(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992484 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.25

(22) Дата подачи заявки
2018.04.19

(51) Int. Cl. *A61K 47/61* (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ С ЗАМЕДЛЕННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ, СОДЕРЖАЩИЕ БЕССЛЕДНЫЕ ЛИНКЕРЫ

(31) **62/487,888**
(32) **2017.04.20**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2018/052740**
(87) **WO 2018/193408 2018.10.25**

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Адамс Кристофер М., Эйприл Мириам, Фазал Танзина, Форстер Корнелия Джутта, Холл Эдвард Чарльз, Ли Камерон Чак-Мунн (US)

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

(57) В данном документе описаны системы доставки лекарственных средств для обеспечения доставки биологически активных средств, содержащих первичные или вторичные аминогруппы или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, их фармацевтически приемлемые соли, реагенты для доставки лекарственных средств, связанные с ними, фармацевтические композиции, содержащие системы доставки лекарственных средств, и применение систем доставки лекарственных средств в качестве терапевтических средств с замедленным высвобождением.

201992484 A1

201992484 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559029EA/026

СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ С ЗАМЕДЛЕННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ, СОДЕРЖАЩИЕ БЕССЛЕДНЫЕ ЛИНКЕРЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В данном документе описаны системы доставки лекарственных средств для обеспечения доставки биологически активных средств, содержащих первичные или вторичные аминогруппы или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, их фармацевтически приемлемые соли, реагенты для доставки лекарственных средств, связанные с ними, фармацевтические композиции, содержащие системы доставки лекарственных средств, и применение систем доставки лекарственных средств в качестве терапевтических средств с замедленным высвобождением.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Модулирование физико–химических или фармакокинетических свойств лекарственного средства in vivo может зависеть от конъюгирования лекарственного средства с носителем. В частности, конъюгирование лекарственного средства с носителем часто используется в качестве способа увеличения продолжительности терапевтического действия, уменьшения максимальной концентрации лекарственного средства после введения или для обеспечения локальной доставки лекарственного средства в желаемую ткань или компартмент или для комбинации этих целей. Как правило, носители в системах доставки лекарственных средств (a) применяются посредством нековалентного связывания с лекарственным средством, составленным с помощью физико–химических методов в смеси растворителя и носителя, либо (b) связаны посредством ковалентного присоединения реагента–носителя с функциональной группой, присутствующей в лекарственном средстве.

В случае с подходами, не предусматривающими ковалентное связывание, требуется высокоэффективное инкапсулирование лекарственного средства для предотвращения неконтролируемого взрывного высвобождения лекарственного средства, которое может происходить при первоначальном введении системы носитель/лекарственное средство либо в ходе разложения носителя после введения субъекту. Для ограничения диффузии несвязанной водорастворимой молекулы лекарственного средства требуются сильные контакты, обеспечиваемые ван–дер–ваальсовыми взаимодействиями, которые часто опосредованы гидрофобными компонентами, образованием водородных связей или электростатическим связыванием, опосредованным заряженными компонентами. Многие конформационно чувствительные лекарственные средства, такие как белки, пептиды или антитела, становятся нефункциональными в ходе процесса инкапсулирования и/или в ходе последующего хранения инкапсулированного лекарственного средства.

В качестве альтернативы, лекарственное средство может быть ковалентно конъюгировано с носителем посредством стабильного линкера или посредством обратимо

связанного линкерного компонента, от которого лекарственное средство высвобождается. Если лекарственное средство стабильно связано с носителем, такой конъюгат должен проявлять остаточную активность, достаточную для того, чтобы оказывать фармацевтический эффект, и при этом конъюгат постоянно находится в активной форме.

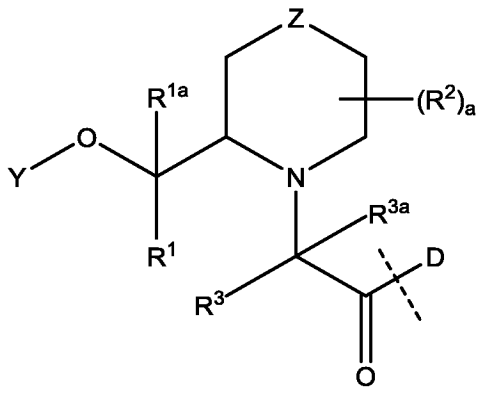
Если лекарственное средство конъюгировано с носителем посредством расщепляемого линкера, то такие конъюгаты обычно называют лекарственными средствами, связанными с носителем. Этот подход может быть применен к биологически активным молекулам различных классов и размеров от низкомолекулярных органических молекул, природных продуктов, до антител и их аналогов, белков, пептидов и т. п. Важным аспектом в случае с лекарственными средствами, связанными с носителем, является механизм высвобождения лекарственного средства из носителя. Механизм высвобождения может быть ферментативным, pH–зависимым или происходить посредством автономного гидролиза. Как правило, высвобождение лекарственного средства нелегко контролировать и трудно поддерживать в течение длительных периодов времени.

По–прежнему существует потребность в новых системах доставки лекарственных средств, подходящих для замедленного высвобождения биологически активных компонентов в терапевтических целях. В данном документе описаны системы доставки лекарственных средств, которые обеспечивают замедленное высвобождение биологически активных компонентов для терапевтически значимых применений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе описаны системы доставки лекарственных средств, содержащие биологически активные молекулы, носители и бесследные линкеры, которые обеспечивают возможность связывания биологически активной молекулы с носителем, фармацевтические композиции, содержащие системы доставки лекарственных средств, и применение систем доставки лекарственных средств в качестве терапевтических средств с замедленным высвобождением.

Один из вариантов осуществления, описанных в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, C(O)C_1–C_8алкил, C(O)N(H)C_1–C_8алкил, C(O)OC_1–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

В одном аспекте D содержит белок, пептид, полипептид, нуклеиновую кислоту, олиго– или полинуклеотид, углевод, олиго– или полисахарид или малую молекулу, каждый из которых содержит по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, и при этом малая молекула имеет молекулярную массу от 100 г/моль до приблизительно 2000 г/моль.

В другом аспекте D содержит белок, пептид, нуклеиновую кислоту, Fab, scFv, моноклональное антитело или малую молекулу. В другом аспекте D содержит бролуцизумаб (D1) (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), D4 (SEQ ID NO:7), абциксимаб, адалимумаб, афлиберцепт, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб, канакинумаб, цертолизумаб, цетуксимаб, даклизумаб, даратумумаб, денозумаб, экулизумаб, эфализумаб, голимумаб, ибритумомаб, инфликсимаб, ипилимумаб, лампализумаб, муромонаб–CD3, натализумаб, ниволумаб, офатумумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, пегплераниб, пембролизумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастузумаб, устекинумаб или ведолизумаб или их комбинации. В другом аспекте D содержит один или несколько биологически активных пептидов, в том числе без ограничения натрийуретический пептид C–типа (CNP), предсердный натрийуретический пептид (ANP), эксендин–4, инсулин, адренокортикотропный гормон, адреномедуллин, адропин, ω–агатоксин, белок, родственный агути, ангиотензин(ангиотензины), апелин 12, апелин 13, апелин 36 или их производные, брадикинин, кальцитонин, кокаин/амфетамин–регулируемый транскрипт (CART), кортикотропин–высвобождающий фактор (CRF), α–дефензины, β–дефензины, пептид, индуцирующий дельта–сон (DSIP), эластазоспецифический ингибитор (элафин), эндокинины, эндоморфины, эндорфины, эндотелины, эксендин, активный фрагмент фибронектина, галанин, галаниноподобный пептид, большой гастрин, гастрин I, пептид, родственный гастрину, желудочный ингибирующий полипептид, гастрин–высвобождающий пептид, грелин, дезацилгрелин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид, фактор, высвобождающий гормон роста, GsMTx–4 Grammostola spatulata, гуанситоксин–1E, гуанилин, гепцидин 1, гепцидин/LEAP–1, гистатин 5, человеческий гормон роста, гуманин, хувентоксин, ибериотоксин, императоксин A, инсулиноподобные факторы роста, интермедин, IRL 1620, соединяющий пептид, калиотоксин, кисспептины, куртоксин, липотропин, фактор роста клеток печени, антимикробный пептид 2, экспрессирующийся в печени, гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон, лизенин, LL–37, маргатоксин, мастопаран, пептид, дегранулирующий тучные клетки,

меланиноконцентрирующий гормон, меланоцитостимулирующий гормон, фактор, ингибирующий высвобождение MSH, мидкин, кардиовозбуждающий пептид моллюсков, пептид, ингибирующий толерантность к морфину, мотилин, мускариновые токсины, нейроэндокринный регуляторный пептид–2, нейрокинин A, нейрокинин B, нейромедины, нейроностатин–13, нейропептиды, нейротензин, нейротоксин NSTX–3, ноцистатин, ноцицептин, обестатин, опиоидные пептиды (энкефалины, эндорфины, BAM–12P, казоморфин, динорфины, эндоморфины, неоэндорфины, ноцицептин), орексин–A/–B, орфанин, остеокальцин, окситоцин, панкреастатин, паратиреоидный гормон, белок, родственный паратиреоидному гормону, пептид 234, пептид гистидин–метионин, пептид T, пептид YY, физалемин, полипептиды, активирующие аденилатциклазу гипофиза, тромбоцитарный фактор–4, плектазин, плейотропин, проадреномедуллин, пролактин–высвобождающий пептид, псалмотоксин 1, пуротоксин–1, пироглутамилированный RF–амидный пептид, ренин, пептид 1, родственный RF–амидам, пептид 3, родственный RF–амидам, салузин–α/β, сарафотоксины, пептид, связанный с шизофренией, сциллатоксин, секретин, серелаксин, сывороточный фактор тимуса, ингибитор 1 натрий–калиевой АТФазы, соматостатин, токсин Stichodactyla, субстанцию K, стресскопин, пептид, родственный стресскопину, субстанцию P, тахикинины, SNX–482 тарантула, ProTx–I тарантула, ProTx–II тарантула, тертиапин, титьютоксин Ka, тиреотропин–высвобождающий гормон, тафтсин, урогуанилин, изомер урогуанилина A или B, урокортин, урокортин II, уротензин II, пептид, родственный уротензину II, вазоактивный интестинальный пептид, вазопрессин, вазотоцин, пептид, ингибирующий репликацию вируса, ксенин или их комбинации.

В другом аспекте D представляет собой малую молекулу, имеющую молекулярную массу от приблизительно 100 г/моль до приблизительно 2000 г/моль или меньше, которая связана с R посредством первичной аминогруппы, вторичной аминогруппы или атома азота кольца в азагетероарильном кольце.

В другом аспекте малая молекула содержит [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации.

В другом аспекте R^1 представляет собой водород или метил, R^{1a} представляет собой водород или метил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют циклопропан–1,1–диильную группу. В другом аспекте каждый из R^3 и R^{3a} представляет собой водород. В другом аспекте X представляет собой O. В другом аспекте Y представляет собой $C(O)R^4$, и R^4 представляет собой C_1–C_6алкил, C_3–C_6циклоалкил или C_1–C_2алкокси–C_1–C_2алкил. В другом аспекте R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–

метилциклопропил или метоксиметил. В другом аспекте Y представляет собой $SiR^5R^6R^7$; каждый из R^5 и R^6 представляет собой метил, этил, пропил или изопропил; и R^7 представляет собой C_1–C_4алкил, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, изобутокси, вторбутокси, 2–этоксиэтокси, 2–изопропоксиэтокси, тетрагидропиранилокси или –$(OCHR^3CH_2)_bO$–C_1–C_4алкил, где b равняется 2, 3 или 4.

В другом аспекте Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер Q–$[Sp–Q]_h$–Q;

Q в каждом случае независимо выбран из связи, O, C(O), N(H), N(C_1–C_4алкила), C(O)NH, C(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O), N(C_1–C_4алкил)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1–C_4алкил)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O)N(H), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1–C_4алкила), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(C_1–C_4алкила), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, N(H)$S(O)_2$, N(C_1–C_4алкил)$S(O)_2$, $S(O)_2$N(H), $S(O)_2$N(C_1–C_4алкила), C_1–C_2алкил–C(O)N(H), N(H)C(O)C_1–C_2алкила, C_1–C_2алкил–C(O)O, OC(O)C_1–C_2алкила, 1,2,3–триазола, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, C_1–C_4алкил–$P(O)_2$–O или O–$P(O)_2$–C_1–$_4$алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенных C_1–C_{20}алкила, C_2–C_{20}алкенила, C_2–C_{20}алкинила, $[W–O]_g$, C_1–C_8алкил–$[O–W]_g$, $[O–W]_g$–O–C_1–C_8алкила, C_1–C_8алкил–$[O–W]_g$–O–C_1–C_8алкила, олигопептида;

h представляет собой целое число от 1 до 20;

g представляет собой средневзвешенное число от приблизительно 2 до приблизительно 50;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, C(O)C_1–C_8алкил, C(O)OC_1–C_8алкил, C(O)N(H)C_1–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

В другом аспекте Z представляет собой NR^9; R^9 представляет собой C(O)–$(CH_2)_n$–Q–A или –C(O)$(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$–Q–A; n представляет собой целое число от 1 до 8, и A представляет собой R^{10} или R^{11}. В другом аспекте R^{10} представляет собой азидил, алкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}циклоалкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}гетероциклоалкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}циклоалкенил, норборнил, замещенный или незамещенный винилкарбоксил, замещенный или незамещенный винилсульфонил, замещенный или незамещенный C_2–C_8алкенил, амино, тиол, замещенный или незамещенный C_1–C_8карбоксил, замещенный или незамещенный C_1–C_8карбонил, –O–NH_2, гидразидил, малеимид, альфа–галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил,

лизин, глутамин, циклодекстрин или адамантанил. В другом аспекте R^{10} содержит реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем. В другом аспекте R^{11} является биоразлагаемым. В другом аспекте R^{11} содержит полимер или сшитый полимер. В другом аспекте R^{11} содержит гидрогель, содержащий один или несколько сшитых полимеров. В другом аспекте R^{11} содержит полимер, сшитый полимер или гидрогель, содержащий одно или несколько из гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиэтиленоксида, полипропиленоксида, полиглутамата, полилизина, полисиаловой кислоты, поливинилового спирта, полиакрилата, полиметакрилата, полиакриламида, полиметакриламида, поливинилпирролидона, полиоксазолина, полииминокарбоната, полиаминокислоты, гидрофильного сложного полиэфира, полиамида, полиуретана, полимочевины, декстрана, агарозы, ксилана, маннана, каррагинана, альгината, желатина, коллагена, альбумина, целлюлозы, метилцеллюлозы, этилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксиэтилированного крахмала, хитозана, нуклеиновых кислот, их производных, их сополимеров или их комбинаций. В другом аспекте R^{11} содержит гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, сшитый гидрогель на основе гиалуроновой кислоты, сшитый гидрогель на основе полиэтиленгликоля или их комбинации. В другом аспекте R^{11} содержит гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль. В другом аспекте R^{11} содержит гидрогель, содержащий сшитую гиалуроновую кислоту или сшитый полиэтиленгликоль. В другом аспекте гиалуроновая кислота или полиэтиленгликоль функционализированы по меньшей мере одной функциональной группой, содержащей азидил, алкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}циклоалкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}гетероциклоалкинил, C_7–C_{12}циклоалкенил, норборнил, винилкарбоксил, винилсульфонил, C_2–C_8алкенил, амино, тиол, C_1–C_8карбоксил, C_1–C_8карбонил, –O–NH2, карбогидразид, малеимид, альфа–галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин, адамантанил или их комбинации. В другом аспекте R^{11} содержит гидрогель, содержащий сшитую гиалуроновую кислоту, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну боковую цепь, выбранную из $–NH(W1)(O(W1))_d–V$, где W1 представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи; d представляет собой среднечисловое значение от 0 до 500; и V представляет собой подходящую функциональную группу, содержащую азидил, алкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}циклоалкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}гетероциклоалкинил, C_7–C_{12}циклоалкенил, норборнил, винилкарбоксил, винилсульфонил, C_2–C_8алкенил, амино, тиол, C_1–C_8карбоксил, C_1–C_8карбонил, –O–NH2, карбогидразид, малеимид, альфа–галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин или адамантанил. В одном аспекте V представляет собой азид.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет

собой способ получения состава на основе сшитого носителя, при этом способ включает: (a) функционализацию молекулы носителя R^{11}; (b) получение реакционноспособного сшивающего средства и (c) осуществление реакции функционализированной молекулы носителя с реакционноспособным сшивающим средством с образованием сшитого носителя путем инкубирования в течение от приблизительно 0,5 часа до приблизительно 48 часов при температуре от приблизительно 4°C до приблизительно 60°C. В одном аспекте молекула носителя R^{11} содержит полимер или сшитый полимер. В другом аспекте R^{11} содержит гидрогель, содержащий один или несколько сшитых полимеров. В одном аспекте молекула носителя содержит гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль. В другом аспекте молекулу носителя функционализируют азидными, сульфгидрильными, амино–, аминокси– ($O–NH_2$) или альдегидными компонентами с получением реакционноспособных функциональных групп для сшивания. В другом аспекте получение реакционноспособного сшивающего средства включает осуществление реакции полиэтиленгликоля с 1–((трет–бутоксикарбонил)амино)циклопропан–1–карбоновой кислотой, 3–((трет–бутоксикарбонил)амино)пропановой кислотой, 1–(трет–бутоксикарбонил)пиперидин–4–карбоновой кислотой, 2–(1–(((трет–бутоксикарбонил)амино)метил)циклопропил)уксусной кислотой, 2–метил–3–((трет–бутоксикарбонил)амино)пропановой кислотой или 7–((трет–бутоксикарбонил)амино)гептановой кислотой и удаление защитных групп из функционализированного сложного эфира полиэтиленгликоля. В другом аспекте получение реакционноспособного сшивающего средства дополнительно включает введение по меньшей мере двух бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–илметильных групп после удаления защитных групп из функционализированного сложного эфира полиэтиленгликоля. В другом аспекте получение реакционноспособного сшивающего средства дополнительно предусматривает реакцию функционализированного сложного эфира полиэтиленгликоля с удаленными защитными группами с подходящим реагентом или реагентами для введения концевых реакционноспособных групп, таких как алкинильный, циклоалкинильный, гетероциклоалкинильный компоненты, компонент карбоновой кислоты или активированной карбоновой кислоты, альдегидный или кетонный, амино– или аминоксикомпоненты, с получением реакционноспособных функциональных групп для сшивания с молекулами носителя.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой сшитый гидрогель, который можно получить с помощью способов, описанных в данном документе. В одном аспекте молекула носителя функционализирована азидом.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ получения аддукта лекарственного средства, содержащего бесследный линкер R, связанный с биологически активным средством D, при этом способ включает: (a) получение биологически активного средства D, содержащего первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; (b) осуществление реакции биологически активного средства с бесследным линкером R,

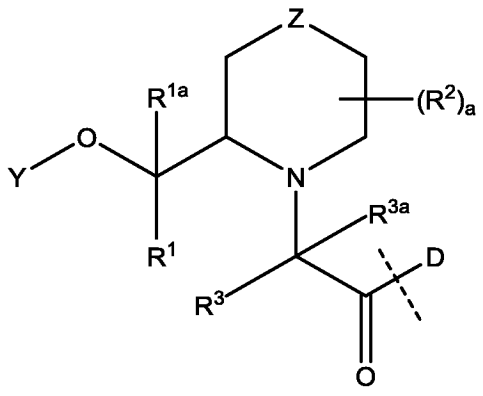
который имеет активированную карбонильную функциональную группу; и (c) очистку аддукта лекарственного средства от реагентов. В одном аспекте R определен выше в формуле (I).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой аддукт лекарственного средства, который можно получить с помощью способов, описанных в данном документе.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ получения системы доставки лекарственных средств, при этом способ включает: (a) получение молекулы носителя R^{11}, где R^{11} представляет собой сшитый гидрогель, и эта стадия, таким образом, включает способ, применяемый для получения данного гидрогеля; при этом молекула носителя может быть необязательно очищена на этой стадии; (b) отдельное конъюгирование бесследного линкера R с биологически активным средством D, содержащим первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, за счет чего, таким образом, обеспечивается образование аддукта бесследный линкер–D; при этом аддукт бесследный линкер–D может быть необязательно очищен на этой стадии, (c) конъюгирование молекулы носителя R^{11} с аддуктом бесследный линкер–D и (d) очистку системы доставки лекарственных средств от реагентов.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств, которую можно получить с помощью способов, описанных в данном документе.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения глазного нарушения, такого как дегенерация желтого пятна (т. е. влажная форма возрастной дегенерации желтого пятна), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, содержащий бролуцизумаб (SEQ ID NO:4), афлиберцепт, пегплераниб, ранибизумаб, [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

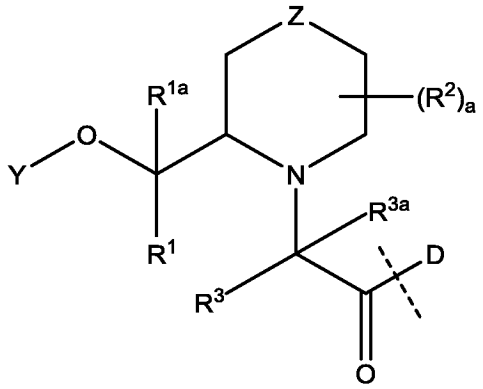
Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1$–C_4алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения скелетно–мышечных нарушений, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, содержащий D2 (SEQ ID NO:4), D3 (SEQ ID NO:5), другие инсулиноподобные факторы роста или их комбинацию; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации,

образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

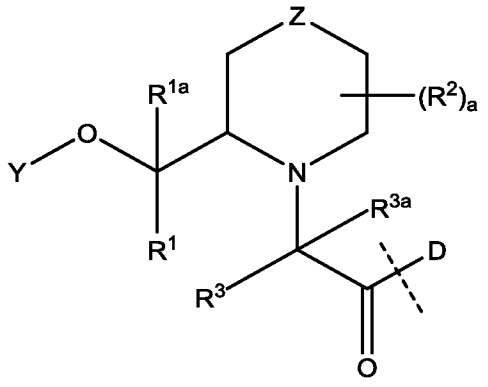
Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4$алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения сердечных нарушений, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, содержащий серелаксин или SEQ ID NO:7; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

а равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический

простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

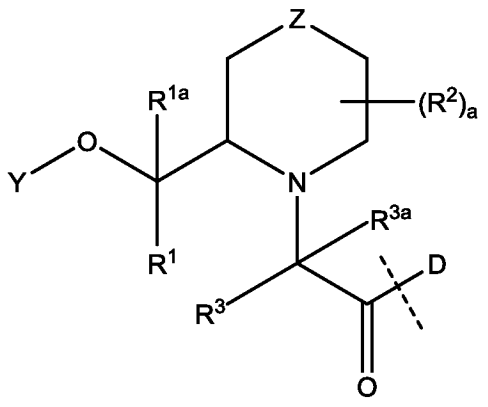
Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4$алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

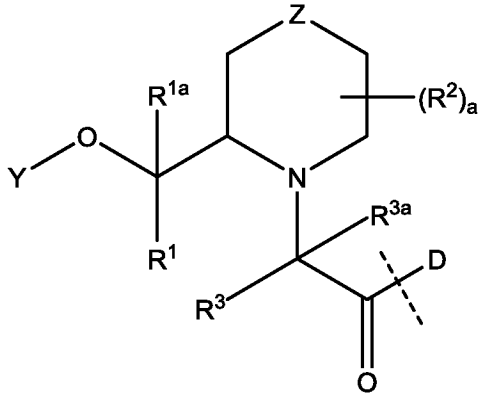
Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1$–C_4алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ увеличения периода полувыведения биологически активного компонента D, содержащего по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, при этом способ включает присоединение D к R, который представлен формулой (I), где R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–

C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

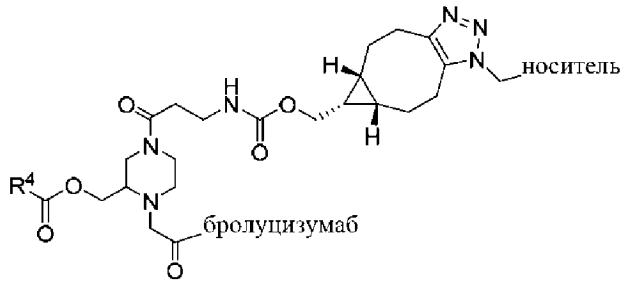
Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4$алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

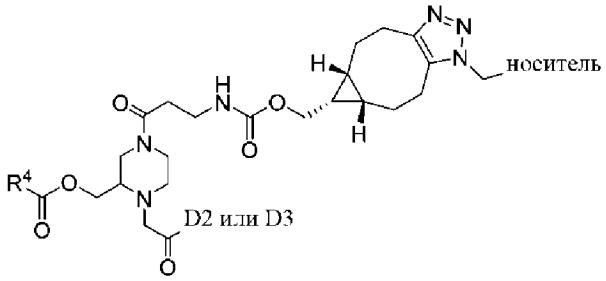
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств, имеющую формулу (III):



(III),

где бролуцизумаб содержит D1 под SEQ ID NO:4; R^4 представляет собой CH_3–, CH_3–O–CH_2–, CH_3CH_2– или $(CH_3)_2CH$–; и носитель содержит гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, гидрогель на их основе, сшитый гидрогель на их основе или их комбинации.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств, имеющую формулу (IV):



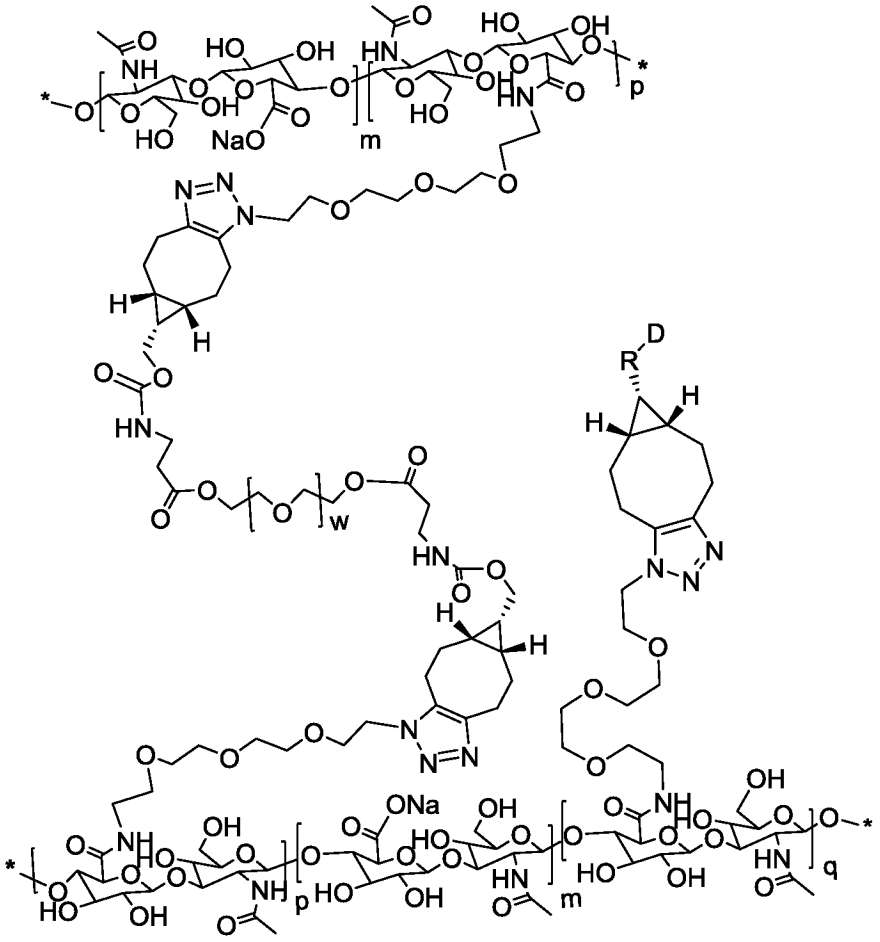
(IV),

где D2 содержит SEQ ID NO:5, D3 содержит SEQ ID NO:6; R^4 представляет собой CH_3–, CH_3–O–CH_2–, CH_3CH_2– или $(CH_3)_2CH$–; и носитель содержит гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, гидрогель на их основе, сшитый гидрогель на их основе или их комбинации.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств, содержащую D–R–R^{11}, где R содержит бесследный линкер, связанный с биологически активным средством D; D содержит биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^{11} содержит множество мономеров гиалуроновой кислоты, каждый из которых содержит случайную последовательность из нефункционализированных мономеров гиалуроновой кислоты и мономеров гиалуроновой кислоты, функционализированных одним или несколькими сшитыми мономерами гиалуроновой кислоты и одним или несколькими аддуктами лекарственного средства D–R. В одном аспекте D содержит бролуцизумаб (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), D4 (SEQ ID NO:7), серелаксин, афлиберцепт, пегплераниб, ранибизумаб, [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–

карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации. В одном аспекте бесследный линкер R является таким, как описано в данном документе.

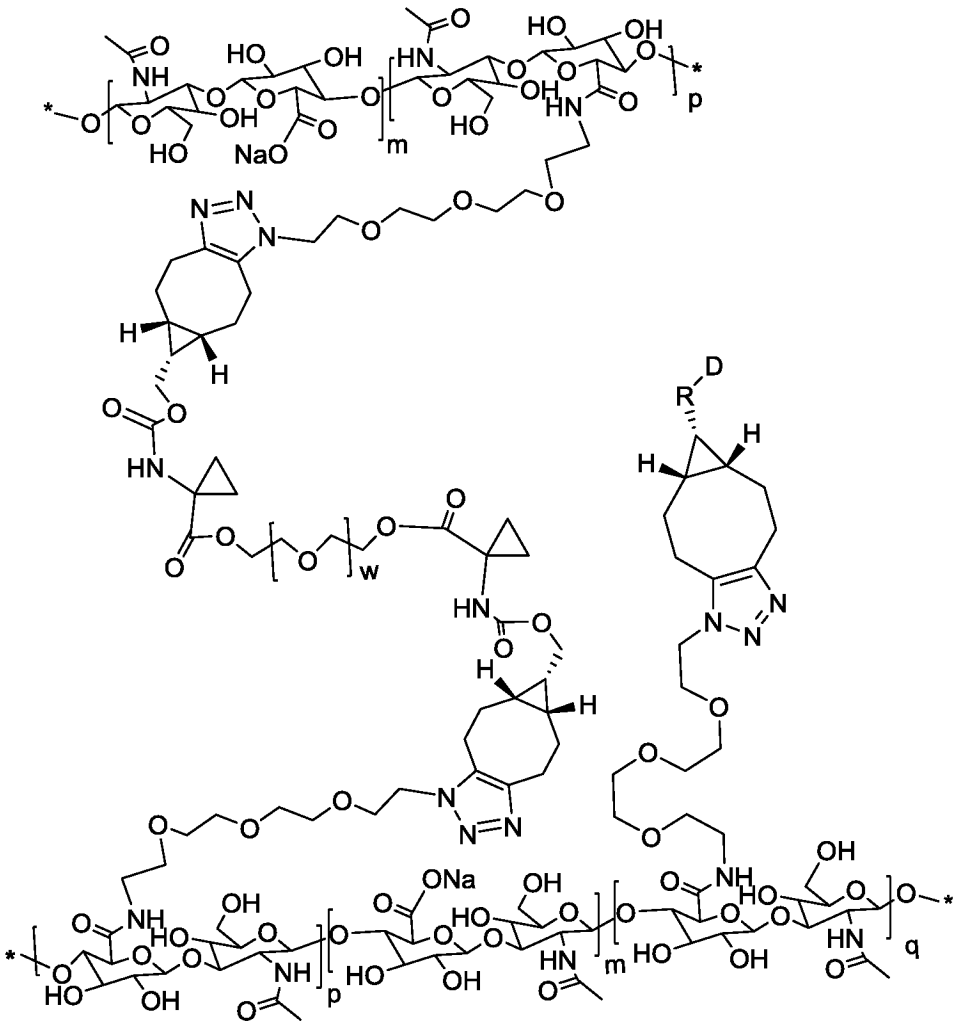
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (XXIV), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXIV).

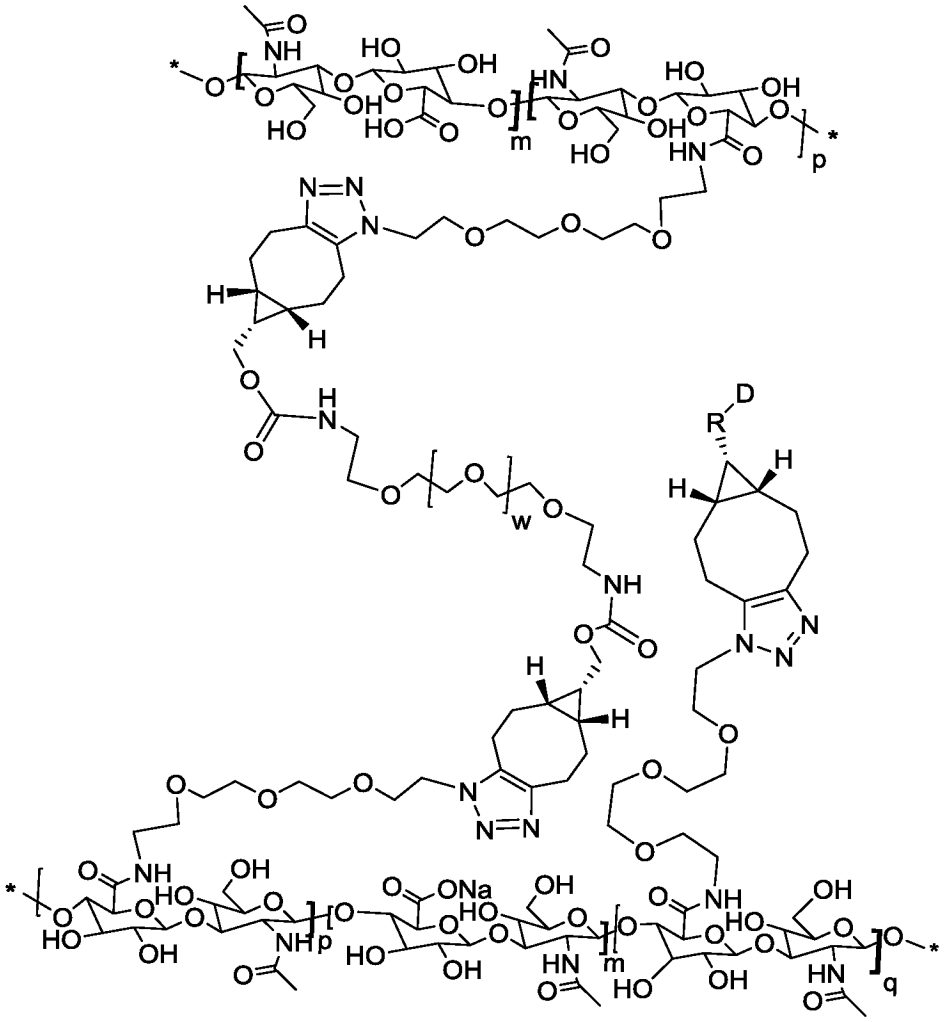
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (XXV), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного

компонента D:



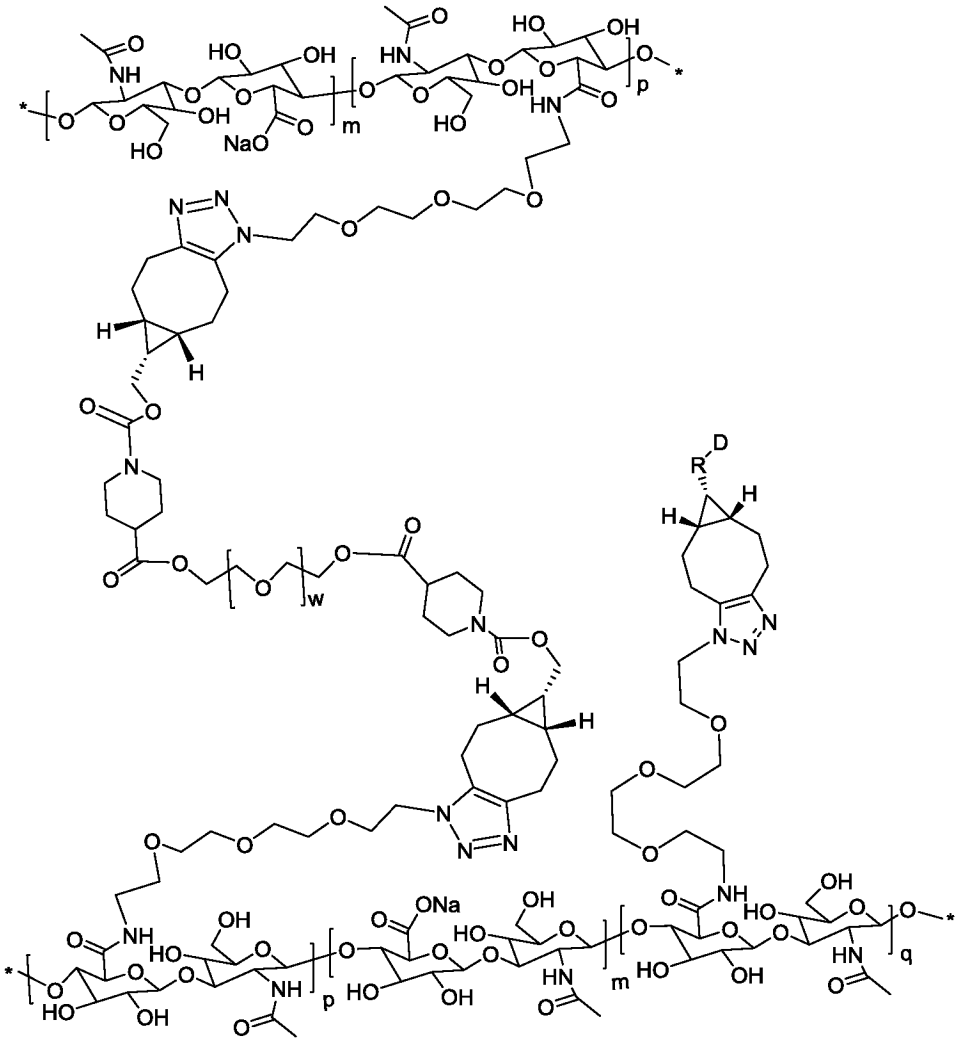
(XXV).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (XXVI), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



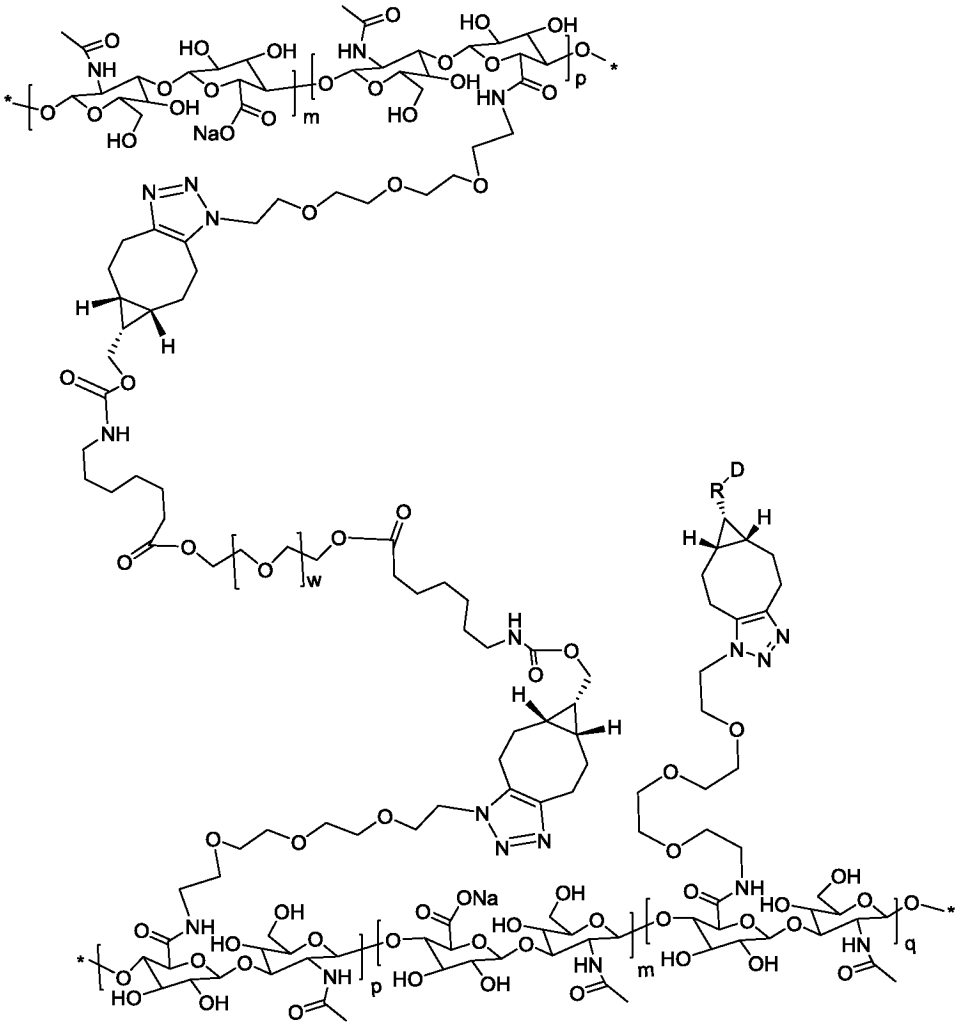
(XXVI).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (XXVII), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



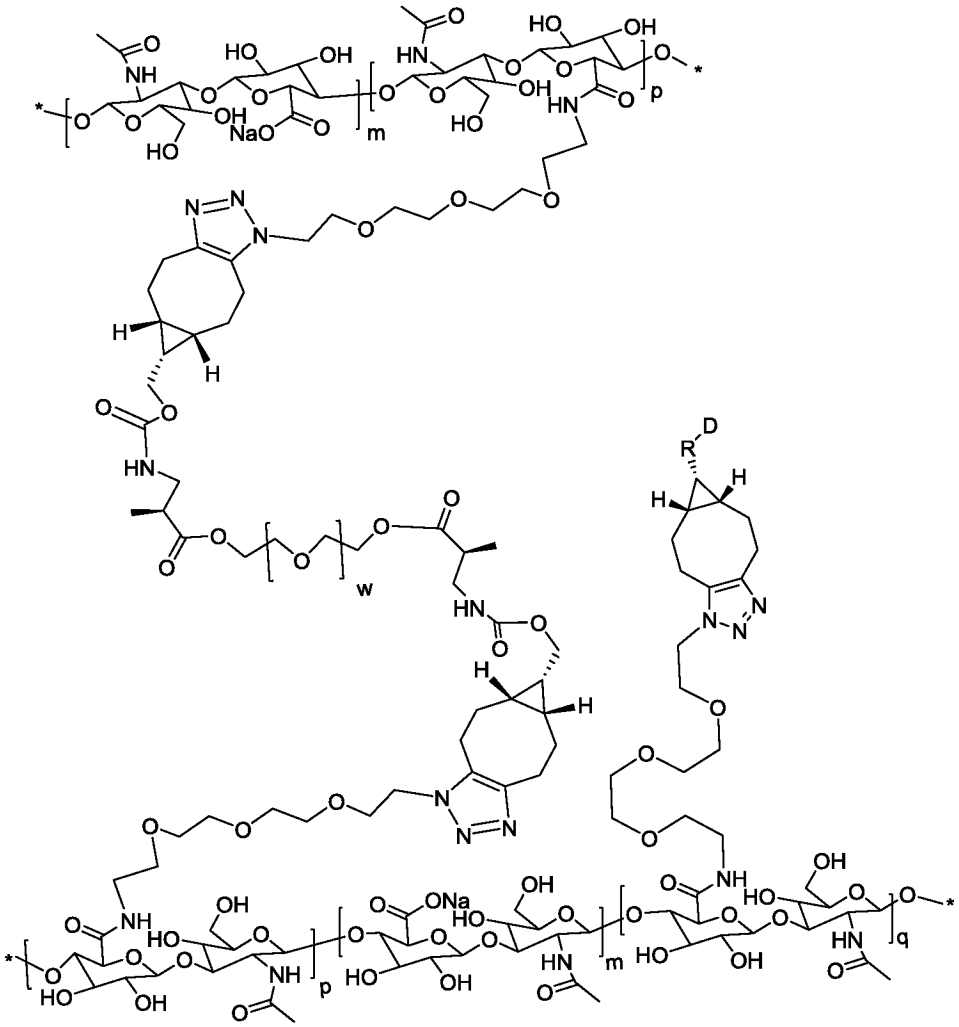
(XXVII).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (XXVIII), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



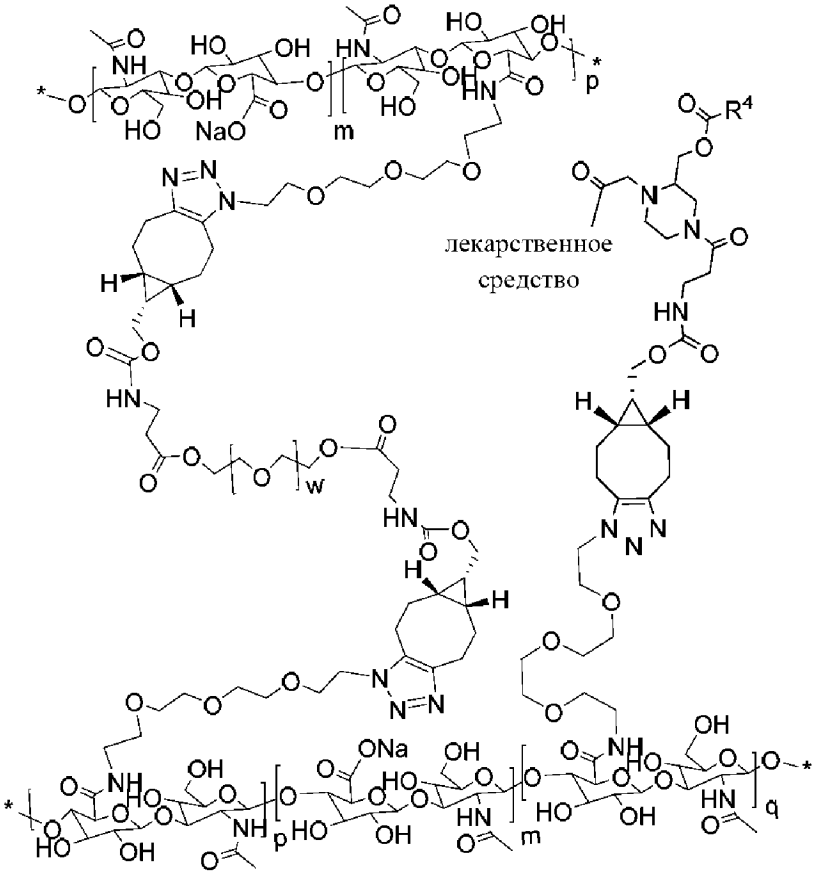
(XXVIII).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (XXIX), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXIX).

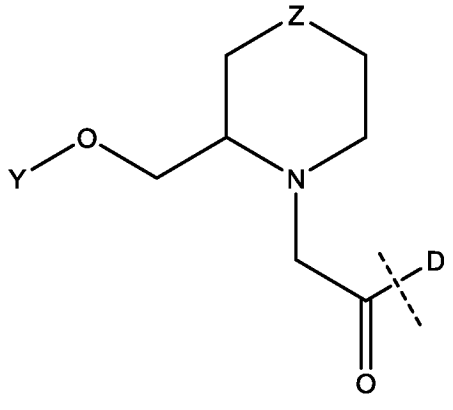
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXX), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:



(XXX).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (XXXI), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXI),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

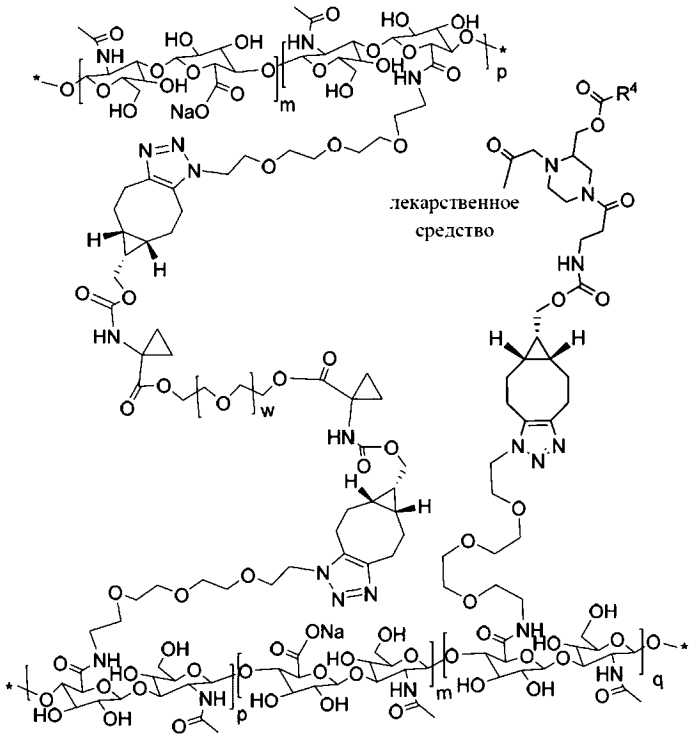
Z представляет собой N–L–A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)–бис–[3–(((((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метокси)карбонил)амино)пропаноат]. В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXXII), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:



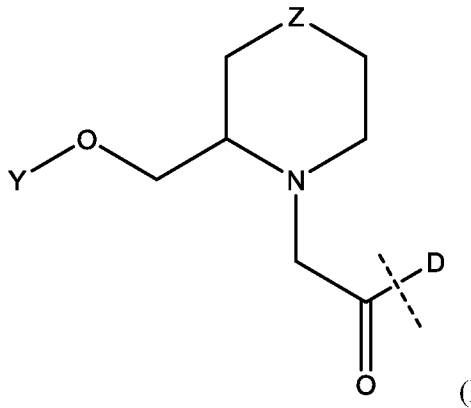
(XXXII).

В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет

собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой XXXIII, где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXIII),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

Z представляет собой N–L–A;

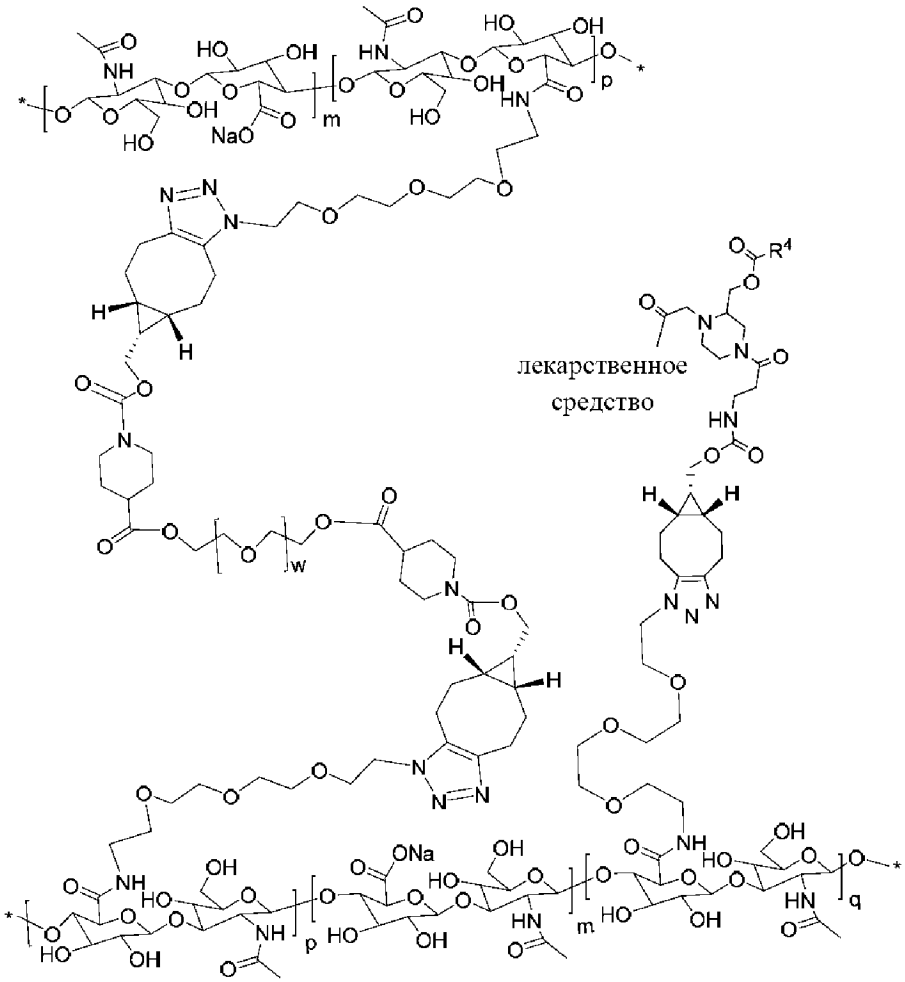
L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит сложный эфир PEG(2000)–бис–[1–((((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метокси)карбонил)аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты].

В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXXIV), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:

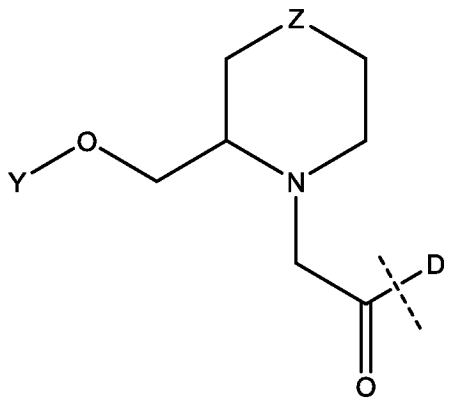


(XXXIV).

В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой XXXV, где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXV),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

Z представляет собой N–L–A;

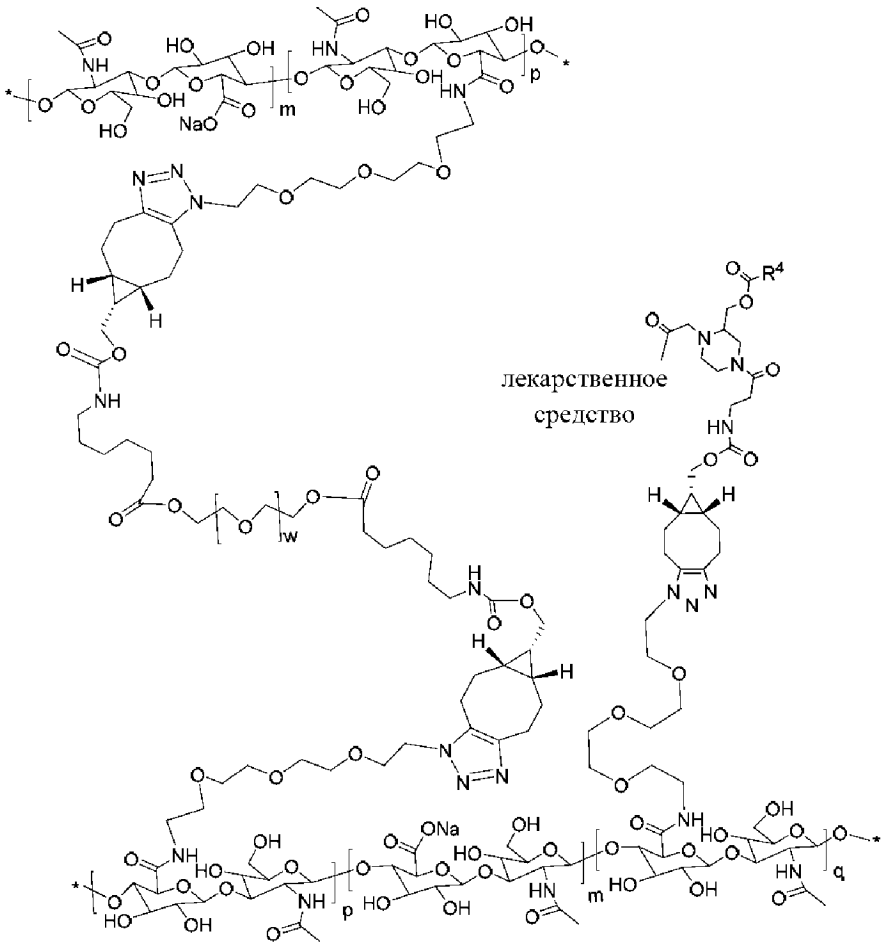
L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит сложный эфир PEG(2000)–бис–[1–((((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метокси)карбонил)пиперидин–4–карбоновой кислоты].

В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXXVI), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:

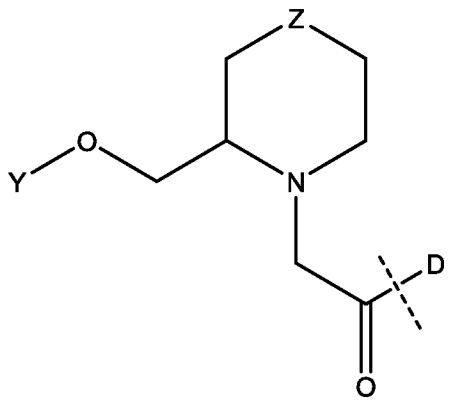


(XXXVI).

В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой XXXVII, где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXVII),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

Z представляет собой N–L–A;

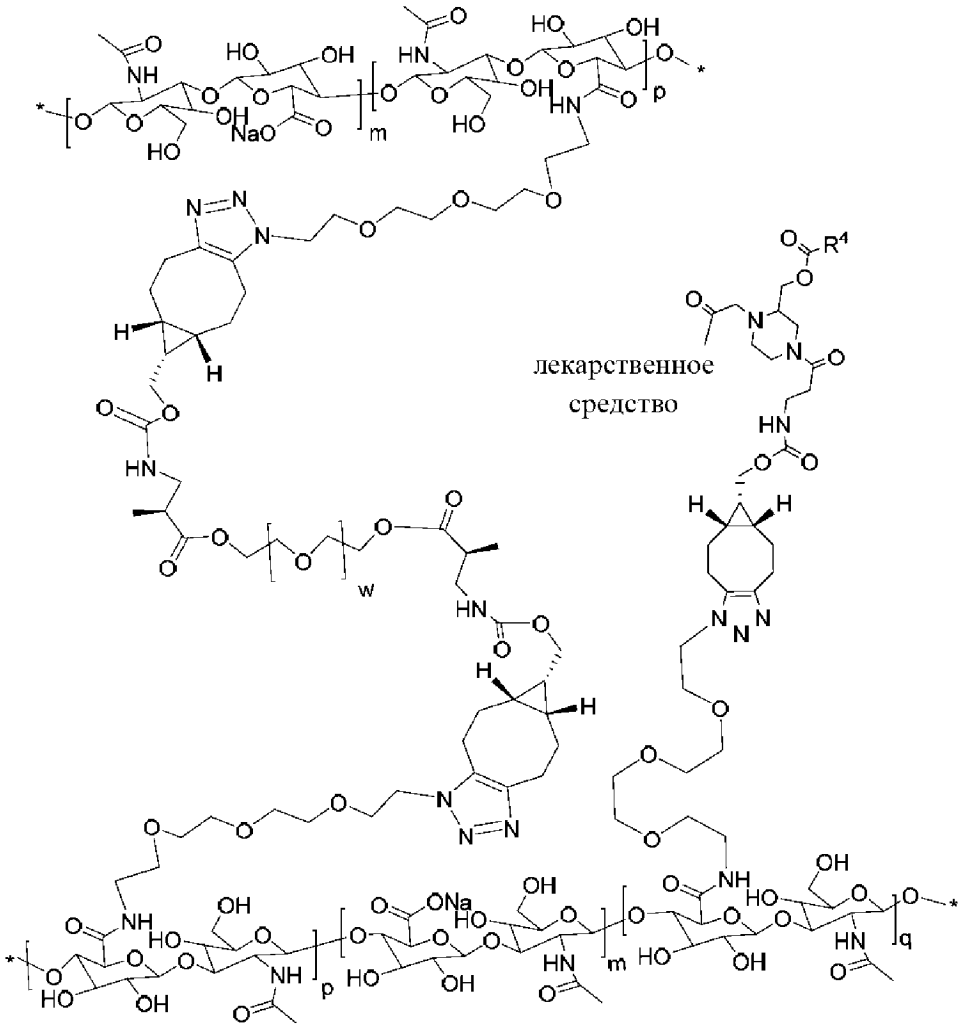
L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)–бис–[7–(((((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метокси)карбонил)амино)гептаноат].

В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXXVIII), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:

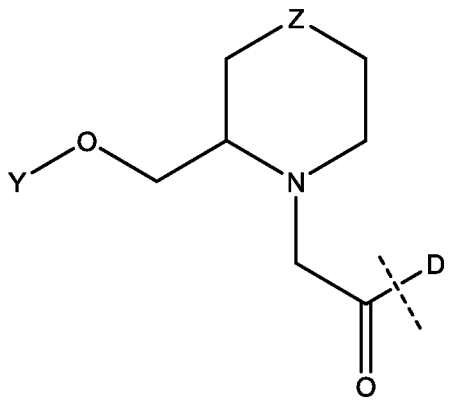


(XXXVIII).

В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, который представлен формулой (XXXIX), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXIX),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

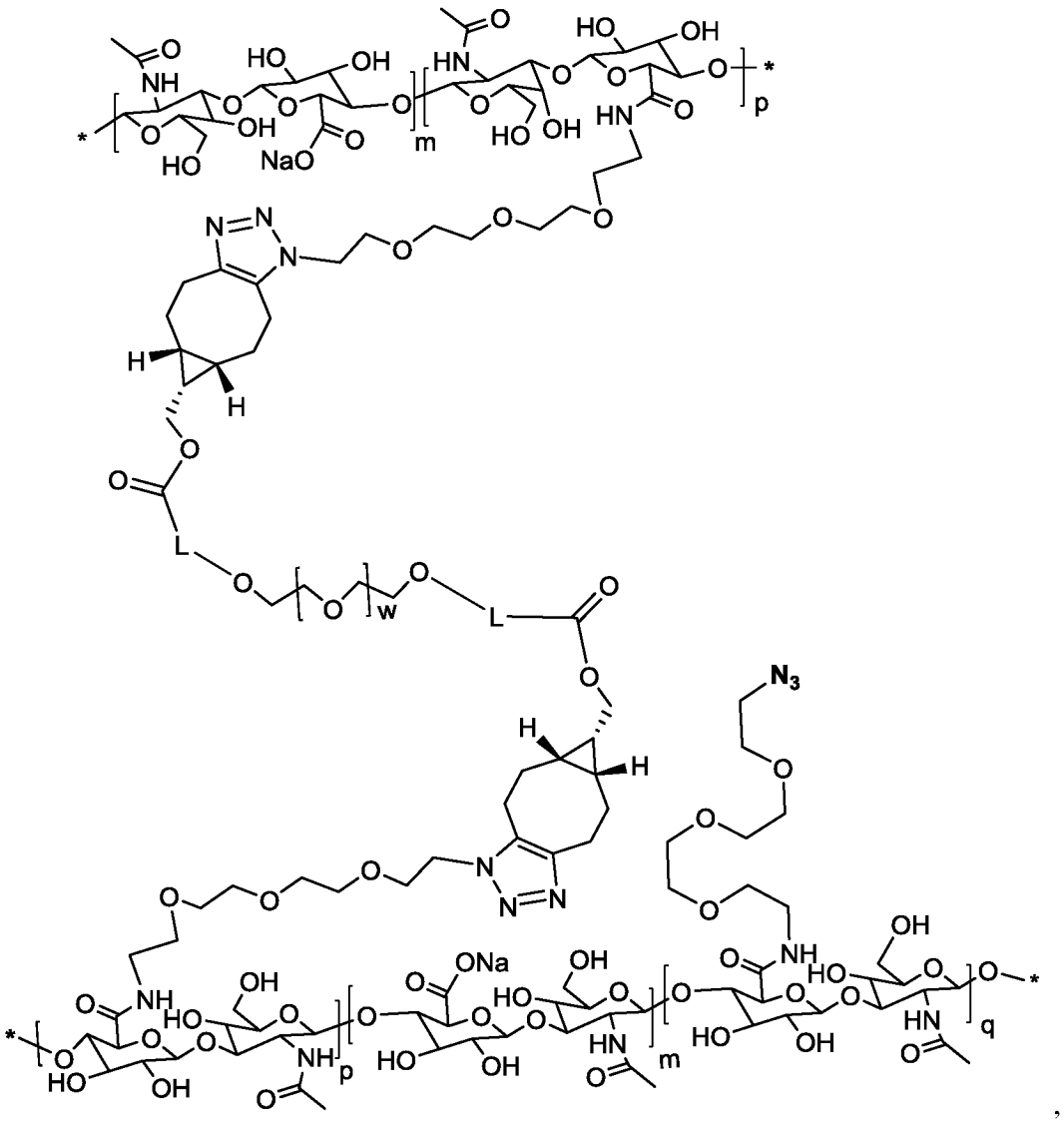
Z представляет собой N–L–A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)–бис–[2–метил–3–(((((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метокси)карбонил)амино)пропаноат]. В одном аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3. В другом аспекте D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему–носитель или ее фармацевтически приемлемую соль, представленную формулой:



,

где

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер Q–[Sp–Q]$_h$–Q;

Q в каждом случае независимо выбран из связи, O, C(O), N(H), N(C_1–C_4алкила), C(O)NH, C(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O), N(C_1–C_4алкил)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1–C_4алкил)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O)N(H), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1–C_4алкила), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(C_1–C_4алкила), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, S(O)$_2$, N(H)S(O)$_2$, N(C_1–C_4алкил)S(O)$_2$, S(O)$_2$N(H), S(O)$_2$N(C_1–C_4алкила), C_1–C_2алкил–C(O)N(H), N(H)C(O)C_1–C_2алкила, C_1–C_2алкил–C(O)O, OC(O)C_1–C_2алкила, 1,2,3–триазола, OP(O)$_2$, P(O)$_2$O, C_1–C_4алкил–P(O)$_2$–O или O–P(O)$_2$–C_1–$_4$алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенных C_1–C_{20}алкила, C_2–C_{20}алкенила, C_2–C_{20}алкинила, [W–O]$_g$, C_1–C_8алкил–[O–W]$_g$, [O–W]$_g$–O–C_1–C_8алкила, C_1–C_8алкил–[O–W]$_g$–O–C_1–C_8алкила или олигопептида;

h представляет собой целое число от 1 до 20;

g представляет собой средневзвешенное число от приблизительно 2 до приблизительно 50;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи; и

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показано графическое изображение системы доставки лекарственных средств, содержащей лекарственное средство, конъюгированное с носителем с помощью бесследного линкера, а также лекарственного средства после высвобождения. В ходе реакции с участием инициатора образуется нуклеофильная функциональная группа, благодаря которой происходит расщепление амидной связи, связывающей лекарственное средство с системой доставки лекарственных средств. В этом неограничивающем примере лекарственное средство связано посредством первичной аминогруппы.

На фиг. 2 показано частичное представление химической структуры конъюгата гидрогель–лекарственное средство, где гидрогель состоит из гиалуроновой кислоты, сшитой с PEG, и лекарственное средство конъюгировано с гидрогелем посредством бесследного линкера с инициатором Y. На фиг. 2 и во всем настоящем описании полимерные молекулы, такие как гиалуроновая кислота, представлены как $[P]_n$, где P представляет собой повторяющееся мономерное звено, а n представляет собой среднее количество повторяющихся мономерных звеньев. Количество повторяющихся звеньев является результатом случайного распределения для любой указанной группы полимеров. Кроме того, относительная способность независимых молекул к образованию связей в случае с гидрогелями или системами доставки лекарственных средств, описанными в данном документе, является случайной величиной в пределах некоторой группы. Структурные изображения гидрогелей или систем доставки лекарственных средств представляют одно потенциальное структурное звено в двух измерениях, при том что эти комплексы являются трехмерными со многими структурными субзвеньями.

На фиг. 3 показана иллюстративная реакция бесследного линкера с полимером гиалуроновой кислоты, функционализированным азидной группой.

На фиг. 3B показана иллюстративная реакция бесследного линкера с гидрогелем, функционализированным азидной группой.

На фиг. 4A (иллюстрирующей пример 8.1) показан пример высвобождения бролуцизумаба из конъюгата с гидрогелем in vitro.

На фиг. 4B показано сравнительное высвобождение бролуцизумаба из конъюгатов с гидрогелем C1a, C2a, C3a и C4a in vitro.

На фиг. 5A (иллюстрирующей пример 8.2) показано высвобождение D2 из конъюгата с гидрогелем in vitro, при этом проводится сравнение высвобождения от бесследных линкеров L1, L2 и L5 в буфер PBS.

На фиг. 5B показано высвобождение D2 из конъюгата с гидрогелем in vitro, при

этом проводится сравнение высвобождения от бесследных линкеров L1, L2 и L5 в бычью синовиальную жидкость (BSF).

На фиг. 6 (иллюстрирующей пример 8.3) показано высвобождение D4 от бесследного линкера in vitro, при этом проиллюстрированы утрата исходного соединения, появление и последующее исчезновение промежуточного соединения и высвобождение D4.

На фиг. 7 (иллюстрирующей пример 9.1) показаны данные тестирования конъюгата бролуцизумаб–гидрогель in vivo при двух разных уровнях дозы. На фиг. 7A показаны данные об истечении флуоресцеина в кроличьей модели со стимуляцией с помощью VEGF. На фиг. 7B показаны уровни бролуцизумаба D1, измеренные в жидкой части стекловидного тела, полученного от тех же кроликов, что и на фиг. 7A.

На фиг. 8 (иллюстрирующей пример 9.3) показано высвобождение D4 из конъюгата с гидрогелем in vivo.

На фиг. 9 (иллюстрирующей пример 8.2) показана активность D2, высвобождающегося из гидрогеля в бычью синовиальную жидкость in vitro (ежедневный отбор образцов).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе описаны системы доставки лекарственных средств для обеспечения доставки биологически активных средств, содержащих первичные или вторичные аминогруппы или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, их фармацевтически приемлемые соли, реагенты для доставки лекарственных средств, связанные с ними, фармацевтические композиции, содержащие системы доставки лекарственных средств, и применение систем доставки лекарственных средств в качестве терапевтических средств с замедленным высвобождением.

Используемый в данном документе термин "алкил" означает неразветвленную, разветвленную или циклическую углеродную цепь. Если не указано иное, один или несколько атомов водорода при атоме углерода алкила могут быть заменены заместителем. Типичные примеры алкила включают, без ограничения, метил, этил, н–пропил, изопропил, н–бутил, втор–бутил, изобутил, трет–бутил, н–пентил, изопентил, неопентил, н–гексил, 3–метилгексил, 2,2–диметилпентил, 2,3–диметилпентил, н–гептил, н–октил, н–нонил, н–децил и т. п. Если два компонента молекулы связаны алкильной группой, ее также называют алкиленом. Термин "низший алкил", используемый в данном документе, в некоторых предпочтительных способах осуществления представляет собой подгруппу алкилов и означает углеводородную группу с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащую от 1 до 4 атомов углерода. Типичные примеры низшего алкила включают, без ограничения, метил, этил, н–пропил, изопропил, н–бутил, изобутил, трет–бутил и т. п. Подразумевается, что термины "алкил" или "низший алкил" включают как замещенный, так и незамещенный алкил или низший алкил, если не указано иное, и эти группы могут быть замещены дополнительными органическими и/или неорганическими группами, в том числе без ограничения группами, выбранными из

галогена (т. е. для образования галогеналкила), алкила, галогеналкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкилалкила, арила, арилалкила, гетероциклического радикала, гетероциклоалкила, гидроксила, алкокси (с образованием таким образом полиалкокси, как, например, полиэтиленгликоля), алкенилокси, алкинилокси, галогеналкокси, циклоалкокси, циклоалкилалкилокси, арилокси, арилалкилокси, гетероциклоокси, гетероциклоалкилокси, меркапто, амино, алкиламино, алкениламино, алкиниламино, галогеналкиламино, циклоалкиламино, циклоалкилалкиламино, ариламино, арилалкиламино, гетероциклоамино, гетероциклоалкиламино, дизамещенного амино, ациламино, ацилокси, сложного эфира, амида, сульфонамида, мочевины, алкоксиациламино, аминоацилокси, нитро, цианоалкил–$S(O)_m$, галогеналкил–$S(O)_m$, алкенил–S(O)n, алкинил–$S(O)_m$, циклоалкил–$S(O)_m$, циклоалкилалкил–$S(O)_m$, арил–$S(O)_m$, арилалкил–$S(O)_m$, гетероцикло–$S(O)_m$ или гетероциклоалкил–$S(O)_m$, где m=0, 1, 2 или 3.

Используемый в данном документе термин "алкенил", в отдельности или как часть другой группы, означает углеводород с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 10, 20 или 30 или больше атомов углерода (или, в случае с низшим алкенилом, от 1 до 4 атомов углерода), который содержит от 1 до 4, 5 или 6 или больше двойных связей в нормальной цепи. Типичные примеры алкенила включают, без ограничения, винил, 2–пропенил, 3–бутенил, 2–бутенил, 4–пентенил, 3–пентенил, 2–гексенил, 3–гексенил, 2,4–гептадиен и т. п. Подразумевается, что термины "алкенил" или "низший алкенил" включают как замещенный, так и незамещенный алкенил или низший алкенил, если не указано иное, и эти группы могут быть замещены группами, описанными выше применительно к алкилу и низшему алкилу.

Используемый в данном документе термин "алкинил", используемый в данном документе в отдельности или как часть другой группы, означает углеводород с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 10, 20, 30 или 40 или больше атомов углерода (или, в случае с низшим алкинилом, от 1 до 4 атомов углерода), который содержит 1, 2 или 3 или больше тройных связей в нормальной цепи. Типичные примеры алкинила включают, без ограничения, 2–пропинил, 3–бутинил, 2–бутинил, 4–пентинил, 3–пентинил и т. п. Подразумевается, что термины "алкинил" или "низший алкинил" включают как замещенный, так и незамещенный алкинил или низший алкинил, если не указано иное, и эти группы могут быть замещены теми же группами, которые приведены выше применительно к алкилу и низшему алкилу выше.

Используемый в данном документе термин "циклоалкинил" означает циклическую углеводородную кольцевую систему, имеющую от 6 до 16 атомов углерода и 1, 2 или 3 кольца, конденсированных или имеющих внутренний мостик, которые содержат по меньшей мере 1 или больше тройных связей в кольцевой структуре.

Используемый в данном документе термин "гетероциклоалкинил" означает циклическую углеводородную кольцевую систему, имеющую от 6 до 16 атомов углерода, 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из атомов кислорода, азота и серы, и 1, 2 или 3 кольца, конденсированных или имеющих внутренний мостик, которые содержат по

меньшей мере 1 или больше тройных связей в кольцевой структуре.

Используемый в данном документе термин "циклоалкил", в отдельности или как часть другой группы, означает насыщенную или частично насыщенную циклическую углеводородную группу, содержащую 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов углерода (при этом в гетероциклической группе атомы углерода могут быть заменены, как обсуждается ниже). Типичные примеры циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил. Эти кольца могут быть необязательно замещены дополнительными заместителями, описанными в данном документе, такими как галоген или низший алкил. Термин "циклоалкил" является общим, и подразумевается, что он включает гетероциклические группы, обсуждаемые ниже, если не указано иное.

Используемые в данном документе термины "гетероциклический радикал" или "гетероциклил", в отдельности или как часть другой группы, означают алифатическую (например, полностью или частично насыщенную гетероциклическую) или ароматическую (например, гетероарильную) моноциклическую или бициклическую кольцевую систему. Примером моноциклических кольцевых систем является любое 3–8–членное кольцо, содержащее 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из атомов кислорода, азота и серы. 5–членное кольцо имеет от 0 до 2 двойных связей, а 6–членное кольцо имеет от 0 до 3 двойных связей. Типичные примеры моноциклических кольцевых систем включают, без ограничения, азетидин, азепин, азиридин, диазепин, 1,3–диоксолан, диоксан, дитиан, фуран, имидазол, имидазолин, имидазолидин, изотиазол, изотиазолин, изотиазолидин, изоксазол, изоксазолин, изоксазолидин, морфолин, оксадиазол, оксадиазолин, оксадиазолидин, оксазол, оксазолин, оксазолидин, пиперазин, пиперидин, пиран, пиразин, пиразол, пиразолин, пиразолидин, пиридин, пиримидин, пиридазин, пиррол, пирролин, пирролидин, тетрагидрофуран, тетрагидротиофен, тетразин, тетразол, тиадиазол, тиадиазолин, тиадиазолидин, тиазол, тиазолин, тиазолидин, тиофен, тиоморфолин, тиоморфолинсульфон, тиопиран, триазин, триазол, тритиан и т. п. Примером бициклических кольцевых систем является любая из описанных выше моноциклических кольцевых систем, конденсированных с арильной группой, определенной в данном документе, циклоалкильной группой, определенной в данном документе, или другой моноциклической кольцевой системой, определенной в данном документе. Типичные примеры бициклических кольцевых систем включают, без ограничения, например, бензимидазол, бензотиазол, бензотиадиазол, бензотиофен, бензоксадиазол, бензоксазол, бензофуран, бензопиран, бензотиопиран, бензодиоксин, 1,3–бензодиоксол, циннолин, индазол, индол, индолин, индолизин, нафтиридин, изобензофуран, изобензотиофен, изоиндол, изоиндолин, изохинолин, фталазин, пурин, пиранопиридин, хинолин, хинолизин, хиноксалин, хиназолин, тетрагидроизохинолин, тетрагидрохинолин, тиопиранопиридин и т. п. Эти кольца включают их кватернизированные производные и могут быть необязательно замещены дополнительными органическими и/или неорганическими группами, в том числе без ограничения группами, выбранными из галогена, алкила, галогеналкила, алкенила,

алкинила, циклоалкила, циклоалкилалкила, арила, арилалкила, гетероциклического радикала, гетероциклоалкила, гидроксила, алкокси, алкенилокси, алкинилокси, галогеналкокси, циклоалкокси, циклоалкилалкилокси, арилокси, арилалкилокси, гетероциклоокси, гетероциклоалкилокси, меркапто, амино, алкиламино, алкениламино, алкиниламино, галогеналкиламино, циклоалкиламино, циклоалкилалкиламино, ариламино, арилалкиламино, гетероциклоамино, гетероциклоалкиламино, дизамещенного амино, ациламино, ацилокси, сложного эфира, амида, сульфонамида, мочевины, алкоксиациламино, аминоацилокси, нитро, циано, алкил–$S(O)_m$, галогеналкил–$S(O)_m$, алкенил–$S(O)_m$, алкинил–$S(O)_m$, циклоалкил–$S(O)_m$, циклоалкилалкил–$S(O)_m$, арил–$S(O)_m$, арилалкил–$S(O)_m$, гетероцикло–$S(O)_m$, гетероциклоалкил–$S(O)_m$, где m=0, 1, 2 или 3.

Используемый в данном документе термин "гетероарил" соответствует описанному выше применительно к гетероциклическому радикалу.

Используемые в данном документе термины "циклоалкилалкил," "циклоалкилалкенил" и "циклоалкилалкинил", используемые в данном документе в отдельности или как часть другой группы, означают циклоалкильную группу, определенную в данном документе, присоединенную к исходному молекулярному компоненту посредством соответственно алкильной, алкенильной или алкинильной группы, определенных в данном документе.

Используемый в данном документе термин "алкокси", в отдельности или как часть другой группы, означает алкильную или низшую алкильную группу, определенную в данном документе (и, таким образом, включающую замещенные варианты, такие как полиалкокси), присоединенную к исходному молекулярному компоненту посредством оксигруппы –O–. Типичные примеры алкокси включают, без ограничения, метокси, этокси, пропокси, 2–пропокси, бутокси, трет–бутокси, пентилокси, гексилокси и т. п. В некоторых аспектах алкоксигруппы, если они являются частью более сложной молекулы, содержат алкоксизаместитель, присоединенный к алкилу или низшему алкилу посредством простой эфирной связи.

Используемые в данном документе термины "галоген" или "радикал галогена" означают любой подходящий галоген, в том числе –F, –Cl, –Br или –I.

Используемый в данном документе термин "ацил", в отдельности или как часть другой группы, означает радикал –C(O)R’, где R’ представляет собой любой подходящий заместитель, такой как арил, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил или другой подходящий заместитель, описанный в данном документе.

Используемый в данном документе термин "алкилтио", в отдельности или как часть другой группы, означает алкильную группу, определенную в данном документе, присоединенную к исходному молекулярному компоненту посредством тиольного компонента, описанного в данном документе. Типичные примеры алкилтио включают, без ограничения, метилтио, этилтио, трет–бутилтио, гексилтио и т. п.

Используемые в данном документе термины "амид", "амидо" или "амидил", используемые в данном документе в отдельности или как часть другой группы, означают

радикал $–C(O)NR_aR_b$, где R_a и R_b независимо являются любыми подходящими заместителями, такими как алкил, водород, циклоалкил, алкенил, алкинил или арил.

Используемый в данном документе термин "сложный эфир", в отдельности или как часть другой группы, означает радикал –C(O)OR’, где R’ является любым подходящим заместителем, таким как алкил, циклоалкил, алкенил, алкинил или арил.

Используемый в данном документе термин "простой эфир", в отдельности или как часть другой группы, означает радикал –COR’, где R’ является любым подходящим заместителем, таким как алкил, циклоалкил, алкенил, алкинил или арил.

Используемый в данном документе термин "сульфон", в отдельности или как часть другой группы, означает радикал –S(O)(O)R’, где R’ представляет собой любой подходящий заместитель, такой как алкил, циклоалкил, алкенил, алкинил или арил.

Используемый в данном документе термин "сульфонамид", в отдельности или как часть другой группы, означает радикал $–S(O)_2NR_aR_b$, в котором R_a и R_b независимо представляют собой любой подходящий заместитель, такой как H, алкил, циклоалкил, алкенил, алкинил или арил.

Используемый в данном документе термин "карбоксил" означает радикал –C(O)OH.

Используемый в данном документе термин "гидроксил" означает радикал –OH.

Используемый в данном документе термин "амино" означает радикал $–NH_2$.

Используемый в данном документе термин "винил" означает радикал $–CH_2CH_2$.

Используемый в данном документе термин "сульфонат" означает радикал –S(O)(O)OR’, где R’ представляет собой любой подходящий заместитель, такой как алкил, циклоалкил, алкенил, алкинил или арил.

Используемый в данном документе термин "сульфонил" означает радикал –S(O)(O)R’, где R’ представляет собой любой подходящий заместитель, такой как алкил, циклоалкил, алкенил, алкинил или арил.

Используемый в данном документе термин "тиол" означает радикал –SH.

Используемые в данном документе термины "оксиамин" или "аминокси" означают радикал $–ONH_2$.

Используемые в данном документе термины "гидразид" или "гидразидил" означают радикал $–C(O)–NH–NH_2$.

Используемые в данном документе термины "малеимид" или "малеимидил" означают циклическое соединение с молекулярной формулой $C_2H_2(C(O))_2NH$ или радикал $–N(C(O))_2C_2H_2$, имеющие по меньшей мере одну двойную связь C–C.

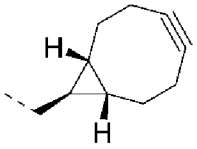
Используемый в данном документе термин "фуран" означает пятичленное ароматическое кольцо с четырьмя атомами углерода и одним атомом кислорода.

Используемые в данном документе термины "тетразин" или "тетразинил" означают шестичленное ароматическое кольцо, содержащее четыре атома азота, с молекулярной формулой $C_2H_2N_4$ или радикал $–C_2HN_4$.

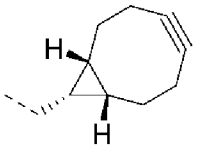
Используемые в данном документе термины "азид", "азидил" или "азидо" означают

группу $–N_3$.

Используемый в данном документе термин "BCN" означает бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метильный радикал, в котором экзоциклический метилен может иметь экзо– или эндоориентацию относительно бицикла, как показано:



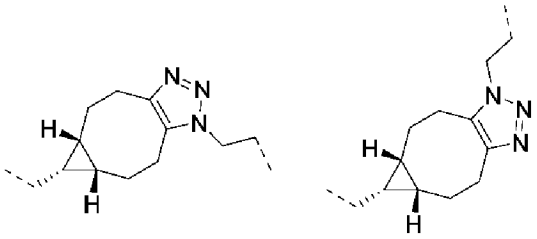
Экзо-BCN



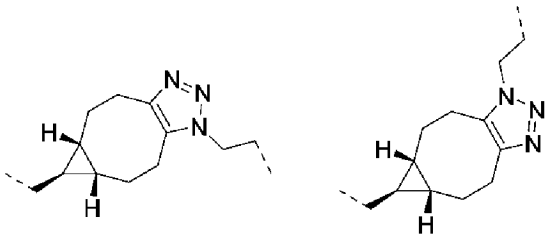
Эндо-BCN

Как используется в данном документе во всем настоящем описании, для удобства большинство структур изображены без учета их стереохимических особенностей и таким образом представляют все известные стереоизомеры.

В частности, что касается структуры триазольных продуктов реакции между BCN и азидосоединением, как используется в данном документе во всем настоящем описании, N–связанный заместитель в триазольном кольце показан для удобства в одном региохимическом положении. Средний специалист в данной области поймет, что реакция BCN–алкина с азидосоединением приведет к получению стереоизомерной смеси продуктов с N–связанным заместителем в положении 1 и 3 триазола, как показано:



Стереоизомерные продукты реакции эндо-BCN с алкилазидом



Стереоизомерные продукты реакции экзо-BCN с алкилазидом

Используемый в данном документе термин "реакционноспособная функциональная группа" означает функциональную группу, подходящую для ортогональных реакций связывания. Подходящими реакционноспособными функциональными группами являются группы, которые легко подвергаются ортогональным реакциям. Иллюстративные и неограничивающие ортогональные химические реакции включают реакции с участием функциональных групп, показанных в таблице 1.

Используемый в данном документе термин "инициатор" означает функциональную группу, присутствующую в аддукте лекарственное средство–бесследный линкер D–R, которая способна подвергаться химической реакции, в результате которой образуется новая функциональная группа. Присутствие новой функциональной группы значительно снижает стабильность связи между лекарственным средством и соответствующим бесследным линкером и приводит к повышению вероятности высвобождения

лекарственного средства.

Термин "среднечисловая молекулярная масса" или "M_n" означает статистическое среднее значение молекулярной массы для всех молекул в образце, выраженное в единицах г/моль. Среднечисловую молекулярную массу можно определить с помощью методик, известных из уровня техники, таких как гель–проникающая хроматография (где M_n можно рассчитать, исходя из известных стандартов, с использованием системы выявления в режиме реального времени, такой как детектор показателя преломления, детектор ультрафиолетового излучения или другой детектор), вискозиметрия, масс–спектрометрия или коллигативные методы (например, осмометрия с использованием давления паров, определение концевых групп или протонный ЯМР). Среднечисловая молекулярная масса определяется по приведенному ниже уравнению,

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

где M_i представляет собой молекулярную массу молекулы, а N_i представляет собой количество молекул, соответствующее данной молекулярной массе.

Термин "средневзвешенная молекулярная масса" или "M_w" означает статистическое среднее значение молекулярной массы для всех молекул с учетом массы каждой молекулы при определении ее вклада в среднее значение молекулярной массы, выраженное в единицах г/моль. Чем выше молекулярная масса указанной молекулы, тем больший вклад эта молекула будет вносить в значение M_w. Средневзвешенную молекулярную массу можно рассчитать с помощью методик, известных из уровня техники, которые чувствительны к размеру молекул, таких как статическое рассеяние света, малоугловое рассеяние нейтронов, рентгеновское рассеяние и скорость седиментации. Средневзвешенная молекулярная масса определяется по приведенному ниже уравнению,

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

где ‘M_i’ представляет собой молекулярную массу молекулы, а ‘N_i’ представляет собой количество молекул, соответствующее данной молекулярной массе.

Термин "средневязкостная молекулярная масса" или "M_v" означает статистическое среднее значение молекулярной массы для всех молекул с учетом массы каждой молекулы при определении ее вклада в среднее значение молекулярной массы, выраженное в единицах г/моль. Большие молекулы или полимеры имеют более высокую вязкость, чем молекулы меньшего размера. Средневязкостная молекулярная масса определяется по приведенному ниже уравнению,

$$M_v = \left(\frac{\sum N_i M_i^{(1+a)}}{\sum N_i M_i}\right)^{1/a}$$

где ‘M_i’ представляет собой молекулярную массу молекулы, ‘N_i’ представляет собой количество молекул, соответствующее данной молекулярной массе, а a

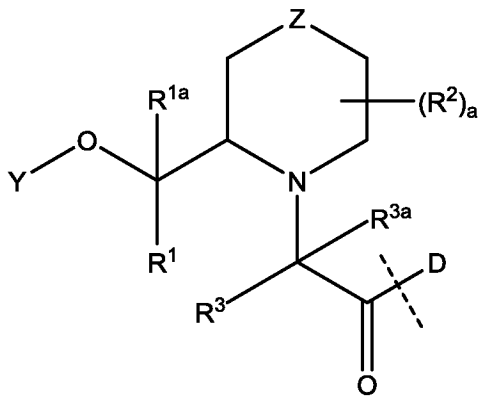
представляет собой константу, значение которой определяется молекулой, растворителем и температурой. Гибкие полимерные молекулы имеют значения a, составляющие $0,5 \leq a \leq 0,8$. Полугибкие полимерные молекулы имеют значения a, составляющие $\geq 0,8$. Средневязкостную молекулярную массу можно определить с помощью экспериментов по определению характеристической вязкости или эксклюзионной хроматографии.

Используемый в данном документе термин "лекарственное средство" означает один или несколько биологически активных компонентов, содержащих по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце. Биологически активные компоненты могут представлять собой малые молекулы, макромолекулы, такие как белки, пептиды или нуклеиновые кислоты, или их комбинации. Что касается конкретно бесследного линкера R, лекарственное средство или биологически активный компонент содержат "D" в форме представления D–R. Термины или фразы "лекарственное средство", "биологически активная молекула", "биологически активный компонент", "биологически активное средство", "действующее вещество" означают любое вещество, которое способно оказывать влияние на любые физические или биохимические свойства биологического организма, в том числе без ограничения вирусов, бактерий, грибов, растений, животных и людей. В частности, лекарственные средства или биологически активные молекулы означают любые вещества, предназначенные для диагностики, излечения, смягчения проявлений, лечения или предупреждения заболеваний людей или других животных или для иного улучшения физического или психического здоровья людей или животных. Как используется в данном документе, некоторые лекарственные средства во всем данном документе называются D1–D4. D1 содержит бролуцизумаб (SEQ ID NO: 4). D2 содержит (SEQ ID NO: 5). D3 содержит (SEQ ID NO: 6). D4 содержит (SEQ ID NO: 7).

Используемый в данном документе термин "биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце" означает как свободный биологически активный компонент до присоединения к бесследному линкеру, так и свободный биологически активный компонент "D–H," который образуется в результате отщепления от аддукта с бесследным линкером "D–R." В некоторых аспектах аддукт лекарственного средства D–R может обладать биологической активностью.

Используемый в данном документе термин "свободная форма" лекарственного средства или биологически активного компонента означает лекарственное средство в его немодифицированной, фармакологически активной форме, как, например, до присоединения к бесследному линкеру или после высвобождения от бесследного линкера в системе доставки лекарственных средств.

Используемый в данном документе термин "бесследный линкер R" означает линкер, который представлен формулой (I), подходящий для высвобождения биологически активного компонента D, содержащего по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

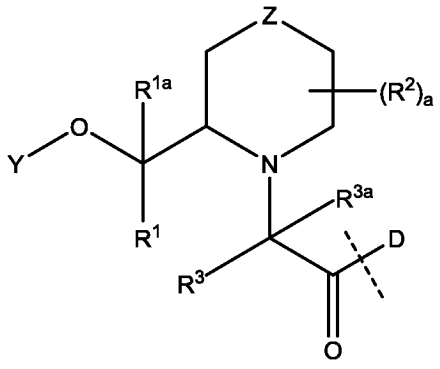
L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, C(O)C_1–C_8алкил, C(O)N(H)C_1–C_8алкил, C(O)OC_1–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

В другом варианте осуществления R представляет собой линкер, который представлен формулой (I), подходящий для высвобождения биологически активного компонента D, содержащего по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер $Q–[Sp–Q]_h–Q$;

Q в каждом случае независимо выбран из связи, O, C(O), N(H), N(C_1–C_4алкила), C(O)NH, C(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O), N(C_1–C_4алкил)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1–C_4алкил)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O)N(H), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1–C_4алкила), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(C_1–C_4алкила), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, $N(H)S(O)_2$, N(C_1–C_4алкил)$S(O)_2$, $S(O)_2N(H)$, $S(O)_2N$(C_1–C_4алкила), C_1–C_2алкил–C(O)N(H), N(H)C(O)C_1–C_2алкила, C_1–C_2алкил–C(O)O, OC(O)C_1–C_2алкила, 1,2,3–триазола, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, C_1–C_4алкил–$P(O)_2$–O или O–$P(O)_2$–C_1–$_4$алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенных C_1–C_{20}алкила, C_2–C_{20}алкенила, C_2–C_{20}алкинила, $[W–O]_g$, C_1–C_8алкил–$[O–W]_g$, $[O–W]_g$–O–C_1–C_8алкила, C_1–C_8алкил–$[O–W]_g$–O–C_1–C_8алкила, олигопептида;

h представляет собой целое число от 1 до 20;

g представляет собой средневзвешенное число от приблизительно 2 до приблизительно 50;

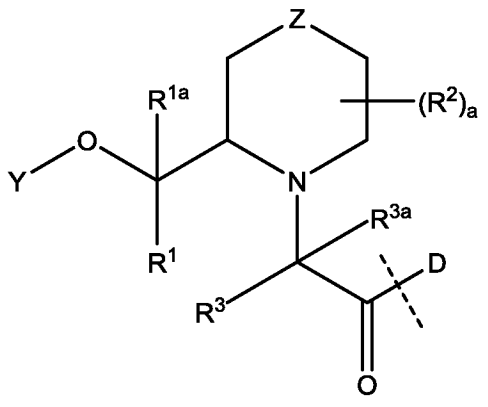
W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, C(O)C_1–C_8алкил, C(O)OC_1–C_8алкил, C(O)N(H)C_1–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

В другом варианте осуществления R представляет собой линкер, который представлен формулой (I), подходящий для высвобождения биологически активного компонента D, содержащего по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q в каждом случае независимо равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1$–C_4алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

В одном аспекте бесследный линкер представляет собой линкер, подходящий для замедленного высвобождения биологически активного компонента. В одном аспекте "R" представляет собой бесследный линкер в форме представления D–R, где "D" означает лекарственное средство, содержащее биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце.

Используемый в данном документе термин "аддукт лекарственного средства" означает лекарственное средство D, связанное с бесследным линкером R. Что касается конкретно бесследного линкера R, аддукт лекарственного средства содержит "D–R".

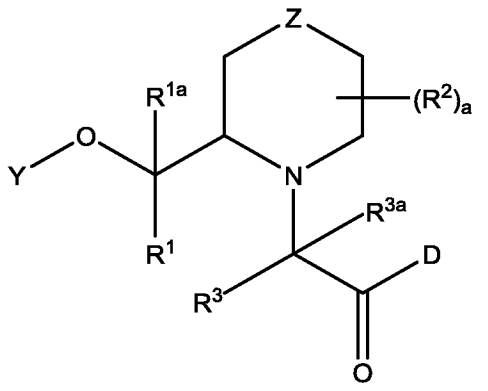
Используемый в данном документе термин "носитель" означает растворимый полимер, биополимер или сшитый полимер или биополимер. Носители включают в себя белки, нуклеиновые кислоты, углеводы или полиэтиленгликоли. В одном аспекте носитель или несколько носителей сшиты межмолекулярными связями, внутримолекулярными связями или их комбинациями. В одном аспекте сшитый носитель содержит гидрогель. Что касается конкретно бесследного линкера R, носитель содержит R^{11}. В одном аспекте Z связан с носителем, как правило, полимером или гидрогелем. Носитель присоединен к бесследному линкеру R непосредственно или посредством нерасщепляемого спейсера. В качестве неограничивающих примеров, носители могут включать в себя полиэтиленгликоли, полимеры гиалуроновой кислоты или сшитую гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль, которые способны образовывать гидрогели.

Используемый в данном документе термин "полимер" означает молекулу, состоящую из повторяющихся структурных звеньев (мономеров), соединенных

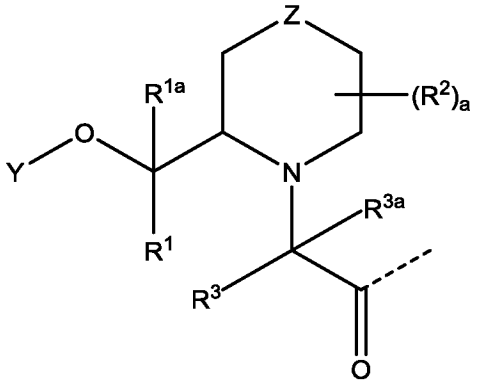
химическими связями линейным, циклическим, разветвленным или дендримерным способом или их комбинациями, который может иметь синтетическое или биологическое происхождение или комбинацию того и другого. Как правило, полимер имеет среднюю молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 1 кДа. Сополимер представляет собой полимер, состоящий из по меньшей мере двух химически отличающихся мономеров. Как правило, полимер состоит из молекул, характеризующихся определенным распределением значений молекулярной массы. Одним из способов описания распределения молекулярной массы полимера является средняя молекулярная масса. Как правило, полимер состоит из молекул, характеризующихся определенным распределением степени полимеризации. Одним из способов описания распределения степени полимеризации полимера является средняя степень полимеризации.

Как описано в данном документе и изображено в структурах в данном документе, полимерные молекулы, такие как полиэтиленгликоль или гиалуроновая кислота, представлены как $[P]_n$, где P представляет собой повторяющееся мономерное звено, а n представляет собой среднюю степень полимеризации мономера в полимере. Средний специалист в данной области поймет, что две полимерные молекулы, изображенные с идентичным повторяющимся звеном P, но разными n, считаются эквивалентными, если разница составляет приблизительно 10% или меньше от значения n. Для сополимеров гиалуроновой кислоты, описанных в данном документе и изображенных в структурах в данном документе, распределение мономеров в полимере не определено и предполагается как случайное. Кроме того, относительная способность независимых молекул к образованию связей в случае с гидрогелями или системами доставки лекарственных средств, описанными в данном документе, является случайной величиной в пределах некоторой группы. Структурные изображения гидрогелей или систем доставки лекарственных средств представляют одно потенциальное структурное звено в двух измерениях, при том что эти комплексы являются трехмерными со многими структурными субзвеньями.

Как описано в данном документе, точное положение образования амидной связи в случае с аддуктом бесследный линкер–лекарственное средство R–D неизвестно. Это может происходить, если D содержит больше одной первичной или вторичной аминогруппы или одного атома азота кольца в азагетероарильном кольце, способных образовывать амидную связь с линкером R (т. е. является белком). Для удобства аддукты, в которых положение образования амидной связи точно не известно, изображены в данном документе следующим образом:



R =



Используемый в данном документе термин "гидрогель" означает трехмерную гидрофильную или амфифильную полимерную сеть, способную поглощать большие количества воды. Данные сети состоят из гомополимеров или сополимеров и являются нерастворимыми вследствие присутствия ковалентных химических или физических (ионных, гидрофобных взаимодействий, переплетений) сшивок. Сшивки обеспечивают структурированность и физическую целостность сети. Гидрогели проявляют термодинамическую совместимость с водой, что позволяет им набухать в водной среде. Цепочки сети связаны таким образом, что в ней существуют поры, и водорастворимые растворенные вещества, размеры которых меньше, чем поры, могут диффундировать внутрь сети и наружу из нее.

Используемые в данном документе термины "линкер" или "линкер, не обладающий биологической активностью" означают линкер, который не вызывает каких–либо фармакологических эффектов. В некоторых вариантах осуществления линкер включает в себя двух– или поливалентный органический линкер, совместимый с биологическими системами. Термин "двухвалентный" означает имеющий реакционноспособную группу, подходящую для присоединения к бесследному линкеру или лекарственному средству D, на каждом конце полимера. Термин "поливалентный" означает имеющий реакционноспособную группу, подходящую для присоединения к бесследному линкеру или лекарственному средству D, на каждом конце полимера и дополнительные реакционноспособные компоненты, расположенные вперемежку вдоль молекулы линкера.

Используемый в данном документе термин "система доставки лекарственных средств" включает носитель, связанный с аддуктом лекарственного средства, $D–R–R^{11}$, где носитель содержит R^{11}. Как описано в данном документе, система доставки лекарственных средств представляет собой молекулярный конъюгат, содержащий одно или несколько лекарственных средств D; один или несколько бесследных линкеров R и один или несколько носителей R^{11}. В некоторых вариантах осуществления может быть представлено несколько различных соединений лекарственных средств, конъюгированных с системой доставки лекарственных средств. Например, два разных лекарственных средства, такие как D1 и D2, могут быть конъюгированы в одной системе доставки лекарственных средств.

Используемая в данном документе фраза "водонерастворимый" означает

способную к набуханию трехмерную сшитую молекулярную сеть, образующую гидрогель. Если гидрогель суспендирован в большом избытке воды или водного буфера физиологической осмоляльности, то он способен поглощать значительное количество воды, например, до 10–кратного в расчете по весу, и поэтому способен к набуханию, но после удаления избытка воды все еще сохраняет физическую стабильность и форму геля. Такая форма может обладать любыми геометрическими параметрами, и следует понимать, что такой отдельный гидрогелевый объект следует рассматривать как одну молекулу, состоящую из компонентов, где каждый из компонентов связан с каждым другим компонентом посредством химических связей.

Используемый в данном документе термин "замедленное высвобождение" или "замедленная скорость высвобождения" означает ситуацию, при которой интервалы между последовательными дозами соответствующей системы доставки лекарственных средств, необходимые для достижения желаемого терапевтического эффекта, увеличены. Лекарственные средства с ежедневным дозированием могут, например, быть превращены в форму с замедленным высвобождением между двумя введениями с интервалом между двумя введениями длительностью в одну неделю или даже дольше.

Используемый в данном документе термин "функциональная группа" означает группу атомов в молекулах, которая проявляет специфическую химическую активность. Примерами являются амидные группы, аминогруппы, спиртовые группы, карбонильные группы, группы карбоновых кислот, тиольные группы.

Используемый в данном документе термин "защитная группа" означает компонент, который временно защищает функциональную группу молекулы в ходе синтеза для достижения хемоселективности в последующих химических реакциях. Защитными группами для спиртов являются, например, бензил и тритил, защитными группами для аминов являются, например, трет–бутилоксикарбонил, 9–флуоренилметилоксикарбонил и бензил, а для тиолов примерами защитных групп являются 2,4,6–триметоксибензил, фенилтиометил, ацетамидометил, п–метоксибензилоксикарбонил, трет–бутилтио, трифенилметил, 3–нитро–2–пиридилтио, 4–метилтритил.

