

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391158** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.21

(22) Дата подачи заявки
2021.11.24

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)

(54) СОСТАВЫ С ЗАМЕДЛЕННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕВОДНОГО МЕМБРАННОГО ЭМУЛЬГИРОВАНИЯ

(31) **63/118,264**

(32) **2020.11.25**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/060800**

(87) **WO 2022/115588 2022.06.02**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

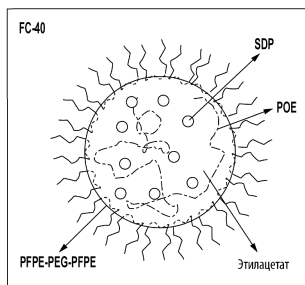
(72) Изобретатель:

Чен Хангер, Чжао Имин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предложены неводные мембранно-эмульсионные способы получения полимерных микрочастиц и микрочастиц с полимерным покрытием. В некоторых вариантах реализации предложены способы получения микрочастиц с замедленным высвобождением или контролируемым высвобождением путем смешивания микронизированного белкового порошка и полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора, перемешивания первого неводного раствора с образованием суспензии, подачи суспензии в диспергирующий насос, в котором суспензия вливается через пористую мембрану в непрерывную фазу, содержащую фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество, с образованием эмульсии углеводород-во-фторуглероде. Углеводородный растворитель, фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество удаляют и микрочастицы собирают.



A1

202391158

202391158

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577511EA/019

СОСТАВЫ С ЗАМЕДЛЕННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕВОДНОГО МЕМБРАННОГО ЭМУЛЬГИРОВАНИЯ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по заявке США с серийным номером 63/118264, поданной 25 ноября 2020 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Аспекты данного изобретения, как правило, относятся к составам микросфер лекарственного средства и способам их получения с применением неводных эмульсионных систем, полученных способом мембранного эмульгирования.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Доставка терапевтического белка с замедленным высвобождением к биологически значимой мишени является желательной для лечения медицинских состояний, таких как онкологическое заболевание, сердечно-сосудистые заболевания, сосудистые заболевания, ортопедические заболевания, стоматологические заболевания, раны, аутоиммунные заболевания, желудочно-кишечные расстройства и заболевания глаз. Биосовместимые и биоразлагаемые полимеры и другие имплантируемые устройства доставки для контролируемой и пролонгированной доставки лекарственных средств применяются уже несколько десятилетий. Например, в некоторых устройствах доставки на полимерной основе по мере разложения полимера с течением времени терапевтическое лекарственное средство медленно высвобождается.

[0004] Пролонгированное высвобождение может быть желательным для соблюдения пациентом режима и схемы лечения. В частности, уменьшение количества инъекций может быть полезным, особенно в тех случаях, когда инъекцию должен выполнить доктор, например, в случае внутриглазных терапевтических средств. Существует неудовлетворенная медицинская потребность в лекарственных средствах с пролонгированным высвобождением для эффективной доставки лекарственных средств с течением времени с минимальным количеством инъекций. В случае других заболеваний, например, онкологического заболевания и воспалительных заболеваний, существует потребность в улучшенных имплантируемых составах с пролонгированным высвобождением, содержащих стабильные и эффективные белковые терапевтические средства.

[0005] Терапевтические макромолекулы, такие как антитела, рецепторные Fc-слипые белки, белки-ловушки и белки-мини-ловушки, должны быть составлены таким образом, чтобы не только сделать молекулы подходящими для введения пациентам, но и сохранить их стабильность во время хранения и в месте введения. Например, терапевтические белки (например, антитела и слипые белки) в водном растворе склонны к деградации, агрегации и/или нежелательным химическим модификациям, если раствор не составлен должным образом. Стабильность белкового терапевтического средства в

жидком составе зависит не только от видов вспомогательных веществ, используемых в составе, а также от количества и соотношения этих вспомогательных веществ по отношению друг к другу, но также и от концентрации растворимого белка. При приготовлении терапевтического белкового состава необходимо также принимать во внимание соображения, не связанные со стабильностью. Примеры таких дополнительных соображений включают вязкость раствора и концентрацию терапевтического белка, которую может обеспечить данный состав. При составлении терапевтического белка для пролонгированного высвобождения необходимо проявлять большую осторожность, чтобы получить состав, который остается стабильным с течением времени, при хранении и физиологической температуре, содержит адекватную концентрацию антител и обладает другими свойствами, которые позволяют удобно вводить состав пациентам.

[0006] Некоторые составы с пролонгированным высвобождением производятся с применением различных методологий инкапсуляции, включая: внутреннее разделение фаз, межфазную полимеризацию, формирование множественных эмульсий, послойную адсорбцию полиэлектролитов и способы мягкого шаблонирования. Множественные эмульсии вода-в-масле-в-воде (W/O/W) являются наиболее распространенным типом множественных эмульсий и позволяют инкапсулировать водные/гидрофильные ядра непосредственно в водной суспензии. К сожалению, водные эмульсионные системы имеют определенные проблемы при применении для инкапсулирования биологически активных агентов в составы с пролонгированным высвобождением. Например, осаждение белков происходит на границе раздела вода-органика с сопутствующим снижением их иммунореактивности (Raghuvanshi, R., et al., Pharm Dev Technol, 3(2):269-76 (1998)). В некоторых водных эмульсионных системах вода может диффундировать в органическую фазу и гидролизовать белок. После гидролиза белковые капли начинают сливаться и выходить в водную среду, агрегировать или осаждаться. После затвердевания в микрочастице появляются пустоты и водные каналы, где когда-то был белок, но вышел в водную среду.

[0007] Неводные эмульсии могут заменить обычные водные эмульсии, если присутствие воды нежелательно. Однако в литературе или предшествующем уровне техники имеется мало сообщений о неводных эмульсиях. Известны два типа неводных эмульсионных систем на углеводородной основе: (1) два несмешивающихся органических растворителя, стабилизированных блок-сополимерами (например, гексан/диметилформамид); и (2) несмешивающиеся с маслом полярные растворители (например, формамид, ацетонитрил), заменяющие воду с применением существующих поверхностно-активных веществ. Ранее были исследованы эмульсии вода-в-перфторированном масле (W/F) и широко применялись в микрожидкостной технике на основе капель для биологических анализов с одной клеткой или одной молекулой. В этих исследованиях PFPE-ПЭГ-PFPE использовался в качестве фторсодержащего поверхностно-активного вещества (FS) для стабилизации капель воды во фторуглеродных растворителях.

[0008] Хотя доступно множество пар несмешивающихся растворителей, обычно одна полярная и одна неполярная, задача состоит в том, чтобы найти пару, подходящую для синтеза полимерных микросфер. Типовые биоразлагаемые полимеры, т.е. поли(лактид-ко-гликолид) (ПМГК), полимолочная кислота (ПМК), поли(ортоэфир) (РОЕ) в основном растворяются в растворителях средней полярности, таких как хлороформ, дихлорметан, этилацетат и т.д. Это ограничивает выбор непрерывной фазы. Кроме того, совместимость с технологическим процессом, токсичность, безопасность и остаточные растворители являются проблемами при использовании этих органических растворителей и должны учитываться при использовании в качестве фармацевтического продукта.

[0009] Фторуглероды можно использовать в качестве непрерывной фазы в неводной эмульсионной системе благодаря следующим общим свойствам:

1. Фторуглероды не являются ни «гидрофобными», ни «гидрофильными», они не смешиваются с большинством органических (углеводородных) растворителей, что делает их идеальными в качестве непрерывной фазы для капельных углеводородных эмульсий.

2. Фторуглероды не растворяют белки и другие гидрофильные молекулы, полимеры на основе углеводов и органические вспомогательные вещества, т.е. эти типы молекул не растворяются во фторуглеродах.

3. Фторуглероды имеют низкую вязкость.

4. Фторуглероды химически инертны и могут быть относительно менее токсичными или вызывающими коррозию по сравнению с обычно используемыми углеводородными растворителями.

5. Фторуглероды летучи и пригодны для повторного использования

[0010] В предыдущей литературе сообщалось о различных типах эмульсионных систем, содержащих фторуглерод, с помощью способов микрофлюидики, таких как двойная эмульсия вода-во-фторуглероде (W/F), вода-во-фторуглероде-в-воде (W/F/W), водная тройная эмульсия/фторуглерод/масло/вода (W/F/O/W), двойная эмульсия фторуглерод/углеводород/вода (F/H/W) и двойная эмульсия углеводород/фторуглерод/вода (H/F/W). Некоторые из этих эмульсий были использованы для синтеза полимерных микросфер. Однако все они по-прежнему представляют собой эмульсионные системы на водной основе, использующие воду в качестве дисперсной или непрерывной фазы.

[0011] Независимо от типа применяемой эмульсии размер микросфер или микрочастиц обычно широк, и размер невозможно легко контролировать для достижения цели без тщательной оптимизации процесса и стратегий контроля. Таким образом, остается потребность в разработке новых способов, которые контролируют размер микросфер или микрочастиц для достижения цели без обширной оптимизации процесса и стратегий управления.

[0012] Таким образом, целью данного изобретения является предоставление неводных мембранных эмульсионных систем и способов получения лекарственных составов и способов их применения.

[0013] Другой целью данного изобретения является создание составов с пролонгированным высвобождением с улучшенной стабильностью белка, стабильным пролонгированным высвобождением и контролируемым распределением по размерам.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0014] Предложены неводные мембранно-эмульсионные способы получения полимерных микрочастиц и микрочастиц с полимерным покрытием. В некоторых вариантах реализации предложен способ получения микрочастиц с замедленным высвобождением или контролируемым высвобождением путем объединения микронизированного белкового порошка и полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора, перемешивания первого неводного раствора с образованием суспензии, подачи суспензии в дисперсионную ячейку, причем суспензию вливают через пористую мембрану в непрерывную фазу, содержащую фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество, под тангенциальным потоком непрерывной фазы с образованием эмульсии углеводорода-во-фторуглероде (мембранное эмульгирование). Способ дополнительно включает стадии добавления гидрофторэфира к эмульсии углеводород-во-фторуглероде и удаления углеводородного растворителя из углеводородной фазы для получения отвержденных микрочастиц. В некоторых вариантах реализации к эмульсии добавляют смесь гидрофторэфира и фторуглерода, чтобы способствовать удалению углеводорода. В некоторых вариантах реализации способ включает последующее добавление в эмульсию дополнительного количества чистого гидрофторэфира. Способ дополнительно включает удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц, причем микрочастицы содержат белок, инкапсулированный в матрице полимера. Способ необязательно включает промывание микрочастиц во фторуглеродной жидкости для удаления остаточного фторсодержащего поверхностно-активного вещества, удаление фторуглеродной жидкости и сбор микрочастиц, например, путем вакуумной фильтрации. В некоторых вариантах реализации вакуумная фильтрация использует мембранный фильтр из полиэфирсульфона. В некоторых вариантах реализации белковый порошок получают из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, слитого белка или рекомбинантного белка. В некоторых вариантах реализации белок представляет собой белок-ловушку VEGF, например, афлиберцепт. В некоторых вариантах реализации эмульсия образуется путем объемного эмульгирования.

[0015] В некоторых вариантах реализации углеводородный растворитель выбирают из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации.

[0016] В некоторых вариантах реализации фторуглеродный раствор содержит 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N,N-бис(1,1,2,2,3,3,4,4, 4-нонафторбутил)бутан-1-амин.

[0017] В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество представляет собой перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир. Некоторые варианты реализации содержат от 0,1 до 5,0% масс./об.

фторсодержащего поверхностно-активного вещества, обычно около 0,5% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества.

[0018] В некоторых вариантах реализации гидрофторэфир представляет собой 2-(трифторметил)-3-этоксидодекафторгексан.

[0019] В некоторых вариантах реализации соотношение протеинового порошка и полимера составляет 0%-30%.

[0020] В некоторых вариантах пористая мембрана представляет собой мембрану из нержавеющей стали, необязательно мембрану из нержавеющей стали с фторофильным покрытием.

[0021] Фторуглеродные и углеводородные жидкости можно удалить путем выпаривания фторуглеродных и углеводородных жидкостей при атмосферном давлении окружающей среды или в вакууме. В некоторых вариантах реализации фторуглеродная жидкость содержит гидрофторэфир (HFE). В некоторых вариантах реализации HFE добавляют к неводной эмульсии для быстрого извлечения углеводорода-во-фторуглеродную жидкость для ускорения отверждения микросфер. В некоторых вариантах реализации протеиновый порошок представляет собой микронизированный протеиновый порошок. В некоторых вариантах реализации микрочастицы промывают для удаления любого остаточного углеводородного растворителя, фторуглеродной жидкости, фторсодержащего поверхностно-активного вещества или их комбинации, оставшихся на микрочастицах. Иллюстративная фторуглеродная жидкость включает перфторсодержащее соединение C5-C18, включая, помимо прочего, 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N,N-бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)бутан-1-амин. Примеры углеводородных растворителей включают, но не ограничиваются ими, дихлорметан, хлороформ, этилацетат и их комбинации. Типичным фторсодержащим поверхностно-активным веществом является тройной блок-сополимер перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир (PFPE-ПЭГ-PFPE). Примером биоразлагаемого полимера является полиортоэфир (POE). В некоторых вариантах реализации белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, гибридный белок или рекомбинантный белок. В некоторых вариантах реализации белок представляет собой высушенный распылением белок-ловушку VEGF. В некоторых вариантах реализации микрочастицы имеют диаметр от 1,0 до 100 мкм, от 1,0 до 200 мкм или от 30 до 60 мкм. В некоторых вариантах реализации микрочастицы, образованные раскрытыми способами неводной эмульсии, представляют собой текучие композиции микрочастиц. Описанные текучие композиции микрочастиц могут быть суспендированы в фармацевтически приемлемом вспомогательном веществе, например, солевом растворе с pH-буфером, или суспендированы в масляном носителе, таком как триглицериды со средней длиной цепи. Текучие композиции микрочастиц можно вводить парентерально, например, с помощью шприца с иглой 27G. В некоторых вариантах реализации распределение микросфер или микрочастиц по размерам составляет менее 10 CV%. В некоторых вариантах реализации распределение микросфер по размерам составляет от 10 до 20 CV%.

[0022] В другом варианте реализации предложен способ получения полимера или покрытых полимером микрочастиц путем смешивания от 1,0 до 30,0% масс./масс. всего твердого белка, высушенного распылением, в углеводородном растворе с образованием неводного первого раствора при перемешивании первого неводного раствора для образования суспензии, подавая суспензию в дисперсионную ячейку, причем суспензию вливают через пористую мембрану в непрерывную фазу, содержащую фторуглеродную жидкость и от 0,1 до 5,0% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества, под тангенциальным потоком непрерывной фазы с образованием эмульсию углеводорода-фторуглероде, удаление углеводородного растворителя для получения отвержденного полимера или покрытых полимером микросфер и удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц, при этом микрочастицы содержат белок, инкапсулированный в матрице полимера. В некоторых вариантах реализации подача суспензии осуществляется со скоростью от 0,1 до 1,0 мл/мин. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает стадию добавления гидрофторэфира во фторуглеродную жидкость эмульсии углеводородов во фторуглеродах в качестве соразтворителя для извлечения углеводородного растворителя из дисперсной фазы в непрерывную фазу и содействия ускорению отверждения микрочастицы.

[0023] В некоторых вариантах реализации микрочастицы, полученные с помощью мембранной эмульсии, имеют мало пор или совсем не имеют пор или каналов на поверхности полимера или внутренней матрице микрочастиц.

[0024] В еще одном варианте реализации предлагается фармацевтическая композиция, содержащая покрытые полимером микрочастицы, полученные с использованием описанных в данном документе способов неводной мембранной эмульсии.

[0025] В некоторых вариантах реализации размер микрочастиц можно довести до желаемого диаметра или размера путем изменения композиции составов и параметров процесса.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0026] На Фиг. 1А представлена схема, демонстрирующая способ получения пустых микросфер РОЕ с помощью нерасфасованной эмульсии на основе Н/Ф - Схема 1. На Фиг. 1В продемонстрирована химическая структура FC-40. На Фиг. 1С продемонстрирована химическая структура фторированного поверхностно-активного вещества PFPE-ПЭГ-PFPE (Pico-Surf™ 1), трехблочного сополимера перфторполиэфир/поли(этиленгликоль). Pico-Surf™ 1 коммерчески доступен, например, в виде 5% (масс./масс.) в FC-40.

[0027] На Фиг. 2А представлена микрофотография чистых микросфер РОЕ, сформированных с помощью эмульсии Н/Ф. На Фиг. 2В представлена микрофотография, демонстрирующая агрегацию РОЕ, обнаруженную при низком содержании FS.

[0028] На Фиг. 3А, 3В и 3С представлена микрофотография чистых микросфер РОЕ, сформированных с помощью эмульсии Н/Ф с низкой, средней и высокой скоростью

гомогенизации.

[0029] На Фиг. 4 (Схема 2) представлена диаграмма, демонстрирующая способ инкапсуляции SDP в микросферы POE с помощью объемной эмульсии на основе S/H/F.

[0030] На Фиг. 5 (Схема 3) представлена схема, демонстрирующая систему эмульсии углеводород-во-фторуглероде для инкапсуляции белка SDP.

[0031] На Фиг. 6A и 6B представлено флуоресцентное изображение капель этилацетата, содержащих POE и высушенный распылением белок с флуоресцентной меткой (F-SDP), диспергированных в FC-40. Обратите внимание, что F-SDP сохранил свой первоначальный размер и морфологию внутри капли. Зеленые флуоресцентные изображения отображаются в оттенках серого.

[0032] На Фиг. 7A представлена микрофотография в светлом поле микросфер, инкапсулированных в белок-ловушку VEGF F-SDP. На Фиг. 7B представлено флуоресцентное изображение микросфер, инкапсулированных в белок-ловушку VEGF F-SDP (полоса=20 мкм). На Фиг. 7C представлено флуоресцентное изображение микросфер, инкапсулированных в белок-ловушку VEGF F-SDP (полоса=10 мкм). Зеленые флуоресцентные изображения представлены в оттенках серого на Фиг. 7B и 7C.

[0033] На Фиг. 8A-8D представлено флуоресцентное изображение микросфер POE, инкапсулированных в белок-ловушку VEGF F-SDP, помещенных в водную среду. Обратите внимание, что F-SDP сохранил свой первоначальный размер и морфологию внутри капли. Зеленые флуоресцентные изображения представлены в оттенках серого.

[0034] На Фиг. 9 представлен линейный график объемной плотности (%) в зависимости от размера (мкм) для микрочастиц, полученных с использованием дихлорметана (ДХМ) или этилацетата (EtAc) в способах неводной эмульсии.

[0035] На Фиг. 10A и 10B представлены микрофотографии микрочастиц, нагруженных 10% и 30% масс./масс. белка-ловушки VEGF SDP соответственно.

[0036] На Фиг. 11A и 11B представлены репрезентативные флуоресцентные изображения микросфер POE, инкапсулированных в белок-ловушку VEGF F-SDP, загруженных 10% и 30% масс./масс. SDP соответственно. Обратите внимание, что F-SDP сохранил свой первоначальный размер и морфологию внутри капли. Зеленые флуоресцентные изображения представлены в оттенках серого.

[0037] На Фиг. 12A и 12B представлены изображения микрочастиц, загруженных 5% масс./масс. SDP и 10% масс./масс. SDP, на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ).

[0038] На Фиг. 13A и 13B представлены СЭМ-изображения высушенного распылением белка с $Dv50$ 2,18 мкм и 5,63 мкм.

[0039] На Фиг. 14A, 14B и 14C представлены изображения в светлом поле, флуоресценцию и СЭМ VEGF-Трап F-SDP, инкапсулированного в ПМК-микросферы. Зеленые флуоресцентные изображения представлены в оттенках серого на Фиг. 14B.

[0040] На Фиг. 15A и 15B представлены светлопольные и флуоресцентные изображения VEGF-Трап F-SDP, инкапсулированного в микросферы ПМГК. Зеленые

флуоресцентные изображения представлены в оттенках серого на Фиг. 15B.

[0041] На Фиг. 16 представлена диаграмма, демонстрирующая образование капли эмульсии суспензии SDP, когда суспензия вливается через пористую мембрану в непрерывную углеводородную фазу.

[0042] На Фиг. 17 представлена схема типового способа получения микрочастиц с применением мембранной эмульсии. Этапы, отмеченные звездочками, указывают на этапы, которые предотвращают флокуляцию и агрегацию продукта микрочастиц.

[0043] На Фиг. 18 представлены СЭМ-изображения микросфер, полученных с применением способов водной и неводной эмульсии, и показано, что микросферы имеют поры и каналы для воды с применением водного способа и имеют гладкую поверхность с применением неводных способов.

[0044] На Фиг. 19 представлены СЭМ-изображения микросфер с инкапсулированными белками, полученных с применением способов водной и неводной эмульсии.

[0045] На Фиг. 20 представлены изображения флуоресцентной микроскопии инкапсулированных белком микросфер, полученных с применением способов водной и неводной эмульсии, и показано, что SDP восстанавливаются и объединяются в более крупные капли с применением способа водной эмульсии, сохраняя при этом свою первоначальную форму изюма с применением способа неводной эмульсии. Зеленые флуоресцентные изображения представлены в оттенках серого.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

[0046] Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается композициями и способами, описанными в данном документе, а также описанными экспериментальными условиями, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для целей описания некоторых вариантов реализации и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0047] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые композиции, способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании данного изобретения. Все упомянутые публикации полностью включены в данное описание посредством ссылки.

[0048] Применение терминов в единственном числе и подобных ссылок в контексте описания заявленного данного изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в данном документе или явно не

противоречит контексту.

