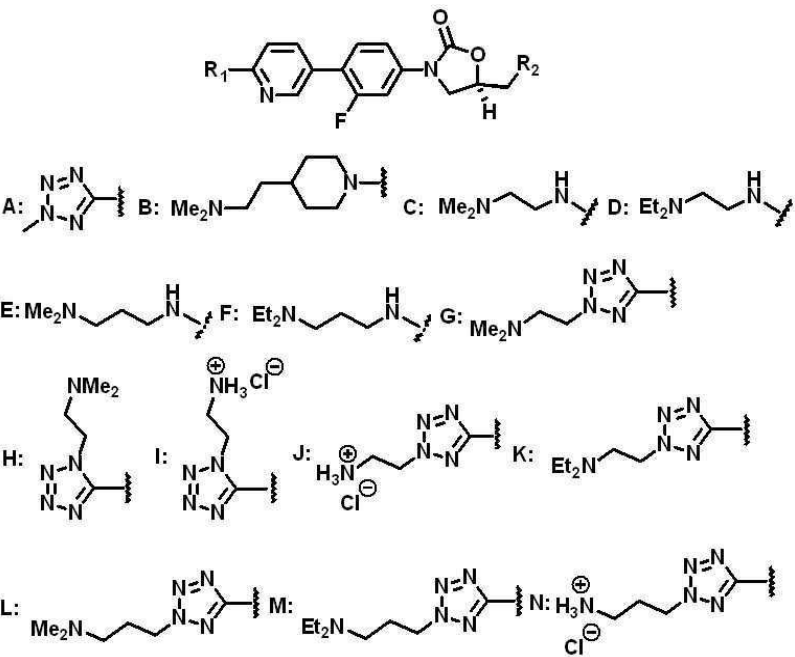
[0664] 5×10^5 CFU/mL 접종 배지 100 μ L를 모든 웰에 옮겨 분석 플레이트를 제조했다. 이어서, 약물 제조 플레이트의 각 약물 희석액 2.5 μ L를 분석 플레이트의 해당 웰로 옮겼다. 이후 분석 플레이트를 지퍼백에 넣고 인큐베이터 내부에 넣고 37° C에서 인큐베이션했다. 이어서 플레이트를 3일 및 10일에 플레이트 판독기에서 OD 600 nm에서 판독했다. 10일째 OD600 판독 후, 10 μ L의 Alamar Blue 염료를 각 분석 웰에 첨가했다. 12일째에 모든 분석 플레이트를 플랫배드 컬러 스캐너로 스캔했다. Alamar Blue를 사용할 때 파란색에서 분홍색으로 눈에 띄는 색상 변화를 일으키지 않거나 약물이 없는 대조군 웰에 비해 OD600이 80% 이상 감소하는 가장 낮은 연속 항균 농도 (일반적으로 2배 연속 희석)는 이들 화합물에 대한 MIC로 간주되었다.

[0665] 2개의 독특한 약물 민감성 균주(M.tb Erdman 및 M.tb H37Rv)를 사용하여 분석을 수행했다. 잠재적인 단백질 결합을 평가하기 위해 MIC 분석을 4%(w/v) 인간 혈청 알부민(huSA)(Sigma # A1653)의 존재 하에 수행할 수도 있다 (혈청 이동 분석). 일반적으로 두 웰의 MIC의 이동(MIC의 4배 이동)은 상당한 것으로 간주된다. PA-824(양성 대조군)의 경우 MIC의 4배 이동이 예상된다.

[0666] MIC는 Alamar Blue(MABA) 판독값 또는 광학 밀도 판독값(OD600)에 의해 측정되었으며, 이는 일치하거나 분석의 한계 내에 있는 단지 하나의 2배 희석만 상이했다. 시험된 모든 화합물은 Mtb Erdman 및 H37Rv 모두에 대한 MIC 값의 일관성을 나타내거나 하나의 화합물 AKG-40을 제외하고 하나의 2배 희석 내에 있었고; AKG-40은 Erdman에 대해 1-2 μ g/mL의 더 높은 MIC 값과 H37Rv에 대해 0.5의 MIC를 나타냈다. 이러한 불일치는 Erdman 플레이트에서 느린 성장(낮은 OD 판독값)으로 인한 것일 수 있다.

[0667] 리네졸리드는 2 μ g/mL, 테디졸리드는 0.25 μ g/mL, 베타칼린은 0.125 μ g/mL의 예상 MIC 값을 나타냈다. 이러한 값은 과거 MIC 데이터 및 공개된 값과 일치한다 (Ruiz et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2019, Mar 27;63(4), pii: e01939-18, Reddy et al. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jul;54(7):2840-6, Torrea et al. J Antimicrob Chemother. 2015 Aug; 70(8):2300-5). AKG-28은 0.03-0.015 μ g/mL의 MIC를 나타내어 테디졸리드보다 훨씬 활성이 높았다. 아세트아미드 기를 포함하는 옥사졸리딘 유사체 중 AKG-39는 0.5 μ g/mL의 MIC를, AKG-40은 1-0.5 μ g/mL의 MIC를 나타냈다. MIC가 0.06 μ g/mL인 AKG-38도 테디졸리드보다 몇 배 더 큰 활성을 보였다.

[0668] 옥사졸리딘의 C5 위치에 아민기 또는 아세트아미드기를 갖는 분자는 더 활성적이었고(AKG-3 대 테디졸리드, AKG-28 또는 AKG-38 대 AKG-16, AKG-39 대 AKG-24, AKG-40 대 AKG-26), 테트라졸에 아미노알킬 측쇄를 갖는 화합물이 양호한 활성을 보였다. 옥사졸리딘은 위치 C5에서 1차 아민(AKG-28-1 대 AKG-28) 또는 아세트아미드(AKG-28-1 대 AKG-38)에 대한 t-부톡시카보닐아미노(Boc-NH) 기의 치환은 활성의 감소를 가져왔다. 디메틸아미노알킬 측쇄를 함유하는 화합물은 아미노에틸 또는 디에틸아미노에틸 유사체(AKG-16 대 AKG-24, AKG-28 대 AKG-29, AKG-30 대 AKG-31)와 비교할 때 특히 우수했다. 마찬가지로, 테트라졸 고리 상의 더 짧은 디알킬아미노알킬 측쇄(예를 들어 에틸렌 대 프로필렌)는 더 큰 활성을 나타냈다(AKG-16 대 AKG-25, AKG-24 대 AKG-26, AKG-28 대 AKG-30). 테트라졸의 2' 위치에 치환된 유사체는 1' 위치에 치환된 것보다 더 활성적이었다(AKG-16 대 AKG-21, AKG-23 대 AKG-22).



[0669]

표 2

[0670]

화합물 ID	R_1	R_2	마이코박테리움 투베르쿨로시스 MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			Erdman	H37Rv
리네졸리드		-NHCOMe	1	1
수테졸리드		-NHCOMe	0.5	0.5
테디졸리드		-OH	0.25	0.25
AKG-1	A	-NMe ₂	>8	>8
AKG-2	A	-NEt ₂	>8	>8
AKG-3	A	-NH ₂ .HCl	0.125	0.06
AKG-5	A	-OCO(CH ₂) ₃ NMe ₂	1	1
AKG-6	A	B	>8	>8
AKG-7	A	-O (CH ₂) ₂ NEt ₂	>8	>8
AKG-8	A	-N (CH ₂) ₃ NEt ₂	>8	>8
AKG-9	A	D	>8	>8
AKG-11	B	-OH	4	4
AKG-12	C	-OH	4	4
AKG-13	D	-OH	>8	>8
AKG-14	E	-OH	8	8
AKG-15	F	-OH	>8	>8
AKG-16	G	-OH	0.25	0.25
AKG-17	A	-NHCO(CH ₂) ₂ NH ₂ .HCl	2	2
AKG-18	A	-NHCO(CH ₂) ₃ NH ₂ .HCl	2	2
AKG-19	A	-NH(CH ₂) ₂ NH ₂ .HCl	>8	>8
AKG-20	A	-OCO(CH ₂) ₂ NEt ₂	0.5	0.5
AKG-21	H	-OH	>8	>8
AKG-22	I	-OH	1	0.5
AKG-23	J	-OH	0.25	0.25
AKG-24	K	-OH	1	1
AKG-25	L	-OH	1	1
AKG-26	M	-OH	2	2
AKG-27	N	-OH	0.5	0.5

AKG-28	G	- NH ₂ .HCl	0.03	0.015
AKG-28-1	G	- NHCOOCMe ₃	0.25	0.125
AKG-29	J	- NH ₂ .HCl	0.25	0.125
AKG-30	L	- NH ₂ .HCl	0.125	0.125
AKG-31	M	- NH ₂ .HCl	0.5	0.5
AKG-38	G	-NHCOMe	0.06	0.06
AKG-39	K	-NHCOMe	0.5	0.5
AKG-40	M	-NHCOMe	1	0.5

실시예 3. 인간 신장 및 인간 간세포에 대한 시험관내 세포독성 분석

아프리카 녹색 원숭이 신장(Vero; ATCC # CCL81) 또는 인간 간세포/간(HepG2; ATCC #HB8065) 세포에서 IC50을 결정하기 위해 일련의 10회 희석에 걸쳐 화합물을 시험관내에서 시험했다. 이러한 분자는 일반적으로 무독성인 것으로 예상되므로 독소루비신의 양성 대조군이 모든 연구에 포함된다. 데이터는 전체 세포 생존율 곡선과 각 화합물에 대한 실제 IC50 값의 계산으로 보고된다.

부착 세포를 ~80% 컨플루언시까지 성장시켰다. 세포를 0.25% 트립신-EDTA(Gibco # 25200-072)를 첨가하여 트립신 처리한 후, 세포를 스피ندا운하고, 5ml의 성장 배지(MEM 배지; Corning # 10010 CM)를 첨가하여 세포를 분산시켰다. 세포 밀도는 혈구계산기를 사용하여 결정되었다. 성장 배지(10% FBS를 포함하는 MEM 배지; Corning # 35015 CV)를 세포에 첨가하여 적절한 세포 농도로 조정했다. 그런 다음, 200 μ l의 세포(5,000개 세포/웰)를 96-웰 투명 평면 바닥 플레이트(Costar #9804)에 첨가하고 플레이트에서 37° C, 5% CO2의 가습 인큐베이터에서 24시간 동안 배양했다.

성장 배지를 용매로 사용하여 시험 화합물의 연속 희석액을 준비한다(표 2). 이들 화합물은 농도가 5 mg/ml인 HCl 염의 무균 수용액으로 제공되었다. 희석액을 만들기 위해 각 약물 스톱을 실온으로 데우고 와동시키고 육안으로 침전물을 검사했다. 고체 약물이 존재하는 경우 스톱을 60 °C 수조에서 가열한 다음 거의 실온으로 냉각시켰다. 처리 농도에 기초하여 20배 작업 스톱을 연속 희석에 의해 만들었다. 이들은 250 μ g/ml의 시험된 최고 약물 농도로 성장 배지에서 1x로 추가로 희석되었다.

오래된 배지를 흡인하고 이를 200 μ l의 약물 함유 배지로 교체함으로써 각 화합물에 대한 초기 250 μ g/ml 농도로부터 일련의 1:2 희석으로 화합물을 웰에 첨가했다. 플레이트를 72시간 동안 5% CO2가 있는 가습 인큐베이터에서 37° C로 인큐베이션했다. 화합물 배양 기간이 끝나면 각 웰의 배지를 100 μ l의 1X PrestoBlue Cell Viability Reagent(ThermoFisher Cat # A13261)로 교체한다. 플레이트를 37° C에서 가습 인큐베이터에서 5% CO2로 30분에서 2시간 동안 배양한다. 30분, 60분, 120분에 판독값을 가져온다. SpectraMax M5 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 560nm 여기 및 590nm 방출로 형광을 판독한다. 모든 샘플 판독값에서 배양 배지(배경 대조구 웰)만 포함하는 컨트롤의 RFU를 빼서 배경값을 수정한다. 아래 공식을 사용하여 세포 독성의 백분율을 계산한다:

$$\% \text{ 세포독성} = [(RFU_{\text{배지}} - RFU_{\text{처리}}) / RFU_{\text{배지}}] \times 100\%$$

IC50은 다음 공식을 사용하여 GraphPad Prism을 사용하여 결정되었다:

$$Y=100/(1+10^{((\text{LogIC50}-X)*\text{힐 슬로프}))})$$

표 3

화합물 ID	세포 생존력 IC50 (μ g/ml)	
	VERO	HepG2
AKG-1	112.6	116.0
AKG-2	67.9	24.5
AKG-3	17.8	21.2
AKG-5	32.5	30.8
AKG-6	27.4	15.5
AKG-7	103.6	11.2

AKG-9	139.3	28.1
AKG-11	31.9	42.8
AKG-12	89.1	67.6
AKG-13	93.9	31.8
AKG-14	155.8	45.6
AKG-15	156.2	35.6
AKG-16	97	91
AKG-17	>250	37.3
AKG-18	>250	9.5
AKG-19	>250	42.2
AKG-20	>250	15.1
AKG-21	>250	156.3
AKG-22	57.7	17.2
AKG-23	>250	7.3
AKG-24	31.3	11.4
AKG-25	182	9.4
AKG-26	128.5	9.0
AKG-27	5.6	9.0
AKG-28	83.0	13.4
AKG-29	109.9	74.4
AKG-30	110.5	18.9
AKG-31	111.5	13.2
AKG-38	395	97
AKG-39	201	70
AKG-40	>250	113

[0680] 놀랍게도, 테디줄리드 포스페이트에 대한 활성 대사물 테디줄리드의 치환기를 모방하는 옥사줄리딘은 고리의 C5 측쇄 상에 하이드록실기를 함유하는 대부분의 유사체는 HepG2 간세포 세포주에 대해 한 자릿수 IC50을 나타내며 가장 간독성이 컸다. 테디줄리드는 현재 MRSA 치료용으로 승인된 가장 활성적인 옥사줄리딘이며, 테트라졸 D-고리, 피리딜 C-고리 및 아릴 B-고리에서 상기 기술된 화합물과 구조적 유사성을 가지고 있다(도 6 참조). 그러나 여기에서 간세포에 대한 증가된 독성은 C5 측쇄의 동일한 위치에 있는 아미노 또는 아세트아미드 기(AKG28-31, AKG38-40 및 AKG-3)를 갖는 것과 비교하여 C5 측쇄에 하이드록실기를 갖는 테옥사줄리딘(AKG-23, AKG-25, AKG-26 및 AKG-27)에 대한 낮은 선택성 지수를 유발한다.

[0681] 실시예 4. 선택성 지수의 결정

[0682] 포유동물 세포, 즉 각각 실험예 2 및 3에 기재된 바와 같은 아프리카 녹색 원숭이 신장(VERO) 또는 인간 간세포-유래(HepG2) 세포에 대한 것과 비교하여, 2개의 마이코박테리움 투베르쿨로시스 균주, Erdman 및 H37Rv에 대한 화합물의 상대적 억제 활성을 결정하기 위해 선택성 지수(SI)를 계산했다. 높은 SI는 체내 정상 세포에 덜 해로운 약물 농도에서 결핵 균주의 박테리아를 우선적으로 죽이는 것을 나타내므로 바람직하다. 선택성 지수는 아래 공식을 사용하여 계산되었다.

[0683]
$$SI = IC_{50, \text{포유동물}} / MIC_{\text{박테리아}}$$

[0684] 여기서 박테리아는 Erdman 또는 H37Rv 계통의 M. 투베르쿨로시스이고 포유류 세포는 VERO 또는 HepG2 세포주이다.

[0685] IC50이 VERO 또는 HepG2 세포에 대해 시험된 가장 높은 값보다 큰 경우, SI는 그 가장 높은 농도를 사용하여 계산된 비율보다 큰(>) 것으로 표시된다. 마찬가지로 Erdman 또는 H37Rv 균주의 MIC가 시험된 약물의 최고 농도(8 µg/ml)보다 큰 경우 SI는 해당 최고 농도를 사용하여 계산된 비율보다 작은(<) 것으로 표시된다. 두 숫자가 시험된 최고 농도보다 높은 계산값은 미결정(nd)으로 표시된다. 결과는 표 4에 제시되어 있다. SI는 마이코박테리아 균주 또는 포유동물 세포주에서 분자의 활성과 직접적으로 관련되지 않았고, 마이코박테리아 균주에서 증가된 효능은 포유동물 세포주에 대한 증가된 독성과 직접적으로 관련되지 않았다. 예를 들어, AKG-38은 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 두 변종 모두에 대해 나노몰의 MIC를 나타낸 반면 패닐의 다른 분자에 비해 VERO 및 HepG2 세포주 모두에 대해 상대적으로 비활성이어서 높은 SI를 제공했다. 이것은 AKG-28에서도 유사하게 나타났다. AKG-28과 AKG-38 두 분자 모두 테트라졸 고리의 2' 위치에 디메틸아미노에틸 치환기를 가지고 있다는 것은

주목할 만하다.

표 4

[0686]

화합물 ID	선택성 지수 (SI)			
	Erd/VERO	Erd/HepG2	H37Rv /VERO	H37Rv /HepG2
AKG-1	<14.1	<14.5	<14.1	14.5
AKG-2	<8.5	<3.1	<8.5	3.1
AKG-3	142.4	169.6	296.7	353.3
AKG-5	32.5	30.8	32.5	30.8
AKG-6	3.4	<1.9	<3.4	1.9
AKG-7	13.0	<1.4	<13.0	1.4
AKG-9	<17.4	<3.5	<17.4	3.5
AKG-11	8.0	10.7	8.0	10.7
AKG-12	22.3	16.9	22.3	16.9
AKG-13	<11.7	<4.0	<11.7	<4.0
AKG-14	19.5	5.7	19.5	5.7
AKG-15	<19.5	<4.5	<19.5	<4.5
AKG-16	388.0	364.0	388.0	364.0
AKG-17	>125	18.7	>125	18.7
AKG-18	>125	4.8	>125	4.8
AKG-19	>31.3	5.3	>31.3	5.3
AKG-20	>500	30.2	>500	30.2
AKG-21	nd	<19.5	nd	<19.5
AKG-22	57.7	17.2	115.4	34.4
AKG-23	>1000	29.2	>1000	29.2
AKG-24	31.3	11.4	31.3	11.4
AKG-25	182.0	9.4	182.0	9.4
AKG-26	64.3	4.5	64.3	4.5
AKG-27	11.2	18.0	11.2	18.0
AKG-28	2766.7	446.7	5533.3	893.3
AKG-29	439.6	297.6	879.2	595.2
AKG-30	884.0	151.2	884.0	151.2
AKG-31	223.0	26.4	223.0	26.4
AKG-38	6583.3	1616.7	6583.3	1616.7
AKG-39	402.0	140.0	402.0	140.0
AKG-40	>250.0	113.0	>500.0	226.0

[0687]

일부 실시양태에서, 관심 화합물은 100 초과, 200 초과, 300 초과, 400 초과, 500 초과, 1000 초과, 1500 초과, 2000 초과, 2500 초과, 3000 초과, 3500 초과, 4000 초과, 4500 초과, 5000 초과, 5500 초과, 6000 초과, 6500 초과, 100 내지 7000, 100 내지 6000, 100 내지 5000, 100 내지 4000, 100 내지 3000, 100 내지 2000, 100 내지 1000, 100 내지 900, 100 내지 800, 100 내지 700, 100 내지 600, 100 내지 500, 100 내지 400, 100 내지 300, 100 내지 200, 200 내지 7000, 200 내지 6000, 200 내지 5000, 200 내지 4000, 200 내지 3000, 200 내지 2000, 200 내지 1000, 200 내지 900, 200 내지 800, 200 내지 700, 200 내지 600, 200 내지 500, 200 내지 400, 200 내지 300, 300 내지 7000, 300 내지 6000, 300 내지 5000, 300 내지 4000, 300 내지 3000, 300 내지 2000, 300 내지 1000, 300 내지 900, 300 내지 800, 300 내지 700, 300 내지 600, 300 내지 500, 300 내지 400인 Erd/HepG2 및 H37Rv/HepG2에 대한 SI 지수를 갖는다. 일부 실시양태에서, 관심 화합물은 100 내지 1700, 200 내지 1700, 300 내지 1700 범위인 Erd/HepG2 및 H37Rv/HepG2에 대한 SI 지수를 갖는다. 옥사졸리딘은 고리의 C5 측쇄에 아미노 또는 아세트아미드 기를 갖고 테트라졸 고리의 2' 위치에 아미노알킬 기를 갖는 화합물은 C5 측쇄에 하이드록실 기를 갖는 화합물에 비해 비교적 더 높은 SI를 나타냈다. 또한, 특정 테트라졸 치환은 동일한 위치에서 메틸, 디에틸아미노에틸, 아미노에틸 또는 디메틸아미노프로필 치환보다 선호되는 테트라졸 고리의 2' 위치(AKG-28 및 AKG-38)에서 디메틸아미노에틸 치환으로 SI를 더욱 개선했다. 디메틸아미노에틸 그룹을 테트라졸 고리의 1' 위치로 옮기면(화합물 AKG-21 대 AKG-28) 예기치 않게 마이코박테리움 투베르쿨로시스에 대한 활성이 크게 손실되었다.

[0688] 실시예 5. 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)에 대한 시험관내 활성 분석.

[0689] 그람 양성 박테리아 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)에 대한 치료를 위한 리포솜 형태의 후속 전달을 정당화하기에 충분한 효능을 입증하기 위해 납 옥사졸리디논 억제제의 활성을 측정했다. 일부 실시양태에서, 평가된 3개의 균주 중 2개의 MIC는 6 $\mu\text{g/mL}$ 미만이다. 일부 실시양태에서, 3개의 평가된 균주 중 2개의 2 $\mu\text{g/mL}$ 미만의 MIC가 더 바람직하다.

[0690] 3개의 S. 아우레우스 균주를 5% 양 혈액 세포로 보충된 트립티카제 소이 아가 플레이트 상에서 주변 대기에서 37°C에서 밤새 성장시켰다. 배양물을 무균적으로 면봉으로 닦고 멸균수 튜브로 옮기고 광학 밀도를 600nm에서 0.5로 조정했다. 그런 다음 배양물을 1:100으로 희석하여 120 μL 에서 웰당 약 5×10^5 개 세포를 전달했다. 인큐베이션 후, 시험 항목의 MIC를 각 웰에서의 성장의 존재/부재에 의해 결정했다. MIC 분석은 세 번 수행되었다.

[0691] 테디졸리드는 미국 특허 제7,816,379호에 기술된 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 와 유사한 0.206-0.617 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 나타냈다. 흥미롭게도 옥사졸리디논 고리의 R2에서 1차 아민 변형이 있는 모든 분자(AKG-3, AKG-28, AKG-29 및 AKG-30)는 세 가지 MRSA 균주(>50 $\mu\text{g/mL}$) 모두에 대해 무시할만한 활성을 나타냈다. 동일한 위치에 아세트아미드 기를 갖는 분자(AKG-38, AKG-39 및 AKG-40)는 세 가지 MRSA 균주에 대해 테디졸리드 자체보다 3~9배 덜 활성적이었다.

표 5

화합물 ID	메티실린 내성 황색포도상구균 (MRSA)		
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
균주	ATCC BAA-1556	ATCC 43300	880 NR-49120
테디졸리드	0.617	0.617	0.206
AKG-3	50	50	50
AKG-16	1.85	1.85	1.85
AKG-22	1.85-5.55	16.67	5.55
AKG-28	>50	>50	>50
AKG-29	50	>50	50
AKG-30	>50	>50	>50
AKG-38	1.85	1.85	0.617
AKG-39	1.85	1.85	1.85
AKG-40	1.85	5.55	1.85

[0693] 실시예 6: 리포솜 조성물.

[0694] 일반 프로토콜.

[0695] 1. 지질 성분(인지질(PhL), 콜레스테롤, 및 선택적으로 - PEG-지질 유도체 및/또는 지질 형광 표지를 약 60mM 인지질로 지질 현탁액을 얻기 위해 계산된 부피의 1/10에 해당하는 100% 에탄올의 양(V)과 조합시키고 지질이 완전히 용해될 때까지 65-68°C의 온도에서 교반한다.

[0696] 중성 인지질은 디아실포스파티딜콜린, 디알킬포스파티딜콜린, 스펡고미엘린 및 디아실포스파티딜에탄올아민을 포함할 수 있다. 수소화된 소이포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린 및 계란 스펡고미엘린은 바람직한 인지질 중 일부이다.

[0697] PEG-지질 성분은 PEG(분자량 2,000)-디스테아로일글리세롤(PEG-DSG), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG-DSPE) 또는 N-팔미토일-스핑고신-1-{숙시닐[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)2000]}(PEG-세라마이드)을 포함할 수 있다. PEG-지질 성분의 분자량은 또한 1,500-6,000g/mol로 다양할 수 있지만 바람직하게는 약 2,000MW이다.

[0698] 지질 형광 표지는 1,1'-디옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸인도카보시아닌-5,5'-디설포산 (DiIC18(3)-DS), 1,1'-디옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸인도카보시아닌-5,5'-디설포산 (DiIC8(5)-DS), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-(시아닌 7) (18:0 Cy7 PE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N-(시아닌 7) (DSPE PEG(2000)-N-Cy7), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-(시아닌 5) (18:0 Cy5 PE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)-2000]-N-(시아닌 5) (DSPE PEG(2000)-N-Cy5), 1-올레오일-2-[12-[(7-니트로-2-1,3-벤즈옥사디

아줄-4-일)아미노]도데카노일]-sn-글리세로-3-포스포콜린 (18:1-12:0 NBD PC)을 포함할 수 있다.

- [0699] 2. 균일한 현탁액이 얻어질 때까지 65-68℃에서 교반하면서 에탄올성 지질 용액을 포획제 용액(0.25-0.5M 황산 암모늄 또는 1N 트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트)의 부피 V와 합쳤다.
- [0700] 잠재적 포획제는 0.1-2g - 당량/L(0.1-2 N), 바람직하게는 0.2-1.5 N의 농도로 수크로스 옥타설페이트, 암모늄 설페이트, 암모늄 시트레이트, 시트르산, 텍스트란 설페이트, 폴리비닐설포네이트, 또는 이노시톨 헥사포스페이트의 암모늄 염의 디에틸암모늄 또는 트리에틸암모늄 염을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 암모늄 염이 전형적으로 사용되며 암모늄 자체, 모노알킬-, 디알킬- 또는 트리알킬-암모늄 염을 포함할 수 있다.
- [0701] 3. 지질 현탁액을 트랙-에칭된 폴리카보네이트 막, 전형적으로 공칭 공극 크기가 100 nm인 2개 또는 4개 막 및 공칭 공극 크기가 200 nm인 1개(Whatman Nuclepore, USA) 막을 통해, 열배럴 압출기(Lipex, Canada)를 사용하여 65-68℃, 400-450 psi의 압력에서 적어도 3회 압출했다. 100ml Lipex 압출기에서 두 개의 100nm 막을 사용했을 때 압출 압력은 일반적으로 260-300psi였다. 생성된 리포솜은 Z-평균 입자 크기(직경) Xz가 약 80 내지 약 130nm이고 PDI가 0.1 미만이다.
- [0702] 4. 압출된 지질 현탁액(단일라멜라 및/또는 올리고라멜라 리포솜을 함유하는 것으로 알려짐)을 냉장고(2-8℃)에서 냉각시키고 양압 하에서 0.2-마이크론 폴리에테르설폰(PES) 막 필터를 통해 여과했다.
- [0703] 5. 이렇게 제조된 압출되고 여과된 리포솜 현탁액의 분취량을 중력-공급된 Sepharose CL-4B 크기 배제 컬럼(용리액 - 유형 1 물)에서 크로마토그래피하여 리포솜-외 포획제로부터 리포솜을 정제했다. 정제된 리포솜을 컬럼의 공극 부피 분획 근처에서 수집했다. 규모 확대 연구를 위해 이 단계는 중공 섬유 카트리지(500kDa의 MWCO를 포함하는 Repligen Spectrum MicroKros PS 또는 mPES 막)에서 접선 유동 여과(TFF)를 사용하여 수행되어 유형 1 또는 USP "주사용수" 내독소가 없는 물을 사용하여 8-10 부피 교환을 실행했다(또는 리포솜 현탁액의 전도성이 200 µS/cm 미만으로 떨어질 때까지).
- [0704] 6. 정제된 압출된 리포솜 제제에서 지질 농도는 콜레스테롤의 농도를 측정하고 공지된 인지질/콜레스테롤 물비를 보정함으로써 UV 검출과 함께 HPLC를 사용하여 결정되었다. 대안적으로, 인지질 함량을 직접 정량화하기 위해 분광광도 블루 포스포몰리브데이트 방법을 사용했다.
- [0705] 7. 약물은 5-20 mg/ml의 약물 농도에서 염산 염의 형태로 타입 1 또는 내독소가 없는 순수한 물에 용해되었다(예를 들어, AKG-3 및 AKG-5는 모노하이드로클로라이드로 사용되었고, AKG-28 및 AKG-29는 다이하이드로클로라이드로 사용됨). 유리 염기 형태로 제조된 약물(예를 들어, AKG-16, AKG-38)에 동량의 HCl을 첨가했다. 필요한 경우 1N NaOH, HCl 또는 트리스(히드록시메틸)아미노메탄(Tris)-염기 용액을 사용하여 용액의 pH를 2.5-5.5 사이로 조정하고 양압 하에서 0.2-마이크론 PES 필터를 통해 여과했다. 필요한 경우, 이렇게 만들어진 스톱 용액의 약물 농도는 305nm에서 UV 검출을 사용한 HPLC에 의해 확인되었다.
- [0706] 8. 단계 5의 정제된 리포솜 및 약물 스톱 용액을 원하는 약물-대-인지질(DL) 비율, 단계 2의 포획제 용액의 측정된 삼투압과 동일한 삼투압에서 1.5-3.3 mg/ml 범위의 농도를 제공하는 데 필요한 양의 삼투압제(일반적으로 텍스트로스) 및 물의 존재 하에 조합했다. 임의로, 소정의 pH(일반적으로 pH 4 내지 pH 7)의 완충액을 첨가했다. 일부 경우에, 첨가된 삼투압제의 양(예를 들어, 약 45g/L의 텍스트로스)은 포획제 용액의 측정된 삼투압보다 적은 삼투압을 제공했고, 로딩은 약물의 6-8mg/ml에서 실행했다.
- [0707] 9. 약물-리포솜 혼합물을 65-68℃에서 약 15-20분 동안 일정하게 교반하면서 배양하고 얼음 위에서 빠르게 냉각시켰다. 5-10분 후, 계산된 양의 3M NaCl 스톱 용액을 첨가하여 혼합물을 주위 온도에 도달시키고 0.1M NaCl로 조정했다.
- [0708] 10. 중력-공급 Sepharose CL-4B 컬럼, 용리액 - 140-144mM NaCl 중 10mM HEPES-완충액 pH 7.0 상에서 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 캡슐화되지 않은 약물로부터 약물-로딩된 리포솜을 정제했다(HBS-7). 리포솜 분획은 컬럼 공극 부피 근처에서 수집했다. 규모-확대 연구를 위해, HBS-7 완충액으로 10회 부피 교환을 사용하여 상기 항목 5에 기술된 바와 같이 TFF를 사용하여 정제 및 완충액 교환을 수행했다. 규모-확대된 공정에서는 일반적으로 약 8개의 부피 교환이 사용되었다. 임의로, 정제된 리포솜은 완충액 공급 없이 TFF 공정을 계속하여 농축했다. 정제된, 약물-로딩된 리포솜을 양압 하에서 0.2 마이크론 멸균 PES 필터를 사용하여 무균 여과하고 냉장고(2-8℃)에 보관했다.
- [0709] 11. 정제된 약물-로딩된 리포솜 제제에서 약물 및 지질 농도를 HPLC로 측정했다. 대안적으로, 인지질 정량화를 위해 분광광도계(블루 포스포몰리브데이트) 방법이 사용되었고, 약물은 6.5mg/ml 도데실황산나트륨의 존재 하에

70% 이소프로판올-0.1N HCl에 용해된 리포솜 샘플에서 UV 흡수(302-305nm)에 의해 정량화되었다. 캡슐화 효율은 다음과 같이 결정되었다:

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

여기서 DLO는 SEC 또는 TFF 정제 전 리포솜 로딩 혼합물의 약물 대 인지질 비율이고 DL은 정제 후 약물-로딩된 리포솜의 약물 대 인지질 비율이다(단계 10).

12. 평균 리포솜 크기(Z-평균 직경, X_z) 및 다분산 지수(PDI)를 Zeta크기 μ -V, Zeta크기 μ -Nano 또는 Zeta크기 μ -Pro(Malvern Panalytical, US)의 누적법에 의한 동적 레이저 산란을 사용하여 결정했다.

실시예 7. 리포솜의 생체 내 안정성 및 혈액 청소율

약물 캡슐화의 안정성 및 본 발명의 화합물을 캡슐화하는 리포솜의 혈액 청소율을 하기 일반 프로토콜에 따라 마우스에서 연구했다. 주어진 실험실 군주 (C3H 암컷 또는 CD-1 수컷)의 마우스 3마리 그룹에 체중 1kg당 약물 9mg의 용량으로 꼬리 정맥을 통해 약물-로딩된 리포솜을 주사했다. 시점 1과 2에서 안와후동에서 혈액을 채취하고 동물을 희생시켰다. 전형적으로, 혈액 샘플링 시점은 주사 후 5분, 1시간, 6시간 및 24시간을 포함했다. 혈장을 원심분리에 의해 분리하고, 임의로 가용화제(옥탄올판산나트륨)를 함유하는 산성화된 이소프로판올로 추출하고, HPLC로 약물 및 지질(리포솜이 지질 표지를 혼입한 경우, DiIC18(3)-DS)을 분석했다. 리포솜 약물의 혈액 청소율은 주어진 시점에 남아있는 주입된 용량의 백분율로 표현되었다. 약물 캡슐화의 생체내 안정성은 주사-전 DL 값과 비교하여 주어진 시점에서 혈장에서 DL 비율의 백분율 변화(감소)에 의해 평가되었다.

실시예 8. 상이한 pH에서 리포솜 내로의 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16의 로딩

산업용 칼륨 수크로스 옥타설페이트 7수화물(물 145ml 중 40.2g)의 용액을 수소 형태의 Dowex 50Wx8 100-200 메쉬의 500-ml 이온 교환 컬럼을 통해 통과시키고 생성된 유리산 형태의 수크로스 옥타설페이트를 순수한 트리에틸아민을 사용하여 pH 6.2로 적정하여 트리메틸암모늄 수크로스 옥타설페이트 포획제 용액을 제조했다. TEA-SOS(트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트)의 농도(1 N, 0.125 M 수크로스 옥타설페이트에 해당)는 적정에서 소비된 트리에틸아민의 양으로부터 추정되었다. 잔류칼륨은 Horiba LAQUATwin K-11 칼륨분석기로 첨가법으로 추정하였으며 초기 칼륨량의 0.1% 미만이었다.

포획제로서 1 N 트리에틸암모늄 수크로스 옥타설페이트(TEA-SOS)를 사용하여 수소화 대두 포스파티딜콜린(HSPC)(Lipoid, Germany), 콜레스테롤(몰비 3:2), 및 1,2-디스테아로일글리세롤의 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 에테르(PEG-DSG, PEG 분자량 2000, NOF, Japan) (HSPC의 0.5 mol.%)로 구성된 리포솜을 본질적으로 상기 일반 프로토콜에 기재된 바와 같이 제조했다. 약물 로딩 단계는 4.3-7.1 범위의 pH를 갖는 16mM 모르폴리노에탄설펜산(MES)-4mM 구연산나트륨 완충액의 존재 하에, 또한 임의의 완충 물질(pH 5.2-5.9)의 첨가 없이 500g/mol PhL의 DL 비율(DLO)에서 수행되었다. 모든 약물은 pH의 전체 연구 범위에서 고효율(98% 이상, pH 4.38에서 AKG-16은 93.3%의 효율로 로딩됨)로 리포솜으로 캡슐화되었다(도 1). 효율적인 캡슐화를 위해 완충 물질의 첨가가 필요하지 않았다.

실시예 9. TEA-SOS 포획제를 사용한 상이한 DL 비율에서의 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16의 리포솜 내로의 캡슐화.

포획제로서 1 N TEA-SOS를 포함하는 HSPC, 콜레스테롤(3:2 몰비) 및 PEG-DSG(HSPC의 0.5 mol.%)로 구성된 리포솜을 본질적으로 일반 프로토콜(실시예 6)에 기재된 바와 같이 제조했다. 완충 물질(pH 4.98-6.22)의 첨가 없이 750-1500 g/mol PhL 범위의 DLO 비율에서 약물 로딩 단계를 수행했다. 화합물 3, 5 및 16에 대한 최대 약물 부하량은 각각 900-930 g/mol PhL, 982-1197 g/mol PhL 및 938-951 g/mol PhL 범위에서 관찰되었으며 최대 약물 부하에서 또는 그 근처에서의 부하 효율은 각각 97.6%, 96.0% 또는 85.2% 이상이었다(도 2A 및 도 2B).

실시예 10. 더 높은 수준의 PEG화로 또는 포획제로서 0.25M 황산암모늄(AS)을 사용한 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16의 리포솜 내로의 캡슐화.

다양한 PEG-DSG 함량을 갖는 HSPC 및 콜레스테롤(몰비 3:2)로 구성된 리포솜 및 포획제를 일반 프로토콜에 따라 제조하고 실시예 9에서와 같이 화합물 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16을 250 또는 500g/mol PhL의 DLO 비율에서 로딩했다. 세 화합물 모두 아래 표 6에 나타난 바와 같이 고효율로 리포솜에 로딩되었다.

표 6

PEG-DSG, PhL의 mol%	포획제	DLO 비율 g/mol PhL	약물 로딩 효율		
			AKG-3	AKG-5	AKG-16

0.5*	1 N TEA-SOS	500	100.8	101.3	102.6
5	1 N TEA-SOS	500	107.4	99.3	104.8
0.5	0.25 M AS	250	100.4	98.5	90.6
0.5	0.25 M AS	500	80.3	97.7	82.9

[0723] *이 줄의 데이터는 실시예 8, "추가 버퍼 없음" 로딩에서 가져온 것임. 따라서, 화합물 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16은 증가된 수준의 PEG화 및 리포솜내 약물 포획제로서 황산암모늄과 함께 인지질-콜레스테롤 리포솜에 효과적으로 로딩되었다. 그러나 포획제로 0.25M 황산암모늄을 사용하여 500g 약물/mol PhL의 더 높은 약물-대-지질 비율로 로딩시 세 가지 옥사졸리디논 중 두 가지(AKG-3 및 AKG-16)에서 로딩 효율이 감소했다.

[0724] 실시예 11. 포획제로서 0.5 M AS를 사용한 화합물 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16의 리포솜 내로의 로딩.

[0725] 0.5 mol% 또는 5 mol% PEG-DSG(PhL에 대해) 및 포획제로서 0.5 M 황산암모늄(AS)을 갖는 HSPC 및 콜레스테롤 (3:2 몰비)로 구성된 리포솜을 일반 문헌에 따라 제조하고 실시예 8에서와 같이 화합물 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16을 500-1500 g/mol PhL 범위의 DL0 비율로 로딩했다. 결과는 도 3A, 도 3B, 도 3C 및 도 3D에 도시되어 있다. 세 화합물 모두 93-100%의 캡슐화 효율로 420-450g/mol PhL의 DL 비율로 두 리포솜에 로딩되었다. 최대 약물 패이로드의 다음과 같다.

표 7

[0726]

약물	최대 캡슐화된 약물 패이로드, g/mol PhL	
	0.5 mol% PEG	5 mol% PEG
AKG-3	590	600-606
AKG-5	627	nd
AKG-16	668-675	614-619

[0727] 시험된 모든 세 화합물은, 0.5 mol% PEG-DSG를 포함하는 제제, 및 화합물 AKG-3 및 AKG-16에 대해, 5 mol% PEG-DSG를 함유하는 제제에 대해, 500 g 약물/mol PhL 초과로 0.5 M 황산암모늄 리포솜 내로 로딩될 수 있었다. 이러한 높은 수준의 로딩은 질병 치료를 위해 투여된 약물의 충분한 용량에 도달할 수 있다는 점에서 중요하다. 로딩은 0.25M 황산암모늄을 사용하여 로딩 효율이 더 낮은 실시예 10에 비해 상당히 개선되었으며, 이는 0.5M의 더 높은 황산암모늄 농도가 더 높은 삼투압 및 삼투 파열 가능성에도 불구하고 인지질 1몰당 담지할 수 있는 약물의 양에 대해 개선되었으며, 낮은 독성과 고용량으로 향상된 결과를 유발할 수 있는 항감염제에 적합함을 입증한다. 실시예 12. 화합물 AKG-3, AKG-5, AKG-16, 및 AKG-28의, 형광 지질 표지를 포함하는 다양한 조성의 리포솜 내로의 로딩.

[0728] 0.5mol% PEG-DSG(PhL 대비), 0.15mol.% 지질 형광 표지 DiIc18(3)-DS(ThermoFisher, USA), 및 포획제로서 0.5 M 암모늄 설페이트(AS) 또는 1N TEA-SOS 0.5mol%를 갖는 HSPC 및 콜레스테롤(60:40 몰비)로 구성된 리포솜을 일반 프로토콜에 따라 제조하고 실시예 11에서와 같이 pH 4.7-5.8에서 화합물 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16을 로딩했다 (추가 완충 물질 없음). 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다:

표 8

[0729]

배치 ID	화합물	포획제	DL0, g/mol PhL	캡슐화된 약물, g/mol PhL	리포솜 z-평균 크기, nm	리포솜 PDI
76	AKG-3	1 N TEA-SOS	500	497.0	112.7	0.008
85	AKG-3	1 N TEA-SOS	1000	830.7	104.3	0.111
78	AKG-3	0.5 M AS	693	632.9	104.9	0.013
79	AKG-5	1 N TEA-SOS	500	515.6	114.3	0.124
80	AKG-5	1 N TEA-SOS	1000	1003.2	110.5	0.071
81	AKG-5	0.5 M AS	693	709.3	111.4	0.060
82	AKG-16	1 N TEA-SOS	500	489.2	114.8	0.046
86	AKG-16	1 N TEA-SOS	1000	854.2	107.6	0.097
84	AKG-16	0.5 M AS	693	708.0	112.6	0.092

[0730] 세 가지 약물 모두 리포솜에 효율적으로 로딩되었다. 리포솜 로딩 동안 AKG-5의 분해는 HPLC에서 두 번째 피크

의 출현으로 검출되었다. 다양한 양의 PEG-DSG 또는 N-메톡시폴리(에틸렌글리콜)옥시카보닐-1,2-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (PEG-DSPE, PEG 분자량 2000, Lipoid, Germany), 및 지질 형광 표지 DiIC18(3)-DS (PhL에 대해 0.15 mol.%)를 함유하는, 다양한 인지질 (HSPC, 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC, Avanti Polar Lipids, USA), 또는 달걀 스펅고미엘린 (ESM, Lipoid, Germany) 및 콜레스테롤 (60:40 몰비)로 구성된 리포솜을 동일한 일반 프로토콜에 따라 상이한 포획제로 제조하고 유사한 방식으로 AKG-16을 로딩했다. 표시된 경우, 일반 프로토콜의 리포솜 압출 단계는 50nm 기공 크기를 가진 두 개의 적층된 폴리카보네이트 막을 통한 압출로 보완되었다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다:

표 9

[0731]

배치 ID	포스포-지질	50 nm 압출	PEG-지질 (mol.%)	포획제	DL0 비율 g/mol PhL	약물 로드, g/mol PhL	리포솜 z-평균 크기, nm	PDI
88	HSPC	없음	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	500	547.0		
90	DSPC	있음	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	500	514.0	83.3	0.182
91	DSPC	있음	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	1000	599		
93	HSPC	없음	PEG-DSG (5)	1 N TEA-SOS	500	490.2	108.6	0.046
94	DSPC	없음	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	500	504.0	112.7	0.081
95	ESM	없음	PEG-DSG (0.5)	1 N TEA-SOS	500	539.9	101.3	0.074
97	HSPC	있음	PEG-DSPE (9.2)	0.25M AS	150	128.2	81.5	0.073

[0732]

포획제로서 9.2 mol% PEG-DSPE (PhL에 대해), 0.15 mol.% 지질 표지 DiIC18(3)-DS, 및 0.25 M 암모늄 설페이트 (AS)를 갖는 HSPC 및 콜레스테롤 (3:2 몰비)로 구성된 리포솜을 부가적 50-nm 압출과 함께 일반 프로토콜 및 실시예 12에 따라 제조하고 150 g/mol PhL 약물-지질 비율 (DL0)에서 AKG-28을 로딩했다. 리포솜(배치 ID 98)은 73.8g/mol PhL의 DL 비율, Z-평균 리포솜 크기 77.8nm 및 크기 다분산 지수(PDI) 0.090을 갖는다. 이들 연구는 AKG-3, AKG-5 및 AKG-16이 중성 인지질 성분으로서 HSPC, DSPC 또는 ESM을 포함하는 지질 조성의 범위를 갖는 리포솜 내로 낮은(0.5mol%) 또는 높은(5mol%) PEG-지질 함량으로 효율적으로 로딩될 수 있음을 입증한다. 그러나 효율은 1 N TEA-SOS에 비해 0.25 M AS를 사용할 때 약 500 g AKG-16/mol PhL에서 128 g AKG-16/mol PhL로 크게 감소했다. 0.25M AS로 AKG-28을 로딩할 때 유사한 낮은 로딩 효율(즉, 73.8g/mol PhL)이 관찰되었다. 이는 TEA-SOS 또는 더 높은 농도의 AS가 고농도의 화합물을 리포솜에 로딩하는 데 바람직할 수 있음을 시사한다.

[0733]

실시예 13- 마우스에서 실시예 12의 리포솜의 혈액 지속성 및 생체내 캡슐화 안정성.

[0734]

연구는 상기 일반 프로토콜에 기술된 바와 같이 수컷 CD-1 마우스에서 수행되었다.

표 10

[0735]

리포솜 배치 ID	% ID 혈장 내 (리포솜 지질)		% 초기 DL 비율	
	5 min	6 시간	5 min	6 시간
88	82.4 ± 9.8	30.6 ± 7.0	89.2 ± 0.6	75.6 ± 2.7
90	84.7 ± 1.2	35.2 ± 5.1	95.9 ± 0.2	81.0 ± 2.5
93	85.4 ± 3.5	38.2 ± 1.4	94.5 ± 0.5	82.9 ± 1.1
94	83.1 ± 6.1	23.9 ± 1.2	97.7 ± 0.5	89.2 ± 0.0
95	79.3 ± 3.5	36.7 ± 2.0	97.9 ± 0.8	101.9 ± 8.8
96	80.2 ± 4.3	39.7 ± 7.0	102.8 ± 1.7	99.2 ± 2.8
97	83.5 ± 6.9	34.4 ± 2.8	88.7 ± 10.8	3.7 ± 0.3
98	80.3 ± 6.6	43.7 ± 4.7	100.2 ± 2.8	86.7 ± 1.1

[0736]

이들 연구는 TEA-SOS 포획제를 사용하여 다양한 중성 인지질 성분(HSPC, DSPC 또는 SM)으로 구성되고 AKG-16으로 로딩된 리포솜이 천천히 제거되어 대부분의 제제에 대해 6h에서 주사 용량의 30% 초과가 혈장에 남아 있음을 입증한다. 또한, 대부분의 제제는 0.25 M AS를 사용하여 로딩된 AKG-16을 포함하는 리포솜 배치 ID 97을 제외하

고는 약물의 우수한 보유율을 나타냈으며, 이는 0.25 M 황산암모늄을 사용하여 약물을 로드하는 것이 표 9에 나타난 바와 같이 낮은 로딩 효율을 초래할 뿐만 아니라 또한 이 제제에서 리포솜으로부터 상당한 누출로 인해 6 시간에서 낮은 DL 비율(3.7%)을 초래함을 제안한다. **실시예 14.** 상이한 DL 비율에서, 다양한 포획제를 사용한 화합물 AKG-28 및 AKG-38의 리포솜 내로의 캡슐화.

[0737] 포획제로서 0.5 mol% PEG-DSG(PhL에 대해), 0.15 mol.% 지질 표지 DiIC18(3)-DS, 및 0.5 M 황산 암모늄(AS) 또는 1N TEA-SOS를 갖는, HSPC 및 콜레스테롤(3:2 몰비)로 구성된 리포솜을 일반 프로토콜에 따라 제조하고 실시예 8에서와 같이 pH 4.95-5.17(완충제 물질 첨가 없음) 및 300-1050 g/mol PhL(AKG-28) 또는 400-1400 g/mol PhL(AKG-38) 범위 내 DL0 비율로 화합물 AKG-28 및 AKG-38을 로딩했다. 0.5 M AS를 사용하여, 화합물 AKG-28 및 AKG-38에 대한 최대 약물 부하는 각각 404-424 g/mol PhL 및 818-842 g/mol PhL 범위였으며, 95% 이상의 부하 효율은 각각 302g/mol PhL(정량적 부하) 및 387-764g/mol PhL(95.5-96.7% 부하)의 약물 부하에서 얻었다. 1 N TEA-SOS를 사용하여 화합물 AKG-28 및 AKG-38에 대한 최대 약물 부하는 각각 315-328 g/mol PhL 및 989 g/mol PhL 범위였으며 최대 부하 효율은 각각 250g/mol PhL 및 400-777g/mol PhL(97.2% 이상 로딩)의 약물 부하(**도 4A 및 도 4B**)에서 83.5%였다.

[0738] AKG-38은 400 내지 800g AKG-38/mol PhL 사이에서 거의 정량적 로딩을 나타냈고, 반면에 생성된 약물-대-지질 비는 250-1000g AKG-28/mol PhL 범위에 걸쳐 AKG-28에 대해 평탄하게 유지되어서 AKG-38보다 AKG-28에 대해 더 낮은 최대 약물 부하를 제안한다. AKG-28에 대해 이전에 입증된 더 높은 효능은 AKG-28의 리포솜 제제가 결핵과 같은 감염성 질병을 치료하는 데 효과적이도록 함을 이해해야 한다.

[0739] **실시예 15. 화합물 다양한 인지질 조성, PEG화 정도 및 포획제를 갖는 리포솜 내로의 AKG-28 및 AKG-38의 캡슐화.**

[0740] 포획제로서 0.5 M AS 또는 1 N TEA-SOS를 포함하는 인지질(PhL) 및 콜레스테롤(3:2 몰비), PEG-DSG, 및 DiIC18(3)-DS(PhL의 0.15 몰%)로 구성된 리포솜을 일반 프로토콜에 따라 제조하고 약물 부하 및 캡슐화 효율(EE)을 최적화하도록 선택된 DL0 비율로 화합물 AKG-28 및 AKG-38(완충제 물질이 첨가되지 않은 경우)을 로딩했다. 결과는 하기 표 10 및 11에 있다.

표 11

[0741] 화합물 AKG-28의 캡슐화.

배치 ID	PhL	PEG-DSG, PhL의 mol%	포획제	DL0 비율 g/mol PhL	약물 로드, g/mol PhL	EE, %	리포솜 z-평균 크기, nm	리포솜 PDI
128	HSPC	0.5	0.5M AS	300	265.9	88.6	116.7	0.031
129	HSPC	0.5	1N TEA-SOS	300	273.9	91.3	115.2	0.038
130	HSPC	5	1N TEA-SOS	300	260.4	86.8	109.2	0.031
131	ESM	0.5	1N TEA-SOS	300	109.4	36.5	109.8	0.054
138	HSPC	0.5	0.5M AS	400	260.4	65.1		
139	HSPC	0.5	0.5M AS	400	232.2	58.1		

표 12

[0742] 화합물 AKG-38의 캡슐화.

배치 ID	PhL	PEG-DSG, PhL의 mol%	포획제	DL0 비율 g/mol PhL	약물 로드, g/mol PhL	EE, %	리포솜 z-평균 크기, nm	리포솜 PDI
132	HSPC	0.5	0.5M AS	600	532.1	88.7	127	0.023
133	HSPC	0.5	1N TEA-SOS	600	590.7	98.5	115.1	0.019
134	HSPC	5	1N TEA-SOS	600	565.6	94.3	110.6	0.074
135	ESM	0.5	1N TEA-SOS	600	529.3	88.2	106.7	0.049
140	HSPC	0.5	0.5M AS	800	739.5	92.4		
141	HSPC	0.5	1N TEA-SOS	800	864.0	108.0		

[0743] 본 실시예는 AKG-28이 230-275g AKG-28/mol PhL 사이의 최대 약물 부하로, 포획제로서 0.5 M AS 또는 1 N TEA-SOS를 사용하여 HSPC로 구성된 리포솜에 효율적으로 로딩될 수 있음을 나타낸다. 그러나, 이 화합물에 대한 중

성 인지질로서 스펅고미엘린을 함유하는 제제는 단지 최대 약 110g AKG-28/mol PhL로, 비교적 낮은 로딩을 나타냈다. 화합물 AKG-38은 약물이 600g AKG-38/mol PhL으로 첨가되었을 때 0.5M AS 또는 1N TEA-SOS를 사용하여 525-600g/mol 사이의, 800g AKG-38/mol PhL에서 첨가될 때 735g/mol보다 큰 상당히 더 높은 D/L 비율로 로딩되었다. 화합물 AKG-38에 대한 로딩은 AKG-28보다 스펅고미엘린의 존재에 덜 민감했다.

실시예 16. 증가된 PEG화 및 포획제로서 0.5M 황산암모늄을 사용한, 화합물 AKG-16, AKG-28, AKG-29 및 AKG-38의 리포솜 내로의 캡슐화.

포획제로서 0.5 M 황산암모늄을 갖고 HSPC 및 콜레스테롤(3:2 몰비), PEG-DSG(5 mol.%) 및 DiIC18(3)-DS(0.15 mol.%)로 구성된 리포솜을 일반 프로토콜에 따라 제조하고 약물 부하 및 캡슐화 효율(EE)을 최적화하도록 선택된 DLO 비율로 화합물 AKG-16, AKG-28, AKG-29 또는 AKG-38(완충제 물질이 첨가되지 않은 경우)을 로딩했다. 그 결과는 하기 표 13에 있다.

표 13

배치 ID	화합물	DLO 비율, g/mol PhL	약물 로드, g/mol PhL	EE, %
145	AKG-16	600	598.9	99.8
142	AKG-28	300	292.3	97.4
143	AKG-29	300	43.6	14.5
144	AKG-38	600	506.2	84.4

이 데이터는 테트라졸 고리의 2번 위치에 디메틸아미노에틸 치환체를 함유하는 모든 화합물이 80% 초과로 리포솜에 효율적으로 로딩된 반면, 동일한 위치에 아미노에틸 치환체가 있는 AKG-29는 14.5%의 효율성과 43.6g AKG-29/mol PhL의 최종 약물 부하로 리포솜에 제대로 로딩되지 않았다는 것을 나타낸다. 이는 시험한 모든 화합물에 적정 가능한 아민이 존재함에도 불구하고 테트라졸 고리에 치환된 암모늄(예를 들어 N,N-디메틸아미노에틸 그룹)이 있는 화합물이 동일 위치에서 예기치 않게 1차 아민(아미노에틸기)을 가진 화합물보다 더 효율적인 약물 부하를 허용한다는 것을 나타낸다. **실시예 17. 마우스에서 실시예 15 및 16의 리포솜의 혈액 지속성 및 생체 내 캡슐화 안정성.**

연구는 상기 일반 프로토콜에 기술된 바와 같이 수컷 CD-1 마우스에서 수행되었다.

표 14

리포솜 배치 ID	%ID 혈장 내 (리포솜 지질)		% 초기 DL 비율	
	5 min	6 시간	5 min	6 시간
128	80.6 ± 1.3	34.9 ± 0.8	75.2 ± 1.1	67.9 ± 4.0
129	83.6 ± 0.6	42.2 ± 3.4	95.7 ± 0.9	88.7 ± 3.1
130	83.4 ± 11.9	54.6 ± 3.8	94.4 ± 4.0	93.2 ± 1.1
132	83.2 ± 8.3	42.4 ± 1.7	48.6 ± 0.2	29.5 ± 0.5
133	71.3 ± 6.0	21.9 ± 8.1	97.3 ± 2.6	93.2 ± 4.3
134	78.8 ± 2.3	46.5 ± 3.2	93.8 ± 2.6	83.3 ± 4.7
135	77.9 ± 3.6	38.7 ± 2.9	102.6 ± 2.5	102.3 ± 1.8
142	80.9 ± 2.9	48.9 ± 2.8	52.9 ± 1.1	40.0 ± 0.3
144	83.3 ± 5.6	42.0 ± 4.4	50.4 ± 1.1	24.0 ± 0.5
145	80.6 ± 1.3	40.3 ± 0.1	41.4 ± 1.7	13.1 ± 0.0

데이터는 포획제로서 모두 0.5 M AS를 갖는 리포솜 배치 ID 128, 132, 142, 144, 및 145에서 약물은, 5분에서의 낮은 DL 비율 및 추가로 6시간에서의 DL 비율의 감소로 나타난 바와 같이 혈액과 접촉시 거의 즉시 캡슐화된 약물의 25-60%를 소실함을 보여주었고, 특히 AKG-38 및 AKG-16-로딩된 리포솜에 대해 현저했다. 따라서, 0.5 mol% 또는 5 mol% PEG-DSG 및 40 mol% 콜레스테롤, 0.5 M AS(포획제로서)의 제형은 5분 및 6시간 시점 모두에서 초기 DL 비율의 %가 80%보다 컸던 1N TEA-SOS(리포솜 배치 ID 129, 130, 133-135))를 사용하는 제형만큼 효율적으로 약물을 보유할 수 없었다. **실시예 18. 다양한 비율의 인지질-대-콜레스테롤을 사용한 AKG-28 및 AKG-38의 제조 및 폐기화된 리포솜으로의 로딩.**

5mol% PEG-DSG 또는 PEG-DSPE(PhL에 대해), 0.15mol.% 지질 표지 DiIC18(3)-DS, 및 포획제로서 0.5M 황산암모

늄(AS) 또는 1N TEA-SOS를 함유하는 리포솜 제제를 일반 프로토콜에 따라 제조하고 실시예 8에서와 같이 pH 5.07-5.82(완충 물질 첨가 없음)에서 화합물 AKG-28 및 AKG-38로 로딩했다.