Используемый в данном документе термин "защищенная функциональная группа" означает функциональную группу, защищенную одной или несколькими защитными группами.

Используемый в данном документе термин "PBS" означает фосфатно–солевой буферный раствор.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства биологически активного средства и которые обычно не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения. Во многих случаях биологически активное средство способно образовывать кислые и/или основные соли благодаря наличию амино– и/или карбоксильных групп или групп, сходных с ними.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты могут быть

образованы неорганическими и органическими кислотами, например, ацетатные, аспартатные, бензоатные, безилатные, бромидные/гидробромидные, бикарбонатные/карбонатные, бисульфатные/сульфатные, камфорсульфонатные, хлоридные/гидрохлоридные, хлортеофиллинатные, цитратные, этандисульфонатные, фумаратные, глюцептатные, глюконатные, глюкуронатные, гиппуратные, гидройодидные/йодидные, изетионатные, лактатные, лактобионатные, лаурилсульфатные, малатные, малеатные, малонатные, манделатные, мезилатные, метилсульфатные, нафтоатные, напсилатные, никотинатные, нитратные, октадеканоатные, олеатные, оксалатные, пальмитатные, памоатные, фосфатные/гидрофосфатные/дигидрофосфатные, полигалактуронатные, пропионатные, стеаратные, сукцинатные, субсалицилатные, тартратные, тозилатные и трифторацетатные соли.

Неорганические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т. п.

Органические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, сульфосалициловую кислоту и т. п.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут быть образованы неорганическими и органическими основаниями.

Неорганические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, соли аммония и металлов из групп I–XII периодической таблицы элементов. В определенных вариантах осуществления соли получены из натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, серебра, цинка и меди; особенно подходящие соли включают соли аммония, калия, натрия, кальция и магния.

Органические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, в том числе встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины, основные ионообменные смолы и т. п. Определенные органические амины включают изопропиламин, бензатин, холинат, диэтаноламин, диэтиламин, лизин, меглюмин, пиперазин или трометамин.

Фармацевтически приемлемые соли могут быть синтезированы из исходного соединения, основного или кислотного компонента с помощью традиционных химических способов.

Как правило, такие соли можно получать путем осуществления реакции этих соединений в форме свободной кислоты со стехиометрическим количеством подходящего основания (такого как гидроксид, карбонат, бикарбонат и т. п. Na, Ca, Mg или K) или путем осуществления реакции этих соединений в форме свободного основания со

стехиометрическим количеством подходящей кислоты. Такие реакции, как правило, проводят в воде или в органическом растворителе или в смеси этих двух веществ. Обычно желательно применять неводную среду, такую как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, при наличии соответствующей практической возможности. Перечни дополнительных подходящих солей можно найти, например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1990); и в "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use", Stahl and Wermuth (Wiley–VCH, Weinheim, Germany, 2002).

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно–активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), средства для обеспечения изотоничности, средства, замедляющие всасывание, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, связующие вещества, наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, подсластители, вкусоароматические средства, красители и т. п. и их комбинации, которые будут известны специалистам в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18nd Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289–1329). За исключением случаев, когда какой–либо традиционный носитель является несовместимым с активным ингредиентом, предусматривается его применение в терапевтических или фармацевтических композициях.

Термин "терапевтически эффективное количество" биологически активного средства относится к количеству биологически активного средства, которое вызывает биологический или медицинский ответ у субъекта, например, уменьшение интенсивности симптома, облегчение состояния, замедление или задержку прогрессирования заболевания или предупреждение заболевания и т. д.

В другом неограничивающем варианте осуществления термин "терапевтически эффективное количество" означает количество биологически активного средства, которое при введении в клетку, ткань или неклеточный биологический материал или среду является эффективным для по меньшей мере частичного лечения заболевания или нарушения. Как будет понятно средним специалистам в данной области, абсолютное количество конкретного средства, которое является эффективным, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как желаемая биологическая конечная точка, средство, которое должно быть доставлено, ткань–мишень и т. д. Средним специалистам в данной области понятно, что "терапевтически эффективное количество" может быть введено в одной дозе или может быть достигнуто путем введения нескольких доз. Например, в случае со средством для лечения сердечной недостаточности эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для того, чтобы привести к клиническому улучшению состояния пациента, например, к увеличению выносливости к физической нагрузке/способности переносить физическую нагрузку, повышению кровяного давления, уменьшению задержки жидкости и/или улучшению результатов

количественного теста функционирования сердца, например, фракции выброса, способности переносить физическую нагрузку (времени до истощения) и т. д.

Используемый в данном документе термин "субъект" означает животное. Как правило, животное является млекопитающим. Субъект также означает, например, приматов (например, людей), коров, овец, коз, лошадей, собак, кошек, кроликов, крыс, мышей, рыб, птиц и т. п. В определенных вариантах осуществления субъектом является примат. В других вариантах осуществления субъектом является человек.

Используемые в данном документе термины "ингибировать", "ингибирование" или "ингибирующий" означают ослабление или подавление данного состояния, симптома, или нарушения, или заболевания или значительное уменьшение исходной активности для биологической активности или процесса.

Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" какого–либо заболевания или нарушения в одном варианте осуществления означают уменьшение интенсивности проявлений заболевания или нарушения (т. е. замедление, или остановку, или ослабление развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" означает облегчение или уменьшение интенсивности по меньшей мере одного физического параметра, в том числе параметров, которые пациент может не ощущать. В еще одном варианте осуществления "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" означает модулирование заболевания или нарушения физическим путем (например, стабилизацию ощутимого симптома) либо физиологическим путем (например, стабилизацию физического параметра) или и то, и другое. В еще одном варианте осуществления "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" означает предупреждение или задержку появления, или развития, или прогрессирования заболевания или нарушения. Используемые в данном документе термины "предупреждать", "осуществление предупреждения" и "предупреждение" означают предупреждение рецидива, появления или развития одного или нескольких симптомов нарушения у субъекта вследствие введения средства терапии (например, терапевтического средства) или введения комбинации средств терапии (например, комбинации терапевтических средств).

Как используется в данном документе, субъект "нуждается в" или является "нуждающимся в" лечении, если такое лечение принесет пользу такому субъекту с биологической, медицинской точки зрения или с точки зрения качества его жизни.

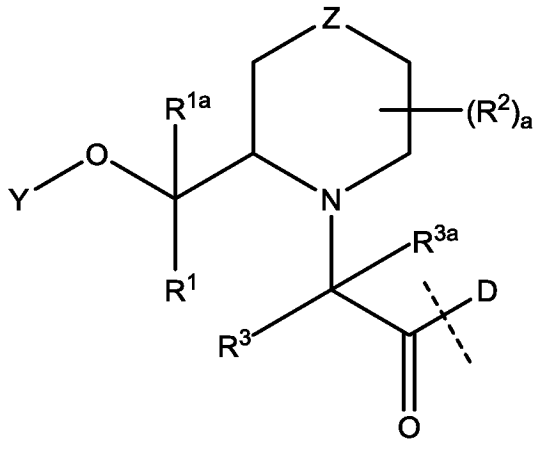
Используемые в данном документе термины в форме единственного числа и аналогичные термины, используемые в данном документе (в частности, в рамках формулы изобретения), следует истолковывать как охватывающие как форму единственного числа, так и форму множественного числа, если в данном документе не указано иное или если это явно не противоречит контексту.

Используемый в данном документе термин "приблизительно" относится к любым значениям, в том числе как целым числам, так и дробным компонентам, которые

находятся в пределах изменения на величину до ± 10% от значения, модифицированного термином "приблизительно".

Термин "или" может быть соединительным или разделительным, так что "или" охватывает "и/или".

Один вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой аддукт лекарственного средства, содержащий лекарственное средство и бесследный линкер, D–R, где R представляет собой линкер, который представлен формулой (I), подходящий для высвобождения биологически активного компонента D, содержащего по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

а равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический

простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

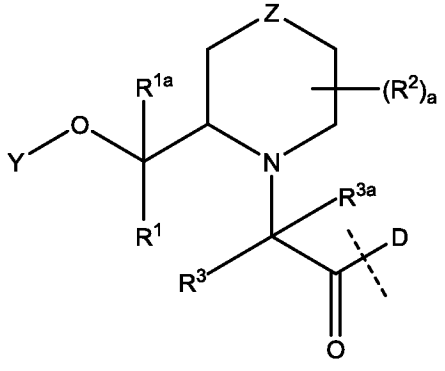
L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой аддукт лекарственного средства, содержащий лекарственное средство и бесследный линкер, D–R, где R представляет собой линкер, который представлен формулой (I), подходящий для высвобождения биологически активного компонента D, содержащего по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–

C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер $Q–[Sp–Q]_h–Q$;

Q в каждом случае независимо выбран из связи, O, C(O), N(H), $N(C_1–C_4$алкила), C(O)NH, $C(O)N(C_1–C_4$алкила), N(H)C(O), $N(C_1–C_4$алкил)C(O), N(H)C(O)O, $N(C_1–C_4$алкил)C(O)O, OC(O)N(H), $OC(O)N(C_1–C_4$алкила), N(H)C(O)N(H), $N(C_1–C_4$алкил)C(O)N(H), $N(H)C(O)N(C_1–C_4$алкила), $N(C_1–C_4$алкил)$C(O)N(C_1–C_4$алкила), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, $N(H)S(O)_2$, $N(C_1–C_4$алкил)$S(O)_2$, $S(O)_2N(H)$, $S(O)_2N(C_1–C_4$алкила), $C_1–C_2$алкил–C(O)N(H), $N(H)C(O)C_1–C_2$алкила, $C_1–C_2$алкил–C(O)O, $OC(O)C_1–C_2$алкила, 1,2,3–триазола, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, $C_1–C_4$алкил–$P(O)_2$–O или $O–P(O)_2–C_1–_4$алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенных $C_1–C_{20}$алкила, $C_2–C_{20}$алкенила, $C_2–C_{20}$алкинила, $[W–O]_g$, $C_1–C_8$алкил–$[O–W]_g$, $[O–W]_g–O–C_1–C_8$алкила, $C_1–C_8$алкил–$[O–W]_g–O–C_1–C_8$алкила, олигопептида;

h представляет собой целое число от 1 до 20;

g представляет собой средневзвешенное число от приблизительно 2 до приблизительно 50;

W представляет собой $C_2–C_4$алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь,

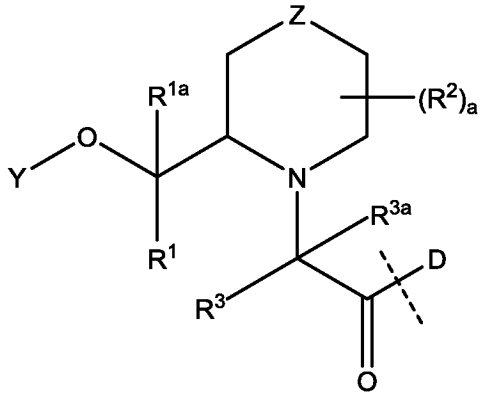
представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, C(O)C_1–C_8алкил, C(O)OC_1–C_8алкил, C(O)N(H)C_1–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой аддукт лекарственного средства, содержащий лекарственное средство и бесследный линкер, D–R, где R представляет собой линкер, который представлен формулой (I), подходящий для высвобождения биологически активного компонента D, содержащего по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой C(O)R^4, C(O)OR^4, C(O)NHR^4, C(O)NR^5R^6, Si$R^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в

комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q в каждом случае независимо равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4$алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

В некоторых аспектах R^1–R^8 в формуле (I) имеют следующие значения. В одном аспекте R^1 представляет собой водород или метил. В другом аспекте R^{1a} представляет собой водород или метил. В другом аспекте R^1 и R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил. В другом аспекте R^2 представляет собой метил. В другом аспекте две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную или спиро–C_3–C_6циклоалкильную группу. В другом аспекте R^3 представляет собой водород или метил. В другом аспекте R^{3a} представляет собой водород или метил. В другом аспекте R^3 и R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил. В другом аспекте Y представляет собой $C(O)R^4$, и R^4 представляет собой C_1–C_6алкил, C_1–C_2алкокси, C_1–

C_2алкил или C_1–C_6алкокси. В другом аспекте R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил. В другом аспекте Y представляет собой $SiR^5R^6OR^7$; и каждый из R^5 и R^6 представляет собой метил, этил, пропил или изопропил; и R^7 представляет собой этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор–бутил, этоксиэтил, этоксиизопропил, тетрагидропиранил или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где b равняется 2, 3 или 4.

В некоторых аспектах R^8 и R^9 в формуле (I) имеют следующие значения. В одном аспекте R^9 представляет собой $C(O)C_2$карбамоил. В другом аспекте R^9 представляет собой $C(O)C_2$амидил. В другом аспекте R^9 представляет собой $C(O)C_5$алкил. В другом аспекте R^9 представляет собой $C(O)C_2$алкил. В другом аспекте R^9 представляет собой $C(O)C_1$алкил. В другом аспекте R^9 представляет собой $C(O)CH_2CH_2NHC(O)CH_2CH_2CH_2CH_2$. В другом аспекте R^9 представляет собой $C(O)(CH_2CH_2O)_bCH_2CH_2$, где b равняется 1, 2, 3 или 4. В другом аспекте R^9 представляет собой амидил. В другом аспекте R^9 представляет собой карбамоил. В другом аспекте R^9 представляет собой C_1алкиламидил. В другом аспекте R^9 представляет собой C_2алкиламидил.

В некоторых аспектах Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

В некоторых аспектах Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер $Q–[Sp–Q]_h–Q$;

Q в каждом случае независимо выбран из связи, O, C(O), N(H), $N(C_1–C_4$алкила), C(O)NH, $C(O)N(C_1–C_4$алкила), N(H)C(O), $N(C_1–C_4$алкил)C(O), N(H)C(O)O, $N(C_1–C_4$алкил)C(O)O, OC(O)N(H), $OC(O)N(C_1–C_4$алкила), N(H)C(O)N(H), $N(C_1–C_4$алкил)C(O)N(H), $N(H)C(O)N(C_1–C_4$алкила), $N(C_1–C_4$алкил)$C(O)N(C_1–C_4$алкила), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, $N(H)S(O)_2$, $N(C_1–C_4$алкил)$S(O)_2$, $S(O)_2N(H)$, $S(O)_2N(C_1–C_4$алкила), $C_1–C_2$алкил–C(O)N(H), $N(H)C(O)C_1–C_2$алкила, $C_1–C_2$алкил–C(O)O, $OC(O)C_1–C_2$алкила, 1,2,3–триазола, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, $C_1–C_4$алкил–$P(O)_2$–O или $O–P(O)_2–C_1–_4$алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенных $C_1–C_{20}$алкила, $C_2–C_{20}$алкенила, $C_2–C_{20}$алкинила, $[W–O]_g$, $C_1–C_8$алкил–$[O–W]_g$, $[O–W]_g–O–C_1–C_8$алкила, $C_1–C_8$алкил–$[O–W]_g–O–C_1–C_8$алкила, олигопептида;

h представляет собой целое число от 1 до 20;

g представляет собой средневзвешенное число от приблизительно 2 до приблизительно 50;

W представляет собой $C_2–C_4$алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь,

представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, C(O)C_1–C_8алкил, C(O)OC_1–C_8алкил, C(O)N(H)C_1–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

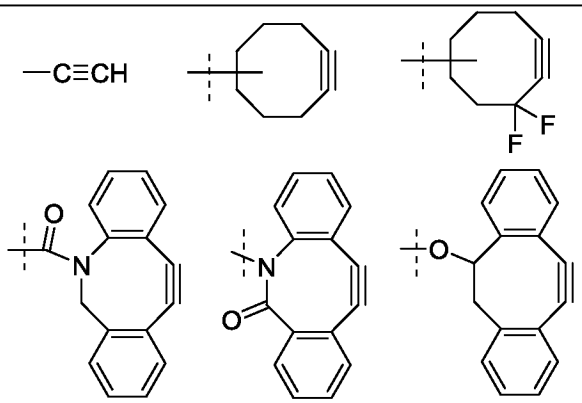
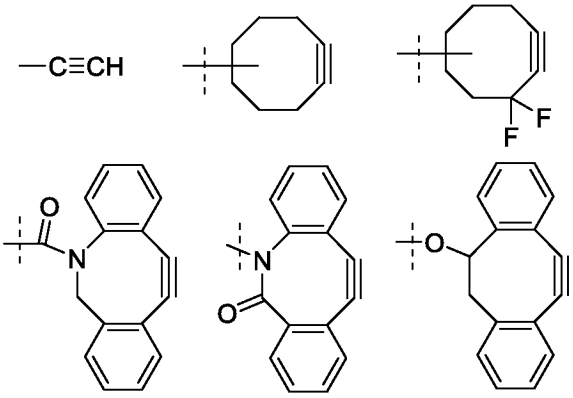
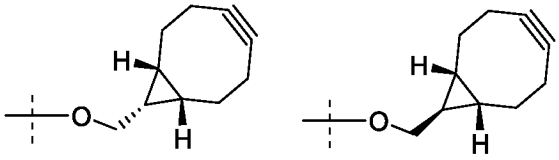
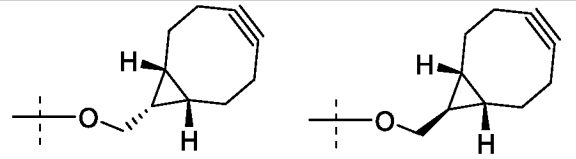
R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

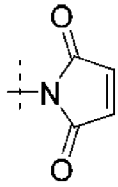
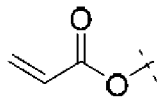
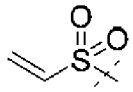
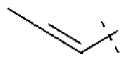
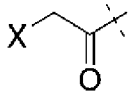
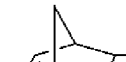
R^{11} представляет собой носитель.

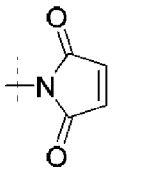
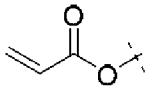
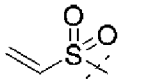
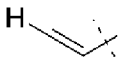
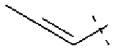
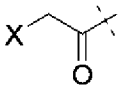
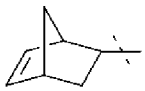
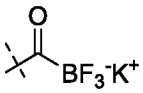
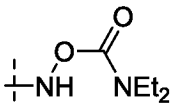
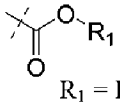
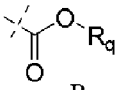
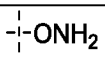
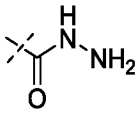
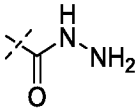
В некоторых аспектах g и h равняются от 1 до приблизительно 25 или от 1 до приблизительно 10.

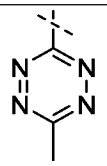
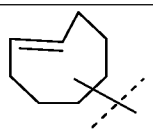
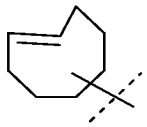
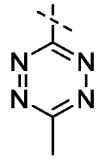
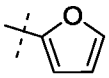
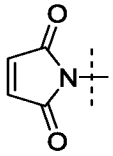
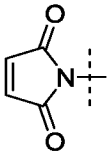
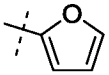
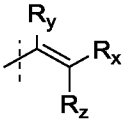
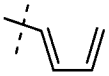
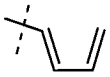
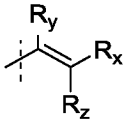
В некоторых аспектах Z в формуле (I) представляет собой NR^9. В одном аспекте R^9 дополнительно замещен R^{10}. В другом аспекте R^9 дополнительно замещен R^{11}.

Согласно формуле (I) R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для ортогональных реакций связывания. Подходящими реакционноспособными функциональными группами являются группы, которые легко подвергаются ортогональным реакциям. Иллюстративные и неограничивающие ортогональные химические реакции включают реакции с участием функциональных групп, показанных в таблице 1. В указанной строке в таблице 1 функциональная группа X (левый столбец) подходит для реакции связывания с функциональной группой Y (правый столбец). Реакции связывания могут включать образование ковалентных связей или межмолекулярных комплексов. В большинстве вариантов осуществления реакция связывания приводит к образованию ковалентной связи. В других реакциях, таких как реакция адамантана с циклодекстраном, связывание представляет собой нековалентную ассоциацию молекул. В одном аспекте функциональная группа выбрана из азидила, алкинила, замещенного или незамещенного C_6–C_{12}циклоалкинила, C_6–C_{12}гетероциклоалкинила, C_6–C_{12}циклоалкенила, норборнила, винилкарбоксила, винилсульфонила, C_2–C_8алкенила, замещенного или незамещенного C_1–C_8алкокси, тиола, C_1–C_8карбоксила, C_1–C_8карбонила, оксиамина, карбогидразида, малеимида, альфа–галогенкарбонила, фурана, замещенного или незамещенного тетразинила, лизина, глутамина, циклодекстрина и адамантанила. В другом аспекте функциональная группа представляет собой замещенный C_6–C_{12}циклоалкинил, где заместитель включает в себя конденсированную циклопропильную группу. В другом аспекте функциональная группа представляет собой бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил. В другом аспекте функциональная группа представляет собой азидил.

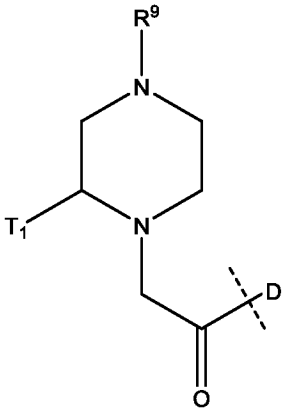
Таблица 1. Иллюстративные ортогональные химические реакции	
Соединение (или полимер) 1–X **X:**	**Соединение (или полимер) 2–Y** **Y:**
	
	
	
	

	      X = галоген

       X = галоген	
	
	 R_1 = H или активированный сложный эфир
 R_q = H или активированный сложный эфир	
 	 
  	

	
	
	
	
	
	
Lys	Gln
Gln	Lys
циклодекстрин или другая молекула-хозяин	адамантан или другая молекула-хозяин
адамантан или другая молекула-хозяин	циклодекстрин или другая молекула-хозяин

В некоторых вариантах осуществления бесследный линкер R имеет формулу (II):

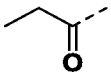
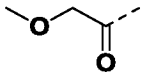
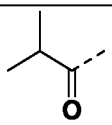
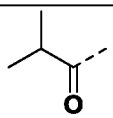
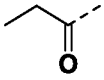
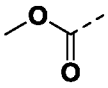
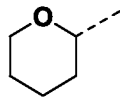
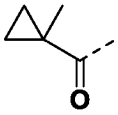
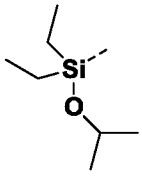
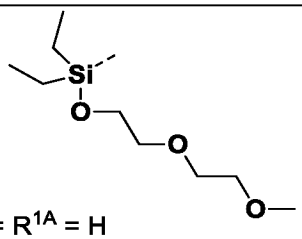
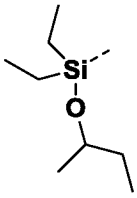
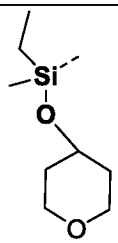
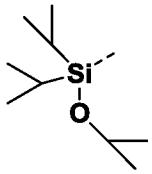
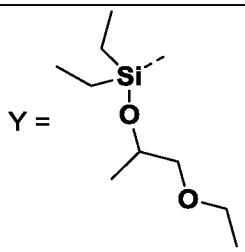
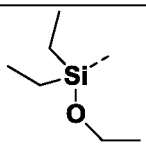
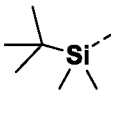
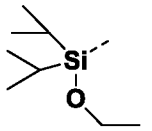


(II),

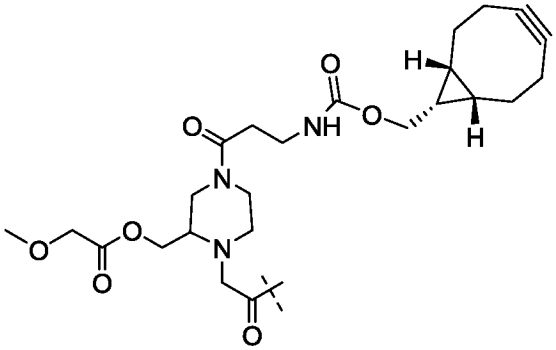
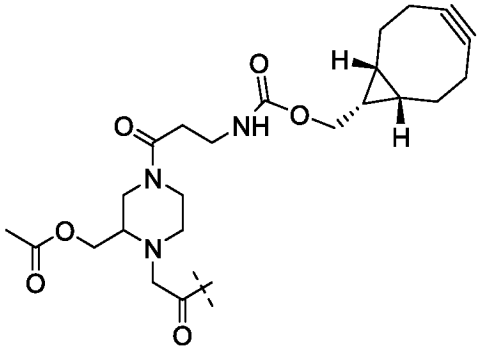
где как R^9, так и D определены в формуле (I) выше, а T_1 содержит замещенный или незамещенный C_2–C_{10}сложный эфир, замещенный или незамещенный C_3–C_{10}силиловый простой эфир, содержащие один или несколько гетероатомов, выбранных из атомов азота или кислорода.

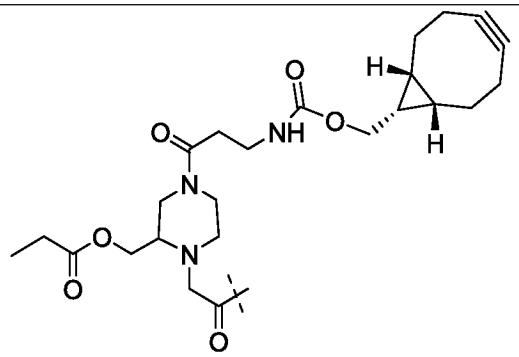
В некоторых аспектах T_1 представляет собой $–CR^1R^{1a}OY$, который содержит

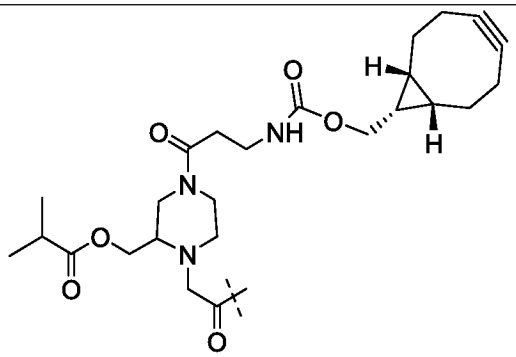
инициаторный компонент и содержит одну из следующих структур из таблицы 2.

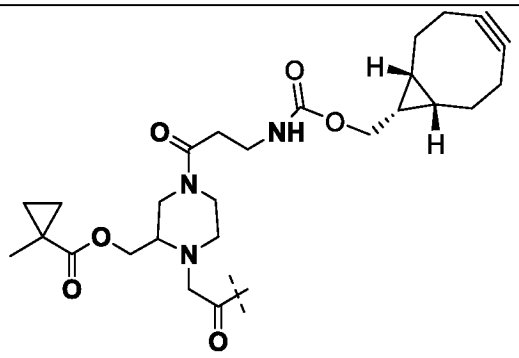
Таблица 2. Инициаторные компоненты			
Y = $R^1 = R^{1A} = H$	Y = $R^1 = H; R^{1A} = CH_3$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = H; R^{1A} = CH_3$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$
Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	Y =  $R^1 = R^{1A} = H$	–

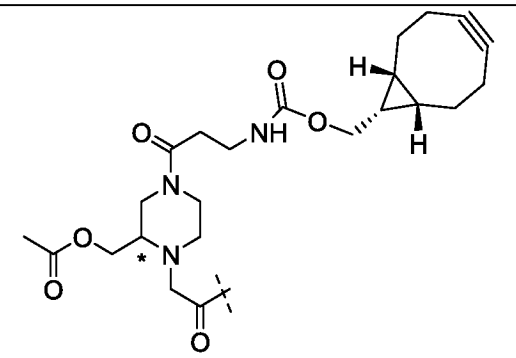
В некоторых вариантах осуществления бесследный линкер R согласно формуле I либо формуле II содержит любую из следующих структур из таблицы 3.

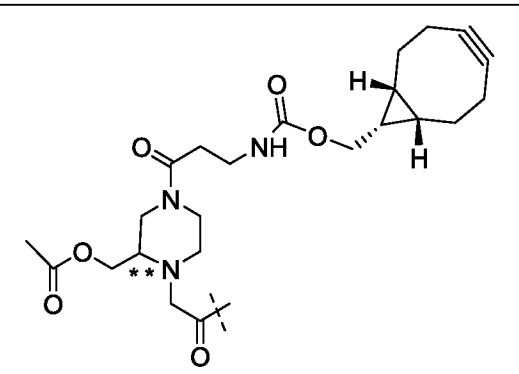
Таблица 3. Иллюстративные бесследные линкеры	
	

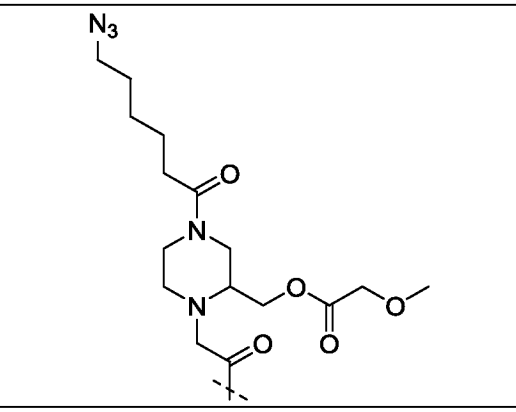


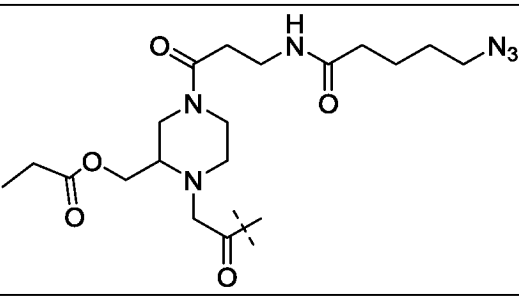


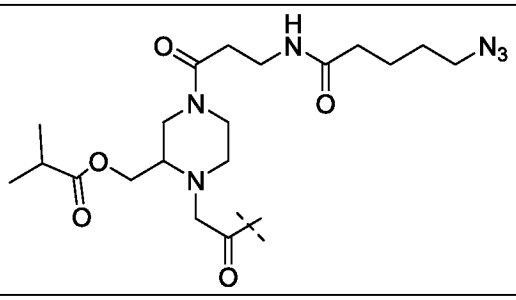


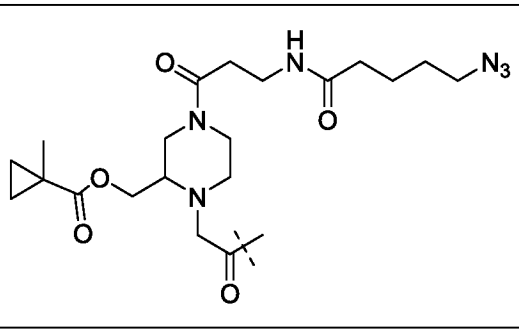


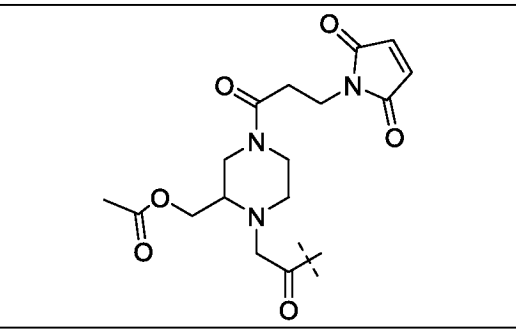


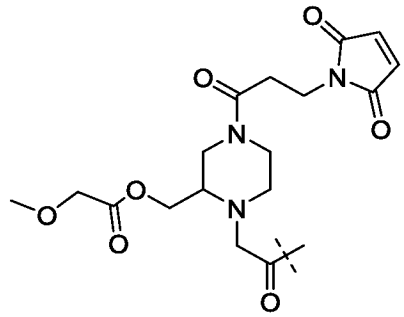
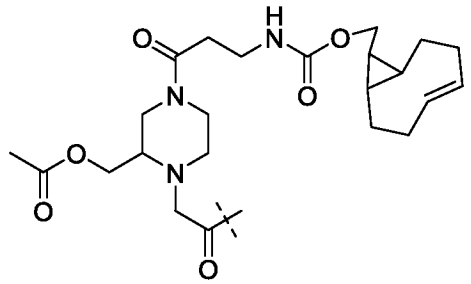
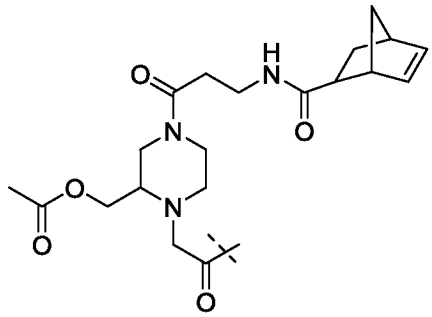
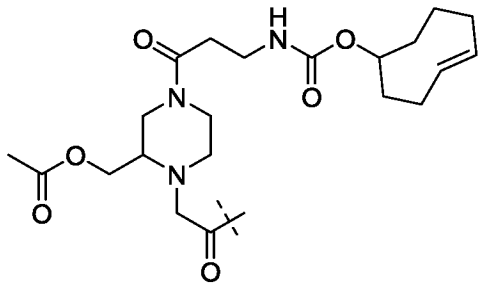
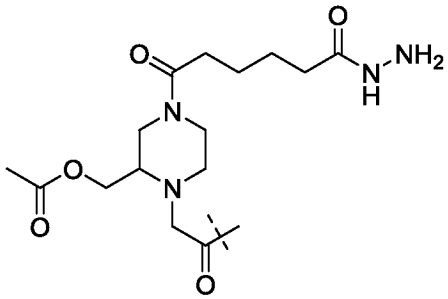
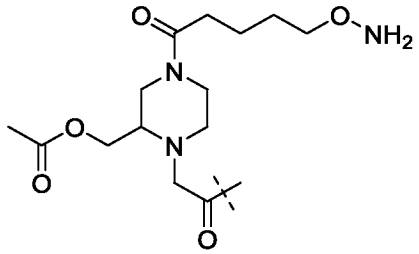
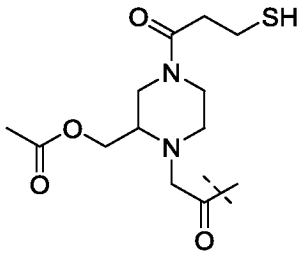
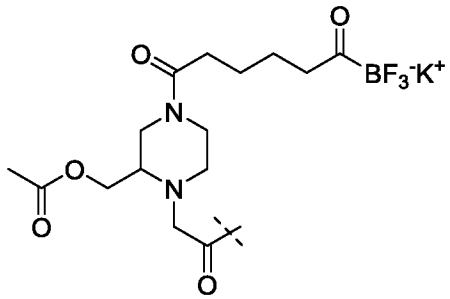




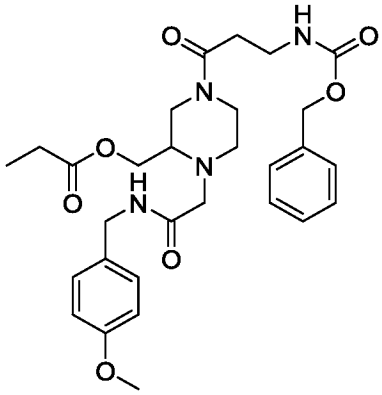
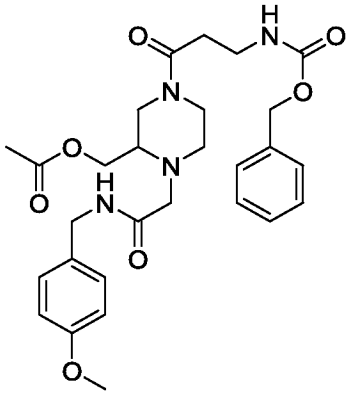


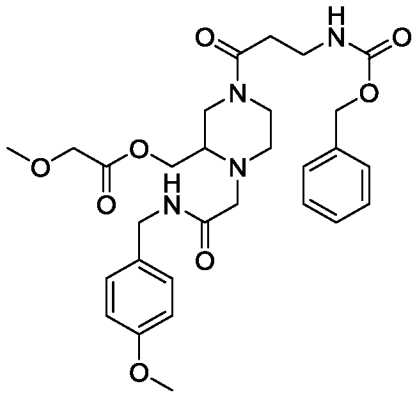
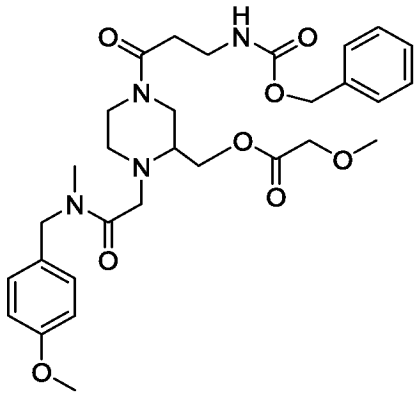
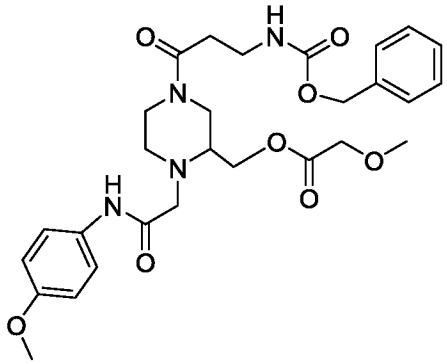
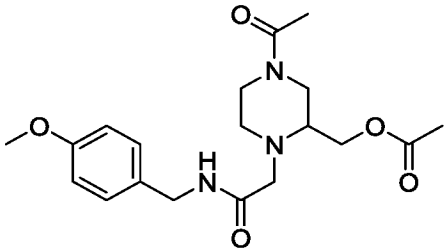
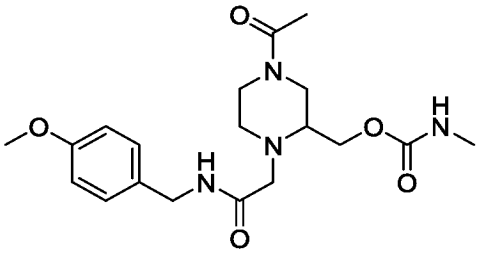
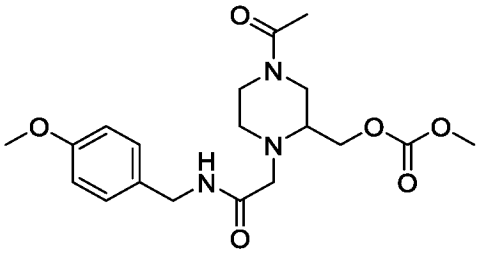
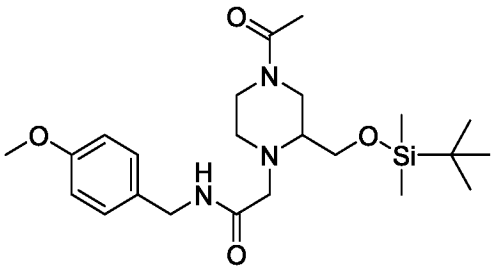
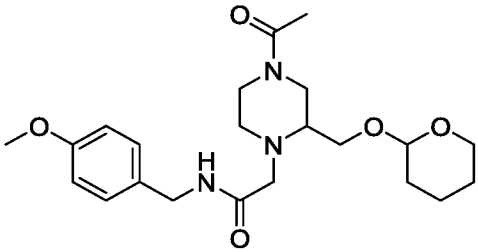
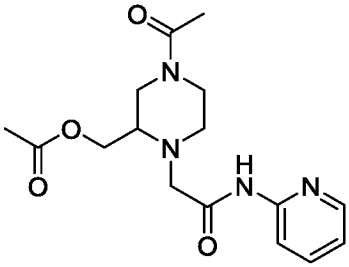
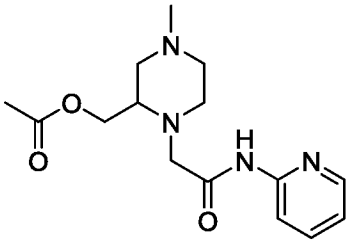
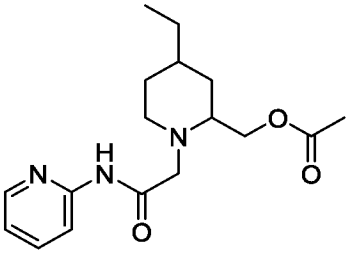
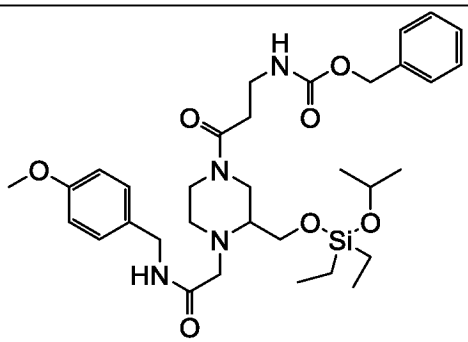


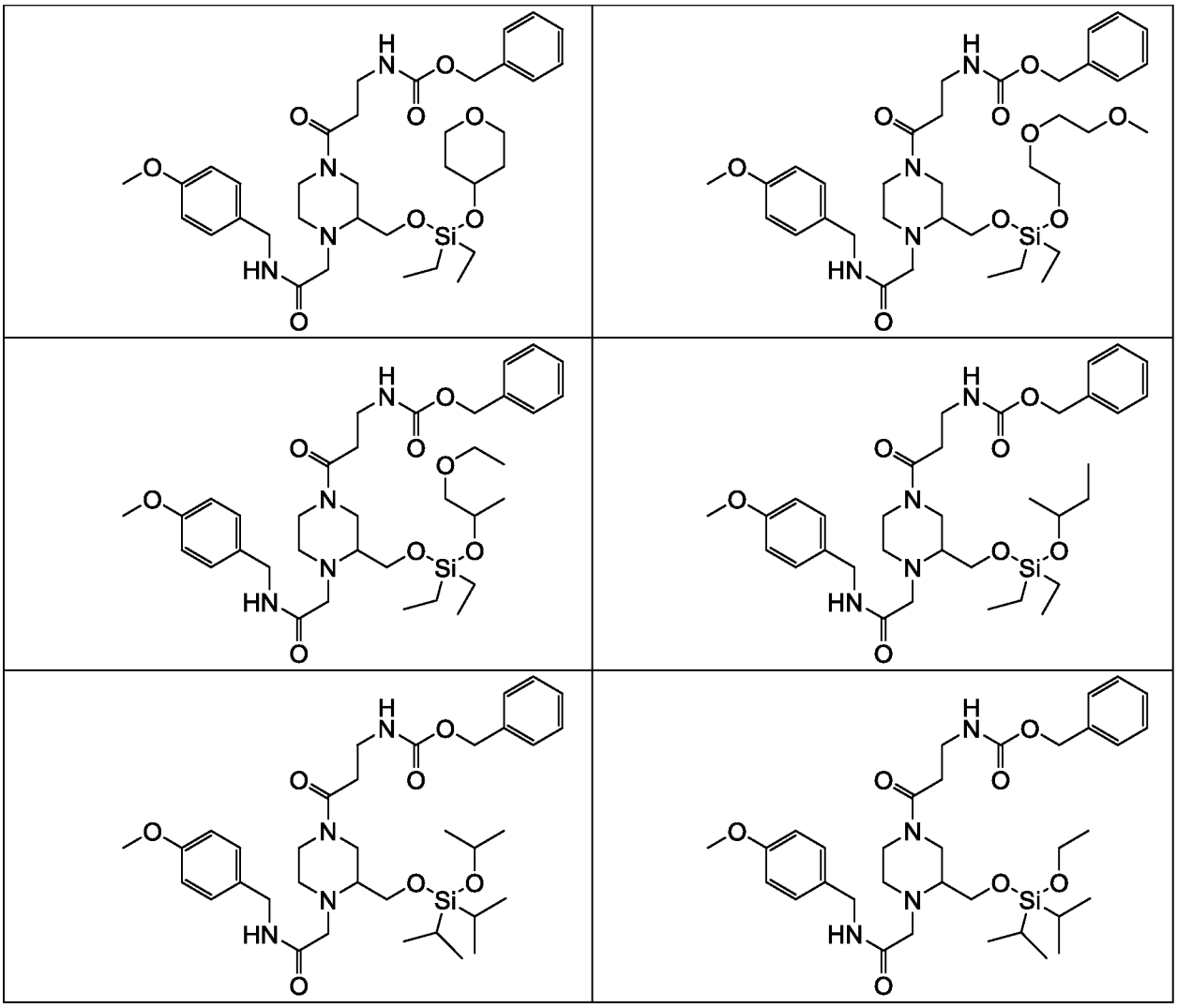


В другом варианте осуществления бесследный линкер R согласно формуле (I) или формуле (II) конъюгирован с лекарственным средством или биологически активным компонентом. В одном аспекте конъюгат лекарственное средство–бесследный линкер содержит одну из следующих структур из таблицы 4.

Таблица 4. Иллюстративные бесследные линкеры	
	



Синтез бесследного линкера R

Другой вариант осуществления представляет собой способ получения бесследного линкера R согласно формуле (I), включающий любую из стадий: (A) осуществления реакции по атому азота N4 пиперазинового соединения, содержащего нуклеофильную группу в положении C2, с функционализированным ацильным линкерным соединением с образованием N4–ацилпиперазина; (B) карбоксиметилирования по атому азота N1 пиперазинового кольца в N4–ацилпиперазине, где карбоксильная группа ковалентно присоединена к подходящей защитной группе; (C) осуществления реакции нуклеофильной группы N4–ацилпиперазина с инициаторным соединением, описанным в данном документе; (D) при необходимости, преобразования функционализированного ацильного линкера при N4 таким образом, чтобы он содержал функциональную группу, подходящую для присоединения бесследного линкера к соединению–носителю. В одном аспекте нуклеофильная группа в положении C2 пиперазинового соединения содержит гидроксил. В другом аспекте нуклеофильная группа в положении C2 пиперазинового соединения представляет собой первичную спиртовую группу. В другом аспекте первичная спиртовая группа, присутствующая в пиперазиновом соединении, из стадии (A) или (D) конъюгирована с подходящей защитной группой или инициаторной группой. В другом аспекте защитная группа или инициаторная группа включает в себя соединение,

содержащее сложноэфирную группу, группу силилового простого эфира, ацетальную, карбаматную, карбонатную или дисилоксановую группу. В одном аспекте защитную группу для N4–карбоксиметилового сложного эфира удаляют с образованием карбоновой кислоты, которая подходит для образования амидной связи с биологически активным средством, содержащим по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце. В другом аспекте на стадии карбоксиметилирования карбоксильную группу карбоксиметилирующего реагента ковалентно присоединяют посредством амидной связи к биологически активному средству, содержащему по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце. В одном аспекте функциональная группа из стадии A является подходящей для присоединения бесследного линкера к соединению–носителю.

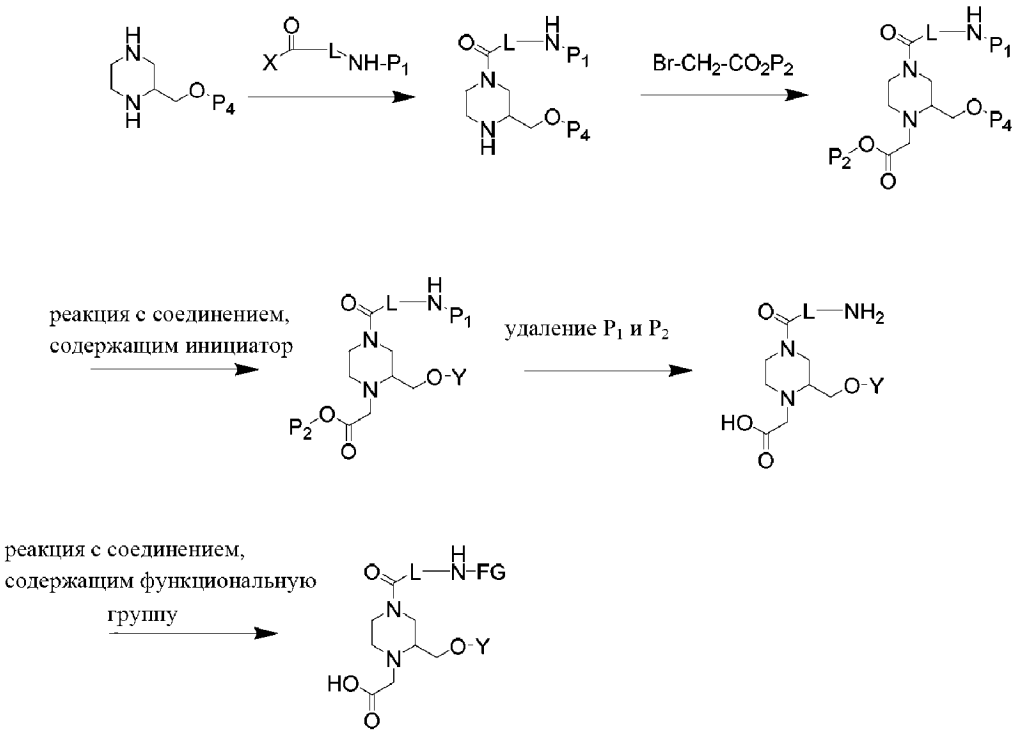
Другой вариант осуществления представляет собой способ получения бесследного линкера R согласно формуле (I), включающий любую из стадий: (A) карбоксиметилирования по атому азота N1 пиперазинового соединения, содержащего нуклеофильную группу в положении C2, где карбоксильная группа ковалентно присоединена к подходящей защитной группе; (B) осуществления реакции по атому азота N4 пиперазинового соединения с функционализированным алкильным линкером с образованием N4–алкилпиперазина; (C) осуществления реакции нуклеофильной группы N4–алкилпиперазина с инициаторным соединением, описанным в данном документе; (D) при необходимости, преобразования функционализированного алкильного линкера при N4 таким образом, чтобы он содержал функциональную группу, подходящую для присоединения бесследного линкера к соединению–носителю. В одном аспекте реакционноспособная группа пиперазинового соединения содержит гидроксил. В другом аспекте нуклеофильная группа в положении C2 пиперазинового соединения представляет собой первичную спиртовую группу. В другом аспекте первичная спиртовая группа, присутствующая в пиперазиновом соединении, из стадии (A) или (D) конъюгирована с подходящей защитной группой или инициаторной группой. В другом аспекте инициаторное соединение включает в себя соединение, содержащее сложноэфирную группу, группу силилового простого эфира, ацетальную, карбаматную, карбонатную или дисилоксановую группу. В одном аспекте защитную группу для N4–карбоксиметилового сложного эфира удаляют с образованием карбоновой кислоты, которая подходит для образования амидной связи с биологически активным средством, содержащим по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце. В другом аспекте на стадии карбоксиметилирования карбоксильную группу карбоксиметилирующего реагента ковалентно присоединяют посредством амидной связи к биологически активному средству, содержащему по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце. В одном аспекте функциональная группа из стадии A является подходящей для присоединения бесследного линкера к соединению–носителю.

Другой вариант осуществления представляет собой способ получения бесследного линкера R согласно формуле (I), включающий любую из стадий: (A) введения функционализированного линкера в положение C4 пиридинового соединения, содержащего нуклеофильную группу в положении C2, посредством реакции кросс–сочетания или замещения; (B) гидрирования 4–замещенного пиридинового соединения с образованием 4–замещенного пиперидинового соединения; (C) карбоксиметилирования по атому азота N1 4–замещенного пиперидинового соединения, где карбоксильная группа ковалентно присоединена к подходящей защитной группе; (D) осуществления реакции нуклеофильной группы 4–замещенного пиперидинового соединения с инициаторным соединением, описанным в данном документе; (E) при необходимости, преобразования функционализированного алкильного линкера при C4 таким образом, чтобы он содержал функциональную группу, подходящую для присоединения бесследного линкера к соединению–носителю. В одном аспекте нуклеофильная группа пиридинового или пиперидинового соединений содержит гидроксил. В другом аспекте нуклеофильная группа в положении C2 пиридинового или пиперидинового соединений представляет собой первичную спиртовую группу. В другом аспекте инициаторное соединение включает в себя соединение, содержащее сложноэфирную группу, группу силилового простого эфира, ацетальную, карбаматную, карбонатную или дисилоксановую группу. В одном аспекте защитную группу для N4–карбоксиметилового сложного эфира удаляют с образованием карбоновой кислоты, которая подходит для образования амидной связи с биологически активным средством, содержащим по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце. В другом аспекте на стадии карбоксиметилирования карбоксильную группу карбоксиметилирующего реагента ковалентно присоединяют посредством амидной связи к биологически активному средству, содержащему по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце. В одном аспекте функциональная группа из стадии A является подходящей для присоединения бесследного линкера к соединению–носителю.

Подходящие защитные группы представляют собой компоненты, которые обратимо связаны с реакционноспособными функциональными группами или химическими функциональными группами таким образом, что они делают их неспособными реагировать, например, с другими химическими функциональными группами. Иллюстративные и неограничивающие защитные группы для аминогруппы включают флуоренилметиленоксигруппу (FMOC), трет–бутилоксикарбонильную (BOC), карбоксибензильную (Cbz) группы и т. п. Иллюстративные и неограничивающие защитные группы для спиртовой группы включают группы трет–бутилового простого эфира, аллилового простого эфира, бензилового простого эфира, трет–бутилдиметилсилилового простого эфира (TBDMS) и т. п. При необходимости на протяжении всего процесса синтеза можно добавлять или удалять группы для удаления защиты, чтобы блокировать и делать доступными определенные компоненты.

В одном варианте осуществления способ получения бесследного линкера соответствует схемам реакций **1–3**. Следующие схемы являются общими и неограничивающими схемами получения бесследных линкеров. Как показано в примерах в данном документе, некоторые пути синтеза не соответствуют в точности этим общим схемам. В другом аспекте способ получения бесследного линкера в соответствии со схемами реакций приведен в примере 1.

Схема 1



при этом одну или несколько стадий, показанных выше, можно выполнять в другом последовательном порядке или пропустить в зависимости от используемых реагентов;

X представляет собой активирующую группу, содержащую Cl, O–NHS, O(C=O)–R^{2a} или X–OH, и реакция предусматривает применение стандартных связывающих реагентов для образования пептидной связи, таких как гексафторфосфат 1–[бис(диметиламино)метилен]–1H–1,2,3–триазоло[4,5–b]пиридиний–3–оксида (HATU);

R^{2a} представляет собой C_1–C_8алкил или арил;

P_4 представляет собой подходящую защитную группу или H;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

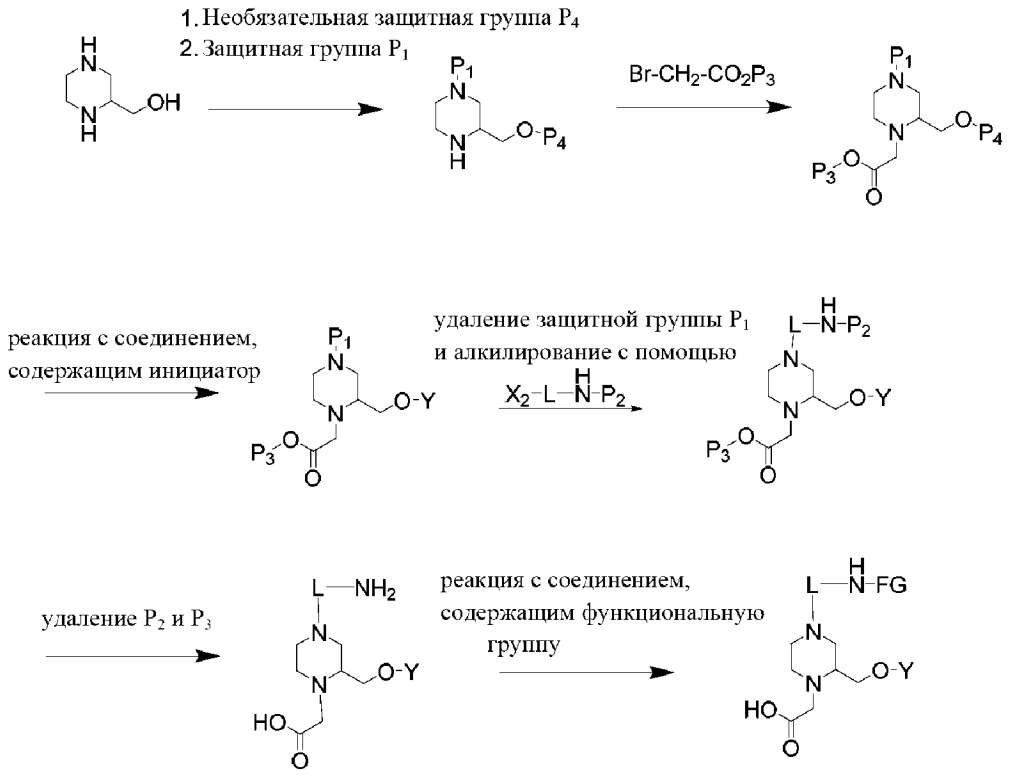
P_1 и P_2 представляют собой защитные группы, которые могут быть идентичными;

Y представляет собой подходящий инициатор, приведенный в таблице 2; и

FG содержит подходящую(подходящие) функциональную(функциональные) группу(группы), способные к конъюгированию с носителем, описанным в данном

документе.

Схема 2



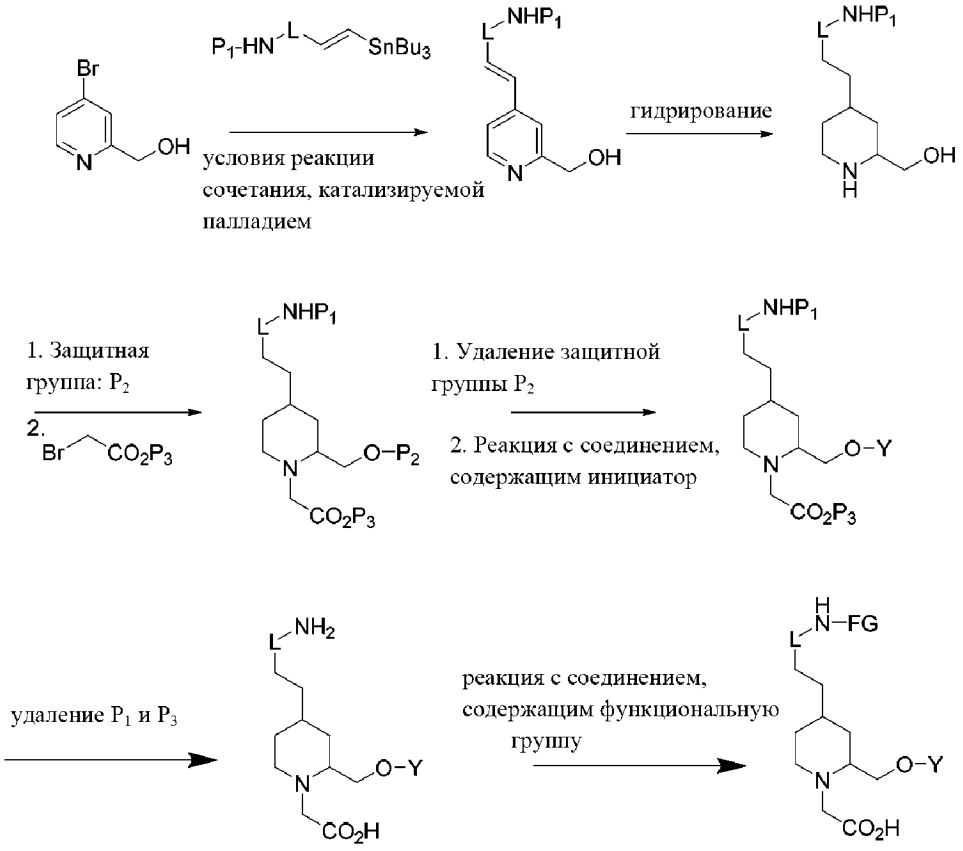
при этом одну или несколько стадий, показанных выше, можно выполнять в другом последовательном порядке или пропустить в зависимости от используемых реагентов;

где X_2 представляет собой активирующую группу, такую как Cl, Br, I или трифлат;

Y, L, P_1, P_2, P_4 и FG являются такими, как описано на схеме 1;

P_3 представляет собой защитную группу, которая может быть идентичной P_1 и P_2.

Схема 3



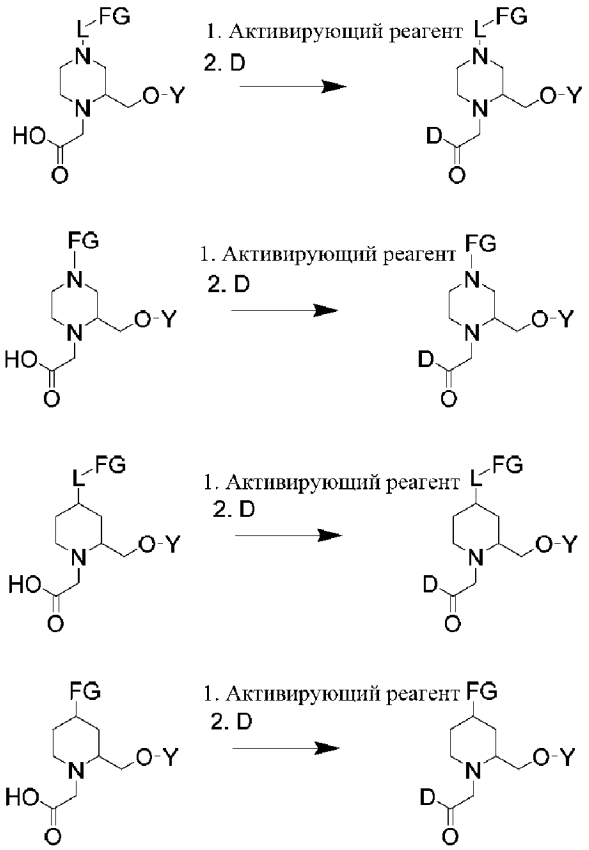
при этом одну или несколько стадий, показанных выше, можно выполнять в другом последовательном порядке или пропустить в зависимости от используемых реагентов; и

L, P_1, P_2, P_3, Y и FG являются такими, как описано на схеме 2.

Как описано в данном документе, аддукт D–R формулы (I) или формулы (II) получают путем осуществления реакции бесследного линкера R в форме карбоновой кислоты с аминогруппой биологически активного средства, содержащего по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, с образованием амидной связи. Этот процесс описан на схеме 4. Подходящий активатор карбоновой кислоты используется для стимулирования реакции образования амидной связи. В качестве примера, карбоновую кислоту можно превратить в аминореактивную форму под действием дисукцинимидилкарбоната с образованием сложного NHS–эфира; затем осуществляют реакцию группы сложного NHS–эфира бесследного линкера R с аминосодержащим лекарственным средством D с образованием аддукта D–R.

На схеме 4 L, Y и FG являются такими, как описано на схемах 1–3; D представляет собой биологически активное средство, содержащее по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце.

Схема 4



Один вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой бесследный линкер R согласно формуле (I) или формуле (II), присоединенный к композиции носителя посредством линкера, имеющего одну или несколько функциональных групп. В одном аспекте композиция носителя содержит R^{11} бесследного линкера, описанный в данном документе. В одном аспекте R^{11} содержит полимер, биополимер или полиэтиленгликоль, связанный с R^8 или R^9 посредством линкера. В одном аспекте композиция носителя представляет собой гидрогель. В одном аспекте гидрогелевая композиция содержит гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, полиэтиленоксид, полиглутамат, полилизин, полисиаловую кислоту, поливиниловый спирт, полиакрилат, полиметакрилат, сополимеры полиакрилата и полиметакрилата, полиакриламид, полиметакриламид, поливинилпирролидон, полиоксазолин, полииминокарбонат, полиаминокислоту, гидрофильный сложный полиэфир, полиамид, полиуретан, полимочевину, декстран, агарозу, ксилан, маннан, каррагинан, альгинат, желатин, коллаген, альбумин, целлюлозу, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксиэтилкрахмал, хитозан, нуклеиновые кислоты, их производные, их сополимеры или их комбинации. В другом аспекте R^{11} содержит наночастицу или молекулярную поверхность. В одном аспекте гидрогель содержит гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль. В другом аспекте R^{11} содержит сшитый гидрогель на основе гиалуроновой кислоты или полиэтиленгликоля. В

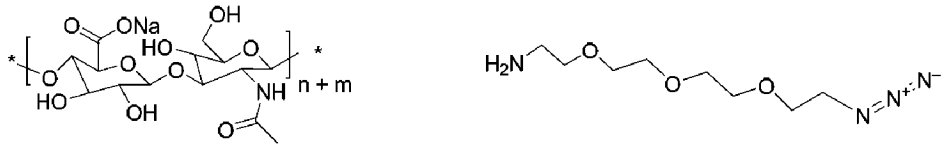
одном аспекте, в котором система доставки лекарственных средств используется в глазу или в синовиальных соединениях, R^{11} содержит гиалуроновую кислоту или сшитую гиалуроновую кислоту.

Как описано в данном документе, композиции носителя R^{11} могут быть сшиты для соединения нескольких молекул друг с другом и облегчения образования гидрогеля. Сшивание можно осуществлять с помощью любых способов, известных из уровня техники (см., например, Liu et al., Chem. Commun. 51, (2015). В одном варианте осуществления, описанном в данном документе, гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль функционализируют одной или несколькими функциональными группами, показанными в таблице 1, с получением реакционноспособных функциональных групп для сшивания. В другом аспекте гиалуроновая кислота или полиэтиленгликоль функционализированы функциональной группой, выбранной из азидила, алкинила, замещенного или незамещенного C_7–C_{12}циклоалкинила, C_7–C_{12}циклоалкенила, замещенного или незамещенного C_7–C_{12}гетероциклоалкинила, винилкарбоксила, винилсульфонила, C_2–C_8алкенила, амино, тиола, C_1–C_8карбоксила, C_1–C_8карбонила, оксиамина, карбогидразида, малеимида, альфа–галогенкарбонила, фурана, замещенного или незамещенного тетразинила, лизина, глутамина, циклодекстрина и адамантанила. В другом аспекте гиалуроновая кислота функционализирована азидильной группой.

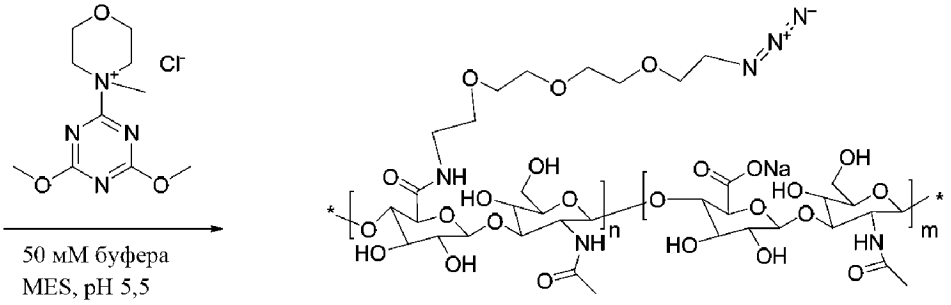
Степень функционализации может определять пористость гидрогеля. В одном аспекте функционализировано от приблизительно 5% до приблизительно 50% полимера–носителя, включая все целые числа в пределах указанного диапазона. В одном аспекте полимер–носитель функционализирован на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50% или даже больше.

В одном аспекте носитель представляет собой гиалуроновую кислоту. В другом аспекте осуществляют реакцию гиалуроновой кислоты с хлоридом 4–(4,6–диметокси–1,3,5–триазин–2–ил)–4–метилморфолин–4–ия (номер CAS 3945–69–5) и 2–(2–(2–(2–азидоэтокси)этокси)этокси)этанамином (номер CAS 134179–38–7) с образованием гиалуроновой кислоты, функционализированной азидной группой ([HA–N_3]). В одном аспекте реакция является следующей:

.



Гиалуроновая кислота, натриевая соль (HA)

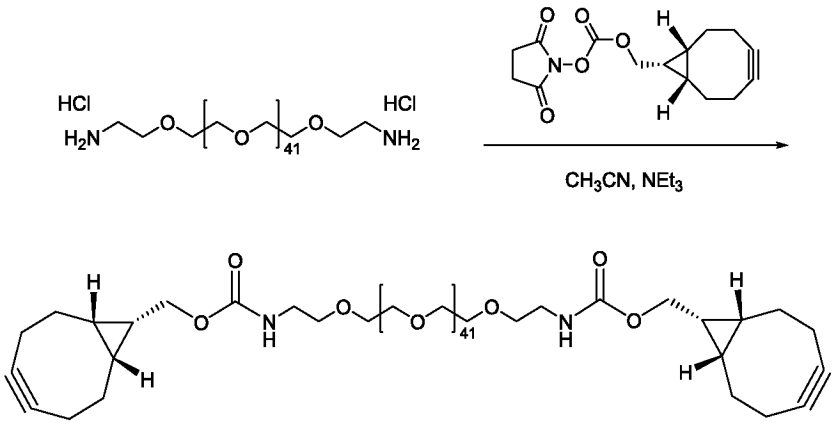


Условия эксперимента описаны в примере 3. В одном аспекте функционализировано от приблизительно 5% до приблизительно 50% гиалуроновой кислоты, включая все целые числа в пределах указанного диапазона. В одном аспекте гиалуроновая кислота функционализирована на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50% или даже больше.

В другом варианте осуществления полиэтиленгликоль функционализирован различными реагентами для образования сшивающих средств для связывания функционализированных мономеров гиалуроновой кислоты, как обсуждается выше.

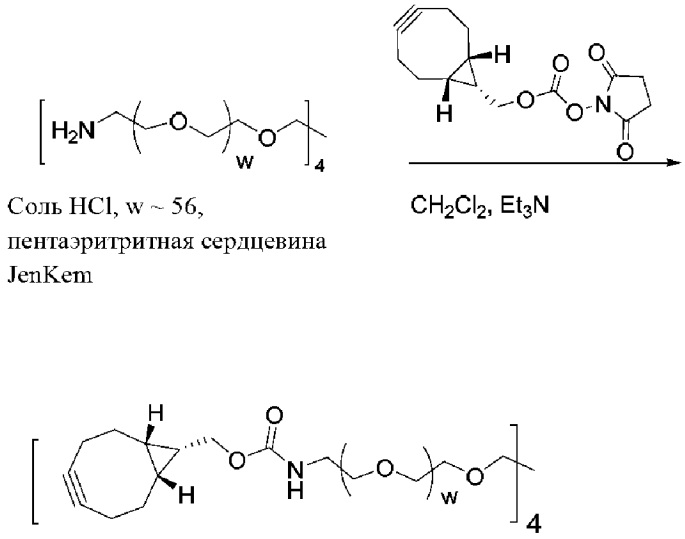
Синтез сшивающего средства на основе PEG–BCN с 2 ветвями размером 2 кДа

В одном аспекте осуществляют реакцию гидрохлорида полиэтиленгликольдиамина с M_n ~ 2 кДа в соответствии с показанным. Условия реакции описаны в примере 4.



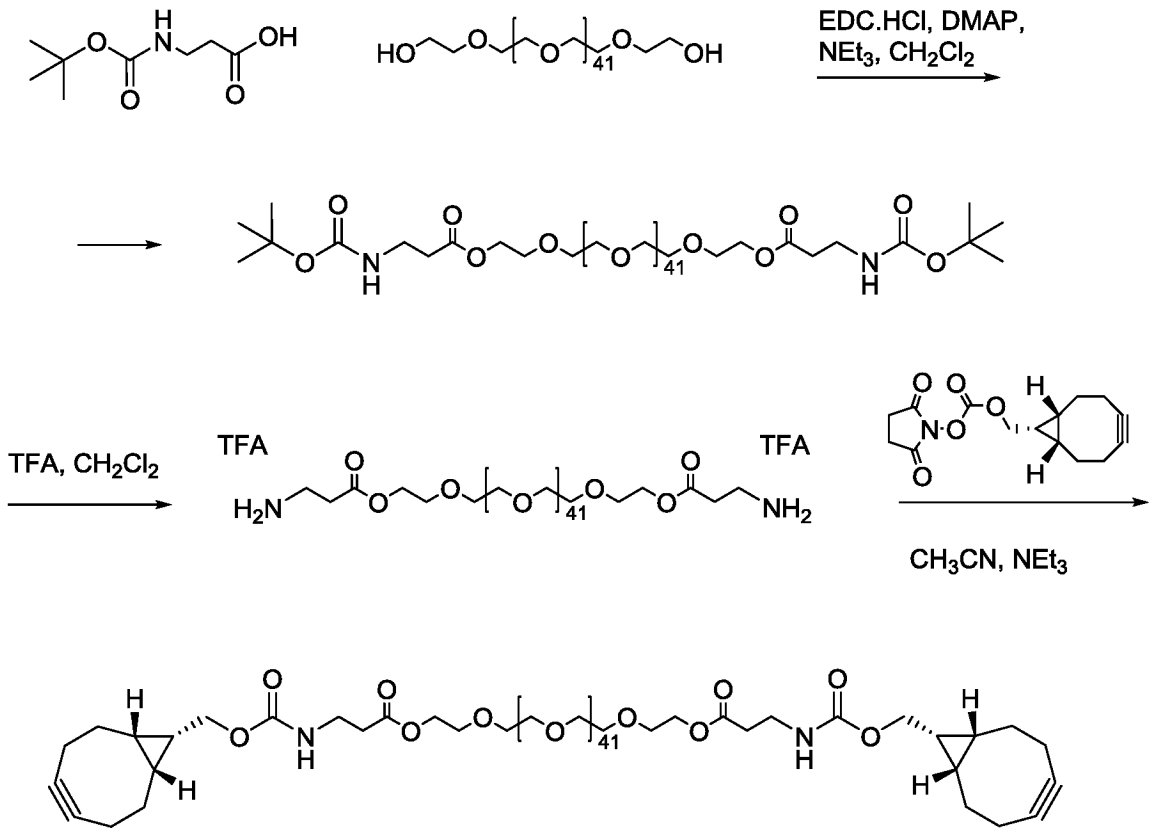
Синтез сшивающего средства на основе PEG–BCN с 4 ветвями размером 10 кДа

В другом аспекте осуществляют реакцию гидрохлорида полиэтиленгликольамина с 4 ветвями с M_n ~ 10 кДа (пентаэритритная сердцевина, JenKem Technology) в соответствии с показанным. Условия реакции описаны в примере 4.



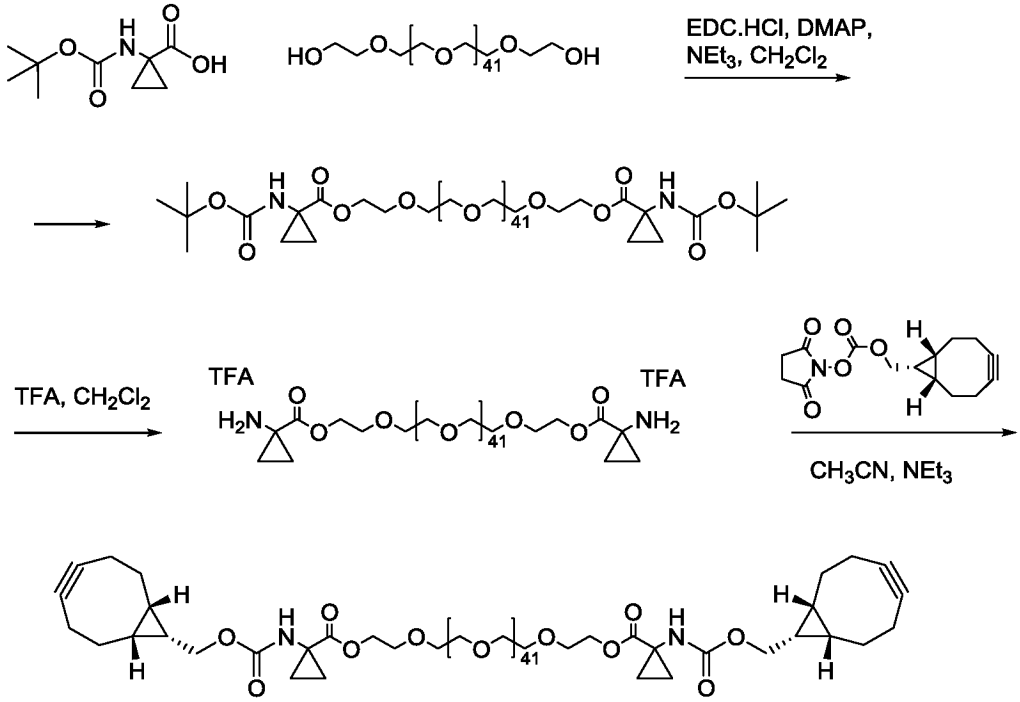
Синтез сшивающего средства на основе PEG–BCN и бета–аланина с 2 ветвями размером 2 кДа

В другом аспекте осуществляют реакцию полиэтиленгликоля с M_n ~ 2 кДа и 3–((трет–бутоксикарбонил)амино)пропановой кислоты в соответствии с показанным. Условия реакции описаны в примере 4.



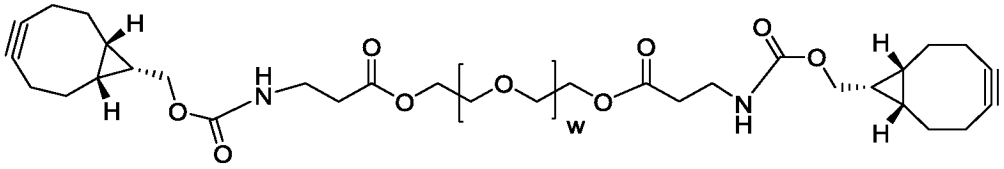
Синтез сшивающего средства на основе PEG–BCN и аминоциклопропанкарбоновой кислоты с 2 ветвями размером 2 кДа

В другом аспекте осуществляют реакцию полиэтиленгликоля с M_n ~ 2 кДа и 1–((трет–бутоксикарбонил)амино)циклопропан–1–карбоновой кислоты в соответствии с показанным. Условия реакции описаны в примере 4.

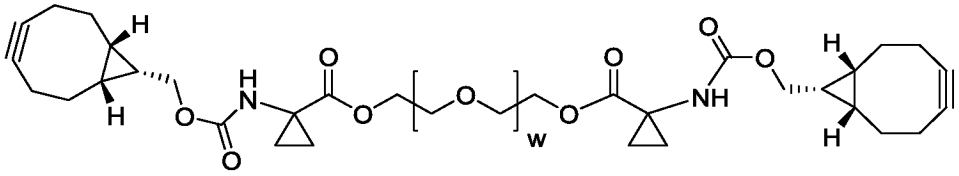


Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет

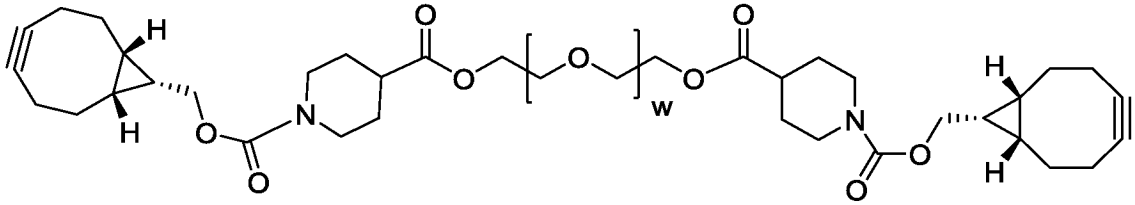
собой одно или несколько сшивающих средств. В одном аспекте сшивающее средство имеет формулу V:



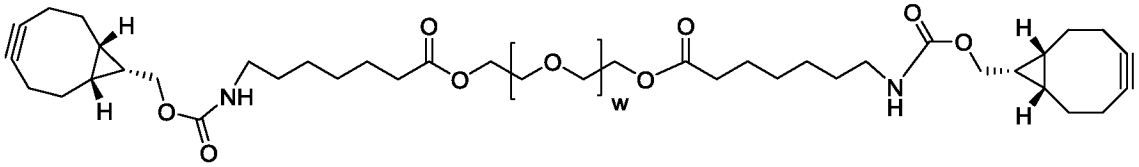
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VI:



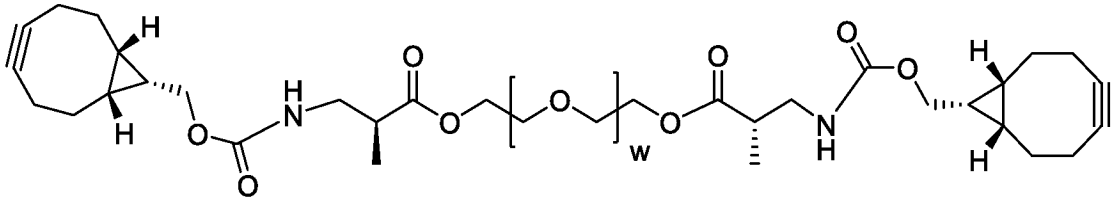
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VIa:



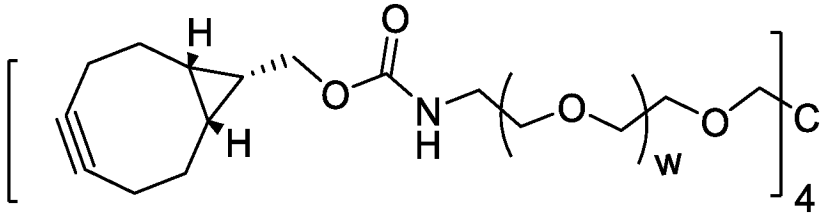
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VIb:



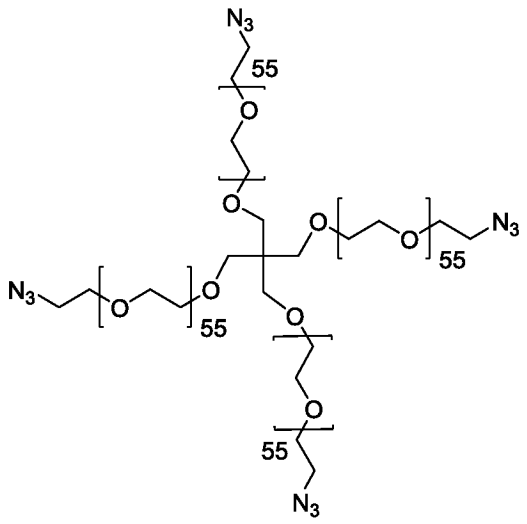
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VIc:



В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VII:

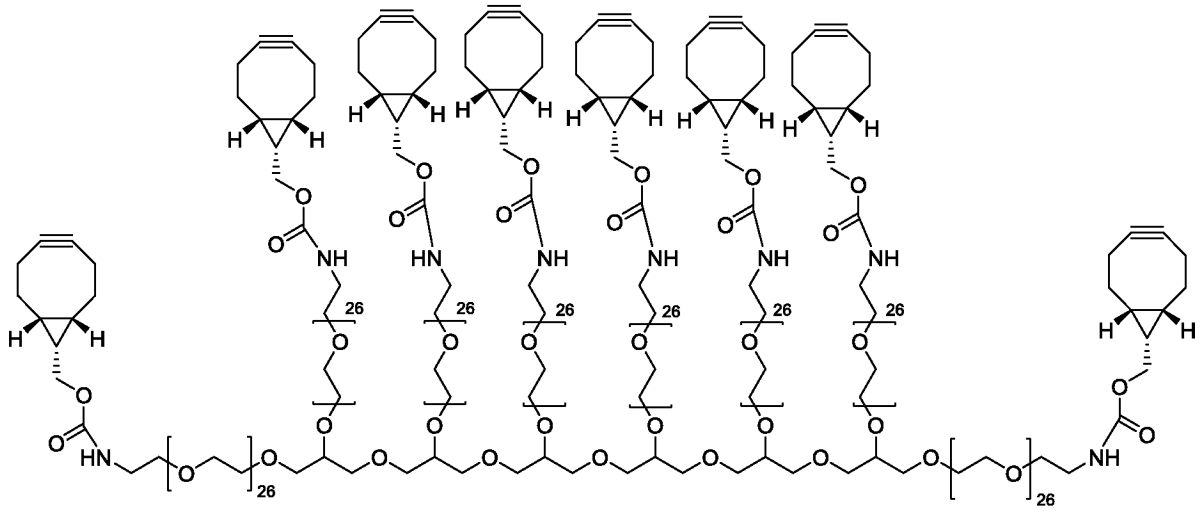


В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VIII:



.

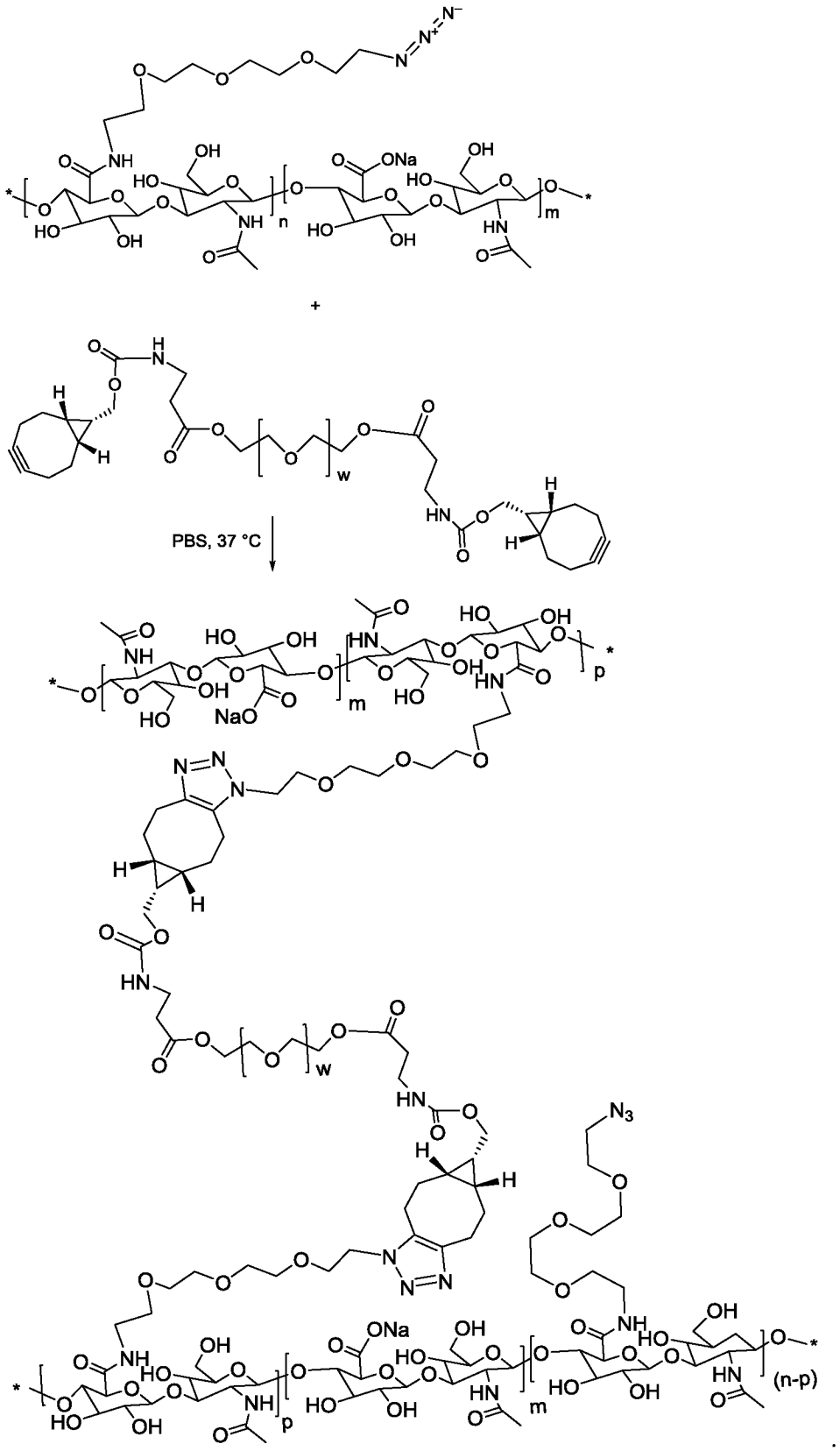
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу IX:



.

В другом варианте осуществления, описанном в данном документе, R^{11} содержит функционализированный носитель, прореагировавший с одним или несколькими сшивающими средствами с образованием сшитого носителя. В одном варианте осуществления сшитый носитель образует гидрогель. В одном аспекте сшитый носитель представляет собой гиалуроновую кислоту, которая была функционализирована и сшита с помощью одного или нескольких сшивающих средств на основе полиэтиленгликоля, описанных в данном документе, с образованием гидрогеля.

В одном варианте осуществления сшитый носитель, содержащий гиалуроновую кислоту, можно получить путем осуществления реакции соответствующим образом функционализированных полимеров в соответствии с показанным:



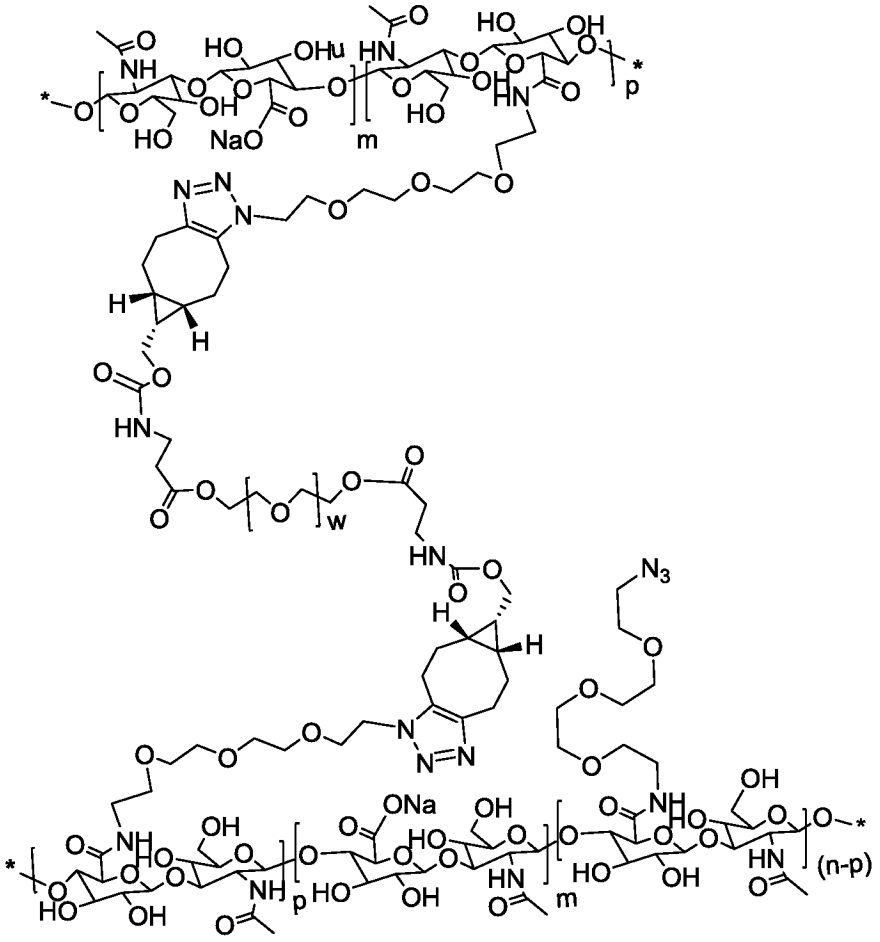
Без ограничения каким–либо конкретным примером и в качестве иллюстрации, в одном варианте осуществления натриевая соль гиалуроновой кислоты обозначена поставщиком Lifecore Biomedical (HA200K, Часка, Миннесота) как имеющая номинальную среднюю молекулярную массу, варьирующуюся в разных партиях в диапазоне 151–300 кДа, как определено с помощью вискозиметрии. Для целей данной

иллюстрации молекула натриевой соли гиалуроновой кислоты с предполагаемой номинальной средней молекулярной массой 200 кДа будет состоять в среднем из приблизительно 500 мономерных звеньев. В этой и следующих структурах немодифицированное мономерное звено определяется как "m", мономерное звено, модифицированное азидогруппой – как "n", мономерное звено, модифицированное азидогруппой, конъюгированное с сшивающей молекулой – как "p", и мономерное звено, модифицированное азидогруппой, конъюгированное с аддуктом лекарственное средство–бесследный линкер – как "q". Для полимерной цепи, содержащей ≈ 500 мономерных звеньев, (n+m+p+q ≈ 500). Если процент модификации молекулы натриевой соли гиалуроновой кислоты составляет 25%, то m=75% и (n+p+q) = 25%.

Аналогичным образом, звено PEG, присутствующее в одном варианте осуществления сшивающего средства, получено из исходного PEG, описанного как имеющий номинальную среднюю молекулярную массу 2 кДа, и будет состоять из приблизительно 44 повторяющихся мономерных звеньев PEG, описанных в этих изображенных структурах как "w".

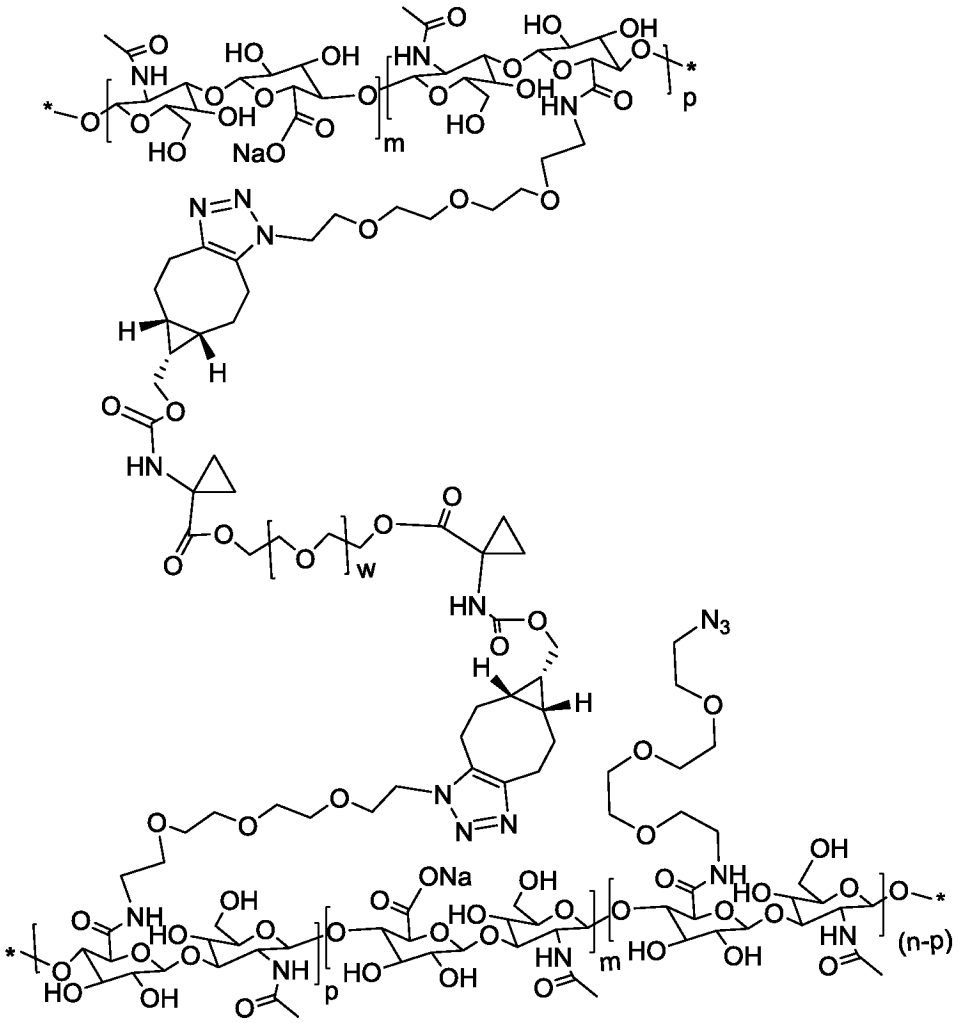
В следующих формулах в одном варианте осуществления сумма немодифицированных дисахаридных повторяющихся звеньев гиалуроновой кислоты (m) и модифицированных дисахаридных повторяющихся звеньев гиалуроновой кислоты (n+p+q) при случайном распределении (= m+n+p) + q) может составлять приблизительно 500 звеньев при номинальной средней молекулярной массе, определенной с помощью вискозиметрии как составляющая примерно 200 кДа. Это относится к формулам от X до XXII.

В одном аспекте сшитый носитель имеет формулу X:



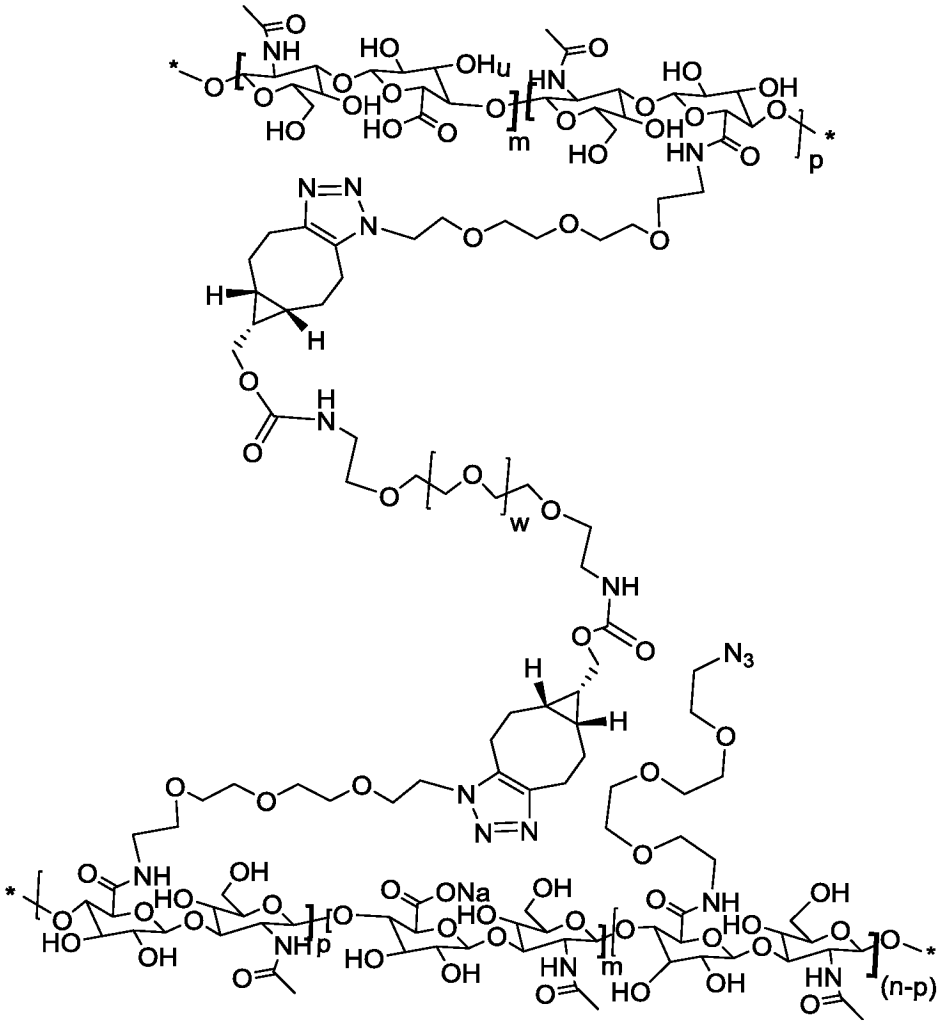
(X).

В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XI:



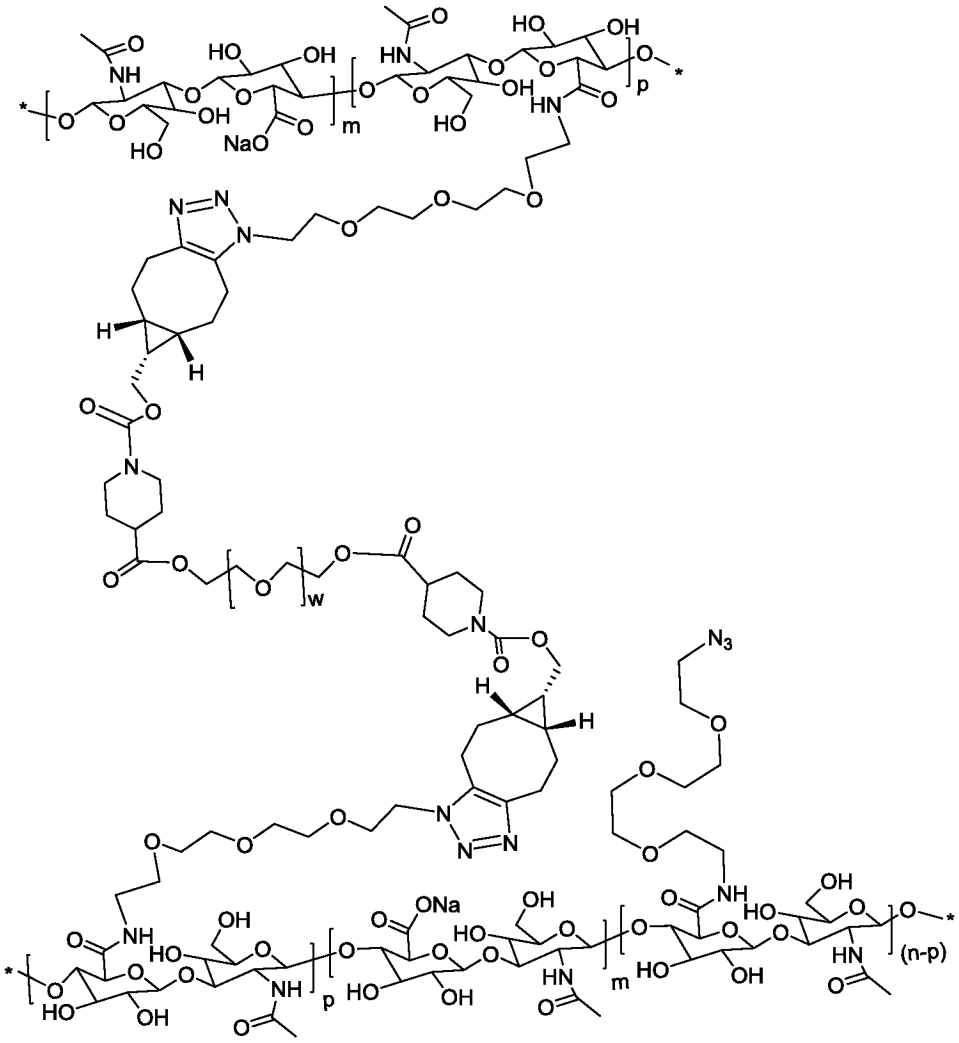
(XI).