[0049] Все числовые пределы и диапазоны, изложенные в данном документе, включают все числа или значения, близкие к ним или находящиеся между числами диапазона или предела. Диапазоны и пределы, описанные в данном документе, явно обозначают и устанавливают все целые, десятичные и дробные значения, определенные и охватываемые диапазоном или пределом. Таким образом, перечисление диапазонов значений в данном документе предназначено только для использования в качестве сокращенного способа ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если иное не указано в данном документе, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было указано отдельно в данном документе.

[0050] Применение термина «около» предназначено для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 10%; в других вариантах реализации значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 5%; в других вариантах реализации значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 2%; в других вариантах реализации значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 1%. Предыдущие диапазоны предназначены для разъяснения контекста, и никаких дополнительных ограничений не подразумевается. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иным образом явно не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или иллюстративного языка (например, «такой как»), представленных в данном документе, предназначено только для лучшего освещения данного изобретения и не налагает ограничения на объем данного изобретения, если не заявлено иное. Никакая формулировка в описании не должна толковаться как указывающая на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения данного изобретения.

[0051] «Смешивание» обеспечивает смешивание сил, которые включают сжимающие силы сдвига и кавитацию. Способы и методологии включают, но не ограничиваются ими, гомогенизацию, встряхивание, обработку ультразвуком, перемешивание, взбалтывание, взбивание, встряхивание, эмульгирование, агитацию и/или их комбинации. Приложение сил смешения может быть постоянным или периодическим.

[0052] Термины «микросфера» и «микрочастица» используются взаимозаменяемо.

[0053] «Белок» относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды, а также может включать такие модификации, как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, а белки включают, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки продуцируются различными

типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток и обычно вводятся в клетку с помощью способов генной инженерии (например, таких как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, безинтронная последовательность и т.д.), где он может находиться в виде эписомы или быть интегрирован в геном клетки.

[0054] «Антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться более чем с одним различным эпитопом. Биспецифические антитела, как правило, описаны в патенте США № 8586713, который включен в данную заявку посредством ссылки.

[0055] «Слитые белки Fc» содержат часть или все два, или более белков, один из которых представляет собой часть Fc молекулы иммуноглобулина, которые иначе не встречаются вместе в природе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая Fc-домен), описано, например, у Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; та Hollenbaugh et al., «Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins», в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992. «Fc-слитые белки рецептора» содержат один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с фрагментом Fc, которые в некоторых вариантах реализации содержат шарнирную область, за которой следуют домены CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации Fc-слитый белок содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более лигандом (лигандами). Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 или ловушка VEGF.

[0056] Белки, в которых отсутствуют части Fc, такие как рекомбинантно

полученные ферменты и мини-ловушки, также могут быть получены в соответствии с данным изобретением. Мини-ловушки представляют собой белки-ловушки, в которых используется компонент мультимеризации (МС) вместо части Fc, и они раскрыты в патентах США № 7279159 и 7087411.

[0057] «Микронизированная белковая частица» или «белковая частица» означает частицу, содержащую несколько молекул белка с низким, очень низким или почти нулевым количеством воды (например, <3% воды по массе). Используемая в данном документе микронизированная белковая частица обычно имеет сферическую форму и имеет ECD в диапазоне от 2 микрон до около 35 микрон. Микронизированная белковая частица не ограничивается какой-либо конкретной белковой единицей и подходит для приготовления и доставки терапевтического белка. Обычные терапевтические белки включают, среди прочего, антигенсвязывающие белки, такие как, например, растворимые фрагменты рецепторов, антитела (включая IgG) и производные или фрагменты антител, другие Fc-содержащие белки, включая слитые белки Fc, и слитые белки рецептор-Fc, включая белки ловушечного типа (Huang, C., *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 692-99 (2009)), например, ловушка VEGF.

II. Получение композиций микросфер с применением углеводородно-фторуглеродных мембранных эмульсий

[0058] Предложены системы и способы приготовления фармацевтических композиций с использованием безводных или неводных мембранных эмульсионных систем. Описанные способы безводной мембранной эмульсии преодолевают несколько проблем с существующими водными эмульсионными системами при инкапсулировании гидрофильных молекул лекарственного средства. Например, сравнительные исследования между описанными безводными эмульсионными системами и существующими водными эмульсионными системами, представленными в данном документе, показывают, что составы, полученные с использованием водных эмульсионных систем, просачивают лекарственное средство, например, белковое лекарственное средство, из капелек эмульсии в непрерывную водную фазу во время производства. Эта утечка лекарственного средства из капелек эмульсии приводит к низкой эффективности инкапсуляции. Описанные в данном документе способы с применением мембранных эмульсий на неводной основе инкапсулируют молекулы лекарственных средств, включая, помимо прочего, гидрофильные лекарственные средства, такие как белки, с повышенной эффективностью инкапсуляции по сравнению с водными эмульсионными системами, сохраняют исходную структуру белковых частиц или их комбинацию. Описанные безводные мембранные эмульсионные системы и способы могут производить инкапсулированные лекарственные формы с помощью нерасфасованных способов (например, перемешивание, гомогенизация, обработка ультразвуком) и других обычных способов. Системы и способы также могут быть применены к широкому спектру полимерных материалов, твердотельных полезных нагрузок и способов эмульгирования. В приведенной ниже сводке показаны результаты сравнения различных проб эмульсий, демонстрирующие, что

неводные эмульсионные системы обеспечивают значительное улучшение инкапсуляции микрочастиц по сравнению с водными эмульсионными системами.

Краткое изложение способов и результатов

Система растворителей	Эмульсионный способ	Дисперсная фаза	Непрерывная фаза	Ключевые результаты
S/O/W	Нерасфасованная масса (перемешивание или гомогенизация)	ДХМ	Вода, 1% ПВА	Полые или пустые сферы, плохая инкапсуляция
S/H/F	Нерасфасованная масса (перемешивание)	Этилацетат	FC-40, 0,2-2% Pico-surf™ 1	Микросферы являются текучими, ресуспендируемыми и инкапсулируют белок до 30% масс./масс. Микронизированный белок сохранил свой первоначальный размер частиц и морфологию. Инкапсулированный белок сохранил высокую чистоту. Микросферы имеют гладкую поверхность без пор и каналов.

А. Мембранные эмульсии твердого вещества в углеводороде во фторуглероде (S/H/F).

[0059] Мембранное эмульгирование (МЭ) в целом представляет собой относительно новый способ высококонтролируемого производства частиц, который обеспечивает хороший контроль размера и узкое распределение по размерам (G. T. Vladislavljević and R. A. Williams, Adv. Colloid Interface Sci., vol. 113(1): 1-20, (2005)). На сегодняшний день для МЭ разработано множество различных типов мембран, включая пористое стекло Shirasu (SPG), ацетат целлюлозы, полимер, анодный пористый оксид алюминия и кремниевые микроканалы. Для раскрытых способов МЭ мембрана из

нержавеющей стали с порами, просверленными лазером, работала хорошо, а имеющееся в продаже оборудование от Micropore Technologies (Redcar, Великобритания) позволило провести процесс лабораторных исследований, а также перейти к производству в соответствии с GMP. В других вариантах реализации мембрана выбрана из группы, состоящей из пористого стекла Shirasu (SPG), ацетата целлюлозы, полимера, анодированного пористого оксида алюминия и кремниевых микроканалов. Тщательно контролируемый размер пор мембраны из нержавеющей стали позволяет всем частицам SDP ниже предела проходить через мембрану. Прямой трубчатый канал без извилистых путей снижает тенденцию к блокированию канала SDP. В некоторых вариантах реализации мембрана имеет фторофильное покрытие, обеспечивающее хорошую совместимость с получением эмульсии углеводород-во-фторуглероде (H/F). Кроме того, мембраны из нержавеющей стали прочны, их легко чистить и стерилизовать. В некоторых вариантах реализации диаметр пор составляет от 3 мкм до 300 мкм. В некоторых вариантах диаметр пор составляет 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мкм.

[0060] В некоторых вариантах реализации предложены способы получения микрочастиц с замедленным высвобождением или контролируемым высвобождением путем смешивания микронизированного белкового порошка и полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора, перемешивания первого неводного раствора с образованием суспензии, подачи суспензии в диспергирующий насос, в котором суспензия вливается через пористую мембрану в непрерывную фазу, содержащую фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество, с образованием эмульсии углеводород-во-фторуглероде. В некоторых вариантах реализации подача суспензии осуществляется со скоростью от 0,1 до 1,0 мл/мин. Способ дополнительно включает стадии добавления гидрофторэфира к эмульсии углеводород-во-фторуглероде и удаления углеводородного растворителя для получения отвержденных микрочастиц. В некоторых вариантах реализации к эмульсии добавляют смесь гидрофторэфира и фторуглерода. В некоторых вариантах реализации способ включает добавление в эмульсию дополнительного количества чистого гидрофторэфира. Способ дополнительно включает удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц, причем микрочастицы содержат белок, инкапсулированный в матрице полимера. Способ необязательно включает промывание микрочастиц во фторуглеродной жидкости для удаления остаточного фторсодержащего поверхностно-активного вещества, удаление фторуглеродной жидкости и сбор микрочастиц, например, путем вакуумной фильтрации. В некоторых вариантах реализации вакуумная фильтрация использует мембранный фильтр из полиэфирсульфона. В некоторых вариантах реализации белковый порошок получают из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, слитого белка или рекомбинантного белка. В некоторых вариантах реализации белок представляет собой белок-ловушку VEGF, например, афлиберцепт. В некоторых вариантах реализации эмульсия образуется с помощью нерасфасованной эмульсии. В некоторых вариантах реализации микрочастицы имеют

менее 15% разрыва через 24 часа с последующим линейным замедленным высвобождением лекарственного средства.

[0061] В некоторых вариантах реализации соотношение протеинового порошка и полимера составляет 0%-30%.

[0062] В некоторых вариантах реализации углеводородный растворитель выбирают из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации.

[0063] В некоторых вариантах реализации фторуглеродный раствор содержит 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N,N-бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)бутан-1-амин.

[0064] В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество представляет собой перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир.

[0065] В некоторых вариантах реализации гидрофторэфир представляет собой 2-(трифторметил)-3-этоксидодекафторгексан.

[0066] В некоторых вариантах пористая мембрана представляет собой мембрану из нержавеющей стали, необязательно мембрану из нержавеющей стали с фторофильным покрытием.

[0067] Фторуглеродные и углеводородные жидкости можно удалить путем выпаривания фторуглеродных и углеводородных жидкостей при атмосферном давлении окружающей среды или в вакууме. В некоторых вариантах реализации фторуглеродная жидкость содержит гидрофторэфир (HFE). В некоторых вариантах реализации HFE добавляют к неводной эмульсии для быстрого извлечения углеводорода-во-фторуглеродную жидкость для ускорения отверждения микросфер. В некоторых вариантах реализации протеиновый порошок представляет собой микронизированный протеиновый порошок. В некоторых вариантах реализации микрочастицы промывают для удаления любого остаточного углеводородного растворителя, фторуглеродной жидкости, фторсодержащего поверхностно-активного вещества или их комбинации, оставшихся на микрочастицах. Иллюстративная фторуглеродная жидкость включает перфторсодержащее соединение C5-C18, включая, не ограничиваясь этим, 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N,N-бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)бутан-1-амин. Примеры углеводородных растворителей включают, но не ограничиваются ими, дихлорметан, хлороформ, этилацетат и их комбинации. Типичным фторсодержащим поверхностно-активным веществом является тройной блок-сополимер перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир (PFPE-ПЭГ-PFPE). Примером биоразлагаемого полимера является полиортоэфир (POE). В некоторых вариантах реализации белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, гибридный белок или рекомбинантный белок. В некоторых вариантах реализации белок представляет собой высушенный распылением белок-ловушку VEGF. В некоторых вариантах реализации микрочастицы имеют диаметр от 1,0 до 100 мкм, от 1,0 до 200 мкм или от 30 до 60 мкм. В некоторых вариантах реализации микрочастицы, образованные раскрытыми способами неводной

эмульсии, представляют собой текучие композиции микрочастиц. Описанные текучие композиции микрочастиц могут быть суспендированы в фармацевтически приемлемом вспомогательном веществе, например, солевом растворе с рН-буфером, или суспендированы в масляном носителе, таком как триглицериды со средней длиной цепи. Текучие композиции микрочастиц можно вводить парентерально, например, с помощью шприца с иглой 27G. В некоторых вариантах реализации распределение микросфер или микрочастиц по размерам составляет менее 10 CV%. В некоторых вариантах реализации распределение микросфер по размерам составляет 10-20 CV%.

[0068] В другом варианте реализации предложен способ получения полимера или покрытых полимером микрочастиц путем смешивания от 1,0 до 30,0% масс./масс. всего твердого белка, высушенного распылением, в углеводородном растворе с образованием неводного первого раствора при перемешивании первого неводного раствора для образования суспензии, подавая суспензию в дисперсионный насос, причем суспензию вливают через пористую мембрану в непрерывную фазу, содержащую фторуглеродную жидкость и от 0,1 до 5,0% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества, под тангенциальным потоком непрерывной фазы с образованием эмульсию углеводорода-во-фторуглероде, удаление углеводородного растворителя для получения отвержденного полимера или покрытых полимером микросфер и удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц, при этом микрочастицы содержат белок, инкапсулированный в матрице полимера. В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает стадию добавления сложного гидрофторуглерода во фторуглеродную жидкость эмульсии углеводород-во-фторуглероде перед удалением углеводородного растворителя, чтобы способствовать удалению углеводородного растворителя.

[0069] В некоторых вариантах реализации микрочастицы, полученные с помощью мембранной эмульсии, имеют мало пор или совсем не имеют пор или каналов на поверхности полимера или внутренней матрице микрочастиц.

[0070] В еще одном варианте реализации предлагается фармацевтическая композиция, содержащая покрытые полимером микрочастицы, полученные с использованием описанных в данном документе способов неводной мембранной эмульсии.

[0071] В некоторых вариантах реализации размер микрочастиц можно довести до желаемого диаметра или размера путем изменения композиции составов и параметров процесса.

[0072] Раствор углеводорода и белка может быть образован за счет приложения сил смешивания, таких как сжимающие силы сдвига и кавитация. Методики включают, но не ограничиваются ими, гомогенизацию, встряхивание, обработку ультразвуком, перемешивание, взбалтывание, взбивание, встряхивание, эмульгирование, агитацию и/или их комбинации. Способ дополнительно включает стадию удаления углеводородного растворителя и фторуглеродной жидкости при перемешивании эмульсии. Углеводородные и фторуглеродные жидкости могут быть удалены выпариванием,

необязательно, в условиях вакуума. В других вариантах реализации микрочастицы можно собирать фильтрованием. Удаление углеводородных и фторуглеродных жидкостей делает микрочастицы твердыми, которые затем можно собрать. В некоторых вариантах реализации к фторуглероду может быть добавлен HFE, чтобы способствовать извлечению углеводорода из дисперсной фазы в непрерывную фазу фторуглерода для более быстрого процесса отверждения. HFE смешивается как с фторуглеродом, так и с углеводородом и, таким образом, может выступать в качестве соразтворителя для повышения растворимости углеводорода-во-фторуглеродной фазе. Микрочастицы с замедленным высвобождением, полученные с помощью способа неводной эмульсии, содержат белок, инкапсулированный в матрицу из биоразлагаемого или биоразлагаемого полимера. В некоторых вариантах реализации микрочастицы имеют единую структуру ядро-оболочка. В других вариантах реализации микрочастицы имеют несколько ядер, диспергированных в полимере. В еще других вариантах реализации популяция микрочастиц включает микрочастицы, имеющие структуру с одним ядром, инкапсулированную полимерной оболочкой, и микрочастицы, имеющие многоядерные структуры в полимерной оболочке. Фторуглеродная жидкость может представлять собой перфторсодержащее соединение C5-C18, включая, помимо прочего, FC-40, а углеводородный раствор выбирают из группы, состоящей из этилацетата, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана и дихлорметана или их комбинаций. В некоторых вариантах реализации фторсодержащее поверхностно-активное вещество представляет собой перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир, коммерчески доступный как Pico-Surf™ 1. В некоторых вариантах реализации биоразлагаемый полимер представляет собой POE. В других вариантах реализации полимер выбран из группы, состоящей из полимолочной кислоты и поли(молочно-гликолевой кислоты). Как правило, белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок, рекомбинантный белок или его фрагмент, или укороченную версию. Обычно белок микронизируют, например, сухой распылением, сухой электрораспылением, обратимым осаждением, замораживанием распылением, микротемплатированием или их комбинацией. В некоторых вариантах реализации белок представляет собой белок-ловушку VEGF или его укороченную форму. Другие белки, которые можно использовать в раскрытых способах, описаны ниже. Микрочастицы, полученные раскрытыми способами, имеют полимерную оболочку, в большинстве своем лишенную пор или каналов. Полимерная оболочка не перфорирована. В некоторых вариантах реализации микрочастицы имеют диаметр от 1 до 200 мкм.

1. Углеводородные растворители

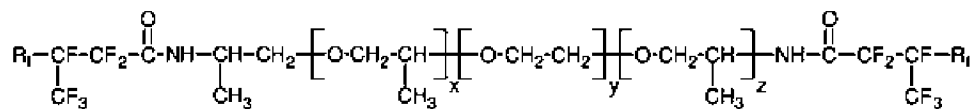
[0073] В некоторых вариантах реализации углеводородный растворитель (также называемый углеводородной жидкостью) выбирают таким образом, чтобы полимерные материалы, например, биоразлагаемые или биорасщепляемые полимеры, были растворимы в углеводороде. В некоторых вариантах реализации углеводородный растворитель выбирают из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола,

этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации. В некоторых вариантах реализации углеводородный растворитель может содержать ацетонитрил, диметилформамид, диметилсульфоксид, ацетон, этанол, метанол, пентан, пропанол, гексан или их комбинацию.

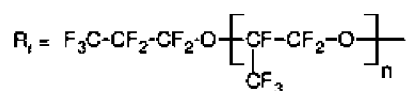
2. Фторсодержащие жидкости

[0074] Типовой фторсодержащей жидкостью является фторуглеродная жидкость, включающая, помимо прочего, Flourinert™ FC-40 (средняя молекулярная масса=650 г/моль) 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N,N- бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)бутан-1-амин (Фиг. 1B), Fluorinert™ FC-70 (средняя молекулярная масса=821 г/моль) или их комбинация. В некоторых вариантах реализации фторуглеродная жидкость представляет собой или содержит гидрофторэфир (HFE). Пример HFE включает, но не ограничивается ими, NOVEC™ 7000 (1-метоксигептафторпропан), NOVEC™ 7100 (метоксинонафторбутан), NOVEC™ 7200 (этоксинафторбутан), NOVEC™ 7500 (2-(трифторметил)-3-этоксидодекафторгексан). В других вариантах реализации фторуглеродная жидкость содержит FC-40, FC-70, Novac™ 7500, Novac™ 7100, Novac™ 7000 или их комбинации. В некоторых вариантах реализации второй раствор содержит фтористое поверхностно-активное вещество (FS) в дополнение к фторсодержащей жидкости. Примером FS является тройной блок-сополимер перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир (PFPE-ПЭГ-PFPE), который коммерчески доступен как Pico-Surf™ 1. В некоторых вариантах реализации фторуглеродная жидкость или второй раствор содержат FC-40 и Pico-Surf™ 1.

[0075] В некоторых вариантах реализации FS представляет собой

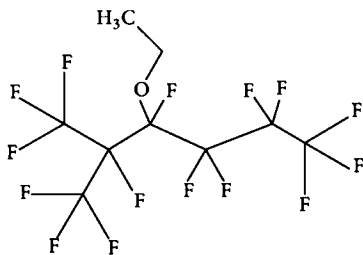


где



причем: $n \sim 37$, $x+z \sim 6,0$, $y \sim 12,5$, или при этом $n=3,7$, $x+z \sim 3,6$, $y \sim 9,0$. (Lee, M. et al., Lab Chip., 7:14(3): 509-13(2014)).

[0076] В некоторых вариантах реализации HFE имеет следующую химическую структуру:



2-(трифторметил)-3-этоксидодекафторгексан.

[0077] Другие HFE, подходящие для использования в данном способе, представляют собой класс молекул, в которых все атомы водорода находятся на атомах углерода без замещения фтором и отделены от фторированных атомов углерода эфирным кислородом, т.е. RfORh. HFE имеют молекулярную структуру, которая может быть линейной, разветвленной или циклической, или их комбинацией (например, алкилциклоалифатической), и предпочтительно не содержат этиленовой ненасыщенности, имея в общей сложности от около 4 до около 20 атомов углерода. Такие HFE известны и легко доступны либо в виде практически чистых соединений, либо в виде смесей. Благодаря липофильности и фторофильности HFE они смешиваются как с фторуглеродом, так и с углеводородом. При добавлении к эмульсии углеводород/фторуглерод они могут действовать как соразтворитель для извлечения углеводорода-во-фторуглеродную фазу и ускорения процесса отверждения.

[0078] В некоторых вариантах реализации углеводородный растворитель, фторуглерод или оба они удаляются путем выпаривания, необязательно в вакууме, необязательно при перемешивании эмульсии. В некоторых вариантах реализации микрочастицы собирают фильтрованием, необязательно фильтрованием под вакуумом.

[0079] Процентное содержание HFE во фторуглеродной фазе может составлять 0-20% по объему, в то время как увеличение процентного содержания HFE увеличивает скорость извлечения углеводородов. Однако процентное содержание HFE не может быть слишком высоким, так как размер и морфологию микросферы может стать труднее контролировать.

