

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391722** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.08.03

(51) Int. Cl. **A61K 9/16** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.16

(54) **ИЗГОТОВЛЕНИЕ БЕЛОК-ИНКАПСУЛИРУЮЩИХ МИКРОГЕЛЕЙ**

(31) **63/127,033**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.12.17**

Чен Хангер, Чжао Имин (US)

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/063890**

(74) Представитель:

(87) **WO 2022/133135 2022.06.23**

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) В данном изобретении предложены способы изготовления микрогелей, инкапсулирующих белок, с помощью использования эмульсий углеводорода во фторуглероде. Способы изготовления микрогеля на основе неводной эмульсии можно использовать для инкапсулирования широкого спектра белков и пептидов, включая антитела и слитые с антителами белки, для терапевтического применения с простым введением.



202391722

A1

A1

202391722

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578527EA/042

ИЗГОТОВЛЕНИЕ БЕЛОК-ИНКАПСУЛИРУЮЩИХ МИКРОГЕЛЕЙ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/127,033, поданной 17 декабря 2020 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] Данное изобретение в основном относится к микрогелям лекарственных препаратов, составам, содержащим микрогели лекарственных препаратов, и способам изготовления микрогелей лекарственных препаратов с использованием неводных эмульсионных систем.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Доставка терапевтического белка с пролонгированным или замедленным высвобождением к биологически релевантной мишени желательна для лечения медицинских состояний, таких как онкологическое заболевание, сердечно-сосудистые заболевания, сосудистые заболевания, ортопедические заболевания, стоматологические заболевания, раны, аутоиммунные заболевания, желудочно-кишечные заболевания и заболевания глаз, потому что она позволяет использовать большие дозы, которые требуют менее частого введения. Сокращение количества инъекций или увеличение интервала между инъекциями может быть желательным для соблюдения пациентом режима лечения, особенно когда инъекцию должен сделать врач, например, в случае применения внутриглазных терапевтических средств.

[4] Для контролируемой и устойчивой доставки лекарственных препаратов используют биосовместимые и биоразлагаемые полимеры и другие имплантируемые устройства доставки, включая, например, устройства доставки на основе полимеров, в которых полимер со временем разрушается, а терапевтический лекарственный препарат медленно высвобождается. Однако существуют различные проблемы в поддержании стабильности лекарственного препарата при использовании полимеров и устройств доставки на основе полимеров, особенно для доставки белковых терапевтических средств.

[5] Терапевтические макромолекулы, такие как антитела и слитые белки рецептор-Fc, должны быть приготовлены таким образом, чтобы не только сделать молекулы подходящими для введения пациентам, но и сохранить их стабильность при хранении и в месте введения. Например, терапевтические белки (такие как антитела или слитые белки) в водном растворе склонны к деградации, агрегации и/или нежелательным химическим модификациям, если раствор не приготовлен должным образом.

[6] При приготовлении терапевтического белка для замедленного высвобождения необходимо проявлять большую осторожность, чтобы получить состав, который остается стабильным во времени, при хранении и физиологической температуре, содержит адекватную концентрацию терапевтического белка (например, антитела) и обладает

другими свойствами, которые позволяют удобно вводить состав пациентам.

[7] Некоторые составы с пролонгированным или замедленным высвобождением производят с использованием технологий инкапсуляции, которые включают формирование множественных эмульсий, разделение диспергированной фазы, полимеризацию на границе раздела фаз, послойную адсорбцию полиэлектролитов и способы сборки на мягкой подложке. Например, наиболее распространенным типом множественных эмульсий является вода-в-масле-в-воде (В/М/В). Множественные эмульсии типа В/М/В позволяют инкапсулировать водные/гидрофильные ядра непосредственно в водной суспензии; однако существуют определенные проблемы при использовании для инкапсулирования биологически активных агентов в составы с пролонгированным или замедленным высвобождением. Например, осаждение белков может происходить на границе раздела водной и органической фазы с сопутствующим снижением иммунореактивности белков.

[8] В других 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 отверждения могут появиться пустоты и водные каналы там, где когда-то был белок, но вышел в водную среду.

