

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190650 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.21

(22) Дата подачи заявки
2019.10.02

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

(54) ЗАМЕДЛЕННАЯ ДОСТАВКА АНГИОПОЭТИН-ПОДОБНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ 3

(31) 62/740,609

(32) 2018.10.03

(33) US

(86) PCT/IB2019/058400

(87) WO 2020/070675 2020.04.09

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Адамс Кристофер, Эйприл Мириам,
Фазал Танзина, Форстер Корнелия
Джутта (US), Гервин Николь (CH),
Холл Эдвард Чарльз (US), Ланглуа
Жан Батист Жорж Арман (CH), 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 аминокислоты или атом азота кольца в азатетраарильном 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.

A1

202190650

202190650

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567519EA/032

ЗАМЕДЛЕННАЯ ДОСТАВКА АНГИОПОЭТИН-ПОДОБНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ 3

Настоящая заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/740609, поданной 3 октября 2018 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка подается с машиночитаемой формой перечня последовательностей в соответствии со Сводом федеральных нормативных актов (C.F.R.), раздел 37, § 1.821(c). Представленный текстовый файл "PAT058317-WO-PCT_SL.txt" был создан 31 октября 2019 г., имеет размер 99303 байта и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

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.

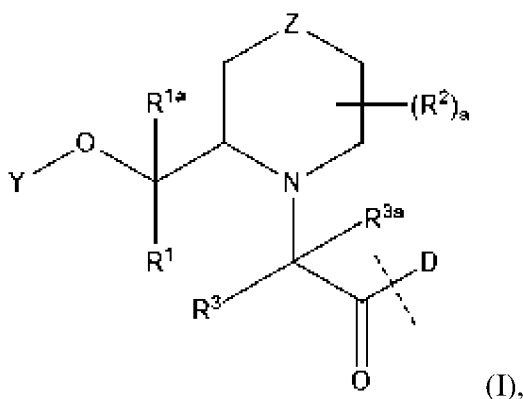
В качестве альтернативы, лекарственное средство может быть ковалентно конъюгировано с носителем посредством стабильного линкера или посредством обратимо связанного линкерного компонента, от которого лекарственное средство высвобождается. Если лекарственное средство стабильно связано с носителем, такой 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

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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе; R^1 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил; R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил; R^2 независимо в каждом случае выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации с атомом(атомами) углерода, к которому(которым) они присоединены, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу; а равняется 0, 1, 2, 3 или 4; R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил; R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил; R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил; R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; 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_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси; каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила; R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкил, $C(O)C_1-C_8$ алкил, $C(O)N(H)C_1-C_8$ алкил, $C(O)OC_1-C_8$ алкил, 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 полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте D содержит любую из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий замену K423Q или делецию K423. В другом аспекте D содержит полипептид

ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 201-460; 207-460; 225-455; 225-455; 225-460; 225-460; 226-455; 226-455; 226-460; 226-460; 228-455; 228-455; 228-460; 228-460; 233-455; 233-455; 233-460; 233-460; 241-455; 241-455; 241-460; 241-460; 242-455; 242-455; 242-460 или 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 в каждом случае. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, предусматривающий по меньшей мере 95% идентичность с аминокислотными остатками 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q D1 (SEQ ID NO: 19). 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 переменная a равняется 0. В другом аспекте каждый из R^3 и R^{3a} представляет собой водород. В другом аспекте Y представляет собой $C(O)R^4$, и R^4 представляет собой C_1 - C_6 алкил, C_3 - C_6 циклоалкил или C_1 - C_2 алкокси- C_1 - C_2 алкил. 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_4 алкил, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, изобутокси, втор-бутокси, 2-этоксиэтокси, 2-изопропоксиэтокси, тетрагидропиранилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO$ - C_1 - C_4 алкил, 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 независимо в каждом случае выбран из связи, O, $C(O)$, $N(H)$, $N(C_1-C_4$ алкил), $C(O)NH$, $C(O)N(C_1-C_4$ алкил), $N(H)C(O)$, $N(C_1-C_4$ алкил) $C(O)$, $N(H)C(O)O$, $N(C_1-C_4$ алкил) $C(O)O$, $OC(O)N(H)$, $OC(O)N(C_1-C_4$ алкил), $N(H)C(O)N(H)$, $N(C_1-C_4$ алкил) $C(O)N(H)$, $N(H)C(O)N(C_1-C_4$ алкил), $N(C_1-C_4$ алкил) $C(O)N(C_1-C_4$ алкил), $C(O)O$, $OC(O)$, $OC(O)O$, S, $S(O)_2$, $N(H)S(O)_2$, $N(C_1-C_4$ алкил) $S(O)_2$, $S(O)_2N(H)$, $S(O)_2N(C_1-C_4$ алкил), 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- $P(O)_2O$ или $O-P(O)_2$ - C_1 - C_4 алкила; Sp независимо в каждом случае выбран из необязательно замещенного 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 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_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_8 алкил, $C(O)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)OC_1$ - C_8 алкил, $C(O)N(H)C_1$ - C_8 алкил, 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 CHR^8 или NR^9 ; каждый из R^8 и R^9 независимо выбран из водорода, C_1 - C_8 алкила, $C(O)-(CH_2)_n$ -Q-A, $C(O)C_1$ - C_8 алкила 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 независимо в каждом случае равняется 1, 2 или 3; каждый из g и r независимо имеет средневзвешенную длину от приблизительно 2 до приблизительно 50; m равняется 1 или 0; W представляет собой C₂-C₄алкил-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(C₁-C₄алкил); A представляет собой водород, C₁-C₈алкил, C(O)C₁-C₈алкил, C(O)N(H)C₁-C₈алкил, C(O)OC₁-C₈алкил, R¹⁰ или R¹¹, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R¹⁰; R¹⁰ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и R¹¹ представляет собой носитель. В другом аспекте Z представляет собой NR⁹; R⁹ представляет собой C(O)-(CH₂)_n-Q-A или -C(O)(CH₂)_q[O-W]_g(NHC(O))_m(CH₂)_q[O-W]_p-Q-A; n представляет собой целое число от 1 до 8; и A представляет собой R¹⁰ или R¹¹. В другом аспекте R¹⁰ представляет собой азидил, алкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂циклоалкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂гетероциклоалкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂циклоалкенил, норборнил, замещенный или незамещенный винилкарбоксил, замещенный или незамещенный винилсульфонил, замещенный или незамещенный C₂-C₈алкенил, амино, тиол, замещенный или незамещенный C₁-C₈карбоксил, замещенный или незамещенный C₁-C₈карбонил, -O-NH₂, гидразидил, малеимид, альфа-галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин или адамантан. В другом аспекте R¹⁰ содержит реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания системы доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемой соли формулы (I) с носителем. В другом аспекте R¹¹ является биоразлагаемым. В другом аспекте R¹¹ содержит полимер или сшитый полимер. В другом аспекте R¹¹ содержит гидрогель, содержащий один или несколько сшитых полимеров. В другом аспекте R¹¹ 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, гидроксипропилированного крахмала, хитозана, нуклеиновых кислот, их производных, их сополимеров или их комбинаций. В другом аспекте R¹¹ содержит гиалуроновую кислоту, полиэтиленгликоль, сшитый гидрогель на основе гиалуроновой кислоты, сшитый гидрогель на основе полиэтиленгликоля или их комбинации. В другом аспекте R¹¹ содержит гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль. В другом аспекте R¹¹ содержит гидрогель, содержащий сшитую гиалуроновую кислоту или сшитый полиэтиленгликоль. В другом аспекте гиалуроновая кислота или полиэтиленгликоль функционализированы по

меньшей мере одной функциональной группой, содержащей аزيدил, алкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂циклоалкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂гетероциклоалкинил, C₇-C₁₂циклоалкенил, норборнил, винилкарбоксил, винилсульфонил, C₂-C₈алкенил, amino, тиол, C₁-C₈карбоксил, C₁-C₈карбонил, -O-NH₂, карбогидразид, малеимид, альфа-галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин, адамантан или их комбинации. В другом аспекте R¹¹ 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 C₂-C₄алкил-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 аزيدил, алкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂циклоалкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂гетероциклоалкинил, C₇-C₁₂циклоалкенил, норборнил, винилкарбоксил, винилсульфонил, C₂-C₈алкенил, amino, тиол, C₁-C₈карбоксил, C₁-C₈карбонил, -O-NH₂, карбогидразид, малеимид, альфа-галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин или адамантан. В другом аспекте V представляет собой азид.

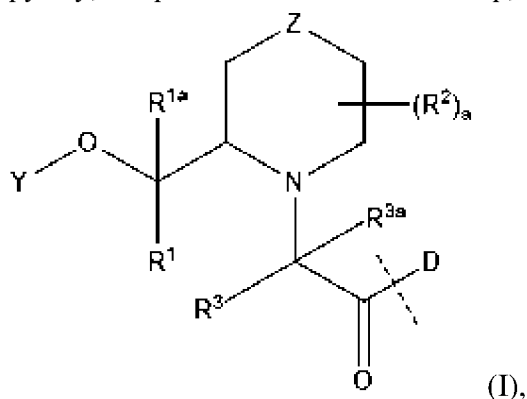
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ получения состава на основе сшитого носителя, при этом способ включает: (a) функционализацию молекулы носителя R¹¹; (b) получение реакционноспособного сшивающего средства и (c) осуществление реакции функционализированной 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 содержит гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль. В другом аспекте молекулу носителя функционализируют азидными, сульфгидрильными, amino-, аминокси- (O-NH₂) 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-ил)метильных групп после удаления защитных групп из функционализированного сложного эфира

полиэтиленгликоля. Другой аспект предусматривает сшитый гидрогель, получаемый с помощью способов, описанных в данном документе. В другом 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 полипептидом ANGPTL3, содержащим по меньшей мере одну первичную аминогруппу D, при этом способ включает: (а) получение полипептида ANGPTL3, содержащего по меньшей мере одну первичную аминогруппу D; (b) осуществление реакции биологически активного средства с бесследным линкером R, который имеет активированную карбонильную функциональную группу; и (с) очистку аддукта лекарственного средства от реагентов. Один аспект представляет собой аддукт лекарственного средства, получаемый с помощью способа, описанного в данном документе.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ получения системы доставки лекарственных средств, при этом способ включает: (а) получение молекулы носителя R^{11} , где R^{11} представляет собой сшитый гидрогель; необязательно стадия (а) может дополнительно предусматривать очистку молекулы носителя R^{11} , представляющего собой сшитый гидрогель; (b) отдельное конъюгирование бесследного линкера R с полипептидом ANGPTL3, содержащим по меньшей мере одну первичную аминогруппу D, тем самым с образованием аддукта бесследный линкер-D; стадия (b) может необязательно дополнительно предусматривать очистку аддукта бесследный линкер-D; (с) конъюгирование молекулы носителя R^{11} с аддуктом бесследный линкер-D и (d) очистку системы доставки лекарственных средств от реагентов. Один аспект представляет собой систему доставки лекарственных средств, полученную с помощью способа, описанного в данном документе.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения макулярной дегенерации, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D-R, который представлен формулой (I), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



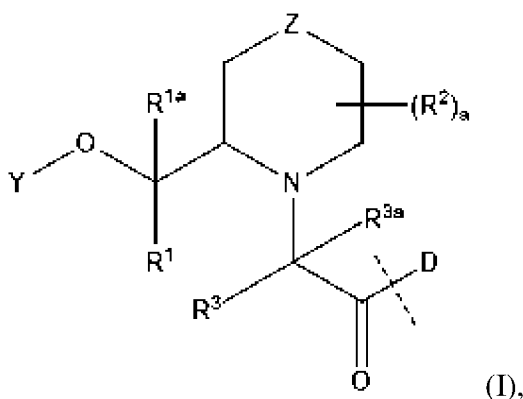
где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе; R^1 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил; R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил; R^2 независимо в каждом случае выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу; а равняется 0, 1, 2, 3 или 4; R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил; R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил; R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил; R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или $CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5-, 6- или 7-членный циклический простой эфир; R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидроксигруппой, амино, C_1 - C_4 алкокси или моно- и ди- C_1 - C_4 алкиламином; каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила; R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкила, $C(O)C_1-C_8$ алкила 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 независимо в каждом случае 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_4 алкил-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_8 алкил, $C(O)C_1-C_8$ алкил, $C(O)N(H)C_1-C_8$ алкил, $C(O)OC_1-C_8$ алкил, 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, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D-R, который представлен формулой (I), где D предусматривает полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:

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_4 алкил; R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил; R^2 независимо в каждом случае выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу; а равняется 0, 1, 2, 3 или 4; R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил; R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил; R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил; R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или $CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5-, 6- или 7-членный циклический простой эфир; R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидроксидом, амин, C_1 - C_4 алкокси или моно- и ди- C_1 - C_4 алкиламином; каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила; R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкила, $C(O)C_1-C_8$ алкила 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 независимо в каждом случае 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_4 алкил-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_8 алкил, $C(O)C_1-C_8$ алкил, $C(O)N(H)C_1-C_8$ алкил, $C(O)OC_1-C_8$ алкил, 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.

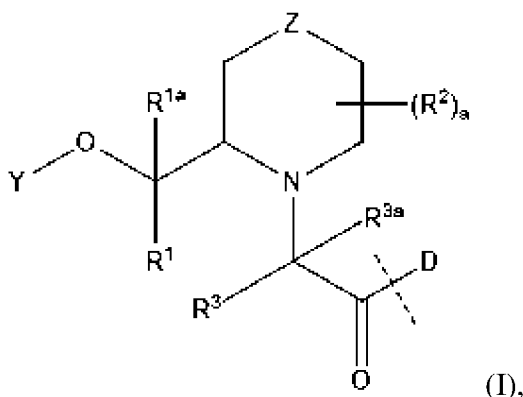
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ лечения заболевания или нарушения, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, системы доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемой соли, содержащей конъюгат D-R, который представлен формулой (I), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе; R^1 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил; R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил; R^2 независимо в каждом случае выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу; а равняется 0, 1, 2, 3 или 4; R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил; R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил; R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил; R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или $CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5-, 6- или 7-членный циклический простой эфир; R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидроксигруппой, аминогруппой, C_1 - C_4 алкокси или моно- и ди- C_1 - C_4 алкиламином; каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила; R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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, $\text{C}_1\text{-C}_8$ алкила, $\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_8$ алкила или $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_q[\text{O-W}]_g(\text{NHC}(\text{O}))_m(\text{CH}_2)_q[\text{O-W}]_p\text{-Q-A}$, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 Q-A; q независимо в каждом случае 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 $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкил-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($\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил); A представляет собой водород, $\text{C}_1\text{-C}_8$ алкил, $\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_8$ алкил, $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{C}_1\text{-C}_8$ алкил, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{-C}_8$ алкил, 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.

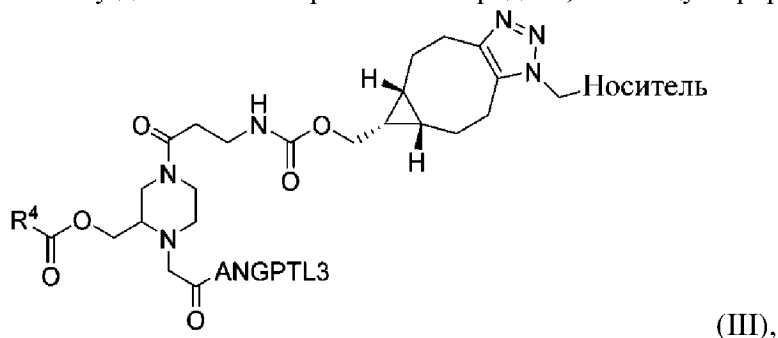
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой способ продления периода полувыведения полипептида ANGPTL3, содержащего по меньшей мере одну первичную аминогруппу D, при этом способ включает присоединение D к R, который представлен формулой (I), где R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе; R^1 представляет собой водород или $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил; R^{1a} представляет собой водород или $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют $\text{C}_3\text{-C}_6$ циклоалк-1,1-диил; R^2 независимо в каждом случае выбран из $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную $\text{C}_3\text{-C}_6$ циклоалкильную или спиро- $\text{C}_3\text{-C}_6$ циклоалк-1,1-диильную группу; a равняется 0, 1, 2, 3 или 4; R^3 представляет собой водород или $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил; R^{3a} представляет собой водород, $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют $\text{C}_3\text{-C}_6$ циклоалк-1,1-диил; Y представляет собой $\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$, $\text{C}(\text{O})\text{NHR}^4$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{SiR}^5\text{R}^6\text{R}^7$ или $\text{CR}^{12}\text{R}^{12a}\text{OR}^{13}$; R^{12} представляет собой водород или $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил; R^{12a} представляет собой водород или $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил, или $\text{CR}^{12}\text{R}^{12a}$, взятые в комбинации, образуют $\text{C}_3\text{-C}_6$ циклоалк-1,1-диил; R^{13} представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкил; или $\text{CHR}^{12}\text{OR}^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5-, 6- или 7-членный циклический простой эфир; R^4 представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_8$ алкил или $\text{C}_3\text{-C}_7$ циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкильными группами, и

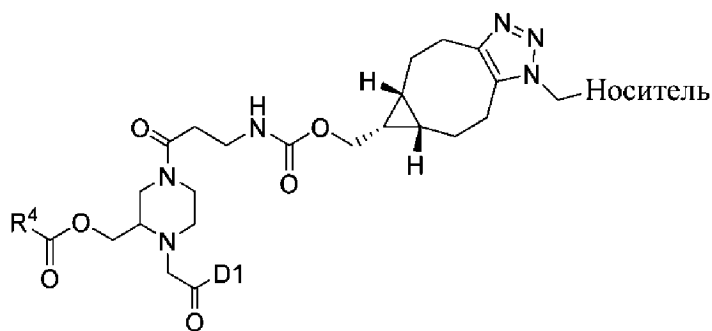
где алкил необязательно замещен гидроксигруппой, аминами, C_1 - C_4 алкокси или моно- и ди- C_1 - C_4 алкиламином; каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила; R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкила, $C(O)C_1-C_8$ алкила 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 независимо в каждом случае 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_4 алкил-1,2-диол, 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_8 алкил, $C(O)C_1-C_8$ алкил, $C(O)N(H)C_1-C_8$ алкил, $C(O)OC_1-C_8$ алкил, 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 полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45.

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



где ANGPTL3 содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45 или их комбинация.

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

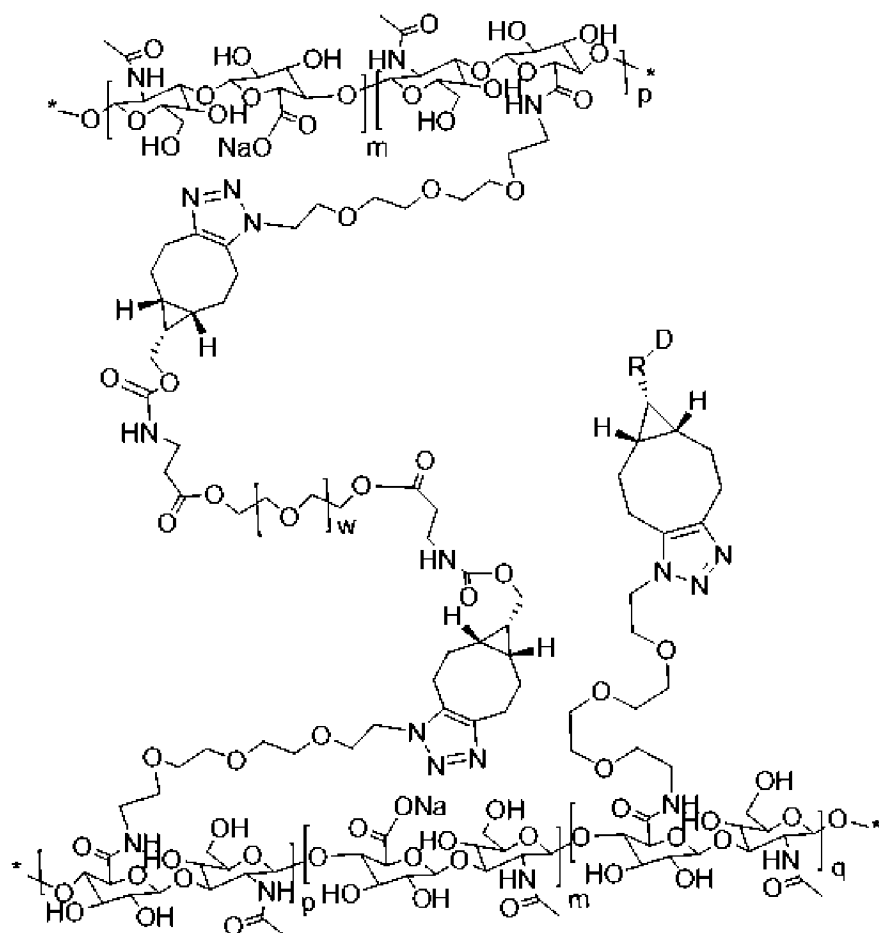


(IV),

где D1 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q (SEQ ID NO: 19).

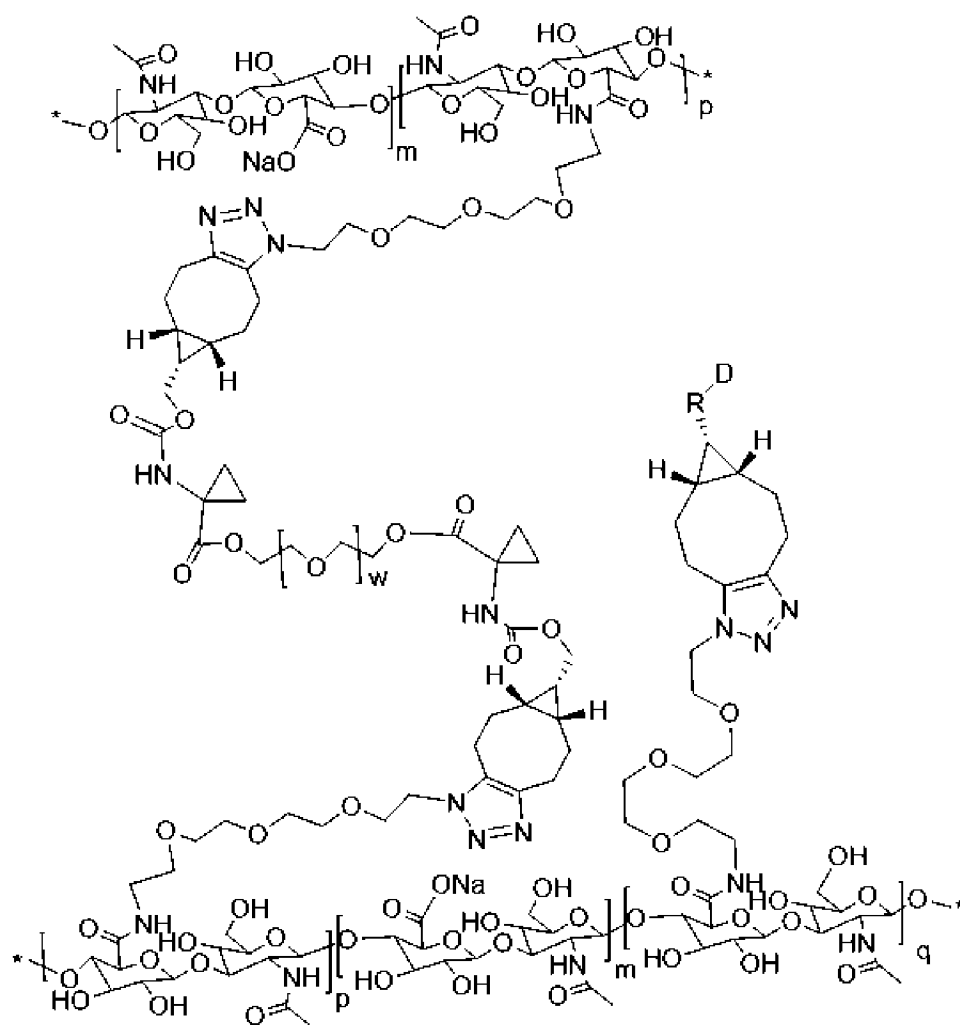
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств, содержащую D-R-R¹¹, где R содержит бесследный линкер, связанный с биологически активным средством D; D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R¹¹ 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. В одном аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45.

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 полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



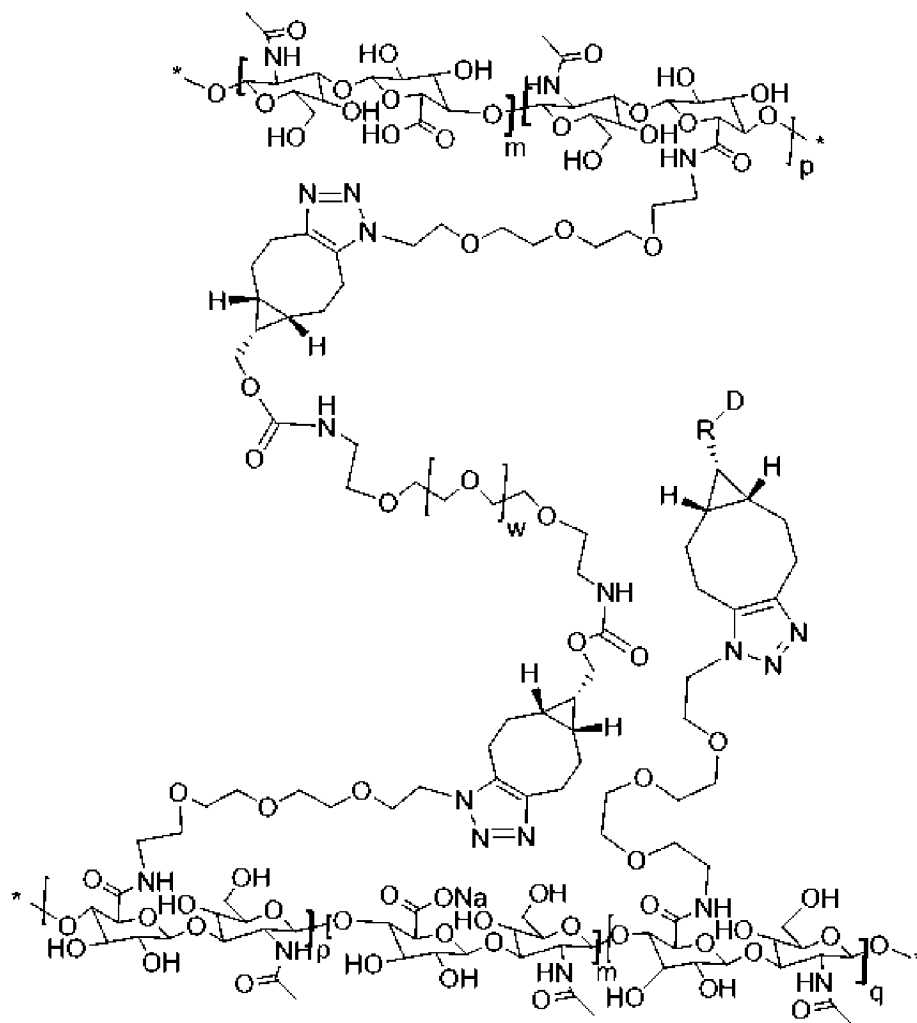
(XXIV).

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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



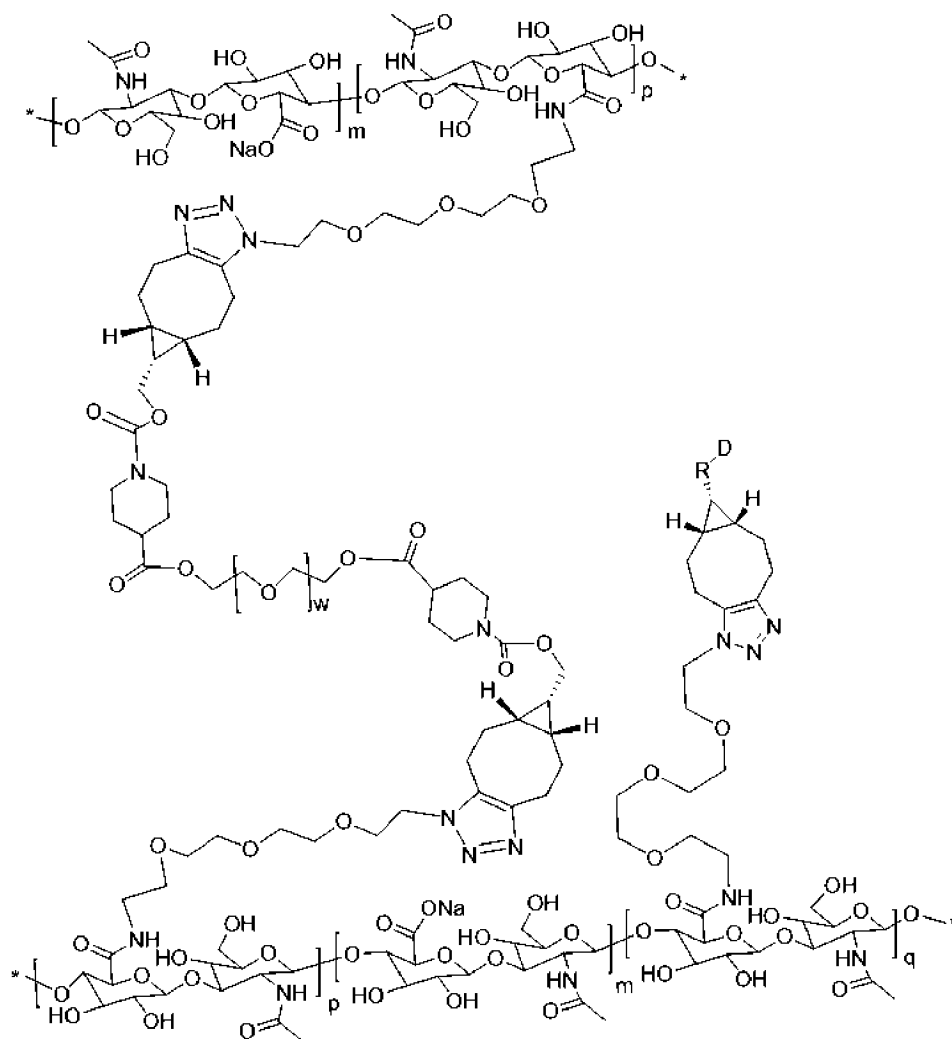
(XXV).

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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



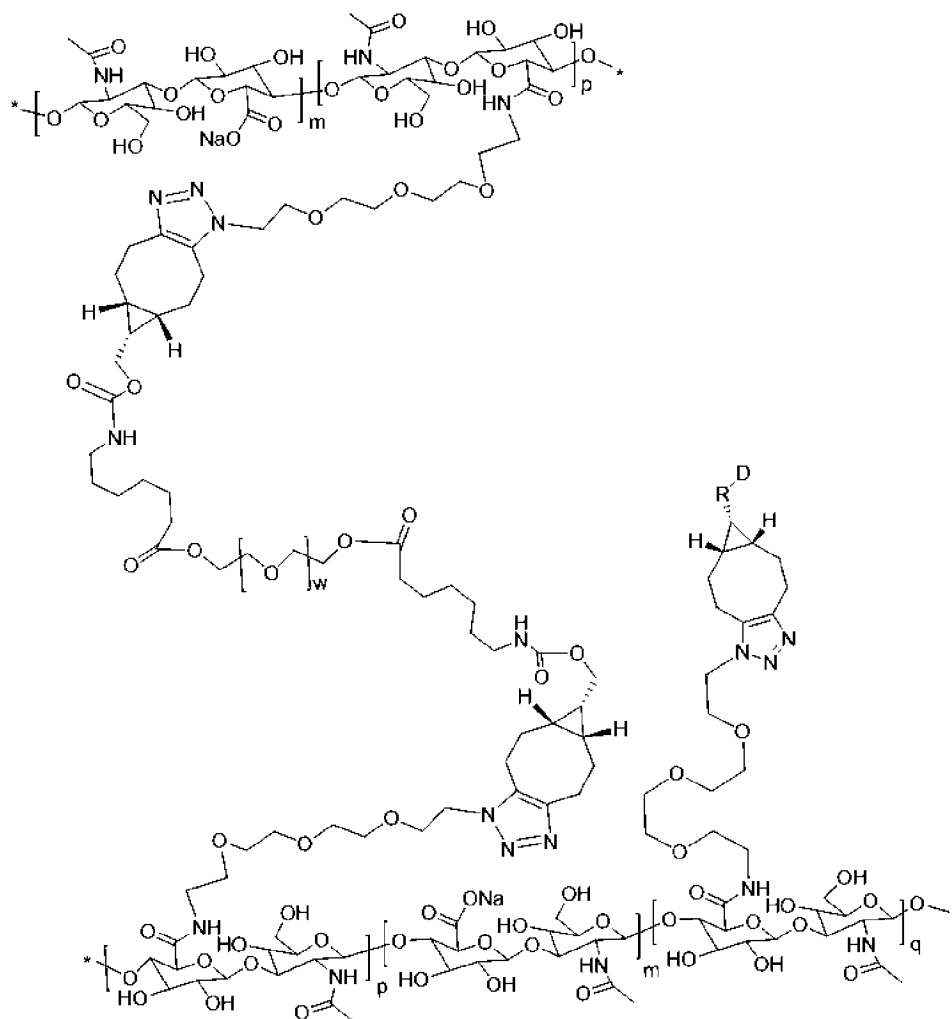
(XXVI).

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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



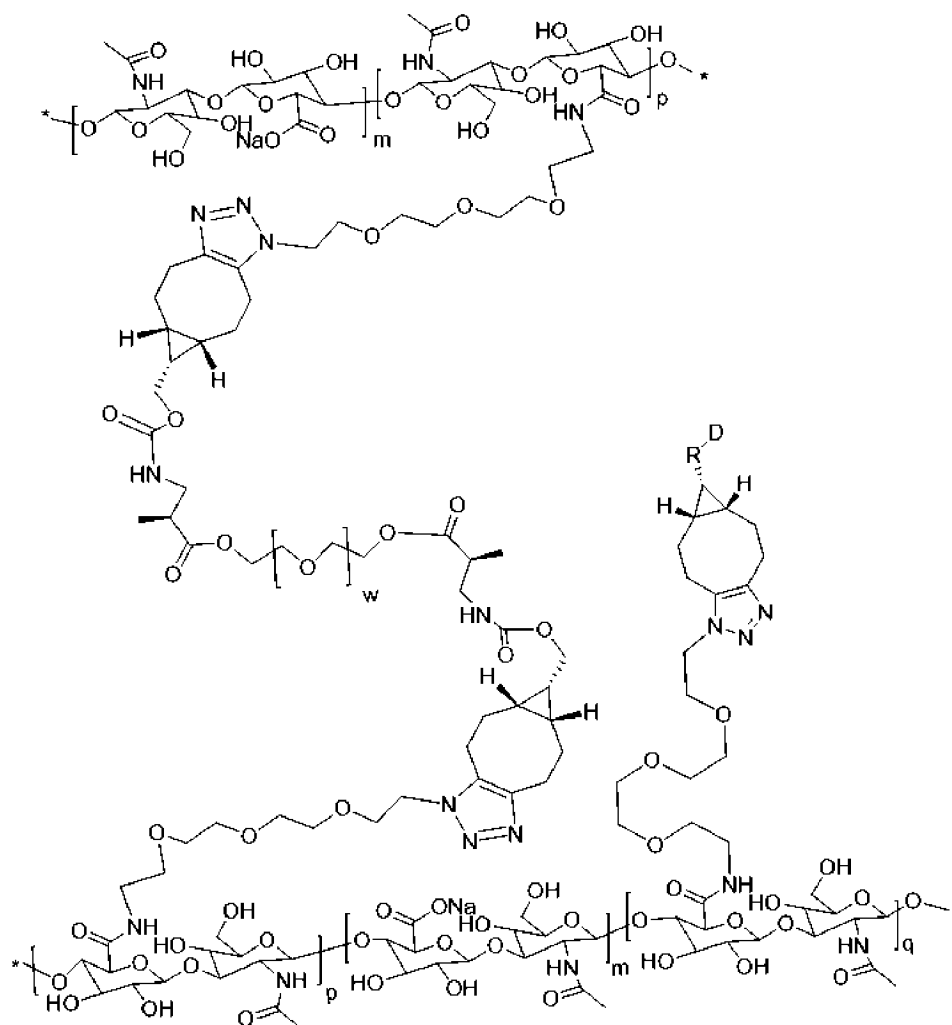
(XXVII).

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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



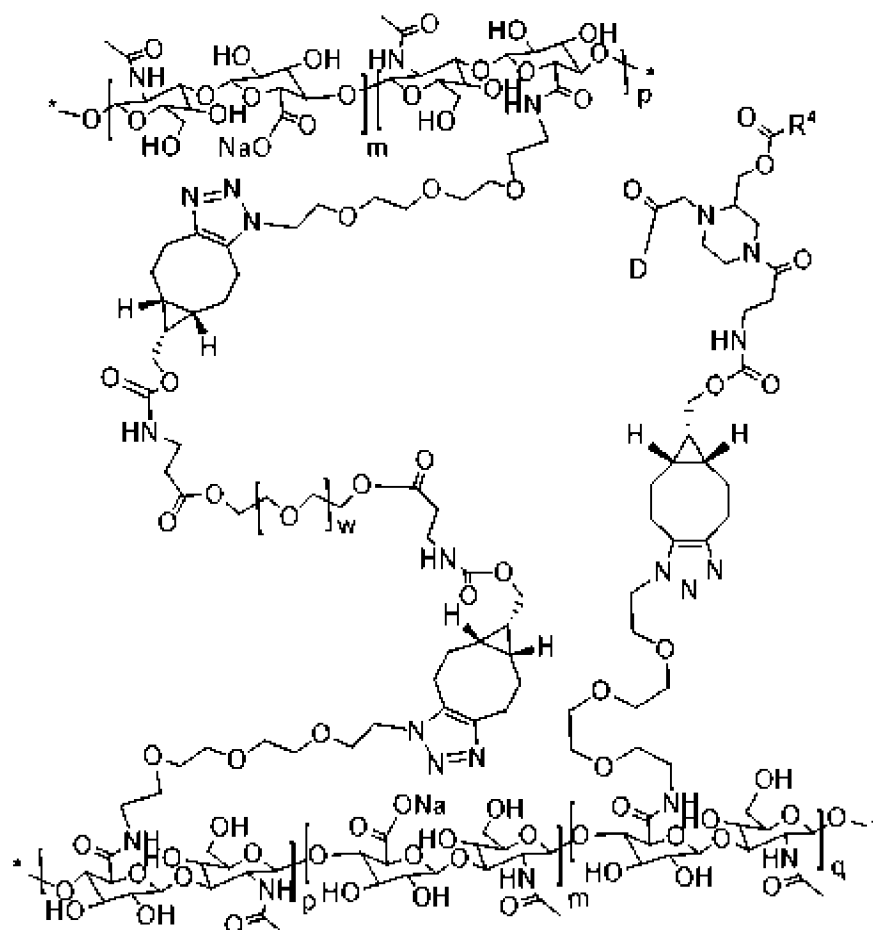
(XXVIII).

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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



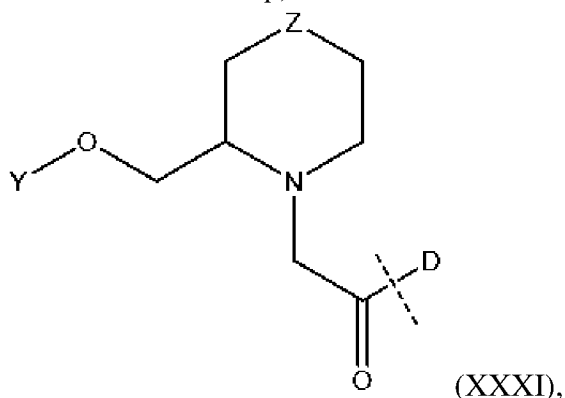
(XXIX).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXX), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R⁴ представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1-метилциклопропил или метоксиметил:



(XXX).

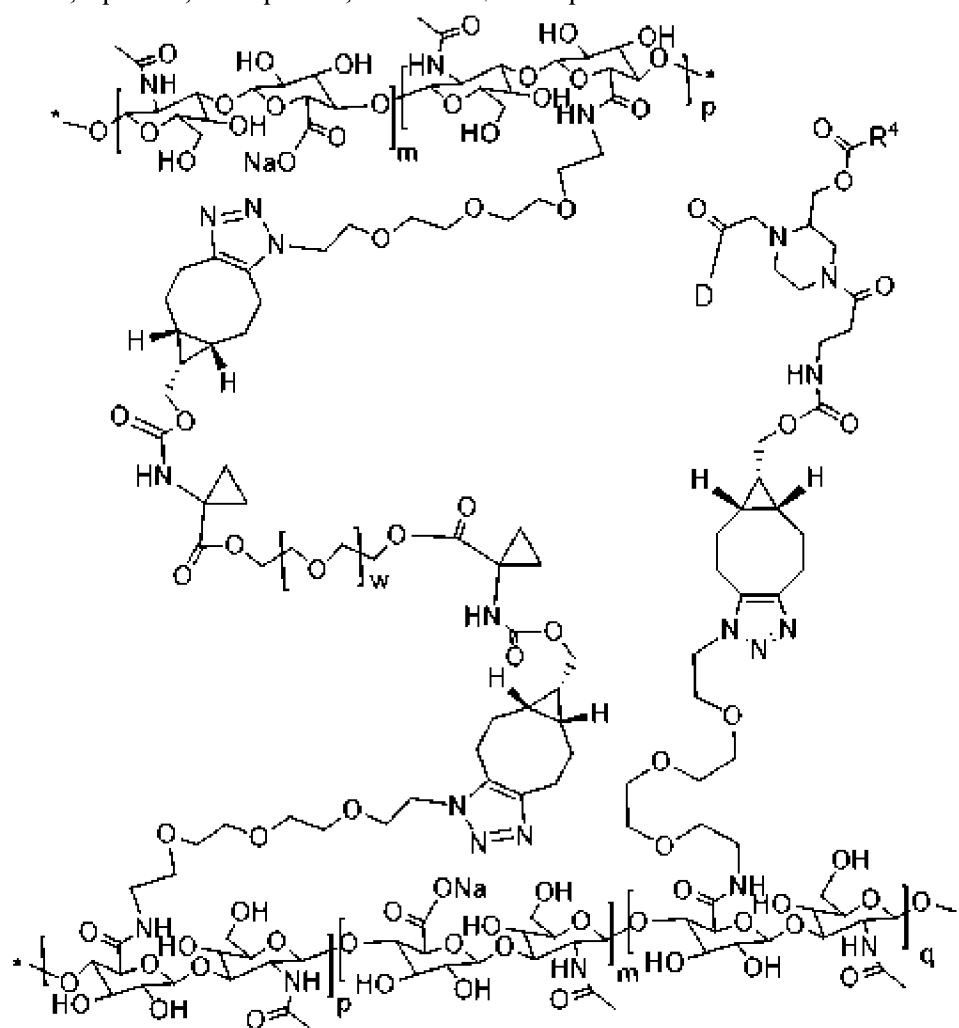
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D-R, который представлен формулой (XXXI), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе; Y представляет собой $C(O)R^4$; R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси; Z представляет собой N-L-A; L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$; A представляет собой

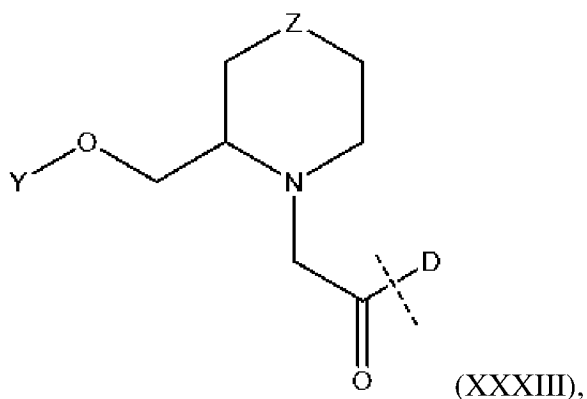
R^{11} ; R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)-бис-[3-((((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбони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

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXXII), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1-метилциклопропил или метоксиметил:



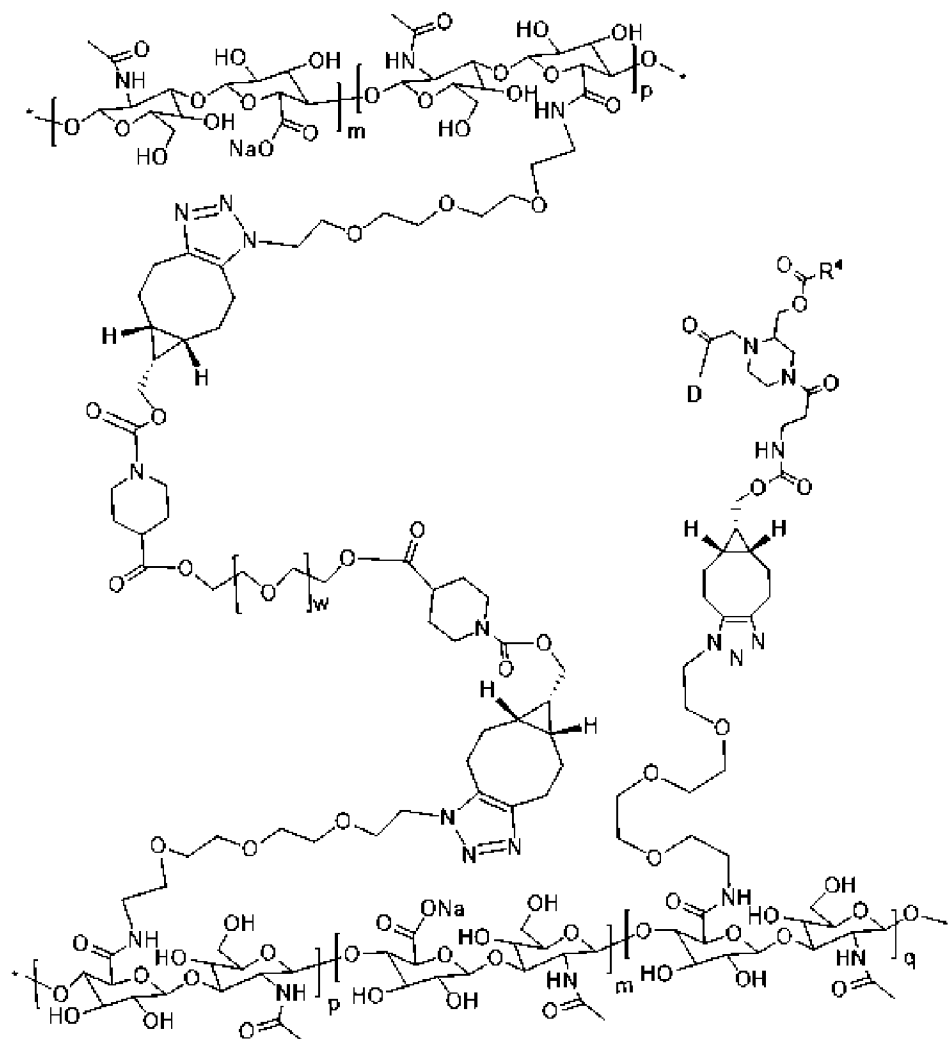
(XXXII).

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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



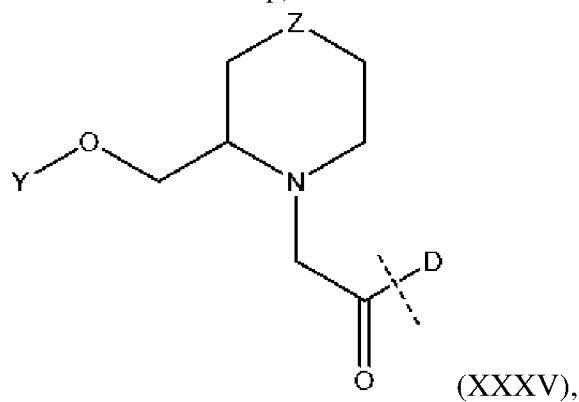
где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе; Y представляет собой $C(O)R^4$; R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси; 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-[1-(((1'R,8'S,9's)-бицикло[6.1.0]нон-4'-ин-9'-ил)метокси)карбонил)аминоциклопропан-1-карбоновой-кислоты-сложный-эфир].

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXXIV), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1-метилциклопропил или метоксиметил:



(XXXIV).

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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:

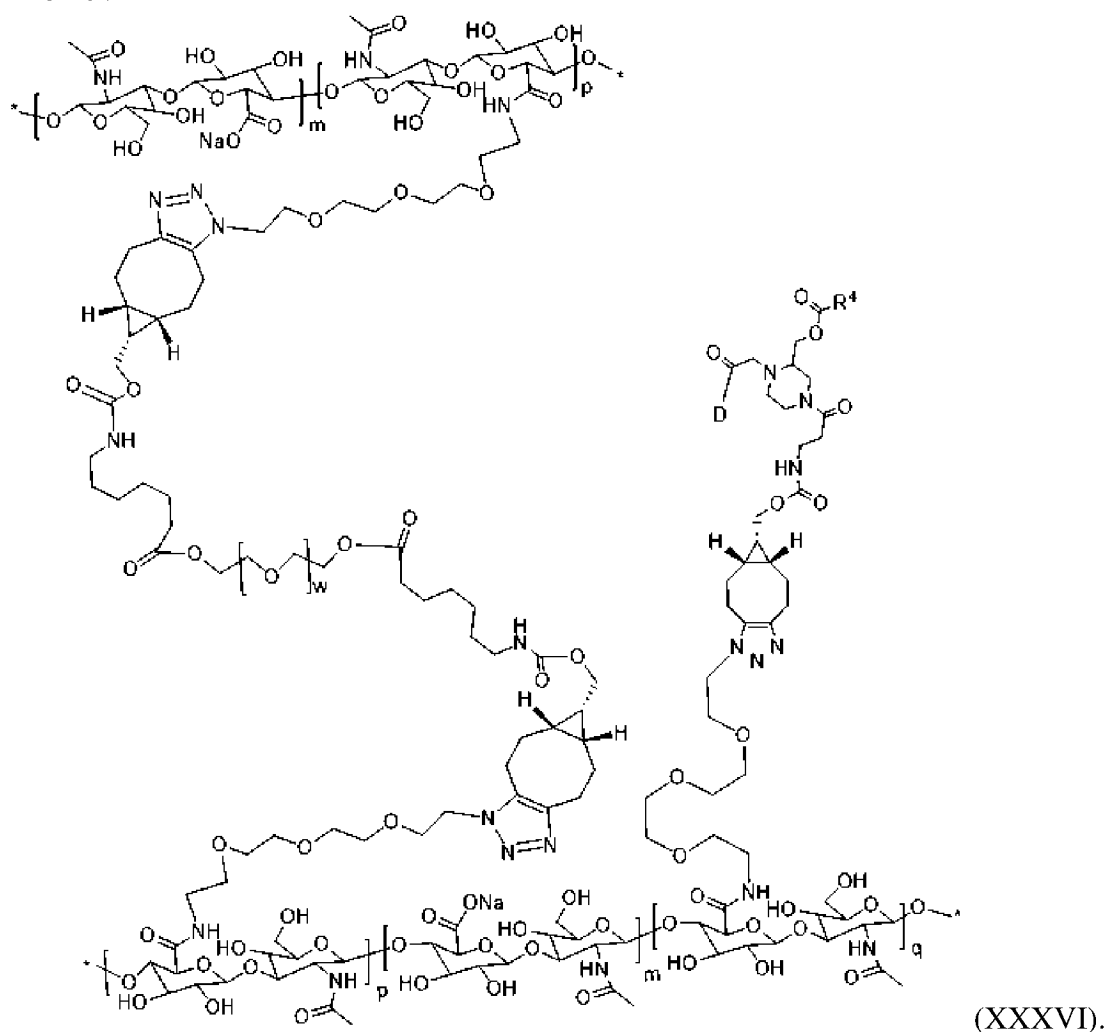


(XXXV),

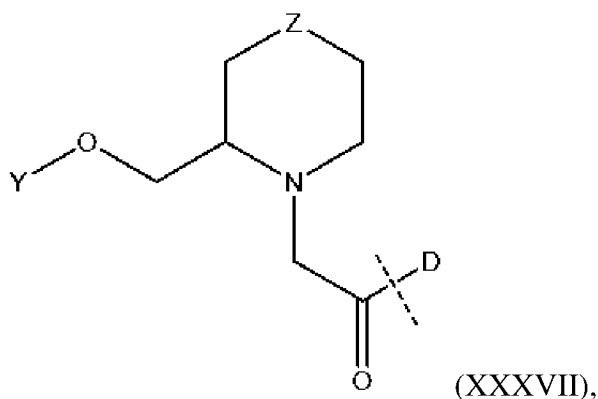
где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе; Y представляет собой C(O)R⁴; R⁴ представляет собой C₁-C₈алкил или C₃-C₇циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными

С₁-С₄алкильными группами, и где алкил необязательно замещен С₁-С₄алкокси; Z представляет собой N-L-A; L представляет собой C(O)CH₂CH₂NH; A представляет собой R¹¹; R¹¹ представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь N(H)(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит 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-сложный-эфир].

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXXVI), где лекарственное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R⁴ представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1-метилциклопропил или метоксиметил:

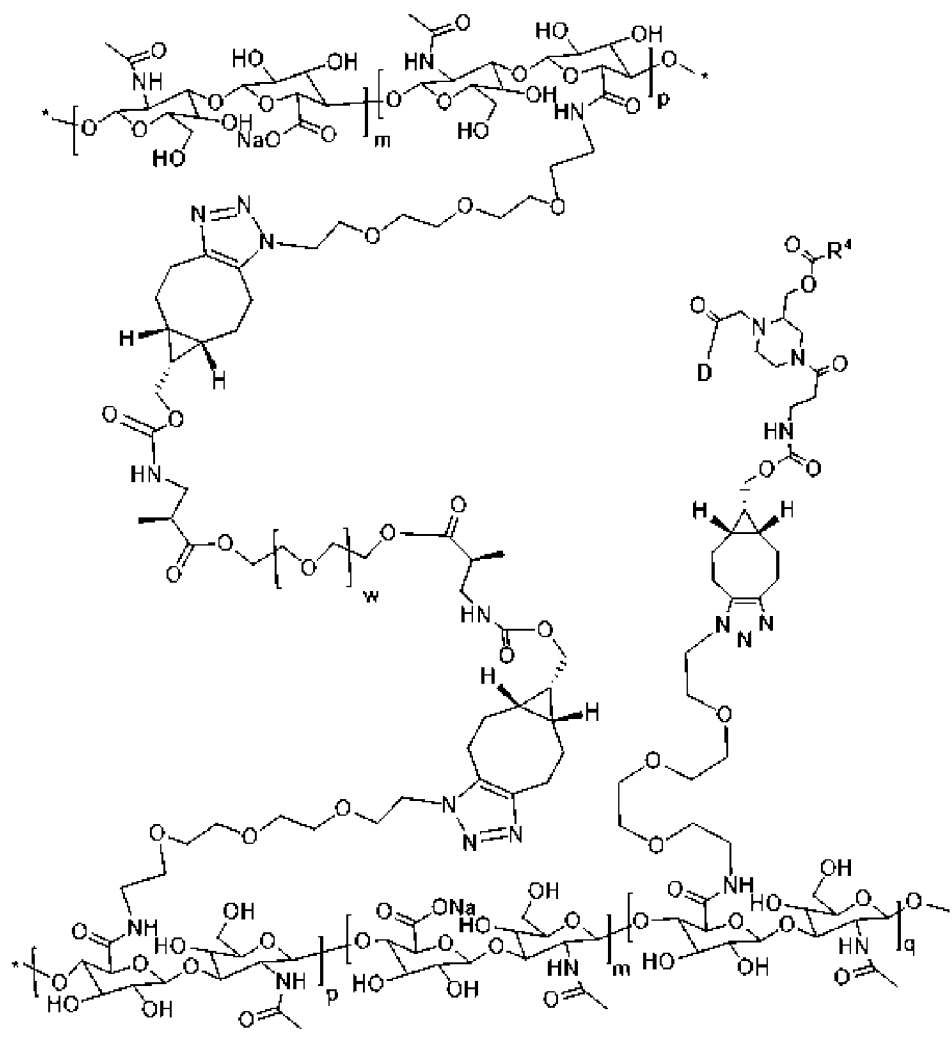


Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D-R, который представлен формулой XXXVII, где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминокислотную группу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



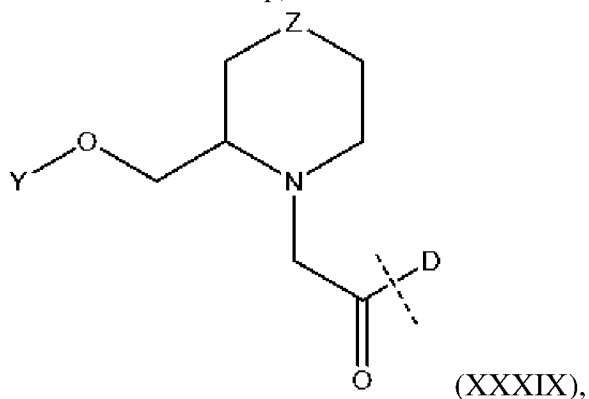
где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе; Y представляет собой C(O)R⁴; R⁴ представляет собой C₁-C₈алкил или C₃-C₇циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C₁-C₄алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C₁-C₄алкокси; Z представляет собой N-L-A; L представляет собой C(O)CH₂CH₂NH; A представляет собой R¹¹; R¹¹ представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь N(H)(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃, 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].

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, которая представлена формулой (XXXVIII), где лекарственное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R⁴ представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1-метилциклопропил или метоксиметил:



(XXXVIII).