[0752] 혈액과의 접촉 시 신속한 약물 방출(실시예 17에 기재된 바와 같음)에 대해 포획제에서 0.5 MAS를 갖는 리포솜을 안정화하려는 시도로, DSPC(HSPC에 비해 비교하여 더 많은 약물 누출-안정성 리포솜을 생성하는 것으로 일반적으로 공지됨) 및 감소된 비율의 콜레스테롤(Chol)을 사용한 리포솜을 제조하고 DLO 250g/mol PhL에서 AKG-28, 또는 600g/mol PhL에서 AKG-38을 로딩했다(표 15). 예상과 달리, 콜레스테롤 함량을 40mol%에서 10mol%로 감소시키면 AKG-28 및 AKG-38 모두에 대해 캡슐화 효율이 극적으로 감소되었다. 더 낮은 콜레스테롤은 또한 응집에 대해 리포솜을 불안정화시켰다. 30mol.% 콜레스테롤(PhL-콜레스테롤 몰비 70:30)에서, 1N TEA-SOS 및 5mol%의 PEG-DSG 또는 PEG-DSPE를 사용하여 만든 AKG-28 함유 리포솜은 30mol% 콜레스테롤, AKG-38의 5mol% PEG-DSPE 함유 제형과 마찬가지로 약물 로딩 동안 비가역적으로 응집되었고, 반면 30mol% 콜레스테롤에서의 AKG-38의 5mol% PEG-DSG 제형은 77.1% 또는 462.4g /물 PhL의 감소된 로딩 효율을 나타냈다.

표 15

[0753]

배치 ID	화합물	PEG-지질 (지질 부분)	포획제	Chol (mol %)	약물 로드, (g/mol PhL)	EE, (%)
158	AKG-28	DSG	0.5 M AS	40	231.2	92.5
159	AKG-28	DSG	0.5 M AS	30	173.5	69.4
160	AKG-28	DSG	0.5 M AS	20	116.4	46.6
161	AKG-28	DSG	0.5 M AS	10	92.4	36.9
162	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	30	130.5	52.2
166	AKG-38	DSG	0.5 M AS	40	462.8	77.1
167	AKG-38	DSG	0.5 M AS	30	280.2	46.7
168	AKG-38	DSG	0.5 M AS	20	120.0	20.0
169	AKG-38	DSG	0.5 M AS	10	69.8	11.6
170	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	30	114.9	19.1

[0754] 대조적으로, HPSC를 사용하여 제조되고 40mol% 이상의 콜레스테롤, 최대 65mol%의 콜레스테롤(최대 연구)을 함유하는 리포솜은 AKG-28(DLO 250g/mol PhL) 및 AKG-38(DLO 500g/mol PhL) 둘 다, PEG-지질(PEG-DSG 및 PEG-DSPE) 및 포획제(AS 또는 TEA-SOS)에 대해 87% 이상의 우수한 캡슐화 효율을 나타내었고 리포솜 응집이 없었다(표 16). 또한, 0.5 M AS 및 1 N TEA-SOS 제형 둘 다에서, 이 부류의 현재 치료 표준 약물인 리네졸리드를 로딩하기 위한 최적화된 제형의 가능성을 평가했다. 테디졸리드는 실시예 6의 일반 프로토콜에 따라 리포솜으로의 막형단 구매-보조 로딩을 수행하기에는 물에 충분히 용해되지 않았다. 리네졸리드를 사용한 두 경우 모두에서 캡슐화 효율은 5% 미만이었으며, 이는 이들 AKG-28 및 AKG-38의 리포솜 제제가 리네졸리드 대비 안정적으로 약물을 봉입하는 능력이 월등히 뛰어난을 입증한다.

[0755] 리포솜의 Z-평균 크기(x_z) 및 다분산 지수(PDI)는 173° 측정 각도에서 Malvern Zetasizer Pro(Malvern Panalytical)를 사용하는 동적 광 산란(DLS) 누적법에 의해 결정되었다.

표 16

[0756]

배치 ID	화합물	PEG-지질 (지질 부분)	포획제	Chol (mol %)	약물 로드, (g/mol PhL)	리포솜 평균 크기 x_z , nm	다분산 지수	EE, (%)
174	AKG-28	DSG	0.5 M AS	40	249.8			99.9
175	AKG-28	DSG	0.5 M AS	45	253.9			101.6
176	AKG-28	DSG	0.5 M AS	50	252.6			101.0
201	AKG-28	DSG	0.5 M AS	55	228.2	107.2	0.0495	91.3
202	AKG-28	DSG	0.5 M AS	60	233.0	109.4	0.0333	93.2
203	AKG-28	DSG	0.5 M AS	65	235.3	111.0	0.0359	94.1
177	AKG-28	DSG	1 N TEA-SOS	40	223.5			89.4
178	AKG-28	DSG	1 N TEA-SOS	45	258.7			103.5
179	AKG-28	DSG	1 N TEA-SOS	50	259.5			103.8
180	AKG-38	DSG	0.5 M AS	40	440.4			88.1
181	AKG-38	DSG	0.5 M AS	45	488.7			97.7

182	AKG-38	DSG	0.5 M AS	50	468.4			93.7
207	AKG-38	DSG	0.5 M AS	55	460.7	109.2	0.0034	92.1
208	AKG-38	DSG	0.5 M AS	60	475.1	111.3	0.0201	95.0
209	AKG-38	DSG	0.5 M AS	65	475.3	111.9	0.0118	95.1
183	AKG-38	DSG	1 N TEA-SOS	40	505.4			101.1
184	AKG-38	DSG	1 N TEA-SOS	45	495.8			99.2
185	AKG-38	DSG	1 N TEA-SOS	50	489.4			97.9
186	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	40	244.4	108.9	0.0250	97.8
187	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	45	241.6	107.8	0.002	96.6
188	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	50	250.4	109.1	0.0076	100.1
204	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	55	223.5	117.0	0.0037	89.4
205	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	60	237.8	114.8	0.0113	95.1
206	AKG-28	DSPE	0.5 M AS	65	233.0	115.1	0.0266	93.2
189	AKG-28	DSPE	1 N TEA-SOS	40	244.6	109.3	0.0480	97.8
190	AKG-28	DSPE	1 N TEA-SOS	45	245.6	107.7	0.0165	98.2
191	AKG-28	DSPE	1 N TEA-SOS	50	245.0	107.9	0.0221	98.0
192	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	40	434.8	115.1	0.0040	87.0
193	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	45	462.7	112.9	0.0202	92.5
194	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	50	467.0	109.4	0.0323	93.4
210	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	55	463.3	114.5	0.0183	92.7
211	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	60	479.6	114.9	0.0020	95.9
212	AKG-38	DSPE	0.5 M AS	65	475.0	114.2	0.0511	95.0
195	AKG-38	DSPE	1 N TEA-SOS	40	503.6	109.1	0.002	100.7
196	AKG-38	DSPE	1 N TEA-SOS	45	489.8	108.5	0.0298	98.0
197	AKG-38	DSPE	1 N TEA-SOS	50	481.4	107.3	0.0395	96.3
229	리네졸리드	DSPE	0.5 M AS	55	21.0			4.2
230	리네졸리드	DSPE	1 N TEA-SOS	55	19.7			3.9

[0757] 실시예 19. 혈장의 존재 하에서 AKG-28 또는 AKG-38 및 다양한 비율의 인지질-대-콜레스테롤을 포함하는 폐결화된 리포솜의 시험관내 버스트 방출 5 mol% PEG-DSPE 또는 PEG-DSG 및 다양한 비율의 HSPC 대 Chol(40-65 mol% Chol)을 함유하는 AKG-28 및 AKG-38의 리포솜 제형의 시험관내 안정성을 마우스 CD-1 또는 인간 풀 혈장 (Innovative Research의 리튬-해파린 안정화)의 존재 하에서 안정성에 대해 평가했다. 필요에 따라 혈장을 해당하고 1N HCl로 pH 7.4로 조절한 후 유리 극세사 필터(GF/C), 1 μ m 폴리에테르설폰(PES), 0.22 μ m PES 필터로 순차적으로 여과했다. 혈장(80 μ l)을 0.5ml Eppendorf 튜브에서 리포솜 약물 제형(20 μ l)과 혼합했다. 이어서 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 인큐베이션한 다음 냉각수에 넣었다. 혼합물(0.1mL)을 2mL Sepharose CL-4B 컬럼에서 지체 없이 크로마토그래피하고 Hepes-완충 식염수(pH 7.0)로 용리하고 0.25mL의 리포솜 약물을 공극 부피 분획에서 수집했다. 이어서, 약물 및 DiI(3)-DS 지질 표지를 실시예 7에 기술된 바와 같이 HPLC로 분석하고, 캡슐화되어 남아있는 약물 %를 하기 공식을 사용하여 결정했다:

[0758] $(A_d / A_l) / (A_{d,0} / A_{l,0}) * 100 =$ 캡슐화된 잔류 약물%

[0759] 여기서 A_d - 영역은 약물 피크, A_l 영역은 지질 표지 피크, $A_{d,0}$ -영역은 혈장과 함께 약물 피크 사전 배양, $A_{l,0}$ -은 지질 표지 피크 사전 배양이다.

[0760] 결과는 도 5A, 도 5B, 도 5C 및 도 5D에 도시되어 있다. 캡슐화된 AKG-28을 갖는 리포솜의 경우(도 5A), 40mol.% 콜레스테롤을 함유하는 제제에 대한 인간 혈장에서 버스트 방출 현상(리포솜으로부터의 약물 방출을 나타내는 DL 비율의 급격한 강하)이 관찰되었지만, 콜레스테롤이 45mol.% 이상인 제형의 경우 그렇지 않았다. AKG-38을 캡슐화한 리포솜의 경우(도 5B), 콜레스테롤 함량이 40mol.% 및 45mol.%인 제형의 경우 사람 및 마우스 혈장 모두에서 버스트 방출 현상이 관찰되었으나 콜레스테롤 함량이 50mol.% 이상에서는 관찰되지 않았다.

[0761] 실시예 20. AKG-38 및 40 또는 55mol% 콜레스테롤을 함유하는 5mol% PEG-지질 리포솜의 시험관내 혈장 방출 및 생체내 약동학

[0762] 0.5 M AS 포획제를 사용하는 실시예 18의 리포솜 제형 중 3개를 실시예 7에 기술된 바와 같이 암컷 CD-1 마우스에서 2 시점 약동학 연구에서 평가하여, 5분 및 6시간 모두에서 혈액에 남아 있는 리포솜 지질을 측정하고, 그리고 약물 대 지질 비율(DL)의 결정을 통해 리포솜으로부터의 약물 방출을 측정한다. 5 mol% PEG-DSG 또는 5

mol% PEG-DSPE를 갖고 55 mol% Chol을 함유하는 리포솜은 5분에서 주사-전 D/L 비율의 95% 이상 및 6시간에서 >85%를 나타내었지만, 40 mol% Chol을 함유하는 PEG-DSG 제제는 5분 및 6시간 모두에서 극적으로 감소된 DL 비율을 나타냈고, 이는 시험관내 혈장의 존재 하에 약물 누출 데이터와 일치한다(표 17). 이 소견은 폐결화된 리포솜 독소루비신 및 나노리포솜 이리노테칸과 같이 임상용으로 승인된 다수의 매우 안정한 리포솜 약물이 약 40 몰%의 비율로 콜레스테롤을 함유하기 때문에 약물-로딩된 리포솜 제제에 대한 이전의 경험과 대조적이었다 (예를 들어, Doxil® drug information package insert, updated 08/2019, and Drummond, D. C., et al. (2006). "Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy." Cancer Res. 66(6): 3271-3277 참조)

표 17

리포솜 로트 ID		180	207	210
Chol, mol% (Chol+PC 의)		40	55	55
PEG-지질		DSG	DSG	DSPE
로딩 후 D/L 비율		440.4 ± 8.5	460.7 ± 16.2	463.3 ± 13.7
캡슐화 eff-cy, %		88.1 ± 1.7	92.1 ± 3.2	92.7 ± 2.7
시험관내 혈장 안정성, 20 min 37° C	마우스 CD1	54.6 ± 1.6	92.4 ± 0.7	95.0 ± 0.8
	인간	55.9 ± 3.7	94.3 ± 0.6	96.8 ± 0.9
2 점 PK 데이터 (CD-1 마우스, 9 mg/kg iv):				
리포솜 지질, % ID	5 min	103.4 ± 11.7	114.9 ± 14.9	104.3 ± 5.6
	6 시간	51.1 ± 5.2	52.6 ± 3.6	50.3 ± 5.7
D/L 비율, 주사-전 값의 %	5 min	60.8 ± 1.2	95.1 ± 1.2	96.8 ± 0.2
	6 시간	30.9 ± 2.4	86.6 ± 5.7	90.0 ± 4.1

[0763]

[0764]

실시예 21. AKG-3, AKG-16, AKG-22, AKG-28, AKG-29, AKG-30, AKG-38, AKG-39 및 AKG-40에 의한 미토콘드리아 단백질 합성(MPS) 억제 및 M. MPS 억제 대비 M. 투베르쿨로시스 (H37Rv) 억제에 대한 선택성.

[0765]

미토콘드리아 단백질 합성의 억제는 제조업체의 지침에 따라 AbCam(Catalog #ab11021)의 비색 MitoBiogenesis™ 세포-내 ELISA 키트를 사용하여 결정되었다. 미토콘드리아 단백질 합성 억제는 리네졸리드 및 기타 옥사졸리디논, 특히 안구 및 말초 신경병증 및 유산산증에 대한 중요한 독성과 관련이 있다(Renslo (2010) Expert Rev Anti Infect Ther 8(5) 565-574; Flanagan et al. (2015) Antimicrob Agents Chemother 59(1) 178-185; Santini et al. (2017) Expert Opin Drug Saf 16(7) 833-843). Complex IV(COX-1)의 미토콘드리아 DNA- 인코딩된 서브유닛 I와 Complex II(SDH-A)의 핵 DNA-인코딩된 70kDa 서브유닛을 포함하는 두 개의 미토콘드리아 단백질의 수준을 동시에 측정했다. H9C2 래트 BDIX 심장 근모세포 세포주는 384웰 플레이트 분석 형식으로 이러한 연구에 사용되었다. 세포는 10% FBS와 1xGlutamine이 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO2에서 성장시켰다. 세포를 47.5μl/웰로 384웰 플레이트에 1,500개 세포/웰의 밀도로 플레이트팅했다. 200 μM의 고농도에서 시작하여 조건당 9개의 3배 희석 및 1개의 복제를 포함하여 각 화합물의 10개 농도를 2.5 μl의 세포에 첨가하고 세포와 함께 37 ° C 및 5% CO2에서 5일 동안 배양했다. 시험된 화합물은 테디졸리드 및 리네졸리드 대조군 뿐만 아니라 AKG-3, AKG-16, AKG-22, AKG-28, AKG-29, AKG-30, AKG-38, AKG-39 및 AKG-40을 포함했다.

[0766]

그런 다음 MitoBiogenesis In-Cell Elisa를 제조업체의 지침(Abcame Catalog #ab11021)에 따라 수행하고 플레이트 리더에서 15분 동안(20초-1분 간격) 동력학 모델에서 405nm에서 SDH-1A 검출을 위해 알칼리성 포스파타제 (AP)를 전개시키고 15분(20초-1분 간격) 동력학 모델에서 600nm에서 COX-I 검출을 위해 HRP를 전개시켰다. COX-I 및 SDH-A 신호는 각 화합물의 농도에 대한 COX-1/SDH-A의 비율로 표시되었고 IC50은 9개의 연구 화합물과 2개

의 대조군 각각에 대해 계산되었다.

[0767] MPS 선택성 지수(SI-MPS)는 MPS IC₅₀($\mu\text{g/ml}$)을 실시예 2에서 결정된 약물 민감성 H37Rv M. 투베르쿨로시스 균주의 MIC로 나누어 결정했다. 시험된 화합물 중 2개, AKG-28 AKG-29는 리네졸리드에 대해 결정된 것보다 10배 이상, 테디졸리드에 대해 결정된 것보다 20배 이상 높은 SI-MPS를 가졌다. 이 두 화합물 모두 옥사졸리디논 고리의 R2 위치에 1차 아미노기를 함유하고 있다. 미토콘드리아 단백질 합성에 비해 M. 투베르쿨로시스에 대한 높은 효능(MIC <0.1)과 높은 선택성으로 인해 AKG-28은 리포솜 캡슐화 및 결핵 또는 기타 마이코박테리아 치료에 탁월한 후보이다.

표 18

화합물	테트라졸 링 위치, R ₁ (식 (I))	R ₂ (식 (I))	MIC (H37Rv) ($\mu\text{g/ml}$)	MPS IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	SI-MPS MPS/H37
리네졸리드	적용불가	-NHCOCH ₃	1.00	2.157	2.16
테디졸리드	2', CH ₃ -	-OH	0.25	0.143	0.57
AKG-3	2', CH ₃ -	-NH ₂	0.06	0.115	1.91
AKG-16	2', (CH ₃) ₂ N(CH ₂) ₂ -	-OH	0.25	0.244	0.98
AKG-22	1', NH ₂ (CH ₂) ₂ -	-OH	0.5	1.184	2.37
AKG-28	2', (CH ₃) ₂ N(CH ₂) ₂ -	-NH ₂	0.015	0.411	27.41
AKG-29	2', NH ₂ (CH ₂) ₂ -	-NH ₂	0.125	4.11	32.80
AKG-30	2', (C ₂ H ₅) ₂ N(CH ₂) ₃ -	-NH ₂	0.125	0.252	2.02
AKG-38	2', (CH ₃) ₂ N(CH ₂) ₂ -	-NHCOCH ₃	0.06	0.041	0.69
AKG-39	2', (C ₂ H ₅) ₂ N(CH ₂) ₂ -	-NHCOCH ₃	0.5	0.060	0.12
AKG-40	2', (C ₂ H ₅) ₂ N(CH ₂) ₃ -	-NHCOCH ₃	0.5	0.064	0.13

[0769] 실시예 22. 리포솜 AKG-28 로트 275의 대량 제조. 로트 267. 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. HSPC (Lipoid AG) 4.95 g (6.30 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 2.98 g (7.71 mmol), 및 PEG-DSPE (Lipoid AG) 850 mg (0.315 mmol) (HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비)을 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 9ml와 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 68 ° C 조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에서 93.3g의 0.5M 수성 황산암모늄 (0.2미크론 여과)을 68 ° C 조에서 예열하고 뜨거운 지질 에탄올 용액에 교반하면서 부었다. 얻어진 현탁액을 68 ° C 조에서 20분 동안 교반하고 순환 68 ° C 물로 가열된 Lipex 100-ml 열배럴 리포솜 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 두 개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막 (Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 260-300psi에서 8번 압출했다. 생성된 압출된 리포솜을 냉장고(2-8 ° C)에서 밤새 보관하고 양압 하에서 0.2- μm 폴리에테르설폰(PES) 필터를 통해 여과했다. 잔류 전도도가 200 $\mu\text{S/cm}$ 미만(5.2 부피 교환 후 143 $\mu\text{S/cm}$)으로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa인 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 완충액 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (암모늄 설페이트)를 제거했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법에 의해 57.4mM인 것으로 측정되었다.

[0770] 20 mg/ml 수성 스톱 용액(NaOH로 pH 5.03으로 조정됨) 형태의 720 mg AKG-28(이염산염으로서)을 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 텍스트로스 45mg/ml 및 AKG-28 농도 6mg/ml의 존재 하에 250g/mol의 약물-대- 인지질 (DL) 비율에서 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 일정하게 교반하면서 외부 가열에 의해 60-63 ° C로 신속하게 가열하고, 65 ° C 수조에서 교반하면서 인큐베이션을 계속했다. 20분 인큐베이션 후 혼합물을 얼음물에서 10 ° C 미만으로 빠르게 식히고 이 온도에서 약 10분 동안 유지했다. 주변 온도에 도달하고 0.1M NaCl로 조정한 후, 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜은 약 12mg/ml의 AKG-28로 정용여과에 의해 사전 농축되었고, 내독소가 없는 물(HBS- 7 버퍼)로 만든 0.144M NaCl을 함유하는 pH 7.0의 10mM HEPES-Na 완충액 내로의 총 약 8 부피 교환으로 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제되었다. 정제 전에 캡슐화되지 않은 약물의 비율은 사전 농축 정용여과에서 305nm에서 분광광도계로 추정되었고 약 0.9%인 것으로 밝혀졌다(99.1% 로딩 효율에 해당). 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2- μm

m 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 이 절차를 세 번 더 반복했다(로트 269, 271, 273). 얻어진 리포솜은 표 19에 나타난 특성을 가졌다.

표 19

[0771]

로트 ID	스케일, AKG-28의 mg	DL 비율 g AKG-28/mol PhL	평균 입자 크기 Xz, nm	PDI
267	720	251.9	115.4	0.0248
269	750	248.7	112.6	0.0282
271	750	268.0	114.0	0.0482
273	766	244.9	114.7	0.0153

[0772]

이들 로트를 조합하여 리포솜 형태의 12.0 mg/ml AKG-28, 입자 크기 Xz 113.7 nm, PDI 0.0417을 갖는 로트 275를 얻었다. **실시예 23. 리포솜 AKG-38 로트 276의 대량 제조.**

[0773]

로트 268. 실시예 22의 프로토콜을 다음과 같은 차이점을 가지고 사용했다: AKG-38의 스톡 수용액(유리 염기로서)은 동등한 양의 1N HCl에 약물을 용해시키고 부피를 조정하여 20 mg/ml의 AG-38(유리 염기로서), pH 5.08을 얻었다. 로딩 혼합물은 1300mg의 AKG-38을 함유하고 8mg/ml의 AKG-38 및 450g/mol 인지질의 DL 비율로 제조되었으며, 추가로 10mM NaCl을 함유했다. 로딩 후 리포솜은 약 22mg/ml의 약물로 사전 농축되었고; 정제 전 캡슐화되지 않은 약물의 비율은 사전 농축 정용여과에서 305nm에서 분광광도계로 추정되었고 약 3.2%인 것으로 밝혀졌다(96.8% 로딩 효율에 해당). 이 과정을 3회 더 반복했다(로트 270, 272, 274). 얻어진 리포솜은 표 20에 나타난 특성을 가졌다.

표 20

[0774]

로트 ID	스케일 AKG-38의 mg	DL 비율 g AKG-38/ mol PhL	평균 입자 크기 Xz, nm	PDI
268	1300	445.9	114.6	0.0419
270	1360	444.9	114.2	0.0456
272	1350	463.7	115.3	0.0245
274	1375	437.3	115.0	0.0349

[0775]

이들 로트를 조합하여 리포솜 형태의 22.3 mg/ml AKG-38, 입자 크기 Xz 113.1 nm, PDI 0.0454를 갖는 로트 276를 얻었다. **실시예 24. "빈 리포솜" 로트 277의 제조.**

[0776]

2mmol HSPC, 2.444mmol 콜레스테롤 및 0.1mmol PEG-DSPE(HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비)를 에탄올에 용해시키고, 리포솜 현탁액으로 형성하고, 0.5M 황산암모늄 대신 비교환 양이온의 황산염인 0.13M 황산나트륨을 사용한 것을 제외하고는 실시예 22에 기재된 바와 같이 폴리카보네이트 막을 통해 압출했다. 압출된 리포솜을 리포솜의 황산나트륨으로부터 정제하고 총 10회 부피 교환으로 MWCO 500 KDa가 포함된 폴리스폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF 완충액 교환에 의해 HBS-7 완충액 내로 넣었다. 정제된 리포솜은 42.9mM 인지질, 입자 크기 Xz 113.7nm 및 PDI 0.0612를 가졌다. 0.2 μm 멸균 필터를 무균적으로 통과시키고 멸균 HBS-7을 사용하여 20mM 인지질로 조정했다.

[0777]

실시예 25. 리포솜 AKG-38 로트 279.

[0778]

실시예 6의 일반 절차를 따랐다. HSPC (Lipoid AG) 13.102 g (16.67 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 7.877 g (20.37 mmol), 및 PEG-DSPE (Lipoid AG) 2.250 g (0.833 mmol) (HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비)를 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 25ml와 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 68° C 욕조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에 259.1g(250ml)의 0.5M 수성 황산암모늄(0.2미크론 여과)을 70° C 조에서 예열하고 교반하면서 뜨거운 지질 에탄올 용액에 부었다. 얻어진 현탁액을 70° C 조에서 적어도 20분 동안 교반하고 네 부분으로 나누었다. 각 부분을 68° C 조에서 20분 동안 교반하고 순환 70 ° C 물로 가열된 Lipex 100-ml 열배열 리포솜 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 두 개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막(Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 280 psi에서 5번 압출했다. 이러한 부분적으로 압출된 리포솜 부분을 조합하고(Xz 129.7 nm) 동일한 막 스택을 통해 5번 더 압출하여 크기 Xz 115.9 nm, PDI 0.0212의 리포솜을 생성했다. 리포솜은 냉장고(2-8 ° C)에서 하룻밤 동안 보관하고 양압 하에서 0.2- μm 폴리에

테르설펜(PES) 필터를 통해 여과했다. 인지질 농도는 $60.22 \pm 0.34 \text{ mM}$ 로 나타났다. 잔류 전도도가 $180 \mu\text{S/cm}$ (5.1 부피 교환 후 $180 \mu\text{S/cm}$)으로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa 인 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 완충액 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (암모늄 설페이트)를 제거했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포리브레이트 방법에 의해 $54.97 \pm 0.32 \text{ mM}$ 인 것으로 측정되었다.

[0779] KG-38(유리 염기)을 0.95 당량의 1N HCl 과 혼합하고 내독소가 없는 물로 구성하여 20mg/ml 수성 스톱 용액($\text{pH } 5.16$)을 얻었다. 용액을 $0.2\text{-}\mu\text{m}$ 필터에 통과시키고, 3958mg 의 약물을 함유하는 여액의 양을 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 44.5mg/ml 텍스트로스, 10mM NaCl 및 8mg/ml 의 AKG-38 농도, $\text{pH } 5.54$ 의 존재 하에 약물 대 인지질(DL) 비율이 450g/mol 인 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 5 분 동안 일정하게 교반하면서 외부 가열에 의해 61°C 로 가열하고, 추가 22 분 동안 65°C 조에서 교반하면서 인큐베이션을 계속했다. 그 후 혼합물을 빙수조로 옮기고 7 분간 교반하여 온도가 10°C 가 되도록 한 후 다시 빙수조에서 8 분간 유지했다. 빙수조에서 꺼내어 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱을 첨가하여 0.1M NaCl 로 조정된 후, 약물 로딩된 리포솜($\text{pH } 6.53$)을 컷오프 500KD 분자량의 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 22 mg/ml 의 AKG-38로 정용여과에 의해 사전 농축하고 총 8 부피 교환 동안 HBS-7 완충액으로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 $0.2\text{-}\mu\text{m}$ PES 고유량 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 $21.1 \pm 0.19 \text{ mg/ml}$, DL 비율 $454 \pm 4.7 \text{ g/mol}$ 인지질, X_z 116.4 nm , PDI 0.0231 . 제제화된 약물의 수율 $3834\text{mg}(96.9\%)$.

[0780] 실시예 26. 리포솜 AKG-28 로트 281.

[0781] 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. 0.5M 황산 암모늄을 함유하는 $45:55:2.25$ 의 물비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE로 구성된 압출된 리포솜을 실시예 25에 기재된 바와 같이 제조했다. 잔류 전도도가 $150 \mu\text{S/cm}$ (4.1 부피 교환)로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa (Spectrum Laboratories)인 있는 폴리에테르설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (암모늄 설페이트)를 제거했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포리브레이트 방법에 의해 55.4 mM 인 것으로 측정되었다.

[0782] 20 mg/ml 수성 스톱 용액(NaOH 로 $\text{pH } 5.24$ 로 조정됨) 형태의 969.5 mg AKG-28(이염산염으로서)을 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 텍스트로스 44.5mg/ml 및 AKG-28 농도 6mg/ml 의 존재 하에 250g/mol 의 약물-대- 인지질(DL) 비율에서 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 일정하게 교반하면서 외부 가열에 의해 65.4 로 2.5 분 내 가열하고, 65°C 수조에서 교반하면서 인큐베이션을 계속했다. 20 분 인큐베이션 후, 혼합물을 얼음물에서 2.75 분 동안 9.3°C 로 냉각시키고, 약 10 분 동안 얼음물 수조에서 유지시켰다. 그런 다음 혼합물을 주변 온도에 도달하도록 하고 0.1M NaCl ; $\text{pH } 6.43$ 로 조정했다. 로딩 혼합물 133.4g 을 분자량 컷오프 500KD 의 폴리설펜 중공사 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 12mg/ml 의 AKG-28로 정용여과에 의해 사전 농축되었고 총 8.1 부피 교환으로 HBS-7 완충액 내로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 정제 전에 캡슐화되지 않은 약물의 비율은 사전 농축 정용여과에서 302nm 에서 분광광도계로 추정되었고 약 0.7% 인 것으로 밝혀졌다 (99.3% 로딩 효율에 해당). 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 $0.2\text{-}\mu\text{m}$ 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-28 $13.26 \pm 0.21 \text{ mg/ml}$, DL 비율 $258.2 \pm 3.7 \text{ g/mol}$ 인지질, X_z 117.3 nm , PDI 0.0421 .

[0783] 실시예 27. 리포솜 AKG-38 로트 285.

[0784] 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. 0.5M 황산 암모늄을 함유하는 $45:55:2.25$ 의 물비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE로 구성된 압출된 리포솜을 본질적으로 실시예 25에 기재된 바와 같이 제조했다. 잔류 전도도가 $138 \mu\text{S/cm}$ (5.6 부피 교환)로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa (Spectrum Laboratories)인 있는 폴리에테르설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (암모늄 설페이트)를 제거했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포리브레이트 방법에 의해 53.1 mM 인 것으로 측정되었다.

[0785] KG-38(유리 염기)을 0.95 당량의 1N HCl 과 혼합하고 내독소가 없는 물로 구성하여 19.9mg/ml 수성 스톱 용액($\text{pH } 5.13$)을 얻었다. 용액을 $0.2\text{-}\mu\text{m}$ 필터에 통과시키고, 1400 mg 의 약물을 함유하는 여액의 양을 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 44.5mg/ml 텍스트로스, 10mM NaCl 및 8mg/ml 의 AKG-38 농도, $\text{pH } 5.58$ 의 존재 하에 약물 대 인지질(DL) 비율이 450g/mol 인 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 2.25 분 동안 일정하게 교반하면서 외부 가열에

의해 63℃로 가열하고, 총 2분 동안 65℃ 조에서 교반하면서 인큐베이션을 계속했다. 그 후 혼합물을 빙수조로 옮기고 3분간 교반하여 온도가 10.3 ° C가 되도록 한 후 다시 빙수조에서 7분간 유지했다. 빙수조에서 꺼내어 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱을 첨가하여 0.1M NaCl로 조정한 후, 약물 로딩된 리포좀(pH 6.70)을 컷오프 500 KD 분자량의 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포좀을 약 22 mg/ml의 AKG-38로 정용여과에 의해 사전 농축하고 총 7.7 부피 교환 동안 HBS-7 완충액으로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포좀의 약물로부터 정제했다. 농축되고 정제된 리포좀은 23.1 mg/ml의 AKG-38 농도를 가졌다. HBS-7 완충액으로 약물 농도를 20mg/ml로 조정하고, 농축되고 정제된 리포좀을 무균적으로 0.2-μm PES 고유량 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포좀은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 20.35 ± 0.26 mg/ml, DL 비율 437.8 ± 6.5 g/mol 인지질, X_z 121.1 nm, PDI 0.0200. 제제화된 약물의 수율 1355 mg (96.8%).

[0786] 실시예 28. 리포좀 AKG-28 로트 286.

[0787] 리포좀의 포획제가 없는 0.5M 황산암모늄을 함유하는 압출된 리포좀(HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비)을 실시예 27에서와 같이 얻었다.

[0788] 20 mg/ml 수성 스톱 용액(NaOH로 pH 5.18로 조정됨) 형태의 600 mg AKG-28(이염산염으로서)을 TFF 후 리포좀 현탁액과 조합하여 텍스트로스 44.5mg/ml 및 AKG-28 농도 6mg/ml의 존재 하에 250g/mol의 약물-대- 인지질 (DL) 비율에서 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 교반하면서 65° C 수조에 넣고 4.5분 내에 60° C에 도달했다. 총 20분 동안 교반하면서 인큐베이션을 계속하고, 혼합물을 얼음물에서 2분 동안 10.0℃로 식히고, 얼음물 수조에서 약 10분 동안 유지시켰다. 그런 다음 혼합물을 주변 온도에 도달하도록 하고 0.1M NaCl; pH 6.23로 조정했다. 로딩 혼합물 104.6 g을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설폰 중공사 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포좀을 약 12mg/ml의 AKG-28로 정용여과에 의해 사전 농축되었고 총 8.3 부피 교환으로 HBS-7 완충액 내로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포좀의 약물로부터 정제했다. 농축되고 정제된 리포좀을 무균적으로 0.2-μm 멸균 필터 (HBS-7 완충액으로 추적)에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포좀은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-28 12.05 ± 0.13 mg/ml, DL 비율 239.4 g/mol 인지질, X_z 120.1 nm, PDI 0.0294. 제제화된 약물의 수율 555.5 mg (92.6%).

[0789] 실시예 29. 리포좀 AKG-38 로트 292.

[0790] 로트 288. 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. HSPC (Lipoid AG) 9.17 g (11.67 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 5.51 g (14.26 mmol), 및 PEG-DSPE (Lipoid AG) 1.575 g (0.583 mmol) 을를 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 17.5 ml와 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 69-70° C ° C 욕조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에 181.4 g (175 ml)의 0.5M 수성 황산암모늄(0.2미크론 여과)을 70℃ 조에서 예열하고 교반하면서 뜨거운 지질 에탄올 용액에 부었다. 얻어진 현탁액을 70℃ 조에서 적어도 20분 동안 교반하고 3 부분으로 나누었다. 각 부분을 68℃ 조에서 20분 동안 교반하고 순환 70 ° C 물로 가열된 Lipex 100-ml 열배럴 리포좀 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 두 개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막(Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 280 psi에서 5번 압출했다. 이러한 부분적으로 압출된 리포좀 부분을 조합하고(X_z 126.7 nm) 동일한 막 스택을 통해 4번 더 압출하여 크기 X_z 119.2 nm, PDI 0.0385의 리포좀을 생성했다. 리포좀은 냉장고(2-8 ° C)에서 하룻밤 동안 보관하고 양압 하에서 0.2-μm 폴리에테르설폰(PES) 필터를 통해 여과했다. 인지질 농도는 59.08 ± 0.44 mmol로 나타났다. 잔류 전도도가 152 μS/cm (5.4 부피 교환 후 152 μS/cm)으로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa인 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템 (Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 완충액 교환을 통해 여분의 리포좀 포획제 (암모늄 설페이트)를 제거했다. TFF 후 리포좀 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법에 의해 57.76 ± 0.53 mM인 것으로 측정되었다.

[0791] KG-38(유리 염기)을 0.95당량의 1N HCl과 혼합하고 내독소가 없는 물로 구성하여 19.7mg/ml 수성 스톱 용액(pH 5.11)을 얻었다. 용액을 0.2-μm 필터에 통과시키고, 3509 mg의 약물을 함유하는 여액의 양을 TFF 후 리포좀 현탁액과 조합하여 44.5mg/ml 텍스트로스, 10mM NaCl 및 8mg/ml의 AKG-38 농도, pH 5.50의 존재 하에 약물 대 인지질(DL) 비율이 450g/mol인 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 5분 동안 일정하게 교반하면서 외부 가열에 의해 61.6℃로 가열하고, 추가 20분 동안 65℃ 조에서 교반하면서 인큐베이션을 계속했다. 그 후 혼합물을 빙수조로 옮기고 7분간 교반하여 온도가 10 ° C가 되도록 한 후 다시 빙수조에서 8분간 유지했다. 빙수조에서 꺼내어 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱을 첨가하여 0.1M NaCl로 조정한 후, 약물 로딩된 리포좀(pH 6.53)을 컷오프 500 KD 분자량의 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포좀을 약 22 mg/ml의 AKG-38로

정용여과에 의해 사전 농축하고 총 7.7 부피 교환 동안 HBS-7 완충액으로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2- μ m PES 고유량 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 22.47 ± 0.38 mg/ml, DL 비율 441.6 g/mol 인지질, X_z 121.3 nm, PDI 0.0465. 제제화된 약물의 수율 3375 mg (96.2%).

[0792] 로트 289. Ls-288의 공정을 1506mg의 AKG-38(유사하게 제조된 20.0mg/ml 스톡 수용액, pH 5.15)을 사용하여 반복했다. 용액을 동일한 TFF 후 압출된 리포솜 현탁액과 조합시켜, 44.5mg/ml 텍스트로스, 10mM NaCl, 및 8 mg/ml의 AKG-38 농도, pH 5.53의 존재 하에 450g/mol의 약물-대-인지질(DL) 비율로 로딩 혼합물을 형성시켰다. 혼합물을 2분 동안 일정하게 교반하면서 외부 가열에 의해 64.3°C로 가열하고, 추가 20분 동안 65°C 조에서 교반하면서 인큐베이션을 계속했다. 그 후 혼합물을 빙수조로 옮기고 2.75분간 교반하여 온도가 9.6 ° C가 되도록 한 후 다시 빙수조에서 14분간 유지했다. 빙수조에서 꺼낸 후, 로딩 혼합물을 주위 온도에 도달하도록 하고 3M NaCl 스톡을 사용하여 0.1M NaCl; pH 6.54로 조정했다. 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 22 mg/ml의 AKG-38로 정용여과에 의해 사전 농축하고 총 8.1 부피 교환 동안 HBS-7 완충액으로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2- μ m PES 고유량 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 22.84 ± 0.41 mg/ml, DL 비율 452.7 g/mol 인지질, X_z 120.3 nm, PDI 0.0522. 제제화된 약물의 수율 1407 mg (93.4%).

[0793] 로트 290. 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. HSPC (Lipoid AG) 7.86 g (10.00 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 4.73 g (12.22 mmol), 및 PEG-DSPE (Lipoid AG) 1.35 g (0.50 mmol) (HSPC:Chol:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비)를 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 15ml와 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 69-70° C 욕조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에 155.5 g (150 ml)의 0.5M 수성 황산암모늄(0.2미크론 여과)을 70°C 조에서 예열하고 교반하면서 뜨거운 지질 에탄올 용액에 부었다. 얻어진 현탁액을 70°C 조에서 적어도 20분 동안 교반하고 2 부분으로 나누었다. 각 부분을 68°C 조에서 20분 동안 교반하고 순환 70 ° C 물로 가열된 Lipex 100-ml 열배럴 리포솜 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 두 개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막(Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 280 psi에서 4번 압출했다. 이러한 부분적으로 압출된 리포솜 부분을 조합하고(X_z 131.5 nm) 동일한 막 스택을 통해 4번 더 압출하여 크기 X_z 122.7 nm, PDI 0.0215의 리포솜을 생성했다. 리포솜은 냉장고(2-8 ° C)에서 하룻밤 동안 보관하고 양압 하에서 0.2- μ m 폴리테트라설폰(PES) 필터를 통해 여과했다. 인지질 농도는 58.99 ± 0.22 mM로 나타났다. 잔류 전도도가 146 μ S/cm (5.5 부피 교환 후 146 μ S/cm)으로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa인 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 완충액 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (암모늄 설페이트)를 제거했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법에 의해 56.94 ± 0.41 mM인 것으로 측정되었다.

[0794] KG-38(유리 염기)을 0.95당량의 1N HCl과 혼합하고 내독소가 없는 물로 구성하여 20 mg/ml 수성 스톡 용액(pH 5.15)을 얻었다. 용액을 0.2- μ m 필터에 통과시키고, 2315 mg의 약물을 함유하는 여액의 양을 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 44.5mg/ml 텍스트로스, 10mM NaCl 및 8/02mg/ml의 AKG-38 농도, pH 5.52의 존재 하에 약물 대 인지질(DL) 비율이 450g/mol인 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 3.25분 동안 일정하게 교반하면서 외부 가열에 의해 64.4°C로 가열하고, 추가 17분 동안 65°C 조에서 교반하면서 인큐베이션을 계속했다. 그 후 혼합물을 빙수조로 옮기고 2.75분간 교반하여 온도가 10 ° C 미만인 되도록 한 후 다시 빙수조에서 총 10분간 유지하여 주위 온도에 도달하도록 하고 3M NaCl 스톡을 사용하여 0.1M NaCl; pH 6.63로 조정했다. 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 22 mg/ml의 AKG-38로 정용여과에 의해 사전 농축하고 총 8.0 부피 교환 동안 HBS-7 완충액으로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2- μ m PES 고유량 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 22.07 ± 0.23 mg/ml, DL 비율 441.6 g/mol 인지질, X_z 120.4 nm, PDI 0.0395. 제제화된 약물의 수율 2141 mg (92.5%).

[0795] 로트 292. 로트 288(150.3g), 289(61.2g) 및 290(19.5g)을 조합하여 22.5mg/ml의 리포솜 제제화된 AKG-38의 로트 292 278.4g을 얻었다. 모든 리포솜 제제는 2-8° C에서 보관되었다.

[0796] **실시예 30. 리포솜 AKG-28 로트 235의 제조.**

[0797] 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. HSPC (Lipoid AG) 940 mg (1.20 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 568 mg (1.47 mmol), PEG-DSPE (Lipoid AG) 163 mg (0.06 mmol), 및 0.0018 mmol의 친유성 형광 표지 DiI_{C18}(3)-DS (AAT Bioquest, USA) (HSPC:Chol:PEG-DSPE:DiI_{C18}(3)-DS 45:55:2.25:0.0675 몰비, HSPC에 대해 0.15 mol% DiI₃-DS)을 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 2ml와 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 68 ° C 조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에 20 ml의 0.5M 수성 황산암모늄 용액(0.2미크론 여과)을 68 ° C 조에서 예열하고 교반하면서 뜨거운 지질 에탄올 용액에 부었다. 얻어진 현탁액을 68 ° C 조에서 20분 동안 교반하고 순환 68 ° C 물로 가열된 Lipex 100-ml 열배럴 리포솜 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 두 개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막(Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 300psi에서 8번 압출했다. 생성된 압출된 리포솜을 냉장고(2-8 ° C)에서 밤새 보관하고 양압 하에서 0.2-μm 폴리에테르설폰(PES) 필터를 통해 여과했다. 잔류 전도도가 146 μS/cm (10 부피 교환 후 60 μS/cm)으로 떨어질 때까지 MW 컷 오프 500KDa인 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 완충액 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (암모늄 설페이트)를 제거했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법에 의해 37.56 ± 0.62 mM인 것으로 측정되었다.

[0798] 20 mg/ml 수성 스톱 용액(NaOH로 pH 4.99로 조정됨) 형태의 50 mg AKG-28(이염산염으로서)을 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 텍스트로스 140 mg/ml 및 AKG-28 농도 3mg/ml의 존재 하에 250g/mol의 약물-대- 인지질 (DL) 비율에서 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물(pH 5.53)을 65 ° C 수조에서 20분 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 얼음물에서 빠르게 냉각시키고 약 10분 동안 얼음물 수조에 보관했다. 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱 용액으로 0.1M NaCl로 조정된 후 pH는 5.80이었다. 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 5mg/ml의 AKG-28로 정용여과에 의해 사전 농축되었고 총 약 10 부피 교환으로 HBS-7 완충액 내로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 정제된 리포솜은 주사기로 작동되는 작은 500KD 중공 섬유 카트리지(MicroKros, Spectrum)를 사용하여 TFF로 2배 더 농축되었다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2-μm 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-28 8.22 ± 0.16 mg/ml, DL 비율 257.3 ± 10.3 g/mol 인지질, 리포솜 크기 Xz 118.2 nm, PDI 0.0188. 제제화된 약물의 수율 41.4 mg (82.8%).

[0799] 실시예 31. 리포솜 AKG-38 로트 236의 제조.

[0800] 실시예 30의 0.5M 황산암모늄을 함유하는 TFF 후 압출된 리포솜을 사용했다. KG-38(유리 염기)을 0.95당량의 1N HCl과 혼합하고 내독소가 없는 물로 구성되어 20 mg/ml 수성 스톱 용액(pH 5.11)을 얻었다. 용액을 0.2-μm 필터에 통과시키고, 70 mg의 약물을 함유하는 여액의 양을 TFF 후 리포솜 현탁액(실시예 30)과 조합하여 140 mg/ml 텍스트로스, 및 3mg/ml의 AKG-38 농도의 존재 하에 약물 대 인지질(DL) 비율이 450g/mol인 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 65 ° C 수조에서 20분 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 얼음물에서 빠르게 냉각시키고 약 10분 동안 얼음물 수조에 보관했다. 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱 용액으로 0.1M NaCl로 조정된 후 pH는 6.33이었다. 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 6mg/ml의 AKG-38로 정용여과에 의해 사전 농축되었고 총 약 10 부피 교환으로 HBS-7 완충액 내로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 정제된 리포솜은 주사기로 작동되는 작은 500KD 중공 섬유 카트리지(MicroKros, Spectrum)를 사용하여 TFF로 2배 더 농축되었다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2-μm 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 9.04 ± 0.16 mg/ml, DL 비율 463.9 ± 19.8 g/mol 인지질, 리포솜 크기 Xz 119.3 nm, PDI 0.0267. 제제화된 약물의 수율 56 mg (80%).

[0801] 실시예 32. 혈장 존재 하에서 시험관내 로트 235 및 236의 리포솜 내에 캡슐화된 약물의 보유.

[0802] 37 ° C에서 인간 혈장의 80% 마우스의 존재 하에 리포솜 내 캡슐화된 약물의 보유는 본원의 실시예 19에 기술된 바와 같이 결정되었다. 인큐베이션 시간은 20분이었다.

표 21

리포솜 로트 ID	235	236
마우스 혈장	100.2 ± 4.3	91.0 ± 2.5
인간 혈장	99.6 ± 3.9	94.8 ± 2.6

- [0804] 이들 리포솜은 혈장과 접촉하는 약물의 버스트 방출에 대해 안정했다. 실시예 33. 리포솜 AKG-28 및 AKG-38 로트 231, 232 (HSPC:콜레스테롤:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비, 포획제 0.5 M 암모늄 설페이트)의 제조.
- [0805] 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. HSPC (Lipoid AG) 4.255 g (5.41 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 2.56 g (6.62 mmol), 및 PEG-DSPE (Lipoid AG) 729 mg (0.27 mmol) (HSPC:콜레스테롤:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비)을 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 9ml에 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 70° C 욕조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에 90 ml의 0.5M 수성 황산암모늄 용액(0.2미크론 여과)을 70° C 조에서 예열하고 교반하면서 뜨거운 지질 에탄올 용액에 부었다. 얻어진 현탁액을 70° C 조에서 25분 동안 교반하고 순환 70° C 물로 가열된 Lipex 100-ml 열배럴 리포솜 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 두 개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막(Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 260 psi에서 8번 압출했다. 생성된 압출된 리포솜을 냉장고(2-8 ° C)에서 밤새 보관하고 양압 하에서 0.2-μm 폴리에테르설펜(PES) 필터를 통해 여과했다. 잔류 전도도가 146 μS/cm (10 부피 교환 후 60 μS/cm)으로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa인 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 완충액 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (암모늄 설페이트)를 제거했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 분광광도법에 의해 46.97 ± 0.80 mM인 것으로 측정되었다.
- [0806] 로트 231. 20 mg/ml 수성 스톱 용액(NaOH로 pH 5.02로 조정됨) 형태의 350 mg AKG-28(이염산염으로서)을 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 텍스트로스 137.6 mg/ml 및 AKG-28 농도 2.53 mg/ml의 존재 하에 250g/mol의 약물-대-인지질 (DL) 비율에서 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물(pH 5.60)을 65° C 수조에서 20분 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 얼음물에서 빠르게 냉각시키고 약 10분 동안 얼음물 수조에 보관했다. 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱 용액으로 0.1M NaCl로 조정된 후 pH는 5.68이었다. 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 9mg/ml의 AKG-28로 정용여과에 의해 사전 농축되었고 총 10.9 부피 교환으로 HBS-7 완충액 내로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 완충제 공급 없이 TFF 정용여과를 계속함으로써 정제된 리포솜을 약 12 mg/ml의 약물로 추가로 농축시켰다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2-μm 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-28 11.42 ± 0.09 mg/ml, DL 비율 247.7 ± 7.1 g/mol 인지질, 리포솜 크기 X_z 116.5 nm, PDI 0.0511. 제제화된 약물의 수율 322.7 mg (92.2%).
- [0807] 로트 232. KG-38(유리 염기)을 0.95당량의 1N HCl과 혼합하고 내독소가 없는 물로 구성하여 20 mg/ml 수성 스톱 용액(pH 5.09)을 얻었다. 용액을 0.2-μm 필터에 통과시키고, 580 mg의 약물을 함유하는 여액의 양을 이 실시예의 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 137.6 mg/ml 텍스트로스, 및 2.53 mg/ml의 AKG-38 농도, pH 5.72의 존재 하에 약물 대 인지질(DL) 비율이 500g/mol인 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 65° C 수조에서 20분 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 얼음물에서 빠르게 냉각시키고 약 10분 동안 얼음물 수조에 보관했다. 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱 용액으로 0.1M NaCl로 조정된 후 pH는 6.40이었다. 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 12 mg/ml의 AKG-38로 정용여과에 의해 사전 농축하고 총 8.5 부피 교환 동안 HBS-7 완충액으로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 완충제 공급 없이 TFF 정용여과를 계속함으로써 정제된 리포솜을 2배 추가로 농축시켰다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2-μm 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 16.03 ± 0.07 mg/ml, DL 비율 487.3 ± 13.9 g/mol 인지질, 리포솜 크기 X_z 120.0 nm, PDI 0.0069. 제제화된 약물의 수율 538.9 mg (92.9%).
- [0808] 실시예 34. 리포솜 AKG-28 로트 233 (HSPC:콜레스테롤:PEG-DSG 60:40:3 몰비, 포획제 1 N 트리에틸암모늄 수크로옥타설페이트)의 제조
- [0809] 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. HSPC (Lipoid AG) 1.88 g (2.4 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 619 mg (1.6 mmol), 및 PEG-DSG (Sunbright GS-020, NOF, Japan) 312 mg (0.12 mmol)을 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 3 ml에 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 67° C 욕조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에 31.5 g (30 ml)의 1 N 수성 트리에틸암모늄 수크로옥타설페이트 용액 (0.2미크론 여과 pH 6.20, 실시예 8 참조)을 65° C 조에서 예열하고 교반하면서 뜨거운 지질 에탄올 용액에 부었다. 얻어진 현탁액을 65° C 조에서 5분 동안 교반하고 순환 65° C 물로 가열된 Lipex 100-ml 열배럴 리포솜 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 4개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막(Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 400 psi에서 3번 압출했다. 생성된 압출된 리포솜을 냉장고(2-8 ° C)에서 밤새 보관하고 양압 하에서 0.2-μm 폴리에테르설펜(PES) 필터를 통해 여과했다. 잔류 전도도가 21 μS/cm(14.5 부피 교환)으로 떨어질 때

까지 MW 컷오프 500KDa인 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 완충액 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (TEA-SOS)로부터의 압출된 리포솜 9.2g을 정제했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포폴리브레이트 분광광도법에 의해 31.32 ± 0.85 mM인 것으로 측정되었다.

[0810] 20 mg/ml 수성 스톱 용액(NaOH로 pH 5.02로 조정됨) 형태의 140 mg AKG-28(이염산염으로서)을 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 텍스트로스 116.1 mg/ml 및 AKG-28 농도 2.52 mg/ml의 존재 하에 250g/mol의 약물-대-인지질 (DL) 비율에서 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물(pH 5.43)을 65°C 수조에서 20분 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 얼음물에서 빠르게 냉각시키고 약 10분 동안 얼음물 수조에 보관했다. 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱 용액으로 0.1M NaCl로 조정된 후 pH는 5.80이었다. 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 9mg/ml의 AKG-28로 정용여과에 의해 사전 농축되었고 총 10.9 부피 교환으로 HBS-7 완충액 내로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 완충제 공급 없이 TFF 정용여과를 계속함으로써 정제된 리포솜을 약 12 mg/ml의 약물로 추가로 농축시켰다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2- μ m 멸균 필터(HBS-7 완충액으로 추적)에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-28 10.64 ± 0.20 mg/ml, DL 비율 246.8 ± 11.7 g/mol 인지질, 리포솜 크기 X_z 116.3 nm, PDI 0.0022. 제제화된 약물의 수율 118.2 mg (84.4%).

[0811] **실시예 35. 리포솜 AKG-38 로트 234 (HSPC:콜레스테롤:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비, 포획제 1 N 트리에틸암모늄 수크로옥타실레이트)의 제조**

[0812] 실시예 6의 일반 절차를 따랐다. HSPC (Lipoid AG) 3.30 g (4.20 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 1.985 g (5.13 mmol), 및 PEG-DSPE (Lipoid AG) 567 mg (0.21 mmol) (HSPC:콜레스테롤:PEG-DSPE 45:55:2.25 몰비)을 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 7ml에 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 70°C 욕조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에 10 ml의 1 N 수성 트리에틸암모늄 수크로옥타실레이트 (TEA-SOS) 용액 (0.2미크론 여과)을 70°C 조에서 예열하고 교반하면서 뜨거운 지질 에탄올 용액에 부었다. 얻어진 현탁액을 70°C 조에서 10분 동안 교반하고 순환 70 ° C 물로 가열된 Lipex 100-ml 열배럴 리포솜 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 두 개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막(Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 260 psi에서 8번 압출했다. 생성된 압출된 리포솜을 냉장고(2-8 ° C)에서 밤새 보관하고 양압 하에서 0.2- μ m 폴리에테르설펜(PES) 필터를 통해 여과했다. 인지질 농도는 54.6 mM이었다. 잔류 전도도가 64 μ S/cm (13.8 부피 교환)으로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa인 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하는 KrosFlo TFF 시스템(Spectrum Laboratories)에서 내독소가 없는 물로 TFF 완충액 교환을 통해 여분의 리포솜 포획제 (TEA-SOS)로부터의 압출된 리포솜 11.33 g을 정제했다. TFF 후 리포솜 현탁액의 인지질 농도는 블루 포스포폴리브레이트 분광광도법에 의해 28.67 ± 1.01 mM인 것으로 측정되었다.

[0813] KG-38(유리 염기)을 0.95당량의 1N HCl과 혼합하고 내독소가 없는 물로 구성되어 20 mg/ml 수성 스톱 용액(pH 5.09)을 얻었다. 용액을 0.2- μ m 필터에 통과시키고, 250 mg의 약물을 함유하는 여액의 양을 이 실시예의 TFF 후 리포솜 현탁액과 조합하여 116.4 mg/ml 텍스트로스, 및 2.53 mg/ml의 AKG-38 농도, pH 5.24의 존재 하에 약물 대 인지질(DL) 비율이 500g/mol인 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 65°C 수조에서 20분 동안 교반하면서 인큐베이션하고, 얼음물에서 빠르게 냉각시키고 약 10분 동안 얼음물 수조에 보관했다. 주변 온도에 도달하고 3M NaCl 스톱 용액으로 0.1M NaCl로 조정된 후 pH는 6.60이었다. 약물-로딩된 리포솜을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설펜 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 10 mg/ml의 AKG-38로 정용여과에 의해 사전 농축하고 총 8.0 부피 교환 동안 HBS-7 완충액으로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜의 약물로부터 정제했다. 완충제 공급 없이 TFF 정용여과를 계속함으로써 정제된 리포솜을 대략 2배 추가로 농축시켰다. 농축되고 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2- μ m 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 리포솜은 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 15.71 ± 0.33 mg/ml, DL 비율 518.6 ± 18.4 g/mol 인지질, 리포솜 크기 X_z 114.3 nm, PDI 0.0284. 제제화된 약물의 수율 235.7 mg (94.3%).

[0814] **실시예 36. 삼투압제 농도가 AKG-28 및 AKG-38의 리포솜으로의 로딩 효율 및 혈장 내 리포솜에 의한 약물 보유에 미치는 영향**

[0815] 실시예 6의 일반적인 프로토콜을 따랐다. 45:55:2.25:0.0675의 몰비로 HPSC, 콜레스테롤, PEG-DSPE 및 DiIC18(3)-DS(형광 지질 표지)의 지질 조성 및 0.5M 황산암모늄을 함유하는 압출된 리포솜을 실시예 30에 기재된 바와 같이 제조했다. 주사기로 작동되는 MicroKros 폴리설펜 중공 섬유 카트리지(MWCO 500 KDa, Spectrum

Laboratories)를 사용하여 내독소가 없는 "주사용수"(WFI) 품질의 물(Hyclone)에 대한 TFF 교환에 의해 리포솜 외부의 황산암모늄으로부터 리포솜을 정제했다(13.8 부피 교환, 잔류 전도도 88 μ S/cm, 인지질 농도 55.4mM). 리포솜은 65°C 수조에서 수용액에서 정제된 압출된 리포솜과 함께 약물 농도 2.22 mg/ml 및 250 g/mol 인지질 (AKG-28) 또는 450 g/mol 인지질(AKG-38)의 DL 비율에서 다양한 농도의 삼투압제(포도당) 존재 하에 20분 동안 약물(실시에 30 및 31에 기술된 바와 같이 수성 20 mg/ml 스톱으로 제조됨)의 인큐베이션에 의해 AKG-28 또는 AKG-38로 로딩되었다. 봉입되지 않은 약물은 세파로스 CL-4B, 용리액 HBS-7 완충액에서 크기 배제 크로마토그래피로 제거하고, 약물 및 인지질 분석 결과로부터 로딩(봉입) 효율을 결정했다. 삼투압제 농도는 리포솜을 형성하기 위해 사용된 0.5M 황산암모늄 용액에 대해 등삼투성인 것으로 결정된 168mg/ml 텍스트로스 농도의 백분율 및 절대 항 모두로 표현되었다. 리포솜 분야에서의 일반적인 합의로부터의 기대와는 반대로, 약물은 저삼투압 조건 하에서도(즉, 리포솜내 포획제 용액보다 더 낮은 리포솜의 용액의 삼투압), 첨가된 삼투 균형제(텍스트로스)의 완전한 부재까지 본 발명의 리포솜에 효과적으로 로딩되었다 (캡슐화 효율 85% 이상, 대부분 90% 이상) (표 22). 더욱이, 실시에 19에 기술된 시험관내 혈장 방출 분석 조건 하에서 혈장에 노출시, 삼투압제의 최저 농도로 로딩된 리포솜 내 약물 캡슐화는 적어도 거의 완전한 (86.3 %) 삼투 균형에서 로딩된 리포솜만큼 안정적이었다.