[9] В другом примере микрочастицы гидрогеля (называемые в данном документе «микрогели») могут быть использованы для получения составов с пролонгированным или замедленным высвобождением терапевтических белков. Микрогели представляют собой микроструктуры, которые могут содержать сшитые гидрофильные полимерные сети, гидратированные большим количеством воды. Поперечные связи, соединяющие полимеры, могут быть образованы на основе ковалентной, ионной, аффинной и/или физической силы. Микрогели, в отличие от объемных гидрогелей, имплантация которых требует хирургического вмешательства, являются мягкими, деформируемыми и могут вводиться с помощью иглы или катетера, что менее инвазивно и может привести к лучшим терапевтическим результатам.

[10] Для изготовления микрогелей доступны несколько путей синтеза. Периодическая эмульсионная полимеризация или полимеризация осаждением в данное время являются наиболее распространенными способами, основанными на эмульсиях вода-в-масле или обращенных эмульсиях масло-в-воде. В этих способах наличие водной фазы ограничивает эффективность инкапсуляции гидрофильных полезных нагрузок.

[11] Хотя при изготовлении микрогелей доступно множество пар несмешивающихся растворителей, обычно выбирают один полярный и один неполярный растворитель. Однако найти пару, подходящую для синтеза полимерных микрогелей (иногда называемых в данном документе микросферами), может быть непросто, потому что типичные биоразлагаемые полимеры, включая, например, поли(лактид-со-гликолид) (PLGA), полимолочную кислоту (ПМК) или поли(ортоэфир) (ПОЭ) в основном растворимы в растворителях средней полярности, таких как хлороформ, дихлорметан или

этилацетат. Это ограничивает выбор дисперсионной фазы. Кроме того, совместимость с технологическим процессом, токсичность, безопасность и наличие остаточных растворителей являются проблемами при использовании этих органических растворителей, и должны рассматриваться для использования в качестве фармацевтического продукта.

[12] Другие способы изготовления, такие как литография, микрожидкостная полимеризация и электрораспыление, обычно используют в небольших лабораторных масштабах и могут столкнуться с проблемами при масштабировании в клинических или коммерческих производственных условиях. Различные типы эмульсионных систем, содержащих фторуглероды, были изготовлены с помощью микрофлюидных технологий, таких как эмульсия вода-во-фторуглероде (В/Ф), двойная эмульсия вода-во-фторуглероде-в-воде (В/Ф/В), тройная эмульсия типа вода/фторуглерод/масло/вода (В/Ф/М/В), двойная эмульсия типа фторуглерод/углеводород/вода (Ф/У/В) и двойная эмульсия типа углеводород/фторуглерод/вода (У/Ф/В). Некоторые из данных эмульсий были использованы для синтеза полимерных микросфер. Однако все они по-прежнему представляют собой эмульсионные системы на водной основе, использующие воду в качестве диспергированной или дисперсионной фазы.

[13] Таким образом, существует потребность в способах получения микрогелей с использованием неводных эмульсионных систем.

[14] При этом, существует неудовлетворенная потребность в усовершенствованных полимерах и устройствах для доставки на основе полимеров, которые предоставляют составы с пролонгированным или замедленным высвобождением для эффективной доставки лекарственных препаратов с течением времени с минимальным количеством инъекций. В случае других заболеваний, например онкологических и воспалительных заболеваний, существует потребность в улучшенных имплантируемых составах с пролонгированным или замедленным высвобождением, содержащих стабильные и эффективные белковые терапевтические средства.

[15] Следовательно, было бы желательно предложить неводные эмульсионные системы для получения лекарственных препаратов и способы их применения. Также было бы желательно предложить составы с пролонгированным высвобождением с улучшенной стабильностью белка, стабильным пролонгированным или замедленным высвобождением (длительным усвоением) и простым введением.

[16] Неводные эмульсии могут заменить обычные водные эмульсии, в случае, когда наличие воды нежелательно. Существует два типа неводных эмульсионных систем на основе углеводорода: (1) два несмешивающихся органических растворителя, стабилизированных блок-сополимерами (например, гексан/диметилформамид); и (2) не смешивающиеся с маслом полярные растворители (например, формамид, ацетонитрил), заменяющие воду с использованием существующих поверхностно-активных веществ. Эмульсии типа вода-в-перфторированном масле (В/Ф) применяли в микрогидродинамике на основе капель для биологических анализов отдельных клеток или одиночных молекул,

при этом ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ использовали в качестве фторсодержащего поверхностно-активного вещества (ВПАВ) для стабилизации капель воды во фторуглеродных растворителях.