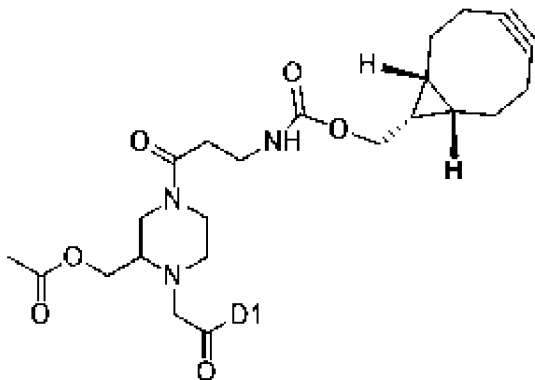
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемую соль, содержащую D-R, который представлен формулой (XXXIX), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



(XXXIX),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азатетраоарильном кольце; Y представляет собой C(O)R⁴; R⁴ представляет собой C₁-C₈алкил или C₃-C₇циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными

С₁-С₄алкильными группами, и где алкил необязательно замещен С₁-С₄алкокси; Z представляет собой N-L-A; L представляет собой C(O)CH₂CH₂NH; A представляет собой R¹¹; R¹¹ представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь N(H)(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃, 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 D1 (SEQ ID NO: 19), и R⁴ представляет собой -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₃ или метилциклопропил. В другом аспекте D представляет собой D1 (SEQ ID NO: 19), и R⁴ представляет собой -CH₃. В другом аспекте аддукт D-R содержит:



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 на протяжении всего описания 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. 3А показана иллюстративная реакция бесследного линкера с полимером гиалуроновой кислоты, функционализированным азидной группой.

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

На фиг. 4А (иллюстрирующей пример 8.1) показан пример высвобождения D1 (SEQ ID NO: 19) из конъюгата с гидрогелем *in vitro*.

На фиг. 4В показано высвобождение D1 (SEQ ID NO: 19) из конъюгата с гидрогелем C2-2 *in vitro*.

На фиг. 5 (иллюстрирующей пример 9) показано высвобождение D1 (SEQ ID NO: 19) из конъюгата с гидрогелем C2-2 *in vitro*, введенного крысам посредством внутрисуставной инъекции.

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, то это также называется алкиленом. Термин “низший алкил”, используемый в данном документе, в некоторых предпочтительных вариантах 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, сульфонида, мочевины, алкоксиациламино, аминацилокси, 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 такими же группами, которые приведены выше применительно к алкилу и низшему алкилу.

Используемый в данном документе термин “циклоалкинил” означает циклическую углеводородную кольцевую систему, содержащую 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, содержащую 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, цикlopентил, 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, тиadiaзол, тиadiaзолин, тиadiaзолидин, 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, amino, алкиламино, алкениламино, алкиниламино, галогеналкиламино, циклоалкиламино, циклоалкилалкиламино, ариламино, арилалкиламино, гетероциклоамино, гетероциклоалкиламино, дизамещенного amino, ациламино, ацилокси, сложного эфира, амида, сульфонида, мочевины, алкоксиамина, 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 $-S(O)_2NR_aR_b$, где 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 $-N(C(O))_2C_2H_2$, содержащие по меньшей мере одну двойную связь C-C.

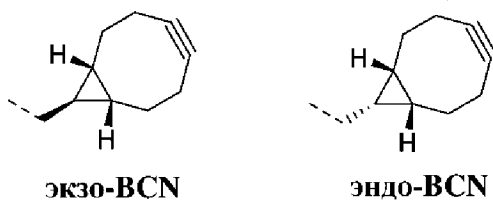
Используемый в данном документе термин “фуран” означает пятичленное ароматическое кольцо с четырьмя атомами углерода и одним атомом кислорода.

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 $-N_3$.

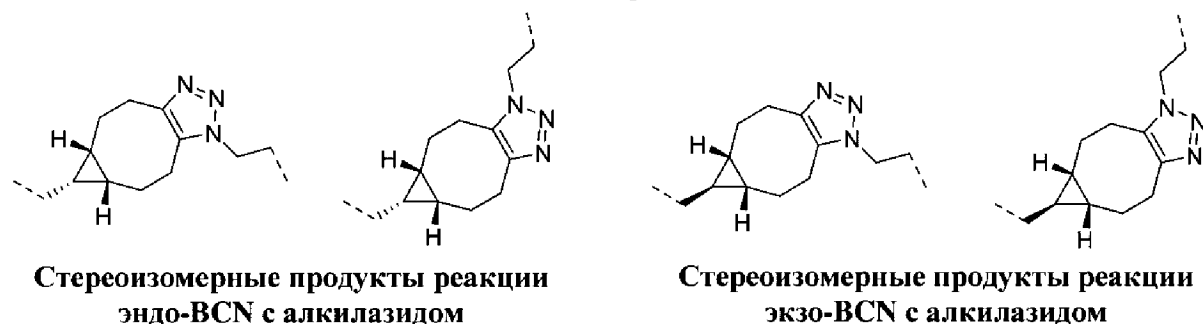
Используемый в данном документе термин “BCN” означает бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метильный радикал, в котором экзоциклический метилен может иметь экзо- или

эндоориентацию относительно бицикла, как показано:



Как используется в данном документе во всем 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 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:



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 2.

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, и ‘ N_i ’ представляет собой количество молекул, соответствующее данной молекулярной массе, и 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” или “D” 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 заболевания у людей или других животных или для иного улучшения физического или психического здоровья людей или животных.

В одном варианте осуществления биологически активный компонент D содержит ангиопозтин-подобные полипептиды 3 (ANGPTL3). “ANGPTL3” относится к представителю семейства белков ангиопозтина. Аминокислотная последовательность ANGPTL3 человека (номер доступа в GenBank NP_055310.1) приведена под SEQ ID NO: 1; а соответствующая ей полинуклеотидная последовательность приведена под SEQ ID NO: 2 (последовательность с идентификационным номером в NCBI NM014495.2, где кодирующая последовательность ANGPTL3 содержит нуклеотиды 52-1434 из SEQ ID NO: 2). См. таблицу 1. Для целей настоящего изобретения нумерация аминокислоты, как правило, определяется со ссылкой на последовательность полноразмерного полипептида ANGPTL3 дикого типа человека (SEQ ID NO: 1). Таким образом, в вариантах осуществления, в которых полипептид по настоящему изобретению содержит только С-концевую часть полноразмерного ANGPTL3 и не содержит N-концевой части, хотя длина пептида составляет менее 460 аминокислот, нумерация положений основана на SEQ ID NO: 1. Например, ссылка на положение 423 аминокислоты полипептида ANGPTL3 относится к положению 423 из SEQ ID NO: 1, несмотря на то, что длина самого полипептида ANGPTL3 по настоящему изобретению может составлять всего лишь 200 аминокислот. Определение аминокислоты в представляющей интерес последовательности, которая “соответствует” положению в эталонной последовательности, такой как SEQ ID NO: 1, осуществляют путем оптимального выравнивания последовательностей, например, применяя выравнивание с помощью CLUSTAL с параметрами по умолчанию или выравнивания с помощью BLAST 2 с параметрами по умолчанию, и сравнения последовательностей. Например, положение 423 в представляющей интерес последовательности, которое “определено со ссылкой на SEQ

ID NO: 1”, или аминокислота, которая “соответствует” положению 423 SEQ ID NO: 1, означает аминокислоту, которая выравнивается с положением 423 SEQ ID NO: 1 при оптимальном выравнивании представляющей интерес последовательности с SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления биологически активный компонент D содержит полипептид ANGPTL3 D1. Используемый в данном документе D1 относится к полипептиду ANGPTL3, имеющему последовательность под SEQ ID NO: 19.

Термины “пептидомиметик” и “миметик” означают синтетическое химическое соединение, которое имеет по сути такие же функциональные характеристики, что и встречающийся в природе или не встречающийся в природе полипептид (например, ANGPTL3), но отличающиеся (хотя, как правило, аналогичные) структурные характеристики. Аналоги пептидов обычно используются в данной области в качестве непептидных активных соединений (например, лекарственных средств) со свойствами, аналогичными свойствам матричного пептида. Такие непептидные соединения называются “пептидными миметиками” или “пептидомиметиками”. Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Пептидные миметики, которые структурно аналогичны терапевтически применимым пептидам, можно использовать для получения эквивалентного эффекта или усиленного терапевтического или профилактического эффекта. Обычно пептидомиметики структурно аналогичны парадигмальному полипептиду (т. е. полипептиду, который обладает биологической или фармакологической активностью), такому как обнаружен в представляющем интерес полипептиде, но имеют одну или несколько пептидных связей, необязательно замененных связью, выбранной из группы, состоящей из, например, -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (*цис* и *транс*), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-. Миметик может либо полностью состоять из синтетических неприродных аналогов аминокислот, либо представлять собой химерную молекулу частично из природных аминокислот пептида и частично неприродных аналогов аминокислот. Миметик также может включать любое количество консервативных замен природных аминокислот при условии, что такие замены также по сути не изменяют структуру и/или активность миметика. Например, композиция миметиков входит в объем полипептидов, описанных в данном документе, если она способна проявлять хондрогенную активность полипептида ANGPTL3.

Термины “полипептид”, “пептид” и “белок” используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Данные термины применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и к полимерам из не встречающихся в природе аминокислот. Полипептиды, пептиды и белки, описанные в данном документе, содержат протеазоустойчивые пептидомиметики ANGPTL3, обладающие хондрогенной

активностью.

Термин “аминокислота” относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также такие аминокислоты, которые были впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, т. е. имеют альфа-атом углерода, который связан с атомом водорода, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, например, к гомосерину, норлейцину, метионинсульфоксиду, метионинметилсульфонию. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, как и встречающаяся в природе аминокислота. Кодируемые природным кодом аминокислоты представляют собой 20 стандартных аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин), а также пирролизин, пирролинкарбоксилизин и селеноцистеин.

“Варианты с консервативными модификациями” относятся как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновой кислоты. Что касается конкретных последовательностей нуклеиновой кислоты, варианты с консервативными модификациями относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по сути идентичные аминокислотные последовательности, или же, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по сути идентичным последовательностям. Вследствие вырожденности генетического кода любой указанный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором кодом задан аланин, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты являются “молчащими вариантами”, которые представляют собой одну разновидность вариантов с консервативными модификациями. Каждая полипептидная последовательность в данном документе, которая кодируется полинуклеотидом, охватывает каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области техники будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, который кодирует полипептид, неявно определен в каждой

описанной последовательности.

Специалисту в данной области будет понятно, что отдельные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, при которых происходит изменение, добавление или удаление одной аминокислоты или небольшой процентной доли аминокислот относительно исходной кодируемой аминокислотной последовательности, приводят к “варианту с консервативными модификациями”, при этом такое изменение производит замену аминокислоты на химически аналогичную аминокислотную и/или полипептидную последовательность, за счет чего образуется структурно аналогичный белок, характеризующийся функциональной активностью, аналогичной исходному белку. Из уровня техники хорошо известны таблицы консервативных замен, в которых приведены функционально сходные аминокислоты. Такие варианты с консервативными модификациями дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели, как описано в данном документе.

Термин “консервативные аминокислотные замены” относится к (концептуальной или иной) замене аминокислоты из одной такой группы на другую аминокислоту из той же группы. Один пример замен основан на проведении анализа нормализованных частот аминокислотных изменений в соответствующих белках гомологичных организмов. По результатам таких анализов можно определить группы аминокислот, где аминокислоты внутри группы заменяются преимущественно друг на друга и, следовательно, больше всего похожи друг на друга по своему воздействию на общую структуру белка. См. Schulz and Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag. Один пример набора групп аминокислот, определенных таким образом, включает: (i) группу заряженных аминокислот, состоящую из Glu и Asp, Lys, Arg и His; (ii) группу положительно заряженных аминокислот, состоящую из Lys, Arg и His; (iii) группу отрицательно заряженных аминокислот, состоящую из Glu и Asp; (iv) группу ароматических аминокислот, состоящую из Phe, Tyr и Trp; (v) группу аминокислот с азотсодержащим кольцом, состоящую из His и Trp; (vi) группу крупных алифатических неполярных аминокислот, состоящую из Val, Leu и Ile; (vii) группу слабополярных аминокислот, состоящую из Met и Cys; (viii) группу аминокислот с небольшим аминокислотным остатком, состоящую из Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln и Pro; (ix) группу алифатических аминокислот, состоящую из Val, Leu, Ile, Met и Cys; и (x) группу небольших гидроксиаминокислот, состоящую из Ser и Thr. Другие примеры консервативных замен, основанных на общих физических свойствах, представляют собой замены в пределах следующих групп: (1) аланин (A), глицин (G); (2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); (3) аспарагин (N), глутамин (Q); (4) аргинин (R), лизин (K); (5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); (6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); (7) серин (S), треонин (T) и (8) цистеин (C), метионин (M). См. Creighton, *Proteins* (1984).

“Процентное значение идентичности последовательностей” определяется путем

сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом для оптимального выравнивания этих двух последовательностей часть аминокислотной последовательности или полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (например, полипептидом ANGPTL3), которая не содержит добавлений или делеций. Процентное значение рассчитывают путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях встречаются идентичные основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток, с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей.

Термины “идентичный” или “процентная идентичность” применительно к двум или больше нуклеиновым кислотам или полипептидным последовательностям относятся к двум или больше последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми последовательностями. Две последовательности являются “по существу идентичными”, если две последовательности имеют указанную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т. е. 95% идентичность, необязательно 96%, 97%, 98% или 99% идентичность в определенном участке или, если не указано, во всей последовательности), при сравнении и выравнивании для достижения максимального соответствия в окне сравнения или определенном участке, согласно измерению с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или с помощью выравнивания в ручном режиме и визуального осмотра. Полипептиды, которые являются по существу идентичными соответственно полипептидам, приведенным в качестве примера в данном документе (например, под любой из SEQ ID NO: 1, 3-45), а также варианты их применения, включают без ограничения применение для лечения или предупреждения артрита или поражения сустава. Необязательно, в случае нуклеиновых кислот, идентичность имеет место в области, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 150 нуклеотидов, или более предпочтительно в области, имеющей длину от 300 до 450 или 600 или больше нуклеотидов, или по всей длине эталонной последовательности. В случае аминокислотной последовательности, необязательно, идентичность имеет место в области, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 50 аминокислот, или более предпочтительно в области, имеющей длину от 100 до 150 или 200 или больше аминокислот, или по всей длине эталонной последовательности.

При сравнении последовательностей в типичном случае одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При применении алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости устанавливают координаты подпоследовательностей, и устанавливают программные параметры алгоритма для анализа последовательностей. Можно использовать

программные параметры по умолчанию или можно устанавливать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает значения процентной идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью, исходя из программных параметров.

“Окно сравнения”, как используется в данном документе, включает ссылку на сегмент из любого количества смежных положений, выбранного из группы, состоящей из от 50 до 600, обычно от приблизительно 75 до приблизительно 200, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью с таким же количеством смежных положений после того, как две последовательности были подвергнуты оптимальному выравниванию. Способы выравнивания последовательностей для целей сравнения хорошо известны из уровня техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита-Уотермана (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, с помощью алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана-Вунша (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, с помощью способа поиска сходства Пирсона-Липмана (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA) или с помощью выравнивания в ручном режиме и визуального осмотра. См., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995).

Двумя примерами алгоритмов, которые являются подходящими для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны соответственно в Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным от Национального центра биотехнологической информации. На первой стадии данный алгоритм предусматривает идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) за счет идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому пороговому баллу T с положительным значением при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T называется пороговым баллом соседнего слова (Altschul et al., выше). Эти первоначальные совпадения соседних слов выступают в качестве “затравок” для начала поисков, предназначенных для нахождения более длинных HSP, которые их содержат. Совпадения слов продлеваются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться суммарный балл выравнивания. В случае нуклеотидных последовательностей суммарные баллы рассчитывают с использованием параметров M (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда < 0). В случае аминокислотных последовательностей для подсчета суммарного балла используют матрицу замен. Продление совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда суммарный балл выравнивания уменьшается

на величину X относительно своего максимального достигнутого значения; суммарный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными баллами; или достигается конец любой из последовательностей. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве параметров по умолчанию используются длина слова (W), составляющая 11, значение ожидания (E), составляющее 10, $M=5$, $N = -4$ и сравнение обеих нитей. В случае аминокислотных последовательностей в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию используются длина слова, составляющая 3, и значение ожидания (E), составляющее 10, а также матрица замен BLOSUM62. См. Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989), число выравниваний (B) составляет 50, значение ожидания (E) составляет 10, $M=5$, $N = -4$ и производится сравнение обеих нитей.

Алгоритм BLAST также осуществляет статистический анализ сходства между двумя последовательностями. См. Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993). Одной мерой сходства, предусмотренной в алгоритме BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями возникло случайно. Например, нуклеиновая кислота считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,2, более предпочтительно менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001.

Термин “выделенный” применительно к нуклеиновой кислоте или белку означает, что нуклеиновая кислота или белок являются очищенными до такой степени, что они по сути не содержат других клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии. Зачастую они находятся в гомогенном или почти гомогенном состоянии. Они могут находиться в сухом состоянии, либо в водном растворе. Чистоту и однородность можно определить с помощью методик аналитической химии, которые известны и обычно применяются в данной области техники, например, с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, высокопроизводительной жидкостной хроматографии и т. д. Белок, который является преобладающим видом молекул, присутствующих в препарате, является по существу очищенным. Термин “очищенный” в некоторых аспектах означает, что белок дает по сути одну полосу в электрофоретическом геле. Как правило, это означает, что белок является на по меньшей мере 85% чистым, более предпочтительно на по меньшей мере 95% чистым и наиболее предпочтительно на по меньшей мере 99% чистым.

Используемый в данном документе полипептид ANGPTL3 может быть природным или рекомбинантным и полученным из любых видов; пептид ANGPTL3 также может быть синтетическим. В одном аспекте полипептид ANGPTL3 содержит последовательность

Homo sapiens ANGPTL3, ее мутант, ее делецию или ее усеченный вариант. Особенно применимыми являются полипептиды ANGPTL3, содержащие мутанты или делеции аминокислоты K423, с использованием нумерации для полноразмерной последовательности ANGPTL3 дикого типа человека (SEQ ID NO: 1). В другом аспекте полипептид ANGPTL3 описан в патентах США №№ 9301971; 9649359; 9745358; 9868771 или европейском патенте № EP2964250, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки для конкретных идей, относящихся к полипептидам ANGPTL3 и их последовательностям. В другом аспекте полипептид ANGPTL3 представляет собой протеазоустойчивый полипептид. В одном аспекте полипептид ANGPTL3 представляет собой протеазоустойчивый полипептид, который имеет аминокислотную замену по сравнению с нативной пептидной последовательностью дикого типа по остатку R или K.

В другом аспекте полипептид ANGPTL3 представляет собой D1 (SEQ ID NO: 19), который содержит усеченный вариант ANGPTL3 человека (например, аминокислоты 242-460) с мутацией K423Q, с использованием нумерации для полноразмерной последовательности ANGPTL3 дикого типа человека (SEQ ID NO: 1). В другом аспекте полипептид ANGPTL3 содержит любую из SEQ ID NO: 1 или 3-45, показанных в таблице 1. В другом аспекте полипептид ANGPTL3 содержит полипептид, кодируемый последовательностью ДНК под SEQ ID NO: 2 или последовательностью, содержащей ее мутации и делеции. В одном аспекте полипептид ANGPTL3 содержит последовательность, характеризующуюся 80-99% идентичностью с SEQ ID NO: 1 или 3-45, включая все целые числа в указанном диапазоне. В другом аспекте полипептид ANGPTL3 содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 96% идентичностью, по меньшей мере 97% идентичностью, по меньшей мере 98% идентичностью или по меньшей мере 99% идентичностью с любой последовательностью, показанной в таблице 1, где полипептид содержит аминокислоту, которая представляет собой полярную аминокислоту, отличную от K или R, в положении 423, как определено со ссылкой на SEQ ID NO: 1. В одном аспекте полипептиды ANGPTL3 обладают хондрогенной активностью. В другом аспекте полипептид ANGPTL3 содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 96% идентичностью, по меньшей мере 97% идентичностью, по меньшей мере 98% идентичностью или по меньшей мере 99% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте полипептид ANGPTL3 содержит полипептид, кодируемый последовательностью ДНК, характеризующейся 90-100% идентичностью с кодирующей частью SEQ ID NO: 2 (например, нуклеотидами 52-1434), включая последовательности ДНК, кодирующие мутации, усечения или делеции.

Таблица 1. Последовательности ANGPTL3

SEQ ID NO:	Описание
1	Ангиопоэтин-подобный полипептид 3 (ANGPTL3) <i>Homo sapiens</i>

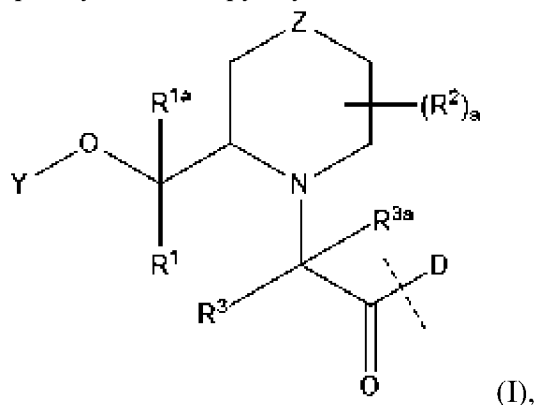
2	Последовательность ДНК ANGPTL3
3	ANGPTL3 K423Q
4	ANGPTL3 K423S
5	ANGPTL3 207-460 K423Q
6	ANGPTL3 207-460 K423S
7	ANGPTL3 225-460 K423Q
8	ANGPTL3 225-460 K423S
9	ANGPTL3 225-460 S424T
10	ANGPTL3 226-460 K423Q
11	ANGPTL3 226-460 K423S
12	ANGPTL3 228-460 K423Q
13	ANGPTL3 228-460 K423S
14	ANGPTL3 228-460 S424T
15	ANGPTL3 233-460 K423Q
16	ANGPTL3 233-460 K423S
17	ANGPTL3 241-460 K423Q
18	ANGPTL3 241-460 K423S
19	ANGPTL3 242-460 K423Q
20	ANGPTL3 242-460 K423S
21	ANGPTL3 225-455 K423Q
22	ANGPTL3 225-455 K423S
23	ANGPTL3 226-455 K423Q
24	ANGPTL3 226-455 K423S
25	ANGPTL3 228-455 K423Q
26	ANGPTL3 228-455 K423S
27	ANGPTL3 233-455 K423Q
28	ANGPTL3 233-455 K423S
29	ANGPTL3 241-455 K423Q
30	ANGPTL3 241-455 K423S
31	ANGPTL3 242-455 K423Q
32	ANGPTL3 242-455 K423S
33	ANGPTL3 201-460 K423del
34	ANGPTL3 225-460 K423del
35	ANGPTL3 226-460 K423del

36	ANGPTL3 228-460 K423del
37	ANGPTL3 233-460 K423del
38	ANGPTL3 241-460 K423del
39	ANGPTL3 242-460 K423del
40	ANGPTL3 225-455 K423del
41	ANGPTL3 226-455 K423del
42	ANGPTL3 228-455 K423del
43	ANGPTL3 233-455 K423del
44	ANGPTL3 241-455 K423del
45	ANGPTL3 242-455 K423del

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. В некоторых аспектах биологически активный компонент содержит полипептид ANGPTL3, как описано в данном документе.

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:



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_4 алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или

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

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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;

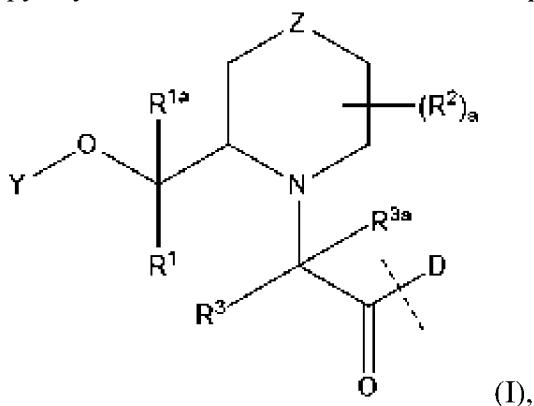
A представляет собой водород, C_1 - C_8 алкил, $C(O)C_1-C_8$ алкил, $C(O)N(H)C_1-C_8$ алкил, $C(O)OC_1-C_8$ алкил, R^{10} или R^{11} , где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10} ;

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:



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_4 алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или

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

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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(C₁-C₄алкил), C(O)NH, C(O)N(C₁-C₄алкил), N(H)C(O), N(C₁-C₄алкил)C(O), N(H)C(O)O, N(C₁-C₄алкил)C(O)O, OC(O)N(H), OC(O)N(C₁-C₄алкил), N(H)C(O)N(H), N(C₁-C₄алкил)C(O)N(H), N(H)C(O)N(C₁-C₄алкил), N(C₁-C₄алкил)C(O)N(C₁-C₄алкил), C(O)O, OC(O), OC(O)O, S, S(O)₂, N(H)S(O)₂, N(C₁-C₄алкил)S(O)₂, S(O)₂N(H), S(O)₂N(C₁-C₄алкил), C₁-C₂алкил-C(O)N(H), N(H)C(O)C₁-C₂алкила, C₁-C₂алкил-C(O)O, OC(O)C₁-C₂алкила, 1,2,3-триазола, OP(O)₂, P(O)₂O, C₁-C₄алкил-P(O)₂-O или O-P(O)₂-C₁-4алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенного C₁-C₂₀алкила, C₂-C₂₀алкенила, C₂-C₂₀алкинила, [W-O]_g, C₁-C₈алкил-[O-W]_g, [O-W]_g-O-C₁-C₈алкила, C₁-C₈алкил-[O-W]_g-O-C₁-C₈алкила, олигопептида;

h представляет собой целое число от 1 до 20;

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

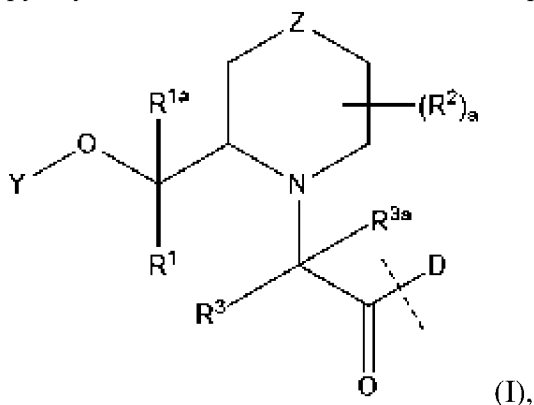
W представляет собой C₂-C₄алкил-1,2-диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

A представляет собой водород, C₁-C₈алкил, C(O)C₁-C₈алкил, C(O)OC₁-C₈алкил, C(O)N(H)C₁-C₈алкил, R¹⁰ или R¹¹, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R¹⁰;

R¹⁰ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R¹¹ 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:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной

аминогруппе, вторичной аминогруппе или атому азота кольца в азаетероарильном кольце;

R^1 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или

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

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкила, $C(O)C_1$ - C_8 алкила 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_4 алкил-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(C₁-C₄алкил);

A представляет собой водород, C₁-C₈алкил, C(O)C₁-C₈алкил, C(O)N(H)C₁-C₈алкил, C(O)OC₁-C₈алкил, R¹⁰ или R¹¹, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R¹⁰;

R¹⁰ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R¹¹ 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”.

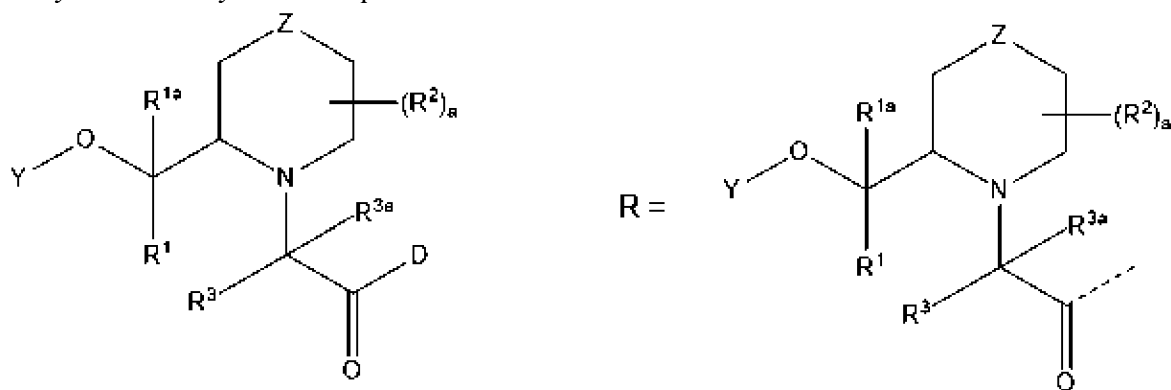
Используемый в данном документе термин “носитель” означает растворимый полимер, биополимер или сшитый полимер или биополимер. Носители включают в себя белки, нуклеиновые кислоты, углеводы или полиэтиленгликоли. В одном аспекте носитель или несколько носителей сшиты межмолекулярными связями, внутримолекулярными связями или их комбинациями. В одном аспекте сшитый носитель содержит гидрогель. Что касается конкретно бесследного линкера R, носитель содержит R¹¹. 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, которая может иметь синтетическое или биологическое происхождение или комбинацию того и другого. Как правило, полимер имеет среднюю молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 1 кДа. Соплимер 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 азатетраарильном кольце, способных образовывать амидную связь с линкером R (т. е. является белком или полипептидом). Для удобства аддукты, в которых положение образования амидной связи точно не известно, изображены в данном документе следующим образом:



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 попеременно вдоль молекулы линкера.

Используемый в данном документе термин “система доставки лекарственных средств” включает носитель, связанный с аддуктом лекарственного средства, $D-R^{11}$, 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 другой полипептид ANGPTL3, как описано в данном документе, 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, которые проявляют 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 amino-и/или карбоксильных групп или групп, сходных с ними.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты могут быть образованы неорганическими кислотами 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, октадеcanoатные, 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, диэтанолламин, 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 проведения реакции этих соединений в форме свободной кислоты со стехиометрическим количеством подходящего основания (такого как гидроксиды, карбонаты, бикарбонаты натрия, калия, кальция или магния или т. п.) или путем проведения 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, вспомогательные

вещества, 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” относится к животному. Как правило, животное является млекопитающим. Субъект также относится, например, к приматам (например, людям и приматам, отличным от человека), коровам, овцам, козам, лошадям, собакам, кошкам, кроликам, крысам, мышам, рыбам, птицам 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 снижение или подавление данного состояния, симптома, или нарушения, или заболевания, или значительное уменьшение исходной активности в отношении 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” означают 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” означают модулирование заболевания или нарушения либо физическим путем (например, при стабилизации ощутимого симптома), либо физиологическим путем (например, при стабилизации физического параметра) или и то, и другое. В еще одном варианте осуществления “лечить”, “осуществление лечения” или “лечение” означают 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).

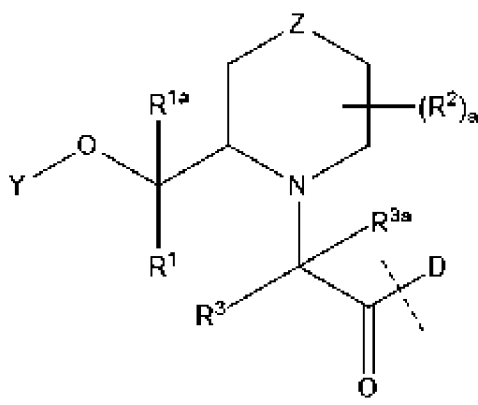
Как используется в данном документе, субъект “нуждается в” или является “нуждающимся в” лечении, если такое лечение принесет пользу такому субъекту с биологической, медицинской точки зрения или с точки зрения качества его жизни.

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 $\pm 10\%$ 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 D, содержащего полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминокгруппу 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_4 алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или

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

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

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

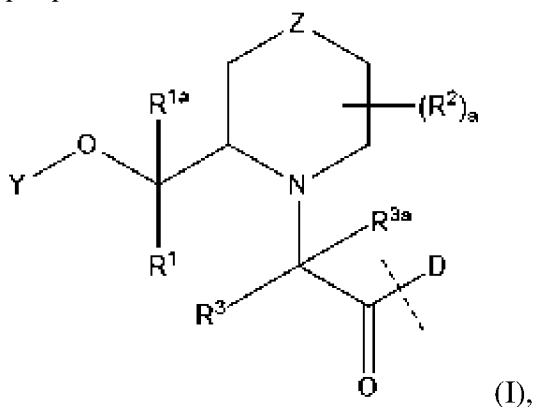
L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

A представляет собой водород, C₁-C₈алкил, C(O)C₁-C₈алкил, C(O)N(H)C₁-C₈алкил, C(O)OC₁-C₈алкил, R¹⁰ или R¹¹, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R¹⁰;

R¹⁰ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R¹¹ 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 D, содержащего полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце:



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

R¹ представляет собой водород или C₁-C₄алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C₁-C₄алкил, или CR¹R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C₃-C₆циклоалк-1,1-диил;

R² в каждом случае независимо выбран из C₁-C₄алкила или оксо, или две группы R², взятые в комбинации, образуют конденсированную C₃-C₆циклоалкильную или спиро-C₃-C₆циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R³ представляет собой водород или C₁-C₄алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C₁-C₄алкил, или CR³R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C₃-C₆циклоалк-1,1-диил;

Y представляет собой C(O)R⁴, C(O)OR⁴, C(O)NHR⁴, C(O)NR⁵R⁶, SiR⁵R⁶R⁷ или CR¹²R^{12a}OR¹³;

R¹² представляет собой водород или C₁-C₄алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C₁-C₄алкил, или CR¹²R^{12a}, взятые в комбинации, образуют C₃-C₆циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или
 $CHR^{12}OR^{13}$, взятые в комбинации, образуют 5-, 6- или 7-членный циклический простой эфир;

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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 алкил), C(O)NH, C(O)N(C_1 - C_4 алкил), 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 алкил), 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 алкил), N(C_1 - C_4 алкил)C(O)N(C_1 - C_4 алкил), 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 алкил), 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 - C_4 алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенного 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;

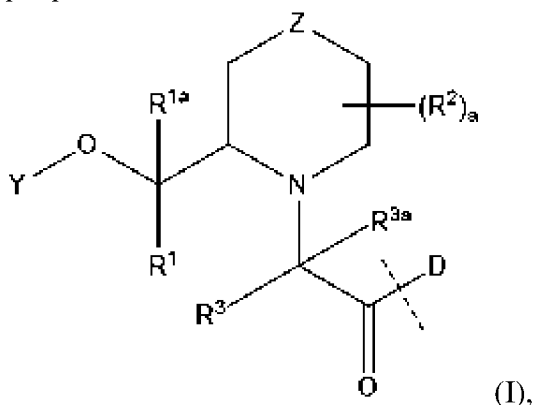
A представляет собой водород, C_1 - C_8 алкил, C(O) C_1 - C_8 алкил, C(O)OC C_1 - C_8 алкил, C(O)N(H) C_1 - C_8 алкил, R^{10} или R^{11} , где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10} ;

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 D, содержащего полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную или вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азагетероарильном кольце:



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_4 алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или

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

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где

гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C₁-C₄алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой CHR⁸ или NR⁹;

каждый из R⁸ и R⁹ независимо выбран из водорода, C₁-C₈алкила, C(O)C₁-C₈алкила или -C(O)(CH₂)_q[O-W]_g(NHC(O))_m(CH₂)_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 C₂-C₄алкил-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(C₁-C₄алкил);

A представляет собой водород, C₁-C₈алкил, C(O)C₁-C₈алкил, C(O)N(H)C₁-C₈алкил, C(O)OC₁-C₈алкил, R¹⁰ или R¹¹, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R¹⁰;

R¹⁰ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы I с носителем; и

R¹¹ представляет собой носитель.

В некоторых аспектах R¹-R⁸ в формуле (I) имеют следующие значения. В одном аспекте R¹ представляет собой водород или метил. В другом аспекте R^{1a} представляет собой водород или метил. В другом аспекте R¹ и R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C₃-C₆циклоалк-1,1-диил. В другом аспекте R² представляет собой метил. В другом аспекте две группы R², взятые в комбинации, образуют конденсированную или спиро-C₃-C₆циклоалкильную группу. В другом аспекте R³ представляет собой водород или метил. В другом аспекте R^{3a} представляет собой водород или метил. В другом аспекте R³ и R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C₃-C₆циклоалк-1,1-диил. В другом аспекте Y представляет собой C(O)R⁴, и R⁴ представляет собой C₁-C₆алкил, C₁-C₂алкокси, C₁-C₂алкил или C₁-C₆алкокси. В другом аспекте R⁴ представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1-метилциклопропил или метоксиметил. В другом аспекте Y представляет собой SiR⁵R⁶OR⁷; и каждый из R⁵ и R⁶ представляет собой метил, этил, пропил или изопропил; и R⁷ представляет собой этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил, этоксиэтил, этоксиизопропил, тетрагидропиранил или -(OCHR³CH₂)_bO-C₁-C₄алкил, где b равняется 2, 3 или 4.

В некоторых аспектах R⁸ и R⁹ в формуле (I) имеют следующие значения. В одном аспекте R⁹ представляет собой C(O)C₂карбамоил. В другом аспекте R⁹ представляет собой C(O)C₂амидил. В другом аспекте R⁹ представляет собой C(O)C₅алкил. В другом аспекте R⁹ представляет собой C(O)C₂алкил. В другом аспекте R⁹ 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_1 алкиламидил. В другом аспекте R^9 представляет собой C_2 алкиламидил.

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_8 алкил, $C(O)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)N(H)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)OC_1$ - C_8 алкил, 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 алкил), $C(O)NH$, $C(O)N(C_1$ - C_4 алкил), $N(H)C(O)$, $N(C_1$ - 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 алкил), $N(H)C(O)N(H)$, $N(C_1$ - C_4 алкил) $C(O)N(H)$, $N(H)C(O)N(C_1$ - C_4 алкил), $N(C_1$ - C_4 алкил) $C(O)N(C_1$ - C_4 алкил), $C(O)O$, $OC(O)$, $OC(O)O$, 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 алкил), 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 -4алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенного 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_8 алкил, $C(O)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)OC_1$ - C_8 алкил, $C(O)N(H)C_1$ - C_8 алкил, 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

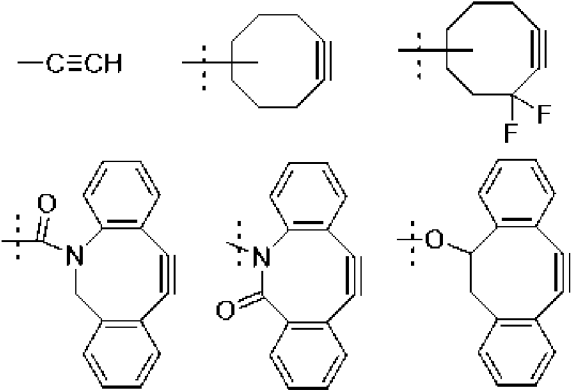
R^{11} представляет собой носитель.

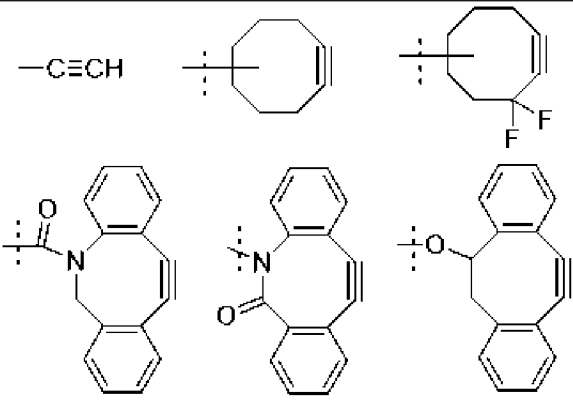
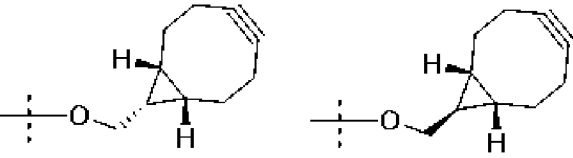
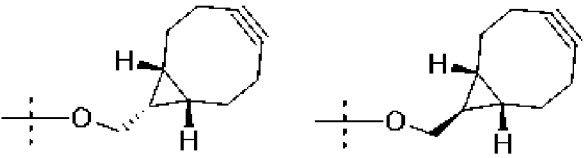
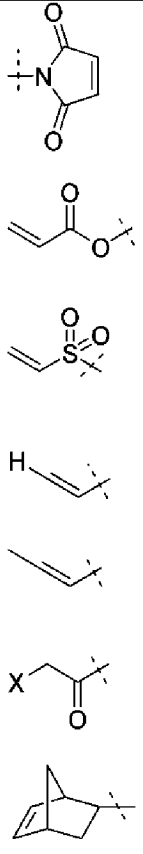
В некоторых аспектах g и h равняются от 1 до приблизительно 25 или от 1 до приблизительно 10.

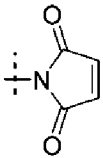
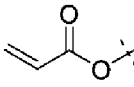
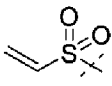
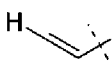
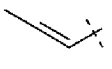
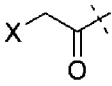
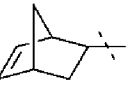
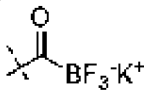
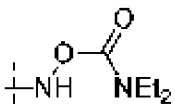
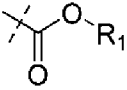
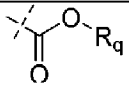
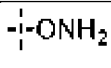
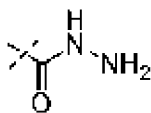
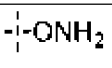
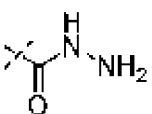
В некоторых аспектах Z в формуле (I) представляет собой NR^9 . В одном аспекте R^9 дополнительно замещен R^{10} . В другом аспекте R^9 дополнительно замещен R^{11} .

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 2. В указанной строке в таблице 2 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 азида, 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_8 алкенила, замещенного или незамещенного C_1 - C_8 алкокси, тиола, C_1 - C_8 карбоксила, C_1 - C_8 карбонила, 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.

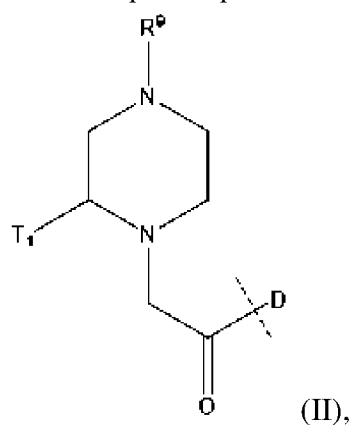
Таблица 2. Иллюстративные ортогональные химические реакции

Соединение (или полимер) 1-X X:	Соединение (или полимер) 2-Y Y:
	

	
	
	
	 $X = \text{галоген}$

       X = галоген	
	
	 R ₁ = H или активированный сложный эфир
 R _q = H или активированный сложный эфир	
 	 
 	 

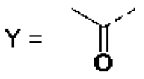
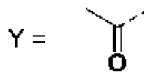
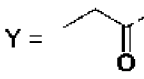
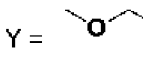
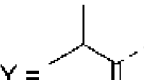
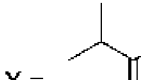
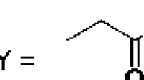
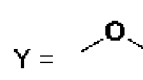
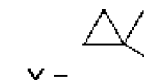
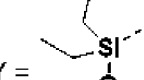
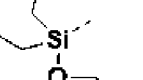
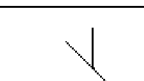
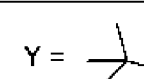
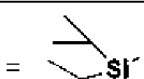
В некоторых вариантах осуществления бесследный линкер R имеет формулу (II):



где как R^9 , так и D определены в формуле (I) выше, а T_1 содержит замещенный или

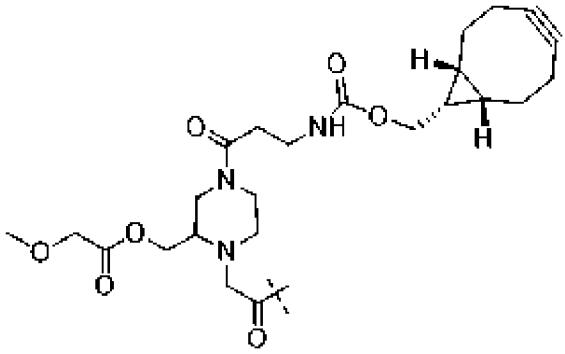
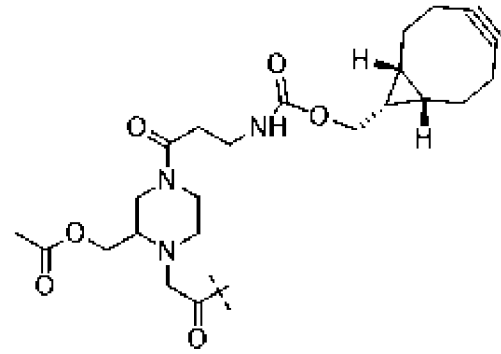
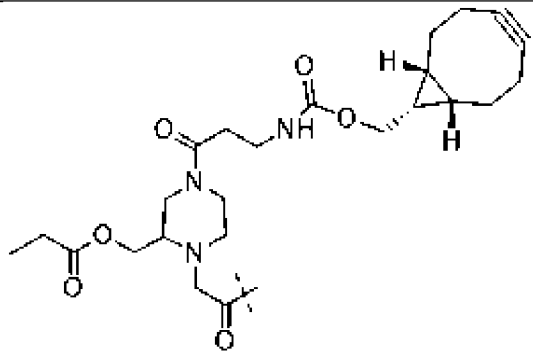
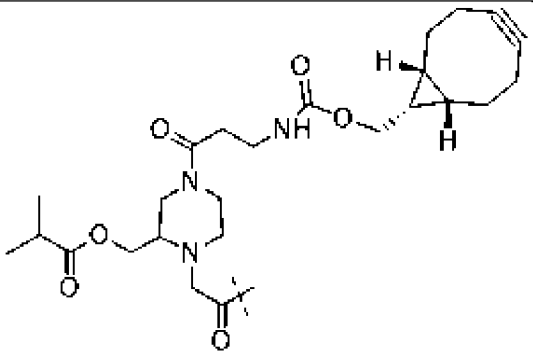
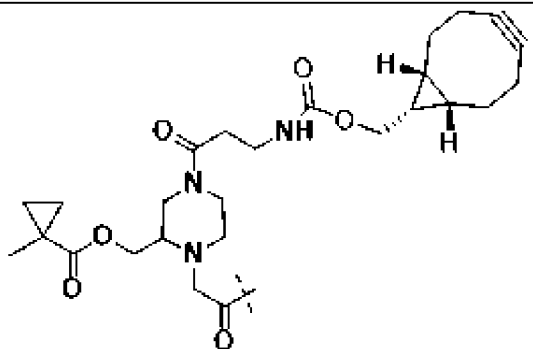
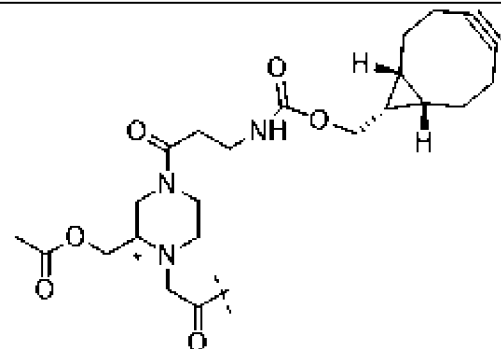
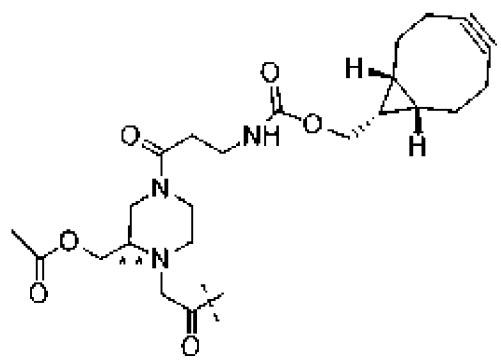
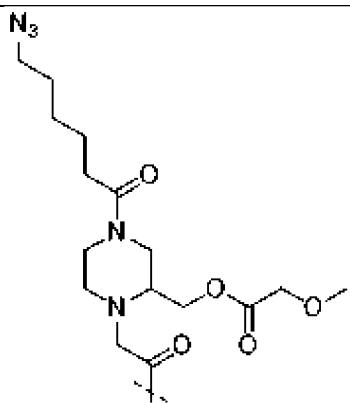
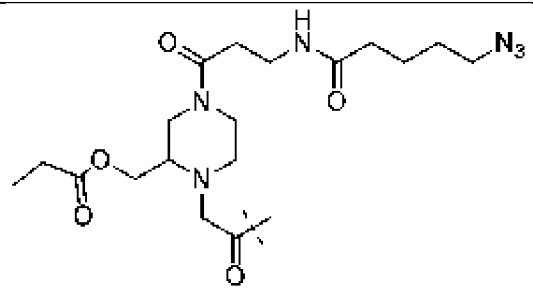
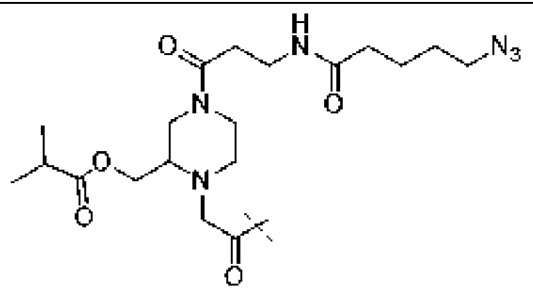
незамещенный C₂-C₁₀сложный эфир, замещенный или незамещенный C₃-C₁₀силиловый простой эфир, содержащие один или несколько гетероатомов, выбранных из атомов азота или кислорода.

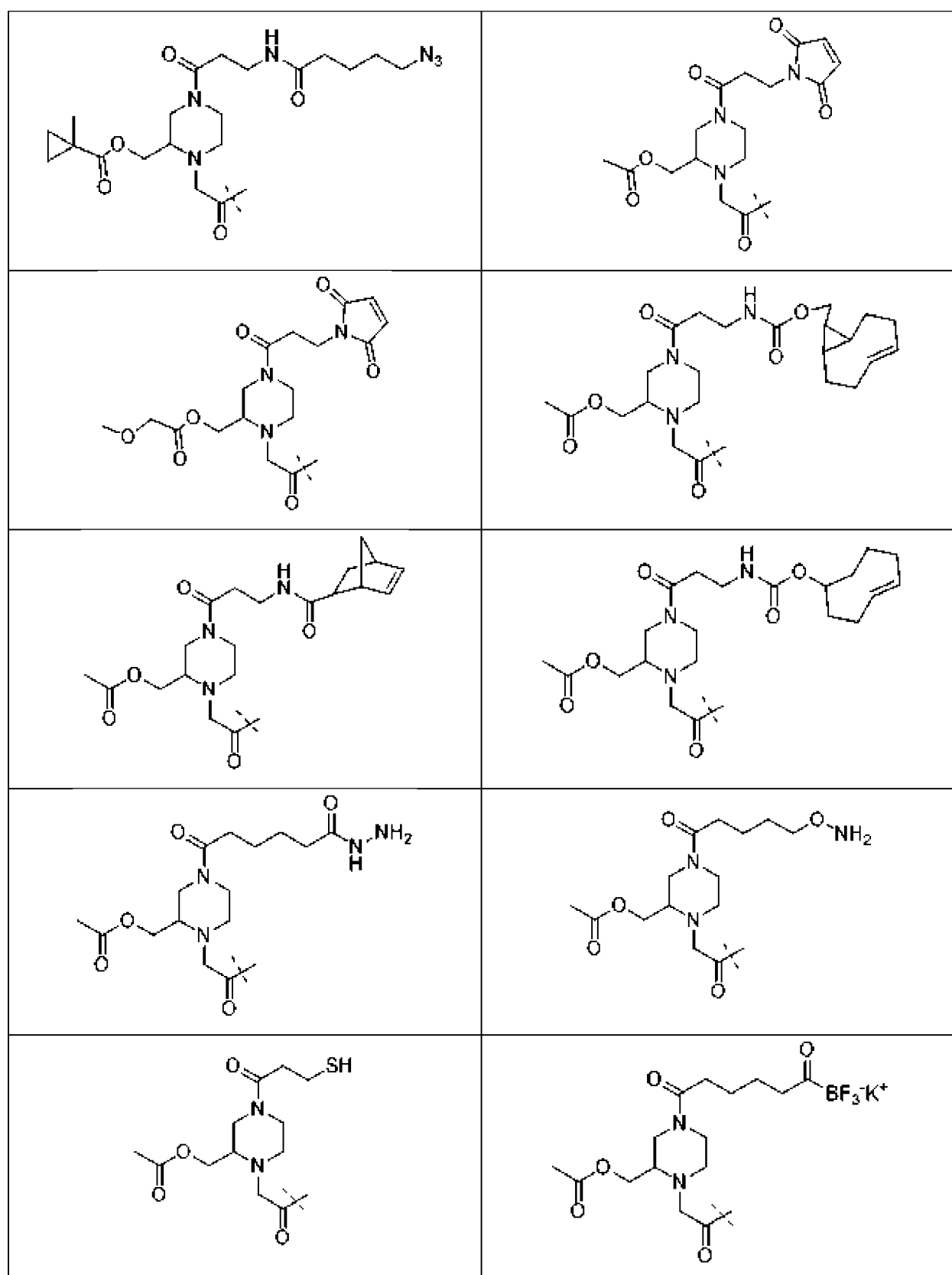
В некоторых аспектах T₁ представляет собой -CR¹R^{1A}OY, который содержит инициаторный компонент и содержит одну из следующих структур из таблицы 3.

Таблица 3. Инициаторные компоненты			
 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = H; R^{1A} = CH_3$	 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$
 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = H; R^{1A} = CH_3$	 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$
 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$
 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$
 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$	 $R^1 = R^{1A} = H$	-

В некоторых вариантах осуществления бесследный линкер R формулы I, либо формулы II содержит любую из следующих структур из таблицы 4.

Таблица 4. Иллюстративные бесследные линкеры	
--	--



В другом варианте осуществления бесследный линкер R формулы (I) или формулы (II) конъюгирован с лекарственным средством или биологически активным компонентом. В одном аспекте бесследный линкер R формулы (I) или формулы (II) конъюгирован с полипептидом ANGPTL3. В другом аспекте полипептид ANGPTL3 содержит SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте полипептид ANGPTL3 содержит D1 (SEQ ID NO: 19).

Синтез бесследного линкера R

Другой вариант осуществления представляет собой способ получения бесследного линкера R формулы (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 азатетраарильном 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 азатетраарильном 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 формулы (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.