В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XII:



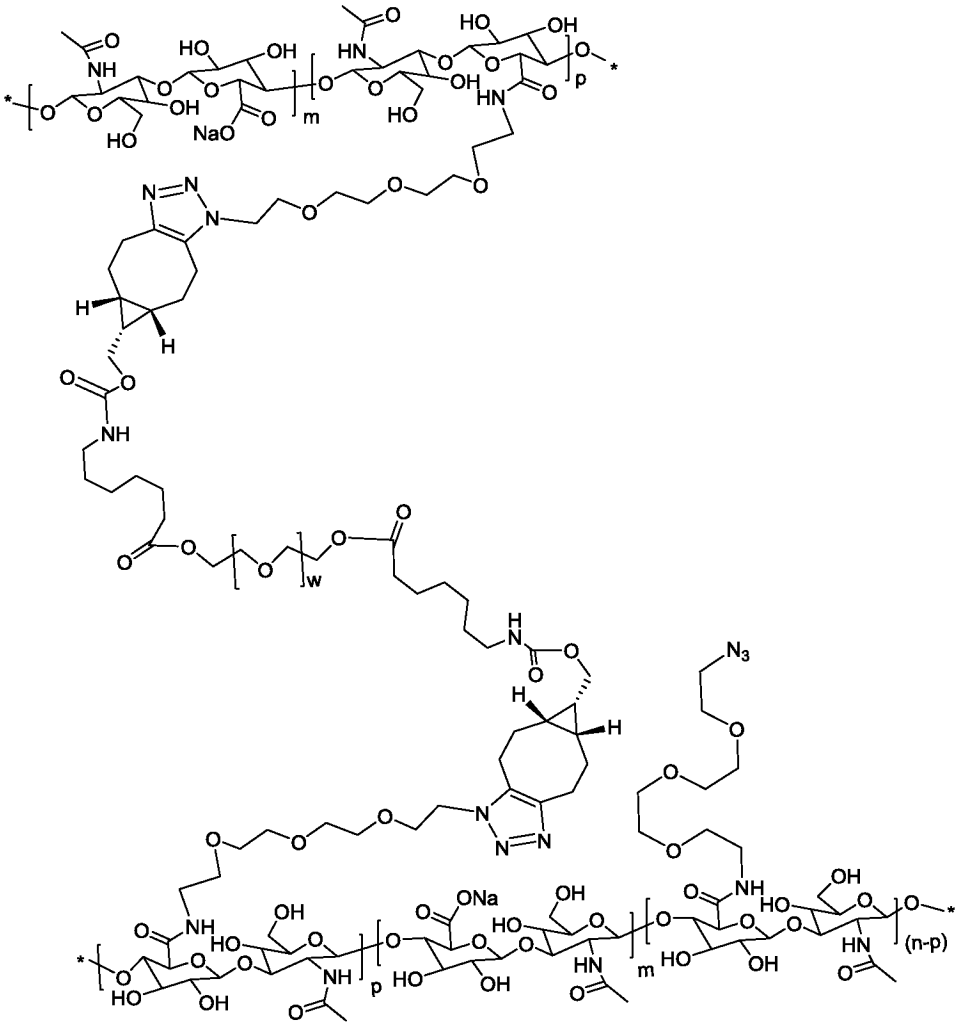
(XII).

В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XIIa:



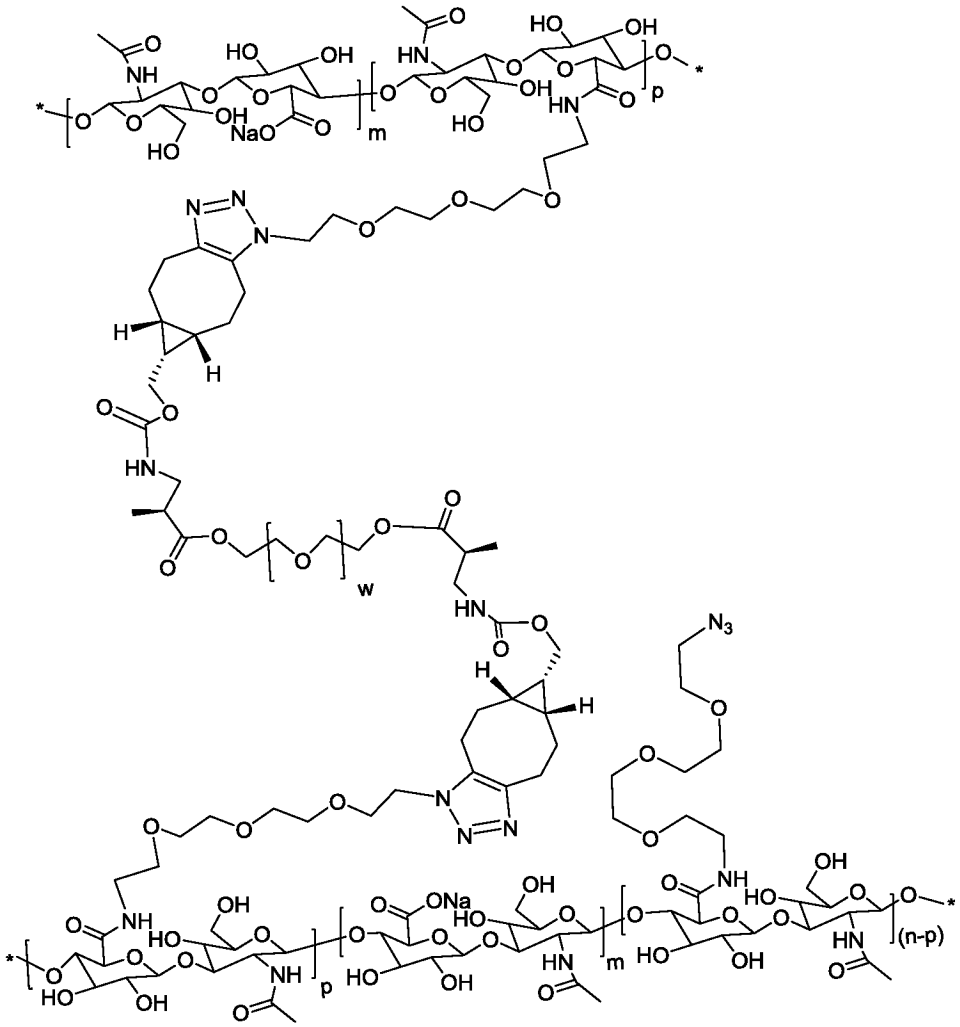
(XIIa).

В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XIIb:



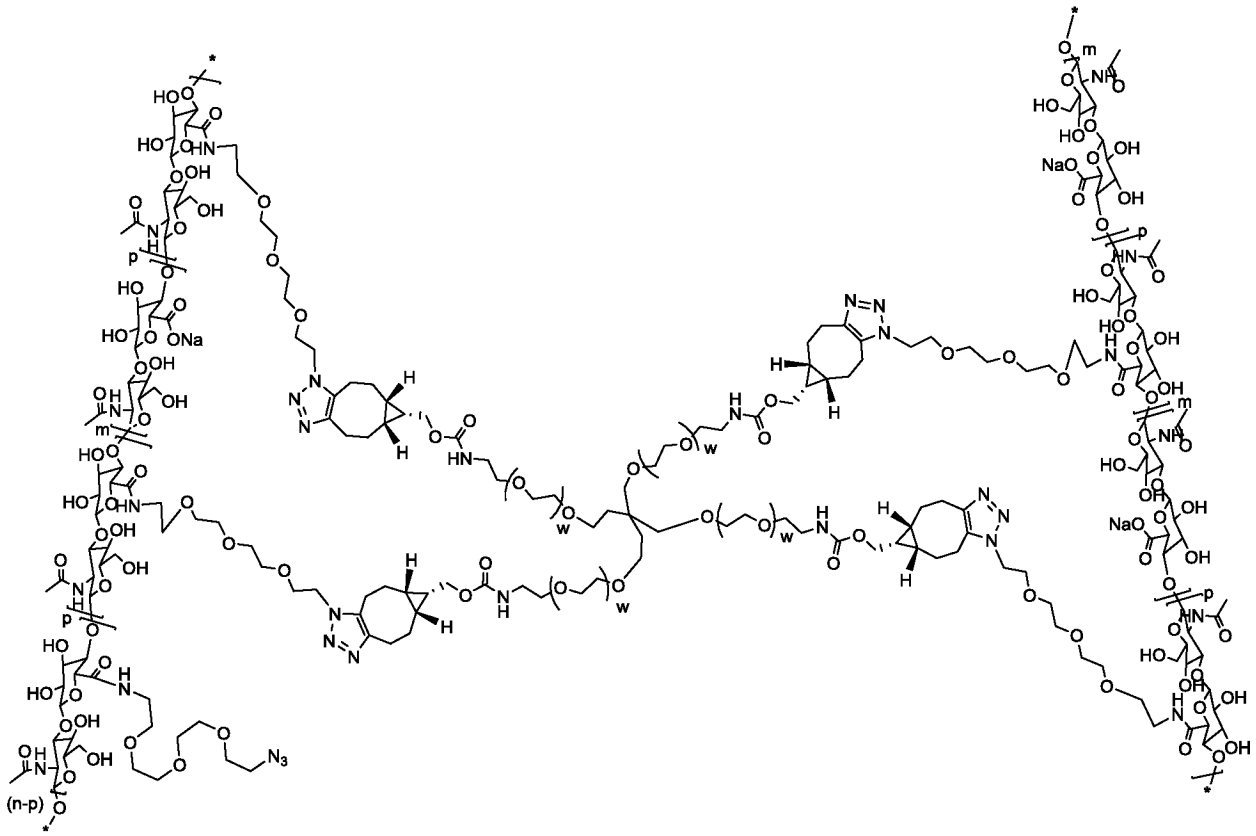
(XIIb).

В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XIIc:



(XIIc).

В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XIII:



(XIII).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой аддукт лекарственного средства D–R, где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; а R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента. В одном аспекте D содержит белок, нуклеиновую кислоту, углевод, пептид, нуклеотид, олигосахарид или малую молекулу, каждый из которых имеет по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу, и при этом малая молекула имеет молекулярную массу от приблизительно 100 г/моль до приблизительно 2000 г/моль.

В одном варианте осуществления, описанном в данном документе, D содержит низкомолекулярную биологически активную молекулу. В одном аспекте D содержит биологически активную молекулу, содержащую по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, с молекулярной массой от приблизительно 100 г/моль до приблизительно 2000 г/моль, включая все целые числа в пределах указанного диапазона. В одном аспекте D содержит биологически активную молекулу, содержащую по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, с молекулярной массой, составляющей приблизительно 100 г/моль, приблизительно 150 г/моль, приблизительно 200 г/моль, приблизительно 250 г/моль, приблизительно 300 г/моль, приблизительно 350 г/моль, приблизительно 400 г/моль, приблизительно 450 г/моль, приблизительно 500 г/моль, приблизительно 550 г/моль, приблизительно 600

г/моль, приблизительно 650 г/моль, приблизительно 700 г/моль, приблизительно 750 г/моль, приблизительно 800 г/моль, приблизительно 850 г/моль, приблизительно 900 г/моль, приблизительно 950 г/моль, приблизительно 1000 г/моль, приблизительно 1050 г/моль, приблизительно 1100 г/моль, приблизительно 1150 г/моль, приблизительно 1200 г/моль, приблизительно 1250 г/моль, приблизительно 1300 г/моль, приблизительно 1350 г/моль, приблизительно 1400 г/моль, приблизительно 1450 г/моль, приблизительно 1500 г/моль, приблизительно 1550 г/моль, приблизительно 1600 г/моль, приблизительно 1650 г/моль, приблизительно 1700 г/моль, приблизительно 1750 г/моль, приблизительно 1800 г/моль, приблизительно 1850 г/моль, приблизительно 1900 г/моль, приблизительно 1950 г/моль или приблизительно 2000 г/моль.

В другом варианте осуществления D содержит биологически активную молекулу, содержащую по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, с молекулярной массой от приблизительно 100 г/моль до приблизительно 2000 г/моль, которая модулирует по меньшей мере одну биологически значимую мишень терапевтически благоприятным образом. В одном аспекте D включает в себя средства, активные в центральной нервной системе, противоинфекционные, противоаллергические, иммуномодулирующие средства, средства против ожирения, антикоагулянты, противодиабетические средства, противоопухолевые средства, антибактериальные средства, противогрибковые средства, анальгетики, противозачаточные средства, противовоспалительные средства, антиангиогенные средства, средства против глаукомы, средства, стимулирующие регенерацию, стероидные препараты, сосудорасширяющие средства, сосудосуживающие средства или сердечно–сосудистые средства. В одном аспекте D содержит акарбозу, алапроклат, алендронат, амантадин, амикацин, аминептин, аминоглютетимид, амисульприд, амлодипин, амотосален, амоксапин, амоксициллин, амфетамин, амфотерицин B, ампициллин, ампренавир, аминон, анилеридин, апраклонидин, апрамицин, артикаин, атенолол, атомоксетин, авизафон, баклофен, беназеприл, бенсеразид, бензокаин, бетаксолол, блеомицин, бромфенак, брофаромин, карведилол, катин, катинон, карбутамид, цефалексин, клинафлоксацин, ципрофлоксацин, дефероксамин, делавирдин, дезипрамин, даунорубицин, дексметилфенидат, диафенилсульфон, дизоцилпин, дофамин, добутамин, дорзоламид, доксорубицин, дулоксетин, эфлорнитин, эналаприл, эпинефрин, эпирубицин, эрголин, эртапенем, эсмолол, эноксацин, этамбутол, фенфлурамин, фенолдопам, фенотерол, финголимод, флекамид, флувоксамин, фосампренавир, фроватриптан, фуросемид, флуоксетин, габапентин, гатифлоксацин, гемифлоксацин, гентамицин, грепафлоксацин, гексилкаин, гидралазин, гидрохлортиазид, икофунгипен, идарубицин, имиквимод, инверсин, изопротеренол, исрадипин, канамицин A, кетамин, лабеталол, ламивудин, левобунолол, леводопу, левотироксин, лизиноприл, ломефлоксацин, лоракарбеф, мапротилин, мефлокин, мелфалан, мемантин, меропенем, месалазин, мескалин, метилдопу, метилендиоксиметамфетамин, метопролол, милнаципран, митоксантрон,

моксифлоксацин, норэпинефрин, норфлоксацин, нотриптилин, неомицин B, нистатин, озельтамивир, памидроновую кислоту, пароксетин, пазуфлоксацин, пеметрексед, периндоприл, фенметразин, фенелзин, прегабалин, прокаин, псевдоэфедрин, протриптилин, ребоксетин, ритодрин, сабарубицин, сальбутамол, серотонин, сертралин, ситаглиптин, соталол, спектиномицин, сульфадиазин, сульфамеразин, сертралин, спектиномицин, сульфален, сульфаметоксазол, такрин, тамсулозин, тербуталин, тимолол, тирофибан, тобрамицин, токамид, тозуфлоксацин, трандолаприл, транексамовую кислоту, транилципромин, триметрексат, тровафлоксацин, валацикловир, валганцикловир, ванкомицин, виомицин, вилоксазин и зальцитабин.

В другом варианте осуществления D содержит один или несколько биологически активных пептидов, в том числе без ограничения натрийуретический пептид C–типа (CNP), предсердный натрийуретический пептид (ANP), эксендин–4, инсулин, адренокортикотропный гормон, адреномедуллин, адропин, ω–агатоксин, белок, родственный агути, ангиотензин(ангиотензины), апелин 12, апелин 13, апелин 36 или их производные, брадикинин, кальцитонин, кокаин/амфетамин–регулируемый транскрипт (CART), кортикотропин–высвобождающий фактор (CRF), α–дефензины, β–дефензины, пептид, индуцирующий дельта–сон (DSIP), эластазоспецифический ингибитор (элафин), эндокинины, эндоморфины, эндорфины, эндотелины, эксендин, активный фрагмент фибронектина, галанин, галаниноподобный пептид, большой гастрин, гастрин I, пептид, родственный гастрину, желудочный ингибирующий полипептид, гастрин–высвобождающий пептид, грелин, дезацилгрелин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид, фактор, высвобождающий гормон роста, GsMTx–4 Grammostola spatulata, гуанкситоксин–1E, гуанилин, гепцидин 1, гепцидин/LEAP–1, гистатин 5, человеческий гормон роста, гуманин, хувентоксин, ибериотоксин, императоксин A, инсулиноподобные факторы роста, интермедин, IRL 1620, соединяющий пептид, калиотоксин, кисспептины, куртоксин, липотропин, фактор роста клеток печени, антимикробный пептид 2, экспрессирующийся в печени, гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон, лизенин, LL–37, маргатоксин, мастопаран, пептид, дегранулирующий тучные клетки, меланиноконцентрирующий гормон, меланоцитостимулирующий гормон, фактор, ингибирующий высвобождение MSH, мидкин, кардиовозбуждающий пептид моллюсков, пептид, ингибирующий толерантность к морфину, мотилин, мускариновые токсины, нейроэндокринный регуляторный пептид–2, нейрокинин A, нейрокинин B, нейромедины, нейроностатин–13, нейропептиды, нейротензин, нейротоксин NSTX–3, ноцистатин, ноцицептин, обестатин, опиоидные пептиды (энкефалины, эндорфины, BAM–12P, казоморфин, динорфины, эндоморфины, неоэндорфины, ноцицептин), орексин–A/–B, орфанин, остеокальцин, окситоцин, панкреастатин, паратиреоидный гормон, белок, родственный паратиреоидному гормону, пептид 234, пептид гистидин–метионин, пептид T, пептид YY, физалемин, полипептиды, активирующие аденилатциклазу гипофиза, тромбоцитарный фактор–4, плектазин, плейотропин, проадреномедуллин, пролактин–высвобождающий пептид, псалмотоксин 1, пуротоксин–1, пироглутамилированный RF–

амидный пептид, ренин, пептид 1, родственный RF–амидам, пептид 3, родственный RF–амидам, салузин–α/β, сарафотоксины, пептид, связанный с шизофренией, сциллатоксин, секретин, серелаксин, сывороточный фактор тимуса, ингибитор 1 натрий–калиевой АТФазы, соматостатин, токсин Stichodactyla, субстанцию K, стресскопин, пептид, родственный стресскопину, субстанцию P, тахикинины, SNX–482 тарантула, ProTx–I тарантула, ProTx–II тарантула, тертиапин, титьютоксин Ka, тиреотропин–высвобождающий гормон, тафтсин, урогуанилин, изомер урогуанилина A или B, урокортин, урокортин II, уротензин II, пептид, родственный уротензину II, вазоактивный интестинальный пептид, вазопрессин, вазотоцин, пептид, ингибирующий репликацию вируса, ксенин или их комбинации.

В другом аспекте D содержит одно или несколько из ACTH, аденозиндезаминазы, агалсидазы, альфа–1–антитрипсина (AAT), ингибитора альфа–1–протеиназы (API), альтеплазы, амилинов (амилина, симлина), анистреплазы, сериновой протеазы Ancrod, антител (моноклональных или поликлональных, а также фрагментов или продуктов слияния), антитромбина III, антитрипсинов, апротинина, аспарагиназ, атозибана, бифалина, бивалирудина, костных морфогенетических белков, бычьего панкреатического ингибитора трипсина (BPTI), фрагментов кадгерина, кальцитонина (лососевого), коллагеназы, эстеразного ингибитора компонента C1 системы комплемента, конотоксинов, фрагментов рецепторов цитокинов, ДНКазы, динорфина A, эндорфинов, энфувиртида, энкефалинов, эритропоэтинов, эксендинов, фактора VII свертывания крови, фактора VIIa свертывания крови, фактора VIII свертывания крови, фактора VIIIa свертывания крови, фактора IX свертывания крови, фибринолизина, фактора роста фибробластов (FGF), пептида 2, высвобождающего гормон роста (GHRP2), слитых белков, фолликулостимулирующих гормонов, грамицидина, грелина, дезацилгрелина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G–CSF), галактозидазы, глюкагона, глюкагоноподобных пептидов, глюкоцереброзидазы, гранулоцитарно–макрофагального колониестимулирующего фактора (GM–CSF), человеческих белков теплового шока (HSP), белка, активирующего фосфолипазу (PLAP), хорионического гонадотропина (hCG), гемоглобинов, вакцин против гепатита B, гирудина, человеческого ингибитора сериновых протеаз, гиалуронидаз, идуронидазы, иммуноглобулинов, вакцин против гриппа, интерлейкинов (1–альфа, 1–бета, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12, 13, 21), антагониста рецепторов IL–1 (rhIL–1ra), инсулинов, инсулиноподобных факторов роста, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста (rhIGFBP), интерферонов (альфа–2a, альфа–2b, альфа–2c, бета–1a, бета–1b, гамма–1a, гамма–1b), молекул внутриклеточной адгезии, фактора роста кератиноцитов (KGF), гликопротеинового лиганда P–селектина (PSGL), трансформирующих факторов роста, лактазы, лептина, лейпролида, левотироксина, лютеинизирующего гормона, вакцины против болезни Лайма, натрийуретических пептидов (ANP, BNP, CNP и их фрагментов), нейропептида Y, панкрелипазы, панкреатического полипептида, папаина, паратиреоидного гормона, PDGF, пепсина, пептида YY, ацетилгидролазы фактора активации тромбоцитов (PAF–AH), пролактина,

белка C, тимальфазина, октреотида, секретина, серморелина, растворимого рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), супероксиддисмутазы (SOD), соматотропина (гормона роста), соматостатина, стрептокиназы, сахаразы, терлипрессина, фрагмента столбнячного токсина, тилактазы, тромбинов, тимозина, тиреостимулирующего гормона, тиреотропина, фактора некроза опухоли (TNF), слитой молекулы рецептор TNF–Fc IgG, тканевого активатора плазминогена (tPA), TSH, уродилатина, уратоксидазы, урокиназы, вакцин, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), вазоактивного интестинального пептида, вазопрессина, циконотида, лектина, рицина или их комбинаций.

В другом варианте осуществления D содержит абциксимаб, адалимумаб, афлиберцепт, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб, канакинумаб, цертолизумаб, цетуксимаб, даклизумаб, даратумумаб, денозумаб, экулизумаб, эфализумаб, голимумаб, ибритумомаб, инфликсимаб, ипилимумаб, лампализумаб, муромонаб–CD3, натализумаб, ниволумаб, офатумумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, пегплераниб, пембролизумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизумаб или их производные или комбинации.

В другом варианте осуществления D содержит абатацепт, альбумин, алефацепт, ингибитор альфа–1–протеазы, альфа–галактозидазу A, альфа–L–идуронидазу, ботулинический токсин A, ботулинический токсин B, дарбэпоэтин, денилейкин, дорназу альфа, коллагеназу, белки системы комплемента, эритропоэтин, этанерцепт, фактор VIII свертывания крови, фибрин, фибриноген, филграстим, фолликулостимулирующий гормон, глюкоцереброзидазу, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G–CSF), сарграмостим, человеческий гормон роста, человеческий хорионический гонадотропин, гиалуронидазу, инсулин, инсулиноподобные факторы роста, инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF–1), интерфероны (IF), лютропин, опрелвекин, прамлинтид, меказермин, N–ацетилглюкозамин–4–сульфатазу (галсульфазу), тканевой активатор плазминогена (TPA), белковые вакцины или их комбинации.

В другом варианте осуществления D содержит одно или несколько из белков, пептидов, антител, гуманизированных антител, фрагментов антител, Fab, scFv, нуклеиновых кислот, углеводов, малых молекул или их комбинаций.

В другом варианте осуществления D содержит одно или несколько из нуклеотидов, олигонуклеотидов, полинуклеотидов, нуклеиновых кислот, в том числе без ограничения ДНК, РНК, PNA, siRNA, miRNA, мРНК, тРНК, рРНК, или их комбинаций.

В одном варианте осуществления D содержит бролуцизумаб (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6) или D4 (SEQ ID NO:7), ранибизумаб, бевацизумаб, [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–

5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств, содержащую конъюгат носитель–бесследный линкер–биологически активное средство D–R–R^{11}, где D содержит биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, описанный в данном документе, R содержит бесследный линкер, описанный в данном документе, присоединенный к R^{11}, содержащему полимер–носитель или гидрогель, описанный в данном документе. В одном аспекте R^{11} содержит гиалуроновую кислоту, сшитую гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, сшитый полиэтиленгликоль или другой подходящий полимер, описанный в данном документе. В другом аспекте R содержит бесследный линкер, описанный в данном документе. В другом аспекте D содержит одно или несколько из белков, пептидов, антител, Fab, Fc, scFv, нуклеиновых кислот, siRNA, miRNA, мРНК, углеводов, пептидонуклеиновых кислот (PNA), малых органических молекул, содержащих по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, или их комбинаций. В одном аспекте D содержит бролуцизумаб (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6) или D4 (SEQ ID NO:7), ранибизумаб, бевацизумаб, [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации.

В другом варианте осуществления D–R–R^{11} имеет формулу XIV, где "лекарственное средство" может представлять собой одно или несколько из бролуцизумаба (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6) или D4 (SEQ ID NO:7), ранибизумаба, бевацизумаба, [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амида 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амида 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамида; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамида или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления D–R–R^{11} содержит любое из соединений, показанных в формулах XIV–XXIII.

В одном варианте осуществления лекарственное средство или биологически

активное средство D содержит полипептиды D2 (SEQ ID NO:5) или их пегилированный вариант, такой как, например, D3 (SEQ ID NO:6). Полипептиды D2 и D3, также как и их производные, можно получить согласно описанному в публикации международной патентной заявки № WO 2007/146689, соответствующие идеи которой включены в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте осуществления лекарственное средство или биологически активное средство D содержит бролуцизумаб (SEQ ID NO:4). Бролуцизумаб представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий участок VH (SEQ ID NO:1), участок VL (SEQ ID NO:2) и линкерный участок (SEQ ID NO:3). Бролуцизумаб, также как и его производные, можно получить согласно описанному в публикации международной патентной заявки № WO 2009/155724, соответствующие идеи которой включены в данный документ посредством ссылки. Метионин, полученный из стартового кодона, присутствует в VL–участке бролуцизумаба. В некоторых случаях метионин может подвергаться посттрансляционному отщеплению перед сборкой в систему доставки лекарственных средств, описанную в данном документе.

В другом варианте осуществления лекарственное средство или биологически активное средство D содержит D4 (SEQ ID NO:7). D4 представляет собой пептид из 13 аминокислот, содержащий последовательность pE–R–P–R–L–C–H–K–G–P–Nle–C–F–OH (SEQ ID NO:7), которая содержит дисульфидную связь между C_6 и C_{12} и в которой pE обозначает пироглутамат, а Nle обозначает норлейцин. D4, также как и его производные, можно получить согласно описанному в публикации международной патентной заявки № WO 2013/111110, соответствующие идеи которой включены в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте осуществления лекарственное средство или биологически активное средство D содержит апелин 12, апелин 13, апелин 36 или их производное. Апелин и его производные раскрыты в WO2013/111110, WO 2014/081702, WO 2015/013168, WO 2015/013165 или WO 2015/013167, соответствующие идеи каждой из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте осуществления лекарственное средство или биологически активное средство D содержит одно или несколько лекарственных средств на основе антител к фактору роста эндотелия сосудов, таких как бевацизумаб или ранибизумаб. Бевацизумаб представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело IgG1, которое связывается с человеческим фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и ингибирует его биологическую активность в системах анализа in vitro и in vivo. Бевацизумаб содержит человеческие каркасные участки и участки, определяющие комплементарность, мышиного антитела, которое связывается с VEGF. Антитело имеет приблизительную молекулярную массу 149 кДа. Бевацизумаб получают в системе экспрессии на основе клеток яичника китайского хомячка в питательной среде. Ранибизумаб представляет собой фрагмент рекомбинантного гуманизированного моноклонального антитела IgG1 каппа–изотипа, предназначенный для внутриглазного

применения. Ранибизумаб связывается с человеческим фактором роста эндотелия сосудов A (VEGF–A) и ингибирует его биологическую активность. Ранибизумаб, не имеющий Fc–участка, имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно 48 кДа, и вырабатывается в системе экспрессии на основе клеток E. coli в питательной среде. Бевацизумаб и ранибизумаб описаны в публикациях международных патентных заявок №№ WO 1994/004679 и WO 1998/45331 соответственно, соответствующие идеи обеих из которых включены в данный документ посредством ссылки.

В другом варианте осуществления лекарственное средство или биологически активное средство D содержит [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид или (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид. Синтез этих молекул описан в публикации международной патентной заявки № WO 2010/066684, соответствующие идеи которой включены в данный документ посредством ссылки.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ сборки системы доставки лекарственных средств; при этом способ может включать одну стадию из следующей последовательности стадий:

(a) получение молекулы носителя R^{11}, где R^{11} представляет собой сшитый гидрогель, и эта стадия, таким образом, включает способ, применяемый для получения данного гидрогеля; при этом молекула носителя может быть необязательно очищена на этой стадии;

(b) отдельное конъюгирование бесследного линкера R с биологически активным средством D, содержащим первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, за счет чего, таким образом, обеспечивается образование аддукта бесследный линкер–D; при этом аддукт бесследный линкер–D может быть необязательно очищен на этой стадии,

(c) конъюгирование молекулы носителя R^{11} с аддуктом бесследный линкер–D и

(d) очистка системы доставки лекарственных средств от реагентов. Этот способ показан на **схеме 5A** ниже.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ сборки системы доставки лекарственных средств, включающий следующие стадии:

(a) получение молекулы носителя R^{11}, где R^{11} представляет собой сшитый гидрогель, и эта стадия, таким образом, включает способ, применяемый для получения данного гидрогеля; при этом молекула носителя может быть необязательно очищена на этой стадии;

(b) конъюгирование бесследного линкера R с молекулой носителя R^{11}, за счет чего,

таким образом, обеспечивается образование аддукта молекула носителя–бесследный линкер, который может быть необязательно очищен на этой стадии;

(c) конъюгирование биологически активного средства D, содержащего первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, с аддуктом молекула носителя–бесследный линкер и

(d) очистку системы доставки лекарственных средств от реагентов. Этот способ показан на **схеме 5B** ниже.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ сборки системы доставки лекарственных средств, включающий следующие стадии:

(a) получение несшитой молекулы носителя R^{11}, при этом молекула носителя может быть необязательно очищена на этой стадии;

(b) отдельное конъюгирование бесследного линкера R с биологически активным средством D, содержащим первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, за счет чего, таким образом, обеспечивается образование аддукта бесследный линкер–D; при этом аддукт бесследный линкер–D может быть необязательно очищен на этой стадии;

(c) конъюгирование молекулы носителя R^{11} с аддуктом бесследный линкер–D, который может быть необязательно очищен на этой стадии;

(d) получение сшитого гидрогеля путем инкубирования аддукта несшитая молекула носителя–бесследный линкер–биологически активное средство R^{11}–R–D с соответствующим сшивающим реагентом с образованием гидрогеля и

(e) очистку системы доставки лекарственных средств от реагентов. Этот процесс показан на **схеме 5C** ниже.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ сборки системы доставки лекарственных средств, включающий следующие стадии:

(a) получение несшитой молекулы носителя R^{11}, при этом молекула носителя может быть необязательно очищена на этой стадии;

(b) конъюгирование бесследного линкера R с молекулой носителя R^{11}, за счет чего, таким образом, обеспечивается образование аддукта молекула носителя–бесследный линкер, который может быть необязательно очищен на этой стадии; и

(c) конъюгирование биологически активного средства D, содержащего первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, с аддуктом молекула носителя–бесследный линкер;

(d) получение сшитого гидрогеля путем инкубирования аддукта несшитая молекула носителя–бесследный линкер–биологически активное средство R^{11}–R–D с соответствующим сшивающим реагентом с образованием гидрогеля и

(e) очистку системы доставки лекарственных средств от реагентов. Этот процесс показан на **схеме 5D** ниже.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ сборки системы доставки лекарственных средств, включающий следующие стадии:

(a) получение несшитой молекулы носителя R^{11}, при этом молекула носителя может быть необязательно очищена на этой стадии;

(b) конъюгирование бесследного линкера R с молекулой носителя R^{11}, за счет чего, таким образом, обеспечивается образование аддукта молекула носителя–бесследный линкер, который может быть необязательно очищен на этой стадии;

(c) получение сшитого гидрогеля путем инкубирования аддукта несшитая молекула носителя–бесследный линкер R^{11}–R с соответствующим сшивающим реагентом с образованием гидрогеля, который может быть необязательно очищен на этой стадии;

(d) конъюгирование биологически активного средства D, содержащего первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, с аддуктом сшитая молекула носителя–бесследный линкер, который может быть необязательно очищен на этой стадии; и

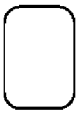
(e) очистку системы доставки лекарственных средств от реагентов. Этот процесс показан на **схеме 5E** ниже.

Схемы 5A–E. На схеме 5 показано пять процессов A–E сборки систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе.

Условные обозначения:

Молекула носителя R^{11}, несшитая

Сшивающее средство



Молекула носителя R^{11}, сшитый гидрогель

Бесследный линкер R

Биологически активное средство D

Схема 5A

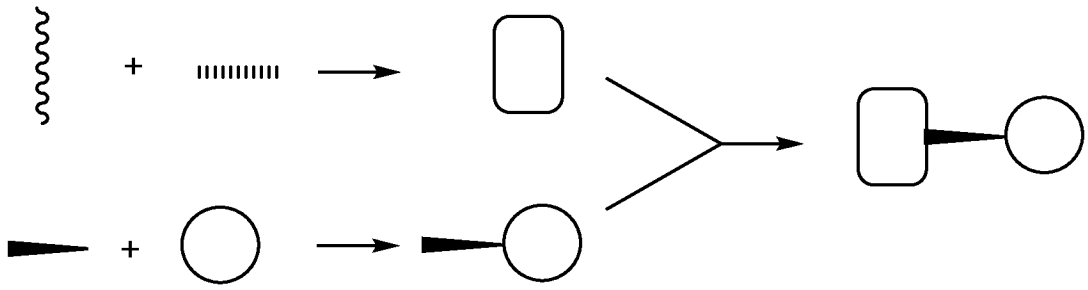


Схема 5B

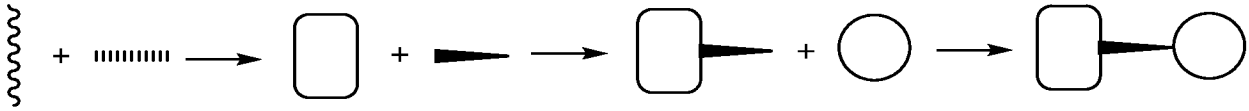


Схема 5C

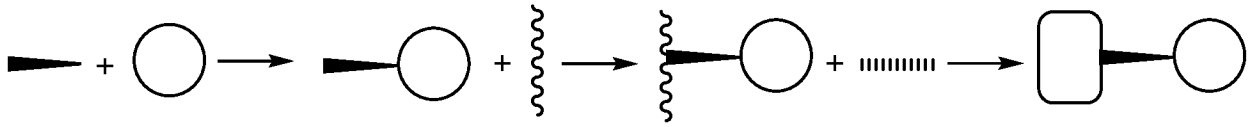


Схема 5D

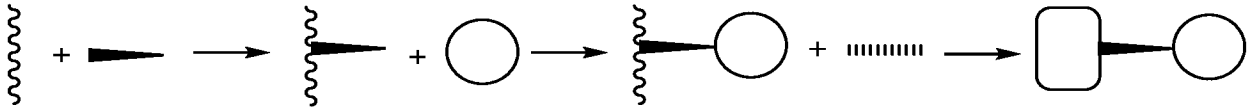
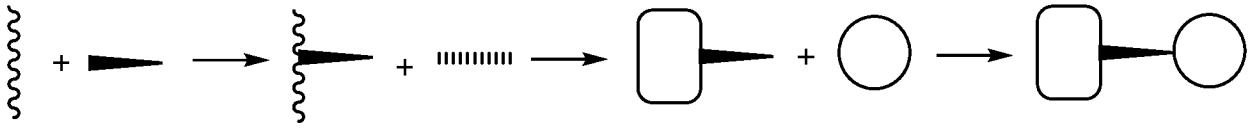
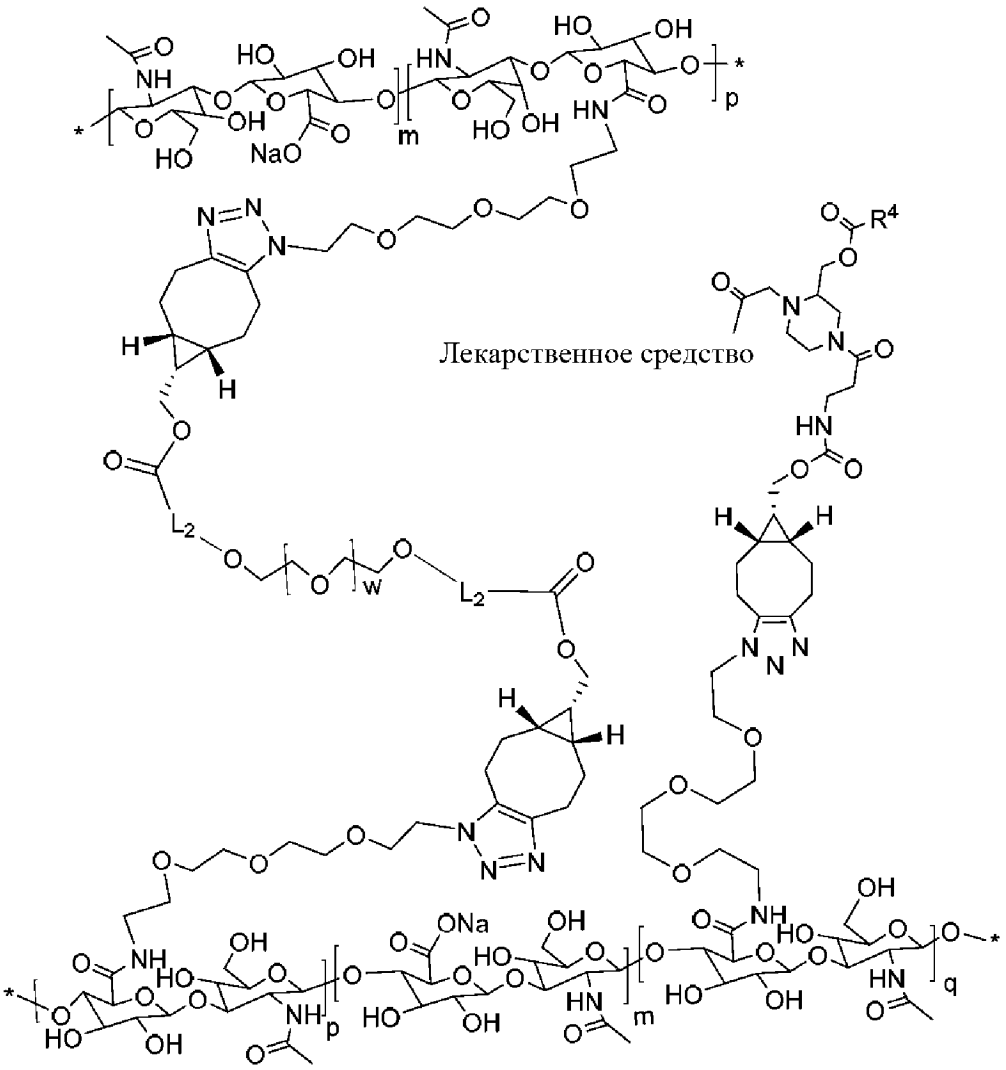


Схема 5E



В одном варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XIV):



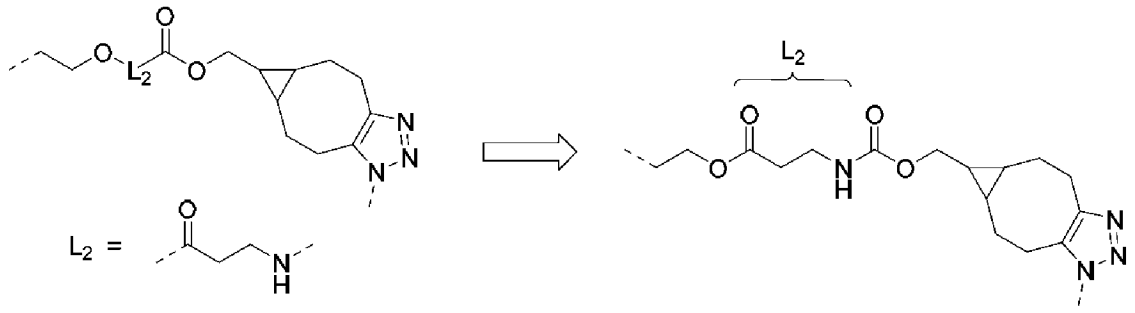
(XIV),

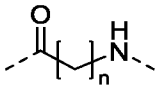
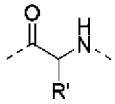
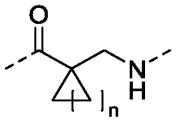
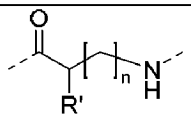
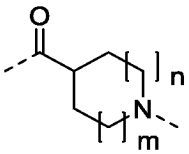
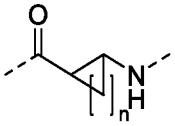
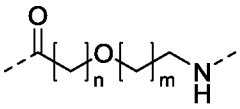
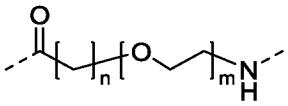
где L_2 представляет собой спейсерную группу, которая может быть специфичной для конкретного сшивающего средства, а "лекарственное средство" представляет собой биологически активную молекулу, содержащую по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, которое модулирует по меньшей мере одну биологически значимую мишень терапевтически благоприятным образом.

В одном варианте осуществления спейсеры L_2 включают в себя любые соединения, показанные в таблице 5.

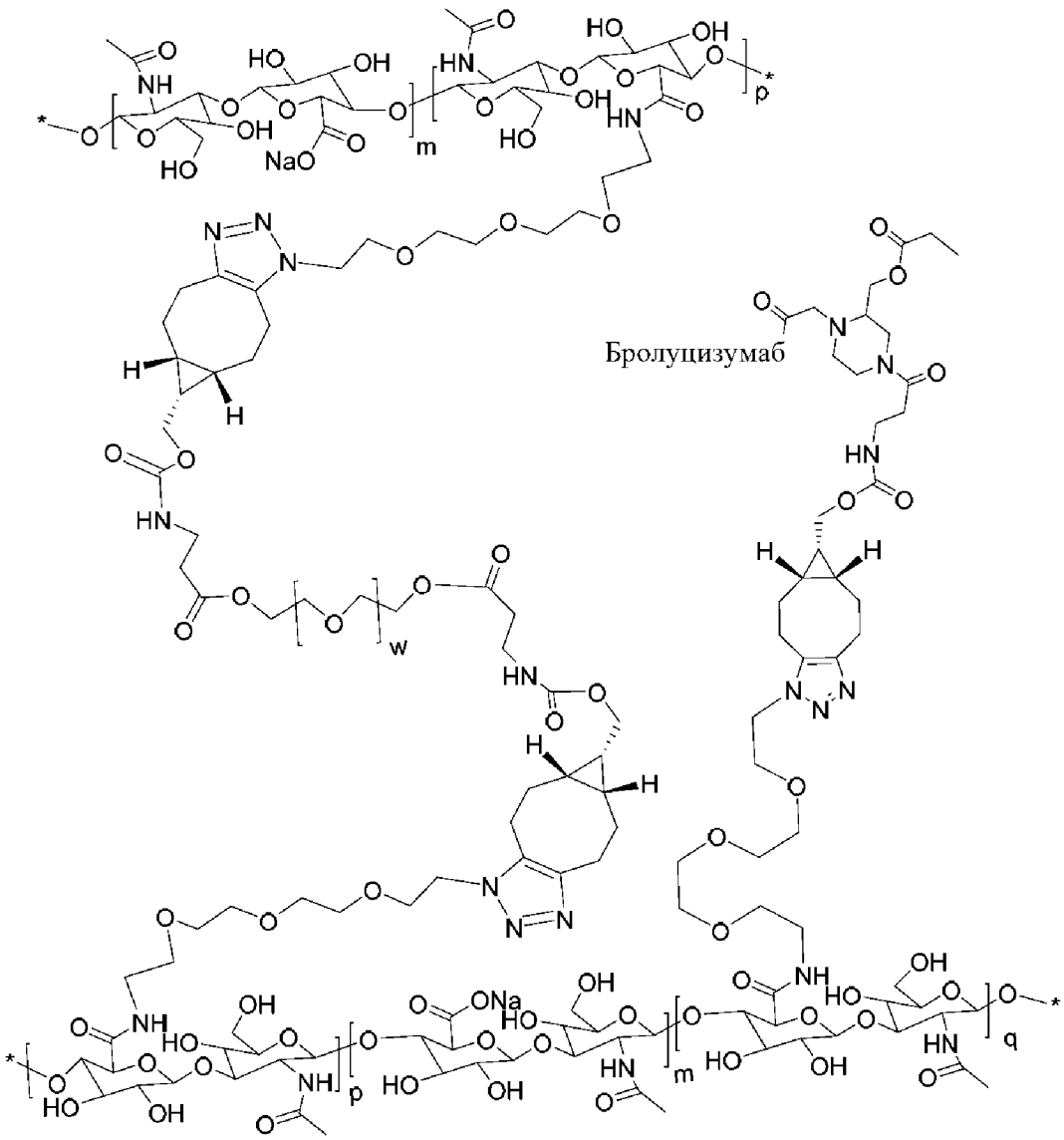
Таблица 5. Иллюстративные спейсеры L_2

В нижеприведенной таблице L_2 представляет собой спейсер между O и C(O)O. Например:



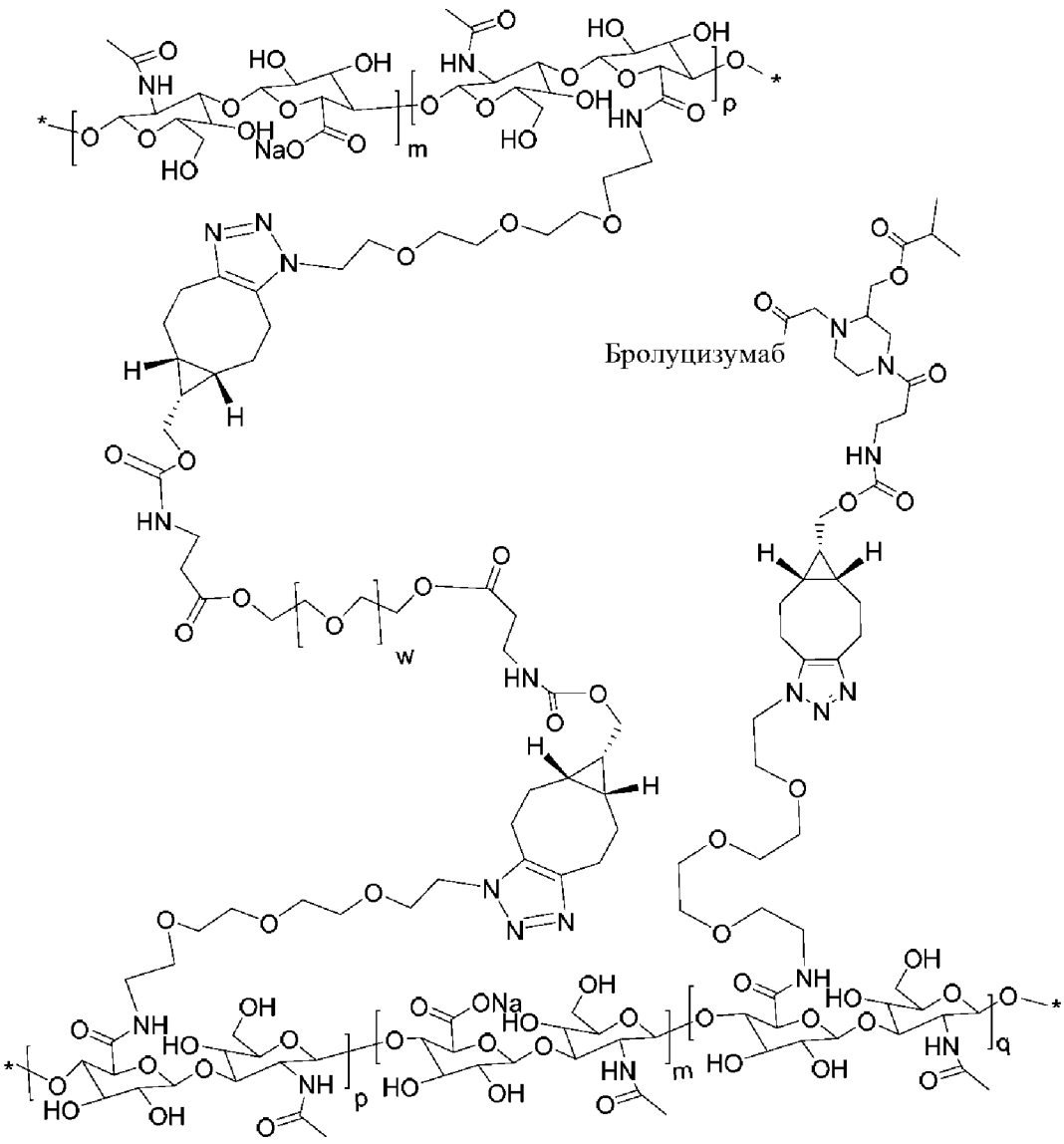
 n = 1-10	 R' = Me, Et, Pr, iPr, C1-C6-алкил, C1-C6-циклоалкил
 n = 1-6	 R' = Me, Et, Pr, iPr, C1-C6-алкил, C1-C6-циклоалкил n = 1-5
 n=0-2 m=0-2	 n = 1-5
 n = 1-6 m = 1-6	 n = 1-6 m = 1-6

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XV), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



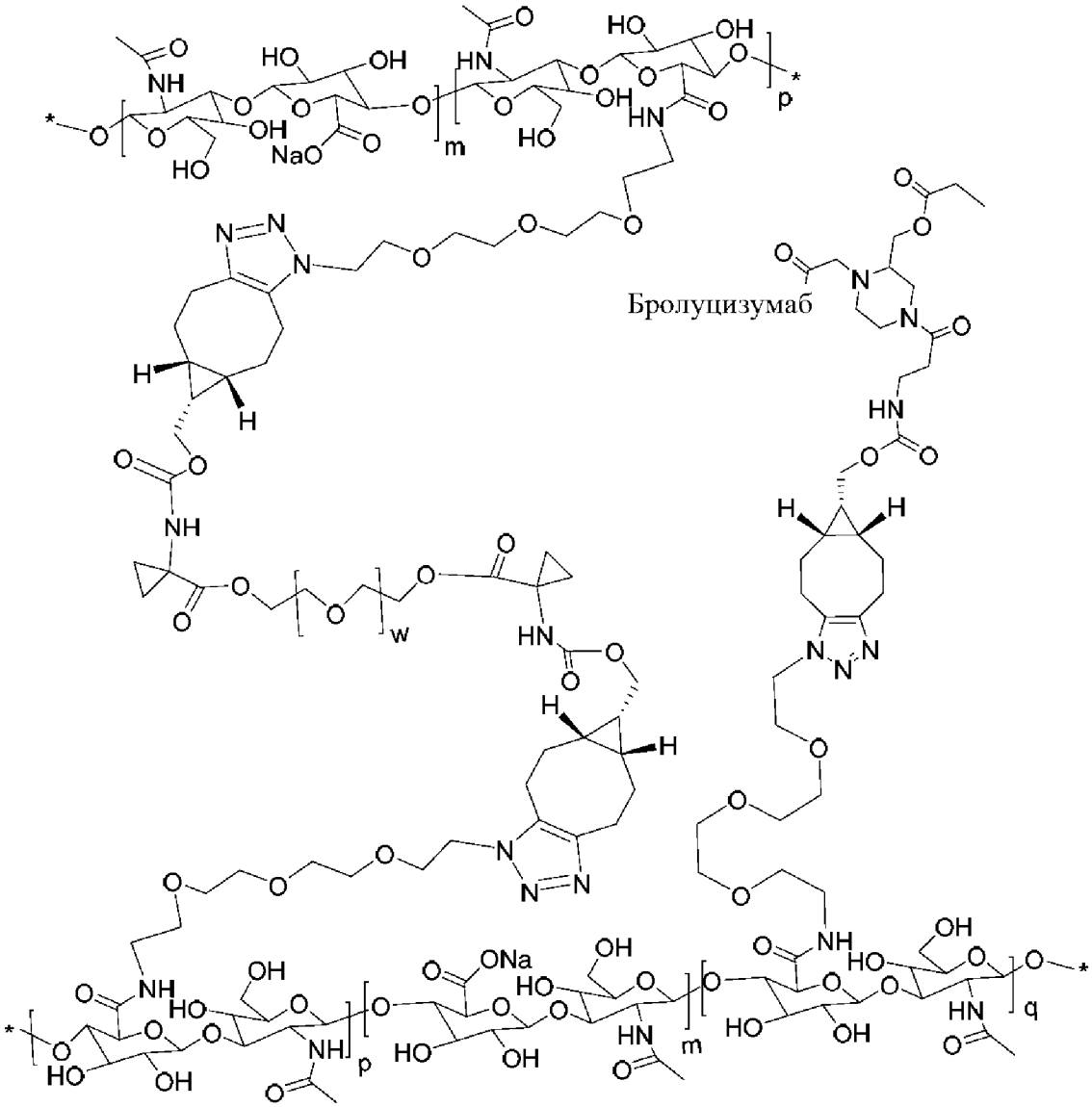
(XV).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVI), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



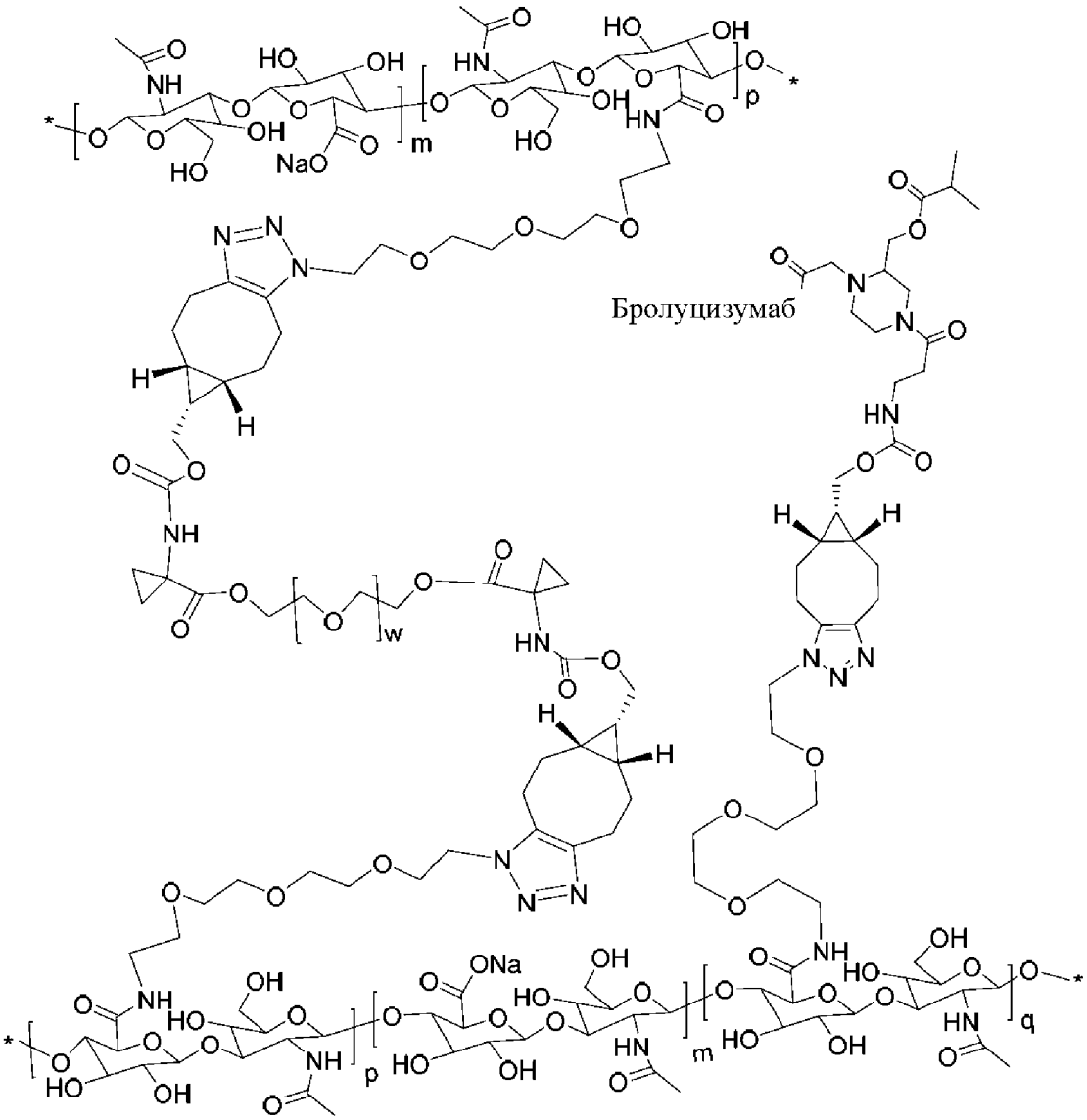
(XVI).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVII), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



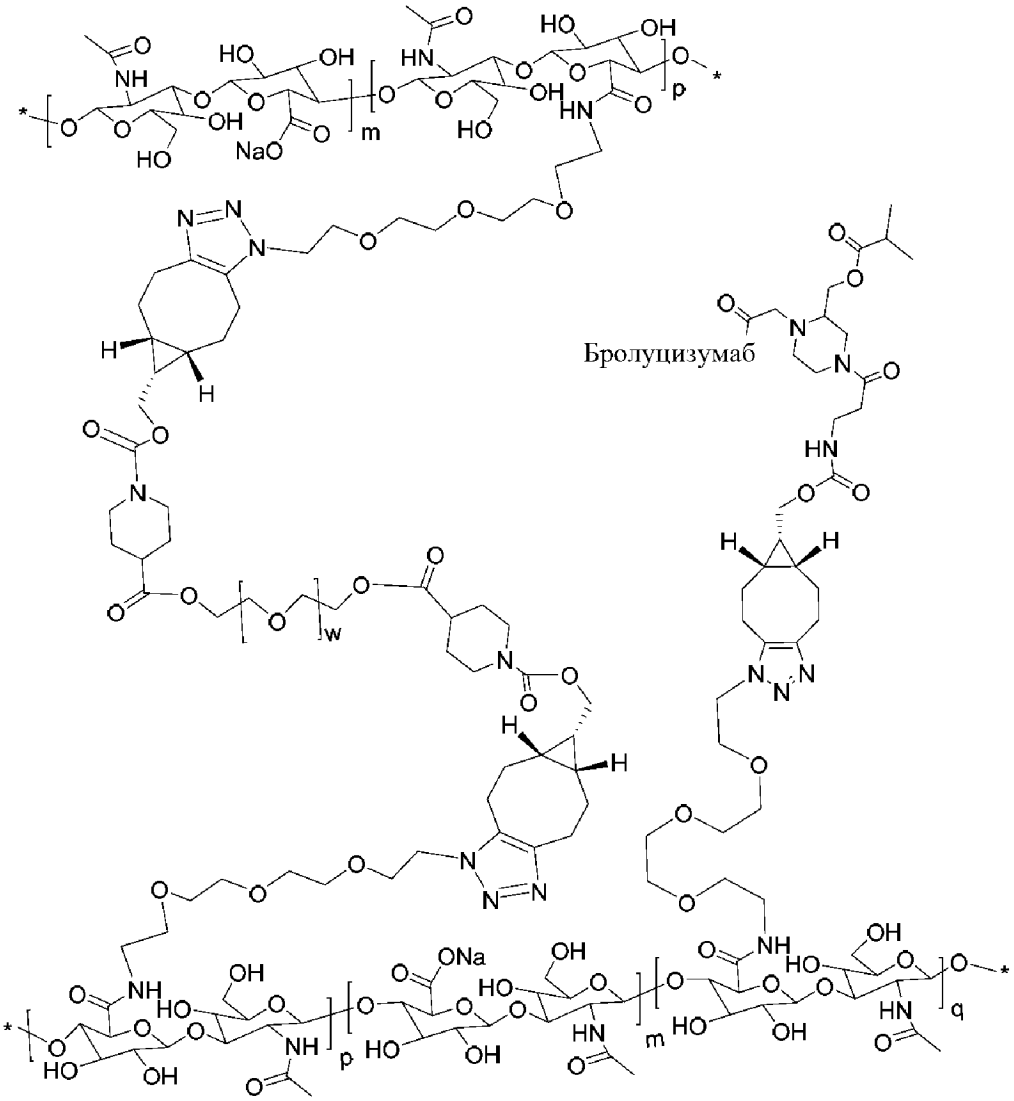
(XVII).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIII), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



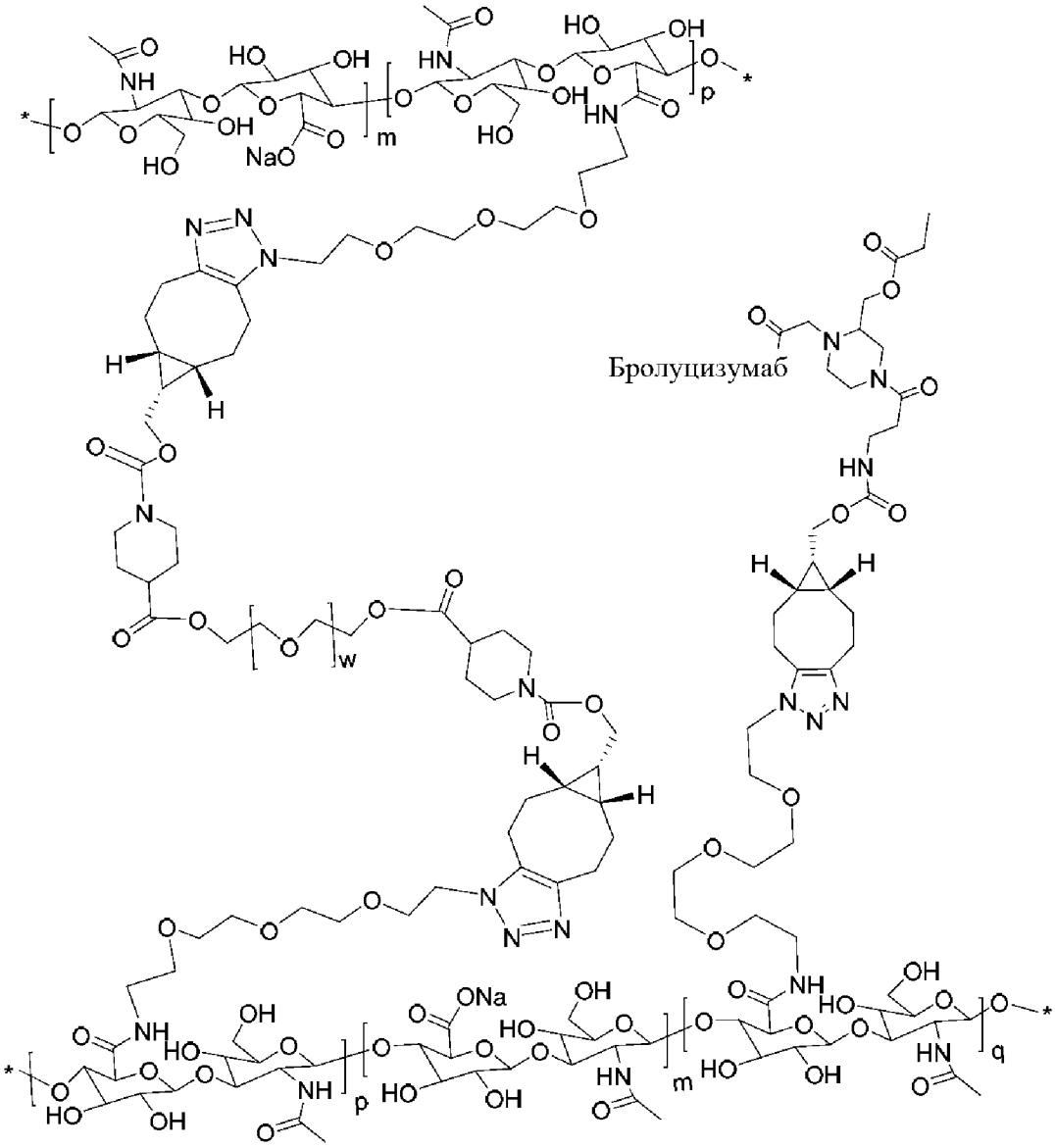
(XVIII).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIa), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



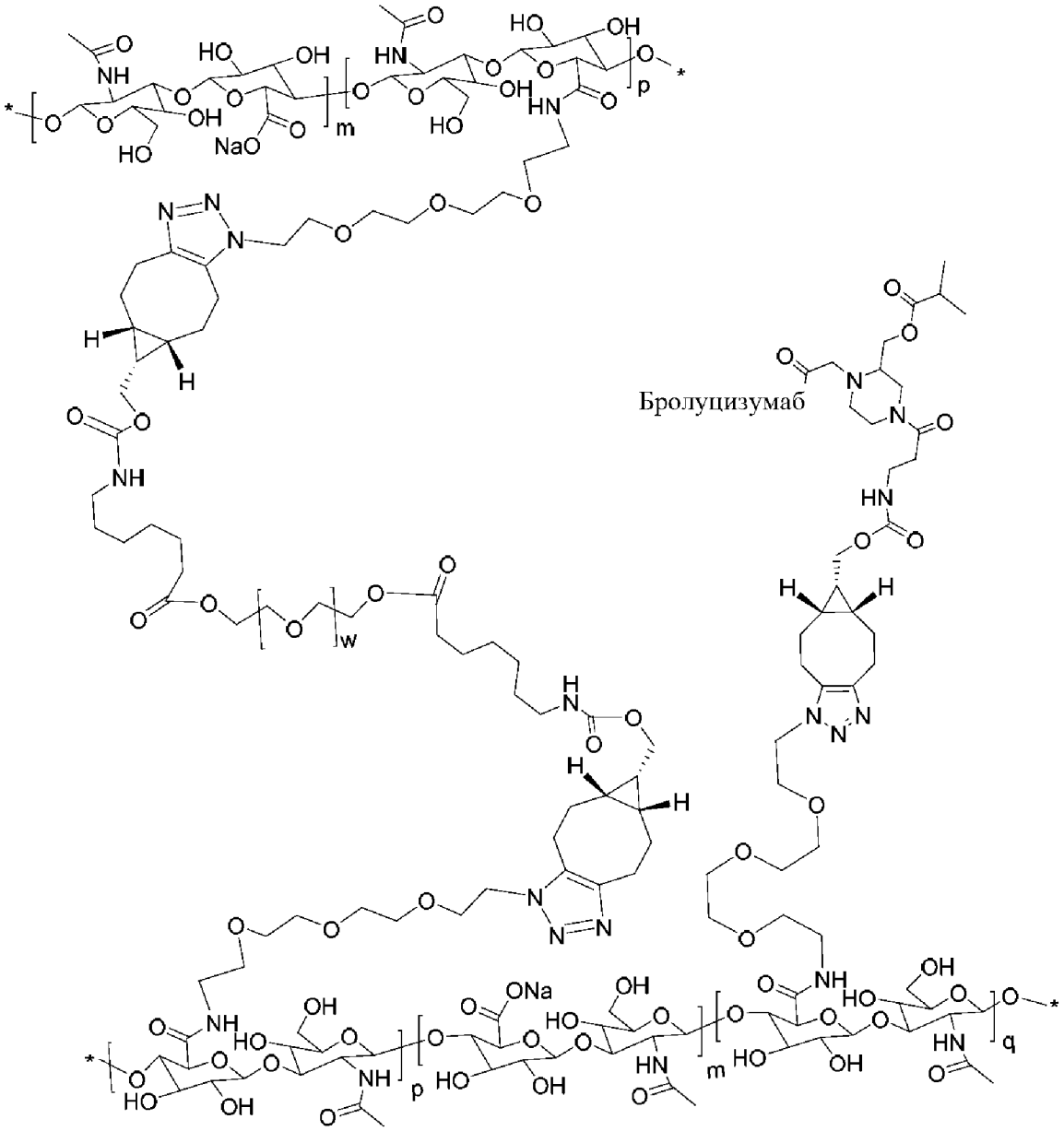
(XVIIIa).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIb), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



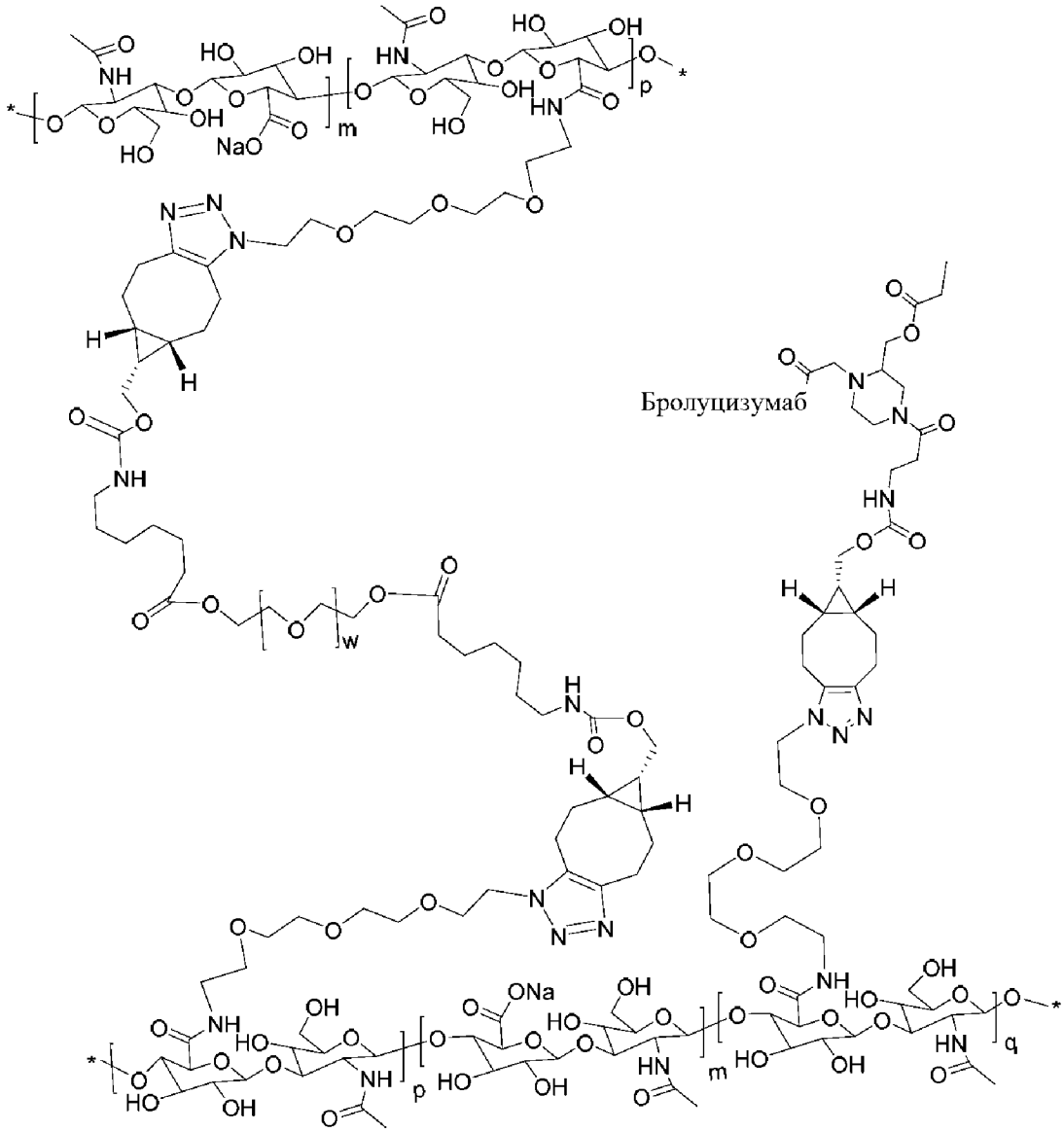
(XVIIIb).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIc), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



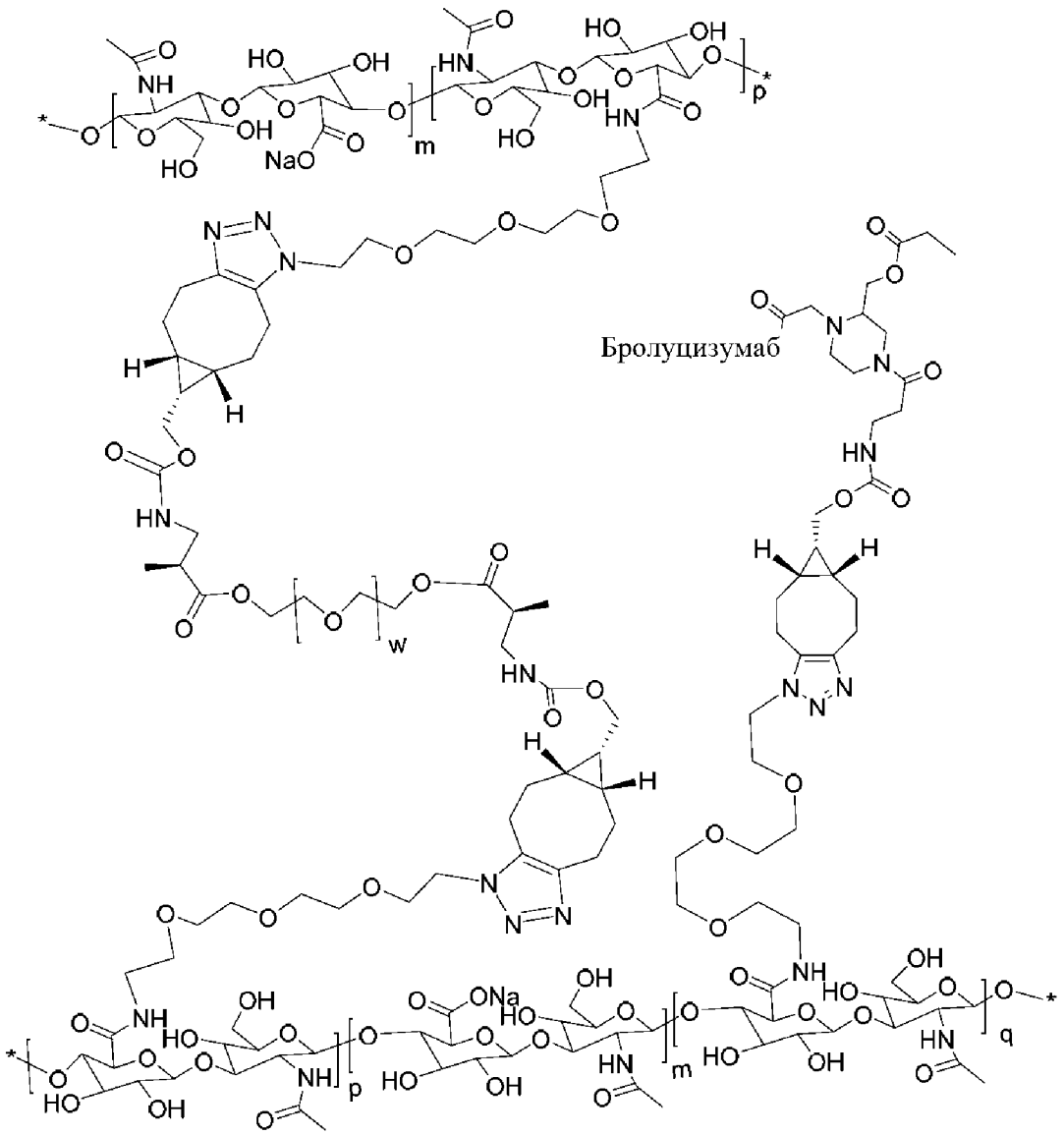
(XVIIIc).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIId), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



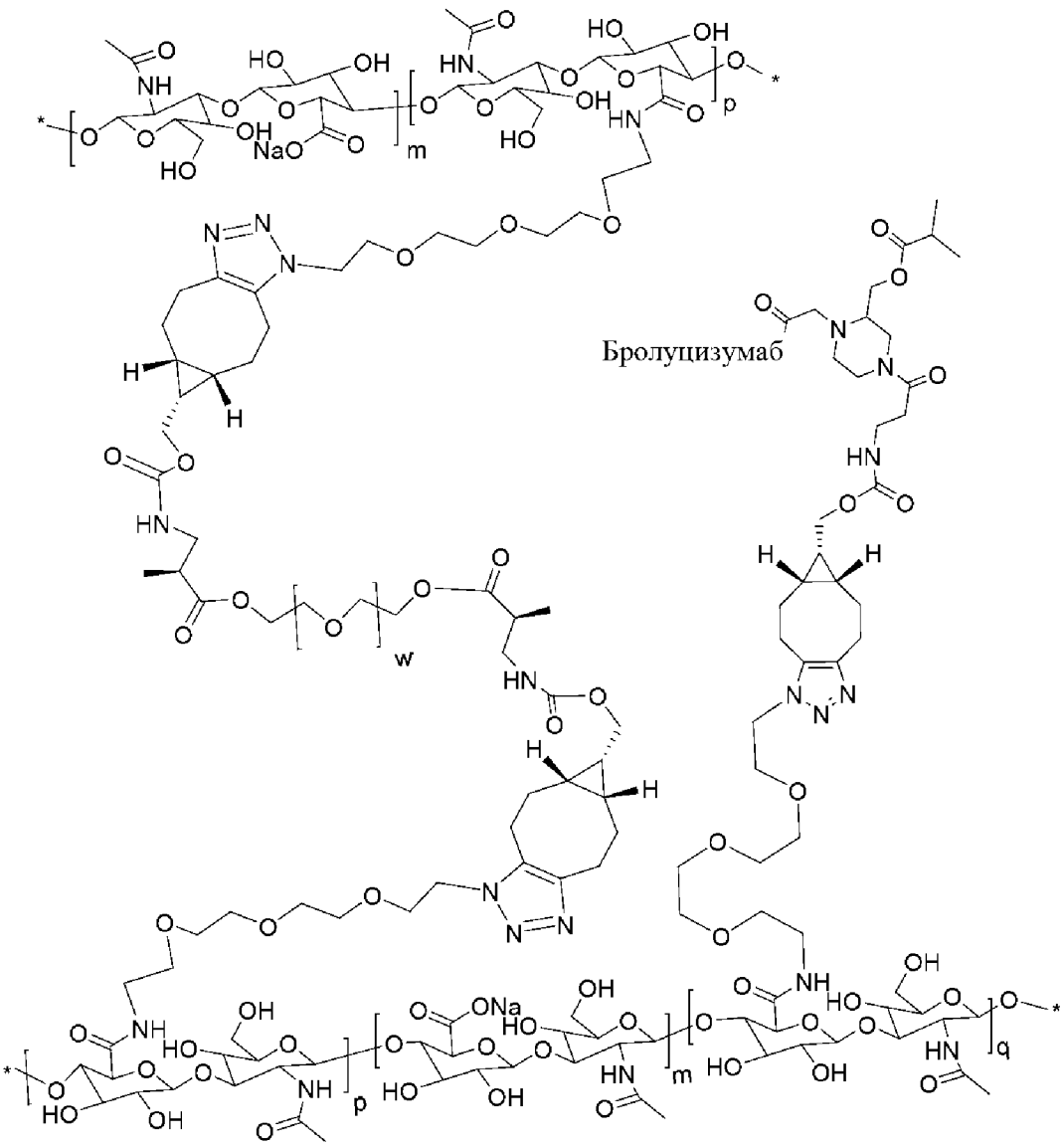
(XVIIId).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIe), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



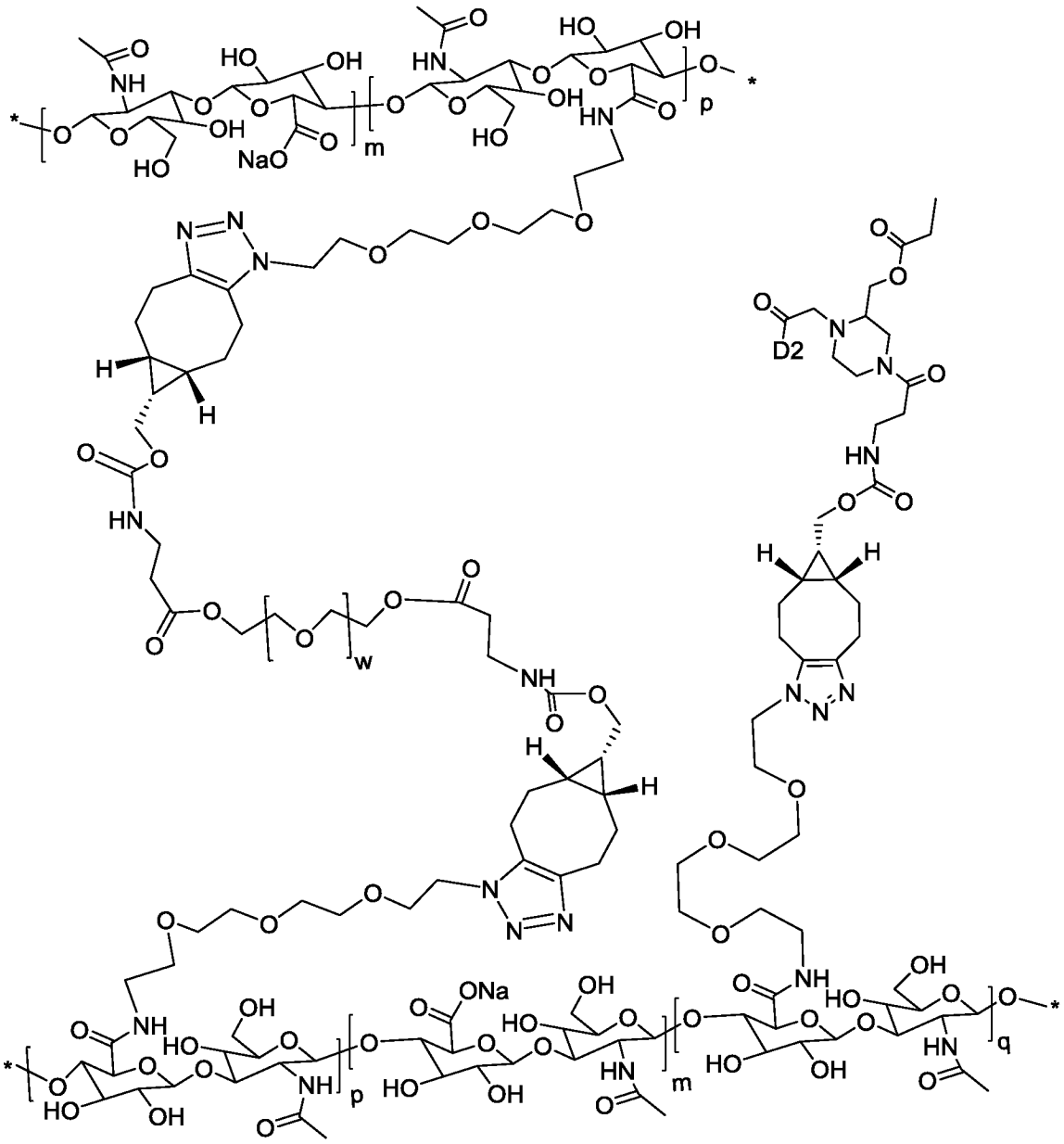
(XVIIIe).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIf), при этом лекарственное средство представляет собой бролуцизумаб:



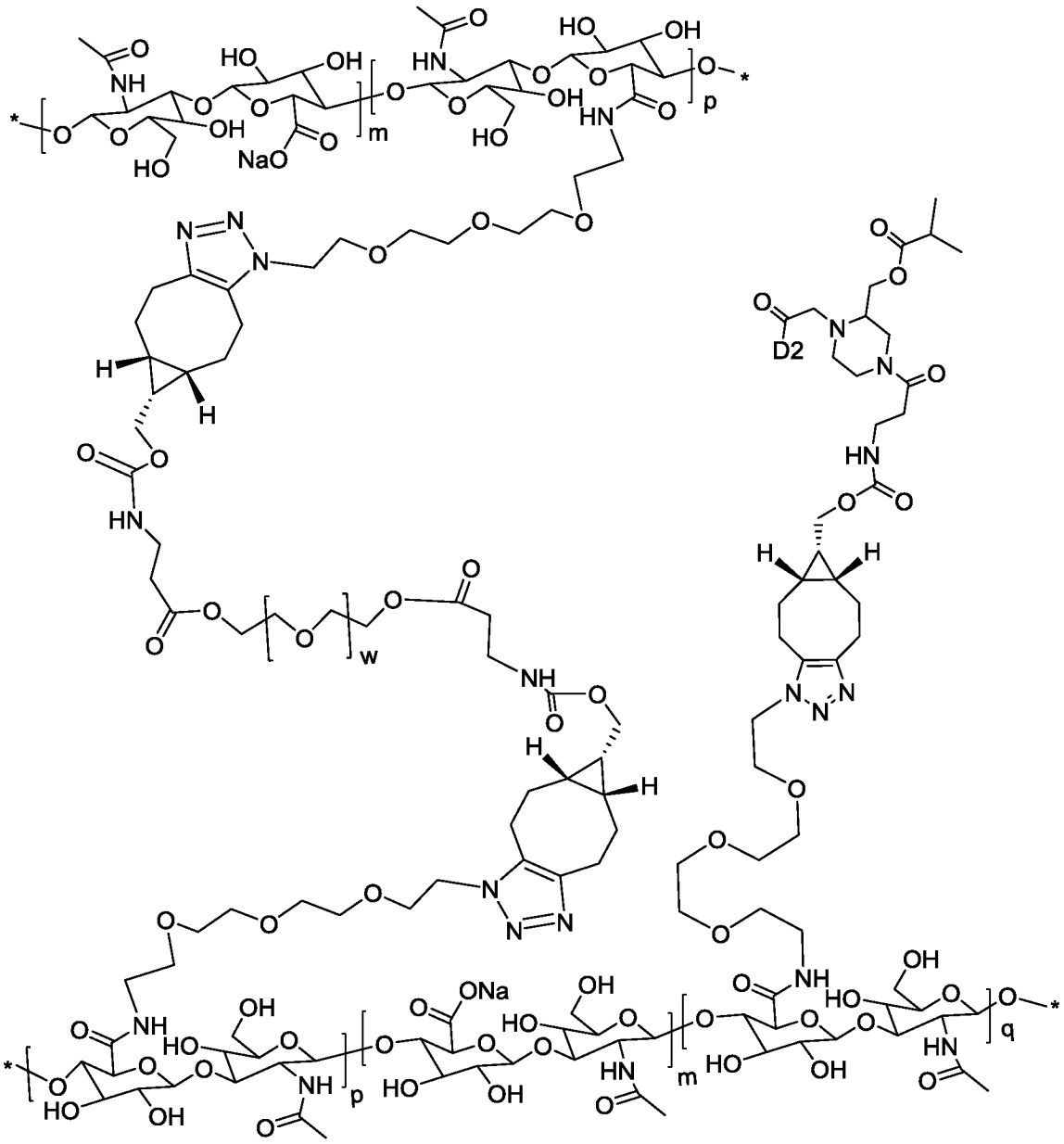
(XVIIIf).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XIX), при этом лекарственное средство представляет собой D2:



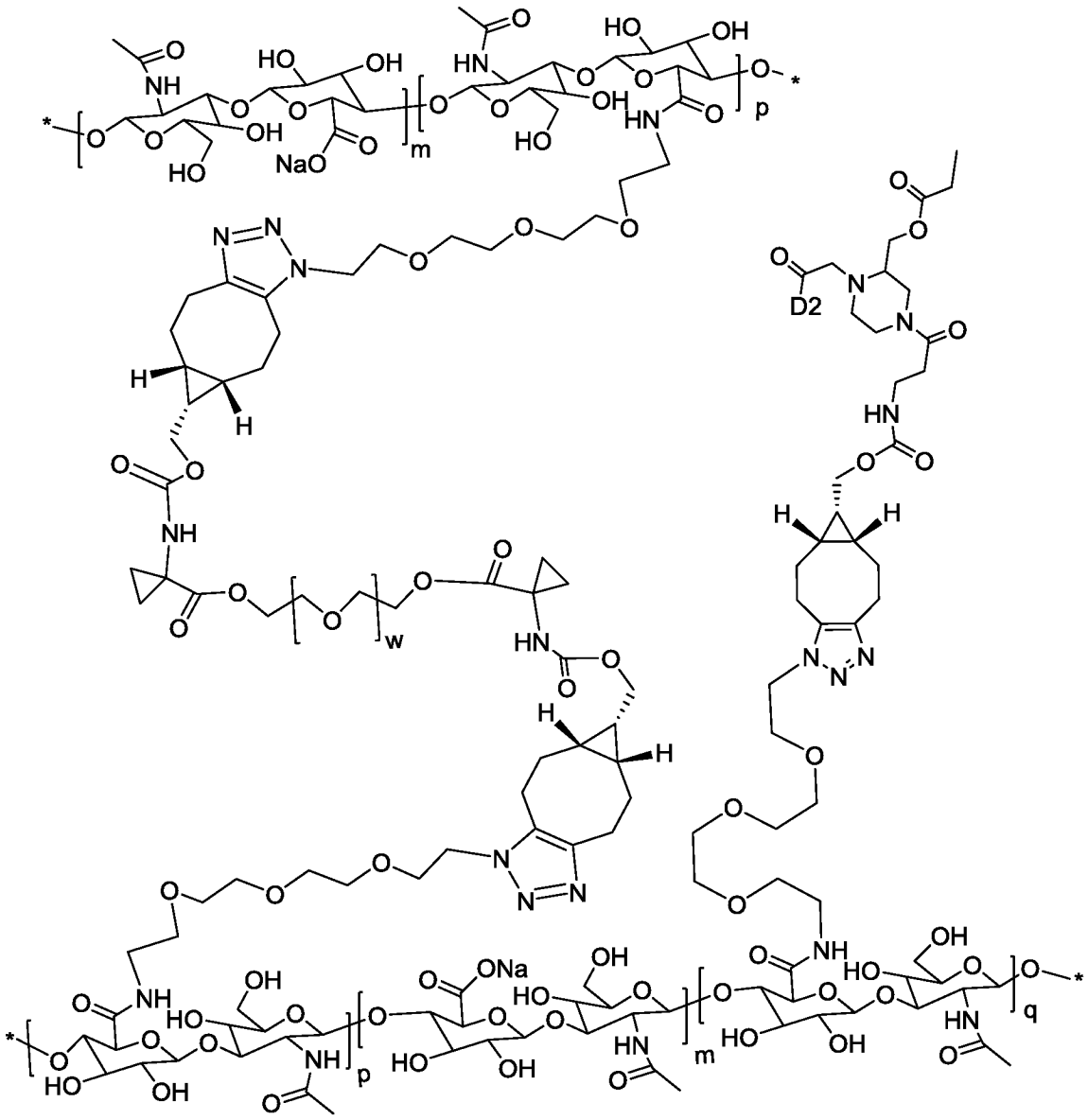
(XIX).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XX), при этом лекарственное средство представляет собой D2:



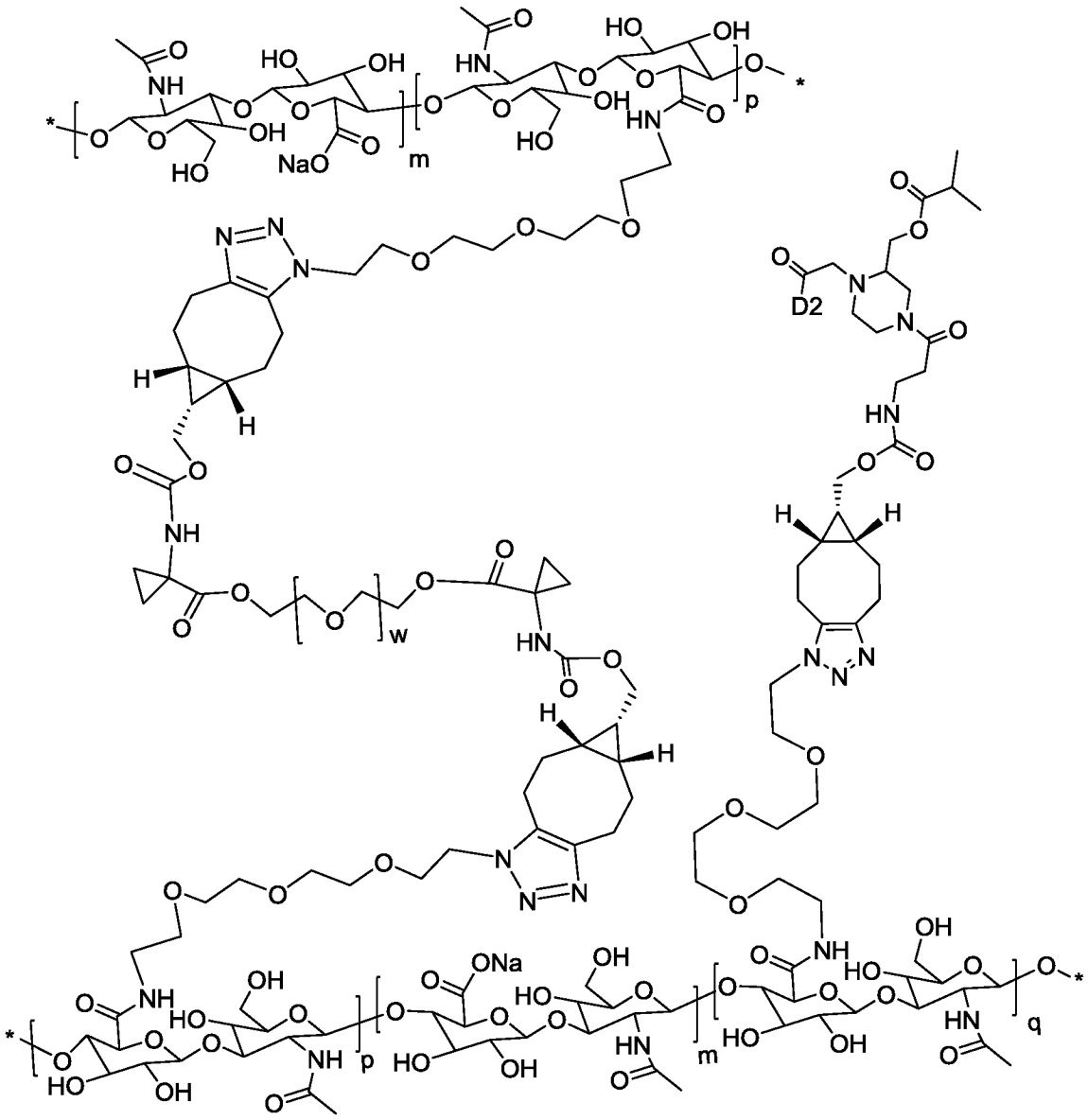
(XX).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XXI), при этом лекарственное средство представляет собой D2:



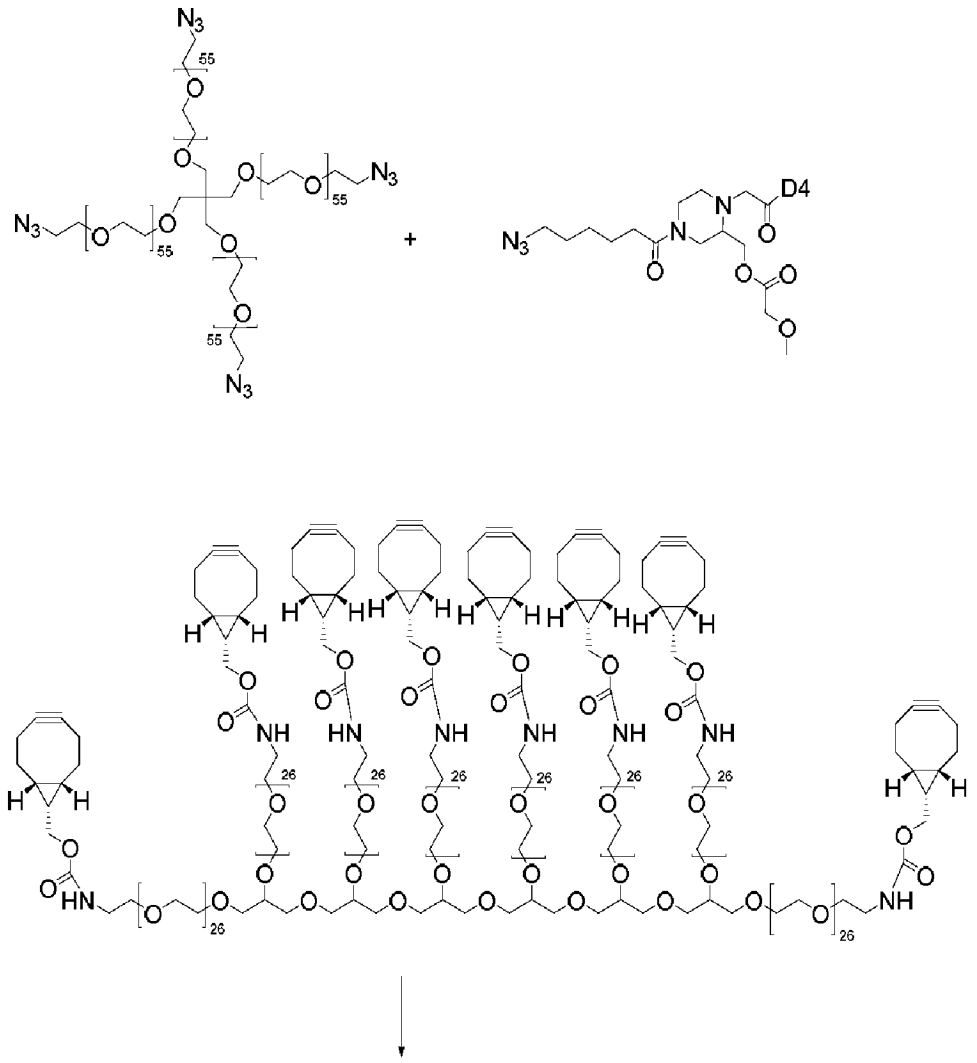
(XXI).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XXII), при этом лекарственное средство представляет собой D2:



(XXII).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XXIII), при этом лекарственное средство представляет собой D4:



(XXIII).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения заболеваний или нарушений с помощью систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе. Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, относится к системе доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей D–R, представленный формулой (I), для применения в качестве лекарственного препарата. Другой вариант осуществления представляет собой применение системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей D–R, представленный формулой (I), для получения лекарственного препарата для лечения сердечного нарушения, скелетно–мышечного нарушения, глазного нарушения, в том числе без ограничения влажной формы возрастной дегенерации желтого пятна, отека желтого пятна, окклюзии ветвей центральной вены сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, глаукомы,

наследственной геморрагической телеангиэктазии (HHT), пролиферативной диабетической ретинопатии, увеита, пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), географической атрофии, сухой формы возрастной дегенерации желтого пятна, неоваскуляризации, диабетического отека желтого пятна или промежуточной стадии возрастной дегенерации желтого пятна. В одном аспекте фармацевтические композиции из систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, путем инъекции. В одном аспекте введение можно осуществлять путем инъекции или хирургической имплантации.

Один вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения нарушений со стороны глаз, в том числе без ограничения влажной формы возрастной дегенерации желтого пятна, отека желтого пятна, окклюзии ветвей центральной вены сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, глаукомы, наследственной геморрагической телеангиэктазии (HHT), пролиферативной диабетической ретинопатии, увеита, пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), географической атрофии, сухой формы возрастной дегенерации желтого пятна, неоваскуляризации, диабетического отека желтого пятна или промежуточной стадии возрастной дегенерации желтого пятна, при этом способ включает введение системы доставки лекарственных средств D–R, описанной в данном документе, где D содержит ранибизумаб, бевацизумаб, бролуцизумаб (SEQ ID NO:4), [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации. В одном аспекте композиция представляет собой раствор или суспензию, инъецируемые в глаз. В одном аспекте инъекция представляет собой внутриглазную инъекцию (например, интравитреальную инъекцию). В другом аспекте композиция представляет собой гелеобразную или полутвердую композицию, имплантируемую в глаз с помощью хирургических способов или путем инъекции.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения скелетно–мышечных нарушений, в том числе без ограничения при регенерации хрящевой ткани, заживлении сухожилий, заживлении ран или бульбоспинальной мышечной атрофии, включающий введение системы доставки лекарственных средств D–R, описанной в данном документе, где D содержит D2 (SEQ ID NO:5), пегилированный вариант D2, например, D3 (SEQ ID NO:6), или их комбинацию.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, относится к системе доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей D–R, представленный формулой (I), где D содержит D2 (SEQ ID NO:5), пегилированный вариант D2, например, D3 (SEQ ID NO:6), или их комбинацию, для

применения в лечении сердечного нарушения, скелетно–мышечного нарушения или глазного нарушения, в том числе без ограничения влажной формы возрастной дегенерации желтого пятна, отека желтого пятна, окклюзии ветвей центральной вены сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, глаукомы, наследственной геморрагической телеангиэктазии (HHT), пролиферативной диабетической ретинопатии, увеита, пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), географической атрофии, сухой формы возрастной дегенерации желтого пятна, неоваскуляризации, диабетического отека желтого пятна или промежуточной стадии возрастной дегенерации желтого пятна. В одном аспекте композиция представляет собой раствор или суспензию, инъецируемые в сустав. В другом аспекте композиция представляет собой гелеобразную или полутвердую композицию, имплантируемую в сустав с помощью хирургических способов или путем инъекции с использованием иглы с широким просветом. В другом аспекте композиция находится в форме частиц, инъецируемых в сустав или вблизи сустава. В другом аспекте композицию имплантируют в сустав или около сустава в виде биоразлагаемой сетки или марли, которая в конечном счете поглощается или перерабатывается в месте изначального нахождения. В другом аспекте композицией пропитывают швы, скобы, пластины, сетки или аналогичные изделия, которые используются во время хирургической операции для повторного прикрепления или восстановления сухожилий, связок, хрящевой ткани, костной ткани или других компонентов сустава после травмы или заболевания.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения сердечного нарушения, такого как сердечная недостаточность, острая декомпенсированная сердечная недостаточность (ADHF), хроническая сердечная недостаточность, легочная гипертензия, фибрилляция предсердий, синдром Бругада, желудочковая тахикардия, атеросклероз, гипертензия, рестеноз, ишемические сердечно–сосудистые заболевания, кардиомиопатия, фиброз сердца, аритмия, задержка жидкости в организме, сахарный диабет (в том числе гестационный сахарный диабет), ожирение, заболевания периферических артерий, нарушения мозгового кровообращения, транзиторные ишемические атаки, травматические повреждения головного мозга, боковой амиотрофический склероз, ожоговые травмы (в том числе солнечные ожоги) или преэклампсия, включающий введение системы доставки лекарственных средств D–R, описанной в данном документе, где D содержит D4 (SEQ ID NO:7). В одном аспекте композиция представляет собой раствор или суспензию, которые доставляются внутривенно, внутриартериально, подкожно, внутримышечно или внутрибрюшинно. В другом аспекте композиция представляет собой гелеобразную или полутвердую композицию, имплантируемую с помощью хирургических способов или путем инъекции с использованием иглы с широким просветом. В другом аспекте композиция представляет собой гелеобразную или полутвердую композицию, наносимую местно или непосредственно на кожные раны.