3. Эродируемые или биоразлагаемые полимеры

[0080] В некоторых вариантах реализации полимер представляет собой биоразлагаемый или биоразрушаемый полимер. В некоторых вариантах реализации полимер выбран из группы, состоящей из разветвленного или линейного полиэтиленгликоля (ПЭГ), полимолочной кислоты (ПМК), полигликолевой кислоты (ПГК), полимолочно-полигликолевого сополимера (ПЛГК), поли-d,l-лактида-ко-гликолида (ПМГК), ПМГК-этиленоксид фумарата, ПМГК-альфа-токоферилсукцината, этерифицированного до полиэтиленгликоля 1000 (ПМГК-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксивеноксигексан)] (pCPH), поли (гидроксимасляная кислота-согидроксивалериановая кислота) (ПГБ-ПВС), полиэтиленгликоль-поли(молочная кислота) сополимера (ПЭГ-ПЛА), поли-ε-капролактона (ПКЛ), полиалкилцианоакрилата (ПАЦ), поли(этил)цианоакрилата (ПЕС), полиизобутилцианоакрилата, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламида (поли(HPMA)), поли-β-R-гидроксипропионата (PHB), поли-β-R-гидроксиалканоата (PNA), поли-β-R-яблочной кислоты, фосфолипидно-холестериновых полимеров, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламина (DOPC/ПЭГ-DSPE)/холестерина, полисахаридов, целлюлозф, этилцеллюлозы, метилцеллюлозы, альгинатов, декстрановых и декстрановых гидрогелевых полимеров, амилозы, инулина, пектина и гуаровой камеди, хитозана, хитина, гепарина, гиалуроновой кислоты,

полиротаксанов и полипсевдоротаксинов на основе циклодекстрина (ЦД), полиаспартатов, полиглутаматов, полилюцина, сополимеров лейцин-глутамата, полибутиленсукцината, желатина, коллагенов, фибринов, фибрина, полиортоэфиров, сополимеров полиортоэфир-полиамидин, сополимеров полиортоэфир-диамин, полиортоэфиров, включающих латентные кислоты, сополимера поли(этиленгликоль)/поли(бутилентерефталат), а также их комбинаций и сополимеров. В некоторых вариантах реализации полимер представляет собой поли-ε-капролактон (ПКЛ) или его производное или сополимер. В некоторых вариантах реализации полимер представляет собой ПМГК или его производное, или сополимер. В некоторых вариантах реализации полимер представляет собой этилцеллюлозу или ее производное или сополимер. В некоторых вариантах реализации полимер представляет собой полиортоэфир или его производное или сополимер. В некоторых вариантах реализации полимер представляет собой полиэфирамид.

[0081] Термин «полимер», в контексте данного документа, относится к макромолекуле, включающей повторяющиеся момеры, соединенные ковалентными химическими связями. Полимеры биосовместимы и биоразлагаемы. Биосовместимый и биоразлагаемый полимер может быть природным или синтетическим. Природные полимеры включают полинуклеотиды, полипептиды, такие как встречающиеся в природе белки, рекомбинантные белки, желатин, коллагены, фибрины, фибрин, полиаспартаты, полиглутаматы, полилизин, сополимеры лейцина и глутамата; и полисахариды, такие как альгинаты целлюлозы, декстран и декстрановые гидрогелевые полимеры, амилоза, инулин, пектин и гуаровая камедь, хитозан, хитин, гепарин и гиалуроновая кислота. Синтетические биосовместимые или биоразлагаемые полимеры включают полимолочную кислоту (ПМК), полигликолевую кислоту (PGA), полимолочно-полигликолевый сополимер (ПМГК), поли-D,L-лактид-ко-гликолид (ПМГК), ПМГК-этиленоксидфумарат, ПМГК-альфа-токоферилсукцинат, этерифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (ПМГК-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксифеноксигексан)] (pCPH), поли(гидроксимасляная кислота-согидроксивалериановая кислота) (PHB-PVA), сополимер полиэтиленгликоль поли(молочной кислоты) (ПЭГ-ПМК), поли-ε-капролактон (PCL), полиалкилцианоакрилат (PAC), поли(этил)цианоакрилат (PEC), полиизобутилцианоакрилат, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид (поли(HРМА)), поли-β-R-гидроксibuтират (PHB), поли-β-R-гидроксиалканоат (РНА), поли-β-R-яблочная кислота, фосфолипид-холестериновые полимеры, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтанолламин (DOPC/ПЭГ-DSPE)/холестерин, этилцеллюлоза, полиротаксаны и полипсевдоротаксины на основе циклодекстрина (CD), полибутиленсукцинат (PBS), полиортоэфир, сополимеры полиортоэфира и полиамидина, сополимеры полиортоэфира и диамина, полиортоэфир, включающие латентные кислоты для контроля скорости разложения, и среди прочего сополимеры поли(этиленгликоль)/поли(бутилентерефталат).

[0082] Этилцеллюлоза (ЭЦ) является хорошо известным и легкодоступным

биоматериалом, используемым в фармацевтике и пищевой промышленности. Это производное целлюлозы, в котором некоторые гидроксильные группы глюкозы заменены этиловым эфиром. См. Martinac et al., *J. Microencapsulation*, 22(5): 549-561 (2005) и приведенные там ссылки, в которых описываются способы использования этилцеллюлозы в качестве биосовместимых полимеров при производстве микросфер. См. также US 4210529 (1980) и ссылки в нем для подробного описания этилцеллюлозы и способов получения производных этилцеллюлозы.

[0083] Поли-D,L-лактид-ко-гликолид (ПМГК) также является хорошо известным биосовместимым и биоразлагаемым полимером, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), используемым в тканевой инженерии и фармацевтических системах доставки. ПМГК представляет собой сложный полиэфир, состоящий из мономеров гликолевой и молочной кислот. Описание синтеза ПМГК и производства наночастиц ПМГК см. в Astete and Sabliov, *Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 17(3): 247-89 (2006) и ссылки в ней.

[0084] Поли-ε-капролактон (PCL) представляет собой еще один биосовместимый и биоразлагаемый полимер, одобренный FDA для использования людьми в качестве средства доставки лекарственных средств. PCL представляет собой полиэфир ε-капролактона, который быстро гидролизуеться в организме с образованием нетоксичной или малотоксичной гидроксикарбоновой кислоты. Описание производства PCL см. в Labet and Thielemans, *Chemical Society Reviews* 38: 3484-3504 (2009) и ссылки в ней. Описание производства и применения микросфер и наносфер на основе PCL в качестве систем доставки см. в Sinha et al., *Int. J. Pharm.*, 278(1): 1-23 (2004) и ссылки в ней.

[0085] Полиортоэфир (РОЕ) представляет собой биоразлагаемый полимер, разработанный для доставки лекарственных средств. Обычно это полимер ацетата кетена, предпочтительно циклического ацетата дикетена, такого как, например, 3,9-диметилен-2,4,8,10-тетраоксаспиро[5.5]ундекан, который полимеризуется посредством конденсации гликоля с образованием ортоэфирных связей. Описание синтеза полиортоэфира и различных типов можно найти, например, в США 4304767. Полиортоэфиры можно модифицировать, чтобы контролировать их профиль высвобождения лекарственного средства и скорость разложения путем замены или исключения различных гидрофобных диолов и полиолов, например, путем замены гексантриола на декантриол; а также добавление латентных кислот, таких как, например, гликолид, октандиовая кислота или т.п., к основной цепи для повышения чувствительности к pH. Индивидуальные формы РОЕ могут включать гликолевую кислоту в основу РОЕ для настройки потери массы и высвобождения лекарственного средства. Другие модификации полиортоэфира включают интеграцию амина для повышения функциональности. Получение, описание и применение сложных полиортоэфиров описаны в патентах США 5968543; США 4764364; Heller and Barr, *Biomacromolecules*, 5(5): 1625-32 (2004); и Heller, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57: 2053-62 (2005).

4. Белковые лекарственные средства

[0086] В некоторых вариантах реализации составы микрочастиц, полученные раскрытыми способами и системой безводной эмульсии, включают лекарственное средство. Примеры лекарственных средств включают, но не ограничиваются ими, белки, слитые белки и их фрагменты, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также лиганд-связывающие домены и белки. В некоторых вариантах реализации белок представляет собой белок-ловушку VEGF (например, афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1, например, как описано в патентах США № 7087411 и 7279159, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации белок-ловушка VEGF представляет собой укороченную форму белка-ловушки VEGF, как описано в патенте США № 7396664, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[0087] В некоторых вариантах реализации белок в составе микрочастиц представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, четырехвалентную G-подобную молекулу иммуноглобулина с двойной специфичностью, называемую иммуноглобулином с двойным варибельным доменом (DVD-IG), антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой антитело IgG2. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах реализации антитело содержит химерный шарнир. В других вариантах реализации антитело содержит химерный Fc. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

[0088] В некоторых вариантах реализации антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела к PD1, как описано в патенте США № 9987500, лиганда-1 против запрограммированной гибели клеток (например, антитело к PD-L1, как описано в патенте США № 9938345), антитела к Dll4, антитела к ангиопоэтину-2 (например, антитела к ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела к ангиопоэтино-подобному 3 белку (например, антитело к AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитело к PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитело к PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела к комплементу 5 (например, антитело к C5, как описано в патенте США № 9795121), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитело к EGFR, как описано в патенте США

№ 9132192 или антитело к EGFRvIII, как описано в патенте США № 9475875), антитела к пропротеинконвертазе субтилизина кексина-9 (например, антитело к PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или патенте США № 9540449), антитела к фактору роста и дифференцировки-8 (например, антитело к GDF8, также известное как антитело к миостатину, как описано в патентах США № 8871209 или 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, антитело к GCGR, как описано в патенте США № 9587029 или 9657099), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитело к IL4R, как описано в заявке на патент США № US2014/0271681A1, патентах США № 8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитело к IL6R, как описано в патентах США № 7582298, 8043617 или 9173880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, анти-интерлейкин 33 (например, антитело к IL33, как описано в патентах США № 9453072 или 9637535), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитело к RSV, как описано в патенте США № 9447173 и 10125188 и заявке на патент США № US2019/0031741A1), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, антитело к CD3, как описано в патенте США № 9657102), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, антитело к CD20, как описано в патенте США № 9657102 и заявке US20150266966A1, и в патенте США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки-48 (например, антитело к CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела к Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, антитело к MERS, как описано в патенте США № 9718872), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в патенте США № 9771414), антитела к вирусу Зика, антитела к гену активации лимфоцитов 3 (например, антитела к LAG3 или антитела к CD223), антитела к фактору роста нервов (например, антитела к NGF, как описано в заявке на патент США № US2016/0017029 (исключена) и патентах США № 8309088 и 9353176) и антитела к белку Y. В некоторых вариантах реализации биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела анти-CD3 x анти-CD20 (как описано в патентах США № 9657102 и US20150266966A1), биспецифического антитела анти-CD3 x анти-Muc16 (например, биспецифическое антитело анти-CD3 x анти-Muc16) и биспецифического антитела анти-CD3 x антиген-специфический мембранный антиген простаты (например, биспецифическое антитело анти-CD3 x анти-PSMA). В некоторых вариантах реализации интересующий белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-атто, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белимумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, бролуцизумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, денозумаба, динутуксимаба, дипилимаба, дирвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтанзинеалирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гузелкумаба, ибритумомаба тиуксетана,

идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфиликсимаба-dyub, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, резлизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

[0089] В некоторых вариантах реализации белок в комплексах представляет собой рекомбинантный белок, который содержит фрагмент Fc и другой домен (например, слитый с Fc белок). В некоторых вариантах реализации слитый белок Fc представляет собой слитый белок рецептора Fc, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с фрагментом Fc. В некоторых вариантах реализации фрагмент Fc содержит шарнирную область, за которой следуют домены CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах реализации рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более различных цепей рецептора, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит область связывания лиганда IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc hIgG1; см. Патент США № 6927044, который полностью включен в данный документ в качестве ссылки), или ловушка VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1 слитый с Fc hIgG10). В других вариантах реализации слитый белок Fc представляет собой слитый белок ScFv-Fc, который содержит один или более из одного или более антигенсвязывающих доменов, таких как вариабельный фрагмент тяжелой цепи и вариабельный фрагмент легкой цепи, из антитела, связанного с фрагментом Fc.

[0090] В некоторых вариантах реализации белки, не содержащие Fc-фрагменты, такие как рекомбинантно полученные ферменты и мини-ловушки, также могут быть получены в соответствии с изобретением Мини-ловушки представляют собой белки ловушки, которые используют мультимеризирующий компонент (МК) вместо Fc-фрагмента, и описаны в патентах США № 7279159 и 7087411.

[0091] В некоторых вариантах реализации исходный белок находится в форме сухого порошка, например микронизированного сухого порошка. В некоторых вариантах реализации белок представляет собой высушенный распылением порошок (SDP). Использование белка, высушенного распылением, вместо раствора белка имеет преимущества, заключающиеся в более высоком содержании белка в микрочастицах и лучшей стабильности белка во время процесса инкапсуляции. В некоторых вариантах реализации молекулы сухого белка остаются в твердом состоянии и окружены стабилизаторами в течение всего процесса инкапсуляции и условий хранения. В некоторых вариантах реализации инкапсулированный высушенный распылением белок характеризуется высоким выходом и низким уровнем агрегатов, возможно, из-за

минимального взаимодействия с поверхностью, поскольку только небольшая часть поверхностных белков подвергается воздействию границы раздела. В некоторых вариантах реализации белок перед инкапсуляцией подвергают микронизации.

В. Микрочастицы

[0092] Некоторые варианты реализации предлагают фармацевтическую композицию, полученную с использованием раскрытой неводной мембранной эмульсионной системы. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит микрочастицы, которые имеют полимерную оболочку и микронизированное белковое ядро. В некоторых вариантах реализации микрочастицы имеют приблизительно сферическую форму. Некоторые микрочастицы и белковые ядра будут приближаться к сферичности, в то время как другие будут иметь более неправильную форму. Таким образом, используемый в данном документе термин «диаметр» означает каждое из следующих значений: (a) диаметр сферы, описывающей ядро микрочастицы или белка, (b) диаметр наибольшей сферы, которая находится в пределах границ микрочастицы или ядро белка, (c) любая мера между описанной сферой (a) и ограниченной сферой (b), включая среднее значение между ними, (d) длина самой длинной оси микрочастицы или ядра белка, (e) длина самой короткой оси микрочастицы или ядра белка, (f) любая мера между длиной длинной оси (d) и длиной короткой оси (e), включая среднее значение между двумя и/или (g) эквивалентный диаметр окружности («ECD»), определенный с помощью визуализации микропотоков (MFI), анализа слежения за наночастицами (NTA), или как объемный или усредненный диаметр с помощью способов светорассеяния, таких как статическое рассеяние света (SLS), динамическое рассеяние света (DLS) или лазерный дифракционный анализ. Диаметр обычно выражается в микрометрах (мкм или микрон). Диаметр можно определить оптическим измерением или измерением с помощью сканирующей электронной микроскопии.

[0093] Микрочастицы, полученные раскрытыми неводными эмульсионными способами, состоят из множества молекул белка с низким, очень низким или близким к нулю количеством воды (например, < или = 3% воды по массе). Используемый в данном документе термин «микронизированная белковая частица» имеет ECD в диапазоне от 2 мкм до около 35 мкм, или от 2,0 до 50 мкм, или от 5,0 до 15,0 мкм, от 30 до 60 мкм, или около 10 мкм. Микронизированная белковая частица не ограничивается какой-либо конкретной белковой единицей и подходит для приготовления и доставки терапевтического белка, включая белки, описанные выше.

[0094] Например, белковая частица может быть микронизирована путем распылительной сушки, лиофилизации и измельчения, струйного измельчения, обратимого осаждения в нерастворителе, грануляции, постепенного осаждения (US 7998477 (2011)), осаждения в сверхкритической жидкости (US 6063910 (2000)) или образование частиц, вызванное двуокисью углерода под высоким давлением (Bustami et al., *Pharma. Res.* 17: 1360-66 (2000)). Используемая в данном документе фраза «распылительная сушка» означает способ получения сухого порошка, содержащего

частицы микронного размера, из взвеси или суспензии с использованием распылительной сушилки. Распылительные сушилки используют распылитель или распылительную насадку для диспергирования суспензии или взвеси в виде распыляемой капли контролируемого размера. Размер капель от 10 до 500 мкм можно получить с помощью распылительной сушилки. По мере высыхания растворителя (воды или органического растворителя) белковое вещество высыхает в частицы микронного размера, образуя порошкообразное вещество; или, в случае белково-полимерной суспензии, во время сушилки полимер затвердевает в оболочке вокруг белковой загрузки.

[0095] В некоторых вариантах реализации микронизированный белок представляет собой белок-ловушку VEGF. Фармацевтические составы для образования микронизированных частиц белка-белка-ловушки VEGF могут содержать от около 10 мг/мл до около 100 мг/мл белка-белка-ловушки VEGF, от около 1,0 до около 50 мг/мл белка, около 10 мг/мл, около 15 мг/мл, около 20 мг/мл, около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 75 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 95 мг/мл или около 100 мг/мл белка-белка-ловушки VEGF.

[0096] В некоторых вариантах реализации микрочастицы, полученные с использованием раскрытых неводных мембранных эмульсионных систем, содержат ядро белковой частицы внутри полимерной оболочки, имеют диапазон диаметров от около 2 мкм до около 70 мкм, от около 5 мкм до около 65 мкм, около от 10 мкм до около 60 мкм, от около 15 мкм до около 55 мкм, от около 10 мкм до около 50 мкм, от около 1,0 до 15 мкм, около 20 мкм, около 25 мкм или около 30 мкм. Изменение размера в значительной степени отражает толщину полимерной оболочки, хотя диаметр белкового ядра может в некоторой степени способствовать изменению размера.

[0097] В некоторых вариантах реализации микрочастицы, образованные раскрытыми способами неводной эмульсии, представляют собой текучие композиции микрочастиц. Описанные текучие композиции микрочастиц можно суспендировать в фармацевтически приемлемом вспомогательном веществе, например, в физиологическом растворе с pH-буфером. Текучие композиции микрочастиц можно вводить парентерально, например, с помощью шприца, такого как шприц с иглой 27G.

[0098] В некоторых вариантах реализации микрочастицы применимы для пролонгированного или продолжительного высвобождения белковых терапевтических средств. В некоторых вариантах реализации составы микросфер вводят интравитреально, супрахориоидально или подкожно. Например, предполагается, что микрочастицы белка-ловушки VEGF можно использовать для пролонгированного высвобождения терапевтического белка белка-ловушки VEGF, например, в стекловидное тело или супрахориоидальное пространство для лечения сосудистых заболеваний глаза, или для подкожной имплантации для пролонгированного высвобождения белка-ловушки VEGF для лечения других расстройств.

[0099] Микрочастицы по данному изобретению высвобождают белок в

физиологической водной среде при температуре около 37 °С с относительно постоянной скоростью в течение продолжительного периода времени, по меньшей мере, до 60, 90, 120 или 150 дней. В некоторых вариантах реализации микрочастицы имеют менее 15% разрыва через 24 часа с последующим линейным замедленным высвобождением лекарственного средства.

[00100] Некоторые варианты реализации обеспечивают композицию микросфер, полученных с использованием способов неводной мембранной эмульсии, раскрытых в настоящем документе, где композиция содержит >100 мг белка, высушенного распылением. В некоторых вариантах реализации способы неводной мембранной эмульсии имеют выход >90% и дают микрочастицы с чистотой >99%, которые имеют >10% масс./масс. загрузку и <10% разрыв.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Синтез холостых микросфер с помощью объемной эмульсии на основе Н/Ф.

Материалы и способы

[00101] Эмульсионные системы на масляной и водной основе часто используются для синтеза полимерных микрочастиц или наночастиц, где гидрофобные полимерные материалы растворяются в органической фазе и диспергируются в непрерывной водной фазе. Однако водорастворимые полимеры, например ПЭГ, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) и полимеры, которые легко гидролизуются в присутствии воды, включают полиангидриды, алифатические сложные полиэфиры с короткими средними блоками, такие как полимолочная кислота, и некоторые полиаминокислоты, такие как поли(глутаминовая кислота), обычные эмульсионные системы на водной основе не идеальны. Следующие примеры демонстрируют полезность описанной эмульсионной системы Н/Ф для получения вышеупомянутых гидролизуемых или разлагаемых водой полимерных микрочастиц. В некоторых вариантах реализации эти полимеры сначала растворяют в углеводородном растворителе, включая полярные растворители, например, ацетонитрил, тетрагидрофуран, и менее полярные растворители, например, ДХМ, хлороформ. Затем этот полимерный раствор добавляют в непрерывную фазу, фторуглеродную жидкость, например, FC-40 с FS, например, Picosurf 1. Эмульсию получают перемешиванием, встряхиванием или другими способами смешивания. Капли эмульсии окончательно затвердевают в полимерные сферы путем испарения или экстракции углеводородных растворителей.

[00102] В конкретном варианте реализации для синтеза чистых микросфер РОЕ с помощью объемной эмульсии Н/Ф, как показано на **Схеме 1 (Фиг. 1А)**, добавляли 200 мкл около 10%, 20%, 30% и 40% масс./об. РОЕ в ДХМ к 2 мл FC-40, содержащего 0,5% масс./масс. FS Pico-Surf™ 1 (Sphere Fluidics). Эмульгирование достигается за счет встряхивания. Капли эмульсии были легче, чем FC-40, и плавали поверх раствора. Отбирали аликвоты и помещали на предметные стекла для получения изображения под микроскопом. Микросферы затвердевали при перемешивании при пониженном давлении

в течение 3 часов. Затвердевшие полимерные сферы в FC-40 сначала подвергали вакуумной фильтрации через мембрану PES 0,22 мкм. FC-40 прошел через фильтр, а микросферы остались. Затем микросферы дополнительно промывали FC-40 и полностью сушили при пониженном давлении. В другом примере с тем же способом около 30% масс./об. POE в ДХМ использовали в углеводородной фазе и около 0,01%, 0,1% и 0,5% FS в FC40 использовали во фторуглеродной фазе для оценки влияния концентрации FS.