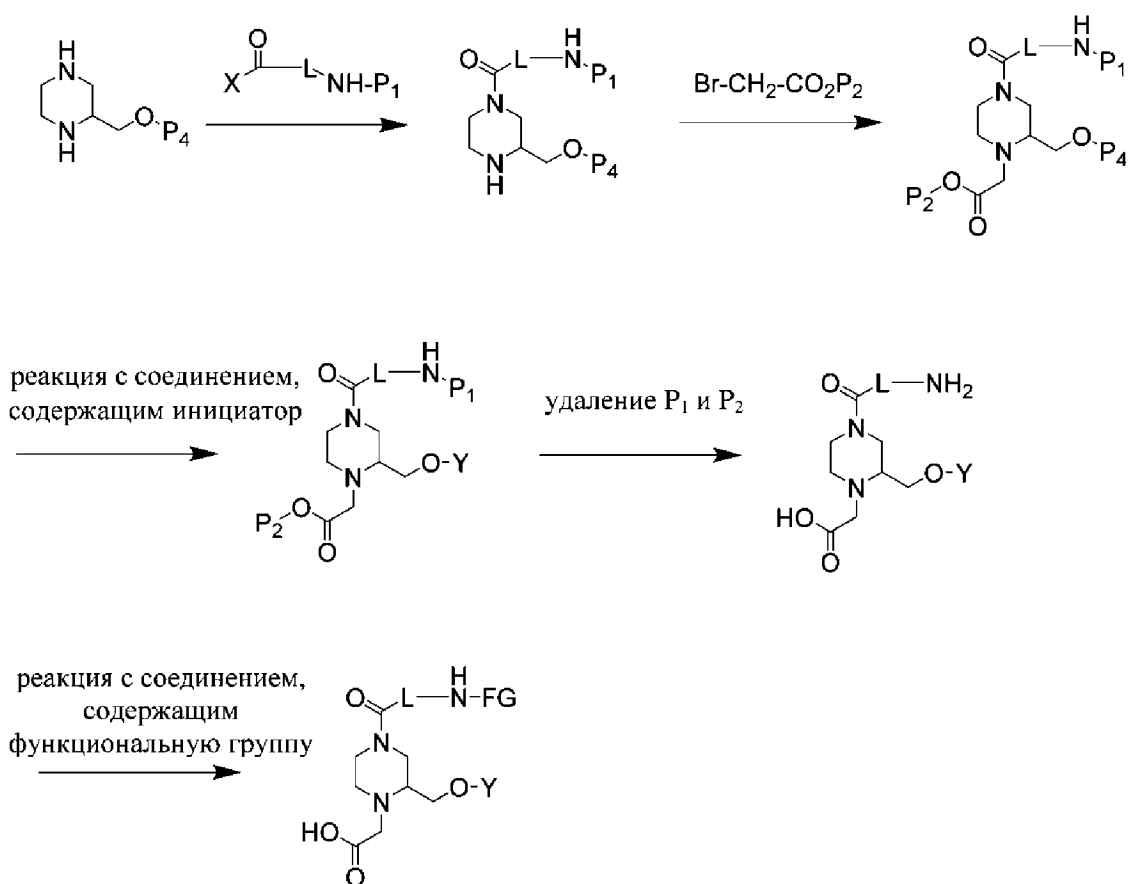
Другой вариант осуществления представляет собой способ получения бесследного линкера R формулы (I), включающий любую из стадий: (A) введения функционализированного линкера в положение C4 пиридинового соединения, содержащего нуклеофильную группу в положении C2, посредством реакции кросс-сочетания или 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 А 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)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридин-3-оксида (HATU);

R^{2a} представляет собой C₁-C₈алкил или арил;

P₄ представляет собой подходящую защитную группу или H;

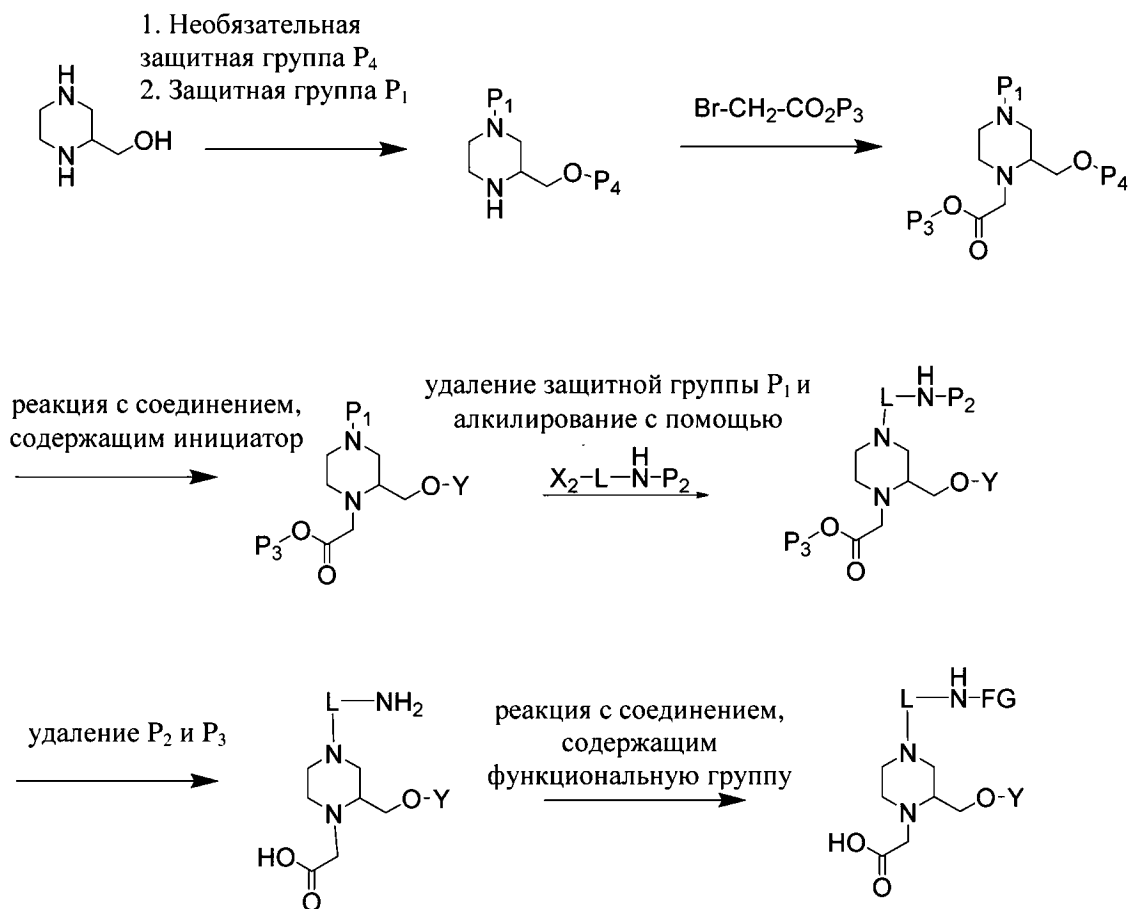
L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

P₁ и P₂ представляют собой защитные группы, которые могут быть идентичными;

Y представляет собой подходящий инициатор, приведенный в таблице 3; и

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

Схема 2

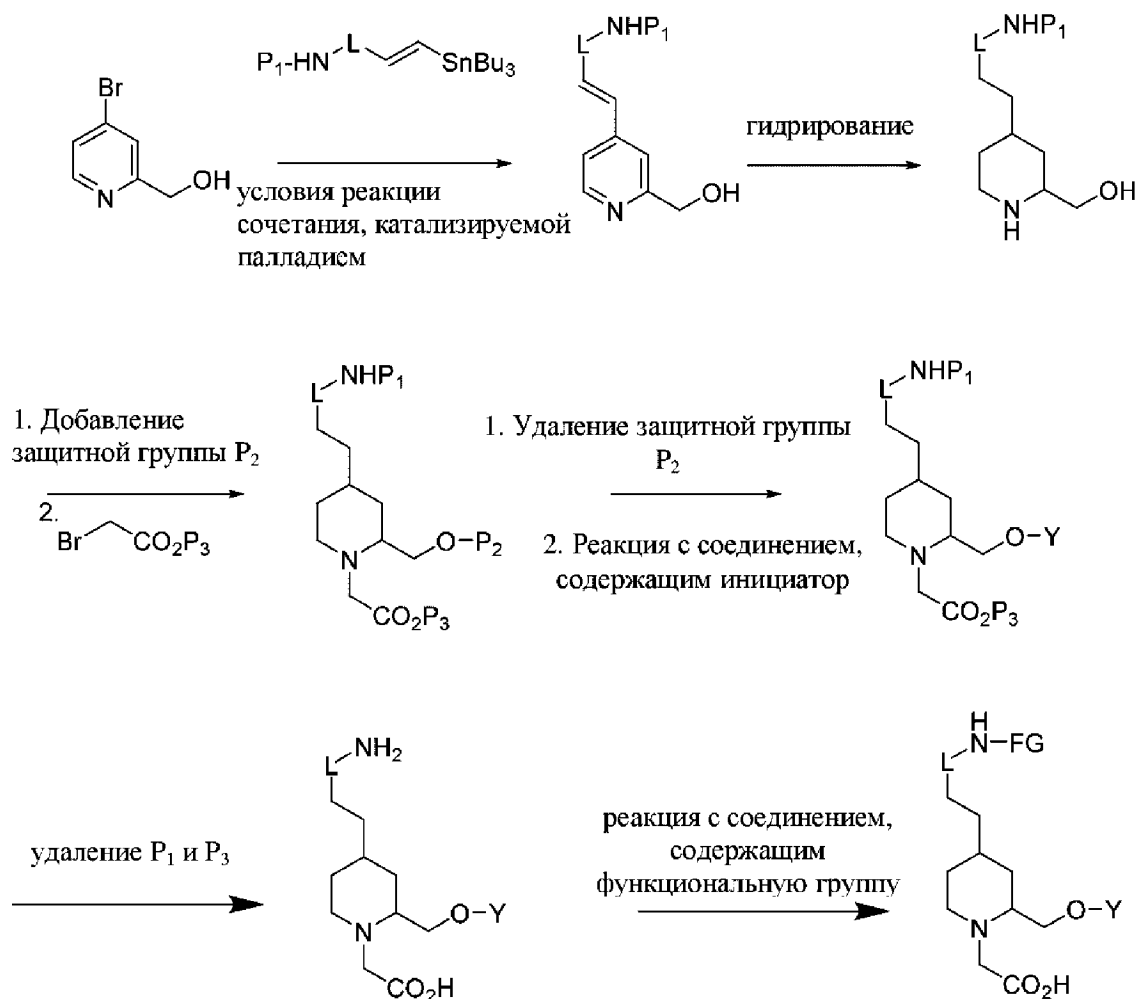


при этом одну или несколько стадий, показанных выше, можно выполнять в другом последовательном порядке или пропустить в зависимости от используемых реагентов;

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

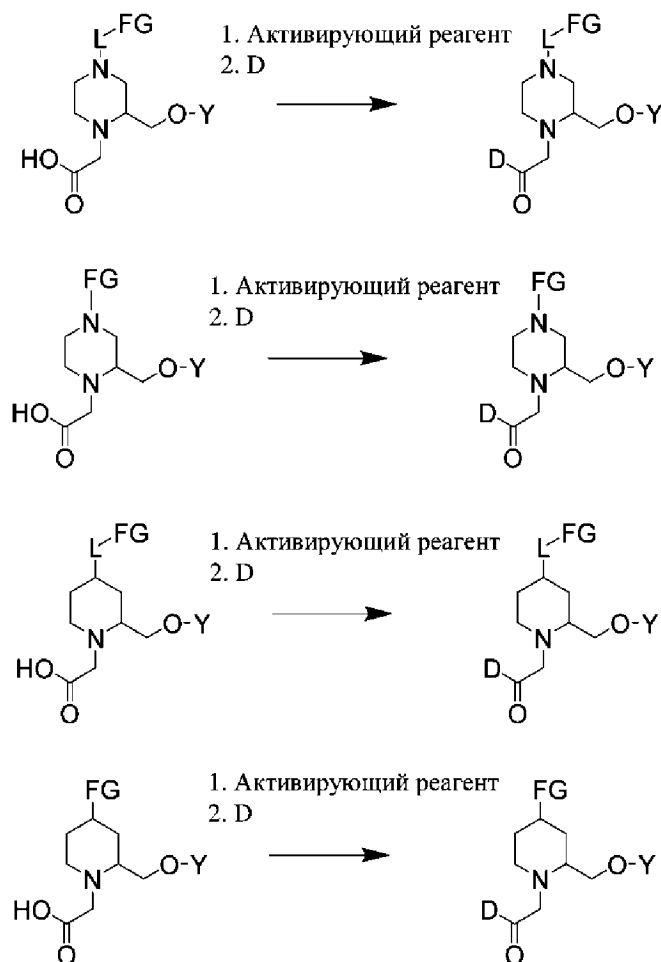
L , P_1 , P_2 , P_3 , Y и FG являются такими, как описано на схеме 2.

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 аминоксодержащим 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



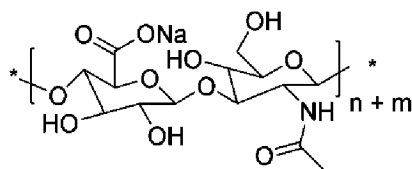
Один вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой бесследный линкер R согласно формуле (I) или формуле (II), присоединенный к композиции носителя посредством линкера, содержащего одну или несколько функциональных групп. В одном аспекте композиция носителя содержит R¹¹ бесследного линкера, описанный в данном документе. В одном аспекте R¹¹ содержит полимер, биополимер или полиэтиленгликоль, связанный с R⁸ или R⁹ 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, гидроксипропилкрахмал, 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.

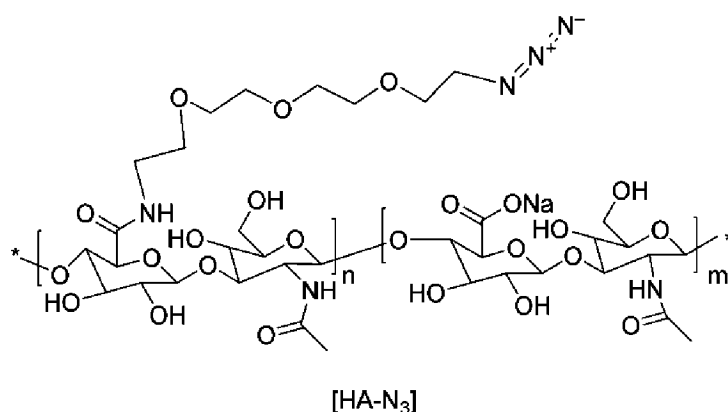
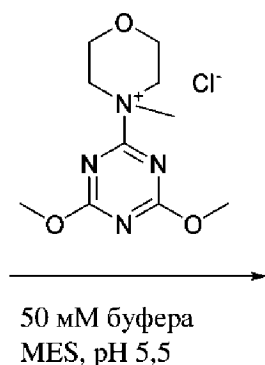
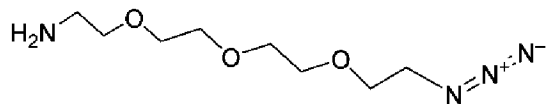
Как описано в данном документе, композиции носителя R^{11} могут быть сшиты для соединения нескольких молекул друг с другом и облегчения образования гидрогеля. Сшивание можно осуществлять с помощью любых способов, известных из уровня техники. См., например, Liu et al., "Solution processable, cross-linked sulfur polymers as solid electrolytes in dye-sensitized solar cells," Chem. Commun. 51: 14660-14662 (2015). В одном варианте осуществления, описанном в данном документе, гиалуроновую кислоту или полиэтиленгликоль функционализируют одной или несколькими функциональными группами, показанными в таблице 2, 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_8 алкенила, амина, тиола, C_1 - C_8 карбоксила, C_1 - C_8 карбонила, оксамина, 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% полимер-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)этоксид)этанамин (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 (НА)

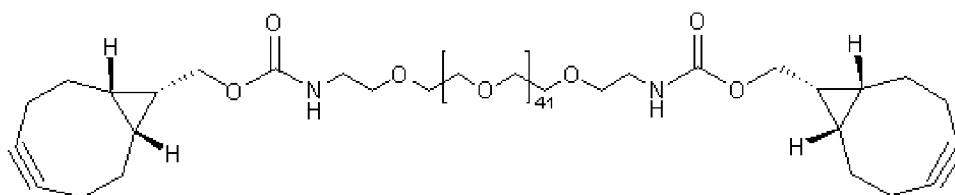
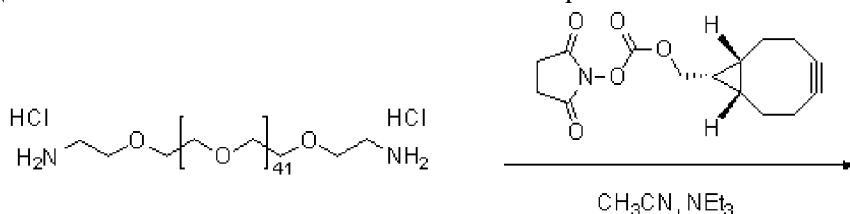


Условия эксперимента описаны в примере 3. В одном аспекте функционализировано от приблизительно 5% до приблизительно 50% гиалуроновой кислоты, включая все целые числа в пределах указанного диапазона. В одном аспекте гиалуроновая кислота функционализирована на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 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.

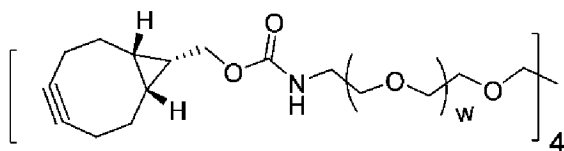
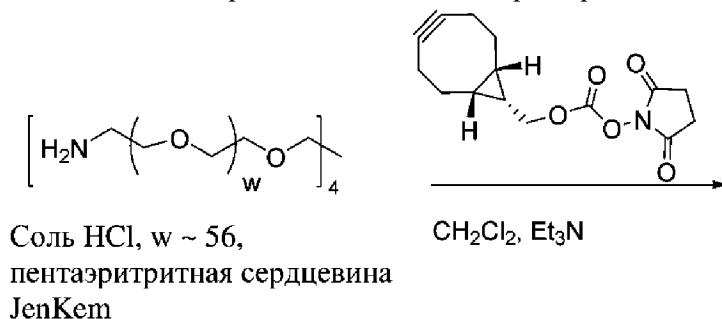
Синтез сшивающего средства на основе PEG-BCN с 2 ветвями размером 2 кДа

В одном аспекте осуществляют реакцию гидрохлорида полиэтиленгликолядиамин с $M_n \sim 2$ кДа в соответствии с показанным. Условия реакции описаны в примере 4.



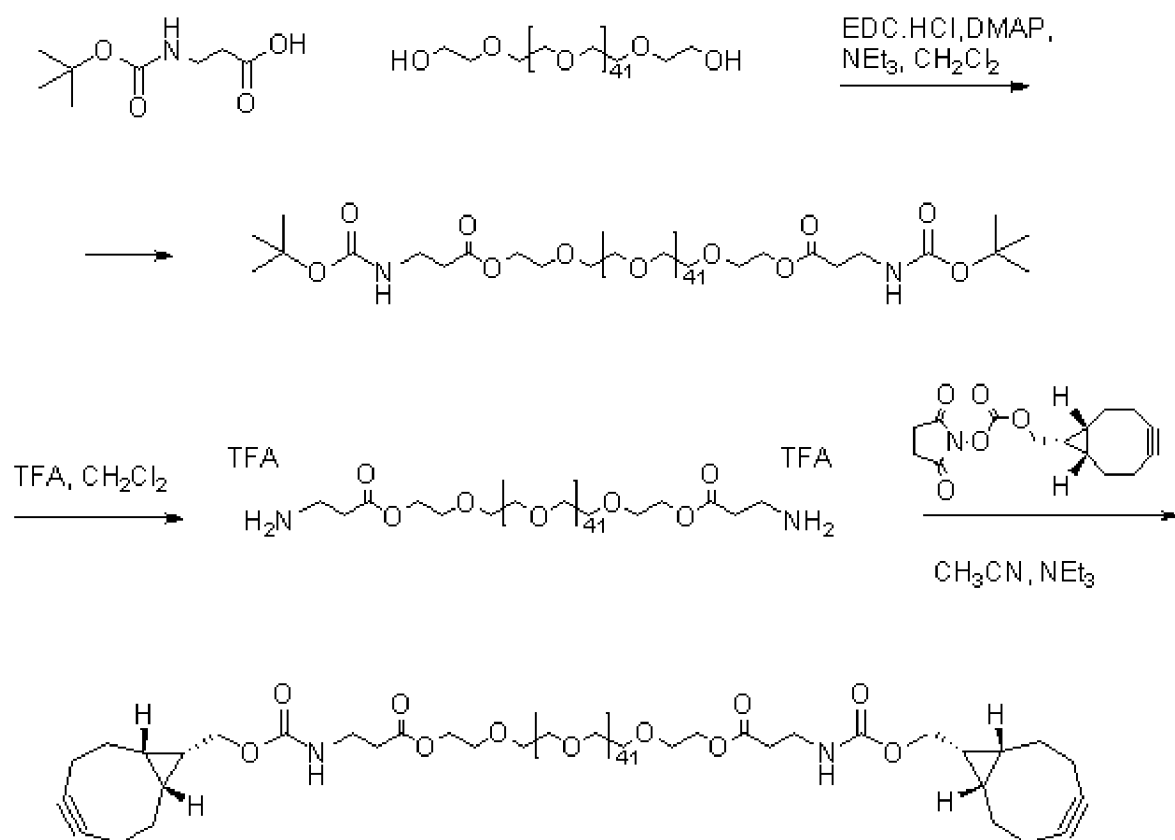
Синтез сшивающего средства на основе PEG-BCN с 4 ветвями размером 10 кДа

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



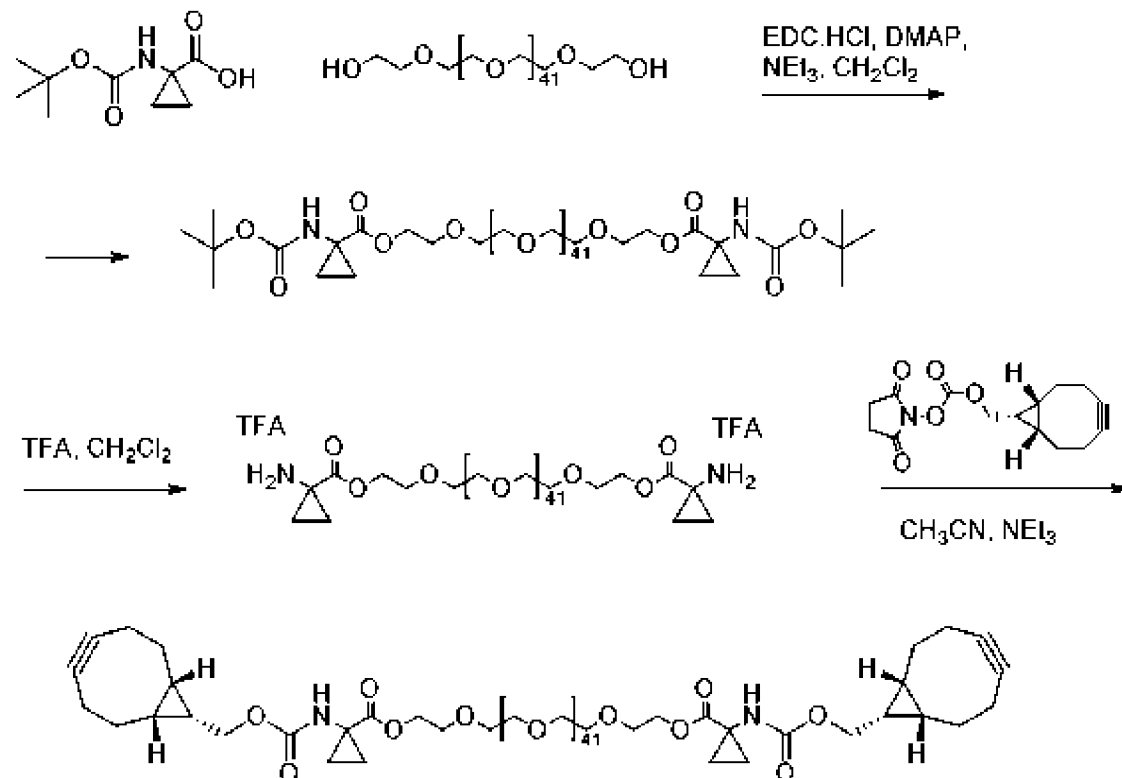
Синтез сшивающего средства на основе PEG-BCN и бета-аланина с 2 ветвями размером 2 кДа

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

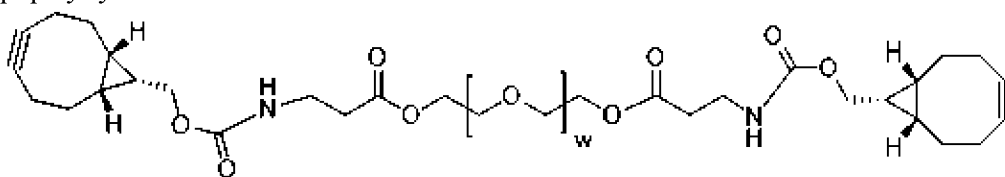


Синтез сшивающего средства на основе PEG-BCN и аминокicloпропанкарбоновой кислоты с 2 ветвями размером 2 кДа

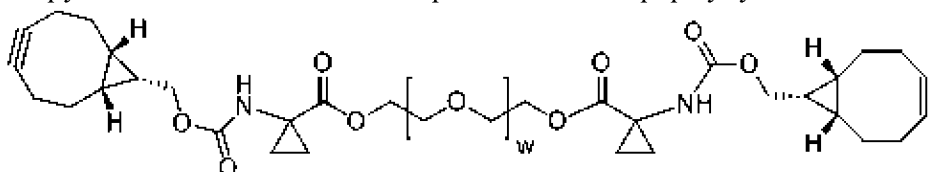
В другом аспекте осуществляют реакцию полиэтиленгликоля с $M_n \sim 2$ кДа и 1-((трет-бутоксикарбонил)амино)циклопропан-1-карбоновой кислоты в соответствии с показанным. Условия реакции описаны в примере 4.



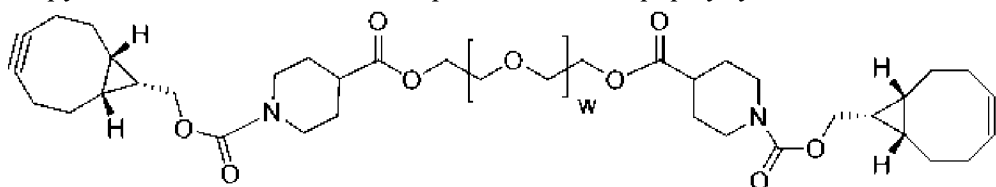
Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой одно или несколько сшивающих средств. В одном аспекте сшивающее средство имеет формулу V:



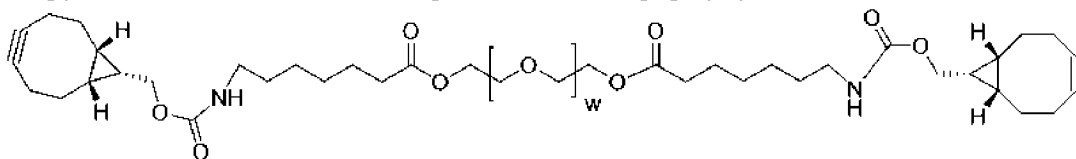
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VI:



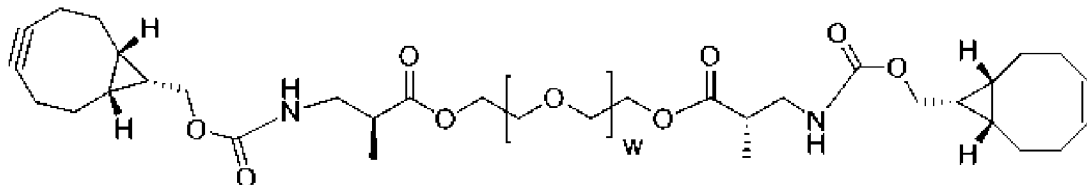
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VIa:



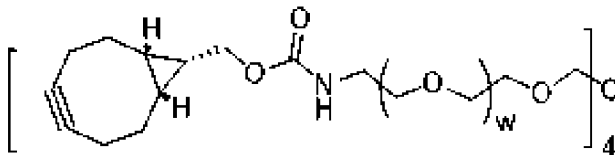
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VIb:



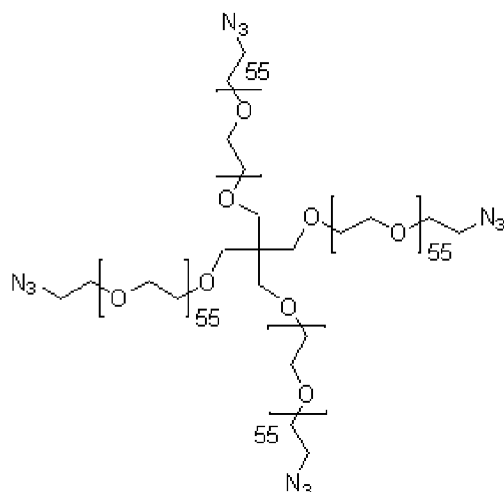
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VIc:



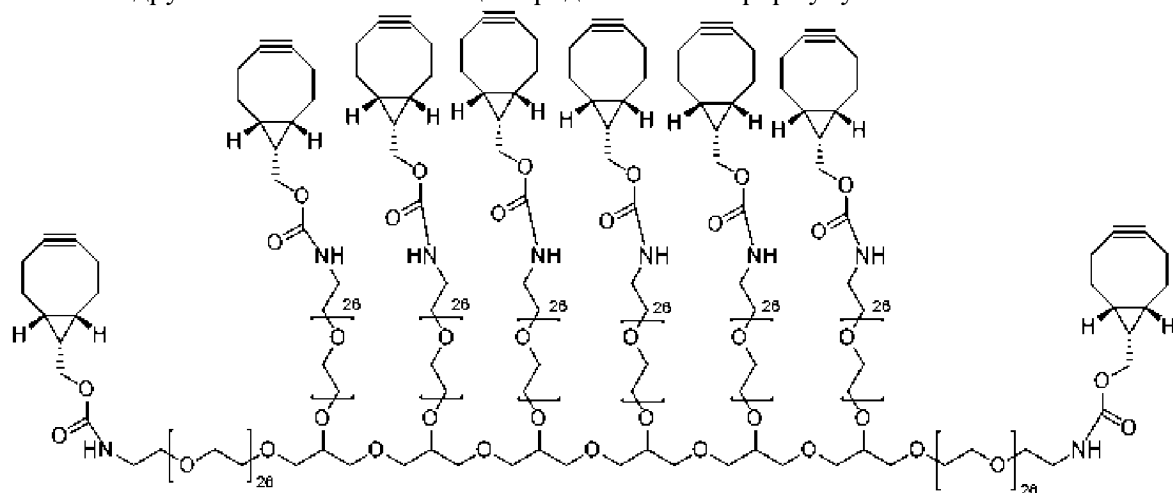
В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VII:



В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу VIII:

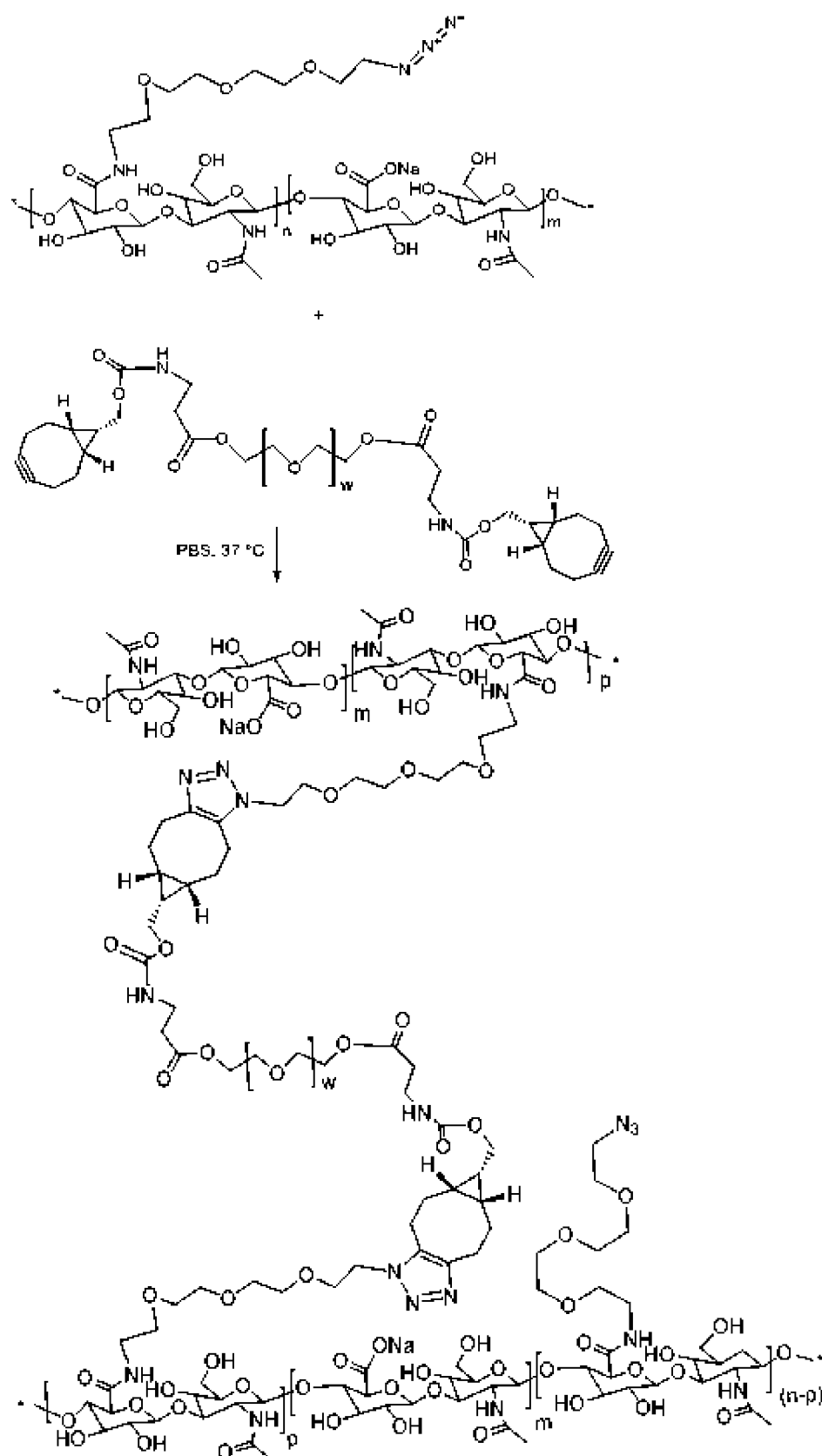


В другом аспекте сшивающее средство имеет формулу IX:



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:



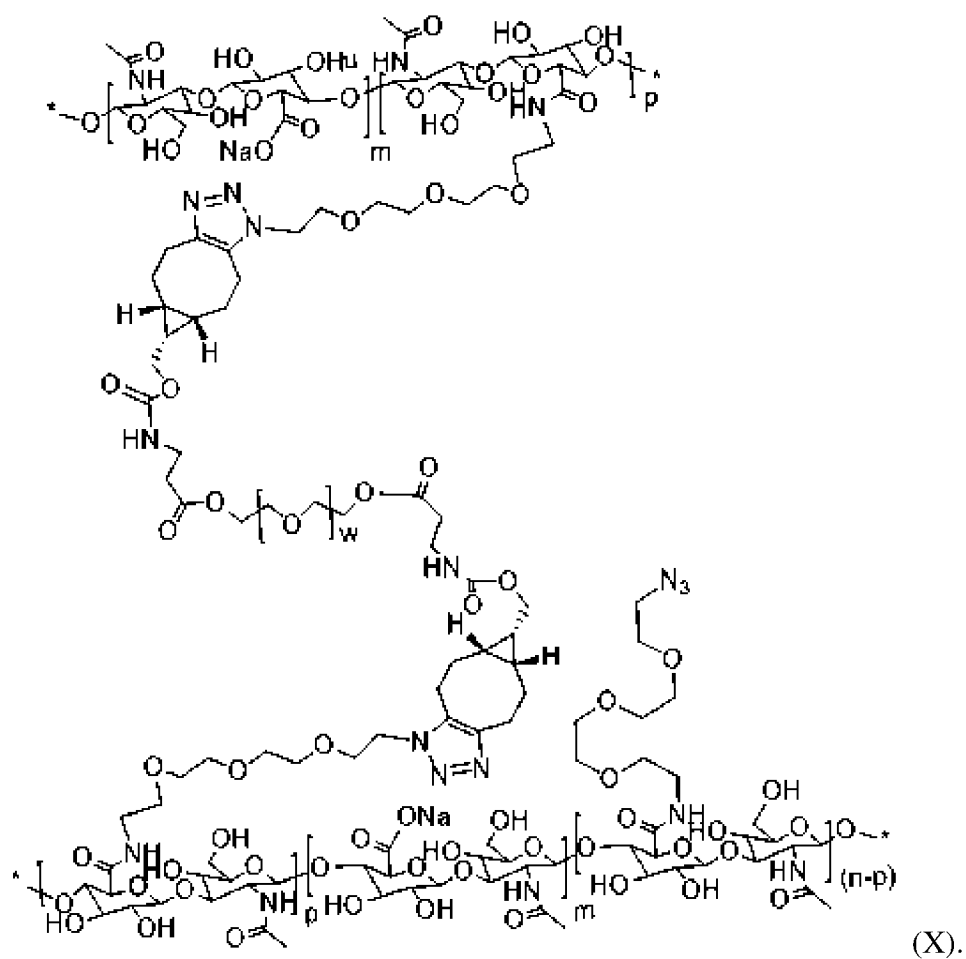
Без ограничения каким-либо конкретным примером и в качестве иллюстрации, в одном варианте осуществления натриевая соль гиалуроновой кислоты обозначена поставщиком Lifecore Biomedical (HA200K, Часка, Миннесота) как имеющая номинальную среднюю молекулярную массу, варьирующуюся в разных партиях в диапазоне 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 лекарственного средства - бесследный линкер - как “q”. Для полимерной цепи, содержащей ≈ 500 мономерных звеньев, ($n+m+p+q \approx 500$). Если процент модификации молекулы натриевой соли гиалуроновой кислоты составляет 25%, то $m=75\%$ и $(n+p+q) = 25\%$.

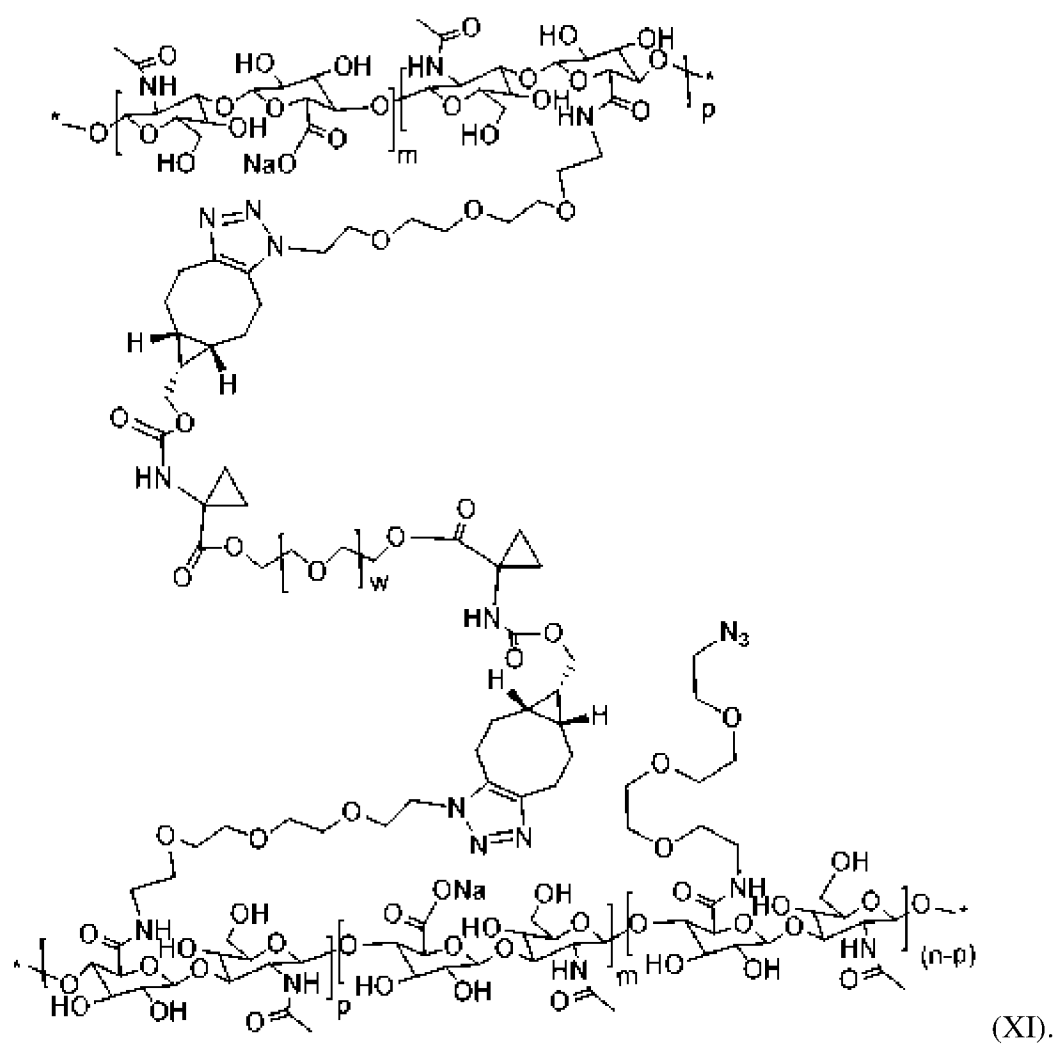
Аналогичным образом, звено PEG, присутствующее в одном варианте осуществления сшивающего средства, получено из исходного PEG, описанного как имеющий номинальную среднюю молекулярную массу 1 кДа, 2 кДа, 4 кДа, 6 кДа, 8 кДа или 10 кДа, и будет соответственно состоять из приблизительно 22, 45, 91, 136, 181 или 226 повторяющихся оксиэтиленовых мономерных звеньев, описанных в этих изображенных структурах как “w”. В некоторых аспектах w может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 250. В других аспектах w содержит приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, приблизительно 210, приблизительно 220, приблизительно 230, приблизительно 240 или приблизительно 250 оксиэтиленовых мономерных звеньев. В других аспектах w составляет приблизительно 20, приблизительно 45, приблизительно 90, приблизительно 140, приблизительно 180 или приблизительно 225.

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 составляющей примерно 200 кДа. Это относится к формулам от X до XXII.

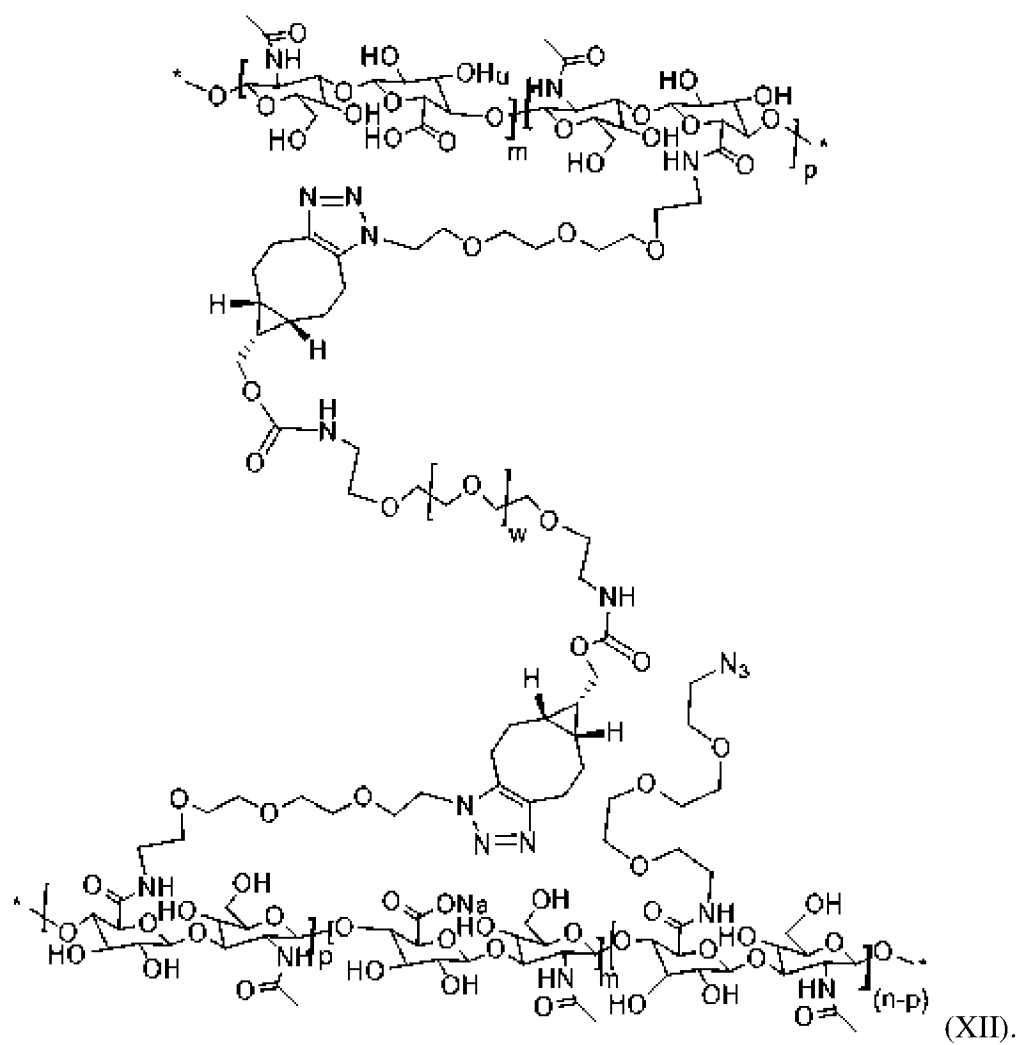
В одном аспекте сшитый носитель имеет формулу X:



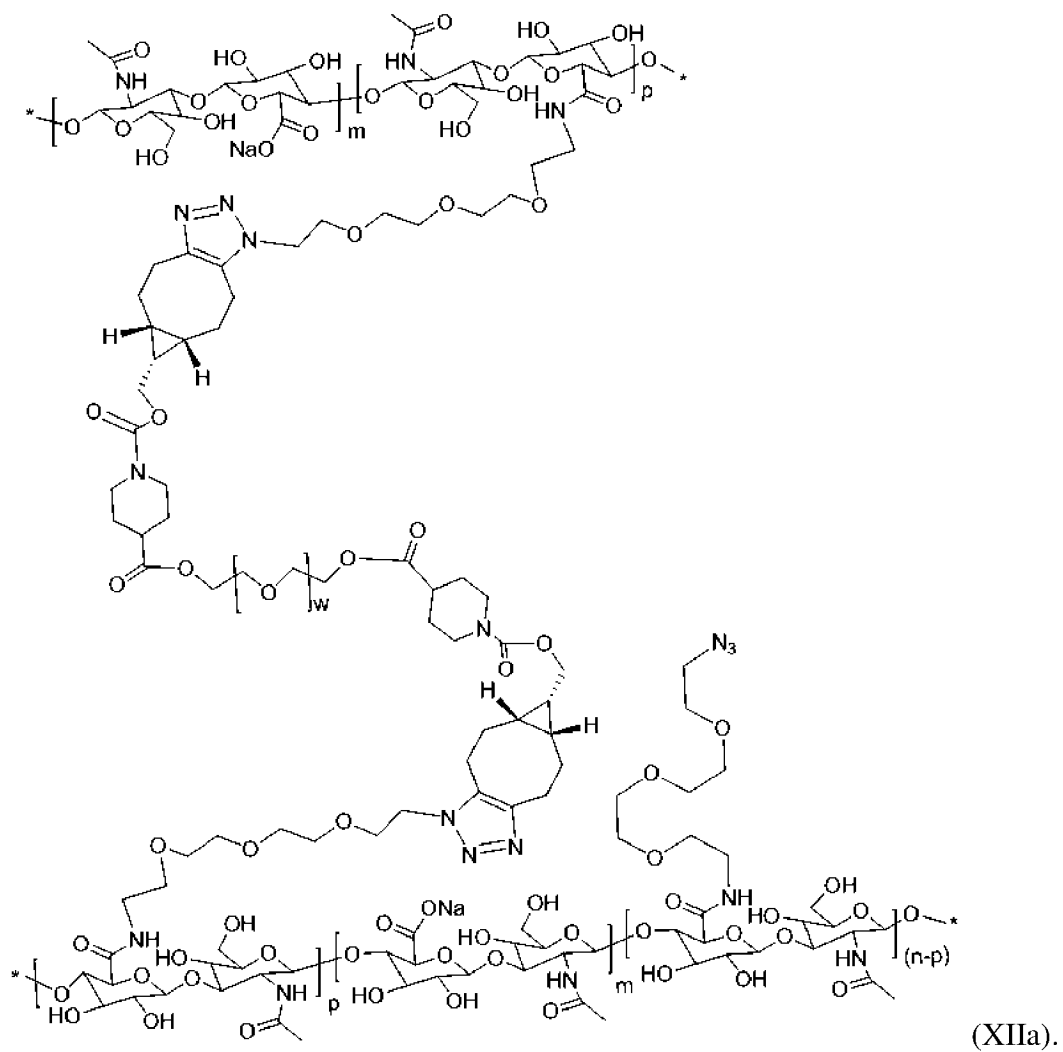
В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XI:



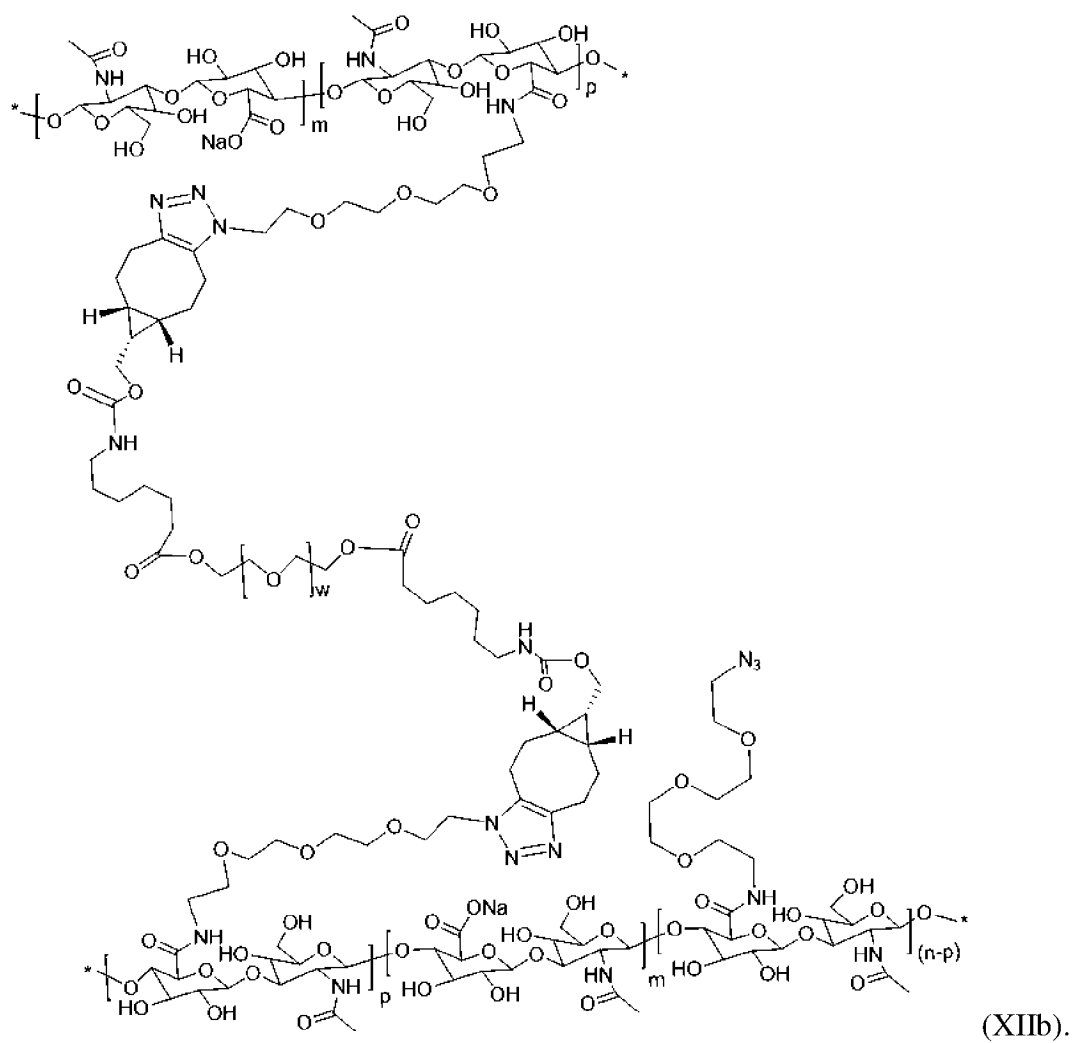
В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XII:



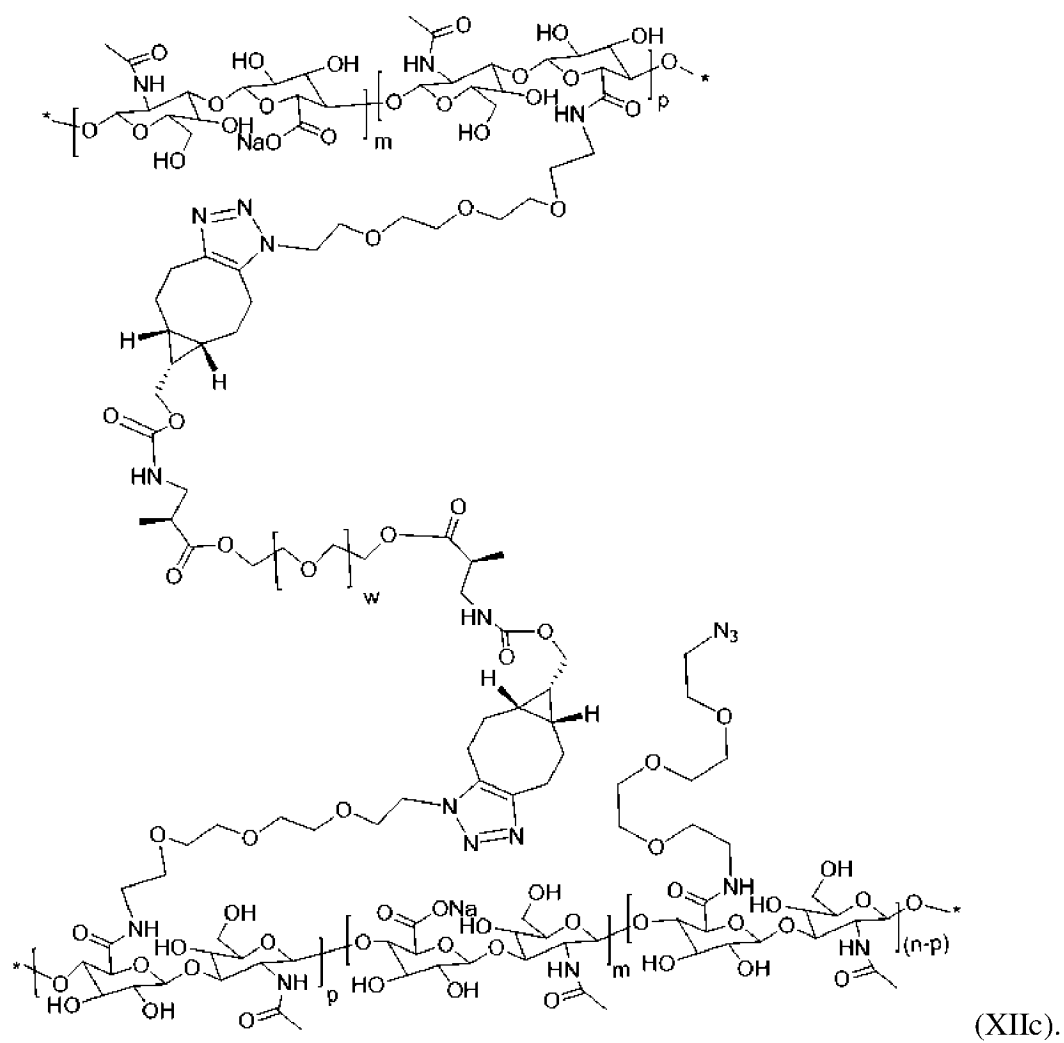
В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XIIa:



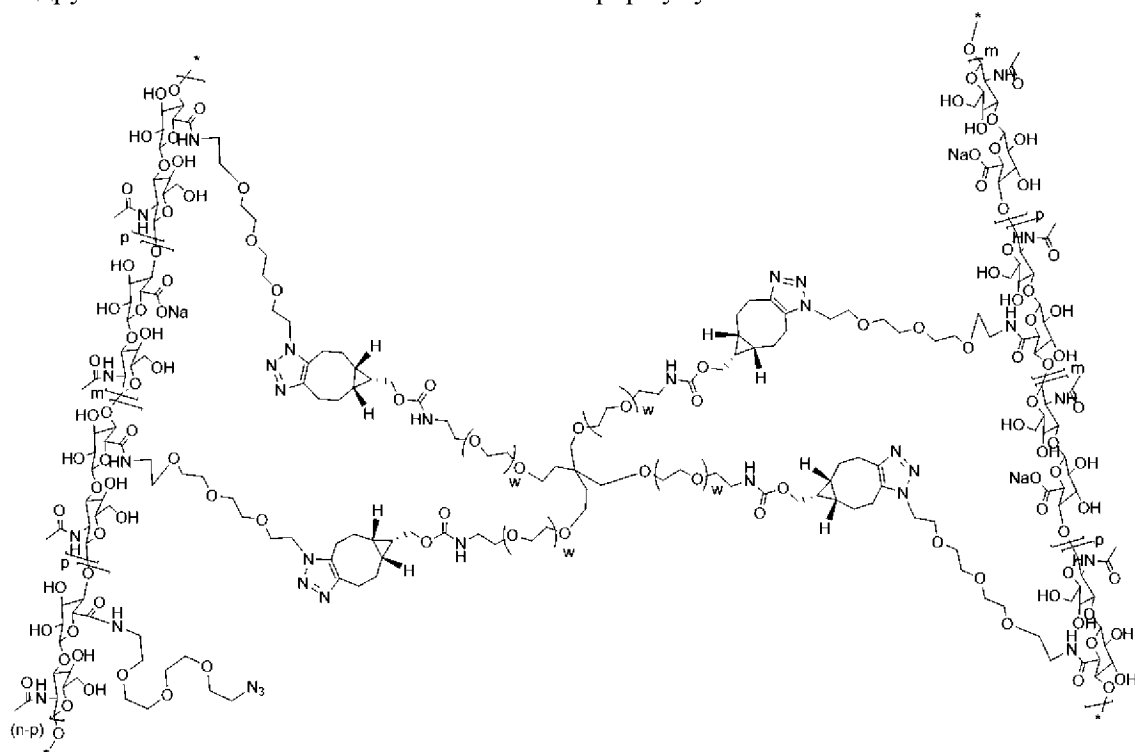
В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XIIб:



В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу XIIc:



В другом аспекте сшитый носитель имеет формулу 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, каждое 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.

Один вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой аддукт лекарственного средства D-R, где D содержит полипептид ANGPTL3. В одном аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте D содержит любую из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий замену K423Q или делецию K423. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 201-460; 207-460; 225-455; 225-455; 225-460; 225-460; 226-455; 226-455; 226-460; 226-460; 228-455; 228-455; 228-460; 228-460; 233-455; 233-455; 233-460; 233-460; 241-455; 241-455; 241-460; 241-460; 242-455; 242-455; 242-460 или 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 в каждом случае. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, предусматривающий по меньшей мере 95% идентичность с аминокислотными остатками 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q D1 (SEQ ID NO: 19).

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой систему доставки лекарственных средств, содержащую конъюгат носитель-бесследный линкер-биологически активное средство D-R-R¹¹, 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 R¹¹, содержащему полимер-носитель или гидрогель, описанный в данном документе. В одном аспекте R¹¹ 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 полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе. В одном аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте D содержит любую из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий замену K423Q или делецию K423. В другом аспекте D содержит полипептид

ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 201-460; 207-460; 225-455; 225-455; 225-460; 225-460; 226-455; 226-455; 226-460; 226-460; 228-455; 228-455; 228-460; 228-460; 233-455; 233-455; 233-460; 233-460; 241-455; 241-455; 241-460; 241-460; 242-455; 242-455; 242-460 или 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 в каждом случае. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, предусматривающий по меньшей мере 95% идентичность с аминокислотными остатками 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q. В другом аспекте D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q D1 (SEQ ID NO: 19).