В одном варианте осуществления система доставки лекарственных средств, описанная в данном документе, высвобождает биологически активное средство с

определенной скоростью высвобождения. В одном аспекте скорость высвобождения может настраиваться или модулироваться "инициаторным" компонентом бесследного линкера R. Не ограничиваясь какой–либо теорией, полагают, что в ходе реакции с участием инициатора в физиологических условиях образуется нуклеофильная функциональная группа, например, гидроксильная функциональная группа, благодаря которой происходит расщепление внутримолекулярной амидной связи, связывающей лекарственное средство с системой доставки лекарственных средств. В одном варианте осуществления реакция с участием инициатора представляет собой реакцию гидролиза, приводящую к образованию гидроксильной функциональной группы. Не ограничиваясь какой–либо теорией, полагают, что стерическое затруднение в инициаторном компоненте коррелирует с более низкой скоростью реакции с участием инициатора, а наличие и близость электроноакцепторных групп коррелирует с более высокой скоростью реакции с участием инициатора.

В одном варианте осуществления период полувысвобождения биологически активного компонента составляет приблизительно 0,5 часа, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 6 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 22 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 1 день, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, приблизительно 12 месяцев, приблизительно 1 год, приблизительно 1,5 года, приблизительно 2 года, приблизительно 2,5 года, приблизительно 3 года, приблизительно 3,5 года, приблизительно 4 года или более чем 4 года. В одном аспекте период полувысвобождения биологически активного компонента составляет приблизительно 2,5 дня, приблизительно 4,5 дня, приблизительно 7 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 28 дней, приблизительно 30 дней, приблизительно 31 день, приблизительно 32 дня, приблизительно 40 дней, приблизительно 58 дней, приблизительно 60 дней, приблизительно 65 дней, приблизительно 70 дней, приблизительно 80 дней, приблизительно 125 дней, приблизительно 165 дней, приблизительно 380 дней, приблизительно 940 дней или даже больше.

В одном варианте осуществления период полугидролиза сложноэфирной связи в инициаторном компоненте бесследного линкера составляет приблизительно 0,5 часа, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 6

часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 22 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 1 день, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, приблизительно 12 месяцев, приблизительно 1 год, приблизительно 1,5 года, приблизительно 2 года, приблизительно 2,5 года, приблизительно 3 года, приблизительно 3,5 года, приблизительно 4 года или более чем 4 года. В одном аспекте период полугидролиза сложноэфирной связи в инициаторном компоненте бесследного линкера составляет приблизительно 1 день, приблизительно 1,5 дня, приблизительно 2 дня, приблизительно 2,5 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 30 дней, приблизительно 32 дня, приблизительно 35 дней, приблизительно 40 дней, приблизительно 55 дней, приблизительно 60 дней, приблизительно 90 дней, приблизительно 120 дней, приблизительно 150 дней, приблизительно 180 дней, приблизительно 200 дней, приблизительно 300 дней, приблизительно 400 дней или даже дольше.

В другом варианте осуществления период полувыведения системы доставки лекарственных средств $R–R^{11}$ после высвобождения лекарственного средства D (например, $D–R–R^{11} \rightarrow R–R^{11}+D$) из ткани, органа или компартмента, в которые система доставки лекарственных средств была дозирована, составляет приблизительно 0,5 часа, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 6 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 22 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 1 день, приблизительно 2 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 4 дня, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, приблизительно 12 месяцев, приблизительно 1 год, приблизительно 1,5 года, приблизительно 2 года, приблизительно 2,5 года, приблизительно 3 года, приблизительно 3,5 года, приблизительно 4 года или более чем 4 года.

Другие варианты осуществления, описанные в данном документе, представляют собой фармацевтические композиции, содержащие систему доставки лекарственных средств D–R–R^{11}, описанную в данном документе. В одном аспекте фармацевтические композиции являются подходящими для инъекции или имплантации субъекту, нуждающемуся в этом.

Фармацевтические композиции, подходящие для введения путем инъекции или имплантации, включают стерильные водные растворы, суспензии или дисперсии и стерильные порошки или лиофилизаты для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии для немедленного приема.

Носители, подходящие для внутривенного введения, включают фосфатно–солевой буферный раствор (PBS), физиологический раствор, раствор Рингера или воду для инъекций. Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Предпочтительные фармацевтические составы являются стабильными в условиях получения и хранения и должны быть защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Как правило, соответствующий носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, буферы, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрывающего средства, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае с дисперсией и путем применения поверхностно–активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достичь с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Во многих случаях предпочтительным будет включение в композицию средств для обеспечения изотоничности, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, аминокислот, сорбита, хлорида натрия или их комбинаций. Длительное всасывание инъекционных композиций может обеспечиваться посредством включения в композицию средства, которое замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Некоторые инъекционные композиции представляют собой водные изотонические растворы или суспензии, и суппозитории преимущественно получают из жировых эмульсий или суспензий. Указанные композиции могут быть стерилизованы и/или могут содержать вспомогательные средства, такие как консерванты, стабилизирующие, смачивающие или эмульгирующие средства, ускорители растворения, соли для регуляции осмотического давления и/или буферы. Кроме того, они также могут содержать другие терапевтически ценные вещества. Указанные композиции получают в соответствии с традиционными способами смешивания, гранулирования или нанесения покрытия соответственно, и они содержат приблизительно 0,1–75% или содержат приблизительно 1–50% активного ингредиента.

Стерильные инъецируемые растворы или суспензии можно получить посредством

включения системы доставки лекарственных средств в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, если требуется, с последующей стерилизующей фильтрацией. Как правило, растворы или суспензии получают путем включения активного соединения в стерильную основу, такую как стерильный PBS и любые вспомогательные вещества. В случае со стерильными порошками для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые дают в результате порошок из активного ингредиента и любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, ранее подвергнутого стерилизующей фильтрации.

Также возможным является способ чресслизистого или трансдермального введения. Подходящие композиции для трансдермального применения содержат эффективное количество биологически активного средства с подходящим носителем. Носители, подходящие для трансдермальной доставки, включают всасываемые фармакологически приемлемые растворители для содействия прохождению через кожу получающего их пациента. Например, трансдермальные устройства находятся в форме перевязочного материала, содержащего поддерживающий элемент, резервуар, содержащий соединение, необязательно вместе с носителями, необязательно барьерный элемент, контролирующий скорость, для доставки соединения через кожу получающего его пациента с контролируемой и предварительно определенной скоростью в течение длительного периода времени, а также средство для прикрепления устройства к коже.

Подходящие композиции для местного применения, например, в отношении кожи, глаз или суставов, включают водные растворы, суспензии, мази, кремы, гели или распыляемые составы, например, для доставки с помощью аэрозоля и т. п. Такие системы местной доставки будут, в частности, подходить для кожного применения. Таким образом, они являются особенно подходящими для применения в составах для местного применения, в том числе косметических, которые хорошо известны из уровня техники. Они могут содержать солюбилизаторы, стабилизаторы, средства для повышения тоничности, буферы или консерванты.

Как используется в данном документе, местное применение может также относиться к ингаляционному или интраназальному применению. Доставку можно удобно осуществлять в форме сухого порошка (отдельно в виде смеси, например, сухой смеси с лактозой, либо в виде частиц с комбинированными компонентами, например, с фосфолипидами) из ингалятора сухого порошка или посредством подачи распыляемого аэрозоля из контейнера под давлением, насоса, пульверизатора, распылителя или небулайзера с применением подходящего распыляющего вещества или без него.

В данном документе также описаны фармацевтические композиции и лекарственные формы, содержащие одно или несколько средств, которые снижают скорость разрушения композиций, описанных в данном документе как активные ингредиенты. Такие средства, которые упоминаются в данном документе как "стабилизаторы", включают без ограничения антиоксиданты, такие как аскорбиновая

кислота, буферы для поддержания pH или солевые буферы и т. д.

Эффективное количество фармацевтической композиции для терапевтического применения будет зависеть, например, от терапевтической ситуации и целей. Специалист в данной области поймет, что подходящие уровни дозы для лечения будут, таким образом, варьироваться отчасти в зависимости от терапевтического средства, включенного в систему доставки лекарственных средств, показания, при котором применяется система доставки лекарственных средств, пути введения и габаритов (массы тела, площади поверхности тела или размера органа), а также состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. Соответственно, врач–клиницист может подобрать дозу и модифицировать путь введения для достижения оптимального терапевтического эффекта.

Частота дозирования будет зависеть от фармакокинетических параметров терапевтического средства, включенного в применяемую систему доставки лекарственных средств. Как правило, врач–клиницист будет вводить композицию до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая обеспечивает желаемый эффект. Таким образом, композицию можно вводить в виде одной дозы, в виде двух или более доз (которые могут содержать или не содержать одно и то же количество желаемых молекул) в течение некоторого времени или в виде непрерывной инфузии с помощью имплантируемого устройства или катетера. Дополнительное уточнение подходящей дозы обычно выполняется средними специалистами в данной области и находится в пределах объема заданий, обычно выполняемых ими. Подходящие дозы могут быть определены путем использования соответствующих данных о зависимости доза–ответ.

Система доставки лекарственных средств может быть получена в виде растворов или суспензий микрочастиц. В одном аспекте носитель получают в виде материала в форме микрочастиц, который можно вводить с помощью стандартного шприца в ткань–мишень, например, путем подкожного, интравитреального, внутрисуставного, внутрисухожильного или внутримышечного введения. Такие частицы могут характеризоваться распределением частиц по среднему размеру от 1 мкм до 5000 мкм. Другие аспекты включают биоразлагаемую марлю, сетку или швы, которые были пропитаны системами доставки лекарственных средств, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления микрочастицы систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе, можно получать с помощью эмульсионной полимеризации, литографии, прядения, формования, распылительной сушки, размалывания, продавливания, механического измельчения или аналогичных процедур, известных из уровня техники. В одном варианте осуществления системы доставки лекарственных средств, полимеры–носители или гидрогели, описанные в данном документе, можно разделять на микрочастицы путем продавливания через сетку или сита. В одном аспекте продавливание может повторяться многократно и/или через сетки с последовательно уменьшающимся размером отверстий до достижения желаемого распределения частиц по размеру.

В одном варианте осуществления на основании данных лазерной дифракции для

измерения размера частиц система доставки лекарственных средств характеризуется распределением частиц по среднему размеру от 1 мкм до 5000 мкм при суспендировании в изотоническом водном буфере для составления. В некоторых аспектах система доставки лекарственных средств характеризуется распределением частиц по среднему размеру от 10 мкм до 1000 мкм при суспендировании в изотоническом буфере. В другом аспекте система доставки лекарственных средств характеризуется распределением частиц по среднему размеру от 50 мкм до 500 мкм при суспендировании в изотоническом водном буфере. В другом аспекте система доставки лекарственных средств характеризуется распределением частиц по среднему размеру от 100 мкм до 300 мкм при суспендировании в изотоническом водном буфере. В другом аспекте система доставки лекарственных средств характеризуется распределением частиц по среднему размеру от 200 мкм до 300 мкм при суспендировании в изотоническом водном буфере. В некоторых вариантах осуществления распределение частиц по среднему размеру охватывает приблизительно 10 мкм, приблизительно 50 мкм, приблизительно 100 мкм, приблизительно 150 мкм, приблизительно 200 мкм, приблизительно 250 мкм, приблизительно 300 мкм, приблизительно 350 мкм, приблизительно 400 мкм, приблизительно 450 мкм, приблизительно 500 мкм, приблизительно 750 мкм, приблизительно 1000 мкм, приблизительно 1500 мкм, приблизительно 2000 мкм, приблизительно 2500 мкм или приблизительно 5000 мкм.

Размеры частиц можно определять с помощью стандартных методик, известных среднему специалисту в данной области. Иллюстративные методики, которые можно применять для измерения распределения частиц по размеру для частиц системы доставки лекарственных средств, могут включать анализ методом лазерной дифракции, рассеяние света (например, динамическое рассеяние света), микроскопический визуальный анализ частиц, элютриацию или аэрозольную масс–спектрометрию. Образец частиц системы доставки лекарственных средств может быть измерен в виде сухого образца или влажного образца. Можно использовать любой коммерчески доступный прибор для измерения размеров частиц, в том числе приборы от Cilas; Brookhaven Instruments Corporation; Malvern Instruments; Horiba Scientific или Wyatt, следуя рекомендуемому порядку эксплуатации в соответствии с инструкциями производителя.

Размеры частиц, измеренные с помощью методик, описанных в данном документе, могут быть выражены в виде выведенного диаметра с нормальным распределением или ненормальным распределением со средним значением, медианой (например, медианно–массовым диаметром) и модой размеров частиц в диаметре. Распределение частиц по размеру может быть выражено как распределение по величине диаметра, распределение по площади поверхности или распределение частиц по объему. Среднее значение для распределения частиц по размеру можно рассчитать и выразить различными способами, как, например, в виде среднеобъемного диаметра (D[4,3] или d_{43}), среднеповерхностного диаметра (D[3,2] или d_{32}) или среднечислового диаметра частиц (D[1,0] или d_{10}). Поскольку значения распределения частиц по размеру варьируются в зависимости от

методики измерения и от того, как выражено распределение, при сравнении различных распределений частиц по среднему размеру расчеты должны производиться по одной и той же методике, чтобы получить точное сравнение. Например, образец с измеренным и рассчитанным среднеобъемным диаметром должен сравниваться со вторым образцом, имеющим измеренный и рассчитанный среднеобъемный диаметр, в идеальном случае измеренный с использованием того же измерительного прибора в тех же условиях. Таким образом, конкретные распределения частиц по размеру, описанные в данном документе, не подразумеваются как ограниченные каким–либо одним типом способа измерения или расчета распределения частиц по размеру (например, распределением по величине диаметра, распределением по площади поверхности или распределением частиц по объему), а скорее указывают на значения размера частиц и их распределения для каждого способа измерения размеров частиц, описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления системы доставки лекарственных средств можно вводить путем инъекции с помощью иглы с внутренним диаметром менее 0,6 мм (например, 20 калибра), предпочтительно с помощью иглы с внутренним диаметром менее 0,3 мм (например, 25 калибра), более предпочтительно с помощью иглы с внутренним диаметром менее 0,25 мм (например, 27 калибра), еще более предпочтительно с помощью иглы с внутренним диаметром менее 0,2 мм (например, 28 калибра) и наиболее предпочтительно с помощью иглы с внутренним диаметром менее 0,16 мм (например, 30 калибра). В одном варианте осуществления в случаях, когда системы доставки лекарственных средств вводят внутриглазным или интравитреальным путем, предпочтительной является игла с внутренним диаметром менее 0,16 мм (например, 30–34 калибра). Например, когда инъецируется система доставки лекарственных средств с распределением частиц по размеру от 100 мкм до 300 мкм, для доставки может быть оптимальной игла 20 калибра. Поскольку морфологические характеристики частиц являются гибкими, тем не менее, можно успешно использовать иглы меньшего размера по ширине, чем размер частиц системы доставки лекарственных средств.

Фразы и термины "может быть введен путем инъекции", "инъецируемый" или "инъецируемость" относятся к комбинации факторов, таких как определенное усилие, прилагаемое к поршню шприца, содержащего системы доставки лекарственных средств, описанные в данном документе, набухшие в жидкости при определенной концентрации (вес/объем) и при определенной температуре, игла указанного внутреннего диаметра, соединенная с выпускным отверстием такого шприца, и время, необходимое для выдавливания определенного объема систем доставки лекарственных средств из шприца через иглу.

В одном варианте осуществления измерение инъецируемости проводят для системы доставки лекарственных средств, суспендированной в PBS или физиологическом растворе до концентрации от приблизительно 0,1% до приблизительно 20% (вес/об.), включая все целые числа в пределах указанного диапазона процентных значений.

Следовательно, системы доставки лекарственных средств демонстрируют

благоприятный эффект контролируемой скорости высвобождения применительно к высвобождаемому лекарству D–H. Предпочтительно, достигается замедленная скорость высвобождения. Замедленное высвобождение означает, что интервалы между введением соответствующих систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе, увеличены по сравнению с введением лекарственного средства в отсутствие системы доставки лекарственных средств. Например, системы доставки лекарственных средств, в которых используются лекарственные средства, обычно вводимые один или несколько раз в день, обеспечивают терапевтически эффективные уровни в течение по меньшей мере трех дней, по меньшей мере одной недели, в течение по меньшей мере одного месяца, в течение нескольких месяцев или в течение нескольких лет.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой фармацевтическую композицию на основе систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе. Фармацевтические композиции могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ, таких как следующие вещества.

(i) Буферные средства: физиологически переносимые буферы для поддержания pH в желаемом диапазоне, такие как фосфат натрия, бикарбонат, сукцинат, гистидин, цитрат и ацетат, сульфат, нитрат, хлорид, пируват. Также можно использовать антациды, такие как $Mg(OH)_2$ или $ZnCO_3$. Буферную емкость можно скорректировать так, чтобы она соответствовала условиям, наиболее чувствительным к стабильности pH.

(ii) Модификаторы изотоничности: для минимизации боли, которая может быть обусловлена повреждением клеток из–за разницы осмотического давления в инъекционном депо. Примерами являются глицерин и хлорид натрия. Эффективные концентрации можно определить с помощью осмометрии с использованием предполагаемой осмоляльности 285–315 мосмоль/кг для сыворотки крови.

(iii) Консерванты и/или противомикробные препараты: для многодозовых препаратов для парентерального применения может потребоваться добавление консервантов в достаточной концентрации, чтобы минимизировать риск заражения субъектов во время инъекции, поэтому были установлены соответствующие нормативные требования. Типичные консерванты включают м–крезол, фенол, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен, хлорбутанол, бензиловый спирт, нитрат фенилртути, тимеросал, сорбиновую кислоту, сорбат калия, бензойную кислоту, хлоркрезол и хлорид бензалкония.

(iv) Стабилизаторы: стабилизация достигается путем укрепления сил, стабилизирующих белок, путем дестабилизации денатурированного состояния или путем непосредственного связывания вспомогательных веществ с белком. Стабилизаторы могут представлять собой аминокислоты, такие как аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, глицин, гистидин, лизин, пролин, сахара, такие как глюкоза, сахароза, трегалоза, полиолы, такие как глицерин, маннит, сорбит, соли, такие как фосфат калия, сульфат натрия, хелатирующие средства, такие как EDTA, гексафосфат, лиганды, такие как двухвалентные ионы металлов (цинка, кальция и т. п.), другие соли или органические молекулы, такие

как производные фенола. Кроме того, можно использовать олигомеры или полимеры, такие как циклодекстрины, декстран, дендримеры, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, протамин или человеческий сывороточный альбумин.

(v) Антиадсорбционные средства: главным образом ионные или неионогенные поверхностно–активные вещества или другие белки или растворимые полимеры используются для покрывания внутренней поверхности контейнера с композицией или конкурентной адсорбции на ней, например, полоксамер (Pluronic F–68), додециловый эфир PEG (Brij 35), полисорбат 20 и 80, декстран, полиэтиленгликоль, PEG–полигистидин, BSA и HSA и желатины. Выбранные концентрация и тип наполнителя зависят от эффекта, которого следует избегать, но обычно монослой поверхностно–активного вещества образуется на границе раздела фаз на уровне чуть выше значения CMC.

(vi) Вещества, способствующие лиофилизации, или криопротекторы: во время сублимационной или распылительной сушки вспомогательные вещества могут нейтрализовать дестабилизирующие эффекты, вызываемые разрывом водородных связей и удалением воды. Для этой цели можно использовать сахара и полиолы, но соответствующие положительные эффекты также наблюдались для поверхностно–активных веществ, аминокислот, неводных растворителей и других пептидов. Трегалоза особенно эффективна для снижения агрегации, индуцированной влагой, а также улучшает термостабильность, потенциально обусловленную доступностью гидрофобных групп белка для молекул воды. Маннит и сахарозу также можно использовать в качестве единственного лио–/криопротектора либо в комбинации друг с другом, при этом известно, что более высокие доли маннита или сахарозы усиливают физическую стабильность лиофилизированной массы. Маннит также можно использовать в комбинации с трегалозой. Трегалозу также можно использовать в комбинации с сорбитом, или сорбит можно использовать в качестве единственного протекторного средства. Также можно использовать крахмал или производные крахмала.

(vii) Средства, защищающие от окисления: антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, эктоин, метионин, глутатион, монотиоглицерин, морин, полиэтиленимин (PEI), пропилгаллат, витамин E, хелатирующие средства, такие как лимонная кислота, EDTA, гексафосфат, тиогликолевая кислота.

(viii) Загустители или усилители вязкости: замедляют осаждение частиц во флаконе и шприце и используются для облегчения перемешивания и ресуспендирования частиц, а также для облегчения инъекции суспензии (т. е., снижают усилие, прилагаемое к поршню шприца). Подходящими загустителями или усилителями вязкости являются, например, карбомерные загустители, такие как Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, производные целлюлозы, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза (гипромеллоза, HPMC) или диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE или DEAE–C), коллоидный силикат магния (Veegum) или силикат натрия, гелеобразный гидроксиапатит, гелеобразный фосфат трикальция, ксантаны, каррагинаны, такие как Satiagum UTC 30, алифатические поли(гидроксикислоты), такие как поли(D, L– или L–молочная кислота) (PLA) и

поли(гликолевая кислота) (PGA) и их сополимеры (PLGA), тройные сополимеры D, L–лактида, гликолида и капролактона, полоксамеры, гидрофильные блоки поли(оксиэтилена) и гидрофобные блоки поли(оксипропилена) для получения триблок–сополимера поли(оксиэтилен)–поли(оксипропилен)–поли(оксиэтилен) (например, Pluronic.™), полиэфир–эфирный сополимер, такой как сополимер полиэтиленгликольтерефталата и полибутилентерефталата, изобутират ацетата сахарозы (SAIB), декстран или его производные, комбинации декстранов и PEG, полидиметилсилоксан, коллаген, хитозан, поливиниловый спирт (PVA) и его производные, полиалкилимиды, сополимер акриламида и диаллилдиметиламмония (DADMA), поливинилпирролидон (PVP), гликозаминогликаны (GAG), такие как дерматансульфат, хондроитинсульфат, кератансульфат, гепарин, гепарансульфат, гиалуронан, триблок–сополимеры ABA или блок–сополимеры AB, состоящие из гидрофобных A–блоков, таких как полилактид (PLA) или сополимер лактида и гликолида (PLGA), и гидрофильных B–блоков, таких как полиэтиленгликоль (PEG) или поливинилпирролидон. Такие блок–сополимеры, а также вышеупомянутые полоксамеры могут проявлять поведение обратимого термического гелеобразования (жидкое состояние при комнатной температуре для облегчения введения и гелеобразное состояние выше температуры перехода золь–гель при температуре тела после инъекции).

(ix) Средства, способствующие диффузии: модифицируют проницаемость соединительной ткани посредством гидролиза компонентов внеклеточного матрикса в интерстициальном пространстве, таких как, без ограничения, гиалуроновая кислота, полисахарид, находящиеся в интерстициальном пространстве соединительной ткани. Средство, усиливающее растекание, такое как, без ограничения, гиалуронидаза, временно снижает вязкость внеклеточного матрикса и стимулирует диффузию инъецируемых лекарственных средств.

(x) Другие вспомогательные средства, такие как смачивающие средства, модификаторы вязкости, антибиотики, гиалуронидаза. Кислоты и основания, такие как хлористоводородная кислота и гидроксид натрия, являются вспомогательными средствами, необходимыми для корректировки pH в ходе получения.

Система доставки лекарственных средств может быть представлена в виде жидкости, суспензии или в виде сухой композиции.

В одном варианте осуществления система доставки лекарственных средств представляет собой сухую композицию. Подходящими способами сушки являются, например, распылительная сушка и лиофилизация (сублимационная сушка). В одном аспекте система доставки лекарственных средств высушена путем лиофилизации.

В одном варианте осуществления система доставки лекарственных средств находится в композиции в дозе, достаточной для обеспечения наличия терапевтически эффективного количества биологически активного средства в течение по меньшей мере 12 часов при однократном применении. В одном аспекте одного применения системы доставки лекарственных средств достаточно в течение приблизительно 1 дня,

приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней, приблизительно 4 дней, приблизительно 5 дней, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, приблизительно 4 недель, одного месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, одного года, 2 лет, 3 лет, 4 лет или даже дольше.

В одном варианте осуществления система доставки лекарственных средств представлена в виде одноразовой дозы, что означает, что контейнер, в котором она поставляется, содержит одну фармацевтическую дозу.

В другом варианте осуществления композиция представлена в виде многодозовой композиции, что означает, что она содержит более одной терапевтической дозы. Многодозовая композиция предпочтительно содержит по меньшей мере 2 дозы. Такие многодозовые системы доставки лекарственных средств могут применяться для различных субъектов, нуждающихся в этом, или предназначены для применения у одного субъекта, при этом оставшиеся дозы сохраняются после применения первой дозы до тех пор, пока это необходимо.

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств содержится в одном или нескольких контейнерах. В случае с жидкими или суспензионными композициями контейнер предпочтительно представляет собой однокамерный шприц. В случае с сухими композициями контейнер предпочтительно представляет собой двухкамерный шприц. Сухая композиция предоставляется в первой камере двухкамерного шприца, а раствор для разбавления предоставляется во второй камере двухкамерного шприца.

Перед применением сухой системы доставки лекарственных средств для субъекта, нуждающегося в этом, сухую композицию разбавляют. Разбавление может происходить в контейнере, в котором предоставляется сухая система доставки лекарственных средств, таком как флакон, шприц, двухкамерный шприц, ампула и картридж. Разбавление осуществляют путем добавления предварительно определенного количества раствора для разбавления к сухой композиции. Растворы для разбавления представляют собой стерильные жидкости, такие как фосфатно–солевой буферный раствор, изотонический солевой раствор, вода для инъекций или другие буферы, которые могут содержать дополнительные вспомогательные вещества, такие как консерванты и/или антимикробные средства, такие как, например, бензиловый спирт и крезол. Раствор для разбавления предпочтительно представляет собой стерильный фосфатно–солевой буферный раствор (PBS) или физиологический раствор. В качестве альтернативы, раствор для разбавления представляет собой стерильную воду для инъекций.

Другой вариант осуществления представляет собой способ получения разбавленной композиции, содержащей терапевтически эффективное количество системы доставки лекарственных средств и необязательно одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, при этом способ включает стадию приведения композиции в контакт с объемом основы для разбавления. Затем разбавленную систему доставки лекарственных средств можно вводить путем инъекции или другими путями.

Другой вариант осуществления представляет собой разбавленную композицию, содержащую терапевтически эффективное количество системы доставки лекарственных средств, основу для разбавления и необязательно одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Другой вариант осуществления представляет собой предварительно заполненный шприц, содержащий раствор или суспензию, содержащую терапевтически эффективное количество системы доставки лекарственных средств и необязательно одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. В одном аспекте шприц заполнен системой доставки лекарственных средств, описанной в данном документе, в объеме от приблизительно 0,01 мл до приблизительно 5 мл. В одном аспекте шприц заполнен объемом от приблизительно 0,05 мл до приблизительно 5 мл, от приблизительно 1 мл до приблизительно 2 мл, от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 0,15 мл, от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 0,5 мл, от приблизительно 0,15 мл до приблизительно 0,175 мл или от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мл. В одном варианте осуществления шприц заполнен системой доставки лекарственных средств, описанной в данном документе, в объеме 0,165 мл. В некоторых аспектах шприц заполнен системой доставки лекарственных средств, описанной в данном документе, в объеме, составляющем приблизительно 0,01 мл, приблизительно 0,02 мл, приблизительно 0,03 мл, приблизительно 0,04 мл, приблизительно 0,05 мл, приблизительно 0,06 мл, приблизительно 0,07 мл, приблизительно 0,08 мл, приблизительно 0,09 мл, приблизительно 0,1 мл, приблизительно 0,2 мл, приблизительно 0,3 мл, приблизительно 0,4 мл, приблизительно 0,5 мл, приблизительно 0,6 мл, приблизительно 0,7 мл, приблизительно 0,8 мл, приблизительно 0,9 мл, приблизительно 1 мл, приблизительно 1,2 мл, приблизительно 1,5 мл, приблизительно 1,75 мл, приблизительно 2 мл, приблизительно 2,5 мл, приблизительно 3 мл, приблизительно 4 мл или приблизительно 5 мл. Шприц часто заполняется дозой, превышающей желаемую, которая должна быть введена пациенту, для учета потерь из–за "мертвого пространства" внутри шприца и иглы. Можно также предварительно определить количество потерь при заправке шприца врачом, так чтобы он был готов для инъекции пациенту.

В одном варианте осуществления шприц заполнен объемом дозы (т. е. объемом лекарственного препарата, предназначенного для доставки пациенту) системы доставки лекарственных средств, описанной в данном документе, составляющим от приблизительно 0,01 мл до приблизительно 5 мл в зависимости от пути инъекции (например, от приблизительно 0,01 мл до приблизительно 0,1 мл, от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 0,5 мл, от приблизительно 0,2 мл до приблизительно 2 мл, от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 5 мл или от приблизительно 1 мл до приблизительно 5 мл). В одном варианте осуществления, предназначенном для интравитреальной инъекции, шприц заполнен объемом дозы от приблизительно 0,01 мл до приблизительно 0,1 мл раствора или суспензии системы доставки лекарственных средств с концентрацией лекарственного средства от 1 мг/мл до 40 мг/мл, описанной в

данном документе. В одном варианте осуществления, предназначенном для внутрисуставной инъекции, шприц заполнен объемом дозы от приблизительно 0,05 мл до приблизительно 5,0 мл раствора или суспензии системы доставки лекарственных средств с концентрацией лекарственного средства от 1 мг/мл до 40 мг/мл, описанной в данном документе. В одном варианте осуществления, предназначенном для подкожной инъекции, шприц заполнен объемом дозы от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 5,0 мл раствора или суспензии системы доставки лекарственных средств с концентрацией лекарственного средства от 0,1 мг/мл до 40 мг/мл, описанной в данном документе. В других вариантах осуществления, предназначенных для инъекции другими путями, шприц заполнен объемом дозы от приблизительно 0,01 мл до приблизительно 5,0 мл раствора или суспензии системы доставки лекарственных средств с концентрацией лекарственного средства от 0,1 мг/мл до 40 мг/мл, описанной в данном документе. В некоторых аспектах шприц заполнен системой доставки лекарственных средств, описанной в данном документе, для доставки пациенту, нуждающемуся в этом, в объеме, составляющем приблизительно 0,01 мл, приблизительно 0,02 мл, приблизительно 0,03 мл, приблизительно 0,04 мл, приблизительно 0,05 мл, приблизительно 0,06 мл, приблизительно 0,07 мл, приблизительно 0,08 мл, приблизительно 0,09 мл, приблизительно 0,1 мл, приблизительно 0,2 мл, приблизительно 0,3 мл, приблизительно 0,4 мл, приблизительно 0,5 мл, приблизительно 0,6 мл, приблизительно 0,7 мл, приблизительно 0,8 мл, приблизительно 0,9 мл, приблизительно 1 мл, приблизительно 1,2 мл, приблизительно 1,5 мл, приблизительно 1,75 мл, приблизительно 2 мл, приблизительно 2,5 мл, приблизительно 3 мл, приблизительно 4 мл или приблизительно 5 мл.

Поскольку шприц содержит раствор лекарственного препарата, выпускное отверстие может быть обратимо герметично закрыто для поддержания стерильности лекарственного препарата. Эта герметизация может быть достигнута с помощью устройства для герметичного закрывания, известного из уровня техники, такого как наконечник Люэра или заглушка с контролем несанкционированного вскрытия.

Другой вариант осуществления представляет собой набор, содержащий один или несколько предварительно заполненных шприцев, содержащих раствор или суспензию одной или нескольких систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления такой набор содержит предварительно заполненный шприц, содержащий системы доставки лекарственных средств, описанные в данном документе, в блистерной упаковке или в герметичной гильзе. Блистерная упаковка или гильза могут быть стерильными внутри. В одном аспекте предварительно заполненные шприцы, описанные в данном документе, могут быть помещены внутрь таких блистерных упаковок или гильз до проведения стерилизации, например, терминальной стерилизации.

Такой набор может дополнительно содержать одну или несколько игл для введения систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе. Если система

доставки лекарственных средств предназначена для интравитреального введения, обычно используют иглу 30 калибра длиной ½ дюйма, хотя можно использовать иглы 31 или 32 калибра. Для интравитреального введения в качестве альтернативы можно использовать иглы 33 или 34 калибра. Такие наборы могут дополнительно содержать инструкции по применению, этикетку лекарственного средства, противопоказания, предупреждения или другую соответствующую информацию. Один вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой коробку или упаковку, содержащую один или несколько предварительно заполненных шприцев, содержащих одну или несколько систем доставки лекарственных средств, описанных в данном документе, содержащихся в блистерной упаковке, иглу и необязательно инструкции по введению, этикетку лекарственного средства, противопоказания, предупреждения или другую соответствующую информацию.

Для стерилизации шприца можно применять способ терминальной стерилизации, и в таком способе может использоваться известный способ, такой как способ стерилизации этиленоксидом или пероксидом водорода (H_2O_2). Иглы, подлежащие использованию вместе со шприцем, можно стерилизовать тем же способом, что и наборы, описанные в данном документе. В одном аспекте упаковка подвергается воздействию стерилизующего газа, пока наружная часть шприца не станет стерильной. После осуществления такого способа наружная поверхность шприца может оставаться стерильной (находясь при этом в его блистерной упаковке) в течение периода до 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев или дольше. Таким образом, в одном варианте осуществления предварительно заполненный шприц (в его блистерной упаковке), описанный в данном документе, может иметь срок годности до 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев или даже дольше. В одном варианте осуществления менее чем один шприц на миллион характеризуется выявляемым присутствием микроорганизмов снаружи от шприца спустя 18 месяцев хранения. В одном аспекте предварительно заполненный шприц был стерилизован с помощью этиленоксида при уровне обеспечения стерильности по меньшей мере 10^{-6}. В другом аспекте предварительно заполненный шприц был стерилизован с помощью пероксида водорода при уровне обеспечения стерильности по меньшей мере 10^{-6}. Значительные количества стерилизующего газа не должны проникать в камеру переменного объема шприца. Термин "значительные количества", используемый в данном документе, означает количество газа, которое может вызвать недопустимую модификацию раствора или суспензии системы доставки лекарственных средств в камере переменного объема. В одном варианте осуществления способ стерилизации обуславливает алкилирование системы доставки лекарственных средств на $\leq$ 10% (предпочтительно $\leq$ 5%, $\leq$ 3%, $\leq$ 1%). В одном варианте осуществления предварительно заполненный шприц был стерилизован с помощью этиленоксида, но наружная поверхность шприца имеет $\leq$ 1 ppm, предпочтительно $\leq$ 0,2 ppm остаточного этиленоксида. В одном варианте осуществления предварительно заполненный шприц был стерилизован с помощью пероксида водорода,

но наружная поверхность шприца имеет ≤ 1 ppm, предпочтительно ≤ 0,2 ppm остаточного пероксида водорода. В другом варианте осуществления предварительно заполненный шприц был стерилизован с помощью этиленоксида, и общее количество остаточного этиленоксида, находящееся снаружи от шприца и внутри блистерной упаковки, составляет ≤ 0,1 мг. В другом варианте осуществления предварительно заполненный шприц был стерилизован с помощью пероксида водорода, и общее количество остаточного пероксида водорода, находящееся снаружи от шприца и внутри блистерной упаковки, составляет ≤ 0,1 мг.

Другой аспект представляет собой набор из частей. Для жидких и суспензионных композиций и в случае, когда устройство для введения представляет собой просто шприц для подкожных инъекций, набор может содержать шприц, иглу и контейнер, содержащий композицию на основе системы доставки лекарственных средств для использования вместе со шприцем. В случае с сухой композицией контейнер может иметь одну камеру, содержащую сухую композицию на основе системы доставки лекарственных средств, и вторую камеру, содержащую раствор для разбавления. В одном варианте осуществления устройство для инъекций представляет собой шприц для подкожных инъекций, приспособленный таким образом, чтобы отдельный контейнер с композицией на основе системы доставки лекарственных средств мог сообщаться с инъекционным устройством так, чтобы при использовании жидкая, или суспензионная, или разбавленная сухая композиция в контейнере находилась в жидкостном соединении с выпускным отверстием устройства для инъекций. Примеры устройств для введения включают без ограничения шприцы для подкожных инъекций и шприцы–ручки. Особенно предпочтительными устройствами для инъекций являются шприцы–ручки, и в этом случае контейнер представляет собой картридж, предпочтительно одноразовый картридж.

Другой вариант осуществления содержит набор, содержащий иглу и контейнер, содержащий композицию на основе системы доставки лекарственных средств и необязательно дополнительно содержащий раствор для разбавления, при этом контейнер приспособлен для использования вместе с иглой. В одном аспекте контейнер представляет собой предварительно заполненный шприц. В другом аспекте контейнер представляет собой двухкамерный шприц.

Другой вариант осуществления представляет собой картридж, содержащий композицию на основе системы доставки лекарственных средств, описанную в данном документе выше, для использования вместе со шприцем–ручкой. Картридж может содержать одну дозу или множество доз системы доставки лекарственных средств.

В другом варианте осуществления раствор или суспензия системы доставки лекарственных средств содержит систему доставки лекарственных средств и одно или несколько вспомогательных веществ, а также другие биологически активные средства в их свободной форме или в виде лекарственных средств либо в комбинации с другими системами доставки лекарственных средств, такими как пегилированные лекарственные средства или лекарственные средства, связанные с гидрогелем. В одном аспекте такие

дополнительные одно или несколько биологически активных средств представляют собой лекарственное средство в свободной форме или вторую систему доставки лекарственных средств.

В другом варианте осуществления одновременно вводят одну или несколько систем доставки лекарственных средств, при этом каждая система доставки лекарственных средств имеет отдельные либо сходные формы биологической активности.

В альтернативном варианте осуществления систему доставки лекарственных средств применяют в комбинации со вторым биологически активным соединением таким образом, что субъекту, нуждающемуся в этом, вначале вводят систему доставки лекарственных средств, а затем вводят второе соединение. В качестве альтернативы, композицию на основе системы доставки лекарственных средств вводят субъекту, нуждающемуся в этом, после того, как тому же субъекту было введено другое соединение.

Другой вариант осуществления представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, представленный формулой (I), для применения в качестве лекарственного препарата.

Другой вариант осуществления представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D–R, представленный формулой (I), для применения в лечении скелетно–мышечного нарушения.

Другой вариант осуществления представляет собой применение системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей D–R, представленный формулой (I), для получения лекарственного препарата для лечения скелетно–мышечных нарушений.

Другой вариант осуществления представляет собой систему доставки лекарственных средств или фармацевтическую композицию для применения в способе лечения или предупреждения заболеваний или нарушений, которые можно лечить с помощью биологически активного компонента, высвобождающегося из системы доставки лекарственных средств.

Другой вариант осуществления представляет собой способ получения композиции на основе системы доставки лекарственных средств в виде раствора или суспензии. В одном варианте осуществления такую композицию получают путем:

(i) смешивания системы доставки лекарственных средств с одним или несколькими вспомогательными веществами;

(ii) переноса количества жидкой или суспензионной композиции, эквивалентного одной или нескольким дозам, в подходящие контейнеры и

(iii) герметизации контейнеров.

Другой вариант осуществления представляет собой способ получения сухой композиции на основе системы доставки лекарственных средств. В одном варианте осуществления такую композицию получают путем:

(i) смешивания системы доставки лекарственных средств с одним или несколькими

вспомогательными веществами;

(ii) переноса количества, эквивалентного одной или нескольким дозам, в подходящие контейнеры;

(iii) высушивания композиции в указанных контейнерах и

(iv) герметизации контейнеров.

Подходящими контейнерами являются флаконы, шприцы, двухкамерные шприцы, ампулы и картриджи.

Другой вариант осуществления представляет собой способ синтеза системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, определенной выше. Системы доставки лекарственных средств или предшественники систем доставки лекарственных средств могут быть получены известными способами или в соответствии с последовательностями реакций, описанными ниже. Исходные материалы, используемые при получении (синтезе) систем доставки лекарственных средств или их предшественников, являются известными или коммерчески доступными или могут быть получены с помощью известных способов или в соответствии с описанным ниже.

Среднему специалисту в соответствующей области техники будет очевидно, что подходящие модификации и адаптации композиций, способов и путей применения, описанных в данном документе, можно осуществлять без отступления от объема каких–либо их вариантов осуществления или аспектов. Представленные композиции и способы являются иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие масштаб какого–либо из указанных вариантов осуществления. Все различные варианты осуществления, аспекты и варианты выбора, раскрытые в данном документе, можно использовать в комбинации во всех возможных видоизменениях или версиях. Объем композиций, составов, способов и процессов, описанных в данном документе, включает все фактические или потенциальные комбинации вариантов осуществления, аспектов, вариантов выбора, примеров и предпочтений, описанных в данном документе.

ПРИМЕРЫ

Сокращения

Ac	ацетил
ACN	ацетонитрил
AcOH	уксусная кислота
Ac_2O	уксусный ангидрид
водн.	водный
атм.	атмосфера
Boc, BOC	третичный бутилкарбокси
Boc–ангидрид	ди–*трет*–бутилдикарбонат
$(Boc)_2O$, $(BOC)_2O$	ди–*трет*–бутилдикарбонат
br.	широкий
BSA	бычий сывороточный альбумин
BuOH	бутанол
CAD	детектор заряженного аэрозоля
расч.	расчетный

Кат., кат.	каталитический
CBZ, Cbz	карбобензилокси
$Cu(OTf)_2$	Трифторметансульфонат меди (II)
d	дублет
dd	дублет дублетов
DCM	дихлорметан
DIAD	диизопропилазодикарбоксилат
DIPEA, DIEA	N, N–диизопропилэтиламин
DMAP	4,4–диметиламинопиридин
DMF	N, N–диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
DOSY–ЯМР	одномерная диффузионно–упорядоченная спектроскопия ЯМР
ECL	электрохемилюминесценция
элем. анал.	элементный анализ
ELSD	испарительный детектор светорассеяния
EDC·HCl	гидрохлорид N–(3–диметиламинопропил)–N'–этилкарбодиимида
ESI	электрораспылительная ионизация
EtOAc, AcOEt	этилацетат
Et	этил
EtOH	этанол
FCC	колоночная флэш–хроматография
FITC	флуоресцеинизотиоцианат
г	граммы
G	калибр
ч	час(ы)
HATU	гексафторфосфат 2–(1H–7–азабензотриазол–1–ил)–1,1,3,3–тетраметилурония–метанаминия
HC	условия для HPLC
HPLC	высокоэффективная жидкостная хроматография
IPA	2–пропанол
IR	инфракрасная спектроскопия
i или iso	изо
IVT, ivt	интравитреальный
K_2CO_3	карбонат калия
кД, кДа	килодальтон
л	литр(ы)
LCMS	жидкостная хроматография с масс–спектрометрией
M	моль/л
МГц	мегагерц
m	мультиплет
Me	метил
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол

MES	2–(N–морфолино)этансульфоновая кислота
мг	миллиграмм(ы)
мкг	микрограмм
мМ	миллимоль/л
мм	миллиметр(ы)
мин	минуты
мл	миллилитр(ы)
ммоль	миллимоли
мкл	микролитр
мкмоль	микромоли
MOPS	3–(N–морфолино)пропансульфоновая кислота
MS	масс–спектрометрия
MsCl	метансульфонилхлорид
MsOH	метансульфоновая кислота
MWCO	порог отсечения по молекулярной массе
масса/заряд	соотношение массы и заряда
н.	нормальный
NA	нет данных
$NaBH_4$	борогидрид натрия
$NaBH_3CN$	цианоборогидрид натрия
$Na(AcO)_3BH$	триацетоксиборогидрид натрия
нг	нанограмм
NH_4Cl	хлорид аммония
NHS	N–гидроксисукцинимид
нМ	наномоль/л
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
OMe	метокси
PBS	фосфатно–солевой буферный раствор
1× PBS	фосфатно–солевой буферный раствор, как правило, приблизительно 10 мМ PO_4^{3-}
Pd/C	палладий на угле
$Pd(dppf)Cl_2$	дихлорид 1,1′–бис(дифенилфосфино)ферроценпалладия (II)
аддукт $Pd(dppf)Cl_2•CH_2Cl_2$	комплекс дихлорид 1,1′–бис(дифенилфосфино)ферроценпалладия(II)/дихлорметан
$Pd(PPh_3)_4$	тетракис(трифенилфосфин)палладий (0)
Ph	фенил
ppm	частей на миллион
фунт/кв. дюйм	фунты на квадратный дюйм
рац.	рацемическая смесь
rcf	центробежное ускорение
RP	обращенно–фазовый
к. т., КТ	комнатная температура
s	синглет
насыщ.	насыщенный

SDS–PAGE	электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия
SEC	эксклюзионная хроматография
SFC	сверхкритическая флюидная хроматография
t	триплет
t–Bu, tBu	третичный бутил
$t_{½}$	период полувыведения
t_r или вр. удерж.	время удерживания
TBAF	фторид тетра–*н*–бутиламмония
TBSCl, TBDMSCl	*трет*–бутилдиметилсилилхлорид
TEA, Et_3N, NEt3	триэтиламин
трет–	третичный
TFA	трифторуксусная кислота
Tf_2O	трифторметансульфоновый ангидрид
THF	тетрагидрофуран
TLC	тонкослойная хроматография
TMS	триметилсилил
TMSOTf	триметилсилилтрифторметансульфонат
Трис	*трис*(гидроксиметил)аминометан
Triton X–100	трет–октилфеноксиполиэтоксиэтанол (CAS 9002–93–1)
Ts	*п*–толуолсульфонил
TsOH	*п*–толуолсульфоновая кислота
Tween 20	полисорбат 20, полиоксиэтилен–(20)–сорбитанмонолаурат
UPLC	сверхэффективная жидкостная хроматография
UV	ультрафиолетовый
VEGF	*фактор роста эндотелия сосудов*
об./об.	объем к объему
вес/об.	вес к объему
вес/вес	вес к весу

Следующие лекарственные средства, описанные в этих примерах, сокращенно обозначаются так:

D1: бролуцизумаб (SEQ ID NO:4);

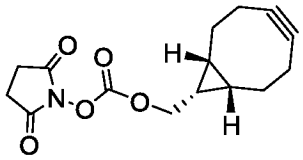
D2: (SEQ ID NO:5);

D3: (SEQ ID NO:6) и

D4: (SEQ ID NO:7).

Способы

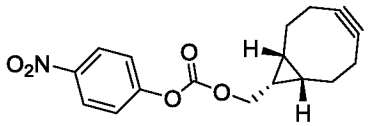
Синтез



((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метил(2,5–диоксопирролидин–1–

ил)карбоната, используемого в некоторых следующих примерах, был описан в A. M. Jawalekar, et al; Molecules, **2013**, 18, 7346–7363.

Синтез



((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метил(4–нитрофенил)карбоната, используемого в некоторых следующих примерах, был описан в J. Dommerholt, et al; Angew. Chem. Int. Ed. **2010**, 49, 9422–9425.

Все другие промежуточные соединения и реагенты, конкретно не описанные как синтезированные в данном документе, являются коммерчески доступными и использовались в том виде, в котором были доставлены.

Способы LCMS

Способ 1

Колонка SunFire C18, 3,5 мкм, 3,0 × 30 мм; температура колонки 40°C; скорость потока 2,0 мл/мин; время остановки 2,20 мин; pH 2,2; элюент A1 0,05% TFA в воде; элюент B1 ацетонитрил; время градиентного элюирования (мин)/%A (элюент A1): %B (элюент B1): 0,00/95: 5; 1,70/5: 95; 2,00/5:95; 2,10/95: 5.

Способ 2

Колонка AcQuity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1 × 30 мм; температура колонки 50°C; скорость потока 1,0 мл/мин; время остановки 2,00 мин; pH 2,6; элюент A1 0,1% муравьиная кислота в воде; элюент B1 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле; время градиентного элюирования (мин)/%A (элюент A1): %B (элюент B1)

0,00/98: 2; 0,10/98:2; 1,50/2: 98; 1,80/2: 98; 1,90/98: 2; 2,00/98:2.

Способ 3

Колонка: Kinetex C18 100A, 2,6 мкм (100 × 4,6 мм); подвижная фаза A (0,1% муравьиная кислота в воде), B (ацетонитрил); градиент (время (мин)/%B): 0/5, 1/30, 3/95, 4/95, 4,1/5, 6/5.

Способ 4

Колонка: AcQuity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1 × 30 мм; температура колонки 50°C; скорость потока 1,0 мл/мин; время остановки: 2,00 мин; pH 2,6; элюент A1 0,1% муравьиная кислота в воде; элюент B1 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле; время градиентного элюирования (мин)/%A (элюент A1): %B (элюент B1); 0,00/98: 2; 0,10/98:2; 1,50/2: 98; 1,80/2: 98; 1,90/98: 2; 2,00/98:2.

Способ 5

Колонка: SunFire C18, 3,5 мкм, 3,0 × 30 мм; температура колонки 40°C; скорость потока 2,0 мл/мин; время остановки 2,20 мин; pH 2,2; элюент A1 5 мМ гидроксида аммония в воде; элюент B1 ацетонитрил; время градиентного элюирования (мин)/%A (элюент A1): %B (элюент B1): 0,00/95:5; 1,70/5: 95; 2,00/5: 95; 2,10/95: 5.

Способ 6

Колонка: Kinetex C18 100A, 2,6 мкм (100 × 4,60 мм); градиент/(время (мин)/%B) 0/5, 1/30, 3/95, 4/95, 4,1/5, 6/5; подвижная фаза: 0,1% муравьиная кислота в воде (A)/ацетонитрил (B); скорость потока: 1,4 мл/мин; температура колонки: 40°C.

Способ 7

Колонка: Synergi MAX–RP 100A Mercury, 2,5 мкм (100 × 4,6 мм); подвижная фаза A (0,1% муравьиная кислота в воде), B (ацетонитрил); градиент (время (мин)/%B): 0/30, 0,5/30, 1,5/95, 2,4/95, 2,5/30, 3,0/30.

Способ 8

Колонка: Kinetex C18 100A, 2,6 мкм (100 × 4,6 мм); подвижная фаза A (0,1% муравьиная кислота в воде), B (ацетонитрил); градиент (время (мин)/%B): 0/50, 1/70, 2/100, 4/100, 4,1/50, 6/50. Данные ESI–MS регистрировали с помощью Acquity G2 Xevo–QTOF–MS. Масс–спектр положительных ионов подвергали деконволюции с помощью программы MaxEnt 1 из пакета программного обеспечения MassLynx.

Способ 9

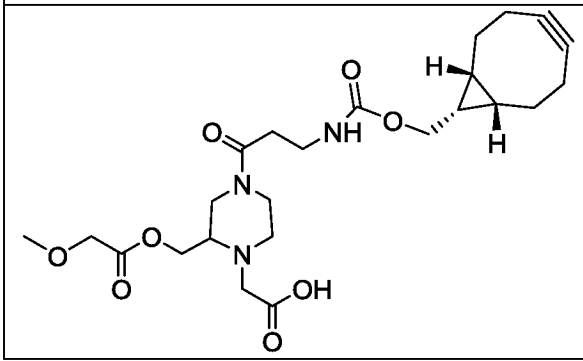
Колонка: ProSwift Monolith (4,6×50 мм); подвижная фаза A (0,1% муравьиная кислота в воде), B (0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле); градиент (время (мин)/%B): 0/2, 0,7/2, 2/98, 2,1/98, 2,3/2, 3,3/2. Данные ESI–MS регистрировали с помощью Acquity G2 Xevo–QTOF–MS. Масс–спектр положительных ионов подвергали деконволюции с помощью программы MaxEnt 1 из пакета программного обеспечения MassLynx. Представляли значения соотношения *масса/заряд* после деконволюции для $(M+H)^+$.

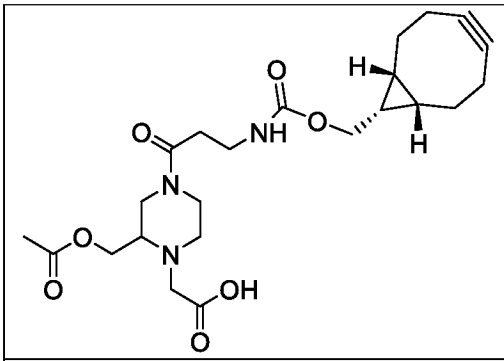
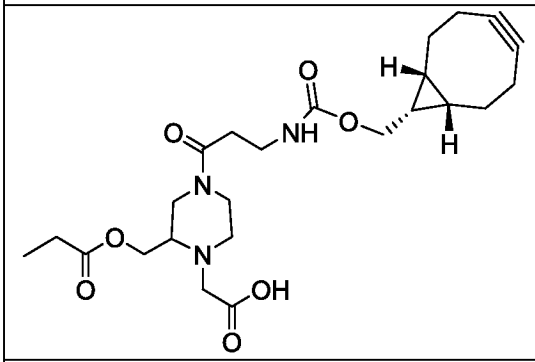
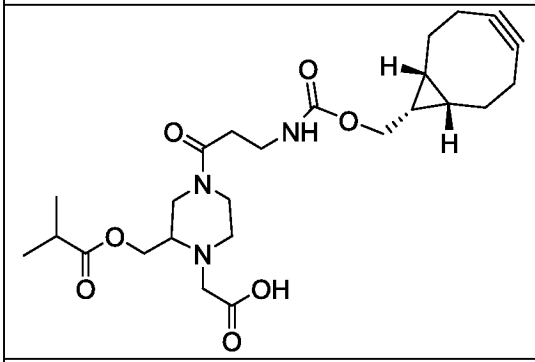
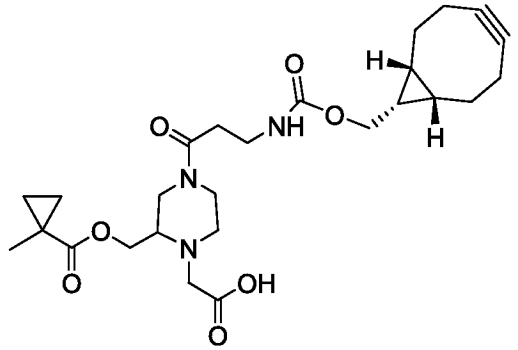
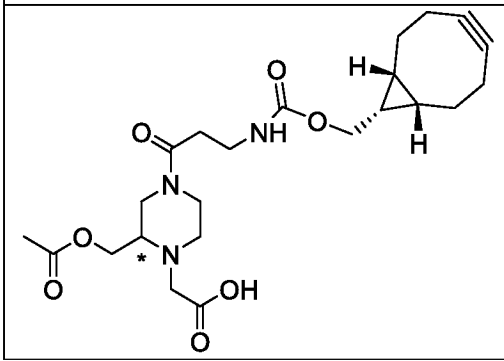
Пример 1

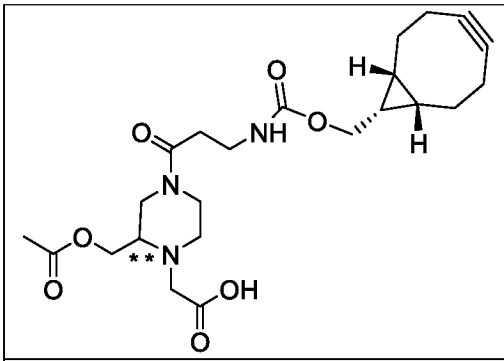
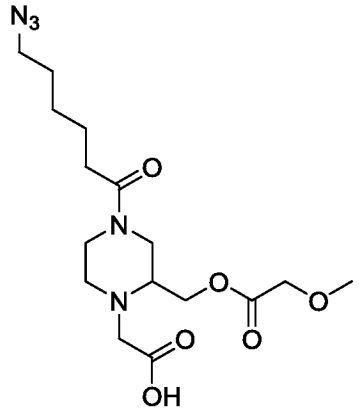
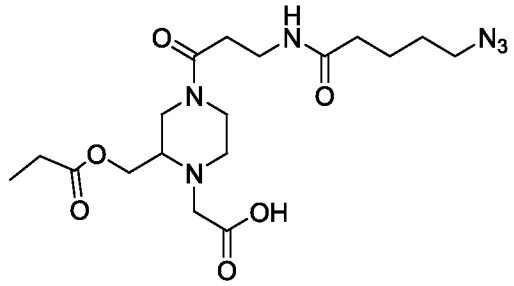
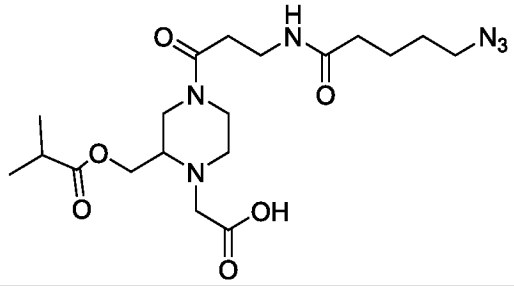
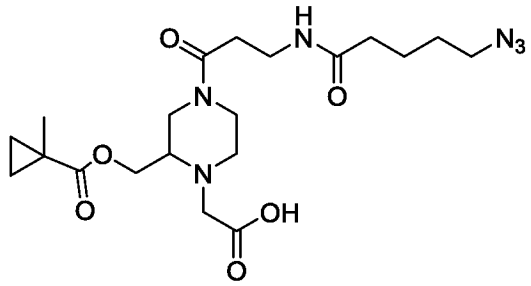
Бесследные линкеры

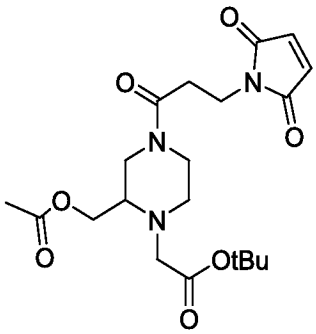
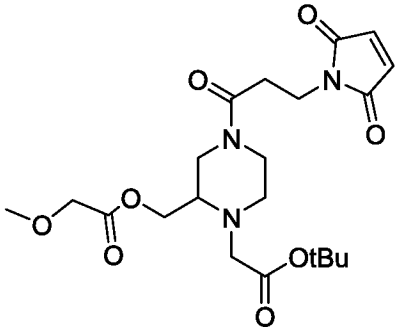
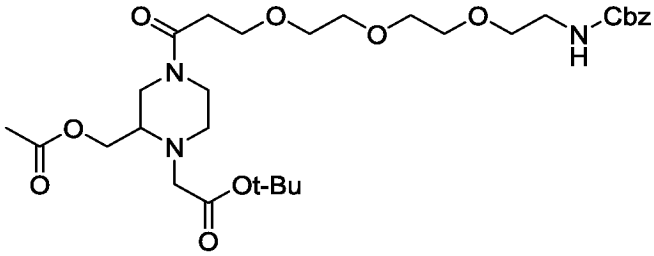
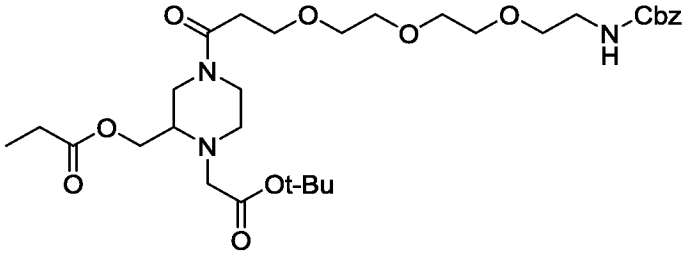
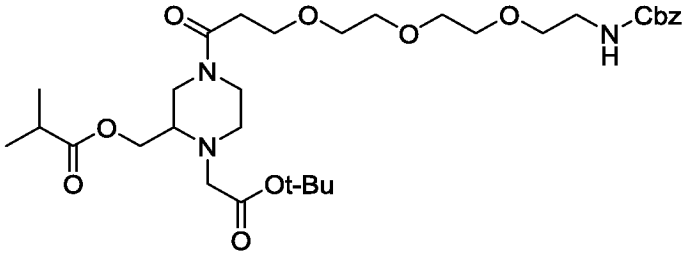
В данном примере описан синтез ряда бесследных линкеров, которые могут быть конъюгированы как с аминосодержащим лекарственным средством, так и с носителем.

Таблица 6. Бесследные линкеры L1–L11 и промежуточные соединения в синтезе бесследных линкеров L12–L16

Структура	Номер
	**L1**

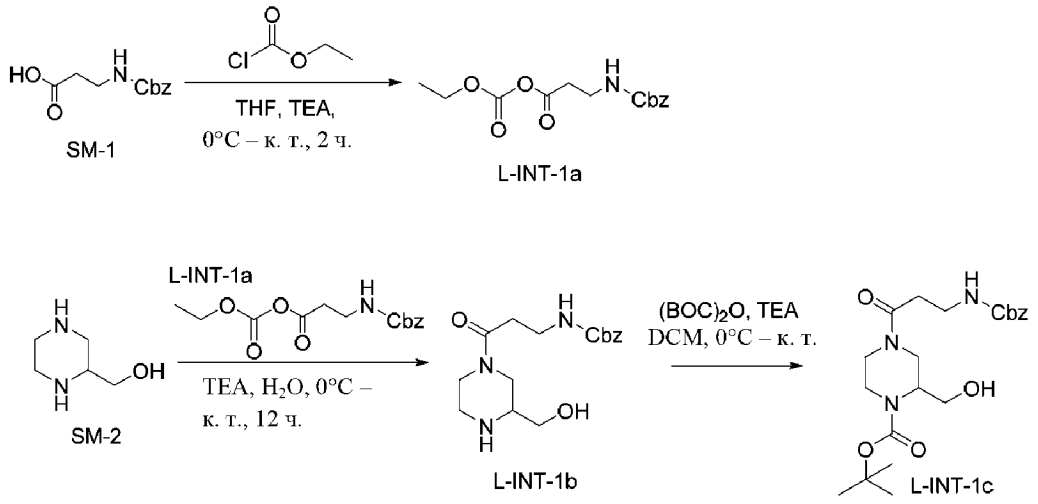
	**L2**
	**L3**
	**L4**
	**L5**
	**L6**

	**L7**
	**L8**
	**L9**
	**L10**
	**L11**

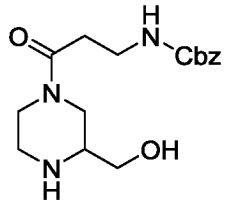
	**L12**
	**L13**
	**L14**
	**L15**
	**L16**

Синтез бесследных линкеров

Общее промежуточное соединение: L–INT–1c

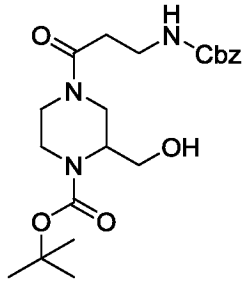


L–INT–1b. 1–(N–Cbz–бета–аланил)–3–(гидроксиметил)пиперазин



К раствору коммерчески доступного N–Cbz–бета–аланина (SM–1, 2,5 г, 11,2 ммоль) в тетрагидрофуране (30 мл) при 0°C добавляли триэтиламин (1,13 г, 11,2 ммоль) и этилхлорформиат (1,21 г, 11,2 ммоль). Раствор перемешивали в течение 2 ч. при 0°C для обеспечения образования in situ N–Cbz–бета–аланинпропионового ангидрида (**L–INT–1a**). Данную реакционную смесь добавляли к раствору 2–(гидроксиметил)пиперазина (SM–2, 1,95 г, 16,8 ммоль) и триэтиламина (1,13 г, 11,2 ммоль) в воде (30 мл), и полученную смесь перемешивали в течение 12 ч. при комнатной температуре. Раствор подщелачивали с помощью раствора карбоната натрия (2 М, 1 мл). Добавляли рассол (2 мл), и водную фазу концентрировали с получением неочищенного твердого вещества. В результате очистки посредством колоночной хроматографии (щелочной оксид алюминия, элюировали с помощью 3–15% метанола в дихлорметане) получали **L–INT–1b**. MS (ESI+) *масса/заряд* 322,2 (M+H).

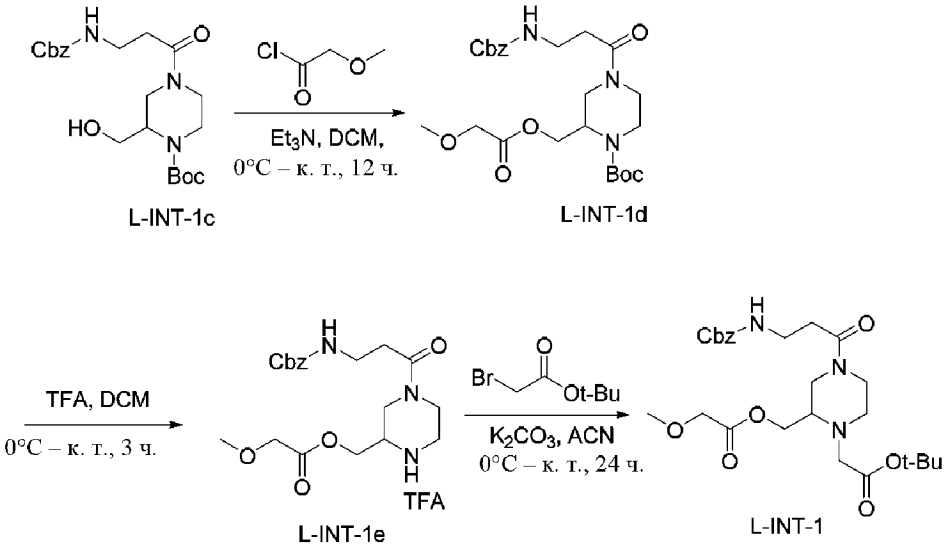
L–INT–1c. 1–(Boc)–2–(гидроксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)пиперазин



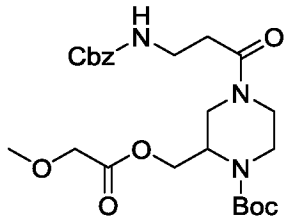
К раствору **L–INT–1b** (1 г, 3,1 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при 0°C добавляли триэтиламин (0,504 г, 4,98 ммоль) и ди–трет–бутилдикарбонат (611 мг, 2,8 ммоль).

Раствор перемешивали в течение 2 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном. Органический слой высушивали (над сульфатом натрия) и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, элюировали с помощью смеси метанол:дихлорметан 2:98) получали **L–INT–1c**. MS (ESI+) *масса/заряд* 422,2 (M+H).

Промежуточное соединение в синтезе линкеров L–INT–1.

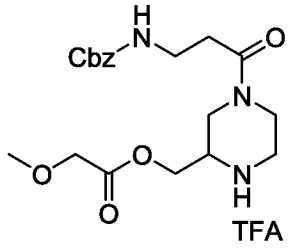


L–INT–1d. 1–(Boc)–2–(2'–метоксиацетоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)пиперазин



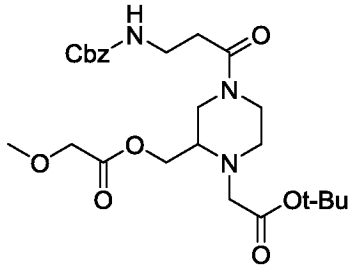
К раствору **L–INT–1c** (1 г, 2,37 ммоль) в дихлорметане (15 мл) при 0°C добавляли триэтиламин (0,60 г, 5,93 ммоль). Затем по каплям добавляли метоксиацетилхлорид (307 мг, 2,85 ммоль), и раствор перемешивали в течение 12 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном. Органический слой высушивали (над сульфатом натрия) и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, элюировали с помощью 1–2% метанола в дихлорметане) получали **L–INT–1d**. MS (ESI+) *масса/заряд* 494,2(M+H).

L–INT–1e. 1–(N–Cbz–бета–аланил)–3–(2'–метоксиацетоксиметил)пиперазин в форме соли трифторуксусной кислоты



К раствору **L–INT–1d** (1 г, 2,02 ммоль) в дихлорметане (26 мл) при 0°C добавляли трифторуксусную кислоту (7 мл). Раствор перемешивали в течение 3 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали, промывали с помощью пентана и высушивали под высоким вакуумом с получением соли трифторуксусной кислоты **L–INT–1e**. MS (ESI+) *масса/заряд* 394 (M+H).

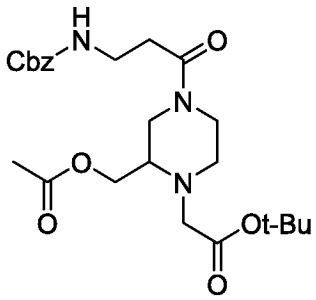
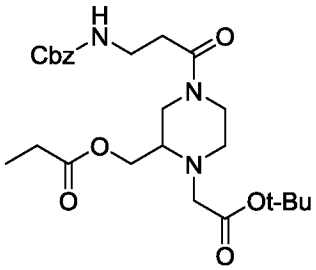
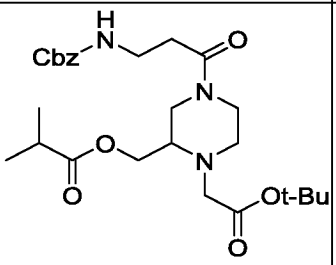
L–INT–1. Трет–бутиловый сложный эфир 2–(2'–метоксиацетоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты



К смеси **L–INT–1e** (1,0 г, 2,54 ммоль) и карбоната калия (1,05 г, 7,63 ммоль) в ацетонитриле (25 мл) при 0°C по каплям добавляли трет–бутилбромацетат (0,744 г, 3,82 ммоль). Раствор перемешивали в течение 24 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушивали (над сульфатом натрия) и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, элюировали с помощью 1–2% метанола в дихлорметане) получали **L–INT–1** в виде бесцветного липкого твердого вещества. LCMS (способ 8): время удерживания=3,43 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 508,3 (M+H). ^{1}H ЯМР (400 МГц, CDCl3) 7,35–7,28 (m, 5H), 5,58–5,52 (m, 1H), 5,08 (s, 2H), 4,38–4,22 (m, 1H), 4,20–4,08 (m, 1H), 4,10–4,00 (m, 3H), 4,00–3,90(m, 1H), 3,70–3,60 (m, 1H), 3,60–3,54 (m, 1H), 3,50–3,49 (d, J=4, 4H), 3,45 (s, 3H), 3,42–3,38 (m, 1H), 3,33 (s,1H), 3,32–3,29 (m,1H), 3,28–3,20 (m, 1H), 3,18–3,10 (m, 1H), 3,10–3,00 (m, 1H), 2,86–2,72 (m, 2H), 2,53–2,51 (t, J=4, 2H) ,1,46(s, 9H).

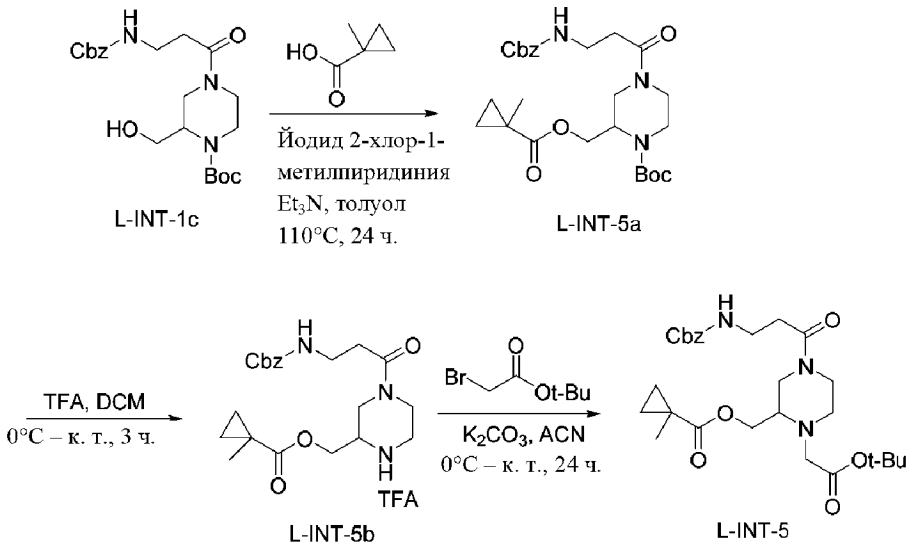
Соединения, показанные в **таблице 7**, получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **L–INT–1**.

Таблица 7. Иллюстративные бесследные линкерные соединения			
Структура, название	**Номер**	**LCMS: [M+H]; время удерживания; способ**	**^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$)**

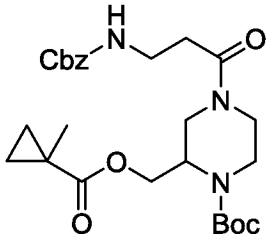
 Трет–бутиловый сложный эфир 2–(ацетоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты	**L–INT–2**	478,3; 3,46 мин; 8	7,35–7,31 (m, 5H), 5,56–5,55 (m, 1H), 5,08 (s, 2H), 4,28–4,10(m, 2H), 4,10–3,92(m, 2H), 3,68–3,55(m, 1H), 3,48(s, 3H), 3,46–3,42(m, 1H), 3,41–3,40(d, J=4, 1H),3,33–3,28 (m, 2H), 3,28–3,15(m, 1H), 3,10–2,98(m, 2H), 2,88–2,76(m, 2H), 2,53–2,51(t, J=4, 2H), 2,09–2,07(d, J=8, 3H), 1,45(s, 9H)
 Трет–бутиловый сложный эфир 2–(пропаноилоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты	**L–INT–3**	492,3; 3,61 мин; 8	7,35–7,26 (m, 5H), 5,56–5,55 (m, 1H), 5,08 (s, 2H), 4,28–3,94 (m, 4H), 3,52–3,39 (m, 4H), 3,34–3,20 (m, 3H), 3,12–2,94 (m, 2H), 2,81–2,76 (m, 2H), 2,53–2,50 (m, 2H), 2,38–2,33(m, 2H), 1,45(s, 9H) ,1,17–1,12 (m, 3H).
 Трет–бутиловый сложный эфир 2–(изобутаноилоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)–1–	**L–INT–4**	506,3; 3,80 мин; 8	7,35–7,30 (m, 5H), 5,57–5,54 (t, J=4, 1H), 5,08 (s, 2H), 4,26–3,93 (m, 3H), 3,64–3,48 (m, 3H), 3,43–3,19 (m, 4H), 3,09–2,99 (m, 2H), 2,80–2,76 (m, 2H), 2,75–2,51 (m, 3H), 1,45(s, 9H) ,1,18–1,16 (d, J=4, 6H)

пиперазинуксусной кислоты			

L–INT–5. Трет–бутиловый сложный эфир 2–(1'–метилциклопропилкарбонилоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты

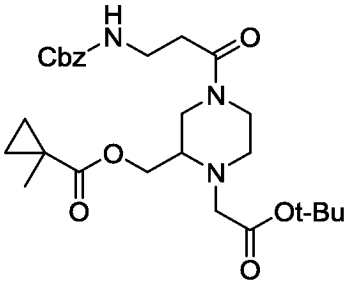


L–INT–5a. 1–(Boc)–2–(1'–метилциклопропилкарбонилоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)пиперазин



К раствору **L–INT–1c** (1,0 г, 2,37 ммоль), 1–метилциклопропанкарбоновой кислоты (0,475 г, 4,75 ммоль) и йодида 2–хлор–1–метилпиридиния (1,21 г, 4,75 ммоль) в толуоле (20 мл) добавляли триэтиламин (5,0 мл), и полученную реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч. при 110°C. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу промывали рассолом, высушивали (над сульфатом натрия) и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, элюировали с помощью 1–2% метанола в дихлорметане) получали **L–INT–5a**. MS (ESI+) *масса/заряд* 504,2 (M+H).

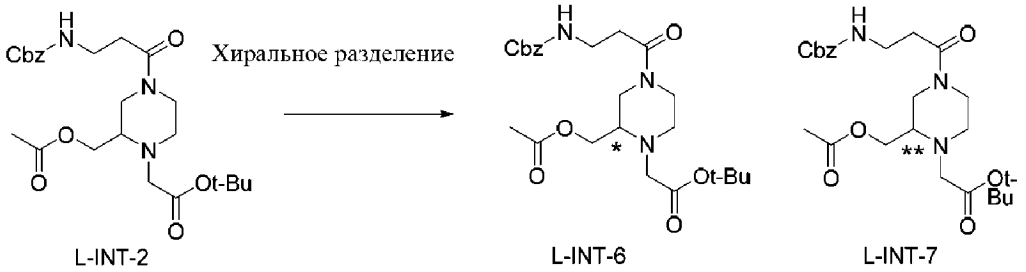
L–INT–5. Трет–бутиловый сложный эфир 2–(1'–метилциклопропилкарбонилоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)–1–



пиперазинуксусной кислоты

L–INT–5 получали в две стадии из L–INT–5a, следуя общим способам, описанным для синтеза L–INT–1e и L–INT–1. **L–INT–5**: LCMS (способ 8): время удерживания=3,84 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 518,3 ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) 7,35–7,30 (m, 5H), 5,5 (s 1H), 5,08 (s, 2H), 4,28–4,12 (m, 2H), 4,06–3,88(m, 2H), 3,67–3,49(m, 3H), 3,41–3,28 (m, 3H), 3,26–3,17 (m, 1H), 3,12–3,05 (m,1H), 3,03–2,90 (m, 1H), 2,78–2,74(m, 2H), 2,53–2,50(t, J=8, 2H), 1,45(s, 9H), 1,29(s, 3H), 1,25–1,20(m, 2H), 0,73–0,68(m, 2H).

L–INT–6 и L–INT–7. Хиральное разделение изомеров трет–бутилового сложного эфира 2–(ацетоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты



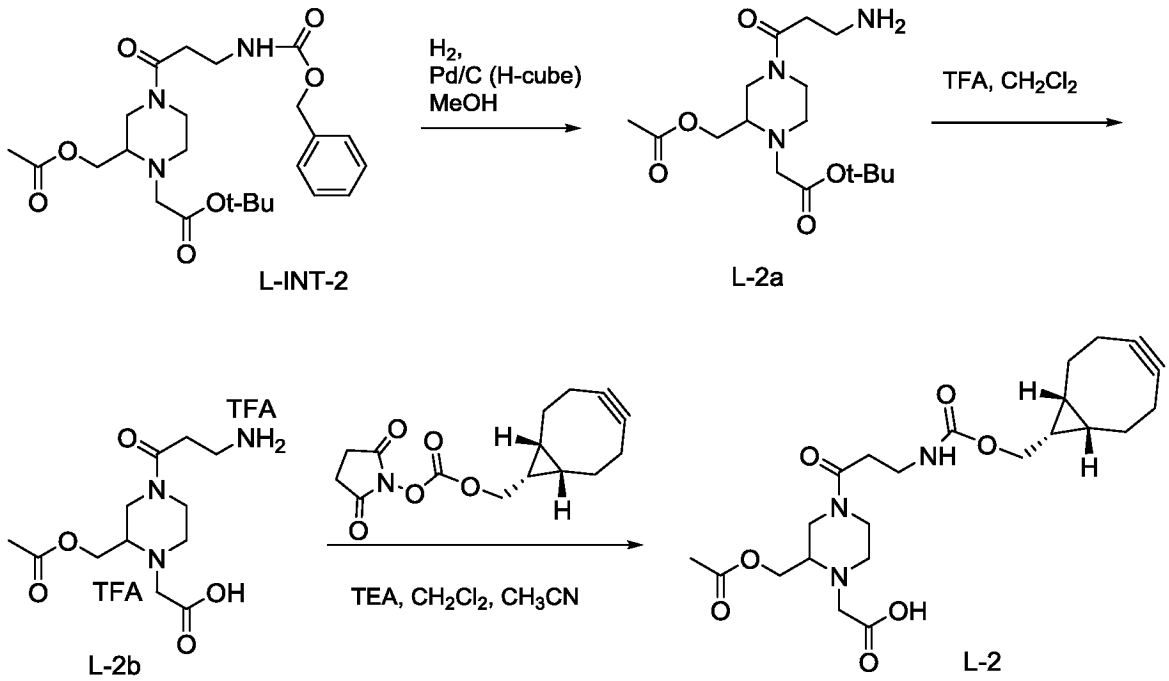
Отдельные энантиомеры **L–INT–2** выделяли посредством очистки **L–INT–2** с помощью препаративной хиральной HPLC (колонка Phenomenex Lux Amylose–2, 5 мкм, 250 мм × 21,2 мм), элюируя с помощью 20 мл/мин подвижной фазы следующего состава (изократический режим): 55% н–гексана, 45% смеси этанол:изопропанол 70:30 с 0,1% диэтиламина. Фракции, содержащие продукт, выпаривали, растворяли в хлороформе, промывали с помощью воды, высушивали (над сульфатом натрия) и выпаривали с получением стереоизомеров **L–INT–6** и **L–INT–7**.

L–INT–6: LCMS (способ 8): время удерживания=1,93 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 478,3(M+H). Хиральная HPLC (способ, описанный ниже): время удерживания=8,018 мин; 98,3% чистота).

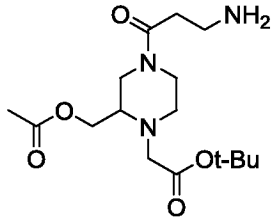
L–INT–7: LCMS (способ 8): время удерживания=1,92 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 478,3(M+H). Хиральная HPLC (способ, описанный ниже): время удерживания=9,694 мин; 94,4% чистота).

Способ хиральной HPLC: колонка: Phenomenex Lux Amylose–2, 5 мкм, 250 мм × 4,60 мм; температура колонки 25°C; скорость потока 1,0 мл/мин; подвижная фаза: A=гексан, B=этанол:метанол 1:1; элюирование: изократический режим 30:70 A:B.

Бесследные линкеры L1–L7

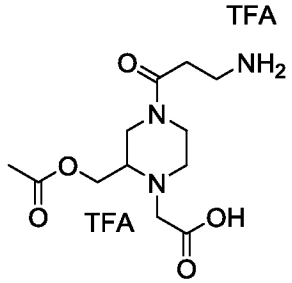


L–2a. Трет–бутиловый сложный эфир 2–(ацетоксиметил)–4–(бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты



L–INT–2 (185,5 мг, 0,39 ммоль) растворяли в метаноле (12 мл) и подвергали гидрогенолизу в потоке (картридж с палладием на угле, 5 атм. H_2, 35°C, 1 ч. при скорости потока 1 мл/мин). Раствор выпаривали с получением титульного соединения **L–2a**. LCMS (способ 1): время удерживания=0,72 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 344,1 (M+H).

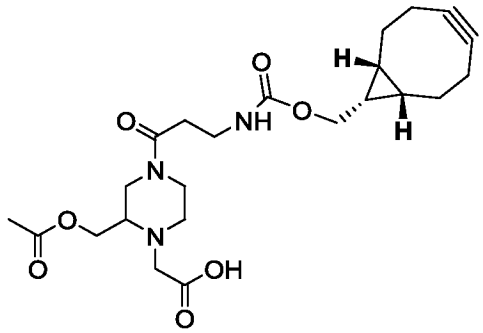
L–2b: 2–(ацетоксиметил)–4–(бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота в форме соли бис–трифторуксусной кислоты



L–2a (123,2 мг, 0,36 ммоль) растворяли в дихлорметане (5 мл) и трифторуксусной кислоте (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем выпаривали с получением неочищенного титульного материала (**L–2b**). LCMS (способ 1): время удерживания=0,10 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 288,0 (M+H).

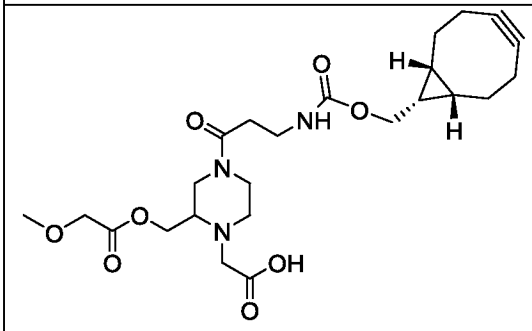
L2. 2–(ацетоксиметил)–4–(N–(((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–

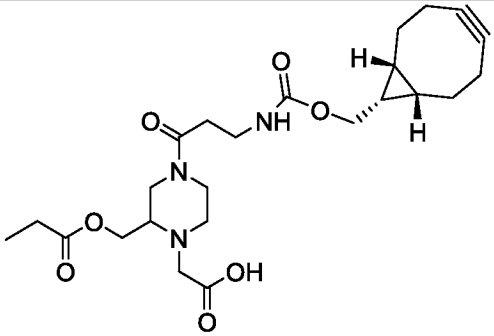
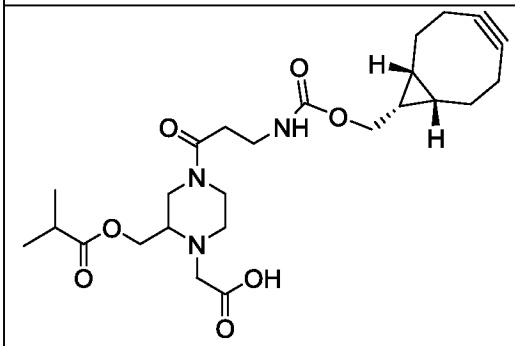
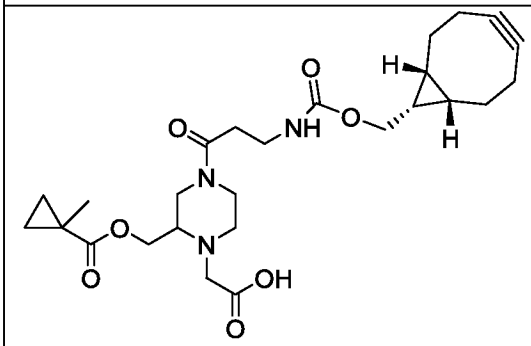
ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота

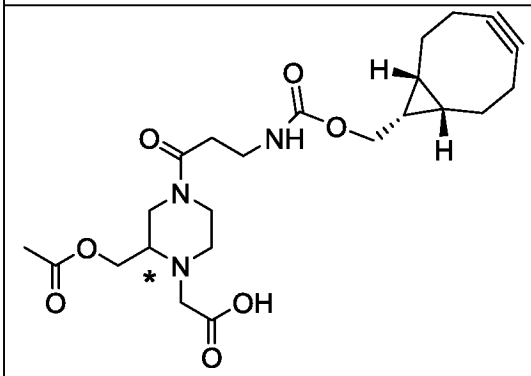
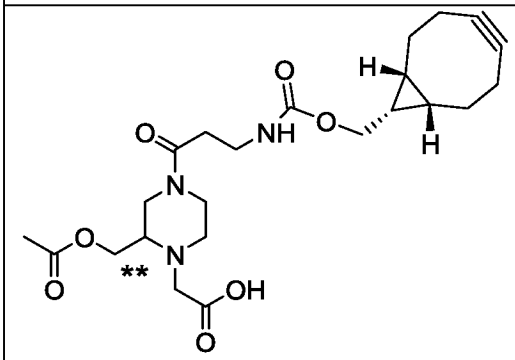


Неочищенное соединение **L–2b** (163 мг, 0,57 ммоль) поглощали в дихлорметане и ацетонитриле с получением слегка мутной смеси. Добавление триэтиламина (0,40 мл, 2,84 ммоль) и ((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метил(2,5–диоксопирролидин–1–ил)карбоната (182 мг, 0,63 ммоль) приводило к получению раствора, который выпаривали спустя 0,5 ч. Неочищенный материал растворяли в 6 мл смеси ацетонитрил:вода 3:1 и очищали с помощью HPLC (колонка: Waters XBridge BEH, 5 мкм, 19 × 150 мм; способ: градиент 15–30% ацетонитрила в течение 10 мин (с 10 мМ гидроксида аммония) в воде, 30 мл/мин). Фракции выпаривали, подвергали быстрому замораживанию и лиофилизировали с получением **L2**. LCMS (способ 1): время удерживания=0,97 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 464,1 (M+H). ^{1}H–ЯМР (CD_3OD, ppm) (образец содержит остаточные следовые количества триэтиламина): 4,17 (m, 4H); 4,00 (m, 1H), 3,75 (m, 1H), 3,5–3,32 (m, 5H), 3,06 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,79 (m, 1H), 2,60 (t, 2H), 2,19 (m, 6H), 2,05 (m, 3H), 1,59 (m, 2H), 1,38 (m, 1H), 0,96 (m, 2H).

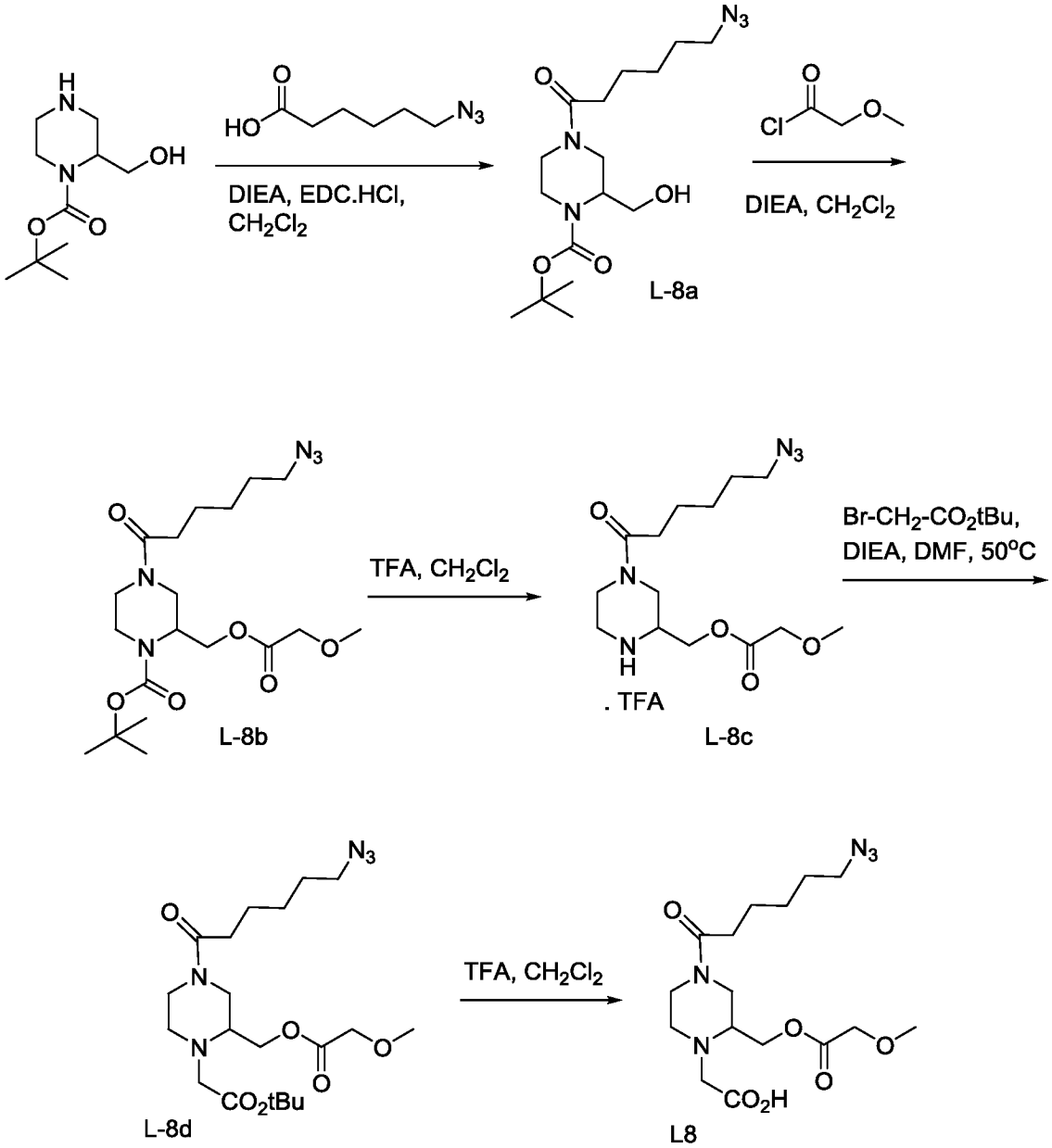
Соединения, показанные в таблице 8, получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза L2.

Таблица 8. Иллюстративные бесследные линкерные соединения			
Структура	**Номер (исходное промежуточное соединение)**	**LCMS: [M+H]; время удерживания; способ**	**^{1}H–ЯМР (400 МГц, CD_3OD)**
 2–(2'–метоксиацетоксиметил)–4–(N–	**L1 (L–INT–1)**	494,1; 0,98 мин; 1	4,25 (m, 2H); 4,14 (m, 4H); 4,0–3,44 (m, 5H), 3,42 (s, 3H), 3,3–3,1 (m, 2H), 2,96 (m, 1H), 2,83 (m, 1H), 2,69 (m, 1H), 2,62 (m, 2H), 2,21 (m, 6H), 1,61 (m, 2H),

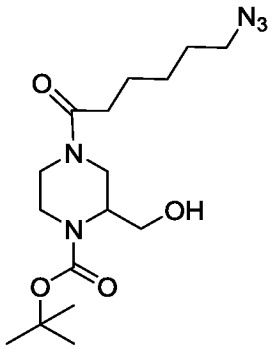
(((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота			1,37 (m, 1H), 0,93 (m, 2H)
 2–(пропаноилоксиметил)–4–(N–(((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота	**L3 (L–INT–3)**	478,2; 1,03 мин; 1	4,17 (m, 3H); 3,99 (dd, 1H), 3,76 (dd, 1H), 3,47 (m, 2H), 3,37 (M, 2H), 3,06 (dd, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,79 (m, 1H), 2,60 (t, 2H), 2,36 (m, 2H), 2,19 (m, 6H), 1,59 (m, 2H), 1,38 (m, 1H), 1,12 (t, 3H), 0,96 (m, 2H)
 2–(изобутаноилоксиметил)–4–(N–(((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота	**L4 (L–INT–4)**	492,7; 0,82 мин; 2	4,17 (m, 3H); 3,99 (dd, 1H), 3,76 (dd, 1H), 3,41 (m, 4H), 3,06 (dd, 1H), 2,90 (m, 1H), 2,79 (m, 1H), 2,58 (m, 3H), 2,19 (m, 6H), 1,60 (m, 2H), 1,37 (m, 1H), 1,16 (d, 6H), 0,96 (t, 2H)
 2–(1'–	**L5 (L–INT–5)**	504,2; 1,09 мин; 1	4,16 (m, 4H); 3,99 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,5–3,35 (m, 5H), 3,06 (m, 1H), 2,93 (m, 1H), 2,88 (dt, 1H), 2,77 (m, 1H), 2,61 (m, 2H), 2,19 (m, 6H), 1,60 (m, 2H), 1,38 (m, 1H), 1,29 (s, 3H),

метилциклопропилкарбонилоксиметил)–4–(N–(((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота			1,22 (d, 2H), 0,93 (t, 2H), 0,73 (dq, 2H)
 Изомер 1. 2–(ацетоксиметил)–4–(N–(((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота	**L6 (L–INT–6)**	464,2; 0,95 мин; 1	Используется в неочищенном виде, без ЯМР
 Изомер 2. 2–(ацетоксиметил)–4–(N–(((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота	**L7 (L–INT–7)**	464,2; 0,96 мин; 1	Используется в неочищенном виде, без ЯМР

Бесследный линкер L8. 2–(2’–метоксиацетоксиметил)–4–(6’–азидогексаноил)–1–пиперазинуксусная кислота



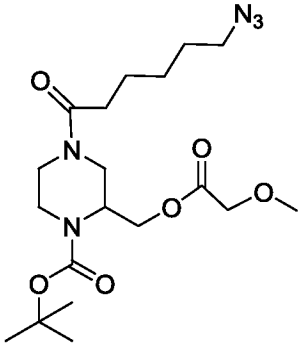
L–8a. 1–(Boc)–2–(гидроксиметил)–4–(6'–азидогексаноил)пиперазин



6–азидогексановую кислоту (743 мг, 4,73 ммоль) и гидрохлорид N–(3–диметиламинопропил)–N'–этилкарбодиимида (1,0 г, 5,22 ммоль) отвешивали в круглодонную колбу и растворяли в дихлорметане (20 мл). Через 5 мин добавляли твердый трет–бутил 2–(гидроксиметил)пиперазин–1–карбоксилат (0,98 г, 4,53 ммоль) и диизопропилэтиламин (1,0 мл, 5,73 ммоль), и раствор хранили при комнатной

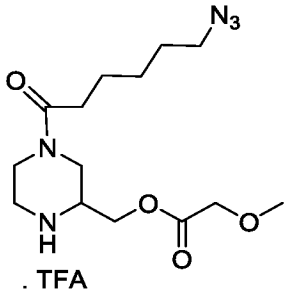
температуре в течение ночи. На следующий день реакционную смесь разбавляли с помощью 100 мл дихлорметана и промывали с помощью 1 M HCl (2 × 50 мл), 1 M NaOH (1 × 50 мл) и рассола (1 × 50 мл). Органическую фазу концентрировали с получением **L–8a**. MS (ESI+) *масса/заряд* 356,3 (M+H).

L–8b. 1–(Boc)–2–(2'–метоксиацетоксиметил)–4–(6''–азидогексаноил)пиперазин



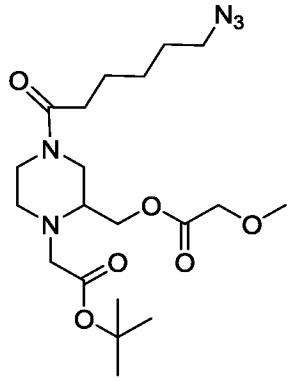
L–8a (959 мг, 2,70 ммоль) растворяли в дихлорметане (12 мл) в круглодонной колбе. Добавляли магнитный мешальник и диизопропилэтиламин (1 мл, 5,73 ммоль), затем добавляли 2–метоксиацетилхлорид (0,32 мл, 3,51 ммоль), и колбу закупоривали. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 6 ч. дополнительно добавляли 100 мкл 2–метоксиацетилхлорида. Через 30 мин реакционную смесь разбавляли с помощью 90 мл этилацетата и промывали с помощью 1 M HCl (2 × 25 мл) и рассола (1 × 20 мл). Органическую фазу концентрировали с помощью роторного испарителя. Продукт очищали с помощью колоночной флэш–хроматографии на диоксиде кремния с градиентом этилацетат:гептаны. Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали с получением **L–8b**. MS (ESI+) *масса/заряд*=428,3 (M+H).

L–8c. 1–(6'–Азидогексаноил)–3–(2''–метоксиацетоксиметил)пиперазин в форме соли трифторуксусной кислоты



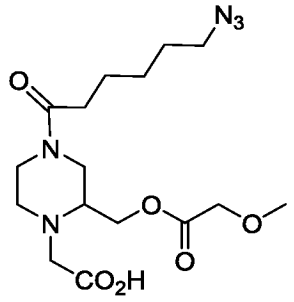
L–8b (846 мг, 1,979 ммоль) растворяли в трифторуксусной кислоте (10 мл, 130 ммоль) и дихлорметане (10 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре. Через 1 ч. растворители удаляли с помощью ротационного испарителя, и продукт высушивали под вакуумом с получением **L–8c**. MS (ESI+) *масса/заряд* 328,2 (M+H).

L–8d. Трет–бутиловый сложный эфир 2–(2'–метоксиацетоксиметил)–4–(6''–азидогексаноил)–1–пиперазинуксусной кислоты



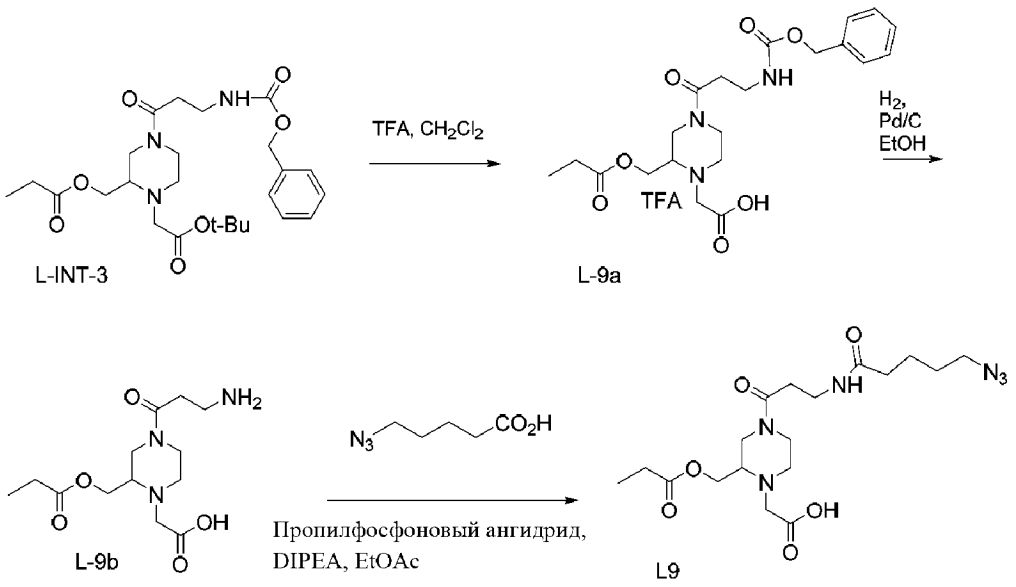
L–8c (439 мг, 0,994 ммоль) растворяли в диметилформамиде (5 мл) в стеклянном флаконе с магнитным мешальником. Добавляли трет–бутилбромацетат (0,220 мл, 1,491 ммоль) и диизопропилэтиламин (0,868 мл, 4,97 ммоль), и флакон закупоривали. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение ночи. На следующий день реакционную смесь удаляли от источника тепла и хранили при −20°C до очистки на следующий день. Реакционную смесь очищали без экстракционной обработки с помощью колоночной флэш–хроматографии на диоксиде кремния с градиентом гептан:этилацетат. Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали с получением **L–8d**. MS (ESI–) *масса/заряд*=486,5 (M+формиат).

L8. 2–(2'–метоксиацетоксиметил)–4–(6''–азидогексаноил)–1–пиперазинуксусная кислота

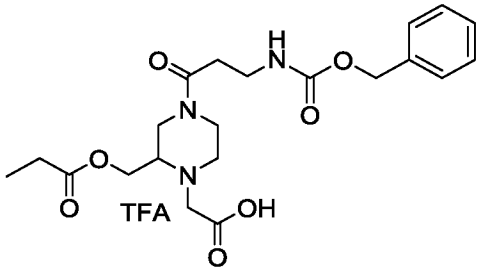


L–8d (150 мг, 0,317 ммоль) растворяли в дихлорметане (5 мл) и трифторуксусной кислоте (5 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. На следующий день раствор концентрировали с помощью роторного испарителя, и остаток повторно растворяли в 4 мл ацетонитрила. Раствор фильтровали и очищали с помощью препаративной обращенно–фазовой HPLC с масс–направленным сбором фракций (способ, описанный ниже). Фракции, содержащие продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением **L8**. MS (ESI+) *масса/заряд*=386,5 (M+H). Условия препаративной HPLC: Waters SunFire C18; размер частиц: 5 мкм; размер колонки: 30 × 50 мм; элюент/градиент: 10% CH_3CN/H_2O/0,7 мин, 10–30% CH_3CN/H_2O/3,5 мин, 30–95% CH_3CN/H_2O 0,5 мин (CH_3CN и H_2O, содержащие 0,1% TFA); скорость потока: 75 мл/мин; температура колонки: комнатная температура; соотношение *масса/заряд* в собранном спектре: +385.