[0816] 결과는 55 mol% Chol, 45 mol% PC, 5 mol% HSPC의 PEG-DSPE 및 0.5 M AS 포획제를 갖는 리포솜이 AKG-28(표 22) 및 AKG-38(표 23)을 250 또는 500 g/mol PhL에서 최대 0% 텍스트로스의 저삼투압 조건 하에서 효율 >85%, 대부분 >90%로 로딩하고, 그리고 저삼투압 조건 하에서 로딩된 리포솜은 혈장의 존재 하에 약물을 효율적으로 보유한다는 것을 나타낸다.

표 22

로트 ID	텍스트로스, g/L	0.5 M AS을 사용한 % 삼투 균형	출력 DL 비율, g/mol PhL	캡슐화 효율, %	리포솜 내 보유된 % 약물, 80% 혈장, 20 min, 37° C	
					마우스	인간
237	144.9	86.3	243.1 $\pm$ 7.5	97.2 $\pm$ 3.0	98.8 $\pm$ 4.6	98.0 $\pm$ 4.0
238	130.4	77.6	243.1 $\pm$ 4.9	97.2 $\pm$ 2.0		
239	115.9	69.0	253.1 $\pm$ 5.2	101.2 $\pm$ 2.1		
240	86.9	51.8	246.1 $\pm$ 3.5	98.4 $\pm$ 1.4		
241	58.0	34.5	253.7 $\pm$ 8.1	101.5 $\pm$ 3.3		
242	29.0	17.3	246.5 $\pm$ 5.4	98.6 $\pm$ 2.2	99.4 $\pm$ 4.3	100.3 $\pm$ 4.9
243	0	0	249.2 $\pm$ 5.4	99.7 $\pm$ 2.2	100.6 $\pm$ 4.3	102.2 $\pm$ 4.8

표 23

로트 ID	텍스트로스, g/L	0.5 M AS에 대한 % 삼투 균형	출력 DL 비율, g/mol PhL	캡슐화 효율, %	리포솜 내 보유된 % 약물, 80% 혈장, 20 min, 37° C	
					마우스	인간
244	144.9	86.3	464.9 $\pm$ 14.6	93.0 $\pm$ 2.9	82.0 $\pm$ 2.4	86.8 $\pm$ 2.8
245	130.4	77.6	463.5 $\pm$ 18.2	92.7 $\pm$ 3.6		
246	115.9	69.0	453.2 $\pm$ 8.7	90.6 $\pm$ 1.7		
247	86.9	51.8	459.8 $\pm$ 13.8	92.0 $\pm$ 2.8		
248	58.0	34.5	466.1 $\pm$ 14.5	93.2 $\pm$ 2.9	85.0 $\pm$ 3.3	89.6 $\pm$ 3.7
249	29.0	17.3	455.8 $\pm$ 12.9	91.2 $\pm$ 2.6	89.7 $\pm$ 3.1	92.8 $\pm$ 3.0
250	0	0	433.1 $\pm$ 17.7	86.6 $\pm$ 3.5	93.8 $\pm$ 3.5	91.2 $\pm$ 3.2

[0819] 실시예 37. 래트에서 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 전체 형태(캡슐화된 + 방출된 약물)의 단일 용량 약동학 연구이 연구는 래트에서 단일 용량 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38로 투여된 AKG28 및 AKG 38의 PK를 평가하기 위해 수행되었다. 이 연구는 체중 kg당 20, 40 또는 80mg의 리포솜 AKG-38(Ls-AKG38) 또는 체중 kg 당 10, 20 및 40mg의 리포솜 AKG-28(Ls-AKG28)의 IV 투여를 사용하여 수컷 Sprague-Dawley 래트에서 수행되었다. Ls-AKG28(로트 275) 및 Ls-AKG38(로트 276)을 각각 실시예 22 및 23에 기재된 바와 같이 제조했다. 비교를 위해, 리네졸리드(체중 50mg/kg)를 0.5% 메틸 셀룰로오스로 제제화하고 20mg/mL 농도에서 pH 3-4(시그마 M0430)로 산성화하여 위관영양액으로 경구 투여했다. 혈장 약물 측정을 위해 5분, 15분, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간, 48시간 및 72시간에

리튬 헤파린 튜브에 0.5ml 혈액을 수집했다. 샘플을 원심분리하고 생성된 혈장을 분리하여 이중 투명 폴리프로필렌 튜브로 옮기고 드라이아이스 위에서 즉시 동결하고 분석할 때까지 -80 °C에서 보관했다. 래트 내 혈장 농도는 HPLC로 측정했다. 비구획 PK 분석을 Phoenix WinNonlin(Version 7.0)을 사용하여 수행했다. Ls-AGK28 및 Ls-AGK38에 대해, 이 PK 소프트웨어를 사용하여 혈장 최대 농도(C_{max}), 혈장 최대 농도를 용량으로 나눈 값($C_{max}/\text{용량}$), C_{max} 시간(T_{max}), 마지막으로 측정된 농도(C_{last}), 마지막으로 측정된 농도의 시간(T_{last}), 0h에서 마지막 시점까지의 시간 곡선 대 혈장 농도 아래 면적(AUC_{0-last}) 및 0h에서 무한대까지의 시간 곡선 대 혈장 농도 아래 면적 (AUC_{0-inf}), 용량으로 나눈 AUC_{0-last} ($AUC_{0-last} / \text{용량}$), 청소율(CL), 분포 용적(V_d) 및 제거 반감기($T_{1/2}$)를 추정했다. 리네졸리드에 대해, 이 PK 소프트웨어를 사용하여 겔보기 청소율(CL/F) 및 겔보기 분포 용적(V_d/F)을 제외하고 동일한 PK 매개변수를 추정했다.

[0820] 10, 20, 및 40 mg/kg 단일 IV 용량(IV x 1)으로 Ls-AGK28을 투여한 후 전체 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일이 도 7에 제시되어 있다. Ls-AGK28 10, 20 및 40 mg/kg IV x 1 투여 후 전체 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약은 표 24에 제시되어 있다.

[0821] 모든 용량에서 Ls-AGK28에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일은 5분에서 72시간까지 검출 가능했다. $C_{max}/\text{용량}$ 및 AUC/용량의 결과에 기초하여 Ls-AGK28의 혈장 PK는 10, 20 및 40 mg/kg 투여 후 선형(용량 비례)이다. 모든 용량에서 Ls-AGK38(~2.59mL/h/kg)의 혈장 청소율(CL)은 Ls-AGK28(~1.67mL/h/kg)보다 컸다. 동일한 용량(20 또는 40mg/kg)에서 Ls-AGK28의 V_d 는 Ls-AGK38보다 컸다.

표 24

Ls-AGK28 10, 20 및 40 mg/kg IV 투여 후 총 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약.

PK 매개변수 총 AGK28	리네졸리드	Ls-AGK28			
	50 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	
C_{max} [$\mu\text{g/mL}$]	26.73	272.23	413.83	577.70	
$C_{max} / \text{용량}$ [$\mu\text{g/mL}/[\text{mg/kg}]$]	0.53	27.22	20.69	14.44	
T_{max} [hr]	1.0	0.083	0.083	0.083	
C_{last} [$\mu\text{g/mL}$]	5.35	8.95	31.05	94.89	
T_{last} [hr]	24.0	72	72	72	
AUC_{0-last} [$\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}$]	282.01	5,565.17	11,287.31	20,712.25	
$AUC_{0-last} / \text{용량}$ [$\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}/[\text{mg/kg}]$]	5.64	556.52	564.37	517.81	
AUC_{0-inf} [$\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}$]	373.53	5,764.67	12,143.11	24,218.25	
청소율 [mL/hr/kg]	133.86	1.73	1.64	1.65	
V_d [mL/kg]	2,291.26	38.66	45.40	61.03	
$T_{1/2}$ [hr]	11.86	15.45	19.11	25.61	

[0822]

[0823] 20, 40 및 80mg/kg IV x 1에서 Ls-AGK38을 투여한 후 전체 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일이 도 8에 제시되어 있다.

[0824] 20, 40 및 80 mg/kg IV x 1에서 Ls-AGK38을 투여한 후 총 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약은 표 25에 제시되어 있다.

[0825] 모든 용량에서 Ls-AGK38에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일은 5분에서 72시간까지 검출 가능했다. $C_{max}/\text{용량}$ 및

AUC/용량의 결과에 기초하여 Ls-AKG38의 혈장 PK는 20, 40 및 80 mg/kg 투여 후 선형(용량 비례)이다. 모든 용량에서 Ls-AKG38(~2.59mL/h/kg)의 혈장 청소율(CL)은 Ls-AKG28(~1.67mL/h/kg)보다 컸다. 동일한 용량(20 또는 40mg/kg)에서 Ls-AKG28의 Vd는 Ls-AKG38보다 컸다.

표 25

Ls-AKG38 20, 40 및 80 mg/kg IV 투여 후 총 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약.

PK 매개변수 총 AKG38	리네졸리드	Ls-AKG38 용량			
	50 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	80 mg/kg	
C_{max} [$\mu\text{g/mL}$]	26.73	452.84	856.42	1,555.85	
C_{max} / 용량 [$\mu\text{g/mL}$]/[mg/kg]	0.53	22.64	21.41	19.44	
T_{max} [hr]	1.0	0.083	0.083	0.083	
C_{last} [$\mu\text{g/mL}$]	5.35	1.29	5.29	27.14	
T_{last} [hr]	24.0	72	72	72	
AUC_{0-last} [hr* $\mu\text{g/mL}$]	282.01	7,532.62	15,402.45	31,313.26	
AUC_{0-last} / 용량 [hr* $\mu\text{g/mL}$]/[mg/kg]	5.64	376.63	385.06	391.42	
AUC_{0-inf} [hr* $\mu\text{g/mL}$]	373.53	7,548.80	15,468.95	31,784.91	
청소율 [mL/hr/kg]	133.86	2.65	2.59	2.52	
Vd [mL/kg]	2,291.26	33.26	32.48	43.74	
$T_{1/2}$ [hr]	11.86	8.70	8.71	12.05	

[0826]

[0827]

Ls-AKG28 10, 20 및 40 mg/kg IV x 1 및 Ls-AKG38 20, 40 및 80 mg/kg IV x 1 투여 후 총 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일이 도 7 및 도 8 각각에서 제시되어 있다. 단일 IV 용량 연구에서, 모든 용량에서 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일은 5분에서 72시간까지 검출 가능했다. Ls-AKG28의 혈장 PK는 10, 20 및 40 mg/kg 투여 후 선형(용량 비례)이다. Ls-AKG38의 혈장 PK는 20, 40 및 80 mg/kg 투여 후 선형(용량 비례)이다. 모든 용량에서 Ls-AKG38(~2.59mL/h/kg)의 혈장 청소율(CL)은 Ls-AKG28(~1.67mL/h/kg)보다 컸다. 동일한 용량(20 또는 40mg/kg)에서 Ls-AKG28의 Vd는 Ls-AKG38보다 컸다. 40mg/kg에서 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 총 혈장 PK 노출은 리네졸리드의 혈장 PK보다 ~73배 및 ~110배 더 높았다(0에서 마지막까지의 AUC 사용).

[0828]

혈장 AUC 및 순환에서의 약물 지속성은 리네졸리드와 비교하여 두 리포좀 제제 모두에 대해 훨씬 더 컸다. 두 리포좀 제제의 PK는 각각 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38에 대해 매우 유사한 AUC/용량 값에 의해 보여지는 바와 같이 선형 용량 의존성을 갖는다.

[0829]

실시예 38. Sprague-Dawley 래트에서 다중 IV 투여 후 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 전체 형태 (캡슐화된 + 방출된 약물)의 혈장 약동학(PK).

[0830]

이 연구는 래트에서 총 8주 동안 매주 증가하는 용량의 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38로 투여된 AKG28 및 AKG 38의 PK를 평가하기 위해 수행되었다. 이 연구는 IV 투여를 사용하여 Sprague-Dawley 래트에서 수행되었다. Ls-AKG28(로트 275) 및 Ls-AKG38(로트 276)은 각각 실시예 22 및 23에 기재된 바와 같이 제조했다. 래트의 혈장 농도는 HPLC로 측정했다. 1일, 15일, 29일 및 43일에 Ls-AKG28을 10, 20 및 40 mg/kg IV x 1로 투여한 후 총 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일은 표 26 및 도 9A, 도 9B, 및 도 9C에 제시되어 있다. 1일, 15일, 29일 및 43일에 Ls-AKG28 10, 20 및 40mg/kg IV x 1 투여 후 전체 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약은 표 26에 제시되어 있다. 도 9A, 도 9B, 및 도 9C의 모든 데이터가 표 26에서 PK 매개변수 결과를 생성하는 데 사용되었다.

[0831]

단일 및 다중 용량 PK 연구에서, Ls-AKG28의 혈장 배치는 제1 용량 이후 유사했다. 10mg/kg의 Ls-AKG28의 경우,

혈장 C_{max} 및 AUC는 1일, 15일, 29일 및 43일에 유사했다. 20mg/kg의 Ls-AGK28의 경우, 혈장 C_{max} 및 AUC는 29일 및 43일에 증가한다. 40mg/kg의 Ls-AGK28의 경우, 혈장 C_{max} 및 AUC는 1일에서 43일 사이에 투여 후 증가한다.

[0832]

1일, 15일, 29일 및 43일에 Ls-AGK38을 20, 40 및 80 mg/kg IV x 1로 투여한 후 총 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일을 표 27 및 도 10A, 도 10B, 및 도 10C에 제시되어 있다. 1일, 15일, 29일 및 43일에 Ls-AGK38 20, 40 및 80mg/kg IV x 1 투여 후 전체 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약이 표 27에 제시되어 있다. 단일 및 다용량 PK 연구에서 Ls-AGK38의 혈장 처리는 첫 번째 용량 이후 유사했다. 20, 40 및 80mg/kg의 Ls-AGK38의 경우, 혈장 C_{max} 및 AUC는 1일에서 43일까지 증가한다. 비세포독성 약물 페이로드를 포함하는 폐경화된 리포솜에 대한 가속화된 혈액 청소율(ABC)에 대한 우려를 고려할 때, 이후 주기에서 증가된 청소율의 결여는 놀라운 일이었고, AGK-28 또는 AGK-38을 포함하는 리포솜이 포유동물에 만성적으로 투여될 수 있음을 시사한다.

표 26

[0833]

1일, 15일, 29일 및 43일에 Ls-AGK28 10, 20 및 40mg/kg IV x 1 투여 후 전체 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약.

	C _{max} [μ g/mL]	AUC _{0-last} [hr*] μ g/mL]	청소율 [mL/hr/kg]	Vd [mL/kg]	T _{1/2} [hr]
Ls-AGK28 (10 mg/kg) - d1	271.28	7,766.70	0.92	36.01	27.27
Ls-AGK28 (10 mg/kg) - d15	270.78	6,093.17	1.36	36.94	18.83
Ls-AGK28 (10 mg/kg) - d29	277.67	6,807.48	1.19	34.84	20.23
Ls-AGK28 (10 mg/kg) - d43	292.14	7,780.12	0.93	34.37	25.48
Ls-AGK28 (20 mg/kg) - d1	423.81	11,133.88	1.49	42.87	19.99
Ls-AGK28 (20 mg/kg) - d15	514.07	11,757.75	1.36	39.97	20.41
Ls-AGK28 (20 mg/kg) - d29	560.15	14,997.08	1.00	35.06	24.31
Ls-AGK28 (20 mg/kg) - d43	561.51	15,702.04	0.91	35.13	26.73
Ls-AGK28 (40 mg/kg) - d1	596.89	19,970.35	1.63	53.70	22.88
Ls-AGK28 (40 mg/kg) - d15	1,018.25	26,606.26	1.07	40.29	26.02
Ls-AGK28 (40 mg/kg) - d29	1,163.03	33,635.70	0.81	34.14	29.19
Ls-AGK28 (40 mg/kg) - d43	1,269.07	37,580.42	0.73	30.78	29.17

표 27

[0834]

1일, 15일, 29일 및 43일에 Ls-AGK38 20, 40 및 80mg/kg IV x 1 투여 후 전체 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약.

	C _{max} [μ g/mL]	AUC _{0-last} [hr*] μ g/mL]	청소율 [mL/hr/kg]	Vd [mL/kg]	T _{1/2} [hr]
Ls-AGK38 (10 mg/kg) - d1	485.39	7,702.72	2.49	38.12	10.61
Ls-AGK38 (10 mg/kg) - d15	529.93	8,792.21	2.16	35.41	11.36
Ls-AGK38 (10 mg/kg) - d29	576.14	9,875.80	1.89	34.05	12.52
Ls-AGK38 (10 mg/kg) - d43	639.70	12,053.96	1.53	29.59	13.43
Ls-AGK38 (20 mg/kg) - d1	880.03	15,364.53	2.50	38.91	10.78
Ls-AGK38 (20 mg/kg) - d15	1,011.05	18,314.30	2.07	35.16	11.78
Ls-AGK38 (20 mg/kg) - d29	1,017.30	21,373.77	1.69	35.96	14.74
Ls-AGK38 (20 mg/kg) - d43	1,013.54	23,414.28	1.51	35.57	16.38
Ls-AGK38 (40 mg/kg) - d1	1,648.38	31,180.74	2.41	43.10	12.40
Ls-AGK38 (40 mg/kg) - d15	2,025.67	38,874.97	1.90	36.31	13.21
Ls-AGK38 (40 mg/kg) - d29	2,231.92	45,921.63	1.62	31.15	13.36
Ls-AGK38 (40 mg/kg) - d43	2,428.35	50,694.28	1.45	29.22	13.99

[0835]

실시예 39. CD-1 마우스에서 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38의 약물 및 리포솜 지질의 약동학 연구. 이 연구는 생체내 혈장에서 AGK-28 및 AGK-38의 리포솜 제제의 리포솜에서 약물 보유의 안정성 및 약물 및 리포솜 지질 모두에 대한 혈액 약동학 파라미터를 결정하기 위해 설계되었다. 연구는 실시예 7에서 상기 일반 프로토콜에 기술된 바와 같

이 수컷 CD-1(20-22g) 마우스에서 수행되었다(시점당 5마리의 마우스). Ls-AKG28(로트 235) 및 Ls-AKG38(로트 236)을 각각 실시예 30 및 31에 기재된 바와 같이 제조했다. 50mg/kg(Ls-AKG28) 또는 90mg/kg(Ls-AKG38) 용량의 리포솜을 시간 0에 양태 꼬리 정맥에 주사하고 주사 후 0.083, 1, 3, 6, 24, 및 48시간에서 혈액을 샘플링했다. AKG-28, AKG-38 및 형광 리포솜 지질 표지(DiIC₁₈(3)-DS)의 혈장 농도를 HPLC로 측정했다. 리포솜 인지질의 혈장 농도는 리포솜 로트 235 및 236을 표준으로 사용하여 형광 표지 정량화로부터 계산되었다. 캡슐화되지 않은 옥사졸리디논 약물의 조직 친화력이 리포솜 캡슐화 약물보다 몇 배 더 높을 것으로 예상되기 때문에(예를 들어 래트에서 리포솜-캡슐화 AKG-28에 대한 33.27-43.74 mL/kg의 V_d에 비해 비캡슐화 옥사졸리디논, 리네졸리드의 V_d 2,291.26mL/kg에 의해 뒷받침됨, 실시예 37 참조), 혈장 약물 농도는 주로 리포솜-관련 약물에 기인할 수 있고 최초(주입전) DL 값으로 정규화된 혈장 약물-리포솜 지질(DL) 비율을 리포솜에 의한 약물 보유의 척도로 취했다. 비구획 PK 분석은 Summit Research Services, PK Solutions 2.0을 사용하여 수행되었다. Ls-AKG28 및 Ls-AKG38에 대해, 이 PK 소프트웨어를 사용하여 혈장 최대 농도(C_{max}), 혈장 최대 농도를 용량으로 나눈 값(C_{max}/용량), C_{max} 시간(T_{max}), 마지막으로 측정된 농도(C_{last}), 마지막으로 측정된 농도의 시간(T_{last}), 0h에서 마지막 시점까지의 시간 곡선 대 혈장 농도 아래 면적(AUC_{0-last}) 및 0h에서 무한대까지의 시간 곡선 대 혈장 농도 아래 면적(AUC_{0-inf}), 용량으로 나눈 AUC_{0-last}(AUC_{0-last} / 용량), 청소율(CL), 분포 용적(V_d) 및 제거 반감기를 추정했다.

[0836] Ls-AKG28(도 11A) 및 Ls-AKG38(도 11B)의 투여 후 약물에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일이 제시되어 있다. 혈장 내 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약은 표 28에 제시되어 있고 리포솜 인지질에 대한 요약은 표 29에 제시되어 있다. 생체내 약물 캡슐화의 안정성을 나타내는 DL 비율의 역학이 도 11C 및 표 30에 제시되어 있다.

[0837] Ls-AKG28은 마우스에서 IV 주사 후 최대 48시간까지 감지할 수 없는 약물 손실과 함께 거의 완벽한 생체내 안정성을 갖는다. Ls-AKG28에 대한 약물 방출의 반감기는 단일 지수 방정식($R^2=0.822$)을 사용하여 866.3시간이다. Ls-AKG28은 약물 방출 속도가 더 빠르다. Ls-AKG38의 약물 방출 반감기는 단일 지수 방정식($R^2=0.950$)을 사용하여 22.9시간이다.

표 28

[0838] Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 투여 후 약물에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약.

PK 매개변수	Ls-AKG28	Ls-AKG38
C _{max} [mg/L]	1261.1	2320.3
C _{max} / 용량 [mg/L]/[mg/kg]	25.22	25.78
T _{max} [hr]	0.083	0.083
C _{last} [mg/L]	81.17	41.48
T _{last} [hr]	48	48
AUC _{0-last} [hr*mg/L]	19,820	30,346
AUC _{0-last} / 용량 [hr*mg/L]/[mg/kg]	396.4	337.2
AUC _{0-inf} [hr*mg/L]	21,156	45,114
청소율 [mL/hr/kg]	2.35	2.93
V _d [mL/kg]	42.13	30.12
T _{1/2} [hr]	12.42	7.14

표 29

[0839]

Ls-AGK28 및 Ls-AGK38의 투여 후 리포솜 인지질에 대한 혈장 PK 매개변수의 요약.

PK 매개변수	Ls-AGK28	Ls-AGK38
C_{max} [mol/L]	0.00485	0.00493
C_{max} / 용량 [mol/L]/[mol/kg]	24.87	25.54
T_{max} [hr]	0.083	0.083
C_{last} [mol/L]	0.00033	0.00041
T_{last} [hr]	48	48
AUC_{0-last} [hr*mol/L]	0.0769	0.0817
AUC_{0-last} / 용량 [hr*mol/L]/[mol/kg]	394.3	421.1
AUC_{0-inf} [hr*mol/L]	0.0826	0.0979
청소율 [mL/hr/kg]	2.34	2.17
V_d [mL/kg]	43.3	41.0
$T_{1/2}$ [hr]	12.82	13.09

표 30

[0840]

마우스에서 IV 투여 후 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38의 혈장 약물 대 리포솜 인지질 비율.

시간 (h)	Ls-AGK28 약물 대 인지질 비율		Ls-AGK38 약물 대 인지질 비율	
	최초의 (%)	표준 편차	최초의 (%)	표준 편차
0.083	101.1	1.75	101.7	4.29
1	102.4	2.10	97.6	1.56
3	101.9	1.27	94.2	4.20
6	101.2	0.89	97.4	2.08
24	98.7	1.92	63.3	2.36
48	98.4	2.54	22.7	1.75

[0841]

실시예 40. ABC 효과의 존재 하 리포솜의 다중 투여 후 마우스에서 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38 약물의 약동학 연구항-PEG 항체의 생성은 반복된 다중 주사 후 PEG-지질 접합체(pegylated 리포솜)를 함유하는 리포솜의 더 빠른 제거를 야기하는 것으로 나타났다(Ishida et al. Journal of Controlled Release 105 (2005) 305-317; Laverman et al. JPET 298 (2001) 607-612), 가속화된 혈액 청소(ABC) 효과로 알려진 현상. 본 연구는 다양한 조성을 갖는 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38을 다양한 용량으로 반복 투여한 후 ABC 효과가 있는지 확인하기 위해 수행되었다. 실시예 33-35, 로트 231, 232, 233 및 234에 따라 리포솜을 제조했다. 이 연구는 일반적으로 실시예 7에 기재된 바와 같이 수컷 CD-1 마우스에서 수행했다. 그룹당 5마리의 마우스를 사용했다. 마우스에서 AGK-28 및 AGK-38의 혈장 농도를 HPLC로 측정했다. 총 4회 주사 동안 주당 1회 지시된 용량 및 제제를 마우스에 주사했다. 약물은 1차 및 4차 투여 후 6시간 시점에서 혈장에서 측정되었다(도 12). 시험된 그룹 중 어느 것도 4번째 주사의 현저한 가속화된 청소율을 갖지 않았다(2-테일, 이등 분산 t-시험 모든 p 값 >0.05). 이 데이터는 이러한 리포솜 옥사졸리디논이 약물 노출에 대한 심각한 부정적인 영향 없이 여러 주간 주기 동안 만성적으로 투여될 수 있음을 확인한다

표 31

[0842]

Ls-AGK28 및 Ls-AGK38 투여 후 리포솜 인지질에 대한 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38에 대한 혈장 약물 농도. 약어: SOS, 1 N TEA-SOS; AS, 0.5M 황산암모늄; Chol, 콜레스테롤과 HSPC 합계의 mol%로서의 콜레스테롤 함량; DL, 약물 대 지질 비율, g/mol 리포솜 인지질; %ID - 주사된 용량의 백분율, 그룹당 평균; SD-표준편차.

기	약물	포획제	Chol (mol%)	DL 비율	주사 용량 (mg/kg)	1 st 용량		4 th 용량	
						%ID	SD	%ID	SD

1	AKG-28	SOS	40	266.9	65	61.99	7.20	55.71	13.88
2	AKG-28	SOS	40	266.9	90	55.74	6.73	63.23	11.07
3	AKG-28	AS	55	252.5	65	56.15	18.3	70.17	3.91
4	AKG-28	AS	55	252.5	90	62.90	3.41	67.11	7.67
5	AKG-38	SOS	55	538.1	90	54.67	6.49	51.57	8.55
6	AKG-38	SOS	55	538.1	120	58.53	9.52	56.79	6.29
7	AKG-38	AS	55	524.5	90	53.57	1.20	44.25	8.66
8	AKG-38	AS	55	524.5	120	55.39	7.99	48.95	8.66

[0843] 이 데이터는 4주기의 치료 후, 리포좀과 결합된 세포독성 물질을 함유하지 않는 다른 폐길화된 리포좀에 대해 이전에 보고된 것과 대조적으로, 본 개시내용의 리포좀 AKG-28 또는 리포좀 AKG-38의 혈액 청소율이 증가하지 않았음을 나타낸다. **실시예 41. CD-1 마우스에서 리포좀 AKG-28 및 리포좀 AKG-38의 용량 의존적 내약성**

[0844] 이 연구의 목적은 마우스에서 상이한 투여량으로 단일 제제로서 주사된 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 내약성을 평가하는 것이었다. 20-22g(각 그룹당 5마리)의 암컷 CD-1 마우스에 Ls-AKG28(50, 65, 90 또는 100 mg/kg/용량) 또는 Ls-AKG38(50, 90, 120 또는 200 mg/kg/용량)을 4주 동안 매주 1회 정맥 주사(꼬리 정맥)한다. 리포좀 제제(Ls-AKG28 로트 231 및 Ls-AKG38 로트 232)는 실시예 33에 이미 기술된 바와 같이 제조했다. 대조군은 4주 동안 매주 1회 동일한 부피의 HEPES 완충 식염수(HBS, pH 7)를 주사했다. 체중은 연구 전반에 걸쳐 일주일에 3회 측정되었고 데이터는 0일에 측정된 체중에 대한 체중 변화의 백분율로 표시되었다.

[0845] 연구 종료 시(마지막 처리 후 72시간) CO2 흡입을 사용하여 동물을 인도적으로 안락사시켰다. 심장 천자에 의해 혈액 샘플을 수집하고 혈액학 분석(Homological ADVIA 120/2120i 분석기)을 위해 EDTA 미리 채워진 마이크로테이너로 옮기고 혈장 분리를 위해 리튬 헤파린으로 미리 채운 마이크로테이너로 옮겼다. 혈장은 10000 rpm에서 5분 동안 원심분리에 의해 세포 분획으로부터 분리되었고 생화학 분석(Cobas 6000 Analyzer)에 사용되었다. 조직 샘플(간, 비장, 신장, 링, 심장, 소장 및 컬럼)은 24시간 후 70% 에탄올로 대체된 10% 완충 포르말린으로 미리 채워진 50ml 튜브에 수집했다. 조직을 파라핀에 포매하고, 절개하고, 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하고 보드 인증 수의 병리학자에 의해 조직병리학에 대해 평가했다.

[0846] **도 13A 및 도 13B**에 도시된 바와 같이, Ls-AKG28에 대해 최대 90 mg/kg까지, 그리고 Ls-AKG28에 대해 200 mg/kg까지의 용량으로 총 4주 용량을 처리할 때 식염수 대조군에 비해 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38 모두에 대해 관찰된 마우스 체중에 유의한 영향이 없었다.

[0847] 대조군에 비해 고용량의 Ls-AKG38(90, 120 및 200 mg/kg)로 처리된 마우스에서 적혈구 수 및 헤마토크릿(**도 13C**)의 현저한 감소는 식염수 대조군에 비해 없었다. Ls-AKG28로 처리한 마우스에서는 그러한 효과가 관찰되지 않았다. 대조군에 비해 혈소판 수의 현저한 감소는 90mg/kg의 가장 높은 용량에서 Ls-AKG28로 처리된 마우스에서 발견되었지만(**도 13C**), 식염수 대조군과 비교하여 여전히 25% 미만 감소이다. Ls-AKG28 또는 Ls-AKG38을 사용한 치료는 백혈구(WBC) 수 또는 혈액 간 효소(ALT 및 AST) 수에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0848] 조직병리학 분석은 50 및 65 mg/kg Ls-AKG28을 투여받은 동물에서 시험 항목-관련 소견을 나타내지 않았다(**도 13D**). 90mg/kg Ls-AKG28을 투여한 동물의 간, 비장 및 신장에서 대식세포(쿠퍼 세포 포함)의 최소 액포화로 구성된 시험 항목-관련 소견이 있었다. Ls-AKG38을 사용한 치료는 90mg/kg 및 120mg/kg의 용량에서 간 및 비장에서 시험 항목-관련 소견과 관련이 있었다. 간에서, 50 및 90 mg/kg에서 Kupffer 세포의 최소 내지 경미한 액포형성 및 비대가 있었고, 50 및 120 mg/kg에서 Kupffer 세포의 중간 정도의 액포형성 및 비대가 있었고, 90 mg/kg 및 120mg/kg에서 액포형성 대식세포의 최소한의 다초점 응집이 있었다.

[0849] Ls-AKG38의 최고 용량(200 mg/kg)에서의 치료는 간 및 비장에서 최소로 증가된 골수의 조혈(EMH), 최소 내지 정도의 다병소 혼합 세포 침윤 및 간 및 최소 국소 간세포 괴사와 관련되었다(**도 13D**). 이러한 현미경적 소견은 이 종에서 배경 소견으로 공통적으로 발생하기 때문에 시험 항목과 관련된 것으로 간주되지 않았다.

[0850] 전반적으로, Ls-AKG28 및 Ls-AKG38 단독요법 둘 모두는 리포좀 약물이 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38에 대해 각각 최고 평가 용량인 90 및 200 mg/kg, 각각으로 주사된 경우에도 마우스에서 우수한 생체 내 내약성을 나타낸다.

[0851] **실시예 42. 마우스에서 BDQ/PMD 또는 BDQ/PMD/MOX와 결합된 Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 생체 내 내약성.**

[0852] 이 실시예에서 리포좀 옥사졸리디논의 생체내 내약성을 치료적으로 관련된 항-결핵 약물과 조합하여 평가했다. 베다퀼린, 프레토마니드 및 리네졸리드(BDQ/PMD/LNZ 또는 BPL) 또는 베다퀼린, 프레토마니드 및 목시플록사신

(BDQ/PMD/MOXI 또는 BPM)의 세 가지 약물 요법은 비록 BPL 요법이 주로 리네졸리드 추가와 관련된 독성으로 인해 제한되었지만 (Conradie et al (2020) N Engl J Med 382(10) 893-902), 다제 내성 결핵을 치료할 때 임상에서 강력한 활성을 보였다(Conradie et al (2020) N Engl J Med 382(10) 893-902 및 Tweed et al. (2019) Lancet Respir Med 7(12)1048-1058). 여기에서 BPL 요법에서 리네졸리드를 대체하거나 BPM 요법에 추가하여 두 가지 요법의 일부로 사용될 때 두 가지 리포좀 옥사졸리디논, Ls-AGK28 및 Ls-AGK38의 안전성과 내약성을 평가했다. CD-1 마우스(각 그룹당 5마리)를 Ls-AGK28(로트 231) 또는 Ls-AGK38(로트 232) 단독으로 또는 베다퀼린(BDQ) 및 프레토마니드(PMD) 조합과 함께 처리했다. Ls-AGK28(Lot 231) 및 Ls-AGK38(Lot 232)을 실시예 33에 기술된 바와 같이 제조했다. 추가로, 마우스를 BDQ, PMD 및 목시플록사신(MOXI) 및 리포좀 옥사졸리디논의 삼중 조합으로 공동-처리했다.

[0853] Ls-AGK28(50mg/kg/용량) 및 Ls-AGK38(90mg/kg/용량)을 4주 동안 매주 1회 꼬리 정맥을 통해 정맥 주사로 투여했다. BDQ, PMD 및 MOXI 조합(각각 25/100/100 mg/kg/용량)을 4주 동안 주 5회 매일 경구 위관 영양법으로 투여했다. 추가 대조군으로, 마우스를 BDQ/PMD/MOX 또는 BDQ/PMD(각각 25/100 mg/kg/용량) + 리네졸리드(LNZ)를 매일 100 mg/kg/용량으로 일주일에 5회 4주 동안 경구 투여했다. 체중 측정, 조직 수집 및 분석은 이전에 실시예 41에 기재된 바와 같이 수행했다.

[0854] 도 14A 및 도 14B에 예시된 바와 같이, BDQ/PMD(BP) 또는 BDQ/PMD/MOX(BPM)와 함께 공동-처리된 Ls-AGK28 또는 Ls-AGK38이 연구 동안 마우스 체중에 미치는 유의한 효과는 관찰되지 않았다. Ls-AGK28 및 Ls-AGK38은 모두 BDQ/PMD 또는 BDQ/PMD/MOX와 조합하여 우수한 내약성을 나타내고 처리된 마우스에서 혈액학 또는 혈액 생화학에 영향을 미치지 않았다(도 14C).

[0855] 조직병리학 데이터(도 14D)는 BDQ/PMD와 조합된 Ls-AGK28의 경우 치료 관련 변화를 나타내지 않았다. Ls-AGK28 + BDQ/PMD/MOX 조합은 폐 및 심장에서 혼합 세포 및 단핵 세포 침윤과 관련된 최소한의 사건을 나타낸다. 단일 요법으로서 Ls-AGK38을 사용한 치료는 간에서의 최소한의 시험 항목 관련 소견(염증성 침윤 및 간세포 괴사)과 관련이 있었다. Ls-AGK38 + BDQ/PMD의 투여는 어떠한 치료 관련 소견도 나타내지 않았고, Ls-AGK38 + BDQ/PMD/MOX의 조합은 폐에서 최소 혼합 세포 침윤과 관련이 있었다. BDQ/PMD/LNZ 조합으로 처리된 동물은 간의 염증 침윤, 최소 간세포 괴사 및 폐의 액포화된 대식세포 침윤의 치료 관련 소견과 관련이 있었다. 따라서, Ls-AGK28(50mg/kg/dose) 및 Ls-AGK38(90mg/kg/dose) 모두 주 1회 4주 동안 마우스에서 BDQ/PMD 또는 BDQ/PMD/MOX와 병용하여 우수한 내약성을 나타냈다.

[0856] 실시예 43. 마우스에서 BDQ/PMD와 조합된 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38의 내약성에 대한 용량 스케줄링의 효과.

[0857] 이 연구에서, 일주일에 두 번 투여된 Ls-AGK28(50mg/kg/용량) 또는 Ls-AGK38(100mg/kg/용량)의 생체내 내약성을 주 1회 투여된 Ls-AGK28(100mg/kg/용량) 또는 Ls-AGK38(200mg/kg/용량)과 비교했다. 실시예 25(Ls-AGK38, 로트 279) 및 실시예 26(Ls-AGK28, 로트 281)에 따라 리포좀을 제조했다. 두 리포좀 약물을 CD-1 암컷 마우스(각 그룹당 5마리)에 단독으로 또는 BDQ/PMD(BP)와 함께 주사했다. BDQ/PMD(각각 25 및 100 mg/kg/용량)를 4주 동안 주 5회 매일 구강 위관 영양법으로 투여했다. 대조군은 HEPES 완충 식염수(HBS, pH 7)를 4주 동안 매주 1회 주사했다. 혈액 및 조직 샘플을 수집하고 실시예 41 및 42에서 기술한 바와 같이 분석했다.

[0858] 주 2회 또는 고용량으로 주 1회 투여된 Ls-AGK28 또는 Ls-AGK38을 사용한 마우스의 단일 요법 및 병용 요법 둘 모두는 체중(도 15A 및 도 15B) 또는 혈구 수 및 생화학에 영향을 미치지 않았다. (도 15C).

[0859] 수집된 조직의 조직병리학 분석(도 15D)은 Ls-AGK28을 50 mg/kg(2qw)으로 투여한 5마리의 마우스 중 2마리에서 대식세포 및 호중구로 구성된 최소 간질 혼합 세포 침윤물 및 100mg/kg(1qw)의 Ls-AGK28을 투여받은 동물 5마리 중 1마리에서 약간의 간질 혼합 세포 침윤물을 보여주었다.

[0860] 50 mg/kg(1qw)의 Ls-AGK28 + BP를 받은 마우스의 폐에는 대식세포(5마리 동물 중 1마리) 또는 혼합(대식세포 및 호중구) 염증 세포(마우스 5마리 중 3마리)로 구성된 최소 간질 침윤물이 있었다. Ls-AGK28 + BP를 100mg/kg(1qw)로 투여한 마우스에서 5마리 동물 중 4마리에서 최소한의 간질 혼합 세포 침윤물이 있었다. 또한, Ls-AGK28 + BP를 100 mg/kg(1qw)으로 투여한 동물 5마리 중 2마리의 폐에서 열은 호염기성 이물질과 관련된 최소한의 다발성 이물질 육아종이 있었다. 이러한 현미경적 소견은 50mg/kg(2qw)에서 Ls-AGK28 + BP를 투여받은 동물 5마리 중 1마리의 간에서 최소한의 다초점 혼합 세포 침윤 및 최소한의 개별 간세포 괴사를 포함하는 이중의 배경 소견으로 공통적으로 발생하기 때문에 시험 항목과 관련된 것으로 간주되지 않았다.

[0861] Ls-AGK38 치료(단독 또는 병용)와 관련된 유사한 현미경 소견은 간 및 비장에서 최소로 증가된 골수외 조혈(EMH), 최소 내지 경도 다초점 혼합 세포 침윤 및 최소 간의 개별 간세포 괴사, 최소 국소 간세포 괴사, 폐의

최소 국소 이물질 육아종(열은 호염기성 이물질과 관련됨) 및 폐의 최소 혼합 세포 침윤을 포함하는 이 종의 배경 소견으로 공통적으로 발생하기 때문에 시험 항목과 관련된 것으로 간주되지 않았다. 최소 내지 온화한 특성, 산발적 발생, 식염수 대조군에서의 존재 및 이 종에서 공통적인 배경 소견으로 발생하기 때문에 이러한 소견은 치료와 관련된 것으로 간주되지 않았다.

[0862] 따라서, 각각 50 mg/kg 및 100 mg/kg 용량으로 매주 2회 또는 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 주 1회 두 배 용량으로 투여된 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38 둘 다(단독으로 또는 BDQ/PMD와 조합하여)는 마우스에서 내약성이 양호했으며 처리된 동물의 체중, 혈액학 또는 조직병리학에 영향을 미치지 않았다.

[0863] **실시예 44. 래트에서 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38의 생체내 내약성.**

[0864] 본 연구의 목적은 래트에서 Ls-AGK28(로트 275) 및 Ls-AGK38(로트 276)의 잠재적인 독성을 결정하는 것이었다. Ls-AGK28(로트 275) 및 Ls-AGK38(로트 276)을 각각 실시예 22 및 23에 기재된 바와 같이 제조했다. 수컷 Sprague-Dawley 래트에게 Ls-AGK28(10, 20 또는 40 mg/kg/dose) 또는 Ls-AGK38(20, 40 또는 80 mg/kg/dose)을 정맥 주사(꼬리 정맥)로 8주 동안 주 1회 투여했다. 대조군은 8주 동안 매주 1회 동일한 부피의 HEPES 완충 식염수(HBS, pH 7)를 주사했다. 연구 중점 전에 이소플루란 마취 후 복부 대동맥의 출혈에 의해 동물을 인도적으로 안락사시켰다. 혈액 및 조직 샘플을 임상 병리학 파라미터 평가를 위해 수집했다. 조직의 대표 샘플을 수집하고 10% 중성 완충액에 보존하고, 파라핀에 포매하고, 절편화하고, 유리 슬라이드에 장착하고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하고, 보드 인증 수의 병리학자에 의해 조직병리학에 대해 평가했다. 혈액 혈액학 분석은 Homological ADVIA 120/2120i Analyzer를 사용하여 수행되었으며 혈액 생화학은 Cobas 6000 Analyzer를 사용하여 분석되었다.

[0865] 하기 매개변수 및 중점을 또한 평가했다: 사망률 및 빈사 상태 확인, 임상 관찰, 체중, 음식 소비, 신경 전도 속도(NCV) 및 근육 활동 전위(MAP), 기능적 관찰 배터리(FOB).

[0866] 신경 전도 속도(NCV) 및 근육 활동 전위(MAP)는 8주차에 수행되었다. 기록 세션 동안 동물은 이소플루란으로 마취되었다. 꼬리 신경 NCV는 꼬리의 중앙 뼈를 따라 흐르는 꼬리 신경의 전도 속도를 측정한다. 이 신경은 래트의 다른 신경보다 약 50% 더 길며 특히 길이 의존성 말단 축삭병증에 취약하다. NCV는 50mm의 거리에 걸쳐 측정되었으며 절절 및 막간 전류, 반응하는 축삭의 구조 및 평균 단면 직경 및 관련 수초의 무결성에 민감하다. 유발 반응의 진폭은 활성화된 섬유 수와 동기화를 반영한다. 데이터는 꼬리의 헤어 라인 아래 약 10mm(육안으로 결정됨)에 위치한 활성 기록 전극과 50mm 더 원위 자극 음극으로 기록되었다. 신호의 진폭과 시작 대기 시간을 기록하고 자극 음극과 활성 전극 사이의 거리를 초기 탈분극 전류의 절대 시작 대기 시간으로 나누어 속도를 계산했다.

[0867] 디지털 신경 NCV는 감각 디지털 신경에서 전도 속도를 측정한다. 디지털 신경은 뒷발의 등쪽 표면을 자극하는 좌골 신경의 원위 극단이다. 신경 전도 속도는 절절 및 막간 전류, 구조 및 반응하는 축삭 돌기의 평균 단면 직경 및 관련 수초의 완전성에 민감하다. 데이터는 양태 복사뼈 뒤의 발목에 위치한 활성 기록 전극과 뒷발의 두 번째 손가락 기저부의 자극 음극으로 기록되었다. 신호의 진폭과 시작 대기 시간을 기록하고 자극 음극과 활성 전극 사이의 거리를 초기 탈분극 전류의 절대 시작 대기 시간으로 나누어 속도를 계산했다.

[0868] 경골 운동 전도(개시 잠복기)는 경골 신경의 원위 부분에서 운동 섬유의 자극 후 래트 뒷발의 고유 근육의 반응 특성을 측정한다. 데이터는 뒷발의 양태 등쪽 근육(인간의 손가락 신근 근육에 해당)에 위치한 활성 전극과 양태 복사뼈 뒤의 발목 근위에 위치한 자극 음극으로 기록되었다. 운동 축삭의 신경 전도 속도는 유도된 복합 근육 활동 전위(CMAP)의 개시 잠복기로부터 추정되었다. CMAP의 진폭은 관련 신경의 극대 자극 후 반응의 피크에서 결정되었다.

[0869] Ls-AGK28, Ls-AGK38 관련 예정되지 않은 사망, 임상 관찰 또는 체중(도 16A 및 도 16B), NCV 및 MAP(표 34), FOB(표 35)음식 소비, 응고 매개변수, 장기 무게 또는 거시적 소견(데이터는 표시되지 않음)에 대한 영향은 없었다. 리네졸리드와 비교한 Ls-AGK28 또는 Ls-AGK38에 대해, 임의의 리포좀 치료 그룹에서 꼬리 또는 좌측 디지털 신경에 대한 최대 감소 신경 전도 속도는 역가 조정된 투여량의 16.5배 증가에도 불구하고 5% 미만이었다(실시예 2에서 *M. 투베르쿨로시스* Erdmann 균주에 대한 유리 약물 역가를 기준으로 함).

[0870] 20 mg/kg 이상의 용량으로 Ls-AGK28 및 Ls-AGK38을 투여하면 혈소판 수가 통계적으로 유의하게 감소했다(대조군과 비교하여 최대 20%의 차이). 다른 혈액학적 및 혈액 생화학 매개변수에 대한 추가 효과는 관찰되지 않았다(표 32, 표 33).

[0871] ≥ 10 mg/kg/용량으로 8주 동안 매주 1회 수컷 Sprague-Dawley 래트에게 정맥내 주사에 의한 Ls-AGK28의 투여

는 비장, 신장 및 간 현미경 소견을 초래했다(표 36). 비장에는 호염기성 과립이 있는 대식세포 액포형성이 최소에서 중간 정도였으며 20 또는 40 mg/kg/용량을 투여한 래트에서 호염기성 물질의 최소에서 경미한 축적이 있었다. 40 mg/kg/dose를 투여한 래트의 신장은 최소한의 사구체 메산지움 세포 액포형성을 보였다. 간은 모든 용량에서 최소 소엽 중심 단세포 괴사 및 최소 내지 경미한 소엽 중심 간세포 변성을 보였다.

표 32

[0872] 수컷 Sprague Dawley 래트에서 리포솜 AKG-28 및 AKG-38매주 8회 투여 후 혈액 내 간 효소 수준에 미치는 영향.

그룹	ALT (U/L)	AST (U/L)
염수	105.7 ± 23.0	52.2 ± 9.2
Ls-AKG28 (10 mg/kg)	89.5 ± 16.5	37.7 ± 9.4
Ls-AKG28 (20 mg/kg)	97.5 ± 20.3	38.0 ± 8.1
Ls-AKG28 (40 mg/kg)	98.5 ± 10.5	56.3 ± 16.8
Ls-AKG38 (10 mg/kg)	98.7 ± 14.0	38.8 ± 10.2
Ls-AKG38 (20 mg/kg)	92.0 ± 23.6	38.2 ± 8.1
Ls-AKG38 (40 mg/kg)	93.3 ± 9.4	45.8 ± 10.1

표 33

[0873] 수컷 Sprague Dawley 래트에서 8주간 투여 후 혈구 수 및 헤마토크리트(HCT)에 대한 리포솜 AKG-28 및 AKG-38의 영향.

그룹	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	HCT (%)	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)
염수	52.2 ± 9.2	8.11 ± 0.48	9.92 ± 3.13	1234 ± 113
Ls-AKG28 (10 mg/kg)	37.7 ± 9.4	8.13 ± 0.26	9.26 ± 1.10	1143 ± 88
Ls-AKG28 (20 mg/kg)	38.0 ± 8.1	8.26 ± 0.35	8.83 ± 1.30	1089 ± 118
Ls-AKG28 (40 mg/kg)	56.3 ± 16.8	8.15 ± 0.34	8.79 ± 2.44	973 ± 66
Ls-AKG38 (10 mg/kg)	38.8 ± 10.2	7.74 ± 0.41	10.46 ± 1.62	1090 ± 50
Ls-AKG38 (20 mg/kg)	38.2 ± 8.1	7.90 ± 0.39	7.23 ± 1.18	1039 ± 75
Ls-AKG38 (40 mg/kg)	45.8 ± 10.1	7.65 ± 0.43	9.37 ± 3.56	984 ± 74

표 34

[0874] 수컷 Sprague Dawley 래트에서 8주간 투여 후 신경 전도도에 대한 리포솜 AKG-28 및 AKG-38의 영향.

그룹	꼬리 NCV (m/sec)	좌측 손가락 NCV (m/sec)	좌측 경골 MAP (msec)
염수	48.7 ± 2.7	31.5 ± 1.8	1.675 ± 0.099
Ls-AKG28 (10 mg/kg)	49.6 ± 1.9	32.6 ± 2.3	1.678 ± 0.092
Ls-AKG28 (20 mg/kg)	49.1 ± 2.3	32.3 ± 4.6	1.707 ± 0.124
Ls-AKG28 (40 mg/kg)	46.8 ± 3.4	33.9 ± 2.2	1.667 ± 0.078
Ls-AKG38 (10 mg/kg)	47.6 ± 1.8	32.7 ± 1.8	1.680 ± 0.055
Ls-AKG38 (20 mg/kg)	45.6 ± 2.6	32.9 ± 3.2	1.752 ± 0.084
Ls-AKG38 (40 mg/kg)	48.6 ± 4.8	31.0 ± 1.7	1.717 ± 0.153

표 35

[0875] 수컷 Sprague Dawley 래트에서 8주간 투여 후 신경 기능 관찰 배터리에 대한 리포솜 AKG-28 및 AKG-38의 영향.

그룹	뒷다리 Splay (cm)	뒷다리 그립 평균 (g)	앞다리 그립 평균 (g)
염수	11.10 ± 1.50	670.2 ± 68.9	1274.8 ± 132.9
Ls-AKG28 (10 mg/kg)	11.20 ± 2.00	715.9 ± 50.9	1335.2 ± 153.0
Ls-AKG28 (20 mg/kg)	12.20 ± 1.50	695.7 ± 125.9	1331.9 ± 117.1
Ls-AKG28 (40 mg/kg)	11.50 ± 1.60	709.9 ± 61.9	1140.2 ± 169.9

Ls-AGK38 (10 mg/kg)	12.10 ± 1.30	741.5 ± 92.9	1373.6 ± 107.2
Ls-AGK38 (20 mg/kg)	11.70 ± 2.70	740.9 ± 74.6	1281.6 ± 114.8
Ls-AGK38 (40 mg/kg)	11.40 ± 2.60	737.6 ± 75.7	1350.1 ± 147.7

표 36

[0876] 수컷 Sprague Dawley 래트에서 리포좀 AKG-28 및 AKG-38로 매주 8회 투여한 후 조직의 현미경 소견 요약.

그룹	1	2	3	4	5	6	7	8
시험 물질		리네졸리드	Ls-AGK28			Ls-AGK38		
용량 (mg/kg/용량)	0	50	10	20	40	20	40	80
그룹당 동물 수	6	6	6	6	6	6	6	6
간 (검사 수)	6	6	6	6	6	6	6	6
변성, 간세포, 소엽 중심	(0) ^a	(0)	(1)	(3)	(6)	(1)	(4)	(6)
최소	0	0	1	3	2	1	3	1
약함	0	0	0	0	4	0	1	5
단일 세포 괴사, 소엽중심	(0)	(2)	(3)	(4)	(6)	(4)	(5)	(6)
최소	0	2	3	4	6	4	5	6
비장 (검사 수)	6	6	6	6	6	6	6	6
액포형성, 대식세포	(0)	(0)	(0)	(6)	(6)	(0)	(0)	(0)
최소	0	0	0	1	0	0	0	0
약함	0	0	0	2	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	3	6	0	0	0
Accumulation, basophilic 물질	(0)	(0)	(0)	(4)	(6)	(0)	(0)	(0)
최소	0	0	0	1	0	0	0	0
약함	0	0	0	3	6	0	0	0
신장 (검사 수)	6	6	6	6	6	6	6	6
액포형성, mesangial 세포, glomerular	(0)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
최소	0	0	0	0	6	0	0	0

^a괄호 안의 숫자는 그 소견을 갖는 동물의 수를 나타냄.

[0877] 20 mg/kg/용량 이상의 용량으로 Ls-AGK38을 투여하면 모든 용량에서 최소 소엽 중심 단세포 괴사 및 최소 내지 경미한 소엽 중심 간세포 변성의 간 현미경 소견이 나타났다. 대조적으로, Ls-AGK28 및 Ls-AGK38 투여된 래트는 리네졸리드 투여된 래트와 비교하여 모든 투여량에서 간 단세포 괴사의 발생률이 증가했다. Ls-AGK28 및 Ls-AGK38을 투여한 래트의 간은 모든 투여량에서 중심 소엽 간세포 변성의 발생률과 중증도가 비슷했다. Ls-AGK28을 투여한 래트는 또한 20 또는 40 mg/kg/용량에서 비장에 대식세포 및 호염기성 물질이 액포화되었고 40 mg/kg/용량에서 신장에서 사구체 간질 세포 액포형성이 있었다.

[0878] 결론적으로, 8주에 걸쳐 다중 정맥 주사에 의한 Ls-AGK28의 투여는 10, 20 및 40mg/kg/용량의 수준에서 래트에서 내약성이 좋았다. 8주에 걸쳐 다중 정맥 주사에 의한 Ls-AGK38의 투여는 20, 40 및 80 mg/kg/용량 수준에서 래트에서 내약성이 좋았다. 실시예 2는 시험관 내에서 M. 투베르쿨로시스(Erdmann 균주) 사멸에서 리네졸리드보다 AKG-28이 33배 더 강력하고 AKG-38이 17배 더 강력하다는 것을 보여주었다. 따라서 역가를 보정했을 때 래트는 1320-1336mg의 리네졸리드 등가 용량에서 유의미한 신경병증(신경 전도 속도의 변화), 간 효소 상승, 적혈구 수 또는 헤마토크릿 감소 또는 체중 감소를 보이지 않았고, 이는 리네졸리드의 임상 관련 용량인 80mg/kg보다 16.5배 높은 수준이다.

[0879] 실시예 45. 폐결핵 감염의 Kramnik C3HeB/FeJ 마우스 모드에서 베다퀼린 및 프레토마니드, 또는 베다퀼린(B), 프레토마니드(Pa) 및 목시플록사신(M)과 조합된 리포좀 AKG-28 및 AKG-38의 효능.

[0880] C3HeB/FeJ(Kramnik) 마우스 감염 모델은 TB 감염 후 폐에서 진행된 저산소성 치즈육아종을 나타낸다(Driver E., et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, vol.56, p.3181-3195). C3HeB/FeJ 마우스에서 관찰된 폐 병리학은 TB 환자에서 볼 수 있는 병변 병리학 및 세균 집단의 이질성과 더 밀접하게 유사하며 50 및 90

mg/kg의 적당한 주간 용량에서 리포좀 AKG-28 및 AKG-38의 효능을 평가하는 데 사용되었다. Ls-AKG28(로트 275) 및 Ls-AKG38(로트 276)을 각각 실시예 22 및 23에 기재된 바와 같이 제조했다. Ls-AKG28(로트 275) 및 Ls-AKG38(로트 276)을 각각 실시예 22 및 23에 기재된 바와 같이 제조했다. C3HeB/FeJ 마우스의 폐 병리학은 콜라겐 테두리(유형 I), 전격성 호중구 폐포염(유형 II) 및 세포 병변(유형 III)에 의해 기술되는 건피성 괴사성 병변으로 분류된 세 가지 유형의 병변을 나타낸다(Irwin et al. (2015) Dis Model Mech 8, 591-602 참조). 8-10주령의 C3HeB/FeJ 암컷 마우스를 LDA(저용량 에어로졸 감염)에 감염시켰다. Glas-Col 흡입 노출 시스템을 사용하여 ~50-75 바실러스마우스 mouse(Erdman 균주)의 표적으로 마우스를 감염시켰다. 에어로졸 실험당 5마리의 마우스를 감염 후 1일째에 희생시켜 세균 흡수를 결정했다.