В другом варианте осуществления D-R-R¹¹ имеет формулу XIV, где “лекарственное средство” содержит полипептид ANGPTL3, содержащий одну или несколько из SEQ ID NO: 1 или 3-45, или полипептиды, характеризующиеся по меньшей мере 90% идентичностью по отношению к ним.

В некоторых вариантах осуществления D-R-R¹¹ содержит любое из соединений, показанных в формулах XV-XXIII.

В одном варианте осуществления лекарственное средство или биологически активное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий одну или несколько из SEQ ID NO: 1 или 3-45.

В одном варианте осуществления лекарственное средство или биологически активное средство D содержит D1, который характеризуется последовательностью под SEQ ID NO: 19.

Один вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой пептидные композиции для восстановления хряща. В частности пептиды ANGPTL3, описанные в данном документе, обладают повышенной протеазоустойчивостью по сравнению с полипептидом ANGPTL3 дикого типа.

Другой вариант осуществления, описанный в данном документе, представляет собой композицию и способ введения полипептидов ANGPTL3 для предупреждения или снижения интенсивности проявления артрита или поражения сустава путем введения полипептида по настоящему изобретению в сустав, хрящевую ткань или ткань, ближайшую к хрящевой, или путем системного его введения. Также описаны композиции и способы индукции дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты.

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 R¹¹, где R¹¹ 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, тем самым с образованием аддукта бесследный линкер-D; при этом аддукт бесследный линкер-D может быть необязательно очищен на этой стадии,

(с) 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:

(а) 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} , тем самым с образованием аддукта молекула носителя-бесследный линкер, который может быть необязательно очищен на этой стадии;

(с) 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:

(а) 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, тем самым с образованием аддукта бесследный линкер-D; при этом аддукт бесследный линкер-D может быть необязательно очищен на этой стадии;

(с) 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

(е) 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:

(а) 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} , тем самым с образованием аддукта молекула носителя-бесследный линкер, который может быть необязательно очищен на этой стадии; и

(с) 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

(е) 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:

(а) 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} , тем самым с образованием аддукта молекула носителя-бесследный линкер, который может быть необязательно очищен на этой стадии;

(с) 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

(е) 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:

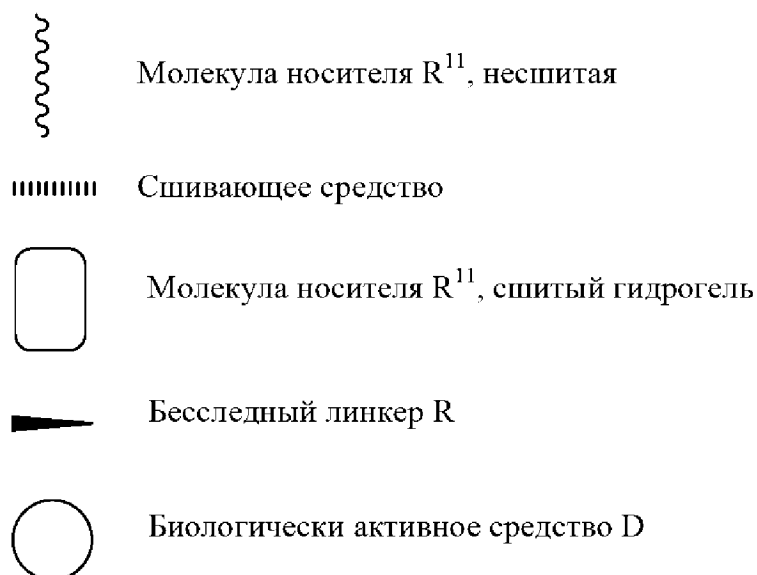


Схема 5A

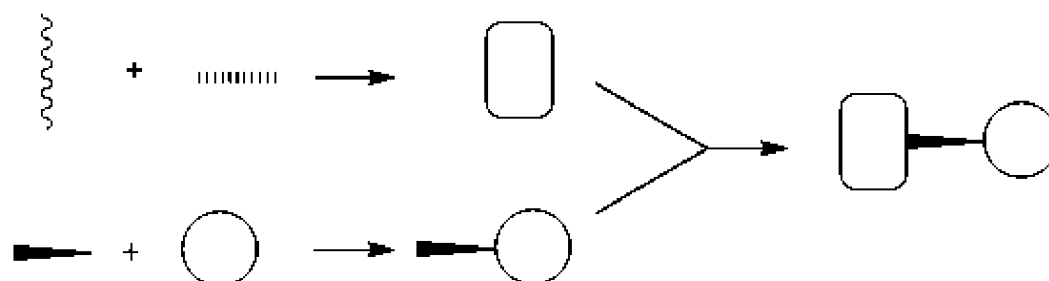


Схема 5B

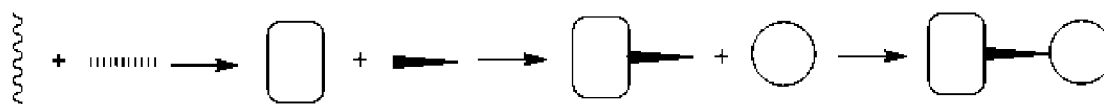


Схема 5C

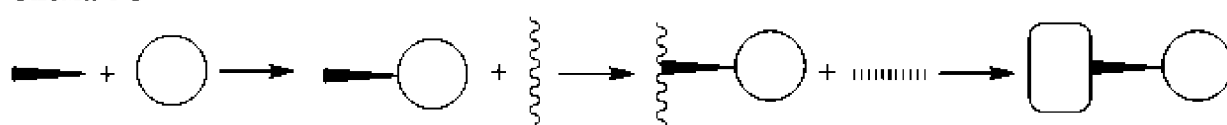


Схема 5D

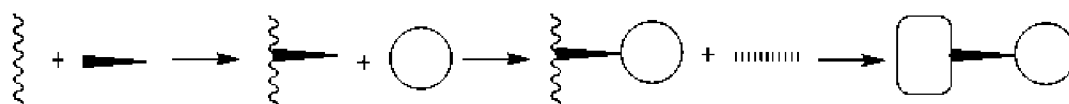
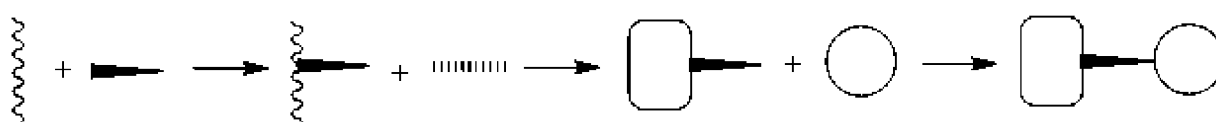
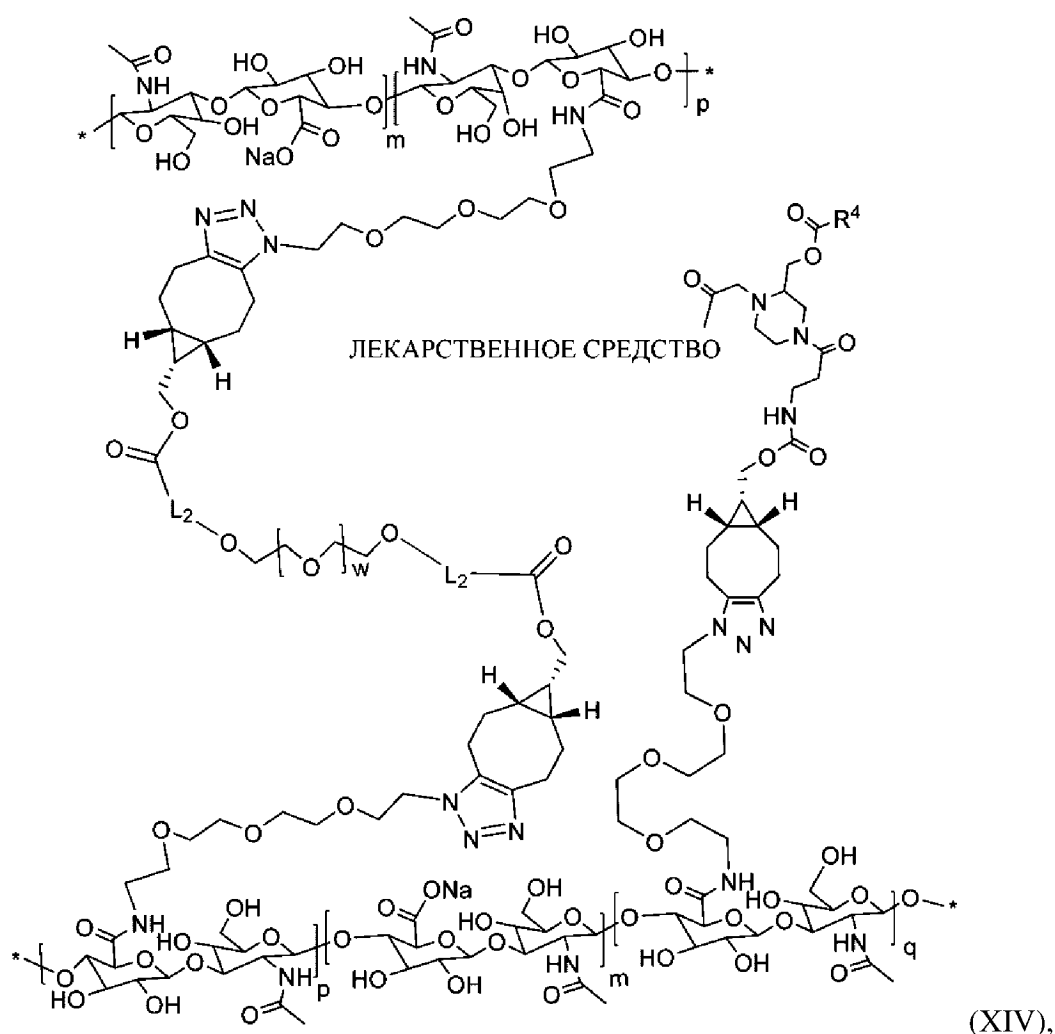


Схема 5E



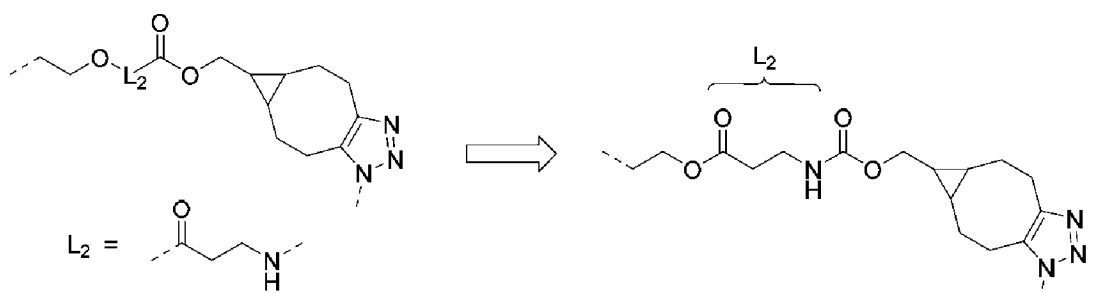
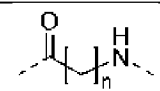
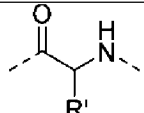
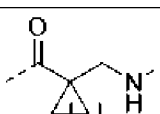
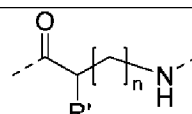
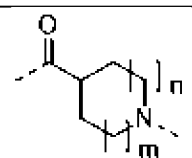
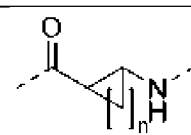
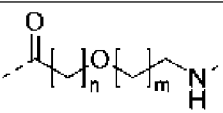
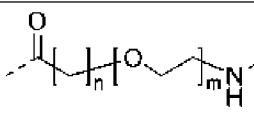
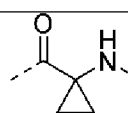
В одном варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XIV):



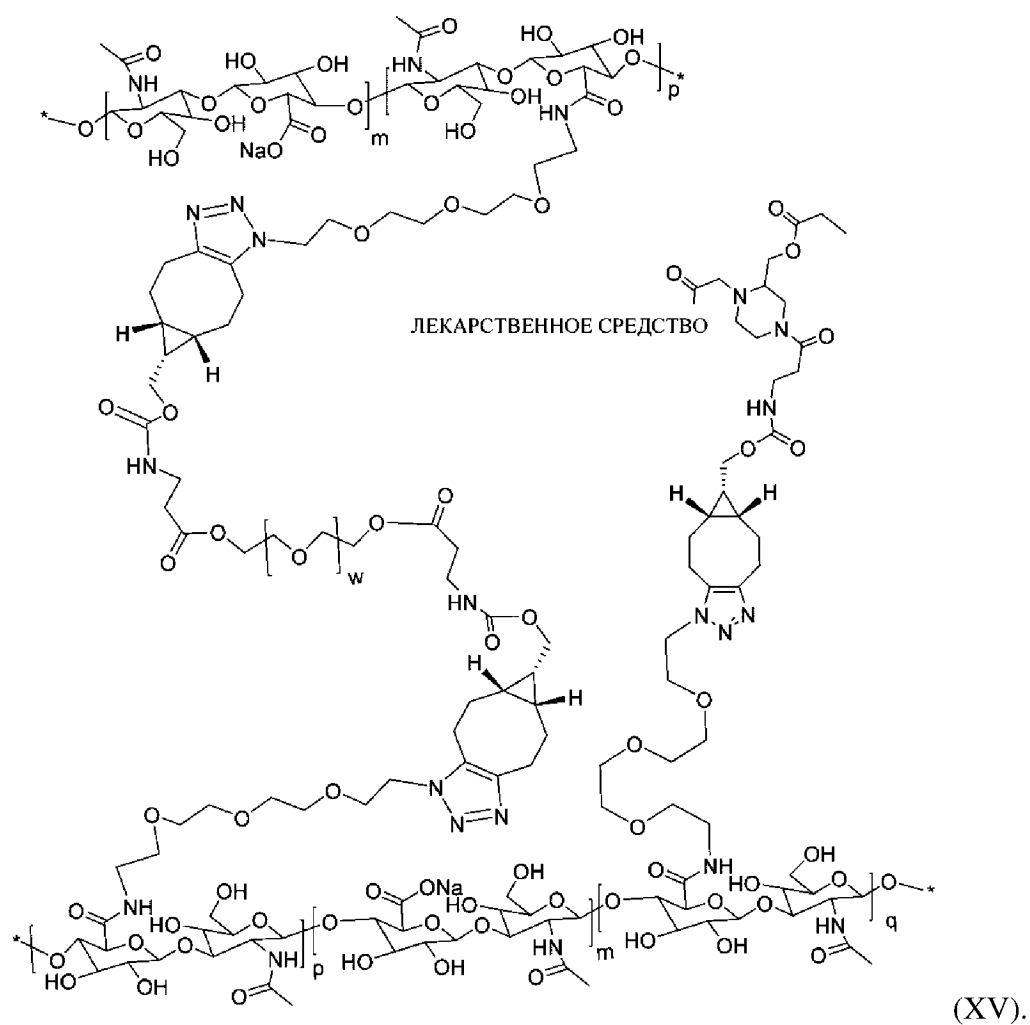
где L_2 представляет собой спейсерную группу, которая может быть специфичной для конкретного сшивающего средства, а “ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО” представляет собой биологически активную молекулу, содержащую по меньшей мере одну первичную аминогруппу, вторичную аминогруппу или атом азота кольца в азатетраарильном кольце, что модулирует по меньшей мере одну биологически значимую мишень терапевтически благоприятным образом. В одном аспекте “ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО” содержит полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе. В другом аспекте “ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО” содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте “ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО” содержит любую из SEQ ID NO: 1 или 3-45. В другом аспекте “лекарственное средство” содержит полипептид ANGPTL3, содержащий замену K423Q или делецию K423. В другом аспекте “ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО” содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 201-460; 207-460; 225-455; 225-455; 225-460; 225-460; 226-455; 226-455; 226-460; 226-460; 228-455; 228-455; 228-460; 228-460; 233-455; 233-455; 233-460; 233-460; 241-455; 241-455; 241-460; 241-460; 242-455; 242-455; 242-460 или 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 в каждом случае. В другом аспекте “ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО” содержит полипептид ANGPTL3, предусматривающий по меньшей мере 95% идентичность с аминокислотными остатками

242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q. В другом аспекте “ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО” содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q, например D1 (SEQ ID NO: 19).

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

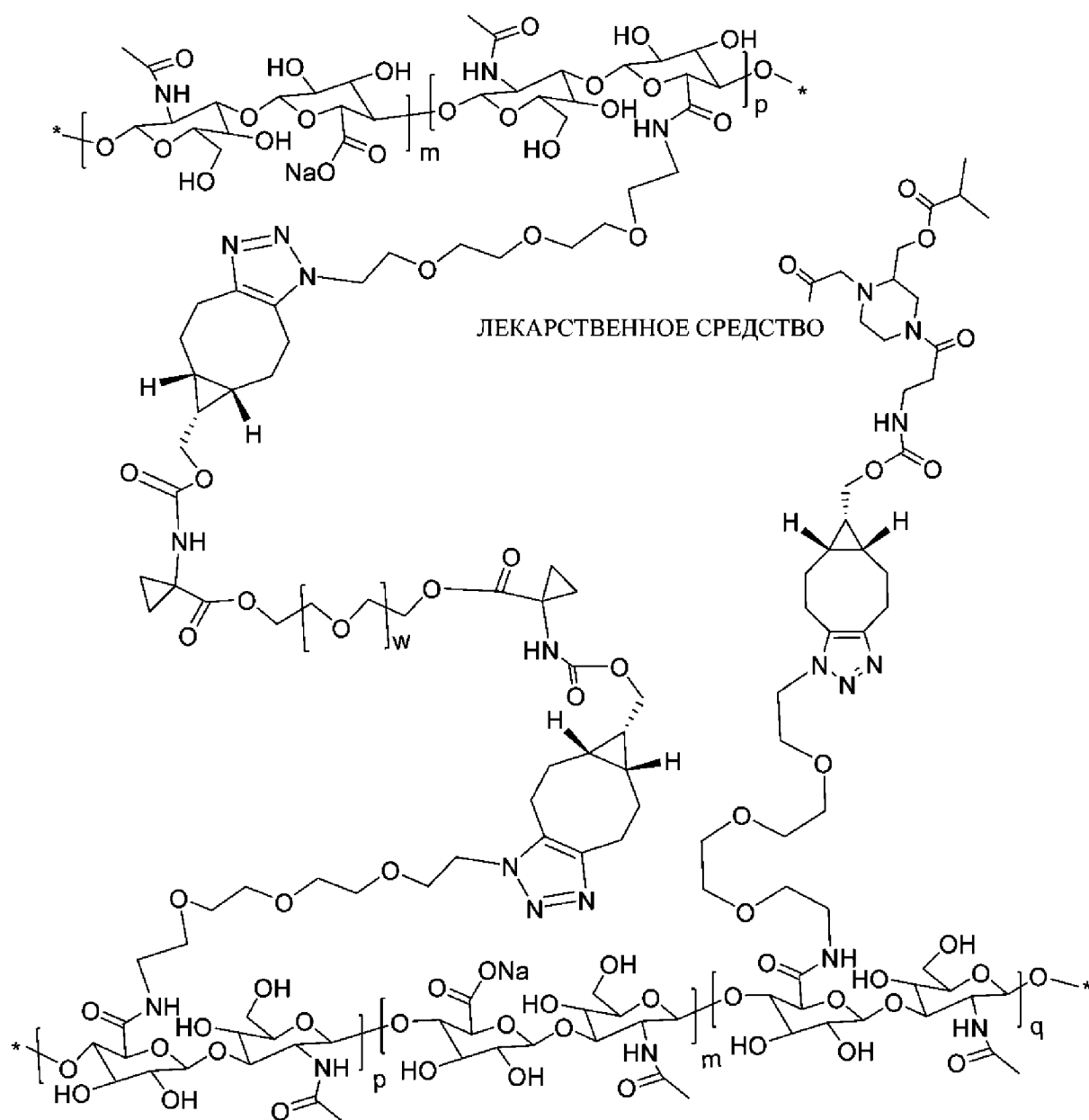
Таблица 5. Иллюстративные спейсеры L_2	
В нижеприведенной таблице L_2 представляет собой спейсер между O и C(O)O. Например: 	
 $n = 1-10$	 $R' = \text{Me, Et, Pr, iPr, C1-Сбалкил, C1-Сбциклоалкил}$
 $n = 1-6$	 $R' = \text{Me, Et, Pr, iPr, C1-Сбалкил, C1-Сбциклоалкил}$ $n = 1-5$
 $n=0-2$ $m=0-2$	 $n = 1-5$
 $n = 1-6$ $m = 1-6$	 $n = 1-6$ $m = 1-6$
 Ср-глицин	

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XV), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



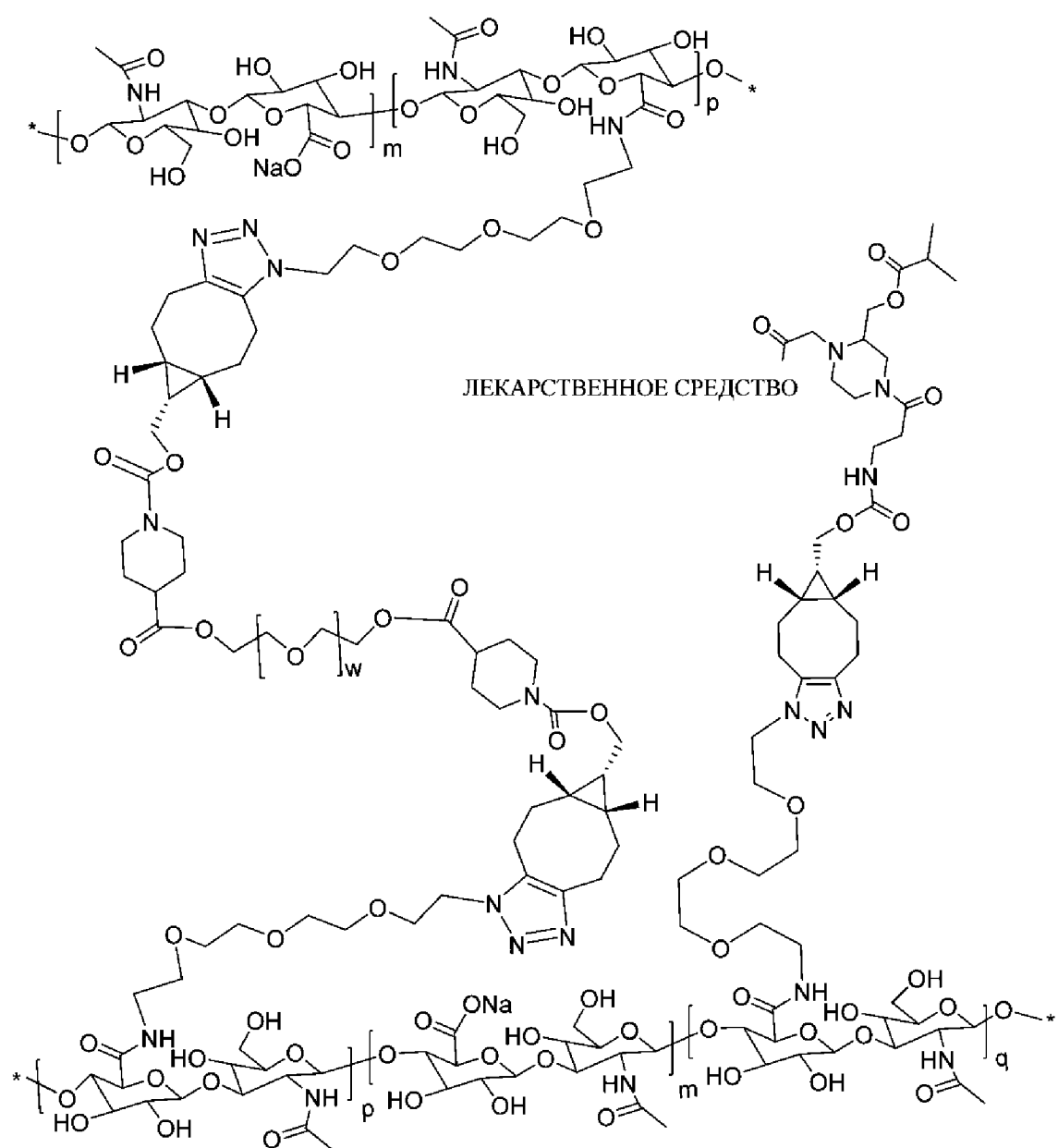
В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVI), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIII), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



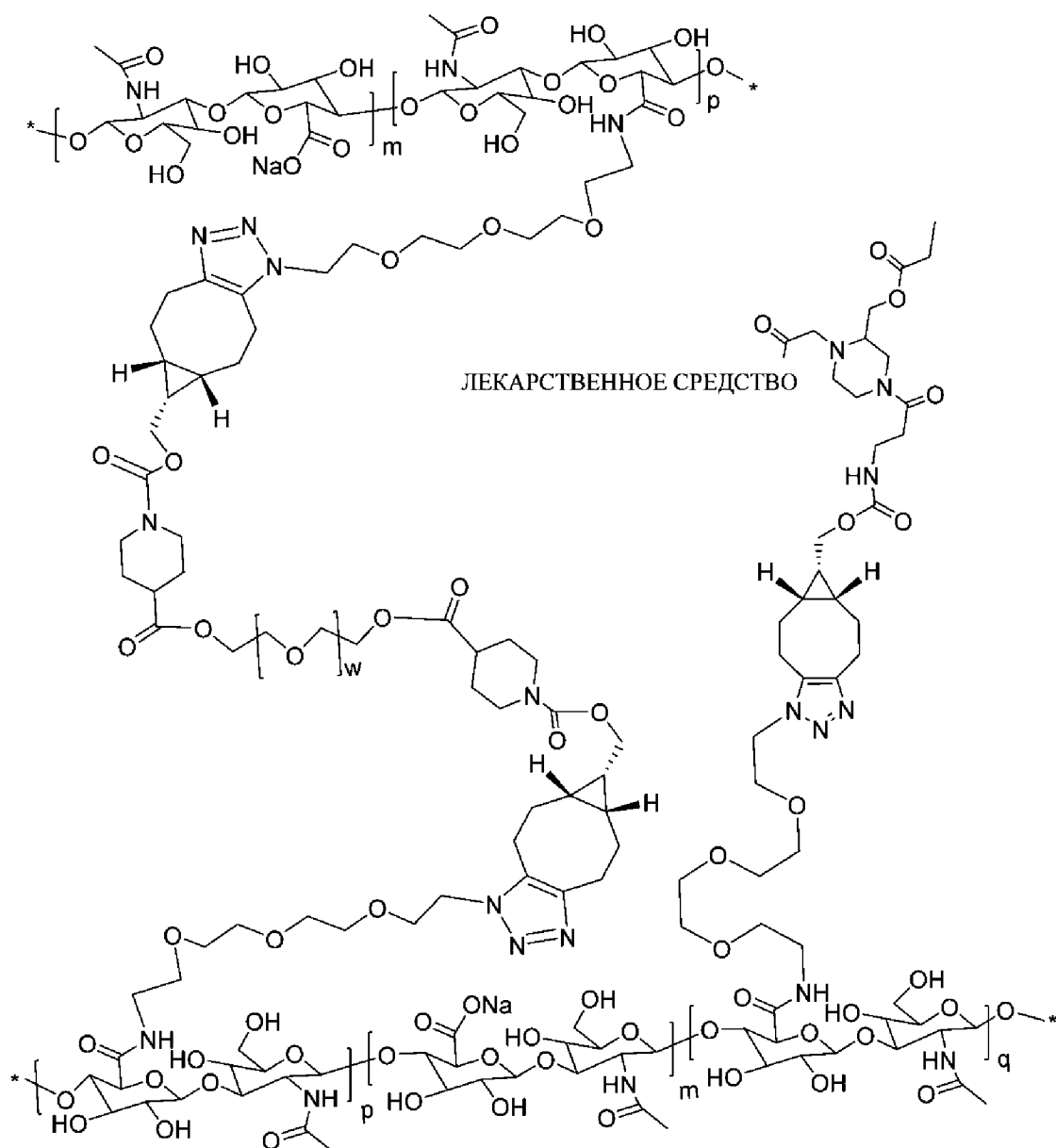
(XVIII).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIa), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



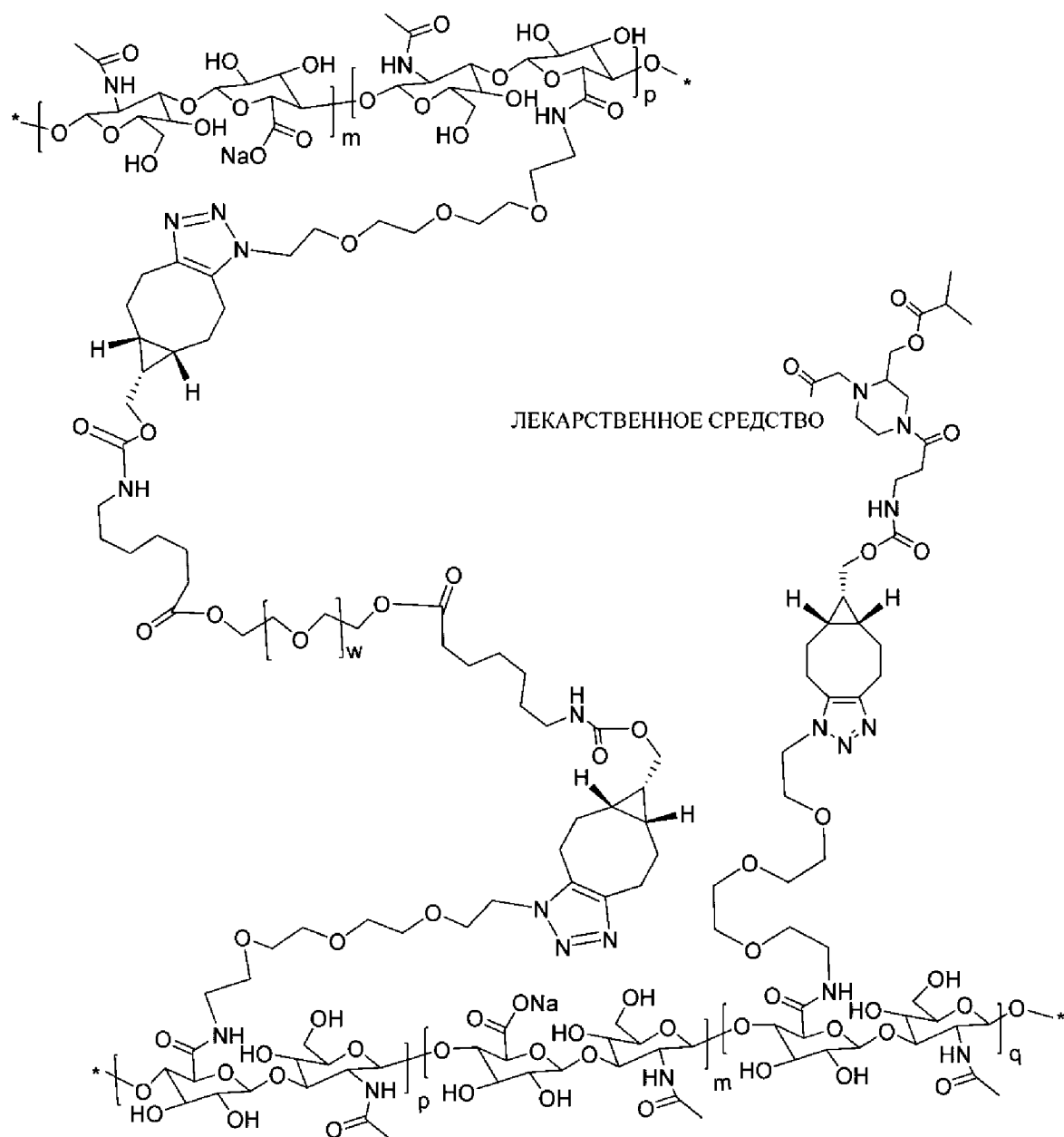
(XVIIIa).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIb), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



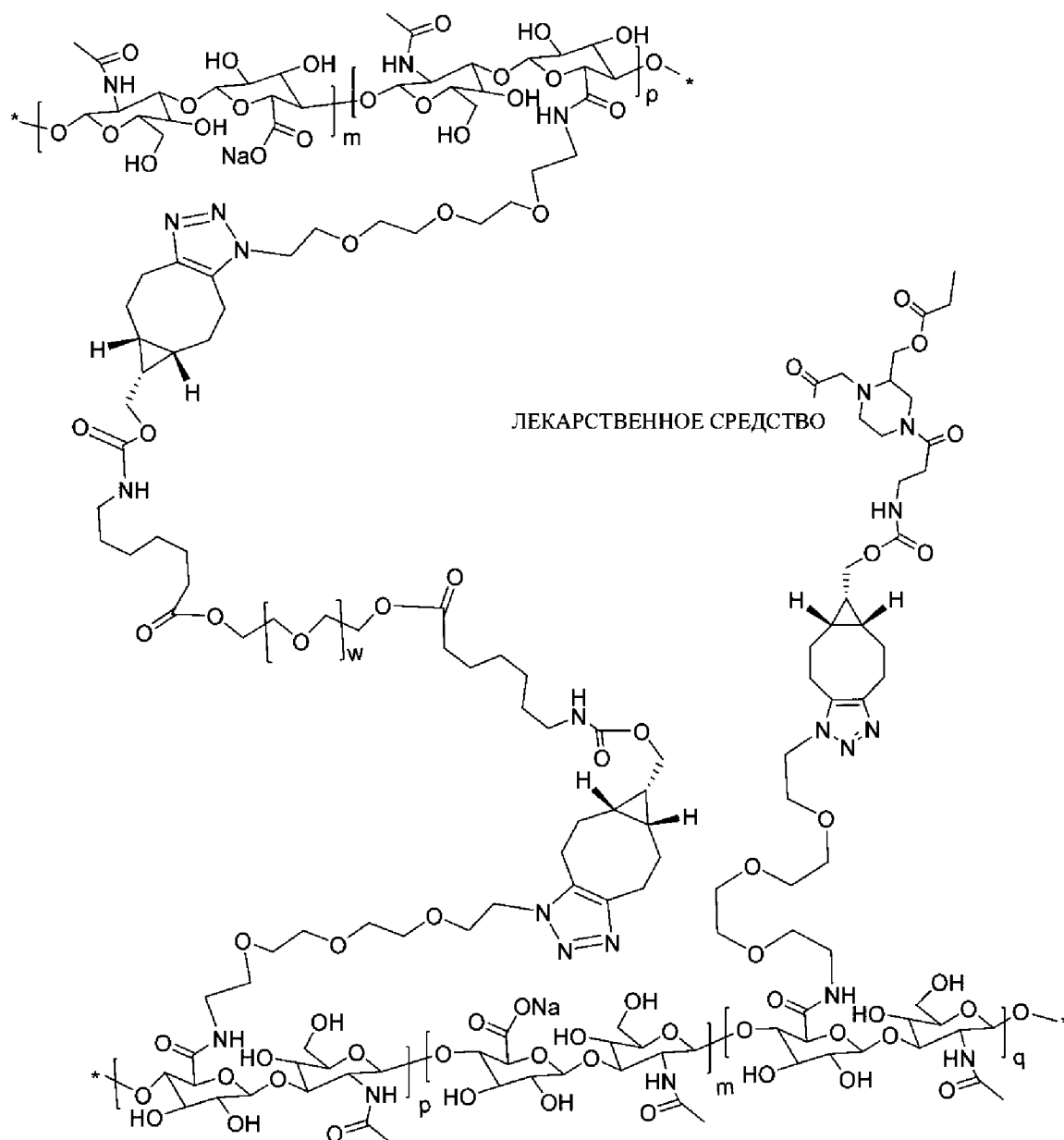
(XVIIIb).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIc), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



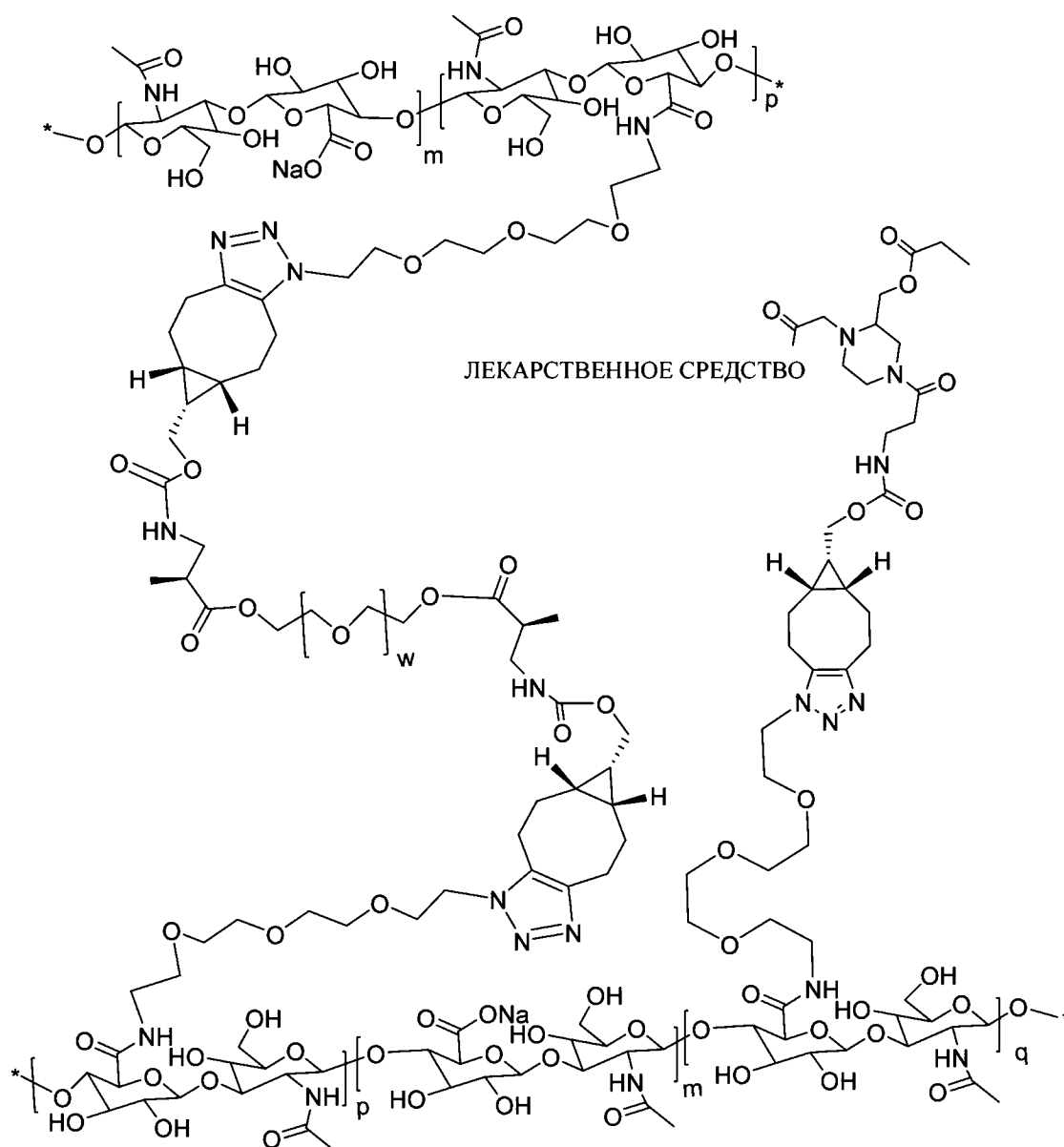
(XVIIIc).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIId), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



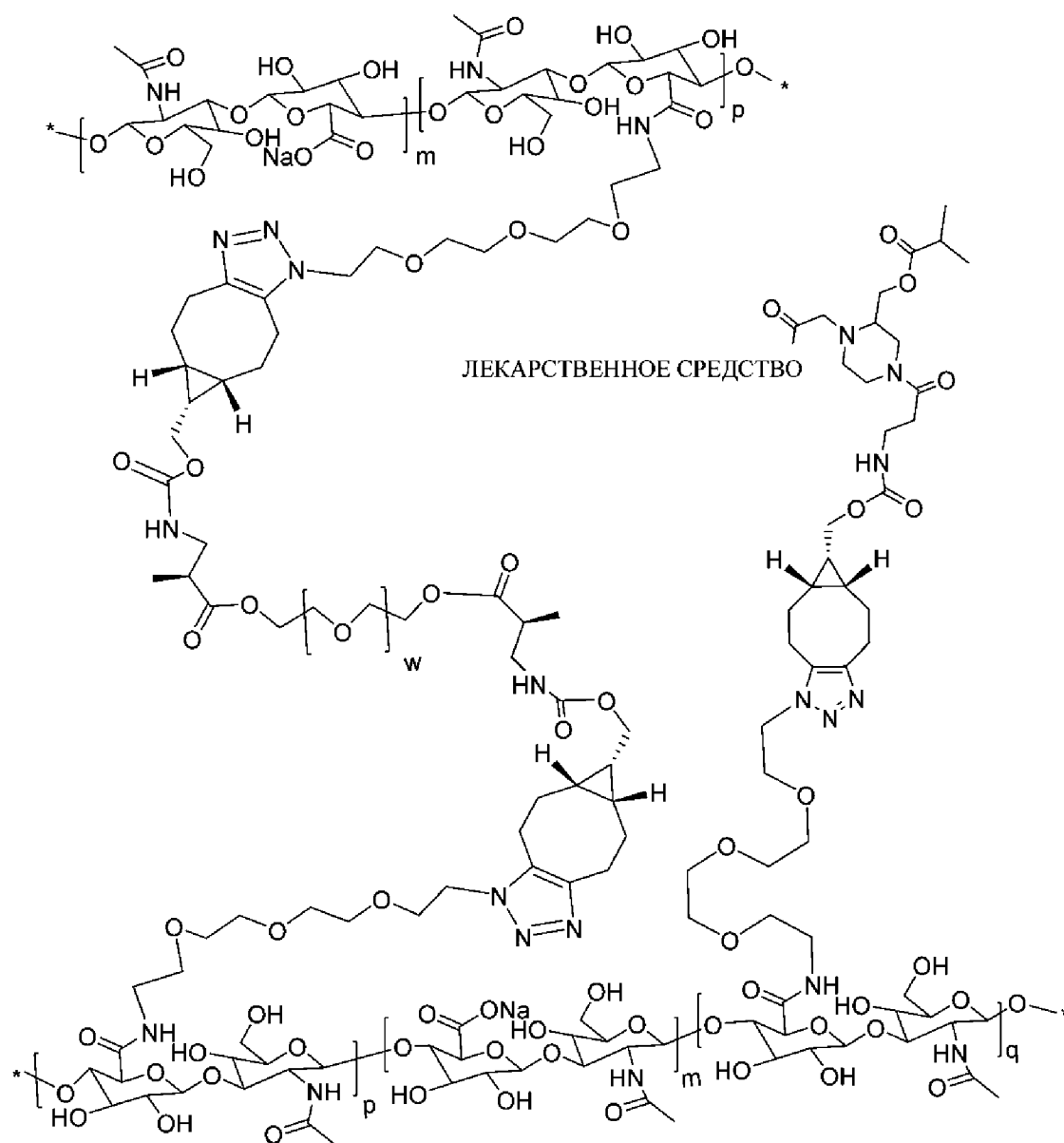
(XVIIIId).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIe), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



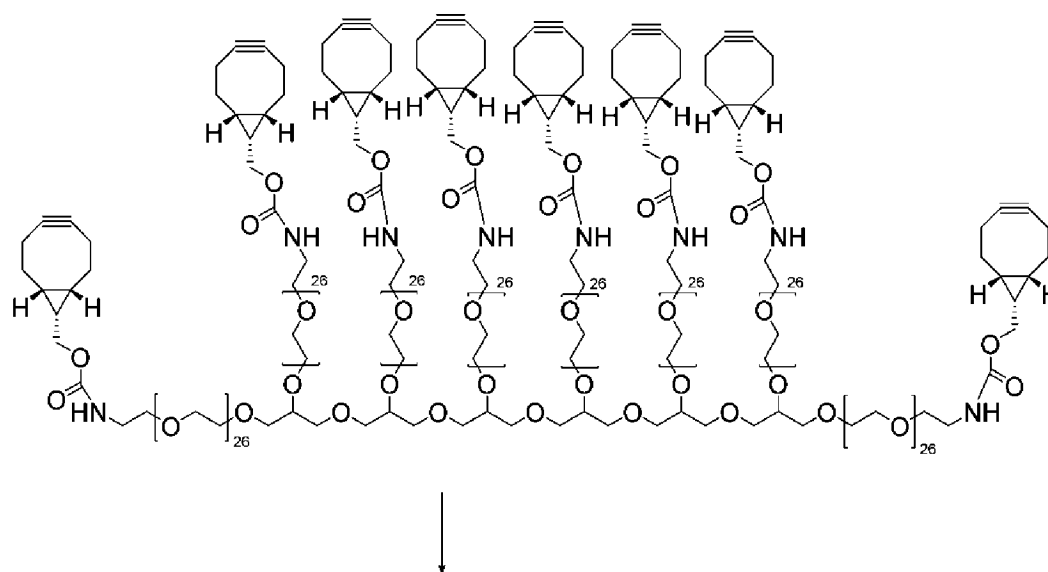
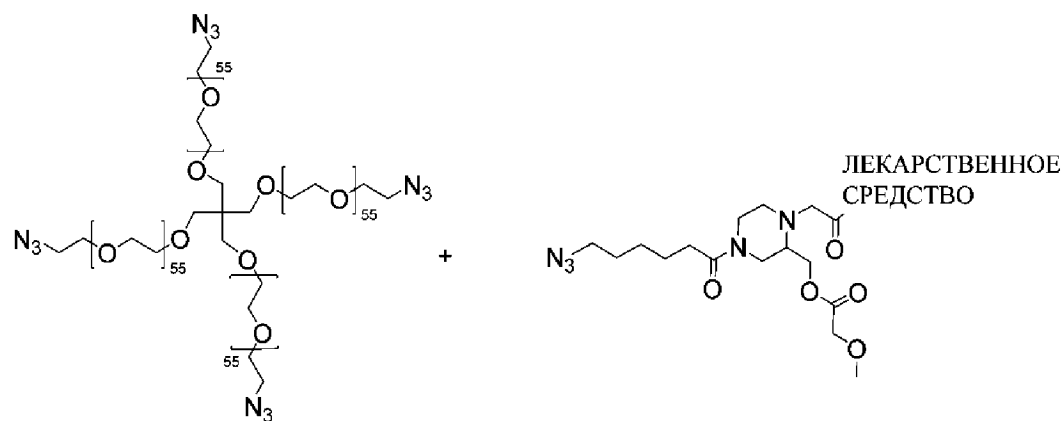
(XVIIIe).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XVIIIf), при этом ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



(XVIII f).

В другом варианте осуществления система доставки лекарственных средств может иметь формулу (XXIII), при этом лекарственное средство представляет собой полипептид ANGPTL3, описанный в данном документе:



[конъюгат гидрогель-лекарственное средство]

(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 повреждения или заболевания сустава, в том числе артрита, остеоартрита, травматического артрита или острого поражения сустава, или травмы сустава. 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.

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 полипептид ANGPTL3, предусматривающий по меньшей мере 95% идентичность последовательностей по отношению к одной или нескольким из SEQ ID NO: 1, 3-45, для применения в лечении повреждения или заболевания сустава, в том числе артрита, остеоартрита, травматического артрита, острого поражения сустава, или травмы сустава. В одном аспекте D содержит D1 (SEQ ID NO: 19). 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. В другом аспекте композиция представляет собой раствор или суспензию, которые доставляются внутривенно, внутриартериально, подкожно, внутримышечно или внутривентально. 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 полувывсвобождения 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 полувывсвобождения 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 настолько, 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, стабилизаторы, смачивающие средства, эмульгирующие средства, ускорители растворения, соли для регуляции осмотического давления, буферы или их комбинации. 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 инъекционные 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 регулирования 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, 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, элютиацию 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). 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 является 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, прикладываемое 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, суспензированной 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 фенолртути, 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 используются ионные или неионогенные поверхностно-активные вещества или другие белки или растворимые полимеры для покрытия внутренней поверхности контейнера с композицией или конкурентной адсорбции на ней, например, полуксамер (Pluronic F-68), додециловый эфир PEG (Brij 35), полисорбат 20 и 80, декстран, полиэтиленгликоль, PEG-полигистидин, BSA и HSA и желатины. Выбранная 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 СМС.

(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, полиэтиленмин (PEI), пропилгаллат, витамин Е, 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, поллоксамеры, гидрофильные блоки поли(оксиэтилена) и гидрофобные блоки поли(оксипропилен) 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 А-блоков, таких как полилактид (PLA) или сополимер лактида и гликолида (PLGA), и гидрофильных В-блоков, таких как полиэтиленгликоль (PEG) или поливинилпирролидон. Такие блок-сополимеры, а также вышеупомянутые поллоксамеры 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 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. 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 будет вызывать 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 ≤ 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 $\leq 0,2$ 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 $\leq 0,1$ 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 $\leq 0,1$ 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 ₂ O	уксусный ангидрид
водн.	водный
атм.	атмосфера
Boc, BOC	третичный бутилкарбоксы
Boc-ангидрид	ди- <i>трет</i> -бутилдикарбонат
(Boc) ₂ O, (BOC) ₂ O	ди- <i>трет</i> -бутилдикарбонат
br.	широкий
BSA	бычий сывороточный альбумин
BuOH	бутанол
CAD	детектор заряженного аэрозоля
расч.	рассчитанный
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
DSC	N, N'-дисукцинимидилкарбонат
ECL	электрохемилюминесценция
элемент. анал.	элементный анализ
ELSD	испарительный детектор светорассеяния

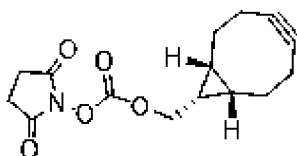
EDC · HCl	гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида
ESI	электрораспылительная ионизация
EtOAc, AcOEt	этилацетат
Et	этил
EtOH	этанол
FCC	колоночная флэш-хроматография
FITC	флуоресцеинизотиоцианат
г	граммы
G	калибр
ч	час(часы)
HATU	гексафторфосфат 2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония-метанаминия
HC	условия для HPLC
HOBT	гидрат 1-гидроксibenзотриазола
HPLC	высокоэффективная жидкостная хроматография
IPA	2-пропанол
IR	инфракрасная спектроскопия
i или iso	изо
K ₂ CO ₃	карбонат калия
кД, кДа	килодальтон
л	литр(литры)
LCMS	жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
М	моль/л
МГц	мегагерц
m	мультиплет
Me	метил
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
мг	миллиграмм(миллиграммы)
мкг	микрограмм
мМ	миллимоль/л
мм	миллиметр(миллиметры)
мин	минуты
мл	миллилитр(миллилитры)

ммоль	миллимоли
мкл	микролитр
мкмоль	микромоль
MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоная кислота
MS	масс-спектрометрия
MsCl	метансульфонилхлорид
MsOH	метансульфоная кислота
MWCO	порог отсечения по молекулярной массе
<i>масса/заряд</i>	соотношение массы и заряда
н.	нормальный
NA	нет данных
NaBH ₄	борогидрид натрия
NaBH ₃ CN	цианоборогидрид натрия
Na(AcO) ₃ BH	триацетоксиборогидрид натрия
нг	нанограмм
NH ₄ Cl	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	комплекс дихлорид 1,1'-
Pd(dppf)Cl ₂ •CH ₂ Cl ₂	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
$t_{1/2}$	период полувыведения
t_r или вр. удерж.	время удерживания
TBAF	фторид тетра- <i>n</i> -бутиламмония
TBSCl, TBDMSCl	<i>трет</i> -бутилдиметилсилилхлорид
TEA, Et ₃ N, NEt ₃	триэтиламин
трет-	третичный
TFA	трифторуксусная кислота
Tf ₂ O	трифторметансульфоновый ангидрид
THF	тетрагидрофуран
TLC	тонкослойная хроматография
TMS	триметилсилил
TMSOTf	триметилсилилтрифторметансульфонат
Трис	<i>трис</i> (гидроксиметил)аминометан
Triton X-100	трет-октилфеноксиполиэтоксиганол (CAS 9002-93-1)
Ts	<i>n</i> -толуолсульфонил
TsOH	<i>n</i> -толуолсульфоновая кислота
Tween 20	полисорбат 20, полиоксиэтилен-(20)-сорбитанмонолаурат
UPLC	сверхэффективная жидкостная хроматография
UV	ультрафиолетовое излучение
об./об.	объем к объему
вес/об.	вес к объему
вес/вес	вес к весу

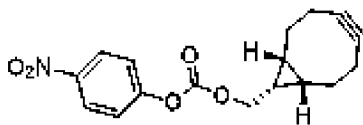
Способы

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 А. М. 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 А (0,1% муравьиная кислота в воде), В (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 mM гидроксид 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: Acclaim PepMap C4, 5 мкм, 300 Å, (300 мкм × 15 см); подвижная фаза A (0,1% муравьиная кислота в воде/ацетонитриле (95/5%)), B (0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле/изопропанол/воде (47,5/47,5/5%)); градиент (время (мин.)/%B): 0/5, 2/5, 10/40, 11/95, 13/95, 14/5, 20/5. Образцы разбавляли 1/100 в MeOH/H₂O (50/50%) и данные ESI-MS регистрировали на системе Lumos Orbitrap MS, связанной с Ultimate 3000 CapLC. Масс-спектр положительных ионов подвергали деконволюции с помощью BioPharma Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific) и представляли массу.

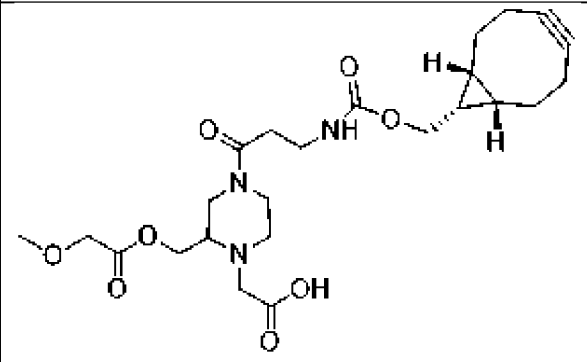
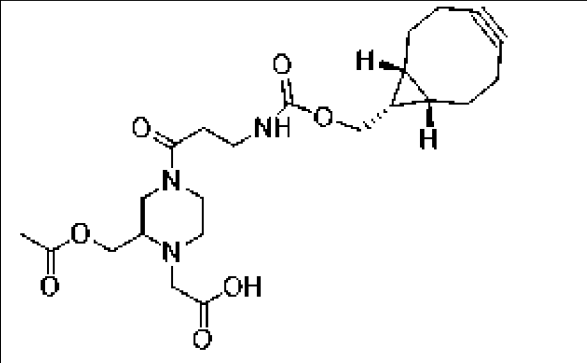
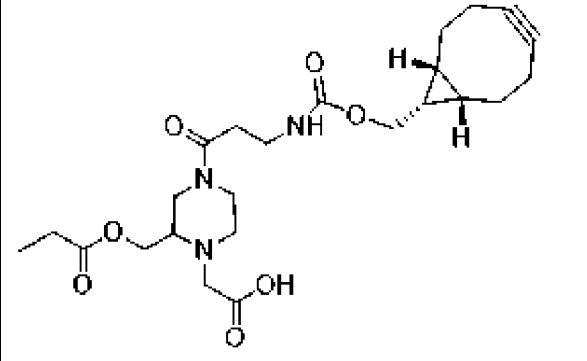
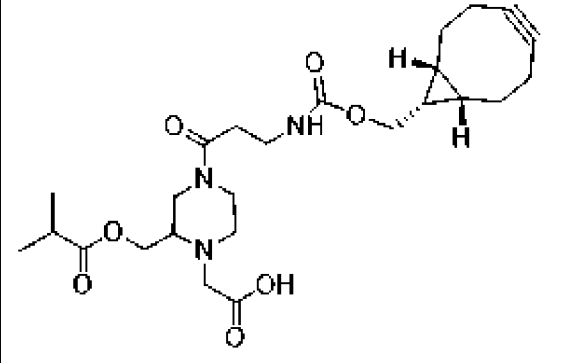
Способ 10

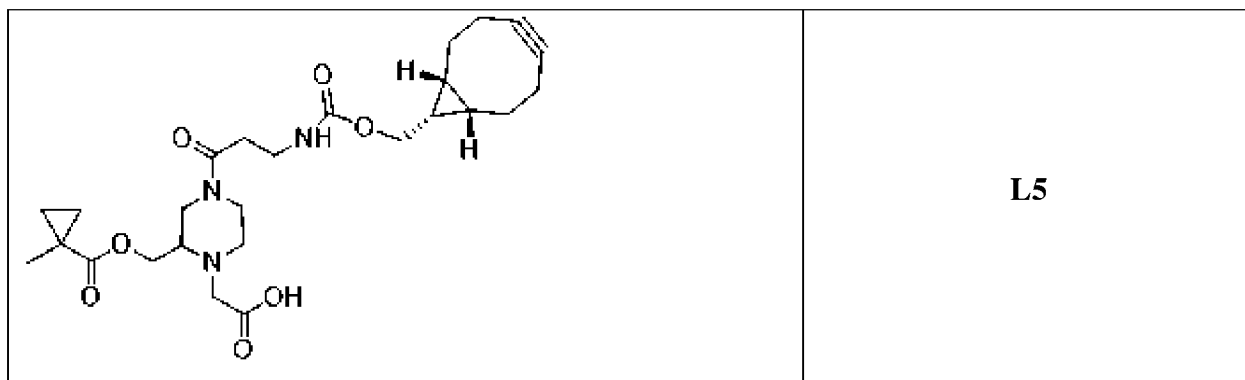
Колонка Acquity UPLC HSS T3 C18 (1,8 мкм, 2,1 × 50 мм); температура колонки 60°C; скорость потока 1,0 мл/мин.; время остановки 2,00 мин.; элюент A1-0,05% муравьиная кислота+3,75 mM ацетат аммония в воде; элюент B1-0,04% муравьиная кислота в ацетонитриле; время градиентного элюирования (мин.)/%A (элюент A1):/%B (элюент B1): 0,00/95:5; 1,40/2:98; 1,80/2:98; 1,90/95:5; 2,00/95:5. Прибор UPLC был соединен с одноквадрольным масс-спектрометром с применением ионизации электрораспылением (ESI) в режиме как положительных, так и отрицательных ионов. 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 аминоксодержащим лекарственным средством, так и с носителем.