[17] Соответственно, в некоторых вариантах реализации согласно данному изобретению фторуглероды используют в качестве дисперсионной фазы в неводной эмульсионной системе, поскольку они обладают несколькими желательными свойствами. Во-первых, фторуглероды не являются ни гидрофобными, ни гидрофильными: они не смешиваются с большинством органических (углеводородных) растворителей, что делает их идеальными в качестве дисперсионной фазы для углеводородных капельных эмульсий. Во-вторых, фторуглероды не растворяют белки и другие гидрофильные молекулы, полимеры на углеводородной основе и органические эксципиенты; другими словами, эти типы молекул не будут растворяться во фторуглероде. В-третьих, фторуглероды имеют низкую вязкость. В-четвертых, фторуглероды химически инертны и могут быть относительно менее токсичными или коррозионно-активными по сравнению с обычно используемыми углеводородными растворителями. Наконец, фторуглероды летучи и пригодны для переработки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[18] Разработан способ получения микрогелей с использованием неводных эмульсионных систем. Способ включает объединение по меньшей мере одного биоразлагаемого и/или биоразрушаемого сшиваемого полимера и по меньшей мере одного модулятора образования поперечных связей с углеводородным растворителем с образованием неводного первого раствора или суспензии диспергированной фазы. Первый раствор или суспензию диспергированной фазы добавляют ко второму раствору или раствору дисперсионной фазы, содержащему фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество. Смесь растворов эмульгируют с помощью способа эмульгирования. Путем удаления сначала углеводородного растворителя, а затем фторуглеродной жидкости можно восстановить порошок частиц микрогеля. Путем суспендирования порошка, содержащего терапевтически активный агент, например, терапевтический белок, в суспензии диспергированной фазы можно получить микрочастицы терапевтического или лекарственного препарата с замедленным или пролонгированным высвобождением.

[19] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы лекарственного препарата, предложенные согласно данному изобретению, содержат активный ингредиент (такой как, например, белок), окруженный внешним слоем микрогеля из сшитого полимера. Микрочастицы лекарственного препарата, полученные описанными способами, могут иметь внешний слой микрогеля из сшитого полимера, лишенный пор или каналов и не перфорированный. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы лекарственного препарата могут иметь диаметр от около 1 мкм до около 200 мкм.

[20] Микрочастицы лекарственного препарата получают согласно данному

изобретению путем использования неводных эмульсионных систем путем объединения активного ингредиента (например, сухого белкового порошка), одного или более биоразлагаемых и/или биоразрушаемых сшиваемых полимеров или предшественников полимеров, и модулятора образования поперечных связей в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора или суспензии диспергированной фазы, и добавления первого раствора или суспензии диспергированной фазы ко второму раствору или раствору дисперсионной фазы, содержащему фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество. Смесь растворов эмульгируют с помощью способа эмульгирования. Путем удаления сначала углеводородного растворителя, а затем фторуглеродной жидкости можно восстановить микрочастицы лекарственного препарата.

[21] Составы, содержащие микрочастицы лекарственного препарата, также предложены согласно данному изобретению.

[22] В конкретных аспектах данное изобретение относится к способу получения микрочастиц, включающему этапы объединения активного ингредиента (например, сухого белкового порошка) и одного или более предшественников сшиваемого полимера с углеводородным растворителем с образованием неводного первого раствора.

[23] Способ дополнительно включает добавление первого раствора ко второму раствору, при этом второй раствор содержит фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество. Способ дополнительно включает перемешивание объединенных первого и второго растворов с образованием неводной эмульсии, имеющей множество капель эмульсионного углеводорода во фторуглеродной жидкости. Способ дополнительно включает удаление углеводородного растворителя и удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрогелей, при этом микрогели содержат активный ингредиент, инкапсулированный в матрицу сшитого полимера.

[24] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения второй раствор может содержать перфторсодержащее соединение C5-C18. В других вариантах реализации данного изобретения второй раствор может содержать FC-70. Активный ингредиент (например, сухой белковый порошок) и один или более предшественников сшиваемого полимера могут быть объединены с углеводородным растворителем, выбранным из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации. В других вариантах реализации данного изобретения активный ингредиент и один или более предшественников сшиваемого полимера объединяют с углеводородным растворителем, выбранным из дихлорметана, этилацетата или их комбинации.

[25] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения этап добавления первого раствора ко второму раствору включает добавление первого раствора ко второму раствору, содержащему перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир.