Бесследные линкеры: L9–L11

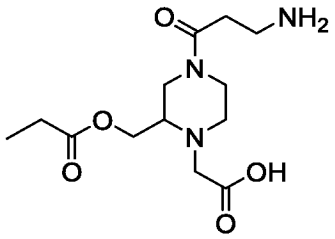


L–9a. 2–(пропаноилоксиметил)–4–(N–Cbz–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота в форме соли трифторуксусной кислоты



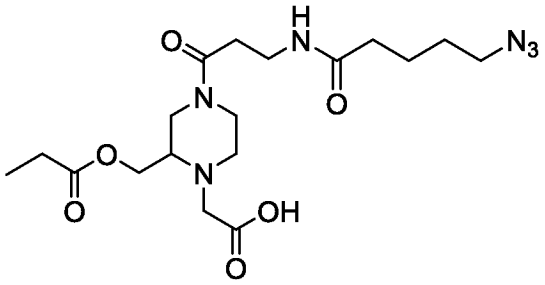
L–INT–3 (250 мг, 0,51 ммоль) растворяли в дихлорметане (5 мл) при 0°C, затем обрабатывали трифторуксусной кислотой (2,5 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. в атмосфере аргона. Реакционную смесь выпаривали, промывали с помощью пентана и высушивали с получением неочищенного **L–9a** в виде соли трифторуксусной кислоты. LCMS (способ 5): время удерживания=0,262 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 436,2 (M+H).

L–9b. 2–(пропаноилоксиметил)–4–(бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота



L–9a (250 мг, 0,57 ммоль) растворяли в этаноле (5 мл), к которому добавляли 10% палладий на угле (25 мг). Раствор перемешивали в атмосфере газообразного водорода из баллона в течение 6 ч. и затем фильтровали через Celite® и промывали этанолом. Объединенные фильтраты выпаривали с получением соединения **L–9b**. LCMS (способ 5): время удерживания=0,774 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 302,2 (M+H).

L9.



L–9b (100 мг, 0,33 ммоль) и 5–азидопентановую кислоту (57 мг, 0,40 ммоль) в этилацетате (5 мл) при 0°C обрабатывали диизопропилэтиламином (107 мг, 0,83 ммоль) и пропилфосфоновым ангидридом (50% раствор в этилацетате, 158 мг, 0,50 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. в атмосфере аргона, затем гасили с помощью воды и выпаривали. За первичной флэш–хроматографией (SiO_2, 10% метанол в дихлорметане) следовала препаративная HPLC (колонка: Zorbax C–18, 4,6 × 150 мм; подвижная фаза A=метанол:0,01% TFA (1:1) в воде, подвижная фаза B=ацетонитрил:метанол (1:1); время=0 мин: 30% B; 1 мин: 70% B; 6 мин: 100% B; 1 мл/мин) с получением **L9**. LCMS (способ 5): время удерживания=0,18 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 427,1 (M+H). ^{1}H–ЯМР (CD_3OD, ppm) (все отнесения предварительные) 4,23–4,17 (m, 2H), 4,16–3,98 (m, 1H), 3,78–3,62 (m, 1H), 3,54 (s, 2H), 3,46–3,43 (t, J=4, 3H), 3,26–3,20 (m, 1H), 3,18–3,05 (m, 1H), 3,03–2,76 (m, 2H), 2,64–2,61 (t, J=8,2H), 2,43–2,36 (m, 2H), 2,24–2,21 (t, J=8, 2H), 1,75–1,58 (m, 4H), 1,15–1,12 (t, J=8, 3H).

Соединения, показанные в таблице 9, получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза L–9**:**

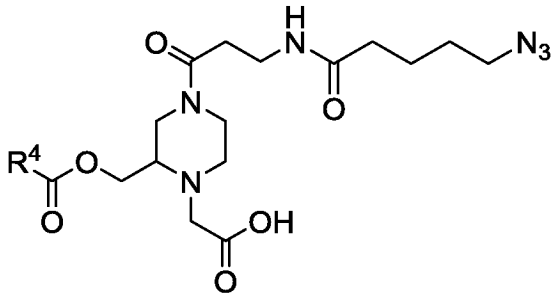
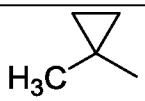
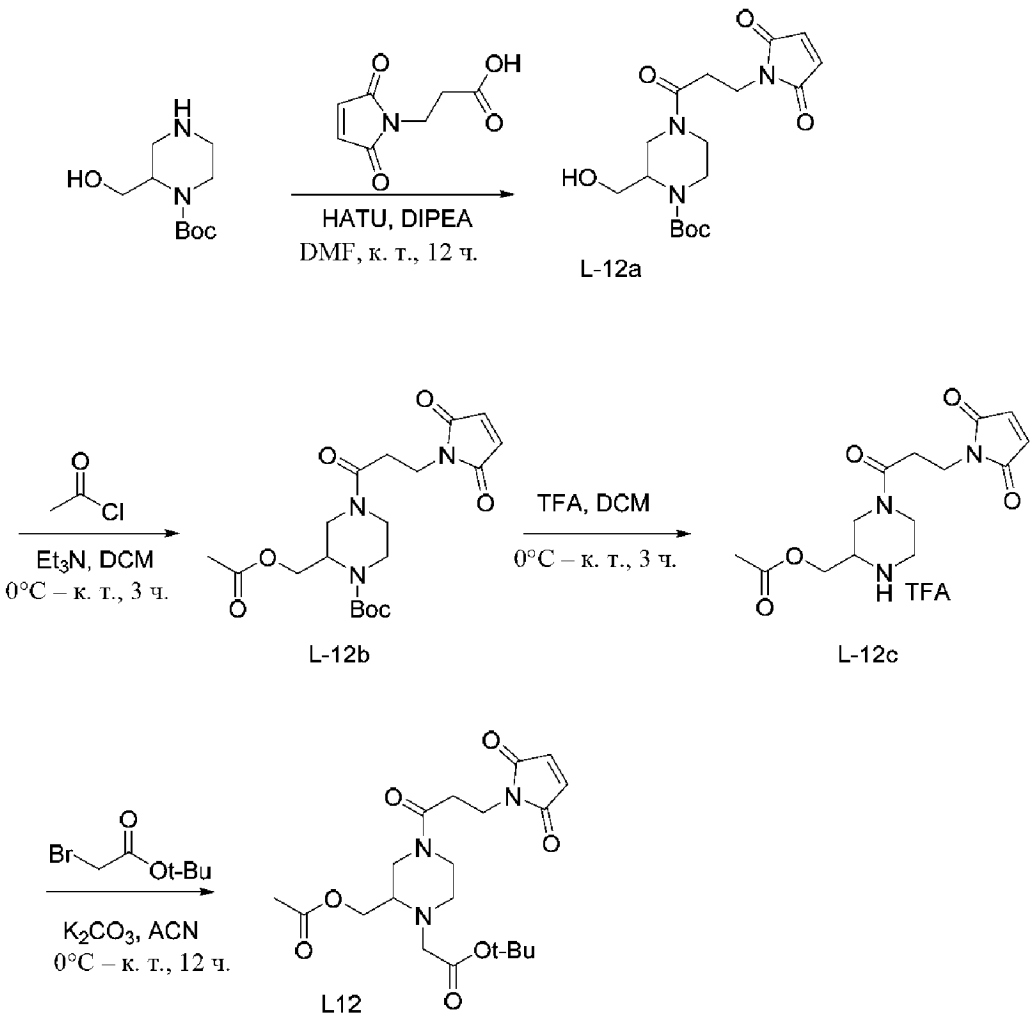


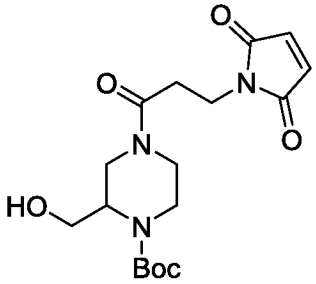
Таблица 9. Иллюстративные бесследные линкерные соединения			
R^4, название	**Номер (исходное промежуточное соединение)**	**LCMS: [M+H]; время удерживания; способ**	**^{1}H–ЯМР (300 МГц, CD_3OD)**
R^4 = $(CH_3)_2CH$–2–(изобутаноилоксим	**L10 (L–INT–4)**	441,1 0,16 мин 5	4,21–4,15(m, 2H), 4,04–3,84(t, J=16, 1H), 3,81–3,73(m, 1H), 3,55(s, 2H), 3,49–3,45(t, J=8,

етил)–4–(N–(5’–азидопентаноил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота			3H), 3,34(s, 1H), 3,27–3,22(m, 1H), 3,14–3,10(m, 2H), 2,99–2,80(m, 2H), 2,70–2,57(m, 3H), 1,72–1,58 (m,4H), 1,19–1,17(d, J=8, 6H).
R^4 =  2–(1’–метилциклопропил карбонилоксиметил)–4–(N–(5’’–азидопентаноил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусная кислота	**L11 (L–INT–5)**	453,2 0,21 мин 5	4,21–4,16 (dd, J=16,4, 2H), 4,05–3,99(t, J=12, 1H),3,83–3,72(m,1H), 3,56(s, 2H), 3,49–3,45(t, J=8, 3H), 3,28–3,20(m, 1H), 3,18–3,04(m,1H),3,02–2,76(m,2H),2,72–2,54(m, 2H), 2,24–2,21(t, J=8, 2H),1,72–1,56(m, 5H), 1,13(s,3H), 1,26–1,21(m, 2H),1,07–0,90(m, 1H), 0,76–0,74(t, J=4, 2H)

Бесследные линкеры: L12 и L13



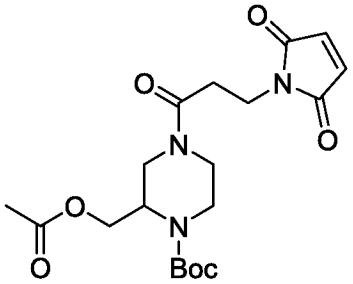
L–12a. 1–(Boc)–2–(гидроксиметил)–4–(N–малеоил–бета–аланил)пиперазин



Трет–бутил–2–(гидроксиметил)пиперазин–1–карбоксилат (200 мг, 0,93 ммоль) растворяли в дихлорметане (10 мл) при 0°C. Добавляли диизопропилэтиламин (359 мг, 2,78 ммоль) и HATU (422 мг, 1,11 ммоль), и раствор перемешивали в течение 15 мин при 0°C. Добавляли 3–малеимидопропионовую кислоту (187 мг, 1,11 ммоль) и затем реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч. при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали дихлорметаном. Органический слой промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (нейтральный оксид алюминия, 2% метанол в этилацетате) получали титульный материал

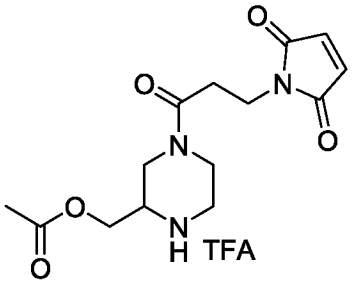
L–12a. LCMS (способ 6): время удерживания=2,87 мин.

L–12b. 1–(Boc)–2–(ацетоксиметил)–4–(N–малеоил–бета–аланил)пиперазин



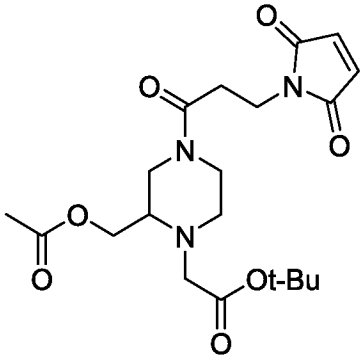
К **L–12a** (300 мг, 0,82 ммоль) и триэтиламину (330 мг, 3,27 ммоль) в дихлорметане (4 мл) при 0°C в атмосфере аргона по каплям добавляли ацетилхлорид (125 мг, 1,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч., затем обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном. Органический слой высушивали (над сульфатом натрия), концентрировали и очищали посредством флэш–хроматографии (нейтральный оксид алюминия, 2% метанол в этилацетате) с получением титульного материала **L–12b**. LCMS (способ 6): время удерживания=3,2 мин.

L–12c. 1–(N–малеоил–бета–аланил)–3–(ацетоксиметил)пиперазин в форме соли трифторуксусной кислоты



L–12b (200 мг, 0,49 ммоль) растворяли в дихлорметане (5 мл) при 0°C, затем обрабатывали по каплям трифторуксусной кислотой (0,4 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. в атмосфере аргона. Реакционную смесь выпаривали, промывали с помощью пентана и высушивали с получением неочищенного титульного материала **L–12c.** LCMS (способ 6): время удерживания=1,709 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 310 (M+H).

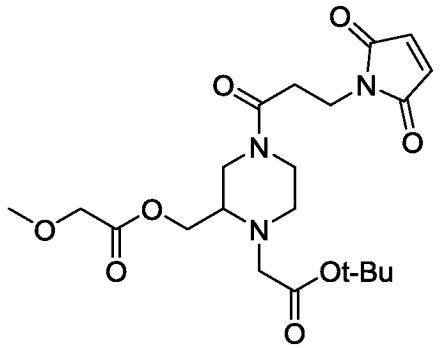
L12. Трет–бутиловый сложный эфир 2–(ацетоксиметил)–4–(N–малеоил–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты



К **L–12c** (140 мг, 0,45 ммоль) и карбонату калия (156 мг, 1,13 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) при 0°C по каплям добавляли трет–бутилбромацетат (100 мг, 0,54 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 10–15°C, затем обеспечивали перемешивание в течение 12 ч. при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушивали (над сульфатом натрия), концентрировали и очищали с помощью препаративной HPLC (колонка: Zorbax Eclipse XDB C18, 21,2 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза A=вода, подвижная фаза B=ацетонитрил; время=0 мин: 30% B; 2 мин: 40% B; 10 мин: 60% B) с получением **L12**. LCMS (способ 6): время удерживания=3,08 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 424 (M+H). ^{1}H–ЯМР ($CDCl_3$, ppm) 6,69 (s, 2H), 4,25–4,14 (m, 2H), 4,09–3,96 (m, 2H), 3,88–3,83 (t, J=9, 2H), 3,65–3,54 (m, 1H), 3,46–3,33 (m, 2H), 3,31–3,17 (m, 2H), 3,05–2,98 (m,2H), 2,84–2,75 (m, 2H), 2,68–2,63 (t, J=9,2H), 2,09–2,07 (d, J=6, 3H), 1,45 (s, 9H).

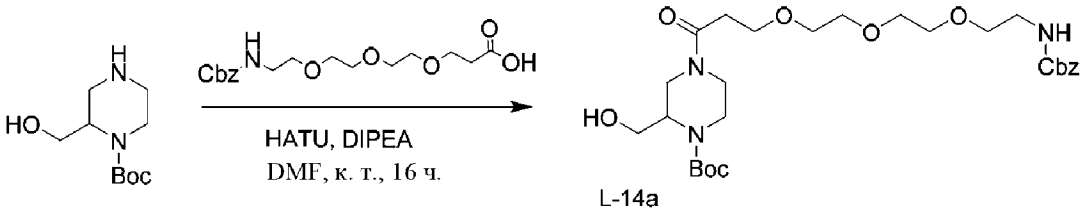
L13 получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **L12:**

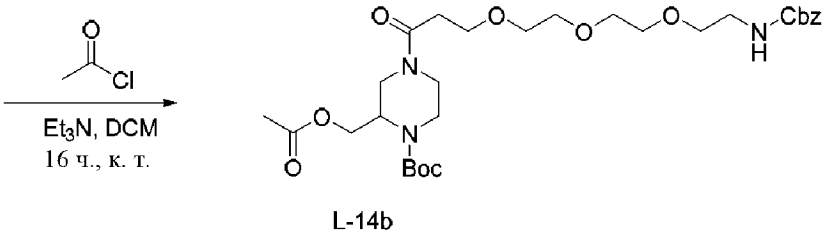
L13. Трет–бутиловый сложный эфир 2–(2'–метоксиацетоксиметил)–4–(N–малеоил–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты ((1–(2–(трет–бутокси)–2–оксоэтил)–4–(3–(малеимидил)пропаноил)пиперазин–2–ил)метил–2–метоксиацетат)

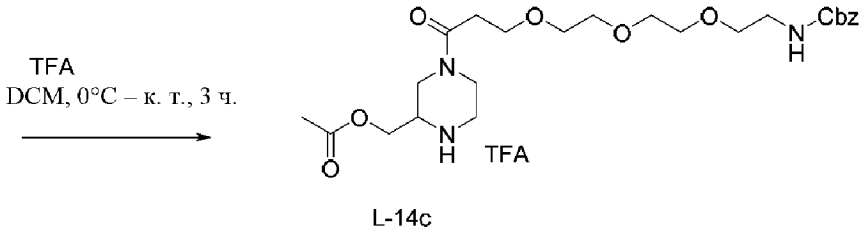


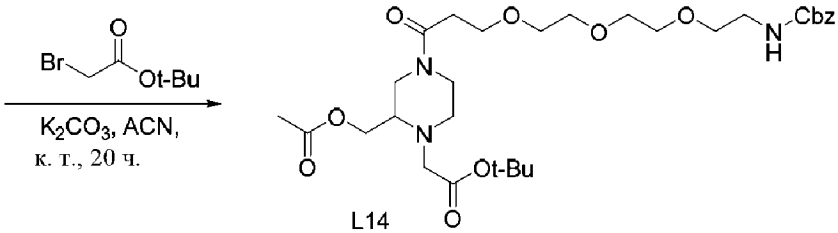
L13. LCMS (способ 6): время удерживания=3,04 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 454,5 (M+H). ^{1}H–ЯМР ($CDCl_3$, ppm) 6,70 (s, 2H), 4,40–4,24 (m, 1H), 4,20–4,10 (m, 1H), 4,07–4,60 (d, J=4, 2H), 4,02–3,94 (m, 1H), 3,87–3,83 (t, J=8, 2H), 3,70–3,60 (m, 1H), 3,68–3,60 (m, 1H),3,58–3,51 (m, 1H), 3,45 (s, 3H), 3,41–3,39 (d, J=8, 1H), 3,36–3,32 (s, 1H), 3,32–3,28 (s, 1H), 3,18–3,10 (m, 1H), 3,04–2,97 (m,1H), 2,83–2,81 (t, J= 4, 1H), 2,79–2,75 (m, 1H), 2,67–2,64 (t, J= 8, 2H), 1,46 (s,9H).

Бесследные линкеры L14–L16

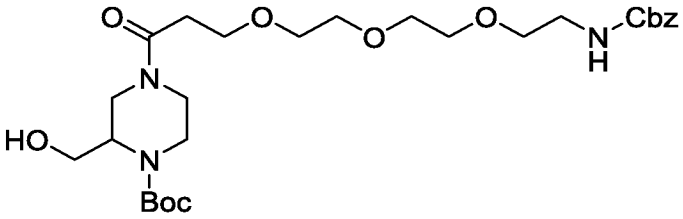








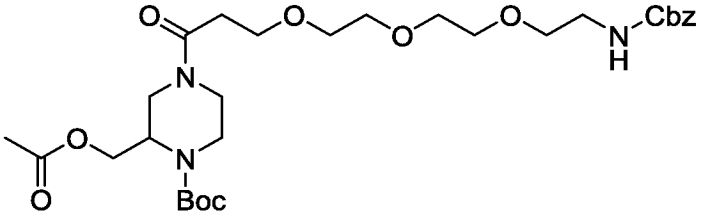
L14a. 1–(Boc)–2–(гидроксиметил)–4–(3'–(2''–(2'''–(2''''–((N–Cbz)–амино)этокси)этокси)этокси)пропаноил)пиперазин



К трет–бутил–2–(гидроксиметил)пиперазин–1–карбоксилату (1,0 г, 4,63 ммоль), растворенному в дихлорметане (20 мл) при 0°C, добавляли диизопропилэтиламин (1,79 г,

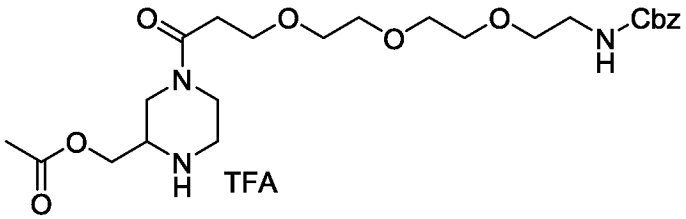
13,9 ммоль) и HATU (2,10 г, 5,55 ммоль). Раствор перемешивали в течение 15 мин при 0°C. Добавляли 3–(2'–(2''–(2'''–((N–Cbz)–амино)этокси)этокси)этокси)пропановую кислоту (1,64 г, 4,63 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч. при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 1–4% метанол в дихлорметане) получали титульный материал **L–14a**. LCMS (способ 5): время удерживания=1,27 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 554,3 (M+H).

L–14b. 1–(Boc)–2–(ацетоксиметил)–4–(3'–(2''–(2'''–(2''''–((N–Cbz)–амино)этокси)этокси)этокси)пропаноил)пиперазин



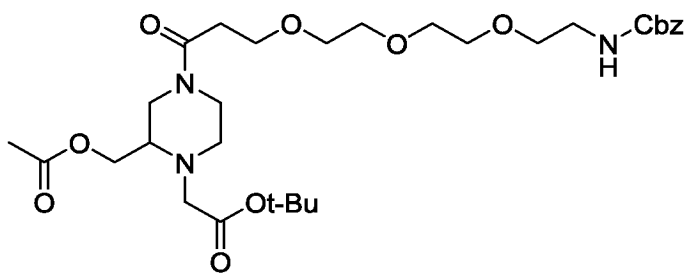
К **L–14a** (500 мг, 0,90 ммоль) и триэтиламину (228 мг, 2,26 ммоль), растворенным в дихлорметане (20 мл) при 0°C, по каплям добавляли ацетилхлорид (83 мг, 1,08 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенный органический слой высушивали над сульфатом натрия и концентрировали, затем очищали посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 1–4% метанол в дихлорметане) с получением титульного материала **L–14b**. LCMS (способ 7): время удерживания=1,54 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 595,8 (M+H).

L–14c. 1–(3'–(2''–(2'''–(2''''–((N–Cbz)–амино)этокси)этокси)этокси)пропаноил)–3–(ацетоксиметил)пиперазин в форме соли трифторуксусной кислоты



L–14b (500 мг, 0,84 ммоль) растворяли в дихлорметане (10 мл) при 0°C, затем обрабатывали по каплям трифторуксусной кислотой (3 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. в атмосфере аргона. Реакционную смесь выпаривали, промывали с помощью пентана и высушивали с получением неочищенного титульного материала **L–14c**, который переносили в следующую реакционную смесь без дополнительной очистки или анализа.

L14. Трет–бутиловый сложный эфир 2–(ацетоксиметил)–4–(3'–(2''–(2'''–(2''''–((N–Cbz)–амино)этокси)этокси)этокси)пропаноил)–1–пиперазинуксусной кислоты



К **L–14c** (500 мг, 1,0 ммоль) и карбонату калия (418 мг, 3,03 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) при 0°C по каплям добавляли трет–бутилбромацетат (295 мг, 1,51 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 ч. при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушивали (над сульфатом натрия), концентрировали и очищали с помощью первичной флэш–хроматографии (SiO_2, 1–5% метанол в дихлорметане) с последующей препаративной HPLC (колонка: Zorbax Eclipse XDB C18, 4,6 × 150 мм, 5 мкм; подвижная фаза A=0,01% TFA в воде, подвижная фаза B=ацетонитрил:метанол (1:1), 1 мл/мин; время=0 мин: 30% B; 1 мин: 70% B; 6 мин: 100% B) с получением **L14**. LCMS (способ 5): время удерживания=3,43 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 610,35 (M+H). ^{1}H–ЯМР ($CDCl_3$, ppm) 7,36–7,31 (m, 5H), 5,49 (s, 1H), 5,09 (s, 2H), 4,26–4,16 (m, 1H), 4,07–3,98(m, 1H), 3,78–3,74(t, J=6, 2H), 3,60–3,53(m, 11H), 3,39–3,32(m, 4H), 2,84–2,72(m, 2H), 2,61–2,57(t, J=3, 2H), 2,08–2,06(d, J=6, 2H), 1,45(s, 9H).

Соединения, показанные в таблице 10, получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **L14:**

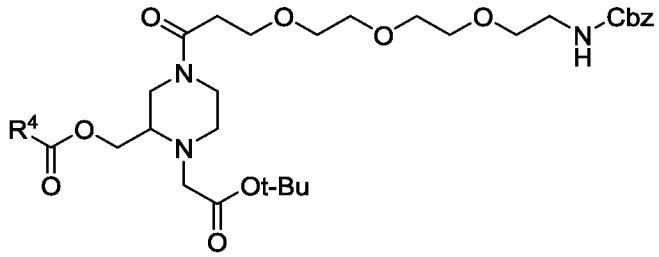
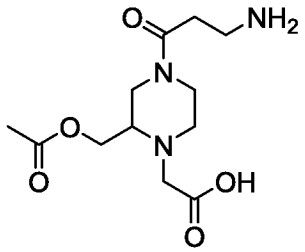
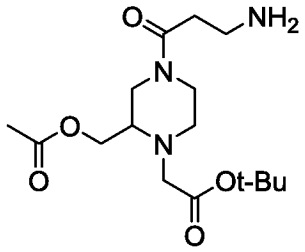
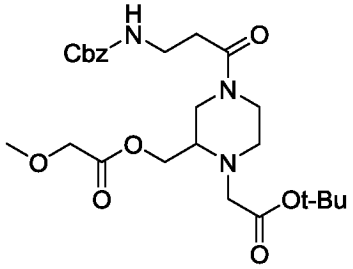
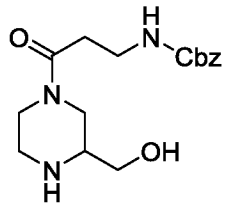
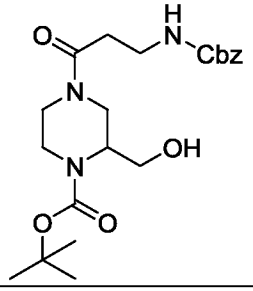
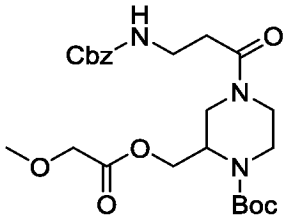
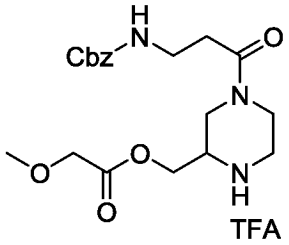
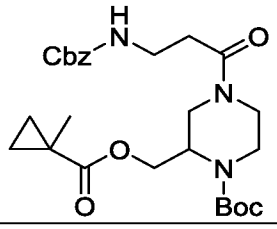
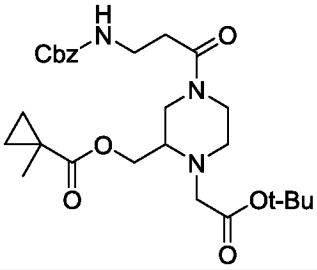
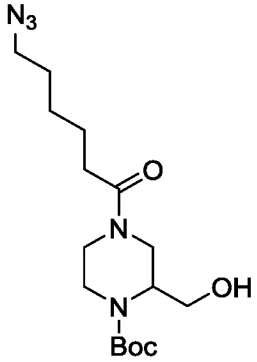


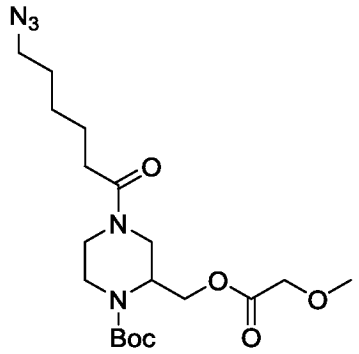
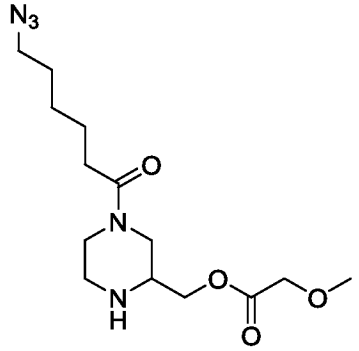
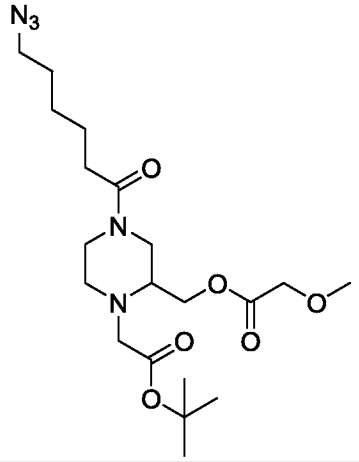
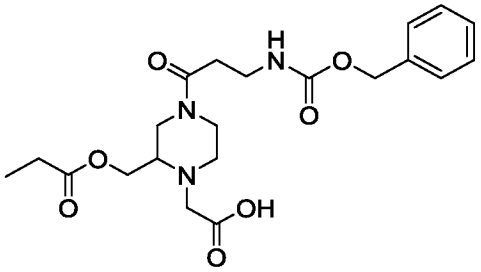
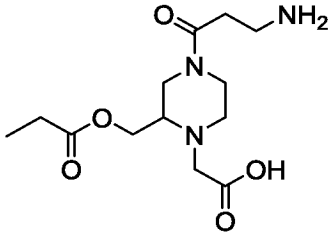
Таблица 10. Иллюстративные бесследные линкерные соединения			
R^4, название	**Номер**	**LCMS: [M+H]; время удерживания; способ**	**^{1}H–ЯМР (300 МГц, $CDCl_3$)**
R^4=CH_3CH_2– Трет–бутиловый сложный эфир 2–(пропаноилоксиметил)–4–(3'–(2''–(2'''–(2''''–((N–	**L15**	624,35; 3,60 мин; 5	7,36–7,30 (m, 5H), 5,41 (s 1H), 5,09 (s, 2H), 4,28–3,96 (m, 3H), 3,78–3,74 (t, J=6, 3H), 3,60–3,53 (m, 12H), 3,43–3,22(m, 6H), 3,10–2,92 (m, 2H),2,81–2,74(m,

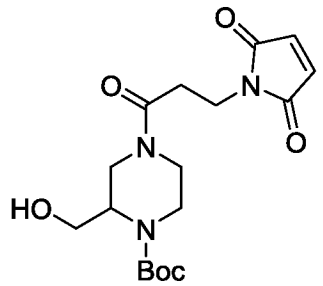
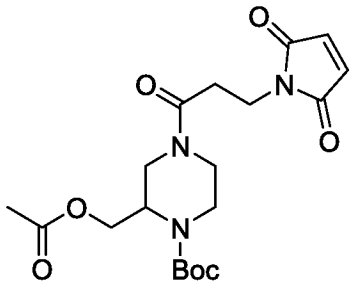
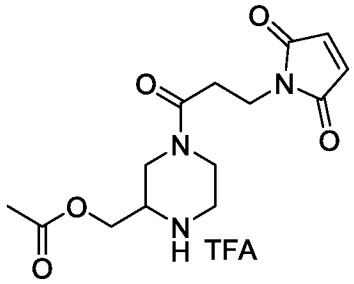
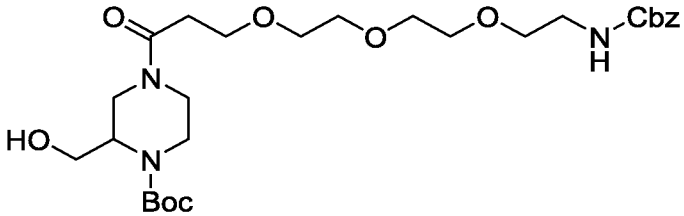
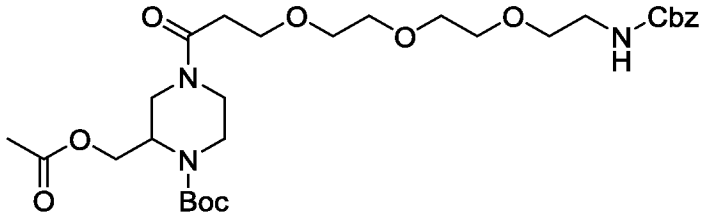
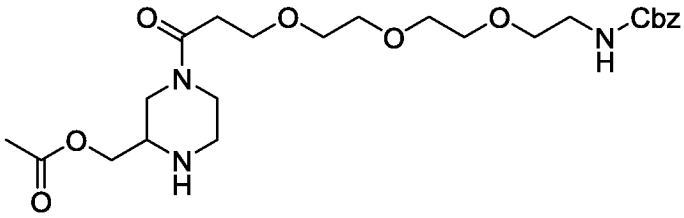
Cbz)–амино)этокси)этокси)этоксиси)пропаноил)–1–пиперазинуксусной кислоты			2H), 2,61–2,56(t, J=9, 2H), 2,39–20 (m, 2H), 1,63(s, 3H), 1,45(s, 9H), 1,16–1,10(t, J=6, 3H).
R^4 = $(CH_3)_2CH$– Трет–бутиловый сложный эфир 2–(изобутаноилоксиметил)–4–(3'–(2''–(2'''–(2''''–((N–Cbz)–амино)этокси)этокси)этоксиси)пропаноил)–1–пиперазинуксусной кислоты	**L16**	638,35; 3,60 мин; 5	7,36–7,30 (m, 5H), 4,95 (s, 1H), 5,10(s, 2H), 4,26–4,12 (m, 2H), 4,08–3,96(m, 2H), 3,81–3,76(m, 3H), 3,61(s, 8H), 3,57–3,54 (t, J=4, 3H), 3,41–3,19(m, 6H),3,11–3,04(m, 1H), 3,02–2,88 (m, 1H), 2,84–2,72 (m, 2H), 2,60–2,57 (m, 3H), 1,45(s, 9H), 1,18–1,16(d, J=8, 6H).

Таблица 11. Иллюстративные промежуточные соединения в синтезе бесследных линкеров

Структура	**Номер**	**Аналогичные соединения**
	**L–2b**	**L–1b, L–3b, L–4b, L–5b, L–6b, L–7b**
	**L–2a**	**L–1a, L–3a, L–4a, L–5a, L–6a, L–7a**
	**L–INT–1**	**L–INT–2, L–INT–3, L–INT–4**

	**L–INT–1b**	**L–INT–2b, L–INT–3b, L–INT–4b**
	**L–INT–1c**	**L–INT–2c, L–INT–3c, L–INT–4c**
	**L–INT–1d**	**L–INT–2c, L–INT–3c, L–INT–4c**
	**L–INT–1e**	**L–INT–2c, L–INT–3c, L–INT–4c**
	**L–INT–5a**	
	**L–INT–5b**	
	**L–8a**	

	**L–8b**	
	**L–8c**	
	**L–8d**	
	**L–9a**	**L–10a, L–11a**
	**L–9b**	**L–10b, L–11b**

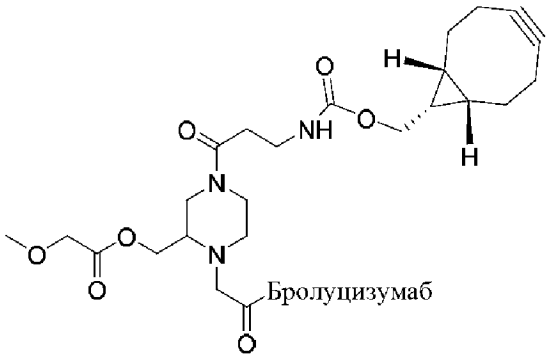
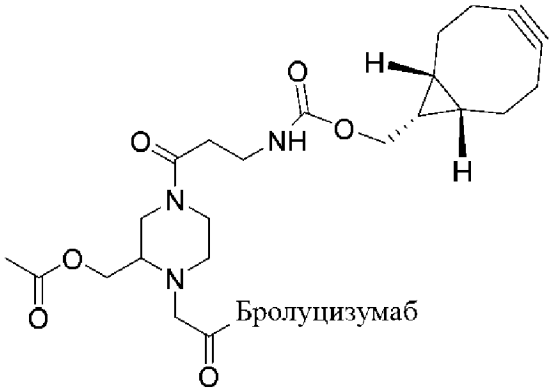
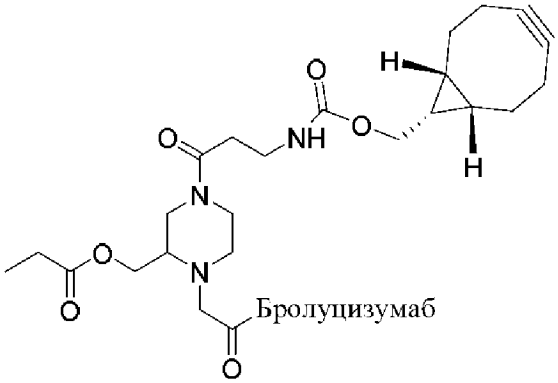
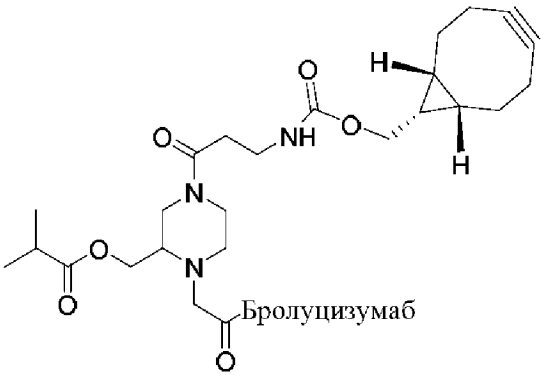
	**L–12a**	**L–13a**
	**L–12b**	**L–13b**
	**L–12c**	**L–13c**
	**L–14a**	**L–15a, L–16a**
	**L–14b**	**L–15b, L–16b**
	**L–15c**	**L–15c, L–16c**

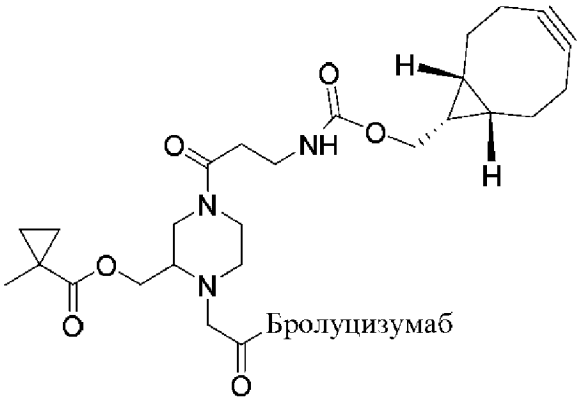
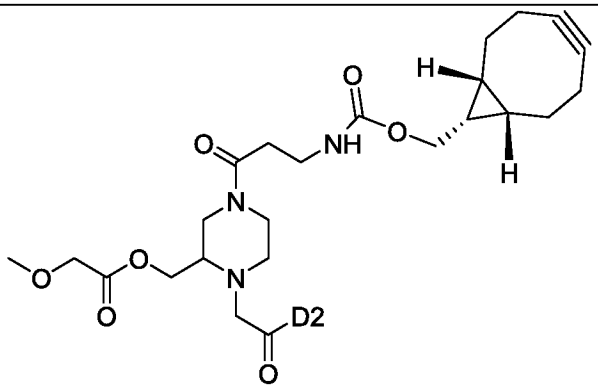
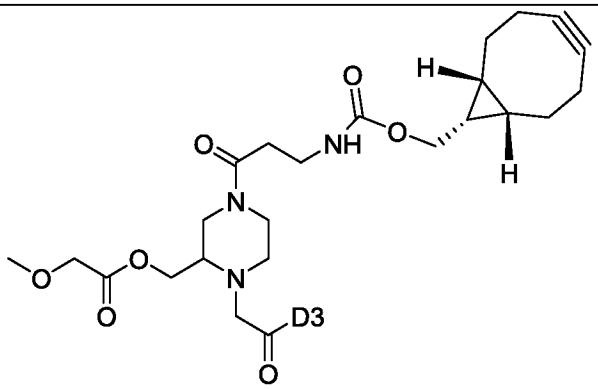
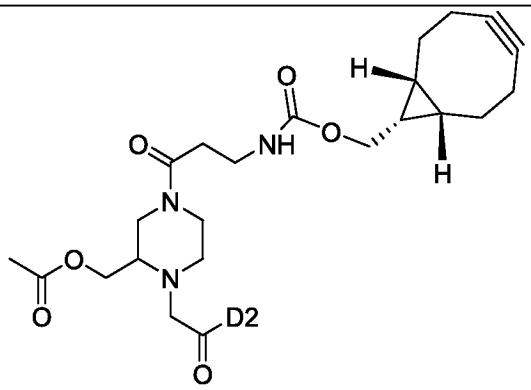
Пример 2

Аддукты бесследных линкеров с биологически активными компонентами

В данном примере описан синтез ряда аддуктов бесследный линкер–лекарственное средство, которые также могут быть конъюгированы с носителем.

Таблица 12. Иллюстративные аддукты бесследный линкер–лекарственное средство			
Номер	**Структура**	**Бесследн**	**Лекарственн**

		ый линкер	ое средство
L1D1		**L1**	Бролуцизумаб =D1
L2D1		**L2**	Бролуцизумаб =D1
L3D1		**L3**	Бролуцизумаб =D1
L4D1		**L4**	Бролуцизумаб =D1

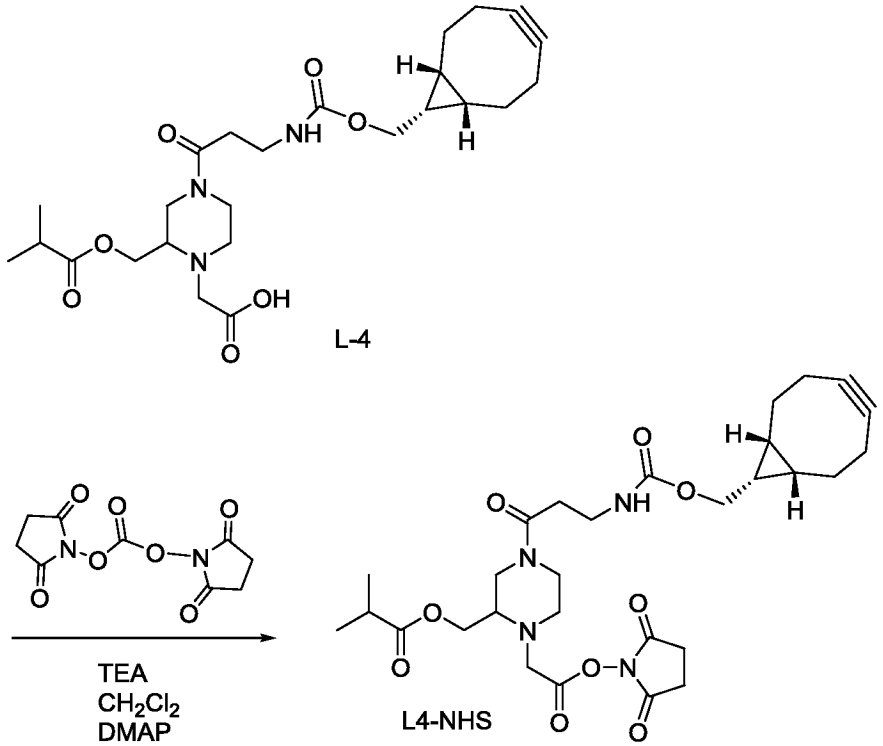
L5D1		**L5**	Бролуцизумаб =D1
L1D2		**L1**	D2
L1D3		**L1**	D3
L2D2		**L2**	D2

L5D2		**L5**	D2
L8D4		**L8**	D4

Синтез аддуктов

Ацилирование биологически активных компонентов с помощью бесследного линкера:

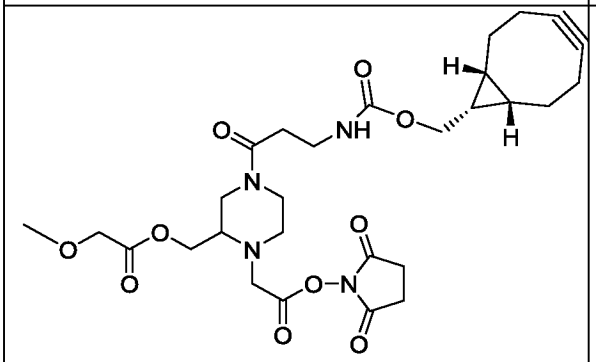
L4–NHS. N–гидроксисукцинимидиловый сложный эфир 2–(изобутаноилоксиметил)–4–(N–(((1R’,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты



Суспензию **L4** (22 мг, 0,045 ммоль) в дихлорметане (5 мл) обрабатывали

триэтиламином (0,0062 мл, 0,045 ммоль), диметиламинопиридином (0,55 мг, 0,0045 ммоль) и N, N'–дисукцинимидилкарбонатом (10,9 мг, 0,043 ммоль) и перемешивали в течение 2 ч. при комнатной температуре, затем выпаривали и незамедлительно использовали в имеющемся состоянии без дополнительной очистки. LCMS (способ 1): время удерживания=1,33 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 589,6 (M+H).

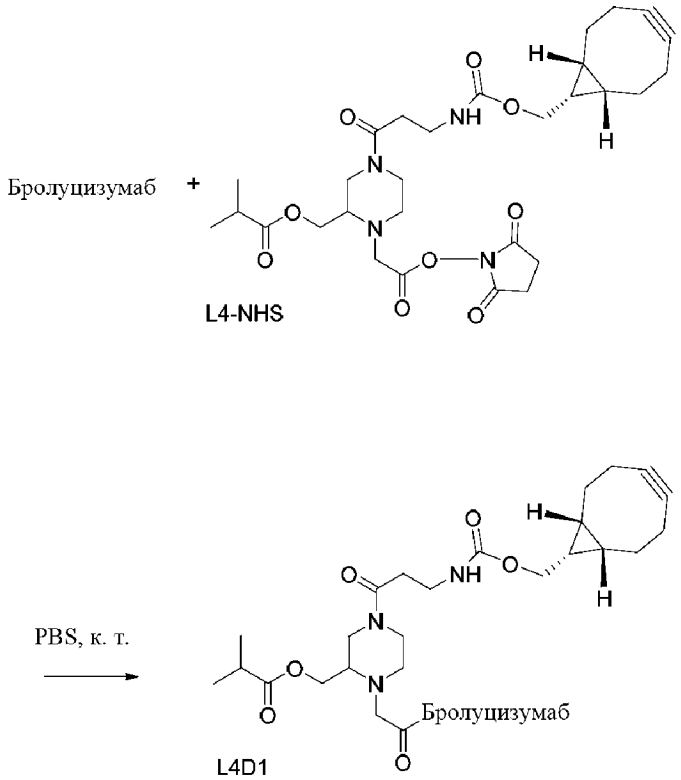
Соединения из таблицы 13 получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **L4–NHS**.

Таблица 13. Иллюстративные активированные бесследные линкерные соединения			
Структура	**Номер (исходное промежуточное соединение)**	**Название**	**MS (ESI+): *масса/заряд* (M+H);** время удерживания; способ
	**L1–NHS (L1)**	N–гидроксисукциниминдиловый сложный эфир 2–(2'–метоксиацетоксиметил)–4–(N–(((1''R,8''S,9''s)–бицикло[6.1.0]нон–4''–ин–9''–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты	591,4; 0,87 мин; 2

	L2–NHS (L2)	N–гидроксисукциним идиловый сложный эфир 2–(ацетоксиметил)–4–(N–(((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты	561,4; 0,87 мин; 2
	L3–NHS (L3)	N–гидроксисукциним идиловый сложный эфир 2–(пропаноилоксиметил)–4–(N–(((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты	575,5; 0,91 мин; 4
	L5–NHS (L5)	N–гидроксисукциним идиловый сложный эфир 2–(1’–метилциклопропил карбонилоксимети	601,4; 0,99 мин; 4

		л)–4–(N–(((1''R,8''S,9''s)–бицикло[6.1.0]нон–4''–ин–9''–ил)метоксикарбонил)–бета–аланил)–1–пиперазинуксусной кислоты	

L4–бролуцизумаб (L4D1b)



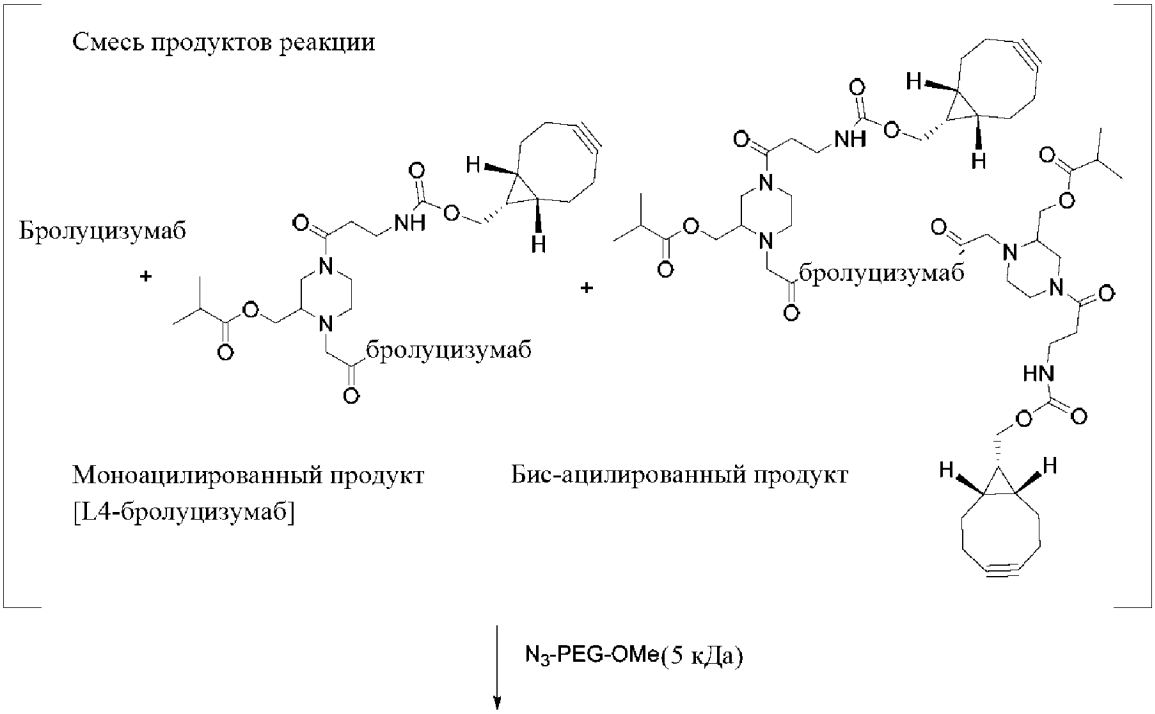
60 мг/мл раствора бролуцизумаба (10 мл, 0,023 ммоль) в буфере, состоящем из 20 мМ дигидрата цитрата тринатрия, 125 мМ хлорида натрия, 0,01 мг/мл Tween 20 при pH 6,25, разбавляли с помощью 1× PBS (10 мл, pH 7,4) с получением 30 мг/мл раствора, который затем медленно обрабатывали с помощью 38 мМ раствора L4–NHS в DMSO (0,65 мл, 0,023 ммоль), перемешивали вихревым способом и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. Очищали с помощью ультрацентрифугирования (концентраторы Vivaspin, MWCO 10 кДа), промывали с помощью 1× PBS (4 раза), удаляли остаточные примеси малых молекул с получением смеси **L4D1** и немодифицированного бролуцизумаба (**D1**). MS (способ 9) *масса/заряд* после деконволюции 26312 (бролуцизумаб, M+H); *масса/*заряд после деконволюции 26786 (**L4D1**, M+H, ожидаемая MW=MW (бролуцизумаб) + 473).

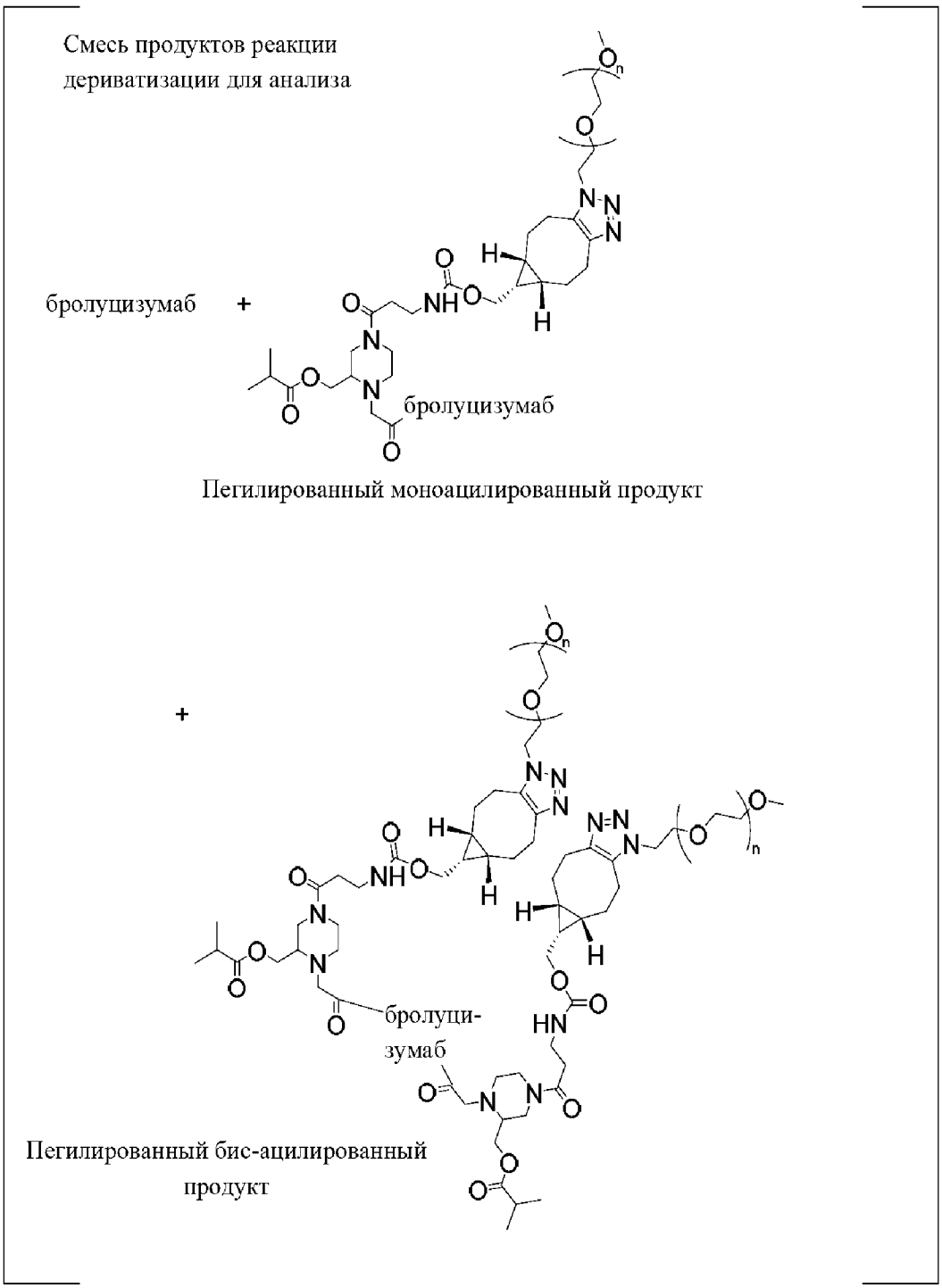
Важным аналитическим параметром является определение соотношения

(немодифицированный бролуцизумаб, n=0): (моноацилированный бролуцизумаб, n=1):(полиацилированный бролуцизумаб, n > 1). Сравнение относительной высоты пиков для различных соединений в масс–спектре позволяет произвести оценку соотношения продуктов, но данное соотношение может быть неточным, так как различные продукты могут иметь неодинаковые молярные факторы отклика при MS–анализе. В данном примере: MS–анализ указывал на соотношение продуктов [(n=0) : (n=1) : (n=2)] ~ 5 : 1 : 0 (способ 9).

В качестве дополнительного способа оценки соотношения продуктов реакции использовали анализ методом SEC (эксклюзионной хроматографии) или SDS–PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) для дериватизированных продуктов реакции; дериватизация необходима для достижения разделения продуктов реакции.

Реакция дериватизации L4D1b





Аликвоту из реакционного раствора 30 мг/мл реакционной смеси **L4D1b** (0,005 мл, 0,0057 мкмоль) обрабатывали метокси–PEG–азидом с M_n ~ 5 кДа (Sigma–Aldrich, 689475, 10 мкл 100 мг/мл раствора в 1× PBS, 0,20 мкмоль), перемешивали вихревым способом, затем встряхивали при 37°C в течение 45 мин.

Анализ производного L4D1b

SEC: (колонка: Agilent AdvanceBio SEC 300A, 2,7 мкм, 4,6 × 150 мм; подвижная фаза: 150 мМ фосфата калия в воде с 5% изопропанола (изократический режим); быстрый

способ: 0,2 мл/мин в течение 13 мин; медленный способ: 0,1 мл/мин в течение 25 мин; выявление: 210 нм). **Производное L4D1b**: определение соотношения (немодифицированный бролуцизумаб, n=0, время удерживания=12,74 мин (медленный способ)) : (моноацилированный бролуцизумаб, n=1, время удерживания=11,26 мин (медленный способ)) : (бис–ацилированный бролуцизумаб, n=2, время удерживания=10,36 мин (медленный способ)) = [(n=0) : (n=1) : (n=2)] = 81 : 18 : 1.

SDS–PAGE: (подвижный буфер MOPS; 4–12% гели бис–трис NuPage® Novex®; краситель кумасси синий; устройство для визуализации Bio–Rad ChemiDoc; программное обеспечение для анализа Image Lab 5.2.1). **Производное L4D1b**: определение соотношения (немодифицированный бролуцизумаб, n=0): (моноацилированный бролуцизумаб, n=1) : (полиацилированный бролуцизумаб, n=2) = [(n=0) : (n=1) : (n=2)] ~ 67 : 33 : следовые количества.

Аддукты, показанные в таблице 14 и таблице 15, получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **L4D1b**. Условия реакции, используемые для получения аддуктов, указаны в таблице 14; характеристики аддуктов описаны в таблице 15.

Таблица 14. Иллюстративные аддукты D–R. Условия реакции

Номер	**Исследование**	**Использовали для получения конъюгата**	**Концентрация белка в реакционной смеси (мг/мл)**	**Буфер**	**Эквиваленты активированных линкеров, добавляемых в реакционную смесь; используемое соединение линкер–NHS**	**Температура и время реакции**
L1D1	Высвобождение in vitro 8.1	C1	30	D	2,0; L1–NHS	RT, 30ч
L2D1a	Высвобождение in vitro 8.1	C2a	30	D	2,0; L2–NHS	RT 2ч
L2D1b	Высвобождение in vivo 9.1	C2b	30	D	2,1; L2–NHS	RT, 2ч
L3D1a	Высвобождение in	C3a	30	D	2,0; L3–NHS	RT, 2ч

	vitro 8.1					
L3D1b		C3b	30	D	1,0; L3–NHS	RT, 2ч
L3D1c		C6	30	D	1,1; L3–NHS	RT, 1ч
L4D1a	Высвобождение in vitro 8.1	C4a	30	D	2,0; L4–NHS	RT, 1ч
L4D1b		C4b	30	D	1,0; L4–NHS	RT, 1ч
L4D1c		C7	30	D	1,1; L4–NHS	RT, 16ч
L4D1d		C14, C15	60	E	0,8; L4–NHS	RT, 1,5ч
L5D1		C5	30	D	1,6; L5–NHS	RT, 16ч
L1D2a		C8	5,1	A	2,1; L1–NHS	RT, 2ч
L1D2b	Высвобождение in vitro 8.2	C10	9,1	C	2,1; L1–NHS	RT, 3ч
L2D2	Высвобождение in vitro 8.2	C11	9,1	C	2,1; L2–NHS	RT, 1ч
L5D2	Высвобождение in vitro 8.2	C12	9,1	C	2,1; L5–NHS	RT, 2ч
L1D3		C9	5,1	B	2,1; L1–NHS	RT, 3ч

Реакционный буфер A:

(1 : 2,2) = (20 мМ фосфата натрия, 40 мМ хлорида натрия, pH 6,5) : (1× PBS, pH 7,4)

Реакционный буфер B:

(1 : 2) = (7 мМ сукцината, pH 5) : (1X PBS, pH 7,4)

Реакционный буфер C:

(1,25 : 1) = (20 мМ фосфата натрия, 40 мМ хлорида натрия, pH 6,5) : (1× PBS, pH 7,4)

Реакционный буфер D:

(1 : 1) = (20 мМ дигидрата цитрата тринатрия, 125 мМ хлорида натрия, 0,01 мг/мл Tween 20, pH 6,25) : (1× PBS, pH 7,4)

Реакционный буфер E:

20 мМ дигидрата цитрата тринатрия, 125 мМ хлорида натрия, 0,01 мг/мл Tween 20, pH 6,25

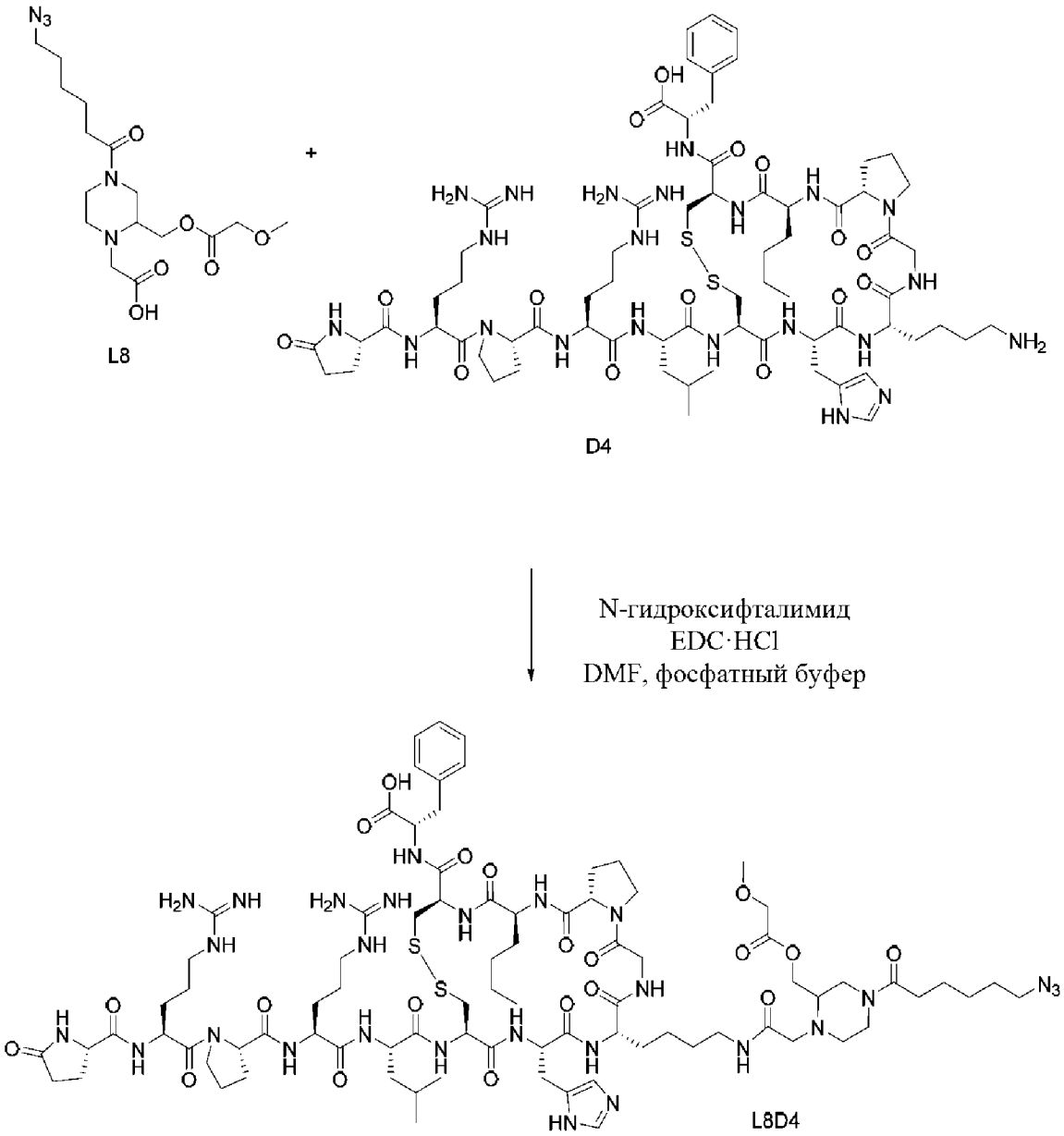
Таблица 15. Иллюстративные аддукты D–R. Определение характеристик аддуктов

Номер	**Исследование**	**Использовали для получения конъюгата**	**MS (способ 9): *масса/заряд* (моноацилированный продукт)**	**MS: соотношение продуктов (n=0 : n=1 : n=2) (способ 9)**	**SEC: соотношение продуктов (n=0 : n=1 : n=2)**	**SDS–PAGE: соотношение продуктов (n=0 : n=1 : n=2)**
L1D1	Высвобождение in vitro 8.1	C1	26788,5	2 : 1 : следовые количества	NA	NA
L2D1a	Высвобождение in vitro 8.1	C2a	26758,5	3 : 2 : следовые количества	NA	NA
L3D1a	Высвобождение in vitro 8.1	C3a	26772,5	3 : 1 : следовые количества	NA	NA
L3D1b		C3b	26773,0	5 : 1 : 0	78 : 20 : 2	68 : 32 : 0
L3D1c		C6	NA	NA	89 : 11 : 0	NA
L4D1a		C4a	26786,5	2 : 1 : следовые количества	NA	NA
L4D1b		C4b	26786,0	5 : 1 : 0	81 : 18 : 1	67 : 33 : 0
L4D1c		C7	26786,0	NA	90 : 10 : 0	NA
L4D1d		C14, C15	26787,0	5:1:0	84: 16: следовые количества	NA
L5D1		C5	NA	NA	83 : 17 : 0	NA
L1D2a		C8	ND	ND	NA	48 : 42 : 10

L1D2b	Высвобождение in vitro 8.2	C10	ND	ND	NA	73 : 27 : 0
L2D2	Высвобождение in vitro 8.2	C11	ND	ND	NA	60 : 40 : 0
L5D2	Высвобождение in vitro 8.2	C12	ND	ND	NA	80 : 20 : 0

NA: не измеряли.
ND: продукты реакций D2 с линкерами плохо ионизируются и не могут быть выявлены с помощью технологии QTOF в настроенной конфигурации, если они не присутствуют в высокой концентрации.

L8D4



L8 (43,4–мг, 0,113 ммоль) растворяли в диметилформамиде (2,55 мл) с последующим добавлением EDC·HCl (21,2 мг, 0,111 ммоль) и N–гидроксифталимида (18,6 мг, 0,114 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи (~ 16 ч.). К данному раствору добавляли **D4** (35 мг, 0,02 ммоль), растворенный в 1,5 мл диметилформамида и 1,5 мл 100 мМ фосфатного буфера (pH 6,5). Через 2 ч. реакционную смесь разбавляли с помощью 4 мл ацетонитрила, фильтровали и очищали с помощью препаративной обращенно–фазовой HPLC с масс–направленным сбором фракций (способ, описанный ниже). Фракции, содержащие продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением **L8D4**. MS (ESI+) *масса/заряд*=952,5 $(M+2H)^{2+}$.

Условия препаративной HPLC: Waters XSelect CSH OBD; размер частиц: 5 мкм; размер колонки: 19 × 150 мм; элюент/градиент: 24% CH_3CN/H_2O/1,65 мин, 24–34%

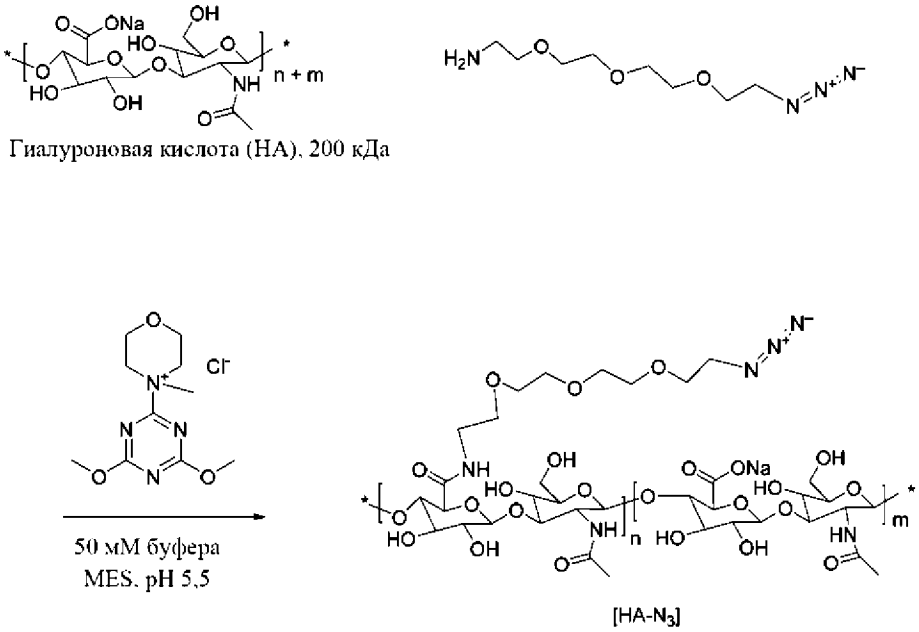
CH_3CN/H_2O/8,35 мин (CH_3CN и H_2O, содержащие 0,1% TFA); скорость потока: 30 мл/мин; температура колонки: комнатная температура; соотношение *масса/заряд* в собранном спектре: +951,7.

Пример 3

Функционализация гиалуроновой кислоты

В данном примере описан синтез функционализированной гиалуроновой кислоты, которая сама по себе может быть носителем или также может подвергаться реакции со сшивающим компонентом с образованием гидрогеля.

Синтез промежуточного соединения гиалуроновой кислоты [HA–N3]:



Натриевая соль гиалуроновой кислоты представляет собой линейный полимер, состоящий из повторяющихся димерных звеньев глюкуроновой кислоты и N–ацетилгалактозамина, при этом молекулярная масса повторяющегося звена составляет 401,3 Да. В данном примере представленные моли гиалуроновой кислоты относятся к молям повторяющегося звена, а эквиваленты реагентов, используемых в реакции с гиалуроновой кислотой, представлены относительно молей повторяющегося звена гиалуроновой кислоты. Средняя молекулярная масса полимера определяет среднее количество повторяющихся звеньев на нить полимера. Натриевая соль гиалуроновой кислоты, обозначенная поставщиком Lifecore Biomedical (HA200K, Часка, Миннесота) как имеющая номинальную среднюю молекулярную массу 200 кДа, может варьироваться в разных партиях в диапазоне 151–300 кДа, как определено с помощью вискозиметрии. В данном примере такая молекула натриевой соли гиалуроновой кислоты с предполагаемой номинальной средней молекулярной массой 200 кДа будет иметь среднюю длину примерно 500 мономерных звеньев.

Синтез [HA–N3]–23%

Раствор натриевой соли гиалуроновой кислоты (номинальная средняя

молекулярная масса 200 кДа; 250,1 мг, 0,623 ммоль; Lifecore Biomedical, LLC; номер продукта HA200K) полностью растворяли в 25 мл буфера MES (50 мМ, pH 5,5). К данному раствору добавляли хлорид 4–(4’,6’–диметокси–1’,3’,5’–триазин–2’–ил)–4–метилморфолин–4–ия (DMTMM, 295 мг, 1,07 ммоль, 1,71 экв.) с последующим добавлением через 5 мин 11–азидо–3,6,9–триоксаундекан–1–амина (N3–PEG3–NH2, 196 мг, 0,90 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, затем разбавляли с помощью 25 мл 0,25 М раствора NaCl и очищали с помощью тангенциальной поточной фильтрации.

Тангенциальную поточную фильтрацию проводили с использованием картриджа Vivaflow–50R с мембраной Hydrosart с MWCO 30 кДа от Sartorius, элюируя с помощью 400 мл 0,25 М раствора NaCl, а затем 400 мл воды.

Продукт подвергали быстрому замораживанию и лиофилизировали с получением титульного материала **[HA–N3]–23%**.

^{1}H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 4,45 (bs, 2H), 4,0–3,1 (m, 15,5H), 1,95 (s, 3H).

DOSY–ЯМР. Одномерные диффузионно–упорядоченные спектры ЯМР (DOSY) собирали с использованием индуцированного эха с одной последовательностью очищенных градиентных импульсов (stegp1s1d) на приборе Bruker AVANCE III, работающем при 400 МГц (для ^{1}H), с криозондом DCH диаметром 5 мм. Время диффузии и время градиента диффузии устанавливали на 50 мс и 4 мс соответственно. Два спектра собирали при силе градиента (gpz6), установленной на 2% и 95%. При сравнении двух спектров не были продемонстрированы различия, за исключением пика растворителя, что указывает на то, что в полимере отсутствуют примеси малых молекул.

Элементный анализ: C: 40,05%; H: 5,67%; N: 5,70%.

Степень замещения **[HA–N3]** определяли как % повторяющихся звеньев, в которых карбоксилатный компонент подвергался реакции с получением изображенного амида. Элементный анализ применяли для определения степени замещения. Соотношение [%C/%N], определенное с помощью элементного анализа очищенного образца, вводится в следующую формулу для определения степени замещения. Если y = [(%C)/(%N)]), тогда:

Степень замещения =

$$100 \times \frac{\frac{14 \times 12{,}01}{14{,}01 \times y} - 1}{4 - \frac{8 \times 12{,}01}{14{,}01 \times y}}$$

В данном примере степень замещения (DS) **[HA–N3]** составляла 23%.

Данная гиалуроновая кислота массой 200 кДа, функционализированная на 23% азидным линкером, обозначена как **[HA–N3]–23%**.

В остальных примерах гиалуроновая кислота массой 200 кДа, функционализированная на X% азидным линкером, обозначена как **[HA–N3]–X%**.

Соединения в таблице 16 получали, и их характеристики определяли с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **[HA–N3]–23%**. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что достигнутая степень замещения зависит от

указанного используемого исходного раствора реагента DMTMM и может быть уникальной. В целом, для указанного исходного раствора DMTMM степень замещения увеличивается с увеличением количества эквивалентов используемого DMTMM, и при этом степень замещения уменьшается с уменьшением количества эквивалентов используемого DMTMM. Некоторые промежуточные соединения [HA–N3] очищали с помощью диализа вместо тангенциальной поточной фильтрации (**[HA–N3]–23%b**, **[HA–N3]–37%**). В таких случаях регенерированную целлюлозную диализную мембрану (MWCO 1–25 кДа) заполняли неочищенной реакционной смесью, которую подвергали диализу в течение 1–3 дней против 0,25 M – 1 M NaCl с несколькими сменами раствора для диализа, а затем подвергали диализу в течение 1–3 дней против деионизированной воды также с несколькими сменами раствора для диализа. После завершения образец удаляли из диализной трубки, подвергали быстрому замораживанию и лиофилизировали.

Таблица 16. Иллюстративные функционализированные соединения гиалуроновой кислоты

Производное гиалуроновой кислоты	**DS**	**Эквиваленты DMTMM/N3–PEG3–NH2, используемые в реакции**	**Элементный анализ**
[HA–N3]–15%	15%	1,66/1,42	C: 39,80 H: 5,52 N: 4,93
[HA–N3]–22%	22%	1,65/1,42	C: 39,89 H: 5,76 N: 5,53
[HA–N3]–23%	23%	1,71/1,44	C: 40,05 H: 5,67 N: 5,70
[HA–N3]–23%b	23%	4,08/3,04	C:36,93 H: 5,97 N: 5,18
[HA–N3]–23%c	23%	1,60/1,02	C: 36,85 H: 6,44 N: 5,19
[HA–N3]–26%	26%	1,90/1,44	C: 39,78 H: 5,72 N: 5,92

[HA–N3]–33%	33%	1,75/1,43	C: 40,60 H: 5,97 N: 6,63
[HA–N3]–37%	37%	3,84/2,88	C: 39,87 H: 5,92 N: 6,82

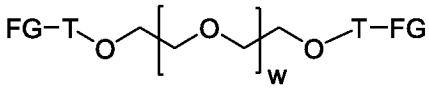
Пример 4

Получение полимеров PEG XL–1–XL–10

В данном примере описан синтез сшивающих средств, которые могут подвергаться реакции с другими функционализированными полимерами с образованием гидрогелей.

Сшивающие полимеры на основе PEG

Общая структура 1.



Общая структура 2.

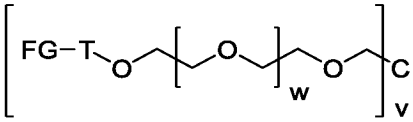
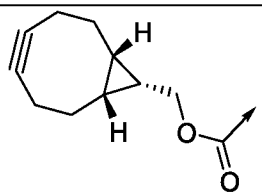
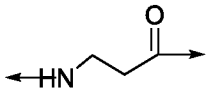
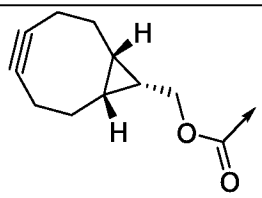
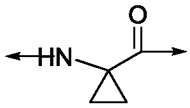
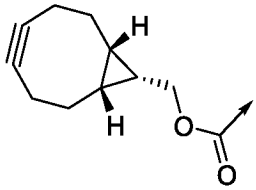
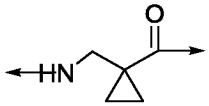
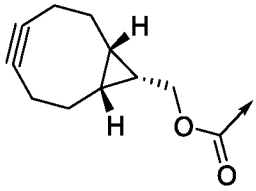
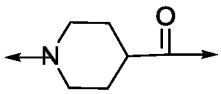
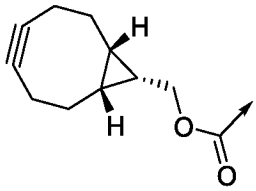
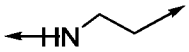
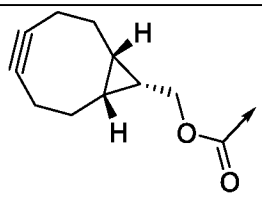
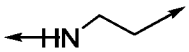
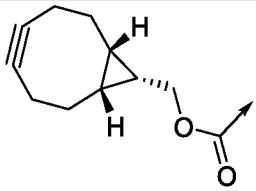
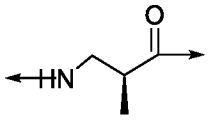
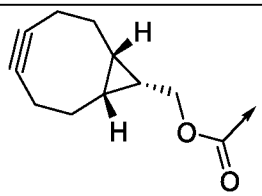
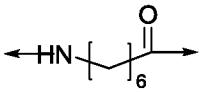
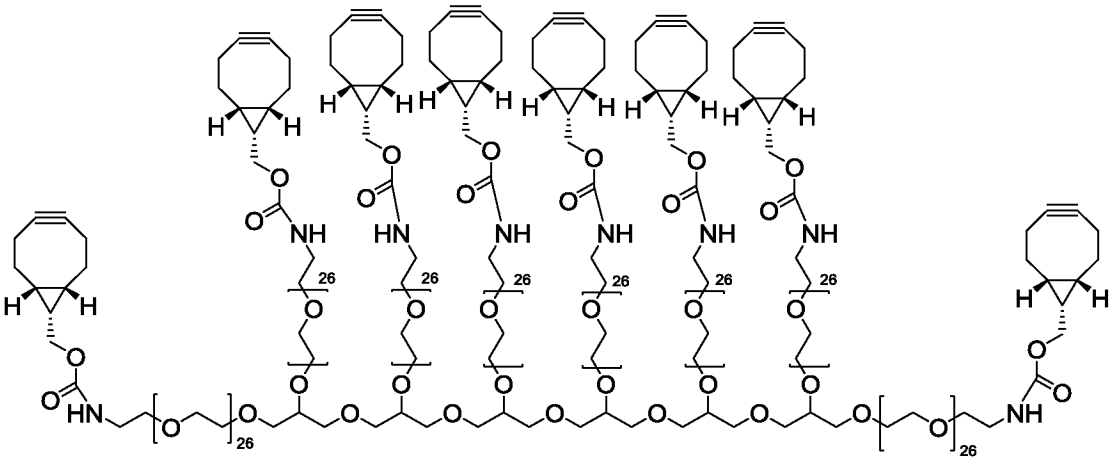


Таблица 17. Иллюстративные сшивающие соединения

Номер	**Общая структура**	**FG**	**T**	**v**	**~ M_n исходного PEG (Да)**
XL–1	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL–2	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL–3	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL–4	1			NA	2000 (w ~ 45)

XL–5	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL–6	2			4	10000 (w ~ 57)
XL–7 (коммерческий продукт)	2	N_3	$–CH_2CH_2–$	4	10000 (w ~ 57)
XL–9	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL–10	1			NA	2000 (w ~ 45)

Структура **XL–8**:



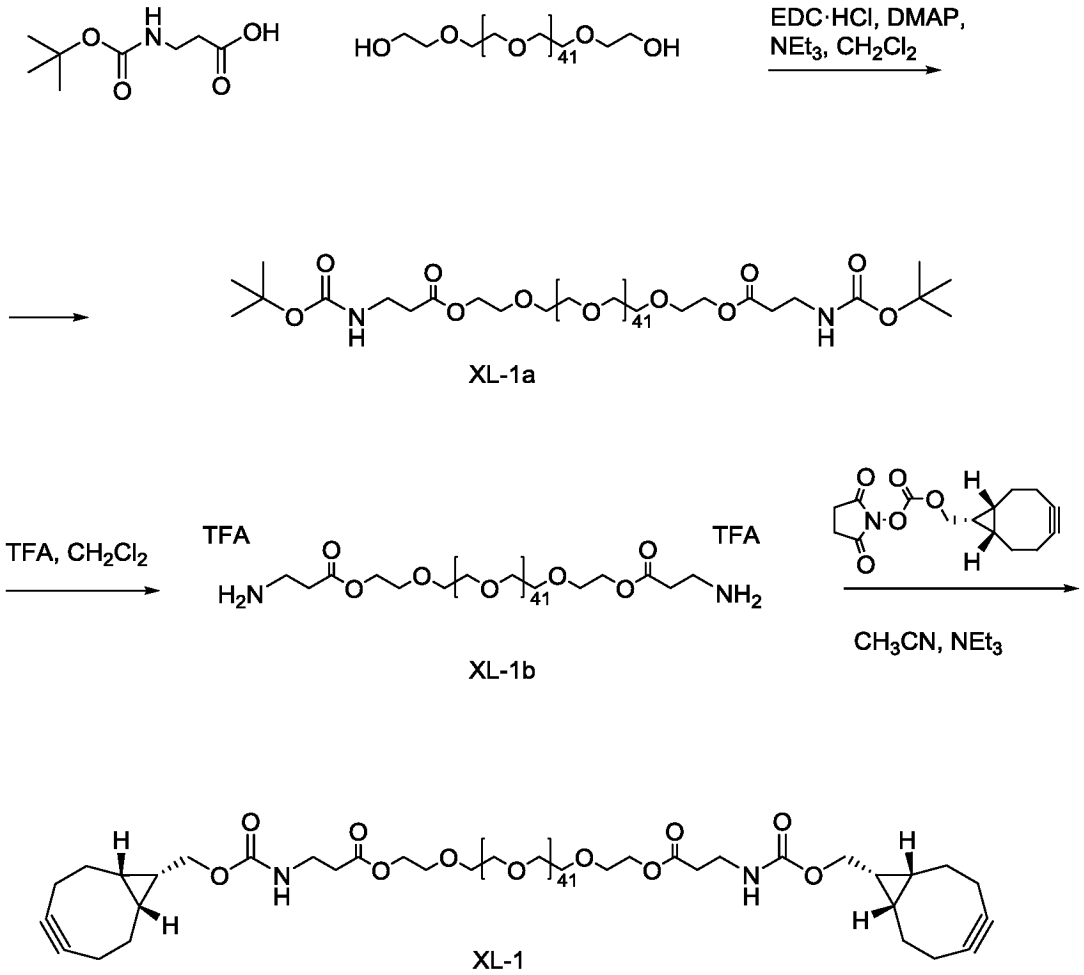
MW исходного PEG: M_n ~ 10000 кДа.

Синтез сшивающих полимеров на основе PEG

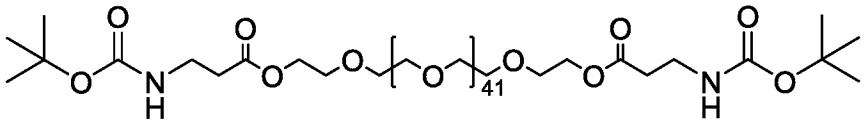
Степень замещения является важным параметром для сшивающих средств, полученных из PEG, и определяется как процентная доля концевых групп PEG, замещенных желаемой введенной функциональной группой. Степень замещения определяли с помощью ^{1}H–ЯМР для сравнения интегрирования сигналов метиленовой группы, специфичной для концевой группы PEG, с интегрированием сигналов протонов, специфичных для введенной функциональной группы. В **XL–1–XL–6** метиленовой группой, специфичной для PEG–компонента, была метиленовая группа сложного эфира

или карбамата [–(C=O)–O–C<u>H</u>$_2$–], которую сравнивали по интегрированию сигналов с протонами в бицикло[6.1.0]нон–4–иновом компоненте. Степень замещения = ((число молей введенной функциональной группы согласно ^{1}H–ЯМР)/(число молей концевой группы PEG согласно ^{1}H–ЯМР)) × 100.

XL–1. PEG(2000)–бис–[3–(((((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метокси)карбонил)амино)пропаноат]

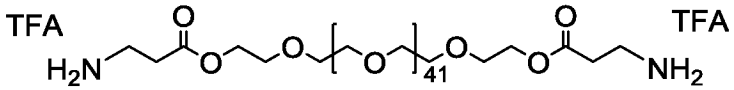


XL–1a. PEG(2000)–бис–[3–((трет–бутоксикарбонил)амино)пропаноат]



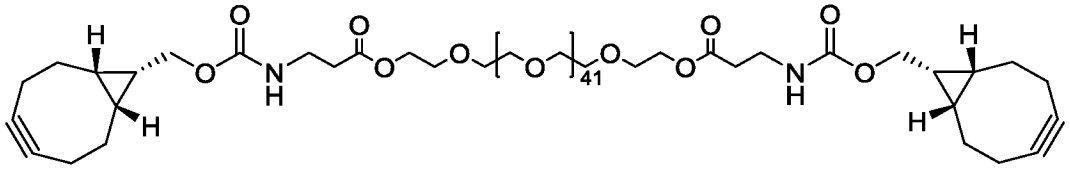
3–((трет–бутоксикарбонил)амино)пропановую кислоту (1,892 г, 10,00 ммоль) и PEG с M_n ~ 2 кДа (5 г, 2,500 ммоль) растворяли в 50 мл дихлорметана. Добавляли диметиламинопиридин (0,153 г, 1,250 ммоль) и EDC·HCl (1,922 г, 10,03 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш–хроматографии на диоксиде кремния с градиентом 0–15% дихлорметана в метаноле. Фракции, содержащие продукт, объединяли и доводили до сухого состояния с получением **XL–1a**. ^{1}H ЯМР (400 МГц, метанол–d4) δ 4,23 (m, 4H), 3,70 (m, 4H), 3,63 (br s, 167H), 2,52 (m, 4H), 1,43 (br s, 18H).

XL–1b. PEG(2000)–бис–[3–(амино)пропаноат] в форме соли бис–трифторуксусной кислоты



XL–1a (600 мг, 0,261 ммоль) растворяли в дихлорметане (6 мл). Добавляли трифторуксусную кислоту (2 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт растирали в порошок с использованием Et_2O дважды, затем высушивали под вакуумом с получением **XL–1b**. ^{1}H ЯМР (400 МГц, метанол–d4) δ 4,33 (m, 4H), 3,73 (m, 4H), 3,64 (br s, 183H), 2,80 (m, 4H).

XL–1–1. PEG(2000)–бис–[3–(((((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метокси)карбонил)амино)пропаноат]



XL–1b (200 мг, 0,086 ммоль) растворяли в ацетонитриле (3 мл). Добавляли триэтиламин (0,599 мл, 4,30 ммоль), затем добавляли ((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метил(2,5–диоксопирролидин–1–ил)карбонат (200 мг, 0,688 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью препаративной обращенно–фазовой HPLC со сбором фракций, запускаемым ELSD (способ, описанный ниже). Фракции, содержащие продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением **XL–1–1**. Для целей хранения **XL–1–1** сохраняли в виде раствора в ацетонитриле, DMSO или метаноле в морозильной камере. Аналитическая HPLC–CAD (способ, описанный ниже): время удерживания=11,93 мин. ^{1}H ЯМР (400 МГц, метанол–d4) δ 4,23 (m, 4H), 4,14 (m, 4H), 3,63 (br s, 175H), 2,54 (m, 4H), 2,22 (m, 12H), 1,60 (m, 4H), 1,37 (m, 2H), 0,94 (m, 4H).

Условия препаративной HPLC: Waters XBridge C18; размер частиц: 5 мкм; размер колонки: 19 × 250 мм; элюент/градиент: 5% CH_3CN/H_2O/0,5 мин, 5–95% CH_3CN/H_2O/12,5 мин, 95% CH_3CN/H_2O/3 мин; скорость потока: 30 мл/мин; температура колонки: комнатная температура.

Условия аналитической HPLC–CAD: Waters XBridge BEH300 C18; размер частиц: 3,5 мкм; размер колонки: 4,6 × 100 мм; элюент/градиент: 2% CH_3CN/H_2O/0,5 мин, 2–98% CH_3CN/H_2O/17,5 мин (CH_3CN, содержащий 0,05% TFA, и H_2O, содержащая 0,1% TFA); скорость потока: 1 мл/мин; температура колонки: 50°C.

Условия аналитической HPLC–CAD (способ 10): Waters ACQUITY BEH C18; размер частиц: 1,7 мкм; размер пор: 130Å; размер колонки: 2,1× 50 мм; элюент/градиент: 5% CH_3CN/H_2O/1,2 мин, 5–95% CH_3CN/H_2O/1,8 мин (CH_3CN, содержащий 0,1% TFA, и H_2O, содержащая 0,1% TFA); скорость потока: 1 мл/мин; температура колонки: 45°C.

В качестве альтернативы реакционную смесь непосредственно очищали

посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 0–10% метанол в дихлорэтане) с получением менее чистой партии XL–1–2.

Соединения из таблицы 18 получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **XL–1** (за исключением **XL–1–2**):

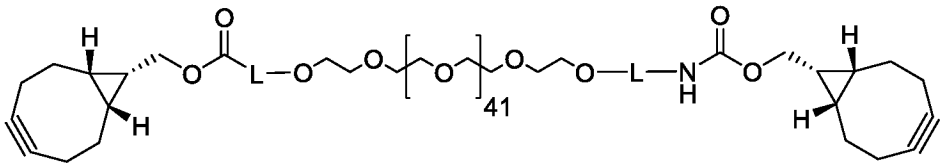
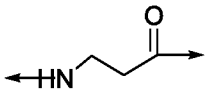
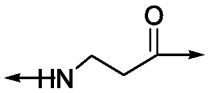
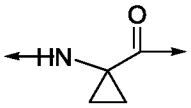
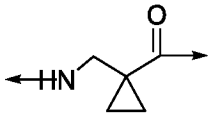
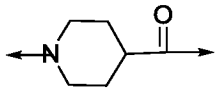
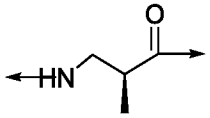
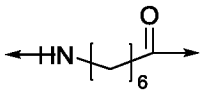


Таблица 18. Иллюстративные сшивающие полимеры на основе PEG				
Номер	**T**	**Количество концевых групп PEG, замещенных функциональной группой**	**Аналитическая HPLC (CAD) Время удерживания (мин)**	**^{1}H–ЯМР (400 МГц, метанол–d4)**
XL–1–1		2 из 2 100%	11,93 мин	δ 4,23 (m, 4H), 4,14 (m, 4H), 3,63 (br s, 175H), 2,54 (m, 4H), 2,22 (m, 12H), 1,60 (m, 4H), 1,37 (m, 2H), 0,94 (m, 4H)
XL–1–2		(1,5–1,8) из 2 75%	NA	δ 4,23 (m, 4H), 4,14 (m, 3,3H), 3,63 (br s, 156H), 2,55 (m, 4H), 2,21 (m, 9,6H), 1,60 (m, 3,6H), 0,94 (m, 3,9H)
XL–2		2 из 2 100%	12,20 мин	δ 4,23 (m, 8H), 3,63 (br s, 180H), 2,23 (m, 12H), 1,61 (m, 4H), 1,48 (m, 4H), 1,39 (m, 2H), 1,15 (m, 4H), 0,95 (m, 4H).

XL–3		2 из 2 100%	12,93 мин	δ 4,19 (m, 8H), 3,85–3,43 (m, 192H), 3,36 (br s, 4H), 2,22 (m, 12H), 1,60 (m, 4H), 1,38 (m, 2H), 1,19 (m, 4H), 0,95 (m, 8H).
XL–4		2 из 2 100%	13,25 мин	δ 4,22 (m, 8H), 4,02 (m, 4H), 3,84–3,43 (m, 194H), 3,00 (br s, 4H), 2,60 (m, 2H), 2,23 (m, 12H), 1,91 (m, 4H), 1,61 (m, 8H), 1,42 (m, 2H), 0,97 (m, 4H).
XL–9		2 из 2 100%	1,85 мин (способ 10)	δ 4,29–4,19 (m, 4H), 4,14 (d, J=8,1 Гц, 4H), 3,87–3,41 (m, 179H), 3,28–3,18 (m, 3H), 2,78–2,62 (m, 2H), 2,37–2,06 (m, 12H), 1,72–1,51 (m, 4H), 1,47–1,31 (m, 2H), 1,21–1,09 (m, 6H), 1,04–0,87 (m, 4H).
XL–10		2 из 2 100%	1,96 мин (способ 10)	δ 4,25–4,18 (m, 4H), 4,13 (d, J=8,3 Гц, 4H), 3,85–3,40 (m, 178H), 3,09 (t, J=7,0 Гц, 4H), 2,34 (t, J=7,5 Гц, 4H), 2,31–2,09 (m, 11H), 1,72–1,54

				(m, 8H), 1,54–1,44 (m, 4H), 1,44–1,25 (m, 11H), 1,03–0,85 (m, 4H).

Промежуточные соединения, используемые для синтеза сшивающих полимеров на основе PEG:

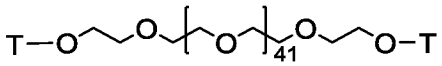
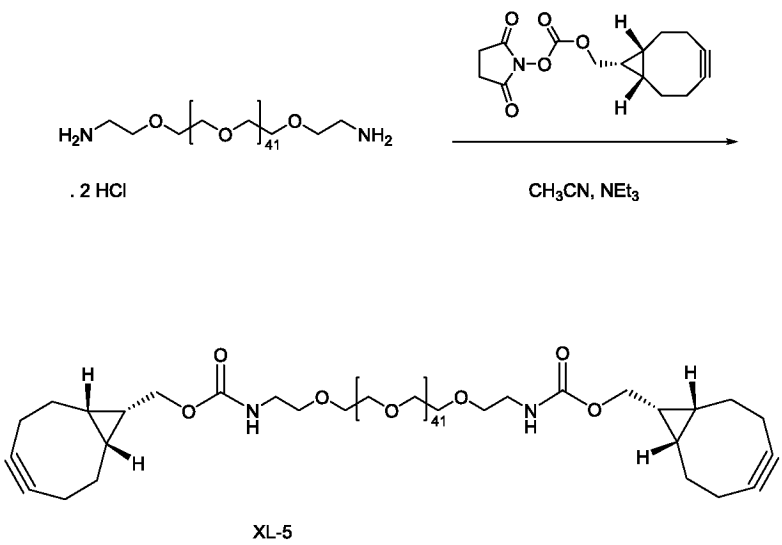


Таблица 19. Иллюстративные сшивающие полимеры на основе PEG			
Номер	**T**	**Количество концевых групп PEG, замещенных функциональной группой**	**^{1}H–ЯМР (400 МГц)**
XL–2a		2 из 2 100%	(хлороформ–d) δ 4,23 (m, 4H), 3,64 (br s, 165H), 1,52 (br m, 4H), 1,45 (br s, 18H), 1,16 (br m, 4H).
XL–3a		2 из 2 100%	(метанол–d4) δ 4,23 (m, 4H), 3,83–3,41 (m, 181H), 1,44 (br s, 18H) 1,17 (m, 4H), 0,94 (m, 4H).
XL–4a		2 из 2 100%	(метанол–d4) δ 4,23 (m, 4H), 3,95 (m, 4H), 3,85–3,41 (m, 180H), 2,92 (br s, 4H), 2,57 (m, 2H), 1,89 (m, 4H), 1,56 (m, 4H), 1,45 (m, 18H).
XL–9a		2 из 2 100%	(метанол–d_4) δ 4,31–4,17 (m, 4H), 3,83–3,44 (m, 179H), 3,27–3,15 (m, 4H), 2,72–2,61 (m, 2H), 1,50–1,39 (m, 18H), 1,14 (d, J=7,2 Гц, 6H).
XL–10a		2 из 2 100%	(метанол–d_4) δ 4,27–4,15 (m, 4H), 3,83–3,44 (m, 180H), 3,04–2,99 (m, 4H), 2,34 (t,

			J=7,3 Гц, 4H), 1,68–1,57 (m, 4H), 1,55–1,40 (m, 22H), 1,39–1,27 (m, 9H).
XL–2b	Соль бис–TFA	2 из 2 100%	(хлороформ–d) δ 4,23 (m, 4H), 3,64 (br s, 165H), 1,55 (br m, 4H), 1,19 (br m, 4H).
XL–3b	Соль бис–TFA	2 из 2 100%	(метанол–d4) δ 4,33 (m, 4H), 3,88–3,42 (m, 184H), 2,91 (br m, 4H), 3,22 (br s, 2H), 1,41 (m, 4H), 1,15 (m, 4H),
XL–4b	Соль бис–TFA	2 из 2 100%	(метанол–d4) δ 4,30 (m, 4H), 3,85–3,54 (m, 178H), 3,39 (m, 4H), 3,15, (m, 4H), 2,79 (m, 2H), 2,14 (m, 4H), 1,95 (m, 4H).
XL–9b	Соль бис-TFA	2 из 2 100%	(метанол–d_4) δ 4,56–4,43 (m, 2H), 4,32–4,20 (m, 2H), 3,92–3,41 (m, 180H), 3,25–3,12 (m, 4H), 2,99–2,84 (m, 2H), 1,28 (d, J=7,0 Гц, 6H).
XL–10b	Соль бис-TFA	2 из 2 100%	(метанол–d_4) δ 4,25–4,19 (m, 4H), 4,10–3,41 (m, 180H), 3,04–2,90 (m, 4H), 2,44–2,30 (m, 4H), 1,77–1,55 (m, 8H), 1,54–1,33 (m, 8H).

XL–5. PEG(2000)–бис–[3–(((((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метилкарбамоил]

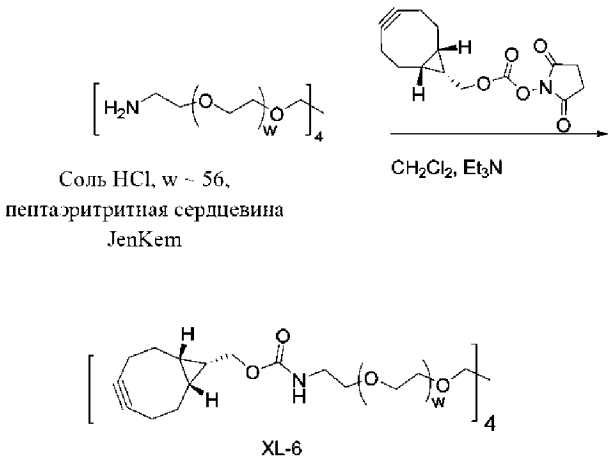


Гидрохлорид PEG–диамина с M_n ~ 2 кДа (JenKem Technology, 300 мг, 0,148 ммоль) растворяли в ацетонитриле (3 мл). Добавляли триэтиламин (0,413 мл, 2,96 ммоль), затем добавляли ((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метил(2,5–диоксопирролидин–1–ил)карбонат (345 мг, 1,184 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью препаративной обращенно–фазовой HPLC со сбором фракций, запускаемым ELSD (способ, описанный ниже). Фракции, содержащие продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением **XL–5**. Для целей хранения **XL–5** сохраняли в виде раствора в ацетонитриле, DMSO или метаноле в морозильной камере. Аналитическая HPLC–CAD (способ, описанный ниже): время удерживания=11,85 мин. ^{1}H ЯМР (400 МГц, метанол–d4) δ 4,14 (m, 4H), 3,63 (br s, 186H), 3,54 (m, 4H), 2,22 (m, 12H), 1,61 (m, 4H), 1,38 (m, 2H), 0,94 (m, 4H).

Условия препаративной HPLC: Waters XBridge C18; размер частиц: 5 мкм; размер колонки: 19 × 250 мм; элюент/градиент: 5% CH_3CN/H_2O/0,5 мин, 5–95% CH_3CN/H_2O/12,5 мин, 95% CH_3CN/H_2O/3 мин; скорость потока: 30 мл/мин; температура колонки: комнатная температура.

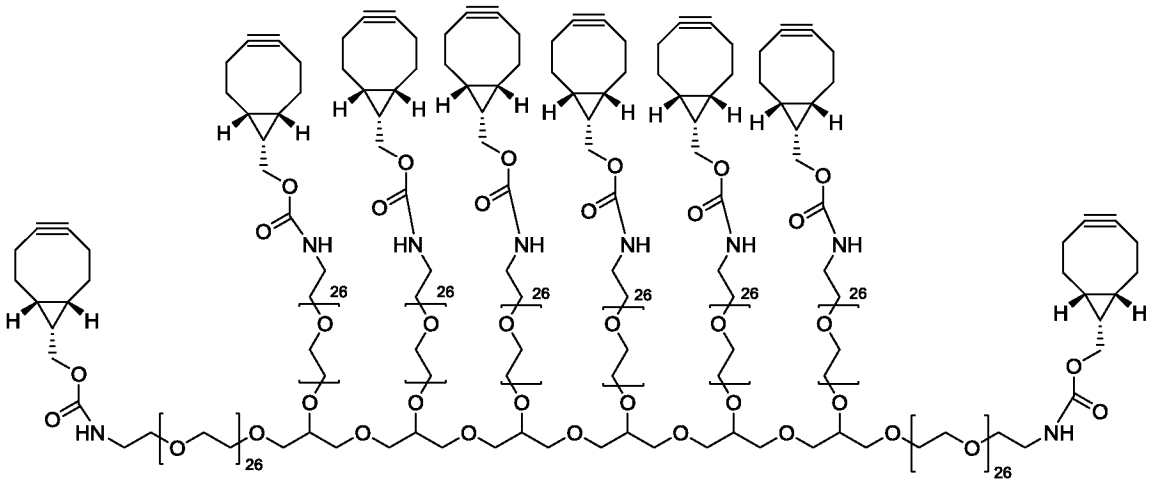
Условия аналитической HPLC–CAD: Waters XBridge BEH300 C18; размер частиц: 3,5 мкм; размер колонки: 4,6 × 100 мм; элюент/градиент: 2% CH_3CN/H_2O/0,5 мин, 2–98% CH_3CN/H_2O/17,5 мин (CH_3CN, содержащий 0,05% TFA, и H_2O, содержащая 0,1% TFA); скорость потока: 1 мл/мин; температура колонки: 50°C.