Полученные результаты

[00103] В присутствии FS смесь углеводородов и фторуглеродов способна образовывать эмульсию Н/Ф. В одном примере ДХМ диспергировали в FC-40 (см. структуру FC-40 на **Фиг. 1В**) в виде эмульсий Н/Ф, а PFPE-ПЭГ-PFPE использовали в качестве FS (см. структуру FS на **Фиг. 1С**). Во фторуглеродную фазу FC-40 добавляли FS в возрастающих концентрациях. Испытания показали, что для предотвращения слипания капель ДХМ необходимо 0,1-5% масс./масс. FS (**Фиг. 2А**). При добавлении менее 0,1% масс./масс. SF наблюдалось более широкое распределение по размерам. Если SF не использовался, капли ДХМ не были стабильными. Рассеянная капля ДХМ быстро сольется, и две фазы вскоре разделятся. Результаты показали необходимость использования достаточного количества FS для получения стабильных эмульсий Н/Ф и непрерывного перемешивания в процессе отверждения для успешного получения полимерных микросфер. (**Фиг. 2В**).

[00104] Добавление POE в ДХМ и встряхивание в FC-40 приводило к образованию капель, содержащих POE. Испарение ДХМ в условиях окружающей среды в открытом контейнере или при пониженном давлении привело к тому, что капля затвердела до микросфер POE (**Фиг. 2А и 2В**). Размеры микросфер были связаны с размерами капель и содержанием POE в органической фазе. Более высокая концентрация POE приводит к большему размеру микросфер (**Таблица 1**).

Таблица 1. Размеры микросфер сфер POE, полученных с различными концентрациями POE в ДХМ.

Диаметр	10% масс./об. POE	20% масс./об. POE	30% масс./об. POE	40% масс./об. POE
Dv(10) (мкм)	0,9	1,3	3,1	7,1
Dv(50) (мкм)	2,7	7,2	17	34,8
Dv(90) (мкм)	6,5	13,4	30,1	67,4

Пример 2: Влияние скорости гомогенизации.

Материалы и способы

[00105] Один (1) мл 30% или 40% масс./об. POE в ДХМ добавляли к 9 мл FC-40 с 0,5% (масс./масс.) FS FC-40 и эмульгировали с помощью ручного гомогенизатора VWR 200 с VWR 7 мм х Зондом генератора пилообразной формы диаметром 95 мм на одной из трех скоростей гомогенизации: низкой (около 50% полной мощности), средней (около 60% полной мощности) и высокой (около 70% полной мощности). Образовавшиеся

эмульсии перемешивали при пониженном давлении. Образовавшиеся микросферы промывали и сушили при пониженном давлении.

Полученные результаты

[00106] Как показано на Фиг. 3А-С, для 30% РОЕ низкая скорость гомогенизации давала микросферы большего размера, тогда как высокая скорость гомогенизации давала меньшие размеры (Таблица 2). 40% РОЕ показал ту же тенденцию. Эти результаты показывают, что настройка скорости гомогенизации может контролировать размер микросфер.

Таблица 2. Размеры микросфер полиэфирных сфер, полученных при различной скорости гомогенизации.

Диаметр	Низкая скорость	Средняя скорость	Высокая скорость
Dv(10) (мкм)	2,8	2,0	1,1
Dv(50) (мкм)	16,1	13,5	5,4
Dv(90) (мкм)	31,5	31,6	12,0

Пример 3: Общие процедуры инкапсуляции SDP белка в микросферы РОЕ с помощью способа объемной эмульсии S/H/F.

Материалы и способы

[00107] Как показано на Фиг. 4, синтез объемной эмульсии можно разделить на три стадии: приготовление рецептуры, эмульгирование, отверждение. Свойства продукта будут разными, поскольку на этих трех стадиях используются разные параметры. Общие процедуры описаны ниже:

[00108] Для составления рецептуры 10%-30% масс./масс. от общей твердой массы белка-ловушки VEGF SDP (или SDP с флуоресцентной меткой (F-SDP) для флуоресцентной визуализации) диспергировали в 500 мкл этилацетата, содержащего 10-35% масс./об. РОЕ, путем вортексирования и после этого обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин. Затем эти суспензии добавляли в 9,5 мл FC-40 с 0,1-0,5% масс./масс. FS. Эмульгирование может быть достигнуто путем перемешивания, встряхивания или гомогенизации с использованием настольного гомогенизатора. Структуры эмульсий показаны на Фиг. 5. Сразу после эмульгирования отбирали аликвоты в процессе и помещали на предметные стекла для получения изображения под микроскопом. Капли затвердевали на предметном стекле путем испарения в условиях окружающей среды. Для отверждения микросфер применяли один из трех способов: (а) перемешивание раствора при комнатной температуре в течение ночи в открытом контейнере и выпаривание этилацетата; (b) перемешивание раствора при пониженном давлении в течение не менее 2 часов для более быстрого испарения растворителя; (с) добавление NOVEC 7500 или смеси FC-40 и NOVEC7500 в эмульсию при перемешивании. HFE действует как соразтворитель, который помогает экстрагировать этилацетат из углеводородной фазы во фторуглеродную фазу и обеспечивает быстрый процесс отверждения (обычно в течение нескольких минут).

[00109] В конце, затвердевшие полимерные сферы в FC-40 сначала подвергали

вакуумной фильтрации через мембрану PES 0,22 мкм. FC-40 прошел через фильтр, а микросферы остались. Затем микросферы дополнительно промывали FC-40 и полностью сушили при поженном давлении.

[00110] Размеры микросфер измеряли способом лазерной дифракции на приборе Malvern Mastersizer 3000 с отбором проб жидкости путем диспергирования порошка продукта в 0,01% масс./об. растворе PVA. Морфологию продукта измеряли с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

[00111] Для измерения содержания белка в микросферах предварительно определенное количество микросфер сначала растворяли в 200 мкл этилацетата, а затем экстрагировали 1 л чистой воды, водную фазу собирали и центрифугировали для удаления мутной суспензии. Чистоту и концентрацию белка измеряли с помощью SEC-UPLC.

[00112] Для измерения резкого высвобождения предварительно определенное количество микросфер инкубировали в 1 мл ФСБ при 37 °С в течение 1 часа. Смесь центрифугировали и супернатант подвергали SEC-UPLC для концентрации белка.

Полученные результаты

[00113] Приведенные выше результаты показали образование стабильной эмульсии Н/Ф в присутствии достаточного количества SF. Эта неводная эмульсия может успешно производить пустые сферы POE. Этот безводный способ был снова использован для включения SDP в микросферы POE. В одном примере VEGF ловушку F-SDP в количестве 10% масс./масс. от общей твердой массы вводили в этилацетат (включая 20% масс./об. POE) в виде суспензии, и эту суспензию в FC-40 (содержащей 0,5 масс. % FS) смешивали при перемешивании и встряхивании. Сразу после эмульгирования аликвоты переносили на предметные стекла для микроскопии. Как показано на **Фиг. 6А и 6В**, этилацетат диспергирован в виде капель в FC-40, частицы SDP четко заключены внутри капель этилацетата. В отличие от системы S/O/W (данные не показаны), не было никаких признаков просачивания белка в непрерывную фторуглеродную фазу. Важно отметить, что в этой системе Н/Ф частица SDP в капле сохраняла свою первоначальную ямчатую форму в порошкообразном состоянии. Поскольку в системе Н/Ф не было воды для восстановления SDP, и, таким образом, SDP оставался в исходной форме твердых частиц. После отверждения микросферы POE, содержащие одну или более частиц SDP, можно четко наблюдать на изображениях с ярким полем и флуоресцентным микроскопом (**Фиг. 7А, 7В и 7С**). После испарения углеводородных и фторуглеродных растворителей на предметных стеклах добавляли воду для проверки взрывного высвобождения и качества инкапсуляции. Как показано на **Фиг. 8А-Д**, после помещения продукта в виде микросфер в воду SDP-инкапсулированные микросферы POE сохраняли свою целостность. Немедленного высвобождения белка не наблюдалось, а форма частиц SDP оставалась прежней, что указывало на то, что частицы SDP были хорошо защищены полимерной матрицей и экранированы от водной среды. Эти результаты свидетельствуют о том, что эмульсия Н/Ф является эффективным решением для инкапсуляции белков и других гидрофильных лекарственных средств в полимерные матрицы и обладает потенциалом

для достижения высокой эффективности инкапсуляции, высокого выхода при минимизации взрывного высвобождения - все это является серьезной проблемой при использовании способов W/O/W или S/O/W на водной основе.

[00114] Описанные в данном документе процедуры являются примерами использования способа объемной эмульсии S/H/F на неводной основе для инкапсуляции SDP белка в микросферы POE. Способ является воспроизводимым, масштабируемым и настраиваемым. Изменяя параметры рецептуры и способа, можно настраивать и контролировать свойства продукта. Влияние некоторых из этих параметров раскрыто в Примере 4.

Пример 4: Влияние углеводородных растворителей

Материалы и способы

[00115] Микрочастицы были получены, как описано в Примере 2, с использованием дихлорметана или этилацетата в качестве углеводорода. Были приготовлены 35% масс./об. POE в ДХМ и 35% масс./об. POE в этилацетате. Десять процентов (10%) масс./масс. от общей твердой массы белкового порошка суспендировали в 0,5 мл раствора POE в ДХМ или в этилацетате. Эти суспензии переносили в 9,5 мл FC-40, содержащего 0,5% по массе FS, в сквентиляционном флаконе на 20 мл. Эти смеси гомогенизировали для получения эмульсии и перемешивали при пониженном давлении в течение 1,5 часов. Образовавшиеся микросферы выделяли фильтрованием, промывали FC-40 и сушили при пониженном давлении.

Полученные результаты

[00116] На Фиг. 9 показано распределение микрочастиц по размерам, полученных с использованием того же состава и условий способа, за исключением типа углеводородного растворителя, либо дихлорметана, либо этилацетата. Микрочастицы, полученные с использованием любого из углеводородов, демонстрируют инкапсуляцию высушенного распылением белка. Использование дихлорметана приводит к образованию более крупных микрочастиц. См. таблицу 3 ниже. Результаты показали, что при одинаковой рецептуре и условиях способа использование разных углеводородных растворителей приводит к микросферам разных размеров. ДХМ продуцировал микросферы большего размера, чем этилацетат. Таким образом, углеводородный растворитель может быть выбран специально для контроля размера микросфер.

Таблица 3. Размеры микрочастиц наполненных SDP сфер POE, полученных с использованием ДХМ или этилацетата.

Диаметр	ДХМ	EtAc
Dv(10) (мкм)	5,2	3,2
Dv(50) (мкм)	30,7	21,2
Dv(90) (мкм)	64,9	42,3

Пример 5: Влияние количества белковой загрузки

Материалы и способы

[00117] Микрочастицы были получены, как описано в Примере 2, с изменением только количества загружаемого белка. Было приготовлено тридцать пять процентов (35%) РОЕ в ДХМ. 5%, 10% и 30% масс./масс. от общей твердой массы протеинового порошка суспендировали в 0,5 мл раствора РОЕ в ДХМ. Эти суспензии переносили в 9,5 мл FC-40, содержащего 0,5% по массе FS, в скнтилляционном флаконе на 20 мл. Эти смеси гомогенизировали в течение около 1 минуты для получения эмульсии, а затем в течение одной минуты в эмульсию добавляли 6 мл смеси Novex7500 и FC-40 в соотношении 1:1 по объему. Затем после перемешивания еще в течение минуты образовавшиеся микросферы выделяли фильтрованием, промывали FC-40 и сушили при пониженном давлении.

Полученные результаты

[00118] Как показано в Таблице 4, увеличение количества белкового порошка в составе приводило к увеличению размера микрочастиц РОЕ, измеренному с помощью анализа лазерной дифракции, а также приводило к увеличению содержания белка в конечных продуктах микросфер РОЕ, что наблюдалось с помощью эксперимента по экстракции белка, светлостольной и конфокальной флуоресцентной микроскопии. На изображениях в светлом поле при загрузке протеинового порошка 30% масс./масс. были показаны более темные и менее прозрачные микросферы, чем при 10% масс. белкового порошка, что указывает на то, что в микросферическом продукте было инкапсулировано большее количество лекарственного средства (Фиг. 10А и 10В). Репрезентативные конфокальные изображения подтвердили, что SDP был инкапсулирован в своей исходной форме в матрице РОЕ из поперечных сечений микросфер (Фиг. 11А и 11В). Больше частиц SDP наблюдалось в микросферах с 30% масс./масс. Опять же, инкапсулированные SDP сохранили свою первоначальную форму ямочек, что указывает на то, что они были неповрежденными в течение всего способа изготовления.

Таблица 4 . Размеры микрочастиц нагруженных SDP сфер РОЕ, полученных с различной нагрузкой SDP.

Диаметр	5% масс./масс. SDP	10% масс./масс. SDP	30% масс./масс. SDP
Dv(10) (мкм)	4,9	5,2	17,1
Dv(50) (мкм)	20,6	30,7	40,7
Dv(90) (мкм)	43,0	64,9	81,3

Фиг. 12А и 12В представляют собой изображения микрочастиц, нагруженных 5% мас./мас. SDP и 10% мас./мас. SDP, на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ).

Пример 6: План экспериментов (DOE) по инкапсуляции SDP в микросферы РОЕ с использованием объемного эмульгирования Н/Г.

Материалы и способы

[00119] Было проведено исследование DOE для оценки влияния критических факторов синтеза в проектируемом пространстве на свойства конечных продуктов. Десять

запусков запланированного эксперимента были выполнены в соответствии с общей процедурой, описанной в Примере 2. Загрузку белкового порошка, размер частиц белкового порошка (размеры $D_v(50)$ составляют 2,2 мкм и 5,6 мкм, см. СЭМ-изображения на Фиг. 13А и 13В соответственно), концентрацию полимера и концентрацию HFE варьировали, в то время как следующие условия состава и способа поддерживаются постоянными, например, объем углеводородной и фторуглеродной фаз, скорость гомогенизации, концентрация FS (Таблица 5). Измеренные отклики, включая размеры микросфер (D_v50 , Span с помощью лазерной дифракции), эффективность инкапсуляции, взрывное высвобождение через 1 час при 37 °С, изображения СЭМ.

Полученные результаты

[00120] Результаты DOE обобщены в Таблице 5.

Таблица 5. План эксперимента и измеренные ответы исследования DOE по инкапсуляции SDP.

Экспериментальный дизайн					Измеренные ответы			
Запуск #	Целевая загрузка белкового порошка (%)	[POE] (%; масса/объем)	[HFE] (%; масса/объем)	Размер белковых частиц ($DV50$; мкм)	Размер микросфер ($DV50$, мкм)	Диапазон	Загрузка SDP продукта (%)*	Взрыв белка** высвобождение (%)
1	25	25	25	5,6	23,3	1,2	25,3	103
2	25	35	25	2,2	27,4	1,4	26,7	99
3	5	35	25	2,2	20,6	1,8	6,1	10
4	5	25	25	5,6	17,9	1,48	5,3	29
5	15	25	25	2,2	18,1	1,50	15,4	52
6	5	35	35	5,6	21,6	1,74	3,9	15
7	5	25	35	2,2	19,4	1,55	4,1	9
8	15	35	35	5,6	25,3	1,39	13,8	78
9	25	25	35	2,2	21,5	1,30	20,8	116
10	25	35	35	5,6	35,2	1,517	23,8	91

* Микросферы растворяли в этилацетате, белок экстрагировали водой и количественно определяли с помощью SEC-UPLC.

** Микросферы инкубировали в ФСБ при 37 °С в течение 1 часа. Высвобожденный белок количественно определяли с помощью SEC-UPLC.

[00121] Специально разработанная подгонка DOE к размеру микросфер (с $R^2=0,76$) выявила основные эффекты загрузки протеинового порошка и концентрации POE (со

значением $p < 0,05$, см. результаты корреляции в **Таблице 6**). Кроме того, подгонка по взрывному высвобождению ($R^2=0,92$) показывает, что только загрузка протеиновым порошком значительно влияет на резкое высвобождение (со значением $p < 0,05$, см. результаты корреляции в **Таблице 7**). Результаты показывают, что увеличение количества протеинового порошка в рецептуре приведет к увеличению полезной нагрузки в конечном продукте, но также повысит процент взрывного высвобождения. Взрывное высвобождение, вероятно, вызвано адсорбированными на поверхности белковыми частицами. Максимальное количество протеинового порошка, интернализованного в полимерную микросферу, определяется физическим пространством для данного размера микросферы. Простое увеличение концентрации протеинового порошка в суспензии препарата не приведет к увеличению инкапсуляции лекарственного средства выше определенного порога, который в этом примере составлял около 30% мас./мас.

Таблица 6. Корреляции факторов с размером микросфер.

Период	Оценка	Стандартная ошибка	Коэффициент Т	Вероятность> t	VIF
Перехват	23,03	0,924421	24,91	<,0001*	
Загрузка SDP (%)(5,25)	3,4875	1,033534	3,37	0,0118*	1
[Полимер] (%; масса/объем) (25,35)	2,99	0,924421	3,23	0,0144*	1

Таблица 7. Положительная корреляция загрузки SDP с взрывным высвобождением.

Период	Оценка	Стандартная ошибка	Коэффициент Т	Вероятность> t	VIF
Перехват	63,190484	4,008836	15,76	<,0001*	
Загрузка SDP (%)(5,25)	43,17019	4,482015	9,63	<,0001*	1

Пример 7. Применение способа инкапсуляции на основе эмульсии S/H/F к различным белкам.

[00122] Описанная эмульсионная система и способ на основе H/F могут быть базовой технологией, применимой для различных полимеров и терапевтических белков. В конкретном примере изобретения белковый порошок рекомбинантного IgG4 (молекулярная масса ~145 кДа), белковый порошок рекомбинантного IgG1 (молекулярная масса ~146 кДа) или белковый порошок рекомбинантного слитого белка (молекулярная масса ~64 кДа) инкапсулировали в микросферы POE, соответственно, посредством того же процесса, что и в Примере 2. Результаты обобщены в Таблице 8. Количество инкапсулированного белкового порошка в микросферическом продукте определяли с

помощью анализа экстракции, и оно соответствовало целевому значению. Чистота белка, сохранялась для рекомбинантного слитого белка IgG1 или несколько снижалась для IgG4 (менее 2%) после процесса инкапсуляции, указывает на хорошую совместимость со способом.

Таблица 8. Результаты SDP с различными типами белков, инкапсулированных в микросферы POE с помощью эмульсий S/H/F.

Тип белка	Чистота белка в SDP по SEC-UPLC	Целевое содержание твердых веществ в составе, % масс./масс.	Инкапсулированный протеиновый порошок, % масс./масс., по результатам экстракции	Инкапсулированный белок % масс./масс. *	Процент взрывного высвобождения белка**	Чистота инкапсулированного белка по SEC-UPLC
Рекомбинантный гибридный белок	97,8%	15	13,7	8,6	44%	98,2%
IgG4	99,4%	15	15,0	12,0	24%	97,6%
IgG1	98,4%	15	16,5	11,7	22%	98,9%
IgG1 (альтернативный состав)	96,8%	15	13,7	8,9	44%	97,4%

* Микросферы растворяли в этилацетате, белок экстрагировали водой и количественно определяли с помощью SEC-UPLC.

** Микросферы инкубировали в ФСБ при 37 °С в течение 1 часа. Высвобожденный белок количественно определяли с помощью SEC-UPLC.

[00123] Другие биоразлагаемые полимеры, например ПМГК и ПМК, также используются в эмульсиях на основе H/F. В конкретном примере изобретения с помощью способа, аналогичного описанному в Примере 2, флуоресцентно меченую белок-ловушку VEGF F-SDP инкапсулировали в ПМГК (лактид:гликолид 50:50, молекулярная масса 42-65 кДа, Sigma Aldrich) и ПМК (эфир с концевой алкильной группой, Mw 18000-28000, Sigma Aldrich) микросферы, соответственно. Также могут быть использованы другие

соотношения полимеров и молекулярные массы. Изображения светлого поля и флуоресцентного микроскопа показали, что белковый порошок был успешно инкапсулирован внутри полимерных микросфер (Фиг. 14А-С для ПМК и Фиг. 15А-В для ПМГК).

Пример 8: Мембранная неводная эмульсия

[00124] Микрочастицы были получены с использованием мембранной эмульсии с использованием материалов, описанных в Таблице 9.