[26] В других вариантах реализации данного изобретения один или более предшественников сшиваемого полимера в сочетании с углеводородным растворителем

включают ядро, выбранное из полиэтиленгликоля, полиэтиленоксида, сополимера полиэтиленоксида с полипропиленоксидом, блок-сополимеров или статистических сополимеров полиэтиленоксида, поливинилового спирта, поли(винилпирролидинона), поли(аминокислот), декстрана или любой их комбинации.

[27] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения один или более предшественников сшиваемого полимера в сочетании с углеводородным растворителем включают первый предшественник сшиваемого полимера, содержащий нуклеофильные функциональные группы, и второй предшественник сшиваемого полимера, содержащий электрофильные функциональные группы. Один или более предшественников сшиваемого полимера в сочетании с углеводородным растворителем могут включать первый предшественник ПЭГ-NH и второй предшественник ПЭГ-NHS. По меньшей мере один из первого предшественника ПЭГ-NH или второго предшественника ПЭГ-NHS в сочетании с углеводородным растворителем может представлять собой одно из 4- или 8-цепочечных соединений.

[28] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения порошок, содержащий активное вещество, в сочетании с углеводородным растворителем представляет собой белковый порошок. Белковый порошок в сочетании с углеводородным растворителем может содержать антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок, рекомбинантный белок или его фрагмент, или усеченную версию. В других вариантах реализации данного изобретения белковый порошок в сочетании с углеводородным растворителем содержит белок-ловушку для VEGF. Белок-ловушка для VEGF в сочетании с углеводородным растворителем может представлять собой усеченную форму белка-ловушки VEGF. В других вариантах реализации данного изобретения белковый порошок в сочетании с углеводородным растворителем, может быть микронизирован путем использования высушивания распылением, высушивания электрораспылением, обратимого осаждения, замораживания орошением, сборки на микроподложке или их комбинации.

[29] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения этап смешивания объединенных первого и второго растворов может включать гомогенизацию, перемешивание на вортексе, воздействие ультразвуком, кавитацию, перемешивание или их комбинацию. Выделенные микрочастицы могут представлять собой микрочастицами с замедленным высвобождением. Первый образованный неводный раствор может содержать от 1,0% до 30% масс./об. высушенного распылением белка, суспендированного в углеводородном растворителе, и от 5,0% до 35% масс./об. одного или более предшественников сшиваемого полимера. Второй раствор, к которому добавляют первый неводный раствор, может содержать от 0,1% до 5,0% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества.

[30] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ может дополнительно включать этап суспендирования микрочастиц в фармацевтически приемлемом эксципиенте. Микрочастицы могут быть суспендированы в рН-буферном

растворе.

[31] В другом варианте реализации данного изобретения данное изобретение относится к способу получения полимерных микросфер или микросфер с полимерным покрытием, включающему этапы объединения диспергированной фазы, содержащей от 1,0% до 30,0% масс./масс. всего высушенного распылением твердого белка, суспендированного в первом неводном углеводородном растворе, при этом первый неводный углеводородный раствор содержит от 5,0% до 35% масс./об. ПЭГ-НН и от 1,0% до 15% масс./об. ПЭГ-НН, в дисперсионную фазу с образованием капель эмульсии диспергированной фазы. Дисперсионная фаза может содержать второй неводный раствор фторуглерода, содержащий от 0,1% до 5,0% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества. Способ дополнительно включает этап отверждения капель эмульсии путем удаления углеводородных жидкостей с образованием отвержденного полимера или покрытых полимером микросфер.

[32] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ получения микрочастиц гидрогеля согласно данному изобретению включает (а) объединение по меньшей мере одного сшиваемого полимера, по меньшей мере одного модулятора образования поперечных связей и порошка, содержащего по меньшей мере один белок, с углеводородным растворителем для образования суспензии диспергированной фазы; (b) добавление указанной суспензии диспергированной фазы к раствору дисперсионной фазы, при этом указанный раствор содержит жидкий фторуглерод и фторсодержащее поверхностно-активное вещество, с образованием объединенной суспензии диспергированной фазы и раствора дисперсионной фазы; (с) смешивание указанной объединенной суспензии диспергированной фазы и раствора дисперсионной фазы с образованием неводной эмульсии, содержащей множество капель углеводорода, включающей указанный по меньшей мере один сшиваемый полимер и указанный порошок, дополнительно содержащий по меньшей мере один белок во фторуглеродной жидкости; и (d) удаление углеводородного растворителя и фторуглеродной жидкости из указанной неводной эмульсии с образованием выделенных микрочастиц гидрогеля, при этом указанные микрочастицы гидрогеля содержат по меньшей мере один указанный белок, инкапсулированный в матрицу указанного сшитого полимера.