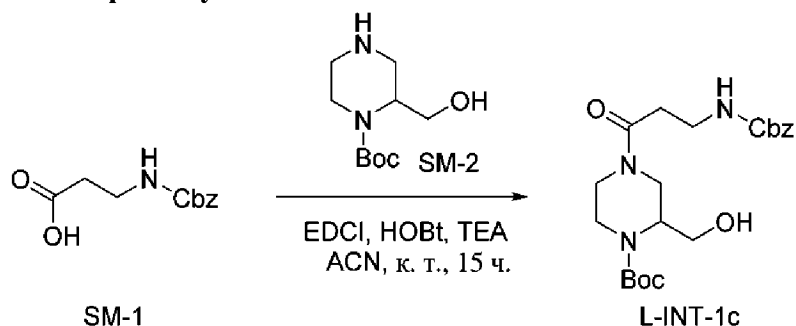
Таблица 6. Бесследные линкеры L1-L5

Структура	Номер
	L1
	L2
	L3
	L4

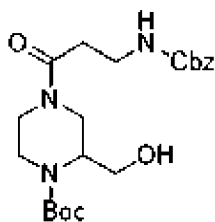


Синтез бесследных линкеров

Общее промежуточное соединение: L-INT-1c

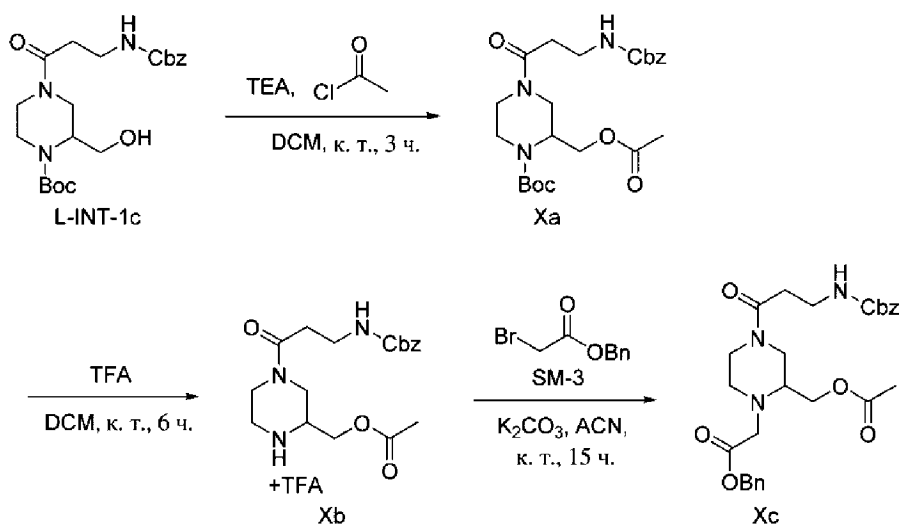


L-INT-1c. 1-(Boc)-2-(гидроксиметил)-4-(N-Cbz-бета-аланил)пиперазин

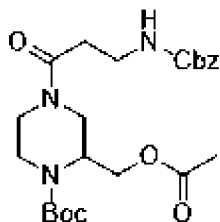


В колбу объемом 250 мл загружали трет-бутил-2-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат **SM-2** (5,81 г, 26,9 ммоль), 3-(((бензилокси)карбонил)амино)пропановую кислоту **SM-1** (5 г, 22,4 ммоль) и ацетонитрил (100 мл). К данной суспензии последовательно добавляли триэтиламин (9,37 мл, 67,2 ммоль), HOBT (0,686 г, 4,48 ммоль) и EDC.HCl (6,44 г, 33,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. После завершения данного периода времени смесь разбавляли водой и три раза экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой последовательно промывали с помощью 1 М раствора HCl, насыщенного раствора NaHCO₃ и, наконец, солевого раствора. Органический слой высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали in vacuo с применением роторного испарителя с получением L-INT-1c (8,75 г, выход 83%) в виде бесцветного масла. Материал применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. MS (ESI+; способ 10): *масса/заряд* 422,5 (M+H). ¹H ЯМР (500 МГц, MeOH-d₄) δ 7,49-7,27 (m, 5H), 5,15-4,98 (m, 2H), 4,56-4,27 (m, 1H), 4,19-3,83 (m, 3H), 3,61-3,37 (m, 4H), 3,29-2,55 (m, 5H), 1,49 (s, 9H).

Промежуточное соединение Xc в синтезе линкеров

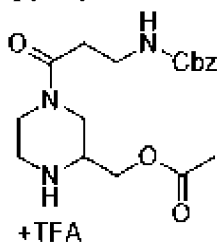


Xa. 1-(Boc)-2-(ацетоксиметил)-4-(N-Cbz-бета-аланил)пиперазин



В колбе объемом 500 мл получали раствор **L-INT-1c** (8,6 г, 20,4 ммоль) в дихлорметане (160 мл). Раствор охлаждали до 0°C с применением бани со льдом, затем добавляли триэтиламин (7,11 мл, 51,0 ммоль) с последующим добавлением ацетилхлорида (1,74 мл, 24,48 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. После завершения данного периода времени смесь гасили водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенный органический слой последовательно промывали солевым раствором, высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали *in vacuo* с применением роторного испарителя с получением **Xa** (10,6 г, выход 95%) в виде желтого масла. Материал применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. MS (ESI⁺; способ 10): *масса/заряд* 464,3 (M+H). ¹H ЯМР (500 МГц, MeOH-d₄) δ 7,48-7,27 (m, 5H), 5,18-5,01 (m, 2H), 4,54-3,84 (m, 6H), 3,47-3,36 (m, 2H), 3,19-2,51 (m, 5H), 2,33-2,01 (m, 3H), 1.49 (s, 9H). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

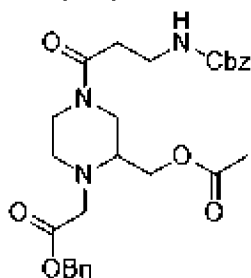
Xb. 1-(N-Cbz-бета-Аланил)-3-(ацетоксиметил)пиперазин в форме соли трифторуксусной кислоты



К раствору **Xa** (10,6 г, 19,44 ммоль) в дихлорметане (160 мл) при 0°C медленно добавляли трифторуксусную кислоту (22,46 мл, 292 ммоль). Баню со льдом удаляли и

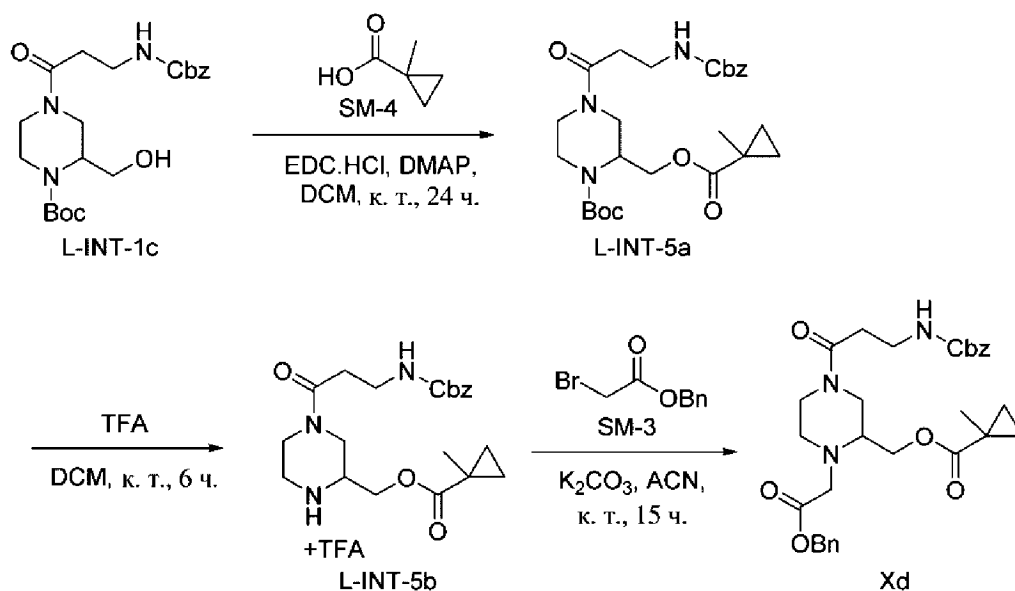
раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. После завершения данного периода времени смесь концентрировали до сухого состояния с получением **Xb** в форме соли трифторуксусной кислоты, которую применяли без дополнительной очистки. MS (ESI+): *масса/заряд* 364,3 (M+H). ^1H ЯМР (500 МГц, MeOH- d_4) δ 7,52-7,22 (m, 5H), 5,09 (s, 2H), 4,62-4,04 (m, 4H), 3,71-3,38 (m, 5H), 3,17-2,59 (m, 4H), 2,27-2,10 (m, 3H). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

Хс. Сложный бензиловый эфир 2-(ацетоксиметил)-4-(N-Cbz-бета-аланил)-1-пиперазинуксусной кислоты

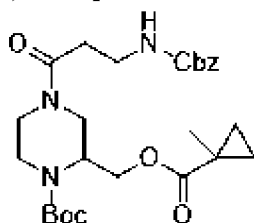


В колбу объемом 250 мл загружали **Xb** (16 г, 18,1 ммоль), карбонат калия (7,50 г, 54,3 ммоль) и ацетонитрил (160 мл). Затем добавляли бензил-2-бромацетат **SM-3** (4,26 мл, 27,1 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. После завершения данного периода времени реакционную смесь гасили водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой последовательно промывали соевым раствором, высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали *in vacuo* с применением роторного испарителя. Неочищенную смесь очищали с помощью флэш-хроматографии (Biotage isolera, колонка RediSep: 220 г диоксида кремния, элюент А: дихлорметан, элюент В: дихлорметан+MeOH (9:1), градиент от 0 до 100% В за 20 мин.) с получением смеси, которая была недостаточно чистой. Проводили вторую очистку с применением флэш-хроматографии (Biotage isolera, колонка RediSep: диоксид кремния SI KP-NH, 44 г, элюент А: циклогексан, элюент В: этилацетат, градиент от 0 до 100% В за 20 мин.) с получением **Xc** (6,52 г, выход 63%) в виде бесцветного масла. MS (ESI+): *масса/заряд* 512,3 (M+H). ^1H ЯМР (500 МГц, MeOH- d_4) δ 7,49-7,15 (m, 10H), 5,17 (s, 2H), 5,08 (s, 2H), 4,19-3,96 (m, 3H), 3,82-3,54 (m, 3H), 3,40 (m, 2H), 3,27-3,08 (m, 2H), 3,06-2,94 (m, 1H), 2,88-2,73 (m, 2H), 2,69-2,52 (m, 2H), 1,99 (d, J=5,1 Гц, 3H). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

Xd. Сложный бензиловый эфир 2-(1'-метилциклопропилкарбонилоксиметил)-4-(N-Cbz-бета-аланил)-1-пиперазинуксусной кислоты

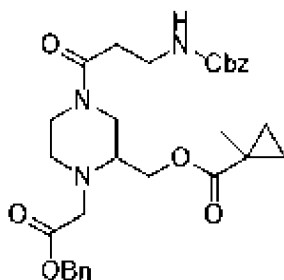


L-INT-5a. 1-(Boc)-2-(1'-метилциклопропилкарбонилосиметил)-4-(N-Cbz-бета-аланил)пиперазин



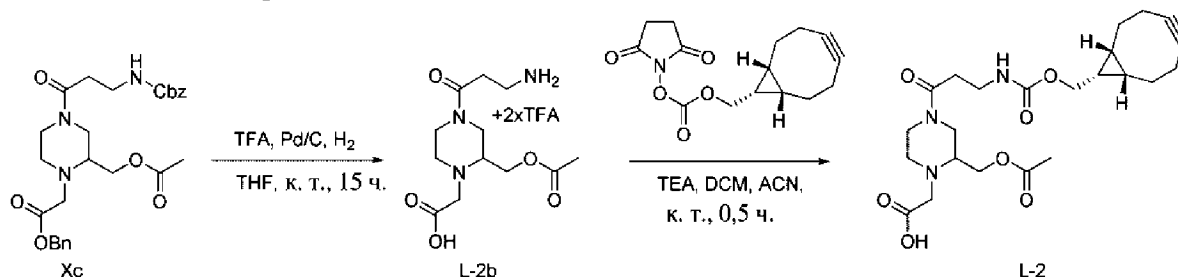
К раствору 1-метилциклопропанкарбоновой кислоты **SM-4** (47,5 мг, 0,475 ммоль) в дихлорметане (2 мл) добавляли **EDC·HCl** (91 мг, 0,475 ммоль) и **DMAP** (58,0 мг, 0,475 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин. при комнатной температуре и добавляли **L-INT-1c** (100 мг, 0,237 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. После завершения данного периода времени реакционную смесь гасили насыщенным раствором хлорида аммония и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой последовательно высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали до сухого состояния с применением роторного испарителя. Неочищенный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (Teledyne Isco, колонка: RediSep 4 г, элюент А: дихлорметан, элюент В: дихлорметан/MeOH 8:2, градиент от 0 до 100% В за 20 мин.) с получением необходимого соединения (97 мг, выход 77%) в виде светло-желтого масла. MS (ESI⁺; способ 10): *масса/заряд* 504,2 (M+H).

Xd. Сложный бензиловый эфир 2-(1'-метилциклопропилкарбонилосиметил)-4-(N-Cbz-бета-аланил)-1-пиперазинуксусной кислоты

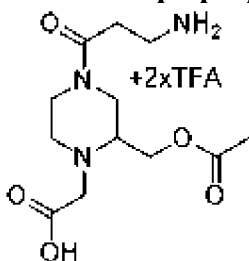


Xd получали за две стадии из L-INT-5a, следуя общим способам, описанным для синтеза **Xb** и **Xc**. **L-INT-5**: UPLC-MS (способ 10): время удерживания=1,18 мин.; MS (ESI+): *масса/заряд* 552,4 (M+H). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,40-7,30 (m, 10H), 7,19-7,17 (m, 1H), 5,14-5,06 (m, 2H), 5,05-5,00 (m, 2H), 4,07-3,97 (m, 2H), 3,91-3,79 (m, 1H), 3,67-3,56 (m, 3H), 3,23-3,18 (m, 2H), 3,10-2,88 (m, 3H), 2,78-2,57 (m, 3H), 2,45-2,39 (m, 2H), 1,20 (m, 3H), 1,08-1,07 (m, 2H), 0,72-0,71 (m, 2H).

Бесследные линкеры L1-L7

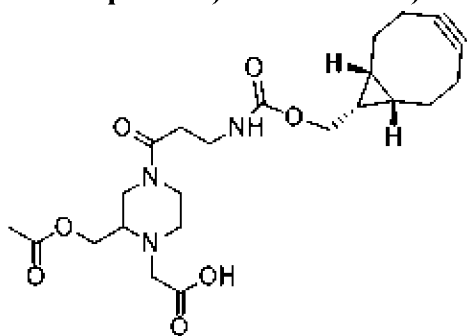


L-2b. 2-(Ацетоксиметил)-4-(бета-аланил)-1-пиперазинуксусная кислота в форме соли бис-трифторуксусной кислоты



Xc (3 г, 5,86 ммоль) растворяли в тетрагидрофуране (60 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (1,04 мл, 13,49 ммоль) с последующим добавлением палладия на угле (0,624 г, 5,86 ммоль). В колбе последовательно создавали вакуум и ее повторно заполняли водородом. Операцию повторяли три раза и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. После завершения данного периода времени смесь разбавляли смесью дихлорметана/метанола (9:1, 50 мл) и фильтровали через слой целита. Целит осторожно промывали метанолом (50 мл) и объединенный фильтрат концентрировали *in vacuo* с получением неочищенного указанного в заголовке материала **L-2b** (3,2 г, выход 95%) в виде желтоватой пены. MS (ESI+): *масса/заряд* 288,3 (M+H). ^1H ЯМР (500 МГц, MeOH-d₄) δ 4,50-4,16 (m, 3H), 4,10-3,82 (m, 3H), 3,72-3,39 (m, 4H), 3,29-3,20 (m, 3H), 2,92-2,76 (m, 2H), 2,11 (d, J=5,1 Гц, 3H). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

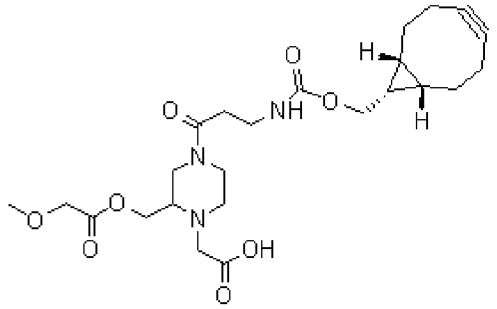
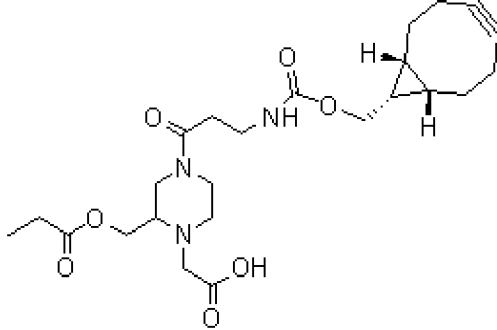
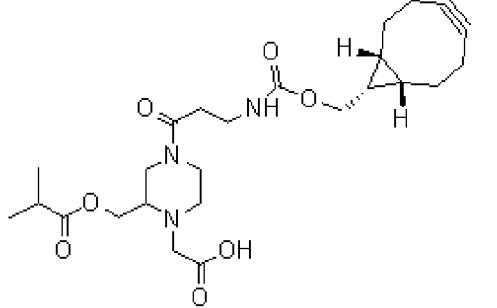
L2. 2-(Ацетоксиметил)-4-(N-(((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метоксикарбонил)-бета-аланил)-1-пиперазинуксусная кислота

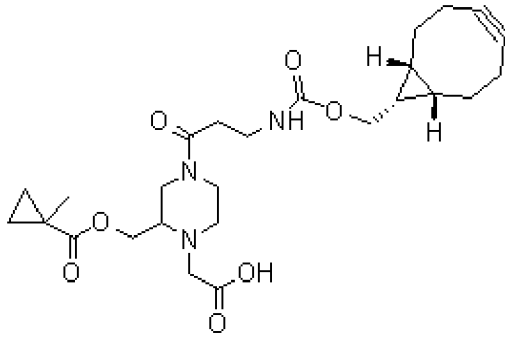
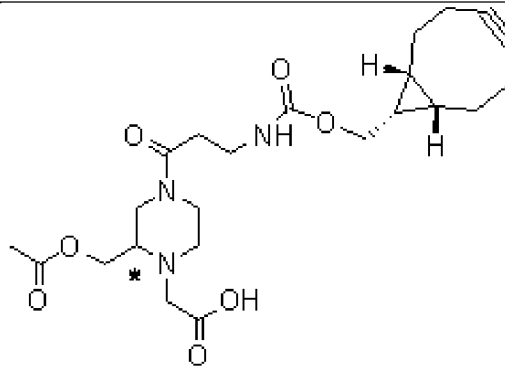
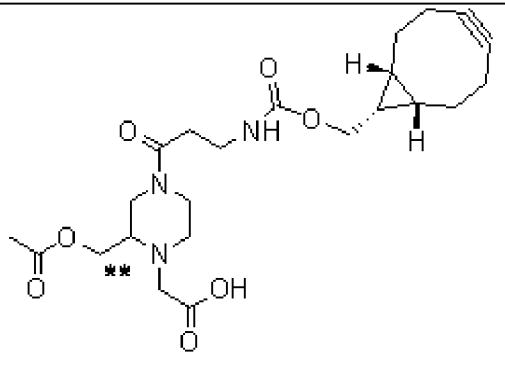


Неочищенный **L-2b** (200 мг, 0,349 ммоль) поглощали в дихлорметане (2 мл) и ацетонитриле (3 мл) с получением слегка мутной смеси. Добавление триэтиламина (0,195 мл, 1,397 ммоль) и ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбоната (112 мг, 0,384 ммоль) приводило к получению раствора, который выпаривали через 1 ч. Неочищенный материал либо (i) 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 mM гидроксида аммония) в воде, 30 мл/мин.). Фракции выпаривали, подвергали быстрому замораживанию и лиофилизировали с получением **L2**; либо (ii) непосредственно адсорбировали на Isolute и очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой (Teledyne Isco, колонка: RediSep C18 Gold 15,5, элюент А: вода, элюент В: ацетонитрил, градиент от 10 до 100% В за 20 мин.) с получением **L2** после лиофилизации. Белый порошок. UPLC-MS (способ 10): время удерживания=0,71 мин.; MS (ESI+): *масса/заряд* 464,3 (M+H). ¹H ЯМР (500 МГц, MeOH-d₄) δ 4,31-4,11 (m, 4H), 4,06-3,96 (m, 1H), 3,84-3,64 (m, 1H), 3,55-3,36 (m, 5H), 3,29-3,00 (m, 2H), 2,98-2,74 (m, 2H), 2,66-2,54 (m, 2H), 2,32-2,16 (m, 6H), 2,10-2,03 (m, 3H), 1,69-1,57 (m, 2H), 1,46-1,35 (m, 1H), 1,03-0,89 (m, 2H). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

Соединения, показанные в таблице 7, получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **L2**.

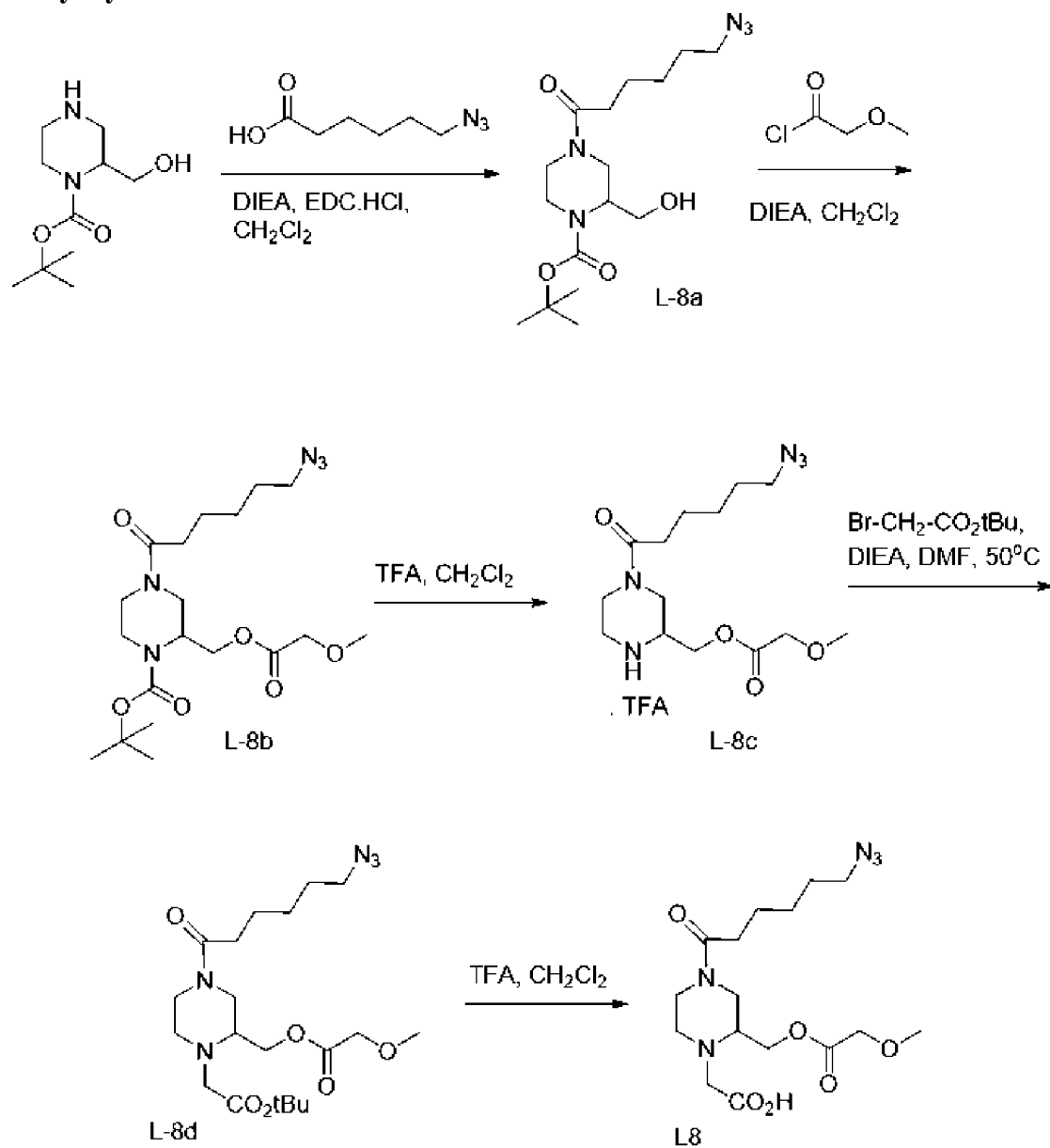
Таблица 7. Иллюстративные бесследные линкерные соединения			
Структура	Номер (исходное промежуточно е соединение)	LCMS: [M+H]; время удержи- вания; способ	¹ H-ЯМР (400 МГц, CD ₃ OD)

 2-(2'-Метоксиацетоксиметил)-4-(N-(((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метоксикарбонил)-бета-аланил)-1-пиперазинуксусная кислота	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), 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)

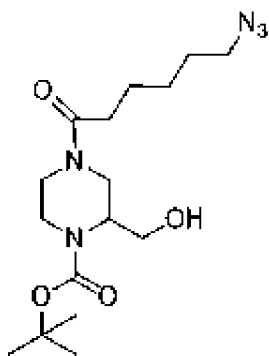
 2-(1'- Метилциклопропилкарбонил)оксиме тил)-4-(N-(((1R,8S,9s)- бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9- ил)метоксикарбонил)-бета-аланил)- 1-пиперазинуксусная кислота	L5 (L-INT-5)	504,2; 1,09 мин.; 1	4,16 (m, 4H); 3,99 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,5- 3,35 (m, 5H), 3,06 (m, 1H), 2,93 (m, 1H), 2,88 (dt, 1H), 2,77 (m, 1H), 2,61 (m, 2H), 2,19 (m, 6H), 1,60 (m, 2H), 1,38 (m, 1H), 1,29 (s, 3H), 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

(((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метоксикарбонил)-бета-аланил)-1-пиперазинуксусная кислота			
--	--	--	--

Бесследный линкер L8. 2-(2'-Метоксияцетоксиметил)-4-(6'-азидогексаноил)-1-пиперазинуксусная кислота

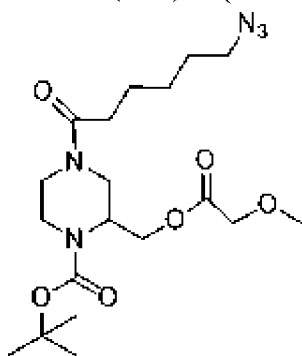


L-8a. 1-(Boc)-2-(гидроксиметил)-4-(6'-азидогексаноил)пиперазин



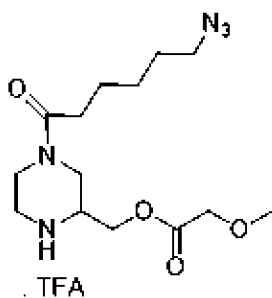
6-Азидогексановую кислоту (743 мг, 4,73 ммоль) и гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (1,0 г, 5,22 ммоль) отвешивали в круглодонную колбу и растворяли в дихлорметане (20 мл). Через 5 мин. добавляли твердый трет-бутил-2-(гидроксиметил)пиперазин-1-карбоксилат (0,98 г, 4,53 ммоль) и 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 М HCl (2 × 50 мл), 1 М NaOH (1 × 50 мл) и солевого раствора (1 × 50 мл). Органическую фазу концентрировали с получением **L-8a**. MS (ESI+): *масса/заряд* 356,3 (M+H).

L-8b. 1-(Вос)-2-(2'-метоксиацетоксиметил)-4-(6''-азидогексаноил)пиперазин



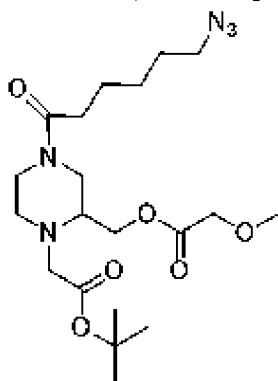
L-8a (959 мг, 2,70 ммоль) растворяли в дихлорметане (12 мл) в круглодонной колбе. Добавляли магнитный мешальник и диизопропилэтиламин (1 мл, 5,73 ммоль), затем добавляли 2-метоксиацетилхлорид (0,32 мл, 3,51 ммоль) и колбу закупоривали. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Через 6 ч. дополнительно добавляли 100 мкл 2-метоксиацетилхлорида. Через 30 мин. реакционную смесь разбавляли с помощью 90 мл этилацетата и промывали с помощью 1 М HCl (2 × 25 мл) и солевого раствора (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



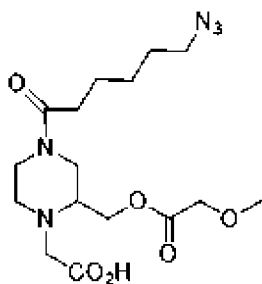
L-8b (846 мг, 1,979 ммоль) растворяли в трифторуксусной кислоте (10 мл, 130 ммоль) и дихлорметане (10 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре. Через 1 ч. растворители удаляли с помощью роторного испарителя и продукт высушивали под вакуумом с получением **L-8c**. MS (ESI+): *масса/заряд* 328,2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

L-8d. Сложный трет-бутиловый 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 мешалником. 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+формат).

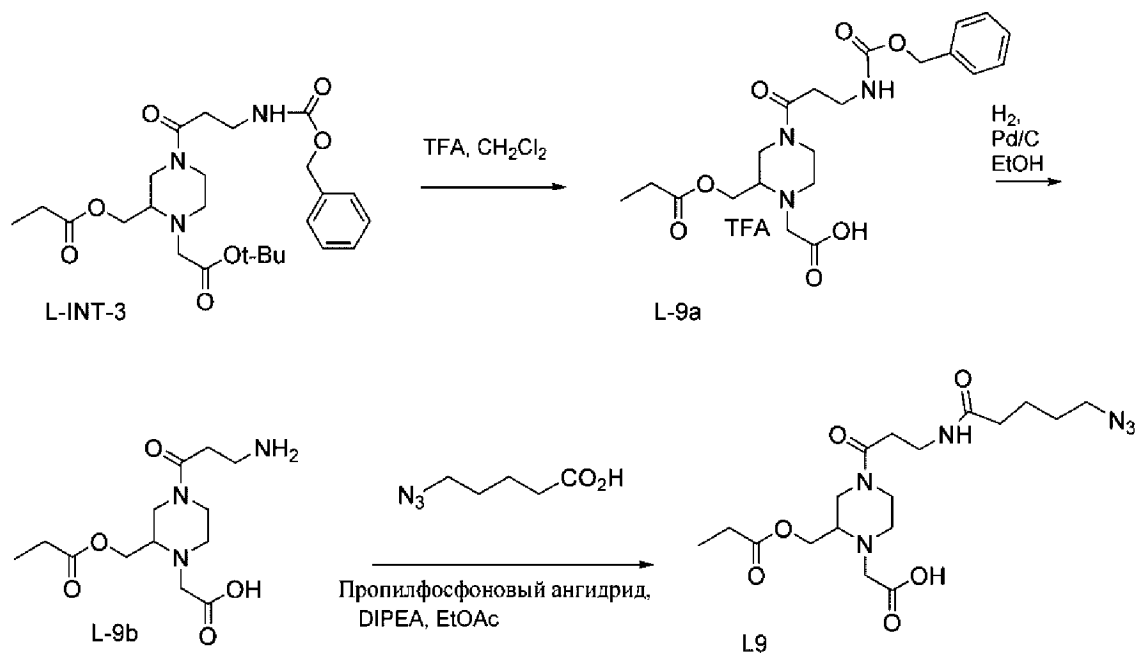
L8. 2-(2'-Метоксиацетоксиметил)-4-(6''-азидогексаноил)-1-пиперазинуксусная кислота



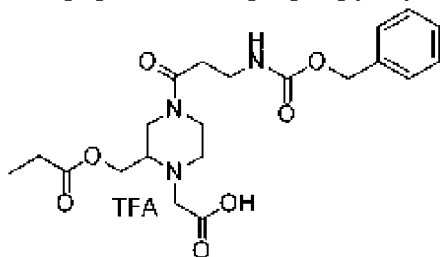
L-8d (150 мг, 0,317 ммоль) растворяли в дихлорметане (5 мл) и трифторуксусной кислоте (5 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение

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 HPLC с обращенной фазой 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% CH₃CN/H₂O/0,7 мин., 10-30% CH₃CN/H₂O/3,5 мин., 30-95% CH₃CN/H₂O 0,5 мин. (CH₃CN и H₂O с содержанием 0,1% TFA); скорость потока: 75 мл/мин.; температура колонки: комнатная температура; соотношение *масса/заряд* в собранном спектре: +385.

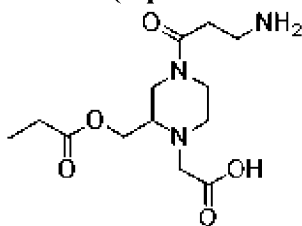
Бесследные линкеры: L9-L11



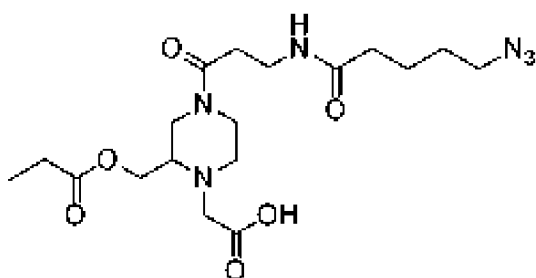
L-9a. 2-(Пропаноилоксиметил)-4-(N-Cbz-бета-аланил)-1-пиперазинуксусная кислота в форме соли трифторуксусной кислоты



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 пентаном 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 полученному 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 водой и выпаривали. После первоначальной флэш-хроматографии (SiO₂, 10% метанол:дихлорметан) 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). ¹H-ЯМР (MeOH-d₄, ppm) (все присвоения 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). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

Соединения, показанные в таблице 8, получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза L-9.

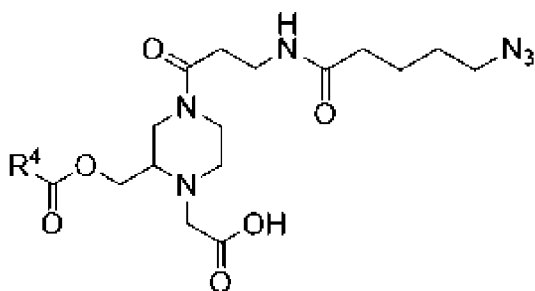
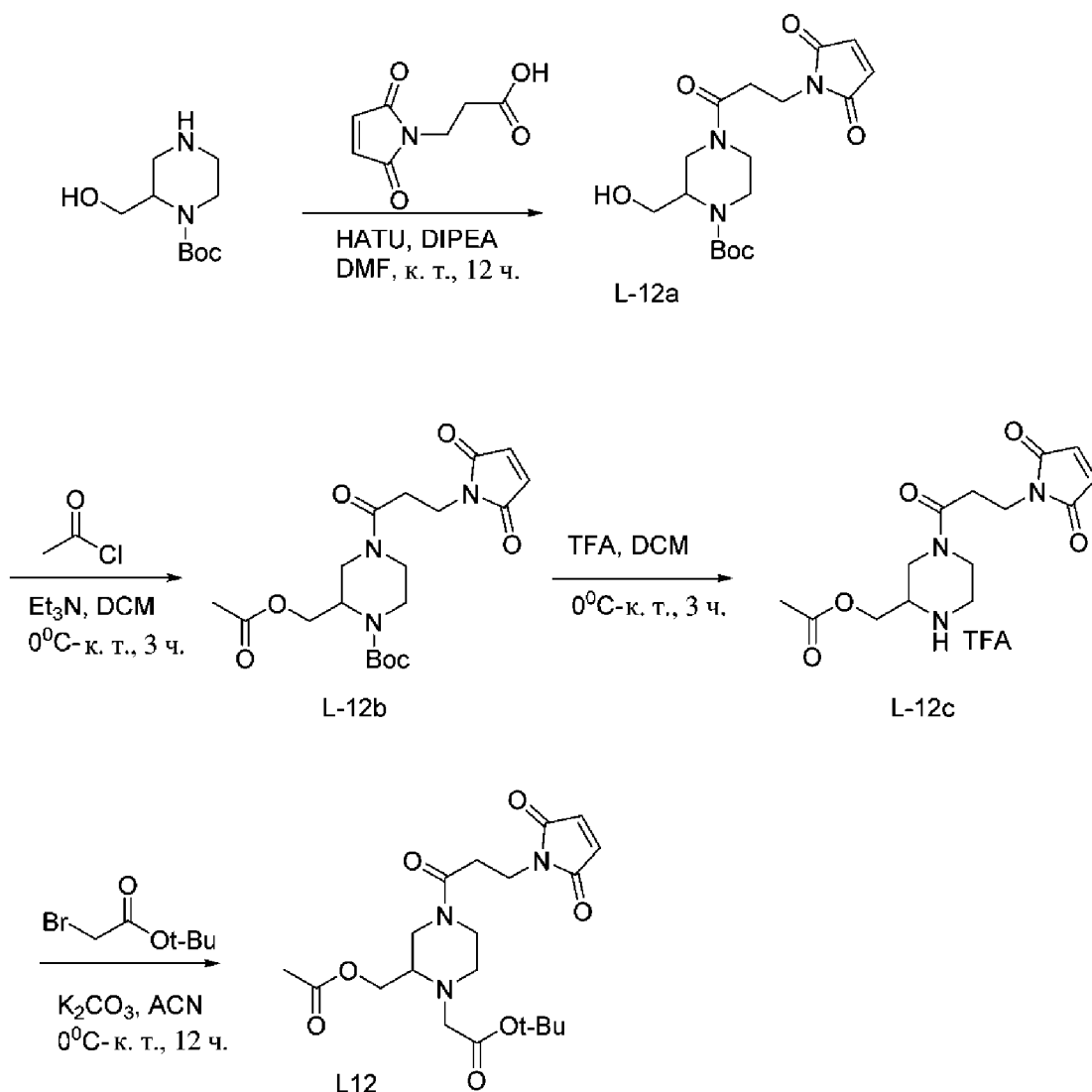
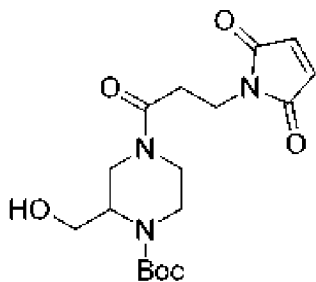


Таблица 8. Иллюстративные бесследные линкерные соединения			
R ⁴ , название	Номер (исходное промежуточн ое соединение)	LCMS: [M+H]; время удерживания ; способ	¹ H-ЯМР (300 МГц, CD ₃ OD)
R ⁴ = (CH ₃) ₂ CH- 2- (Изобутаноилоксимети л)-4-(N-(5'- азидопентаноил)-бета- аланил)-1- пиперазинуксусная кислота	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, 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'- Метилциклопропилкар бонилоксиметил)-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



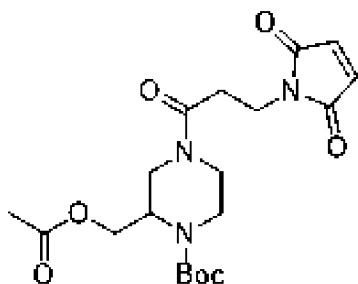
L-12a. 1-(Boc)-2-(гидроксиметил)-4-(N-малеоил-бета-аланил)пиперазин



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 солевым раствором, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. В результате очистки посредством флэш-хроматографии (нейтральный оксид алюминия, 2% метанол:этилацетат) получали

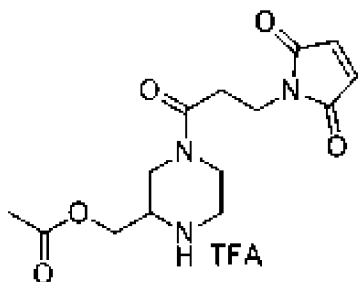
указанный в заголовке материал **L-12a**. LCMS (способ 6): время удерживания=2,87 мин.

L-12b. 1-(Вос)-2-(ацетоксиметил)-4-(N-малеонил-бета-аланил)пиперазин



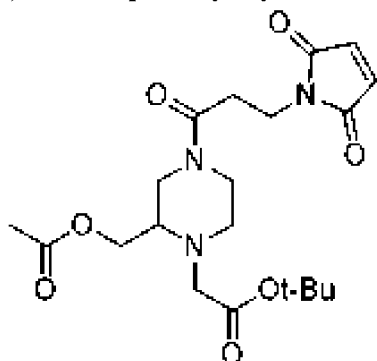
К **L-12a** (300 мг, 0,82 ммоль) и триэтиламину (330 мг, 3,27 ммоль) в дихлорметане (4 мл) при 0°C в атмосфере аргона по каплям добавляли ацетилхлорид (125 мг, 1,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч., затем обрабатывали водой и экстрагировали дихлорметаном.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

L-12c. 1-(N-Малеонил-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 пентаном и высушивали с получением неочищенного указанного в заголовке материала **L-12c**. LCMS (способ 6): время удерживания=1,709 мин.; MS (ESI+): масса/заряд 310 (M+H).

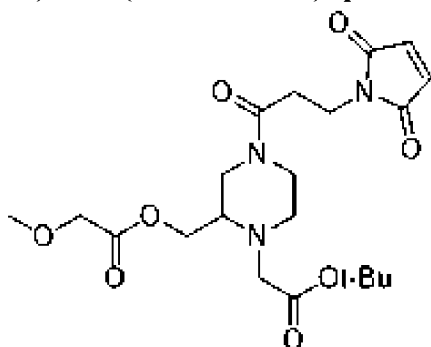
L12. Сложный трет-бутиловый эфир 2-(ацетоксиметил)-4-(N-малеонил-бета-аланил)-1-пиперазинуксусной кислоты



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 ее 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). ¹H-ЯМР (CDCl₃, 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. Сложный трет-бутиловый эфир 2-(2'-меток시아цетоксиметил)-4-(N-малеоил-бета-аланил)-1-пиперазинуксусной кислоты ((1-(2-(трет-бутоксид)-2-оксоэтил)-4-(3-(малеимидил)пропаноил)пиперазин-2-ил)метил-2-меток시아цетат)

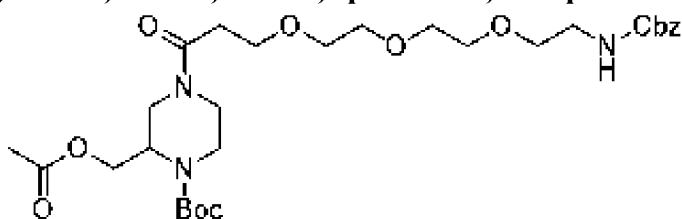


L13. LCMS (способ 6): время удерживания=3,04 мин.; MS (ESI+): *масса/заряд* 454,5 (M+H). ¹H-ЯМР (CDCl₃, ppm) 6,70 (s, 2H), 4,40-4,24 (m, 1H), 4,20-4,10 (m, 1H), 4,07-4,60 (d, J=4, 2H), 4,02-3,94 (m, 1H), 3,87-3,83 (t, J=8, 2H), 3,70-3,60 (m, 1H), 3,68-3,60 (m, 1H), 3,58-3,51 (m, 1H), 3,45 (s, 3H), 3,41-3,39 (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

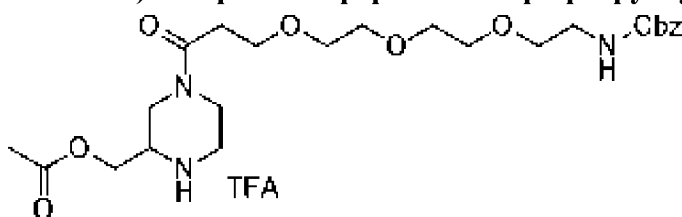
растворенному в дихлорметане (20 мл), при 0°C добавляли диизопропилэтиламин (1,79 г, 13,9 ммоль) и HATU (2,10 г, 5,55 ммоль). Раствор перемешивали в течение 15 мин. при 0°C. Добавляли 3-(2'-(2''-(2'''-(N-Cbz)-амино)этокси)этокси)пропановую кислоту (1,64 г, 4,63 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч. при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали соевым раствором, высушивали над сульфатом натрия и концентрировали. В результате очистки с помощью флэш-хроматографии (SiO₂, 1-4% метанол:дихлорметан) получали указанный в заголовке 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'''-(N-Cbz)-амино)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 с помощью флэш-хроматографии (SiO₂, 1-4% метанол:дихлорметан) с получением указанного в заголовке 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'''-(N-Cbz)-амино)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 пентаном и высушивали с получением неочищенного указанного в заголовке материала **L-14c**, который переносили в следующую реакцию без дополнительной очистки или анализа.

L14. Сложный трет-бутиловый эфир 2-(ацетоксиметил)-4-(3'-(2''-(2'''-(N-Cbz)-амино)этокси)этокси)пропаноил)-1-пиперазинуксусной кислоты

Соединения, показанные в таблице 9, получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **L14**.

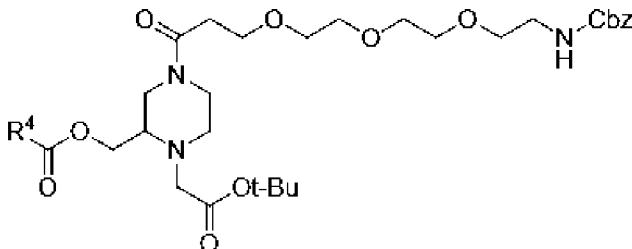
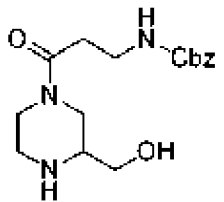
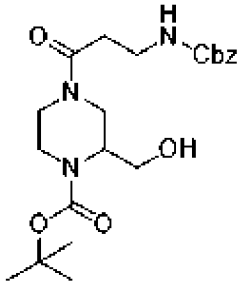
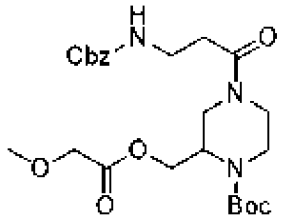
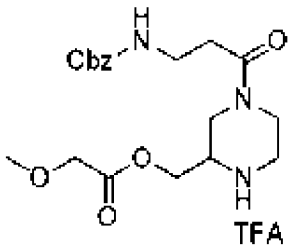
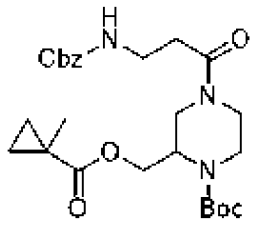
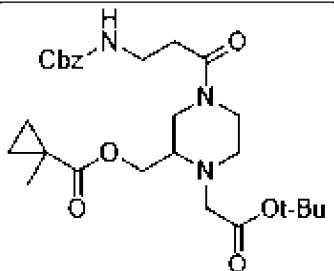


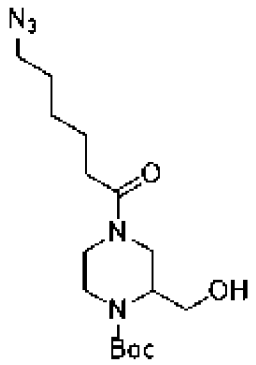
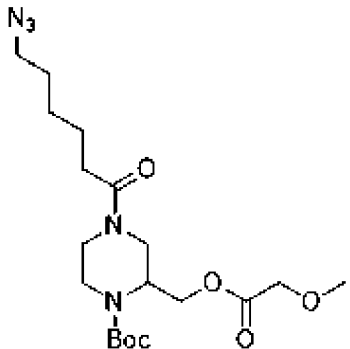
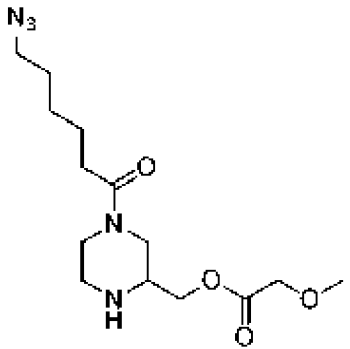
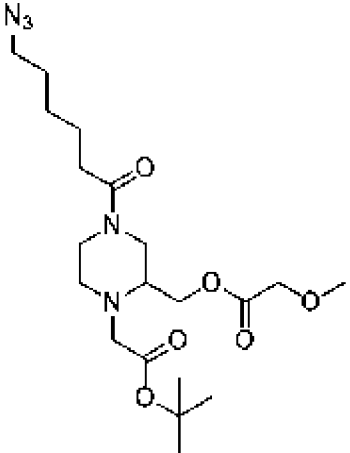
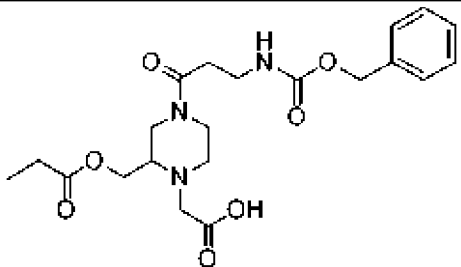
Таблица 9. Иллюстративные бесследные линкерные соединения			
R⁴, название	Номер	LCMS: [M+H]; время удержива ния; способ	¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃)
R ⁴ =CH ₃ CH ₂ - Сложный трет-бутиловый эфир 2- (пропаноилоксиметил)-4-	L15	624,35; 3,60 мин.; 5	7,36-7,30 (m, 5H), 5,41 (s 1H), 5,09 (s, 2H), 4,28-3,96 (m, 3H), 3,78-3,74 (t, J=6, 3H), 3,60-3,53 (m, 12H), 3,43-3,22 (m, 6H), 3,10-

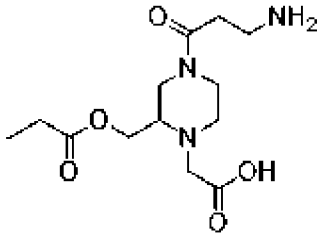
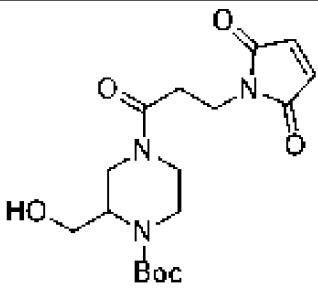
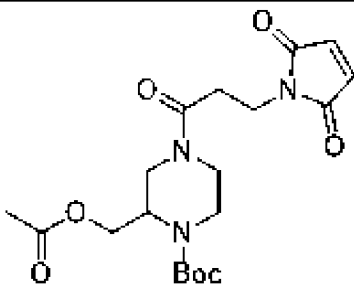
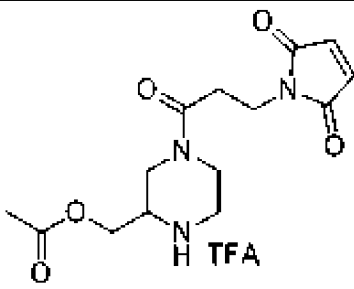
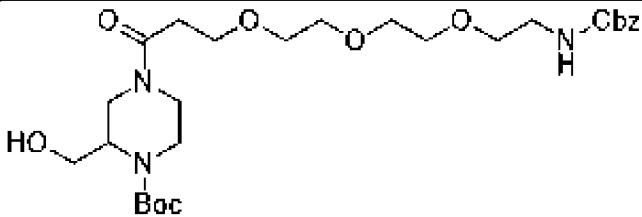
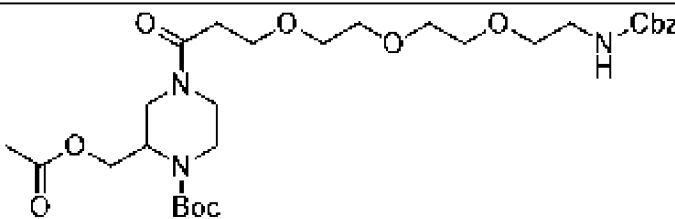
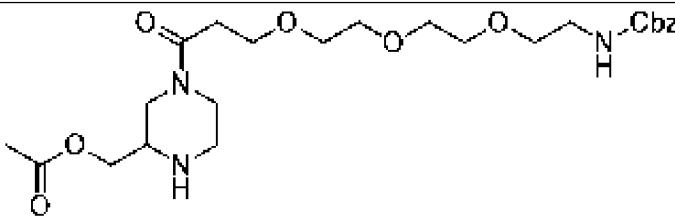
(3'-(2''-(2'''-(2''''-((N-Cbz)-амино)этоксид)этоксид)этоксид)пропаноил)-1-пиперазинуксусной кислоты			2,92 (m, 2H), 2,81-2,74 (m, 2H), 2,61-2,56 (t, J=9, 2H), 2,39-2,30 (m, 2H), 1,63 (s, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,16-1,10 (t, J=6, 3H).
R ⁴ = (CH ₃) ₂ CH- Сложный трет-бутиловый эфир 2-(изобутаноилоксиметил)-4-(3'-(2''-(2'''-(2''''-((N-Cbz)-амино)этоксид)этоксид)этоксид)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 10. 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	

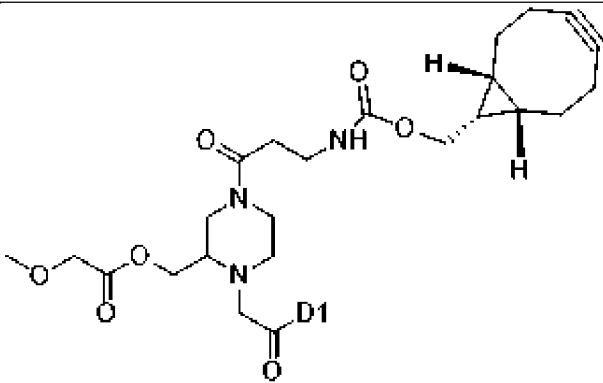
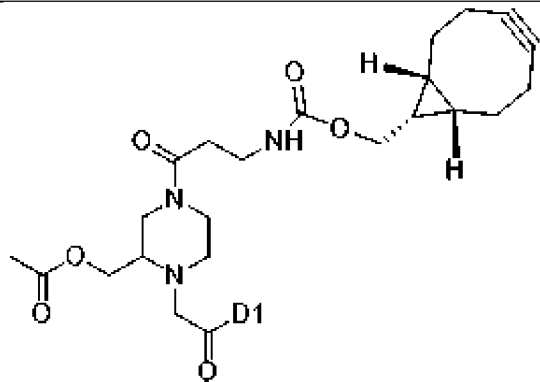
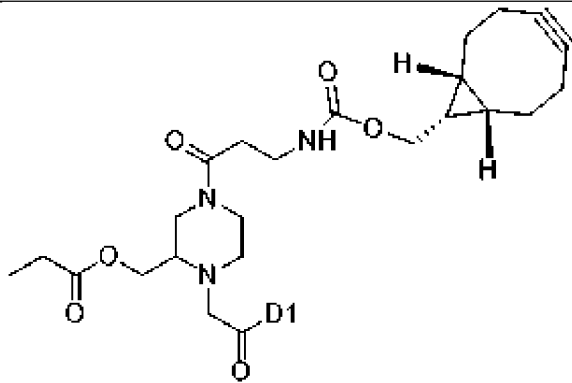
	L-8a	
	L-8b	
	L-8c	
	L-8d	
	L-9a	L-10a, L-11a

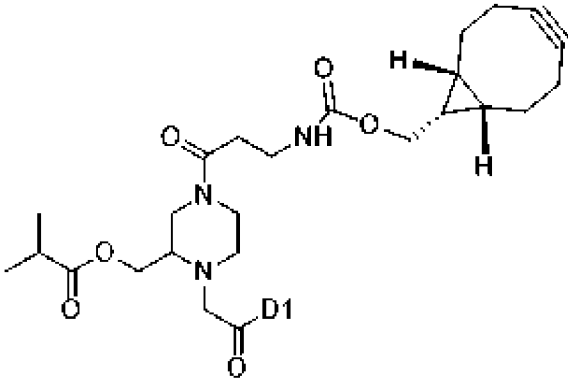
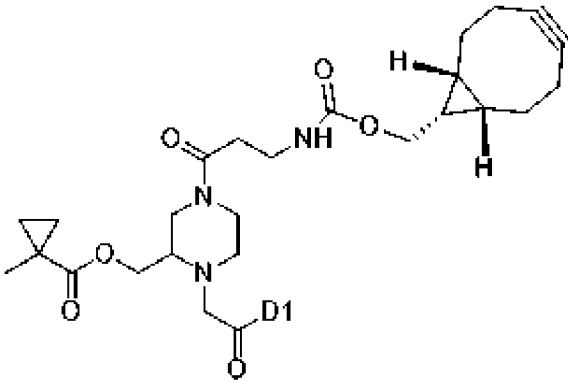
	L-9b	L-10b, L-11b
	L-12a	L-13a
	L-12b	L-13b
	L-12c	L-13c
	L-14a	L-15a, L-16a
	L-14b	L-15b, L-16b
	L-15c	L-15c, L-16c

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. D1, изображенный ниже, содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO:1 и замену K423Q (SEQ ID NO:19).