Таблица 9:

Материал	Описание	Производство	№ лота/позиции
Высушенная распылением Alexa-488 VEGF ловушка с флуоресцентной меткой	Питательный раствор, содержащий 1% белка-ловушки VEGF, меченной Alexa-488.	Регенерон, Нью-Йорк	
Дихлорометан	Органический растворитель, безводный $\geq 99,8$	Sigma Aldrich	270997-1L
FC-40	Fluorinert™ FC-40	Sigma Aldrich	F9755
PVA	Спирт поливиниловый, 146К-186К 87-89% гидролизованный	Sigma Aldrich	363103-500G
Pico-Surf 1	Фторосодержащее поверхностно-активное вещество	Сфера Fluidics	C014

[00125] Мембранное эмульгирование (МЭ) - это относительно новый способ высококонтролируемого производства частиц, который обеспечивает хороший контроль размера и узкое распределение по размерам. На сегодняшний день для МЭ разработано множество различных типов мембран, включая пористое стекло Shirasu (SPG), ацетат целлюлозы, полимер, анодный пористый оксид алюминия и кремниевые микроканалы. Для раскрытых способов было обнаружено, что мембрана из нержавеющей стали с порами, просверленными лазером, лучше всего подходит для этой цели, а имеющееся в продаже оборудование от Micropore Technologies (Redcar, Великобритания) позволило провести лабораторные исследования, а также перейти к производству в соответствии с GMP. Несколько важных особенностей мембранной технологии включают в себя: 1. Тщательно контролируемый размер пор мембраны позволяет всем частицам SDP ниже предела проходить через мембрану; 2. Прямой трубчатый канал без извилистых путей снижает тенденцию к блокированию канала SDP; 3. Фторофильные мембранные покрытия обеспечивают хорошую совместимость с получением углеводородно-фторуглеродной

(H/F) эмульсии. Кроме того, мембраны из нержавеющей стали прочны, их легко чистить и стерилизовать.

[00126] Для одного эксперимента чистые микросферы POE (RS001-серия 1) или инкапсулированные белком микросферы POE (RS001-серия 2) были получены посредством мембранного эмульгирования с использованием обычной эмульсионной системы на водной основе. Производственные параметры приведены в **Таблице 10**. В партии 1 в качестве дисперсной фазы использовали 10% масс./масс. раствора POE в ДХМ, а в качестве непрерывной фазы использовали 1% поливиниловый спирт (PVA) для получения чистых микросфер POE. В партии 2 микрокапсулирование проводили для белка-ловушки VEGF SDP (содержащей 1% белка-ловушки VEGF, меченной Alex488) с размером $D_{50}=2,2$ ($D_{10}=1,0$, $D_{90}=3,8$, Протяжение=1,24). SDP добавляли в 10% мас./мас. раствор POE в ДХМ с SDP:POE=9:1 по массе. Смесь встряхивали и обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут в ванне для обработки ультразвуком, чтобы получить гомогенную суспензию. Суспензию SDP немедленно загружали в шприц BD на 10 мл и подавали в дисперсионную ячейку LDC-1 со скоростью 0,8 мл/мин, обеспечиваемой шприцевым насосом. Эмульсия образовывалась, когда органическая фаза проходила через мембрану с порами 30 мкм при перемешивании с использованием мощности 10В постоянного тока (около 1015 об/мин в зависимости от вязкости). Образовавшуюся эмульсию переносили в незакрытый химический стакан и давали микросферам затвердеть при комнатной температуре без перемешивания в течение ночи. Наконец, микросферические продукты промывали водой MilliQ на вакуумном фильтре и сушили при пониженном давлении в течение ночи.

Таблица 10. Параметры, используемые в партии 1 и партии 2, мембранное эмульгирование с использованием обычной системы водной эмульсии.

	Партия 1 (только POE, O/W)	Партия 2 (POE+SDP, S/O/W)
Мембрана	Гидрофильная мембрана без покрытия, размер пор 30 мкм.	
Непрерывная фаза	1% водный раствор PVA, 100 мл	
Дисперсная фаза	POE 10% масс./масс. в ДХМ, 3 мл	POE 10% масс./масс. в ДХМ+SDP, SDP:POE=9:1 масс./масс., 3 мл
Скорость подачи	1 мл/мин	0,8 мл/мин
Скорость перемешивания	6В постоянного тока (~ 552 об/мин)	10В постоянного тока (~ 1015 об/мин)
Состояние затвердения	Условия окружающей среды, без перемешивания.	

Промывка и сушка	Промойте водой MQ и высушите при пониженном давлении.
------------------	---

[00127] Для другого эксперимента чистые микросферы POE (Партия 3) или микросферы POE, инкапсулированные белком (Партия 4), были получены посредством мембранного эмульгирования с использованием новой системы эмульсии неводного углеводорода-во-фторуглероде. Параметры производства приведены в Таблице 11. В Партии 4а вышеупомянутую VEGF ловушку SDP (содержащую 1% белка-ловушки VEGF, меченной Alexa488) добавляли в углеводородный растворитель, ДХМ, содержащий биоразлагаемый или биорасщепляемый полимер POE. Смесь встряхивали и обрабатывали ультразвуком с образованием гомогенной суспензии. Суспензию SDP сразу загружали в шприц и с помощью шприцевого насоса подавали в дисперсионную ячейку LDC-1. Суспензию вводили через пористую мембрану, имеющую размер пор, больший, чем у частиц протеинового порошка, в непрерывную фазу фторуглерода (например, FC-40), содержащую фторосодержащее поверхностно-активное вещество (например, Pico-Surf 1), с образованием эмульсии углеводород-во-фторуглероде (показана на Фиг. 16). Последующее отверждение микросфер достигалось за счет удаления углеводородного растворителя из образовавшихся капель эмульсии путем добавления во фторуглерод гидрофторэфира NOVEC 7500 в качестве соразтворителя. Отвержденные микросферы собирали и промывали FC-40 для удаления дополнительного фторсодержащего поверхностно-активного вещества и сушили с использованием вакуумной фильтрации, с фильтром PES. Наконец, продукт сушили при пониженном давлении для удаления остаточных растворителей. Блок-схема всего способа показана на Фиг. 17.

Таблица 11 Параметры, использованные в исследовании эмульгирования с мембраной RS002 с использованием системы эмульсии безводный углеводород-во-фторуглероде.

	Партия 3 (POE, H/F)	Партия 4 (SDP+POE, S/H/F)
Мембрана	Мембрана с фторофильным покрытием, размер пор 30 мкм	
Непрерывная фаза	FC-40, PicoSurf 0,5% масс., 50 мл	
Дисперсная фаза	POE 20% масс./масс. в ДХМ, , 3 мл	POE 20% масс./масс. в ДХМ, SDP:POE=9:1 масс./масс., 3 мл
Скорость подачи	0,8 мл/мин	0,5 мл/мин
Скорость перемешивания	8В постоянного тока	550 8В постоянного тока (~ об/мин)
Состояние затвердения	После образования эмульсии добавляли	

	Партия 3 (РОЕ, Н/Ф)	Партия 4 (SDP+РОЕ, S/Н/Ф)
		HFE/FC-40=1:1 по объему, 40 мл. Затем добавляли чистый HFE 10 мл.
Промывка и сушка	Промойте FC-40 на вакуумном фильтре и высушите при пониженном давлении.	

Полученные результаты

[00128] Как показано на Фиг. 18, СЭМ-изображения пустых микросфер РОЕ, изготовленных с помощью обычной эмульсионной системы на водной основе (Партия 1) и с помощью эмульсионной системы на неводной основе (Партия 3), показывают, что оба способа позволяют получить сферические микрочастицы, но с различной морфологией поверхности. Способ на водной основе приводил к высокопористой поверхности из-за присутствия воды в процессе, в то время как способ на неводной основе приводил к гладкой поверхности микросфер без четких пор из-за полностью безводного способа.

[00129] Для микроинкапсуляции белка-ловушки VEGF SDP в микросферы РОЕ сравнение результатов обоих способов показано на Фиг. 19. Эмульгирование мембраны на водной основе (Партия 3) дало хорошие монодисперсные микросферы, но поверхность была очень пористая и с водяными каналами. Монодисперсность микросфер при неводном мембранном эмульгировании хуже, чем при водном варианте, но может быть дополнительно улучшена за счет регулирования параметров способа. Кроме того, на поверхности микросфер РОЕ наблюдается много SDP. На этих поверхностях расположенные SDP могут способствовать выбросу белков после инкубации микросфер в буферах (Таблицы 11 и 12).

[00130] Изображения с флуоресцентного микроскопа выявили морфологию и распределение белковых SDP внутри микросфер РОЕ (Фиг. 20). Для партии 3 SDP были восстановлены водой во время процесса инкапсуляции и объединены в более крупные капли внутри микросферы. Напротив, для Партии 4 SDP, инкапсулированные внутри микросфер, сохраняли свою первоначальную структуру в форме изюма, что указывает на то, что SDP сохранял свою целостность после способа, так как восстановление белка водой не происходило.

[00131] Было определено, что эффективность инкапсуляции (измеренная белковая нагрузка в продукте/теоретическая белковая нагрузка) для Партии 3 и Партии 4 составляет 35,0% и 80,7% соответственно (Таблица 12). Более чем двукратная эффективность инкапсуляции для неводной системы предполагает, что SDP лучше удерживаются в каплях углеводорода и меньше диффузируют в непрерывную фазу по сравнению с водной системой. Чистоту (процент мономера) белка, инкапсулированного в микросферу РОЕ, измеряли с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Партия 4 показала хорошее сохранение чистоты белка после всего способа инкапсуляции.

Таблица 12. Количественное определение и чистота белка, инкапсулированного в микросферы POE.

Образцы	Эмульсионная система	Теоретическая нагрузка белком из исходного раствора*	Измеренное содержание белка в продукте	Эффективность инкапсуляции	Взрывной/общий белок	Чистота белка-ловушки VEGF по SEC*
Партия 3	S/O/W	6%	2,10%	35,0%	0,7%	96,4
Партия 4	S/H/F	6%	4,84%	80,7%	11,6%	96,7

* исходный SDP содержит 60% масс. белка и имеет чистоту 97,3% по SEC.

[00132] Хотя в приведенном выше описании данное изобретение было описано в отношении некоторых его вариантов реализации, и многие детали были представлены с целью иллюстрации, специалистам в данной области техники будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты реализации и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть значительно изменены без отклонения от основных принципов изобретения.

[00133] Данное изобретение может быть реализовано в других конкретных формах, не отступая от его сущности или существенных признаков, и, соответственно, ссылка должна быть сделана на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как указывающее на объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения микрочастиц с полимерным покрытием, включающий:
объединение микронизированного белкового порошка и полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора;
перемешивание неводного первого раствора с образованием суспензии;
подачу суспензии в дисперсионную ячейку, причем суспензию вливают через пористую мембрану в непрерывную фазу, содержащую фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество, под тангенциальным потоком непрерывной фазы с образованием эмульсии углеводородов во фторуглеродах;
добавление гидрофторэфира к эмульсии углеводород-во-фторуглероде;
удаление углеводородного растворителя для получения отвержденных микрочастиц; и
удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц, при этом микрочастицы содержат белок, инкапсулированный в матрице полимера.
2. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадии удаления остаточного фторсодержащего поверхностно-активного вещества из микрочастиц путем промывания микрочастиц во фторуглеродной жидкости и удаления фторуглерода при пониженном давлении, и сбора микрочастиц с применением полиэфирсульфонового мембранного фильтра.
3. Способ по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что фторуглеродная жидкость содержит перфторсодержащее соединение C5-C18.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что углеводородный растворитель выбран из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что раствор фторуглерода содержит 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N,N-бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)бутан-1-амин.
6. Способ по любому из пп. 1-1, отличающийся тем, что фторсодержащее поверхностно-активное вещество включает перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир.
7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что полимер включает полиортоэфир (POE).
8. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что полимер выбран из группы, состоящей из полимолочной кислоты и поли(молочно-ко-гликолевой кислоты).
9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что гидрофторэфир представляет собой 2-(трифторметил)-3-этоксидодекафторгексан.
10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что мембрана представляет собой мембрану из нержавеющей стали с фторофильным покрытием.
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что поры мембраны имеют диаметр от 3 до 300 мкм.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что фторсодержащее поверхностно-активное вещество присутствует во фторуглеродной жидкости в количестве от около 0,1 до 5% масс./об.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что соотношение белкового порошка и полимера составляет 0,1%-30%.

14. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что микронизированный порошок получают из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, слитого белка, рекомбинантного белка или его фрагмента или укороченной версии.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что слитый белок представляет собой слитый белок-ловушку VEGF или его укороченную версию.

16. Способ по п. 14 или 15, отличающийся тем, что слитый белок-ловушка VEGF представляет собой афлиберцепт.

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что подача суспензии осуществляется со скоростью от 0,1 до 1,0 мл/мин.

18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что суспензия представляет собой гомогенную суспензию.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что микрочастицы содержат единую структуру ядро-оболочка.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что по меньшей мере одна микрочастица содержит множество ядер, диспергированных в полимере.

21. Способ по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что микрочастицы включают микрочастицы, содержащие комбинацию структур с одним ядром, инкапсулированных полимером, и микрочастиц, содержащих многоядерные структуры, инкапсулированные полимером.

22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что микрочастицы имеют диаметр от 1 до 200 мкм.

23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от 30 до 60 мкм.

24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что белковый порошок микронизируют с помощью сушки распылением, сушки электрораспылением, обратимого осаждения, замораживания распылением, микротемплатирования или их комбинации.

25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что суспензию получают с применением гомогенизации, вортексирования, обработки ультразвуком, кавитации, взбалтывания, перемешивания, сбивания, взбивания, встряхивания, эмульгирования или их комбинации.

26. Способ по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что углеводородный растворитель удаляют выпариванием.

27. Способ по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что фторуглеродную жидкость удаляют вакуумной фильтрацией.

28. Микрочастицы, полученные способом по любому из пп. 1-27, причем

микрочастицы представляют собой микрочастицы с замедленным высвобождением.

29. Композиция с замедленным высвобождением, содержащая микрочастицы по п. 28.

30. Микрочастицы по любому из пп. 1-29, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют небольшое количество пор или каналов в полимерной оболочке или совсем не имеют их.

31. Способ получения полимера или микрочастиц с полимерным покрытием, включающий:

объединение от 1 до 30% масс./масс. всего твердого высушенного распылением белка, суспендированного в углеводородном растворе, с образованием неводного первого раствора;

перемешивание первого неводного раствора с образованием суспензии;

подачу суспензии в диспергирующий насос, причем суспензия вливается через пористую мембрану в непрерывную фазу, содержащую фторуглеродную жидкость и от 0,1 до 5,0% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества, под тангенциальным потоком непрерывной фазы с образованием эмульсии углеводорода-во-фторуглероде;

удаление углеводородного растворителя с получением отвержденного полимера или микросфер с полимерным покрытием; и

удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц, при этом микрочастицы содержат белок, инкапсулированный в матрице полимера.

32. Способ по п. 31, дополнительно включающий стадию добавления гидрофторэфира во фторуглеродную жидкость эмульсии углеводород-во-фторуглероде перед удалением углеводородного растворителя.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что углеводородный раствор удаляют выпариванием при атмосферном давлении окружающей среды или при пониженном давлении.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что отвержденный полимер или покрытые полимером микросферы собирают вакуумной фильтрацией.

35. Способ по любому из пп. 31-32, отличающийся тем, что высушенный распылением белок представляет собой антители, рекомбинантный белок, слитый белок или его фрагмент.

36. Способ по п. 365, отличающийся тем, что белок представляет собой белок-ловушку VEGF или укороченный белок-ловушку VEGF.

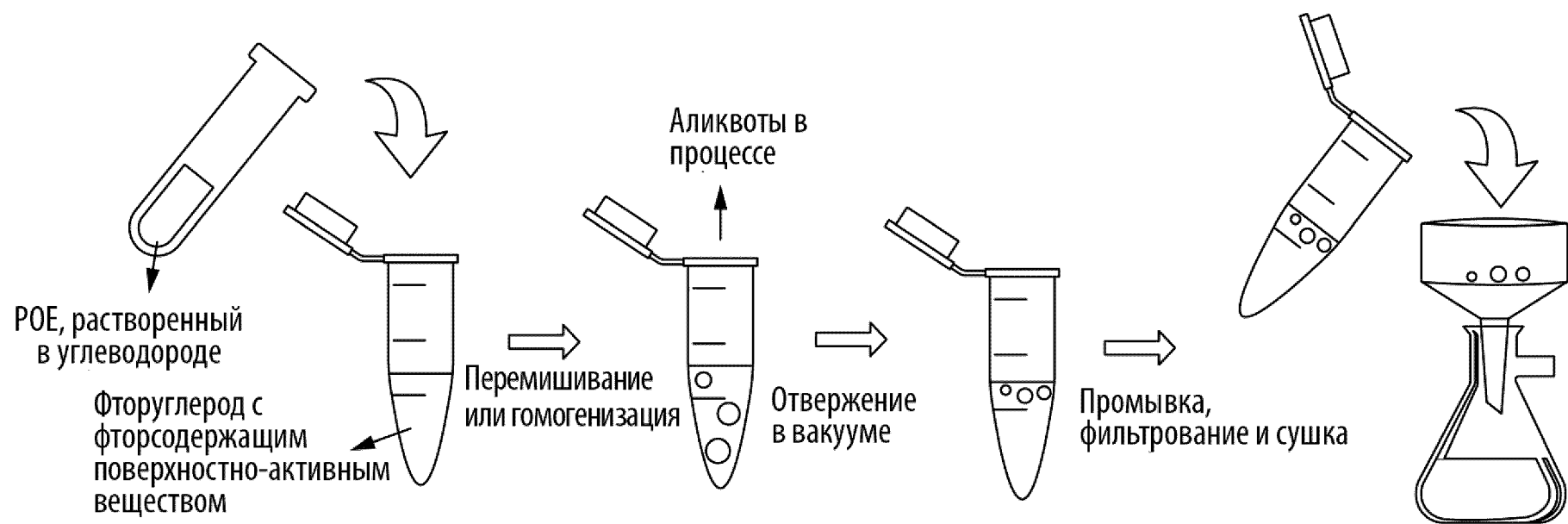
37. Способ по п. 31, отличающийся тем, что углеводородный раствор выбран из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации.

38. Способ по любому из пп. 31-37, отличающийся тем, что фторуглеродная жидкость содержит трифторметилбис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)амин.

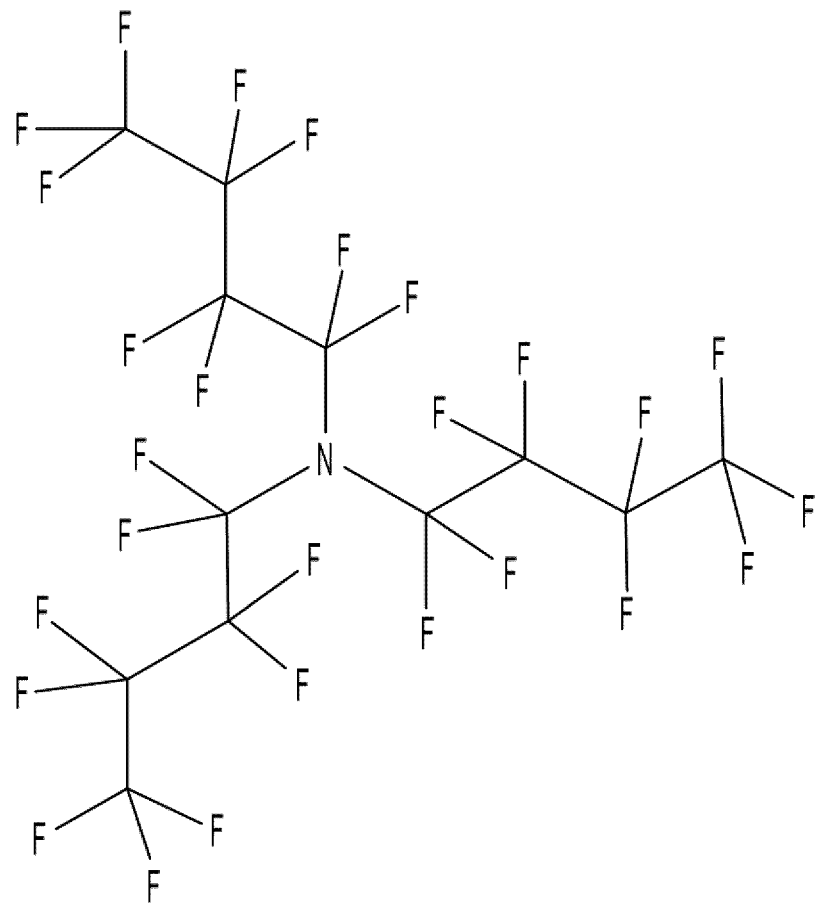
39. Способ по п. 38, дополнительно включающий сбор отвержденных микрочастиц.

40. Микрочастицы, полученные по любому из способов по пп. 31-39.
41. Фармацевтическая композиция, содержащая микрочастицы по п. 40.
42. Фармацевтическая композиция по п. 41, дополнительно содержащая одно или более вспомогательных веществ.
43. Фармацевтическая композиция по п. 41, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция представляет собой композицию с замедленным высвобождением.
44. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 41-43, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция составлена для парентерального введения.
45. Способ по п. 3, отличающийся тем, что гидрофторэфир включает 4-этокси-1,1,1,2,2,3,3,4,5,6,6,6-диэкафтор-5-(трифторметил)гексан.