[33] В одном аспекте по меньшей мере один модулятор образования поперечных связей представляет собой нефункционализированный линейный полимер ПЭГ. В другом аспекте концентрация по меньшей мере одного модулятора образования поперечных связей в диспергированной фазе составляет от около 5,0% до около 35% масс./об.

[34] В одном аспекте фторуглеродная жидкость представляет собой фторуглерод с высокой вязкостью. В другом аспекте раствор с дисперсионной фазой содержит перфторсодержащее соединение C5-C18. В еще одном аспекте раствор с дисперсионной фазой содержит FC-70 или перфтортрипентиламин.

[35] В одном аспекте углеводородный растворитель выбирают из группы,

состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана и их комбинации. В другом аспекте раствор дисперсионной фазы содержит перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир.

[36] В одном аспекте по меньшей мере один сшиваемый полимер содержит ядро, выбранное из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полиэтиленоксида, сополимера полиэтиленоксида и полипропиленоксида, блок-сополимеров или статистических сополимеров полиэтиленоксида, поливинилового спирта, поли(винилпирролидинона), поли(аминокислот), декстрана и любой их комбинации.

[37] В одном аспекте по меньшей мере один сшиваемый полимер включает первый сшиваемый полимер, содержащий по меньшей мере одну нуклеофильную функциональную группу, и второй сшиваемый полимер, содержащий по меньшей мере одну электрофильную функциональную группу. В конкретном аспекте молярное соотношение по меньшей мере одной нуклеофильной функциональной группы к по меньшей мере одной электрофильной функциональной группе составляет от около 1:1 до около 1:2. В другом конкретном аспекте по меньшей мере один сшиваемый полимер содержит первый предшественник ПЭГ-NH и второй предшественник ПЭГ-NHS. В еще одном конкретном аспекте первый предшественник ПЭГ-NH или второй предшественник ПЭГ-NHS представляет собой 4- или 8-цепочечное соединение.

[38] В одном аспекте по меньшей мере один белок представляет собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок, рекомбинантный белок или его фрагмент, или усеченную версию. В конкретном аспекте по меньшей мере один белок представляет собой белок-ловушку для VEGF. В еще одном конкретном аспекте белок-ловушка для VEGF представляет собой усеченную форму белка-ловушки для VEGF.

[39] В одном аспекте по меньшей мере один белок выбран из группы, состоящей из афлиберцепта, рилонацепта, алирокумаба, дупилумаба, сарилумаба, цемиплимаба, антител против лихорадки Эбола и антител против SARS-CoV-2.

[40] В одном аспекте выделенные микрочастицы гидрогеля имеют диаметр от около 1 мкм до около 200 мкм. В другом аспекте порошок микронизируют с помощью использования высушивания распылением, высушивания электрораспылением, обратимого осаждения, замораживания орошением, сборки на микроподложке или их комбинации. В дополнительном аспекте смешивание включает гомогенизацию, перемешивание на вортексе, воздействие ультразвуком, кавитацию, перемешивание или их комбинацию.

[41] В одном аспекте микрочастицы гидрогеля представляют собой микрочастицы с замедленным высвобождением.

[42] В одном аспекте концентрация порошка в суспензии диспергированной фазы составляет от около 1,0% до около 30% масс./об. В другом аспекте концентрация по меньшей мере одного сшиваемого полимера в суспензии диспергированной фазы составляет от около 5,0% до около 35% масс./об. В еще одном аспекте концентрация фторсодержащего поверхностно-активного вещества в растворе дисперсионной фазы

составляет от около 0,1% до около 5,0% масс./об.

[43] В одном аспекте способ дополнительно включает суспендирование выделенных микрочастиц гидрогеля в фармацевтически приемлемом составе. В другом аспекте состав содержит рН-буференный раствор, водный раствор или неводный раствор.

[44] В одном аспекте порошок дополнительно содержит по меньшей мере один эксципиент.