[0881] 감염 8주 후, 치료 시작 시 폐 및 비장의 세균 부하를 측정하기 위해 8마리의 마우스를 희생시켰다. 마우스를 희생시키기 전에 무게를 잴다. 폐와 비장의 육안 병리학 관찰이 이루어졌다. 전체 폐와 비장을 적출하여 -80° C에서 냉동했다. 이전에 동결된 조직을 회수하고 Precellys 균질화기를 사용하여 1X PBS에서 균질화했다. 폐 및 비장 균질물을 7H11 한천 쿼드 플레이트에 도말했다. CFU의 계수는 건조 공기 인큐베이터에서 37° C로 3-5주 배양한 후에 발생했다. 요법을 감염 후 8주에 시작하여 연속 4-6주 동안 계속되는 경구 위관영양 또는 복강내(i.p.) 주사를 통해 투여했다(위관영양의 경우 M-F, i.p. 주사의 경우 매주 1회). 베다퀼린(B), 프레토마니드(Pa), 목시플록사신(M) 및 리네졸리드(L)를 주당 5일씩 4주 또는 6주 동안 총 200 μL/용량을 위관영양법으로 투여했다. 베다퀼린(25mg/kg)을 먼저 투여한 다음, 최소 1시간 후에 프레토마니드(100mg/kg)를 투여했다. 목시플록사신(100 mg/kg) 또는 리네졸리드 (100 mg/kg)는 프레토마니드용량보다 4시간 늦게 투여했다. 리포좀 제제는 총 4주 또는 6주 동안 주당 1회 제공되었다.

[0882] 투약 시점에 마우스를 매일 관찰하고 적어도 일주일에 한 번 체중을 측정했다. 희생은 4주 또는 6주 치료가 완료된 후 2주 후에 발생했다. 처리군당 8마리의 마우스를 희생시키기 전에 체중을 잴다. 전체 폐 및 비장을 모든 처리군에 대해 무균적으로 수확했다. 폐와 비장의 육안적 병리학 관찰을 도식화했다. 육안적 병변 분석을 위해 폐를 촬영했다. 전체 폐와 비장은 -80° C에서 동결되었다. Precellys 균질화기를 사용하여 이전에 동결된 조직을 회수하고 1X PBS 또는 1X PBS 중 10% 소 혈청 알부민(BSA)에서 균질화했다(약물 남용을 방지하기 위해, *설명은 아래 참조). 폐 및 비장 균질물을 균질화 후 7H11 한천 또는 목탄 함유 7H11 쿼드 플레이트에 도말하고 1X PBS 또는 10% BSA에서 연속 희석했다. CFU의 계수는 건조 공기 인큐베이터에서 37° C로 5주간 배양한 후에 발생했다.

[0883] Ls-AKG28을 BPam 치료에 추가하여 폐에서 BPam에 비해 추가로 0.64 log₁₀ CFU 감소가 발생하는 반면, BPam + Ls-AKG38 치료는 치료 4주 후 BPam에 비해 0.25의 추가 log₁₀ CFU 감소를 나타냈다. NIX(BPaL) 요법에서 리네졸리드(L)를 Ls-AKG28 또는 Ls-AKG38로 대체하면 치료 6주차에 BPam보다 효능이 개선되었다. 치료 6주차에 BPam 요법에서 리네졸리드를 Ls-AKG38로 대체하면 BPam 치료군에 비해 효능이 크게 향상되었다. 구체적으로, 6주 동안 BPam 치료는 CFU가 없는 8마리 동물 중 1마리에 대한 플레이트에서 4.18 log₁₀ CFU 감소를 가져왔다. BPam + Ls-AKG28을 6주간 처리한 결과 4.68 log₁₀ CFU가 감소했었는데, 이는 BPam과 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 6주 동안 BPam + Ls-AKG38 처리는 5.26 log₁₀ CFU 감소를 가져왔고, 8마리 동물 중 2마리에 대한 플레이트는 CFU가 없었다. 이는 BPam에 비해 통계적으로 유의미한 감소였다(p=0.04, Dunnett 시험).

[0884] 치료 6주의 비장에서, NIX 요법에서 리네졸리드에 대한 리포좀 제제의 대체는 BPam 치료 그룹에 비해 폐 효능이 약간 개선되었다. NIX 요법으로 6주 동안 치료한 결과 3.56 log₁₀ CFU가 감소했으며, 8마리 동물 중 3마리에 대한 플레이트에서 CFU가 나타나지 않았다. BPam + Ls-AKG28로 6주 동안 처리한 결과 4.18 log₁₀ CFU가 감소했으며, 8마리 중 5마리는 CFU가 나타나지 않았다. BPam + Ls-AKG38로 6주 동안 치료한 결과 4.38 log₁₀ CFU가 감소했으며, 8마리 중 6마리 마우스에 대한 플레이트에서 CFU가 나타나지 않았다. 6주간의 약물 치료에서 마우스 비장의 CFU 부하는 낮았으며 0.66 log₁₀ CFU의 검출 하한에 근접했다.

표 37

폐 Log CFU

[0885]

처리	용량	4 주 (Log CFU)	6 주 (Log CFU)
비처리		7.71 ± 0.65	
BPam	25/100/100 mg/kg	3.05 ± 0.31	
BPam+Ls-AKG28	25/100/100/50 mg/kg	2.41 ± 0.37	
BPam+Ls-AKG38	25/100/100/90 mg/kg	2.80 ± 0.57	
BPamL	25/100/100 mg/kg		2.83 ± 1.28

BPa + Ls-AKG28	25/100/100/50 mg/kg		2.33 ± 0.95
BPa + Ls-AKG38	25/100/100/90 mg/kg		1.75 ± 0.59*

[0886] *2/8 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었고; 모든 마우스는 0.96 log CFU의 검출 한계로 나열되었다.

표 38

[0887] 비장 Log CFU

처리	용량	4 주 (Log CFU)	6 주 (Log CFU)
비처리		5.36 ± 0.48	
BPaM	25/100/100 mg/kg	2.07 ± 0.65	
BPaM+Ls-AKG28	25/100/100/50 mg/kg	1.15 ± 0.45	
BPaM+Ls-AKG38	25/100/100/90 mg/kg	1.85 ± 0.96	
BPaL	25/100/100 mg/kg		1.56 ± 0.82*
BPa + Ls-AKG28	25/100/100/50 mg/kg		0.94 ± 0.45**
BPa + Ls-AKG38	25/100/100/90 mg/kg		0.74 ± 0.23***

[0888] *3/8 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었음**5/8 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었음;.

[0889] ***6/8 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었음; 모든 마우스는 0.66 log CFU의 검출 한계로 나열되었음.

[0890] 모든 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었고 0.66 log CFU의 검출 한계로 나열되었음. 이는 Ls-AKG38 및 Ls-AKG28 이 베다퀼린 및 프레토마니드와 병용했을 때 두 약물의 중간 및 고도로 허용 가능한 용량에서 불과 6주의 치료 후에 리네졸리드보다 활성이 더 높다는 것을 나타낸다. 실시예 42 및 43이 보여주는 바와 같이, Ls-AKG28 및 Ls-AKG38 둘 모두는 이 연구에서 사용된 것보다 적어도 2배 더 높은 용량으로 이러한 조합에서 안전하게 투여될 수 있다. 또한 Ls-AKG28을 BPaM 요법에 추가하면 이 동일한 고도로 허용 가능한 용량에서 폐와 비장 모두에서 CFU가 추가로 감소한다는 것을 나타낸다.

[0891] 실시예 46. 폐 결핵 감염의 Balb/c 모델에서 리포좀 AKG-28을 사용한 단일요법의 효능.

[0892] Ls-AKG28의 스케줄 및 용량 의존적 효능은 결핵의 만성 Balb/c 모델에서 임상적으로 관련된 용량 50 및 100 mg/kg에서 유리 리네졸리드와 비교하여 결정되었다. 만성 Balb/c 마우스 모델에서 폐의 세균 부하는 M. 투베르쿨로시스 감염 후 4-5주에 정상 상태에 도달한다(Lenaerts et al. (2005) AAC 49(6) 2294-2301). Ls-AKG28(로트 286)은 실시예 28에 기술된 바와 같이 제조했다. 6 내지 8주령 Balb/c 암컷 마우스를 Jackson Laboratories로부터 입수하고, 마우스를 M. tuberculosis Erdman의 ~50-100 bacilli/마우스로 감염시키기 위해 마우스를 Glas-Col 흡입 노출 시스템을 사용하여 LDA(저용량 에어로졸 감염)로 감염시켰다.

[0893] 마우스(n=3)를 감염 후 1일째에 희생시켜 박테리아 흡수를 측정했다. 전체 폐를 Precellys 튜브(Bertin cat# KT03961-1-396.7)에서 무균 상태로 수확하고 Precellys 조직 균질화기를 사용하여 4ml의 1X PBS에서 균질화했다. 희석되지 않은 균질액을 2개의 큰 7H11 아가 플레이트(150 x 15mm)로 옮기고 플레이트를 밀봉된 지퍼백에서 37° C의 건조 공기 인큐베이터에서 콜로니가 계수될 때까지 최소 21일 동안 인큐베이션했다. 에어로졸 감염 후 28일째에, 마우스(n=5)를 희생시켜 치료 시작 시 폐 및 비장의 세균 부하를 측정했다. 마우스를 희생시키기 전에 무게를 잴다. 폐와 비장의 육안 병리학 관찰이 이루어졌다. 폐(왼쪽 엽과 오른쪽 상부 [두개] 엽) + 부속엽으로 나누어짐) 및 비장을 무균으로 수확하고 -80° C에서 동결했다. 하부 오른쪽 폐엽[꼬리]은 조직학을 위해 4% 파라포름알데히드(PFA)에서 수집했다. 이전에 동결된 조직을 회수하고 Precellys 균질화기를 사용하여 1X PBS에서 균질화했다. 폐 및 비장 균질물을 7H11 한천 쿼드 플레이트에 도말했다. CFU의 계수는 건조 공기 인큐베이터에서 37° C로 3-5주 배양한 후에 발생했다.

[0894] 5% PEG-200(시그마 P3015, 로트 MKBW3119V)/95%(0.5%) 메틸셀룰로오스(시그마 M0430, 로트 031M0051) 중 리네졸리드를 경구 위관영양법(마우스당 200 uL)을 통해 투여했다. 에어로졸 감염 28일후에 시작하고(Mon) 주당 7일 중 5일 2-8주 동안 지속됨. Ls-AKG28은 50 또는 100 mg/kg의 용량으로 주당 1회 또는 2회 i.p 주사로 투여되었다. 최종 희생은 2, 4 또는 8주 동안 약물로 처리된 마우스에 대한 마지막 투약일로부터 3일 후에 발생했다. 마우스를 희생시키기 전에 무게를 잴다. 폐와 비장의 육안 병리학 관찰이 이루어졌다. 폐(왼쪽 엽과 오른쪽 상부 [두개] 엽) + 부속엽으로 나누어짐) 및 비장을 무균으로 수확하고 -80° C에서 동결했다. 하부 오른쪽 폐엽은 조직학을 위해 4% PFA)에서 수집했다. 이전에 동결된 조직을 회수하고 1X PBS 중 10% 소 혈청 알부민(BSA)에서 균

질화하여 약물 남용을 방지했다. 균질화 후, 폐 및 비장 균질물을 1X PBS 및 10% BSA로 연속 희석한 다음 7H11 한천 또는 목탄 함유 7H11 쿼드 플레이트에 플레이팅했다. CFU의 계수는 건조 공기 인큐베이터에서 37° C로 3-5 주 배양한 후에 발생했다.

[0895] 폐 CFU 수치의 감소는 표 39에, 비장 CFU 수치는 표 40에 제시되어 있다. Ls-AKG28 50 mg/kg을 주 2회 또는 주 1회 100 mg/kg으로 처리하면 단 2주 후 폐에서 100mg/kg(q1x5)에서 리네졸리드의 경우 0.15 미만의 Log10 CFU 감소와 비교하여 1.5 Log10 CFU 감소가 발생한다. 이 감소는 Ls-AKG28의 경우 2주에 비장에서 거의 3 Log10 CFU였다. 8주차에 Ls-AKG28로 처리된 모든 마우스는 8주차에 더 높은 100 mg/kg 용량의 리네졸리드의 경우 폐에서 2.45 log10 CFU 및 비장에서 3.15 log10 CFU인 것과 비교하여 8주차에서 완전히 멸균(또는 폐에서 1.13 및 비장에서 0.66의 검출 한계 미만)이었다. 이러한 단일 요법 활성화는 베다퀼린과 같은 활성 조합 파트너가 없고 단 8주 만에 비교적 짧은 기간인 옥사졸리디논에 대해 놀라운 것이다. 예를 들어, 치료 8주차에 리네졸리드 단독요법은 Balb/c 및 C3HeB/FeJ 마우스에 대해 4-6 범위의 log10 CFU 수를 나타냈고(Lanoix et al. (2015) Dis Models Mech. 8, 603-610), 활성화는 3-14 용량/주 범위의 일정에서 최대 1000 mg/kg/주까지 완만하게 유지된다(Bigelow et al (2021) J Infect. Dis. 223(11) 1855-1864).

표 39

[0896] 폐 Log CFU

처리	용량, 스케줄	2 주 (Log CFU)	4 주 (Log CFU)	8 주 (Log CFU)
비처리		5.71 ± 0.15	5.47 ± 0.19	
리네졸리드	50 mg/kg, q1x5		4.61 ± 0.31	
	100 mg/kg, q1x5	5.58 ± 0.10	4.17 ± 0.21	2.45 ± 0.37
Ls-AKG28	50 mg/kg,		3.81 ± 0.33	
Ls-AKG28	50 mg/kg,	4.01 ± 0.20	2.30 ± 0.57	
Ls-AKG28	100 mg/kg,	4.09 ± 0.34	2.65 ± 0.70	1.13 ± 0.00*

[0897] *6/6 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었음; 모든 마우스는의 검출 한계로 나열되었음. 1.13 log CFU.

표 40

[0898] 비장 Log CFU

처리	용량, 스케줄	2 주 (Log CFU)	4 주 (Log CFU)	8 주 (Log CFU)
비처리		5.08 ± 0.31	4.77 ± 0.21	
리네졸리드	50 mg/kg, q1x5		4.32 ± 0.28	
	100 mg/kg, q1x5	4.53 ± 0.25	3.90 ± 0.28	3.15 ± 0.27
Ls-AKG28	50 mg/kg,		1.74 ± 0.65	
Ls-AKG28	50 mg/kg,	1.71 ± 0.59	0.67 ± 0.02*	
Ls-AKG28	100 mg/kg,	2.25 ± 0.82	1.07 ± 0.93**	0.66 ± 0.00***

[0899] *4/5 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었음**1/6 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었음;.

[0900] ***6/6 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었음; 모든 마우스는의 검출 한계로 나열되었음. 0.66 log CFU.

[0901] 모든 마우스는 측정 가능한 CFU가 없었고 0.66 log CFU의 검출 한계로 나열되었음.

[0902] 실시예 47. 메티실린-내성 황색포도상구균 (MRSA) 토끼 심내막염 모델에서 Liposomal AKG-38의 효능.

[0903] 특히 혈관내계를 수반하는 황색포도상구균 감염(예를 들어, IE; 심장 및 혈액투석 장치 감염 등)이 만연하고, 용납할 수 없을 정도로 높은 이환율, 사망률 및 치료 후 재발률과 관련이 있다. 이러한 감염이 MRSA의 다제내성 변종에 의해 발생하는 경우 특히 그렇다. 더욱이, MRSA 군주가 CLSI(Clinical Standards Laboratory Institute)에서 인정하는 "감수성" 범위(즉, ≤ 2 ug/ml) 내에서 반코마이신("워크하우스" 항-MRSA 제제)에 대한 최소 억제 농도(MIC)를 갖는 경우에도, 임상 결과는 차선책으로 유지된다.

[0904] 원형 고-접종 혈관내 생물막 MRSA 감염 모델, 좌측 대동맥 판막 토끼 IE를 6개월령 및 2.2-2.5 kg의 암컷 뉴질

랜드 백색 토끼에 사용했다. 토끼는 자일라진과 케타민을 근육주사하여 전신마취를 했다. 그런 다음 피부를 노출시키기 위해 오른쪽 경동맥 위에 털을 깎았다. 우측 경동맥 위의 절단 부위를 1% 리도카인으로 국소 마취했다. 그런 다음 오른쪽 경동맥을 노출시키기 위해 절단을 수행했다. 이것을 분리하고 근위부 결찰한 다음 폴리에틸렌 카테터로 역행하여 대동맥 판막을 가로질러 좌심실로 캐놀라를 삽입한 다음 제자리에 묶고 연구 기간 동안 유지했다. 카테터 배치 후 48시간에 좌측 IE의 경우(멸균 대동맥 판막 및 심실 식생을 유도하기 위해), 동물은 MW2 균주의 $\sim 2 \times 10^5$ cfu의 IV 챌린지에 의해 유도된 IE를 가졌다. 사용된 MRSA 균주 MW-2(USA 400 - 클론 복합체[CC] 1)는: **i)** 임상적으로-유래되고; **ii)** 계능 시퀀싱되고; **iii)** 일반적인 병원 획득 MRSA 클론형을 나타내고; **iv)** 실험적 IE 모델에서 악성이고; 그리고 **v)** 시험관내에서 담토마이신(DAP)-감수성이다. 감염은 심장 판막에 감염된 초목에서 신장과 비장으로 퍼집니다.

[0905] 리포솜 AKG-38(Ls-AKG38)을 40mg/kg/용량으로, 1회(DAP와의 병용 요법에서) 또는 2회(DAP와 병용 요법에서 1회; 이후 추가 DAP 요법을 받지 않는 "재발 동물 그룹"에서 DAP 치료후 희생시 2차 주입) 별개의 동물 그룹에서 제공했다. Ls-AKG38(로트 292)은 실시예 29에 기재된 바와 같이 제조했다. 첫 번째 Ls-AKG38 주입은 첫 번째 DAP iv 투여 약 1시간 후이다. DAP는 단독으로 또는 Ls-AKG38과 함께 4일 동안 매일 2mg/kg의 준치사량으로 제공되었다.

[0906] 동물을 인도적으로 안락사시키고, 주요 표적 기관을 멸균 제거하고, 6일째(DAP 단독 또는 DAP + 단일 용량의 Ls-AKG38) 또는 12일째(DAP + 1일 및 6일에 Ls-AKG38 2회 투여)에 양적 배양(왼쪽 IE의 경우 혈액, 심장 식생; 신장 및 비장)했다. 계량, 균질화, 연속 희석 및 플레이트 배양에 의해 멸균 제거된 장기의 표준 준비에 의해 정량적 표적 조직 배양을 수행했다. 혈액의 연속 희석 및 정량 배양을 유사하게 수행했다. 상이한 처리군에 대한 혈액 배양 및 각 표적 장기에 대한 데이터는 조직의 각각 평균 및 중앙값 $\log_{10}$ cfu/ml 또는 $\log_{10}$ cfu/gm($\pm$ SD)로 계산되었다.

[0907] 토끼에서 MRSA의 좌심실 심내막염 모델로부터의 예비 데이터는 하기 표 41에 제시되어 있다. 담토마이신 단독 또는 담토마이신 + 단일 용량의 Ls-AKG38은 접종 후 6일째에 유의한 효능을 나타내지 않았다. 놀랍게도, Ls-AKG38의 두 번째 주사는 12일째에 5개 조직 모두에서 4/5 토끼의 살균 및 여러 기관에서 CFU의 6 Log 이상의 감소를 포함하여 현저한 효능을 나타냈다. 이 데이터는 매일의 담토마이신을 중단한 후 Ls-AKG38로 심내막염을 효과적으로 치료할 수 있음을 시사한다.

표 41

[0908]	초목	신장	비장	간	폐
대조군 (4)	7.45 $\pm$ 0.60	5.93 $\pm$ 0.54	5.71 $\pm$ 0.85	5.03 $\pm$ 0.51	4.73 $\pm$ 0.46
담토마이신	8.13 $\pm$ 0.17	6.90 $\pm$ 0.61	7.43 $\pm$ 0.38	6.77 $\pm$ 0.90	6.37 $\pm$ 0.64
담토마이신 (재발)	9.18 $\pm$ 0.22	8.11 $\pm$ 0.49	7.91 $\pm$ 0.54	7.65 $\pm$ 0.26	8.00 $\pm$ 0.66
담토마이신 + Ls-AKG38 (1 용량)	8.26 $\pm$ 0.66	6.70 $\pm$ 0.83	5.65 $\pm$ 0.61	5.75 $\pm$ 0.83	5.97 $\pm$ 0.77
담토마이신 + Ls-AKG38 (2 용량)	1.14 $\pm$ 0.97 (4/5 멸균)	1.05 $\pm$ 0.69 (4/5 멸균)	0.89 $\pm$ 0.08 (5/5 멸균)	0.93 $\pm$ 0.46 (4/5 멸균)	1.18 $\pm$ 0.61 (4/5 멸균)

[0909] 실시예 48. 시험관 내 다양한 종의 비결핵 마이코박테리아에서 AKG-28 및 AKG-38의 활성. MIC 시험은 Mueller Hinton(MH) 브로스(Cation Adjusted)를 사용하여 CLSI 표준 M7-A7(Becton Dickinson)에 의해 권장되는 칼슘 및 마그네슘 이온 농도로 마이크로브로스 희석 방법(Oregon-Henao et al. (2015) Antimicrobial Agents Chemother 59, 6904-6912)에 의해 수행되었다. MIC 시험은 또한 7H9 브로스(Sigma-Aldrich)를 사용하는 마이크로브로스 희석 방법을 사용하여 수행되었다(Shang et al. (2011) PLoS One 6, e24726; Chan et al. (2010) Am J Respir Cell Mol Biol 43, 287-393)). 목표는 당사의 마이크로브로스 희석 방법에서 다양한 배지를 사용하여 NTM에 대한 활성을 가진 더 많은 화합물을 검출하는 능력을 최적화하는 것이었다. NTM은 7H11 아가 플레이트(Sigma-Aldrich)에서 35-37° C의 주변 공기(박테리아 균주에 따라 다름)에서 3-25일 동안 성장시켰다. CFU를 아가 플레이트에서 가져와 0.05% 트윈-80이 포함된 MH 액체 배지에 넣고 7일 성장 후 광학 밀도(OD) 흡광도가 (OD) 0.08 - 0.1(0.5 맥팔랜드 표준)가 될 때까지 성장시켰다. 그런 다음 박테리아 세포 현탁액을 (OD) 0.08 -

0.1(0.5 McFarland 표준)과 일치하는 식염수에서 준비하여 확인했다.

[0910] 브로쓰(MH) 180 μ l를 96웰 플레이트의 첫 번째 컬럼에 첨가했다. 그런 다음 브로쓰 (MH) 100 μ l를 96웰 플레이트의 다른 컬럼에 추가했다. 화합물은 DMSO에서 1.28mg/mL를 사용하여 만들어지고 시험 범위 64-0.062 μ g/mL에 대해 즉시 사용되며 20 μ l의 화합물이 웰의 첫 번째 열에 추가되고 100 μ l가 연속 희석된다. 마지막으로, 100 μ l NTM 세포 현탁액을 배지만 있는 대조군 웰을 제외한 모든 웰에 첨가했다. 각 유기체에 특이적인 QC 제제 1) 박테리아만 음성 대조군 2) 배지만 있는 음성 대조군 3) 또는 테디졸리드 양성 약물 대조군 4) 임의적 대장균 대조군.

[0911] 3일째에 RGM을 OD에 대해 분석했다. 그 후, 플레이트를 Clinical and Laboratories Standards Institute (Brown-Elliott et al. (2012) Clin Microbiol Rev vol. 25(3), p.545-582)에서 권장하는 Resazurin Microtiter 분석 플레이트 방법을 사용하여 분석했다.). 간략하게, 이 방법은 MIC 96 웰 플레이트에 레자주린 (7-하이드록시-3H-페녹사진-3-온 10-옥사이드)을 첨가하는 것을 사용했다. 레자주린은 청색 염료이며, 핑크색의 강한 적색 형광 레조루핀으로 비가역적으로 환원될 때까지 그 자체는 약한 형광성을 띤다. 이는 박테리아 세포 생존력 MIC 분석에서 산화-환원 지표로 사용되었다.

[0912] 결과는 AKG-28 및 AKG-38 둘 다 일반적으로 다양한 NTM 종 및 균주에서 테디졸리드보다 더 강력했음을 나타낸다. 이는 *M. 아비움*(*M. avium*), *M. 첼로나에*(*M. chelonae*), *M. 압세스스*(*M. abscessus*) 및 *M. 칸사시*(*M. kansasii*)를 포함한다. *M. 마실리엔세* (*M. massiliense*)에서만 테디졸리드가 평가된 세 가지 균주 모두에서 더 활성이었다.

표 42

[0913]

NTM 종	균주	AKG-28 MIC (μ g/mL)	AKG-38 MIC (μ g/mL)	테디졸리드 MIC (μ g/mL)
<i>M. 아비움</i> sbsp. <i>아비움</i>	2285 S	0.125	0.125	0.25
<i>M. 아비움</i> sbsp. <i>아비움</i>	3993	0.125	0.125	0.25
<i>M. 아비움</i> sbsp. <i>아비움</i>	2285 R	0.06	0.06	0.25
<i>M. 첼로나에</i> (<i>M. chelonae</i>)	49	0.06	0.06	0.25
<i>M. 첼로나에</i> (<i>M. chelonae</i>)	69	0.5	0.5	2
<i>M. 첼로나에</i> (<i>M. chelonae</i>)	35752	0.125	0.06	0.125
<i>M. 압세스스</i> sbsp. <i>압세스스</i>	21	0.25	0.06	0.5
<i>M. 압세스스</i> sbsp. <i>압세스스</i>	1948	0.125	0.06	0.5
<i>M. 압세스스</i> sbsp. <i>압세스스</i>	1513	32	32	4
<i>M. 마실리엔세</i> (<i>M. massiliense</i>)	CIP 108297	1	0.5	0.25
<i>M. 마실리엔세</i> (<i>M. massiliense</i>)	CRM0019	0.25	0.25	0.06
<i>M. 마실리엔세</i> (<i>M. massiliense</i>)	M154	0.25	0.25	0.06
<i>M. 칸사시</i> (<i>M. kansasii</i>)	662	>32	>32	>32
<i>M. 칸사시</i> (<i>M. kansasii</i>)	824	0.125	0.06	0.25
<i>M. 칸사시</i> (<i>M. kansasii</i>)	732	0.125	0.03	0.25
<i>M. 칸사시</i> (<i>M. kansasii</i>)	MK13D6	0.125	0.03	0.25
<i>M. 칸사시</i> (<i>M. kansasii</i>)	WT171017	0.125	0.03	0.125

[0914] 실시예 49. 시험관 내 결핵균의 약물 내성 균주에 대한 선택된 화합물의 활성.

[0915] M. 투베르쿨로시스의 약물-감수성 균주에 대한 활성을 나타내는 본 개시내용의 화합물을 여러 다제 내성(MDR) 임상 분리 균주 M70, M28, M94, M14에 대한 활성에 대해 추가로 평가했다(Cheng A.F., et al., 2004)., Antimicrob.Agents Chemother. v. 48, p. 596-601) 및 TN5904(Palanisamay G.S., et al., 2008, Tuberculosis (Edinb.) vol.88 p. 295-306). 이들 균주는 다음과 같은 내성 특징을 특징으로 한다:

[0916] 표 43. 연구에 사용된 M. 투베르쿨로시스 MDR 균주의 약물 내성 특성. (약어: R-내성, S-감수성, STR - 스트렙 토마이신, INH - 이소니아지드, RIF - 리팜핀, EMB - 에탐부톨, PZA - 피라진아미드.

표 43

[0917]

균주\약물	STR	INH	RIF	EMB	PZA
M70	R	R	R	S	R
M28	S	R	R	R	R
M14	R	R	S	S	R
M94	R	R	S	S	S
TN5904	R	R	R	S	R

[0918] 비교물질/내성 대조군(RIF, INH, STR, 목시플록사신(MOX) 및 리네졸리드(LNZ))을 포함하는 시험 화합물의 MIC는 필수적으로 실시예 2에 기술된 바와 같이 다음 변형과 함께, Alamar Blue 종점(MABA)을 갖는 브로쓰 미세희석 방법을 사용하여 결정되었다. DMSO에서 2배로 연속 희석된 시험 화합물 및 비교물질을 100 μ L의 ADC-보충 7H9-글리세롤 배지를 함유하는 96-웰 분석 플레이트의 웰에 첨가했다. DMSO 내 허용해도로 인해 STR을 연속적으로 희석하고 수용액으로서 첨가한 것을 제외하고, 화합물을 원하는 범위의 화합물 농도와 웰의 최종 DMSO 농도를 2%(M70, M28, M94) 또는 2.5%(M14, TN5904)로 유지하도록 DMSO에 희석했다. MDR 균주 및 감수성 H37Rv 균주(양성 대조군)의 박테리아 스톱을 저온 저장고에서 꺼내 해동하고 10^6 CFU/mL(H37Rv, TN5904), 2×10^6 CFU/mL(M70, M14) 또는 3×10^6 CFU/mL(M28, M94)의 박테리아 밀도를 제공하도록 7H9-ADC-글리세롤 배지로 희석하고 50 μ L의 희석된 박테리아 스톱을 웰 내 화합물 함유 배지에 첨가했다. 웰의 최종 약물 농도 범위를 아래 표에 나타낸다. 플레이트를 Ziplock 백에 밀봉하고 37° C에서 배양하고 600 nm(OD600)에서 주기적인 광학 밀도 판독으로 박테리아 성장을 모니터링했다. 14일(OD600이 0.40에 도달하거나 초과하는 경우) 또는 17일에 15 μ L의 Alamar Blue 용액을 웰에 첨가하고 배양을 계속하고 3일 (느리게 성장하는 M28 균주의 경우 7일) 후 배양 혼합물의 색상을 기록했다. 약물이 없는 대조군 웰과 비교하여 Alamar Blue로 눈에 띄는 색상 변화를 일으키지 않은 2배 연속 희석액의 가장 낮은 연속 항균 농도를 이들 화합물의 MIC로 간주했다. OD600-기초 MIC 결정(약물이 없는 대조군 웰에 비해 80% 이상의 OD600 감소)은 MABA 결과와 일치했다. 2개의 웰(4배)의 MIC의 이동이 유의한 것으로 간주되었다. 결과는 하기 표 44에 요약되어 있다.

표 44

[0919] 시험관내 M. 투베르쿨로시스의 약물 감수성 및 약물 내성 균주에서 다양한 화합물의 최소 억제 농도(MIC)(MABA 분석).

화합물	농도 범위, μ g/mL	MIC, μ g/mL					
		M. 투베르쿨로시스 균주 내:					
		H37Rv	M70	M28	M94	M14	TN5904
RIF	8 - 0.03	0.06	>8	>8	0.125	0.06	>8
INH	2 - 0.008	0.06	>2	>2	>2	>2	2
MOX	8 - 0.03	0.125	1	2	0.125	0.125	0.125
STR	8 - 0.03	0.5	2	0.125	>8	>8	1
LNZ	8 - 0.03	2	0.5	0.5	0.5	0.5	1
AKG-3	4 - 0.015	0.125	≤ 0.015	0.06	0.06	0.03	0.06
AKG-16	8 - 0.03	0.25	0.125	0.25	0.06	0.06	0.06
AKG-28	1 - 0.004	0.03	≤ 0.004	0.015	0.015	0.015	0.015
AKG-29	8 - 0.03	0.25	≤ 0.03	0.125	0.125	0.06	0.06
AKG-38	4 - 0.015	0.03	≤ 0.015	0.03	0.03	0.03	0.03

AKG-39	8 - 0.03	0.5	0.125	0.5	1	0.5	0.25
--------	----------	-----	-------	-----	---	-----	------

[0920] 비교자/대조 화합물 RIF, IHN, MOX 및 STR은 DR-TB/MDR-TB 균주 및 H37Rv에 대해 예상되는 시험관내 활성을 나타냈다. 전형적인 MIC 분석의 변동 한계 내에서, 본 발명의 모든 시험된 화합물은 약물-감수성 균주 H37Rv에 대해 그랬던 것처럼 적어도 MDR-TB 균주에 대해 활성이었다. 가장 높은 활성은 AKG-28에 의해 나타났고, AKG-38 및 AKG-3이 그 뒤를 이었다. 화합물 AKG-28 및 AKG-38은 구조적으로 유사한 유사체에 비해 가장 활성이 높은 것으로 나타났다.

[0921] 실시예 50. 리포솜 제제의 지질 및 분해 생성물 분석.

[0922] 본 실시예의 목적은 지질 산화 분해 산물(도 17) 및 인지질 가수분해 산물(도 18)을 검출할 수 있는 방법을 개발하는 것이었다. 리포솜의 지질 성분(HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE)과 그 분해 산물(17-하이드록시콜레스테롤, 7-케토콜레스테롤, 리소-PC, 스테아르산 및 팔미트산)을 HPLC를 통해 리포솜 샘플에서 CAD(Charged Aerosol 검출or) 및 Thermo Scientific Accucore™ C18+ UHPLC 컬럼(L= 50mm, D= 2.1mm, 입자 크기 = 1.5 μm)이 장착된 Thermo Scientific Vanquish Flex UHPLC를 사용하여 정량화했다. UHPLC 작동 조건은 다음 표(표 45)에 나열되어 있다:

[0923] 표 45. 지질 및 그 분해 생성물 분석을 위한 크로마토그래피 조건

HPLC 장비	Thermo Scientific Vanquish Flex UHPLC	
HPLC 컬럼	Accucore™ Vanquish™ C18+ UHPLC 컬럼	
컬럼 온도	50 °C	
유속	0.5 mL/min	
주사 부피	2 µL	
흡광도 검출	230 nm	
CAD	10Hz	
실행 시간	10 min	
샘플 온도	120°C	
샘플 용매	MeOH/THF (85:15)	
이동상	이동상 A 물 내 5 mM 암모늄 아세테이트 (pH 4)	
	이동상 B 메탄올	
이동상 프로그램:		
시간 (min)	이동상 A, %	이동상 B, %
-0.5	15	85
0	15	85
2	10	90
4	0	100
8	0	100
9	15	85
10	15	85

[0924]

[0925] 개별 지질 및 그 분해 생성물의 피크를 확인하기 위해, 상업적으로 얻은 개별 지질을 메탄올/테트라히드로푸란 용액(MeOH:THF = 85:15 vol:vol)에 용해시켜 5 mg/ml 지질 표준을 제조하고 사용 전 -20°C 온도에서 저장했다. 각각의 개별 지질과 그 분해 산물에 대한 검량선은 HPLC 실행 전에 5mg/ml 표준으로부터 작성되었다(표 2). 5 μl의 리포솜 제제를 10초 동안 고속으로 와동시켜 495 μl MeOH/THF(희석 인자 = 100)에 용해시켰다. 크로마토그램은 Chromeleon™ 7.2.10(Thermo Scientific)을 사용하여 분석되었다.

[0926] 콜레스테롤 산화 생성물의 상대적 함량은 다음 공식을 사용하여 계산되었다:

$$D\% = 100 \times C_D / (C_{Chol} + C_{D1} + C_{D2})$$

[0928] 여기서 $C_{D1,2}$ = HPLC로 검출된 산화 생성물의 농도, mg/ml

[0929] C_{chol} = HPLC로 검출된 콜레스테롤의 농도, mg/ml

[0930] 다양한 인지질 유도체의 상대적 함량은 다음 식을 사용하여 계산되었다:

$$D\% = 100 \times C_D / (C_{HSPC} + C_{PEG-DSPE})$$

[0932] 여기서 C_D = HPLC로 검출된 분해 생성물의 농도, mg/ml

[0933] C_{HSPC} = HPLC로 검출된 HSPC의 농도, mg/ml

[0934] $C_{PEG-DSPE}$ = HPLC로 검출된 PEG-DSPE의 농도, mg/ml

[0935] 분석물 및 검량선의 특성은 다음 표에 요약되어 있다 (표 46):

[0936] 표 46. 분석물 및 검량선 특성

표 46

채널	구성성분	채류 시간, min	Cal.유형	포인트 수	농도 범위, μg/mL	결정 계수	C0 (오프셋)	C1 (기울기)
CAD	lyso-PC	1.05	Lin, AddZero	5	2-5	0.999	0.014	0.031
CAD	팔미트산	1.23	Lin, AddZero	5	2-5	0.999	0.030	0.035
CAD	7-HO- 콜레스테롤	1.81	Lin, AddZero	5	2-5	0.991	0.078	0.028
CAD	스테아르산	2.16	Lin, AddZero	5	2-5	0.993	0.071	0.038
DC50 (nM)	7- 케토폴레스테롤	2.05	Lin, AddZero	5	2-5	0.999	-0.057	0.116
CAD	콜레스테롤	4.78	Lin, AddZero	5	2-5	0.990	0.620	0.027
CAD	PEG-DSPE	5.34	Lin, AddZero	5	2-5	0.993	0.416	0.036
CAD	HSPC	6.33	Lin, AddZero	5	2-5	0.996	0.593	0.029

*스테아르산과 7-케토폴레스테롤의 밀접하게 위치한 피크는 230nm 에서 7-케토폴레스테롤 특이적 UV 검출을 사용하여 분리되었다.

[0937]

[0938] 실시예 51. AKG-28 및 AKG-38 약물 부하(DL 비율)가 증가된 리포솜 제제(로트 Ls-293 - to- Ls-302); 제제, 특성 및 저장 안정성.

[0939] 상승된 약물-지질 비율에서 AKG-28 또는 AKG-38을 로딩하고 높은 로딩 효율을 유지하는 가능성을 평가했다. HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE을 2.5g HSPC 규모에 대해 5:3:1의 질량비로 조합했다(HSPC, 콜레스테롤 및 PEG-DSPE의 분자량 각각 786, 386.7 및 2700을 기준으로 몰비 45:54.9:2.62). DiIC₁₈(3)-DS를 에탄올 용액으로서 HSPC 0.15mol%로 첨가하였고; 지질을 에탄올에 용해시키고, 약 60mM 인지질 및 최종 9.1부피%의 에탄올에서 0.5M 황산암모늄 용액에 분산시키고, 본질적으로 실시예 30에 기술된 바와 같이 폴리카보네이트 막 필터를 통해 압출시켜 압출된 로트 L-94를 얻었다. L-94 물질(Xz 122.9 nm, PdI 0.018)의 일부를 2x80 nm 기공 크기 PCTE 막 필터의 스택을 통해 압출하여 압출된 로트 L-95 (Xz 102.6 nm, PdI 0.0193)를 얻었고 L-95의 일부를 두 개의 50nm PCTE 막 필터의 스택을 통해 4회 추가로 압출하여 압출된 로트 L-96(Xz 80.1nm, PdI 0.0378)을 얻었다. 압출된 리포솜을 0.2-μm 주사기 필터를 통과시키고, 리포솜 외 황산암모늄을 물에 대해 TFF로 제거하여 잔류 전도도가 200 μS/cm(5.7-8.3 부피 교환) 미만이 되도록 했다. TFF-후 리포솜의 인지질 농도를 블루 포스포몰리브데이트 방법으로 결정하고, 리포솜의 분취량을 45 mg/ml 텍스트로스 및 AKG 38의 경우 10 mM NaCl 존재 하에, 65° C 수조에서 20분간 교반한 후 얼음-물에서 냉각하면서 주어진 약물-대 지질(DL0) 비율(표 3 참조

조)에서 AKG-38(8mg/ml) 또는 AKG-28(6mg/ml)과 함께 배양했다. 리포솜을 0.1M NaCl로 조정하고, 2-8° C에서 밤새 저장하고, 폴리스폰 중공 섬유 카트리지(MWCO 500 KDa)(7-8 부피 교환(Vex))를 사용하여 TFF에 의해 TFF 완충제 교환/비캡슐화 약물 제거를 수행하고, 완충제 공급 없이 계속 정용여과하여 농축하고, 0.2µm PES 주사기 필터를 통해 여과하여 멸균하고, 각각의 교환/부형제 완충제인 HBS-7 또는 His-6.5(0.144M NaCl 중 10mM 히스티딘-HCl, pH 6.5)로 18 mg/ml AKG-38 또는 10 mg/ml AKG-28의 최종 약물 농도로 조정한다. 그러나, pH 6.5가 분해에 대한 리포솜 지질의 안정성에 바람직하지 않다는 관찰 결과(실시예 65)와 같이, His-6.5를 함유하는 샘플을 1M Hepes-Na(최종 20mM)를 첨가하여 pH 7.41-7.52(목표 pH 7.5)로 재조정했다. 리포솜은 다음과 같은 특징을 가졌다:

[0940] 표 47. 다양한 D/L 비율에서의 리포솜 AKG-38 및 AKG-28 제제 특성.

표 47

Lot ID	Drug	pH	Xz nm	PDI	D/L ratio, g/mol PhL		EE %	Drug conc-n, mg/ml	Volume, ml
					Pre-load	Post-load			
LS-293-7.0	AKG-38	7.05	123.2	0.0089	451.1	439.8 ± 9.2	97.5	17.7	5.35
LS-293		7.43	122.1	0.0342	451.1	442.0 ± 9.5	98.0	17.8	5.86
LS-294		7.45	121.7	0.0144	600.8	584.2 ± 13.1	97.2	17.8	6.07
LS-295		7.52	105.3	0.0302	450.9	441.0 ± 9.3	97.8	17.8	7.15
LS-296		7.41	104.7	0.0503	602.3	574.6 ± 7.4	95.4	17.8	7.56
LS-297		7.49	83.4	0.0876	452.2	440.7 ± 9.3	97.5	17.81	3.76
LS-298-7.0	AKG-28	7.05	121.8	0.0535	250.5	256.6 ± 5.0	102.4	9.8	5.49
LS-298		7.40	122.1	0.0257	250.5	249.8 ± 7.5	99.7	9.9	5.27
LS-299		7.44	122.4	0.0120	327.0	326.0 ± 8.4	99.7	9.9	4.21
LS-300		7.44	104.5	0.0362	249.0	245.7 ± 4.8	98.7	9.9	7.10
LS-301		7.50	104.5	0.0255	330.5	326.1 ± 7.0	98.7	9.9	7.40
LS-302		7.43	82.5	0.0578	286.8	267.6 ± 4.8	93.3	9.91	3.08

[0941]

[0942] 놀랍게도, AKG-28 및 AKG-38 둘 다 약 600g AKG-38/mol PhL 및 약 330g AKG-28/mol PhL, 각각의 증가된 DL0 비율에서 100nm 및 80nm 압출 리포솜에 효율적으로(>95%) 로딩되었다.

[0943] 실시예 52. PK 혈장 샘플 중 AKG-28, AKG-38 및 DiIC₁₈(3)-DS의 HPLC 분석.

[0944] HPLC를 사용하여 AKG-28 및 AKG-38 약물뿐만 아니라 친유성 DiIC₁₈(3)-DS 리포솜 추적자를 측정하기 위한 생체 분석 검정이 개발되었다. AKG-28 및 AKG 38 리포솜의 약동학적 특성은 HPLC를 사용하여 마우스 혈장 내 약물 및 리포솜 인지질을 측정하여 결정되었다. 약물 농도는 직접 측정하였고 혈장 내 인지질 농도는 비-교환형 형광 지질 라벨 DiIC₁₈(3)-DS(AAT Bioquest, Cat No. 22052)를 사용하여 측정했다. 약물 및 DiIC₁₈(3)-DS를 이소프로판올 중 0.1% 트리플루오로아세트산을 1:3(v:v) 비율로 사용하여 마우스 혈장에서 추출했다. 필요한 경우 혈장을 PBS로 희석했다. 이소프로판올 혼합물 내 혈장/0.1% 트리플루오로아세트산을 고속으로 20초 동안 와동시킨 후 13.4 RCF에서 10분 동안 원심분리하고 상청액을 HPLC 자동샘플러 바이알로 옮기고 추출 후 24시간 이내 HPLC 분석할 때까지 빛으로부터 보호하여 23° C에서 저장했다. 리포솜 시험 물품으로부터 표준품을 제조하고 마우스 혈장에 사용된 것과 동일한 절차를 사용하여 추출했다. 리포솜 시험 물품을 블루 포스포몰리브데이트 분광 광도 분석을 사용하여 인지질에 대해 분석했고 DiIC₁₈(3)-DS 피크 대 인지질 농도의 보정을 위한 참조 표준으로 사용했다. 마우스 혈장 내 AKG-28, AKG-38 및 형광 지질 라벨 DiIC₁₈(3)-DS의 HPLC 분석을, C8 가드 컬럼(Phenomenex SecurityGuard 4 x 3mm 내경, Cat. No. AJ0-4290) 이후 C8 역상 컬럼(Phenomenex Kinetex C18 컬럼, 50mm x 4.6mm 내경5µm 입자 크기, 100µm 기공, Cat. No. 00B-4608-E0)을 사용하여 Thermo Vanquish 시스템에서 수행했다. 2µI 샘플 주입량을 사용하고, 컬럼을 A) 0.01% 트리플루오로아세트산, B) 아세토니트릴 중 0.01% 트리플루오로아세트산, C) 이소프로판올 중 0.01% 트리플루오로아세트산으로 구성된 이동상으로 아래 나열된 구배 용출 프로그램을 사용하여 유속 1.0mL/분에서 용출시켰다.

표 48

[0945]

표 48. 약물 및 형광 지질(DiIC₁₈(3)-DS)에 대한 HPLC 구매 용리 프로토콜

분	%A	%B	%C
0	95	5	0
3	71	29	0
8	0	29	71
10	0	29	71
11	95	5	0
15	95	5	0

[0946]

AKG-28 및 AKG-38을 각각 2.7분 및 3.6분의 체류 시간으로 305nm에서의 흡광도에 의해 검출하고, DiIC₁₈(3)-DS을 9.2분의 체류 시간으로 550nm의 여기 및 570nm의 방출을 사용하여 형광에 의해 검출했다. **실시예 53. 마우스에서의 리포솜 Ls-293-Ls-302의 혈장 약동학.**

[0947]

암모늄 구매의 추가 고갈에도 불구하고 마우스에서 장기간 순환하는 약동학적 특성을 유지하기 위한 높은 약물-지질 로딩을 갖는 AKG-28 및 AKG-38의 새로운 리포솜 제제(실시예 51)에 대한 가능성을 평가했다. 실시예 51에 따라 제조된 리포솜을 암컷 CD-1 마우스에 50mg/kg AKG-38 리포솜 또는 30mg/kg AKG-28 리포솜 용량으로 두 번 i.v. 투여했다. 주사 후 5분(0.083시간), 1, 3, 6, 24 및 48시간에 혈액을 Li-헤파린 처리된 Microvettes(Sarstedt)로 샘플링하고, 원심분리하고, 혈장을 실시예 52에 기술된 바와 같이 직접 HPLC 분석으로 AKG-28에 대해 및 간접(DiIC₁₈(3)-DS 라벨) HPLC 분석으로 리포솜 인지질에 대해 분석했다. 결과는 아래 표에 있다:

[0948]

표 49. CD-1 마우스에서 리포솜 AKG-38, 로트 Ls-293-Ls-297(실시예 51)의 혈장 약동학.

표 49

AKG-38, mg/ml						
로트 ID	Ls-293-7	Ls-293	Ls-294	Ls-295	Ls-296	Ls-297
시간, 시간						
0.083	1.451	1.896	1.375	1.650	1.462	1.385
1	1.517	1.234	1.376	1.192	1.249	1.103
3	0.908	1.276	0.831	0.948	1.008	0.968
6	0.859	0.948	0.822	0.754	0.696	0.748
24	0.284	0.383	0.210	0.179	0.287	0.183
48	0.0360	0.0514	0.0224	0.0225	0.0108	0.0076
PS20 (mg/mL)	1.423	1.599	1.347	1.361	1.485	1.417
k, 1/hr	0.0750	0.0695	0.0839	0.0855	0.0963	0.1044
R ₂	0.9888	0.9836	0.9927	0.9955	0.9662	0.9856
T _{1/2} [hr]	9.2	10.0	8.3	8.1	7.2	6.6
지질, μM PhL						
로트 ID	Ls-293-7	Ls-293	Ls-294	Ls-295	Ls-296	Ls-297
시간, 시간						
0.083	3367.4	4473.9	2353.9	3738.4	2506.4	3141.9
1	3828.0	2871.4	2360.3	2831.7	2220.2	2469.7
3	2387.3	2987.5	1428.6	2290.0	1835.1	2234.1
6	2163.2	2348.6	1465.8	1838.9	1309.6	1975.2
24	1015.7	1294.7	509.0	673.8	755.7	766.9
48	216.6	345.8	83.3	220.4	69.2	163.0
C ₀ , μM PhL	3368.1	3550.5	2235.3	2940.4	2445.5	2844.5
k, 1/hr	0.05607	0.04757	0.06740	0.05581	0.06973	0.05870
R ₂	0.9826	0.9716	0.9879	0.9806	0.9619	0.9946
T _{1/2} [hr]	12.4	14.6	10.3	12.4	9.9	11.8
T _{1/2} , hr, 약물 방출	36.6	31.6	41.9	23.3	26.1	15.2

[0949]

[0950] 표 50. CD-1 마우스에서 리포솜 AKG-28, 로트 Ls-298-Ls-302(실시에 51)의 혈장 약동학.

표 50

AKG-28, mg/ml						
로트 ID	Ls-298-7	Ls-298	Ls-299	Ls-300	Ls-301	Ls-302
시간, 시간						
0.083	0.879	0.637	0.790	0.678	0.851	0.381
1	0.687	0.579	0.760	0.777	0.567	0.461
3	0.612	0.438	0.593	0.502	0.504	0.315
6	0.473	0.329	0.475	0.470	0.426	0.309
24	0.144	0.112	0.210	0.137	0.157	0.0891
48	0.0479	0.0280	0.0817	0.0262	0.0322	0.0034
PS20 (mg/mL)	0.733	0.561	0.715	0.708	0.673	0.425
k, 1/hr	0.0592	0.0637	0.0466	0.0687	0.0631	0.0646
R ²	0.9847	0.9914	0.9857	0.9945	0.9877	0.9715
T _{1/2} [hr]	11.7	10.9	14.9	10.1	11.0	10.7
지질, μM PhL						
로트 ID	Ls-298-7	Ls-298	Ls-299	Ls-300	Ls-301	Ls-302
시간, 시간						
0.083	3480.0	2937.0	2794.1	3284.1	3234.1	1797.6
1	2696.5	2598.3	2505.9	3805.1	2159.8	1871.0
3	2335.4	1970.9	2067.8	2573.6	1910.8	1525.4
6	2061.6	1485.0	1631.3	2392.0	1418.1	1391.6
24	517.8	459.7	796.5	674.6	506.3	456.1
48	185.5	106.5	263.6	123.7	122.6	138.8
C ₀ , μM PhL	2914.8	2560.0	2493.5	3538.0	2446.5	1854.5
k, 1/hr	0.06032	0.06763	0.04728	0.06970	0.06343	0.05482
R ₂	0.9800	0.9924	0.9904	0.9957	0.9837	0.9970
T _{1/2} [hr]	11.5	10.2	14.7	9.9	10.9	12.6
T _{1/2} , hr, 약물						
방출	ND	ND	ND	ND	ND	70.7

[0951] ND -검출되지 않음

[0952] 농도 데이터를 Excel 스프레드시트 LOGEST 기능을 사용하여 단일지수 방정식으로 피팅했다. 약물 방출 반감기를 다음 공식으로 계산했다:

[0953]
$$T_{1/2} \text{ 방출} = T_{1/2} \text{ 약물} * T_{1/2} \text{ 지질} / (T_{1/2} \text{ 지질} - T_{1/2} \text{ 약물})$$

[0954] 리포솜의 약물 및 지질 성분 모두에 대한 혈액 수준은 생체 내에서 상대적으로 강한 약물 체류를 갖는 장기 순환 리포솜에 대해 예상되는 단일지수(단일 구획) 모델에 잘 들어맞는다. 두 약물 모두, 지질 매트릭스의 혈장 반감기는 9.9~14.7시간 범위였다. AKG-38 리포솜의 약물 방출 반감기는 AKG-28보다 눈에 띄게 낮았는데, 이는 1가 양이온을 형성하는 AKG-38과 달리 리포솜 내부의 포획제 반대 이온(황산염)과 AKG-28 이온 상호 작용의 2가 특성으로 인해 발생했을 가능성이 높다. 실제로, 더 낮은(약 250g/mol PhL) 및 더 높은(약 330g/mol PhL) 약물/지질 비율 모두에서 약 100nm 또는 약 120nm의 리포솜으로부터 AKG-38의 생체내 약물 방출 속도는 우리 실험 환경에서 신뢰도있게 결정하기에는 너무 느렸다. AKG-38의 경우, 약물 방출 반감기는 리포솜 크기가 더 큰 제제와 DL 비율이 더 낮은 제제(~450 대 ~600g/mol PhL)에서 더 높았지만, 평균 크기(X_z)는 약 120 nm인 리포솜에서는 그 차이가 덜 두드러졌다. 더 작은 크기(약 80nm)의 리포솜은 생체 내에서 약물 방출 속도가 현저히 증가한 것으로 나타났다. 예상과는 달리, 약 100-125nm의 리포솜 평균 크기(X_z) 범위에서 AKG-38의 경우 약 600g/mol IP, AKG-28의 경우 약 330g/mol IP의 더 높은 DL 비율을 갖는 리포솜은 약 450g/mol PhL(AKG-38) 및 약 250d/mol PhL(AKG-28)의 더 낮은 DL 비율을 갖는 리포솜의 특성과 매우 유사한 혈액 PK 특성을 나타냈다.

[0955] 실시예 54. 다양한 약물 로딩 및 로딩-후 처리 조건에서의 AKG-28 리포솜의 제조 및 특성

[0956] 본 실시예에서, 우리는 약물 로딩 또는 로딩-후 처리 단계를 변경함으로써 인지질 분해를 감소시키기 위한 다양

한 전략을 평가했다. HSPC, 콜레스테롤(Chol) 및 PEG-DSPE(45:55:2.25 몰비)의 압출된 리포솜(압출된 로트 L-97, Xz 117.3nm, PDI 0.0453)을 3mmol HSPC 규모로, DiIC₁₈(3)-DS의 양이 HSPC(로트 L-97)에 대해 0.05mol%인 것을 제외하고 기본적으로 실시예 30에 기술된 바와 같이 제조했다. 압출된 리포솜을 0.2-μm 주사기 필터를 통과시키고, 리포솜 외 황산암모늄을 물에 대해 TFF로 제거하여 잔류 전도도가 15 μS/cm (6.0 부피 교환)이 되도록 했다. TFF-후 리포솜 내 인지질 농도를 블루 포스포몰리브데이트 방법으로 결정했고, 리포솜의 분취량을 250g/mol PhL의 DL0 비율에서 텍스트로스 존재 하에서 AKG-28의 20mg/ml 수성 스톱 용액(pH 5.14)과 혼합하고, 65° C 수조에서 20분 동안 교반하면서 배양한 후 얼음물에서 식힌 후 다음 조건에서 추가로 처리했다(LM은 약물-리포솜 로딩 혼합물을 의미함):

- [0957] 로트 Ls-307-1-A: LM, 6 mg/ml 약물, 45 mg/ml 텍스트로스, 로딩-후 NaCl 첨가 0.1 M, TFF 완충제 교환 (실시예 2A에 따름): 20 mM Hepes-Na, 144 mM NaCl 완충제 pH 7.5 (HBS-20-7.5) (10 Vex);
- [0958] Ls-307-1-B: Ls-307-1-A와 동일, 단 교환/부형제 완충제는 10 mM Na-인산염, 144 mM NaCl, pH 7.5 (PBS-10-7.5);
- [0959] Ls-307-1-C: Ls-307-1-A와 동일, 단 교환/부형제 완충제는 10 mM Hepes-Na, 144 mM NaCl, pH 7.0 (HBS-7);
- [0960] Ls-307-2: LM, 6 mg/ml 약물, 45 mg/ml 텍스트로스, 로딩-후 NaCl 첨가 없음, 로딩-후 완충제 교환 없음, 1M Hepes-Na를 최종 20 mM Hepes, pH 7.5에 부가.
- [0961] Ls-308: Ls-307-1-A와 동일, 단 1 M Hepes-Na (pH 7.63, 20 mM 희석에서 pH 7.50를 생성)을 5 min 65° C 배양 끝 전에 LM에 부가했다.
- [0962] Ls-309: Ls-307-1-C와 동일, 단 LM는 3 mg/ml 약물 및 140 mg/ml 텍스트로스를 함유함.
- [0963] Ls-310: Ls-30와 동일, 단 LM는 5.4 mg/ml의 약물을 함유함.
- [0964] 리포솜을 정용여과에 의해 약 8mg/ml의 약물로 농축하고 멸균 여과(0.2um PES)하여 등근 마개(Gerresheimer)가 있는 멸균 유리 봉규산염 바이알에 넣었다. 약물 농도(UV 분광광도법에 의한), 리포솜 입자 크기 및 pH를 본원에 기재된 바와 같이 결정하였고, 리포솜을 37°C에서 2주 동안 배양했다. 지질 완전성 및 분해 생성물을 HPLC로 정량화했다(실시예 50 참조). 결과는 다음 표에 나와 있다:
- [0965] 표 51. 리포솜 AKG-28 제제 특성(Ls-307 내지 Ls-310) 및 2주 안정성

표 51

			리포솜 크기			배양전			37° C에서 2 주		
로트 ID	DL 비율	EE, %	AKG-28	Xz	PDI	pH	지질 분해, %		pH	지질 분해, %	
	g/mol PhL		(mg/ml)	NM			Chol	HSPC		Chol	HSPC
Ls-307-1-A	245.0	97.3	7.95	119.1	0.0050	7.48	0.00	0.00	7.40	0.33	0.38
Ls-307-1-B	245.6	97.6	8.15	117.6	0.0152	7.36	0.00	0.04	7.16	0.00	0.82
Ls-307-1-C	244.0	96.9	7.87	119.2	0.0163	6.92	0.00	0.22	6.46	56.55	3.91
Ls-307-2	245.5	97.3	8.00	119.1	0.0418	7.46	0.00	0.00	6.63	45.93	0
Ls-308	240.5	97.4	8.03	119.2	0.0198	7.48	0.00	0.00	7.34	8.17	0.96
Ls-309	247.2	97.7	8.66	116.2	0.0316	6.89	0.00	0.39	6.36	57.02	5.13
Ls-310	245.5	97.1	8.59	119.7	0.0083	6.93	0.00	0.18	6.32	60.63	2.75

EE - 캡슐화 효율.