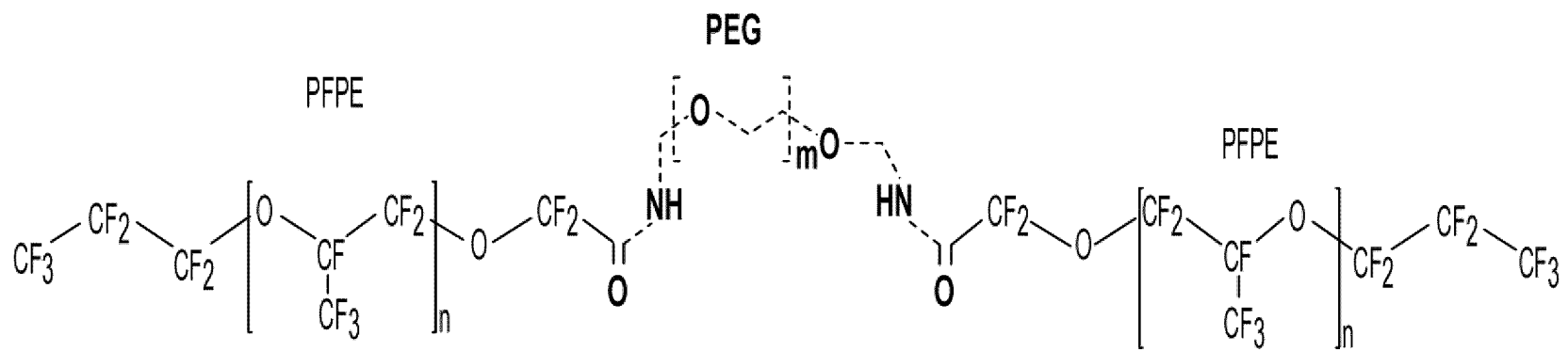
По доверенности



Фиг. 1А

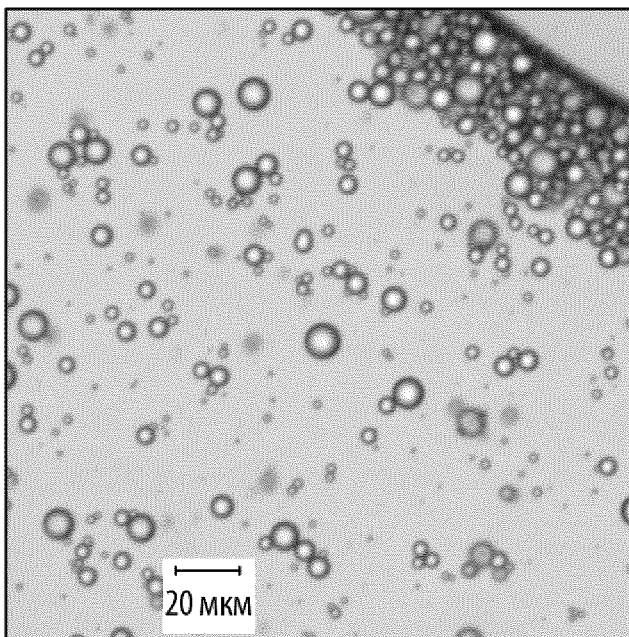


Фиг. 1В

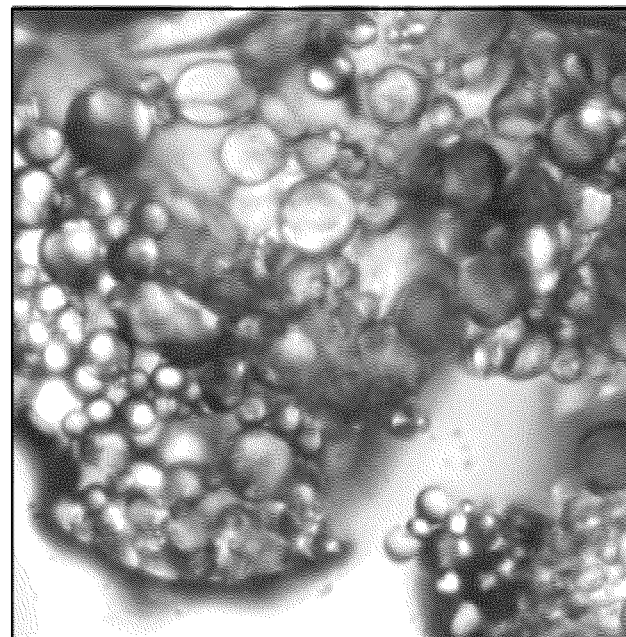


Pico-surf 1 (PFPE-PEG-PFPE)