[45] В данном раскрытии также предложена микрочастица гидрогеля. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы гидрогеля получают любым из вышеупомянутых способов.

[46] Эти и другие аспекты данного изобретения можно будет лучше оценить и понять при рассмотрении в сочетании с приведенным далее описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты реализации данного изобретения и их многочисленные конкретные детали, приведено в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перегруппировки могут быть выполнены в пределах объема данного изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[47] Более полное понимание раскрытых в данном случае концепций и иллюстративных вариантов реализации данного изобретения может быть достигнуто путем обращения к последующему описанию в сочетании с прилагаемыми графическими материалами.

[48] На Фиг. 1А представлен способ получения чистых микрогелей сшитого ПЭГ с помощью (неводной) объемной эмульсии на основе углеводорода во фторуглероде (У/Ф) согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[49] На Фиг. 1В изображена химическая структура Fluorinert™ FC-70 (Millipore Sigma) (перфтортрипентиламин) согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[50] На Фиг. 1С изображена химическая структура фторсодержащего поверхностно-активного вещества ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ (Sphere Fluidics, Pico-Surf™ 1), трехблочного сополимера перфторполиэфир/поли(этиленгликоль) согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[51] На Фиг. 2 представлена схема синтеза чистого микрогеля сшитого ПЭГ согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[52] На Фиг. 3 представлен процесс получения микрочастиц лекарственного препарата, содержащих высушенный распылением белок (ВРБ), инкапсулированный в микрогель сшитого ПЭГ согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[53] На Фиг. 4А представлено изображение светлупольной микроскопии белка-ловушка для VEGF, инкапсулированного микрогелями сшитого ПЭГ согласно

иллюстративному варианту реализации данного изобретения, суспендированными в ФС-70.

[54] На Фиг. 4В представлено изображение люминесцентной микроскопии белка-ловушка для VEGF, инкапсулированного микрогелями сшитого ПЭГ согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения, суспендированными в ФС-70.

[55] На Фиг. 5А представлено изображение светлопольной микроскопии белка-ловушка для VEGF, инкапсулированного микрогелями сшитого ПЭГ согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения, суспендированными в ФС-70.

[56] На Фиг. 5В представлено изображение люминесцентной микроскопии белка-ловушка для VEGF, инкапсулированного микрогелями сшитого ПЭГ согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения, суспендированными в ФС-70.

[57] На Фиг. 6А представлено изображение светлопольной микроскопии белка-ловушка для VEGF, инкапсулированного микрогелями сшитого ПЭГ согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения, суспендированными в воде.

[58] На Фиг. 6В представлено изображение люминесцентной микроскопии белка-ловушка для VEGF, инкапсулированного микрогелями сшитого ПЭГ согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения, суспендированными в воде.

[59] На Фиг. 7 представлено изображение люминесцентной микроскопии белка-ловушка для VEGF, инкапсулированного микрогелями сшитого ПЭГ согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения, суспендированными в воде.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[60] Следует понимать, что данное раскрытие не ограничивается материалами, композициями и способами, описанными в данном документе, или описанными экспериментальными условиями, поскольку такие материалы, композиции, способы и/или условия могут варьироваться. Следует также понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания некоторых вариантов реализации данного изобретения и не предназначена для ограничения.

[61] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, которое обычно понимается специалистом обычной квалификации в области техники, к которой относится данное изобретение. Любые композиции, способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при исследовании различных аспектов вариантов реализации данного изобретения, описанных в данном документе.

[62] Использование терминов в единственном числе и подобных ссылок в контексте описания различных аспектов вариантов реализации данного изобретения, представленных в данном документе (особенно в контексте следующей формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и

множественное число, если только иное не указано в данном документе или явно не противоречит контексту.

[63] Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для использования в качестве сокращенного способа индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если иное не указано в данном документе, и каждое отдельное значение включено в описание изобретения, как если бы оно было отдельно изложено в данном документе.

[64] Термин «около» предназначен для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне приблизительно +/- 10%; в других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне приблизительно +/- 5%; в других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне приблизительно +/- 2%; в других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне приблизительно +/- 1%. Предыдущие диапазоны предназначены для разъяснения контекста, и никаких дополнительных ограничений не подразумевают.