XL–6. PEG(10000)–тетра–[3–(((((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метилкарбамоил]



Гидрохлорид PEG–амина с 4 ветвями с M_n ~ 10 кДа (пентаэритритная сердцевина, JenKem Technology, 500 мг, 0,05 ммоль) растворяли в дихлорметане (15 мл). Добавляли триэтиламин (0,554 мл, 4,00 ммоль), затем добавляли ((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метил(2,5–диоксопирролидин–1–ил)карбонат (175 мг, 0,600 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью диализа против метанола с использованием регенерированной целлюлозной диализной мембраны Spectra/Por 6 с MWCO 2 кДа (Spectrum, Inc). Для анализа и использования в дальнейших реакциях **XL–6** выделяли путем концентрирования с помощью роторного испарителя. Для целей хранения соединение сохраняли в виде раствора в метаноле при комнатной температуре. ^{1}H ЯМР (400 МГц, метанол–d4) δ 4,14 (m, 8H), 3,63 (br s, 995H), 2,22 (m, 24H), 1,61 (m, 8H), 1,38 (m, 4H), 0,94 (m, 8H).

XL–8.



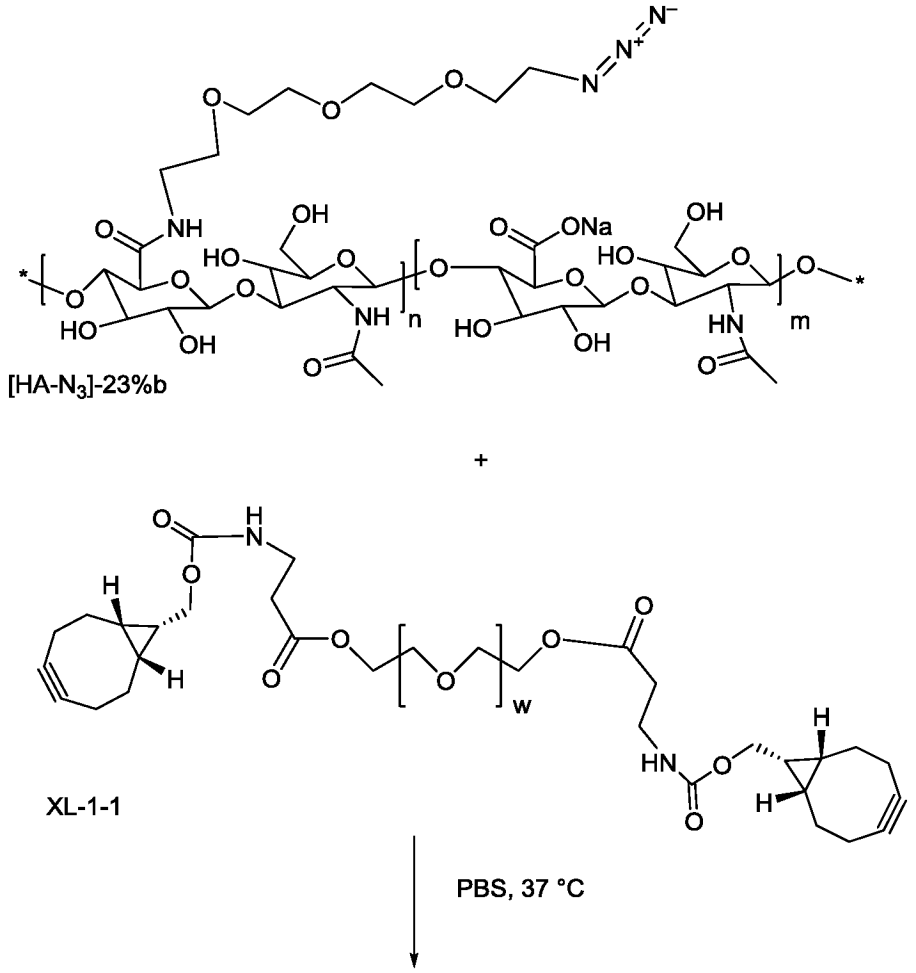
Гидрохлорид PEG–амина с 8 ветвями с M_n ~ 10 кДа (гексаглицериновая сердцевина, JenKem Technology, 800 мг, 0,08 ммоль) растворяли в дихлорметане (5 мл). Добавляли триэтиламин (0,887 мл, 6,40 ммоль), затем добавляли ((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метил(2,5–диоксопирролидин–1–ил)карбонат (807 мг, 2,56 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Реакционную смесь концентрировали с помощью роторного испарителя, затем растворяли в метаноле и очищали с помощью диализа против метанола с использованием

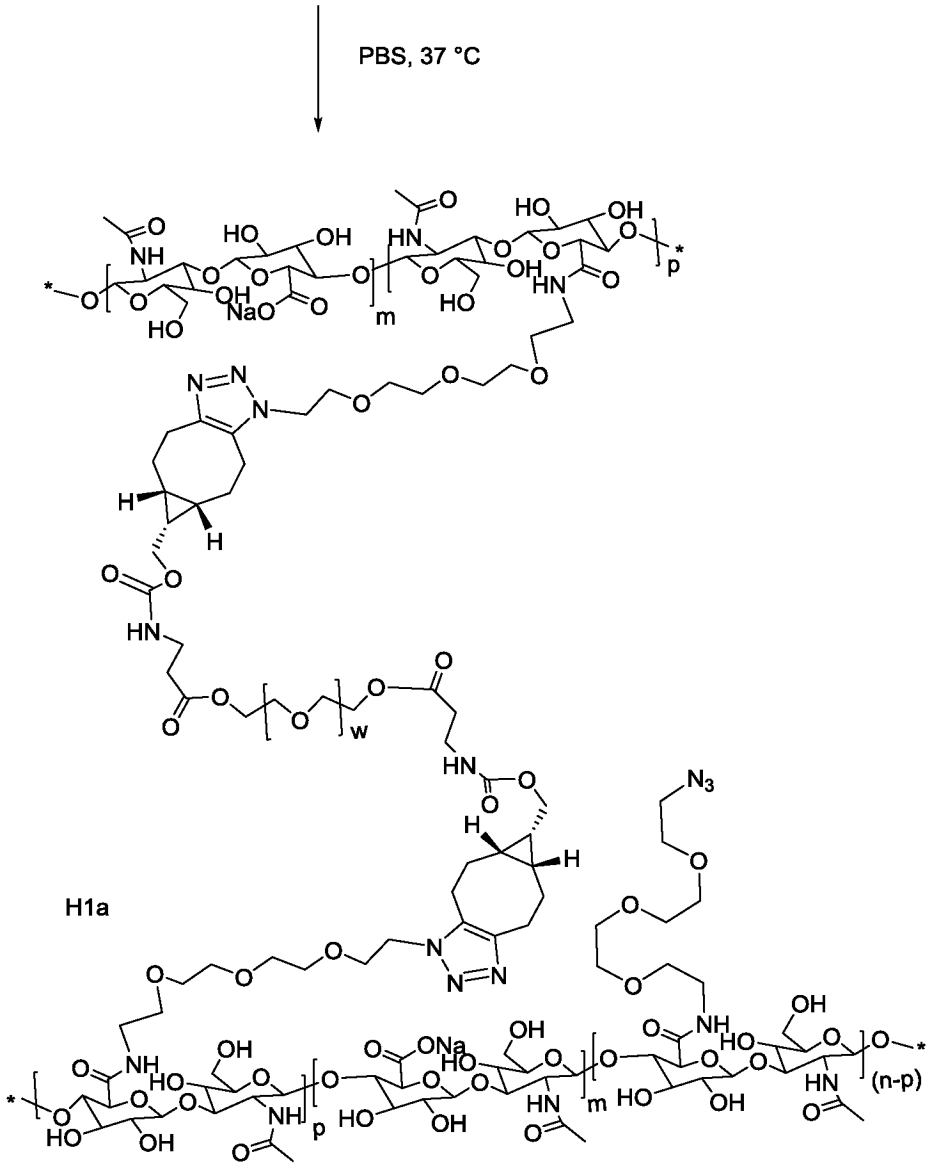
регенерированной целлюлозной диализной мембраны Spectra/Por 6 с MWCO 2 кДа (Spectrum, Inc). Для анализа и использования в дальнейших реакциях, **XL–8** выделяли путем концентрирования с помощью роторного испарителя, однако, для целей хранения **XL–8** сохраняли в виде раствора в метаноле при комнатной температуре. ^{1}H ЯМР (400 МГц, метанол–d4) δ 4,14 (m, 16H), 3,63 (br s, 935H), 2,23 (m, 48H), 1,61 (m, 16H), 1,38 (m, 8H), 0,95 (m, 16H).

Пример 5

В данном примере описан синтез гидрогелей, получаемых путем осуществления реакции соответствующим образом функционализированных полимеров со сшивающими средствами.

Синтез гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты: H1a





[HA–N3]–23%b (60 мг, 136 мкмоль, степень замещения=23%) растворяли в 3,8 мл стерильного буфера 1× PBS, pH 7,4, при комнатной температуре в течение 30 мин в пробирке Eppendorf объемом 5 мл. Молекулярная масса незамещенного повторяющегося димерного звена в форме карбоксилатной соли натрия составляет 401,3 Да. MW азидилированного повторяющегося димерного звена составляет 579,6 Да. Средняя MW димерного звена **[HA–N3]–23%b** в форме соли натрия составляет 442,3 Да = ((401,3 × 0,77) + (579,6 × 0,23)). При использовании средней MW димерного звена в форме соли натрия общее число молей повторяющегося димерного звена составляет 136 мкмоль, и число молей азидилированного повторяющегося димерного звена составляет 31 мкмоль.

К данному раствору добавляли 50 мг/мл раствора **XL–1–1** (0,215 мл, 4,30 мкмоль реагента, при предположении, что MW составляет 2500 Да, 8,60 мкмоль реакционноспособных функциональных групп). В результате этого получали раствор, который имел концентрацию 1,5% вес/об. по **[HA–N3]–23%b**, где согласно предсказанию 6,3% повторяющихся звеньев **[HA–N3]–22%b** были сшиты с помощью **XL–1–1]** ((8,60 мкмоль [реакционноспособных функциональных групп XL–1–1] / 136 мкмоль [звеньев

HA) × 100=6,3%).

Смесь в течение непродолжительного времени перемешивали вихревым способом с целью смешивания, затем распределяли в два шприца объемом 3 мл, которые закупоривали и выдерживали при 37°C в течение ночи с получением **H1a**. Визуальный осмотр (тест на инверсию) продемонстрировал успешное гелеобразование.

Получение частиц гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты

2 мл **H1a** проталкивали через дисковое сито из нержавеющей стали на 100 меш в шприц объемом 5 мл с получением крупных частиц геля. В данный шприц добавляли 1 мл 1× PBS с последующим перемешиванием вихревым способом с целью смешивания. Шприц выдерживали при комнатной температуре в течение 6 ч. для обеспечения возможности набухания гидрогеля. В результате этого получали смесь, которая имела концентрацию 1,0% по **[HA–N3]–23%b**. Набухшие крупные частицы геля **H1a** проталкивали 20 раз через дисковое сито из нержавеющей стали на 200 меш с получением мелких частиц геля в качестве конечного продукта.

Гидрогели на основе гиалуроновой кислоты (и соответствующие частицы гидрогеля), перечисленные в таблице 20, получали аналогично **H1a**. Гидрогель определяли по используемому компоненту **[HA–N3]** и его концентрации в реакции сшивания, а также по используемому сшивающему средству на основе PEG и степени, в которой ожидалось образование сшивок с главной цепью полимера (% сшивания).

Таблица 20. Иллюстративные гидрогели на основе гиалуроновой кислоты

Номер	**[HA–N_3]–X%**	**Концентрация [HA–N3] в реакции образования гидрогеля**	**XL–m**	**% сшивания в гидрогеле**
H1a	[HA–N_3]–23%b	1,5%	**XL–1–1**	6,3
H1b	[HA–N_3]–23%b	1,0%	**XL–1–1**	4,5
H1c	[HA–N_3]–37%	1,0%	**XL–1–1**	5,3
H1e	[HA–N_3]–22%	1,4%	**XL–1–1**	6,3
H1f	[HA–N_3]–23%b	1,0%	**XL–1–1**	5,9
H2	[HA–N_3]–23%	1,4%	**XL–2**	6,4
H5	[HA–N_3]–26%	1,4%	**XL–5**	6,3
H6	[HA–N_3]–37%	1,8%	**XL–6**	5,6
H7	[HA–N_3]–23%c	1,5%	**XL–9**	6,1

H8	[HA–N_3]–23%c	1,5%	**XL–10**	6,2

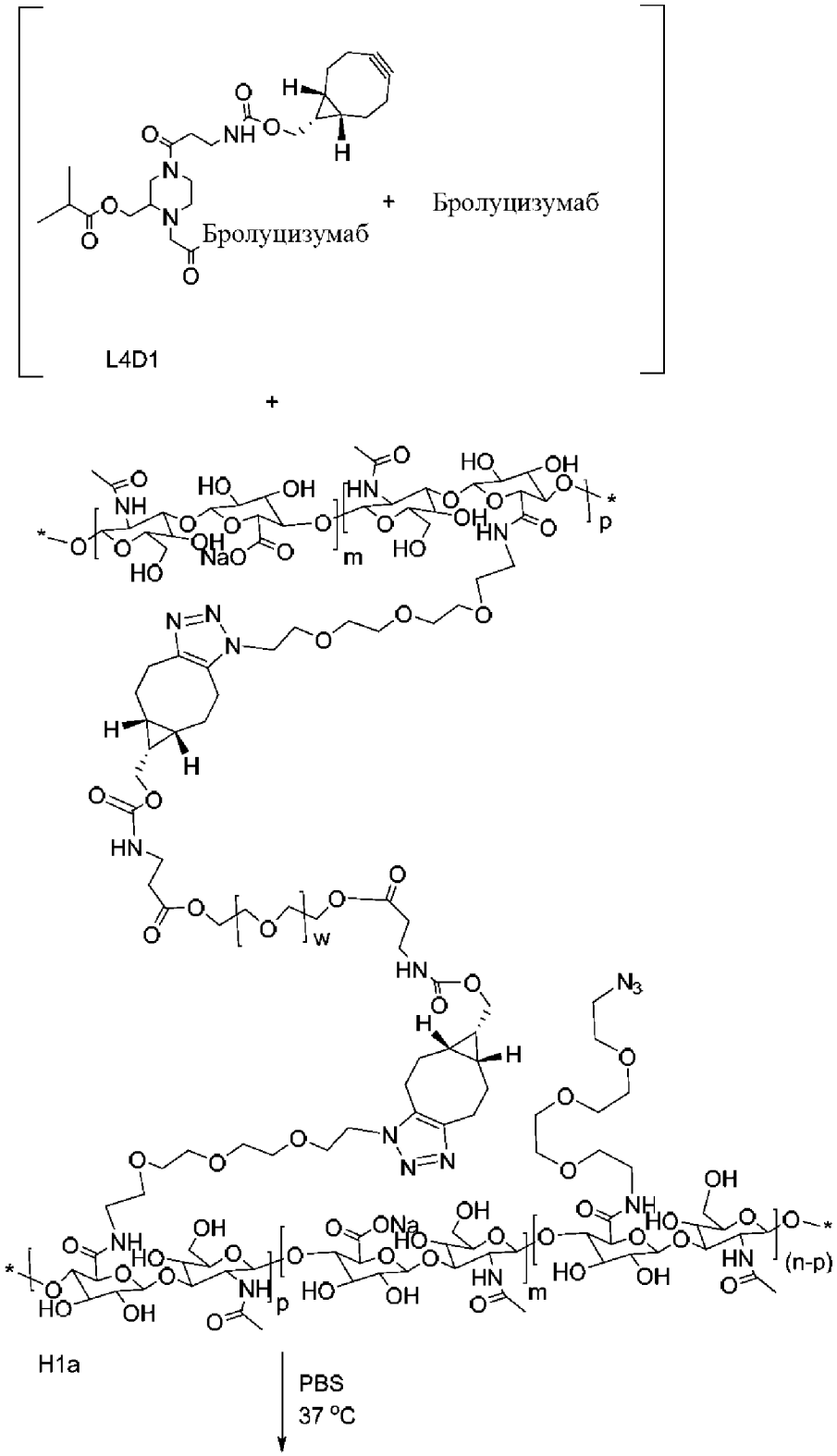
Пример 6

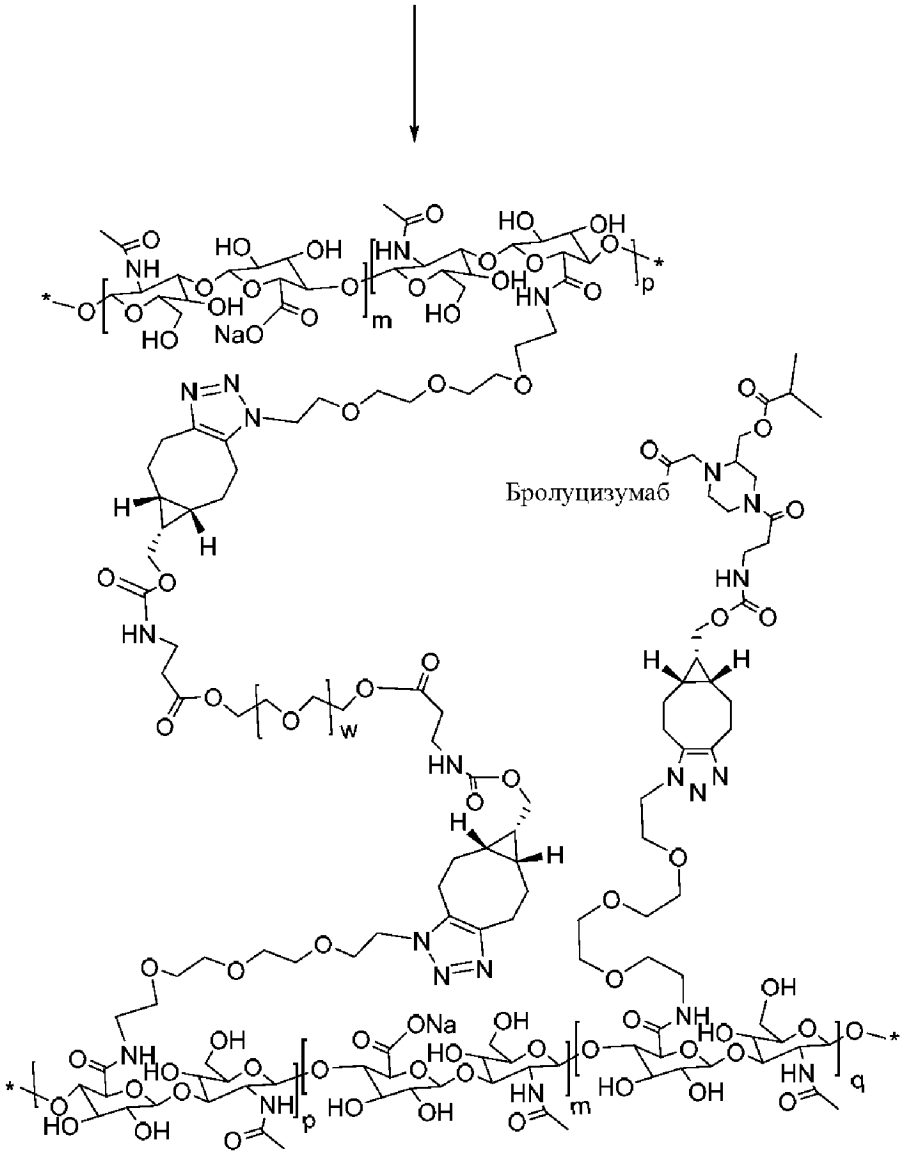
Синтез конъюгатов гидрогель–лекарственное средство

В данном примере описан синтез конъюгатов гидрогель–лекарственное средство, в которых лекарственное средство конъюгировано с носителем посредством бесследного линкера.

При получении образцов для дозирования in vivo все манипуляции с материалами или растворами, которые не были закупорены, проводили в вытяжном шкафу с ламинарным потоком в асептических условиях. Все используемые расходные материалы предварительно не открывали и обозначали как "стерильные".

C4b (H1a–L4D1)


Бролуцизумаб
+ Бролуцизумаб
L4D1
+
H1a
PBS
37 °C



C4b

Суспензию частиц гидрогеля на основе **H1a** (2,5 мл, 10 мг/мл, 23 мМ для общего количества повторяющихся димерных звеньев) обрабатывали раствором **L4D1b** (14,5 мл 42 мг/мл раствора в 1× PBS), перемешивали вихревым способом и выдерживали при 37°C в течение ночи. Реакционную пробирку центрифугировали (центробежное ускорение 1000 g, 5 мин), и из пробирки удаляли надосадочную жидкость с помощью иглы и шприца. Свежий 1× PBS (10–15 мл) добавляли в пробирку, которую встряхивали для ресуспендирования геля. Центрифугирование, удаление надосадочной жидкости и разбавление свежим буфером повторяли. Промывание продолжали до прекращения выявления бролуцизумаба в надосадочной жидкости (для выявления поглощения при 280 нм использовали спектрофотометр NanoDrop, общее количество промывочного PBS ~ 65 мл). Оставшийся осадок гидрогеля **[C4b]** переносили в шприц для хранения и

отмеривания.

Ключевым показателем конъюгатов гидрогель–лекарственное средство является количество нагруженного лекарственного средства на объем гидрогеля (= нагрузка лекарственного средства). Если лекарственное средство представляет собой белок, существует несколько способов определения нагрузки.

Белковую нагрузку гидрогеля определяли посредством принудительного высвобождения конъюгированного белка из известного объема гидрогеля с последующим количественным определением высвободившегося белка. В данном примере 37,3 мкг **[C4b]** отвешивали в реакционную пробирку (это соответствует 37,3 мкл образца при предположении, что плотность данного гидрогеля составляет ~ 1 г/мл). Образец обрабатывали 1 М буфером трис·HCl, pH 9,5 (1 мл), перемешивали вихревым способом и встряхивали при 37°C в течение 48 ч. (или до тех пор, пока измеряемая концентрация не достигала равновесного состояния). Измеренная (спектрофотометром NanoDrop) концентрация высвободившегося лекарственного средства (бролуцизумаба) в данном образце составляла 0,48 мг/мл, что соответствует 13,35 мг бролуцизумаба/мл гидрогеля в **[C4b]** ((0,048 мг/мл/0,0373 мл) × (общий объем 1,0373 мл) = 13,35 мг/мл). Данный анализ проводили в трех повторностях. Средняя определенная нагрузка белка для **[C4b]** до разбавления составляла 13,9 мг бролуцизумаба/мл гидрогеля.

Альтернативный способ определения нагрузки белка основан на расчетах разности. В данном способе измеренное (спектрофотометром Nanodrop) количество бролуцизумаба, извлеченного из смывов с гидрогеля, вычитают из известного общего количества добавленного белка (например: бролуцизумаб+**L4D1**). Разность дает нагрузку бролуцизумаба из расчета общего объема гидрогеля.

Гидрогели из таблицы 21 получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **C4b**.

Таблица 21. Иллюстративные конъюгаты гидрогель–лекарственное средство

Номер	**Исследование**	**Используемый аддукт линкер–лекарственное средство**	**Используемый гидрогель**	**Нагрузка лекарственного средства (мг/мл)**	**Аналитический способ**
C1a	Пример 8.1, высвобождение in vitro	**L1D1**	**H1c**	12,0	Разность
C2a	Пример 8.1, высвобождение in vitro	**L2D1a**	**H1c**	14,1	Разность
C2b	Пример 9.1,	**L2D1b**	**H1b**	10,2	Разность

	исследование in vivo				
C3a	Пример 8.1, высвобождение in vitro	**L3D1a**	**H1c**	15,0	Разность
C3b		**L3D1b**	**H1a**	11,4	Принудительное высвобождение
C6		**L3D1c**	**H2**	21,7	Принудительное высвобождение
C4a	Пример 8.1, высвобождение in vitro	**L4D1a**	**H1c**	18,5	Разность
C4b		**L4D1b**	**H1a**	13,9	Принудительное высвобождение
C7		**L4D1c**	**H2**	17,0	Принудительное высвобождение
C5		**L5D1**	**H1e**	11,1	Принудительное высвобождение
C8		**L1D2a**	**H6**	17,2	Принудительное высвобождение
C10	Пример 8.2, высвобожден	**L1D2b**	**H5**	13,2	Разность

	ие in vitro				
C11	Пример 8.2, высвобождение in vitro	**L2D2**	**H5**	12,5	Разность
C12	Пример 8.2, высвобождение in vitro	**L5D2**	**H5**	10,6	Разность
C9		**L1D3**	**H6**	3,2	Принудительное высвобождение
C14		**L4D1d**	**H7**	14,7	Принудительное высвобождение
C15		**L4D1d**	**H8**	15,6	Принудительное высвобождение

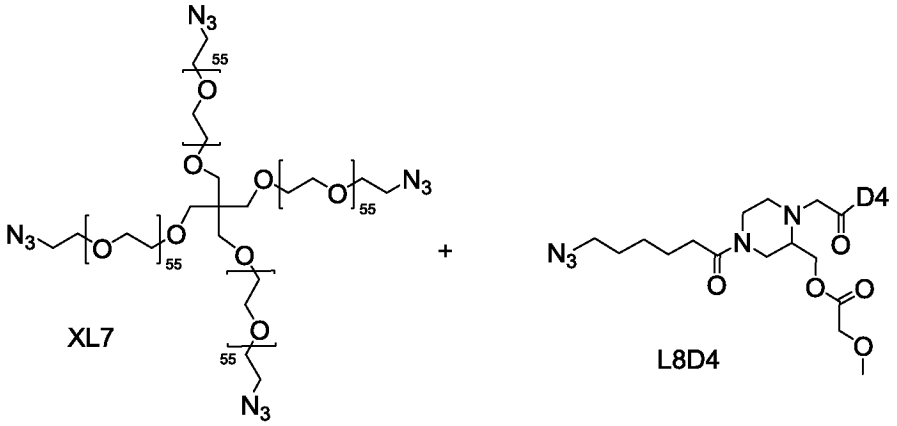
Конъюгат гидрогель–лекарственное средство можно разбавлять с помощью 1× PBS до достижения желаемой конечной концентрации лекарственного средства для дозирования. Количество 1× PBS, которое должно быть добавлено, можно рассчитать с помощью следующего уравнения: (разбавитель PBS (мл)) = [(общее количество лекарственного средства (мг) / желаемая нагрузка лекарственного средства (мг/мл)] − (начальный объем конъюгата (мл)).

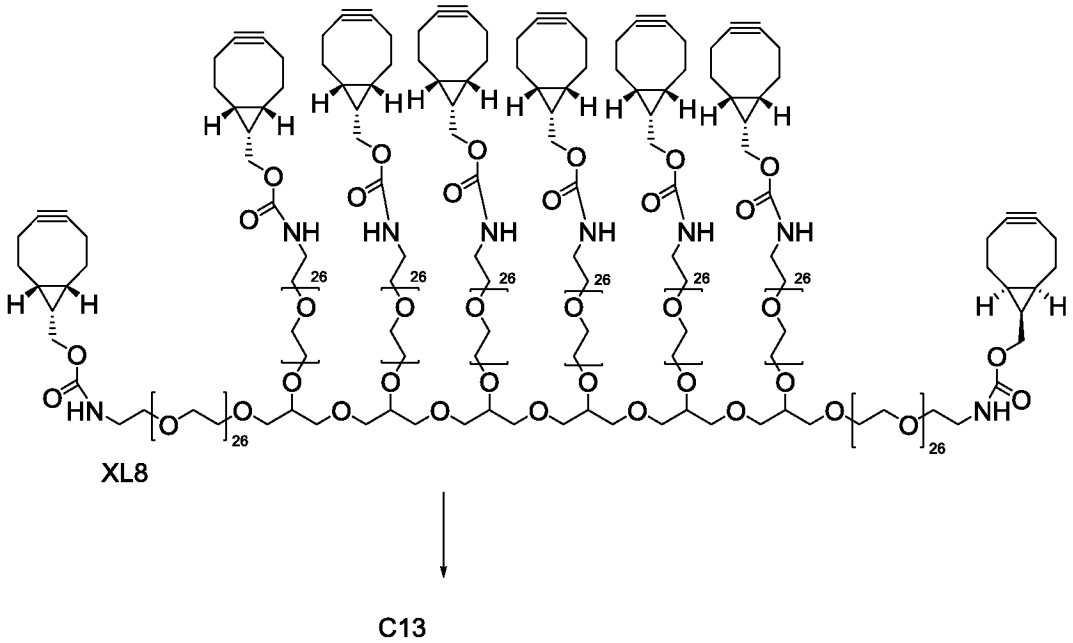
Конъюгат **C4b** (2 мл конъюгата гидрогеля, 13,9 мг/мл бролуцизумаба, общее количество бролуцизумаба=27,8 мг), полученный в соответствии с описанным выше, разбавляли посредством добавления 1× PBS (0,8 мл). Шприц закупоривали и энергично встряхивали для гомогенизации. В результате этого получали общий объем образца 2,8 мл с нагрузкой белка=27,8 мг бролуцизумаба/2,8 мл=9,93 мг/мл бролуцизумаба.

Конъюгат **C4b** отмеривали для дозирования в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл с присоединенными иглами 30G посредством удаления поршня и заполнения желаемым объемом **C4b**.

Конъюгаты гидрогель–лекарственное средство хранили при 4°C.

Синтез конъюгата гидрогель–лекарственное средство: C13





Аддукт линкер–лекарственное средство **L8D4** (трис–трифторацетатную соль, 19,9 мг, 8,86 мкмоль) обрабатывали раствором **XL–8** (0,157 мл 200 мг/мл раствора в DMSO), встряхивали и выдерживали в течение 80 мин, после чего анализ методом HPLC демонстрировал полное конъюгирование **L8D4** с **XL–8**. К данному раствору добавляли раствор **XL–7** (0,154 мл 200 мг/мл раствора в DMSO). Реакционную смесь встряхивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 4 ч.

Гелевую массу проталкивали через дисковое сито из нержавеющей стали на 100 меш в шприц объемом 3 мл с получением крупных частиц геля. В данный шприц добавляли 2 мл DMSO с последующим перемешиванием вихревым способом с целью смешивания. Шприц выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. для обеспечения возможности набухания геля. Набухшие крупные частицы геля проталкивали 20 раз через дисковое сито из нержавеющей стали на 200 меш с получением мелких частиц геля.

Суспензию мелких частиц геля (в закупоренном шприце) центрифугировали в течение 5 мин при центробежном ускорении 2000 g для осаждения геля. Надосадочную

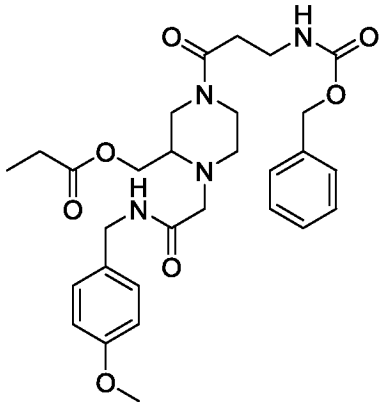
жидкость удаляли с помощью иглы и шприца, и осадок промывали холодным 1× PBS, pH 6,5, следующим образом для удаления неконъюгированных соединений из геля. Суспензию центрифугировали при центробежном ускорении 2000 g в течение 5 мин для осаждения геля. Надосадочную жидкость удаляли из шприца с помощью иглы и шприца, добавляли свежий 1× PBS, pH 6,5, для заполнения шприца, и закупоренный шприц встряхивали для ресуспендирования геля. Центрифугирование, удаление надосадочной жидкости и разбавление свежим буфером повторяли еще четыре раза. После заключительного центрифугирования и удаления буфера надосадочную жидкость тестировали в отношении эндотоксинов, и промытый осадок геля разбавляли с помощью 1× PBS, pH 6,5, до конечного общего объема 1,4 мл. Разбавленную суспензию частиц перешивали вихревым способом с целью смешивания, и продукт **C13** хранили при 4°C.

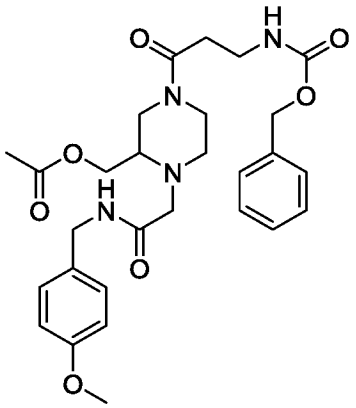
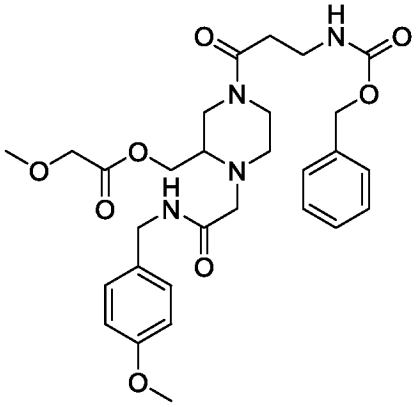
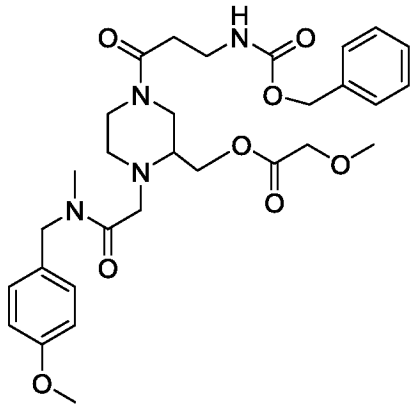
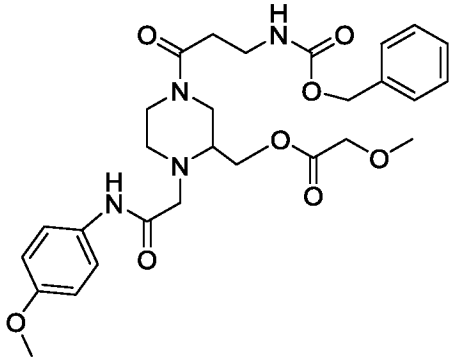
Концентрация D4 в **C13** (при предположении 100% конъюгирования) составляла 10,3 мг/мл.

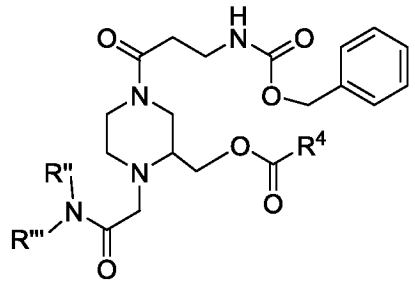
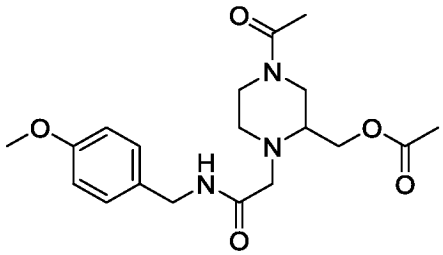
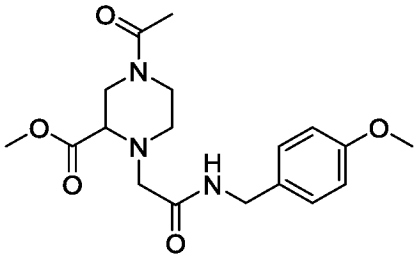
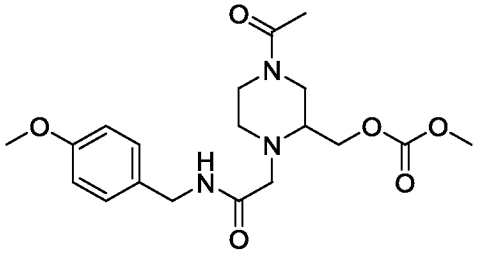
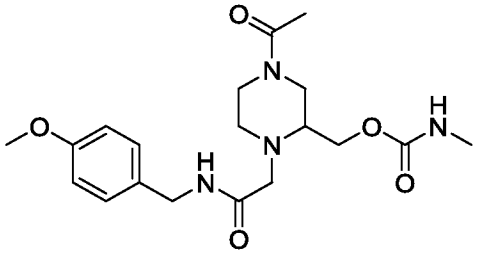
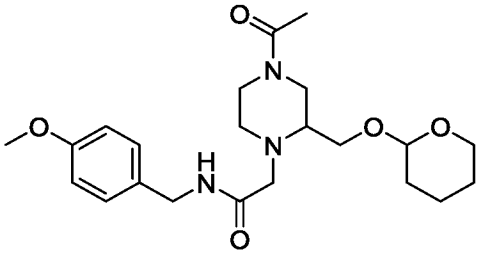
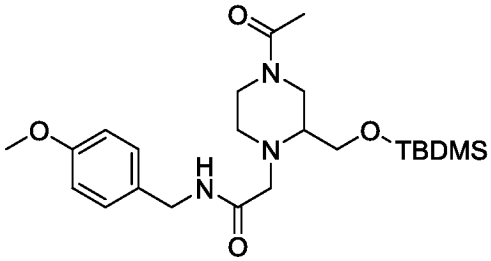
Пример 7

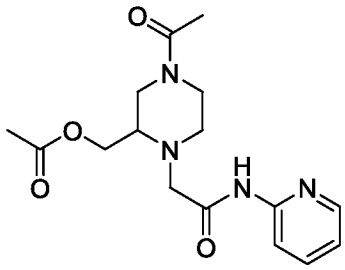
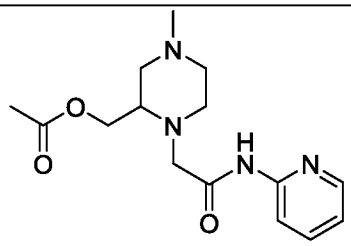
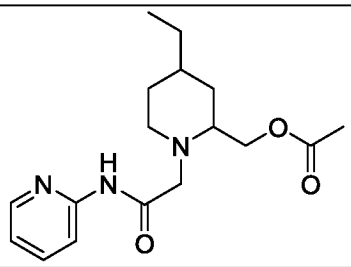
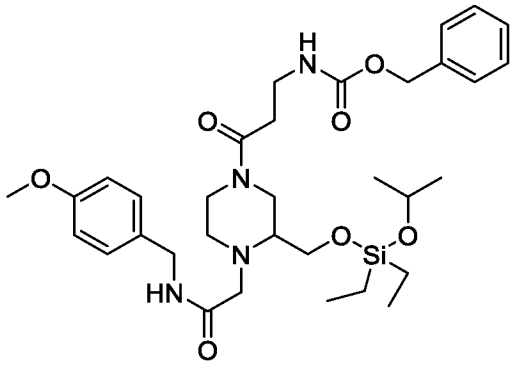
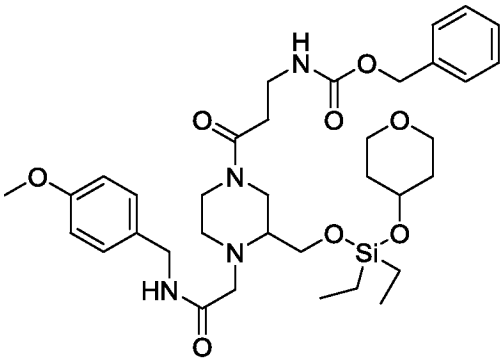
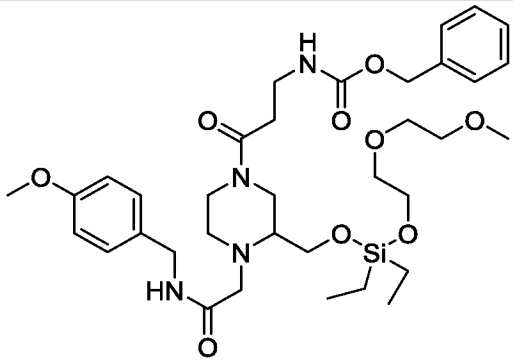
В данном примере описано получение серии модельных конъюгатов бесследный линкер–лекарственное средство, в которых модельное "лекарственное средство" представляет собой низкомолекулярное аминосодержащее соединение, чаще всего п–метоксибензиламин. Соединения **M1–M27** не конъюгированы с полимером, гидрогелем или другим носителем. Исследования высвобождения низкомолекулярного аминосодержащего соединения из соединений **M1–M27** in vitro позволяли оценивать ряд различных инициаторов высвобождения.

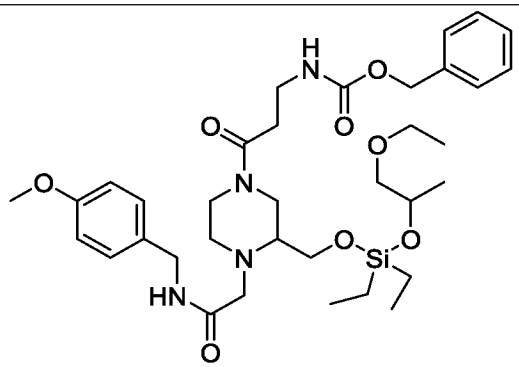
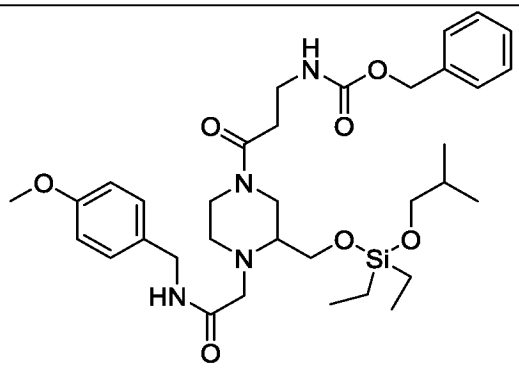
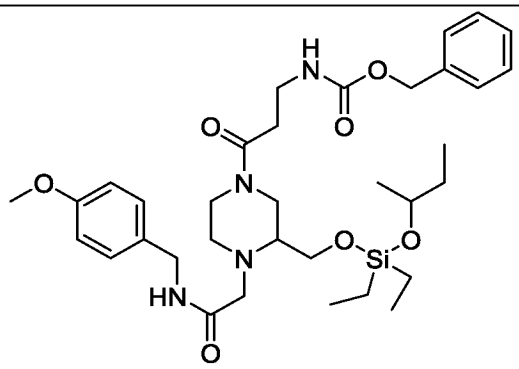
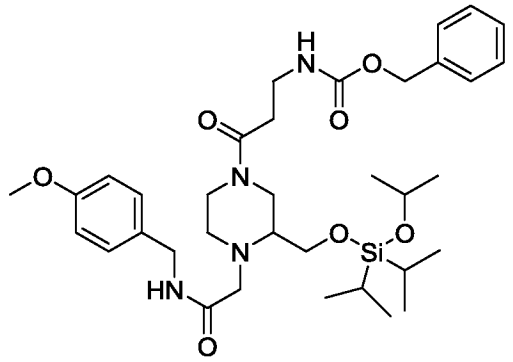
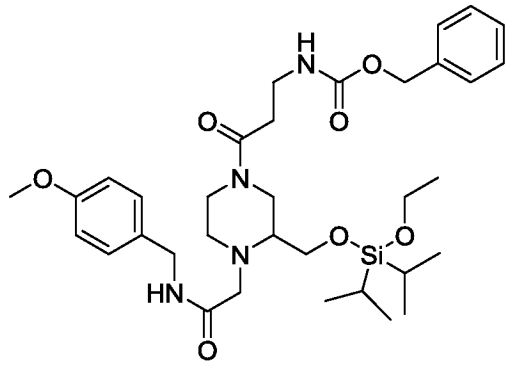
Таблица 22. Модельные соединения

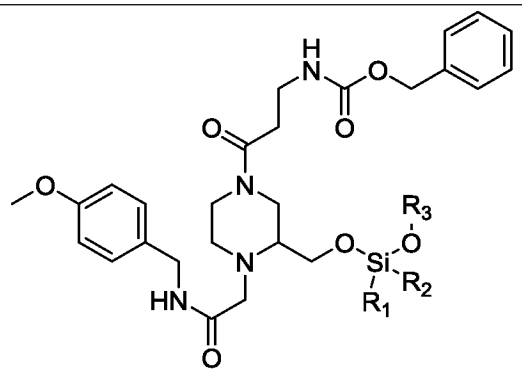
Структура	Номер
	**M1**

	**M2**
	**M3**
	**M4**
	**M5**
Общая структура для M1–M5	**M1–M5**

	
	**M6**
	**M7**
	**M8**
	**M9**
	**M10**
	**M11**

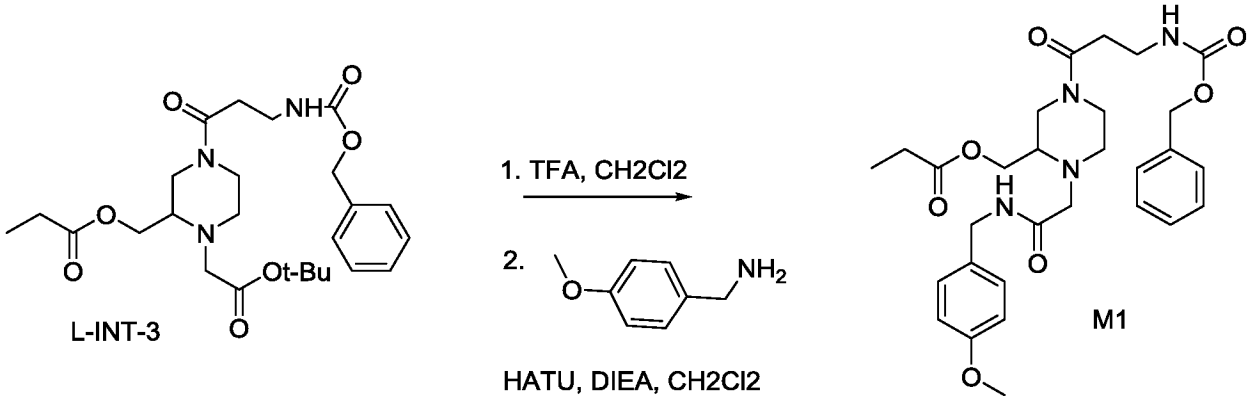
	**M17**
	**M18**
	**M19**
	**M20**
	**M21**
	**M22**

	**M23**
	**M24**
	**M25**
	**M26**
	**M27**
Общая структура для M20–M27:	**M20–M27**

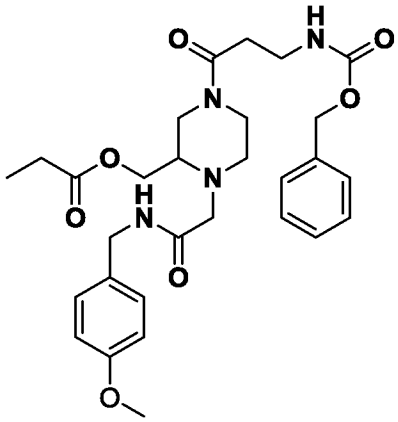
	

Синтез модельных соединений

M1. (4–(3'–(((Бензилокси)карбонил)амино)пропаноил)–1–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метилпропионат



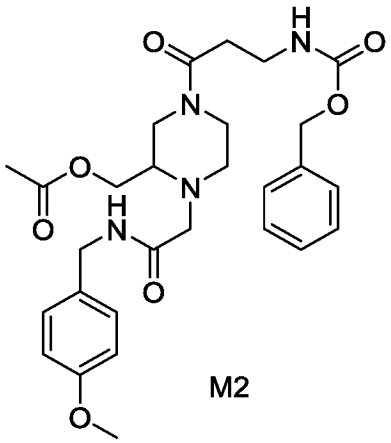
M1. (4–(3'–(((Бензилокси)карбонил)амино)пропаноил)–1–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метилпропионат



Раствор **L–INT–3** (61,7 мг, 0,13 ммоль) в дихлорметане (3 мл) обрабатывали трифторуксусной кислотой (1 мл) и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем выпаривали. Неочищенное промежуточное соединение растворяли в дихлорметане (3 мл) и обрабатывали диизопропилэтиламином (0,066 мл, 0,38 ммоль), HATU (57,3 мг, 0,15 ммоль) и п–метоксибензиламином (0,017 мл, 0,13 ммоль), перемешивали в течение 1 ч., затем выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 0–15% метанол в дихлорметане) получали **M1**. LCMS (способ 1): время удерживания=1,16 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 555,2 (M+H). ^{1}H–ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) 7,25 (m, 5H), 7,12 (m, 2H), 6,80 (m, 2H), 5,43 (m, 1H), 5,01 (m, 2H), 4,33 (d, 2H), 4,02

(tdt, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,55–3,2 (m, 7H), 3,09 (m, 1H), 2,72 (m, 2H), 2,41 (dq, 3H), 2,18 (m, 2H), 1,04 (dt, 3H).

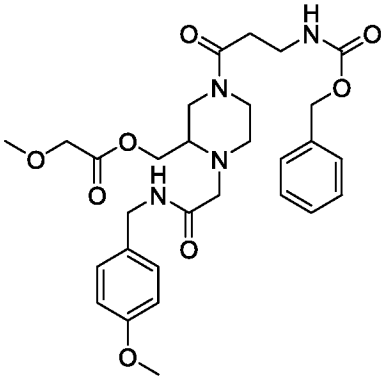
M2. (4–(3'–(((Бензилокси)карбонил)амино)пропаноил)–1–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метилацетат



M2

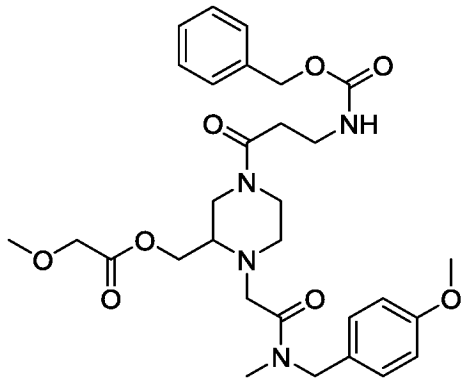
M2 получали из промежуточного соединения (**L–INT–2**) с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **M1**. LCMS (способ 1): время удерживания=1,10 мин: MS (ESI+) *масса/заряд* 541,1 (M+H). ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) 7,35 (m, 5H), 7,20 (m, 2H), 6,88 (m, 2H), 5,53 (m, 1H), 5,09 (m, 2H), 4,41 (d, 2H), 4,10 (tdt, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,55–3,2 (m, 7H), 3,17 (dd, 1H), 2,79 (m, 2H), 2,49 (dq, 3H), 2,0 (m, 3H).

M3. (4–(3'–(((Бензилокси)карбонил)амино)пропаноил)–1–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метилметоксиацетат



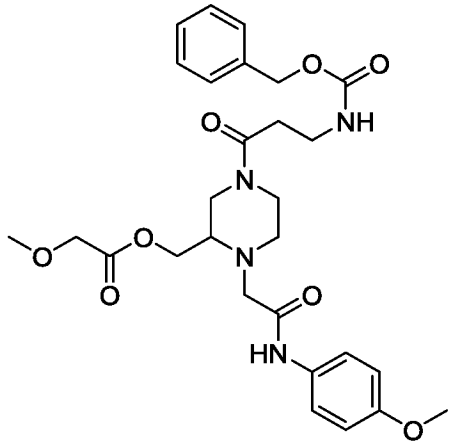
M3 получали из промежуточного соединения (**L–INT–1**) с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **M1**. LCMS (способ 1): время удерживания=1,11 мин MS (ESI+) *масса/заряд* 571,2 (M+H). ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) 7,37 (m, 5H), 7,21 (m, 2H), 6,90 (m, 2H), 5,49 (m, 1H), 5,10 (m, 2H), 4,42 (d, 2H), 4,23 (tdd, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,55–3,2 (m, 9H), 3,20 (dd, 1H), 2,83 (d, 2H), 2,52 (m, 3H).

M4. (4–(3'–(((Бензилокси)карбонил)амино)пропаноил)–1–(2''–((4'''–метоксибензил)(метил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метил–2–метоксиацетат



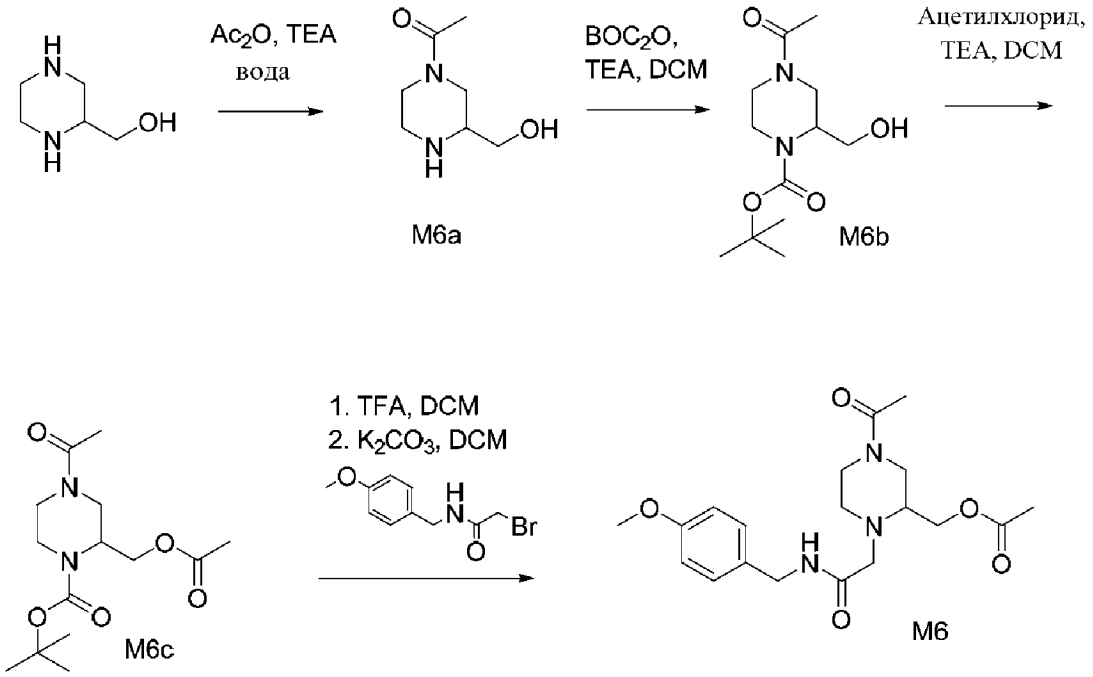
M4 получали из промежуточного соединения (**L–INT–1**) с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **M1**, за исключением того, что п–метоксибензиламин заменяли N–метил–п–метоксибензиламином. LCMS (способ 1): время удерживания=1,04 мин MS (ESI+) *масса/заряд* 585,2 (M+H). ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) 7,35 (m, 5H), 7,20 (m, 2H), 6,80 (m, 2H), 5,43 (m, 1H), 5,13 (m, 2H), 4,7–3,9 (m, 7H), 3,82 (m, 3H), 3,8–3,2 (m, 10H), 2,8 (m, 3H), 2,7 (m, 3H), 2,6 (m, 2H).

M5. (4–(3'–(((Бензилокси)карбонил)амино)пропаноил)–1–(2''–((4'''–метоксифенил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метил–2''''–метоксиацетат

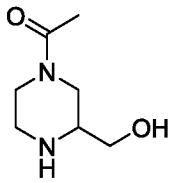


M5 получали из промежуточного соединения (**L–INT–1**) с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **M1**, за исключением того, что п–метоксибензиламин заменяли 4–метоксианилином. LCMS (способ 1): время удерживания=1,14 мин MS (ESI+) *масса/заряд* 557,1 (M+H). ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) 8,7 (br s, 1H), 7,4 (d, 2H), 7,37 (m, 5H), 6,8 (m, 2H), 5,5 (m, 1H), 5,1 (m, 2H), 4,3 (m, 2H), 4,0 (m, 2H), 3,8 (s, 4H), 3,7–3,2 (m, 11H), 3,2 (m, 1H), 2,8 (m, 2H), 2,5 (m, 2H), 2,18 (m, 3H).

M6. (4–Ацетил–1–(2–((4–метоксибензил)амино)–2–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метилацетат

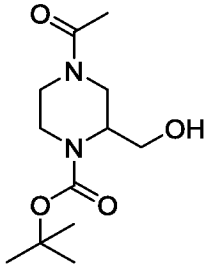


M6a. 1–N–ацетил–3–гидроксиметилпиперазин



Раствор 2–(гидроксиметил)пиперазина (2 г, 17,2 ммоль) в воде (25 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям триэтиламином (3,5 мл, 25 ммоль), перемешивали в течение 10 мин, затем обрабатывали по каплям раствором уксусного ангидрида (1,64 мл, 17,3 ммоль) в воде (15 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. при к. т., затем обрабатывали 2 М карбоната натрия (10 мл) и насыщенным хлоридом натрия (20 мл). Водный слой выпаривали, и остаток очищали посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 3% метанол в дихлорметане) с получением **M6a**. MS (ESI+) *масса/заряд* 159,0 (M+H).

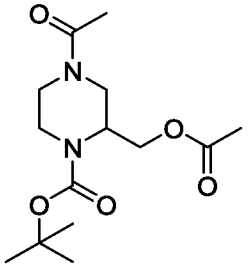
M6b. Трет–бутил–4–ацетил–2–(гидроксиметил)пиперазин–1–карбоксилат



Раствор **M6a** (1,4 г, 8,84 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям триэтиламином (1,78 г, 17,6 ммоль), перемешивали в течение 10 мин, затем обрабатывали по каплям ди–трет–бутилдикарбонатом (2,12 г, 9,73

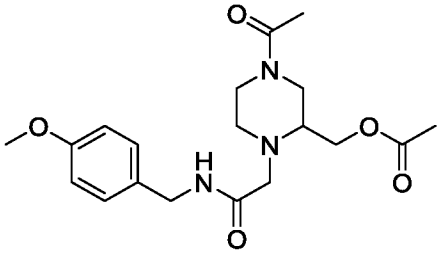
ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч. при к. т., затем разбавляли дихлорметаном, промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 3% метанол в дихлорметане) получали **M6b**. MS (ESI+) *масса/заряд* 259,0 (M+H).

M6c. Трет–бутил–2–(ацетоксиметил)–4–ацетилпиперазин–1–карбоксилат



Раствор **M6b** (0,20 г, 0,77 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям триэтиламином (0,20 г, 1,94 ммоль), перемешивали в течение 10 мин, затем обрабатывали по каплям ацетилхлоридом (0,072 г, 0,93 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. при к. т., затем разбавляли с помощью DCM, промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 3% метанол в дихлорметане) получали **M6c**. MS (ESI+) *масса/заряд* 301,1 (M+H).

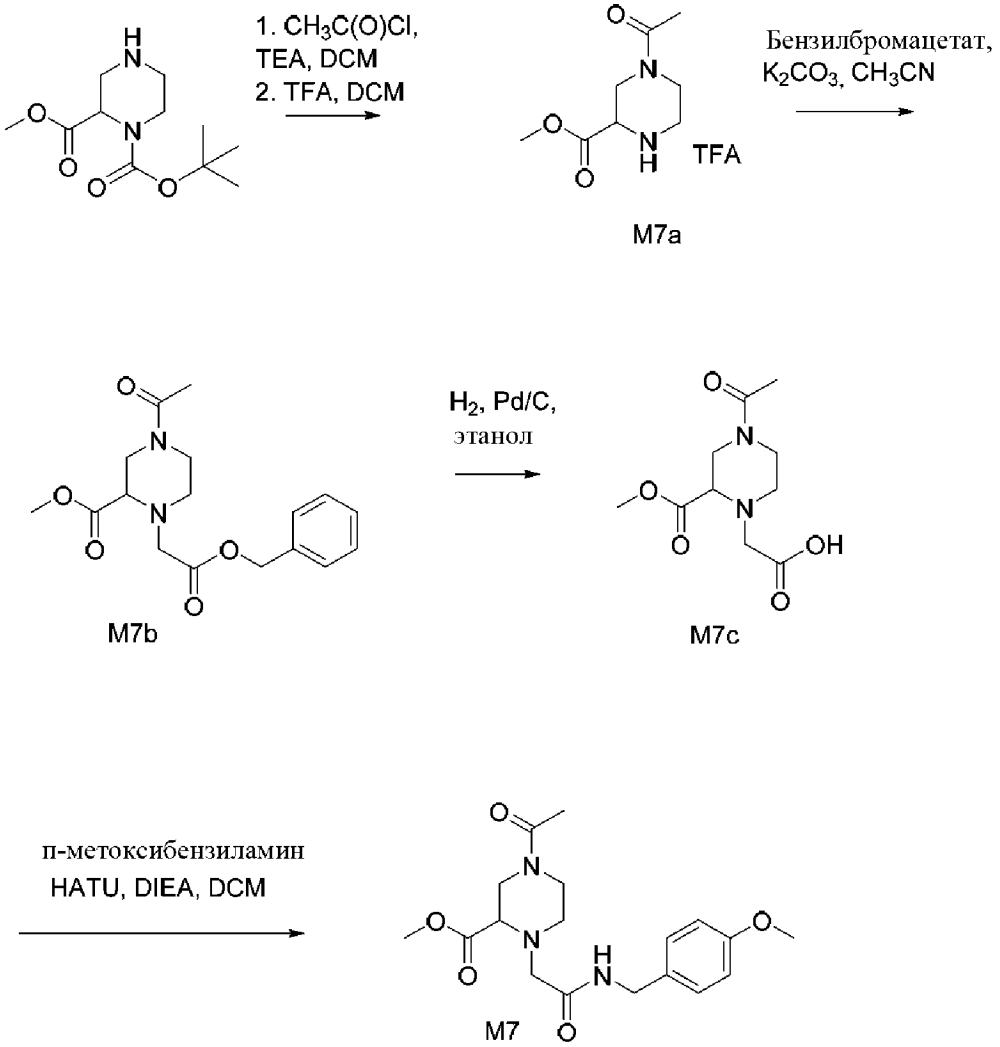
M6. (4–Ацетил–1–(2'–((4''–метоксибензил)амино)–2'–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метилацетат



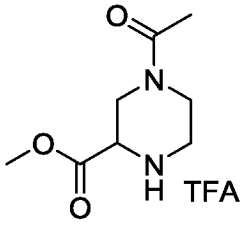
Раствор **M6c** (0,15 г, 0,49 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям трифторуксусной кислотой (2,0 мл) и перемешивали в течение 4 ч. при к. т., затем выпаривали. Данный материал растворяли в ацетонитриле (10 мл) и выдерживали при 0°C в атмосфере аргона, затем обрабатывали карбонатом калия (0,414 г, 2,99 ммоль) и 2–бром–N–(4–метоксибензил)ацетамидом (0,232 г, 0,89 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч. при к. т., затем выпаривали. Неочищенную смесь экстрагировали дихлорметаном, который промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 5% метанол в дихлорметане) с последующей препаративной HPLC (колонка: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21,5 мм * 5 мм); подвижная фаза: A=вода, B=ацетонитрил; градиент: 0–2 мин: 10% B; 2–8 мин: 20% B; 8 мин–окончание: 40% B) получали **M6**. LCMS (способ 8): время удерживания=2,67 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 378,2 (M+H).

M7. Метил–4–ацетил–1–(2'–((4''–метоксибензил)амино)–2'–

оксоэтил)пиперазин–2–карбоксилат



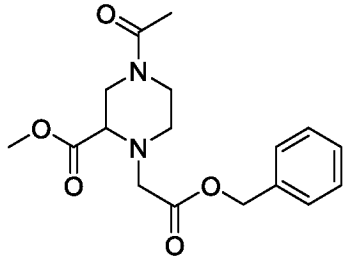
M7a. Метил–4–ацетилпиперазин–2–карбоксилат в форме соли трифторуксусной кислоты



Раствор 1–(трет–бутил)–2–метилпиперазин–1,2–дикарбоксилата (0,20 г, 0,82 ммоль) и триэтиламина (0,33 г, 3,27 ммоль) в дихлорметане (4 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям ацетилхлоридом (0,125 мг, 25 ммоль), затем перемешивали в течение 2 ч. при к. т. Реакционную смесь разбавляли водой, экстрагировали дихлорметаном, и органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид

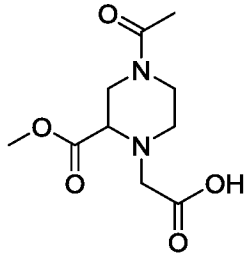
алюминия, 2% метанол в этилацетате) получали промежуточный продукт: MS (ESI+): *масса/заряд* 287 (M+H). Данный материал растворяли в дихлорметане (5 мл) при 0°C и обрабатывали по каплям трифторуксусной кислотой, затем перемешивали в течение 3 ч. при к. т. Реакционную смесь выпаривали, промывали с помощью пентана и высушивали с получением **M7a** в виде соли трифторуксусной кислоты, которую использовали без дополнительной очистки. MS (ESI+): *масса/заряд* 187 (M+H).

M7b. Метил–4–ацетил–1–(2'–(бензилокси)–2'–оксоэтил)пиперазин–2–карбоксилат



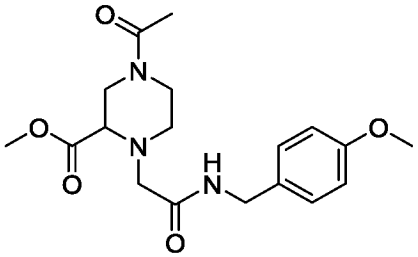
Смесь **M7a** (0,16 г, 0,86 ммоль) и карбоната калия (0,30 мг, 2,15 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям бензилбромацетатом (0,234 мг, 1,03 ммоль), давали ей медленно достичь к. т., затем перемешивали в течение 12 ч. при к. т. Реакционную смесь разбавляли водой, экстрагировали этилацетатом, и органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (нейтральный оксид алюминия, 1% метанол в этилацетате) получали **M7b**. MS (ESI+) *масса/заряд* 335 (M+H).

M7c. 2–(4'–Ацетил–2'–(метоксикарбонил)пиперазин–1'–ил)уксусная кислота



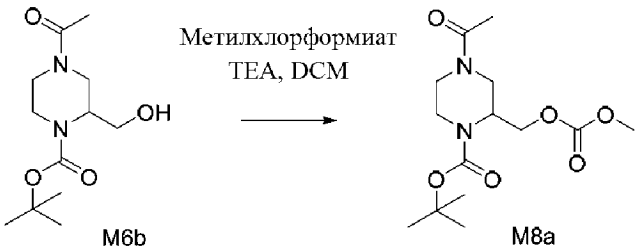
К раствору **M7b** (0,285 г, 0,85 ммоль) добавляли 10% палладий на угле (0,02 г), затем перемешивали под давлением водорода из баллона в течение 12 ч. при к. т. Реакционную смесь фильтровали через Celite, промывали с помощью метанола, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. **M7c** использовали без дополнительной очистки. MS (ESI+) *масса/заряд* 245 (M+H).

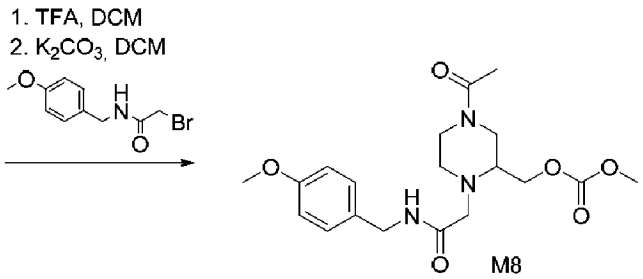
M7. Метил–4–ацетил–1–(2'–((4''–метоксибензил)амино)–2'–оксоэтил)пиперазин–2–карбоксилат



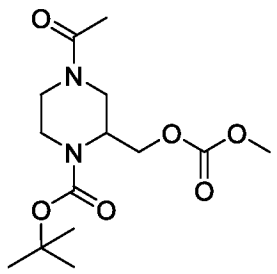
Раствор **M7c** (0,21 г, 0,86 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали диизопропилэтиламином (0,275 г, 2,14 ммоль) и HATU (0,39 г, 1,03 ммоль), затем через 15 мин 4–метоксибензиламином (0,117 г, 0,86 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч. при к. т., затем обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном, который промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки с помощью препаративной HPLC (колонка: XBridge (150 × 19 мм); подвижная фаза: A = (0,01% TFA в воде), B=ацетонитрил; градиент: 0–2 мин: 20% B; 2–8 мин: 20% B; 8 мин–окончание: 80% B) получали **M7**. LCMS (способ 3): время удерживания=2,85 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 364 (M+H).

M8. (4–Ацетил–1–(2'–((4''–метоксибензил)амино)–2'–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метилметилкарбонат



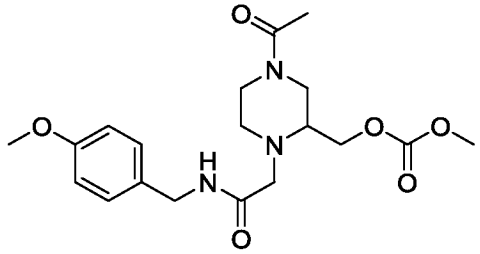


M8a. (4–Ацетил–1–(трет–бутоксикарбоксил)пиперазин–2–ил)метилметилкарбонат



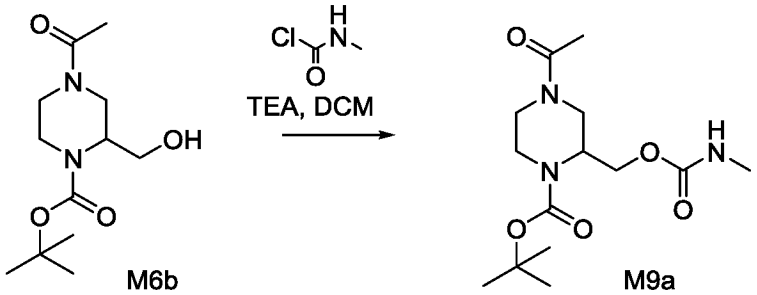
Раствор **M6b** (0,30 г, 1,16 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям триэтиламином (0,20 г, 1,94 ммоль), перемешивали в течение 10 мин, затем обрабатывали по каплям метилхлорформиатом (0,54 г, 5,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 72 ч. при к. т., затем разбавляли дихлорметаном, промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 3% метанол в дихлорметане) получали **M8a**. MS (ESI+) *масса/заряд* 317,1 (M+H).

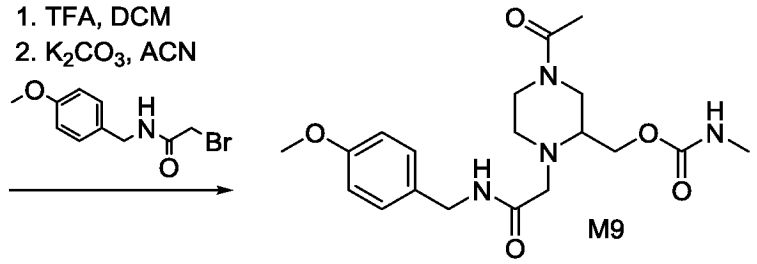
M8. (4–Ацетил–1–(2'–((4''–метоксибензил)амино)–2'–оксоэтил)пиперазин–2–ил)метилметилкарбонат



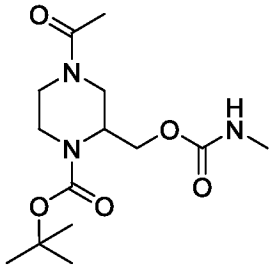
Раствор **M8a** (0,09 г, 0,28 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям трифторуксусной кислотой (2,0 мл) и перемешивали в течение 4 ч. при к. т., затем выпаривали. Данный материал растворяли в ацетонитриле (10 мл) и выдерживали при 0°C в атмосфере аргона, затем обрабатывали карбонатом калия (0,23 г, 1,66 ммоль) и 2–бром–N–(4–метоксибензил)ацетамидом (0,128 г, 0,49 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч. при к. т., затем выпаривали. Неочищенную смесь экстрагировали дихлорметаном, который промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 5% метанол в дихлорметане) с последующей препаративной HPLC (колонка: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21,5 мм * 5 мм); подвижная фаза: A=вода, B=ацетонитрил; градиент: 0–2 мин: 10% B; 2–10 мин: 20% B; 10 мин–окончание: 50% B) получали **M8**. LCMS (способ 7): время удерживания=0,24 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 394,2 (M+H).

M9. 1–(4'–Ацетил–1'–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–2'–ил)метил–N–метилкарбамат



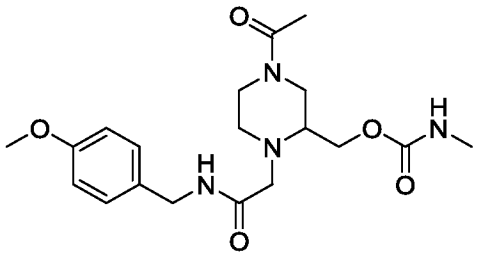


M9a. 1–(4'–Ацетил–1'–(трет–бутоксикарбонил)пиперазин–2'–ил)метил–N–метилкарбамат



Раствор **M6b** (0,30 г, 1,16 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям триэтиламином (0,30 мг, 2,90 ммоль) и перемешивали в течение 10 мин. Добавляли хлорангидрид метилкарбаминовой кислоты (0,11 г, 1,27 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 72 ч. при к. т. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном, промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 3% метанол в этилацетате) получали **M9a**. MS (ESI+) *масса/заряд* 316,1 (M+H).

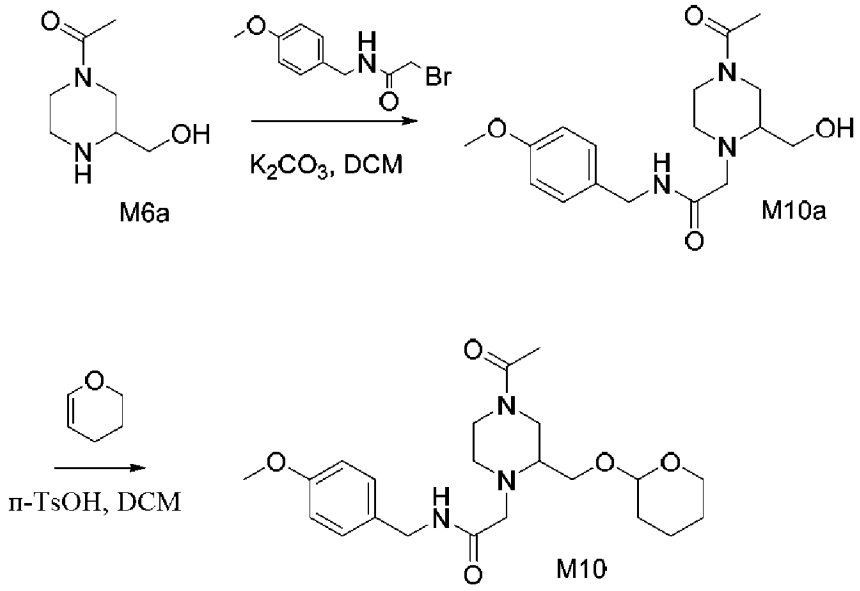
M9. 1–(4'–Ацетил–1'–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–2'–ил)метил–N–метилкарбамат



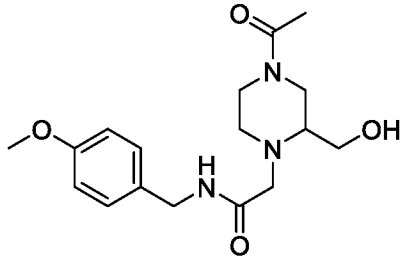
Раствор **M9a** (0,12 г, 0,38 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере

аргона обрабатывали по каплям трифторуксусной кислотой (2,0 мл) и перемешивали в течение 4 ч. при к. т., затем выпаривали и использовали без дополнительной очистки. MS (ESI+): *масса/заряд* 216,1 (M+H). Данный материал растворяли в ацетонитриле (10 мл) и выдерживали при 0°C в атмосфере аргона, затем обрабатывали карбонатом калия (0,385 г, 2,78 ммоль) и 2–бром–N–(4–метоксибензил)ацетамидом (0,215 г, 0,83 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч. при к. т., затем выпаривали. Неочищенную смесь экстрагировали дихлорметаном, который промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 5% метанол в дихлорметане) с последующей препаративной HPLC (колонка: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21,5 мм * 5 мм); подвижная фаза: A=вода, B=ацетонитрил; градиент: 0–2 мин: 10% B; 2–8 мин: 20% B; 8 мин–окончание: 50% B) получали **M9**. LCMS (способ 3): время удерживания=2,61 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 393,2 (M+H).

M10. 2–(4'–Ацетил–2'–(((тетрагидро–2''H–пиран–2''–ил)окси)метил)пиперазин–1'–ил)–N–(4'''–метоксибензил)ацетамид



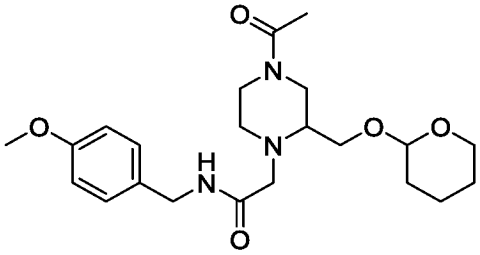
M10a. 2–(4'–Ацетил–2'–(гидроксиметил)пиперазин–1'–ил)–N–(4''–метоксибензил)ацетамид



Раствор **M6a** (1,0 г, 6,32 ммоль) в ацетонитриле (20 мл) выдерживали при 0°C в атмосфере аргона, затем обрабатывали карбонатом калия (2,62 г, 19,0 ммоль) и 2–бром–

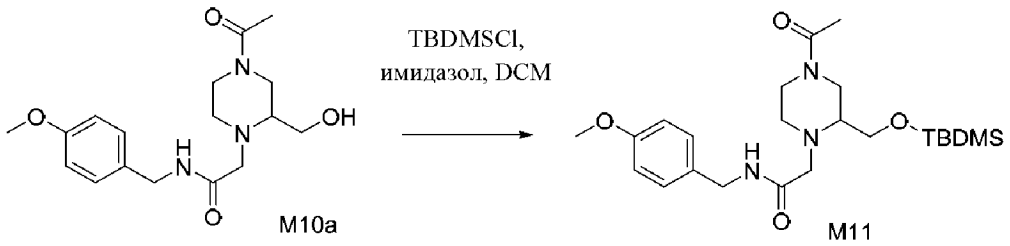
N–(4’–метоксибензил)ацетамидом (1,4 г, 5,68 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч. при к. т., затем обрабатывали водой, экстрагировали этилацетатом, и объединенный органический слой высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 1–2% метанол в дихлорметане) получали **M10a**. LCMS (способ 8): время удерживания=2,61 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 336,3 (M+H).

M10. 2–(4’–Ацетил–2’–(((тетрагидро–2’’H–пиран–2’’–ил)окси)метил)пиперазин–1’–ил)–N–(4’’’–метоксибензил)ацетамид

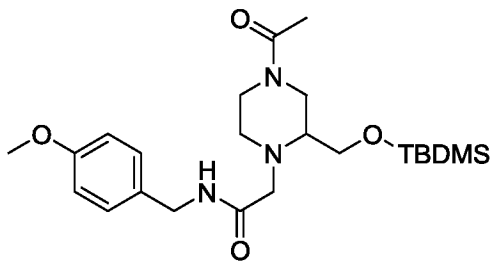


Раствор **M10a** (0,10 г, 0,30 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали 3,4–дигидро–2H–пираном (0,05 г, 0,60 ммоль), затем по частям добавляли толуолсульфоновую кислоту (0,030 г, 0,89 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали насыщенным водным бикарбонатом натрия и экстрагировали дихлорметаном, который промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 1–2% метанол в дихлорметане) получали **M10**. LCMS (способ 8): время удерживания=2,78 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 420,3 (M+H).

M11. 2–(4’–Ацетил–2’–(((трет–бутилдиметилсилил)окси)метил)пиперазин–1’–ил)–N–(4’’’–метоксибензил)ацетамид

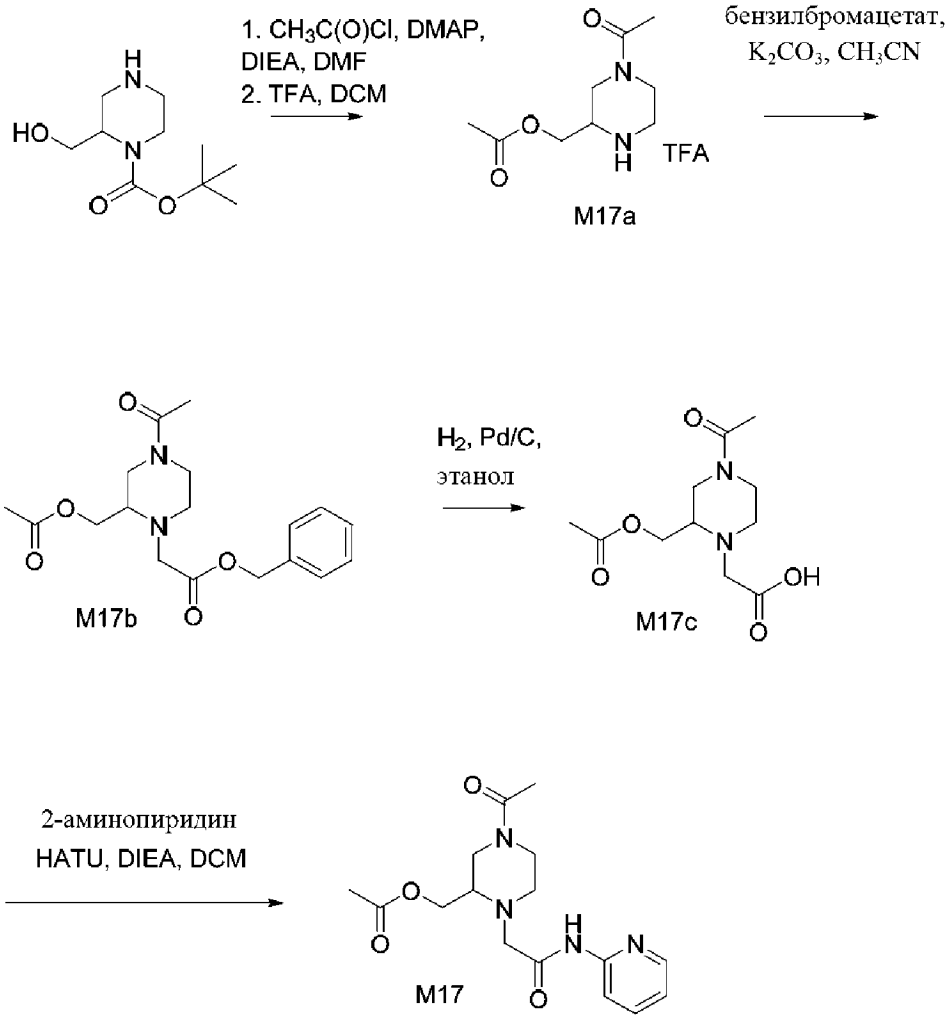


M11. 2–(4’–Ацетил–2’–(((трет–бутилдиметилсилил)окси)метил)пиперазин–1’–ил)–N–(4’’’–метоксибензил)ацетамид

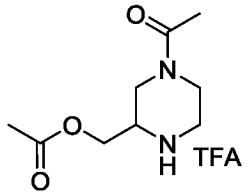


Раствор **M10a** (0,10 г, 0,30 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали имидазолом (0,061 г, 0,89 ммоль), затем по каплям добавляли трет–бутилдиметилхлорсилан (0,054 г, 0,36 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали насыщенным водным хлоридом аммония и экстрагировали дихлорметаном, который промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки с помощью препаративной HPLC (колонка: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21,5 мм * 5 мм); подвижная фаза: A=вода, B=ацетонитрил; градиент: 0–2 мин: 30% B; 2–8 мин: 40% B; 8 мин–окончание: 90% B) получали **M11**. LCMS (способ 8): время удерживания=3,48 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 450,3 (M+H).

M17. 1–(4'–Ацетил–1'–(2''–оксо–2''–(пиридин–2'''–иламино)этил)пиперазин–2'–ил)метилацетат



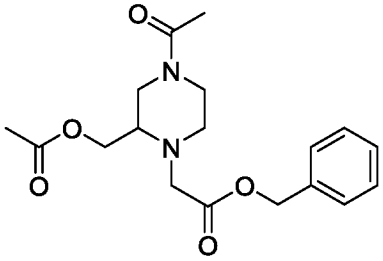
M17a. 1–(4'–Ацетилпиперазин–2'–ил)метилацетат в форме соли трифторуксусной кислоты



К раствору трет–бутил–2–(гидроксиметил)пиперазин–1–карбоксилата (0,70 г, 3,23 ммоль) в DMF (7 мл) при 0°C в атмосфере аргона добавляли диизопропилэтиламин (1,65 мл, 2,76 ммоль), 4–диметиламинопиридин (0,007 г) и ацетилхлорид (0,57 мл, 8,09 ммоль) и перемешивали в течение 16 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали водой и рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 50% этилацетат в гексане) получали промежуточное соединение, которое использовали без дополнительной очистки. MS (ESI+) *масса/заряд* 323 (M+Na). Данный материал растворяли в дихлорметане (2 мл) при 0°C, и обрабатывали трифторуксусной кислотой (1 мл), и

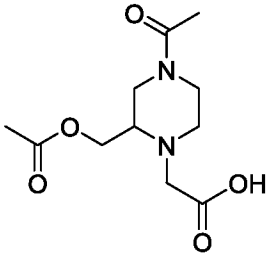
перемешивали в течение 16 ч при к. т., затем выпаривали. Остаток промывали пентаном и высушивали под высоким вакуумом с получением **M17a** в виде соли трифторуксусной кислоты, которую использовали без дополнительной очистки. MS (ESI+): *масса/заряд* 201 (M+H).

M17b. Бензил–2–(2'–(ацетоксиметил)–4'–ацетилпиперазин–1'–ил)ацетат



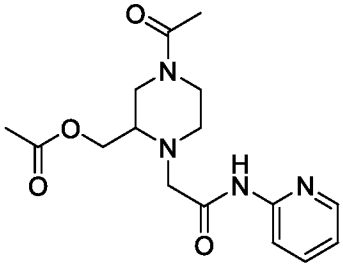
Раствор **M17a** (0,75 г, 3,73 ммоль) в ацетонитриле (8 мл) в атмосфере аргона обрабатывали карбонатом калия (1,54 г, 11,9 ммоль) и бензил–2–бромацетатом (0,59 мл, 3,73 ммоль) и перемешивали в течение 16 ч. при к. т. Реакционную смесь концентрировали и очищали посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 1% метанол в дихлорметане) с получением **M17b**. MS (ESI+) *масса/заряд* 349 (M+H).

M17c. 2–(2'–(Ацетоксиметил)–4'–ацетилпиперазин–1'–ил)уксусная кислота



К раствору **M17b** (0,30 г, 0,86 ммоль) в этаноле (6 мл) добавляли 5% палладий на угле (0,060 г), и реакционную смесь перемешивали под давлением водорода из баллона в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью препаративной HPLC (колонка: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21,5 мм * 5 мм); подвижная фаза: A=вода, B=ацетонитрил; градиент: 0–2 мин: 10% B; 2–10 мин: 20% B; 10 мин–окончание: 40% B) с получением **M17c**. MS (ESI+) *масса/заряд* 259 (M+H).

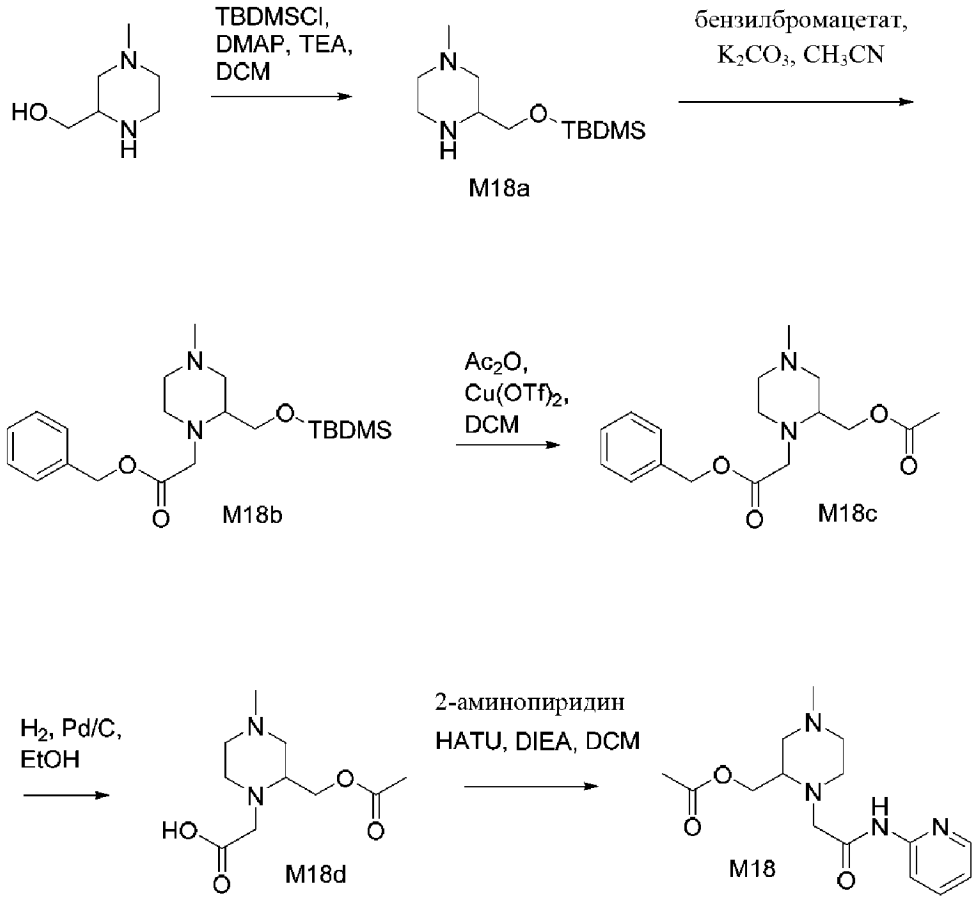
M17. 1–(4'–Ацетил–1'–(2''–оксо–2'''–(пиридин–2'''–иламино)этил)пиперазин–2'–ил)метилацетат



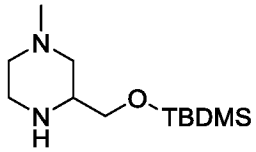
К раствору **M17c** (0,070 г, 0,27 ммоль) в дихлорметане (1 мл) в атмосфере аргона добавляли диизопропилэтиламин (0,039 мл, 0,81 ммоль), HATU (0,35 г, 0,90 ммоль) и 2–

аминопиридин (0,028 г, 0,29 ммоль) и перемешивали в течение 16 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои промывали рассолом и выпаривали. В результате очистки с помощью препаративной HPLC (колонка: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 21,5 мм * 5 мм); подвижная фаза: A=вода, B=ацетонитрил; градиент: 0–2 мин: 10% B; 2–6 мин: 20% B; 6 мин–окончание: 70% B) получали **M17**. LCMS (способ 3): время удерживания=2,35 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 335,2 (M+H).

M18. 1–(4'–Метил–1'–(2''–оксо–2''–(пиридин–2'''–иламино)этил)пиперазин–2'–ил)метилацетат



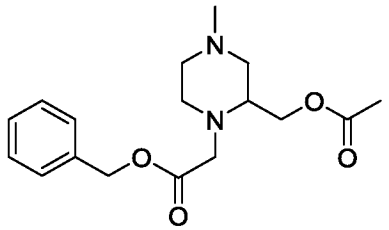
M18a. 3–(((Трет–бутилдиметилсилил)окси)метил)–1–метилпиперазин



К раствору (4–метилпиперазин–2–ил)метанола (0,60 г, 4,6 ммоль) в дихлорметане (7 мл) в атмосфере аргона добавляли триэтиламин (1,08 мл, 7,82 ммоль), 4–диметиламинопиридин (0,01 г), затем по каплям раствор трет–бутилдиметилхлорсилана (1 г, 6,91 ммоль) в дихлорметане (20 мл) и перемешивали в течение 16 ч. при к. т. Дополнительно добавляли триэтиламин (0,6 экв.) и трет–бутилдиметилхлорсилан (0,6

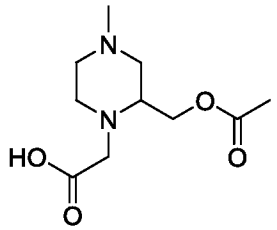
экв.) к раствору, который перемешивали в течение 2 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 1% метанол в дихлорметане) получали **M18a**. MS (ESI+) *масса/заряд* 245 (M+H).

M18c. Бензил–2–(2'–(ацетоксиметил)–4'–метилпиперазин–1'–ил)ацетат



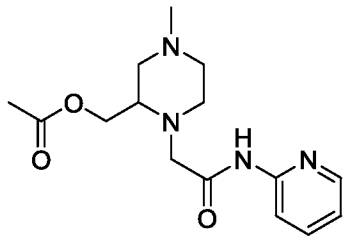
Раствор **M18a** (1,2 г, 4,91 ммоль) в ацетонитриле (12 мл) в атмосфере аргона обрабатывали карбонатом калия (1,69 г, 12,3 ммоль) и бензил–2–бромацетатом (0,7 мл, 4,42 ммоль) и перемешивали в течение 16 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали водой, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (щелочной оксид алюминия, 1% метанол в дихлорметане) получали промежуточное соединение **M18b.** К раствору **M18b** (0,49 г, 1,25 ммоль) в дегазированном (с помощью аргона) дихлорметане (12 мл) добавляли трифторметансульфонат меди (II) (0,45 г, 1,25 ммоль). Данную смесь снова дегазировали (в течение 10 мин) с последующим добавлением уксусного ангидрида (0,31 г, 3,0 ммоль), затем дегазировали в третий раз (в течение 10 мин) и перемешивали в атмосфере аргона в течение 48 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали насыщенным водным бикарбонатом натрия и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (нейтральный оксид алюминия, 0,25% метанол в дихлорметане) получали **M18c**. MS (ESI+) *масса/заряд* 321 (M+H)

M18d. 2–(2'–(Ацетоксиметил)–4'–метилпиперазин–1'–ил)уксусная кислота



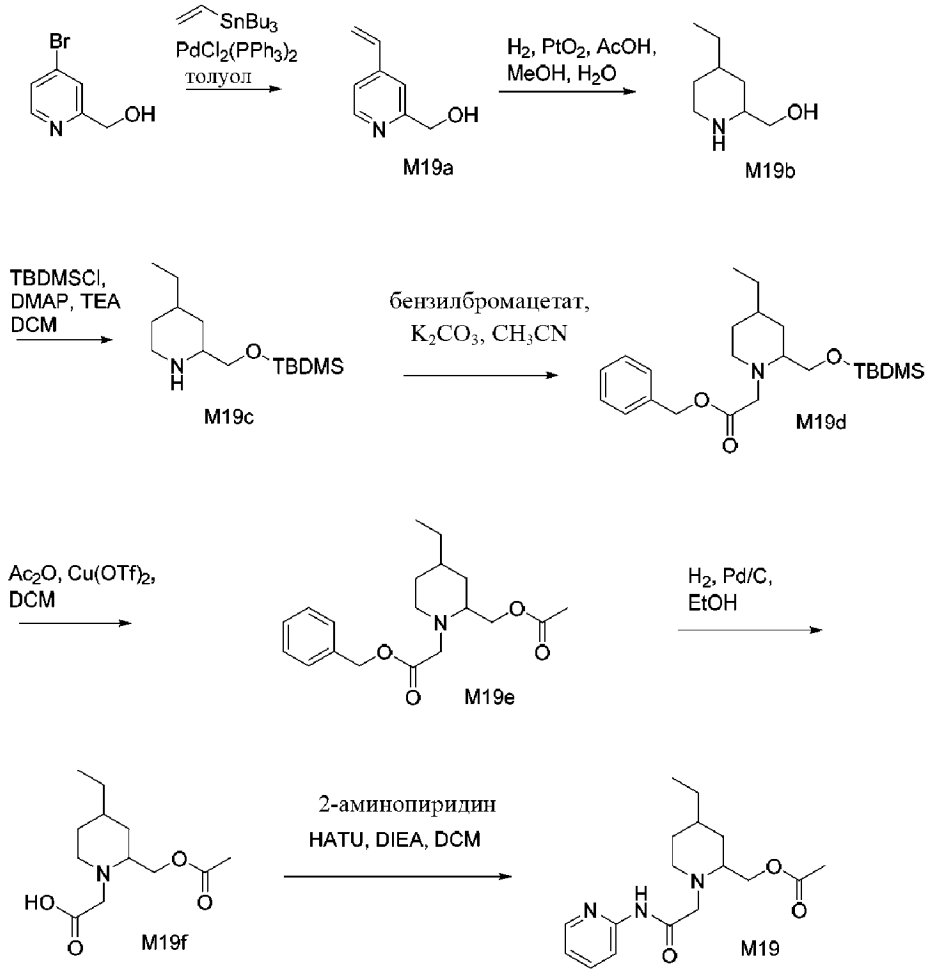
К раствору **M18c** (0,225 г, 0,70 ммоль) в этаноле (5 мл) добавляли 5% палладий на угле (0,045 г), и реакционную смесь перемешивали под давлением водорода из баллона в течение 5 ч. Реакционную смесь фильтровали через Celite, фильтрат высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением **M18d**, которое использовали без дополнительной очистки. MS (ESI+) *масса/заряд* 231,2 (M+H)

M18. 1–(4'–Метил–1'–(2''–оксо–2''–(пиридин–2'''–иламино)этил)пиперазин–2'–ил)метилацетат

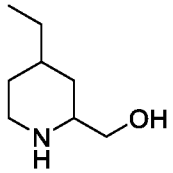


К раствору **M18d** (0,060 г, 0,26 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона добавляли диизопропилэтиламин (0,10 г, 0,78 ммоль) и HATU (0,146 г, 0,39 ммоль). Раствор перемешивали в течение 10 мин, затем добавляли 2–аминопиридин (0,029 г, 0,31 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч. при к. т., затем обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 10–12% метанол в дихлорметане) с последующей препаративной HPLC (колонка: XBridge (150 × 19 мм); подвижная фаза: A = (0,1% TFA в воде), B = (CAN : метанол); градиент: 0–2 мин: 10% B; 2–8 мин: 20% B; 8 мин–окончание: 50% B) получали **M18**. LCMS (способ 8): время удерживания=2,12 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 307,1 (M+H).

M19. 1–(4'–Этил–1'–(2''–оксо–2''–(пиридин–2'''–иламино)этил)пиперидин–2'–ил)метилацетат



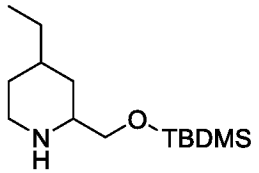
M19b. 1–(4'–Этилпиперидин–2'–ил)метанол



К раствору 1–(4'–бромпиридин–2'–ил)метанола (2 г, 10,6 ммоль) в дегазированном толуоле (20 мл) добавляли трибутилвинилолово (4,44 г, 16,0 ммоль) и $PdCl_2(PPh_3)_2$ (0,746 г, 1,06 ммоль) с последующей второй дегазацией в течение 10 мин. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 18 ч. при 50°C, затем обрабатывали дополнительными порциями трибутилвинилолова (0,5 экв.) и $PdCl_2(PPh_3)_2$ (0,05 экв.) с последующим перемешиванием в течение 18 ч. при 80°C. Реакционную смесь выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 30% этилацетат в гексане) получали промежуточное соединение **M19a**. Смесь **M19a** (1,4 г, 10,4 ммоль), оксида платины (0,941 г, 4,15 ммоль) и уксусной кислоты (0,622 г, 10,4 ммоль) в метаноле (54 мл) и воде (36 мл) хранили в смесительной колбе Парра в течение 36 ч. при давлении водорода 80 фунт/кв. дюйм. Реакционную смесь фильтровали через Celite® и концентрировали. Остаток обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Водный

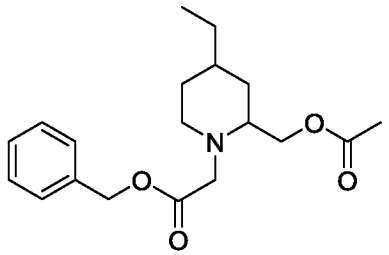
слой концентрировали с получением **M19b**, которое использовали без дополнительной очистки. MS (ESI+) *масса/заряд* 144 (M+H).

M19c. 2–(((Трет–бутилдиметилсилил)окси)метил)–4–этилпиперидин



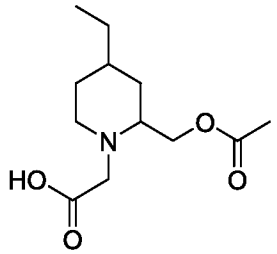
К раствору **M19b** (0,4 г, 2,79 ммоль) в дихлорметане (8 мл) добавляли триэтиламин (0,85 г, 8,4 ммоль), 4–диметиламинопиридин (0,01 г), затем по каплям раствор трет–бутилдиметилхлорсилана (1,26 г, 8,4 ммоль) в дихлорметане (4 мл) и перемешивали в течение 16 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (нейтральный оксид алюминия, 10% этилацетат в гексане) получали **M19c**. MS (ESI+) *масса/заряд* 258,6 (M+H).

M19e. Бензил–2–(2'–(ацетоксиметил)–4'–этилпиперидин–1'–ил)ацетат



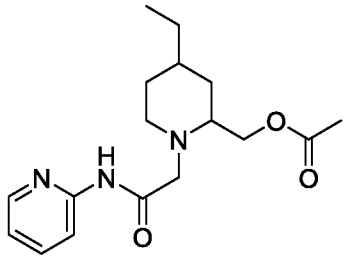
Раствор **M19c** (0,50 г, 1,94 ммоль) и карбоната калия (0,67 г, 4,86 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) при 0°C в атмосфере аргона обрабатывали по каплям бензил–2–бромацетатом (0,53 г, 2,33 ммоль) и перемешивали в течение 6 ч. при к. т. Реакционную смесь обрабатывали насыщенным водным хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 10% этилацетат в гексане) получали промежуточное соединение **M19d**. К раствору **M19d** (0,30 г, 0,74 ммоль) в дегазированном (с помощью аргона) дихлорметане (12 мл) добавляли трифторметансульфонат меди (II) (0,267 г, 0,74 ммоль). Данную смесь снова дегазировали (в течение 10 мин) с последующим добавлением уксусного ангидрида (0,18 г, 1,78 ммоль), дегазировали в третий раз (в течение 10 мин) и перемешивали в течение 24 ч. при к. т. в атмосфере аргона. Реакционную смесь обрабатывали насыщенным водным бикарбонатом натрия и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 15% этилацетат в гексане) получали **M19e**. MS (ESI+) *масса/заряд* 334,0(M+H).