[0966]

- [0967] 가속 안정성 연구 조건(37℃, 4℃에 대한 아레니우스 인자는 9.85) 하에서 지질의 상당한 분해가 pH 7.0 이하의 샘플 및 정제되지 않은 완충된 LM(로트 L-307-2)에서 검출되었다. 콜레스테롤 분해 생성물은 HPLC의 피크 용리 시간과 UV 분광학에 의해 7-히드록시콜레스테롤 및 7-케토콜레스테롤로 확인되었다: 분해 생성물에는 리소-PC, 스테아르산 및 팔미트산이 포함되었다. 그러나 놀랍게도, 완충제 교환 단계 없이, 정제되지 않은 완충된 LM에서는 콜레스테롤의 높은 분해에도 불구하고 HSPC의 분해가 검출되지 않았다.
- [0968] **실시예 55. 다양한 약물 로딩 및 로딩-후 처리 조건에서의 AKG-38 리포솜의 제조 및 특성**
- [0969] 저장 동안 인지질 분해를 감소시키는 가능성에 대해 다양한 약물 로딩 및 가공 단계를 평가했다. 압출된 리포솜을 제조하고, 리포솜 외 포획제를 정제하고, 실시예 54에서와 같이 분석했다. 리포솜의 분취량을 450g/mol PhL의 DL0 비율에서 텍스트로스 존재 하에서 AKG-38의 20mg/ml 수성 스톱 용액(pH 4.99)과 혼합하고, 65° C 수조에서 20분 동안 교반하면서 배양한 후 얼음물에서 식힌 후 다음 조건에서 추가로 처리했다(LM은 약물-리포솜 로딩 혼합물을 의미함):
- [0970] 로트 Ls-303-1-A: LM, 8 mg/ml 약물, 45 mg/ml 텍스트로스, 로딩-후 NaCl 첨가 0.1 M, TFF 완충제 교환 실시예 51(에 따름): 20 mM Hepes-Na, 144 mM NaCl 완충제 pH 7.5 (HBS-20-7.5) (10 Vex);
- [0971] Ls-303-1-B: Ls-307-1-A와 동일, 단 교환/부형제 완충제는 10 mM Na-인산염, 144 mM NaCl, pH 7.5 (PBS-10-7.5);
- [0972] Ls-303-1-C: Ls-307-1-A와 동일, 단 교환/부형제 완충제는 10 mM Hepes-Na, 144 mM NaCl, pH 7.0 (HBS-7);
- [0973] Ls-303-2: LM, 8 mg/ml 약물, 45 mg/ml 텍스트로스, 로딩-후 NaCl 첨가 없음, 로딩-후 완충제 교환 없음, 1M Hepes-Na을 최종 20 mM Hepes, pH 7.5에 부가.
- [0974] Ls-304: Ls-307-1-A와 동일, 단 1 M Hepes-Na (pH 7.63, 20 mM 희석에서 pH 7.50를 생성)을 5 min 65° C 배양 끝 전에 LM에 부가했다.
- [0975] Ls-305: Ls-307-1-C와 동일, 단 LM는 3 mg/ml 약물 및 140 mg/ml 텍스트로스를 함유함.
- [0976] Ls-306: Ls-30와 동일, 단 LM는 7.4 mg/ml의 약물을 함유함.
- [0977] 리포솜을 정용여과에 의해 15 8mg/ml의 약물로 농축하고 멸균 여과(0.2um PES)하여 등근 막개(Gerresheimer)가 있는 멸균 유리 봉규산염 바이알에 넣었다. 약물 농도(UV 분광광도법에 의함), 리포솜 입자 크기 및 pH를 본원에 기재된 바와 같이 결정하였고, 리포솜을 37℃에서 2주 동안 배양했다. 지질 완전성 및 분해 생성물을 HPLC로 정량화했다(실시예 50 참조). 결과는 다음 표에 나와 있다:
- [0978] 표 52. 리포솜 AKG-38 제제 특성(Ls-303~Ls-306) 및 2주 안정성

표 52

로트 ID	DL 비율 g/mol PhL	EE, %	AKG-38 (mg/ml)	리포솜 크기		배양전			37° C에서 2 주		
				Xz	PDI	pH	지질 분해, %		pH	지질 분해, %	
				NM			Chol	HSPC		Chol	HSPC
Ls-303-1-A	442.6	96.4	15.63	118.5	0.0309	7.49	0.00	0.00	7.40	0.00	0.81
Ls-303-1-B	445.9	97.1	15.30	117.8	0.0092	7.32	0.00	0.00	7.15	0.00	1.46
Ls-303-1-C	452.6	98.5	15.10	120.2	0.0185	6.90	0.00	0.67	6.64	0.00	8.76
Ls-303-2	455.3	100.5	15.00	117.9	0.0443	7.39	0.00	0.00	7.33	20.11	0
Ls-304	438.2	95.8	15.40	118.5	0.0065	7.47	0.00	0.00	7.38	0.00	2.29
Ls-305	449.8	99.5	14.91	116.9	0.0308	6.85	0.00	5.00	6.50	0.00	10.22
Ls-306	459.9	100.6	15.02	120.2	0.0246	6.88	0.00	1.90	6.63	0.00	6.66

[0979]

[0980]

리포솜 지질의 분해는 유사하게 제조된 AKG-28 리포솜(실시예 54)과 비교하여 더 낮은 속도이기는 하지만 37°C에서 2주 저장 후에 검출 가능했다(가속 안정성 연구). 리포솜 로트 중 하나에서 콜레스테롤의 상당한 분해가 관찰되었다. 그러나 예기치 않게 동일한 로트(로딩-후 완충제 교환이 없는 약물-로딩 리포솜)에서 HSPC의 분해가 가장 낮았다.

[0981]

실시예 56. DL 비율이 증가된 AKG-28 및 AKG-38 리포솜: 킬레이트제를 사용한 제조, 지질 안정성 및 콜레스테롤 안정화.

[0982]

본 실시예에서는 중금속 킬레이트제를 사용하여 저장하는 동안 관찰된 콜레스테롤 산화 분해 생성물을 감소시키는 가능성을 평가했다. HSPC, 콜레스테롤(Chol) 및 PEG-DSPE(45:55:2.25 몰비)(압출 로트 L-99, Xz 117.9 nm, PDI 0.0078)의 압출된 리포솜을 5.9mmol HSPC 규모로 실시예 54에서와 같이 제조했다. 압출된 리포솜을 0.2-μm 주사기 필터를 통과시키고, 리포솜 외 황산암모늄을 물에 대해 TFF로 제거하여 잔류 전도도가 138 μS/cm (6.1 부피 교환)이 되도록 했다. TFF-후 리포솜의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법으로 결정되었으며, 리포솜의 분취량을 45 mg/ml 텍스트로스 및 AKG 38의 경우 10 mM NaCl 존재 하에, 65° C 수조에서 20분간 교반한 후 얼음-물에서 냉각하면서 주어진 약물-대 지질(DL0) 비율(아래 표 53 참조)에서 AKG-38(8mg/ml) 또는 AKG-28(6mg/ml)과 함께 배양했다. 리포솜을 0.1 M NaCl로 조정하고 2-8° C에서 밤새 저장하고 각 로트를 6개 부분으로 나누었다. 부분 3 및 6에는 킬레이트제인 100mM 데페록사민 메실레이트(Desferal, DFO)를 최종 농도 1mM이 되도록 첨가하고, 모든 부분은 HBS-20-7.5(부분 1-3) 또는 PBS-20-7.5(20mM Na-인산염, 144mM NaCl, pH 7.5; 부분 4-6) 완충제를 사용하여 TFF 완충제 교환/폴리설펀 증공사 카트리지에서 TFF에 의해 비캡슐화 약물 제거를 수행했다(MWCO 500 KDa)(8-11.2 부피 교환(Vex)). TFF 정제된 리포솜은 완충제 공급 없이 계속 정용여과를 통해 농축하듯 0.2-μm PES 주사기 필터를 통한 여과로 멸균하고, 각각의 교환/부형제 완충제로 약물 농도 15mg/ml AKG-38 또는 8mg/ml AKG-28으로 조정했다. 부분 3과 6에는 멸균 100mM DFO 스톱을 최종 0.1mM DFO에 첨가하고, 부분 2와 4에는 DFO 스톱을 최종 0.5mM DFO에 첨가했다. 약물 농도(UV 분광광도법에 의한), 리포솜 입자 크기 및 pH를 본 명세서에 설명된 대로 결정했다. Hepes 완충 샘플의 인지질 농도를 블루 포스포몰리브데이트(Mo) 분석에 의해 측정하고, 인산염 완충 샘플에서는 표준으로서 Mo-분석 Hepes 완충 샘플을 사용하여, 70% 산성화 이소프로판올에서 DiIC₁₈(3)-DS 지질 라벨의 형광 측정법으로 측정했다. 리포솜을 멸균 원형 마개(Gerresheimer)가 있는 멸균 유리 봉규산염 바이알에 무균적으로 분취하고 바이알을 37° C에서 배양했다. 배양 1, 2, 3개월에 리포솜을 샘플링하여 pH, 입자 크기, 약물 및 지질 분해에 대해 분석했다. 실시예 50에 기술된 바와 같이 지질 및 약물 분해 생성물을 HPLC로 확인하고 정량화했다. 다음과 같은 결과가 얻어졌다:

[0983]

표 53. AKG-38 리포솜의 pH 및 지질 분해에 대한 pH, DL0 및 DFO의 영향

표 53

AKG-38 liposomes		DL encapsulated g/mol P	DFO in LM post load	Excipient buffer		Initial pH	1 month			2 months			3 months		
Lot ID	target DL g/mol P			Buffer	DFO		pH	Lipid degradation, %	pH	Lipid degradation, %	pH	Lipid degradation, %	pH	Lipid degradation, %	
Ls-...								Chol	HSPC						
311-1	450	450.6 ± 3.1	None	HBS-20-7.5	None	7.49	7.25	19.86	6.39	7.15	34.43	5.2	6.90	40.59	10.75
311-2	450	452.4 ± 5.2	None	HBS-20-7.5	0.5 mM	7.46	7.28	0	5.76	7.25	0	8.85	7.12	0	13.51
311-3	450	456.6 ± 3.1	1 mM	HBS-20-7.5	0.1 mM	7.47	7.30	0	5.28	7.27	0	9.42	7.19	0	15.29
311-4	450	451.8 ± 6.3	None	PBS-20-7.5	None	7.39	7.15	0	6.09	7.01	30.43	9.92	6.84	33.21	18.6
311-5	450	453.5 ± 9.9	None	PBS-20-7.5	0.5 mM	7.39	7.13	0	5.61	7.07	0	8.63	6.94	0	13.87
311-6	450	447.9 ± 9.6	1 mM	PBS-20-7.5	0.1 mM	7.39	7.13	0	7.08	7.11	0	9.54	7.00	0	14.96
312-1	600	599.9 ± 5.6	None	HBS-20-7.5	None	7.47	6.59	48.49	5.10	6.52	50.43	4.77	6.41	49.90	11.19
312-2	600	601.4 ± 6.3	None	HBS-20-7.5	0.5 mM	7.48	7.01	0	11.72	nd	nd	nd	nd	nd	nd
312-3	600	587.6 ± 6.3	1 mM	HBS-20-7.5	0.1 mM	7.44	7.37	0	3.17	7.31	0	7.92	7.25	0	15.23
312-4	600	613.3 ± 14.0	None	PBS-20-7.5	None	7.40	7.26	0	5.32	7.16	29.13	8.79	6.87	43.04	21.79
312-5	600	613.3 ± 16.2	None	PBS-20-7.5	0.5 mM	7.36	7.25	0	3.67	7.20	0	6.96	7.10	0	13.25
312-6	600	606.0 ± 13.3	1 mM	PBS-20-7.5	0.1 mM	7.44	7.25	0	4.00	7.20	0	7.91	7.13	0	15.51

[0984]

[0985]

표 54. AKG-28 리포좀의 pH 및 지질 분해에 대한 pH, DLO 및 DFO의 영향

표 54

AKG-28 liposomes		DL encapsulated g/mol P	DFO in LM post load	Excipient buffer		Initial pH	1 month			2 months			3 months		
Lot ID	target DL g/mol P			Buffer	DFO		pH	Lipid degradation, %	pH	Lipid degradation, %	pH	Lipid degradation, %	pH	Lipid degradation, %	
Ls-...								Chol	HSPC						
313-1	250	257.5 ± 3.4	None	HBS-20-7.5	None	7.50	7.20	41.09	2.46	7.17	39.26	3.40	7.07	39.42	3.57
313-2	250	257.4 ± 2.7	None	HBS-20-7.5	0.5 mM	7.50	7.34	0	3.91	7.27	0	4.85	7.21	0	8.52
313-3	250	258.8 ± 2.9	1 mM	HBS-20-7.5	0.1 mM	7.50	7.34	0	4.17	7.27	0	6.66	7.20	0	11.78
313-4	250	257.1 ± 6.2	None	PBS-20-7.5	None	7.50	7.01	42.12	2.24	7.02	34.60	3.22	6.83	38.81	3.31
313-5	250	261.8 ± 5.7	None	PBS-20-7.5	0.5 mM	7.41	7.14	0	4.50	7.07	0	6.85	6.97	0	11.30
313-6	250	261.1 ± 6.0	1 mM	PBS-20-7.5	0.1 mM	7.40	7.14	0	5.23	7.10	0	7.89	7.02	0	13.35
314-1	330	338.3 ± 4.8	None	HBS-20-7.5	None	7.48	6.99	52.12	3.53	nd	nd	nd	nd	nd	nd
314-2	330	337.9 ± 6.4	None	HBS-20-7.5	0.5 mM	7.48	7.25	0	7.25	nd	nd	nd	nd	nd	nd
314-3	330	341.4 ± 3.7	1 mM	HBS-20-7.5	0.1 mM	7.48	7.36	0	2.28	7.33	0	5.93	7.28	6.98	10.07
314-4	330	350.2 ± 21.1	None	PBS-20-7.5	None	7.41	7.12	40.92	2.18	7.00	46.96	3.36	6.80	50.87	4.48
314-5	330	350.1 ± 21.1	None	PBS-20-7.5	0.5 mM	7.41	7.24	0	2.00	7.14	0	5.94	7.06	0	9.35
314-6	330	346.2 ± 22.8	1 mM	PBS-20-7.5	0.1 mM	7.41	7.25	0	3.43	7.15	0	7.84	7.06	0	13.42

[0986]

[0987]

지질 분해 산물의 초기 수준은 검출되지 않았다. 콜레스테롤 분해 생성물인 7-하이드록시- 및 7-케토콜레스테롤의 출현은 산화적 분해를 암시하는 반면, HSPC 분해는 에스테르 결합에서 가수분해적으로 진행된다. 리포좀 부형제 완충제에 킬레이트제 디페록사민을 첨가하면 3개월간 37° C 저장(4° C에서 냉장 저장 약 29개월과 동일)에서도 콜레스테롤 분해가 완전히 방지되었다. DFO가 불포화 지방산의 금속 촉매 산화를 억제하는 것으로 알려져 있지만, AKG-28 및 AKG-38 옥사졸리딘은 약물을 함유한 리포좀에서 콜레스테롤의 산화 분해를 억제하는 DFO의 이러한 뛰어난 능력은 놀라웠다. 콜레스테롤의 산화적 분해는 약염기성 친유성 약물이 함유된 약제학적 리포좀에서 자주 관찰되지 않는다. 콜레스테롤 분해가 동일한 조성물이지만 약물이 없는 리포좀에서는 관찰되지 않았기 때문에, 이론에 얽매이지 않고 분해는 이들 캡슐화 약물에 의한 콜레스테롤 산화의 촉매 작용 단독, 또는 약제학적 제제 및 부형제에 일반적으로 존재하는 미량의 중금속과의 복합체와 조합하여 관련이 있을 가능성이 있다고 가정한다. DFO의 이러한 안정화 효과는 Hepes 또는 인산염으로 완충된 리포좀 제제에서도 동일하게 관찰되었다. 또한, 증가된 DLO 비율(AKG-28, 330 g/mol PhL, AKG-38, 600 g/mol PhL)을 갖는 리포좀의 높은 캡슐화 효율은 높았으며, 제제에 초기에 첨가된 약물의 농도가 더 높음에도 불구하고 효과적으로 정량적이었다.

[0988]

실시예 57. 로딩 전에 약물 스톱 용액에 킬레이트제를 첨가하면 AKG-28(Ls 315-318) 및 AKG-38(Ls 319-322)의 리포좀 제제에서 지질 분해가 방지되지 않는다.

[0989]

로딩 전에 원래의 약물 스톱 용액에 킬레이트제를 포함시킴으로써 콜레스테롤 산화 생성물을 감소시키는 가능성을 평가했다. DLO 250 g/mol PhL의 AKG-28 또는 DLO 450 g/mol PhL의 AKG-38이 로딩된 리포좀을 본질적으로 실시예 56에서와 같이 제조했고, 단 일부 로트에서 1 mM의 킬레이트제 DFO, EDTA 또는 DTPA를 리포좀에 첨가하기 전에 20mg/ml 약물 스톱 용액에 첨가했다. 로딩 후, 리포좀을 HBS-20-7.5에 대해 TFF 완충제 교환으로 처리하고 추가 킬레이트제 없이 저장했다. 리포좀을 필터 멸균하고, 분석하고, 멸균 유리 바이알에 분배하고, 37° C에서 배양하고, 실시예 56에 설명된 대로 샘플링했다. 샘플 분석 결과 및 리포좀 특성은 다음 표에 나와 있다:

[0990]

표 55. 킬레이트제 함유 약물 스톱이 로딩된 AKG-28 및 AKG-38 리포좀의 안정성

표 55

Lot ID	Drug	DL encapsulated g/mol P	Chelator in drug stock solution pre-load	Initial				2 weeks				1 month				2 months				3 months			
				pH	pH	pH	pH	Lipid degradation, %	Lipid degradation, %	Lipid degradation, %	Lipid degradation, %	pH	pH	pH	pH	Lipid degradation, %	Lipid degradation, %	Lipid degradation, %	Lipid degradation, %	pH	pH	pH	pH
Is-315	AKG-28	248.2 ± 3.1	None	7.47	7.32	7.32	7.14	22.31	1.37	7.14	46.01	2.26	7.14	40.36	2.86	7.02	38.8	4.59					
Is-316	AKG-28	250.2 ± 3.3	DFO 1 mM	7.47	7.37	7.37	7.32	0	3.36	7.32	0	4.13	7.22	18.47	7.12	6.37	55.18	7.15					
Is-317	AKG-28	252.8 ± 2.6	EDTA 1 mM	7.47	7.35	7.35	7.33	0	4.25	7.33	0	5.81	7.15	28.00	9.3	7.02	30.02	15.55					
Is-318	AKG-28	250.2 ± 2.3	DTPA 1 mM	7.48	7.37	7.37	7.32	0	4.73	7.32	0	5.65	7.17	16.20	9.37	7.12	25.95	12.3					
Is-319	AKG-38	440.1 ± 4.3	None	7.45	7.32	7.32	7.18	16.4	3.87	7.18	38.72	2.81	7.13	34.94	3.53	6.98	38.94	9.13					
Is-320	AKG-38	445.4 ± 5.0	DFO 1 mM	7.44	7.32	7.32	7.27	0	5.2	7.27	0	6.03	7.15	28.16	9.83	6.97	32.77	18.98					
Is-321	AKG-38	442.6 ± 4.2	EDTA 1 mM	7.44	7.32	7.32	7.27	0	5.28	7.27	0	6.86	7.20	15.48	11.25	7.02	30.34	18.22					

[0091]

[0092]

리포솜과 혼합하기 전에 3가지 킬레이트제 중 임의의 것을 약물 스톱 용액에 첨가하면 콜레스테롤 분해 생성물의 형성이 지연되었지만, 전체 3개월 관찰 기간에 걸쳐 분해는 방지되지 않았다. 따라서 리포솜 저장 매질에 킬레이트제를 첨가하는 것이 바람직하다.

[0093]

실시예 58. 킬레이트제 존재 하의 Ls-AKG28 제제의 안정성

[0094]

저장 중에 생성된 콜레스테롤 산화 생성물의 존재를 감소시키기 위한 최종 리포솜 약물 생성물 내 DFO 또는 EDTA 킬레이트제의 가능성을 평가했다. 로트 Ls-323, Ls-324. HSPC, 콜레스테롤(Chol) 및 PEG-DSPE(45:55:2.25 몰비)(압출 로트 L-100, Xz 121.4 nm, PdI 0.0131)의 압출된 리포솜을 본질적으로 실시예 54에서와 같이 10 mmol HSPC 규모로 제조했다. 단, 형광 지질 라벨 DiIC₁₈(3)-DS가 첨가되지 않았다. 약 60mM 인지질에서의 0.5M 황산암모늄-9.1부피% 에탄올 중의 수화된 지질 분산액을 두 부분으로 나누고, 각각을 Lipex 100ml 열배럴 압출기를 사용하여 70°C 및 280psi에서 2x100nm+ 1x200nm PCTE 막의 스택을 통해 4회 통과시켰다. 두 부분을 합하고 동일한 멤브레인 스택을 6회 더 통과시켜 압출된 로트 L-100, Xz 121.4 nm, PdI 0.0131을 얻었다. 압출된 리포솜을 밤새 2-8°C에서 유지하고, 0.2-μm 주사기 필터를 통과시킨 다음, 리포솜 외 황산암모늄을 물에 대해 TFF로 제거하여 잔류 전도도가 152 μS/cm(5.9 부피 교환)가 되도록 했다. TFF-후 압출 리포솜(54.7mM)의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법으로 결정했다. 이들 리포솜의 분취량을 DL0 비율 250g/mol PhL(로트 Ls-323)에서 또는 320g/mol PhL(로트 Ls-324)에서 AKG-28(6mg/ml) 과 함께 1.61 g 또는 0.59g의 약물 규모로 45mg/ml 텍스트로스의 존재하에 각각을 85° C 수조에서 교반하면서 배양하여 로딩 혼합물이 64° C에 도달하고(4분), 65° C 물에서 다시 23분 동안 계속한 후 얼음물에 10분 동안 냉각했다. 리포솜을 3M NaCl 스톱 용액으로 0.1M NaCl로 조정하고 폴리스폰 중공 섬유 카트리지(MWCO 500 KDa) 상에서 TFF 정용여과에 의해 13-14mg/ml의 AKG-28로 농축했다. 각 농축 로트의 일부를 HBS-20-7.5 완충제를 사용하여 동일한 카트리지(6.9-7.9 Vex)에서 TFF 완충제 교환/TFF에 의해 비캡슐화 약물 제거로 처리했다. TFF-정제 및 비정제 약물-로딩 리포솜을 HBS-20-7.5 완충제를 사용하여 약물 농도 12.5 mg/ml(Lot-Ls-323) 또는 13.4 mg/ml(Ls-324)로 조정하고 0.2-μm PES 주사기 필터를 통해 통과시켜 멸균했다. 캡슐화된 약물의 DL 비율은 TFF-후 부분 내 약물 및 인지질 분석을 통해 결정되었으며 246.0 ± 2.3 g/mol PhL(Ls-323; EE 98.4%) 및 315.6 ± 4.8 g/mol PhL(Ls- 324; EE 95.6%)로 나타났다.

[0095]

로트 L-100의 TFF-후 압출된 리포솜의 또 다른 부분을 텍스트로스 없이 0.365g 약물 규모 및 DL0 비율 320g/mol PhL(로트 Ls-326)에서 38.5mg/ml AKG-28 수성 스톱 용액(pH 5.13)과 AKG-28 최종 12.8mg/ml까지 혼합했다. 로딩 혼합물(LM)을 65°C 수조에서 23분 동안 교반한 후, 얼음물에서 10분 동안 냉각시키고, 3M NaCl을 최종 60mM에 첨가했다. 추가된 NaCl 농도는 270-310 mOsm/L의 등장성 삼투압 범위 내에서 LM의 로딩-후 긴장성을 제공하도록 선택되었다. Wescor Vapro 5520 노점 삼투압계를 사용하여 측정된 NaCl 조정 LM의 삼투압농도는 291 ± 3 mOsm/kg이었다. Sepharose CL-4B 상 SEC에 의해 비캡슐화 약물로부터 정제된 배양-후 LM의 분취량은 320.4 ± 3.5g/mol PhL(EE 97.0%)의 캡슐화된 DL 비율을 나타냈다. 배양-후 LM(pH 5.7)을 두 부분으로 나누었다; 부분 1은 1N NaOH(Ls-326LM)를 사용하여 pH 6.49로 조정되었고, 부분 2는 1M Hepes-Na pH 7.5(Ls-326LMH; 조정 후 pH 7.16)를 사용하여 20mM Hepes로 조정되었다. 각 부분은 0.2 μm 멸균 여과되었으며 3개 부분으로 추가로 나누어졌다. 부분 1은 킬레이트제가 없는 대조군으로 사용되었고 부분 2는 멸균 100mM 테페록사민 메실레이트를 사용하여 0.5mM 테페록사민(DFO)으로 조정되었으며 부분 3은 0.5mM EDTA-Na를 사용하여 멸균 100mM EDTA-Na, pH 6.0으로 조정되었다. Ls-323(TFF 정제/완충제 교환됨) 및 Ls-323LM(정제되지 않은 배양-후 로딩 혼합물) 각각의 3개 분취량을 동일한 방식으로 처리하여 0.5mM DFO, 0.5mM EDTA를 함유하거나 킬레이트제를 함유하지 않았다. 약물 농도(UV 분광광도법에 의함), 리포솜 입자 크기 및 pH는 본 명세서에 설명된 대로 결정되었다. 인지질은 블루 포스포몰리브데이트(Mo) 분석에 의해 측정되었다. 리포솜을 멸균 원형 마개(Gerresheimer)가 있는 멸균 유리 봉규산염 바이알에 무균적으로 분취하고 바이알을 37° C에서 배양했다. 배양 2 주, 1 개월, 6 주, 및

10 주에 리포솜을 샘플링하여 pH, 입자 크기, 약물 및 지질 완전성에 대해 분석했다. 실시예 54에 기술된 바와 같이 지질 완전성 및 분해 생성물을 HPLC로 확인하고 정량화했다. 다음과 같은 결과가 얻어졌다:

[0996] 표 56. 최종 리포솜 약물 제조에서 킬레이트제가 저장 안정성에 미치는 영향.

표 56

AKG-28 리포솜				초기		2 주		1 개월			10 주		
로트 ID	DLO 비율	약물	킬레이트제*	pH	pH	지질 분해, %		pH	지질 분해, %		pH	지질 분해, %	
	g/mol P	(mg/ml)				Chol	HSPC		Chol	HSPC		Chol	HSPC
Ls-323	250	12.5	없음	7.50	7.36	7.46	0.00	7.06	41.98	0.52	5.06	74.62	4.06
Ls-323	250	12.5	DFO	7.50	7.39	0.00	0.29	7.35	0.00	1.38	7.16	0.00	6.42
Ls-323	250	12.5	EDTA	7.50	7.37	0.00	0.41	7.27	0.00	1.83	7.07	0.00	6.62
Ls-323LM	250	13.4	없음	6.07	4.76	37.03	0.47	4.13	39.63	5.06	3.44	47.51	82.97
Ls-323LM	250	13.4	DFO	6.07	5.73	0.00	0.11	5.43	0.00	1.42	4.78	0.00	13.70
Ls-323LM	250	13.4	EDTA	6.07	5.83	0.00	0.05	5.48	0.00	0.94	4.72	0.00	12.74
Ls-326	323	12.2	EDTA	6.49	6.51	0.00	0.00	6.47	0.00	0.00	6.40	0.00	0.00
Ls-326	323	12.2	DFO	6.49	6.53	0.00	0.00	6.49	0.00	0.00	6.36	0.00	0.16
Ls-326	323	12.2	없음	6.49	6.37	25.41	0.00	4.99	59.31	1.13	3.93	70.62	14.38
Ls-326H	323	12.0	없음	7.16	7.16	0.00	0.00	7.12	21.34	0.00	6.21	67.86	0.00
Ls-326H	323	12.0	DFO	7.16	7.16	0.00	0.00	7.15	0.00	0.00	7.08	0.00	0.95
Ls-326H	323	12.0	EDTA	7.16	7.15	0.00	0.00	7.15	0.00	0.00	7.12	0.00	1.01

*EDTA 또는 DFO를 최종 농도 0.5 mM로 첨가했다

[0997]

[0998] 킬레이트제 없이, 콜레스테롤의 산화적 분해는 TFF-정제/완충제 교환 샘플뿐만 아니라 pH 7.0 미만의 초기 pH에서 정제되지 않은 LM에서도 2주 배양 후에 이미 관찰되었다. 결국, 킬레이트제가 없는 모든 샘플에서 콜레스테롤의 상당한 분해(10주차에 47.5-74.6%)가 관찰되었다. 반면, 0.5 mM 킬레이트제, DFO 또는 EDTA를 함유한 샘플에서는 10주 배양 후에도 콜레스테롤 분해가 감지되지 않았다. 또한, 삼투제인 텍스트로스 없이 로딩되고 NaCl로 등장성으로 조정된 Ls-326 샘플에서, 킬레이트제의 존재 하에서 HSPC의 가수분해 분해는 현저히 낮았다(10주 배양 후 0-1.01%). 콜레스테롤 분해가 있는 샘플에서도 분해 정도와 상관관계가 있는 pH 저하가 나타났다.

[0999] 실시예 59. 다양한 로딩 조건 및 리포솜 외 매질 조성이 AKG-28 리포솜의 특성 및 저장 안정성에 미치는 영향 - (로트 Ls-338-340).

[1000] 리포솜 AKG-28 제제의 저장 안정성에 대한 다양한 로딩 조건 및 외부 매질 조성의 영향을 평가했다. 로트 Ls-338, Ls-339. HSPC, 콜레스테롤(Chol) 및 PEG-DSPE(45:55:2.25 몰비)(압출 로트 L-102, Xz 117.8 nm, PdI 0.0118)의 압출된 리포솜을 본질적으로 실시예 54에 설명된 대로 5.9 mmol HSPC 규모로 제조했다. 단 PCTE 멤브레인 스택을 통한 통과 횟수가 10번이었다. 압출된 리포솜을 밤새 2-8° C에서 유지하고 0.2 μm 주사기 필터를 통과시켰다. 리포솜 외 황산암모늄을 TFF에 의해 잔류 전도도가 542 μS/cm(4.2 부피 교환)가 될 때까지 물에서 제거했다. TFF-후 압출 리포솜(57.2 mM)의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법으로 결정했다. 이들 리포솜의 분취량을 45mg/ml 텍스트로스의 존재하에 약물 100mg 규모로, 259g/mol PhL(로트 Ls-338) 또는 345g/mol PhL(로트 Ls-339)의 DLO 비율로 AKG-28(6mg/ml, 40mg/ml 스톱 용액으로 첨가, pH 5.17)과 혼합하고, 66° C 수조에서 20분 동안 교반하면서 배양한 후 얼음물에서 10 분 동안 냉각시켰다. 리포솜을 3M NaCl 스톱 용액을 사용하여 0.1M NaCl로 조정하고 HBS-20-7.5 완충제를 사용하여 폴리설펜 중공 섬유 카트리지(MWCO 500 KDa)(8.0-9.4 Vex)에서 TFF에 의해 TFF 완충제 교환/비캡슐화 약물 제거를 수행했다. 리포솜 잔류물을 완충제 공급물 없이 동일한 카트리지에서 정용여과에 의해 농축했다. TFF-정제된 농축 리포솜을 HBS-20-7.5 완충제를 사용하여 약물 농도 9 mg/ml로 조정하고 0.2-μm PES 주사기 필터를 통과시켜 멸균했다. TFF-후 부분의 약물 및 인지질 분석에서 결정된 캡슐화된 약물의 DL 비율은 Ls-338의 경우 253.7 ± 5.3 g/mol PhL(EE 99.9%)이었고 Ls-339의 경우 329.9 ± 6.3 g/mol PhL(EE 95.8 %)이었다.

[1001] 로트 L-102의 TFF-후 압출된 리포솜의 또 다른 부분을 텍스트로스 없이 40mg/ml AKG-28 수성 스톱 용액과 혼합하여 0.400g의 약물 규모로 345g/mol PhL의 DLO 비율(Lot Ls-340)에서 최종 12mg/ml의 AKG-28을 제조했다. 로딩 혼합물(LM)을 66° C 수조에서 20분 동안 교반한 후, 얼음물에서 10분 동안 냉각시키고, 3M NaCl을 첨가하여 최종 NaCl 증가량이 50mM이 되도록 했다. 추가된 NaCl 농도는 추가된 완충제로 인한 추가 삼투압 증가를 처리

하기 위해 선택했다. 약물 로딩 후면서 NaCl 및 pH 조정 전의 LM의 삼투압은 133 ± 6 mOsm/kg이었다. Sepharose CL-4B 상 SEC에 의해 비캡슐화 약물로부터 정제된 배양-후 LM의 분취량은 321.7 ± 5.8 g/mol PhL (EE 95.0%)의 캡슐화된 DL 비율을 나타냈다.

[1002] 배양-후 NaCl로 조정된 LM(pH 5.7)을 여러 로트로 나누고 다음과 같이 추가 처리했다:

[1003] 로트 340S: 정제됨/ TFF에 의해 0.85% NaCl (8.3 Vex)로 완충제 교환됨, 및 교환 후 20 M Hepes-Na, pH 7.5 및 9 mg/ml의 약물로 조정됨.

[1004] 로트 340H: 정제됨/TFF에 의해 HBS-20-7.5 완충제 (8.3 Vex)로 완충제 교환됨 및 동일 완충제로 9m g/ml의 약물로 조정됨.

[1005] 로트 340P: 정제됨/TFF에 의해 PBS-20-7.5 완충제 (8.2 Vex)로 및 완충제 교환됨 동일 완충제로 9m g/ml의 약물로 조정됨.

[1006] 로트 340LMH: 완충제 교환/정제없이, 1 M Hepes-Na 스톱 용액을 사용하여 20 mM Hepes-Na로 조정됨, 및 부가적 NaOH로 pH 7.48로 조정 및 소량의 HBS-20-7.5 완충제로 10 mg/ml의 약물.

[1007] 로트 340LMP: 완충제 교환/정제없이, 1 M Na-인산염, pH 7.5를 사용하여 20 mM Na-인산염으로 조정됨, 및 부가적 NaOH로 pH 7.51로 조정 및 소량의 PBS-20-7.5 완충제로 10 mg/ml의 약물.

[1008] 각 로트를 0.2 μ m 멸균 여과했다. 그런 다음 Ls-338 및 Ls-339를 세 부분으로 나누었다: 부분 1은 킬레이트제-없음 대조군 역할을 하고, 부분 1은 멸균 100mM 데페록사민 메실레이트를 사용하여 0.5mM 데페록사민(DFO)으로 조정하고, 부분 2는 멸균 100mM EDTA-Na, pH 6.0로 0.5mM EDTA-Na로 조정하고 부분 3은 킬레이트제-없음 대조군 역할을 했다. 각 Ls-340 시리즈 로트를 두 부분으로 나누어 같은 방법으로 0.5mM DFO 또는 0.5mM EDTA로 조정했다. 약물 농도(UV 분광광도법에 의한), 리포솜 입자 크기 및 pH는 본 명세서에 설명된 대로 결정되었다. 인지질은 블루 포스포몰리브데이트(Mo) 분석에 의해 측정되었으며, 인산염 완충 샘플에서는 표준으로서 Mo-분석 Hepes 완충 샘플을 사용하여, 70% 산성화 이소프로판올에서 DiIC₁₈(3)-DS 지질 라벨의 형광 측정법으로 측정되었다. 리포솜을 멸균 원형 마개(Gerresheimer)가 있는 멸균 유리 봉규산염 바이알에 무균적으로 분취하고 바이알을 37° C에서 배양했다. 배양 2, 4, 및 6 주에 리포솜을 샘플링하여 pH, 입자 크기, 약물 및 지질 완전성에 대해 분석했다. 지질 완전성 및 분해 생성물을 HPLC로 확인하고 정량화했다(실시예 50). 다음과 같은 결과가 얻어졌다 (표 57):

[1009] 표 16f

샘플	로트 ID	DL 비율	로딩-후 처리				지질 분해, %					
코드		g/mol P	TFF	완충제 pH 7.5	킬레이트제	pH	2 주		4 주		6 주	
				20 mM 까지	0.5 mM 까지		Chol	PC	Chol	PC	Chol	PC
71	Ls-338	253.7 $\pm$ 5.3	HBS-20-7.5		DFO	7.51	0.00	0.40	0.00	0.48	0.00	2.33
72	Ls-338	253.7 $\pm$ 5.3	HBS-20-7.5		EDTA	7.51	4.05	0.00	10.29	0.00	10.35	0.86
73	Ls-338	253.7 $\pm$ 5.3	HBS-20-7.5		없음	7.51	21.19	0.33	24.58	0.54	27.32	1.07
74	Ls-339	329.9 $\pm$ 6.3	HBS-20-7.5		DFO	7.49	0.00	0.00	0.00	0.84	0.00	1.11
75	Ls-339	329.9 $\pm$ 6.3	HBS-20-7.5		EDTA	7.49	7.38	0.00	9.97	0.00	13.09	1.05
76	Ls-339	329.9 $\pm$ 6.3	HBS-20-7.5		없음	7.49	24.46	0.00	33.36	0.29	38.92	0.89
77	Ls-340S	321.7 $\pm$ 5.8	0.85% NaCl	HEPES	DFO	7.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.67
78	Ls-340S	321.7 $\pm$ 5.8	0.85% NaCl	HEPES	EDTA	7.47	2.99	0.00	6.55	0.00	7.93	0.58
79	Ls-340H	320.7 $\pm$ 7.2	HBS-20-7.5		DFO	7.47	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.69
80	Ls-340H	320.7 $\pm$ 7.2	HBS-20-7.5		EDTA	7.47	4.77	0.00	7.49	0.18	8.18	0.72
81	Ls-340P	325.1 $\pm$	PBS-20-		DFO	7.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70

[1010]

		7.4	7.5									
82	Ls-340P	325.1 ± 7.4	PBS-20-7.5		EDTA	7.38	15.63	0.00	16.90	0.00	18.91	0.34
83	Ls-340LMH	344.5 ± 7.9*	없음	HEPES	DFO	7.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42
84	Ls-340LMH	344.5 ± 7.9*	없음	HEPES	EDTA	7.37	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.54
85	Ls-340LMP	344.5 ± 7.9*	없음	인산염	DFO	7.34	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.53
86	Ls-340LMP	344.5 ± 7.9*	없음	인산염	EDTA	7.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60

* 제거되지 않은 캡슐화 약물과 비캡슐화 약물을 포함

[1011]

[1012]

초기에는 지질 분해 생성물이 검출되지 않았다. 킬레이트제가 없는 경우, 콜레스테롤의 상당한 산화 분해가 이미 2주 시점에 관찰되었으며, 이는 이전 관찰과 일치한다. EDTA는 부분적인 보호를 제공하여 콜레스테롤 분해 속도를 늦추고, 6주 배양에 걸쳐 콜레스테롤 분해로부터 DFO 보호가 완료되었다. 약물 로딩 후 완충제 교환을 수행하지 않은 샘플은 인지질 가수분해 속도가 더 낮은 것으로 나타났다. 6주 배양 후, 교환되지 않은, 킬레이트제-안정화 샘플 4개에서 평균 인지질 분해는 $0.52 \pm 0.08\%$ 였고, 완충제-교환된, 킬레이트제-안정화 샘플 10개에서는 $0.91 \pm 0.55\%$ 였다. 6mg/ml(Ls-339) 또는 12mg/ml(Ls-340H)의 약물 농도로 로딩된 유사하게 처리된 로트 간에는 지질 불안정성이 증가하지 않았다; 실제로, 로딩 혼합물 중 더 높은 약물 농도에서의 로딩은 더 낮은 인지질 분해를 유리하게 했다(샘플 79, 0.9% 대 샘플 74, 1.11%, 및 샘플 80, 0.72%, 대 샘플 75, 1.05%).

[1013]

실시예 60. 마우스에서 리포좀 Ls-338, Ls-339, Ls-340의 혈액 약동학.

[1014]

장기간 순환하는 약동학적 특성을 유지하기 위해 다양한 DL 비율로 제조된 AKG-28의 킬레이트제 및 안정화된 리포좀 제제에 대한 가능성을 평가했다. 실시예 59의 리포좀 로트 Ls-338(샘플 71), Ls-339(샘플 74) 및 Ls-340S(샘플 77)의 DFO 안정화 샘플을 암컷 CD-1 마우스(22-25g)에 50mg/kg AKG-28의 용량으로 3회 i.v. 투여했다. 주사 후 5분(0.083시간), 1, 3, 6, 24 및 48시간에 혈액을 Li-헤파린 처리된 Microvettes로 샘플링하고, 원심분리하고, 혈장을 실시예 52에 기술된 바와 같이 직접 HPLC 분석으로 AKG-28에 대해 및 간접(DiIC18(3)-DS 라벨) HPLC 분석으로 리포좀 인지질에 대해 분석했다. i.v. 볼루스 투여에 적절하게 C_{max} 대신 초기 농도(C_0)를 결정한 것을 제외하고 실시예 39에 설명된 대로 PK Solutions 소프트웨어(Summit Research)를 사용하여 약물 및 리포좀 인지질의 혈장 농도로부터 약동학적 매개변수를 결정했다. 리포좀 투여 후 혈장 내 약물, 리포좀 지질 및 DL 비율에 대한 혈장 농도 대 시간 프로파일도 20A, 도 20a, 도 20B 및 도 20BC 각각에 제시되어 있다. 혈장 약동학 매개변수의 요약이 표 58에 제시되어 있다. HBS-7 완충제에 용해된 5 mg/ml AKG-28 용액을 유리 약물 약동학 연구에 사용했다. AKG-28 용액을 20 mg/kg으로 주사하였고, 주사-후 5분, 30분, 1시간, 3시간 및 6시간에 유사한 방식으로 혈장 샘플을 채취했다. 혈장 샘플을 실시예 52의 방법을 사용하여 HPLC로 AKG-28에 대해 분석하되, AKG-28은 305 nm의 여기 및 410 nm의 방출을 사용하는 형광에 의해 검출되었다. 표준품은 비캡슐화 AKG-28의 2mg/ml 스톡 용액에서 제조했다. % 주사 용량(%ID)으로 표현된 약물 농도 대 시간은 표 59에 나와 있다.

[1015]

표 58. 다양한 DL0에서 제조된 리포좀 AKG-28 제제의 PK.

표 58

AKG-28 약물			
샘플 코드	71	74	77
로트 ID	Ls-338	Ls-339	Ls-340S
DL 비율, g/mol PhL	253.7 ± 5.3	329.9 ± 6.3	321.7 ± 5.8
투여량 (mg/kg)	50	50	50
C ₀ , mg/L	1212	1293	1209
C _{last} [mg/L]	165.2	104.3	199.0
T _{last} [hr]	48	48	48
AUC _{0-last} , hr*mg/L	23.702	22.709	25.687
AUC _{0-last} /용량, [hr*mg/L]/[mg/kg]	474.0	454.2	513.7
AUC _{0-inf} [hr*mg/L]	27.540	24.700	30.621
CL, mL/hr/kg	1.82	2.02	1.63
Vd [mL/kg]	42.2	38.6	40.5
T _{1/2} [hr]	16.1	13.2	17.2
단일지수 꺾, R ²	0.9800	0.9889	0.9642
리포좀 인지질			
샘플 코드	71	74	77
용량, mmol/kg	0.1971	0.1516	0.1554
C ₀ , mmol/L	4.734	3.753	3.821
C _{last} , mmol/L	0.709	0.323	0.654
T _{last} [hr]	48	48	48
AUC _{0-last} , hr*mmol/L	98.31	69.28	81.31
AUC _{0-last} /용량, [hr*mmol/L]/[mmol/kg]	498.8	457.0	523.2
AUC _{0-inf} , hr*mmol/L	115.66	75.54	98.15
CL, mL/hr/kg	1.70	2.01	1.58
Vd [mL/kg]	41.7	38.9	40.7
T _{1/2} [hr]	16.9	13.4	17.8
단일지수 꺾, R ²	0.9868	0.9925	0.9669
T _{1/2} , hr, 약물 방출	325.3	908.3	471.9

[1016]

[1017]

표 59. 유리 (비캡슐화) AKG-28의 PK.

표 59

AKG-28 용액	
시간, 시간	주사 용량의 %
0.0833	0.557
0.5	0.191
1	0.182
3	0.049
6	0.029

[1018]

[1019]

약 330g/mol PhL의 DL0 비율에서 제조된 리포좀은 250g/mol PhL의 더 낮은 DL0 비율에서 제조된 리포좀의 탁월한 혈장 안정성 및 장기 순환 약동학적 특성을 유지했다. 주사된 약물 용량으로 표준화된 리포좀 약물 성분의 AUC 값은 mg/kg당 454-513 hour-mg/L 범위였으며, 이는 본 연구에서의 DL0가 250 g/mol PhL인 리포좀에 대한 mg/kg당 474 hour-mg/L 값과 잘 비교된다. 이전 연구에서의 mg/kg당 396 hour-mg/L와 비교된다(실시예 39). 약물과 리포좀 지질 모두에 대한 혈장 농도 데이터는 0.964-0.993 범위의 결정 계수(R²)를 갖는 단일지수 모델

에 대해 우수한 핏을 나타냈다. 모든 리포솜은 오랫동안 순환했다(혈장 반감기 13.4-17.8시간). 약물 방출 반감기를 다음 공식으로 계산했다:

$$T_{1/2} \text{ 방출} = T_{1/2} \text{ 약물} * T_{1/2} \text{ 지질} / (T_{1/2} \text{ 지질} - T_{1/2} \text{ 약물})$$

그리고 매우 느린 방출이 입증되었다(반 방출 시간 325-960시간). DL0=250g/mol PhL 및 DL0=330g/mol PhL에 로딩된 리포솜에 대한 AUC 값과 약물 방출 속도는 유사했다. 유리 약물은 혈장에서 매우 빠르게 제거되었다.

[1022] 실시예 61. AKG-28 재결정화

[1023] 활성 AKG-28 약물 물질의 잠재적 불순물 수준을 감소시키기 위한 재결정화 가능성을 평가했다. 로딩-후 완충제 교환 단계 없이 AKG-28의 리포솜 제제에서 잠재적인 불순물 수준을 감소시키기 위해, AKG-28의 일부를 다음 절차에 따라 수성 에탄올로부터 재결정화했다. AKG-28 2g을 WFI-등가 물 10ml에 녹인 후, 양압하에서 0.2 μm PES 필터를 통해 여과했다. 교반하면서, 100% 에탄올(Sigma E7023)을 주위 온도에서 용액에 천천히 첨가했다. 약 8.5ml 후에 결정화가 시작되었다. 에탄올을 약 70부피% 에탄올이 되도록 25ml가 첨가될 때까지 계속해서 첨가했다. 혼합물을 1시간 동안 교반하고 밤새 냉장고에 두었다. 침전물을 부호너 깔대기(Buchner funnel)로 여과하고, 100% 에탄올로 행구고, 공기 중에서 건조시킨 후, 진공 중에서 밤새 건조시켰다. 재결정화된 AKG-28의 수율은 1.742g(96.3%)이었다. 302nm에서 물 내 UV 분광광도법으로 측정된 모액의 약물 손실은 59.0mg(2.95%)이고 에탄올 린스에서는 2.5mg(0.13%)이다. 20 mg/ml로 물에 용해된 재결정화된 약물은 pH 4.53을 생성한 반면, 출발 물질의 용액은 훨씬 더 산성이었다. QuantiChrom 비색 염화물 분석 키트(BioAssay Systems)를 사용하여 재결정화된 배치(AKG-28R) 및 재결정이 없는 분석 참조 배치에서 염화물 함량을 측정했다. 염화물 함량은 무수물 기준으로 약물 1몰당 염화물 1.94당량, 또는 일수화물 기준으로 약물 1몰당 염화물 2.01당량과 일치했다. AKG-28R의 내독소 수준은 0.01-1 EU/ml 카트리지가 있는 Endosafe PTS 시스템(Charles River)을 사용하여 측정된 결과 0.04 EU/mg 미만이었다. 몇 달 후 4~40° C 및 60~75% RH 범위에서 에탄올 재결정화된 AKG-28 이염산염의 저장 안정성 연구에서 일수화물상태(계산된 수분 함량 3.48%)와 일치하는 3.2~3.3%(Karl Fisher 적정 방법 기준)의 일정한 수분 함량이 나타났다.

[1024] 실시예 62. 리포솜 AKG-28(Ls-345-355 로트)의 캡슐화 효율에 대한 NaCl 및 pH 사전 로딩의 영향

[1025] AKG-28R의 로딩 효율에 대한 이온 강도 조정 및 약물 양말 용액 pH의 효과를 연구했다. 42.7 mg/ml의 AKG-28R 수성 스톱 용액 부분을 5.7-7.0 범위의 다양한 pH 종점까지 1 N NaOH로 적정했다. pH>7.0에서 약물 용액의 겔화가 관찰되었다. 재결정화되지 않은 AKG-28의 40mg/ml 스톱 용액도 사용되었다. 로트 L-102(실시예 59)의 압출된 리포솜을 WFI 등가 물(5.8 Vex; 잔류 전도도 415 μS/cm, 인지질 58.4 mM)에 대한 TFF 교환을 사용하여 리포솜 외 황산암모늄으로부터 정제했다. TFF-후 압출된 리포솜의 분취량을 계산된 부피의 약물 스톱, 3M NaCl 및 물과 혼합하여 약 330g/mol PhL의 DL0 비율, 약 12mg/ml의 약물 농도 및 원하는 사전-로딩 농도의 NaCl(이온 강화제)을 달성했다. 혼합물을 20분 동안 교반하면서 65°C 수조에서 배양했다. 그리고 얼음물에 10분간 담가두었다. Ls-348 및 Ls-349 로트(아래 참조)에 3M NaCl을 로딩 후 60mM 농도로 첨가했다. 65° C 배양 전후에 이중-접합 유리 미세 전극을 사용하여 로딩 혼합물 pH를 측정했다. 로딩 혼합물의 분취량을 Sepharose CL-4B 컬럼의 비캡슐화 약물로부터 정제하고, 302 nm에서 UV 분광광도계 분석으로 약물을 분석하고, 인지질의 경우 블루 포스포몰리브데이트 분석으로 분석하고, 캡슐화된 DL 비율을 계산하고 컬럼 전 샘플의 DL 비율로 나누어서 캡슐화 효율을 얻었다. 결과는 표 60에 제시되어 있다.

[1026] 표 60. Ls-AKG28 로트 Ls-345-355에 대한 로딩 조건 및 캡슐화 효율.

표 60

Lot ID	Drug lot	Loading conditions					Encapsulation results	
		drug	NaCl added	pH			Encapsulated DL ratio	EE, %
		mg/ml	mM	Drug stock	Pre-load	Post-load	g/mol P	
Ls-346	AKG-28R	11.3	188	5.29	5.55	6.05	333.1 ± 3.3	97.8
Ls-347	AKG-28R	10.7	357	5.29	5.63	6.26	341.2 ± 6.5	99.5
Ls-348	AKG-28	11.8	0	5.17	5.37	5.74	316.5 ± 3.1	90.7
Ls-349	AKG-28R	11.8	20	5.29	5.44	5.87	323.6 ± 9.3	93.8
Ls-350	AKG-28R	12.0	80	5.29	5.49	5.95	342.6 ± 7.3	98.8
Ls-351	AKG-28R	12.0	80	5.70	5.78	6.44	336.5 ± 4.3	98.2
Ls-352	AKG-28R	12.0	80	6.15	6.21	6.91	348.5 ± 10.7	99.6
Ls-353	AKG-28R	12.0	80	6.51	6.60	7.17	340.9 ± 3.9	98.0
Ls-354	AKG-28R	12.0	80	6.83	7.01	7.42	343.0 ± 7.2	100.6
Ls-355	AKG-28R	12.0	80	6.96	7.6 (unstable)	7.55	332.6 ± 4.8	97.7

[1027]

[1028]

예상과는 달리, 65℃ 배양 단계 전에 NaCl을 첨가함으로써 로딩 혼합물의 이온 강도 증가는 로딩 효율을 감소시키지 않았을 뿐만 아니라, 분명히 증가시켰다. NaCl이 없거나 낮은(0~20mM) 샘플은 90~95%의 캡슐화 효율을 보인 반면, 80mM 이상, 최대 357mM의 NaCl을 넣은 샘플은 95% 이상 EE, 전형적으로 97% 이상을 나타냈고, 그리고 80mM NaCl에서 약물 스톱 용액 pH 5.29~7.01 범위에서는 98% 이상을 나타냈다. 로딩-후 혼합물에서 비캡슐화 잔여 약물을 최소화하는 것은 비캡슐화 약물 제거 단계를 거치지 않는 리포솜 제제의 경우 특히 중요하다. 중요하게도, EE의 손실 없이 최적 안정성인 7.5에 가까운 로딩-후 pH를 달성하기 위해 약물 스톱 pH를 조정할 수 있는 가능성은 저장 중에 제제 pH의 더 나은 안정성을 위해 리포솜 부형제 완충 용량을 보존할 수 있게 해준다. 7.0에 가까운 더 높은 pH 범위에서는 로딩 혼합물이 주변 온도에서 겔화되어 로딩 혼합물의 취급이 덜 편리해졌다.

[1029]

실시예 63. 선택된 LM의 로딩-후 외부 매질 내 암모늄

[1030]

리포솜 AKG-28 제제의 리포솜 외 암모늄 함량에 대한 제제 처리의 영향을 평가했다. 우리는 로딩 단계 동안 생성된 리포솜 외 암모늄 이온의 특정 수준, 가령 로딩 혼합물 내 약물의 그램 당량 농도에 가까운 수준을 유지하는 리포솜 제제가 저장 중 인지질의 분해 감소를 나타냄을 관찰했다. 약물 로딩 단계 동안 캡슐화된 약염기성 약물 분자에 의해 리포솜으로부터 대체된 이러한 수준의 암모늄은 로딩-후 완충제 교환/비캡슐화 약물 제거를 거치지 않는 로딩-후 혼합물에서 생성된다. 대안적으로, 필요한 수준의 암모늄(또는 치환된 암모늄) 염이 로딩-후 완충제 교환/비캡슐화 약물 제거 단계 후에 리포솜에 첨가되거나 교환/부형제 완충제에 포함될 수 있다. 본 명세서의 실시예에 따라 제조된 리포솜 로트의 교환되지 않은 로딩 혼합물 중 리포솜 외 암모니아 수준을 결정하기 위해, 로딩-후 리포솜 로딩 혼합물의 리포솜 외 매질을 미세원심분리기 한외여과 장치(Nanosep Omega 300, Pall Corp)를 사용하여 MWCO 300 KDa(30분, 12000xg)로 리포솜으로부터 분리했다. 정용여과액 중 암모늄 농도는 Amplitude 비색 암모니아/암모늄 정량 키트(AAT Bioquest, USA)를 사용하여 결정했다. 그 결과는 아래 표 61에 나와 있다. 그 결과는 하기 표 13에 있다.