[65] Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или иллюстративного языка (например, «такой как»), предложенных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения различных аспектов реализации данного изобретения, описанных в данном документе, и не налагает ограничения на объем раскрытия изобретения, если в формуле изобретения не указано иное. Никакие формулировки в данном описании изобретения не должны толковаться как указывающие на какие-либо не заявленные элементы как существенные для применения на практике различных аспектов вариантов реализации данного изобретения, описанных в данном документе.

[66] Термин «белок» относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды, а также может содержать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные препараты на основе белков, а белки включают, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки могут быть получены с помощью различных типов рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток, и, как правило, могут быть введены в клетку с помощью технологий геной инженерии (например, последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, последовательность без интронов и т. д.), в которой они могут находиться в виде эписомы или

интегрироваться в геном клетки.

[67] Термин «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), со вставками более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца 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, например антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими разными эпитопами. Биспецифические антитела в целом описаны в патенте США № 8,586,713, который включен в данную заявку посредством ссылки.

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

[69] Термин «микронизированная белковая частица» или «белковая частица»

относится к частице, содержащей несколько молекул белка с низким, очень низким или близким к нулю количеством воды (например, <3% воды по массе). Используемый в контексте данного документа микронизированная белковая частица обычно имеет сферическую форму и эквивалентный диаметр окружности (ECD) в диапазоне от около 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, фрагменты растворимого рецептора, антитела (включая IgG) и производные или фрагменты антител, другие Fc-содержащие белки, включая Fc-слитые белки, и слитые белки рецептор-Fc, включая белки типа ловушки (Huang, C., *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 692-99 (2009)), такие как, например, ловушка для VEGF.

[70] Термин «микрочастицы гидрогеля» (микрогели) относится к микроструктурам, содержащим гидрофильные полимерные сетки. Сеть полимеров связана поперечными связями, которые могут иметь ковалентную, ионную, аффинную или физическую основу. Микрогели стали потенциальным средством доставки для контролируемого высвобождения терапевтических белков. По сравнению с объемными гидрогелями, для имплантации которых требуется хирургическое вмешательство, мягкие, деформируемые микрогели можно вводить пациенту с помощью иглы или катетера, что менее инвазивно и может привести к лучшим терапевтическим результатам. Используя процессы изготовления, описанные в настоящем документе, микронизированные белковые частицы (то есть микронизированная форма белкового порошка, например, высушенный распылением порошок белка-ловушки для VEGF) можно суспендировать в углеводородном растворе, содержащем сшиваемые полимеры. Сшиваемые полимеры, которые подвергают химической реакции сшивания, также могут называться предшественниками полимеров. После добавления сшивающего агента суспензия (также называемая в данном документе первым раствором или суспензией диспергированной фазы) может быть немедленно добавлена во фторуглеродную диспергирующую фазу, содержащую фторсодержащее поверхностно-активное вещество. Углеводородная фаза быстро диспергируется с помощью способа эмульгирования. Поскольку фторуглеродная дисперсионная фаза удерживает сшиваемые полимеры и высушенный распылением белковый порошок внутри капель углеводорода, полимеры в каплях эмульсии сшиваются и затем затвердевают в отдельные микрогели.

Получение микрочастиц гидрогеля с использованием углеводородно-фторуглеродных эмульсий

[71] Эмульсионные системы на масляной и водной основе часто используются для синтеза полимерных микрочастиц или наночастиц, при этом гидрофобные полимерные материалы растворяются в органической фазе и диспергируются в дисперсионной водной фазе. Однако для водорастворимых полимеров, например ПЭГ или карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), и полимеров, которые легко гидролизуются в

присутствии воды, например, полиангидридов, алифатических сложных полиэфигов с короткими средними блоками, таких как полимолочная кислота, и некоторых поли(аминокислот), таких как поли(глутаминовая кислота), обычные эмульсионные системы на водной основе не идеальны. В дополнение к нежелательному эффекту растворения водорастворимого полимера в дисперсионной водной фазе, функционализированный сшиваемый полимер, такой как ПЭГ-NHS, может вступать в реакцию с водой, в результате чего кинетика реакции образования поперечных связей становится очень неблагоприятной для образования микрогелей.

[72] Кроме того, фармацевтические составы, полученные с использованием водных эмульсионных систем, могут пропускать лекарственный препарат, например белковый лекарственный препарат, из капель эмульсии в дисперсионную водную фазу во время получения составов. Данная потеря лекарственного препарата из капель эмульсии приводит к низкой эффективности инкапсуляции. Водорастворимые лекарственные препараты, такие как белковые лекарственные препараты, могут растворяться в дисперсионной водной фазе, исключая постепенное пролонгированное высвобождение лекарственного препарата из микрогелей.