Таблица 11. Иллюстративные аддукты бесследный линкер-лекарственное средство

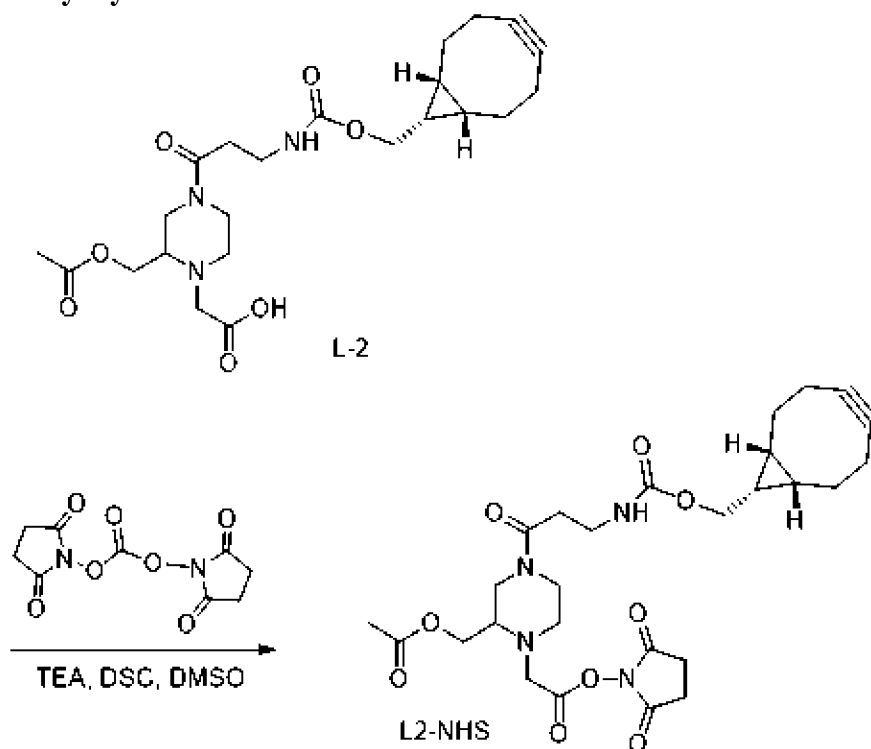
Номер	Структура	Бесследный линкер	Лекарственное средство (D)
L1D1		L1	D1
L2D1		L2	D1
L3D1		L3	D1

L4D1		L4	D1
L5D1		L5	D1

Синтез аддуктов

Ацилирование биологически активных компонентов с помощью бесследного линкера.

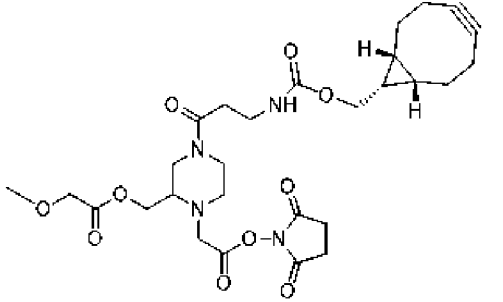
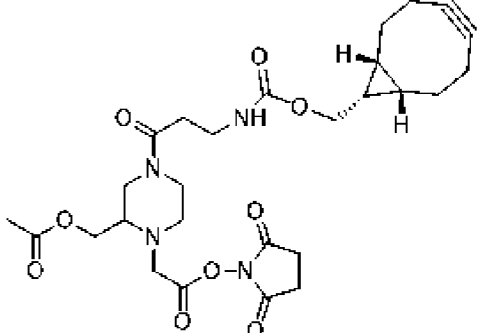
L2-NHS. Сложный N-гидроксисукцинимидовый эфир 2-(ацетилоксиметил)-4-(N-(((1R',8'S,9's)-бицикло[6.1.0]нон-4'-ин-9'-ил)метоксикарбонил)-бета-аланил)-1-пиперазинуксусной кислоты

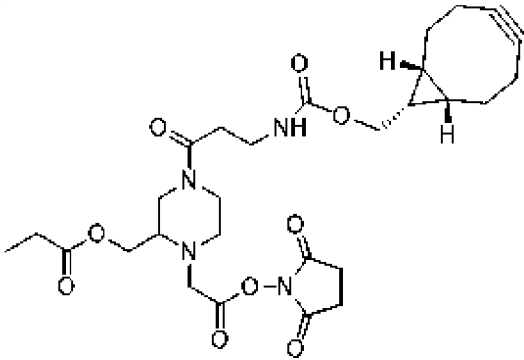
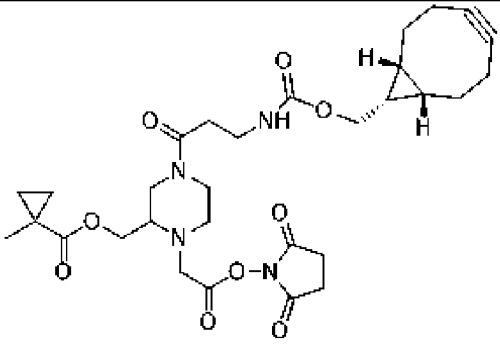


L2 (16 мг, 0,031 ммоль) растворяли в диметилсульфоксиде (0,818 мл) до

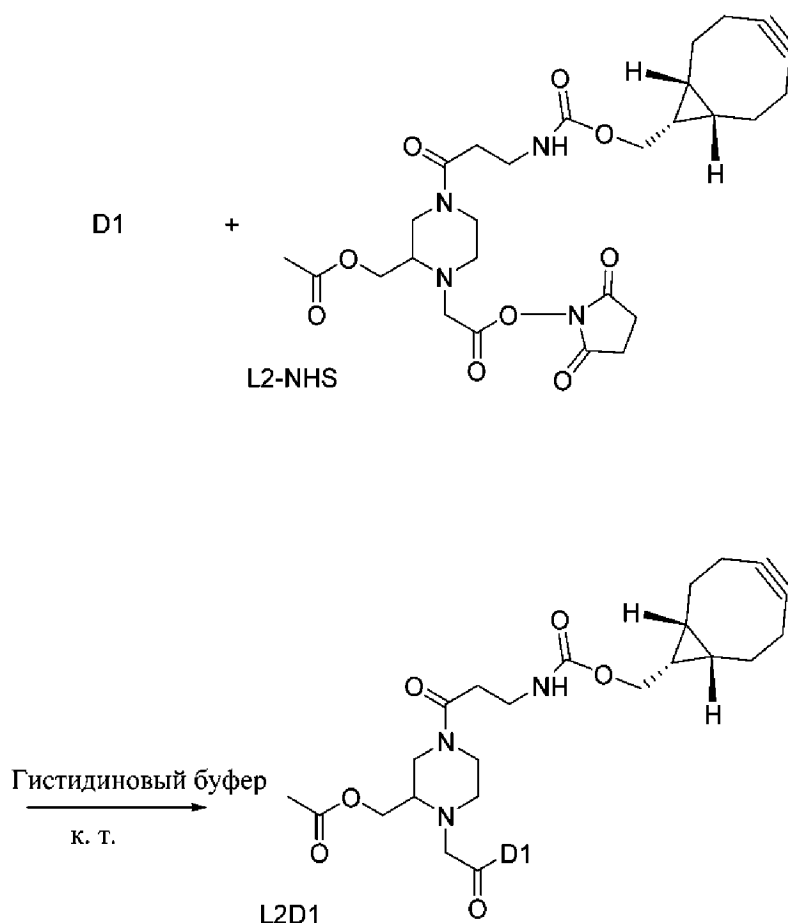
достижения 38 mM концентрации. Добавляли триэтиламин (3,46 мкл, 0,025 ммоль) с последующим добавлением N, N'-дисукцинимидилкарбоната (11,94 мг, 0,047 ммоль) и полученный прозрачный раствор перемешивали в течение 1 ч. при комнатной температуре в атмосфере аргона. Раствор применяли на следующей стадии как таковой, без дополнительной очистки. LCMS (способ 10): время удерживания=0,93 мин.; MS (ESI+): *масса/заряд* 561,4 (M+H).

Соединения из таблицы 12 получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **L2-NHS**.

Таблица 12. Иллюстративные активированные бесследные линкерные соединения			
Структура	Номер (исходное промежу- точное соединени е)	Название	MS (ESI+): <i>масса/заряд</i> (M+H); время удерживани я; способ
	L1-NHS (L1)	Сложный N- гидроксисукцинимиди ловый 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)	Сложный N- гидроксисукцинимиди ловый эфир 2- (ацетоксиметил)-4-(N- (((1'R,8'S,9's)- бицикло[6.1.0]нон-4'- ин-9'- ил)метоксикарбонил)- бета-аланил)-1-	561,4; 0,93 мин.; 10

		пиперазинуксусной кислоты	
	L3-NHS (L3)	Сложный N-гидроксисукцинимидовый 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)	Сложный N-гидроксисукцинимидовый эфир 2-(1'-метилциклопропилкарбонилоксиметил)-4-((N-(((1''R,8''S,9''s)-бицикло[6.1.0]нон-4''-ин-9''-ил)метоксикарбонил)-бета-аланил)-1-пиперазинуксусной кислоты	601,4; 0,99 мин.; 4

L2-D1 (SEQ ID NO:19) (L2D1)

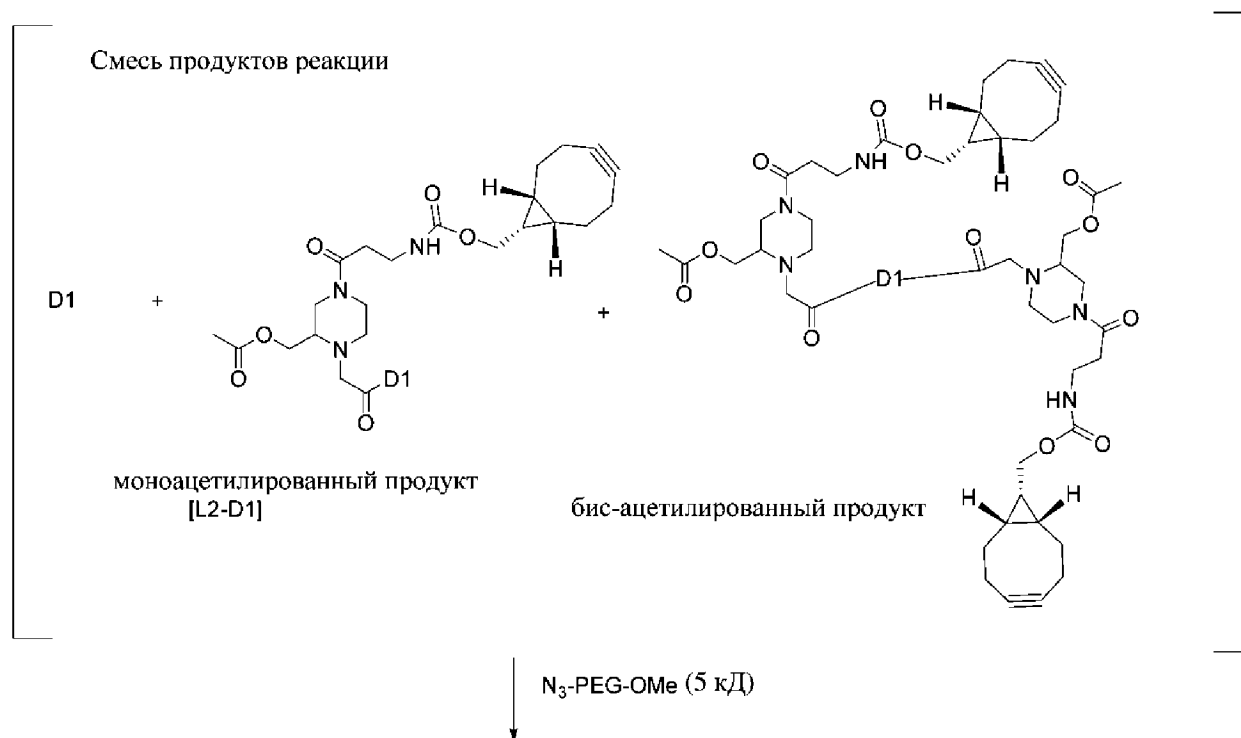


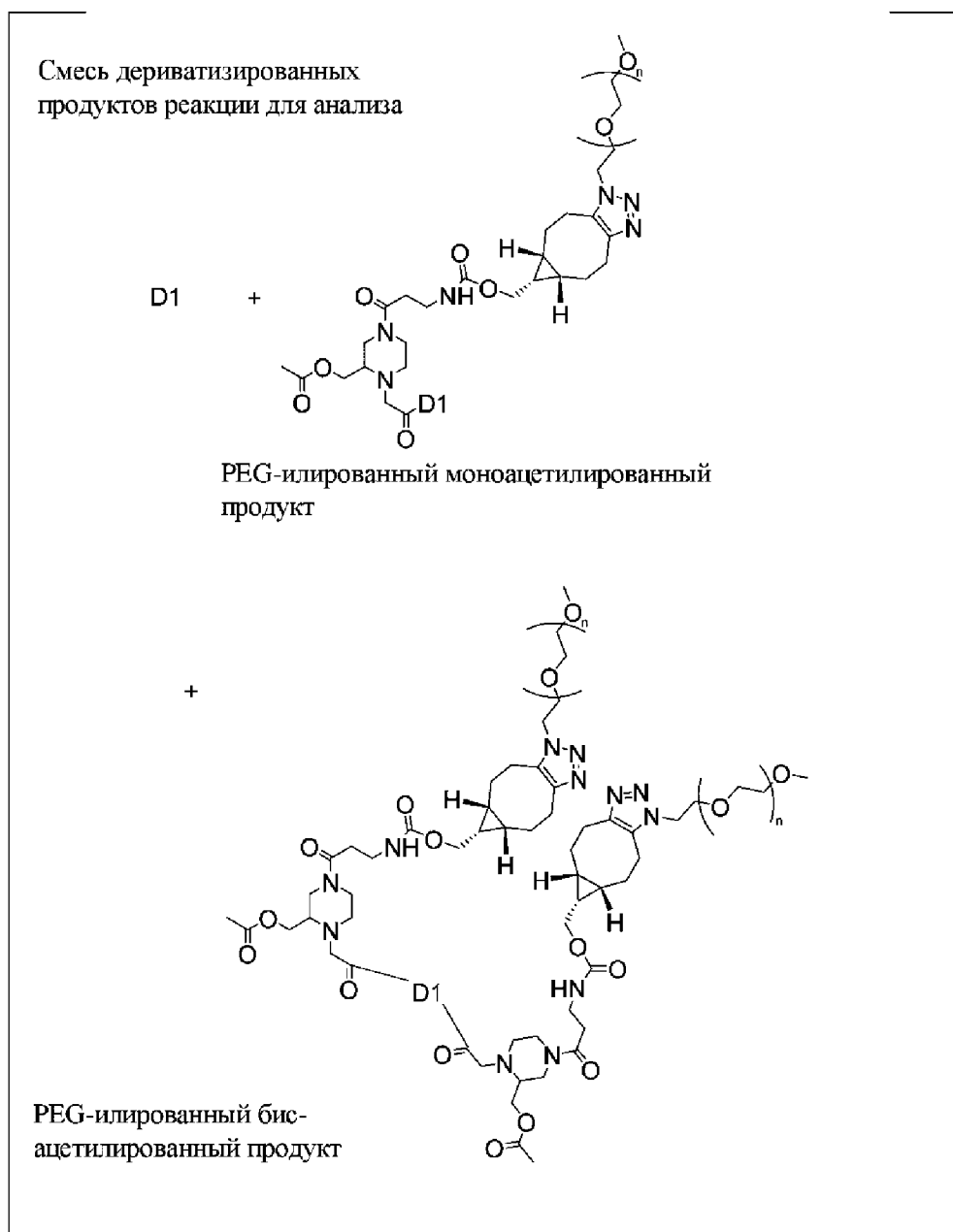
К 10 мг/мл раствору **D1** (SEQ ID NO: 19) (30 мл, 9,66 ммоль) в гистидиновом буфере (20 mM, pH 5,8) или 1x PBS (pH 7,4) медленно добавляли 38 mM раствор L2-NHS в DMSO (0,508 мл, 19,32 ммоль). Реакционную смесь энергично перемешивали вихревым способом и затем встряхивали при комнатной температуре в течение 2 ч. при 200 об./мин. Очистку проводили посредством ультрацентрифугирования (фильтр Amicon, 3 кДа, MWCO, центробежное ускорение 2000 g, 45 мин., к. т.), посредством промывания гистидиновым буфером или 1x PBS (3 раза) удаляли остаточные низкомолекулярные примеси с получением смеси **L2D1** и немодифицированного **D1**. MS (способ 9): *масса/заряд* после деконволюции 29969 (**D1**, M+H); *масса/заряд* после деконволюции 30415 (**L2D1**, M+H, ожидаемая MW=MW (**D1**) + 446).

Важным аналитическим параметром является определение соотношения (немодифицированный **D1**, n=0):(моноацилированный **D1**, n=1):(полиацилированный **D1**, n > 1). Сравнение относительной высоты пиков для различных соединений в масс-спектре позволяет произвести оценку соотношения продуктов.

В дополнительном способе оценки соотношения продуктов реакции использовали анализ с помощью SEC (эксклюзионной хроматографии) дериватизированных продуктов реакции; дериватизация необходима для обеспечения разделения продуктов реакции.

Реакция дериватизации L2D1





Аликвоту из реакционной смеси (10 мг/мл раствора **L2D1**, 0,020 мл, 0,060 мкмоль) обрабатывали метокси-PEG-азидом с $M_n \sim 5$ кДа (Sigma-Aldrich, 689475, 0,014 мл 100 мг/мл раствора в $1 \times$ PBS, 0,28 мкмоль), перемешивали вихревым способом, встряхивали при 37°C в течение 30 мин. и разбавляли с помощью PBS (0,066 мл).

Анализ производного **L2D1**

SEC: (прибор: Agilent LC 1260 Infinity; колонка: Superdex 200 Increase 10/300GL (28-9909-44); температура колонки: к. т., скорость потока: 0,75 мл/мин.; объем введения: 10 мкл; подвижная фаза: 1/9 PBS/вода, предварительно отфильтрованные через мембранный фильтр размером 0,10 (изократический); время прогона: 40 мин.; длины волн обнаружения: 214 нм). **Производное L2D1:** определение соотношения (немодифицированный D1, $n=0$, время удерживания=20,90 мин.) : (моноацилированный D1, $n=1$, время удерживания=18,23 мин.) : (бис-ацилированный D1, $n=2$, время

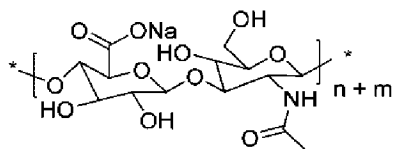
удерживания=16,64 мин.) = [(n=0): (n=1): (n=2)] = 87:12:1.

Пример 3

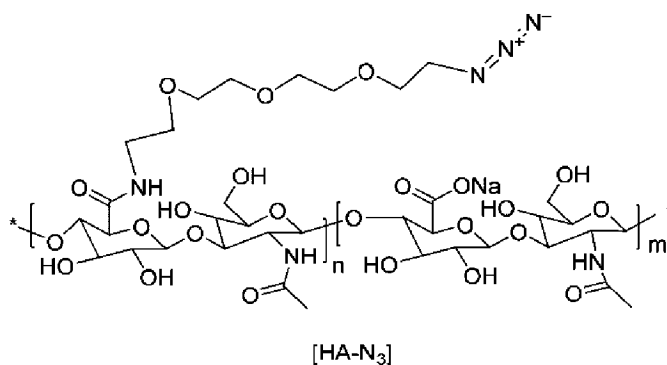
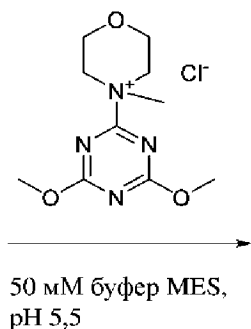
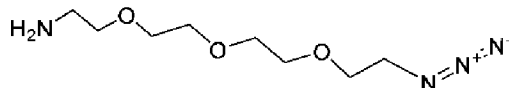
Функционализация гиалуроновой кислоты

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]:



Гиалуроновая кислота (HA), 200 кД



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 mM, 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-амин (N3-PEG3-NH₂, 196 мг, 0,90 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, затем разбавляли с помощью 25 мл 0,25 M 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 M раствора NaCl, а затем 400 мл воды.

Продукт подвергали быстрому замораживанию и лиофилизировали с получением указанного в заголовке материала **[HA-N3]-23%**.

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 4,45 (bs, 2H), 4,0-3,1 (m, 15,5H), 1,95 (s, 3H).

DOSY-ЯМР. Спектры одномерной диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР (DOSY) снимали с использованием индуцированного эха с одной последовательностью очищенных градиентных импульсов (stegp1s1d) на приборе Bruker AVANCE III, работающем при 400 МГц (для ¹H), с криозондом DCH диаметром 5 мм. Время диффузии и время градиента диффузии устанавливали на 50 мс и 4 мс соответственно. Два спектра снимали при силе градиента (gprz6), 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 низкомолекулярные примеси.

Элементный анализ: C: 40,05%; H: 5,67%; N: 5,70%.

Степень замещения **[HA-N3]** определяли как % повторяющихся звеньев, в которых карбоксилатный компонент был подвергнут реакции с получением изображенного амида. Элементный анализ применяли для определения степени замещения. Соотношение [%C/%N], определенное с помощью элементного анализа очищенного образца, вводили 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 с массой 200 кДа, функционализированная на 23% азидным линкером, обозначена как **[HA-N3]-23%**.

В остальных примерах гиалуроновая кислота с массой 200 кДа, функционализированная на X% азидным линкером, обозначена как **[HA-N3]-X%**.

Получали соединения в таблице 13, 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 М - 1 М NaCl с несколькими сменами раствора для диализа, а затем подвергали диализу в течение 1-3 дней против деионизированной воды, причем также с несколькими сменами раствора для диализа. После завершения образец удаляли из диализной трубки, подвергали быстрому замораживанию и лиофилизовали.

Таблица 13. Иллюстративные функционализированные соединения на основе 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]-19%	19%	1,63/1,08	C: 37,19 N: 4,88
[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%с	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

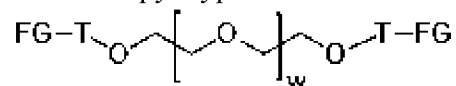
Пример 4

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.



В некоторых аспектах w может составлять 22, 45, 91, 136, 181 или 226 и соответствовать PEG с номинальной средней молекулярной массой, составляющей приблизительно 1 кДа, приблизительно 2 кДа, приблизительно 4 кДа, приблизительно 6 кДа, приблизительно 8 кДа или приблизительно 10 кДа соответственно.

Общая структура 2.

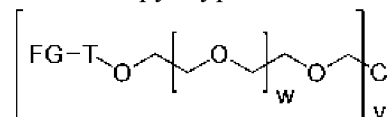
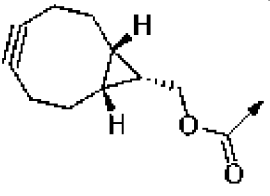
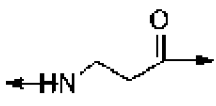
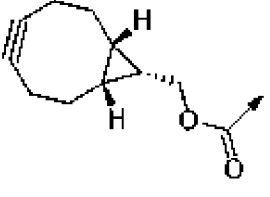
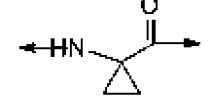
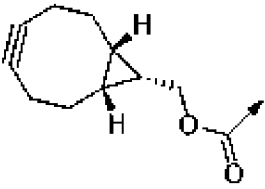
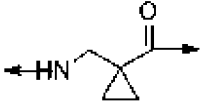
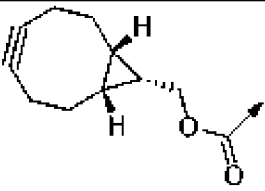
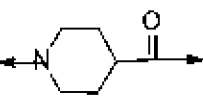
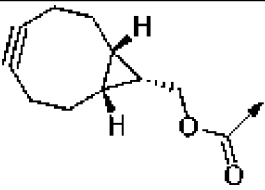
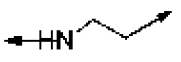
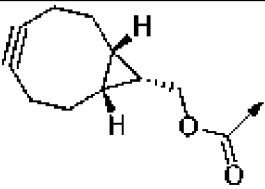
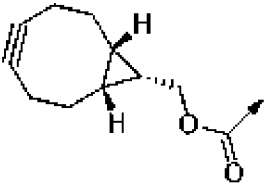
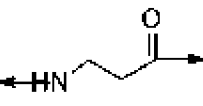
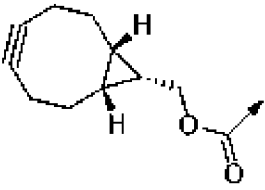
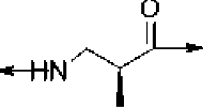
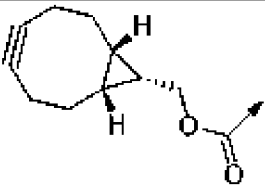
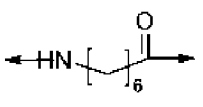
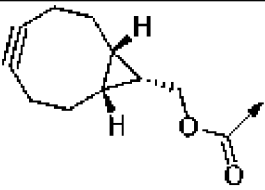
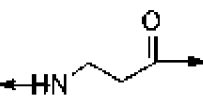
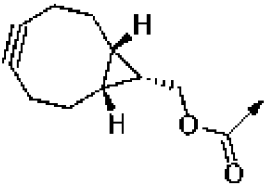
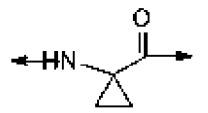
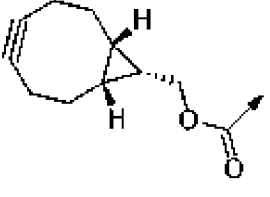
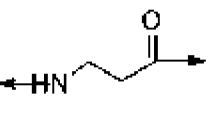
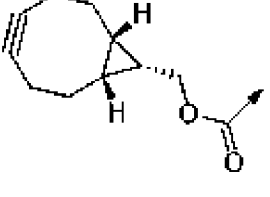
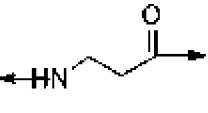
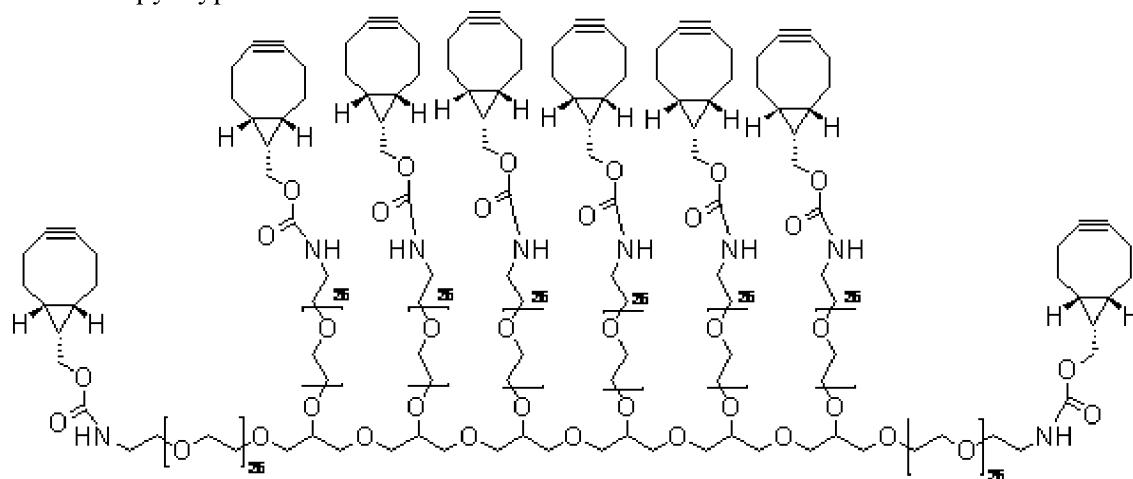


Таблица 14. Иллюстративные сшивающие соединения

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 ~ 226)
XL-7 (коммерческий продукт)	2	N_3	$-CH_2CH_2-$	4	10000 (w ~ 226)
XL-8 (показан ниже)	1			NA	10000 (w ~ 226)
XL-9	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL-10	1			NA	2000 (w ~ 45)
XL-11	1			NA	1000 (w ~ 22)

XL-12	1			NA	4000 (w ~ 90)
XL-13	1			NA	6000 (w ~ 136)
XL-14	1			NA	8000 (w ~ 181)

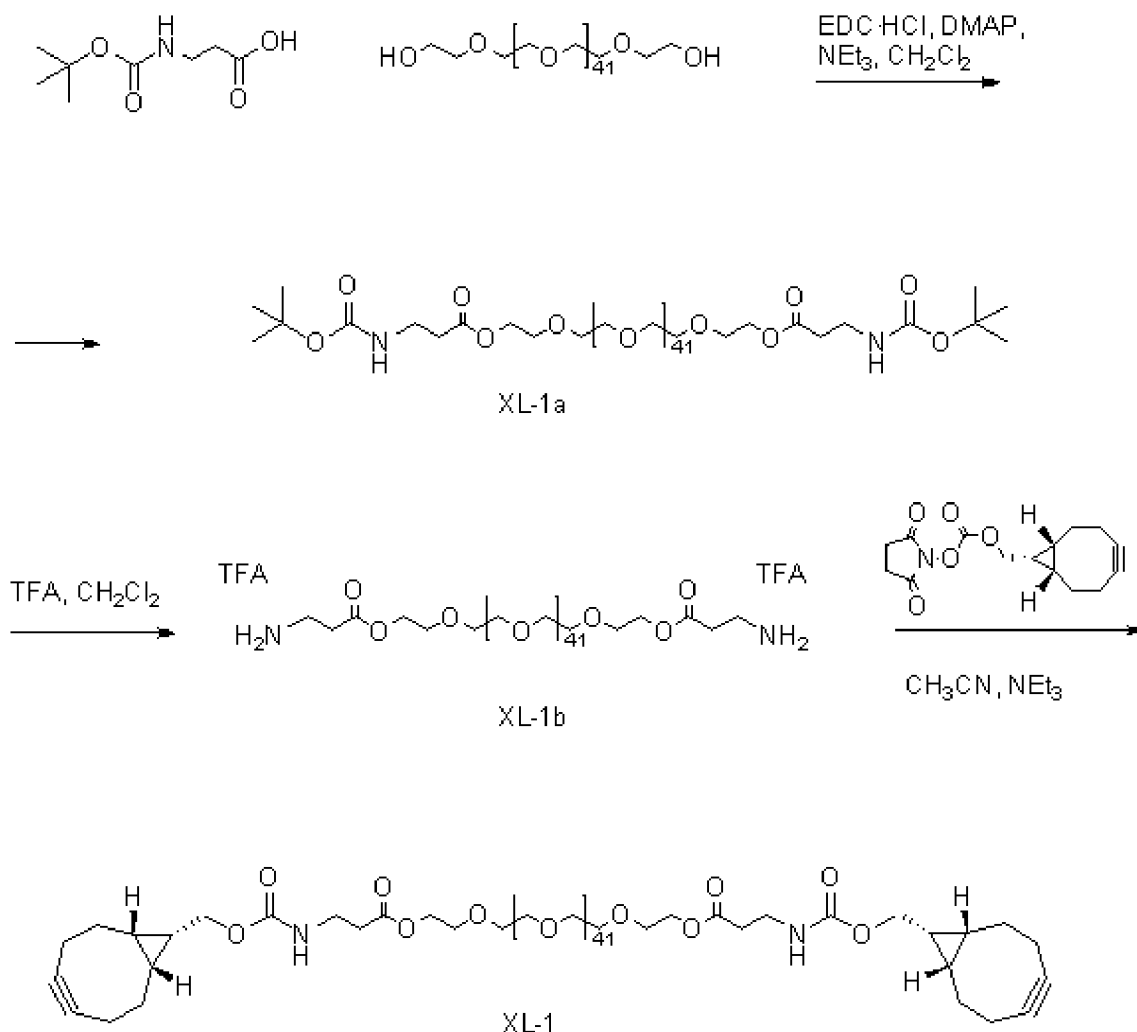
Структура **XL-8**:

MW исходного PEG: $M_n \sim 10000$ кДа.

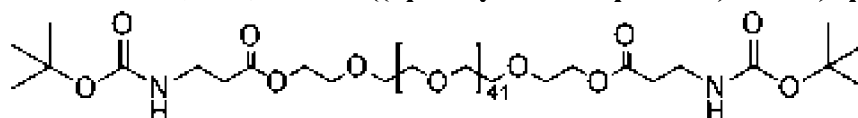
Синтез сшивающих полимеров на основе PEG

Степень замещения является важным параметром для сшивающих средств, полученных из PEG, и определяется как процентная доля концевых групп PEG, замещенных требуемой введенной функциональной группой. Степень замещения определяли с помощью ^1H -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 $[-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-]$, которую сравнивали по интегрированию сигналов с протонами в бицикло[6.1.0]нон-4-иновом компоненте. Степень замещения = $((\text{число молей введенной функциональной группы согласно } ^1\text{H-ЯМР}) / (\text{число молей концевой группы PEG согласно } ^1\text{H-ЯМР})) \times 100$.

XL-1. PEG(2000)-бис-[3-((((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропаноат]

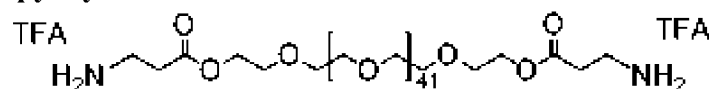


XL-1a. PEG(2000)-бис-[3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропаноат]



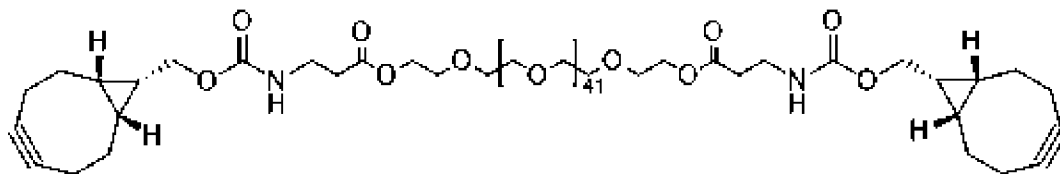
3-((трет-Бутоксикарбонил)амино)пропановую кислоту (1,15 г, 6,0 ммоль) и PEG с $M_n \sim 2$ кДа (3 г, 1,500 ммоль) растворяли в 30 мл дихлорметана. Добавляли диметиламинопиридин (0,092 г, 0,750 ммоль) и EDC·HCl (1,211 г, 6,0 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (с ELSD-детектором) на диоксиде кремния с градиентом 0-20% дихлорметан:дихлорметан/метанол (4:2). Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали до сухого состояния с получением **XL-1a**. ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ 6,83 (t, $J=5,7$ Гц, 2H), 4,16-4,09 (m, 4H), 3,61-3,56 (m, 5H), 3,51 (s, 184H), 3,15 (q, $J=6,7$ Гц, 4H), 2,43 (t, $J=7,0$ Гц, 4H), 1,37 (s, 18H).

XL-1b. PEG(2000)-бис-[3-(амино)пропаноат] в форме соли бис-трифторуксусной кислоты



XL-1a (3,12 г, 1,357 ммоль) растворяли в дихлорметане (36 мл). Добавляли трифторуксусную кислоту (36 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт последовательно растирали с диэтиловым эфиром и отфильтровывали. Операцию повторяли три раза и полученное твердое вещество высушивали под вакуумом с получением **XL-1b**. ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ 7,80 (s, 4H), 4,24-4,11 (m, 4H), 3,72-3,32 (m, 182H), 3,09-2,95 (m, 4H), 2,67 (t, J=6,9 Гц, 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 (600 мг, 0,286 ммоль) растворяли в ацетонитриле (7 мл). Добавляли триэтиламин (1,99 мл, 14,3 ммоль) с последующим добавлением ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбоната (333 мг, 1,14 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (с ELSD-детектором) на диоксиде кремния с градиентом 0-40% дихлорметан:дихлорметан/метанол (4:2). Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали до сухого состояния с получением **XL-1-1**. Для целей хранения **XL-1-1** сохраняли в виде раствора в ацетонитриле (50 мг/мл), помещенного в морозильную камеру. Аналитическая UPLC (способ В, см. ниже): время удерживания=1,19 мин. ^1H ЯМР (500 МГц, MeOH- d_4) δ 4,23 (m, 4H), 4,14 (m, 4H), 3,64 (br s, 214H), 2,55 (m, 4H), 2,22 (m, 12H), 1,61 (m, 4H), 1,35 (m, 2H), 0,92 (m, 4H).

Способ А: аналитическая HPLC с CAD-детектором: Waters XBridge BEH300 C18; размер частиц: 3,5 мкм; размер колонки: 4,6 × 100 мм; элюент/градиент: 2% CH₃CN/H₂O/0,5 мин., 2-98% CH₃CN/H₂O/17,5 мин. (CH₃CN, содержащий 0,05% TFA, и H₂O, содержащая 0,1% TFA); скорость потока: 1 мл/мин.; температура колонки: 50°C.

Способ В: аналитическая UPLC с ELSD-детектором: Waters ACQUITY UPLC HSS T3; размер частиц: 1,8 мкм; размер колонки: 2,1 × 50 мм; элюент/градиент: 5-98% CH₃CN/H₂O за 1,4 мин. (CH₃CN, содержащий 0,04% FA, и H₂O, содержащая 0,05% FA+3,75 mM AA); скорость потока: 1 мл/мин.; температура колонки: 60°C.

Способ С: аналитическая UPLC с CAD: Waters ACQUITY BEH C18; размер частиц: 1,7 мкм; размер пор: 130 Å; размер колонки: 2,1 × 50 мм; элюент/градиент: 5% CH₃CN/H₂O/1,2 мин., 5-95% CH₃CN/H₂O/1,8 мин. (CH₃CN, содержащий 0,1% TFA, и H₂O, содержащая 0,1% TFA); скорость потока: 1 мл/мин.; температура колонки: 45°C.

Соединения из таблицы 15 получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза **XL-1** (за исключением **XL-1-2**).

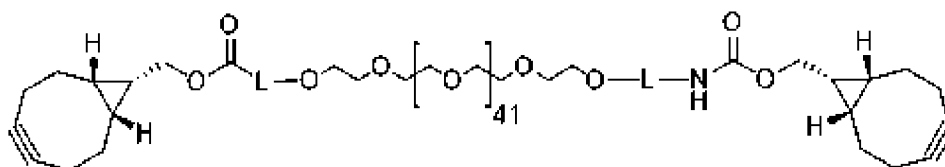
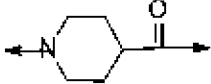
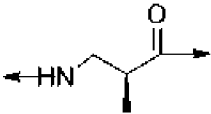
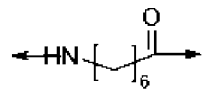


Таблица 15. Иллюстративные сшивающие полимеры на основе PEG

Номер	T	Количество концевых групп PEG, замещенных функционально й группой	Аналит. способ/время удерживания (мин.)	¹ H ЯМР (400 МГц, метанол-d4)
XL-1-1		2 из 2 100%	В 1,19 мин.	(500 МГц) δ 4,23 (m, 4H), 4,14 (m, 4H), 3,64 (br s, 214H), 2,55 (m, 4H), 2,22 (m, 12H), 1,61 (m, 4H), 1,35 (m, 2H), 0,92 (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%	В 1,20 мин.	δ 4,30-4,14 (m, 8H), 3,66 (s, 186H), 2,35-2,13 (m, 12H), 1,64 (d, J=12,2 Гц, 4H), 1,51 (m, 4H), 1,41 (m, 2H), 1,17 (m, 4H), 1,02-0,93 (m, 4H).
XL-3		2 из 2 100%	А 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%	A 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%	C 1,85 мин.	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%	C 1,96 мин.	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:

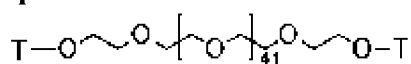
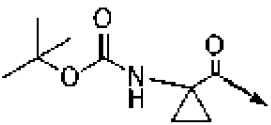
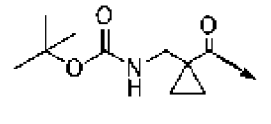
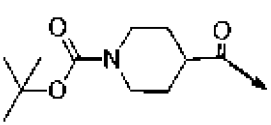
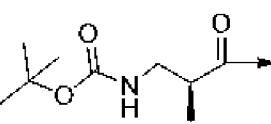
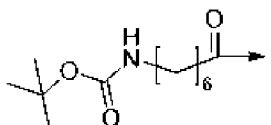
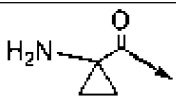
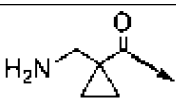
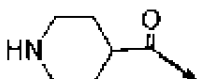
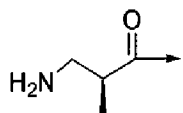
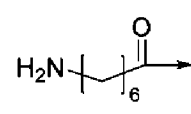
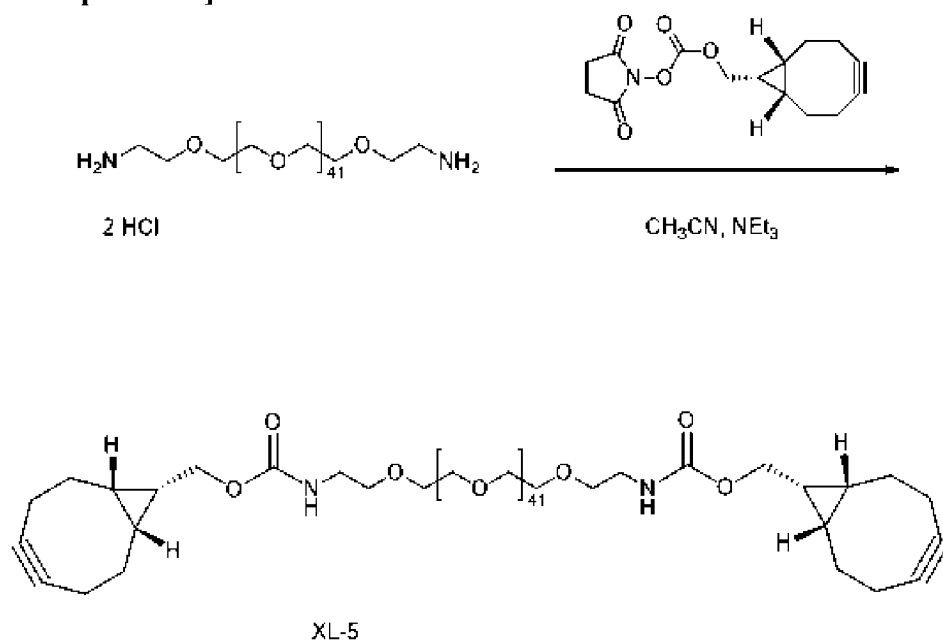


Таблица 16. Иллюстративные сшивающие полимеры на основе PEG			
Номер	T	Количество концевых групп PEG, замещенных функционально й группой	¹ H-ЯМР (400 МГц)
XL-2a		2 из 2 100%	(Хлороформ-d) δ 4,23 (m, 4H), 3,64 (br s, 165H), 1,52 (br m, 4H), 1,45 (br s, 18H), 1,16 (br m, 4H).
XL-3a		2 из 2 100%	(Метанол-d4) 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-d4) 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-d4) 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		2 из 2 100%	(Метанол-d4) δ 4,33 (m, 4H), 3,88-3,42 (m, 184H), 2,91 (br m, 4H),

	Соль бис-ТФА		3,22 (br s, 2H), 1,41 (m, 4H), 1,15 (m, 4H).
XL-4b	 Соль бис-ТФА	2 из 2 100%	(Метанол-d ₄) 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-ТФА	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-ТФА	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]



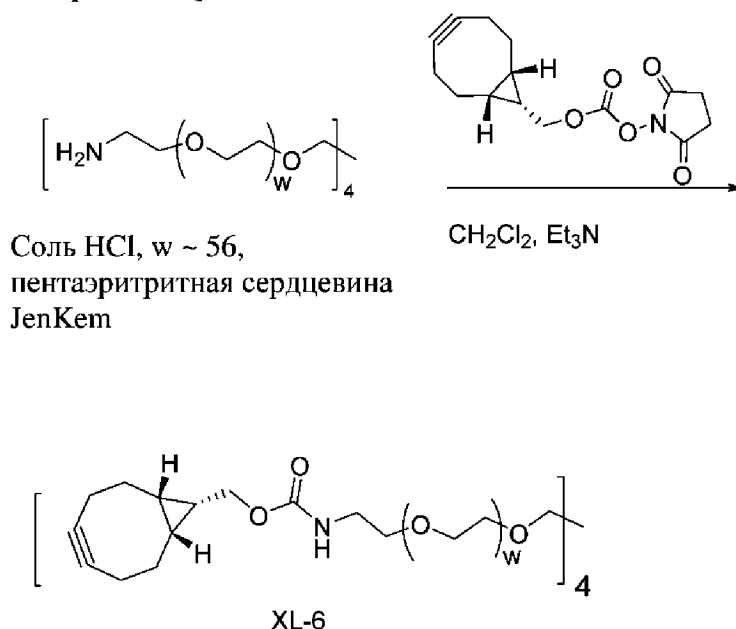
Гидрохлорид PEG-диаминa с $M_n \sim 2$ кДа (JenKem Technology, 300 мг, 0,148 ммоль) растворяли в ацетонитриле (3 мл). Добавляли триэтиламин (0,413 мл, 2,96 ммоль) с последующим добавлением (((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбоната (345 мг, 1,184 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC с обращенной фазой 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, указанный ниже): время удерживания=11,85 мин. ЯМР (400 МГц, MeOH-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). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

Условия препаративной HPLC: Waters XBridge C18; размер частиц: 5 мкм; размер колонки: 19 × 250 мм; элюент/градиент: 5% CH₃CN/H₂O/0,5 мин., 5-95% CH₃CN/H₂O/12,5 мин., 95% CH₃CN/H₂O/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% CH₃CN/H₂O/0,5 мин., 2-98% CH₃CN/H₂O/17,5 мин. (CH₃CN, содержащий 0,05% TFA, и H₂O, содержащая 0,1% TFA); скорость потока: 1 мл/мин.; температура колонки: 50°C.

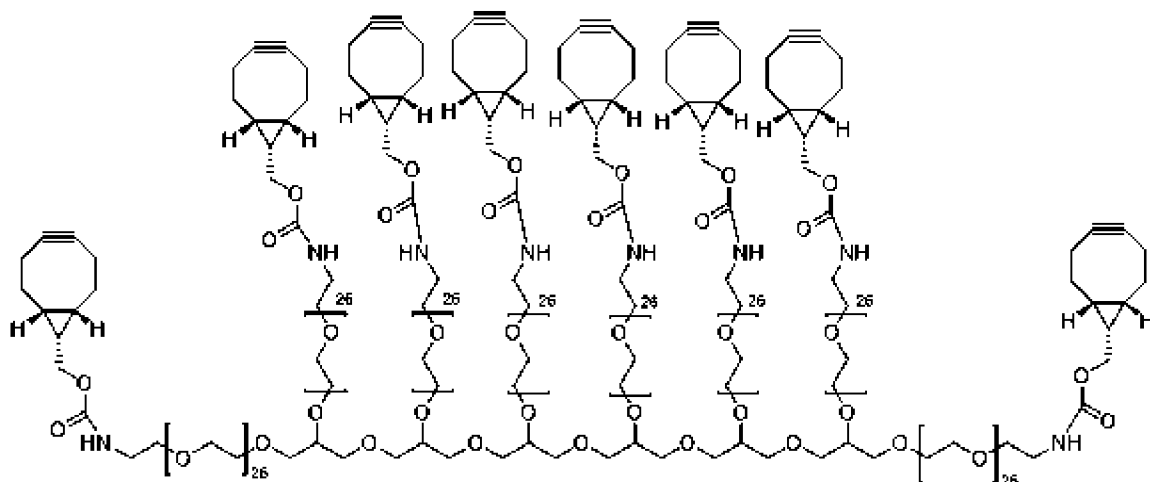
XL-6. PEG(10000)-тетра-[3-((((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метилкарбамоил]



Гидрохлорид PEG-амина с 4 ответвлениями с M_n ~ 10 кДа (пентаэритритное ядро, JenKem Technology, 500 мг, 0,05 ммоль) растворяли в дихлорметане (15 мл). Добавляли триэтиламин (0,554 мл, 4,00 ммоль) с последующим добавлением ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбоната (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. ¹H ЯМР (400 МГц, MeOH-d₄) δ 4,14 (m, 8H), 3,63 (br s, 995H), 2,22 (m, 24H), 1,61 (m, 8H), 1,38 (m,

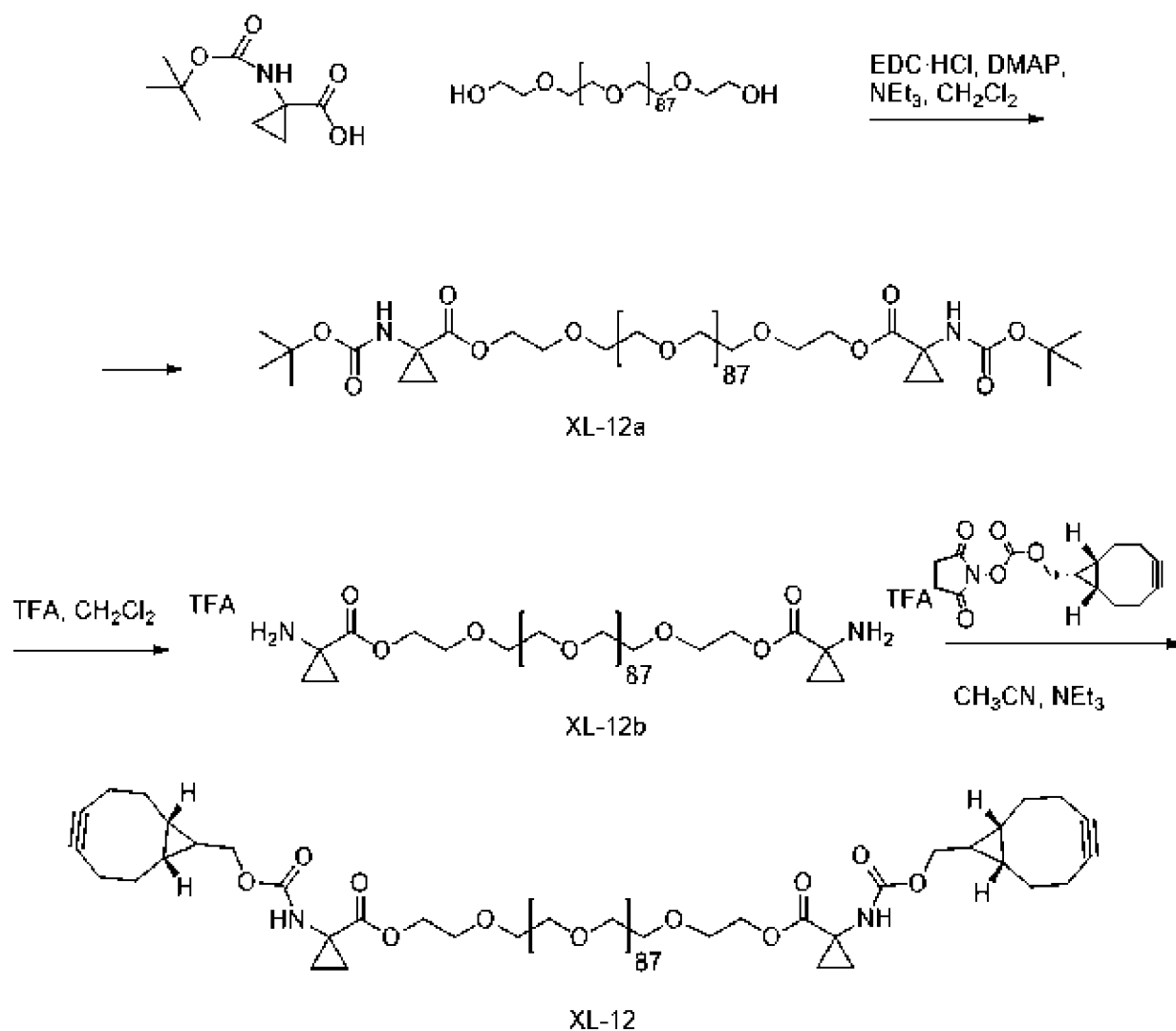
4H), 0,94 (m, 8H). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

XL-8.

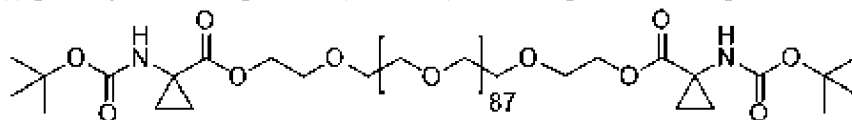


Гидрохлорид PEG-амина с 8 ответвлениями с $M_n \sim 10$ кДа (гексаглицериновое ядро, JenKem Technology, 800 мг, 0,08 ммоль) растворяли в дихлорметане (5 мл). Добавляли триэтиламин (0,887 мл, 6,40 ммоль) с последующим добавлением ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диокспирролидин-1-ил)карбоната (807 мг, 2,56 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. Реакционную смесь концентрировали с применением роторного испарителя, затем растворяли в метаноле и очищали с помощью диализа против метанола с применением 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. ^1H ЯМР (400 МГц, MeOH-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). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

XL-12. PEG(4000)-((оксибис(этан-2,1-диил))бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(1-(((1R,8S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)циклопропан-1-карбоксилат)

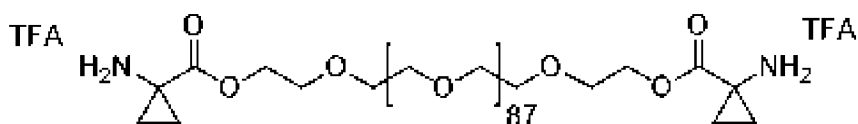


XL-12a. PEG(4000)-((оксибис(этан-2,1-диил))бис(окси))бис(этан-2,1-диил), бис(1-((трет-бутоксикарбонил)амино)циклопропан-1-карбоксилат)



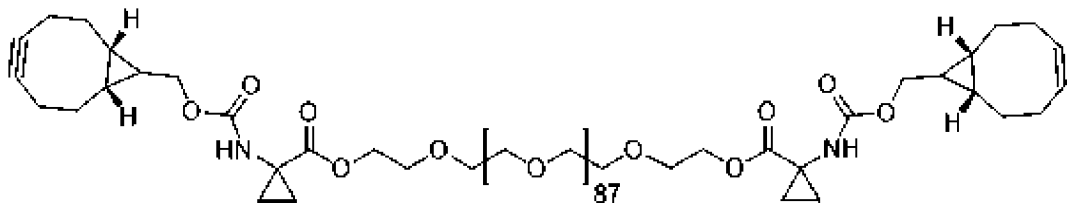
1-((трет-Бутоксикарбонил)амино)циклопропанкарбоновую кислоту (252 мг, 1,25 ммоль) и PEG с $M_n \sim 4$ кДа (1 г, 0,25 ммоль) растворяли в 10 мл дихлорметана. Добавляли диметиламинопиридин (15 мг, 0,125 ммоль) и EDC·HCl (192 мг, 1,0 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (с ELSD-детектором) на диоксиде кремния с градиентом 0-100% гептан: EtOAc, затем 0-100% дихлорметан:дихлорметан/метанол (4: 2). Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали до сухого состояния с получением **XL-12a**. ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ 7,53 (s, 2H), 4,09 (t, 4H), 3,51 (s, 446H), 3,38-3,35 (m, 4H), 1,41-1,33 (m, 18H), 1,30 (d, 4H), 1,03-0,97 (m, 4H).

XL-12b. PEG(4000)-((оксибис(этан-2,1-диил))бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(1-аминоциклопропан-1-карбоксилат) в форме соли бис-трифторуксусной кислоты



XL-12a (1,03 г, 0,238 ммоль) растворяли в дихлорметане (4 мл). Добавляли трифторуксусную кислоту (4 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт последовательно растирали с диэтиловым эфиром и декантировали. Операцию повторяли три раза и полученное твердое вещество высушивали под вакуумом с получением **XL-12b**. ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ 8,72 (s, 4H), 4,30-4,20 (m, 4H), 3,67-3,60 (m, 4H), 3,50 (s, 443H), 1,46-1,41 (m, 4H), 1,36-1,31 (m, 4H).

XL-12. PEG(4000)-((оксибис(этан-2,1-диил))бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(1-((((1R,8S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)циклопропан-1-карбоксилат)

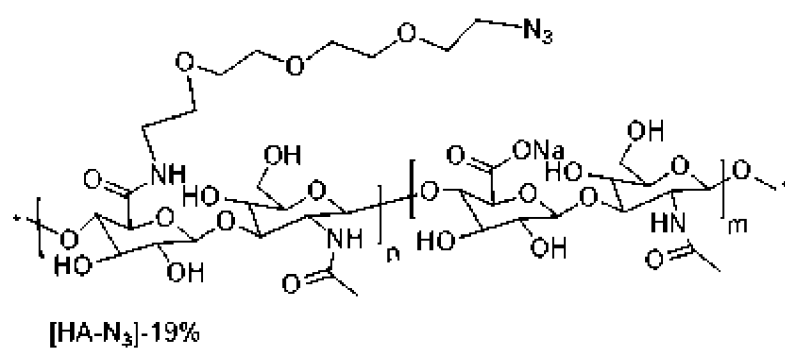


XL-12b (1,04 г, 0,238 ммоль) растворяли в ацетонитриле (5 мл). Добавляли триэтиламин (1,66 мл, 11,89 ммоль) с последующим добавлением ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбоната (277 мг, 0,952 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (с ELSD-детектором) на диоксиде кремния с градиентом 0-100% гептан:EtOAc, затем 0-100% дихлорметан:дихлорметан/метанол (4:2). Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали до сухого состояния. Затем твердое вещество растворяли в дихлорметане и промывали деионизированной водой. Органический слой высушивали с помощью фазового сепаратора с получением **XL-12**. Для целей хранения **XL-12** сохраняли в виде раствора в ацетонитриле (50 мг/мл) и помещали в морозильную камеру. Аналитическая UPLC (способ В, см. выше): время удерживания=1,21 мин. ^1H ЯМР (500 МГц, MeOH- d_4) δ 4,25-4,13 (m, 8H), 3,64 (s, 401H), 2,33-2,10 (m, 8H), 1,67-1,56 (m, 4H), 1,52-1,47 (m, 4H), 1,44-1,34 (m, 2H), 1,19-1,11 (m, 4H), 1,00-0,91 (m, 4H). Способные к обмену протоны не видны в MeOD.