[1031]

표 61. 로딩-후 리포솜의 외부 매질 중 암모니아 농도

표 61

Sample	Loading conditions				Post-load		Ammonium, mM	
	DLO	Drug	Dextrose	TFF exchange	pH adjustment	Chelator	found	estimated
	g/mol P	mg/ml	mg/ml	(buffer)	(buffer)	(0.5 mM)		
Blank							< 0.5	0
Ls-323	250	6.0	45	HBS-20-7.5	no	none	< 0.5	0
Ls-323	250	6.0	45	none	pH 6.07	none	21.3 ± 1.2	~22
Ls-324	320	6.0	45	HBS-20-7.5	no	none	< 0.5	0
Ls-324	320	6.0	45	none	pH 5.93	none	19.4 ± 0.3	~22
Ls-326	320	12.8	0	none	pH 6.49	none	55.5 ± 0.6	~50
Ls-326	320	12.8	0	none	pH 7.16 (Hepes 20 mM)	none	48.4 ± 0.3	~50
Ls-338	259	6.0	45	HBS-20-7.5	no	DFO	< 0.5	0
Ls-339	345	6.0	45	HBS-20-7.5	no	DFO	< 0.5	0
Ls-340H	345	12.0	0	HBS-20-7.5	no	DFO	< 0.5	0
Ls-340LMH	345	12.0	0	none	pH 7.5 (Hepes 20 mM)	DFO	34.1 ± 1.0	~38

[1032]

- [1033] 리포솜 로딩 혼합물 중 암모늄 농도의 추정치는 다음과 같이 이루어졌다:
- [1034] $[NH_4^+] = C_{\text{약물}} / 499.4 * 2 \text{ eq/mol} * EE * DF$, 여기서
- [1035] $C_{\text{약물}}$ - 65° C 배양 단계 중 로딩 혼합물의 약물 농도
- [1036] 499.4 - AKG-28 분자량 (2염산)
- [1037] 2 eq/mol - 약물 양이온의 원자가
- [1038] EE - 캡슐화 효율 (100% =1.0)
- [1039] DF - 로딩-후 처리에 의해 도입된 희석 인자
- [1040] 로딩-후 완충제 교환 단계가 없는 제제의 리포솜 외 매질 내 암모늄의 농도는 현저했고, 약물 로딩 중 리포솜 내로 유입되는 약물의 이온화 분자에 대한 리포솜 내 암모늄 이온의 동등한 막횡단 교환을 통해 생성된 리포솜 외 암모늄의 추정치와 일치했다. 로딩-후 완충제 교환 처리 제제에서 암모늄 농도는 0.5 mM(완충제 교환 전 암모늄 수준의 1-2.5%) 미만이었다.
- [1041] 실시예 64. 가속 안정성 연구에서 리포솜 크기에 대한 저장 효과.
- [1042] 시간 경과에 따른 리포솜 크기에 대한 저장의 영향을 평가했다. z-평균 직경(X_z , nm) 및 다분산 지수(PDI)로 표현된 리포솜 크기는 후방 산란 모드인 Malvern Zetasizer Pro에서 누적 방법을 사용하여 동적 광 산란에 의해 실시예 51, 54, 57, 58 및 59의 저장된 리포솜 샘플에서 결정되었다. 2~4 μ L의 리포솜 분취량을 1~1.2mL의 HBS-7(0.2 μ m 여과)과 혼합하고 적절한 굴절률 및 점도 매개변수를 사용하여 25° C에서 자동 모드로 측정을 수행했다. 또한, 실시예 59의 배양 전 샘플 11개 세트를 2회 측정하고, 첫 번째 측정 결과와 두 번째 측정 결과 간의 차이를 측정의 변동성을 나타내는 지표로 사용했다. X_z 데이터는 해당 배양 전 샘플에 대한 백분율 변화로 표시되었다. 놀랍게도, 상기 실시예의 모든 리포솜은 입자 크기와 관련하여 안정적이었으며, X_z 의 변화는 본질적으로 측정의 편차 내에 있었다(표 62). 3개월 37° C 저장에 걸쳐 최대 변화 4.91% 및 4.31%가 Ls-312-1(실시예 56) 로트와 Ls-321(실시예 57) 로트에서 각각 관찰되었다. 초기 PDI 0.0578이 37° C 배양 1개월에 걸쳐 0.1107로 증가한 Ls-302(실시예 51)를 제외하고 모든 샘플의 PDI는 0.1 미만으로 유지되었으며, 이는 리포솜의 일부 응집에 대한 증거를 제공한다.
- [1043] 표 62. 가속(37° C) 안정성 연구에서 리포솜 샘플의 입자 크기의 상대적 변화

표 62

로트 ID	실시예	샘플 수	안정성 시점	Xz 변화, %		
				최대	평균	SD
Ls-...						
2-5	51	12	1 개월	1.66	0.31	0.82
2-5	54, 55	14	2 주	2.66	0.23	1.44
2-5	56, 57	28	3 개월	4.91	2.06	1.30
2-5	58	12	10 주	2.77	-0.27	1.64
2-5	159	16	1 개월	2.13	0.25	1.20
방법 편차		11	n/a	3.37	1.36	1.51

SD - 표준 편차

- [1044]
- [1045] 실시예 65. Ls-AKG28 및 Ls-AKG38 리포솜의 콜레스테롤 안정성에 대한 저장 완충제 pH의 영향.
- [1046] 리포솜 AKG-28 및 리포솜 AKG-38 모두에 대한 저장 동안 콜레스테롤 산화에 대한 저장 완충제 pH의 영향을 평가했다. 리포솜 Ls-AKG28(로트 Ls-281)은 실시예 26에 설명된 대로 제조했다. 1471mg의 약물 규모(유리 염기로서)의 리포솜 Ls-AKG38(로트 Ls-280)은 본질적으로 동일한 절차(실시예 26)를 사용하여 제조했다. 단 AKG-38 스투크 용액을 실시예 25에서와 같이 제조하고 44.5mg/mL 텍스트로스, 10mM NaCl 및 약물 8 mg/mL 존재 하에 DLO 450g/mol PhL에서 압출된 TFF-후 리포솜과 조합했다. 0.1M NaCl로 조정된 65° C 배양-후 로딩 혼합물의 pH는 6.77이었다. HBS-7에 대한 농축 및 TFF 완충제 교환 후, Ls-280 리포솜은 18.04 ± 0.15 mg/mL AKG-38, DL 비

을 426.3 ± 5.2 g/mol PhL, λ_z 117.0 nm 및 PDI 0.0250을 가졌다. Ls-280 및 Ls-281 로트의 65° C 배양, 얼음물 급냉 및 NaCl 조정 단계 후의 리포솜 로딩 혼합물의 일부를 10mM L-히스티딘-HCl, 144mM NaCl 완충제, pH 6.5(His-6.5). 각각의 완충제 교환을 사용하여 로트의 HBS-7 부분과 His-6.5 부분을 다시 부분으로 나누고 각 부분의 pH를 NaOH 또는 HCl을 사용하여 사전 농축과 함께 TFF 완충제 교환으로 처리했다. 각각의 완충제 교환 로트의 HBS-7 부분과 His-6.5 부분을 다시 부분들로 나누고 각 부분의 pH를 NaOH 또는 HCl을 사용하여 다음 표에 따라 적절하게 조정했다.

표 63

로트 ID	TFF 교환 완충제	다음으로 pH 조정됨
Ls-280-1; Ls-281-1	His-6.5	6.0 (HCl 로 조정됨)
Ls-280-2; Ls-281-2	His-6.5	6.5 (조정 없음)
Ls-280-3; Ls-281-3	HBS-7	7.0 (조정 없음)
Ls-280-4; Ls-281-4	HBS-7	7.5 (NaOH 로 조정됨)

[1047]

[1048]

리포솜을 0.2- μ m 필터 멸균하고, 약물 농도를 UV 분광광도법으로 측정하고 동일한 조성 및 pH(pH 조정 샘플의 경우 유사하게 pH 조정된 교환 완충제가 사용됨)의 멸균 교환 완충제를 사용하여 10.0mg/ml로 조정했다. 농도 조정된 리포솜을 멸균 둥근 마개(Gerresheimer)가 있는 멸균 유리 병규산 바이알에 무균으로 분취하고 주변 온도(20-25° C)에서 배양했다. 배양 1, 2, 4, 8 및 12주에 리포솜을 HPLC로 지질 완전성에 대해 분석했다(실시예 50). 리포솜은 지질 불안정성의 특이한 특징, 즉 눈에 띄는 콜레스테롤 분해를 보여주었다(도 19A, 도 19B). 12주 기간 후, AKG-38 리포솜 제제에서 온전한 콜레스테롤 함량은 배양 전 값의 약 50-60%로 감소했으며, AKG-28 리포솜 제제에서는 이 효과가 훨씬 더 뚜렷해 35%-45% 콜레스테롤이 그대로 남아 있다. 체류 시간이 약 1.77분인 새로운 피크가 검출되었으며, 이는 손상되지 않은 콜레스테롤 피크의 감소와 함께 증가했다. 이 성분은 7-하이드록시콜레스테롤(RT 1.81분)로 추가로 확인되었다. 콜레스테롤 분해는 리포솜 저장 완충제 pH에 따라 달라졌다: pH 6.0-6.5에서 콜레스테롤 분해 시작이 가장 빨랐으며, 연구된 pH 값 범위에서 가장 높은 pH 7.5에서 분해 시작이 가장 느린 것으로 관찰되었다. 리포솜 분야의 관례는 최대 지질 안정성이 약 pH 6.5를 필요로 한다는 것인 반면, Ls-AKG28 및 Ls-AKG38의 경우 pH 6.0-6.5에서 지질 안정성이 가장 낮았고 pH>7.0(예: pH 7.5)에서 더 나은 안정성이 관찰되었다. **실시예 66. AKG-38의 재결정화.**

[1049]

본 실시예에서는 바람직하지 않은 불순물을 제거하기 위한 AKG-38의 재결정화 방법을 설명한다. (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온(AKG-38 유리 염기) 1.00g을 80° C 수조 위의 밀폐된 유리 바이알에서 교반하면서 100% 에탄올(Sigma E7023) 12.5ml에 용해시켰다. 뜨거운 용액을 0.1g의 Celite 545와 함께 20분 동안 교반하고 여과했다. 여액을 실온으로 식힌 후 얼음욕조에 넣어 냉장고에 1시간 동안 저장했다. 결정성 침전물을 부흐너 깔대기(Buchner funnel)로 여과하고, 냉각된 100% 에탄올 2ml로 행구고, 공기 중에서 건조시킨 후 진공 건조시켰다. 재결정화된 AKG-38의 수율은 0.75g(75%)이었다.

[1050]

실시예 67. 킬레이트제 존재 하의 AKG-38 리포솜의 저장 안정성.

[1051]

본 실시예는 AKG-38 리포솜의 저장 안정성에 대한 다양한 농도의 킬레이트제 데페록사민의 효과를 설명한다.

[1052]

리포솜 제조. (로트 ID Ls-371) HSPC (Lipoid AG) 18.89 g (10.00 mmol), 콜레스테롤 (Dishman, High 순도) 11.34 g (12.22 mmol), 및 PEG-DSPE (Lipoid AG) 3.37 g (0.50 mmol) (HSPC/Cholesterol/PEGDSPE 45:55:2.25 몰비)를 무수 에탄올(Sigma, E-7023) 15ml와 조합하고 모든 지질이 용해될 때까지 69-70° C 욕조에서 교반하면서 가열했다. 별도의 용기에 373 g (175 ml)의 0.5M 수성 황산암모늄(0.2미크론 여과)을 70° C 조에서 예열하고 교반하면서 뜨거운 지질 에탄올 용액에 부었다. 얻어진 현탁액을 70° C 조에서 35분 동안 교반하고 순환 70° C 물로 가열된, 37mm 폴리에스테르 배수 디스크가 삽입된 Lipex 100-ml 열배럴 리포솜 압출기(Northern Lipids, Inc.)을 사용하여 두 개의 47mm 100nm 기공 크기와 하나의 200nm 기공 크기 폴리카보네이트 트랙-에칭된 막(Whatman Nucleopore)의 스택을 통해 400-420psi에서 5번 (통과당 4개의 압출기 충전) 통과시켰다. 리포솜은 DLS에 따르면 λ_z 118.5 nm, PDI 0.0214를 가졌다. 리포솜은 냉장고(2-8° C)에서 하룻밤 동안 저장하고 양압 하에서 0.2- μ m 폴리에테르설폰(PES) 필터를 통해 여과했다. 여과된 리포솜 인지질 농도는 56.76 ± 0.67 mM이

었다. 정용여과액의 잔류 전도도가 446 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (4.6 부피 교환)으로 떨어질 때까지 MW 컷오프 500KDa(Spectrum Laboratories)를 갖춘 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 KrosFlo TFF 시스템에서 WFI 품질의 내독소가 없는 물에 대한 TFF 완충제 교환을 통해 리포솜 외 포획제(황산암모늄)를 제거했다. 잔류물의 잔류 전도도는 355 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 이었고, 인지질 농도(블루 포스포몰리브데이트 방법)는 $58.04 \pm 5.08 \text{ mM}$ 이었다.

[1053] 에탄올(8.12g, 17.34mmol))로부터 재결정화된 AKG-38을 0.9당량의 1N HCl(15.6ml)과 혼합하고 WFI 품질 물로 보충하여 39.9mg/ml 수성 스톱 용액, pH 5.61을 얻었다. 주변 온도(21° C)에서 여과전 용액의 비중 측정 결과 밀도 값은 1.010이었다. 용액을 0.2- μm 필터에 통과시키고, 여과액 202.7g(200.7ml)을 WFI 품질 물 56.1g, 3M NaCl 스톱 용액 13.35ml 및 TFF-후 리포솜 현탁액 229.9g과 혼합하여 16 mg/ml AKG-38, DL0 비율 600 g/mol PhL 및 80 mM NaCl, pH 5.75를 갖는 로딩 혼합물을 형성했다. 혼합물을 251.6g씩 두 개의 동일한 부분으로 나누고, 벽이 얇은 유리 300ml 삼각 플라스크에 있는 각 부분을 온도가 64.5° C에 도달할 때까지(2.5분) 85° C 욕조에서 교반하면서 예열했다. 플라스크를 65° C 욕조로 옮기고, 20분 동안 교반하면서 배양하고, 얼음물 욕조에서 10분 동안 교반하면서 냉각하고(<10° C에 도달하는 냉각 시간은 5분임) 주위 조건으로 옮겼다. 로딩-후 pH 6.63(부분 1), pH 6.61(부분 2). 각 부분을 분자량 컷오프 500KD의 폴리설폰 중공 섬유 카트리지를 사용하여 TFF로 정제했다. 리포솜을 약 22 mg/ml의 AKG-38로 정용여과에 의해 사전 농축하고 총 8.0 부피 교환 동안 144 mM NaCl, 2 mM Hepes pH 7.50 완충제(HBS-2-7.5)으로의 TFF 교환에 의해 임의의 리포솜 외 약물로부터 정제했다. 투과액을 수집하고 무게를 측정했다; 투과액(로딩 혼합물에서 제거된 비캡슐화 약물)의 AKG-38 농도는 NanoDrop 2000 마이크로분광광도계(1mm 경로)를 사용하여 400 nm 배경 보정으로 약물 스펙트럼 최대값 298 nm에서 직접 UV 분광광도법으로 투과물(비캡슐화 잔류 약물)의 마지막 몇 ml에서 결정되었다. 투과액 내 비캡슐화 약물의 양을 TFF 정제 단계에 투입된 로딩 혼합물 내 총 약물로 나누어 추정된 캡슐화 효율은 부분 1의 경우 97.2%, 부분 2의 경우 97.1%였다. 8회 용적 교환 후 투과액 내 약물 양으로 추정한 비캡슐화 잔여 약물은 약 0.006mg/ml(~0.04%)였다. DLS에 의한 리포솜 평균 크기 X_z 는 부분 1에서 $118.2 \pm 2.3 \text{ nm}$, 부분 2에서 $118.7 \pm 2.6 \text{ nm}$ 였다($N=3$). 각 부분에, 계산된 양의 1M HEPES-Na 완충제 pH 7.63(144mM NaCl에서 20mM로 희석된 경우 pH 7.50)을 첨가하여 HEPES 농도를 18mM씩 증가시켜 최종 20mM HEPES에 도달했다. 두 부분의 캡슐화 효율, 로딩-후 pH 및 입자 크기가 실질적으로 동일했기 때문에 부분을 합쳐서 약물 농도가 $21.75 \pm 0.08 \text{ mg/ml}$ 인 리포솜 361.8개를 얻었다(70% IPA-0.1N HCl에서 UV 분광학에 의한). 계산된 양의 20mM HEPES, 144mM NaCl, pH 7.50(HBS-20-7.5) 완충제를 첨가하여 약물 농도를 20.2mg/ml로 만들었다. 결합된 리포솜의 12ml 분취량을 저장 안정성 연구를 위해 따로 저장했다. 나머지는 100mM 데페록사민 메실레이트 pH 6.0(DFO)(Excella USP 등급)의 스톱 용액을 최종 0.5mM DFO에 첨가했다. 결합된 정제된 리포솜을 무균적으로 0.2- μm PES 고유량 멸균 필터에 통과시키고 DLS로 입자 크기를 분석하고 분광광도계로 약물 및 인지질 농도를 분석했다. 멸균 완전 부형제 완충제(20mM HEPES, 144mM NaCl, 0.5mM DFO, pH 7.50)를 사용하여 효능을 최종적으로 20.0mg/ml의 AKG-38로 조정했다. 리포솜은 다음과 같은 특징을 가지고 있었다: 인지질 $34.08 \pm 0.55 \text{ mM}$; AKG-38(UV) $19.99 \pm 0.08 \text{ mg/ml}$, DL 비율 $586.6 \pm 3.9 \text{ g/mol}$ 인지질, pH 7.49, 삼투압농도(Wescor Vapro 노점 삼투압계) $300.3 \pm 6.4 \text{ mOs}$, X_z $117.6 \pm 0.9 \text{ nm}$, PDI 0.0130.

[1054] 안정성 분취액(12ml)을 3개 부분으로 나누어 HBS-20-7.5 완충제를 사용하여 20mg/ml AKG-38, 및 100mM DFO 스톱 용액을 사용하여 DFO 없음, 0.1mM DFO 또는 0.5mM DFO로 조정했다. 각 부분을 필터 멸균하고 회색 부틸 마개가 있는 멸균 2ml 유리 바이알 2개에 무균적으로 분배했다. 남은 양은 "0시간" 배양 시점으로 유지되었다. 바이알을 37° C에서 배양하고, 0.25ml 분석 샘플을 바이알 1과 바이알 2를 번갈아 가며 3개월 동안 한 달에 두 번 무균적으로 채취했다(0.1mM DFO 변종은 한 달에 한 번 샘플링했다). 샘플을 pH 및 지질(콜레스테롤 및 HSPC) 분해에 대해 분석했다.

[1055] 결과는 도 21, 도 22 및 도 23에 제시되어 있다. 차트 범례의 숫자 0, 0.1, 0.5는 샘플 내 DFO 농도(mM)를 나타낸다. DFO가 없는 변종과 0.5mM DFO 변종 모두에 대해 바이알 1과 바이알 2를 번갈아 가며 한 달에 두 번 저장 바이알에서 분석 분취량을 빼냈다. 결과는 각 바이알에 대해 별도로 표시된다.

[1056] 가속 분해 연구는 37° C에서 수행되었다. 37C와 4C(냉장 저장) 사이의 Arrhenius 인자를 9로 인정하면 마지막 시점(15.6주)은 2.7년의 냉장 저장에 해당한다.

[1057] 0.1mM 및 0.5mM DFO에서 샘플의 콜레스테롤 분해는 검출할 수 없었다. DFO가 없는 경우, 2~4주의 지연 기간 후에 두 샘플 모두에서 상당한 콜레스테롤 저하가 관찰되었다. 이는 AKG-38의 리포솜 제제에서 DFO의 안정화 역할이 0.1mM 및 0.5mM DFO 농도 모두에서 확인되었다.

[1058] PC 분해 생성물(리소-PC 및 스테아르산)은 선형 방식으로 모든 샘플에 점차적으로 축적되었다. .Excel LINEST

기능을 사용하여 결합된(바이알 1 및 바이알 2) HSPC 분해 데이터의 선형 근사치는 HSPC 분해 속도가 DFO의 존재에 단지 약간만 의존함을 나타낸다(표 64). 냉장(4° C) 저장 시 예상되는 PC 분해율은 약 0.24%/월이었다.

표 64

DFO, mM	37° C에서 PC 분해생성물 축적률, %/주, 평균 ± SE	4° C에서의 예상 속도, %/개월	R ₂
0	0.415 ± 0.051	0.20	0.918
0.1	0.444 ± 0.076	0.21	0.944
0.5	0.501 ± 0.046	0.24	0.950

[1059]

[1060]

모든 샘플에서 pH의 점진적인 감소가 관찰되었다(도 23). pH의 가장 두드러진 하락은 DFO가 없는 샘플에서 나타났다. 0.5 mM DFO 및 37° C에서 pH는 주당 0.013 ± 0.0022 단위($R^2=0.853$)의 비율로 떨어졌고, 4° C에서 월 0.00625 단위의 추정치가 발생했다.

[1061]

실시예 68. 리포솜 제제 중 AKG-38 화합물의 저장 안정성.

[1062]

본 실시예는 가속 분해 조건(37°C) 하에 테페록사민의 존재 하에 저장하는 동안 리포솜 제제에 캡슐화된 AKG-38 화합물의 화학적 안정성을 설명한다. 1.7 g AKG-38 규모의 리포솜(로트 ID Ls-378)을 실시예 67의 절차에 따라 제조하되, 지질은 형광 지질 라벨 DiIC18(3)-DS를 HSPC에 대해 0.05 mol%의 양으로 추가로 포함했다. 로딩 혼합물은 로딩 전 pH 5.89, 로딩-후 pH 6.74를 나타냈다. 약물은 $96.4 \pm 1.6\%$ 의 캡슐화 효율로 리포솜에 캡슐화되었다. 최종 제제는 0.5 mM 테페록사민을 함유하고 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-38 19.9 ± 0.15 mg/ml; 인지질 35.76 ± 0.52 mM; DL 비율 556.6 ± 9.1 g/mol PhL; 입자 크기(3회 평균) X_z 117.8 ± 0.7 nm, PDI 0.0275; pH 7.50. 필터 멸균된 리포솜을 회색 부틸 고무 마개가 있는 멸균 유리 바이알에 3중으로 무균적으로 분배하고 37° C에서 저장했다. 분석 샘플을 주어진 간격으로 무균적으로 채취하여 pH, 입자 크기(X_z , PDI; 3개의 병렬 기기 실행), 지질(콜레스테롤 및 HSPC) 분해에 대해 분석했다. 37° C 저장 기간 6주 및 3개월의 샘플을 305nm(AKG-38 UV 흡광도 최대)에서 UV 검출을 사용하여 HPLC로 약물 및 불순물 피크에 대해 분석했다. 결과는 표 65에 나와 있다(N - 병렬 기기 실행 횟수). HSPC 분해 산물의 양은 HPLC의 온전한 HSPC 지질 피크 면적에 대한 %로 표시된다. 콜레스테롤 분해산물은 어떤 저장 시점에서도 검출되지 않았다. AKG-38 순도는 검출된 모든 피크에 대한 주요 HPLC 피크(온전한 AKG-38)의 면적%로 표현되었다. AKG-38 농도는 온전한 약물의 농도를 의미한다. 37° C에서 3개월 동안 AKG-38 순도는 약 98.99%에서 약 98.07%로 0.92% 감소했으며 전체 온전한 약물 농도는 약 19.9mg/ml에서 약 19.1mg/ml(4.2% 감소)로 약간의 변화만 있었다. 이들 데이터는 37°C에서 3개월의 저장 기간 동안 Ls-378 리포솜 제제 중 AKG-38이 화학적으로 안정했음을 나타낸다. 37° C에서 3개월 저장 속도는 증가율이 10° C마다 2배씩 증가한다고 가정할 때 Arrhenius 법칙에 따라 냉장(4° C) 저장하면 약 27개월에 해당한다.

[1063]

표 65. 37°C에서 AKG-38 리포솜 로트 Ls-378의 저장. N - 병렬 기기 실행 횟수.

표 65

37° C에서 저장 시간	0	6 주	3 개월
pH	7.50	7.27 ± 0.06	7.19 ± 0.02
콜레스테롤 분해 생성물, %	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HSPC 분해 생성물, %	검출되지 않음	2.74 ± 0.52	11.29 ± 0.35
AKG-38 순도, %	98.99	98.50	98.07
AKG-38 농도, mg/mL	19.9 ± 0.2	19.7 ± 0.62	19.06 ± 118
Z-평균 입자 크기, nm (N=3)	117.8 ± 0.7	120.6 ± 1.4	119.0 ± 1.4
PDI	0.0275	0.0258	0.0185

[1064]

[1065] 실시예 69. 리포솜 제제 중 AKG-28 화합물의 저장 안정성.

[1066] 본 실시예는 가속 분해 조건(37℃) 하에 테페록사민의 존재 하에 저장하는 동안 리포솜 제제에 캡슐화된 AKG-28 화합물의 화학적 안정성을 설명한다. 리포솜(로트 ID Ls-376)은 기본적으로 실시예 67 및 68에 설명된 대로 220mg 규모로 제조했다. AKG-28(에탄올 재결정화)은 pH 조정 없이 물에 용해된 40mg/ml 스톱 용액으로 제조했다. 약물 로딩을 로딩 혼합물 내 340g/mol PhL(AKG-28 순수 무수 유리 염기(FB) 기준으로 280g/mol PhL) DL 비율 및 12mg/mL의 약물 농도로 수행했다. 로딩 혼합물은 로딩 전 pH 6.11, 로딩-후 pH 6.78을 나타냈다. 약물은 98.6 ± 1.9%의 캡슐화 효율로 리포솜에 캡슐화되었다. 최종 제제는 0.5 mM 테페록사민을 함유하고 다음과 같은 특성을 가졌다: AKG-28 8.70 ± 0.07 mg/ml (FB 기준); 인지질 31.5 ± 0.5 mM; DL 비율 (FB) 276.2 ± 5.1 g/mol PhL; 입자 크기 (3회 평균) Xz 118.7 ± 0.8 nm, PDI 0.016; pH 7.52. 37℃에서의 저장 안정성 연구를 실시예 68에 설명된 대로 수행했다(254 nm에서 약물에 대한 HPLC 검출 사용). 결과를 표 5에 나타내었다.

[1067] 표 66. 37℃에서 AKG-28 리포솜 로트 Ls-376의 저장. N - 병렬 기기 실행 횟수.

표 66

37° C에서 저장 시간	0	6 주	3 개월
pH	7.52	7.40 ± 0.03	7.36 ± 0.03
콜레스테롤 분해 생성물, %	검출되지 않음	검출되지 않음	검출되지 않음
HSPC 분해 생성물, %	검출되지 않음	2.95 ± 0.24	6.58 ± 0.13
AKG-28 순도, %	99.12	99.00	98.82
AKG-28 농도, mg/mL (FB)	8.69 ± 0.0	9.12 ± 0.72	8.47 ± 118
Z-평균 입자 크기, nm (N=3)	118.7 ± 0.8	118.2 ± 1.7	118.3 ± 0.6
PDI	0.0162	0.0279	0.0345

[1068]

[1069]

37°C에서 3개월 동안 AKG-28 순도는 약 99.1%에서 약 98.8%로 0.3% 포인트 감소했으며, 전체적인 온전한 약물 농도는 약 8.7mg/ml에서 약 8.5mg/ml(2.3% 감소로 약간의 변화만 있어서 분석 불확실성에 가깝다. 이들 데이터는 37°C에서 3개월의 저장 기간 동안 Ls-376 리포솜 제제 중 AKG-28이 화학적으로 안정했음을 나타낸다.

[1070]

실시예 70. 마우스에서 AKG-28 및 AKG-38 리포솜의 혈액 약동학에 대한 저장 효과.

[1071]

37°C에서 3개월 저장 전후의 AKG-28 리포솜(로트 Ls-376, 실시예 69) 및 AKG-38 리포솜(로트 Ls-378, 실시예 68)의 약물의 혈액 약동학을 CD-1 마우스에서 실시예 39 및 60에 기술된 바와 같이 연구했다. 결과(표 67)는 약물 AUC 및 반감기가 약간 증가하고 약물 청소율 및 분포 부피가 약간 감소함을 나타내며, 이는 장기 순환 특성 및/또는 생체내 약물이 리포솜의 보유 특성이 저장 중에 손상되지 않았음을 나타낸다.

[1072]

표 67. 마우스에서 AKG-28 및 AKG-38 리포솜의 약동학적 특성에 대한 저장의 효과.

표 67

로트 ID	Ls-378			Ls-376		
캡슐화 약물	AKG-38			AKG-28		
저장 시간, 개월	0	3	변화, %	0	3	변화, %
주사 용량 (mg/kg)	90	90		50	50	
AUC _{0-last} (obs 면적) µg-hr/mL	30097	34814	15.7	20611	22417	8.8
AUC _{inf} (expo) µg-hr/mL	28316	34887	23.2	20830	23319	11.9
AUC/용량	314.6	387.6	23.2	412.2	448.3	8.8
Vd (면적) mL/kg	41.71	39.29	-5.8	38.12	38.08	-0.1
CL (면적) mL/hr/kg	2.89	2.46	-14.9	2.29	2.07	-9.6
T _{1/2} (Vd 및 CL로부터), hr	9.99	11.08	10.9	11.52	12.75	10.7

[1073]

[1074]

실시예 71. 테페록사민의 다양한 농도에서의 AKG-28 리포솜의 저장.

- [1075] 리포솜 AKG-28 제제의 저장 안정성에 대한 다양한 농도의 데페록사민(DFO) 및 로딩-후 리포솜 가공 조건의 영향을 평가했다. HSPC, 콜레스테롤(Chol), PEG-DSPE 및 DiIc18(3)-DS(45:55:2.25:0.0225 몰비)(압출 로트 L-105, Xz 119.2 nm, PdI 0.0391)의 압출된 리포솜을 본질적으로 실시예 30에 설명되어 있는 바와 같이, 11 mmol HSPC 규모로 제조하되, PCTE 막 스택을 통한 통과 횟수가 350 psi의 작동 압력에서 7번이었다. 압출된 리포솜을 밤새 2~8° C에서 유지하고 0.2 μm 주사기 필터를 통과시켰다. 리포솜 외 황산암모늄을 TFF에 의해 잔류 전도도가 428 μS/cm (5.9 부피 교환)가 될 때까지 물에서 제거했다. TFF-후 압출 리포솜(63.6 mM)의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법으로 결정했다. 이들 리포솜의 분취량을 AKG-28(에탄올로부터 재결정화됨; 11mg/ml, 40mg/ml 스톱 용액으로 첨가됨)과 약물 1.1g 규모로 80m NaCl 존재 하에 DL0 비율 340g/mol PhL(무수 유리 염기(FB) 기준으로 280g/mol PhL)로 혼합하고, 65° C 수조에서 20분간 교반한 후 얼음물에서 10분간 냉각시켰다. 로딩 혼합물은 배양 전(로딩 전) pH 6.11, 배양-후(로딩-후) pH 6.83을 나타냈다. 리포솜을 완충되지 않은 0.85% NaCl(로트 Ls-357S) 또는 HBS-20-7.5 완충제(로트 Ls-357H)를 사용하여, 폴리술폰 중공 섬유 카트리지(MWCO 500 KDa)(9.9 Vex)에서 TFF에 의해 TFF 완충제 교환/비캡슐화 약물 제거로 처리했다. 리포솜 잔류물을 완충제 공급물 없이 동일한 카트리지에서 정용여과에 의해 농축했다. TFF 정제 후, 로트 Ls-357S의 리포솜을 1M HEPES-Na 완충제 스톱, pH 7.63을 첨가하여 20mM의 HEPES-Na 완충제 pH 7.5로 조정했다. TFF로 정제된 농축 리포솜을 HBS-20-7.5 완충제를 사용하여 이염산염 일수화물(무수 유리 염기로서 8.5mg/ml)인 AKG-28의 약물 농도 10.4mg/ml로 조정하고 0.2 μm PES 주사기 필터를 통과시켜 멸균했다. TFF-후 부분 내 약물 및 인지질 분석에서 결정된 캡슐화된 약물의 DL 비율은 Ls-357H의 경우 344.3 ± 3.6 g/mol PhL이었고 Ls-357S의 경우 336.2 ± 3.9 g/mol PhL이었다(실질적으로 정량적 로딩). 각 로트를 추가로 3개 부분으로 나누고, 데페록사민 메실레이트(DFO)의 100mM 멸균 용액을 0.1mM 또는 0.5mM로 첨가했고; 첫 번째 부분에서는 데페록사민을 첨가하지 않았다.
- [1076] 리포솜을 멸균 유리 바이알에 무균적으로 분배하고 실시예 68에 설명된 대로 37°C 저장 안정성 연구를 진행했으며, 분취량을 동일한 간격으로 한 달에 2회 채취했다. 리포솜의 pH 및 지질 분해에 대해 분석했다(표 68).
- [1077] 표 68. 다양한 농도의 DFO 존재 하에 AKG-28 리포솜의 안정성.

표 68

저장 시간	Ls-357H			Ls-357S		
개월	DFO 없음	0.1 mM DFO	0.5 mM DFO	DFO 없음	0.1 mM DFO	0.5 mM DFO
콜레스테롤 분해 생성물, 온전한 콜레스테롤 피크 면적의 %						
0.5	0	0	0	0 ± 0	0	0
1.0	0	0	0	0 ± 0	0	0
1.5	0	0	0	0 ± 0	0	0
2.0	0	0	0	0 ± 0	0	0
2.5	0.47 ± 0.54	0	0	0 ± 0	0	0
3.0	20.7 ± 4.33	0	0	0.9 ± 1.27	0	0
3.5	27.9 ± 3.37	0	0	14.7 ± 1.95	0	0
4.0	64.1 ± 3.68	0	0	34.7 ± 4.43	0	0
HSPC 분해 생성물, 온전한 HSPC 피크 면적의 %						
0.5	2.48 ± 0.11	2.25 ± 0.21	2.05 ± 0.06	0.94 ± 0.00	0.97 ± 0.10	0.85 ± 0.11
1.0	4.52 ± 0.24	4.25 ± 0.13	3.38 ± 0.13	1.80 ± 0.02	1.77 ± 0.12	1.72 ± 0.09
1.5	6.72 ± 0.19	6.13 ± 0.10	4.66 ± 0.09	2.51 ± 0.07	2.60 ± 0.08	2.35 ± 0.14
2.0	7.24 ± 0.42	6.06 ± 0.54	4.70 ± 0.29	2.26 ± 0.38	2.40 ± 0.20	2.33 ± 0.32
2.5	11.3 ± 0.27	9.27 ± 0.51	6.22 ± 0.32	3.25 ± 0.36	3.28 ± 0.24	3.01 ± 0.30
3.0	11.6 ± 0.56	11.1 ± 1.37	7.23 ± 0.21	3.72 ± 0.46	3.53 ± 0.21	3.78 ± 0.18
3.5	12.6 ± 0.49	12.7 ± 0.75	8.01 ± 0.44	4.43 ± 0.05	4.70 ± 0.11	4.53 ± 0.63
4.0	12.6 ± 2.53	15.5 ± 0.97	12.2 ± 1.40	5.35 ± 0.10	7.43 ± 0.18	7.56 ± 0.27
pH						
0.5	7.40 ± 0.01	7.40 ± 0.00	7.41 ± 0.00	7.53 ± 0.00	7.52 ± 0.00	7.52 ± 0.01
1.0	7.37 ± 0.00	7.37 ± 0.00	7.38 ± 0.02	7.51 ± 0.00	7.53 ± 0.00	7.50 ± 0.02
1.5	7.33 ± 0.00	7.35 ± 0.00	7.38 ± 0.00	7.51 ± 0.00	7.52 ± 0.00	7.51 ± 0.00

[1078]

	0.00	0.00	0.02	0.04	0.01	0.00
2.0	7.32 ± 0.01	7.33 ± 0.01	7.37 ± 0.00	7.52 ± 0.00	7.52 ± 0.00	7.49 ± 0.03
2.5	7.30 ± 0.01	7.31 ± 0.00	7.33 ± 0.02	7.49 ± 0.02	7.51 ± 0.01	7.50 ± 0.00
3.0	7.18 ± 0.02	7.25 ± 0.01	7.21 ± 0.09	7.45 ± 0.02	7.44 ± 0.00	7.41 ± 0.01
3.5	7.11 ± 0.03	7.26 ± 0.02	7.27 ± 0.03	7.43 ± 0.00	7.46 ± 0.02	7.43 ± 0.00
4.0	6.18 ± 0.07	7.25 ± 0.00	7.27 ± 0.01	7.34 ± 0.03	7.48 ± 0.01	7.44 ± 0.00

[1079]

[1080]

0.1mM 및 0.5mM의 DFO 첨가는 전체 관찰 기간(4개월) 동안 AKG-28 리포솜의 콜레스테롤 분해에 대해 동일하게 보호적이었는데, 4개월은 아레니우스 법칙에 따라 섭씨 10도당 2배로 가정할 때, 이는 대략 36개월(3년)의 냉장 (4° C) 저장에 해당한다. 킬레이트제(DFO)가 없는 샘플에서는 콜레스테롤 분해가 관찰되었다. 완충되지 않은 생리 식염수(0.85% NaCl)로의 로딩-후 교환으로 얻은 Ls-537S 샘플의 HSPC 분해는 HEPES를 사용하여 pH 7.5에서 완충된 식염수로의 로딩-후 교환으로 얻은 샘플보다 약 2배 느렸다.

[1081] 실시예 68의 방법(약물에 대해 254nm HPLC UV 검출 사용)을 사용하여 0.5mM DFO를 함유한 샘플에서 약물 화학적 분해를 연구하여 다음 결과를 얻었다(표 69):

[1082] 표 69. 37°C에서 AKG-28 리포솜을 저장하는 동안의 AKG-28의 화학적 순도(HPLC에 의한 온전한 약물의 %)

표 69

저장 시간, 개월	Ls-357H	Ls-357S
0	99.939 ± 0.002	99.931 ± 0.002
1	99.795 ± 0.013	99.742 ± 0.008
2	99.701 ± 0.006	99.604 ± 0.010
2.5	99.638 ± 0.005	99.553 ± 0.007
3	99.604 ± 0.006	99.503 ± 0.008
변화 0-3 개월	-0.335 ± 0.008	-0.428 ± 0.010

[1083]

[1084] 약물은 로딩-후 정제 변종 둘 다의 리포솜에 저장 시 상당히 안정했다. AKG-28 순도의 3개월 감소는 0.33~0.43% 포인트였다.

[1085] 실시예 72. 다양한 로딩-후 정제 조건 하에 제조된 AKG-28 리포솜의 지질 안정성: 리포솜 외 암모늄의 양과 관련.

[1086] HSPC, 콜레스테롤(Chol), PEG-DSPE(45:55:2.25 몰비)(압출 로트 L-111, Xz 118.5 nm, PdI 0.0317)의 압출된 리포솜을 기본적으로 실시예 30에 설명된 대로 10.3 mmol HSPC 규모로 제조하되(그러나 지질 라벨 DiIC18(3)-DS는 사용되지 않음), PCTE 필터 스택이 3 x 100 nm 및 1 x 200 nm 필터를 포함하고 리포솜을 460psi 작업 압력 및 70° C에서 4회 필터 스택을 통해 통과시켰다. 압출된 리포솜을 밤새 2-8° C에서 유지하고 0.2-μm 주사기 필터를 통과시켰다. 리포솜 외 황산암모늄을 TFF로 물로부터 제거하여 잔류 전도도가 408 μS/cm(4.7 부피 교환)가 되었다. TFF-후 압출 리포솜(53.1 mM)의 인지질 농도는 블루 포스포몰리브데이트 방법으로 결정했다. 리포솜을 AKG-28(에탄올로부터 재결정화됨)과 약물 3.37 g 규모로 80m NaCl 존재 하에 DL0 비율 340g/mol PhL(무수 유리 염기(FB) 기준으로 280g/mol PhL)로 최종 12mg/ml (40mg/ml 스톱 용액으로 첨가됨)까지 혼합했다. 로딩 혼합물을 85° C 수조에서 교반하면서 65° C로 예열하고 65° C 수조에서 20분간 교반하면서 추가로 배양한 후 얼음물에서 <10° C로 냉각하고 이 온도에서 10분 동안 배양했다. 로딩 혼합물은 배양 전(로딩 전) pH 6.13, 배양-후(로딩-후) pH 6.91을 나타냈다. 리포솜을 완충되지 않은 0.85%(146mM) NaCl(로트 389-0) 또는 1mM(로트 389-1), 2mM(로트 389-2) 또는 20mM(로트 389-20) HEPES-Na, pH 7.50으로 완충된 144mM NaCl를 사용하여, 폴리스폰 중공 섬유 카트리지(MWCO 500 KDa)(8 부피 교환)에서 TFF에 의해 TFF 완충제 교환/비캡슐화 약물 제거로 처리했다. TFF 정제 후, 필요한 경우 리포솜 조성물을 1M HEPES-Na 완충제 스톱(pH 7.63)을 첨가하여 20mM HEPES-Na 완충제 pH 7.5로 조정하고, 100mM DFO 스톱 용액을 첨가하여 모두 0.5M DFO로 조정했다. TFF 정제된 농축 리포솜을 0.5mM DFO가 포함된 HBS-20-7.5 완충제를 사용하여 무수 유리 염기(FB) 함량을 기준으로 AKG-28의 약물 농도 8.34mg/ml로 추가 조정하고 0.2 μm PES 주사기 필터를 통과시켜 멸균했다. TFF 정제 단계 동안 제거된 비캡슐화 AKG-28의 양으로부터 계산된 로딩 효율은 98.9-99.1%, DL 비율은 323.9 g/mol PhL(FB 기준으로 276.6 g/mol PhL)이었다. 리포솜을 멸균 유리 바이알에 무균적으로 분배하고 37° C 저장 안정성 연구를 진행했다. 약 2주 간격으로 분취량을 빼내고 실시예 68에 설명된 대로 pH 및 지질 완전성에 대해 분석했다. 리포솜을 실시예 63의 방법으로 리포솜의 암모늄 함량을 분석하되, 리포솜 외 암모늄 이외에 리포솜 조성물 중 총 암모늄 농도를 C12E10 세제(67 mg/ml)로 리포솜을 용해시킨 후 측정했다.

[1087] 표 70. 다양한 로딩-후 완충제 교환 조건에서 제조된 AKG-28 리포솜의 지질 안정성 및 암모늄 분석.

표 70

교환 완충제 내 HEPES, mM:	0	1	2	20
37° C에서 일수	HSFC 분해, %			
0	0.00	0.00	0.00	0.00
16	0.60 ±	0.70 ±	0.84 ±	0.90 ±
	0.18	0.17	0.17	0.45
33	1.52 ±	2.23 ±	2.25 ±	2.77 ±
	0.14	0.46	0.34	0.25
47	2.67 ±	3.15 ±	3.29 ±	4.16 ±
	0.59	0.49	0.25	0.75
62	3.17 ±	4.42 ±	4.95 ±	5.10 ±
	0.39	0.40	0.41	0.44
77	4.50 ±	6.13 ±	6.40 ±	7.05 ±
	0.17	0.41	0.07	0.33
95	5.49 ±	7.34 ±	7.99 ±	8.98 ±
	0.14	0.02	0.32	0.13
분해율, %/일	0.0559	0.0750	0.0806	0.0895
R ₂	0.9937	0.9938	0.9943	0.9943
	[NH ₄ ⁺], mM			
총	22.93 ±	22.48 ±	21.74 ±	21.76 ±
	0.70	0.92	0.72	0.49
리포솜 외	1.70 ±	0.80 ±	0.83 ±	0.61 ±
	0.20	0.03	0.21	0.02
전체의 %로 리포솜 외	7.4 ± 0.9	3.5 ± 0.2	3.8 ± 1.0	2.8 ± 0.1

[1088]

[1089] 저장 시 분해에 대한 인지질의 안정성은 완충되지 않은 식염수를 사용하여 로딩-후 정제한 조성물에서 눈에 띄게 더 높았다. 우리는 예기치 않게 이러한 더 나은 인지질 안정성이 리포솜 조성물 내 암모늄 이온의 더 높은 리포솜 외 농도와 상관관계가 있다는 것을 발견했다. 완충되지 않은 식염수에 대한 로딩-후 완충제 교환으로 제조된 조성물은 pH 7.5-완충된 로딩-후 완충제 교환 매질로 제조된 것보다 HSFC의 평균 분해율이 1.3-1.6배 낮았으며, 동시에 1.7mM(전체의 7.4%)의 리포솜 외 암모늄(즉, 리포솜 외 매질 내 암모늄)을 가졌는데, 이는 pH 7.5-완충된 로딩-후 교환 식염수 완충제로 제조된 조성물 내 리포솜 외 암모늄의 양보다 2배 높다(0.6-0.8 mM, 전체의 2.8-3.8%). 따라서, 1mM을 초과하는 리포솜 외 매질 내 암모니아 농도(리포솜 외 농도)는 인지질의 더 나은 저장 안정성과 관련이 있다.

[1090] 실시예 73. 다양한 약물 대 지질 비율에서 콜레스테롤 함량이 증가된 리포솜 내로의 AKG-28 캡슐화.

[1091] HSFC, 콜레스테롤(Chol), PEG-DSPE(45:55:2.25 몰비)(압출 로트 L-115, Xz 112.5 nm, PdI 0.0186)의 압출된 리포솜을 15mmol HSFC 규모로 기본적으로 실시예 30에 설명된 대로 제조하되(그러나 지질 라벨 DiIC18(3)-DS는 사용되지 않음), PCTE 필터 스택에는 (아래에서 위로) 1x80 nm, 3 x 100 nm 및 2x200 nm 필터가 포함되었고, 리포솜을 70° C에서 700psi의 작동 압력으로 필터 스택을 통해 두 번 통과시켰다. 압출된 리포솜을 밤새 2-8° C에서 유지하고 0.2-μm 주사기 필터를 통과시켰다. 리포솜 외 황산암모늄을 TFF에 의해 잔류 전도도가 426 μS/cm (4.7 부피 교환)가 될 때까지 물에서 제거했다. TFF-후 압출 리포솜(55.1 mM)의 인지질 농도는 블루 포스

포몰리브레이트 방법으로 결정했다. 리포솜을 DL0 비율 100-800g/mol PhL(무수 유리 염기(FB) 기준 85.4-683.2g/mol PhL)에서 AKG-28(에탄올로 재결정화됨)(39.8mg/ml 스톡 용액으로 첨가)과 80m NaCl의 존재하에 최종 부피 0.8ml의 약물 3.7-9.6mg 규모로 혼합했다. 로딩 혼합물을 65° C 수조에서 20분 동안 교반하면서 배양한 후, 얼음물에서 10분 동안 <10° C로 냉각시켰다. 로딩 혼합물은 배양 전(pre-loading) pH 6.1-6.18, 배양 후(post-loading) pH 6.34-7.26을 가졌다. 비캡슐화 AKG-28을 PD-10 중력-공급된 컬럼(용리액 HBS-7 완충제)의 Sepharose CL-4B에서 크로마토그래피로 제거하고, 리포솜을 공극 부피 분율로 수집하고 AKG-28((50% 이소프로판올-0.1M HCl 내 302nm에서 UV 분광광도법 사용) 및 인지질(블루 포스포몰리브레이트 방법 사용)에 대해 분석했다. 캡슐화된 약물에 대한 약물-지질(DL) 비율을 계산하고 리포솜 로딩 혼합물 내 초기 약물-지질 비율(DL0)과 비교했다. 결과를 표 71에 나타내었다. 효율적인(>90%) 캡슐화는 100-500 g/mol의 DL0 범위에서 관찰되었으며, 약 99-470 g/mol PhL(FB로 85-400 g/mol PhL)의 DL 비율을 갖는 리포솜을 생성했다. 리포솜이 약 530-540 g/mol PhL(FB로서 456-458 g/mol PhL)의 캡슐화된 DL 비율 한계에 도달함에 따라, 더 높은 DL0 비율에서 캡슐화 효율이 감소했다.

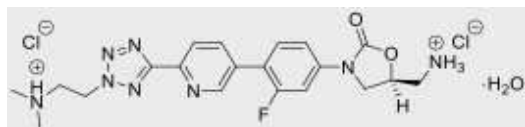
표 71

A2 g/mol PhL	DL (캡슐화)		캡슐화 효율
	g/mol PhL	g/mol PhL (FB)	%
100	99.4 ± 3.3	84.8 ± 2.8	99.4 ± 3.3
200	192.6 ± 6.8	164.5 ± 5.8	96.3 ± 3.5
300	292.3 ± 5.3	249.6 ± 4.6	97.4 ± 1.8
400	393.0 ± 14.6	335.6 ± 12.5	98.3 ± 3.7
500	473.3 ± 3.3	404.2 ± 2.8	94.7 ± 0.7
600	516.2 ± 5.3	440.9 ± 4.5	86.0 ± 1.0
700	533.9 ± 4.9	455.9 ± 4.2	76.3 ± 0.9
800	536.6 ± 7.8	458.2 ± 6.7	67.1 ± 1.5

실시예 74. 예시적 리포솜 생성물

AKG-28 리포솜 주사 제품

AKG-28 리포솜 주사 제품은 항균제인 AKG-28의 이염산염 일수화물 염을 사용하여 정맥내 사용을 위한 리포솜 분산액으로 제제화한다. AKG-28 2염산 일수화물 염의 화학명은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아미노)-1,3-옥사졸리딘-2-온 2염산 염산 일수화물이다. 분자 구조는 다음과 같다:



AKG-28 이염산염 일수화물의 농도를 AKG-28 유리 염기의 농도로의 변환 계수는 0.824이다.

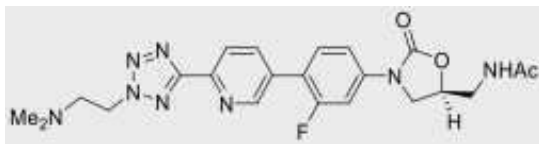
리포솜 주사 제품은 10ml 유리 바이알에 포장된 멸균된 흰색 내지 약간 회백색의 불투명 등장성 액체 리포솜 분산액이다. 각 10mL 단일 용량 바이알에는 85mg(8.5mg/mL)의 AKG-28 유리 염기 (2-옥사졸리딘, 5-(아미노메틸)-3-[4-[6-[2-[2-(디메틸아미노)에틸]-2H-테트라졸-5-일]-3-피리디닐]-3-플루오로페닐]-, (5S)-)이 포함되어 있다. 리포솜은 직경이 약 115nm(Z-평균)인 단일라멜라 지질 이중층 소포이며, 이는 황산염으로서 불용성 겔화 또는 침전 상태의 AKG-28을 포함하는 수성 공간을 캡슐화한다. 소포는 수소화 대두 포스파티딜 콜린(HSPC) 22.6 mg/mL, 콜레스테롤(Chol) 13.6 mg/mL 및 메톡시-말단 폴리에틸렌 글리콜(MW 2000)-디스테아로일포스파티딜

에탄올아민(MPEG-2000-DSPE) 4 mg/mL로 구성되고, 식염수 완충제(20mM HEPES, 141mM NaCl, 0.5mM 테페록사민, pH 7.5)에 현탁되어 있다. 됴 각 mL에는 완충제로서 4.8mg/mL의 2-[4-(2-하이드록시에틸) 피페라진-1-일]에탄숴폰산 (HEPES), 킬레이트제로서 테페록사민 메실레이트 0.33mg/mL, 및 주사용수 내 등장성 시약으로서 염화나트륨 8.2mg/mL도 포함되어 있다. 수산화나트륨 및/또는 염산을 pH 7.5까지 첨가한다. 리포솴 내 지질의 몰 비율은 45:55:2.25(HSPC:Chol:MPEG-DSPE)이다. AKG-28은 AKG-28(유리 염기)-인지질 비율 280g/mol에서 황산암모늄 구배 방법으로 캡슐화된다.

[1099] AKG-28 리포솴 주사는 결핵균과 같은 마이코박테리아 감염 환자의 치료에 유용한 항균제이다. 일부 실시양태에서, AKG-28 리포솴 주사는 다약제 내성(MDR) 또는 극도의 약물 내성(XDR) 결핵균과 같은 마이코박테리아 감염 환자의 치료에 유용한 항균제이다.

[1100] AKG-38 리포솴 주사 제품

[1101] AKG-38 리포솴 주사 제품은 항균제인 AKG-38의 유리 염기를 사용하여 정맥내 사용을 위한 리포솴 분산액으로 제제화한다. AKG-38의 화학명은 (5R)-3-{3-플루오로-4-[6-(2-(2-디메틸아미노에틸)-2H-테트라졸-5-일)-3-피리디닐]페닐}-5-(메틸아세트아미도)-1,3-옥사졸리딘-2-온이다. 분자 구조는 다음과 같다:



[1102]

[1103] AKG-38 리포솴 주사 제품은 10mL 유리 바이알에 포장된 멸균된 흰색 내지 약간 회백색의 불투명 등장성 리포솴 분산액이다. 각 10mL 단일 용량 바이알에는 16mg/mL 농도의 160mg AKG-38 유리 염기가 포함되어 있다. 리포솴은 직경이 약 115 nm인 단일라멜라 지질 이중층 소포로, 황산염으로서 불용성 겔화 또는 침전 상태의 AKG-38을 함유하는 수성 공간을 캡슐화한다. 소포는 수소화 대두 포스파티딜 콜린(HSPC) 20 mg/mL, 콜레스테롤(Chol) 12 mg/mL 및 메톡시-말단 폴리에틸렌 글리콜(MW 2000)-디스테아로일포스파티딜 에탄올아민(MPEG-2000-DSPE) 3.5 mg/mL로 구성되고, 식염수 완충제(20mM HEPES, 141mM NaCl, 0.5mM 테페록사민, pH 7.5)에 현탁되어 있다. 각 mL에는 완충제로서 4.8mg/mL의 2-[4-(2-하이드록시에틸) 피페라진-1-일]에탄숴폰산 (HEPES), 킬레이트제로서 테페록사민 메실레이트 0.33mg/mL, 및 주사용수 내 등장성 시약으로서 염화나트륨 8.2mg/mL도 포함되어 있다. 수산화나트륨 및/또는 염산을 pH 7.5까지 첨가한다. 리포솴 내 지질의 몰 비율은 45:55:2.25(HSPC:Chol:MPEG-DSPE)이다. AKG-38은 AKG-38(유리 염기)-인지질 비율 600g/mol에서 황산암모늄 구배 방법으로 캡슐화된다.

[1104] AKG-38 리포솴 주사는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA) 세균 감염의 치료를 포함하여 그람 양성 세균 감염 환자의 치료에 유용한 항세균제이다. AKG-38 리포솴 주사는 결핵균과 같은 마이코박테리아 감염 환자의 치료에 유용한 항균제이다. 일부 실시양태에서, AKG-38 리포솴 주사는 다약제 내성(MDR) 또는 극도의 약물 내성(XDR) 결핵균과 같은 마이코박테리아 감염 환자의 치료에 유용한 항균제이다.

[1105] 세균 감염의 치료와 관련된 화합물, 조성물 및 방법이 본원에 개시된다. 본원에서 사용되는 용어 "화합물" 및 "약물"은 상호교환적으로 사용된다. 본 개시내용의 일부 양태는 옥사졸리디논의 신규 아미노알킬 유도체에 관한 것이다. 본 개시내용의 일부 양태는 옥사졸리디논 화합물의 신규 아미노알킬 유도체의 합성 방법에 관한 것이다. 다른 양태는 리포솴에 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 개시내용의 다른 양태는 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체 또는 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체를 포함하는 리포솴 조성물의 세균 감염 치료에서의 용도에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 화합물 및 조성물은 마이코박테리아 및 그람 양성 박테리아로부터의 감염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 박테리아 감염은 마이코박테리움 투베르쿨로시스이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 화합물 및 조성물은 마이코박테리아 및 그람 양성 박테리아의 성장을 억제한다. 이들은, 비제한적으로, 마이코박테리움 투베르쿨로시스, 마이코박테리움 아비움 복합체, 마이코박테리움 레프라에, 마이코박테리움 고르도나에, 마이코박테리움 압세수스, 마이코박테리움 뮈코제니쿰, 스트렙토코커스, 반코마이신-내성 엔테로코커스(VRE), 메티실린-내성 황색포도상구균(MRSA), 스테필로코커스 뉴모니아에, 엔테로코커스 파에시움, 스트렙토코커스 아갈락티아에, 스트렙토코커스 뉴모니아에, 스트렙토코커스 피오게네스, 비리단스 그룹 스트렙토코커스, 리스테리아 모노사이토게네스, 노카르디아, 및 코리네박테리움을 포함한다.

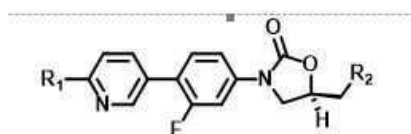
[1106] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체는 인간 신장 또는 간세포와 같은 포유동물 세포와 비교할 때 마이코박테리움 투베르쿨로시스에 대해 선택적으로 활성이다. 일부 실시양태에서,

본원에 기술된 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체는 포유동물 세포, 예컨대 신장 또는 간세포 포유동물 세포와 비교하여 결핵균에 대해 100배 이상의 예상외로 높은 선택성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체는 예기치 않게 100배 이상의 높은 선택성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체는 신장 또는 간세포 포유동물 세포와 비교하여 결핵균에 대해 100 내지 6,500 배, 100 내지 6,000 배, 100 내지 5,500 배, 100 내지 5,000 배, 100 내지 4,500 배, 100 내지 4,000 배, 100 내지 3,500 배, 100 내지 3,000 배, 100 내지 2,500 배, 100 내지 2,000 배, 100 내지 1,500 배, 100 내지 1,000 배, 500 내지 6,500 배, 500 내지 6,000 배, 500 내지 5,500 배, 500 내지 5,000 배, 500 내지 4,500 배, 500 내지 4,000 배, 500 내지 3,500 배, 500 내지 3,000 배, 500 내지 2,500 배, 500 내지 2,000 배, 500 내지 1,500 배, 500 내지 1,000 배, 1,000 내지 6,500 배, 1,000 내지 6,000 배, 1,000 내지 5,500 배, 1,000 내지 5,000 배, 1,000 내지 4,500 배, 1,000 내지 4,000 배, 1,000 내지 3,500 배, 1,000 내지 3,000 배, 1,000 내지 2,500 배, 1,000 내지 2,000 배, 1,000 내지 1,500 배의 높은 선택성을 나타낸다.

[1107] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 화합물 및 조성물은 간, 비장 또는 폐에서 미코박테리움-상주 대식세포의 선택적 흡수를 촉진하여 강력한 세포내 사멸을 제공하는 것을 도울 수 있다. 대식세포는 마이코박테리움과 같은 외래 감염원뿐만 아니라 리포좀과 같은 실험실에서 파생된 나노입자를 포함하는 식균작용을 통해 외래 입자의 제거를 담당한다. 이로 인해 동일한 생물학적 저장소에 둘 다 함께 위치할 수 있는 기회가 생겨 질병에 대한 중요한 저장소에 활성제를 효과적으로 집중시킬 수 있다.

[1108] 결핵 뿐만 아니라 다른 마이코박테리아 및 그람 양성 박테리아 감염의 치료를 위한 조성물 및 방법이 개시되어 있다.

[1109] 본 개시내용의 한 양태는 화학식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다:



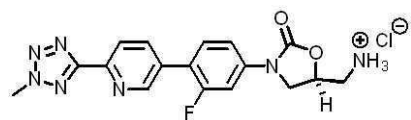
[1110] 식 (I)

[1111] 여기서 R_2 는 아민 (NH_2) 또는 아세트아미드 ($NHCOCH_3$)이고, 그리고

[1112] 여기서 R_1 는 위치 2'에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 링이다.