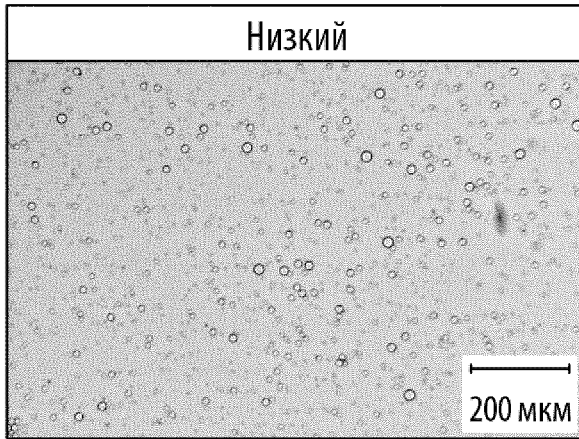
Фиг. 1С



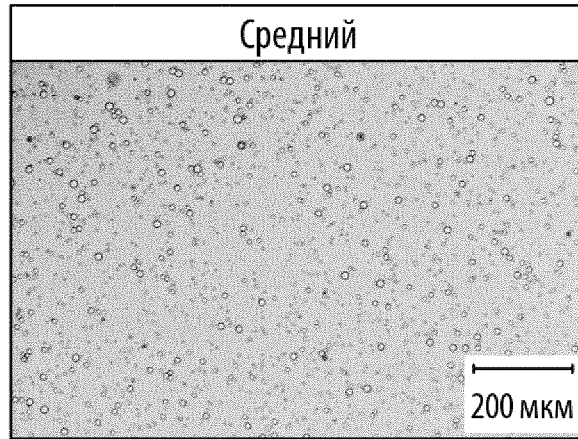
Фиг. 2А



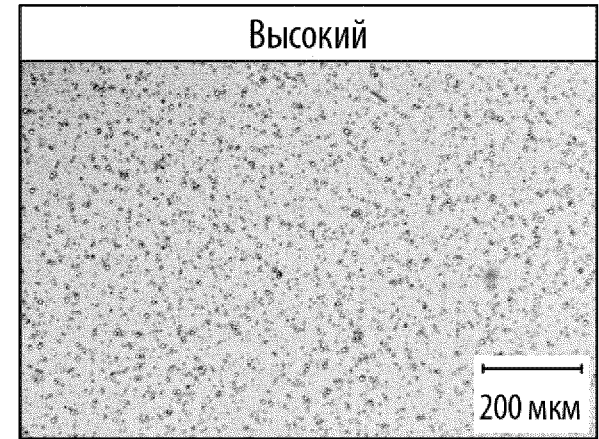
Фиг. 2В



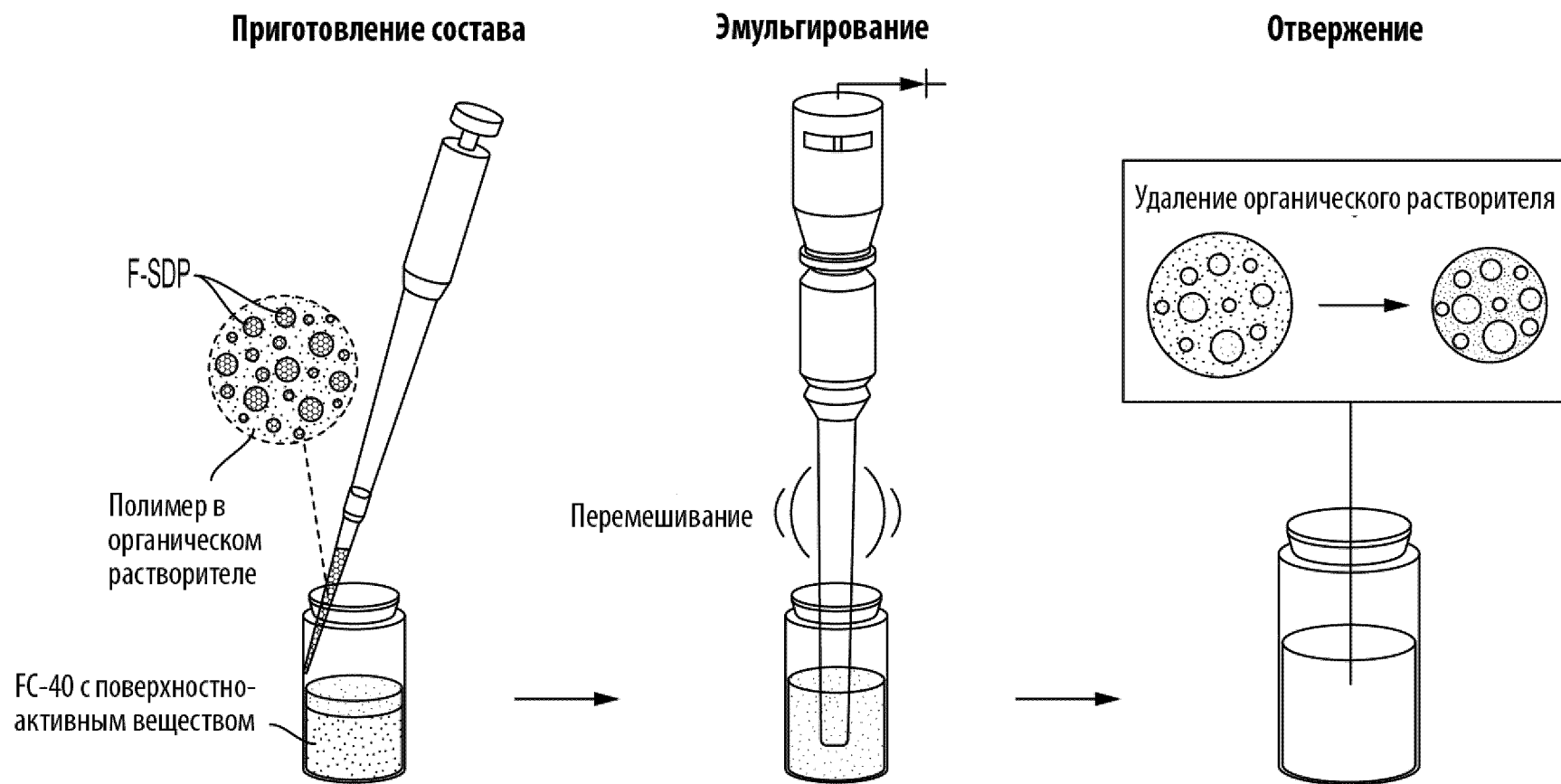
Фиг. 3А



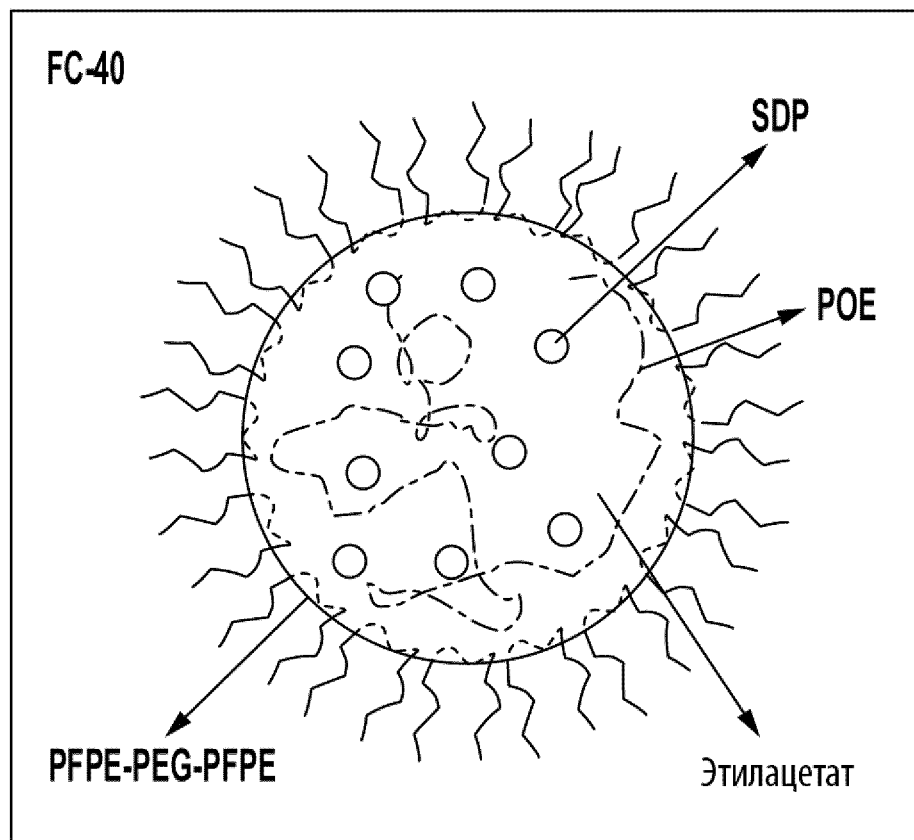
Фиг. 3В



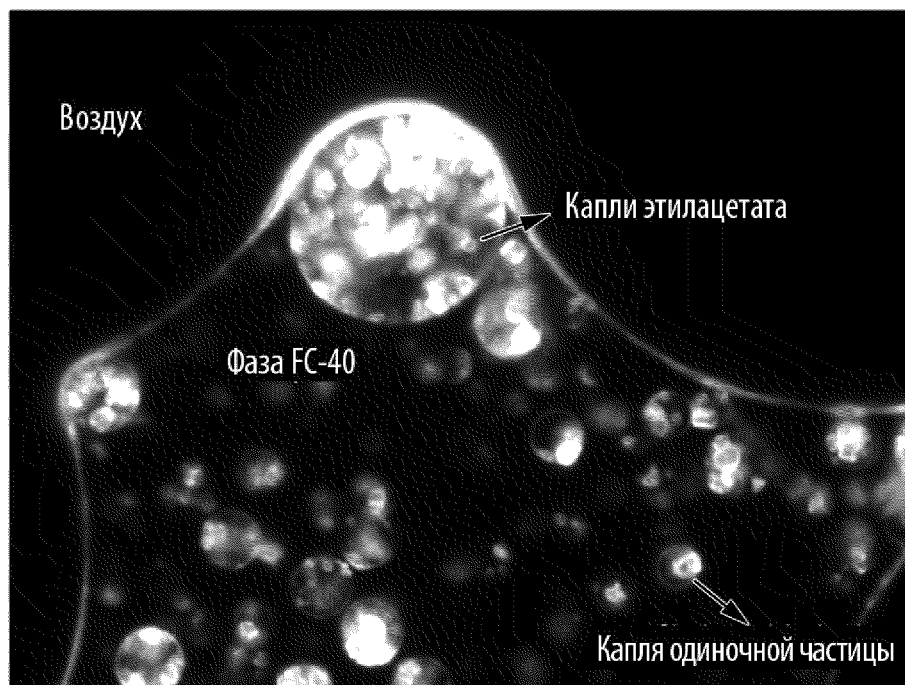
Фиг. 3С



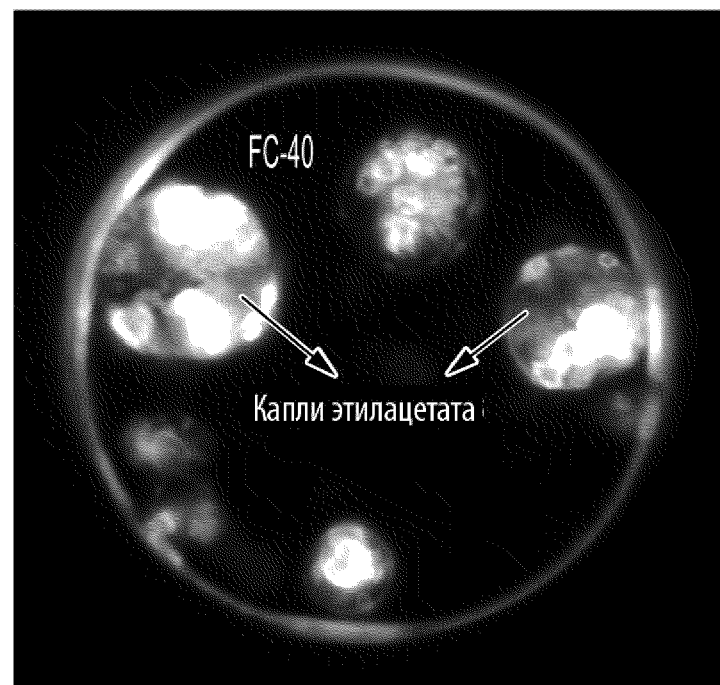
Фиг. 4



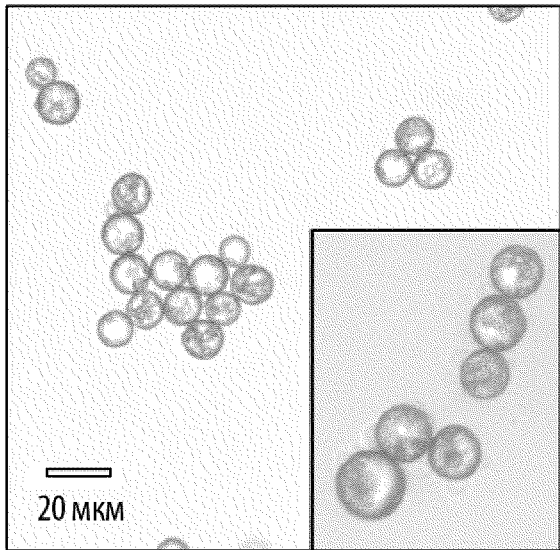
Фиг. 5



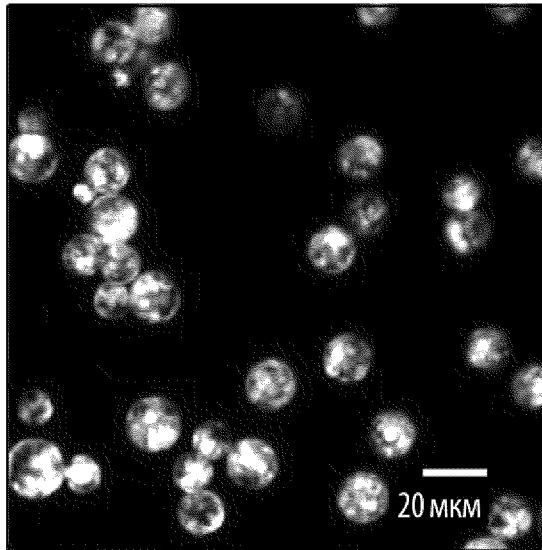
Фиг. 6А



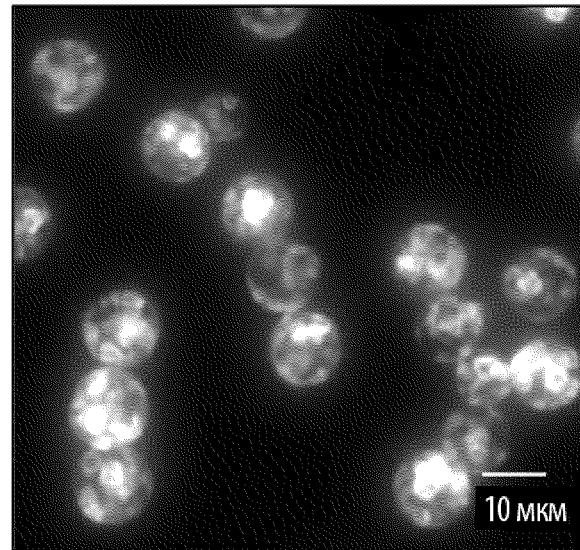
Фиг. 6В



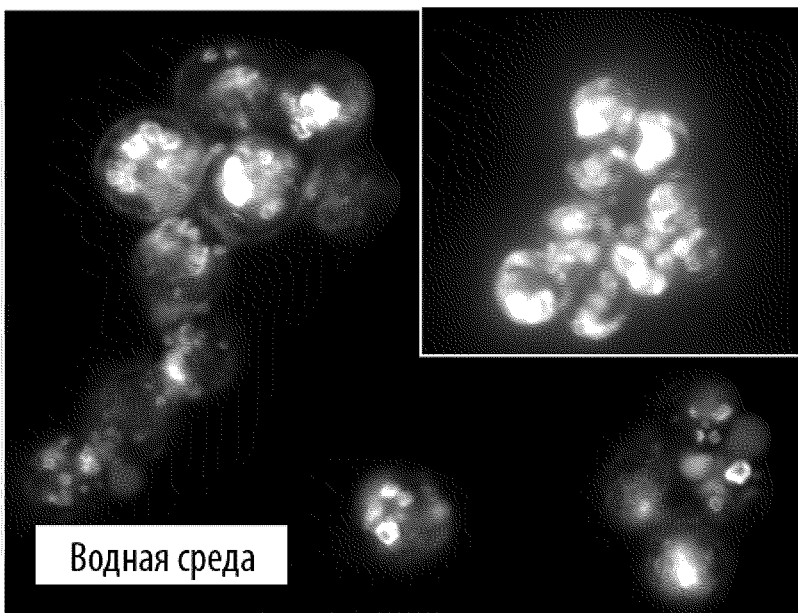
Фиг. 7А



Фиг. 7В

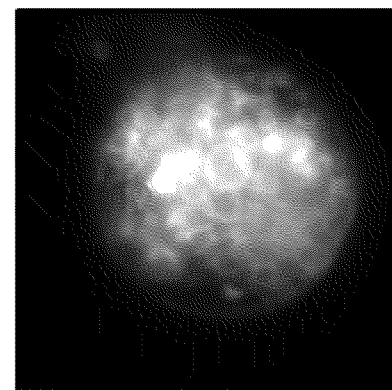


Фиг. 7С

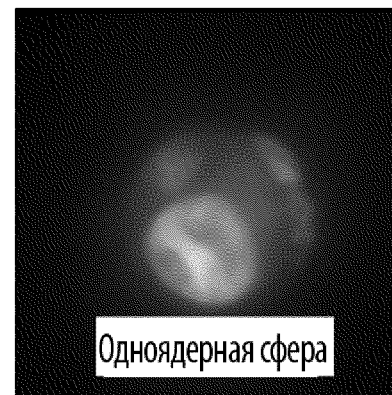


Фиг. 8А

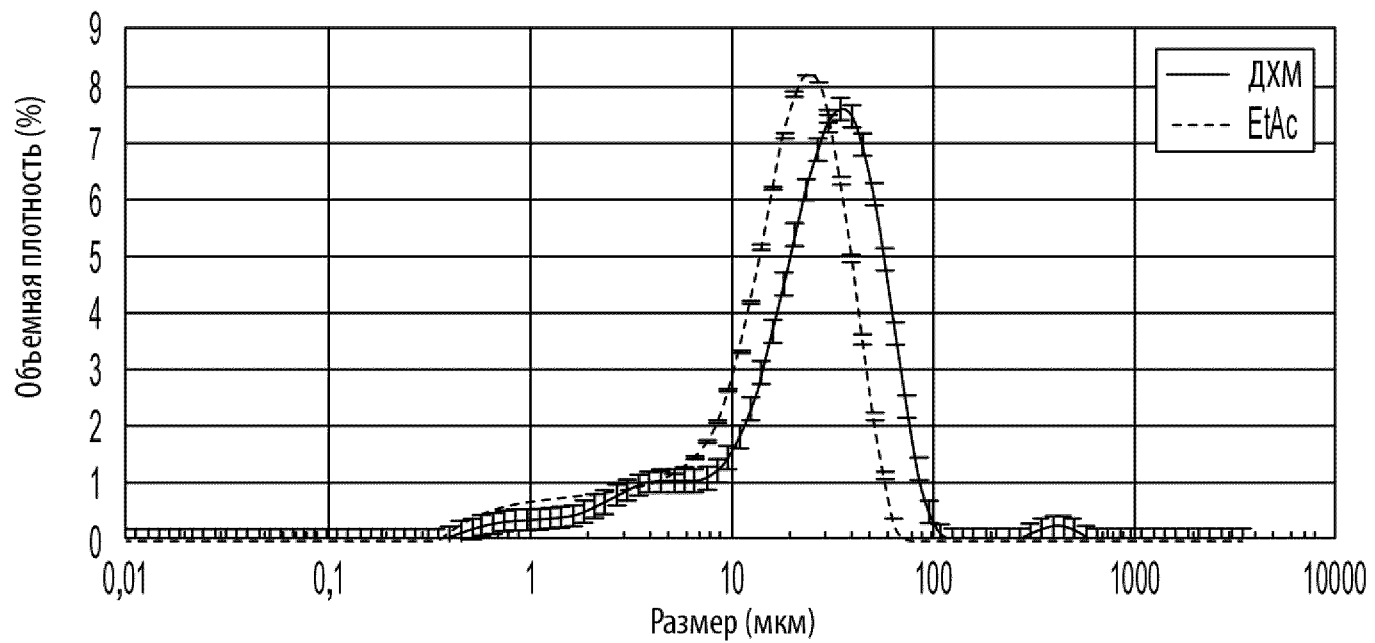
Фиг. 8В



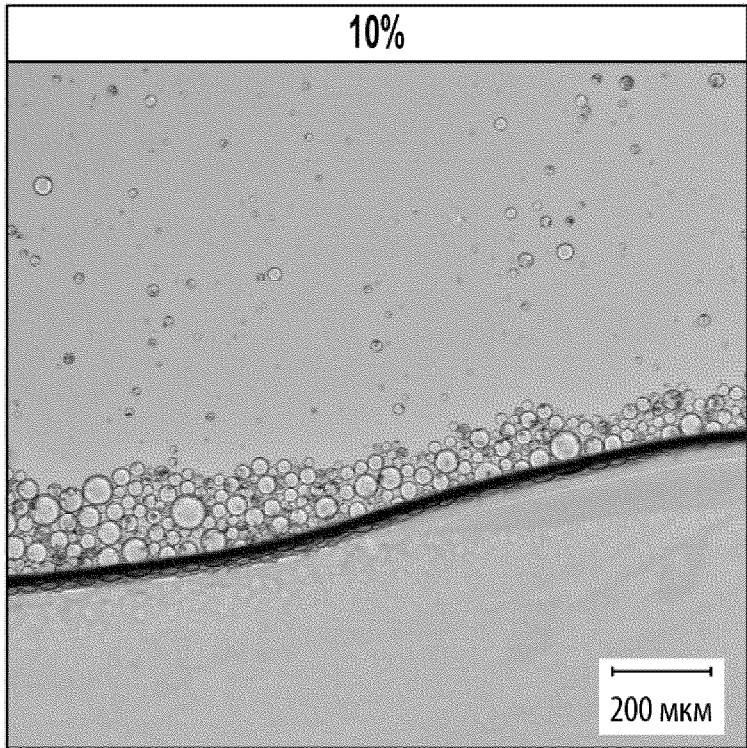
Фиг. 8С



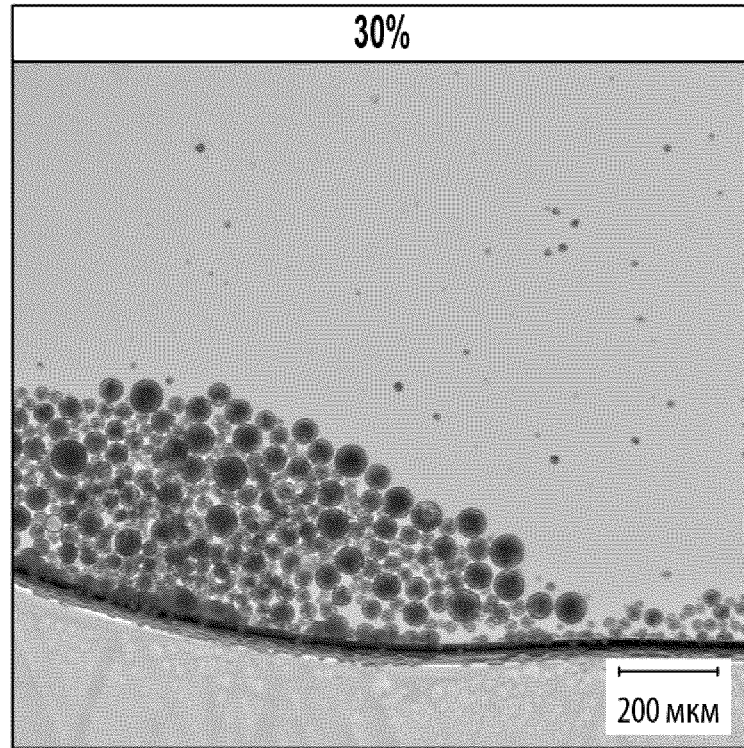
Фиг. 8D



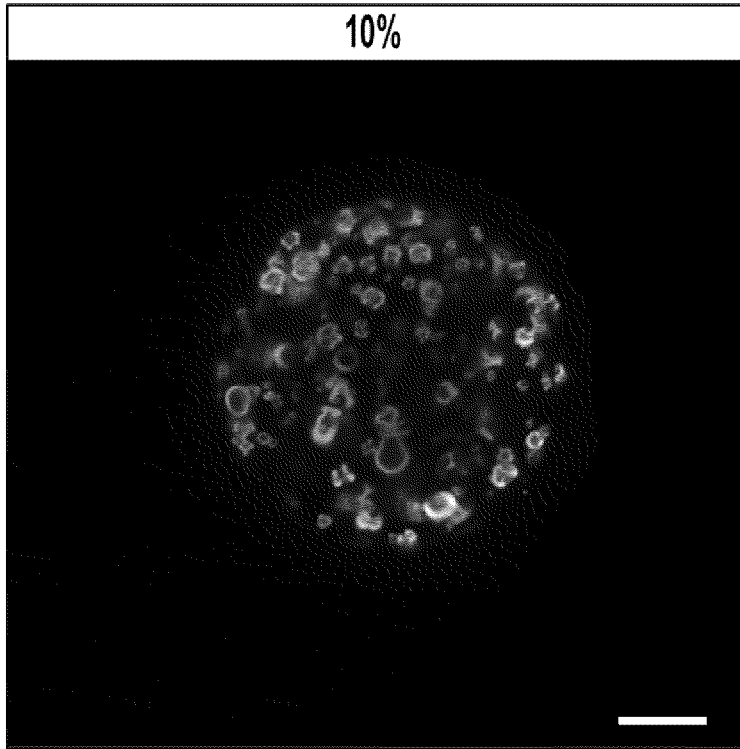
ФИГ. 9



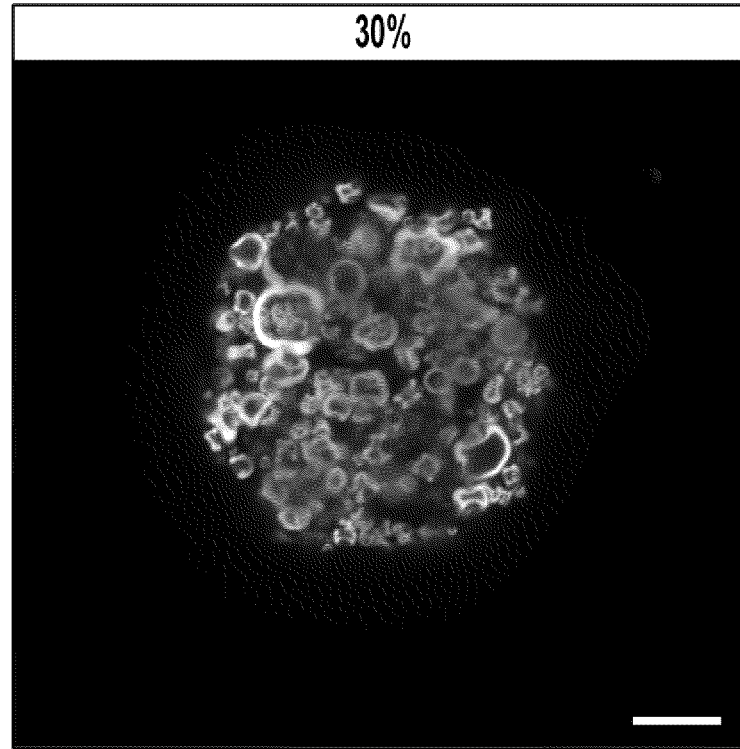
Фиг. 10А



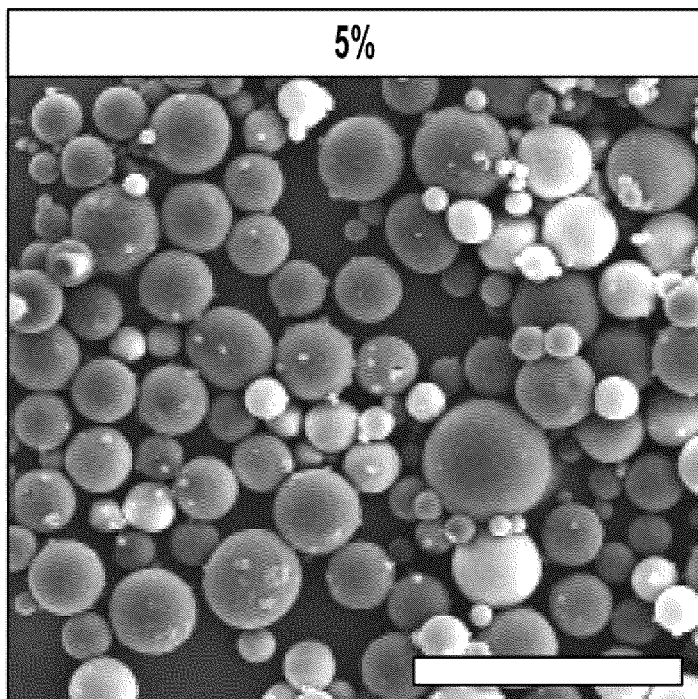
Фиг. 10В



Фиг. 11А



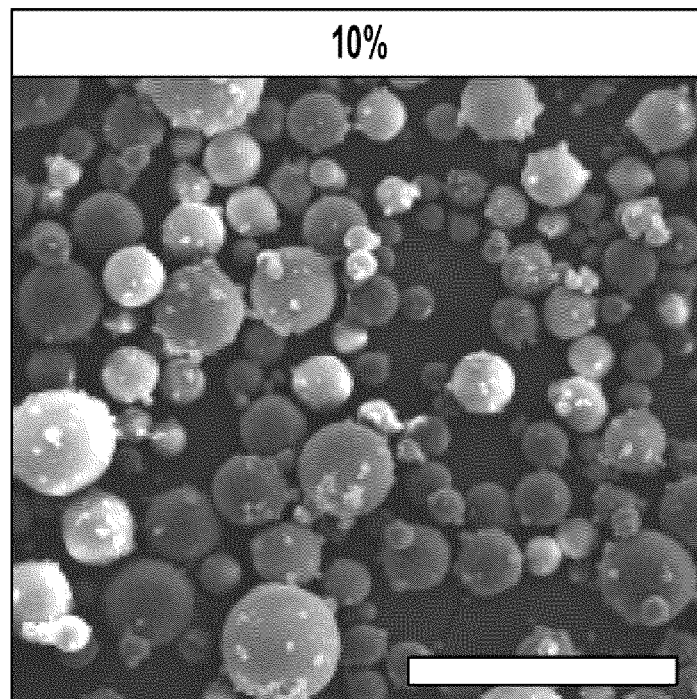
Фиг. 11В



5%

Масштаб: 100 мкм

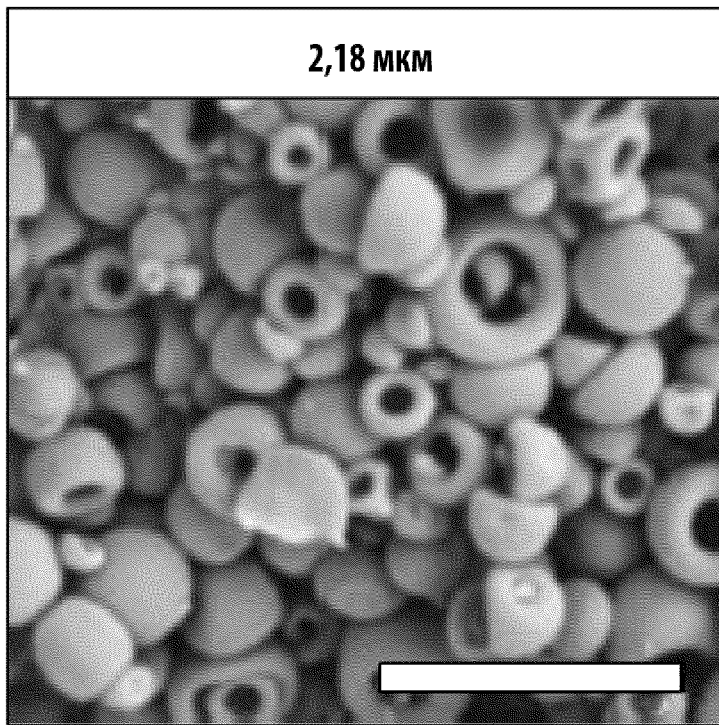
Фиг. 12А



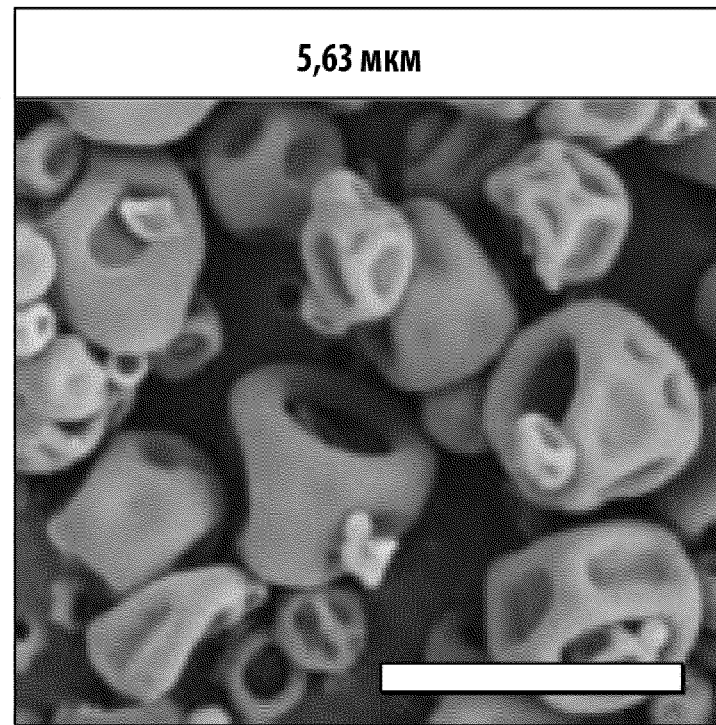
10%

Масштаб: 100 мкм

Фиг. 12В

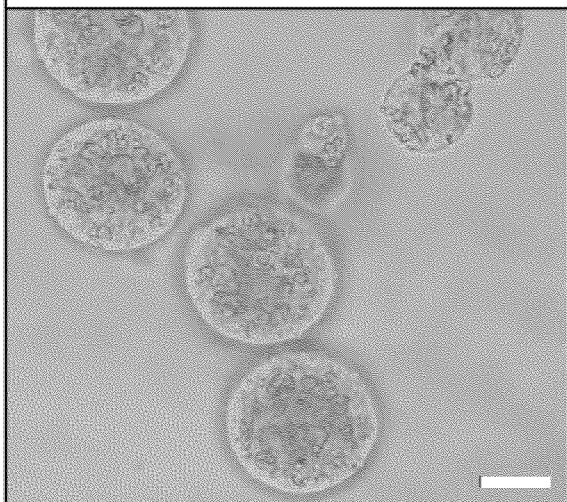


Фиг. 13А

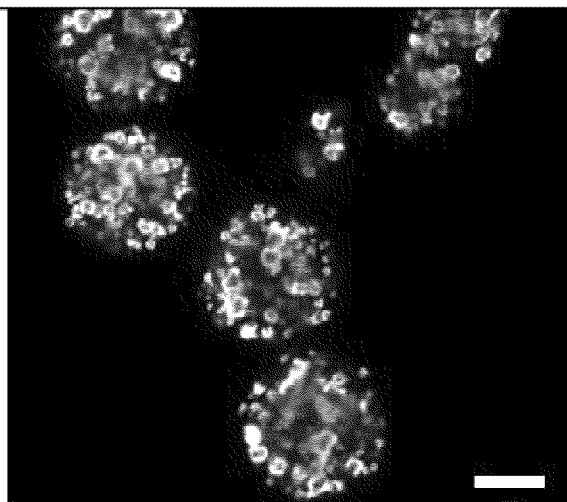


Фиг. 13В

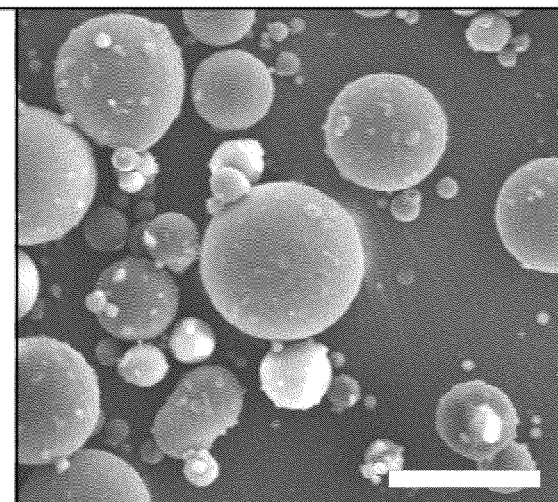
Белок-ловушка VEGF SDP, инкапсулированный в полилактид (PLA)