M19f. 2–(2'–(Ацетоксиметил)–4'–этилпиперидин–1'–ил)уксусная кислота



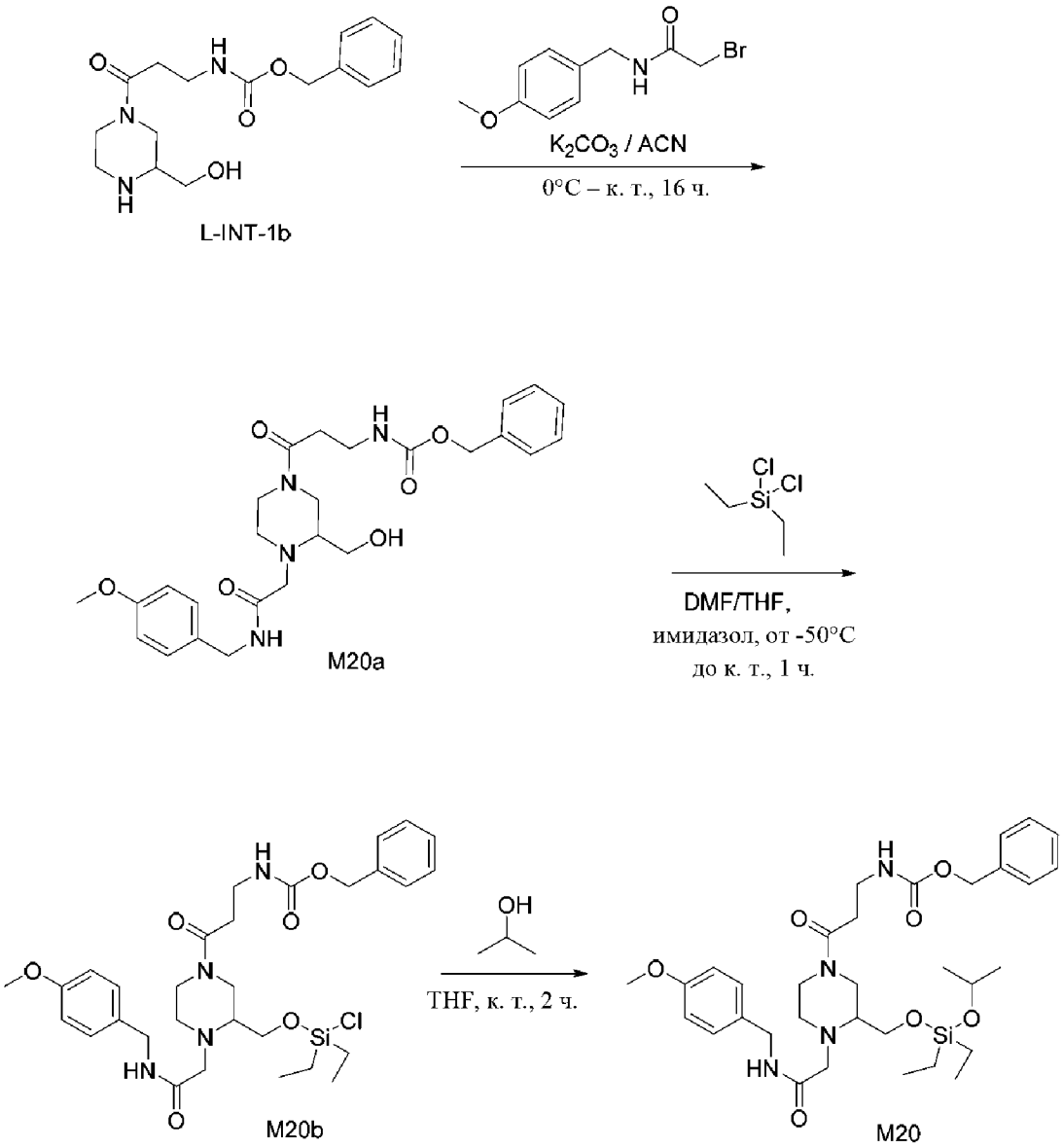
К раствору **M19e** (0,40 г, 1,2 ммоль) в этаноле (8 мл) добавляли 5% палладий на угле (0,08 г), и реакционную смесь перемешивали под давлением водорода из баллона в течение 5 ч. Реакционную смесь фильтровали через Celite®. Фильтрат высушивали над сульфатом натрия и концентрировали с получением **M19f**, которое использовали без дополнительной очистки. MS (ESI+) *масса/заряд* 244,1 (M+H).

M19. 1–(4'–Этил–1'–(2''–оксо–2''–(пиридин–2'''–иламино)этил)пиперидин–2'–ил)метилацетат

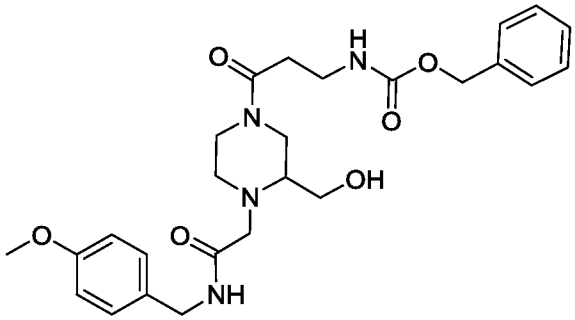


К раствору **M19f** (0,10 г, 0,41 ммоль) в дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона добавляли диизопропилэтиламин (0,16 г, 1,23 ммоль) и HATU (0,187 г, 0,39 ммоль). Раствор перемешивали в течение 15 мин, затем добавляли 2–аминопиридин (0,046 г, 0,49 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч. при к. т., затем обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои промывали рассолом, высушивали над сульфатом натрия и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, 25–30% этилацетат в гексане) получали **M19**. LCMS (способ 8): время удерживания=2,58 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 320,5 (M+H).

M20. Бензил–N–(3–(3'–(((диэтил(изопропокси)силил)окси)метил)–4'–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–1'–ил)–3–оксопропил)карбамат



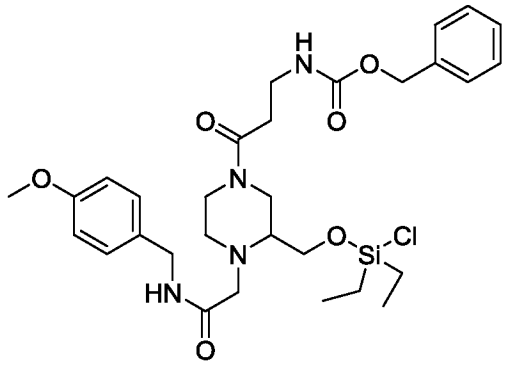
M20a. Бензил–(3–(3–(гидроксиметил)–4–(2–((4–метоксибензил)амино)–2–оксоэтил)пиперазин–1–ил)–3–оксопропил)карбамат



L–INT–1b (342 мг, 1,065 ммоль) растворяли в ацетонитриле (5 мл) и охлаждали до 0°C. Реакционную смесь обрабатывали карбонатом калия (402 мг, 2,91 ммоль) и 2–бром–N–(4–метоксибензил)ацетамидом (250 мг, 0,969 ммоль), перемешивали при к. т. в течение

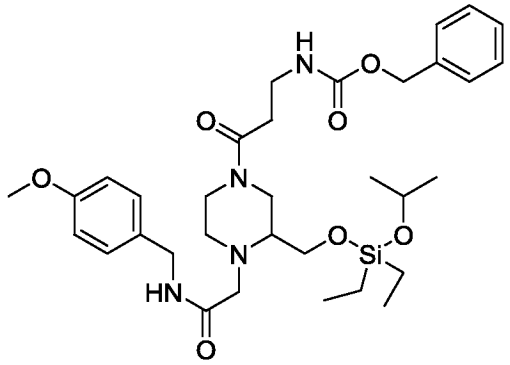
ночи. Реакционную смесь обрабатывали водой и экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу промывали рассолом, высушивали (над сульфатом натрия) и выпаривали. В результате очистки посредством флэш–хроматографии (SiO_2, элюировали с помощью 0–10% метанола в дихлорметане) получали **M20a**. LCMS (способ 1): время удерживания=0,91 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 499,4 (M+H).

M20b. Бензил–N–(3–(3'–(((хлордиэтилсилил)окси)метил)–4'–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–1'–ил)–3–оксопропил)карбамат



M20a (40 мг, 0,080 ммоль) и имидазол (273 мг, 4,01 ммоль) растворяли в тетрагидрофуране (2 мл) при к. т. и по каплям добавляли на протяжении нескольких минут к раствору дихлордиэтилсилана (0,120 мл, 0,802 ммоль) в диметилформамиде (1 мл) и тетрагидрофуране (1 мл) при ~ −50 °C. Полученный раствор извлекали из холодной бани и перемешивали при к. т. в течение 1 ч. с получением **M20b**, которое использовали без дополнительной очистки. LCMS (способ 5): время удерживания=1,13 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 601,3 (M+H для гидролизованного M20b).

M20. Бензил–N–(3–(3'–(((диэтил(изопропокси)силил)окси)метил)–4'–(2''–((4'''–метоксибензил)амино)–2''–оксоэтил)пиперазин–1–ил)–3–оксопропил)карбамат



2–пропанол (0,061 мл, 0,802 ммоль) по каплям добавляли при к. т. к раствору неочищенного **M20b** в DMF/THF, полученному выше. Раствор перемешивали при к. т. в течение 2 ч. и затем концентрировали. В результате очистки с помощью препаративной HPLC (колонка: Waters XBridge, 5 мкм, 30 × 50 мм; способ: градиент от 45% до 70% ацетонитрила/H_2O с 10 мМ NH_4OH на протяжении 3,5 мин при 75 мл/мин) получали фракции, которые концентрировали, подвергали быстрому замораживанию и лиофилизировали с получением **M20**. LCMS (способ 5): время удерживания=1,35 мин; MS (ESI+) *масса/заряд* 643,3 (M+H). ^{1}H–ЯМР (CD_3OD, ppm): δ: 7,25–7,39 (m, 5H), 7,22 (d,

J=8,7 Гц, 2H), 6,85–6,90 (m, 2H), 5,06 (d, J=1,3 Гц, 2H), 4,27–4,42 (m, 2H), 4,08–4,12 (m, 1H), 3,70–3,84 (m, 5H), 3,61–3,66 (m, 1H), 3,44–3,55 (m, 1H), 3,34–3,43 (m, 4H), 3,03–3,19 (m, 2H), 2,74–2,85 (m, 1H), 2,39–2,66 (m, 4H), 1,15 (d, J=6,0 Гц, 6H), 0,92–0,98 (m, 6H), 0,52–0,63 (m, 4H).

Соединения из таблицы 23 получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **M20**:

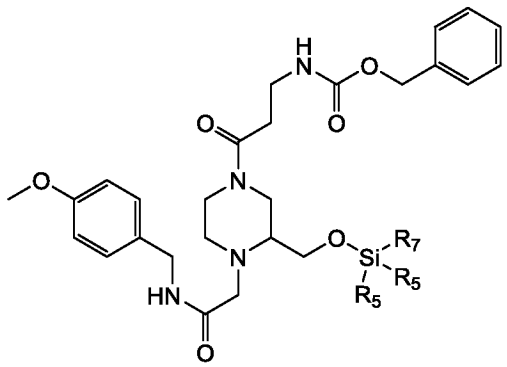
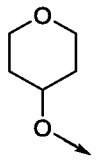
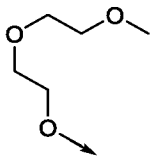
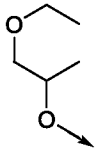
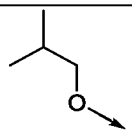


Таблица 23. Модельные соединения			
R_5 **R_7** **Название**	**Номер (используемые промежуточные соединения)**	**LCMS: [M+H]; время удерживания; (способ)**	**^{1}H–ЯМР (400 МГц, CD_3OD)**
R_7 =  R_5=Et бензил–N–(3–(3'–(((диэтил((тетрагидро–2''H–пиран–4''–ил)окси)силил)окси)метил)–4'–(2'''–((4''''–метоксибензил)амино)–2'''–оксоэтил)пиперазин–1'–ил)–3–оксопропил)карбамат	**M21 (M20a, M20b)**	685,5; 1,43 мин; (5)	7,25–7,40 (m, 5H), 7,22 (d, J=8,7 Гц, 2H), 6,85–6,91 (m, 2H), 5,06 (d, J=1,3 Гц, 2H), 4,27–4,41 (m, 2H), 3,93–4,04 (m, 1H), 3,87 (dt, J=11,7, 4,5 Гц, 2H), 3,71–3,83 (m, 5H), 3,61–3,66 (m, 1H), 3,34–3,52 (m, 7H), 3,02–3,20 (m, 2H), 2,74–2,85 (m, 1H), 2,42–2,69 (m, 4H), 1,75–1,86 (m, 2H), 1,47–1,57 (m, 2H), 0,96 (t, J=7,9 Гц, 6H), 0,54–0,65 (m, 4H).

R_7 =  R_5=Et бензил–N–(3–(3’–(((диэтил(2’’–(2’’’–метоксиэтокси)этан–1’’–ил)оксисилил)окси)метил)–4’–(2’’’’–((4’’’’’–метоксибензил)амино)–2’’’’–оксоэтил)пиперазин–1’–ил)–3–оксопропил)карбамат	**M22 (M20a, M20b)**	703,5; 1,41; (5)	7,26–7,37 (m, 5H), 7,18–7,25 (m, 2H), 6,87 (d, J=8,7 Гц, 2H), 5,06 (s, 2H), 4,27–4,43 (m, 2H), 3,65–4,11 (m, 7H), 3,45–3,65 (m, 6H), 3,32–3,44 (m, 9H), 3,08–3,20 (m, 2H), 2,73–2,85 (m, 1H), 2,52–2,67 (m, 3H), 2,39–2,49 (m, 1H), 0,87–1,03 (m, 6H), 0,49–0,68 (m, 4H)
R_7 =  R_5=Et бензил–N–(3–(3’–(((диэтил(1’’–этоксипропан–2’’–ил)оксисилил)окси)метил)–4’–(2’’’’–((4’’’’’–метоксибензил)амино)–2’’’’–оксоэтил)пиперазин–1’–ил)–3–оксопропил)карбамат	**M23 (M20a, M20b)**	687,6; 1,55; (5)	7,25–7,37 (m, 5H), 7,22 (d, J=8,6 Гц, 2H), 6,85–6,90 (m, 2H), 5,01–5,15 (m, 2H), 4,29–4,41 (m, 2H), 4,01–4,10 (m, 1H), 3,58–3,92 (m, 7H), 3,32–3,58 (m, 8H), 3,05–3,19 (m, 2H), 2,73–2,85 (m, 1H), 2,41–2,66 (m, 4H), 1,31–1,37 (m, 1H), 1,11–1,18 (m, 5H), 0,90–0,99 (m, 6H), 0,54–0,65 (m, 4H)
R_7 =  R_5=Et бензил–N–(3–(3’–(((диэтил(изобутокси)силил)окси)метил)–4’–(2’’–((4’’’–метоксибензил)амино)–2’’–	**M24 (M20a, M20b)**	657,4; 1,44; (5)	7,25–7,39 (m, 5H), 7,18–7,25 (m, 2H), 6,84–6,90 (m, 2H), 5,06 (s, 2H), 4,28–4,41 (m, 2H), 3,68–3,84 (m, 5H), 3,50–3,68 (m, 2H), 3,32–3,50 (m, 7H), 3,02–3,19 (m, 2H), 2,72–2,85 (m, 1H), 2,39–2,71 (m, 4H), 1,58–1,75 (m, 1H), 0,81–1,05 (m, 11H), 0,50–0,64

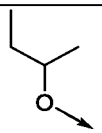
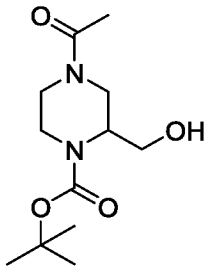
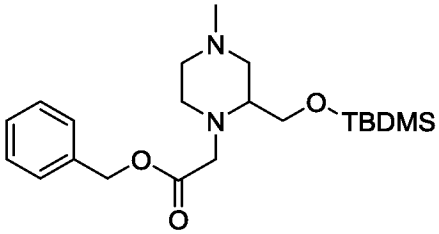
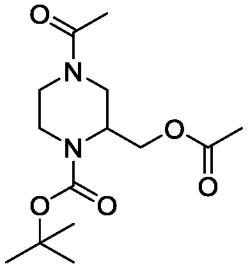
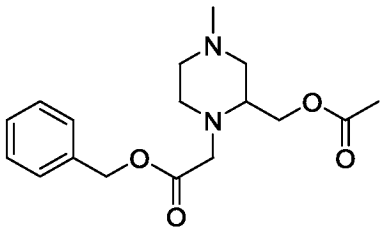
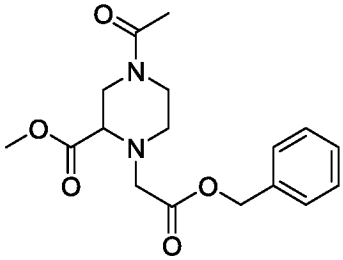
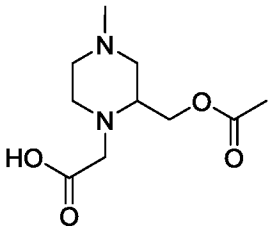
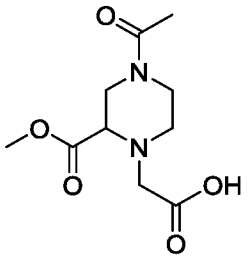
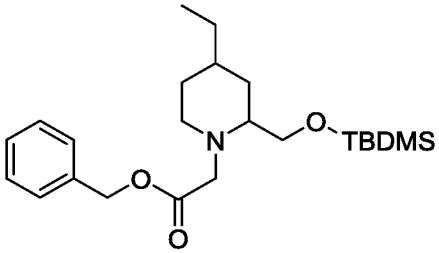
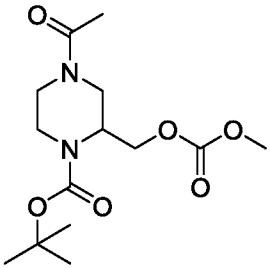
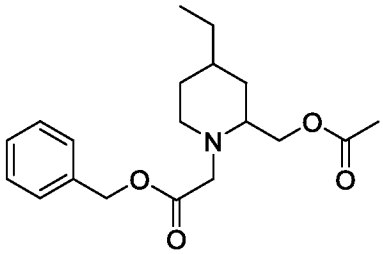
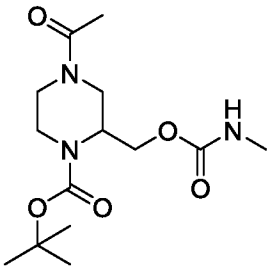
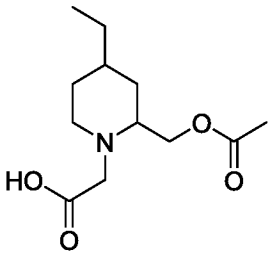
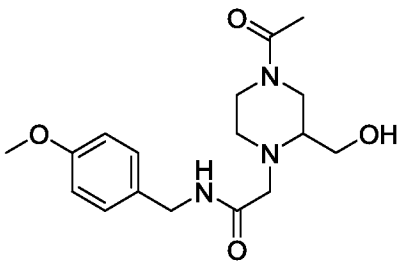
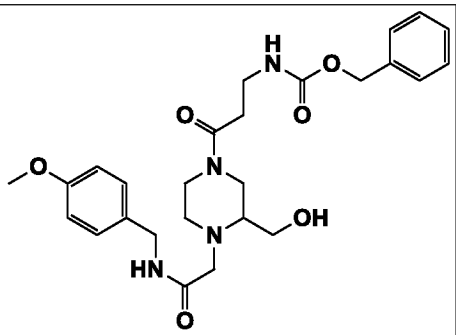
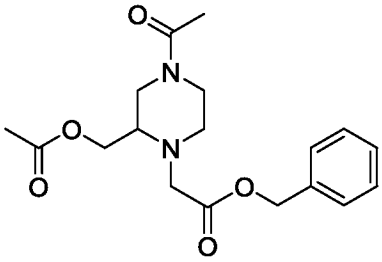
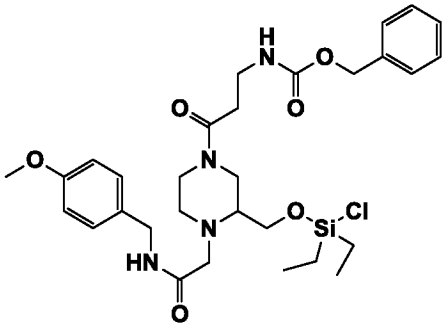
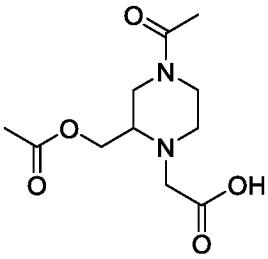
оксоэтил)пиперазин–1’–ил)–3–оксопропил)карбамат			(m, 4H)
R_7 =  R_5=Et бензил–N–(3–(3’–(((втор–бутоксидиэтилсилил)окси)метил)–4’–(2’’–((4’’’–метоксибензил)амино)–2’’–оксоэтил)пиперазин–1’–ил)–3–оксопропил)карбамат	**M25 (M20a, M20b)**	657,4; 1,42; (5)	7,25–7,38 (m, 5H), 7,22 (d, J=8,7 Гц, 2H), 6,84–6,90 (m, 2H), 5,06 (d, J=1,3 Гц, 2H), 4,28–4,41 (m, 2H), 3,69–3,90 (m, 6H), 3,44–3,69 (m, 3H), 3,35–3,40 (m, 3H), 3,02–3,18 (m, 2H), 2,74–2,85 (m, 1H), 2,41–2,69 (m, 4H), 1,36–1,52 (m, 2H), 1,13 (d, J=6,1 Гц, 3H), 0,93–0,98 (m, 6H), 0,86–0,90 (m, 3H), 0,55–0,61 (m, 4H).
R_7=OiPr R_5=iPr бензил–N–(3–(3’–(((изопропоксидиизопропилсилил)окси)метил)–4’–(2’’–((4’’’–метоксибензил)амино)–2’’–оксоэтил)пиперазин–1’–ил)–3–оксопропил)карбамат	**M26** (**M20a**, дихлордиизопропилсилан)	671,4; 1,51; (1)	7,31 (m, 5H), 7,22 (d, 2H), 6,92 (m, 2H), 6,86 (m, 1H), 5,05 (d, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,13 (m, 2H), 3,4–3,90 (m, 10H), 3,37 (m, 4H), 3,08 (m, 2H), 2,78 (m, 1H), 2,60 (m, 3H), 2,44 (m, 1H), 0,5–1,3 (m, 20H)
R_7=OEt R_5=iPr бензил–N–(3–(3’–(((этоксидиизопропилсилил)окси)метил)–4’–(2’’–((4’’’–метоксибензил)амино)–2’’–оксоэтил)пиперазин–1’–ил)–3–оксопропил)карбамат	**M27** (**M20a**, дихлордиизопропилсилан)	657,4; 1,63; (5)	7,31 (m, 5H), 7,21 (d, 2H), 6,86 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,3 (m, 0,5H), 4,13 (m, 2H), 3,4–3,90 (m, 11H), 3,37 (m, 4H), 3,09 (m, 2H), 2,65 (m, 1H), 2,57 (m, 3H), 2,45 (m, 1H), 1,09 (m, 18H)

Таблица 24. Промежуточные соединения в синтезе модельных соединений

Структура	**Номер**	**Структура**	**Номер**

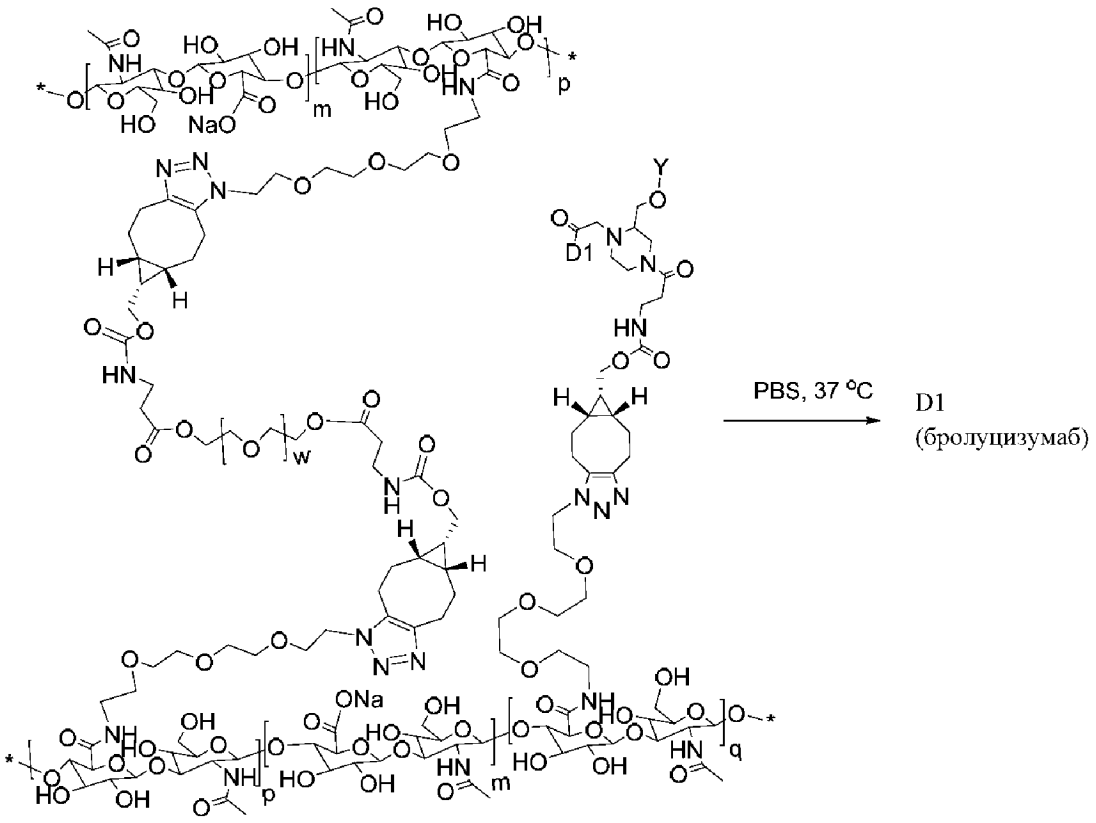
	**M6b**		**M18b**
	**M6c**		**M18c**
	**M7b**		**M18d**
	**M7c**		**M19d**
	**M8a**		**M19e**
	**M9a**		**M19f**

	M10a		M20a
	M17b		M20b
	M17c	–	–

Пример 8

Исследования высвобождения лекарственного средства in vitro

8–1. Высвобождение бролуцизумаба из коньюгатов гидрогель–лекарственное средство



,

где Y выбран из таблицы 2 выше.

Высвобождение бролуцизумаба из конъюгатов с гидрогелем C1a, C2a, C3a и C4a происходит так, как изображено на фиг. 4A. В этом исследовании серию конъюгатов гидрогель–бролуцизумаб выдерживали в 1× PBS при 37°C для оценки высвобождения лекарственного средства после реакции расщепления бесследного линкера. Из этих реакционных смесей производили отбор образцов в различные моменты времени и анализировали их для определения концентрации высвободившегося бролуцизумаба в надосадочной жидкости.

Каждый образец гидрогеля (приблизительно 50 мкл; точное количество определяли путем взвешивания, предполагаемая плотность гидрогеля=1 г/мл) добавляли во вставку Transwell® (Corning, Inc; поликарбонатная мембрана, толщина 10 мкм, диаметр 6,5 мм, размер пор 0,4 мкм). Лунки планшета заполняли 1 мл 1× PBS, и вставки, содержащие гидрогель, помещали в лунки. Для каждого образца гидрогеля подготавливали три лунки. Планшет надежно запечатывали и выдерживали при 37°C во влажной среде.

Образцы буфера для сбора материала отбирали из лунок в различные моменты времени в течение периода до 180 дней. В каждый момент времени и в каждой лунке вставку Transwell® удаляли из лунки, и весь объем буфера для сбора материала переносили в чистую пробирку и взвешивали, затем образец, соответствующий определенному моменту времени, отбирали из буфера для сбора материала (0,10 мл) и хранили при 4°C до окончательного анализа. Буфер для сбора материала пополняли с

помощью 1× PBS для восстановления объема буфера для сбора материала до 1 мл, а затем буфер для сбора материала возвращали в лунку. Затем вставку помещали обратно в ее лунку, и планшет возвращали в инкубатор.

По завершении исследования концентрацию белка (которая представляет концентрацию белка в каждой лунке в определенный момент времени) в образцах, соответствующих определенным моментам времени, определяли с использованием набора для анализа белка (DC™ Protein Assay Kit II, BioRad 5000112) с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием бролуцизумаба. Каждый образец, соответствующий определенному моменту времени, анализировали в двух повторностях, и результаты усредняли. Общее количество белка в указанной лунке в указанный момент времени рассчитывали путем умножения концентрации белка в данный момент времени на измеренное значение объема (при предположении, что плотность составляет 1 г/мл). Количество белка, отобранного из указанной лунки в указанный момент времени, рассчитывали путем умножения концентрации белка в данный момент времени на отобранный объем (0,10 мл). Совокупное количество бролуцизумаба, высвободившегося из каждого гидрогеля в каждую лунку до данного момента времени, рассчитывали путем добавления общего количества бролуцизумаба в лунке в каждый момент времени к совокупному количеству бролуцизумаба, отобранного из этой лунки в каждый момент времени до данного момента времени. Совокупное процентное количество белка, высвободившегося из конъюгатов C1a, C2a, C3a и C4a вплоть до указанного момента времени, показано на фиг. 4B. Совокупное процентное количество высвободившегося бролуцизумаба рассчитывали путем деления совокупного количества высвободившегося бролуцизумаба в указанный момент времени на общее количество бролуцизумаба, присутствующего в исходном образце гидрогеля, и умножения на 100. Данные нормализовали путем установления измеренного количества высвободившегося лекарственного средства, которое достигло значения плато, равным 100%. Как видно из фиг. 4B, высвобождение бролуцизумаба из носителя поддерживается в течение периода нескольких месяцев, и на скорость высвобождения влияет структура бесследного линкера, используемого в конъюгате.

Концентрация белка в лунке в момент времени t:

$[P](t)$

Общий объем в лунке в момент времени t:

$V(t)$

Общее количество белка в лунке в момент времени t:

$P_{лунка}(t) = [P](t) \times V(t)$

Количество белка, отобранного из лунки в момент времени t:

$R(t) = [P](t) \times 0{,}1$ мл

Совокупное количество белка, высвободившегося из гидрогеля до момента времени t:

$P_{совокупное}(t) = P_{лунка}(t) + \sum_{i=0}^{t-1} R(t)$

8–2. Высвобождение D2 из конъюгатов гидрогель–лекарственное средство

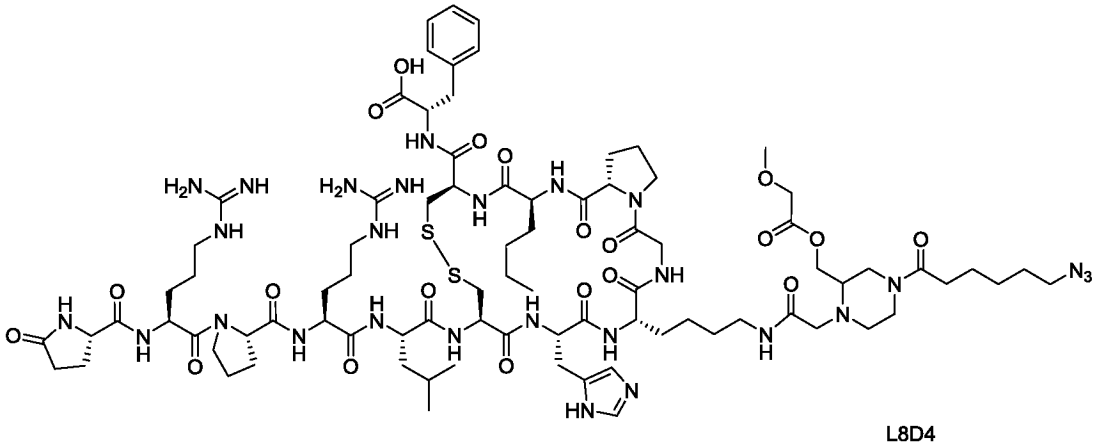
Анализы высвобождения in vitro выполняли во вставках Transwell® диаметром 6,5 мм (размер пор 8 мкм, Corning). Аликвоту 100 мкл гидрогеля на основе HA, связанного с лекарственным средством, добавляли в каждую вставку Transwell вместе со 100 мкл бычьей синовиальной жидкости (BSF, от Bioreclamation IVT), дополненной следующими антимикробными средствами: 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies) и 1% фунгизоном (Life Technologies) или 100 мкл PBS. Общий начальный объем геля и среды для высвобождения во вставке составлял 200 мкл. 900 мкл BSF (с антимикробными средствами) либо PBS пипеткой вносили в лунки планшета Transwell, вставки, содержащие гидрогель, помещали в лунки, и планшет инкубировали во влажном инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 (для каждого образца гидрогеля были приготовлены две вставки). В каждый момент времени вставки Transwell переносили в новую лунку, заполненную 1000 мкл свежей BSF (с антимикробными средствами) или PBS, а содержимое старой лунки отбирали и хранили при –80°C до анализа.

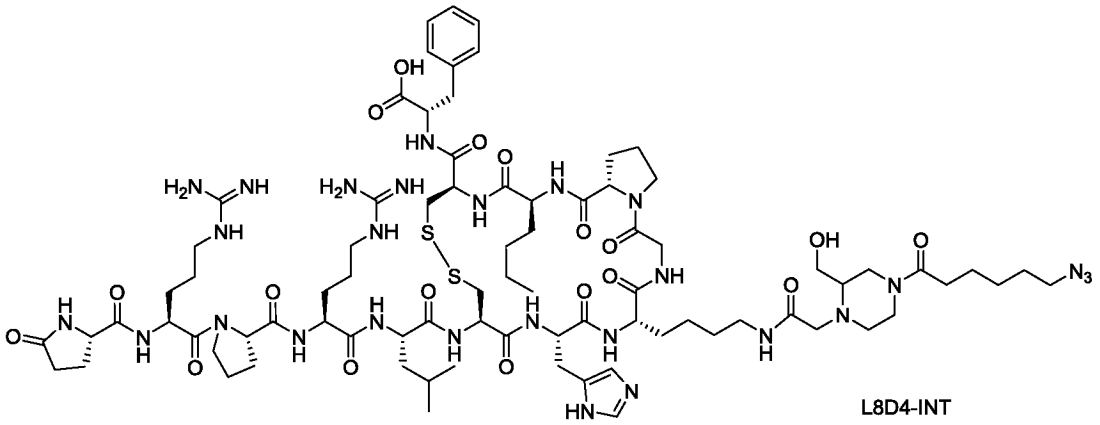
Количественную оценку высвободившегося D2 определяли методом сэндвич–ELISA. Протокол был аналогичен описанному в системе DuoSet для постановки ELISA для человеческого IGF–1 (R & D Systems) со следующими модификациями: для приготовления планшета планшеты в 96–луночном формате (Costar) покрывали захватывающим антителом (Novartis), разбавленным в карбонатно–бикарбонатном буфере из пакета BupH (Thermo Scientific), и инкубировали в течение ночи при 4°C. Все другие реагенты были получены от R & D Systems, за исключением BSA (Sigma), промывочного буфера KPL (Kirkegaard & Perry) и блокирующего раствора, представляющего собой молочный разбавитель/блокирующий раствор KPL (Kirkegaard & Perry). Детекторное антитело инкубировали в течение 1,5 ч. Совокупное количество белка, высвободившегося из гидрогелей C10, C11 и C12 в ходе инкубирования с PBS или BSF, показано на фиг. 5. Количество белка, высвободившегося в лунку в указанный момент времени, рассчитывали путем умножения концентрации белка в среде для высвобождения (BSF или PBS) в данный момент времени на общий объем среды для высвобождения (1,1 мл). Совокупное количество белка, высвободившегося из каждого образца гидрогеля до указанного момента времени, рассчитывали путем добавления количества белка, высвободившегося в данный момент времени (среднее значение из двух лунок для каждого образца гидрогеля), к совокупному количеству белка, высвободившегося в каждый момент времени до данного момента времени. Как видно из фиг. 5, высвобождение D2 из носителя поддерживается в течение периода нескольких недель, и на скорость высвобождения влияет структура бесследного линкера, используемого в конъюгате.

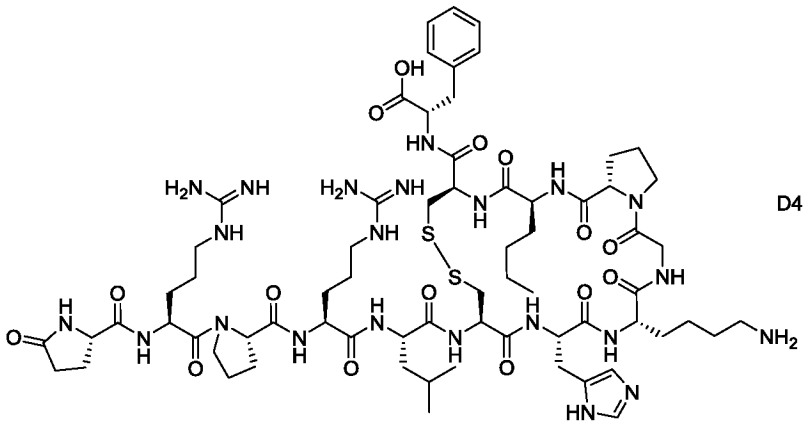
D2 представляет собой лекарственное средство, которое вызывает фосфорилирование рецептора IGF1 в клетках NIH3T3, сверхэкспрессирующих человеческий рецептор IGF–1. Биологическую активность высвободившегося D2 оценивали путем количественного определения фосфорилирования рецептора IGF1, обусловленного инкубированием клеток NIH3T3, сверхэкспрессирующих человеческий

рецептор IGF–1, со средой для высвобождения, содержащей лекарственное средство, в отдельные моменты времени (образцы собирали, как описано выше). Уровень фосфорилирования рецептора IGF–1 определяли путем лизиса клеток и анализа лизатов методом ELISA. Клетки высевали в количестве 6000 клеток/лунка (96–луночный планшет) в DMEM с высоким содержанием глюкозы, 10% FCS, 1% пируватом натрия, 2 мМ L–глутамина, 10 мМ HEPES, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и инкубировали в течение ночи при 37°C во влажном инкубаторе с 5% CO_2. Затем клетки помещали в бессывороточную "голодную" среду (DMEM с высоким содержанием глюкозы, 0,1% BSA, 1% пируват натрия, 2 мМ L–глутамина, 10 мМ HEPES, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) на 1,5 ч. при 37°C и 5% CO_2 перед инкубированием со свежими стандартами D2 или средой для высвобождения, содержащей лекарственное средство, в течение 1 ч. при 37°C и 5% CO_2. Среду для высвобождения, содержащую лекарственное средство, разбавляли "голодной" средой перед добавлением к клеткам, чтобы достичь концентрации D2 в диапазоне калибровочной кривой, при предположении отсутствия потери активности. Соответствующий коэффициент разбавления для каждого образца определяли, исходя из концентрации D2 в среде для высвобождения, которая ранее была измерена с помощью сэндвич–ELISA с использованием способа, описанного в приведенном выше абзаце. Клетки лизировали в 1× трис–буферном солевом растворе (50 мМ трис·HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl) и 1% Triton X–100, 5 мМ EDTA, 1× ингибиторе протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific) в течение 30–45 мин в горизонтальном шейкере при 4°C. Образцы хранили в течение ночи при –80°C. Уровни фосфорилирования IGF–1R анализировали с помощью ELISA, используя DuoSet IC для человеческого фосфорилированного IGF–1R (R & D Systems) со следующими модификациями: захватывающее антитело (R&D, MAB391) разбавляли до 4 мкг/мл в PBS, лунки промывали с помощью 300 мкл/лунка PBS–Tween (Millipore, 524653), лунки блокировали с помощью 200 мкл/лунка 1% BSA в PBS, фосфорилирование выявляли с помощью антитела к фосфотирозину, конъюгированного с HRP (R&D, HAM1676), и люминесцентный сигнал выявляли с помощью хемилюминесцентного субстрата (Pierce, 37069). Эквивалентную концентрацию свежего D2, необходимую для достижения измеренного уровня фосфорилирования IGF–1R в клетках, обработанных высвободившимся D2, интерполировали согласно калибровочной кривой, и затем в нее вносили поправку на разбавление. Полученные значения, показанные на фиг. 9 для D2, высвободившегося из конъюгата C8 в среду для высвобождения на основе BSF, представляют эквивалентную концентрацию свежего D2, которая будет обеспечивать наблюдаемый уровень фосфорилирования IGF–1R в клетках. Как видно из фиг. 9, высвобождение биологически активного D2 из конъюгата C8 поддерживается в течение периода семи дней.

8–3. Высвобождение D4 из аддукта линкер–лекарственное средство: L8D4







1 мг/мл раствора **L8D4** получали в 1× PBS. Измеренное и обнаруженное значение pH раствора аддукта составляло 6,9. Раствор помещали в термомиксер при 40°C и встряхивали при 600 об/мин. Аликвоты отбирали для анализа методом HPLC в следующие моменты времени после растворения: 0 ч., 2 ч., 4 ч., 21,5 ч., 28,5 ч., 43,5 ч., 67,5 ч., 100,5 ч., 180,5 ч. и 266,5 ч.

Состав раствора оценивали в каждый момент времени с помощью HPLC (способ, описанный ниже). Отнесение пиков для исходного (**L8D4**, m/z = +952,2 для $(M+2H)^{2+}$), промежуточного (**L8D4–INT**, m/z = +916,4 для $(M+2H)^{2+}$) и высвободившегося лекарственного средства (**D4**, m/z = +1537,9 для M+H) осуществляли с помощью MS–детектирования, и относительные количества каждого соединения определяли путем интегрирования пиков из хроматограммы, полученной при использовании поглощения UV–излучения при 214 нм. Процентное содержание каждого соединения, присутствующего в растворе, рассчитывали путем деления площади соответствующего пика (**L8D4**, **L8D4–INT** либо **D4**) на сумму трех площадей пиков для **L8D4**, **L8D4–INT** и **D4** и умножения результата на 100. Процентное количество каждого соединения, присутствующего в растворе, наносили на график в зависимости от времени (фиг. 6), а период полуразложения для исходного **L8D4** (1 день) и период полувысвобождения для **D4** (8 дней) оценивали с помощью программного обеспечения для аппроксимации кривой при предположении первого порядка кинетики высвобождения и разложения. Как видно из фиг. 6, высвобождение D4 от бесследного линкера поддерживается в течение периода 11 дней. Наблюдаемые продукты реакции соответствуют механизму расщепления бесследного линкера, показанному на фиг. 1.

Условия аналитической HPLC–MS: ACQUITY UPLC BEH C18; размер частиц: 1,7 мкм; размер колонки: 2,1 × 50 мм; элюент/градиент: 2–98% CH_3CN/H_2O/4,4 мин (CH_3CN, содержащий 0,1% муравьиную кислоту, и H_2O, содержащая 0,1% муравьиную кислоту); скорость потока: 1,0 мл/мин; температура колонки: 50°C.

8–4a. Протокол исследования высвобождения для модельных конъюгатов бесследный линкер–лекарственное средство M1–M19 in vitro

В этом исследовании серию модельных конъюгатов бесследный линкер–лекарственное средство, в которых лекарственное средство представляет собой низкомолекулярное аминосодержащее соединение, выдерживали в 1× PBS при 37°C. Из этих реакционных смесей производили отбор образцов в различные моменты времени и анализировали их для определения концентрации оставшегося исходного соединения, а также концентрации высвободившегося аминосодержащего лекарственного средства (п–метоксибензиламина, 2–аминопиридина, п–метоксианилина или N–метил–п–метоксибензиламина). Рассчитывали периоды полуразложения исходных соединений и периоды полувысвобождения аминосодержащих лекарственных средств.

Способ оценивания скоростей высвобождения аминосодержащего лекарственного средства из M1–M19

Получали каждое соединение **M1–M19** в виде 0,1 M исходного раствора в DMF, а также набор стандартных растворов высвобождающегося аминосодержащего лекарственного средства (4–метоксибензиламина, 2–аминопиридина, п–метоксианилина и N–метил–п–метоксибензиламина). Аликвоту каждого раствора объемом 35 мкл добавляли к 3,465 мл PBS с получением 1 мМ растворов каждого конъюгата или аминосодержащего лекарственного средства. Аликвоту каждого 1 мМ раствора объемом 150 мкл отмеривали

во флаконы для LCMS с полипропиленовым вкладышем; было подготовлено 2 флакона для каждого соединения в каждый момент времени.

Флаконы инкубировали при 37°C. В каждый момент времени (например, 0, 1, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 49 и 56 дней) два флакона с каждым конъюгатом извлекали из инкубатора и замораживали при –20°C, чтобы избежать дальнейшего гидролиза. Все образцы размораживали и анализировали одной партией после завершения исследования высвобождения с использованием способа аналитической HPLC, описанного ниже. Каждый образец анализировали дважды. Контрольные растворы аминосодержащих лекарственных средств получали перед анализом и анализировали в имеющемся состоянии без предварительного инкубирования при 37°C.

Условия аналитической HPLC–MS для исследования 8.4a

HPLC: Thermo Accela для HPLC и автоматический дозатор; температура поддона автоматического дозатора: 8°C; объем вводимой пробы: 20 мкл; колонка: Phenomenex Kinetex C18, 2,1 × 50 мм, 2,6 мкм. Температура колонки: окружающая; подвижные фазы: A=0,1% муравьиная кислота в воде; B=0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле; скорость потока: 200 мкл/мин. Градиент (время/%B): 0/0, 3/0, 10/80, 15/80, 15,1/0, 18/0.

UV: Thermo Accela PDA; диапазон сканирования: 200–400 нм; шаг длины волны: 1 нм; частота дискретизации: 20 Гц; ширина полосы пропускания фильтра: 9 нм; MS: Thermo LTQ XL; режим ионизации: ESI; напряжение распыления: 0 В в течение 0–1 минут, затем переключение на 4 кВ; температура капилляра: 250°C; отводной клапан: подача элюата из системы для LC на слив в течение 0–1 минуты, затем перенаправление потока на MS–спектрометр; диапазон масс: 120–800 Да.

Состав раствора оценивали в каждый момент времени с помощью HPLC. Отнесение пиков для исходного, промежуточного и высвободившегося аминосодержащего лекарственного средства осуществляли с помощью MS–детектирования, и относительные количества каждого соединения определяли путем интегрирования пиков из хроматограммы, полученной при использовании детектирования поглощения UV–излучения при 272 нм. Для каждого соединения **M1–M19** средней площади пика в день 0 назначали нормализованное значение 100. Для стандарта высвобождающегося аминосодержащего лекарственного средства (например, п–метоксибензиламина) средней площади пика каждого стандарта назначали нормализованное значение 100. Абсолютную площадь под кривой для каждого выявленного соединения сравнивали с этими значениями. Воспроизводимость площади пика в разных прогонах, как правило, находилась в пределах 20% для сильного сигнала и была значительно хуже для слабых сигналов, поэтому нормализованные сигналы выше 100, вероятно, соответствуют значениям, равным или близким к 100 (вероятно, 90–100, в пределах погрешности эксперимента). Процентное содержание исходного и аминосодержащего лекарственного средства, присутствующего в растворе, рассчитывали путем деления соответствующей площади пика на среднюю площадь для того же соединения, которой было назначено нормализованное значение 100, и умножения

результата на 100. Процентное содержание исходного и аминосодержащего лекарственного средства, присутствующего в растворе, наносили на график в зависимости от времени, а период полуразложения для исходного лекарственного средства и период полувысвобождения для аминосодержащего лекарственного средства оценивали с помощью программного обеспечения для аппроксимации кривой при предположении первого порядка кинетики. Расчетные значения периода полувыведения, округленные до ближайшего целого дня, представлены в таблице 25.

8–4b. Исследование высвобождения M20–M27 in vitro

В этом исследовании серию модельных конъюгатов бесследный линкер–лекарственное средство **M20–M27** выдерживали в водном растворе при 37°C. Из этих реакционных смесей производили отбор образцов в различные моменты времени и анализировали их для определения концентрации оставшегося исходного соединения. Аналитический способ не был оптимизирован для определения концентрации аминосодержащего лекарственного средства. Рассчитывали период полуразложения для исходных соединений.

Способ оценивания скоростей разложения конъюгатов для M20–M27

Каждое соединение **M20–M27** получали в виде 0,1 M исходного раствора в DMF. Аликвоту каждого раствора объемом 35 мкл добавляли к 3,465 мл смеси 2:1 DMF : PBS (для соединения **M24**: 3:1 DMF : PBS) с получением 1 мМ растворов каждого соединения **M20–M27**. Реакционные флаконы выдерживали при 37°C. В каждый момент времени (например, 0, 1, 3, 8, 14, 21, 28, 35, 49, 56, 70, 92 дня) получали образцы для анализа, отбирая 150 мкл из каждого 1 мМ раствора и разбавляя с помощью 75 мкл DMF. Два образца для анализа отбирали из каждого реакционного флакона в каждый момент времени и хранили при 4°C. Все образцы анализировали одной партией после завершения исследования высвобождения. Каждый образец анализировали дважды с использованием способа аналитической HPLC, описанного ниже.

Состав реакционного раствора оценивали в каждый момент времени с помощью HPLC. Отнесение пиков соединений **M20–M27** осуществляли с помощью MS–детектирования, и определяли интегрирование пиков из хроматограммы, полученной при использовании детектирования поглощения UV–излучения при 272 нм. Для каждого соединения **M20–M27** средней площади пика в день 0 назначали нормализованное значение 100. Абсолютную площадь под кривой в каждый момент времени сравнивали с этими значениями. Воспроизводимость площади пика в разных прогонах, как правило, находилась в пределах 20% для сильного сигнала и была значительно хуже для слабых сигналов, поэтому нормализованные сигналы выше 100, вероятно, соответствуют значениям, равным или близким к 100 (вероятно, 90–100, в пределах погрешности эксперимента). Процентное содержание соединений **M20–M27**, остающихся в растворе, рассчитывали путем деления соответствующей площади пика на среднюю площадь, которой было назначено нормализованное значение 100, и умножения результата на 100. Процентное содержание соединений **M20–M27**, присутствующих в растворе, наносили на

график в зависимости от времени, а период полуразложения оценивали с помощью программного обеспечения для аппроксимации кривой при предположении первого порядка кинетики. Расчетные значения периода полувыведения, округленные до ближайшего целого дня, представлены в таблице 25.

Условия аналитической HPLC–MS для исследования 8.4b

Все настройки являются такими же, как для условий аналитической HPLC–MS для исследования 8.4a, за исключением следующего: подвижные фазы: A=5 мМ гидроксид аммония в воде; B=5 мМ гидроксид аммония в ацетонитриле; скорость потока: 400 мкл/мин; градиент (время/%B): 0/10, 0,5/10, 4/80, 8/80, 8,1/10, 12/10. Отводной клапан переключается через 0,5 минуты после ввода пробы.

Таблица 25. Результаты исследования высвобождения для M1–M27

Название	Расчетное значение $t_{1/2}$ для стабильности, исходное соединение (d)	Расчетное значение $t_{1/2}$ для высвобождения, аминосодержащее лекарственное средство (d)
M1	37	59
M2	23	65
M3	2	12
M4	2	2
M5	3	2
M6	26	41
M7	3	Высвободившееся лекарственное средство отсутствует
M8	35	26
M9	Разложение отсутствует	Высвободившееся лекарственное средство отсутствует
M10	Разложение отсутствует	Высвободившееся лекарственное средство отсутствует
M17	50	34
M18	8	5
M19	6	4
M20	51	NA
M21	126	NA
M22	23	NA
M23	47	NA

M24	36	NA
M25	80	NA
M26	Разложение отсутствует	NA
M27	Разложение отсутствует	NA

Пример 9

9–1. Высвобождение бролуцизумаба из конъюгатов гидрогель–лекарственное средство

В этих примерах конъюгат гидрогель–лекарственное средство дозировали кроликам интравитреально в 2 разных дозах с последующим введением дозы VEGF через 32 дня. Через 34 дня глаза кроликов изучали посредством визуализации для оценки степени блокирования истечения из кровеносных сосудов сетчатки. Также определяли конечное воздействие бролуцизумаба в жидкой части стекловидного тела глаза.

Конъюгат гидрогель–лекарственное средство **C2b**, полученный с нагрузкой бролуцизумаба 10,2 мг/мл, разбавляли перед дозированием с получением образцов с нагрузками бролуцизумаба 6 мг/мл (**C2b1**) и 0,6 мг/мл (**C2b2**). Количество 1× PBS, которое должно быть добавлено, рассчитывали с помощью следующего уравнения: (разбавитель PBS (мл)) = [(общее количество лекарственного средства (мг) / желаемая нагрузка лекарственного средства (мг/мл)] − (начальный объем конъюгата (мл)).

Для получения конъюгата с нагрузкой бролуцизумаба 6 мг/мл (**C2b1**): к 0,9 мл **C2b** в шприце объемом 3 мл добавляли 0,63 мл 1× PBS. Шприц закупоривали и энергично встряхивали для гомогенизации. В результате этого получали общий объем образца 1,53 мл с нагрузкой белка=9,18 мг бролуцизумаба/1,53 мл=6,0 мг/мл бролуцизумаба в **C2b1**.

Конъюгат **C2b1** отмеривали для дозирования в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл с присоединенными иглами 30G посредством удаления поршня и заполнения желаемым объемом **C2b1**. Пузырьки воздуха удаляли путем проведения осторожных манипуляций со шприцем.

Для получения конъюгата с нагрузкой бролуцизумаба 0,6 мг/мл (**C2b2**): к 0,1 мл **C2b1** в шприце объемом 3 мл добавляли 0,9 мл 1× PBS. Шприц закупоривали и энергично встряхивали для гомогенизации. В результате этого получали общий объем образца 1,0 мл с нагрузкой белка=0,60 мг бролуцизумаба/1,0 мл=0,6 мг/мл бролуцизумаба в **C2b2**.

Конъюгат **C2b2** отмеривали для дозирования в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл с присоединенными иглами 30G посредством удаления поршня и заполнения желаемым объемом **C2b2**. Пузырьки воздуха удаляли путем проведения осторожных манипуляций со шприцем.

Интравитреальное введение 400 нг/глаз человеческого VEGF (hVEGF) в глаза самцов голландских кроликов (массой тела примерно 1,6–2 кг) приводит к максимальному истечению через 48 часов после обработки. Это истечение из сосудов можно полностью

ингибировать путем предварительного IVT введения молекулы антитела к VEGF, такого как ранибизумаб, бевацизумаб или бролуцизумаб. Интервал между введением молекулы антитела к VEGF и стимуляцией с помощью hVEGF определяет продолжительность действия антитела к VEGF. В этом исследовании за тридцать два дня до стимуляции с помощью hVEGF (за 34 дня до визуализации) в стекловидное тело инъецировали антитела к VEGF (в растворе либо в виде конъюгата с гидрогелем) либо холостой образец гидрогеля (отрицательный контроль). Каждая группа кроликов состояла из 3–5 животных (6–10 глаз), которым одновременно инъецировали одни и те же антитело/конструкцию. Ингибирование истечения из сосудов, индуцированное каждой конструкцией, направленной против VEGF, рассчитывают относительно истечения из сосудов, наблюдаемого в группе, обработанной холостым образцом гидрогеля.

Зрачки глаз самцов голландских кроликов (массой тела приблизительно 1,6–2 кг) расширяли путем местного применения 1% циклопентолата и 2,5% фенилэфрина, а роговицу анестезировали путем местного применения 0,5% пропаракаина. Затем кроликов анестезировали путем внутримышечной инъекции смеси кетамин/ксилазин (17,5–35 и 2,5–5 мг/кг). Во время прямой визуализации с помощью хирургического микроскопа 50 мкл средства для обработки вводили в стекловидное тело. Иглу 30 калибра вставляли супратемпорально примерно в 2 мм от лимба роговицы в центральную часть стекловидного тела. Глаза кроликов изучали в отношении осложнений после инъекции (например, кровоизлияния, отслоения сетчатки или повреждения хрусталика), а затем процедуру повторяли для другого глаза. Во всех исследованиях в отношении обоих глаз применяли мазь с антибиотиком. Через 32 дня после первоначальной инъекции конъюгата гидрогель–лекарственное средство 400 нг рекомбинантного hVEGF инъецировали в стекловидное тело глаз кроликов. Человеческий VEGF (PeproTech; № по каталогу AF 100–20, партия 0508AF10) разбавляли в стерильном 0,9% солевом растворе. Через 48 часов после стимуляции путем интравитреальной инъекции VEGF сосудистую сеть сетчатки кроликов визуализировали, как описано ниже.

Индуцированные человеческим VEGF изменения сосудов сетчатки определяли количественно посредством получения изображений сосудов сетчатки после внутривенного введения флуоресцентного красителя. Изображения, полученные после доставки флуоресцеина, использовали для определения проницаемости сосудов. Для получения количественных значений истечения флуоресцеина также требовалось проведение визуализации с использованием флуоресцентного красителя, выбранного для мечения сосудов (декстрана, конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC)). Изображения глаз получали через 48 часов после введения VEGF. Изображения представляли собой в среднем до 40 зарегистрированных изображений, полученных с помощью сканирующего лазерного офтальмоскопа (SLO) с линзой с углом обзора 30 градусов на назальном медуллярном луче, прилегающем к зрительному нерву. Для получения всех изображений использовали канал флуоресцеина в 6–режимной системе Spectralis® (Heidelberg Engineering). Перед визуализацией кролики получали 1–2 капли 1%

циклопентолата и 1–2 капли 2,5% фенилэфрина местно для расширения зрачка; также применяли 0,5% пропаракаин в качестве местного анестетика. Затем кроликов анестезировали, как описано ранее. Сосуды метили за приблизительно 5 минут до получения изображений с помощью внутривенной инъекции 1 мл раствора декстрана, конъюгированного с FITC, размером 2000 кДа (SIGMA®) в краевую ушную вену. Концентрацию используемого FITC–декстрана (35–70 мг/мл) подбирали эмпирически для каждой партии, исходя из флуоресцентного сигнала, необходимого для получения высококачественных изображений. Затем получали изображения меченой сосудистой сети сетчатки. Затем оценивали проницаемость сосудов сетчатки путем введения 0,3 мл 10% раствора флуоресцеина в краевую ушную вену. Затем получали изображения для одного глаза через 3 минуты после IV инъекции, после чего получали изображения для другого глаза через приблизительно 4–6 минут после IV инъекции флуоресцеина.

Эффекты VEGF в отношении проницаемости сосудов оценивали по изображениям с использованием флуоресцеина, полученным через 3–6 минут. Анализ выполняли количественно с помощью специально разработанного для этой цели программного обеспечения с использованием MATLAB® (Mathworks®). В случаях недостаточного качества изображения, если было отмечено воспаление или в случаях, когда были проблемы с инъекциями, производили исключения из исследования до раскрытия кода.

Истечение флуоресцеина определяли количественно с помощью методик обработки изображений с использованием способа, описанного ниже.

Сначала изображения, полученные после введения VEGF с использованием FITC–декстрана и флуоресцеина, совмещали друг с другом с использованием характеристик сосудов, общих для обоих изображений, затем выполняли следующее.

1. Участки за пределами медуллярного луча затем вырезали из совместно зарегистрированных изображений вместе с любыми локальными областями с недостаточным для анализа качеством изображения.

2. Очерчивали несколько участков, представляющих интерес, в сосудах сетчатки, и интенсивность одного изображения увеличивали до тех пор, пока сигнал участка, представляющего интерес, не становился одинаковым на обоих изображениях (нормализация).

3. Совмещенное изображение, полученное с использованием FITC–декстрана, вычитали из изображения истечения флуоресцеина, получая изображение с флуоресцеином, вышедшим из сосудов.

4. Истечение флуоресцеина представляли для каждого глаза в виде средней интенсивности пикселей, содержащихся в участке после обрезки, представляющем интерес, на изображении с красителем, вышедшим из сосудов.

Ингибирование истечения флуоресцеина в каждой группе рассчитывали в сравнении с группой отрицательного контроля. Статистический анализ выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия множественного сравнения Даннетта.

Измеренный флуоресцентный сигнал пропорционален истечению из сосудов. Эффективность определяется как снижение измеренной интенсивности флуоресцентного сигнала относительно сигнала, наблюдаемого у животных, которые получали инъекции физиологического раствора или другого отрицательного контроля (такого как холостой образец гидрогеля). Более низкое значение среднего флуоресцентного сигнала соответствует большему ингибированию истечения и, следовательно, большей эффективности.

Данные, полученные в ходе этого исследования, показаны на фиг. 7A, где показано сильное ингибирование истечения флуоресцеина при использовании обеих доз (**C2b1** и **C2b2**) конъюгата гидрогель–лекарственное средство **C2b** по сравнению с отрицательным контролем (гидрогелем **H1b**). Подобное сильное ингибирование также наблюдается для положительного контроля (1000 мкг бролуцизумаба/глаз). При более низкой дозе бролуцизумаба (300 мкг/глаз) демонстрировалось лишь частичное блокирование истечения флуоресцеина, значительно меньшее, чем при использовании конъюгата гидрогель–лекарственное средство в соответствующей дозе (**C2b1**) либо конъюгата гидрогель–лекарственное средство в 10–кратно более низкой дозе (**C2b2**).

9–2. Воздействие препарата в стекловидном теле кроликов

Кроликов из предыдущего исследования со стимуляцией VEGF, которым дозировали **C2b1** и **C2b2**, использовали для оценивания конечных уровней лекарственного средства в стекловидном теле.

Сыворотку крови и глаза кроликов собирали в конечные моменты времени. Глаза кроликов рассекали для извлечения стекловидного тела. Образцы хранили при –80°C до дальнейшей обработки или анализа. Стекловидное тело дополнительно разделяли на "жидкую" и "гелеобразную" фракции стекловидного тела следующим образом. Стекловидное тело размораживали, и твердообразную гелеобразную часть стекловидного тела физически отделяли от жидкой части стекловидного тела в образце с использованием пластикового наконечника для пипетки объемом 1000 мкл. Оставшийся объем считали "жидкой" фракцией стекловидного тела, анализ которой показан на фиг. 7B.

384–луночные планшеты Meso Scale Discovery (MSD) для ELISA (номер по каталогу L21XA–4) покрывали с помощью 15 мкл (1 мкг/мл) кроличьего моноклонального антитела к линкеру, который соединяет VH и VL бролуцизумаба, в PBS и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 3 раза с помощью 80 мкл TBST (трис–буферного солевого раствора, pH 7,5, 0,05% Tween 20) и блокировали с помощью 40 мкл блокирующего буфера (5% BSA в PBS). BSA приобретали у Millipore (номер по каталогу 820452) или у Roche (номер по каталогу 03 116 964 001). Инкубирование для блокирования происходило в течение периода 2 часов при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Затем планшеты трижды промывали с помощью 80 мкл TBST. Образцы смешивали с разбавителем (2% BSA, 0,1% Tween 20, 0,1% Triton X–100 в трис–буферном солевом растворе, pH 7,5), а затем аликвоты образцов объемом 15 мкл инкубировали на планшете MSD для ELISA в течение 1 часа при комнатной температуре с

осторожным встряхиванием. Затем планшеты трижды промывали с помощью TBST. Аликвоту детекторного антитела, представляющего собой конъюгированное с меткой SULFO–TAG кроличье моноклональное антитело к линкеру (SEQ ID NO: 3), который соединяет VH (SEQ ID NO: 2) и VL (SEQ ID NO: 1) бролуцизумаба, объемом 15 мкл (0,5 мкг/мл) добавляли в каждую лунку на 1 час при комнатной температуре и осторожном встряхивании. Метку SULFO–TAG конъюгировали с кроличьим моноклональным антителом к линкеру, который соединяет VH и VL бролуцизумаба, согласно протоколу из набора для мечения MSD (пакет 1 для конъюгирования со сложным NHS–эфиром SULFO–TAG MSD Gold, номер по каталогу R31AA–1). Через час планшеты трижды промывали с помощью 80 мл TBST. Буфер для прочитывания MSD T (номер по каталогу MSD R92TC–2) разбавляли водой до концентрации 1×, и в каждую лунку добавляли 37,5 мкл 1× буфера для прочитывания MSD T. Планшеты прочитывали на детекторе Meso Scale Discovery M6000. Для количественного определения уровней извлечения бролуцизумаба из гидрогеля в качестве стандарта использовали очищенный бролуцизумаб.

Калибровочную кривую с использованием очищенного бролуцизумаба строили следующим образом. Калибровочные кривые по двенадцати точкам строили путем 2–кратного разбавления бролуцизумаба в разбавителе для ELISA с начальной концентрацией 500 нг/мл. Для анализа данных использовали аналитическое программное обеспечение от Meso Scale Discovery (Discovery Workbench версии 4.0). Необработанный электрохемилюминесцентный сигнал (ECL) и концентрации бролуцизумаба преобразовывали для построения калибровочной кривой, нанося на график log концентрации бролуцизумаба по оси x и log необработанных единиц ECL по оси y. Конечные концентрации бролуцизумаба определяли путем умножения значений уровней бролуцизумаба, интерполированных согласно калибровочной кривой, на соответствующий коэффициент разбавления. Использовались только значения сигнала ECL, которые находились в пределах линейного диапазона калибровочной кривой.

Результаты на фиг. 7B указывают на значительно более высокие уровни бролуцизумаба в жидкой части стекловидного тела у кроликов, которым дозировали обе дозы конъюгата гидрогель–лекарственное средство **C2b** (**C2b1** и **C2b2**), по сравнению с отрицательным контролем (**H1b**) и обеими дозами бролуцизумаба, дозируемого в растворе. (Следует отметить, что для целей построения графика образцам, в которых лекарственное средство не было выявлено, назначается значение 0,1 нг/мл).

9–3. Высвобождение D4 из конъюгата C13 in vivo

Оценивание высвобождения пептида из конъюгата гидрогель–лекарственное средство C13 in vivo в модели на грызунах

Все исследования проводились в соответствии с утвержденными NIBR протоколами по уходу за животными и их использованию. Мышей C57BL/6 (самцов в возрасте 1–11 недель) получали от Envigo. **C13** в 1× PBS, pH 6,5 (содержание **D4**=10 мг/мл) переносили в инсулиновые шприцы с закрепленными иглами 27 калибра. Составы

инъецировали подкожно в срединную точку спины мыши в объеме дозы 5 мл/кг (50 мг/кг **D4**). Дозирование осуществляли двум группам животных с n=3 в каждой. Образцы крови объемом 50 мкл отбирали путем поперечного надреза на хвосте в различные моменты времени после дозирования с использованием EDTA в качестве антикоагулянта. Образцы крови центрифугировали при 4000 × g в течение 20 минут с получением 20 мкл надосадочной жидкости плазмы крови.

Концентрацию **D4** в образцах плазмы крови определяли с помощью способов LC/MS. 150 мкл экстракционного растворителя (ацетонитрил:метанол:вода:муравьиная кислота; 1:1:1:0,003) добавляли к 20 мкл плазмы крови и перемешивали вихревым способом в течение 30 секунд в 96–луночном планшете с глубокими лунками. Смесь центрифугировали при 4000 × g в течение 10 минут. Аликвоту надосадочной жидкости объемом 150 мкл переносили в свежеподготовленный планшет с глубокими лунками. Калибровочную кривую для **D4** получали путем серийного разведения **D4** в плазме крови, обработанной EDTA, от 10000 до 0,5 нг/мл **D4** и совместного экстрагирования с неизвестными образцами. Неизвестные и стандартные образцы, которые использовали для построения кривой, вводили (10 мкл, автоматический дозатор CTC PAL HTS) в колонку ACE C18 LC (30 × 2,1, 3 мкм) в системе для HPLC Agilent 1290 при скорости потока 700 мкл/мин. Колонку предварительно уравновешивали 95% буфера A (0,1% муравьиная кислота в воде) и 5% буфера B (0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). **D4** элюировали в градиенте от 5 до 98% буфера B в течение 1,3 минуты. Элюат вводили в Sciex 6500 для MS, работающий в режиме ESI (450°C, CE=15, DP=50). Переход m/z от 378,0 (родительский ион) до 167,0 (дочерний ион) отслеживали для количественного анализа. Определяли концентрации высвободившегося **D4** в плазме крови в различные моменты времени в течение периода до 7 дней после дозирования. Как видно из фиг. 8, длительное воздействие **D4** достигается при дозировании в виде конъюгата гидрогель–лекарственное средство, представленного на примере с использованием бесследного линкера **L8**, описанного в данном документе.

Пример 10

Сравнительная тканевая переносимость гидрогелей

В этом исследовании изучали способность вызывать гранулематозный иммунный ответ у мышей C57BL/6, которым давали однократные подкожные инъекции различных гидрогелей и которых изучали спустя 7 дней. Тестируемыми препаратами были **H9** (частицы гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты, сшитые посредством реакции между гиалуроновой кислотой, функционализированной тиольной группой, и PEG, функционализированным акрилатной группой), **H1f** (частицы гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты, сшитые посредством реакции между гиалуроновой кислотой, функционализированной азидной группой, и алкин–модифицированным PEG) и раствор для инъекций на основе гиалуроновой кислоты Synvisc–One®, применяемый для лечения боли в колене при остеоартрите (Sanofi).

Получение H9

Для получения **H9** использовали гиалуроновую кислоту, функционализированную тиольной группой, **GLYCOSIL™** (коммерчески доступную от EsiBio, Аламида, Калифорния).

На основании опубликованных литературных источников (Shu, X.Z. et al., J Biomed Mater Res A, 2006, **79**(4):902–12; Shu, X.Z., et al., Biomaterials, 2004, **25:**1339–1348) понимают, что GLYCOSIL™ представляет собой полимер гиалуроновой кислоты, функционализированный тиольной группой, имеющий молекулярную массу 158–187 кДа, при этом функционализация тиолсодержащим компонентом составляет 42–45%. Для целей расчета концентрации реакционноспособных групп в реакции гелеобразования степень замещения предполагалась как составляющая 45%. Молекулярная масса незамещенного повторяющегося димерного звена в форме карбоксилатной соли натрия составляет 401,3 Да. Молекулярная масса тиолированного повторяющегося димерного звена со структурой, изображенной в публикациях, составляет 481,5 Да. Средняя MW димерного звена **GLYCOSIL™** в форме соли натрия с предполагаемой степенью замещения 45% составляет 437,5 Да = ((401,3 × 0,55) + (481,5 × 0,45)).

GLYCOSIL™ (10 мг, 22,9 мкмоль) растворяли в 1 мл 1XPBS, pH 7,4, при комнатной температуре в течение 40 мин во флаконе с исходным образцом. При использовании средней молекулярной массы димерного звена в форме соли натрия расчетное общее число молей повторяющегося димерного звена составляло 22,9 мкмоль, а число молей тиолированного повторяющегося димерного звена составляло 10,3 мкмоль. К этому раствору добавляли 1X PBS (0,775 мл) и 100 мг/мл раствора (в PBS) диакрилата полиэтиленгликоля массой 5 кДа (0,125 мл, 12,5 мг, 0,0025 ммоль реагента, 0,005 ммоль реакционноспособных функциональных групп, Creative PEGWorks). Полученный раствор имел концентрацию 5,3 мг/мл по **GLYCOSIL™**, и в нем 22% повторяющихся звеньев **GLYCOSIL™** были сшиты диакрилатом полиэтиленгликоля массой 5 кДа ((0,005 ммоль [реакционноспособных функциональных групп диакрилата полиэтиленгликоля массой 5 кДа] / 0,0229 ммоль [звеньев HA]) × 100=22%).

Смесь в течение непродолжительного времени перемешивали вихревым способом с целью смешивания и переносили в шприц объемом 3 мл, который закупоривали и выдерживали при комнатной температуре в течение ночи с получением **H9**. Визуальный осмотр (тест на инверсию) продемонстрировал успешное гелеобразование.

Частицы гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты **H9** получали в соответствии с описанным для **H1a**, за исключением того, что к частицам после первого продавливания добавляли равный объем PBS. В результате этого получали суспензию частиц гидрогеля, концентрация которой составляла 2,65 мг/мл по **GLYCOSIL™**. Частицы гидрогеля **H9** отмеривали для дозирования в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл с присоединенными иглами 30G посредством удаления поршня и заполнения желаемым объемом **H9**. Пузырьки воздуха удаляли путем проведения осторожных манипуляций со шприцем.

Получение H1f

Частицы гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты **H1f** получали в соответствии

с описанным для **H1a**, при этом к частицам после первого продавливания добавляли половинный объем PBS. В результате этого получали суспензию частиц гидрогеля, концентрация которой составляла 6,7 мг/мл по **[HA–N3]–23%b**. Частицы гидрогеля **H1f** отмеривали для дозирования в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл с присоединенными иглами 30G посредством удаления поршня и заполнения желаемым объемом **H1f**. Пузырьки воздуха удаляли путем проведения осторожных манипуляций со шприцем.

Synvisc–One®

Synvisc–One® приобретали и использовали в полученном состоянии.

Подкожная имплантация

Самцам мышей C57BL/6 (по 5 на тестируемый препарат) вводили 60 мкл тестируемого препарата посредством подкожной инъекции (в межлопаточную область) (таблица 26). Еще 5 мышей, ранее не подвергавшихся экспериментам, служили в качестве контролей. Прижизненные наблюдения проводили два раза в день дозирования (до дозирования и примерно через 4 часа после дозирования) и по меньшей мере один раз в день в течение последующего периода времени до вскрытия. Значения массы тела измеряли два раза в неделю.

Таблица 26. План исследования, распределение животных и дозы тестируемых препаратов

Группа	Количество	Обработка	Объем дозы (мкл)
1	5	Контроль без инъекции	–
2	5	**H9**	60 мкл
3	5	Synvisc–One®	60 мкл
4	5	**H1f**	60 мкл

Через 7 дней животных подвергали эвтаназии с помощью CO_2 в качестве первой формы эвтаназии, и выполняли торакотомию в качестве второй формы эвтаназии. Выполняли вскрытие, регистрируя при этом макроскопические аномалии. У всех животных собирали типичные образцы протокольных тканей. Фиксацию и хранение образцов проводили в 10% нейтральном забуференном формалине. Указанные ткани обрабатывали с получением парафиновых блоков и затем срезов тканей, окрашенных гематоксилином и эозином, для животных из контрольной группы и всех выживших животных, которым осуществляли дозирование.

Клинические наблюдения

Места инъекций ежедневно пальпировали, и регистрировали наблюдения. У всех мышей, которые получали частицы гидрогеля H9, Synvisc–One® и частицы гидрогеля H1f, во время инъекции образовывались шишки в подкожной ткани в местах инъекции. У мышей, которые получали Synvisc–One® и частицы гидрогеля H1f, были шишки, которые исчезали ко дню 4, тогда как у всех мышей, которые получали частицы гидрогеля H9, ко

дню 8 все еще сохранялись твердые шишки. У двух животных, которые получали H9, наблюдались струпья на коже над шишками, начиная с дня 4, и они наблюдались до дня 6. Других заметных клинических наблюдений не было. Масса тела существенно не различалась между группами.

Наблюдения под микроскопом

Все мыши, которым вводили частицы гидрогеля H9, имели выраженную обширную очаговую гранулему в подкожной ткани в месте инъекции. Гранулема характеризовалась четко отграниченной подкожной массой диаметром примерно 4 мм, содержащей ядро из гиалинового материала, смешанного с гранулярным дебрисом эозинофилов и вырожденными нейтрофилами, окруженное плотным ободком из обильных нейтрофилов, который, в свою очередь, содержал слой макрофагов и фибробластов.

Мыши, которым вводили Synvisc–One® или частицы гидрогеля H1f, имели очаговые смешанные клеточные инфильтраты и/или мелкие тонкостенные кисты в подкожной ткани в местах инъекции от минимальных до слабовыраженных (таблица 27).

Таблица 27. Частота и тяжесть гистопатологических изменений, связанных с тестируемым препаратом

Ткань: данные результатов исследования				
	1	**2**	**3**	**4**
Количество изученных животных	5	5	5	5
Кожа: киста(кисты)				
Минимальные	**0**	0	1	0
Умеренные	0	0	1	0
Кожа: гранулема				
Выраженная	0	5	0	0
Кожа: инфильтрация				
Минимальная	0	0	4	3
Умеренная	0	0	0	0

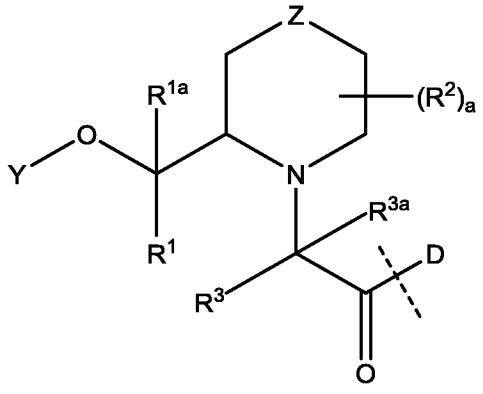
Выводы

Данные результатов микроскопического исследования у мышей, которым давали подкожные инъекции гидрогелей на основе гиалуроновой кислоты, различаются в зависимости от состава дозируемого гидрогеля. Мыши, которым вводили Synvisc–One® или **H1f**, не имели обнаруживаемых при микроскопическом исследовании очаговых смешанных клеточных инфильтратов и/или мелких тонкостенных кист в подкожной ткани в местах инъекции, тогда как **H9** вызывал выраженный гранулематозный иммунный ответ

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации с атомом(атомами) углерода, к которому(которым) они присоединены, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

R^{12} и R^{13}, взятые в комбинации с $C(R^{12a})$ и O, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и

где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

2. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где D содержит белок, пептид, полипептид, нуклеиновую кислоту, олиго– или полинуклеотид, углевод, олиго– или полисахарид или малую молекулу, каждый из которых содержит по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, и при этом малая молекула имеет молекулярную массу от 100 г/моль до приблизительно 2000 г/моль.

3. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где D содержит белок, пептид, нуклеиновую кислоту, Fab, scFv, моноклональное антитело или малую молекулу.

4. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–3, где D содержит бролуцизумаб (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), D4 (SEQ ID NO:7), абциксимаб, адалимумаб, афлиберцепт, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб, канакинумаб, цертолизумаб, цетуксимаб, даклизумаб, даратумумаб, денозумаб, экулизумаб, эфализумаб, голимумаб, ибритумомаб, инфликсимаб, ипилимумаб, лампализумаб, муромонаб–CD3, натализумаб, ниволумаб, офатумумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, пеглераниб, пембролизумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастузумаб, устекинумаб или ведолизумаб или их комбинации.

5. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–3, где D содержит один или несколько биологически активных пептидов, в том числе без ограничения натрийуретический пептид C–типа (CNP), предсердный натрийуретический пептид (ANP), эксендин–4, инсулин, адренокортикотропный гормон, адреномедуллин, адропин, ω–агатоксин, белок, родственный агути, ангиотензин(ангиотензины), апелин 12, апелин 13, апелин 36 или их производные, брадикинин, кальцитонин, кокаин/амфетамин–регулируемый транскрипт

(CART), кортикотропин–высвобождающий фактор (CRF), α–дефензины, β–дефензины, пептид, индуцирующий дельта–сон (DSIP), эластазоспецифический ингибитор (элафин), эндокинины, эндоморфины, эндорфины, эндотелины, эксендин, активный фрагмент фибронектина, галанин, галаниноподобный пептид, большой гастрин, гастрин I, пептид, родственный гастрину, желудочный ингибирующий полипептид, гастрин–высвобождающий пептид, грелин, дезацилгрелин, глюкагон, глюкагоноподобный пептид, фактор, высвобождающий гормон роста, GsMTx–4 Grammostola spatulata, гуанситоксин–1E, гуанилин, гепцидин 1, гепцидин/LEAP–1, гистатин 5, человеческий гормон роста, гуманин, хувентоксин, ибериотоксин, императоксин A, инсулиноподобные факторы роста, интермедин, IRL 1620, соединяющий пептид, калиотоксин, кисспептины, куртоксин, липотропин, фактор роста клеток печени, антимикробный пептид 2, экспрессирующийся в печени, гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон, лизенин, LL–37, маргатоксин, мастопаран, пептид, дегранулирующий тучные клетки, меланиноконцентрирующий гормон, меланоцитостимулирующий гормон, фактор, ингибирующий высвобождение MSH, мидкин, кардиовозбуждающий пептид моллюсков, пептид, ингибирующий толерантность к морфину, мотилин, мускариновые токсины, нейроэндокринный регуляторный пептид–2, нейрокинин A, нейрокинин B, нейромедины, нейроностатин–13, нейропептиды, нейротензин, нейротоксин NSTX–3, ноцистатин, ноцицептин, обестатин, опиоидные пептиды (энкефалины, эндорфины, BAM–12P, казоморфин, динорфины, эндоморфины, неоэндорфины, ноцицептин), орексин–A/–B, орфанин, остеокальцин, окситоцин, панкреастатин, паратиреоидный гормон, белок, родственный паратиреоидному гормону, пептид 234, пептид гистидин–метионин, пептид T, пептид YY, физалемин, полипептиды, активирующие аденилатциклазу гипофиза, тромбоцитарный фактор–4, плектазин, плейотропин, проадреномедуллин, пролактин–высвобождающий пептид, псалмотоксин 1, пуротоксин–1, пироглутамилированный RF–амидный пептид, ренин, пептид 1, родственный RF–амидам, пептид 3, родственный RF–амидам, салузин–α/β, сарафотоксины, пептид, связанный с шизофренией, сциллатоксин, секретин, серелаксин, сывороточный фактор тимуса, ингибитор 1 натрий–калиевой АТФазы, соматостатин, токсин Stichodactyla, субстанцию K, стресскопин, пептид, родственный стресскопину, субстанцию P, тахикинины, SNX–482 тарантула, ProTx–I тарантула, ProTx–II тарантула, тертиапин, титьютоксин Ka, тиреотропин–высвобождающий гормон, тафтсин, урогуанилин, изомер урогуанилина A или B, урокортин, урокортин II, уротензин II, пептид, родственный уротензину II, вазоактивный интестинальный пептид, вазопрессин, вазотоцин, пептид, ингибирующий репликацию вируса, ксенин или их комбинации.

6. Соединение по любому из пп. 1–3, где D представляет собой малую молекулу, имеющую молекулярную массу от приблизительно 100 г/моль до приблизительно 2000 г/моль или меньше, которая связана с R посредством первичной аминогруппы, вторичной аминогруппы или атома азота кольца в азагетероарильном кольце.

7. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая

соль по п. 6, где малая молекула содержит [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации.

8. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–7, где R^1 представляет собой водород или метил, R^{1a} представляет собой водород или метил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют циклопропан–1,1–диильную группу.

9. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–8, где переменная a равняется 0.

10. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–9, где каждый из R^3 и R^{3a} представляет собой водород.

11. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–10, где Y представляет собой $C(O)R^4$, и R^4 представляет собой C_1–C_6алкил, C_3–C_6циклоалкил или C_1–C_2алкокси–C_1–C_2алкил.

12. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по п. 11, где R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил.

13. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–10, где Y представляет собой $SiR^5R^6R^7$;

каждый из R^5 и R^6 представляет собой метил, этил, пропил или изопропил; и

R^7 представляет собой C_1–C_4алкил, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, изобутокси, вторбутокси, 2–этоксиэтокси, 2–изопропоксиэтокси, тетрагидропиранилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где b равняется 2, 3 или 4.

14. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–13, где Z представляет собой CH–L–A, CH–A, N–L–A или N–A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер $Q–[Sp–Q]_h–Q$;

Q в каждом случае независимо выбран из связи, O, C(O), N(H), N(C_1–C_4алкила), C(O)NH, C(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O), N(C_1–C_4алкил)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1–C_4алкил)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O)N(H), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1–C_4алкила), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(C_1–C_4алкила), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, $S(O)_2$, $N(H)S(O)_2$, N(C_1–C_4алкил)$S(O)_2$, $S(O)_2N(H)$, $S(O)_2N$(C_1–C_4алкила), C_1–C_2алкил–C(O)N(H), N(H)C(O)C_1–C_2алкила, C_1–C_2алкил–C(O)O, OC(O)C_1–C_2алкила, 1,2,3–триазола, $OP(O)_2$, $P(O)_2O$, C_1–C_4алкил–$P(O)_2$–O или O–$P(O)_2$–C_1–$_4$алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенных C_1–

C_{20}алкила, C_2–C_{20}алкенила, C_2–C_{20}алкинила, $[W–O]_g$, C_1–C_8алкил–$[O–W]_g$, $[O–W]_g$–O–C_1–C_8алкила, C_1–C_8алкил–$[O–W]_g$–O–C_1–C_8алкила или олигопептида;

h представляет собой целое число от 1 до 20;

g представляет собой средневзвешенное число от приблизительно 2 до приблизительно 50;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, C(O)C_1–C_8алкил, C(O)OC_1–C_8алкил, C(O)N(H)C_1–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

15. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–13, где Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, C(O)–$(CH_2)_n$–Q–A, C(O)C_1–C_8алкила или –C(O)$(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$–Q–A, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q в каждом случае независимо равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

Q представляет собой связь, O, N(H) или N(C_1–C_4алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, C(O)C_1–C_8алкил, C(O)N(H)C_1–C_8алкил, C(O)OC_1–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

16. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по п. 15, где Z представляет собой NR^9;

R^9 представляет собой C(O)–$(CH_2)_n$–Q–A или –C(O)$(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p$–Q–A;

n представляет собой целое число от 1 до 8; и

A представляет собой R^{10} или R^{11}.

17. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–16, где R^{10} представляет собой азидил, алкинил, замещенный или

незамещенный C_7–C_{12}циклоалкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}гетероциклоалкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}циклоалкенил, норборнил, замещенный или незамещенный винилкарбоксил, замещенный или незамещенный винилсульфонил, замещенный или незамещенный C_2–C_8алкенил, амино, тиол, замещенный или незамещенный C_1–C_8карбоксил, замещенный или незамещенный C_1–C_8карбонил, –O–NH_2, гидразидил, малеимид, альфа–галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин или адамантанил.

18. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–17, где R^{10} содержит реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли формулы (I) с носителем.

19. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–16, где R^{11} является биоразлагаемым.

20. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–16 или п. 19, где R^{11} содержит полимер или сшитый полимер.

21. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по п. 19 или п. 20, где R^{11} содержит гидрогель, содержащий один или несколько сшитых полимеров.

22. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–16 и пп. 19–21, где R^{11} содержит полимер, сшитый полимер или гидрогель, содержащий одно или несколько из гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиэтиленоксида, полипропиленоксида, полиглутамата, полилизина, полисиаловой кислоты, поливинилового спирта, полиакрилата, полиметакрилата, полиакриламида, полиметакриламида, поливинилпирролидона, полиоксазолина, полииминокарбоната, полиаминокислоты, гидрофильного сложного полиэфира, полиамида, полиуретана, полимочевины, декстрана, агарозы, ксилана, маннана, каррагинана, альгината, желатина, коллагена, альбумина, целлюлозы, метилцеллюлозы, этилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксиэтилированного крахмала, хитозана, нуклеиновых кислот, их производных, их сополимеров или их комбинаций.

23. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–16 и пп. 19–22, где R^{11} содержит гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, сшитый гидрогель на основе гиалуроновой кислоты, сшитый гидрогель на основе полиэтиленгликоля или их комбинации.

24. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–16 и пп. 19–23, где R^{11} содержит гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль.

25. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–16 и пп. 19–23, где R^{11} содержит гидрогель, содержащий сшитую гиалуроновую кислоту или сшитый полиэтиленгликоль.

26. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по п. 24 или п. 25, где гиалуроновая кислота или полиэтиленгликоль функционализированы по меньшей мере одной функциональной группой, содержащей азидил, алкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}циклоалкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}гетероциклоалкинил, C_7–C_{12}циклоалкенил, норборнил, винилкарбоксил, винилсульфонил, C_2–C_8алкенил, амино, тиол, C_1–C_8карбоксил, C_1–C_8карбонил, –O–NH2, карбогидразид, малеимид, альфа–галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин, адамантанил или их комбинации.

27. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1–16 и пп. 19–26, где R^{11} содержит гидрогель, содержащий сшитую гиалуроновую кислоту, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну боковую цепь, выбранную из $–NH(W1)(O(W1))_d–V$, где W1 представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

d представляет собой среднечисловое значение от 0 до 500; и

V представляет собой подходящую функциональную группу, содержащую азидил, алкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}циклоалкинил, замещенный или незамещенный C_7–C_{12}гетероциклоалкинил, C_7–C_{12}циклоалкенил, норборнил, винилкарбоксил, винилсульфонил, C_2–C_8алкенил, амино, тиол, C_1–C_8карбоксил, C_1–C_8карбонил, –O–NH2, карбогидразид, малеимид, альфа–галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин или адамантанил.

28. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль по п. 27, где V представляет собой азид.

29. Способ получения состава на основе сшитого носителя, при этом способ включает:

(a) функционализацию молекулы носителя R^{11};

(b) получение реакционноспособного сшивающего средства и

(c) осуществление реакции функционализированной молекулы носителя с реакционноспособным сшивающим средством с образованием сшитого носителя путем инкубирования в течение от приблизительно 0,5 часа до приблизительно 48 часов при температуре от приблизительно 4°C до приблизительно 60°C.

30. Способ по п. 29, где молекула носителя содержит гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль.

31. Способ по п. 30, где молекулу носителя функционализируют азидными, сульфгидрильными, амино–, аминокси– ($O–NH_2$) или альдегидными компонентами с получением реакционноспособных функциональных групп для сшивания.

32. Способ по любому из пп. 29–31, где получение реакционноспособного сшивающего средства включает осуществление реакции полиэтиленгликоля с 1–((трет–

бутоксикарбонил)амино)циклопропан–1–карбоновой кислотой, 3–((трет–бутоксикарбонил)амино)пропановой кислотой, 1–(трет–бутоксикарбонил)пиперидин–4–карбоновой кислотой, 2–(1–(((трет–бутоксикарбонил)амино)метил)циклопропил)уксусной кислотой, 2–метил–3–((трет–бутоксикарбонил)амино)пропановой кислотой или 7–((трет–бутоксикарбонил)амино)гептановой кислотой и удаление защитных групп из функционализированного сложного эфира полиэтиленгликоля.

33. Способ по п. 32, где получение реакционноспособного сшивающего средства дополнительно включает введение по меньшей мере двух бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–илметильных групп после удаления защитных групп из функционализированного сложного эфира полиэтиленгликоля.

34. Сшитый гидрогель, получаемый с помощью способов по любому из пп. 29–33.

35. Сшитый гидрогель по п. 34, где молекула носителя функционализирована азидной группой.

36. Способ получения аддукта лекарственного средства, содержащего бесследный линкер R, связанный с биологически активным средством D, при этом способ включает:

(a) получение биологически активного средства D, содержащего первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце;

(b) осуществление реакции биологически активного средства с бесследным линкером R, который имеет активированную карбонильную функциональную группу; и

(c) очистку аддукта лекарственного средства от реагентов.

37. Аддукт лекарственного средства, получаемый с помощью способа по п. 36.

38. Способ получения системы доставки лекарственных средств, при этом способ включает:

(a) получение молекулы носителя R^{11}, где R^{11} представляет собой сшитый гидрогель; при этом стадия (a) может необязательно дополнительно включать очистку молекулы носителя R^{11}, представляющего собой сшитый гидрогель;

(b) отдельное конъюгирование бесследного линкера R с биологически активным средством D, содержащим первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, за счет чего, таким образом, обеспечивается образование аддукта бесследный линкер–D; при этом стадия (b) может необязательно дополнительно включать очистку аддукта бесследный линкер–D,

(c) конъюгирование молекулы носителя R^{11} с аддуктом бесследный линкер–D и

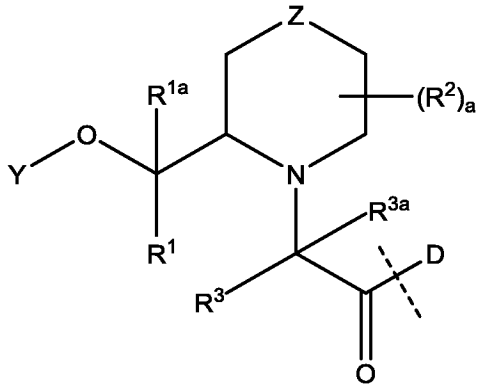
(d) очистку системы доставки лекарственных средств от реагентов.

39. Система доставки лекарственных средств, полученная с помощью способа по п. 38.

40. Способ лечения дегенерации желтого пятна, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере

одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, содержащий бролуцизумаб (SEQ ID NO:4), афлиберцепт, пегплераниб, ранибизумаб, [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации;

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидрокси, амино, C_1–C_4алкокси или моно– и ди–C_1–C_4алкиламино;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q в каждом случае независимо равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4$алкил);

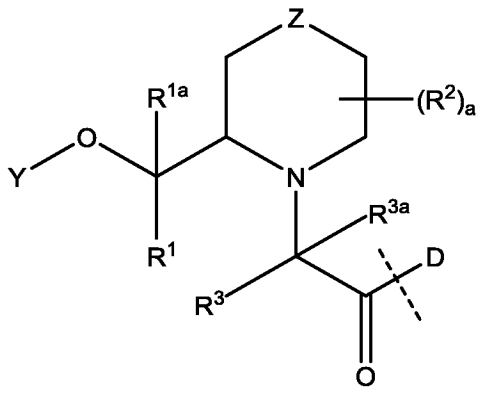
A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

41. Способ лечения скелетно–мышечных нарушений, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, содержащий D2 (SEQ ID NO:4), D3 (SEQ ID NO:5), другие инсулиноподобные факторы роста или их комбинацию;

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидрокси, амино, C_1–C_4алкокси или моно– и ди–C_1–C_4алкиламино;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q в каждом случае независимо равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4алкил)$;

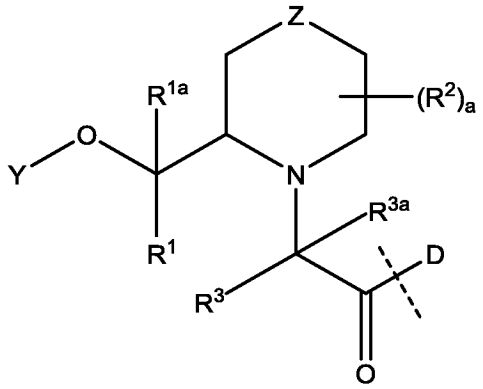
A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

42. Способ лечения сердечных нарушений, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, содержащий серелаксин или SEQ ID NO:7;

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации,

образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидрокси, амино, C_1–C_4алкокси или моно– и ди–C_1–C_4алкиламино;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q в каждом случае независимо равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4$алкил);

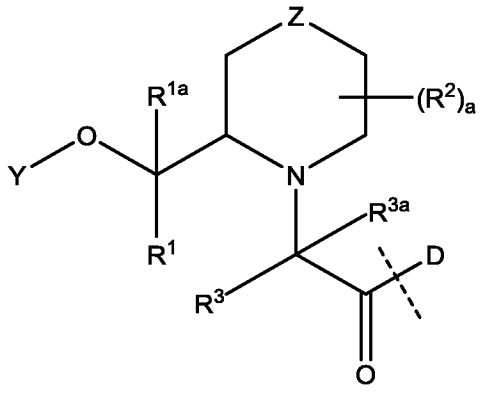
A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил,

$C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

43. Способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D–R, который представлен формулой (I), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический

простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидрокси, амино, C_1–C_4алкокси или моно– и ди–C_1–C_4алкиламино;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q в каждом случае независимо равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

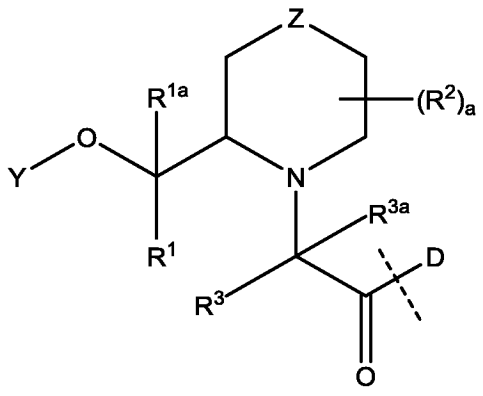
Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4$алкил);

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

44. Способ увеличения периода полувыведения биологически активного компонента D, содержащего по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце, при этом способ включает присоединение D к R, который представлен формулой (I), где R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(I),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или CR^1R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1–C_4алкила или оксо, или две группы R^2, взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3–C_6циклоалкильную или спиро–C_3–C_6циклоалк–1,1–диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1–C_4алкил, или CR^3R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

Y представляет собой $C(O)R^4$, $C(O)OR^4$, $C(O)NHR^4$, $C(O)NR^5R^6$, $SiR^5R^6R^7$ или $CR^{12}R^{12a}OR^{13}$;

R^{12} представляет собой водород или C_1–C_4алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1–C_4алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3–C_6циклоалк–1,1–диил;

R^{13} представляет собой C_1–C_4алкил; или

$CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5–, 6– или 7–членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидрокси, амино, C_1–C_4алкокси или моно– и ди–C_1–C_4алкиламино;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1–C_4алкила и C_3–C_6циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1–C_8алкил, C_3–C_7циклоалкил, C_1–C_8алкокси, C_3–C_7циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $–(OCHR^3CH_2)_bO–C_1–C_4$алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4–7–членное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR^8 или NR^9;

каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1–C_8алкила, $C(O)C_1$–C_8алкила или $–C(O)(CH_2)_q[O–W]_g(NHC(O))_m(CH_2)_q[O–W]_p–Q–A$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q–A;

q в каждом случае независимо равняется 1, 2 или 3;

каждый из g и p независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50;

m равняется 1 или 0;

W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

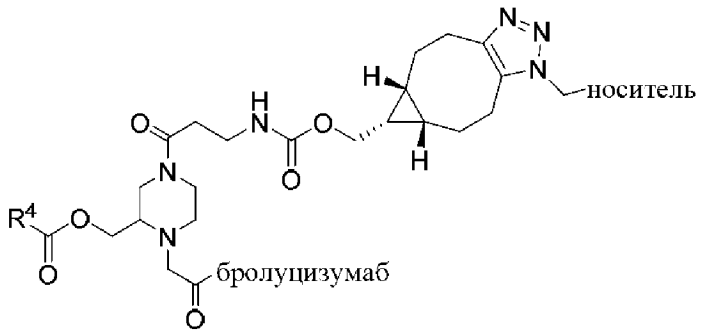
Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1–C_4алкил)$;

A представляет собой водород, C_1–C_8алкил, $C(O)C_1$–C_8алкил, $C(O)N(H)C_1$–C_8алкил, $C(O)OC_1$–C_8алкил, R^{10} или R^{11}, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10};

R^{10} представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R^{11} представляет собой носитель.

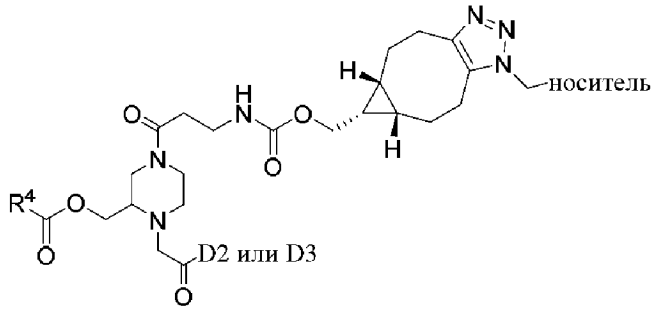
45. Система доставки лекарственных средств, имеющая формулу (III):



(III),

где бролуцизумаб содержит SEQ ID NO:4; R^4 представляет собой CH_3–, CH_3–O–CH_2–, CH_3CH_2– или $(CH_3)_2CH$–; и носитель содержит гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, гидрогель на их основе, сшитый гидрогель на их основе или их комбинации.

46. Система доставки лекарственных средств, имеющая формулу (IV):



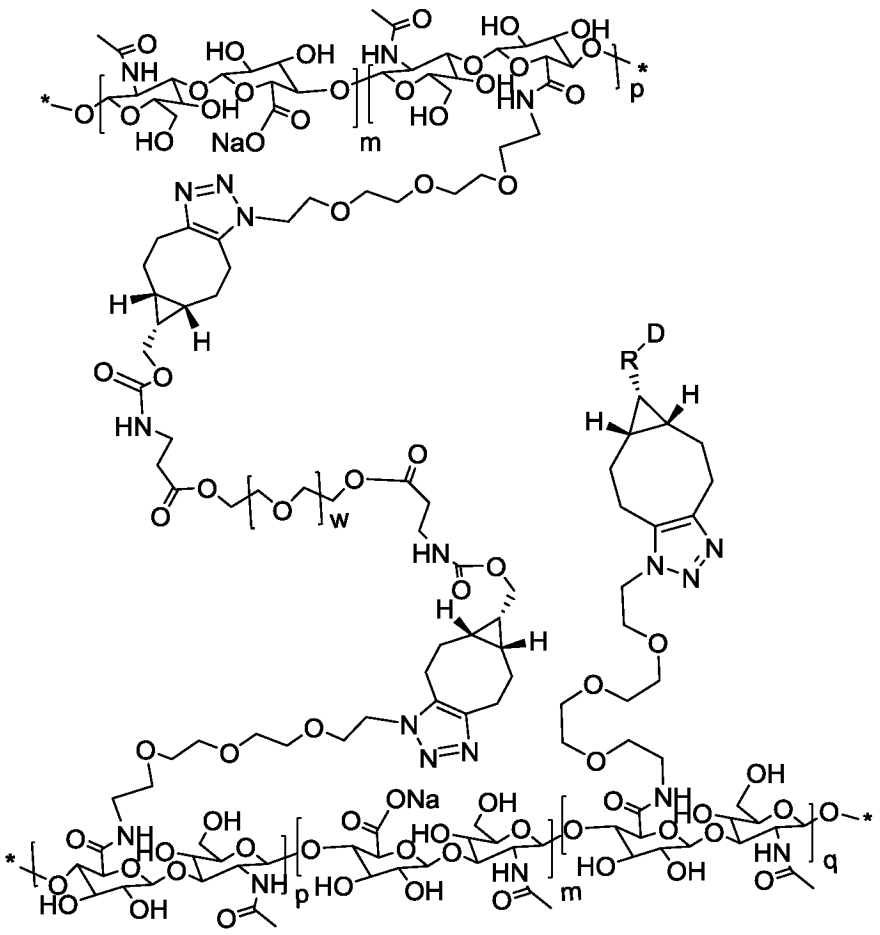
(IV),

где D2 содержит SEQ ID NO:5, D3 содержит SEQ ID NO:6; R^4 представляет собой CH_3–, CH_3–O–CH_2–, CH_3CH_2– или $(CH_3)_2CH$–; и носитель содержит гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, гидрогель на их основе, сшитый гидрогель на их основе или их комбинации.

47. Система доставки лекарственных средств, содержащая D–R–R^{11}, где R содержит бесследный линкер, связанный с биологически активным средством D; D содержит биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^{11} содержит множество полимеров гиалуроновой кислоты, каждый из которых содержит случайную последовательность из нефункционализированных мономеров в виде D–глюкуроновой кислоты, одного или нескольких мономеров в виде D–глюкуроновой кислоты, функционализированных сшивающим средством, или одного или нескольких мономеров в виде D–глюкуроновой кислоты, функционализированных аддуктом лекарственного средства D–R.