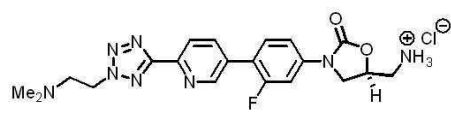
[1114] 일부 실시양태에서, 아미노알킬은 디메틸아미노알킬이다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체는 옥사졸리디논 링의 R_2 위치에서 아민 또는 아세트아미드 기 및 테트라졸 링 상 디메틸아미노에틸 기를 포함한다.

[1115] 일부 실시양태에서, 식 1a의 화합물이 제공된다:



[1117] 식 1a.

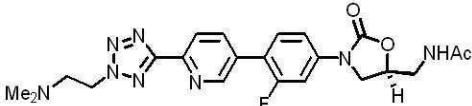
[1118] 일부 실시양태에서, 식 1b의 화합물이 제공된다:



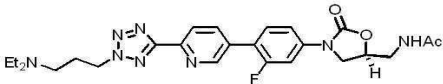
[1119] 식 1b.

[1120] 일부 실시양태에서, 화학식 1b의 화합물은 수성 에탄올로부터 결정화된다. 일부 실시양태에서 화학식 1b의 화합물은 이염산염 또는 이염산염 일수화물의 형태이다.

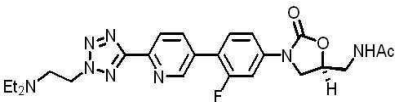
[1121] 일부 실시양태에서, 식 1c의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이 제공된다:

[1122]  식 1c.

[1123] 일부 실시양태에서, 식 1d의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이 제공된다:

[1124]  식 1d

[1125] 일부 실시양태에서, 식 1e의 화합물이 제공된다:

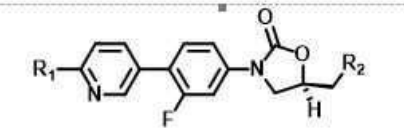
[1126]  식 1e

[1127] 일부 실시양태에서, 상기 화합물은 100 내지 1700 범위인 Erd/HepG2 및 H37Rv/HepG2에 대한 선택성 지수 (SI) 을 가진다.

[1128] 일부 실시양태에서, 상기 화합물은 200 내지 1700 범위인 Erd/HepG2 및 H37Rv/HepG2에 대한 SI 지수를 가진다.

[1129] 일부 실시양태에서, 상기 화합물은 300 내지 1700 범위인 Erd/HepG2 및 H37Rv/HepG2에 대한 SI 지수를 가진다.

[1130] 본 개시내용의 또다른 양태는 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 조성물을 제공하고, 여기서 리포솜 소포는 그 안에 식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하고

[1131] 

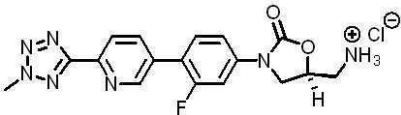
[1132] 식 (I)

[1133] 여기서 R₂는 아민 (NH₂) 또는 아세트아미드 (NHCOCH₃)이고, 그리고

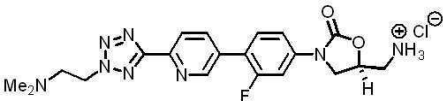
[1134] 여기서 R₁는 위치 2'에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 링이다.

[1135] 일부 실시양태에서, 아미노알킬은 디메틸아미노알킬이다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체는 옥사졸리디논 링의 R₂ 위치에서 아민 또는 아세트아미드 기 및 테트라졸 링 상 디메틸아미노에틸 기를 포함한다.

[1136] 일부 실시양태에서, 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 조성물이 제공되고, 여기서 리포솜 소포는 식 1a의 화합물을 포함한다:

[1137]  식 1a

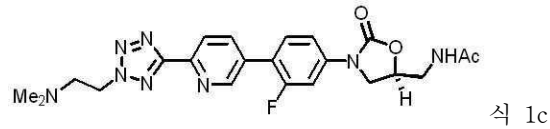
[1138] 일부 실시양태에서, 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 조성물이 제공되고, 여기서 리포솜 소포는 식 1b의 화합물을 포함한다:

[1139]  식 1b

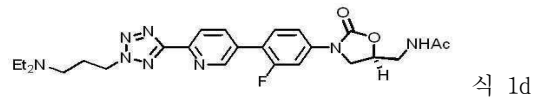
[1140] 일부 실시양태에서, 화학식 1b의 화합물은 수성 에탄올로부터 결정화된다. 일부 실시양태에서 화학식 1b의 화합

물은 이염산염 또는 이염산염 일수화물의 형태이다.

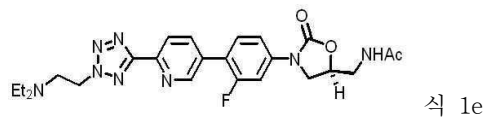
[1141] 일부 실시양태에서, 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 조성물이 제공되고, 여기서 리포솜 소포는 식 1c의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다:



[1142] 일부 실시양태에서, 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 조성물이 제공되고, 여기서 리포솜 소포는 식 1d의 화합물을 포함한다:



[1143] 일부 실시양태에서, 리포솜 소포를 포함하는 리포솜 조성물이 제공되고, 여기서 리포솜 소포는 식 1e의 화합물을 포함한다:



[1144] 본 발명의 양태는 옥사졸리디논의 아미노알킬 유도체인 화합물에 관한 것이다(도 6 참조). 일부 실시양태에서, 하기 화학식 I을 갖는 화합물 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염:

[1145] 식 (I)

[1146] 여기서 R_2 는 아민 (NH_2) 또는 아세트아미드 ($NHCOCH_3$)이고, 그리고

[1147] 여기서 R_1 는 위치 2'에서 아미노알킬로 치환된 테트라졸 링임.

[1148] 다른 실시양태에서, 하기 화학식 I을 갖는 화합물 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염:

[1149] 식 (I)

[1150] 여기서 R_2 는 아민 (NH_2) 또는 아세트아미드 ($NHCOCH_3$)이고, 그리고

[1151] 여기서 R_1 는 위치 1'에서 아미노알킬 기로 치환된 테트라졸 링임.

[1152] 일부 실시양태에서, 아미노알킬은 디메틸아미노알킬이다. 일부 실시양태에서, 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체는 옥사졸리디논 링의 R_2 위치에서 아민 또는 아세트아미드 기 및 테트라졸 링 상 디메틸아미노에틸 기를 포함한다.

[1153] 본 발명은 옥사졸리디논 고리의 R_2 위치에 아민 또는 아세트아미드 기를 포함하고 테트라졸 고리에 디메틸아미노에틸 기를 포함하는 본원에 기재된 옥사졸리디논 화합물의 아미노알킬 유도체에 대한 매우 특정한 구조-활성 관계(SAR)를 나타낸다. 이들 화합물은 (1) 포유동물 세포(예를 들어, 인간 신장 또는 간세포 세포)에서의 활성과 비교할 때 결핵균에 대해 매우 선택적이고, (2) 결핵균에 대해 매우 활성이며, (3) 리포솜에 효율적으로 로딩된다.

[1154] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 옥사졸리디논의 아미노알킬 유도체는 구배 기초 약물 로딩 방법을 사용하여 85% 이상의 효율로 리포솜에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 이들 유도체의 로딩 효율은 90% 이상이다. 일부 실시양태에서, 이들 유도체의 로딩은 95% 이상이거나 심지어 정량적이다. 일부 실시양태에서, 리포솜에 옥사졸리디논의 아미노알킬 유도체를 로딩하는 방법이 기술된다. 일부 실시양태에서, 로딩 방법은 리포솜 내부 수성 공간에서 약염기성 양친매성 약물을 효율적으로 로딩하고 후속적으로 안정화시키기 위해 막횡단 구배 및 포획제를 사용한다. 구배는 (1) 예를 들어 구연산 용액을 사용하여 형성된 단순 pH 구배, (2) 구연산염 또는 황산염 암모늄 염을 사용하는 암모늄 이온 구배, (3) 알킬, 디알킬 또는 트리알킬암모늄 염, (4) 전이 금속 (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) 구배, 또는 심지어 (5) 약물 용해도의 막횡단 구배를 포함할 수 있다. 그 전체가 참고로서 본

원에 포함된 미국 특허 번호 5,316,771, 5,800,833, 8,147,867, 7,744,921, 8,349,360, 6,110,491, 미국 특허 출원 공개 번호 20180369143A1 및 국제 특허 출원 공개 번호 W0199001405 참조. 또한 Allen et al. (1995) Int J Cancer 62:199-204 참조. 이론에 얽매이지 않고, 리포좀 내부에 함유된 양이온은 약염기성 약물의 리포좀 내부로의 축적을 촉진하거나 약물 분자와 직접 교환하는 것을 돕는 막을 가로지르는 pH 구배를 확립하는 역할을 한다. 이는 일부 실시양태에서, 구배의 총 용량 미만의 약물의 정량적 로딩을 초래한다. 반대이온은 리포좀 내부에서 약물과 안정한 복합체를 형성함으로써 순환에서 또는 저장 동안 조기 누출에 대해 제형을 안정화시키는 데 중요한 역할을 할 수 있다(Drummond et al. (2008) J. Pharm Sci 97, 4696-4740 참조).

[1158] 결핵 뿐만 아니라 다른 마이코박테리아 및 그람 양성 박테리아 감염의 치료를 위한 조성물 및 방법이 개시되어 있다. 이들 조성물은 독성이 낮은 약물의 투여 가능성을 최대화하기 위해 고효율로 캡슐화된 매우 강력하고 선택적인 옥사졸리디논을 함유하고, 혈장의 존재 하에서 안정하다. 조성물은 장기간 순환하며 박테리아 또는 마이코박테리아 감염 부위에서 효율적인 축적을 가능하게 하기 위해 정맥내 투여 후 순환하는 동안 캡슐화된 약물을 보유한다. 조성물은 성분 분해와 관련하여 저장 안정성이다. 장기 순환 특성 및 약물의 매우 안정적인 보유와 결합될 때 달성될 수 있는 고용량은 이러한 감염을 치료하기 위해 일반적으로 사용되는 다른 약물의 1일 또는 1일 2회 투여와 비교할 때 감소된 투여 빈도를 허용한다.

[1159] 본 개시내용의 다양한 양태는 단독으로, 조합하여, 또는 전술한 실시예에서 구체적으로 논의되지 않은 다양한 배열로 사용될 수 있으며, 따라서 전술한 설명에서 설명된 또는 도면에 예시된 구성요소의 세부사항 및 배열에 대한 적용에 제한되지 않는다. 예를 들어, 일 실시양태에서 설명된 양태는 다른 실시양태에서 설명된 양태와 임의의 방식으로 조합될 수 있다.

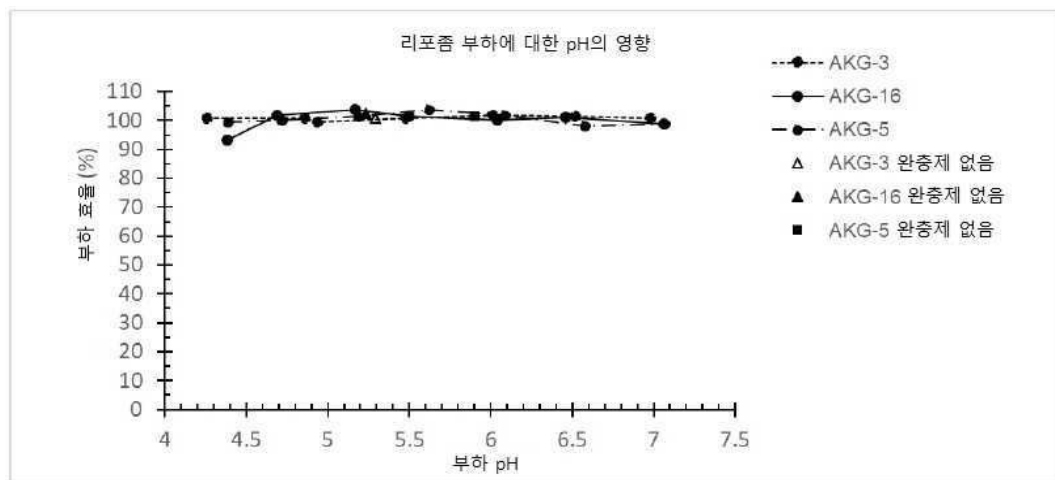
[1160] 본 개시내용의 특정 실시양태가 논의되었지만, 상기 설명은 예시적이고 제한적이지 않다. 본 명세서를 검토하면 본 개시내용의 많은 변형이 당업자에게 명백해질 것이다. 본 개시내용의 전체 범위는 균등물의 전체 범위와 함께 청구항을 참조하고, 그러한 변형과 함께 명세서를 참조하여 결정되어야 한다.

[1161] **참조에 의한 통합**

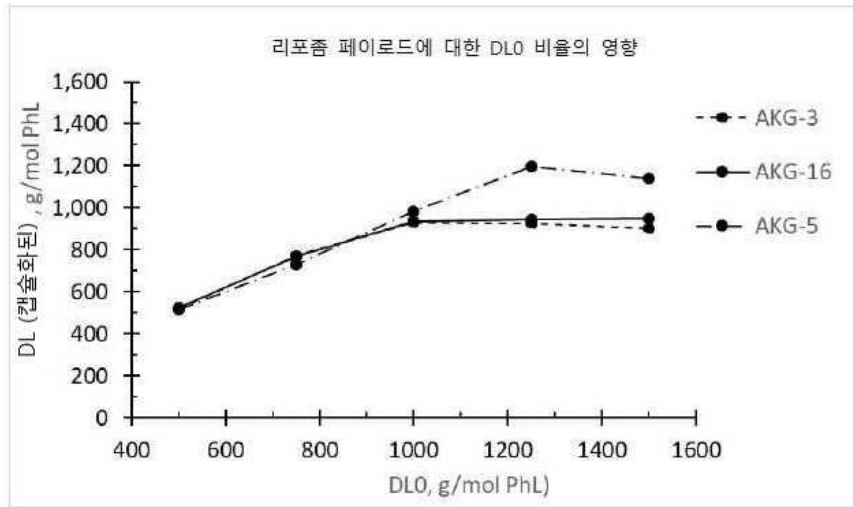
[1162] 본 명세서에 참조된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 마치 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전체가 참조로 여기에 포함된다.