Фиг. 14А

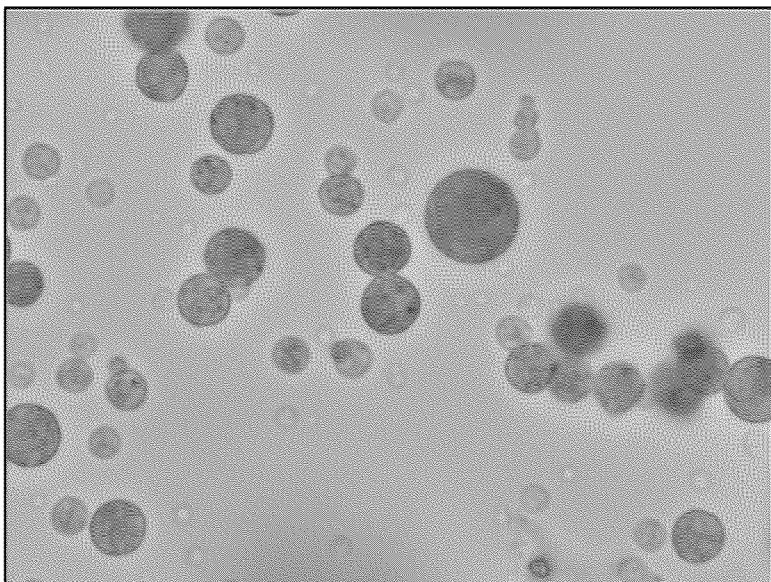


Фиг. 14В

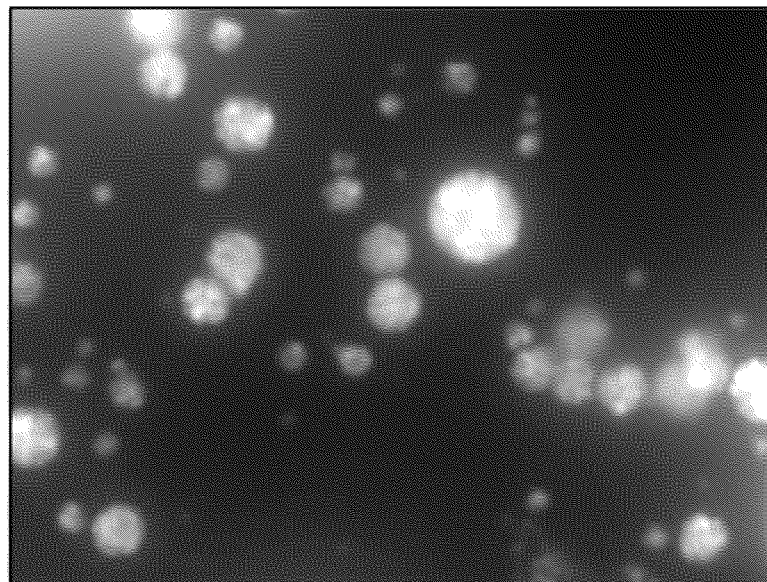


Фиг. 14С

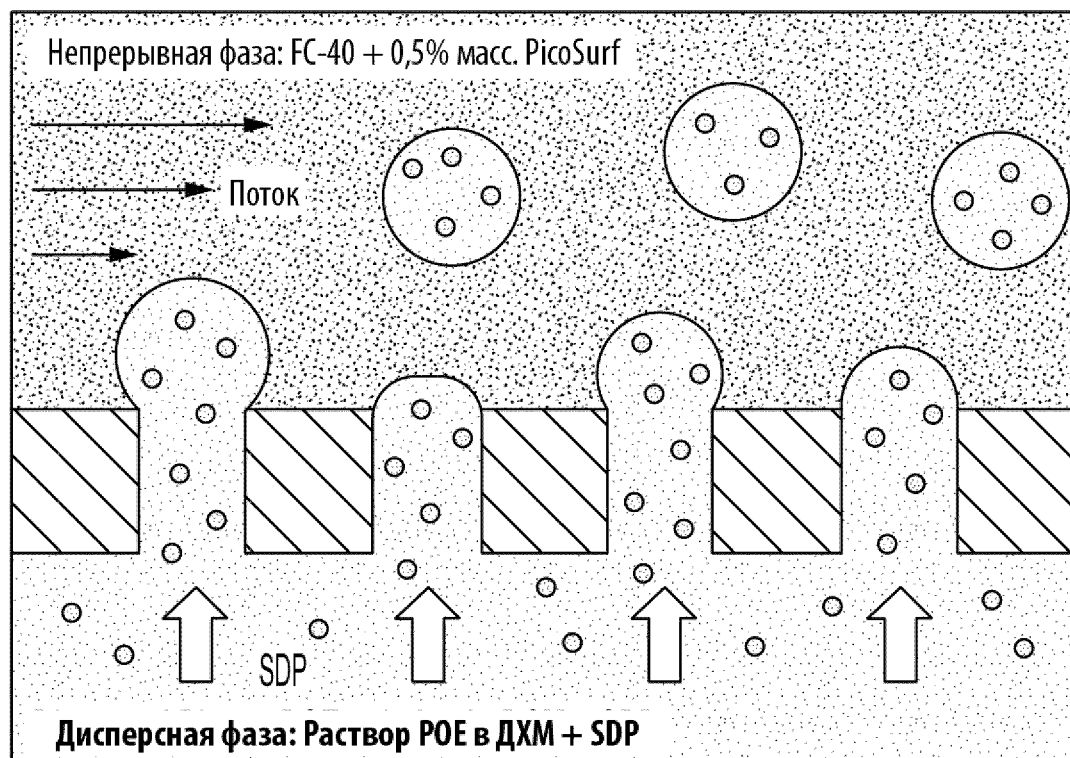
Масштаб: слева, посередине: 20 мкм / справа: 50 мкм



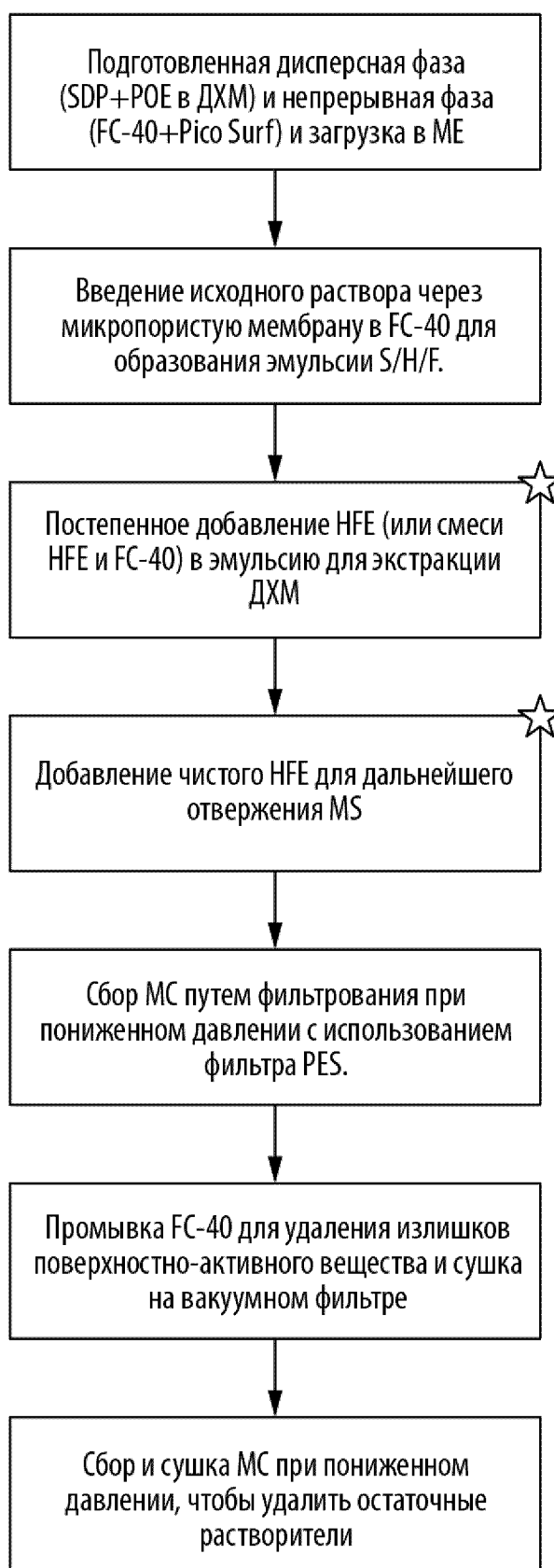
Фиг. 15А



Фиг. 15В

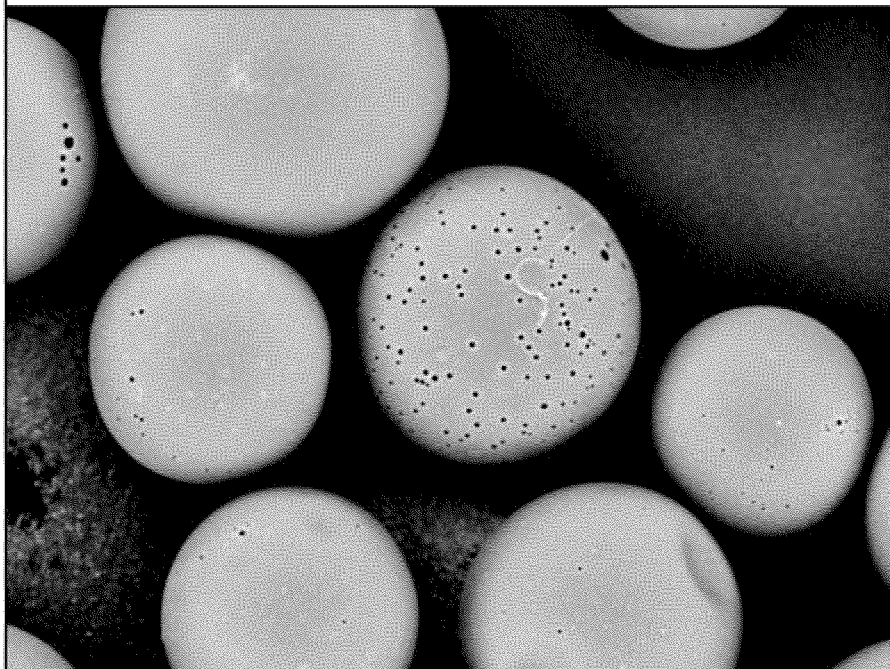


Фиг. 16



Фиг. 17

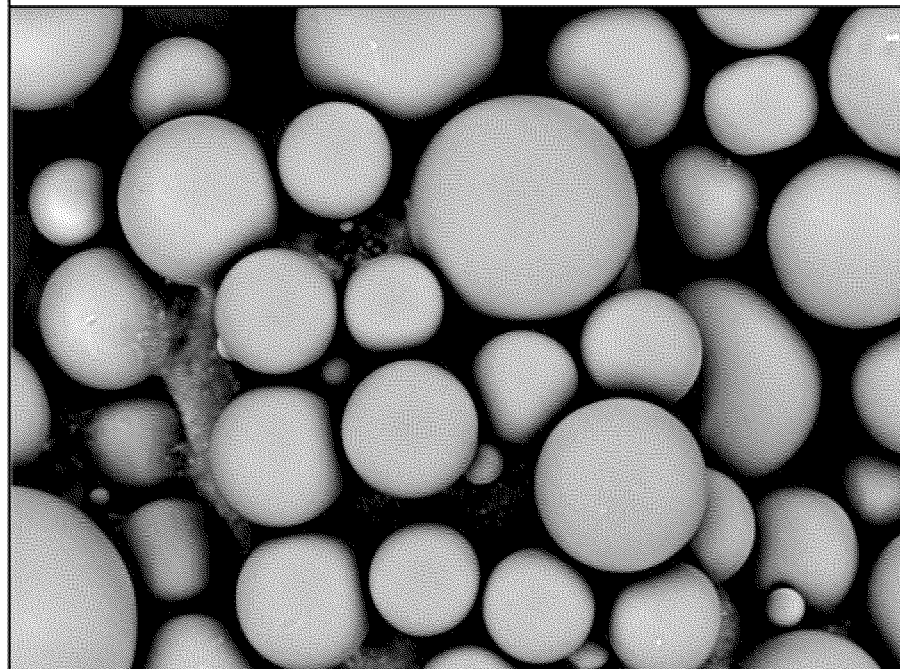
Партия 1: Водный способ, холостой



80 мкм

Увелич. FW HV Int. Det. WD Давл.
2050 x 256 мкм 10кВ Изобр. BSD Full 5,086мм 60Па

Партия 2: Водный способ, холостой

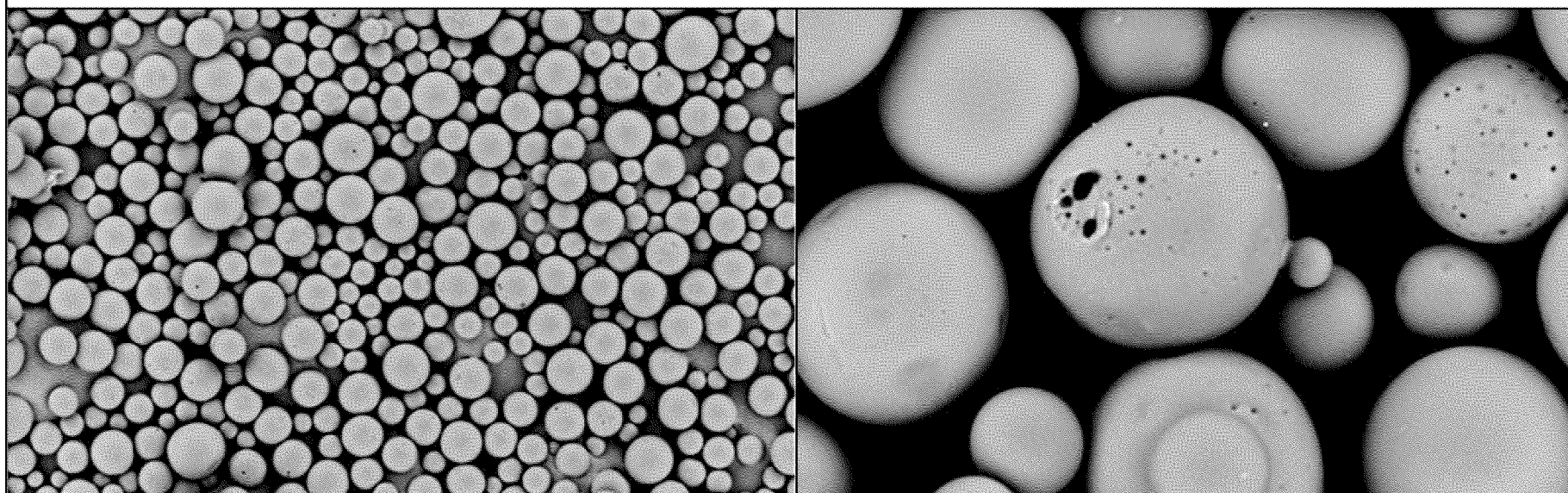


50 мкм

Увелич. FW HV Int. Det. WD Давл.
2600 x 200 мкм 10кВ Изобр. BSD Full 5,995мм 60Па

Фиг. 18

Партия 3: Водный способ, инкапсулированный



300 мкм

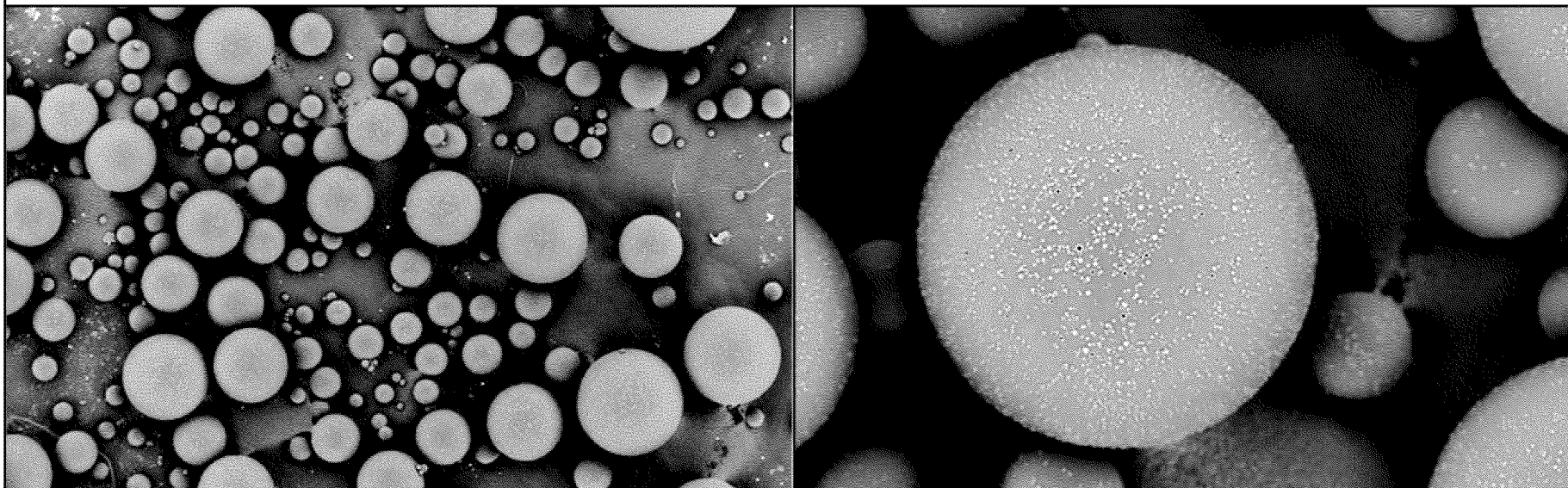
Увелич. FW HV Int. Det. WD Давл.
420x1,24 мкм 10кВ Изобр. BSD Full 5,123мм 60Па

50 мкм

Увелич. FW HV Int. Det. WD Давл.
2250x230 мкм 10кВ Изобр. BSD Full 5,123мм 60Па

Фиг. 19

Партия 4: Способ на неводной основе, инкапсулированный



300 мкм

Увелич. FW HV Int. Det. WD Давл.
420 x 1,24 мкм 10кВ Изобр. BSD Full 4,985мм 60Па

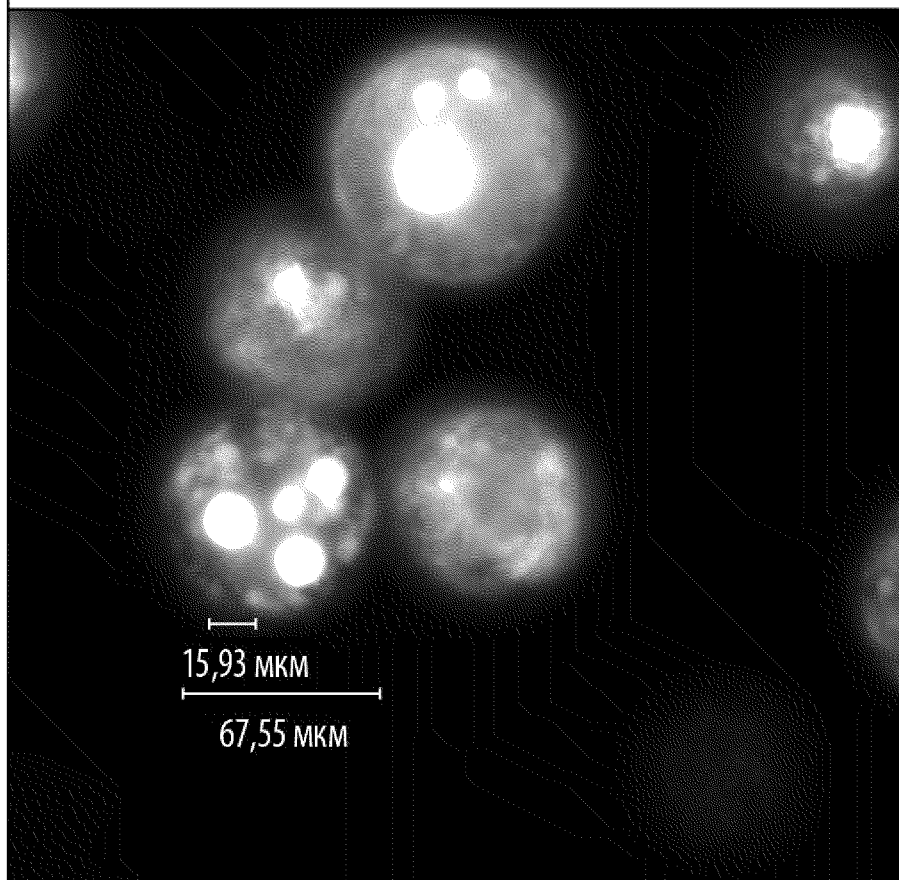
80 мкм

Увелич. FW HV Int. Det. WD Давл.
1650 x 315 мкм 10кВ Изобр. BSD Full 4,904мм 60Па

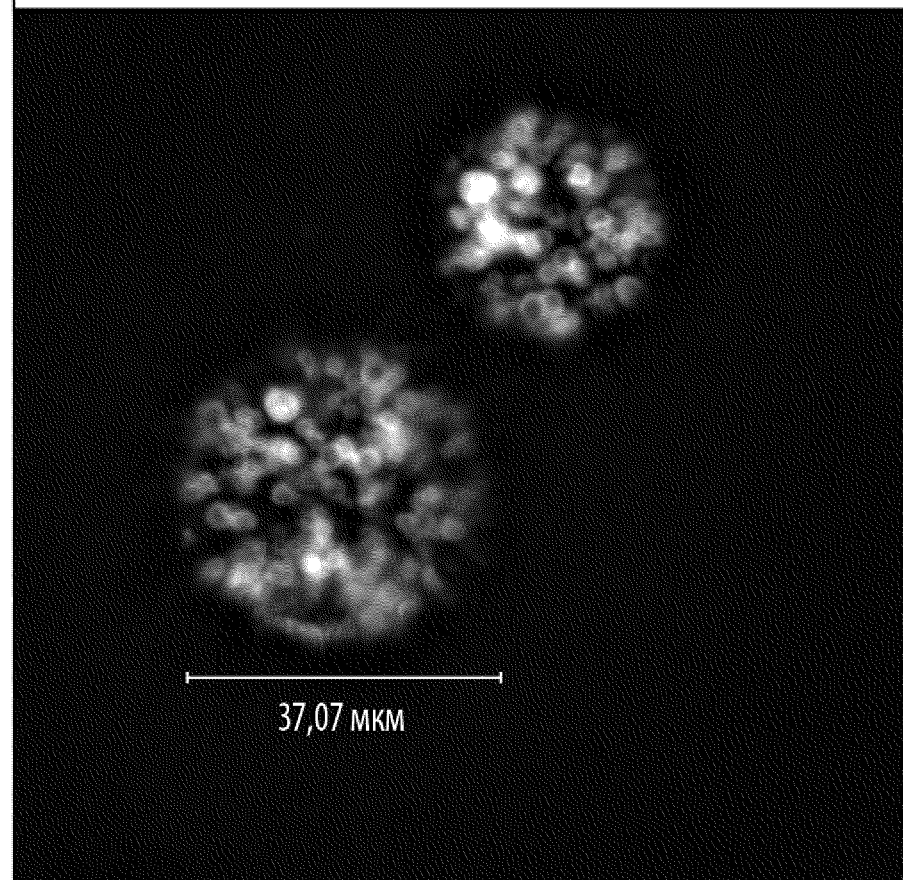
22/23

Фиг. 19
(продолж.)

Партия 3: Водный способ, инкапсулированный



Партия 4: Способ на неводной основе, инкапсулированный



23/23

Фиг. 20