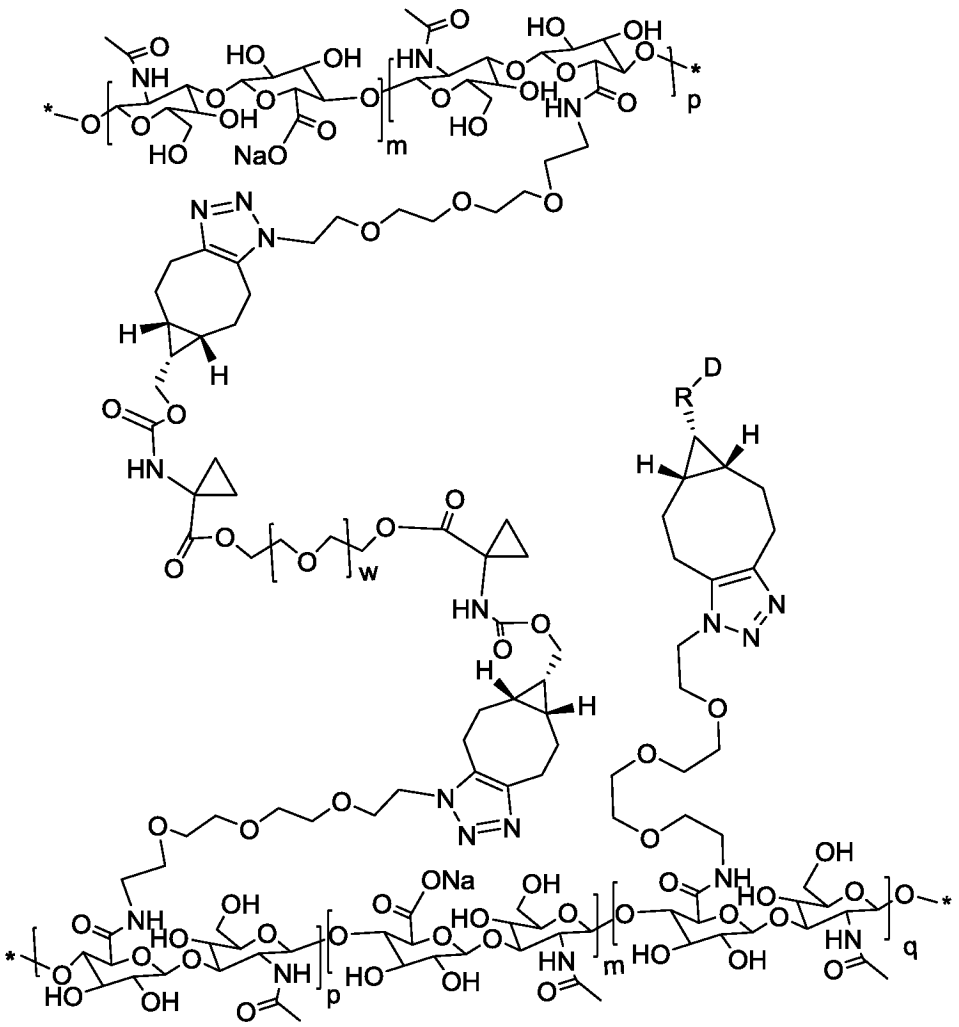
48. Способ по п. 44, где D содержит бролуцизумаб, D1 (SEQ ID NO:4), D2 (SEQ ID NO:5), D3 (SEQ ID NO:6), D4 (SEQ ID NO:7), серелаксин, афлиберцепт, пегплераниб, ранибизумаб, [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; [5–(1–метилциклопропил)–2H–пиразол–3–ил]–амид 5–(6,7–дигидро–5H–пирроло[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–индол–1–карбоновой кислоты; N–(1–метил–5–(трифторметил)–1H–пиразол–3–ил)–5–((6–((метиламино)метил)пиримидин–4–ил)окси)–1H–индол–1–карбоксамид; (S)–5–(6–метил–5,6,7,8–тетрагидропиридо[3,4–d]пиримидин–4–илокси)–N–(5–(1–метилциклопропил)–1H–пиразол–3–ил)–1H–индол–1–карбоксамид или их комбинации.

49. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (XXIV), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



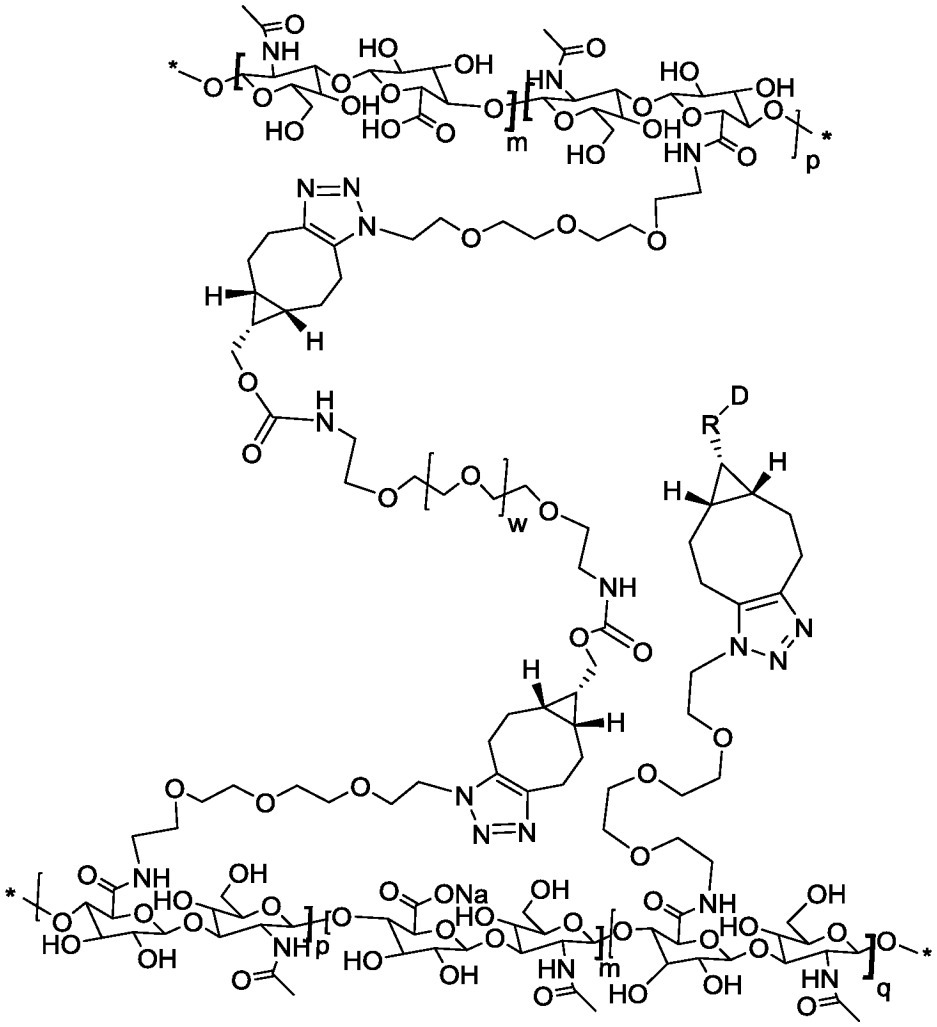
(XXIV).

50. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (XXV), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



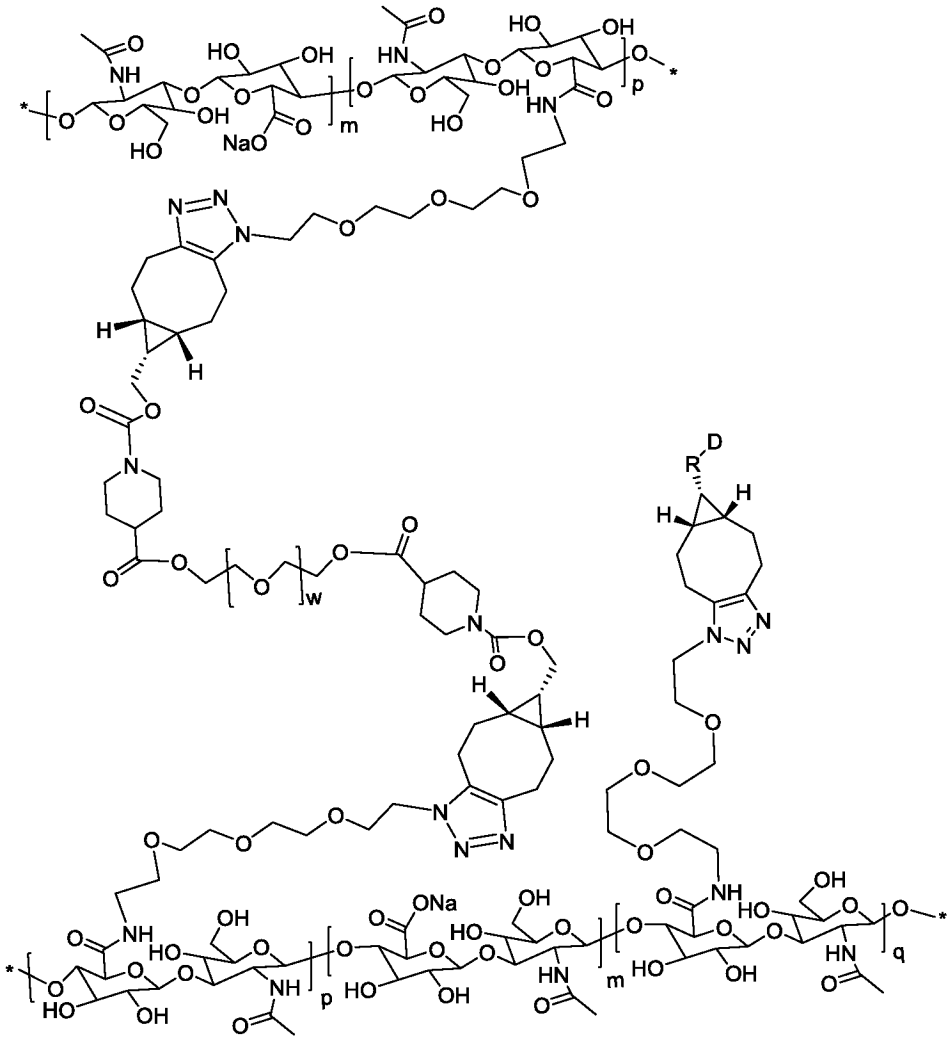
(XXV).

51. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (XXVI), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



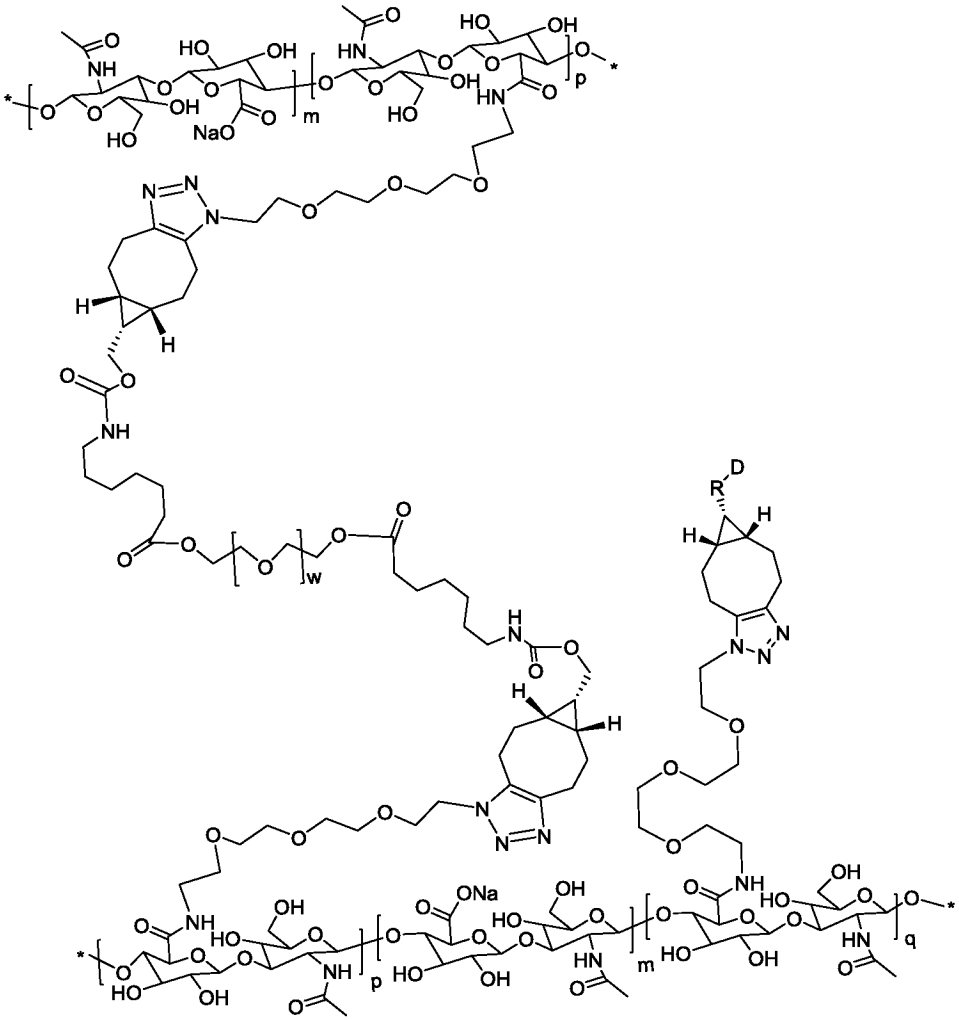
(XXVI).

52. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (XXVII), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



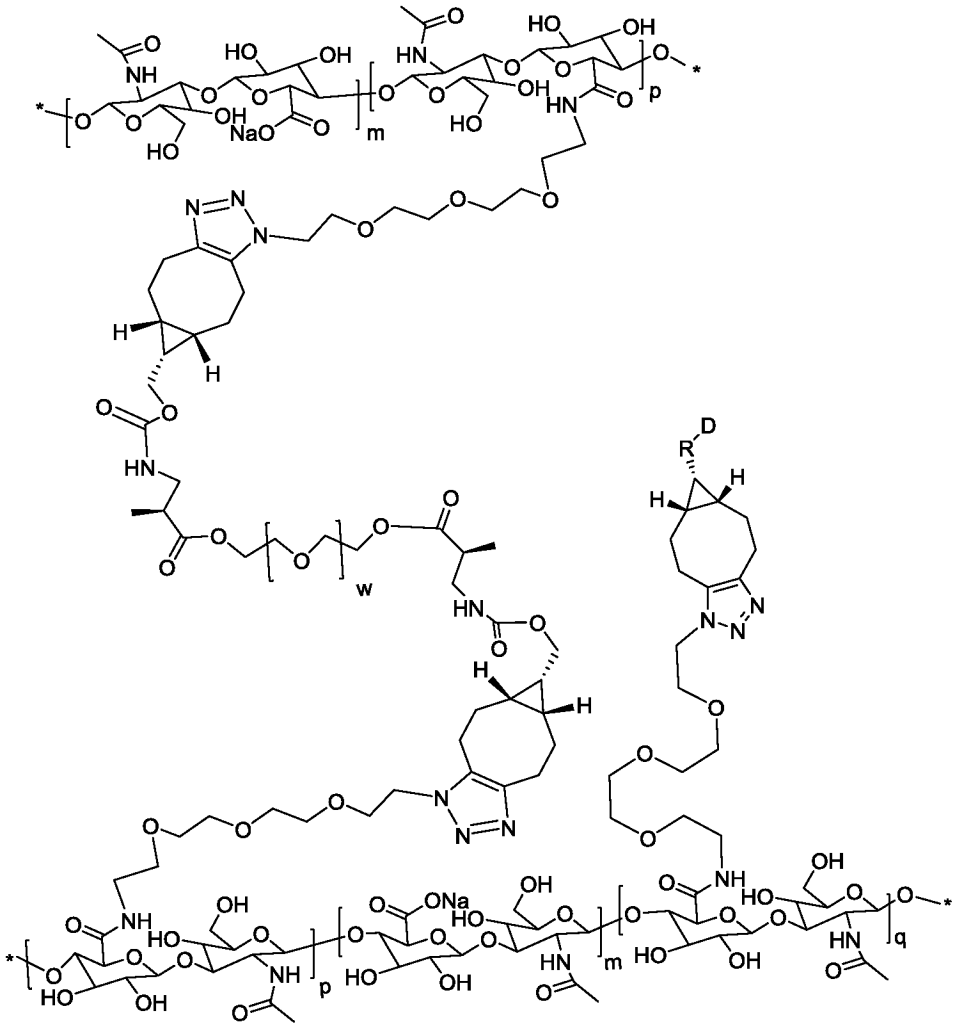
(XXVII).

53. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (XXVIII), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



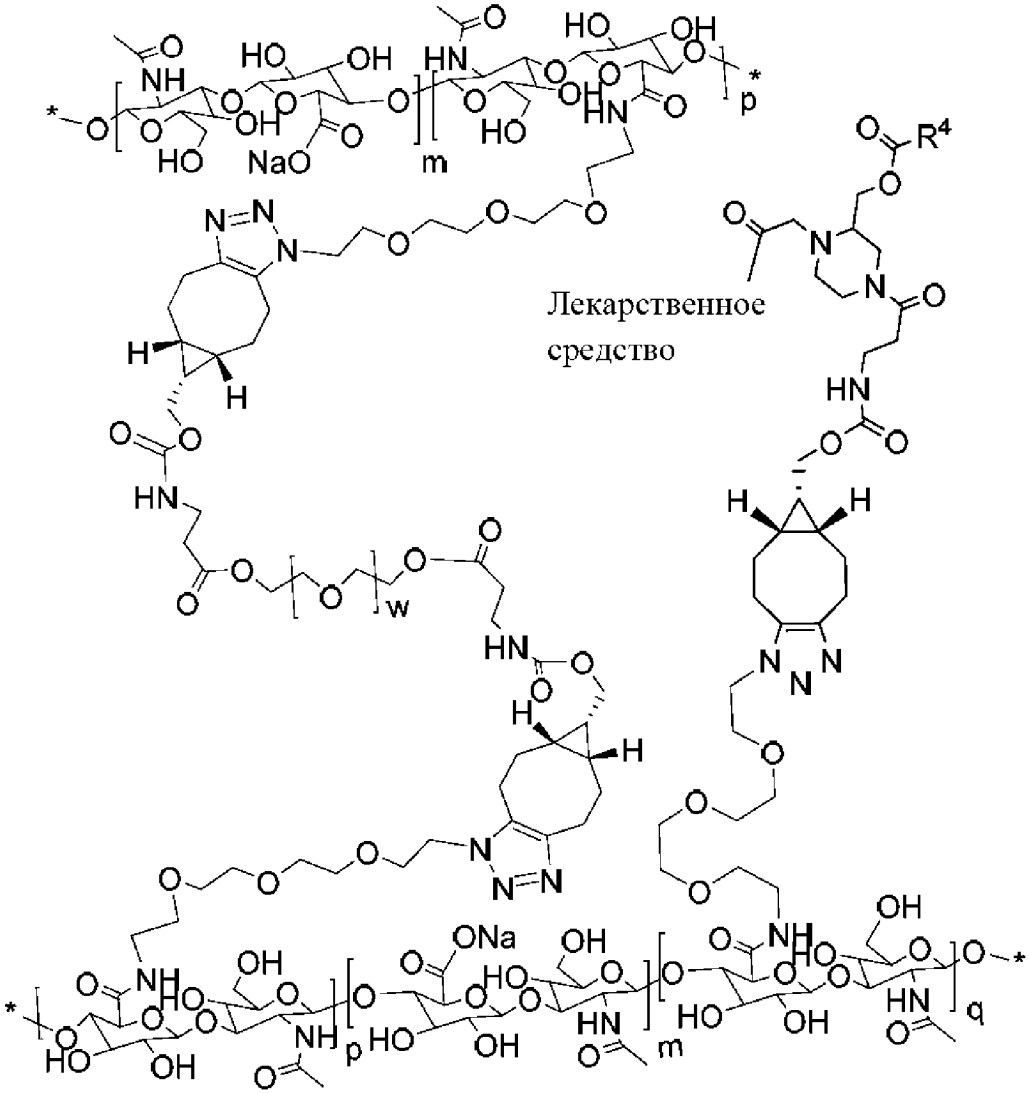
(XXVIII).

54. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (XXIX), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXIX).

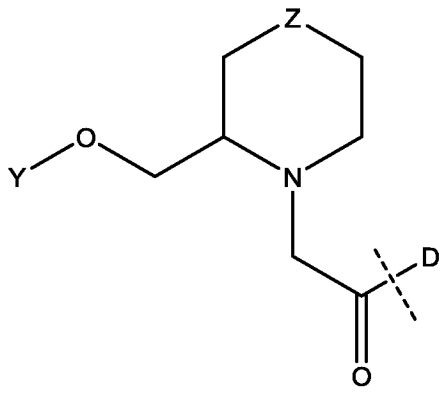
55. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXX), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:



(XXX).

56. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (XXXI), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXI),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

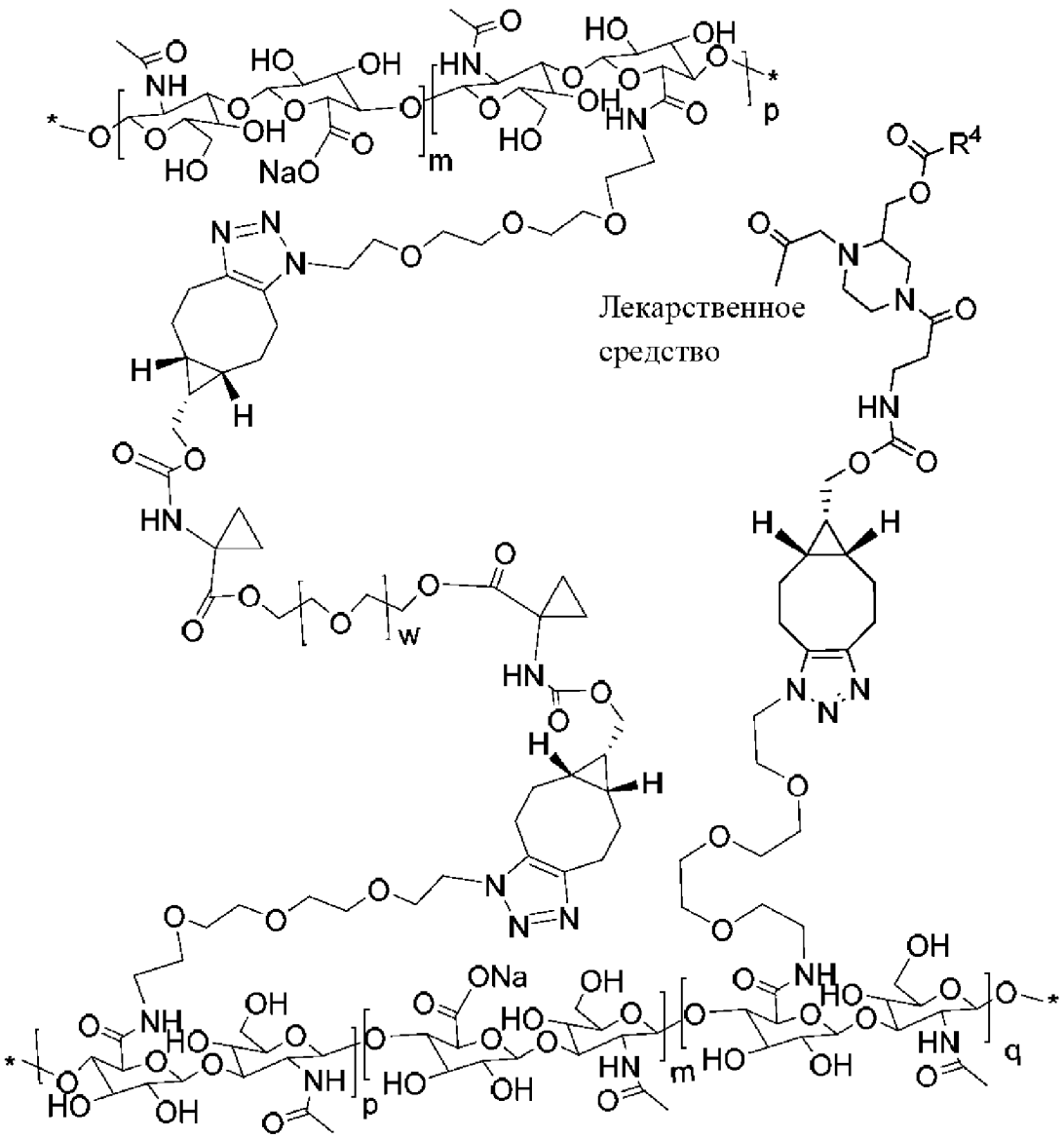
Z представляет собой N–L–A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)–бис–[3–(((((1R,8S,9s)–бицикло[6.1.0]нон–4–ин–9–ил)метокси)карбонил)амино)пропаноат].

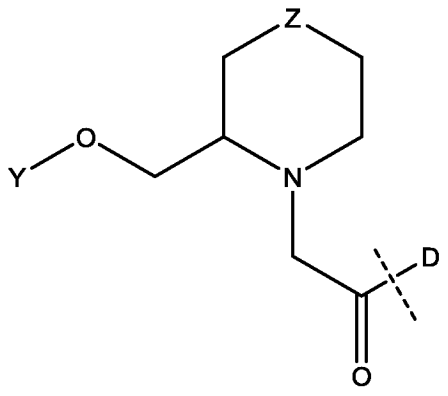
57. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXXII), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:



(XXXII).

58. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой XXXIII, где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXIII),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

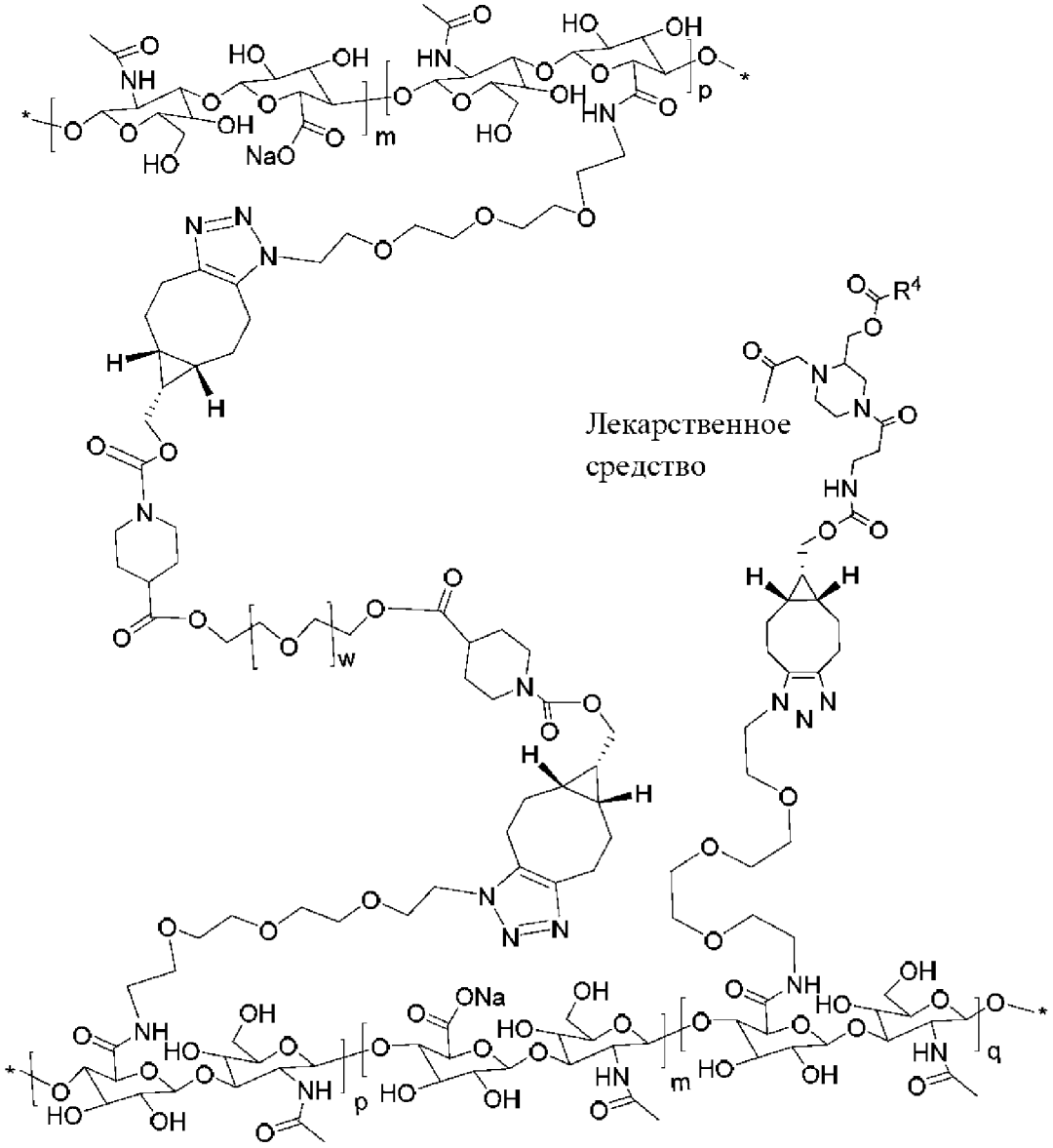
Z представляет собой N–L–A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит сложный эфир PEG(2000)–бис–[1–((((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метокси)карбонил)аминоциклопропан–1–карбоновой кислоты].

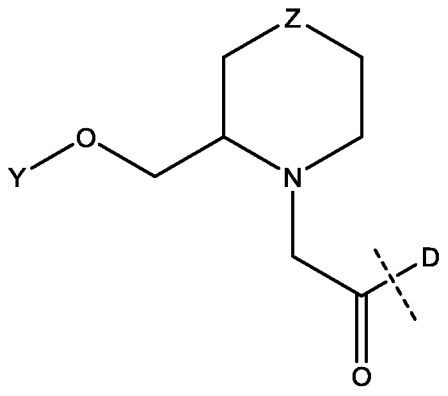
59. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXXIV), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:



(XXXIV).

60. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой XXXV, где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXV),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

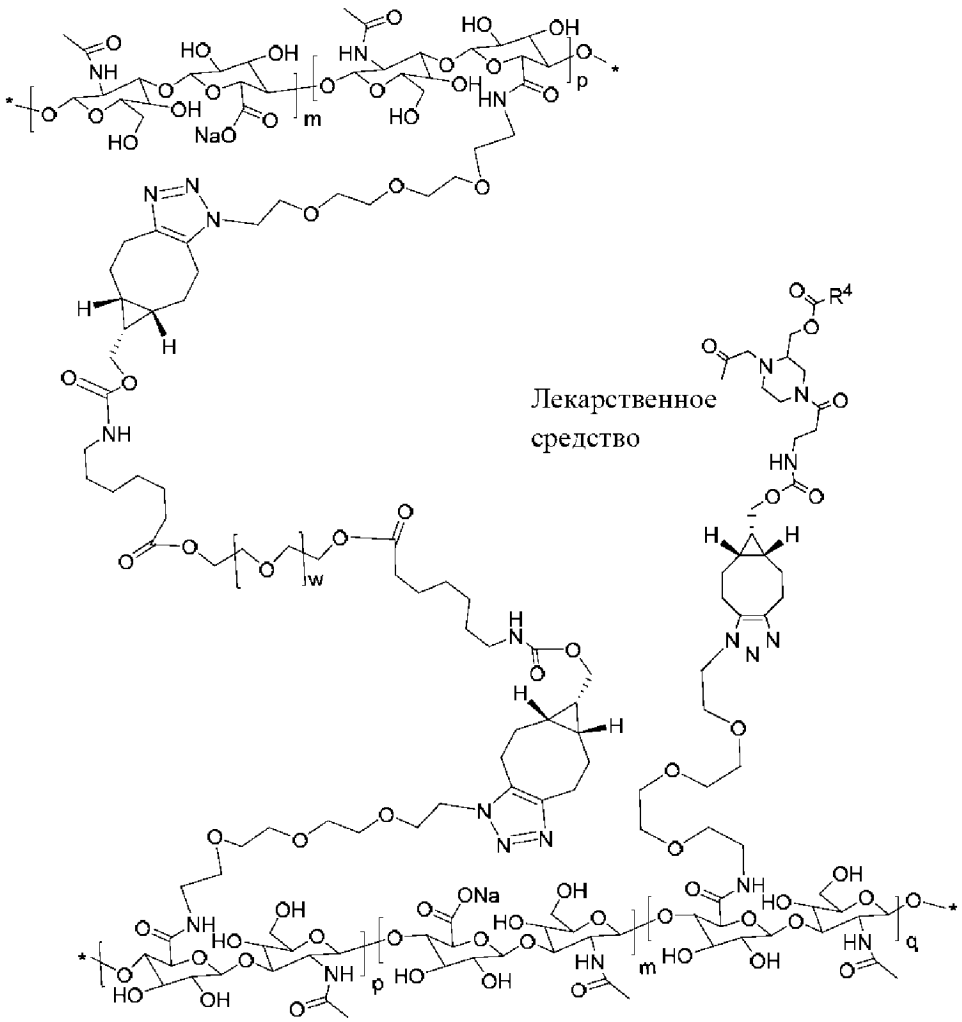
Z представляет собой N–L–A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит сложный эфир PEG(2000)–бис–[1–((((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метокси)карбонил)пиперидин–4–карбоновой кислоты].

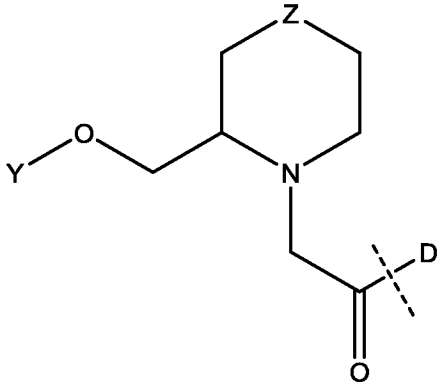
61. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXXVI), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:



(XXXVI).

62. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой XXXVII, где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXVII),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной

аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

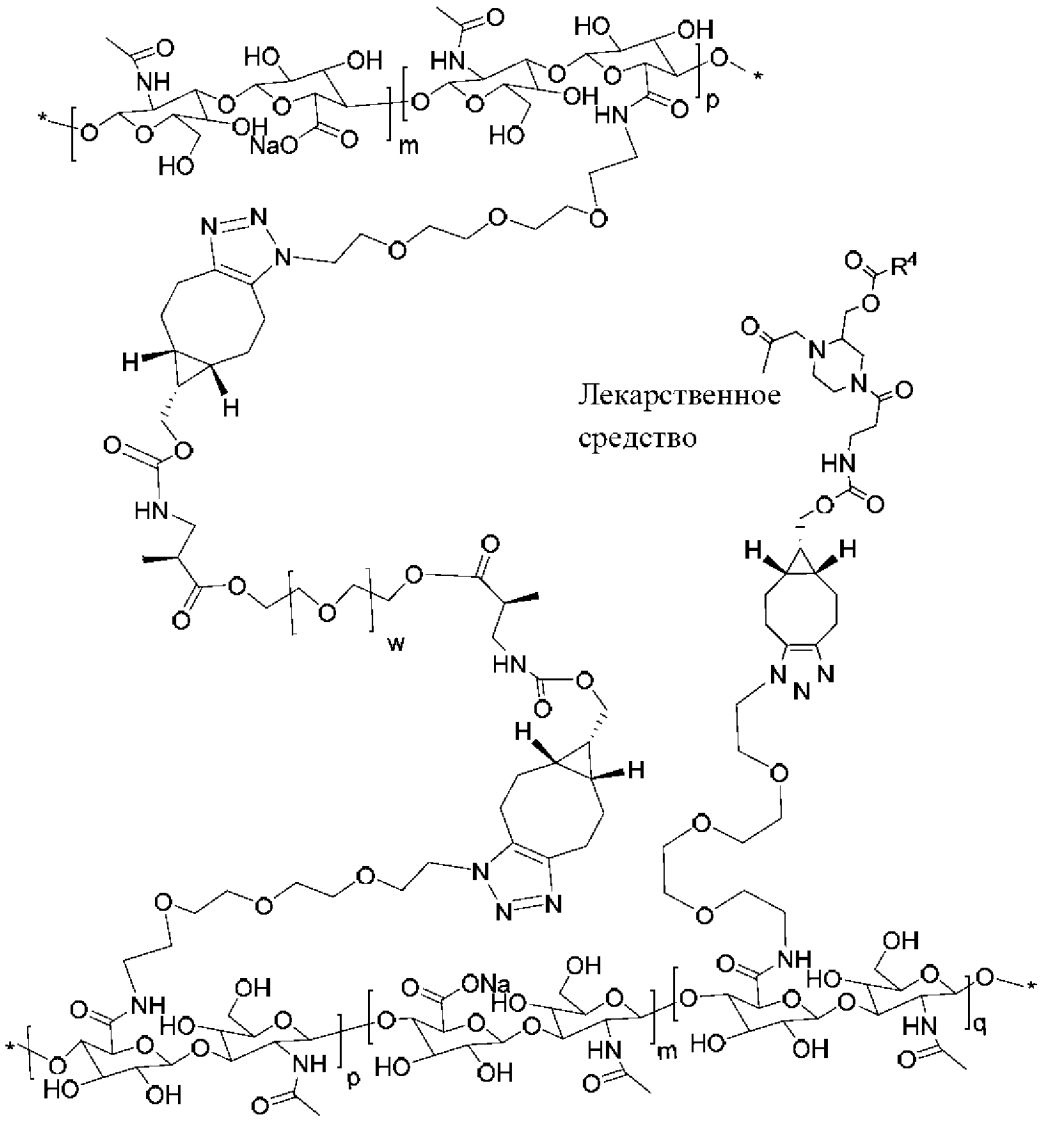
Z представляет собой N–L–A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)–бис–[7–(((((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метокси)карбонил)амино)гептаноат].

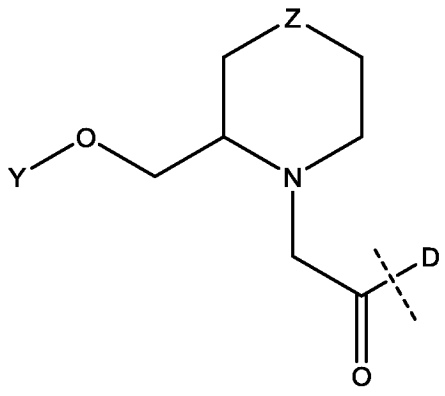
63. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXXVIII), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1–метилциклопропил или метоксиметил:



(XXXVIII).

64. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D–R, который представлен формулой (XXXIX), где D представляет собой биологически активный компонент, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения биологически активного компонента D:



(XXXIX),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азагетероарильном кольце;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси;

Z представляет собой N–L–A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

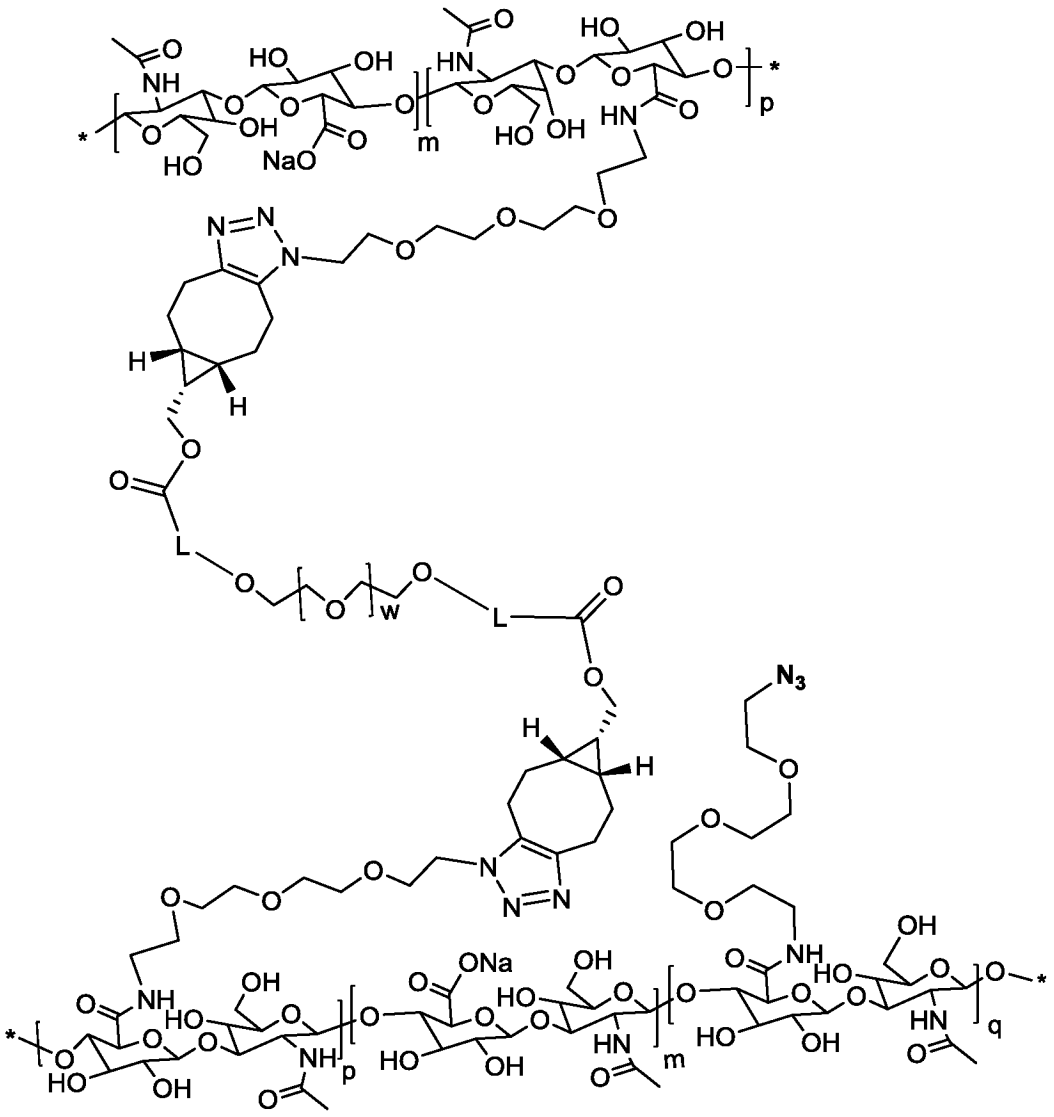
A представляет собой R^{11};

R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)–бис–[2–метил–3–(((((1’R,8’S,9’s)–бицикло[6.1.0]нон–4’–ин–9’–ил)метокси)карбонил)амино)пропаноат].

65. Системы доставки лекарственных средств по любому из пп. 55–64, где D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой CH_2CH_3.

66. Системы доставки лекарственных средств по любому из пп. 55–64, где D представляет собой бролуцизумаб, и R^4 представляет собой $CH(CH_3)CH_3$.

67. Композиция носителя или ее фармацевтически приемлемая соль, представленная формулой:



,

где

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер Q–[Sp–Q]$_h$–Q;

Q в каждом случае независимо выбран из связи, O, C(O), N(H), N(C_1–C_4алкила), C(O)NH, C(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O), N(C_1–C_4алкил)C(O), N(H)C(O)O, N(C_1–C_4алкил)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C_1–C_4алкила), N(H)C(O)N(H), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C_1–C_4алкила), N(C_1–C_4алкил)C(O)N(C_1–C_4алкила), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, S(O)$_2$, N(H)S(O)$_2$, N(C_1–C_4алкил)S(O)$_2$, S(O)$_2$N(H), S(O)$_2$N(C_1–C_4алкила), C_1–C_2алкил–C(O)N(H), N(H)C(O)C_1–C_2алкила, C_1–C_2алкил–C(O)O, OC(O)C_1–C_2алкила, 1,2,3–триазола, OP(O)$_2$, P(O)$_2$O, C_1–C_4алкил–P(O)$_2$–O или O–P(O)$_2$–C_1–$_4$алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенных C_1–C_{20}алкила, C_2–C_{20}алкенила, C_2–C_{20}алкинила, [W–O]$_g$, C_1–C_8алкил–[O–W]$_g$, [O–W]$_g$–O–C_1–C_8алкила, C_1–C_8алкил–[O–W]$_g$–O–C_1–C_8алкила или олигопептида;

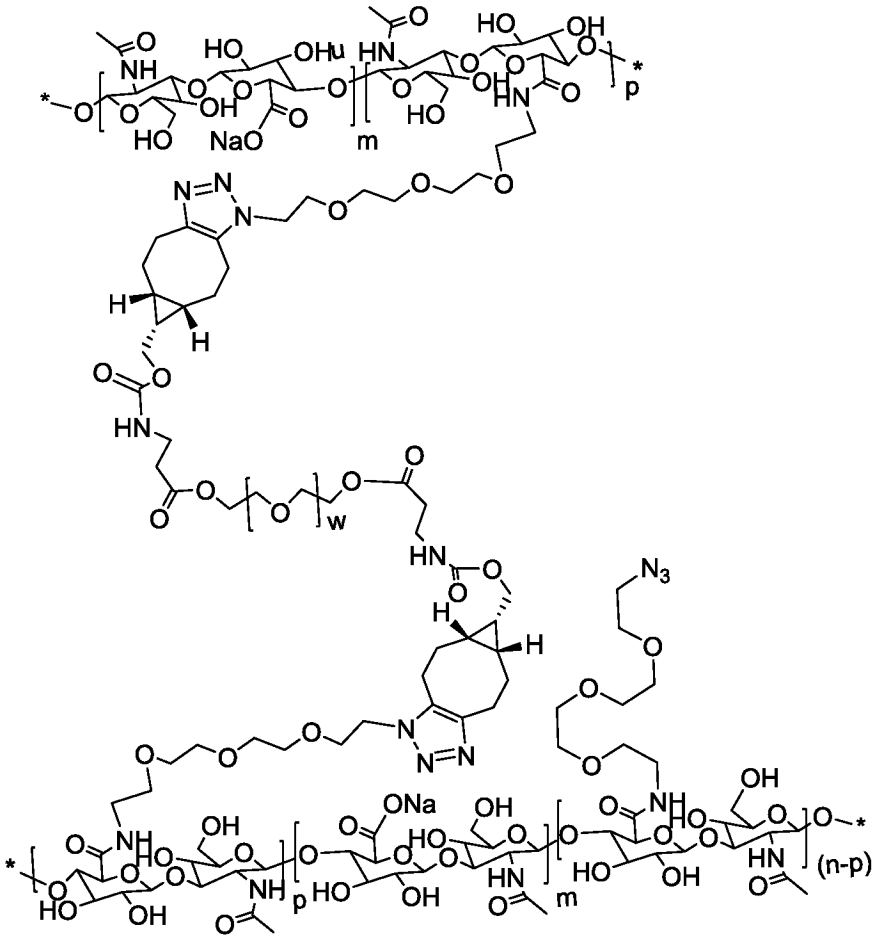
h представляет собой целое число от 1 до 20;

g представляет собой средневзвешенное число от приблизительно 2 до приблизительно 50;

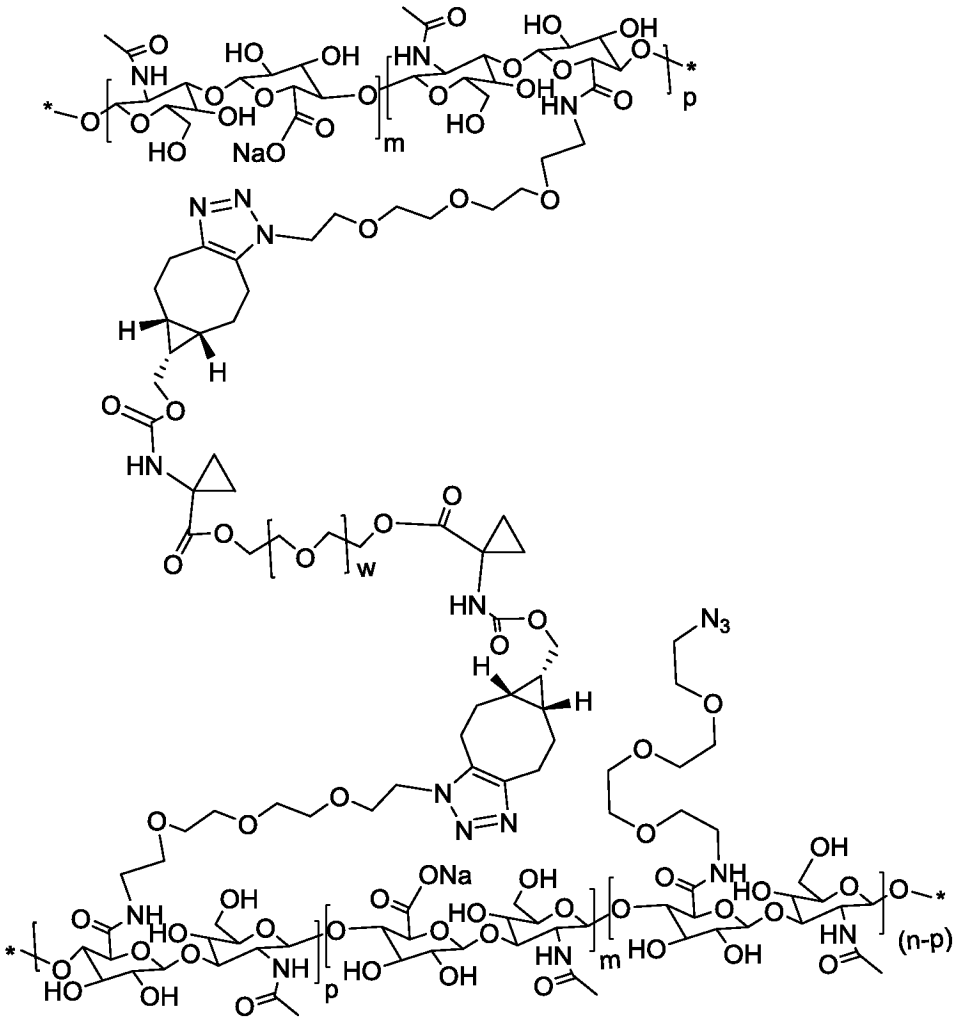
W представляет собой C_2–C_4алкил–1,2–диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи; и

R^4 представляет собой C_1–C_8алкил или C_3–C_7циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1–C_4алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1–C_4алкокси.

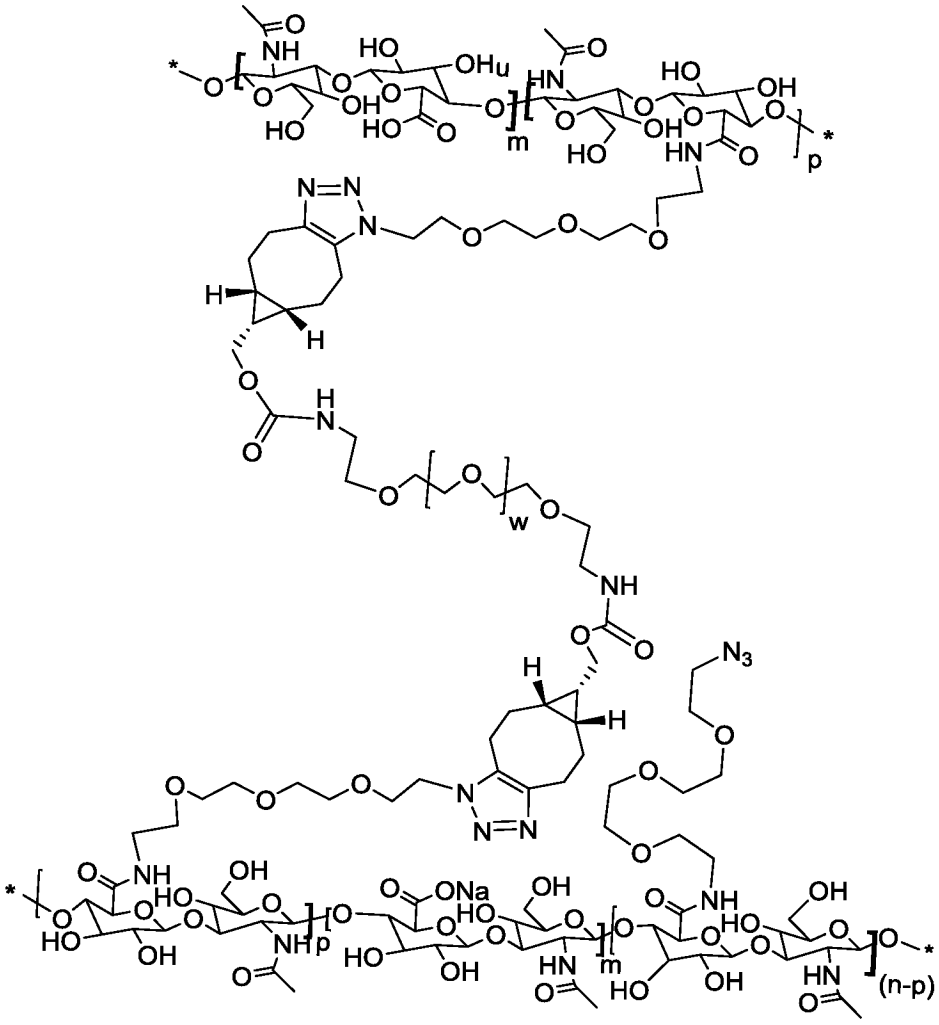
68. Композиция носителя по п. 67, имеющая одну из следующих формул:



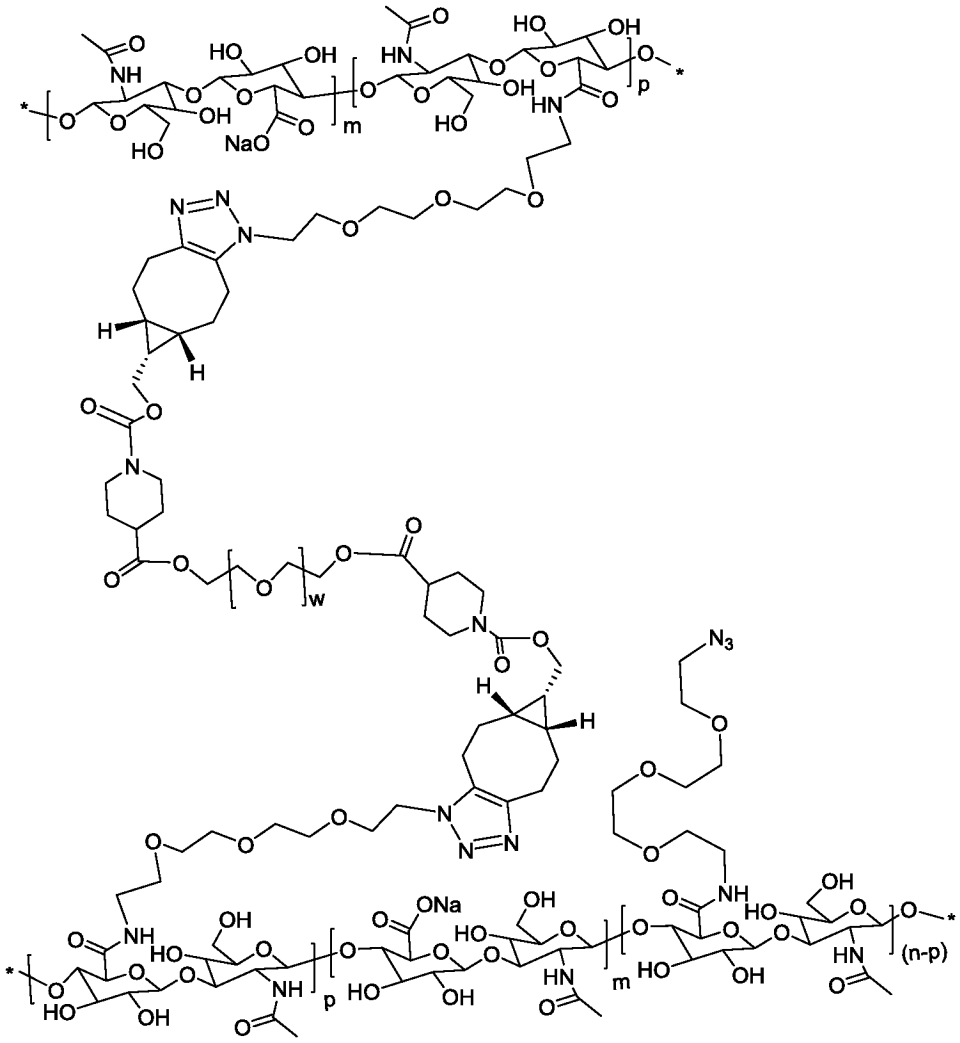
(X),



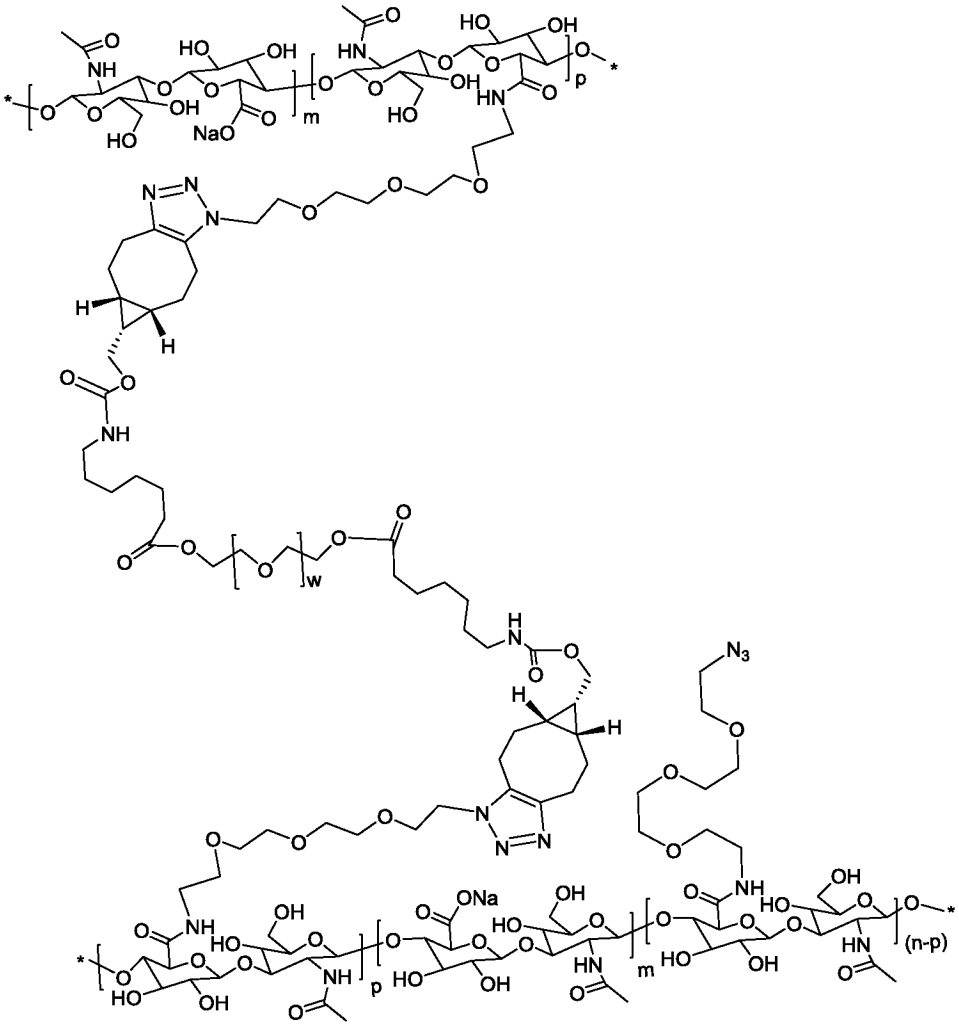
(XI),



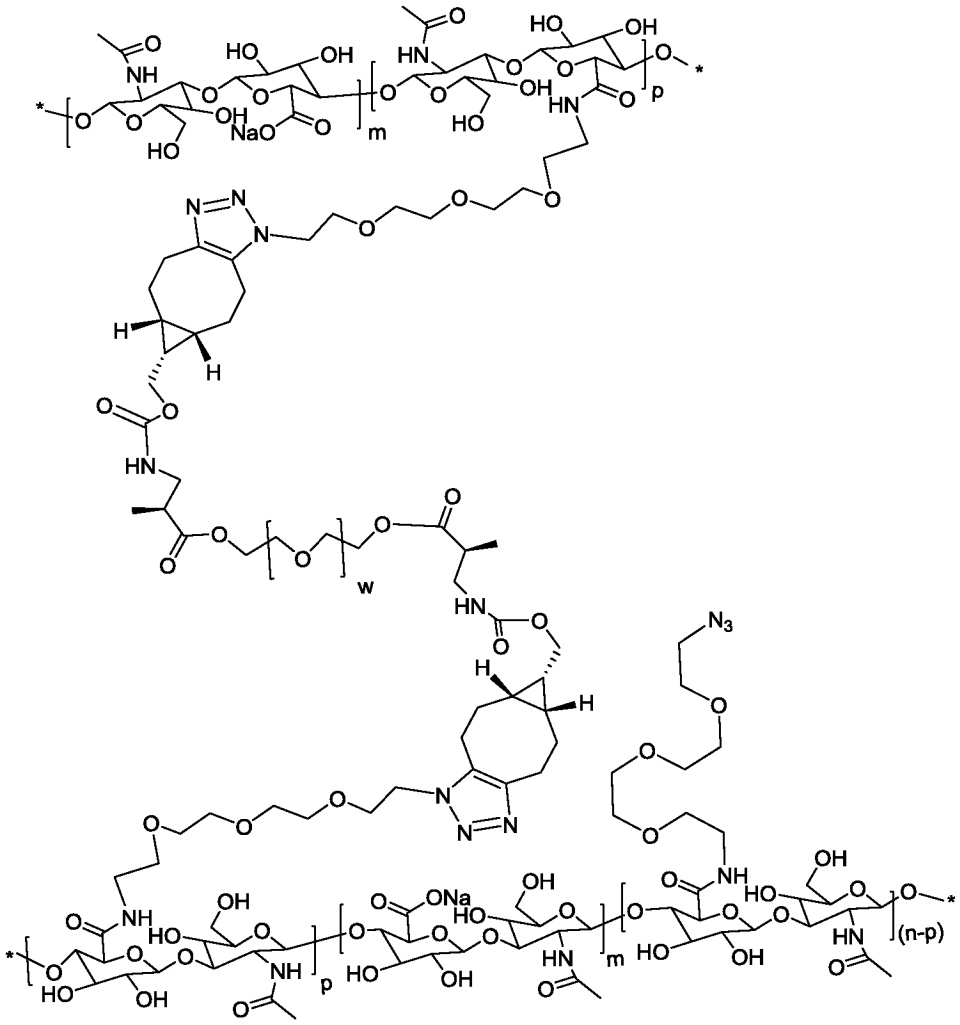
(XII),



(XIIa),



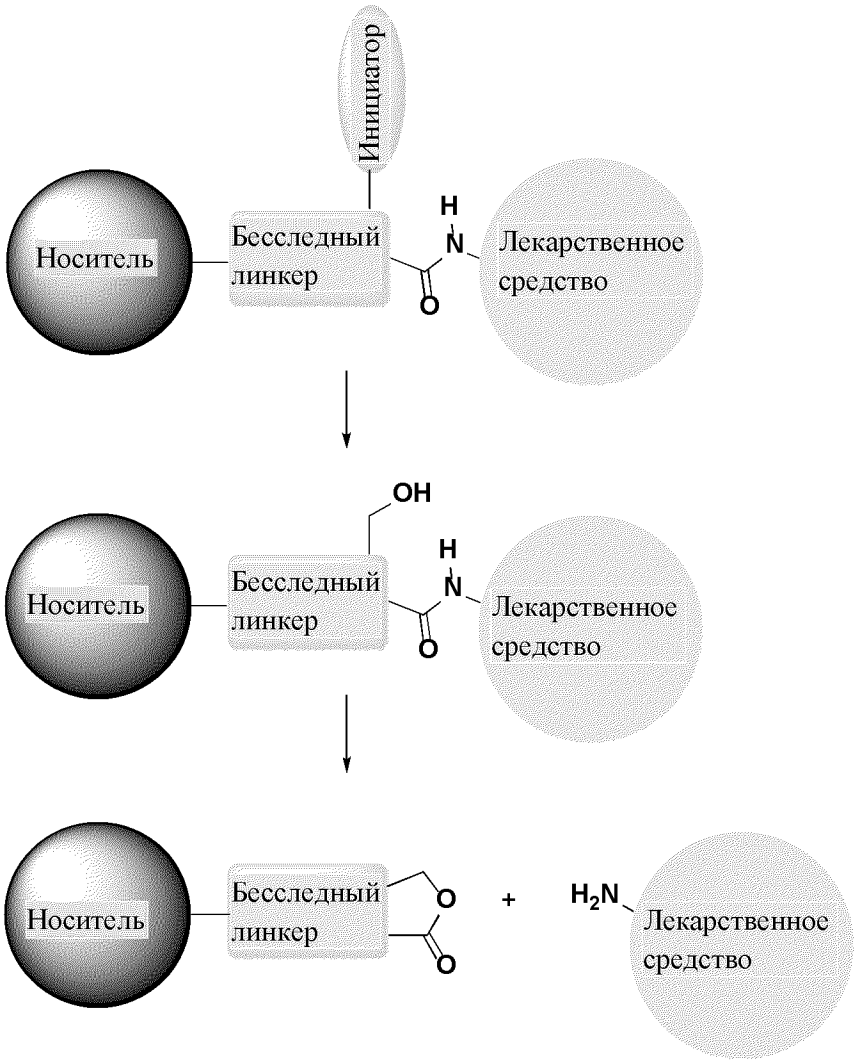
(XIIb) или



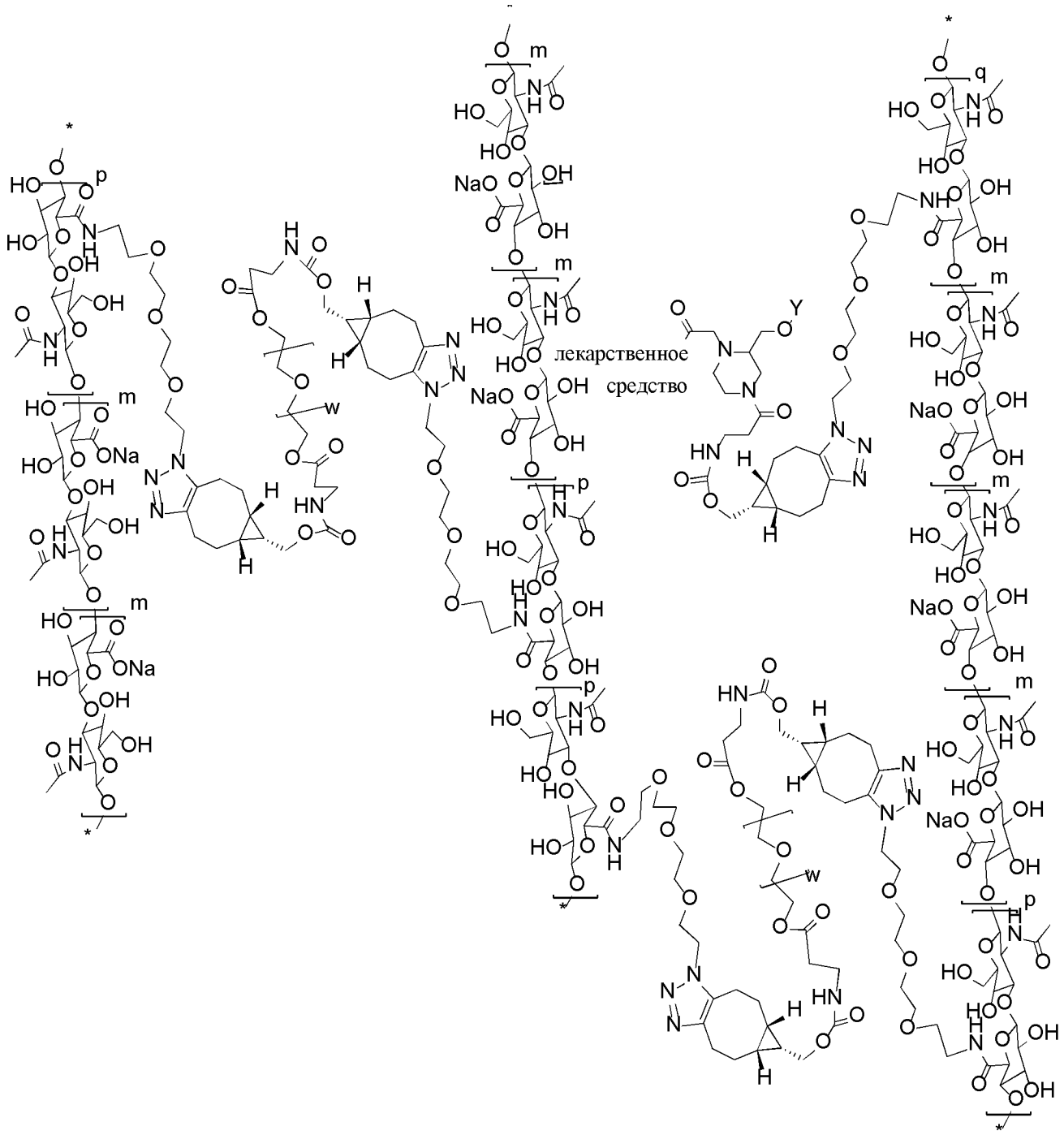
(XIIc).

По доверенности

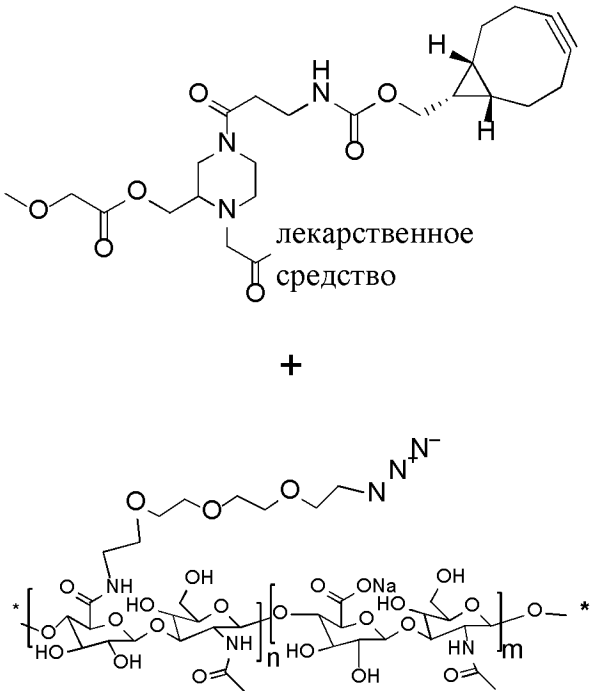
ФИГ. 1


Инициатор
Носитель
Бесследный линкер
H
N
O
Лекарственное средство
OH
Носитель
Бесследный линкер
H
N
O
Лекарственное средство
Носитель
Бесследный линкер
O
O
+
H2N
Лекарственное средство

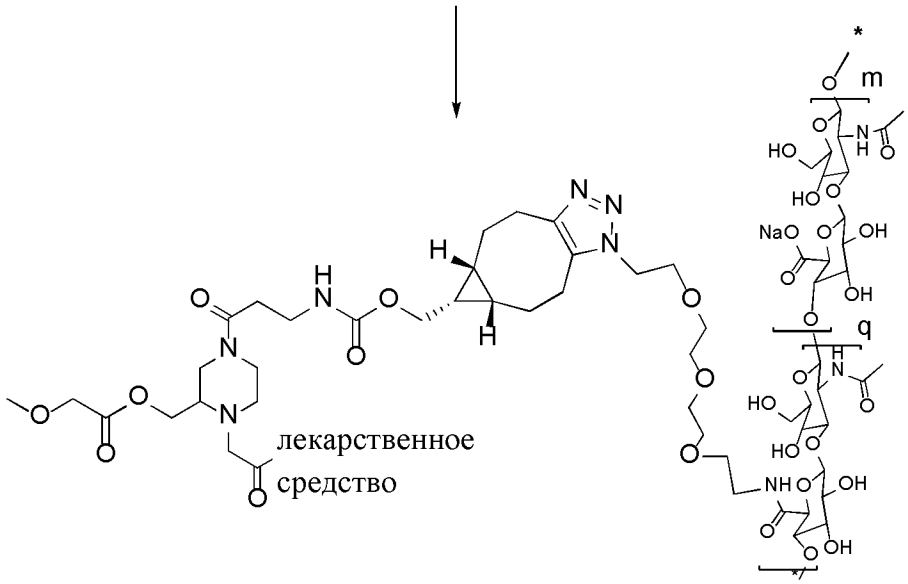
ФИГ. 2



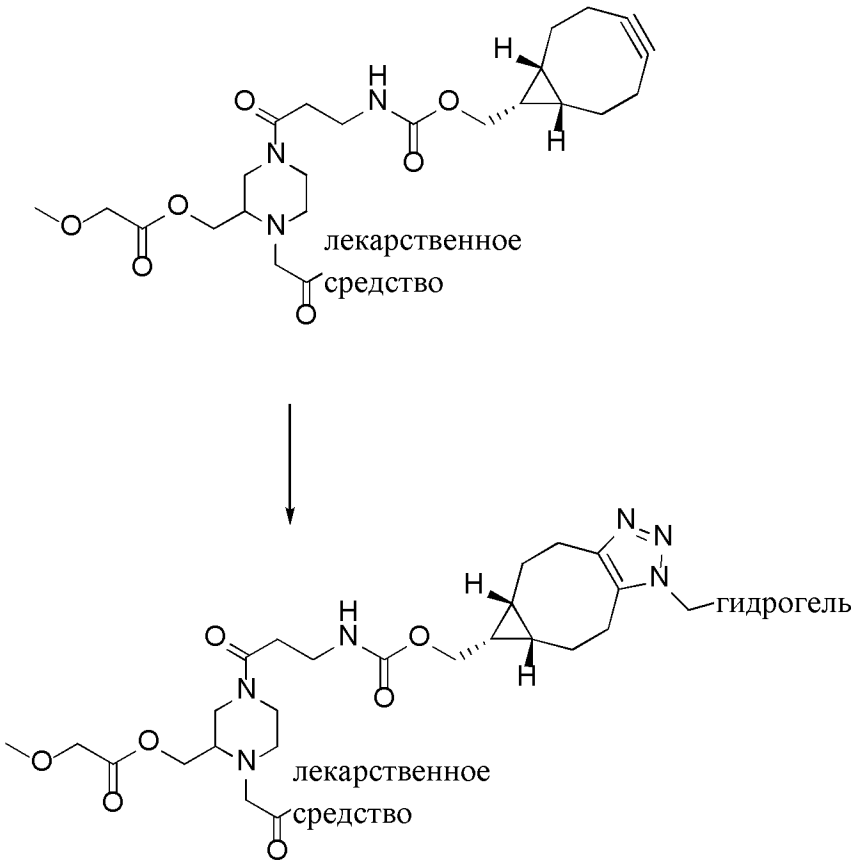
ФИГ. 3А



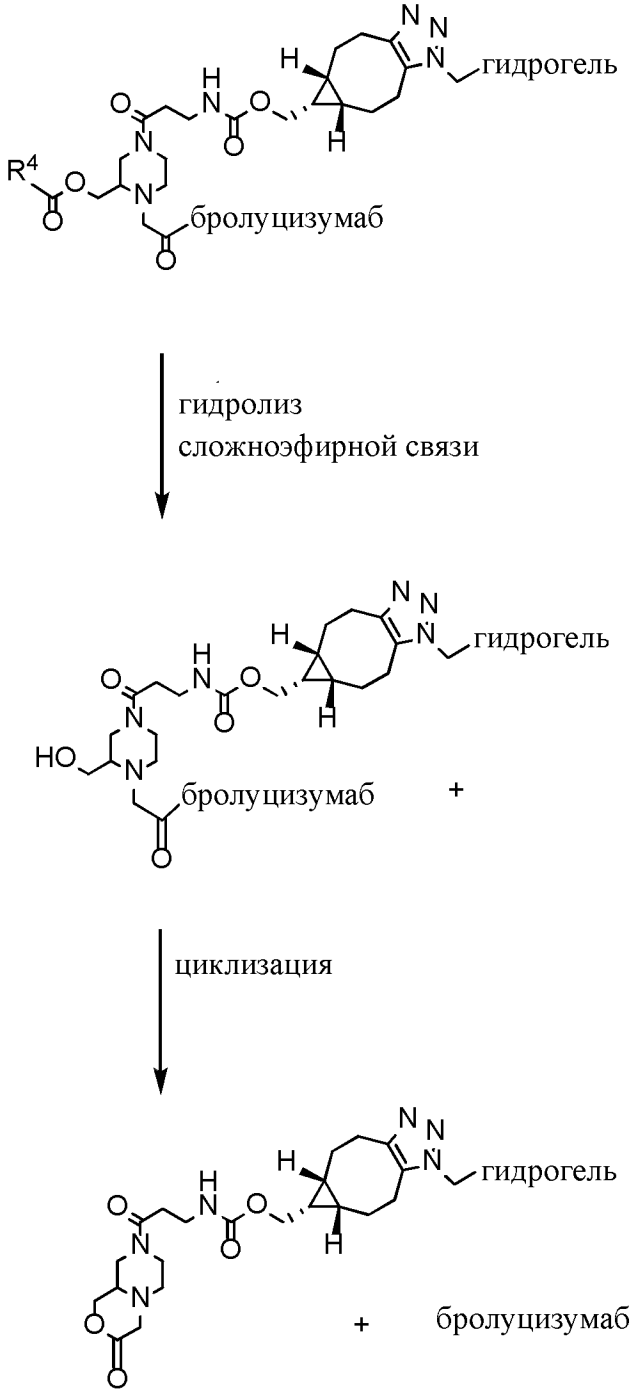
Функционализированная гиалуроновая кислота
Растворимый полимер



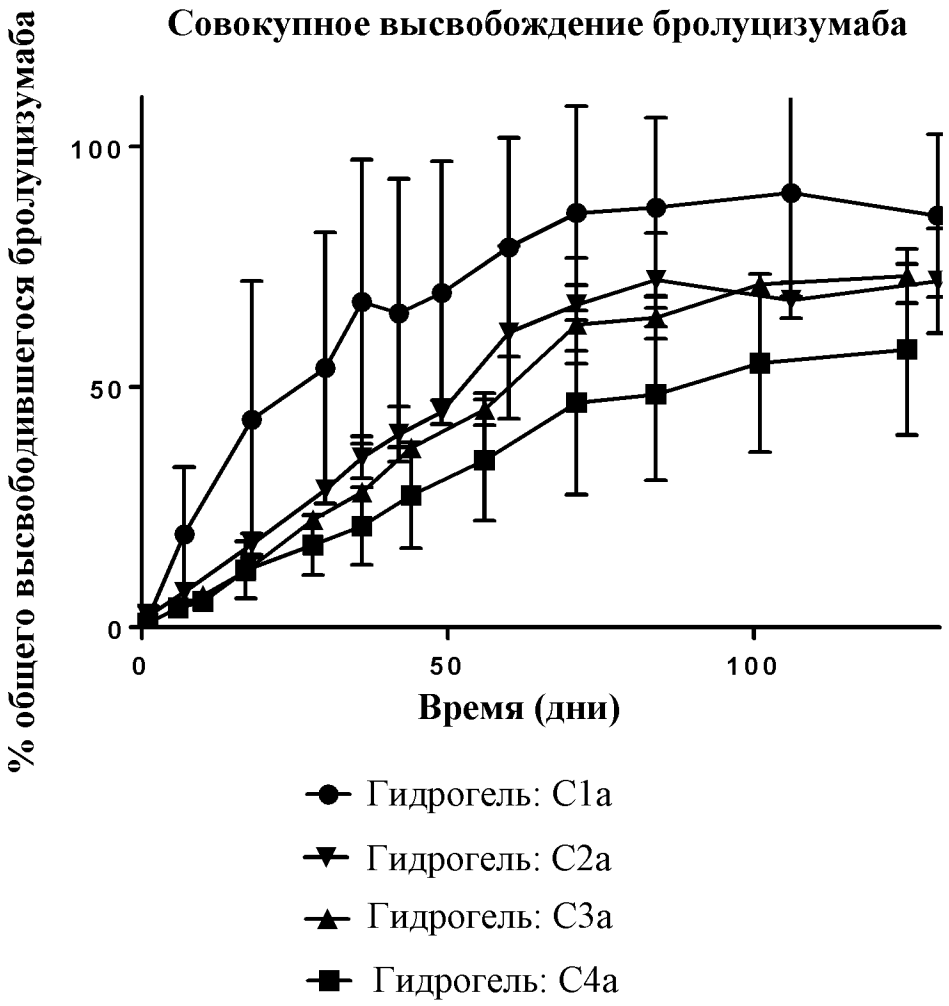
ФИГ. 3B


лекарственное
средство
гидрогель
лекарственное
средство

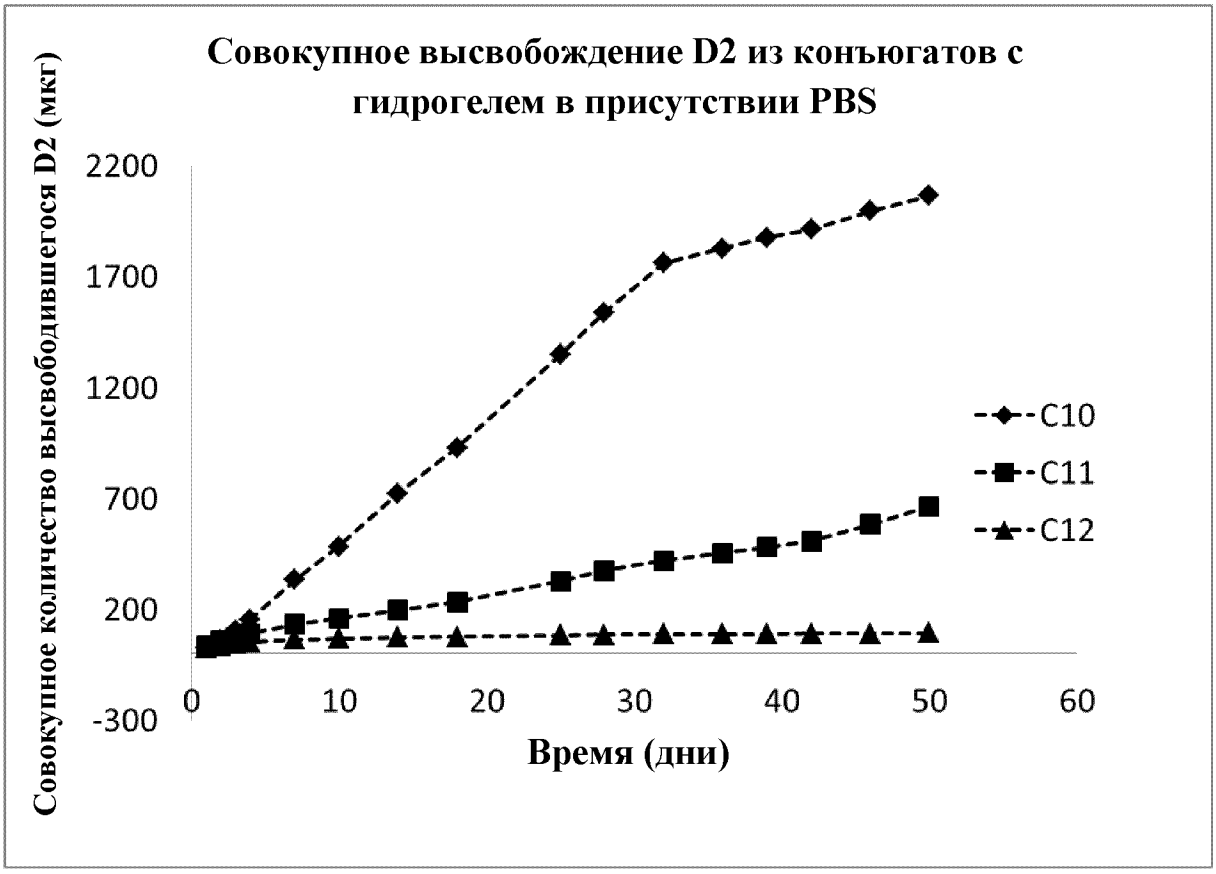
ФИГ. 4А


гидрогель
бролуцизумаб
гидролиз
сложноэфирной связи
гидрогель
бролуцизумаб
+
циклизация
гидрогель
+
бролуцизумаб

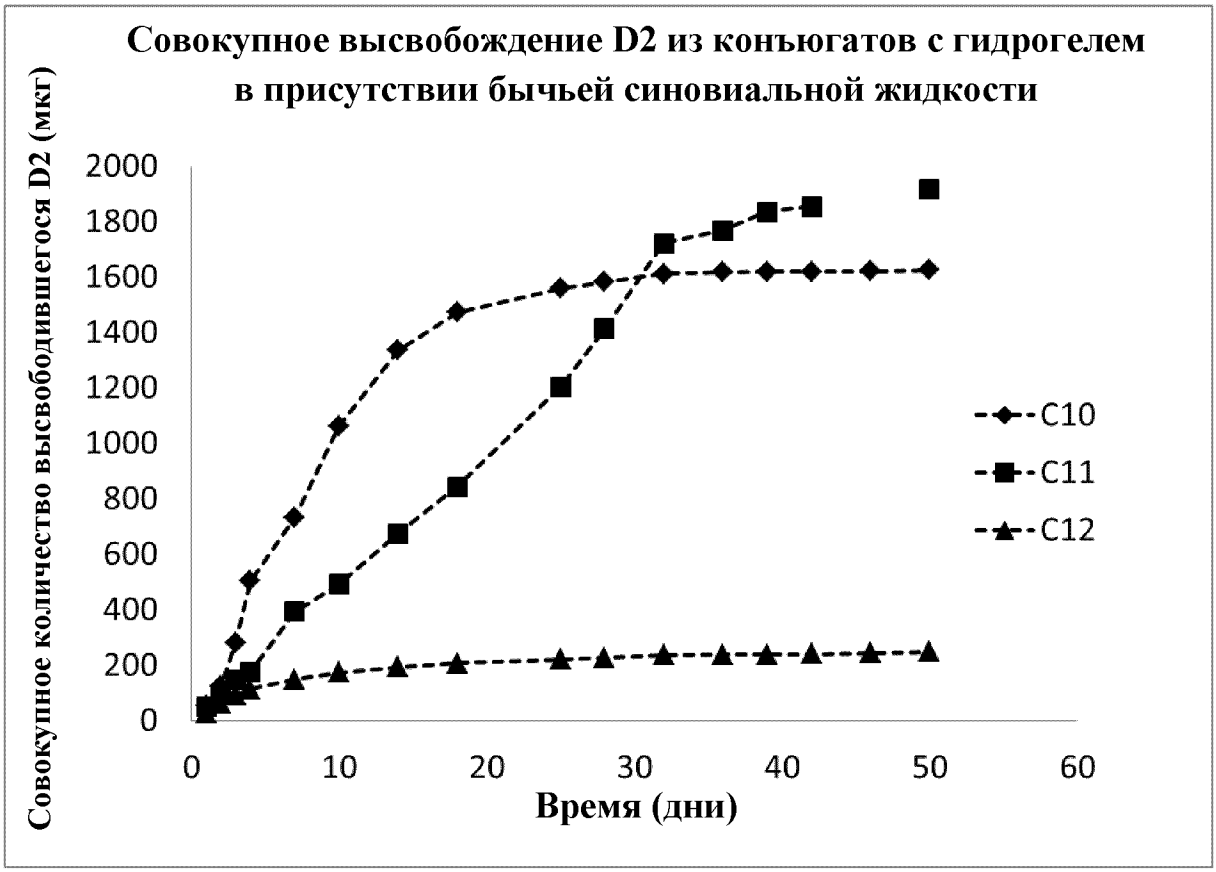
ФИГ. 4B


Совокупное высвобождение бролуцизумаба
% общего высвободившегося бролуцизумаба
100
50
0
0
50
100
Время (дни)
Гидрогель: C1a
Гидрогель: C2a
Гидрогель: C3a
Гидрогель: C4a

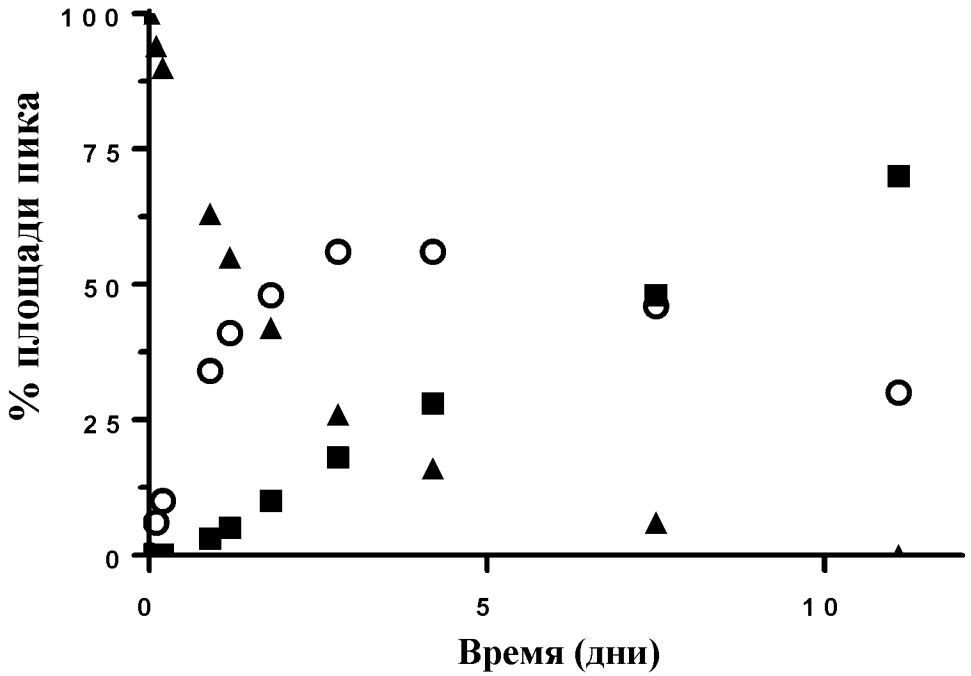
ФИГ. 5А


Совокупное высвобождение D2 из конъюгатов с гидрогелем в присутствии PBS
Совокупное количество высвободившегося D2 (мкг)
2200
1700
1200
700
200
-300
0
10
20
30
40
50
60
Время (дни)
C10
C11
C12

ФИГ. 5B


Совокупное высвобождение D2 из конъюгатов с гидрогелем
в присутствии бычьей синовиальной жидкости
Совокупное количество высвободившегося D2 (мкг)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
Время (дни)
C10
C11
C12

ФИГ. 6

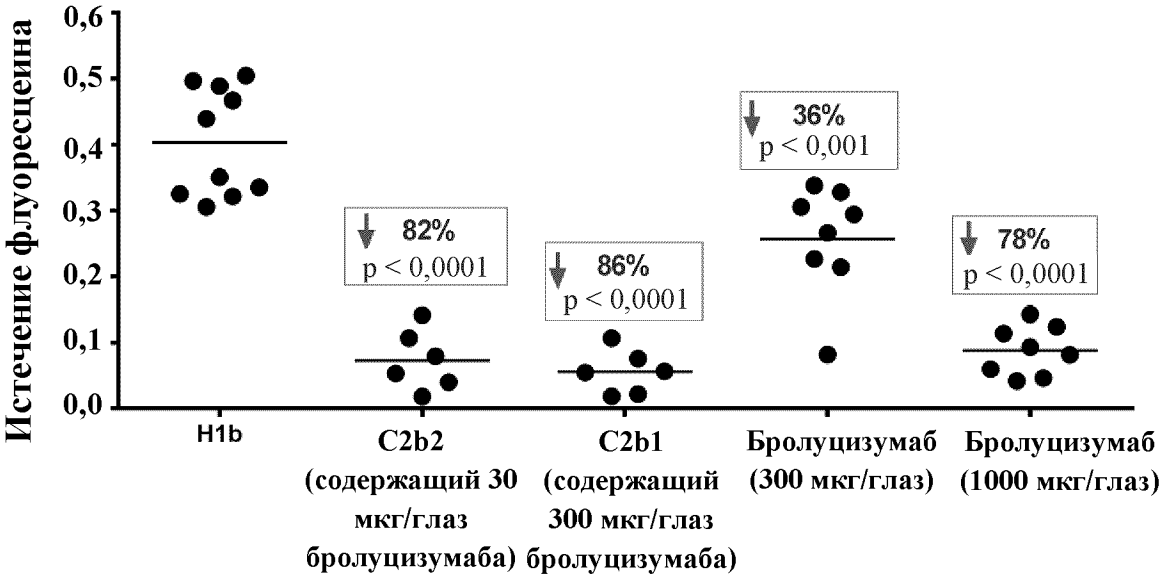


▲ % площади пика исходного соединения

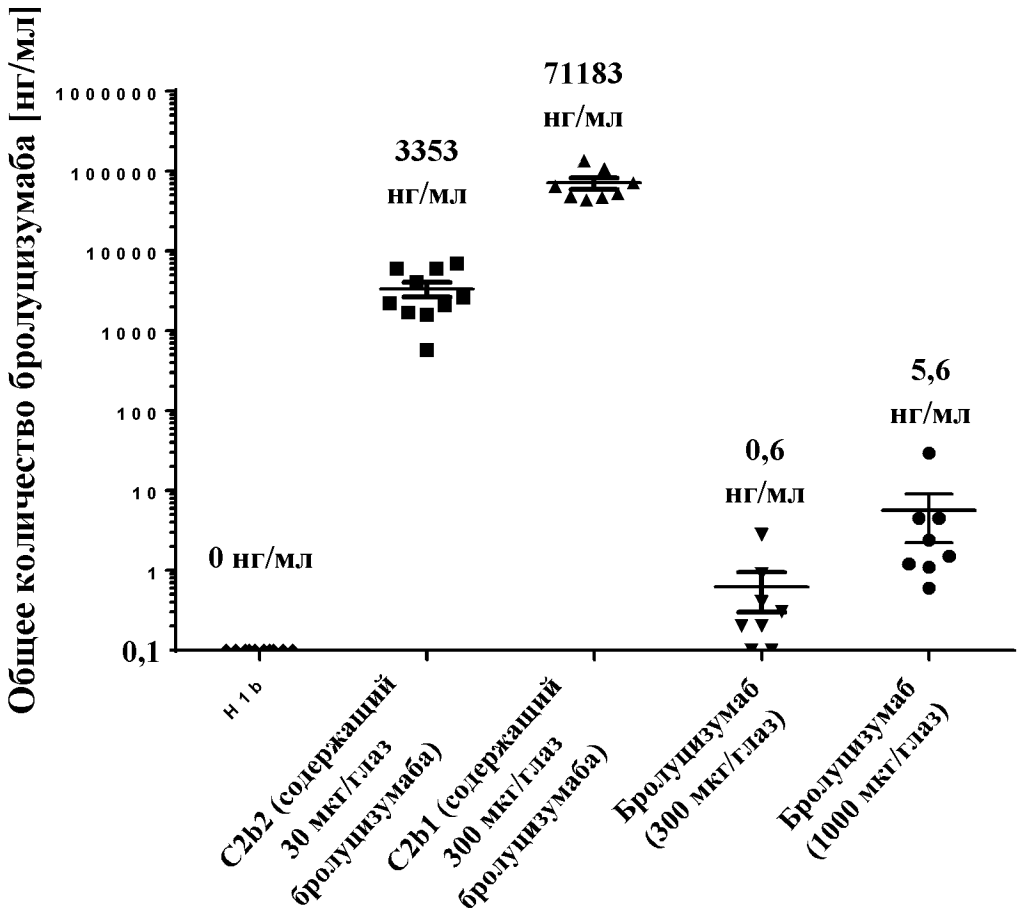
○ % площади пика промежуточного соединения

■ % площади пика лекарственного средства

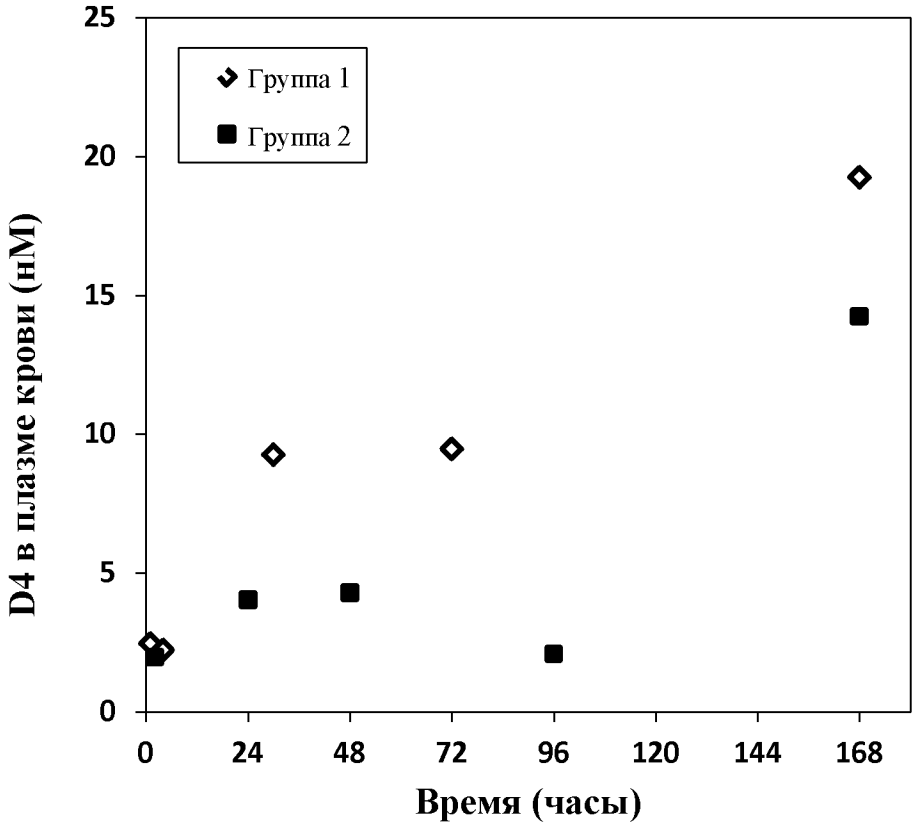
ФИГ. 7А


Истечение флуоресцеина
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
82%
p < 0,0001
86%
p < 0,0001
36%
p < 0,001
78%
p < 0,0001
H1b
C2b2 (содержащий 30 мкг/глаз бролуцизумаба)
C2b1 (содержащий 300 мкг/глаз бролуцизумаба)
Бролуцизумаб (300 мкг/глаз)
Бролуцизумаб (1000 мкг/глаз)

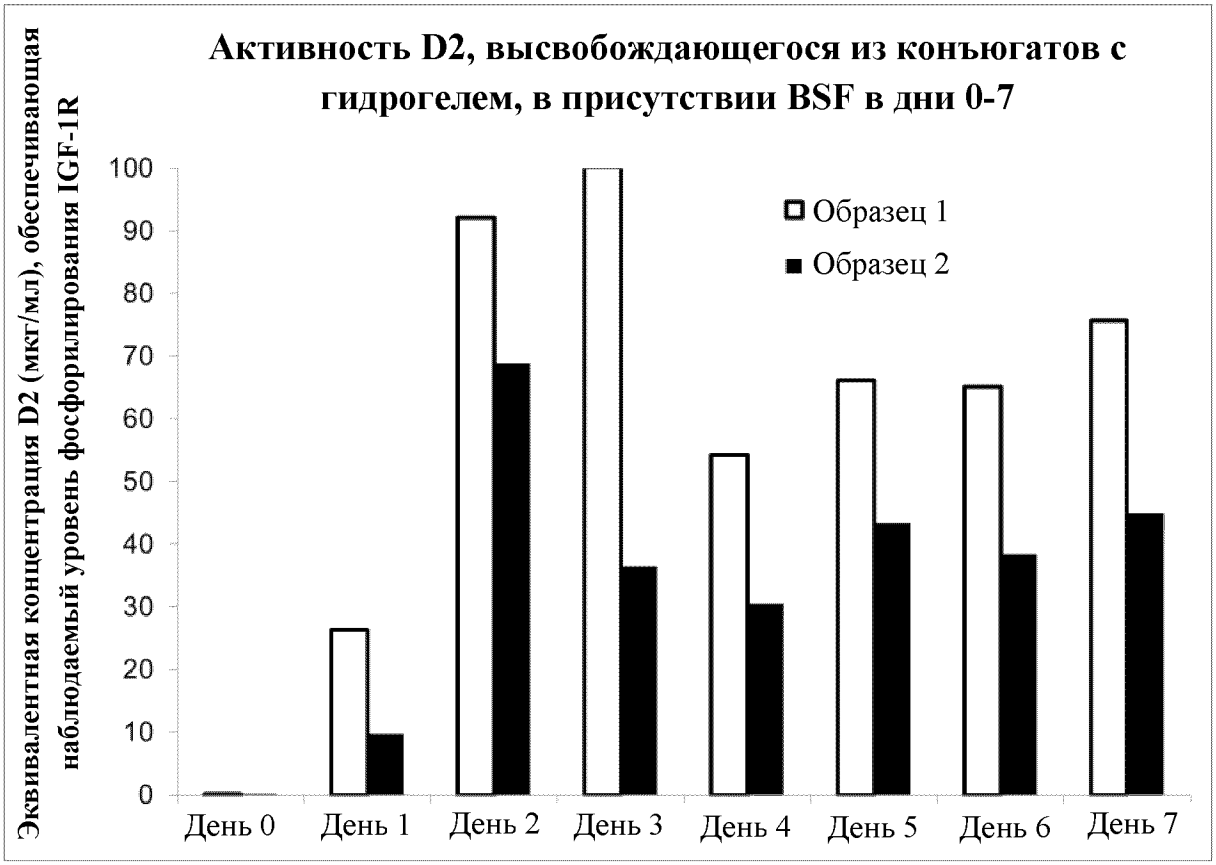
ФИГ. 7B


Общее количество бролуцизумаба [нг/мл]
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0,1
0 нг/мл
3353
нг/мл
71183
нг/мл
0,6
нг/мл
5,6
нг/мл
H1b
C2b2 (содержащий 30 мкг/глаз бролуцизумаба)
C2b1 (содержащий 300 мкг/глаз бролуцизумаба)
Бролуцизумаб (300 мкг/глаз)
Бролуцизумаб (1000 мкг/глаз)

ФИГ. 8


25
20
15
10
5
0
D4 в плазме крови (нМ)
Группа 1
Группа 2
0
24
48
72
96
120
144
168
Время (часы)

ФИГ. 9


Активность D2, высвобождающегося из конъюгатов с гидрогелем, в присутствии BSF в дни 0-7
Эквивалентная концентрация D2 (мкг/мл), обеспечивающая наблюдаемый уровень фосфорилирования IGF-1R
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Образец 1
Образец 2
День 0
День 1
День 2
День 3
День 4
День 5
День 6
День 7