도면

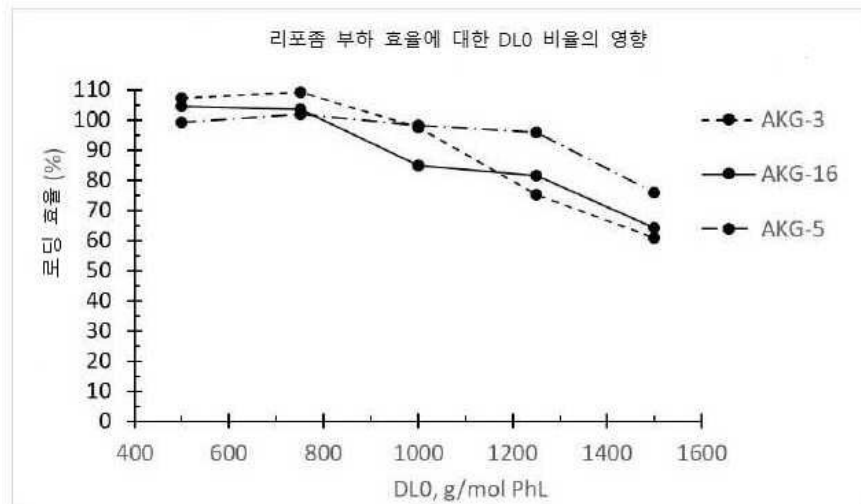
도면1



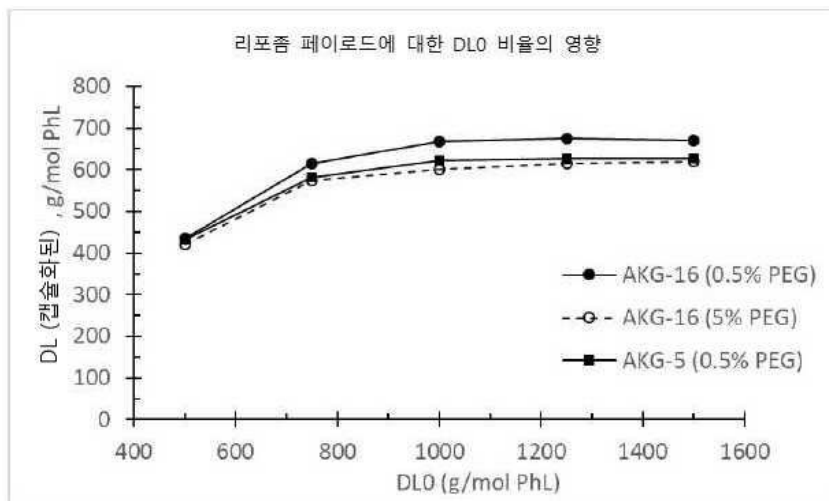
도면2a



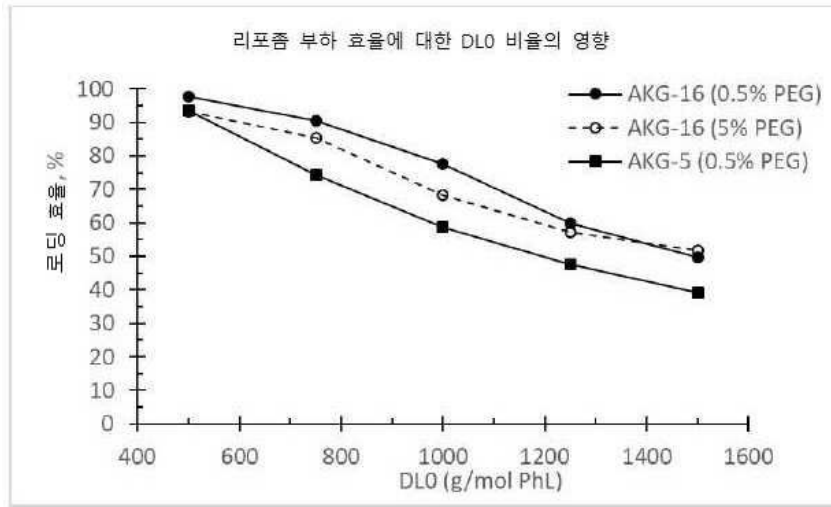
도면2b



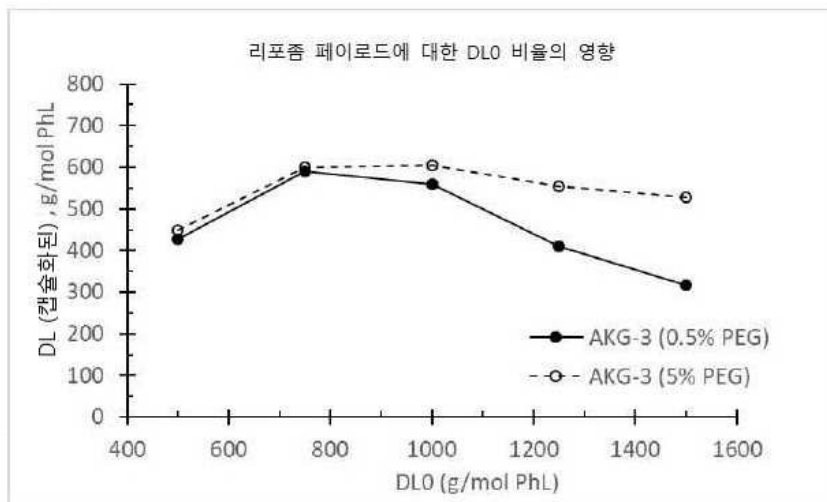
도면3a



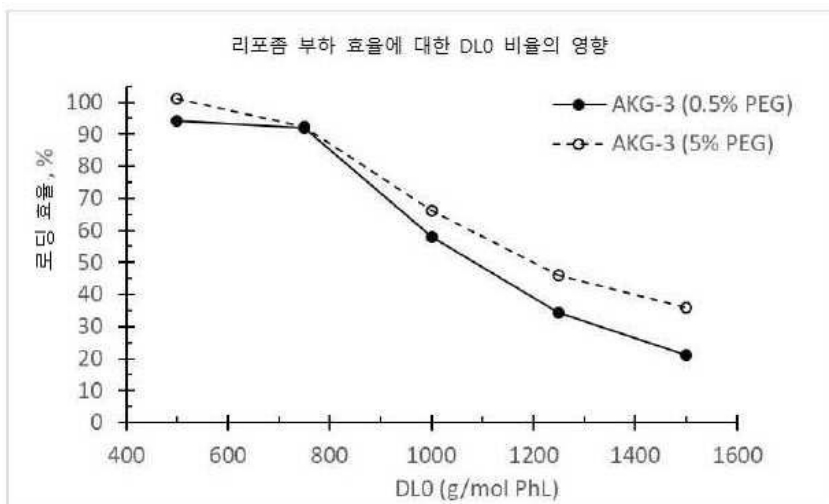
도면3b



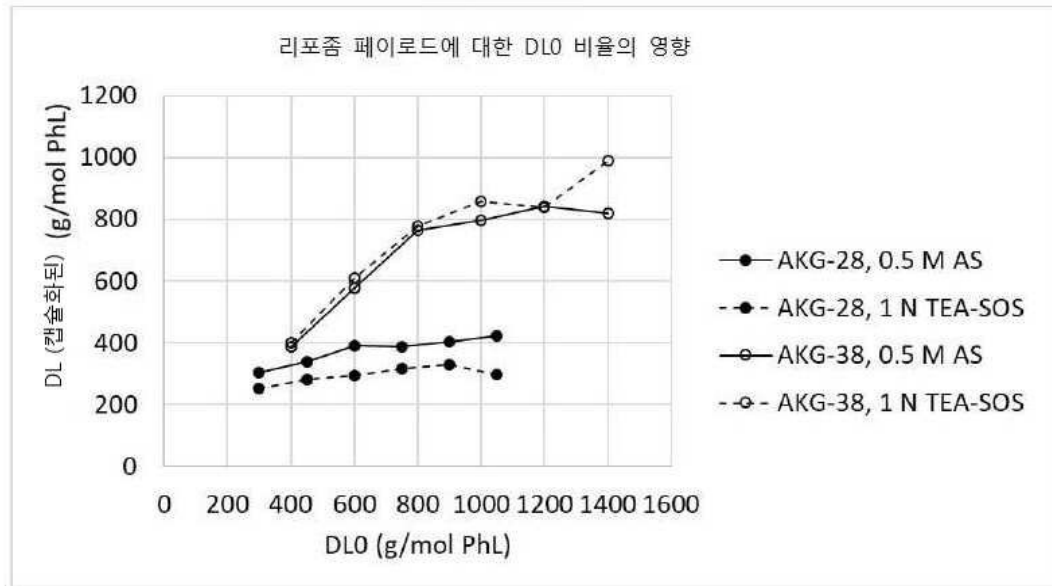
도면3c



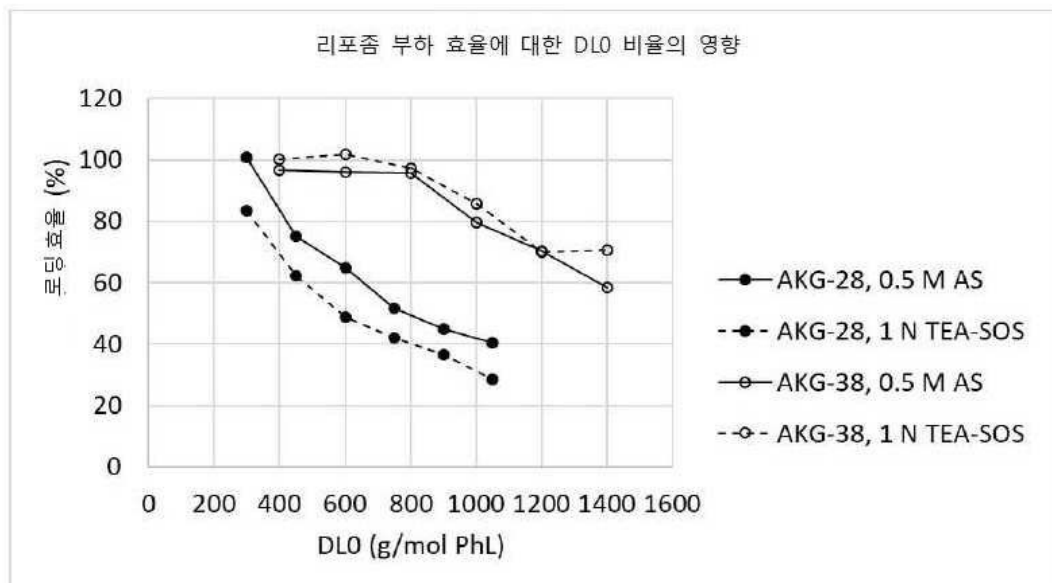
도면3d



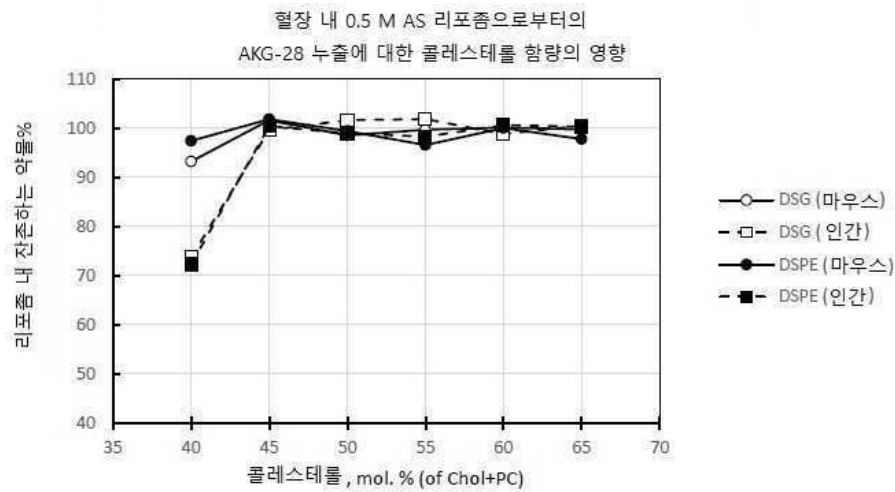
도면4a



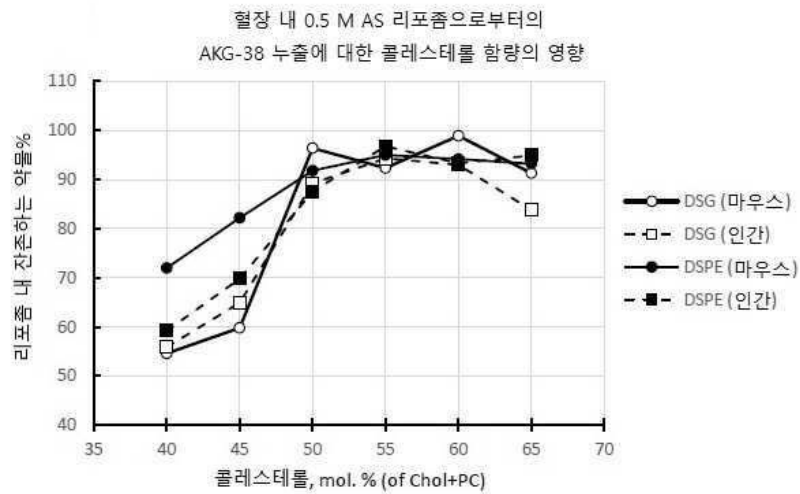
도면4b



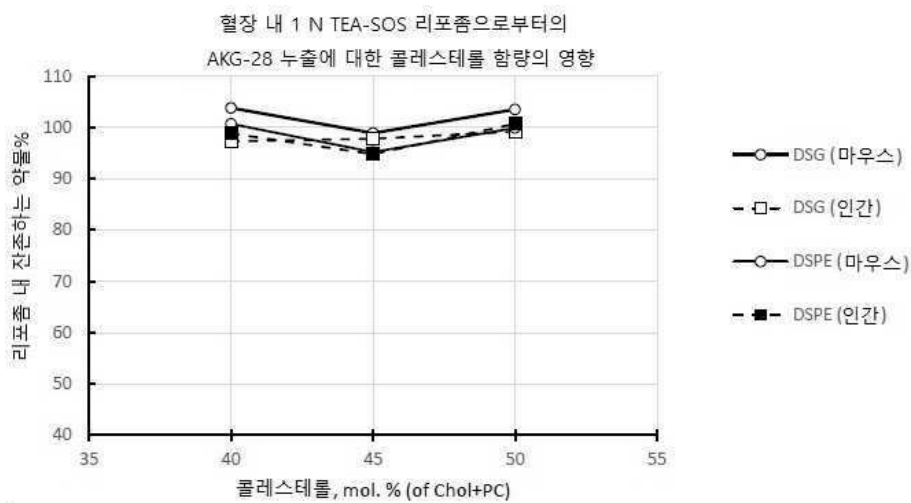
도면5a



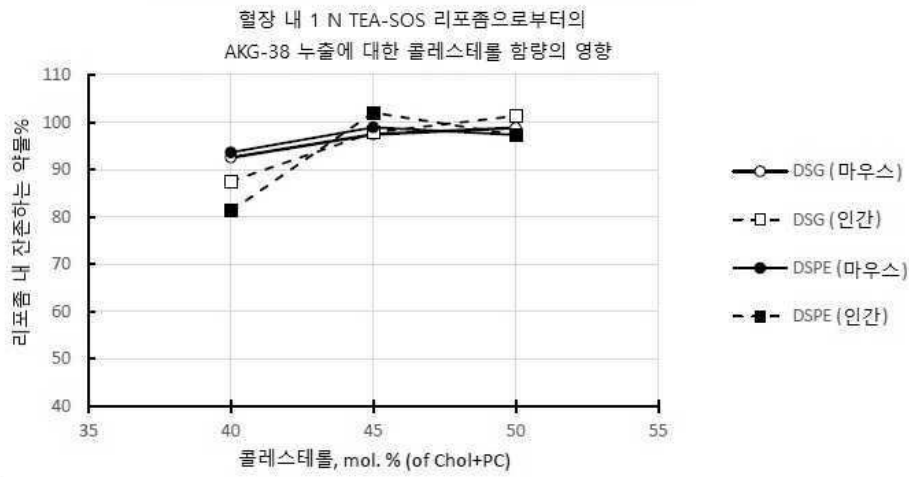
도면5b



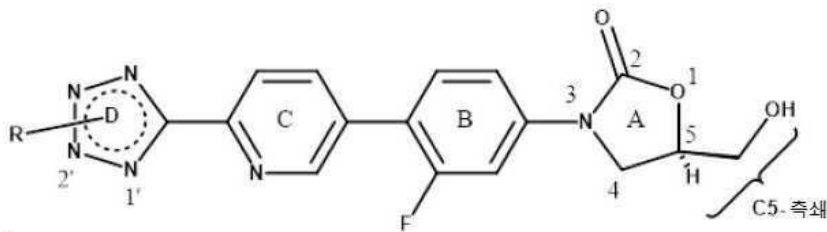
도면5c



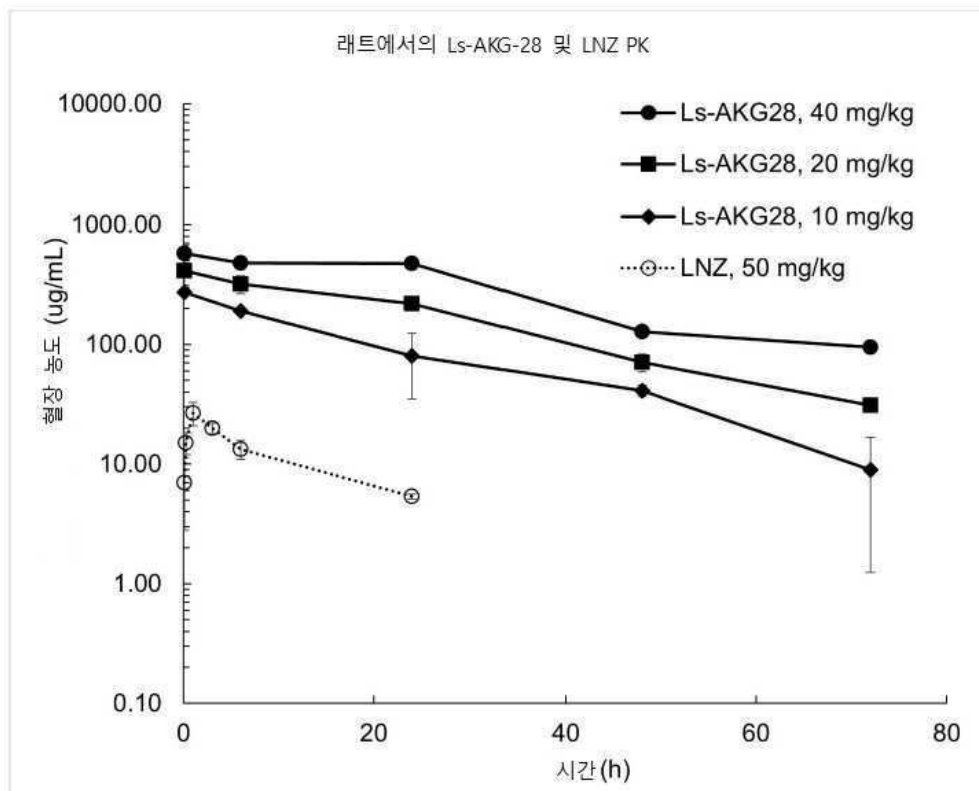
도면5d



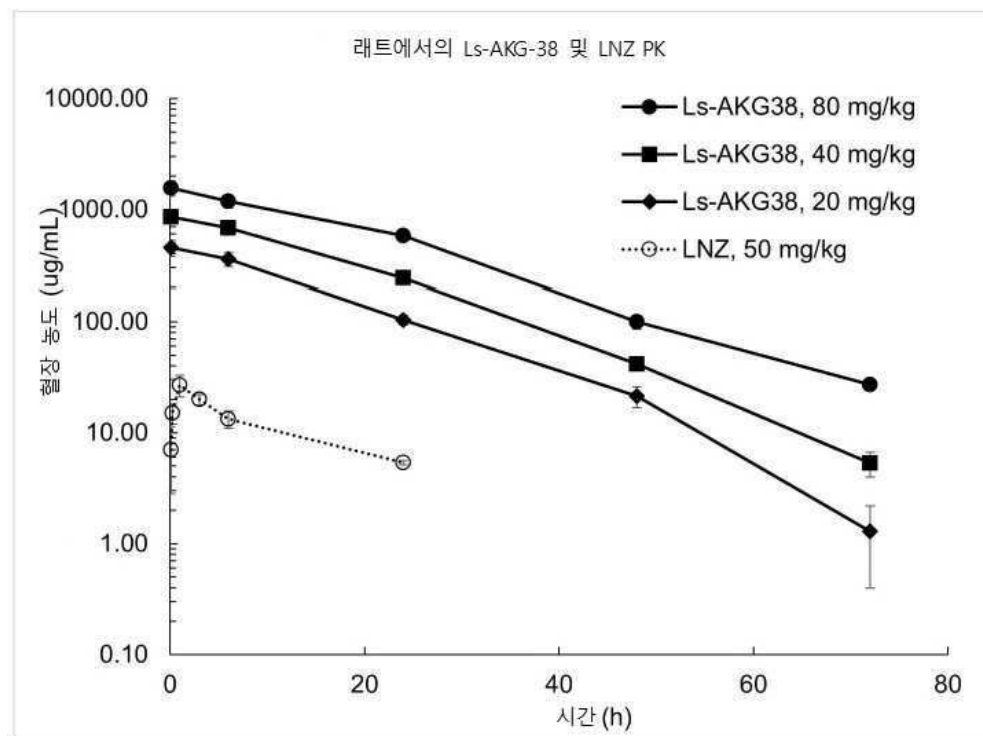
도면6



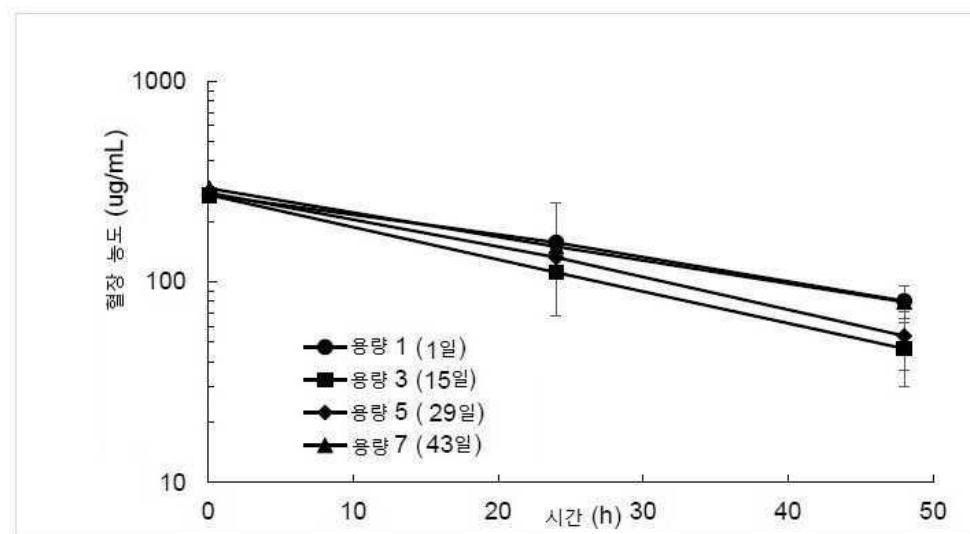
도면7



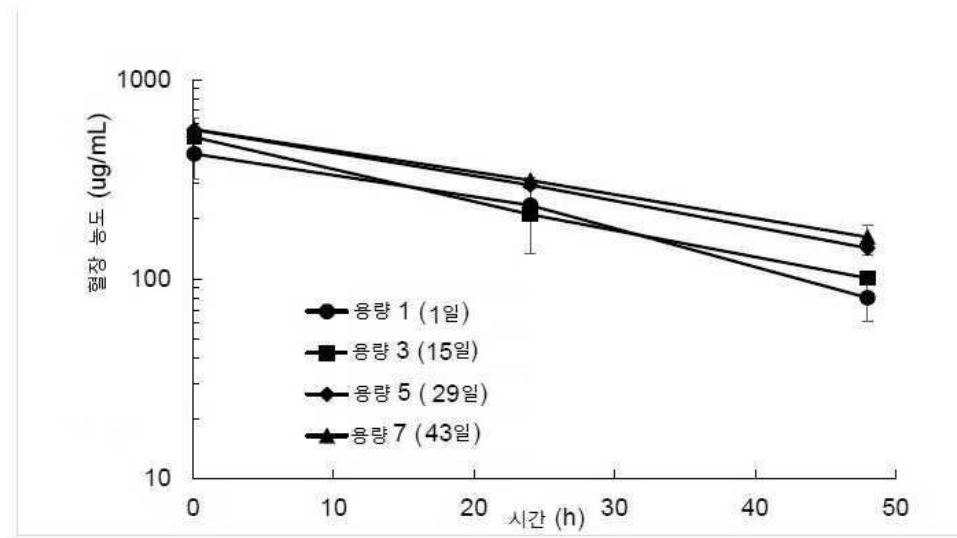
도면8



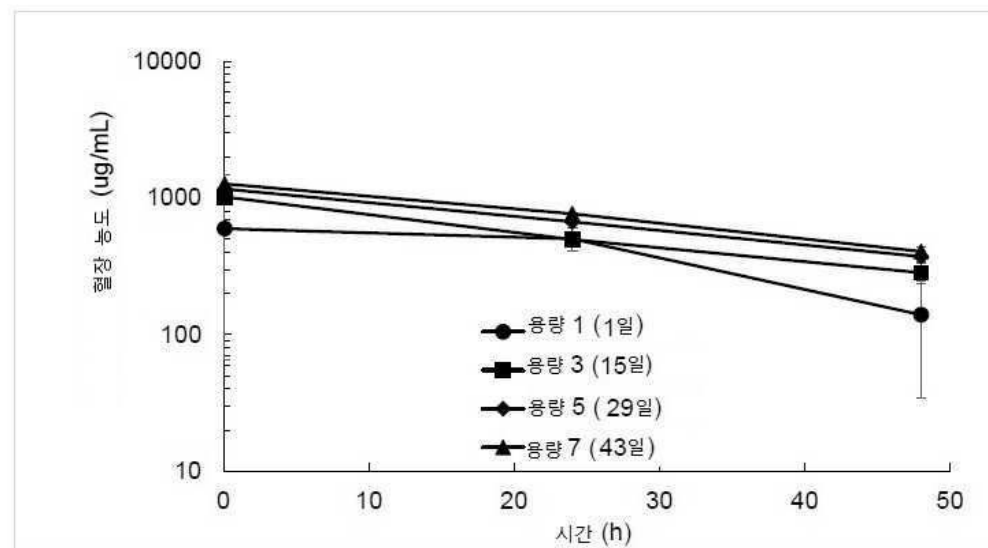
도면9a



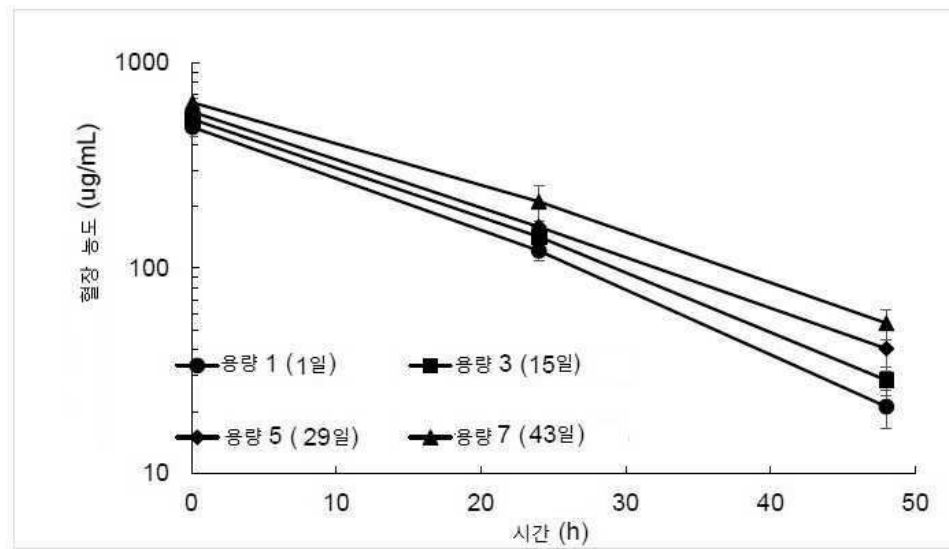
도면9b



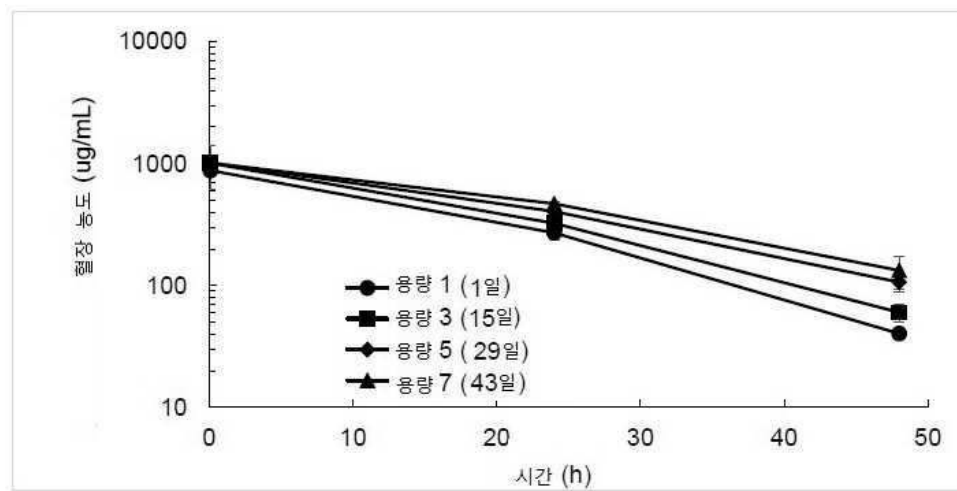
도면9c



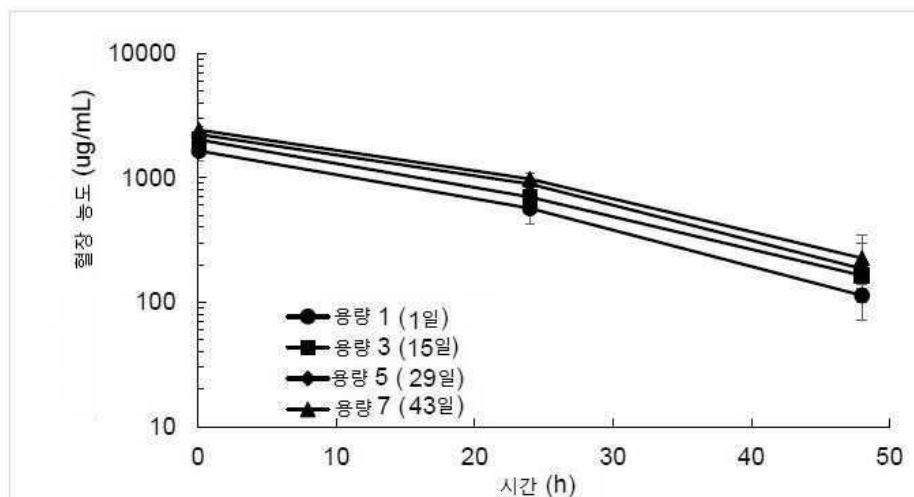
도면10a



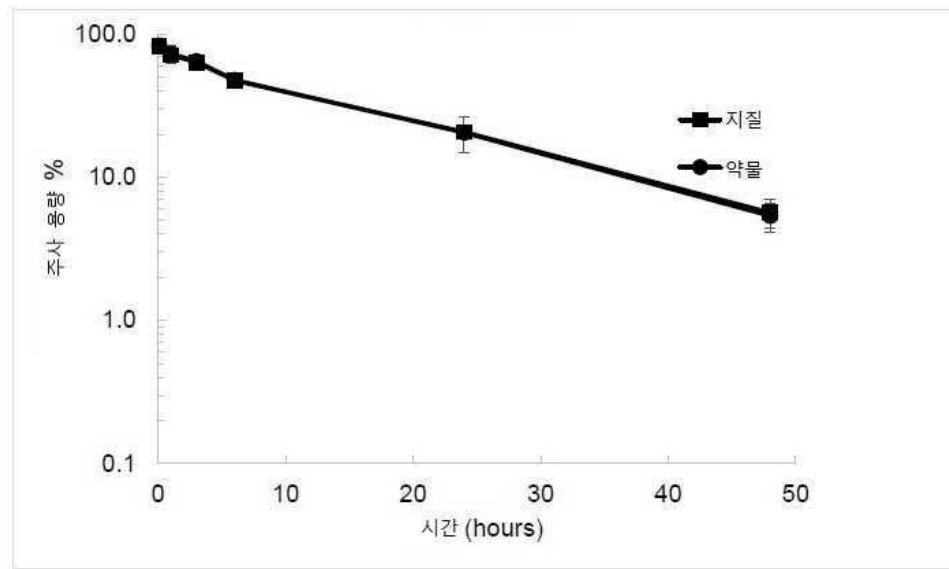
도면10b



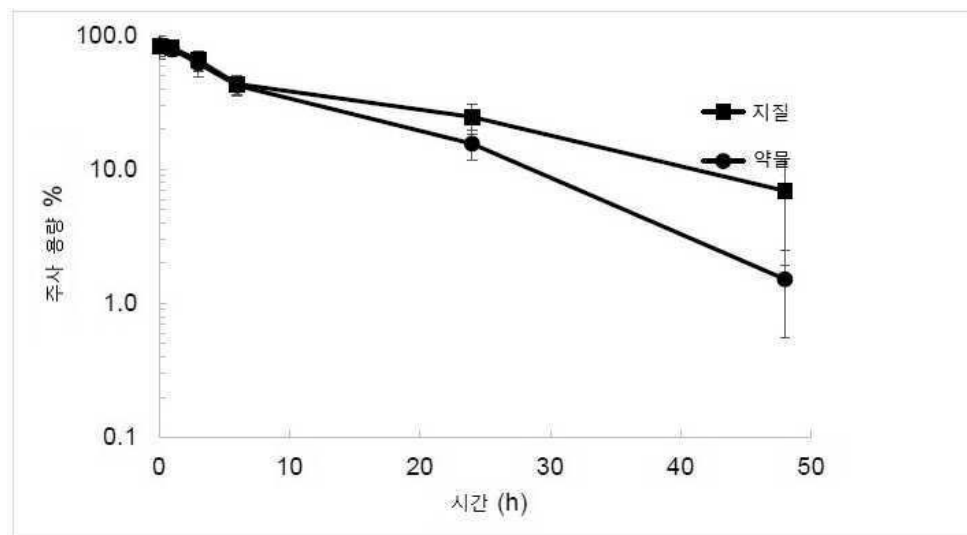
도면10c



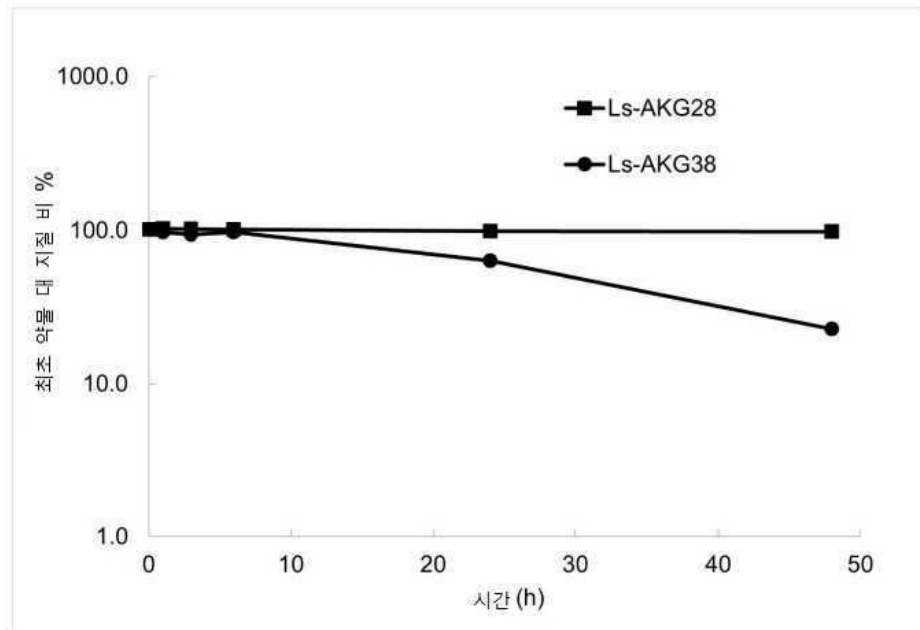
도면11a



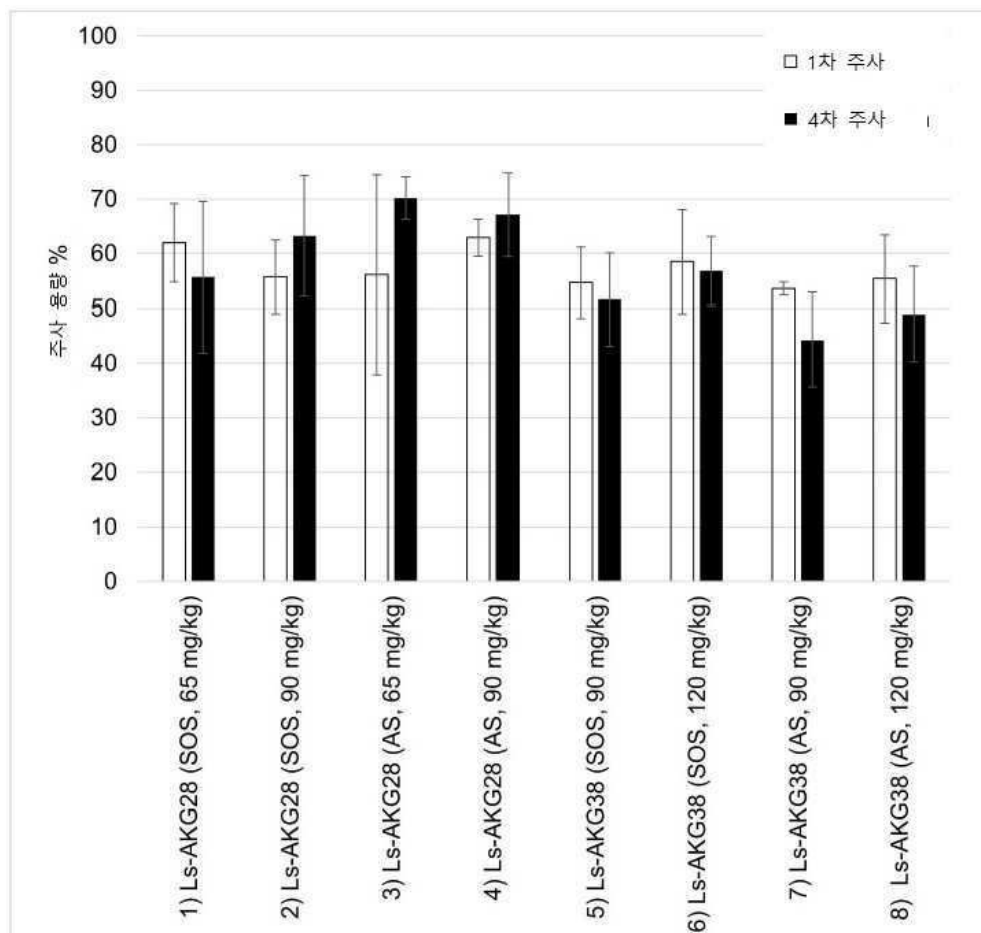
도면11b



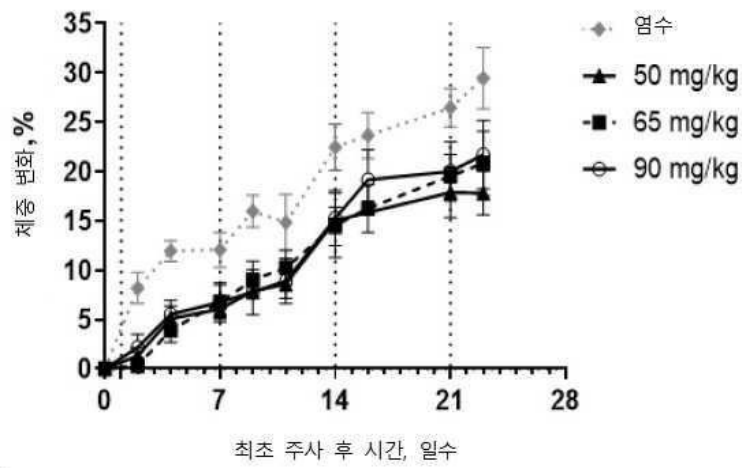
도면11c



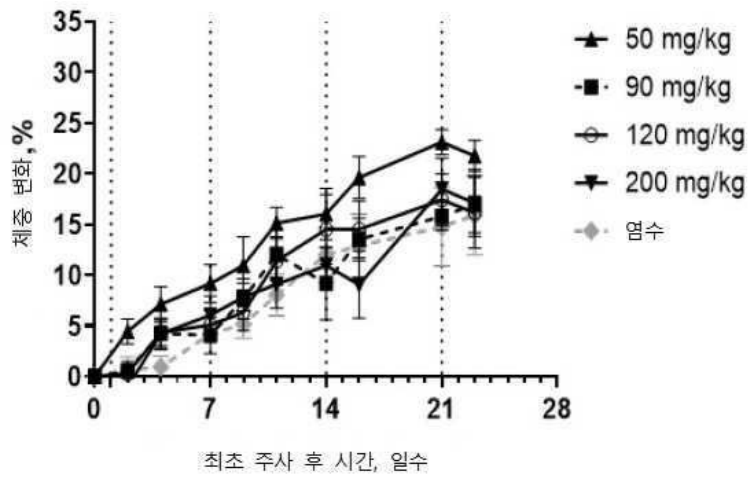
도면12



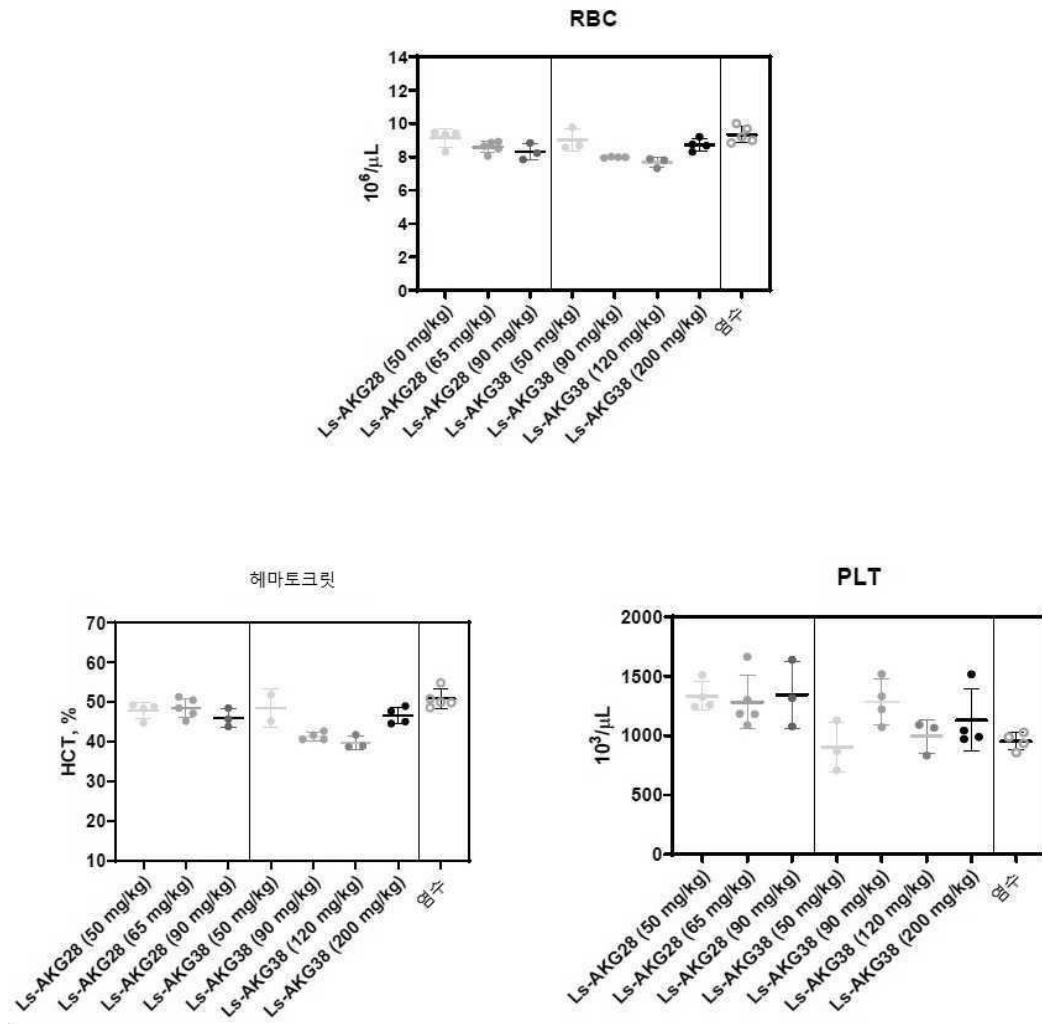
도면13a



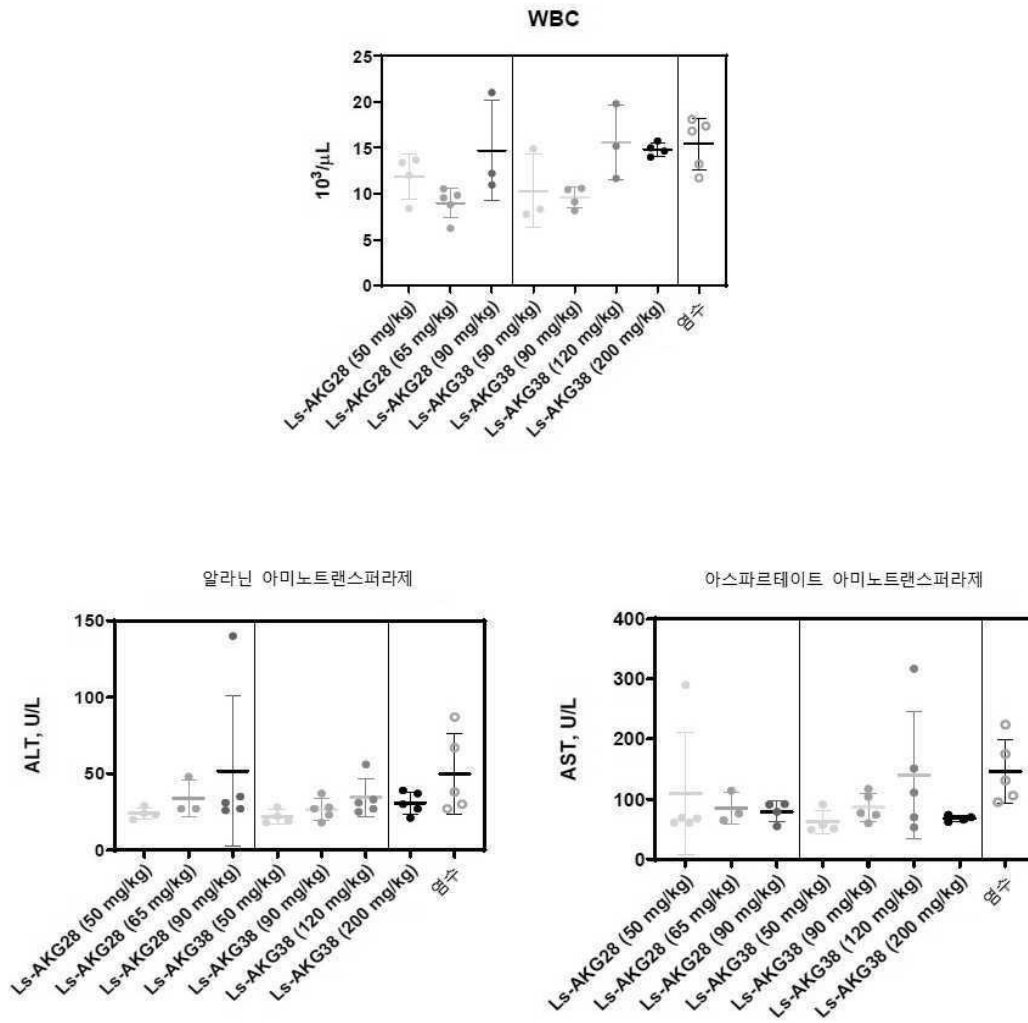
도면13b



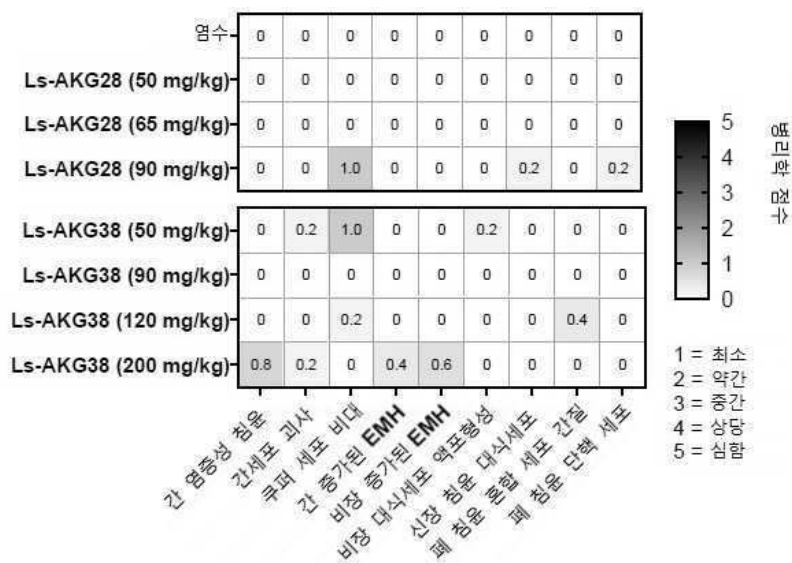
도면13ca



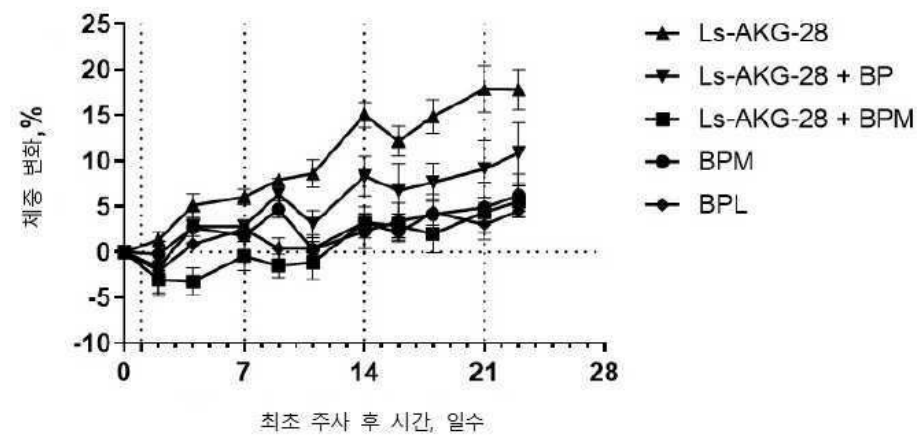
도면13cb



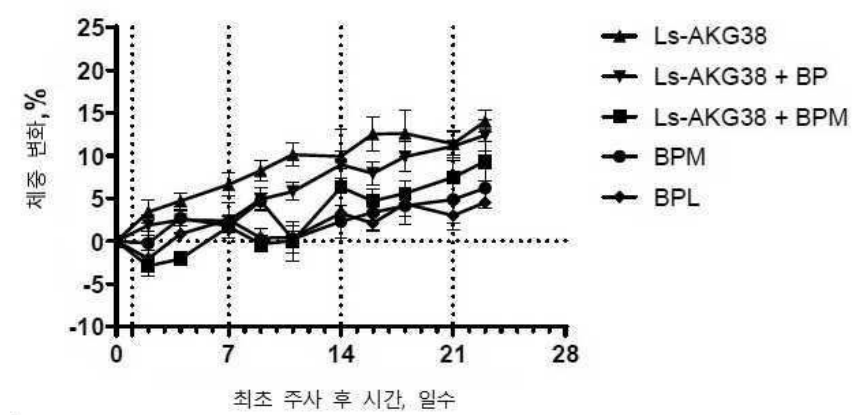
도면13d



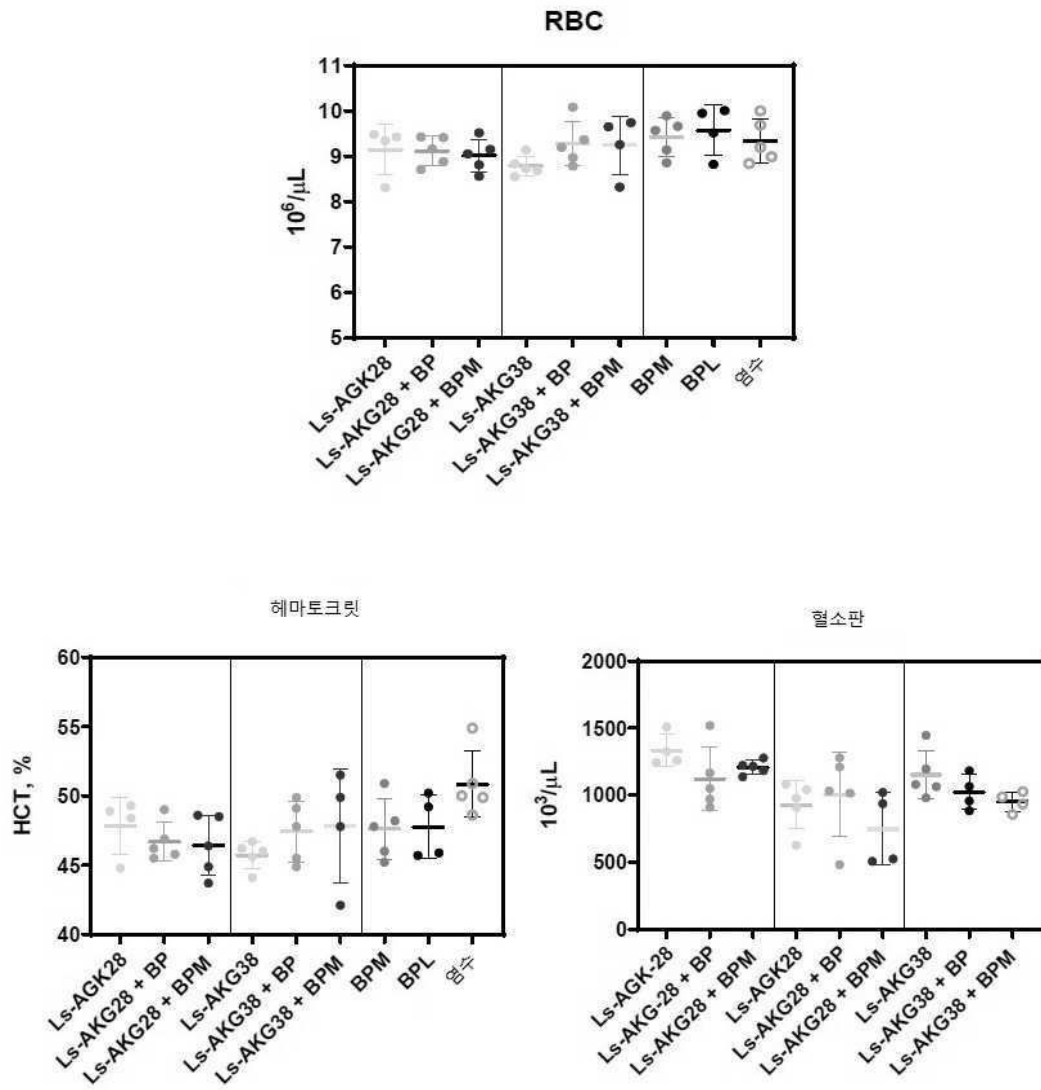
도면14a



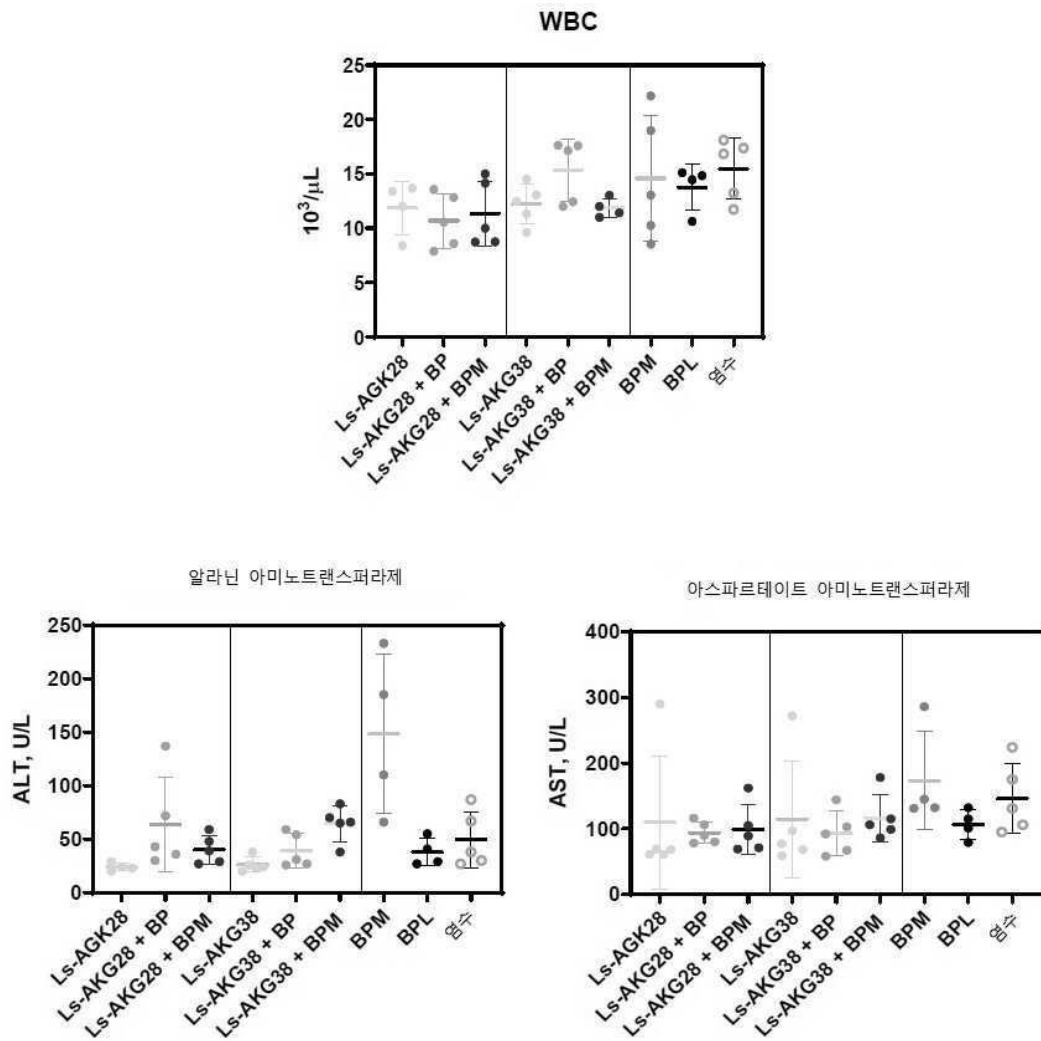
도면14b



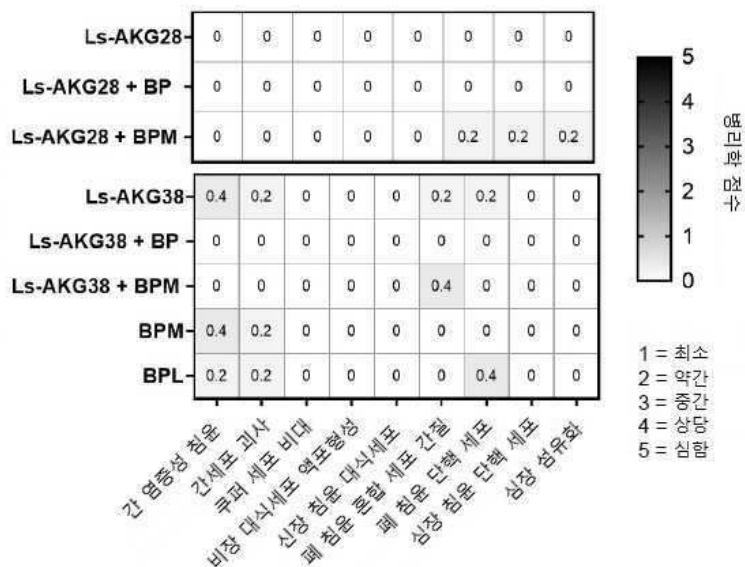
도면14ca



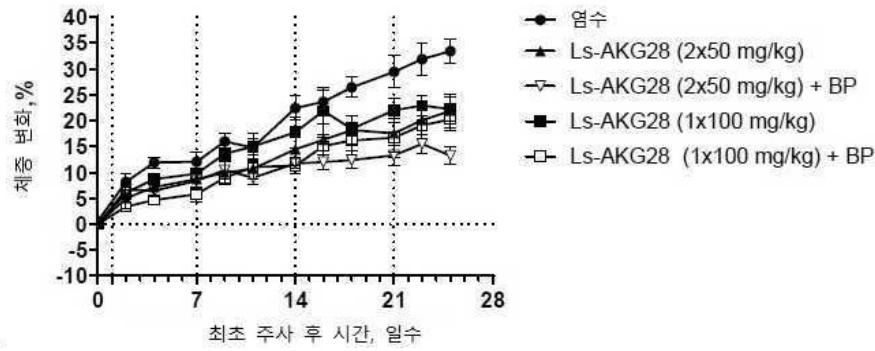
도면14cb



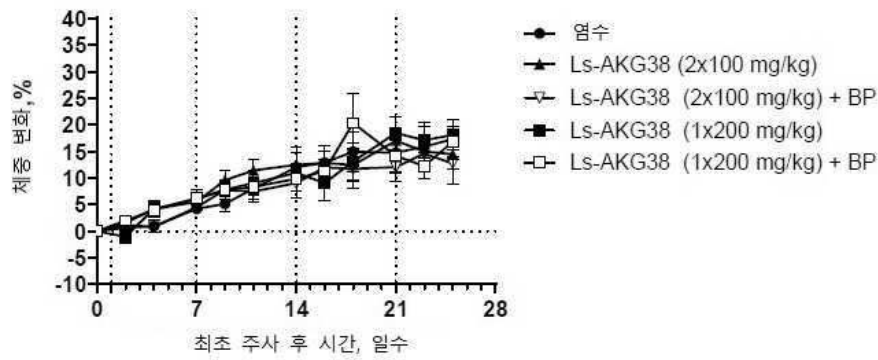
도면14d



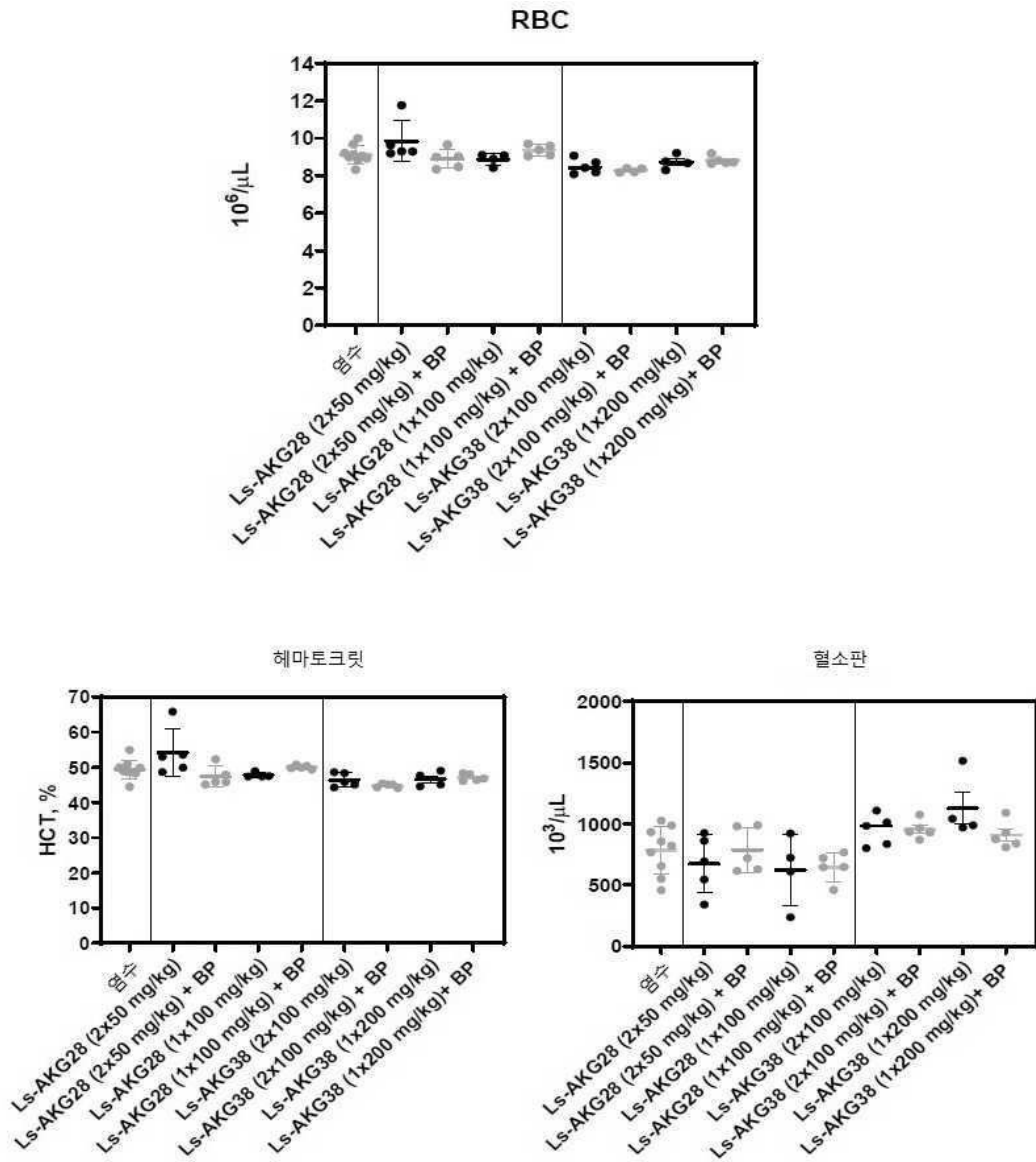
도면15a



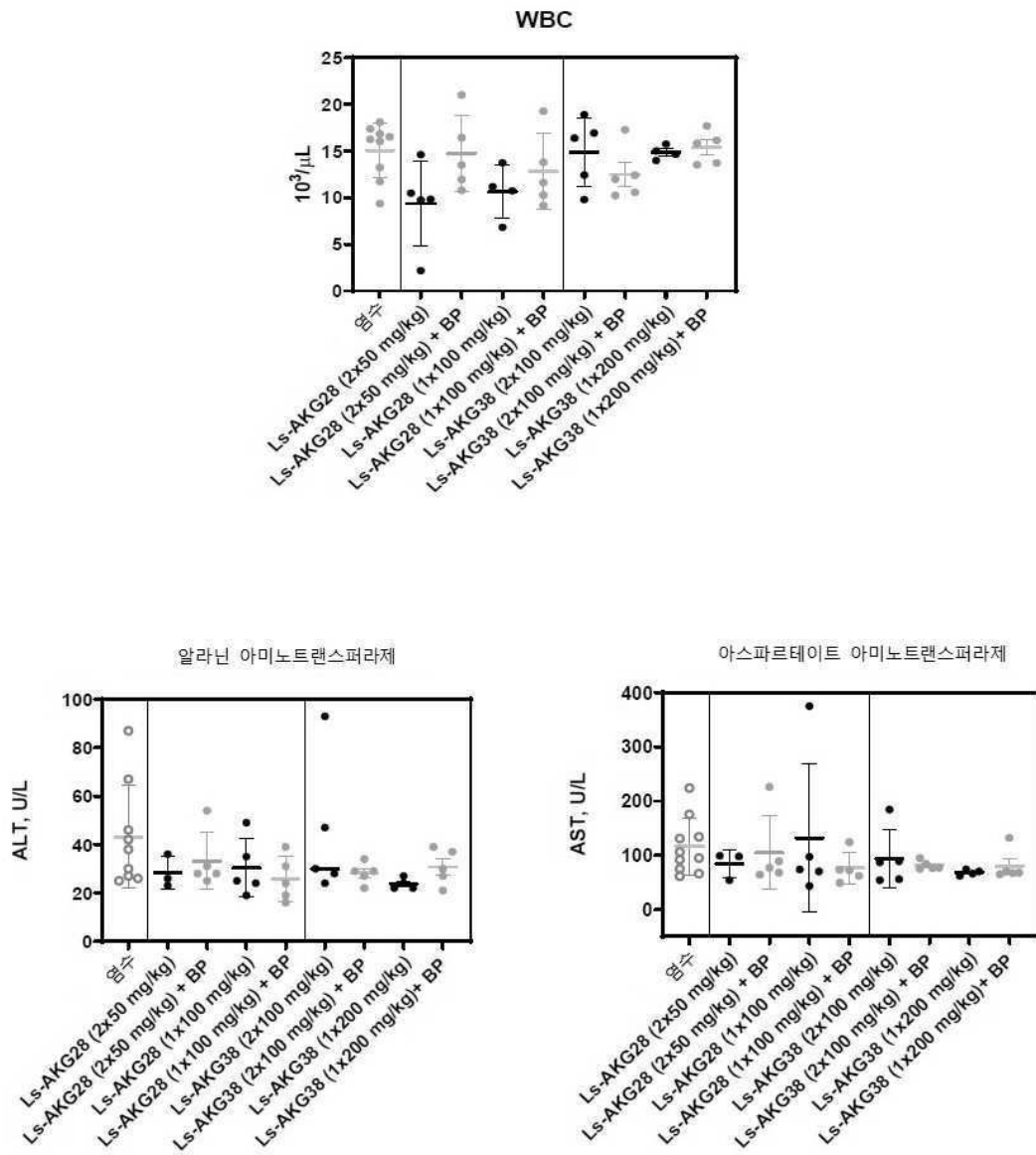
도면15b



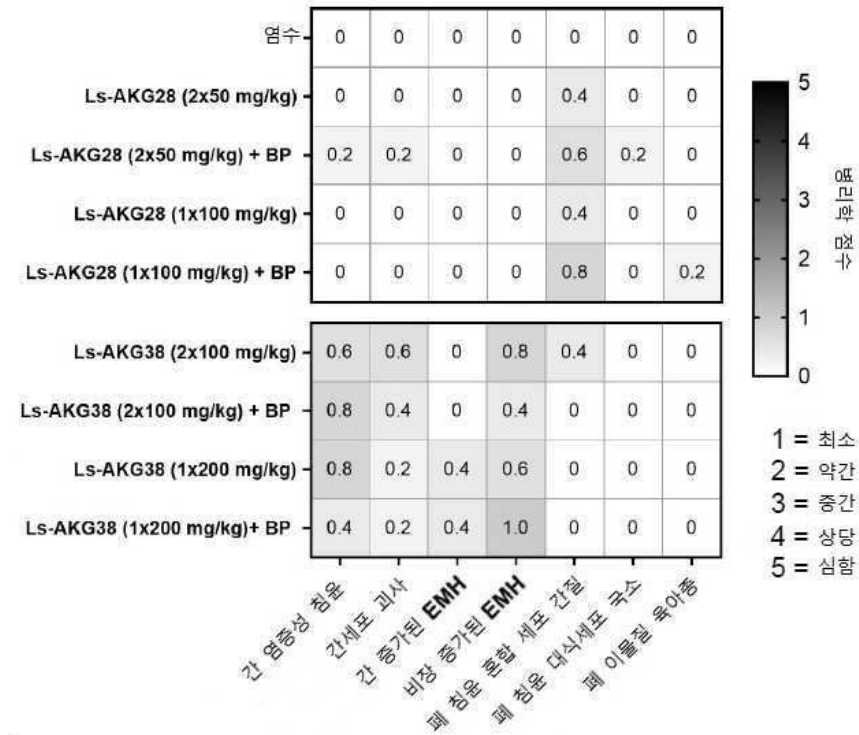
도면15ca



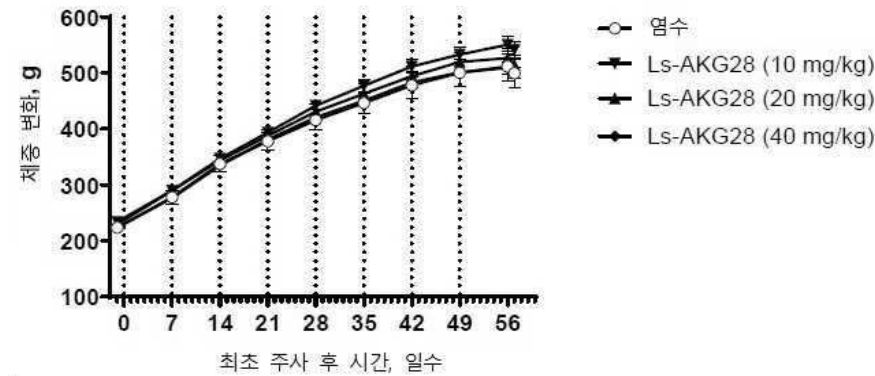
도면15cb



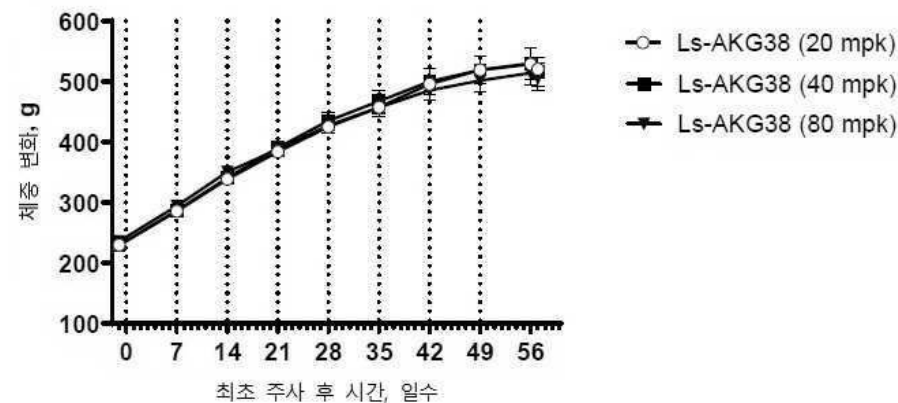
도면15d



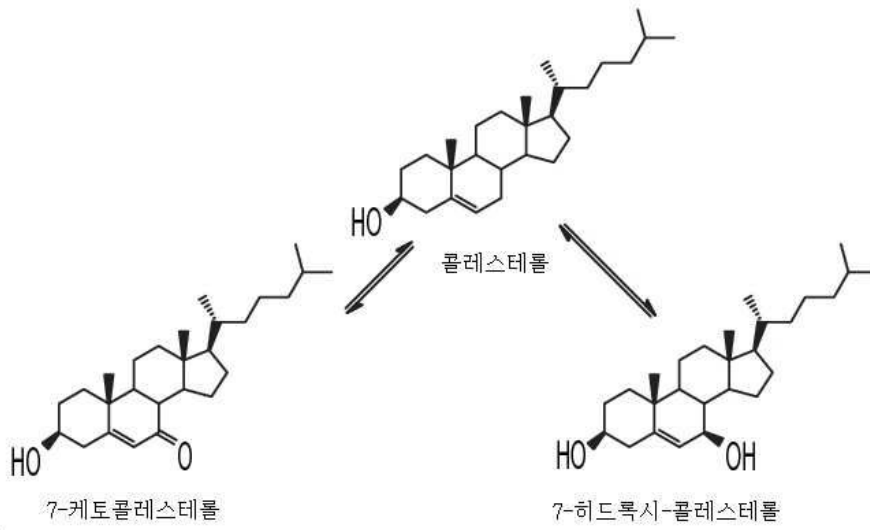
도면16a



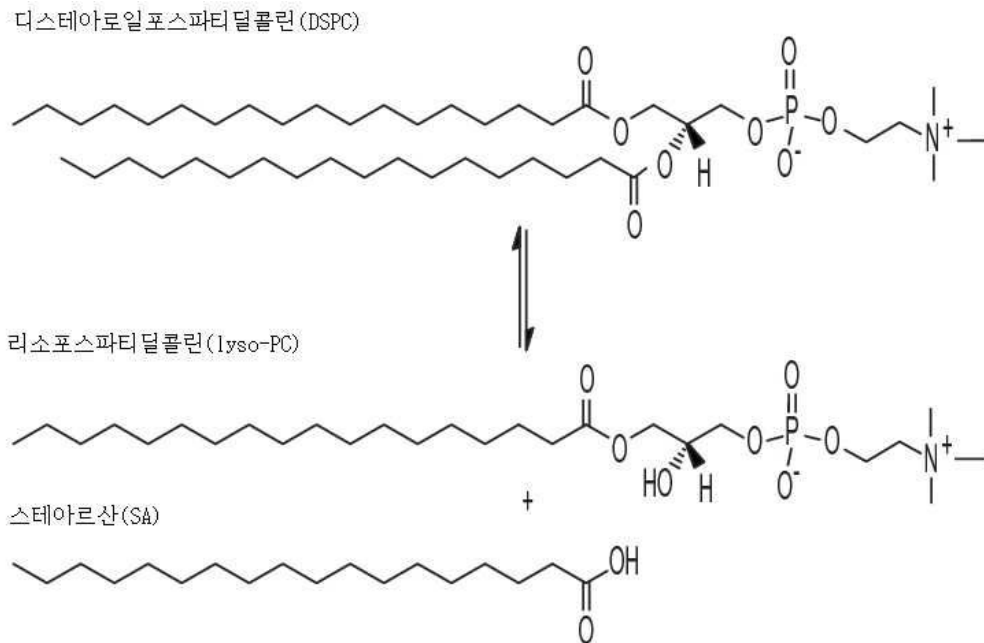
도면16b



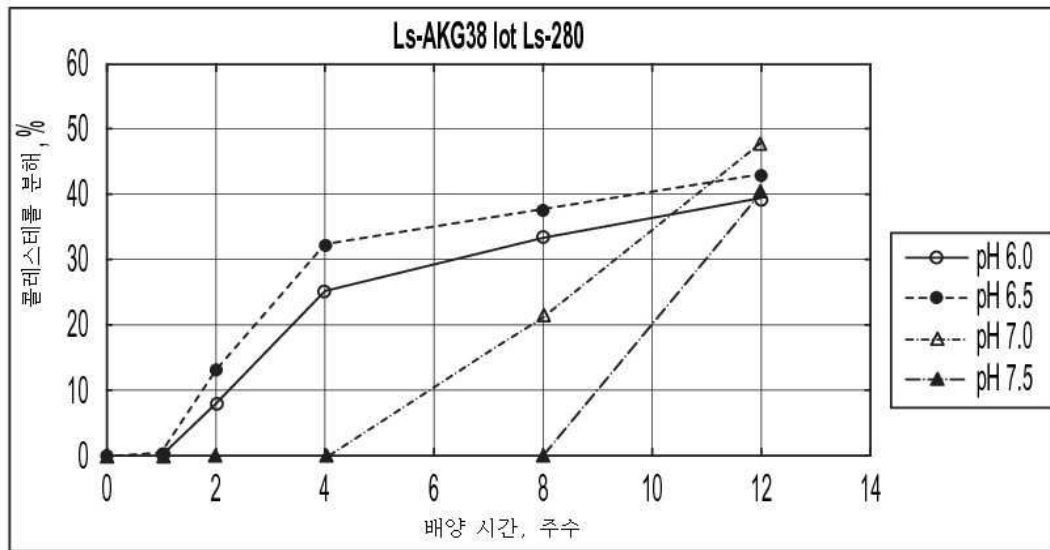
도면17



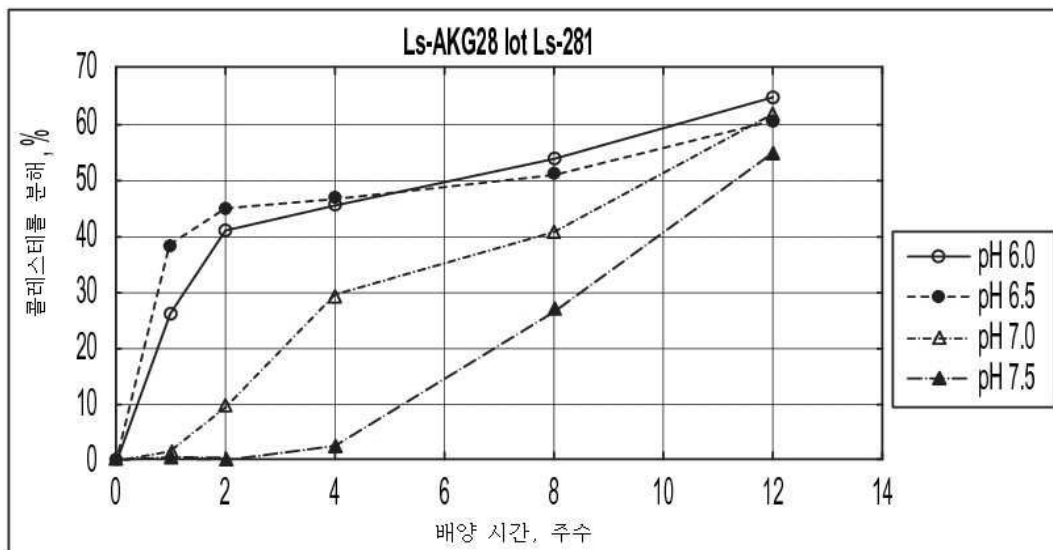
도면18



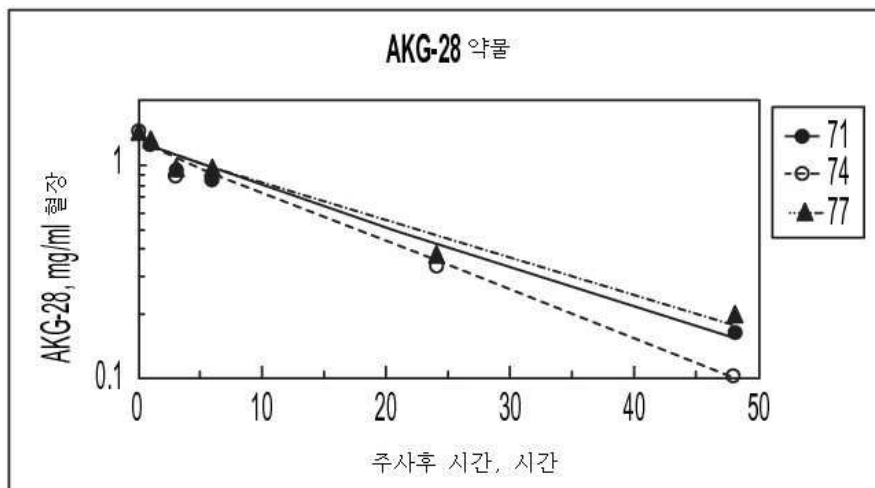
도면19a



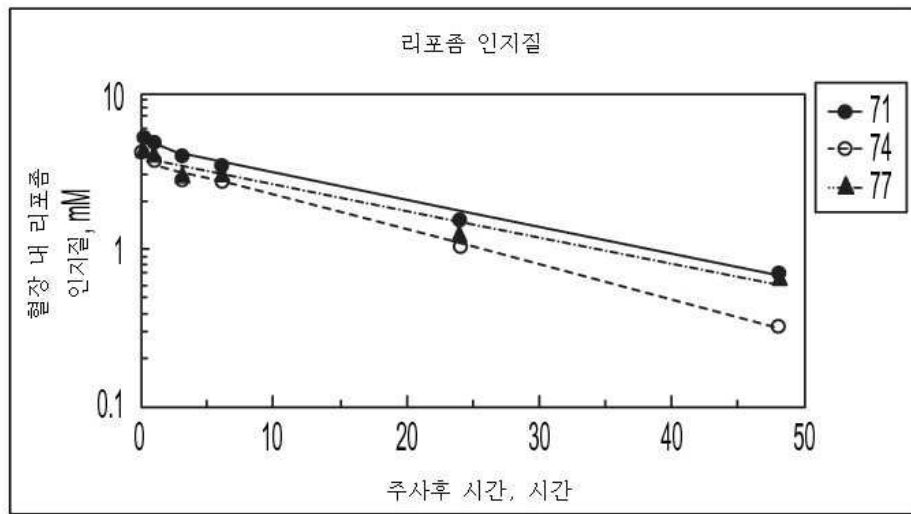
도면19b



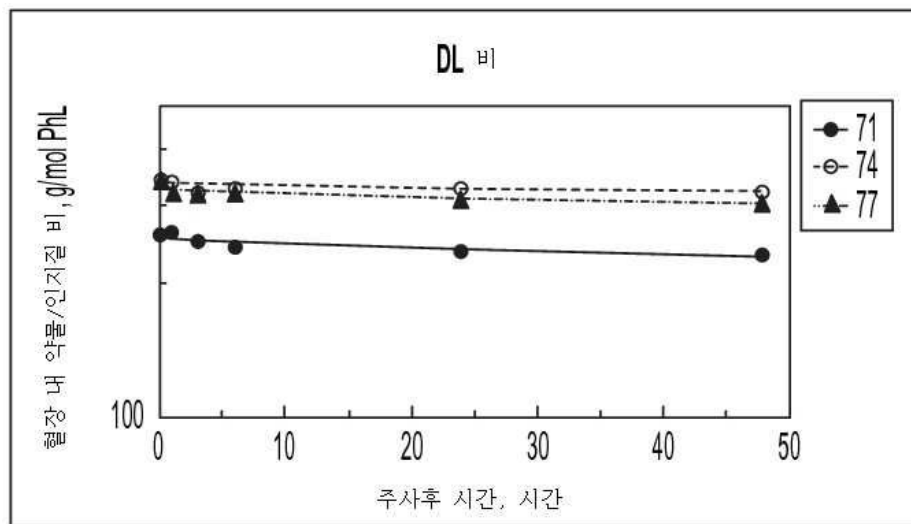
도면20a



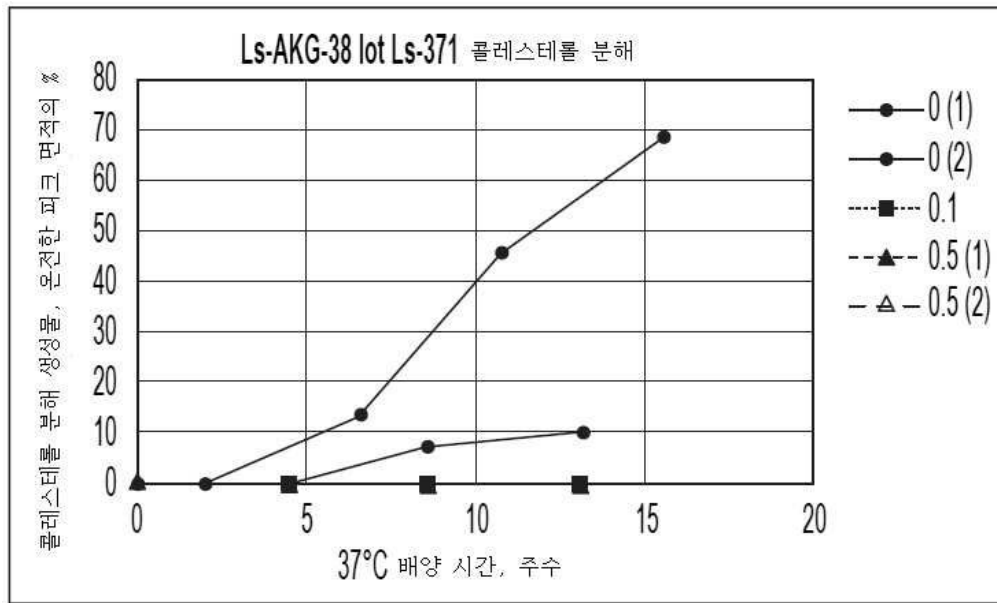
도면20b



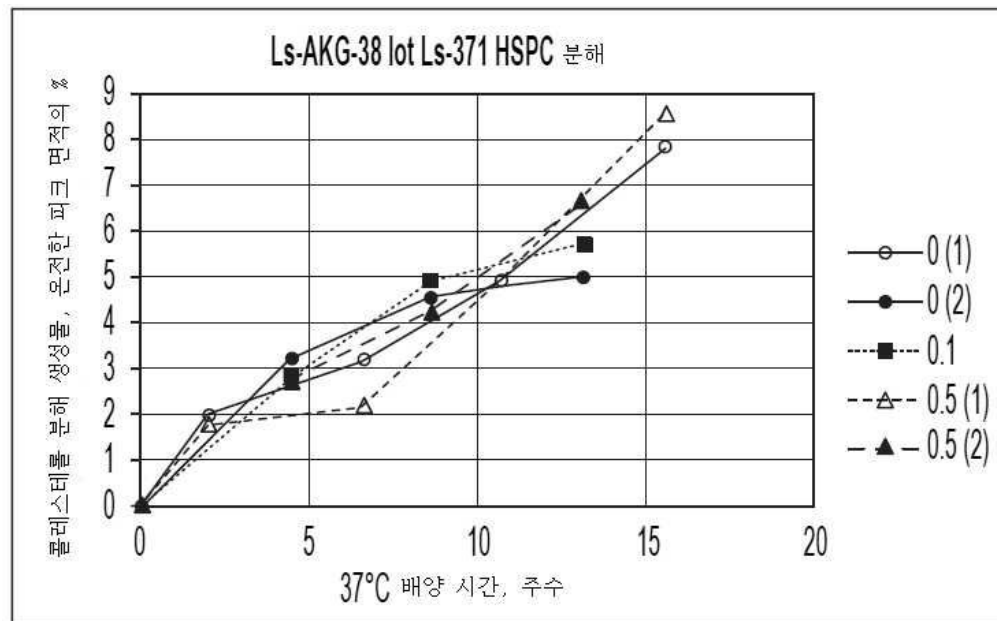
도면20c



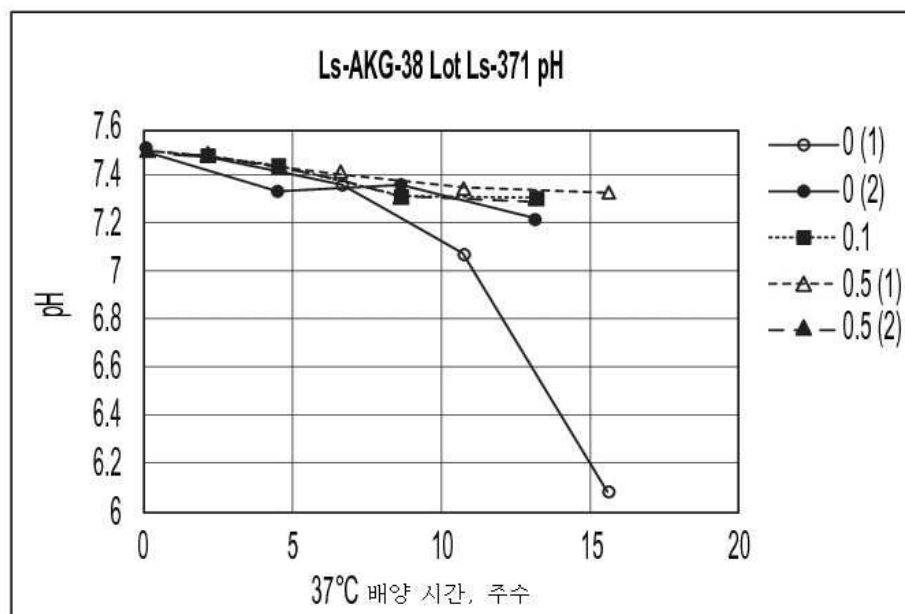
도면21



도면22

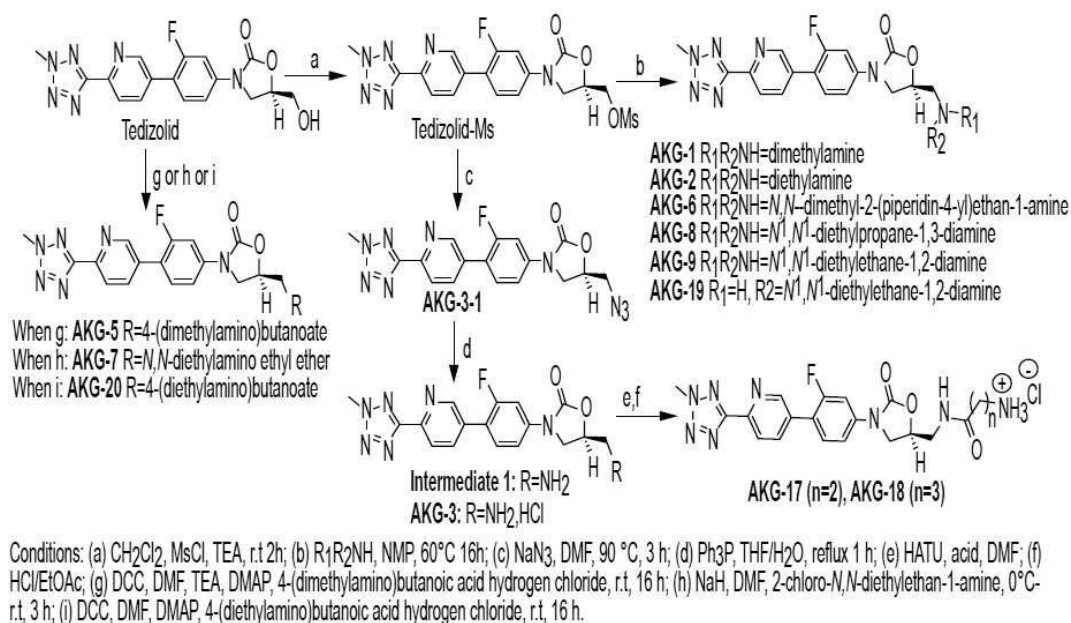


도면23



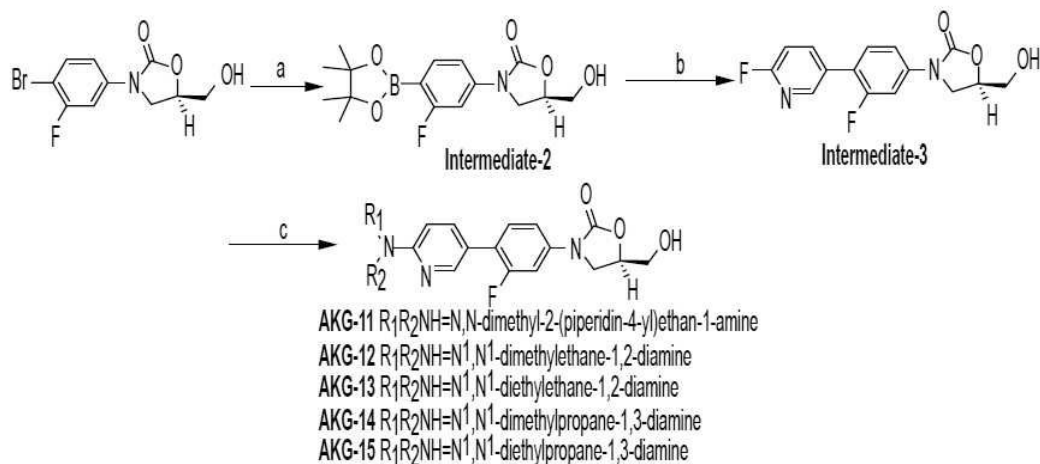
도면24

Scheme 1



도면25

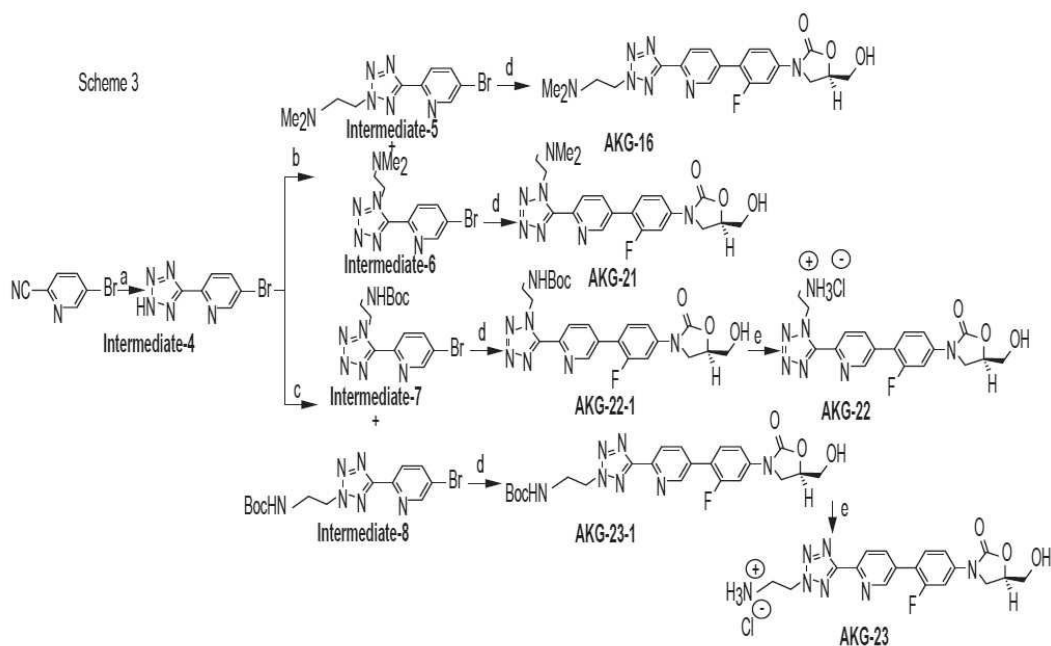
Scheme 2



Conditions: (a) Bis(pinacolato)diboron, KOAc, $(Ph_3P)_2PdCl_2$, dioxane, 90 °C; (b), 5-bromo-2-fluoropyridine, K_3PO_4 , $(dppf)PdCl_2$, dioxane/ H_2O , 90 °C, 16 h; (c), R_1R_2NH , DMAP, NMP, 100 °C, 16 h.

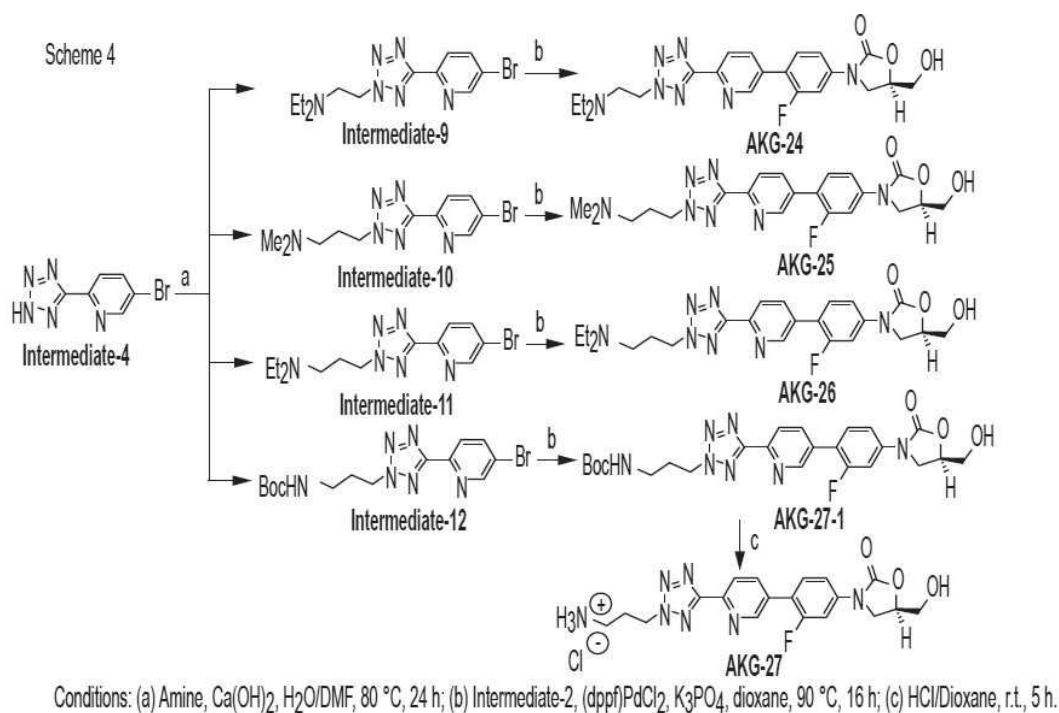
도면26

Scheme 3



Conditions: (a) $NaN_3/ZnCl_2$, pyridine, 120 °C, 2 h; (b) (2-Bromoethyl)dimethylamine hydrobromide, $Ca(OH)_2$, H_2O/DMF , 80 °C, 24 h; (c) $NHBoc(CH_2)_2Br$, $Ca(OH)_2$, H_2O/DMF , 80 °C, 24 h; (d) Intermediate-2, $(dppf)PdCl_2$, K_3PO_4 , dioxane 90 °C, 16 h; (e) $HCl/Dioxane$, r.t., 5 h.

도면27



도면28