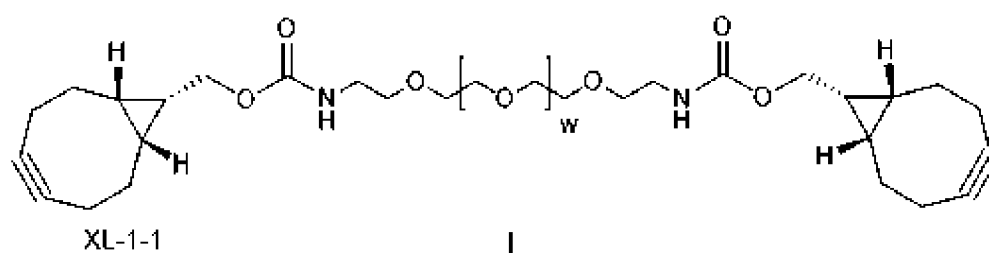
Пример 5

В данном примере описан синтез гидрогелей, получаемых путем осуществления реакции соответствующим образом функционализированных полимеров со сшивающими средствами.

Синтез гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты: H1g

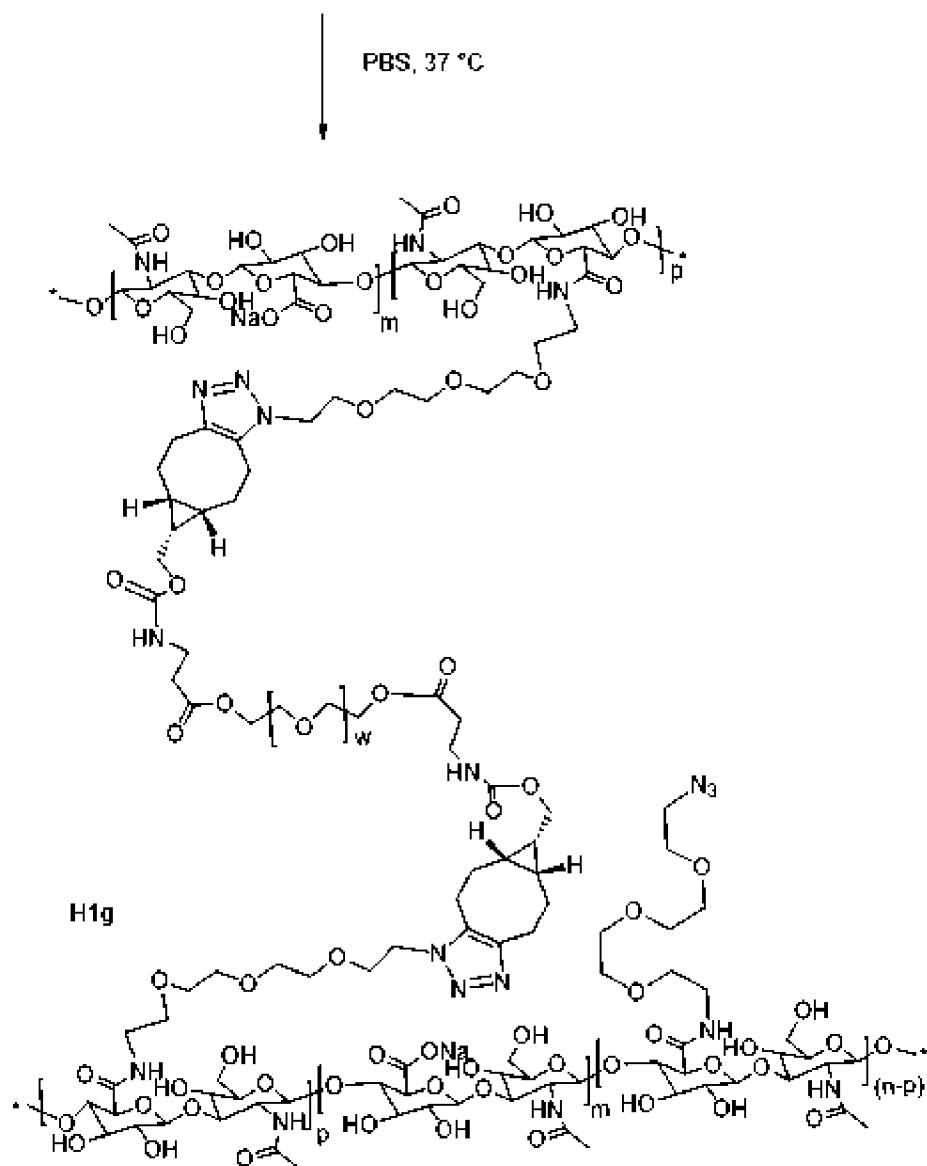


+



PBS, 37 °C

↓



[HA-N3]-19% (60 мг, 137 мкмоль, степень замещения=19%) растворяли в 4,0 мл стерильного буфера 1× PBS, pH 7,4, при комнатной температуре в течение 1 ч. в пробирке объемом 15 мл. Молекулярная масса незамещенного повторяющегося димерного звена в форме карбоксилатной соли натрия составляет 401,3 Да. MW азилированного повторяющегося димерного звена составляет 579,6 Да. Средняя MW димерного звена **[HA-N3]-19%** в форме соли натрия составляет 435,2 Да = $((401,3 \times 0,81) + (579,6 \times 0,19))$. При использовании средней MW димерного звена в форме соли натрия общее число молей повторяющегося димерного звена составляет 137 мкмоль, и число молей азилированного повторяющегося димерного звена составляет 26 мкмоль.

К данному раствору добавляли 50 мг/мл раствор **XL-1-1** (0,205 мл, 4,1 мкмоль реагента при предположении, что MW составляет 2474 Да, 8,20 мкмоль реакционноспособных функциональных групп). В результате этого получали раствор, который имел концентрацию 3% вес/об. относительно **[HA-N3]-19%**, где согласно прогнозированию 6% повторяющихся звеньев **[HA-N3]-19%** были сшиты с помощью **XL-1-1** $((8,20 \text{ мкмоль [реакционноспособных функциональных групп XL-1-1]}/137 \text{ мкмоль$

[звеньев НА) $\times 100=6\%$).

Смесь в течение непродолжительного времени перемешивали вихревым способом с целью смешивания, затем распределяли в шприц объемом 10 мл, который закупоривали и выдерживали при 37°C в течение ночи с получением **H1g**. Визуальный осмотр (тест на инверсию) продемонстрировал успешное гелеобразование.

Получение частиц гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты

2 мл **H1g** 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 1,5% по [НА-N3]-19%. Набухшие крупные частицы геля **H1g** 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 17, получали аналогично **H1g**. Гидрогель определяли по используемому компоненту [НА-N3] и его концентрации в реакции сшивания, а также по используемому сшивающему средству на основе PEG и степени, в которой ожидалось образование сшивков с главной цепью полимера (% сшивания).

Таблица 17. Иллюстративные гидрогели на основе гиалуроновой кислоты

Номер	[НА-N ₃]-X%	Концентрация [НА-N3] в реакции образования гидрогеля	XL-m	% сшивания в гидрогеле
H1a	[НА-N ₃]-23%	1,5%	XL-1-1	6,3
H1b	[НА-N ₃]-23%	1,0%	XL-1-1	4,5
H1c	[НА-N ₃]-37%	1,0%	XL-1-1	5,3
H1e	[НА-N ₃]-22%	1,4%	XL-1-1	6,3
H1f	[НА-N ₃]-23%	1,0%	XL-1-1	5,9
H1g	[НА-N ₃]-19%	1,5%	XL-1-1	6,0
H2a	[НА-N ₃]-19%	1,5%	XL-2-1	6,0
H12a	[НА-N ₃]-19%	1,5%	XL-12-1	6,0

Пример 6

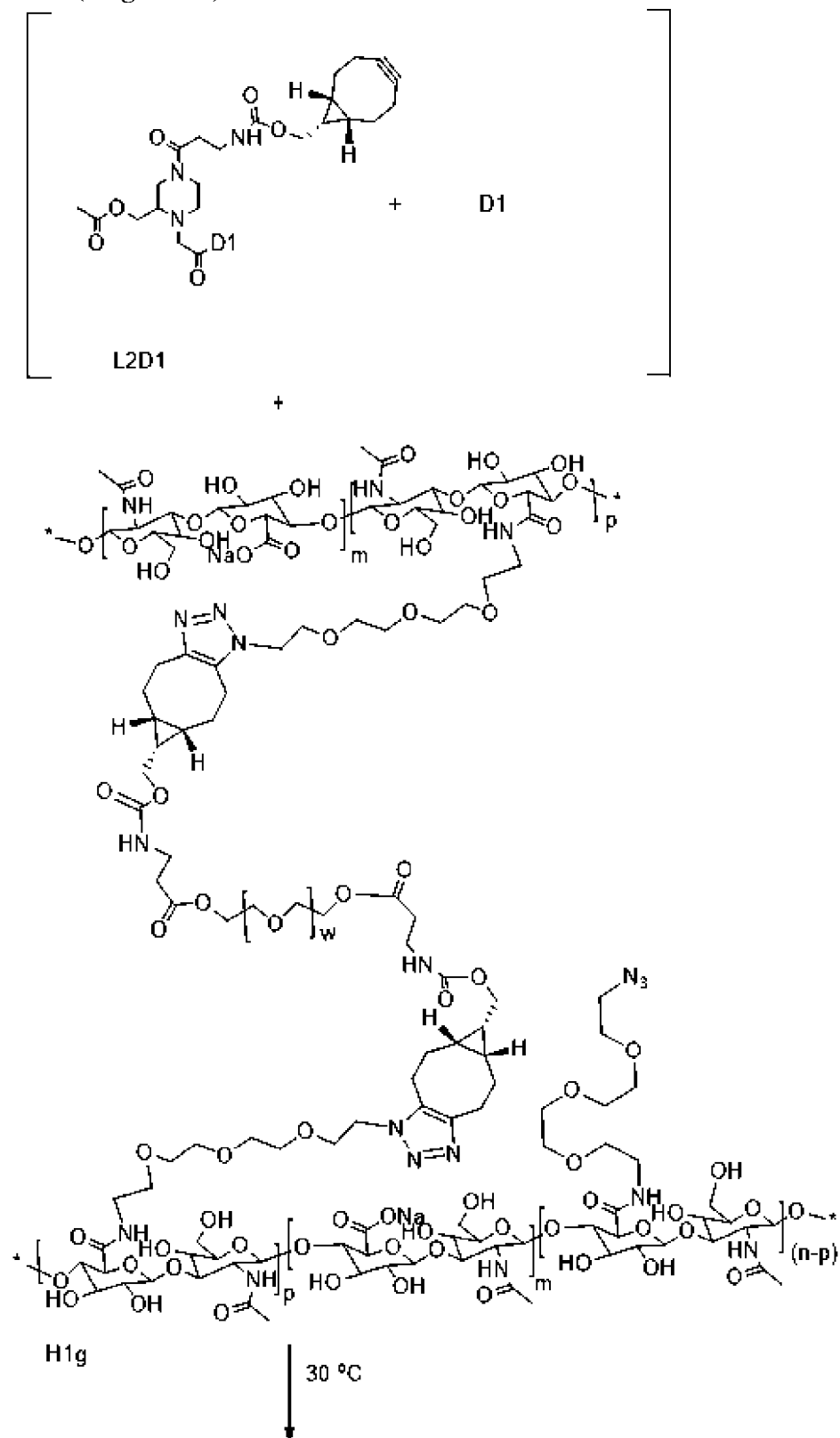
Синтез конъюгатов гидрогель-лекарственное средство

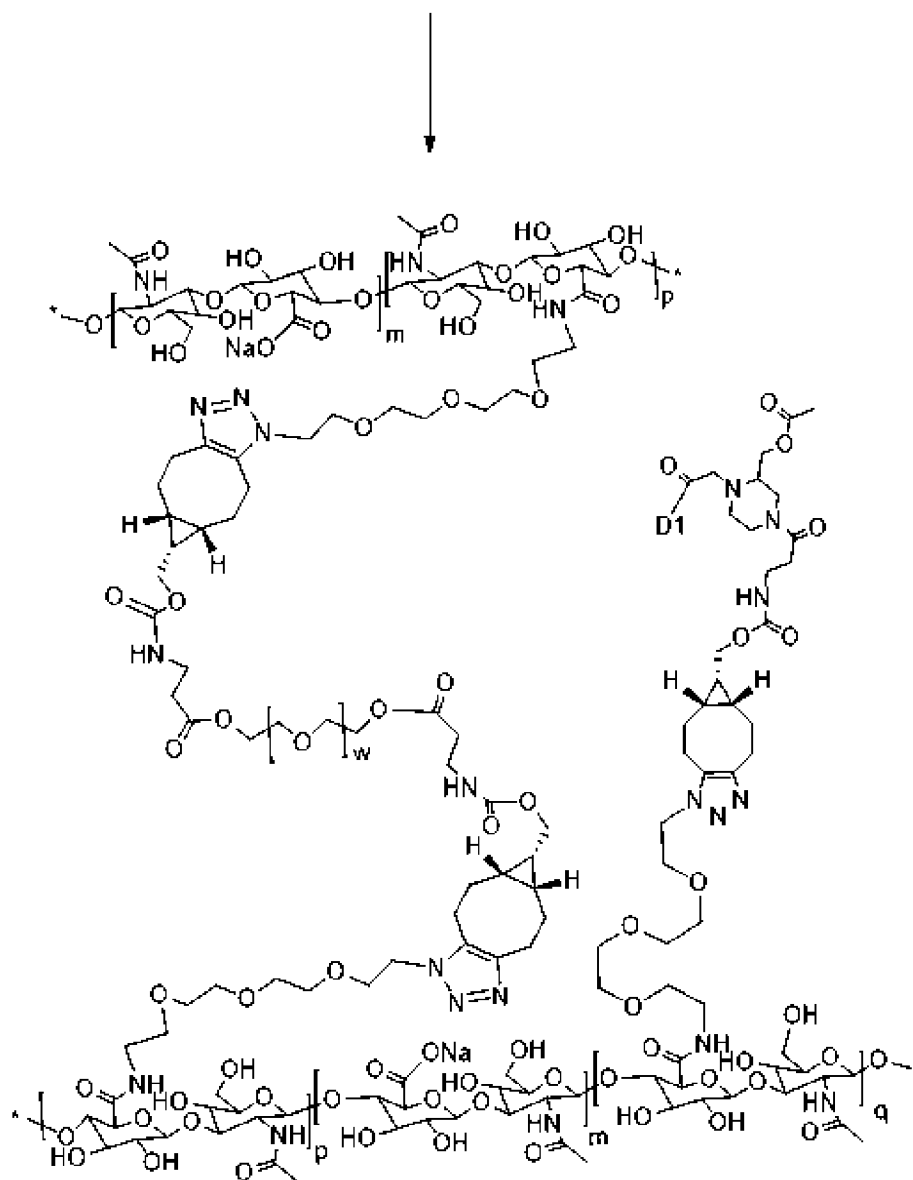
В данном примере описан синтез конъюгатов гидрогель-лекарственное средство, в которых лекарственное средство конъюгировано с носителем посредством бесследного линкера.

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”.

C1-2 (H1g-L2D1)





C1-2

Суспензию частиц гидрогеля на основе **H1g** (1,08 г, 15 мг/мл, 19 mM для общего количества повторяющихся димерных звеньев) обрабатывали раствором **L2D1** (7 мл 13,33 мг/мл раствора в 20 mM гистидиновом буфере (pH=5,8)), перемешивали вихревым способом и встряхивали в течение ночи при 30°C (600 об./мин.). Реакционную пробирку центрифугировали (центробежное ускорение 1500 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 тех пор, пока не определяли отсутствие D1 в надосадочной жидкости. Применяли спектрофотометр Nanodrop для обнаружения поглощения при 280 nm.

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 высвобожденного белка. В данном примере: 20,0 мг [C1-2] отвешивали в реакционную пробирку. Образец обрабатывали с помощью 0,5 М NaOH (4 мл, AVS Titrimorm, 31951.290), перемешивали вихревым способом и встряхивали при 37°C в течение 30 мин. Измеренная с применением УФ-спектрофотометра концентрация высвобожденного лекарственного средства, D1 (SEQ ID NO: 19), составляет 11,68 мг/мл в данном образце, что соответствует 11,68 мг D1/мл гидрогеля в [C1-2]. Данный анализ проводили в двух повторностях. Определенная средняя нагрузка белка для [C1-2] до разбавления составляла 12,14 мг D1/мл гидрогеля.

В другом способе 20,8 мг [C1-2] отвешивали в реакционную пробирку. Образец обрабатывали с помощью 1 М буфера Трис-HCl, pH=9,5 (4 мл), перемешивали вихревым способом и встряхивали при 37°C в течение 24 часов (или до тех пор, пока измеряемая концентрация не достигала равновесного состояния). Измеренная с применением УФ-спектрофотометра концентрация высвобожденного лекарственного средства D1 составляла 13,3 мг/мл в данном образце, что соответствует 13,3 мг D1/мл гидрогеля в [C1-2]. Данный анализ проводили в трех повторностях. Определенная средняя нагрузка белка для [C1-2] до разбавления составляла 12,72 мг D1/мл гидрогеля.

В другом способе 24,5 мг [C2-2] отвешивали в реакционную пробирку и добавляли 2800 мкл воды с последующим добавлением 58,05 мкл раствора гиалуронидазы (от Worthington, LS005475, 8140 Ед./мг). Реакционную смесь встряхивали в течение 3 ч. при к. т. и измеренное с применением УФ-спектрофотометра поглощение составляло 19,68 мг/мл в данном образце. Данный анализ проводили в трех повторностях. Определенная средняя нагрузка белка для [C2-2] до разбавления составляла 19,49 мг D1/мл гидрогеля.

Альтернативный способ определения нагрузки белка основан на расчетах разности. В данном способе измеренную концентрацию D1 (с применением УФ-спектрофотометра), извлеченного из смывов с гидрогеля, вычитают из известного общего количества добавленного белка в начале эксперимента (например: D1+L2D1). Разность дает нагрузку D1 из расчета общего объема гидрогеля.

Гидрогели из таблицы 18 получали с помощью способов, аналогичных тем, которые применяли для синтеза C1-2.

Таблица 18. Иллюстративные конъюгаты гидрогель-лекарственное средство					
Номер	Исследование	Используемый аддукт линкер-лекарственное средство	Используемый гидрогель	Нагрузка лекарственного средства (мг/мл)	Аналитический способ
C1-2	-	L2D1	H1g	12,1	Принудительно

					е высвобождение (NaOH)
C1-2	-	L2D1	H1g	11,8	Разность
C2-1	-	L1D1	H2a	18,5	Принудительно е высвобождение (NaOH)
C2-2	Пример 8.1, высвобождени е in vitro Пример 9, высвобождени е in vivo	L2D1	H2a	19,5	Принудительно е высвобождение (гиалуронидаза)
C2-2	Пример 8.1, высвобождени е in vitro Пример 9, высвобождени е in vivo	L2D1	H2a	18,9	Принудительно е высвобождение (NaOH)
C2-5	-	L5D1	H2a	18,2	Разность
C12-2	-	L2D1	H12a	18,8	Принудительно е высвобождение (NaOH)

Конъюгат гидрогель-лекарственное средство можно разбавлять с помощью $1 \times \text{PBS}$ до достижения требуемой конечной концентрации лекарственного средства для дозирования. Количество $1 \times \text{PBS}$, которое должно быть добавлено, можно рассчитать с помощью следующего уравнения: (разбавитель PBS (мл)) = [(общее количество лекарственного средства (мг) / требуемая нагрузка лекарственного средства (мг/мл)] – (начальный объем конъюгата (мл)).

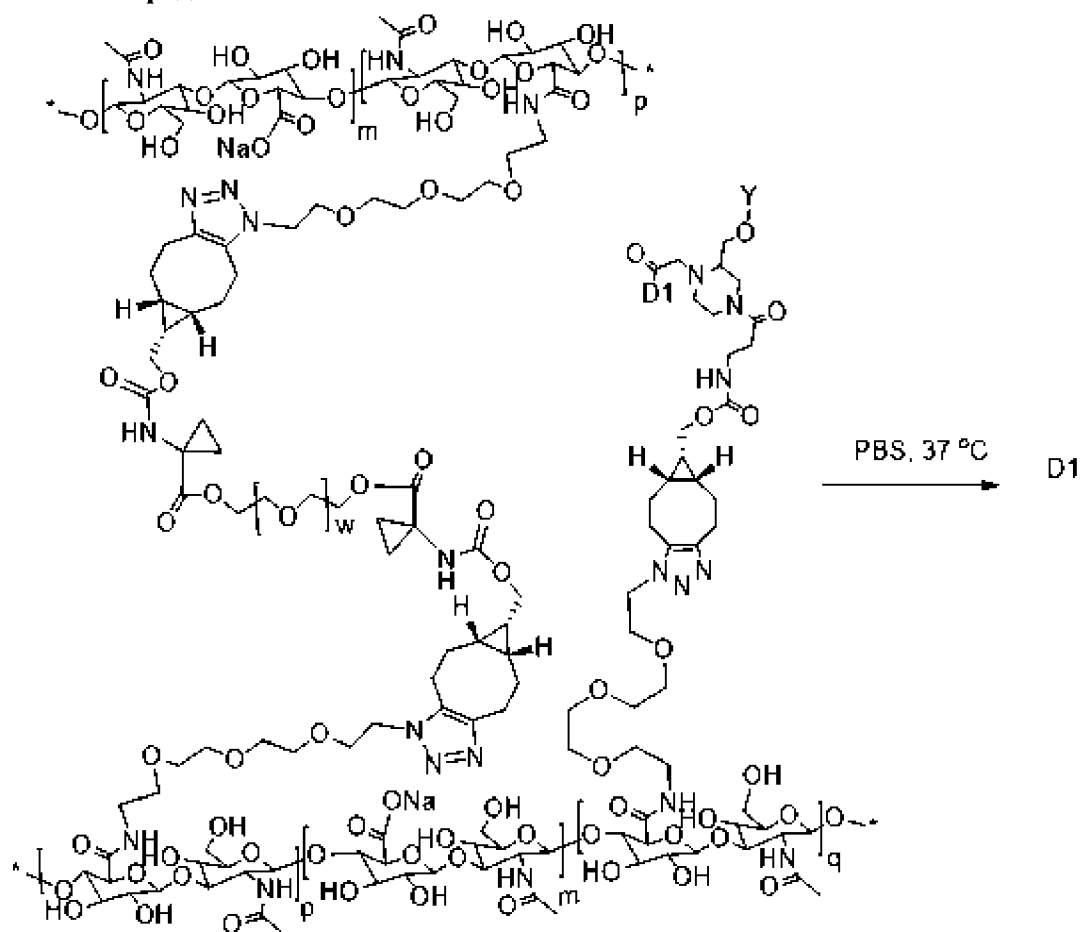
Конъюгат **C2-2** отмеривали для дозирования в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл с присоединенными иглами 30G посредством удаления поршня и заполнения требуемым объемом **C2-2**.

Конъюгаты гидрогель-лекарственное средство хранили при к. т.

Пример 7

Исследования высвобождения лекарственного средства *in vitro*

7-1. Высвобождение D1 (SEQ ID NO: 19) из конъюгатов гидрогель-лекарственное средство



где Y выбран из таблицы 3 выше.

Высвобождение D1 (SEQ ID NO:19) из конъюгатов с гидрогелем **C1-2** и **C2-2** происходит, как изображено на фиг. 4A. В данном исследовании серию конъюгатов гидрогель-D1 выдерживали в $1 \times$ PBS при 37°C для оценки высвобождения лекарственного средства после реакции отщепления бесследного линкера. Из этих реакционных смесей производили отбор образцов в различные моменты времени и анализировали их для определения концентрации высвобожденного D1 в надосадочной жидкости.

Каждый образец гидрогеля (примерно 125 мкл; точное количество определяли путем взвешивания, предполагаемая плотность гидрогеля=1 г/мл) добавляли во вставку Transwell® (Corning Inc; 6-луночный планшет, диаметр 24 мм, поликарбонатная мембрана, размер пор 8,0 мкм). Лунки планшета заполняли 2,6 мл PBS + (1%) пенициллина/стрептомицина (Life Technologies, 10000 ME/мкг/мл). Затем содержащие гидрогель вставки помещали в лунки и добавляли 1,375 мл PBS + (1%) пенициллина/стрептомицина сверху гидрогеля (во вставке). 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 28 дней. В каждый момент времени и для каждой лунки вставку Transwell® удаляли из лунки, высушивали полностью и переносили в новый планшет, в лунку, содержащую 3,6 мл свежего 1х PBS + (1%) пенициллина/стрептомицина. Наполненный вновь планшет возвращали в инкубатор. При этом весь объем буфера для сбора материала переносили в чистую пробирку и взвешивали, затем образец, соответствующий определенному моменту времени, отбирали из буфера для сбора материала (применению для аналитических целей подлежало 0,10 мл) и оставшуюся часть хранили при -80°C до анализа.

Другими буферами, применяемыми в данном анализе, являются бычья синовиальная жидкость (BSF), 1 М раствор Трис-HCl (Teknova, pH 9,5) или среда Игла, модифицированная по Дульбекко (Gibco, номер 41965), состоящая из 1% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, номер 10270106), 12,5 мкг/мл добавки инсулин-трансферрин-селенит натрия (Roche, номер 11074547001), 50 мкг/мл н-гидрата фосфатной соли магния и L-аскорбиновой кислоты (Wako, номер 013-12061), 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Добавку пенициллин/стрептомицин можно не добавлять, если эксперимент проводят при 22°C вместо 37°C .

Для каждого из образцов, соответствующих определенным моментам времени, определяли концентрацию белка (которая представляет собой концентрацию белка в каждой лунке в определенный момент времени) с помощью эксклюзионной хроматографии SEC, сначала откалиброванной в отношении D1 (прибор: Agilent LC 1260 Infinity; колонка: Superdex 200 Increase 10/300GL (28-9909-44); температура колонки: к. т., скорость потока: 0,75 мл/мин.; объем введения: 10 мкл; подвижная фаза: 1/9 PBS/вода, предварительно отфильтрованные через мембранный фильтр с размером 0,10 мкм; время прогона: 40 мин.; длины волн обнаружения: 214, 280 и 680 нм). Каждый образец, соответствующий определенному моменту времени, анализировали в трех повторностях, и результаты усредняли.

Общее количество белка в указанной лунке в указанный момент времени рассчитывали путем умножения концентрации белка в определенный момент времени на измеренное значение объема (при предположении, что плотность составляет 1 г/мл). Совокупное количество D1, высвобожденного из каждого гидрогеля в каждую лунку до данного момента времени, рассчитывали путем добавления общего количества D1 в лунке в каждый момент времени. Совокупное процентное количество белка, высвобожденного из конъюгатов **C2-2** вплоть до указанного момента времени, показано на фиг. 4В. Совокупное процентное количество высвобожденного D1 рассчитывали путем деления совокупного количества высвобожденного D1 в указанный момент времени на общее количество D1, присутствующего в исходном образце гидрогеля, и умножения на 100. Как очевидно из фиг. 4В, высвобождение D1 из носителя происходит медленно, но длится в течение периода, составляющего один месяц.

Концентрация белка в лунке в момент времени t:

$[P](t)$.

Общий объем в лунке в момент времени t :

$$V(t).$$

Общая масса белка в лунке в момент времени t :

$$m(P)_{\text{лунка}}(t) = [P](t) \times V(t).$$

Совокупная масса белка, высвобожденного из гидрогеля до момента времени t :

$$m(P)_{\text{совок.}}(t) = \sum_{i=0}^t m(P)_{\text{лунка}}.$$

Пример 8

Сравнительная тканевая переносимость гидрогелей

В данном исследовании изучали, вызывают ли гидрогели серьезный воспалительный ответ или любые другие побочные явления в течение периода, составляющего 11 недель, после однократной внутрисуставной инъекции крысам Льюиса с остеоартритом колена. Тестируемые препараты представляли собой **H1a**, **H9a** и инъекционный раствор на основе гиалуроновой кислоты Synvisc-One[®], применяемый для лечения боли в колене при остеоартрите (Sanofi).

Получение H9a

Частицы гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты **H9a** получали, как описано для **H1a** (выше, с применением сшивающего средства **XL-9-1**), где к частицам после первого продавливания добавляли половинный объем $1 \times$ PBS. Частицы гидрогеля **H1a/H9a** отмеривали для дозирования в инсулиновые шприцы объемом 0,5 мл с присоединенными иглами 30G посредством удаления поршня и заполнения необходимым объемом **H1a/H9a**. Пузырьки воздуха удаляли путем проведения осторожных манипуляций со шприцем.

Synvisc-One[®]

Synvisc-One[®] приобретали и использовали в полученном состоянии.

Внутрисуставная инъекция

Самцов крыс Льюиса (LEW/OrlRj, Janvier) подвергали хирургическому вмешательству для обеспечения разрыва мениска на одном колене. Когда приблизительно через 7 дней после хирургического вмешательства развился остеоартрит коленного сустава из-за нарушенной стабильности, под анестезией посредством внутрисуставной инъекции вводили 25 мкл тестируемого препарата или солевого раствора в качестве контроля в подвергнутый операции коленный сустав (таблица 19). Одна не подвергнутая обработке крыса (не подвергнутая операции) служила как контроль. Прижизненные наблюдения регистрировали в течение 1-2 часов после введения дозы и по меньшей мере один раз в сутки после этого в течение одной недели. В последующие недели до вскрытия прижизненные наблюдения регистрировали один раз в неделю. Значения массы тела измеряли один раз в неделю.

Таблица 19. План исследования, распределение животных и дозы тестируемых препаратов

Группа	n	Обработка	Доза (мкл)	Момент времени осуществления вскрытия
1,1	3	Synvisc-One [®]	25	4 недели после инъекции
1,2	3	Synvisc-One [®]	25	6 недель после инъекции
1,3	3	Synvisc-One [®]	25	8 недель после инъекции
1,4	3	Synvisc-One [®]	25	11 недель после инъекции
2,1	3	H1a	25	4 недели после инъекции
2,2	3	H1a	25	6 недель после инъекции
2,3	3	H1a	25	8 недель после инъекции
2,4	3	H1a	25	11 недель после инъекции
3,1	3	H9a	25	4 недели после инъекции
3,2	3	H9a	25	6 недель после инъекции
3,3	3	H9a	25	8 недель после инъекции
3,4	3	H9a	25	11 недель после инъекции
4	3	Солевой раствор	25	11 недель после инъекции
5	1	-	-	12 недель после начала исследования

Крыс подвергали эвтаназии через 4, 6, 8 или 11 недель после внутрисуставной инъекции. Синовиальную жидкость из подвергнутого инъекции коленного сустава собирали путем открытия коленного сустава и лаважа 25 мкл солевого раствора. Во время вскрытия регистрировали макроскопические аномалии. Образцы правого подвергнутого операции/инъекции колена собирали у всех животных, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, заливали в парафин и нарезали на срезы. Окрашенные гематоксилином, и эозином, и сафранином-О/малахитовым зеленым срезы коленного сустава оценивал патолог.

Результаты и выводы

Гидрогели не вызывали каких-либо побочных явлений в течение 11 недель при введении внутрисуставной инъекции в коленные суставы крыс. Присутствие гидрогеля в субсиновиальном пространстве, блеббинг синовиальных клеток в суставное пространство и пролиферация синовиальных и субсиновиальных клеток были временными в ранние моменты времени и менее выраженными для конъюгатов с гидрогелем на основе НА, чем для Synvisc-One[®], который представлен на рынке и часто применяется для лечения боли в колене при остеоартрите (Sanofi).

Пример 9

Исследование высвобождения лекарственного средства in vivo

В данном исследовании изучали профиль высвобождения D1 in vivo из конъюгата

гидрогель-лекарственное средство C2-2 после внутрисуставной инъекции в коленные суставы крыс.

Получение C2-2

Конъюгат гидрогель-лекарственное средство C2-2 получали, как описано в примере 6. Концентрация D1 в C2-2 составляла 19,0 мг/г, что соответствует дозе D1, составляющей 0,475/сустав.

Внутрисуставная инъекция

В оба коленных сустава 9 не подвергнутых обработке самцов крыс Льюиса (LEW/OrlRj, Janvier; возрастом 9 недель) под анестезией вводили посредством инъекции 25 мкл C2-2. Собирали кровь/сыворотку в моменты времени, указанные в таблице 20. В каждый момент времени, через 24, 72 и 168 часов после проведения внутрисуставных инъекций, подвергали эвтаназии 3 крыс. Синовиальную жидкость и суставной хрящ собирали из левых коленных суставов, ткань всего сустава - из правых колен.

Таблица 20

Состав с ER	Доза (мг/животное/сустав)	Животное	Собранная биологическая матрица	Моменты времени после введения дозы
C2-2	0,25/i.a.	01-03 01-03 04-06 07-09	Кровь/Сыворотка SF; Cart; Knee B/S; SF; Cart; Knee B/S; SF; Cart; Knee	0,5, 1, 3, 6, 24, 72, 168 ч. 168 ч. 24 ч. 72 ч.
B/S: кровь/сыворотка; SF: синовиальная жидкость; Cart: хрящ; Knee: целые коленные суставы				

Синовиальную жидкость из коленных суставов собирали путем внутрисуставного введения посредством инъекции 20 мкл солевого раствора в закрытый коленный сустав, приведения в движение сустава и сбора жидкости непосредственно после открытия коленного сустава. Затем вводили посредством инъекции еще 20 мкл в открытый коленный сустав и собирали. Лаваж повторяли с еще 20 мкл солевого раствора, что привело к общему объему лаважа 60 мкл. Предварительно взвешенный флакон с синовиальной жидкостью центрифугировали непосредственно после отбора образцов для обеспечения размещения частиц гидрогеля в нижней части пробирки. Затем из предварительно взвешенного флакона удаляли 5 мкл перед хранением основного флакона при -80°C. Отделенные 5 мкл синовиальной жидкости сохраняли в качестве запасного образца для обеспечения возможности проведения анализа без обработки гиалуронидазой и также хранили при -80°C. Концентрации D1 количественно определяли в сыворотке и синовиальной жидкости с помощью ECLIA-анализа. Способ основан на захвате D1 с применением моноклонального антитела к ANGPTL3 (Novartis, iProt109046), иммобилизованного на планшете MSD. Захваченный D1 выявляли с применением биотинилированного поликлонального антитела к ANGPTL3 (R&D Systems, BAF3829) с

последующей инкубацией с меченным SulfoTag стрептавидином. Образцы синовиальной жидкости либо предварительно обрабатывали гиалуронидазой (1500 Ед./мл) и инкубировали О/Н при 4°C со встряхиванием при 450 об./мин. перед анализом, либо сохраняли при -80°C без предварительной обработки гиалуронидазой.

Результаты и выводы

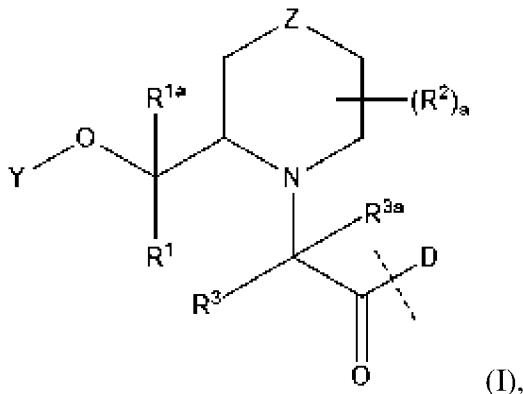
Как показано на фиг. 5, гидрогель C2-2 обеспечивал длительное воздействие в сыворотке на очень низких уровнях в течение 1 недели по сравнению с коротким и высоким системным воздействием, наблюдаемым для состава на основе D1 с немедленным высвобождением, который через 1 неделю больше не выявляли. Внутрисуставная инъекция гидрогеля C2-2 также приводила к высоким устойчивым уровням D1 в течение по меньшей мере одной недели в синовиальной жидкости, которую обрабатывали гиалуронидазой для высвобождения D1 из остаточного гидрогеля в синовиальной жидкости. Уровни свободного D1, выявляемого в синовиальной жидкости без предварительной обработки гиалуронидазой, были значительно ниже, но также были выявляемыми в течение по меньшей мере одной недели.

Данные результаты указывают на то, что гидрогель C2-2 продлевал высвобождение D1 в синовиальную жидкость до по меньшей мере одной недели.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой (I), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе;

R^1 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации с атомом(атомами) углерода, к которому(которым) они присоединены, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; 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_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 -

С₇циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными С₁-С₄алкильными группами;

b представляет собой целое число от 1 до 10;

Z представляет собой СН-L-A, СН-A, N-L-A или N-A;

L представляет собой необязательно замещенный двухвалентный линкер;

A представляет собой водород, С₁-С₈алкил, C(O)С₁-С₈алкил, C(O)N(H)С₁-С₈алкил, C(O)OC₁-С₈алкил, R¹⁰ или R¹¹, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R¹⁰;

R¹⁰ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R¹¹ представляет собой носитель.

2. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где D содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45.

3. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где D содержит любую из SEQ ID NO: 1 или 3-45.

4. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий замену K423Q или делецию K423.

5. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 201-460; 207-460; 225-455; 225-455; 225-460; 225-460; 226-455; 226-455; 226-460; 226-460; 228-455; 228-455; 228-460; 228-460; 233-455; 233-455; 233-460; 233-460; 241-455; 241-455; 241-460; 241-460; 242-455; 242-455; 242-460 или 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 в каждом случае.

6. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где D содержит полипептид ANGPTL3, предусматривающий по меньшей мере 95% идентичность с аминокислотными остатками 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q.

7. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q (SEQ ID NO: 19).

8. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-7, где R¹ представляет собой водород или метил, R^{1a} представляет собой водород или метил, или CR¹R^{1a}, взятые в комбинации, образуют циклопропан-1,1-диильную группу.

9. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-8, где переменная a равняется 0.

10. Система доставки лекарственных средств или 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 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_6 алкил, C_3 - C_6 циклоалкил или C_1 - C_2 алкокси- C_1 - C_2 алкил.

12. Система доставки лекарственных средств или 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 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_4 алкил, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, изобутокси, втор-бутокси, 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 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), $N(C_1-C_4$ алкил), $C(O)NH$, $C(O)N(C_1-C_4$ алкил), $N(H)C(O)$, $N(C_1-C_4$ алкил) $C(O)$, $N(H)C(O)O$, $N(C_1-C_4$ алкил) $C(O)O$, $OC(O)N(H)$, $OC(O)N(C_1-C_4$ алкил), $N(H)C(O)N(H)$, $N(C_1-C_4$ алкил) $C(O)N(H)$, $N(H)C(O)N(C_1-C_4$ алкил), $N(C_1-C_4$ алкил) $C(O)N(C_1-C_4$ алкил), $C(O)O$, $OC(O)$, $OC(O)O$, S, $S(O)_2$, $N(H)S(O)_2$, $N(C_1-C_4$ алкил) $S(O)_2$, $S(O)_2N(H)$, $S(O)_2N(C_1-C_4$ алкил), 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 -4алкила;

Sp в каждом случае независимо выбран из необязательно замещенного 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 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_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_8 алкил, $C(O)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)OC_1$ - C_8 алкил, $C(O)N(H)C_1$ - C_8 алкил, 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 фармацевтически приемлемая

соль по любому из пп. 1-13, где Z представляет собой CHR⁸ или NR⁹;

каждый из R⁸ и R⁹ независимо выбран из водорода, C₁-C₈алкила, C(O)-(CH₂)_n-Q-A, C(O)C₁-C₈алкила или -C(O)(CH₂)_q[O-W]_g(NHC(O))_m(CH₂)_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 C₂-C₄алкил-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(C₁-C₄алкил);

A представляет собой водород, C₁-C₈алкил, C(O)C₁-C₈алкил, C(O)N(H)C₁-C₈алкил, C(O)OC₁-C₈алкил, R¹⁰ или R¹¹, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R¹⁰;

R¹⁰ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R¹¹ представляет собой носитель.

16. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по п. 15, где Z представляет собой NR⁹;

R⁹ представляет собой C(O)-(CH₂)_n-Q-A или -C(O)(CH₂)_q[O-W]_g(NHC(O))_m(CH₂)_q[O-W]_p-Q-A;

n представляет собой целое число от 1 до 8; и

A представляет собой R¹⁰ или R¹¹.

17. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-16, где R¹⁰ представляет собой азидил, алкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂циклоалкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂гетероциклоалкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂циклоалкенил, норборнил, замещенный или незамещенный винилкарбоксил, замещенный или незамещенный винилсульфонил, замещенный или незамещенный C₂-C₈алкенил, amino, тиол, замещенный или незамещенный C₁-C₈карбоксил, замещенный или незамещенный C₁-C₈карбонил, -O-NH₂, гидразидил, малеимид, альфа-галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин или адамантан.

18. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-17, где R¹⁰ содержит реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания системы доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемой соли формулы (I) с носителем.

19. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-16, где R¹¹ является биоразлагаемым.

20. Система доставки лекарственных средств или фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-16 или п. 19, где R¹¹ содержит полимер или сшитый полимер.

21. Система доставки лекарственных средств или 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 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, гидроксипропилированного крахмала, хитозана, нуклеиновых кислот, их производных, их сополимеров или их комбинаций.

23. Система доставки лекарственных средств или 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 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 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 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_8 алкенил, amino, тиол, C_1 - C_8 карбоксил, C_1 - C_8 карбонил, $-O-NH_2$, карбогидразид, малеимид, альфа-галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин, адамантан или их комбинации.

27. Система доставки лекарственных средств или 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_4 алкил-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 C₇-C₁₂циклоалкинил, замещенный или незамещенный C₇-C₁₂гетероциклоалкинил, C₇-C₁₂циклоалкенил, норборнил, винилкарбоксил, винилсульфонил, C₂-C₈алкенил, amino, тиол, C₁-C₈карбоксил, C₁-C₈карбонил, -O-NH₂, карбогидразид, малеимид, альфа-галогенкарбонил, фуран, замещенный или незамещенный тетразинил, лизин, глутамин, циклодекстрин или адамантанил.

28. Система доставки лекарственных средств или 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 R¹¹;

(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, amino-, аминокси- (O-NH₂) 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-ил)метильных 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 функционализована азидной группой.

36. Способ получения аддукта лекарственного средства, содержащего бесследный линкер R, связанный с полипептидом ANGPTL3, содержащим по меньшей мере одну

первичную аминогруппу D, при этом способ включает:

- (а) получение полипептида ANGPTL3, содержащего по меньшей мере одну первичную аминогруппу D;
- (b) осуществление реакции биологически активного средства с бесследным линкером R, который имеет активированную карбонильную функциональную группу; и
- (с) 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:

(а) получение молекулы носителя R^{11} , где R^{11} представляет собой сшитый гидрогель; при этом стадия (а) может необязательно дополнительно включать очистку молекулы носителя R^{11} , представляющего собой сшитый гидрогель;

(b) отдельное конъюгирование бесследного линкера R с полипептидом ANGPTL3, содержащим по меньшей мере одну первичную аминогруппу D, тем самым с образованием аддукта бесследный линкер-D; при этом стадия (b) может необязательно дополнительно включать очистку аддукта бесследный линкер-D,

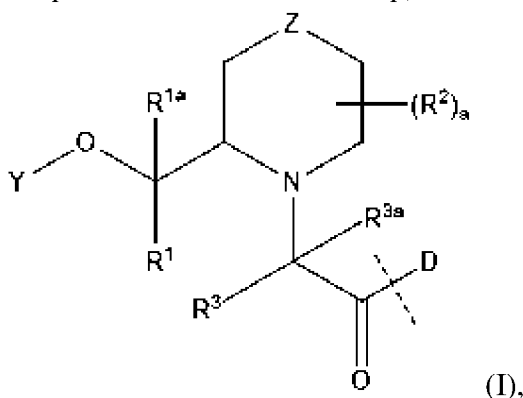
(с) конъюгирование молекулы носителя R^{11} с аддуктом бесследный линкер-D и

(d) очистку системы доставки лекарственных средств от реагентов.

39. Система доставки лекарственных средств, полученная с помощью способа по п. 38.

40. Способ лечения макулярной дегенерации, 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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу;

R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе;

R^1 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу;

а равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или

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

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидроксигруппой, амино, C_1 - C_4 алкокси или моно- и ди- C_1 - C_4 алкиламином;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкила, $C(O)C_1$ - C_8 алкила 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_4 алкил-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_8 алкил, $C(O)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)N(H)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)OC_1$ - C_8 алкил, R^{10} или R^{11} , где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10} ;

необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидроксигруппой, амино, C_1 - C_4 алкокси или моно- и ди- C_1 - C_4 алкиламином;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкила, $C(O)C_1$ - C_8 алкила 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_4 алкил-1,2-диил, в котором боковая цепь, представляющая собой водород, метил или этил, может присутствовать при любом атоме углерода главной цепи;

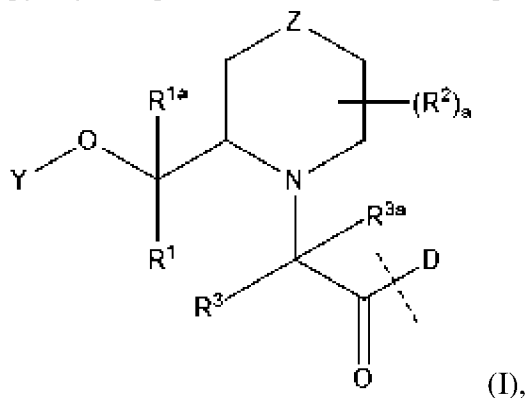
Q представляет собой связь, O, N(H) или $N(C_1-C_4$ алкил);

A представляет собой водород, C_1 - C_8 алкил, $C(O)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)N(H)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)OC_1$ - C_8 алкил, 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 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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе;

R^1 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или CR^1R^{1a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^2 в каждом случае независимо выбран из C_1 - C_4 алкила или оксо, или две группы R^2 , взятые в комбинации, образуют конденсированную C_3 - C_6 циклоалкильную или спиро- C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R^3 представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил, или CR^3R^{3a} , взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-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_4 алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил, или $CR^{12}R^{12a}$, взятые в комбинации, образуют C_3 - C_6 циклоалк-1,1-диил;

R^{13} представляет собой C_1 - C_4 алкил; или

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

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидроксидом, амином, C_1 - C_4 алкокси или моно- и ди- C_1 - C_4 алкиламином;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкила, $C(O)C_1$ - C_8 алкила 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_4 алкил-1,2-диил, в котором боковая цепь,

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

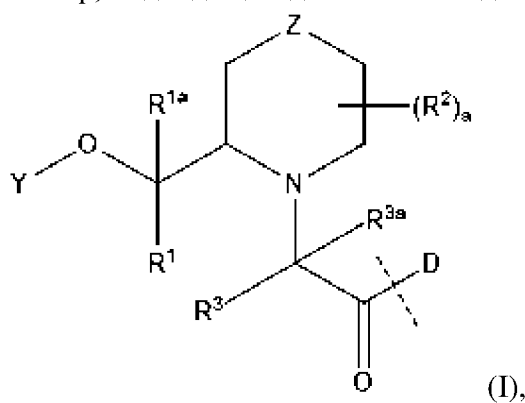
Q представляет собой связь, O, N(H) или N(C₁-C₄алкил);

A представляет собой водород, C₁-C₈алкил, C(O)C₁-C₈алкил, C(O)N(H)C₁-C₈алкил, C(O)OC₁-C₈алкил, R¹⁰ или R¹¹, где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R¹⁰;

R¹⁰ представляет собой реакционноспособную функциональную группу, подходящую для связывания формулы (I) с носителем; и

R¹¹ представляет собой носитель.

43. Способ продления периода полувыведения полипептида ANGPTL3, содержащего по меньшей мере одну первичную аминогруппу D, при этом способ включает присоединение D к R, который представлен формулой (I), где R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе;

R¹ представляет собой водород или C₁-C₄алкил;

R^{1a} представляет собой водород или C₁-C₄алкил, или CR¹R^{1a}, взятые в комбинации, образуют C₃-C₆циклоалк-1,1-диил;

R² в каждом случае независимо выбран из C₁-C₄алкила или оксо, или две группы R², взятые в комбинации, образуют конденсированную C₃-C₆циклоалкильную или спиро-C₃-C₆циклоалк-1,1-диильную группу;

a равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

R³ представляет собой водород или C₁-C₄алкил;

R^{3a} представляет собой водород, C₁-C₄алкил, или CR³R^{3a}, взятые в комбинации, образуют C₃-C₆циклоалк-1,1-диил;

Y представляет собой C(O)R⁴, C(O)OR⁴, C(O)NHR⁴, C(O)NR⁵R⁶, SiR⁵R⁶R⁷ или CR¹²R^{12a}OR¹³;

R¹² представляет собой водород или C₁-C₄алкил;

R^{12a} представляет собой водород или C₁-C₄алкил, или CR¹²R^{12a}, взятые в комбинации, образуют C₃-C₆циклоалк-1,1-диил;

R¹³ представляет собой C₁-C₄алкил; или

CHR¹²OR¹³, взятые в комбинации, образуют 5-, 6- или 7-членный циклический

простой эфир;

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен гидроксигруппой, амино, C_1 - C_4 алкокси или моно- и ди- C_1 - C_4 алкиламином;

каждый из R^5 и R^6 независимо выбран из C_1 - C_4 алкила и C_3 - C_6 циклоалкила;

R^7 представляет собой C_1 - C_8 алкил, C_3 - C_7 циклоалкил, C_1 - C_8 алкокси, C_3 - C_7 циклоалкилокси, гетероциклоалкилокси или $-(OCHR^3CH_2)_bO-C_1-C_4$ алкил, где гетероциклоалкилокси представляет собой 4-7-членное насыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее один гетероатом кольца, выбранный из N, O и S, и необязательно замещенное 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными 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_8 алкила, $C(O)C_1$ - C_8 алкила 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_4 алкил-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);

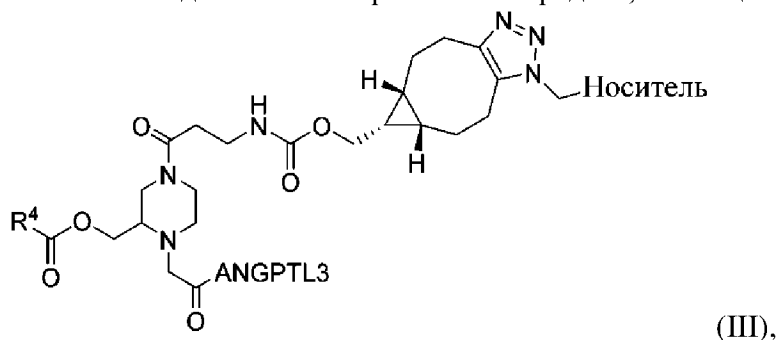
A представляет собой водород, C_1 - C_8 алкил, $C(O)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)N(H)C_1$ - C_8 алкил, $C(O)OC_1$ - C_8 алкил, R^{10} или R^{11} , где алкильная группа необязательно замещена 0 или 1 R^{10} ;

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

R^{11} представляет собой носитель.

44. Способ по п. 43, где D содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45.

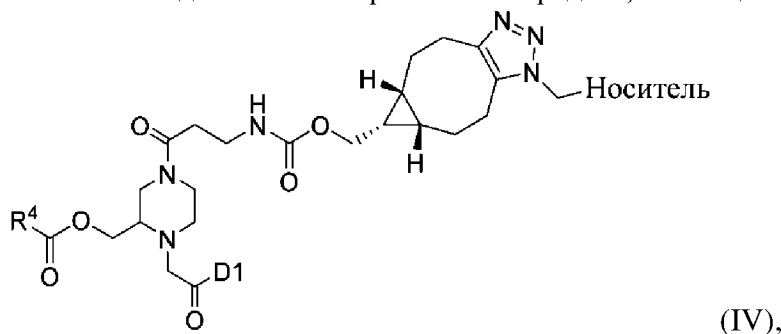
45. Система доставки лекарственных средств, имеющая формулу (III):



где ANGPTL3 содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей

мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45 или их комбинациям.

46. Система доставки лекарственных средств, имеющая формулу (IV):

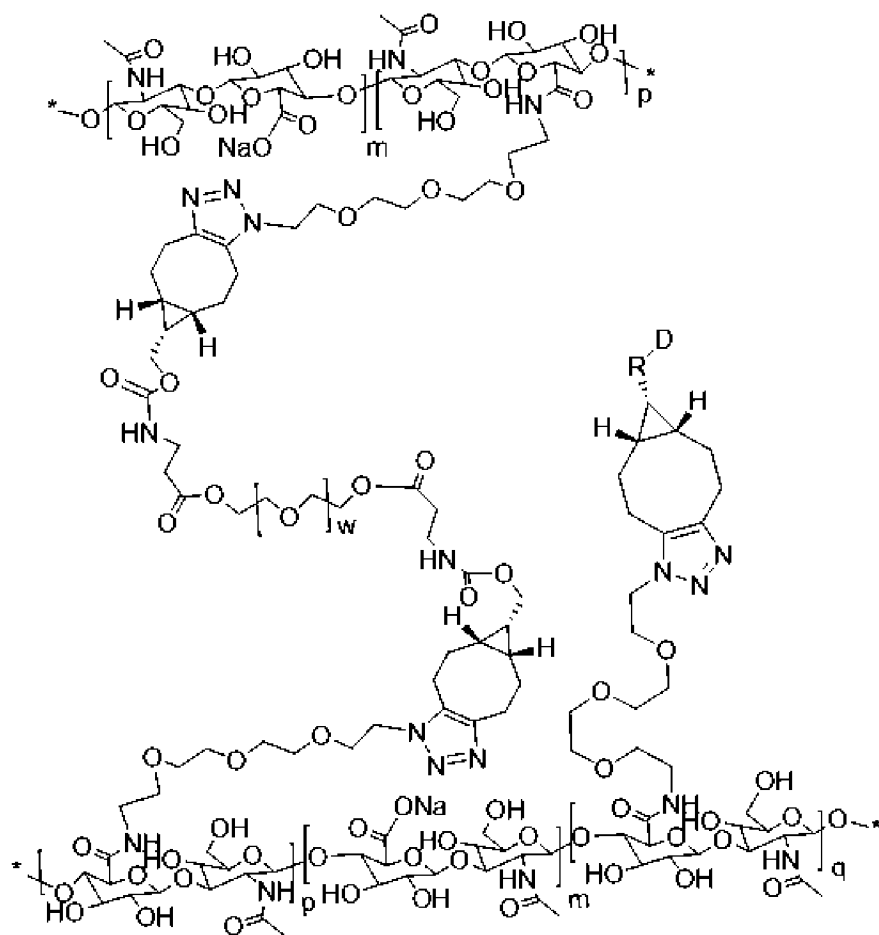


где SEQ ID NO: 19 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий аминокислотные остатки 242-460 со ссылкой на SEQ ID NO: 1 и замену K423Q.

47. Система доставки лекарственных средств, содержащая D-R-R¹¹, где R содержит бесследный линкер, связанный с биологически активным средством D; D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R¹¹ 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.

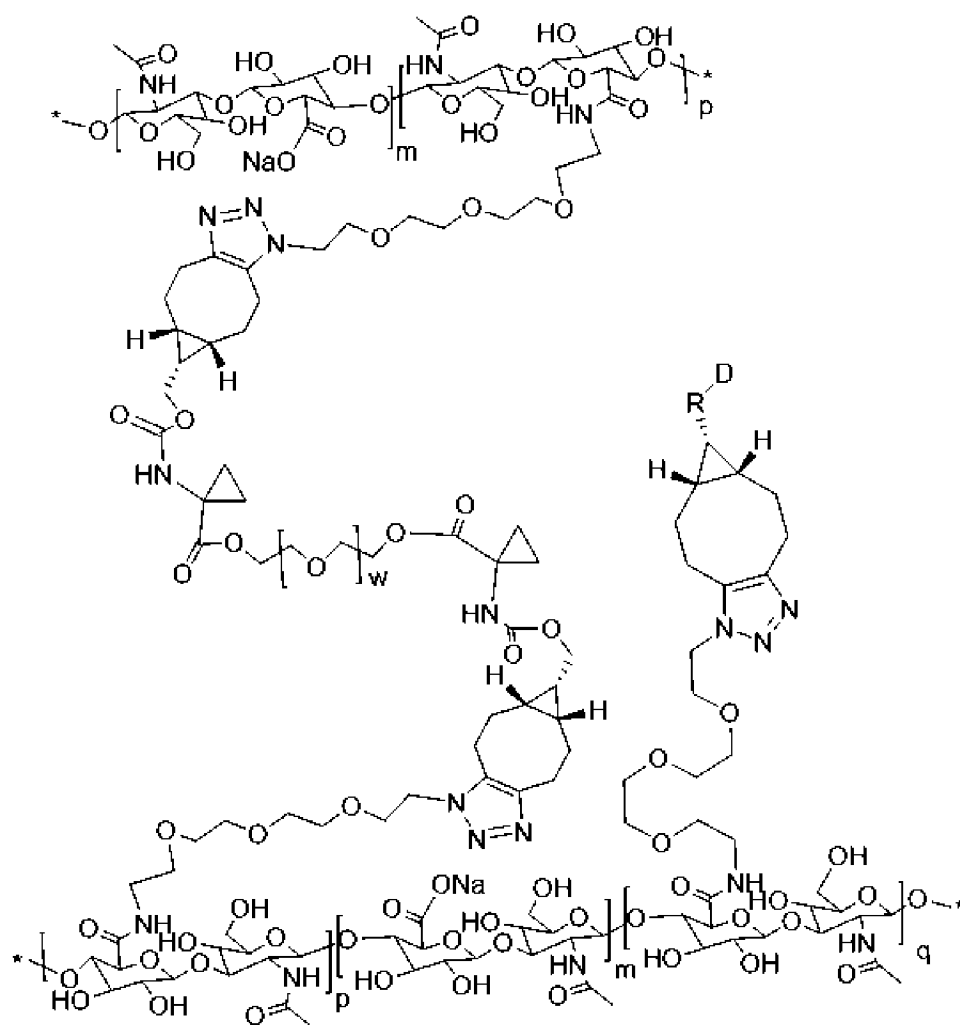
48. Система доставки лекарственных средств по п. 47, где D содержит полипептид ANGPTL3, характеризующийся по меньшей мере 95% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1 или 3-45.

49. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой (XXIV), где D представляет собой полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



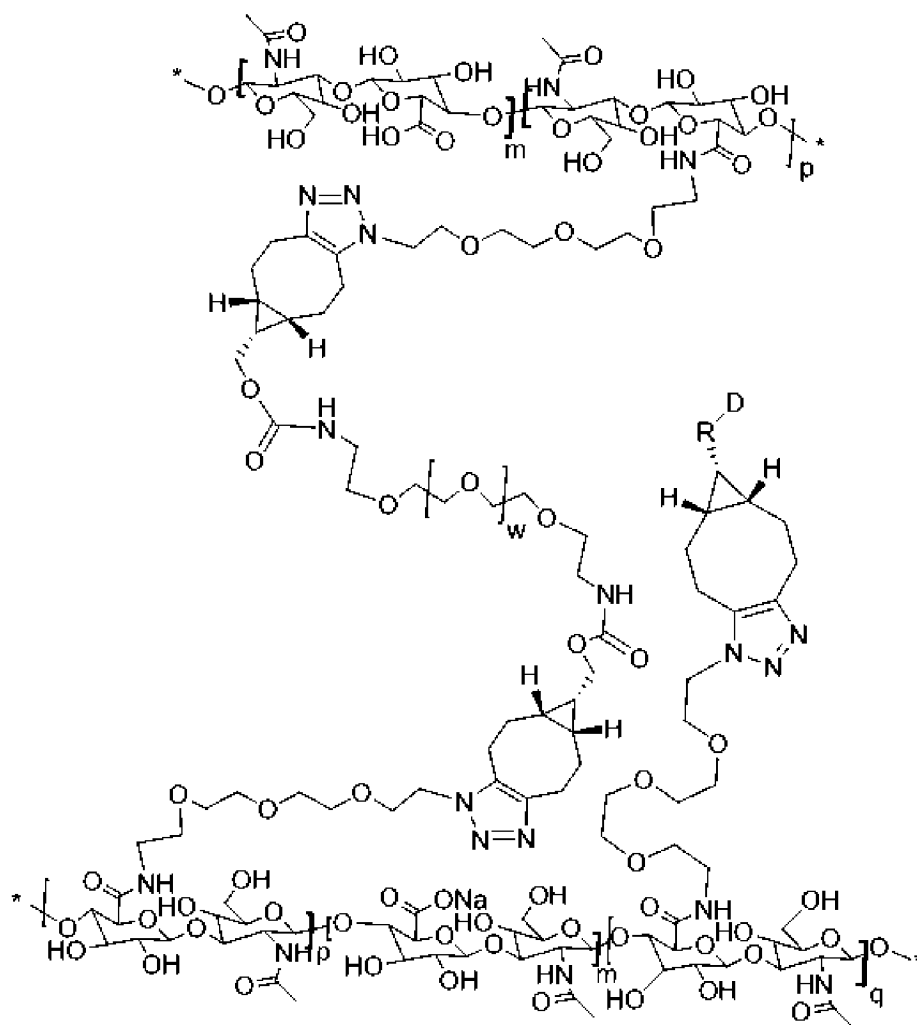
(XXIV).

50. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой (XXV), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



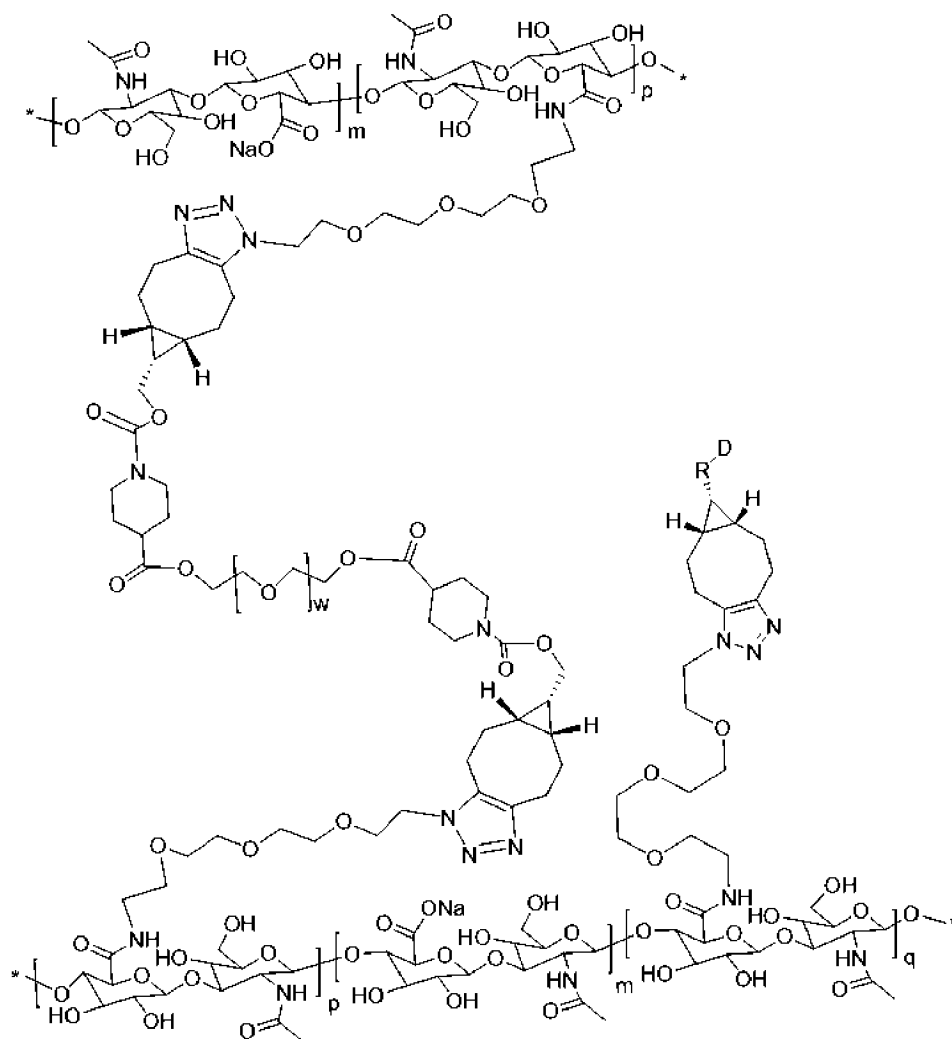
(XXV).

51. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой (XXVI), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



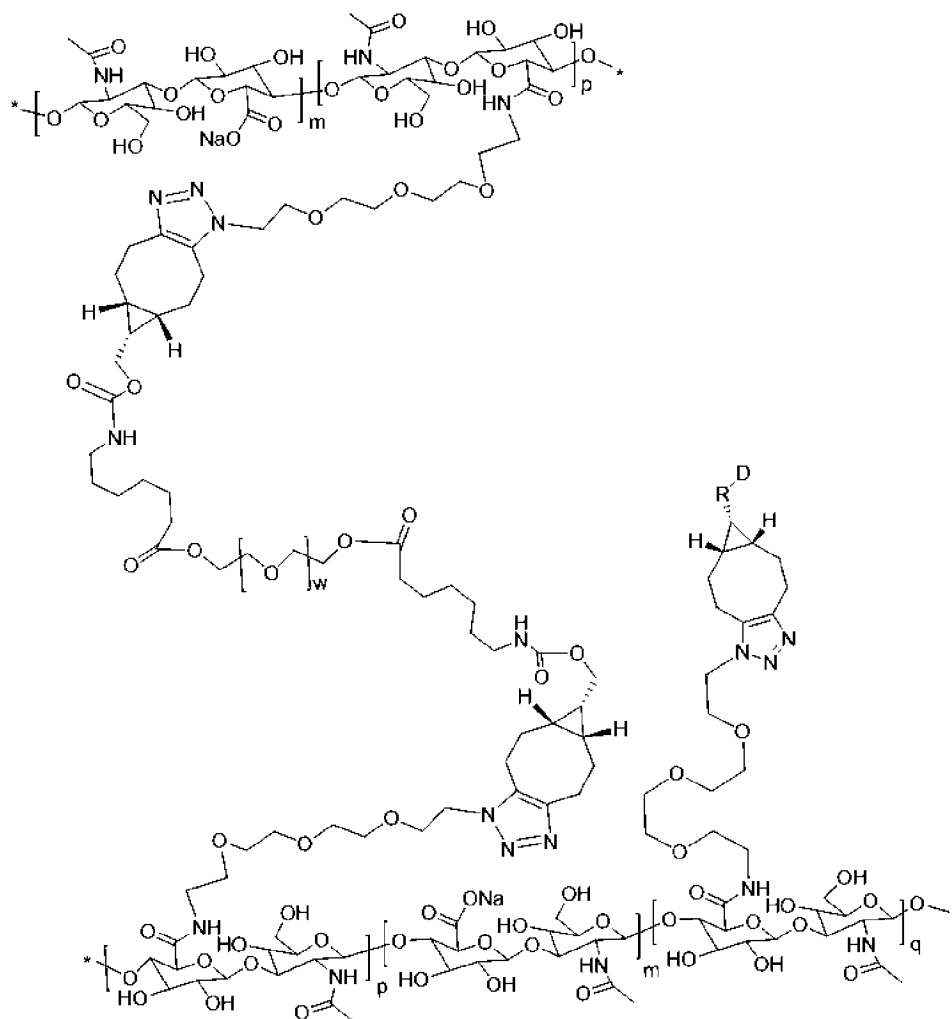
(XXVI).

52. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой (XXVII), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



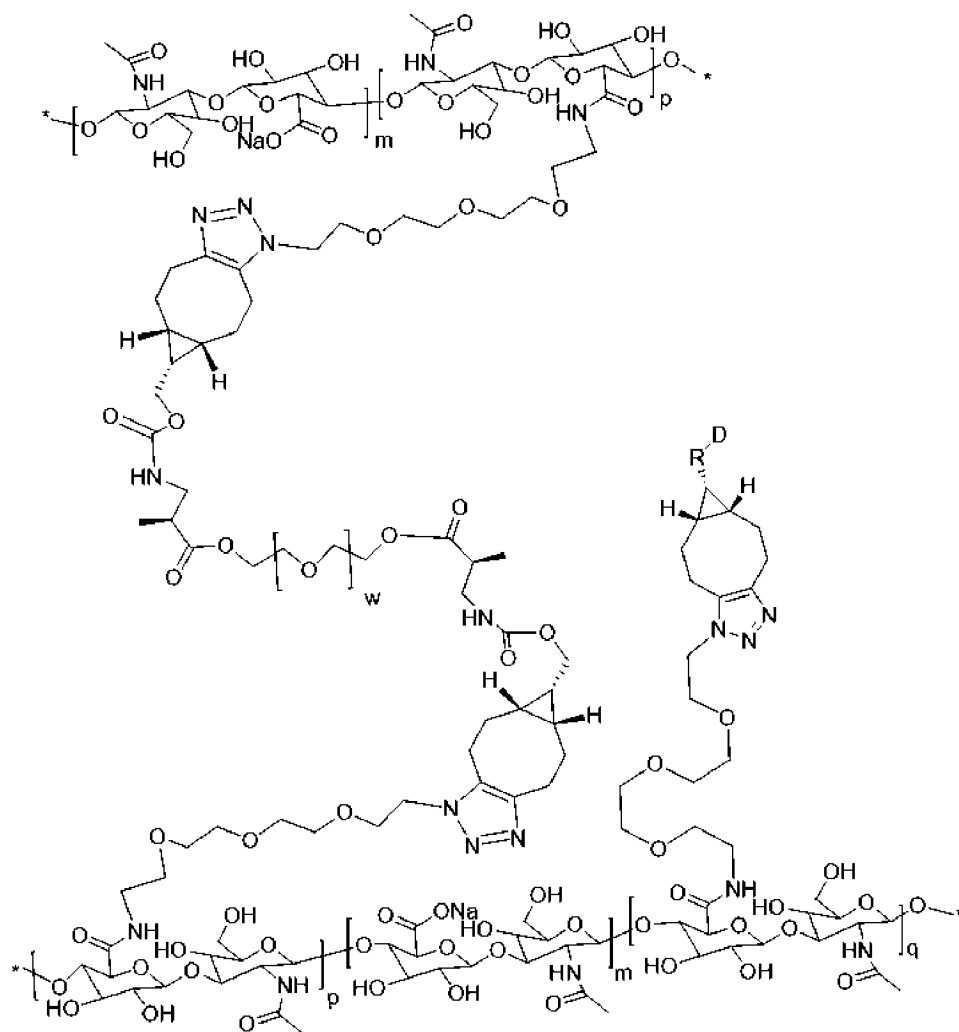
(XXVII).

53. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой (XXVIII), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



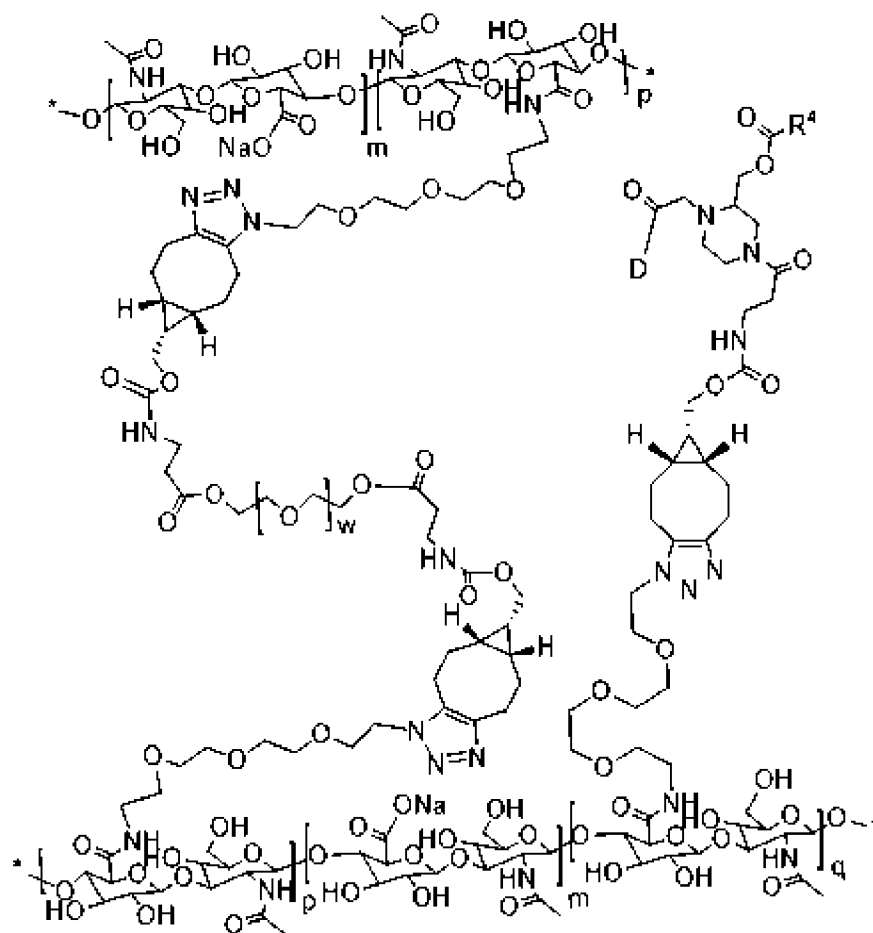
(XXVIII).

54. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой (XXIX), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



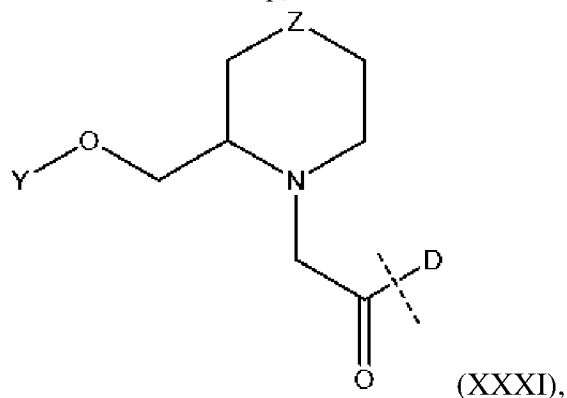
(XXIX).

55. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXX), где лекарственное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R⁴ 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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

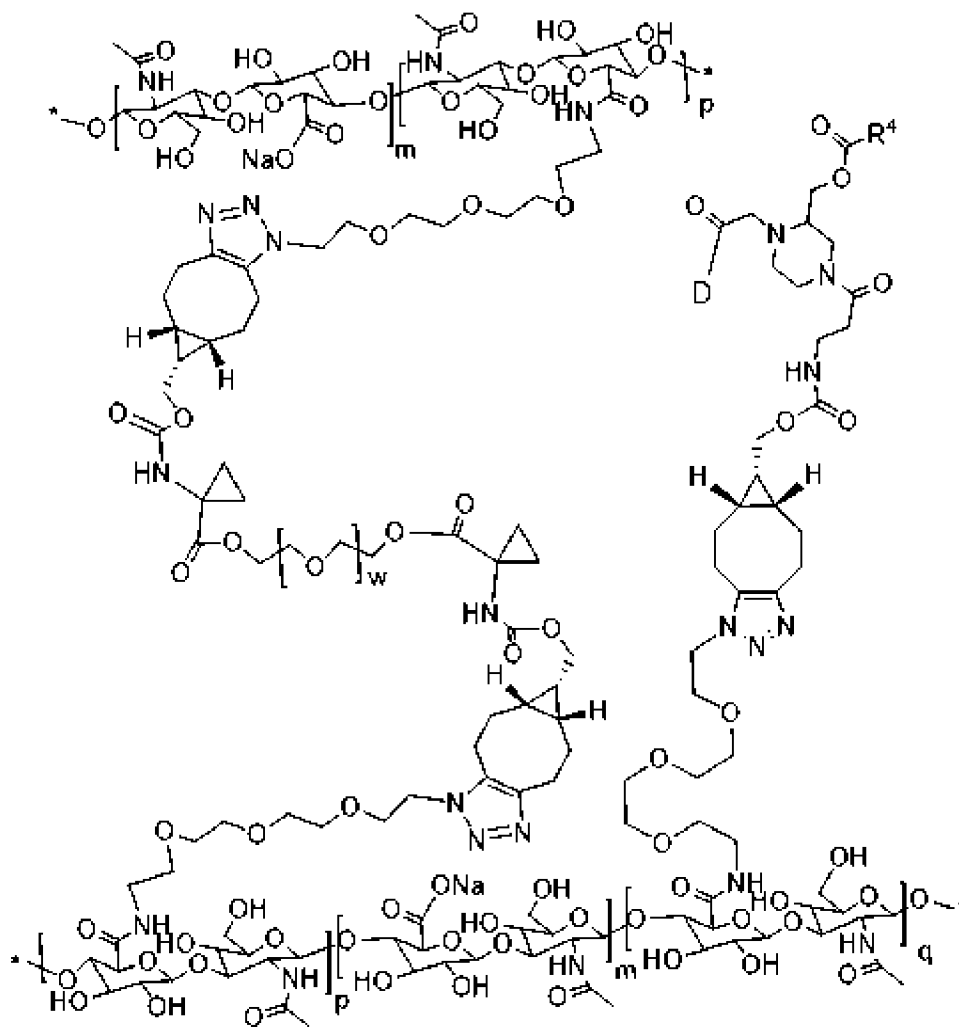
Z представляет собой N-L-A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11} ; и

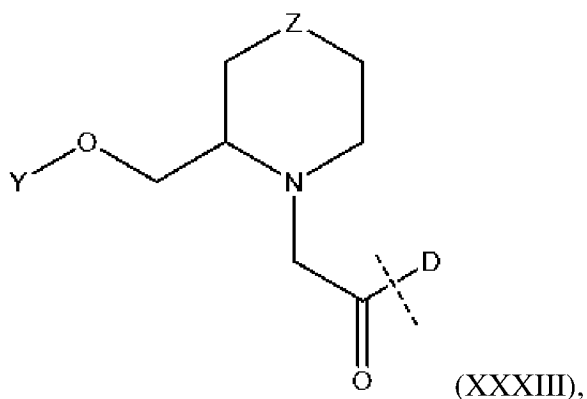
R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)-бис-[3-((((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метокси)карбонил)амино)п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

57. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXXII), где лекарственное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; 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 содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе;

Y представляет собой $C(O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

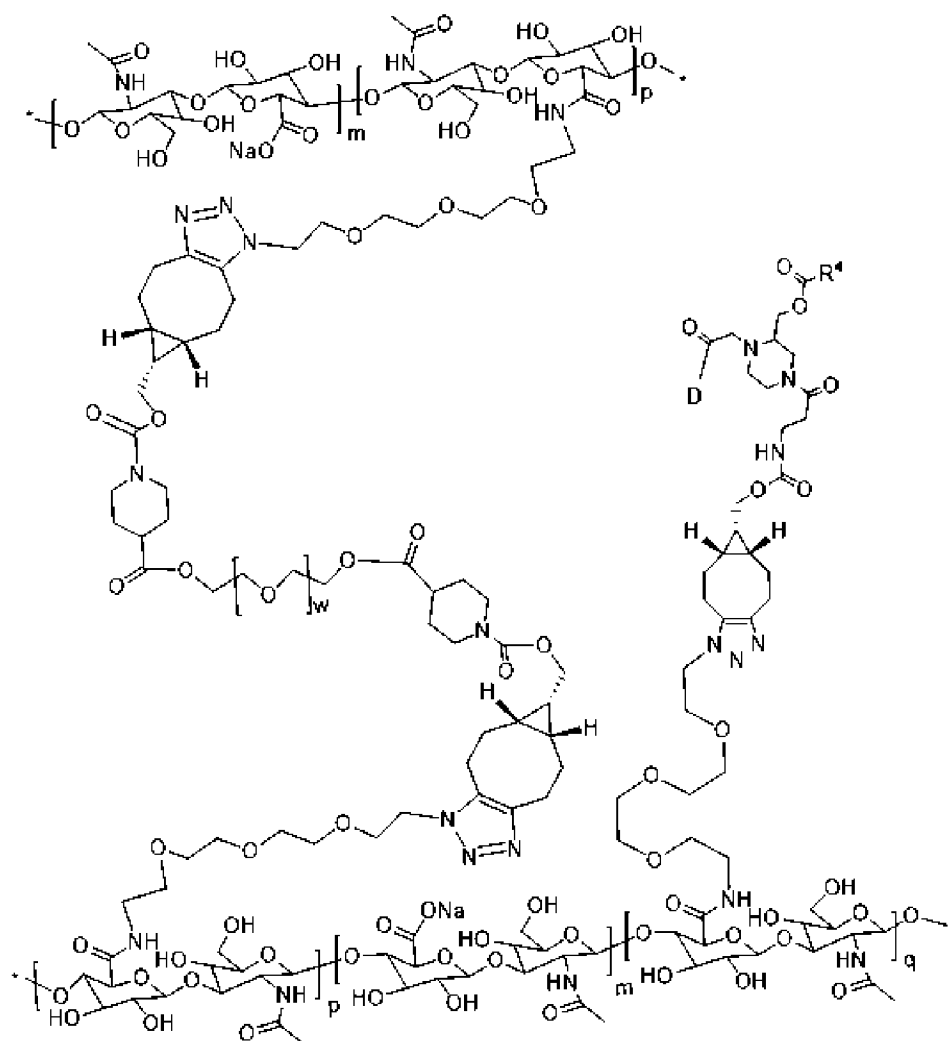
Z представляет собой N-L-A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11} ; и

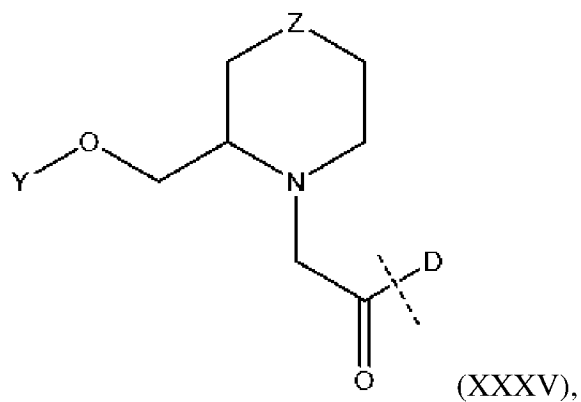
R^{11} представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь $N(H)(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2N_3$, и где сшивающее средство, применяемое для образования гидрогеля, содержит PEG(2000)-бис-[1-(((1'R,8'S,9's)-бицикло[6.1.0]нон-4'-ин-9'-ил)метокси)карбонил)ами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

59. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXXIV), где лекарственное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; 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 лекарственное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



(XXXV),

где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе;

Y представляет собой C(O)R⁴;

R^4 представляет собой C_1 - C_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C_1 - C_4 алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C_1 - C_4 алкокси;

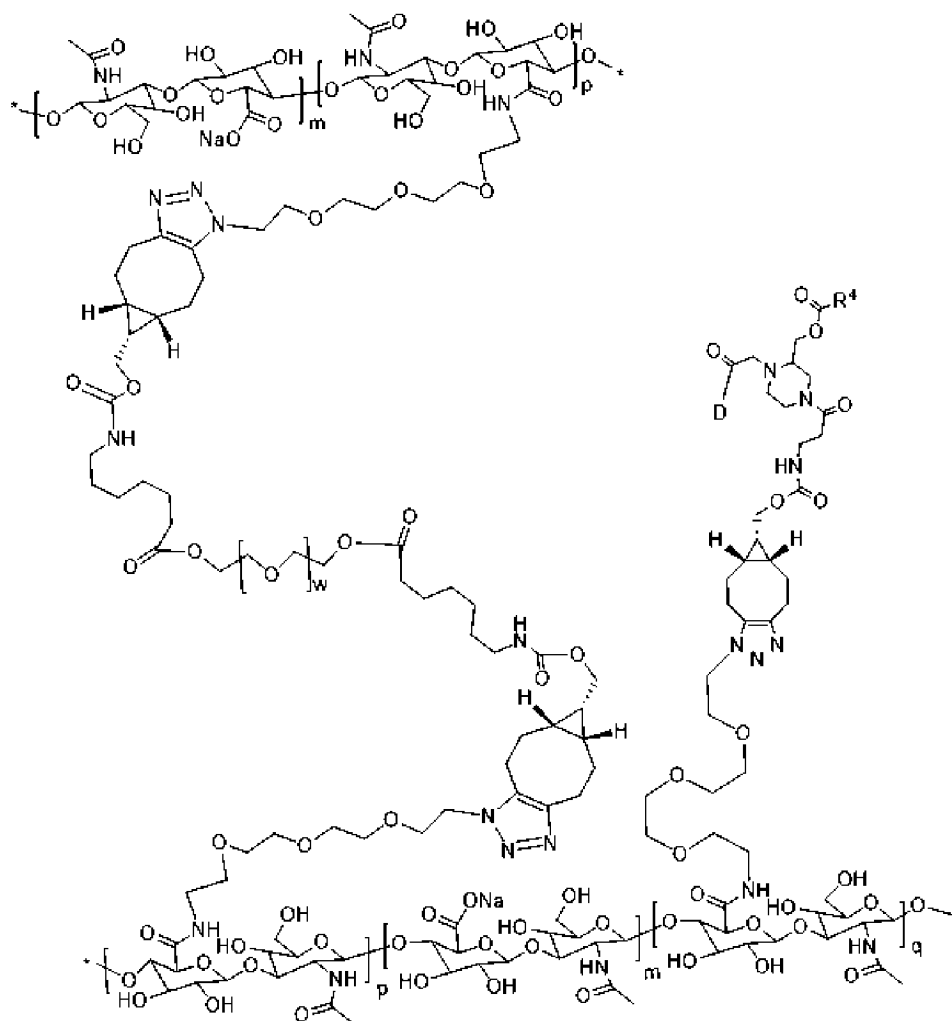
Z представляет собой N-L-A;

L представляет собой $C(O)CH_2CH_2NH$;

A представляет собой R^{11} ; и

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-[1-(((1'R,8'S,9'S)-бицикло[6.1.0]нон-4'-ин-9'-ил)метокси)карбонил)пиперидин-4-карбоновой-кислоты-сложный эфир].

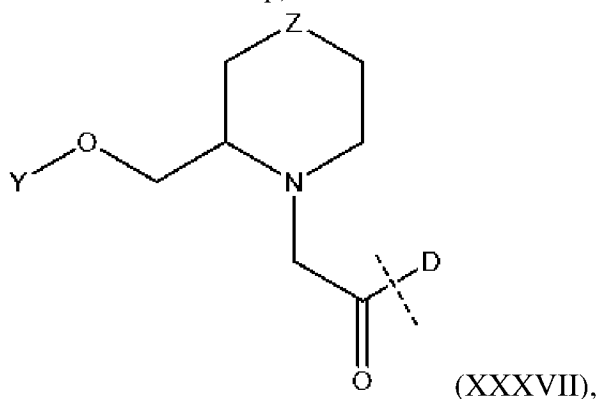
61. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, которая представлена формулой (XXXVI), где лекарственное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R^4 представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1-метилциклопропил или метоксиметил:



(XXXVI).

62. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой XXXVII, где D содержит

полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



где пунктирная линия обозначает участок присоединения к первичной аминогруппе;

Y представляет собой C(O)R⁴;

R⁴ представляет собой C₁-C₈алкил или C₃-C₇циклоалкил, где циклоалкил необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C₁-C₄алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C₁-C₄алкокси;

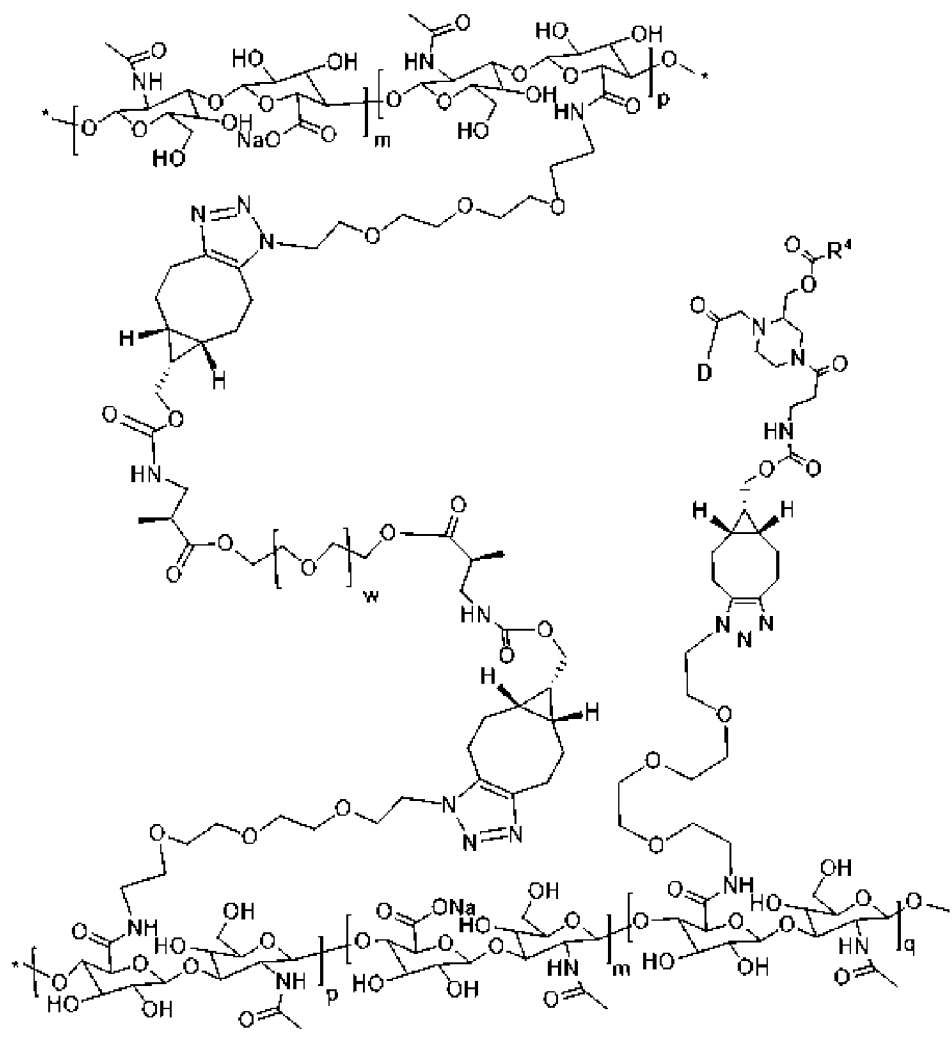
Z представляет собой N-L-A;

L представляет собой C(O)CH₂CH₂NH;

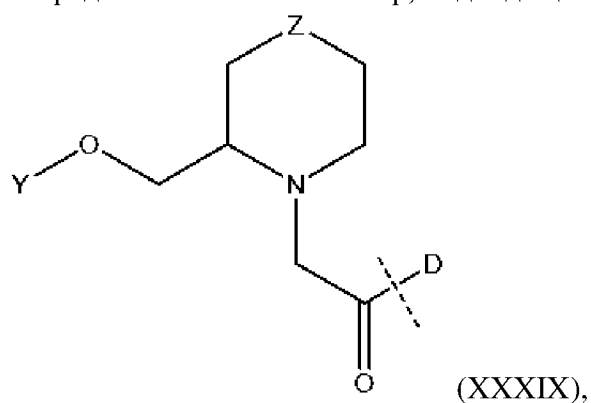
A представляет собой R¹¹; и

R¹¹ представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь N(H)(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃, 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 лекарственное средство D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R⁴ представляет собой метил, этил, пропил, изопропил, 1-метилциклопропил или метоксиметил:



64. Система доставки лекарственных средств или ее фармацевтически приемлемая соль, содержащая D-R, который представлен формулой (XXXIX), где D содержит полипептид ANGPTL3, содержащий по меньшей мере одну первичную аминогруппу; и R представляет собой линкер, подходящий для высвобождения D:



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_8 алкил или C_3 - C_7 циклоалкил, где циклоалкил

необязательно замещен 0, 1 или 2 независимо выбранными C₁-C₄алкильными группами, и где алкил необязательно замещен C₁-C₄алкокси;

Z представляет собой N-L-A;

L представляет собой $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$;

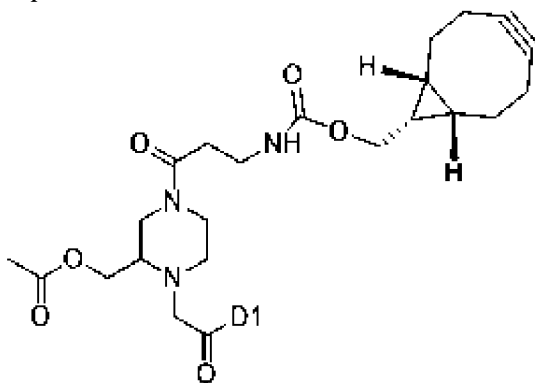
А представляет собой R^{11} ; и

R¹¹ представляет собой гидрогель, полученный из сшитой гиалуроновой кислоты, где гиалуроновая кислота содержит по меньшей мере одну соединенную амидной связью боковую цепь N(H)(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃, 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)аминопропаноат].

65. Системы доставки лекарственных средств по любому из пп. 55-64, где D представляет собой SEQ ID NO: 19, и R⁴ представляет собой -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₃ или метилциклопропил.

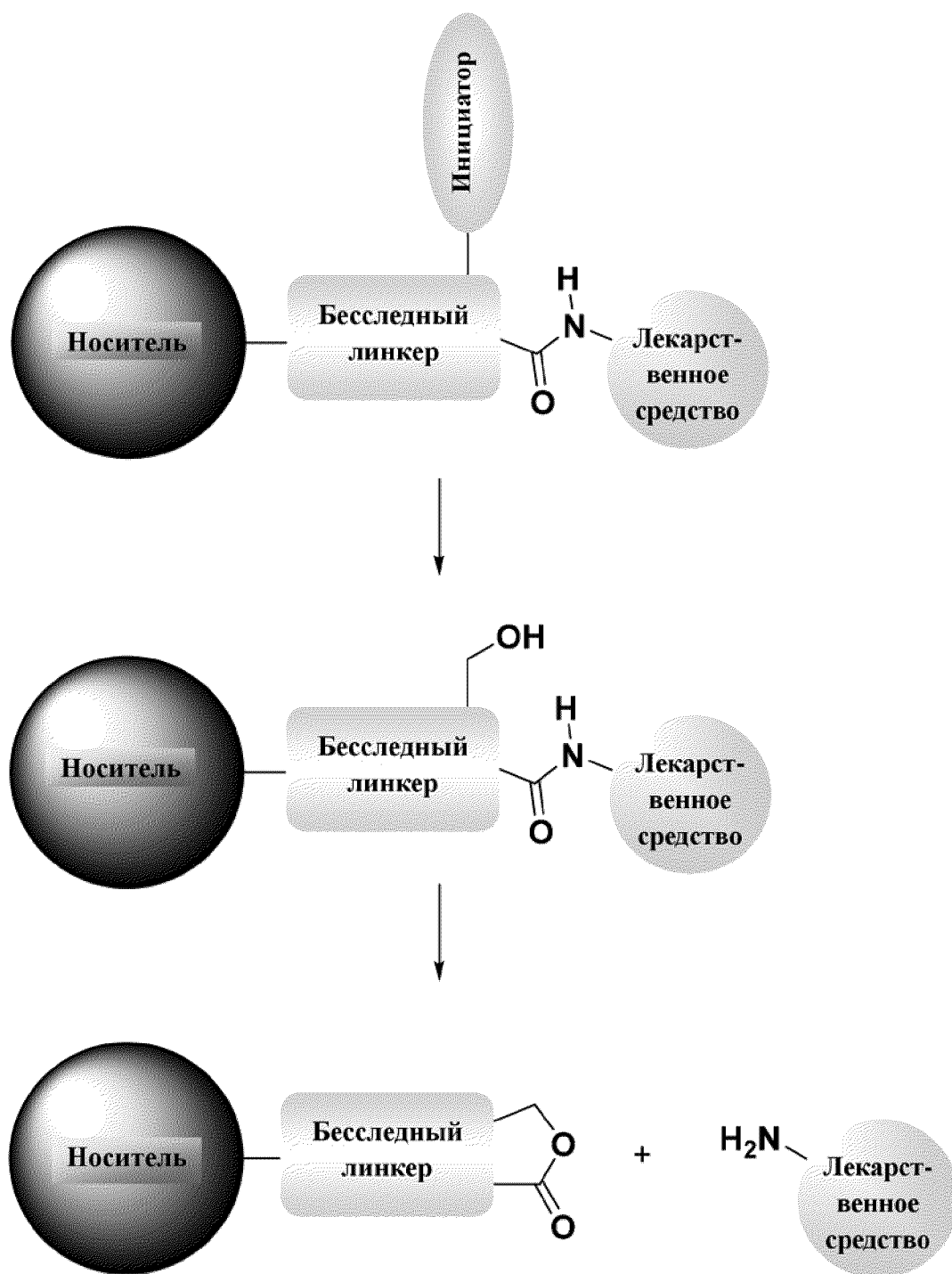
66. Системы доставки лекарственных средств по любому из пп. 55-65, где D представляет собой SEQ ID NO: 19, и R⁴ представляет собой -CH₃.

67. Системы доставки лекарственных средств по любому из пп. 55-66, где аддукт D-R содержит:

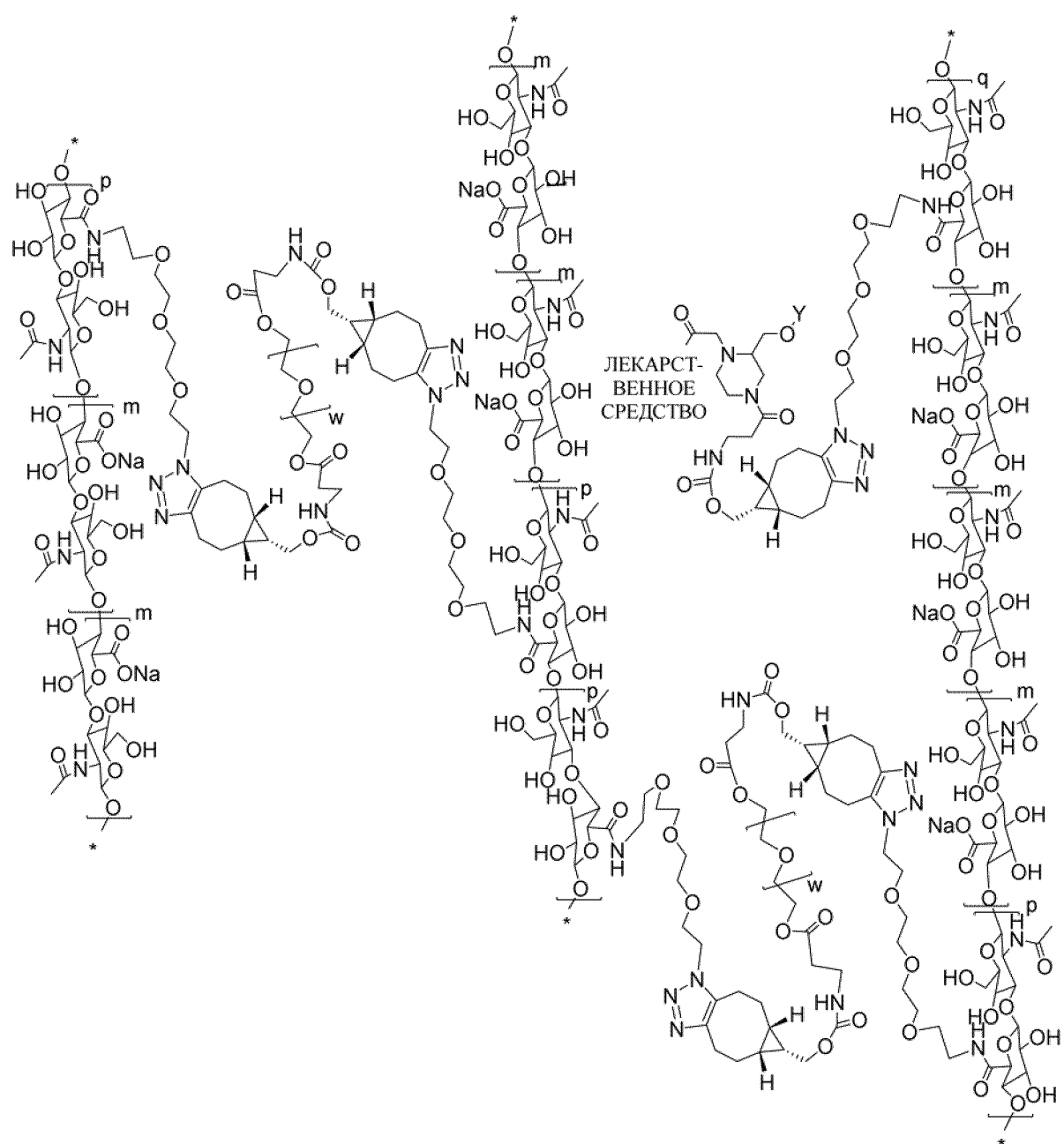


По доверенности

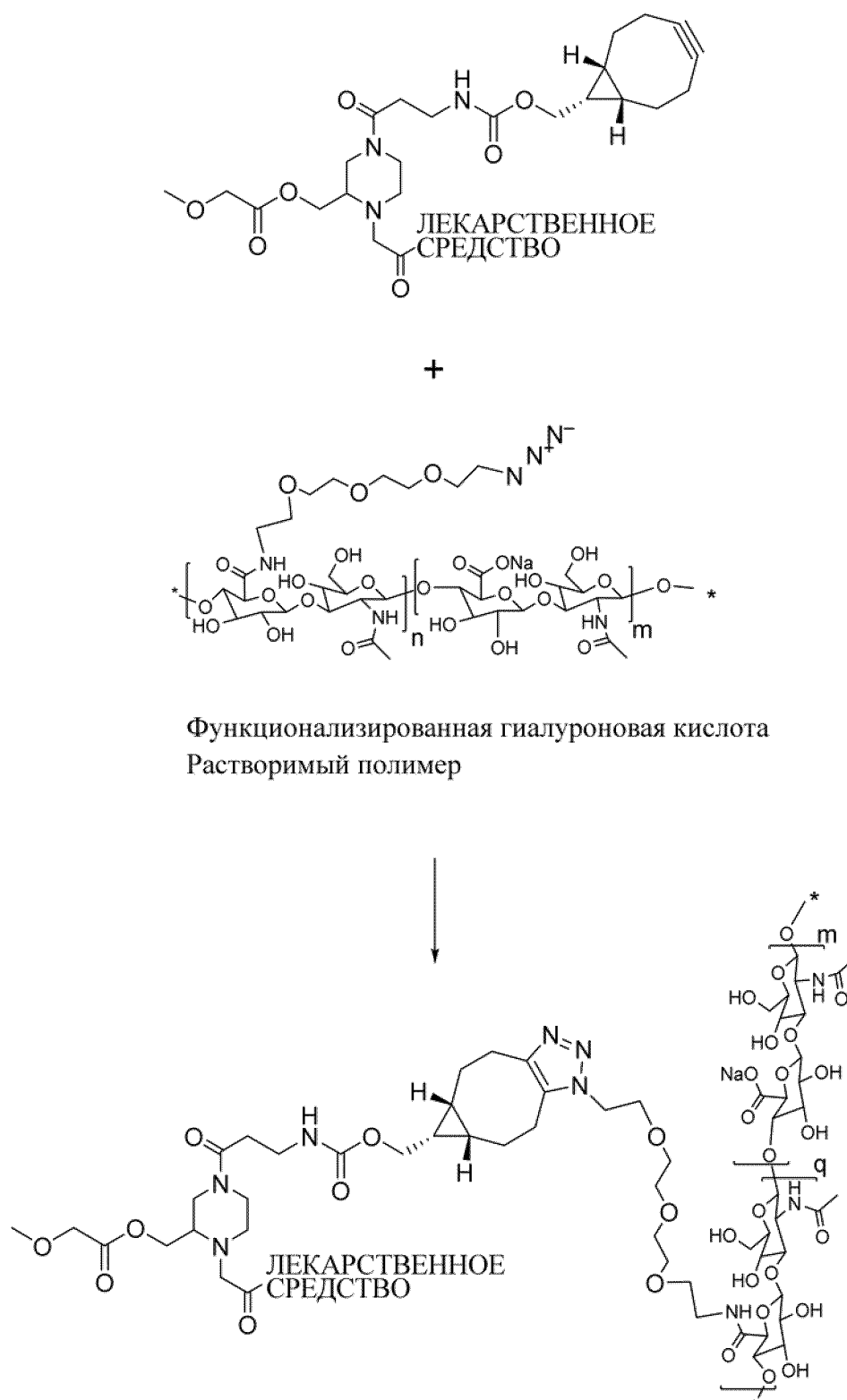
Фиг. 1



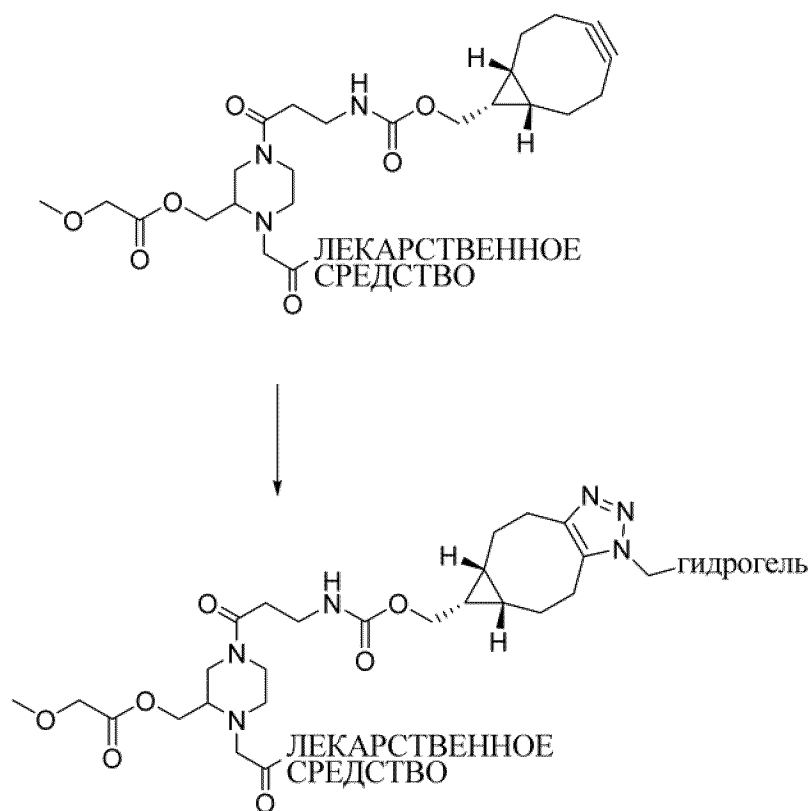
Фиг. 2



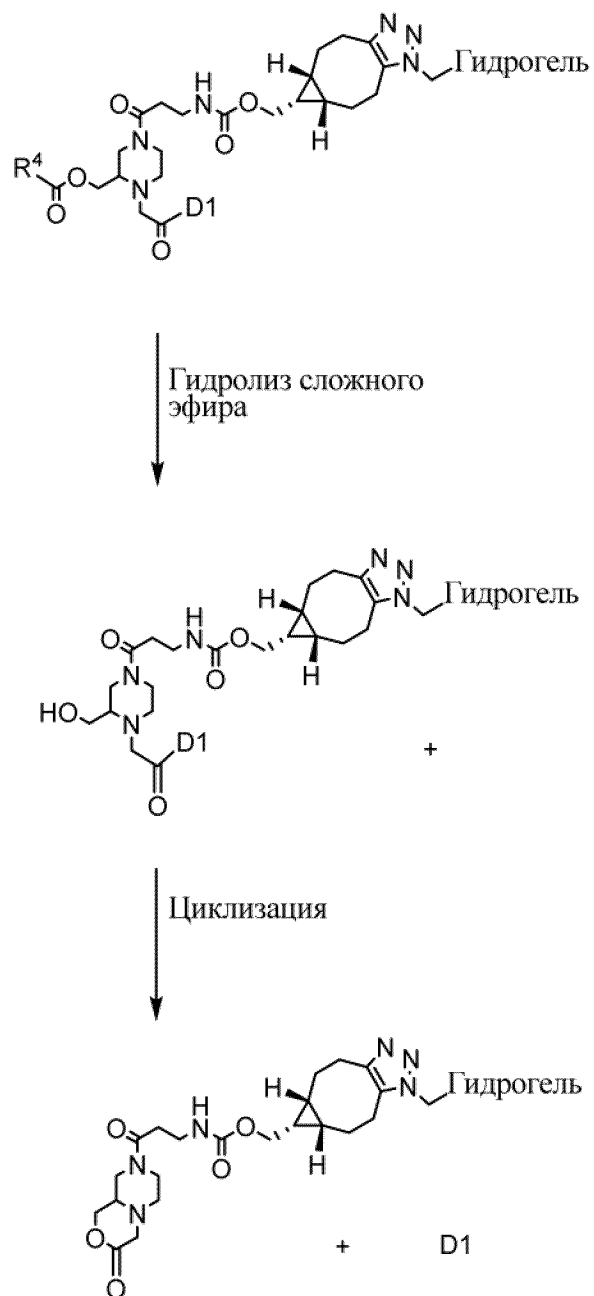
Фиг. 3А



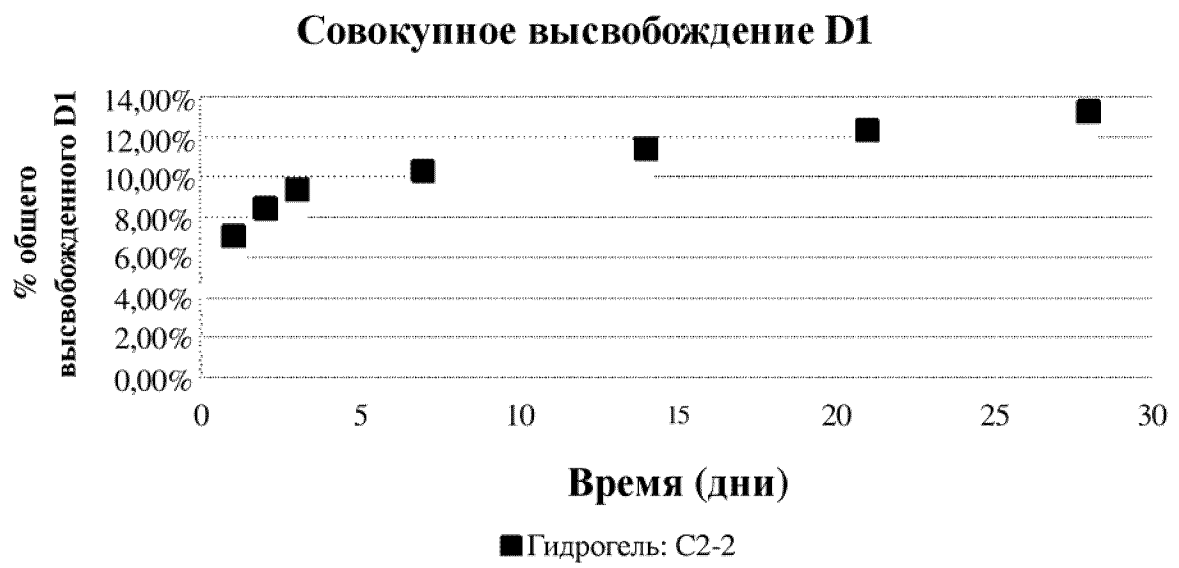
Фиг. 3В



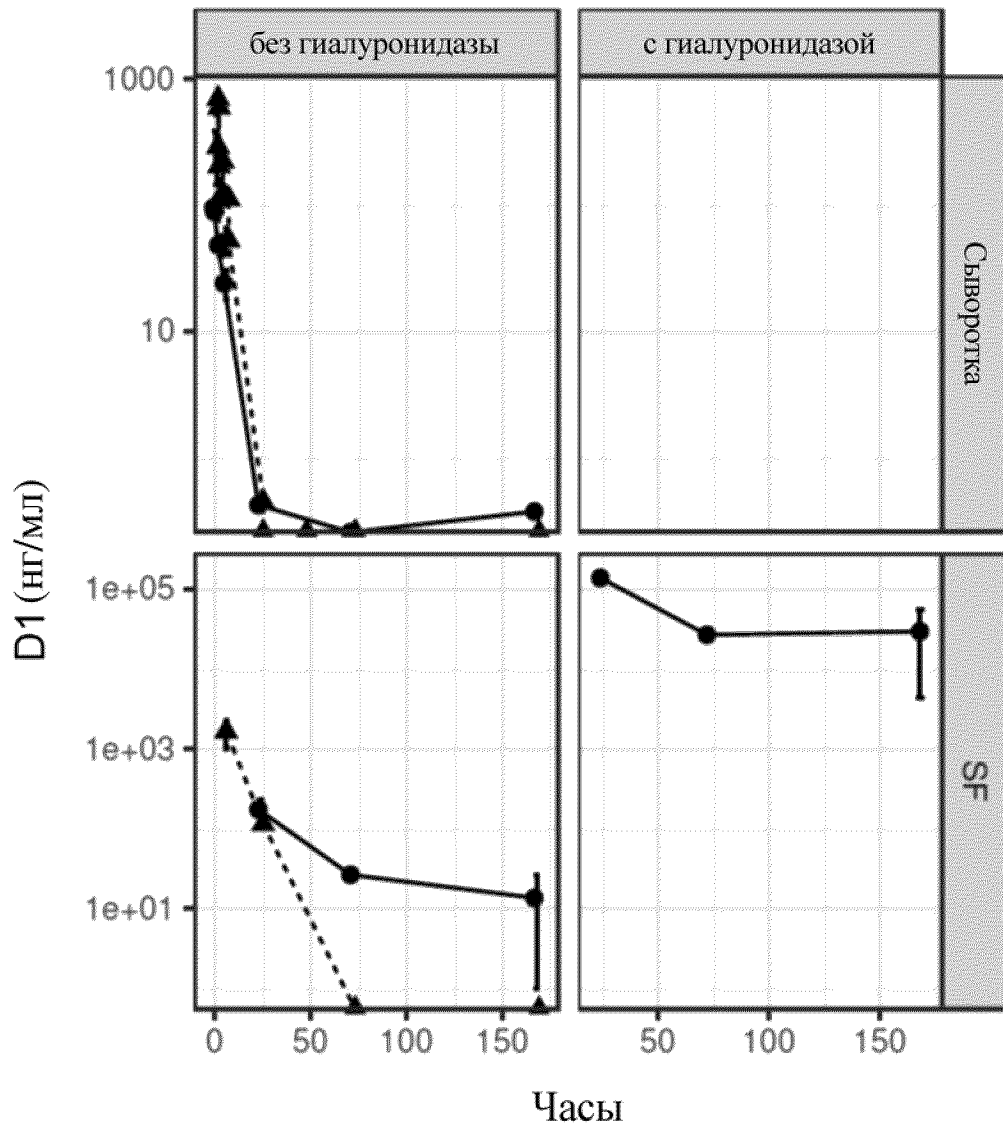
Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5



- Внутрисуставная инъекция C2-2
- ▲ Внутрисуставная инъекция состава на основе D1 с немедленным высвобождением