[73] Предложены системы и способы приготовления фармацевтических композиций с использованием безводных или неводных эмульсионных систем. Описанные безводные эмульсионные способы преодолевают описанные выше проблемы с существующими водными эмульсионными системами.

[74] Описанные в данном документе способы с использованием неводной эмульсии позволяют инкапсулировать молекулы лекарственного препарата, включая, но не ограничиваясь, гидрофильные лекарственные препараты, такие как белки, с повышенной эффективностью инкапсуляции по сравнению с водными эмульсионными системами, повышенным сохранением исходной структуры белковых частиц или их комбинацией. Описанные безводные эмульсионные системы и способы могут позволить получить инкапсулированные лекарственные составы с помощью объемных способов (например, перемешивания, гомогенизации или воздействия ультразвуком) и других обычных способов. Системы и способы, описанные в данном документе, также могут быть применены к широкому диапазону полимерных материалов, твердотельных полезных нагрузок и способов эмульгирования.

Эмульсии твердого вещества-в-углеводороде-во-фторуглероде (ТВ/У/Ф)

[75] Иллюстративный способ неводной эмульсии типа ТВ/У/Ф включает этапы объединения сухого белкового порошка, одного или более биоразлагаемых и/или биоразрушаемых сшиваемых полимеров или полимерных предшественников и одного или более модуляторов образования поперечных связей в углеводородном растворителе для образование неводного первого раствора или суспензии диспергированной фазы и добавление первого раствора или суспензии диспергированной фазы ко второму раствору или раствору дисперсионной фазы, содержащему фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество. Объединение первого раствора или

суспензии диспергированной фазы и второго раствора или раствора дисперсионной фазы осуществляется таким образом, чтобы образовать неводную эмульсию, содержащую несколько капель эмульсии углеводов во фторуглеродной жидкости, например, путем смешивания, такого как перемешивание, воздействие ультразвуком, кавитация, гомогенизация или перемешивание на вортексе.

[76] Способ по данному изобретению дополнительно включает удаление углеводородного растворителя и удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц гидрогеля, имеющих одно или более ядер из микронизированного белка и внешний слой из сшитого биоразлагаемого полимера.

[77] В некоторых вариантах реализации данного изобретения эмульсию перемешивают, а углеводородные и фторуглеродные жидкости выпаривают в условиях окружающей среды или под воздействием вакуума. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения гидрофторэфир (ГФЭ) может быть добавлен к фторуглероду, чтобы способствовать извлечению углеводорода из диспергированной фазы во фторуглеродную дисперсионную фазу. Полученные микрочастицы можно необязательно промыть для удаления углеводородного растворителя, фторуглеродной жидкости, фторсодержащего поверхностно-активного вещества или их комбинации. Эмульсия может быть образована с использованием технологии объемной эмульсии. Удаление углеводородных и фторуглеродных жидкостей делает микрочастицы твердыми, и затем их можно собрать.

[78] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы могут быть собраны путем фильтрации. Микрочастицы с замедленным высвобождением, полученные с помощью данных способов получения неводной эмульсии, содержат белок, инкапсулированный в матрицу сшитого биоразлагаемого и/или биоразрушаемого полимера. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы имеют структуру с одним ядром и внешним слоем. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы имеют несколько ядер, диспергированных в полимере.

[79] В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения совокупность микрочастиц включает как микрочастицы, имеющие одноядерную структуру, инкапсулированную в полимерный внешний слой, так и микрочастицы, имеющие многоядерные структуры в полимерном внешнем слое. Фторуглеродная жидкость может представлять собой фторуглерод с высокой вязкостью, такой как перфторсодержащее соединение C5-C18, включая, но не ограничиваясь, FC-40 или FC-70 (перфтортрипентиламин), а углеводородный раствор может включать углеводородный растворитель, выбранный из этилацетата, хлороформа, толуола, тетрагидрофурана и дихлорметана или их комбинации. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фторсодержащее поверхностно-активное вещество представляет собой перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир, коммерчески доступный как Pico-SurfTM 1.

[80] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения концентрация фторсодержащего поверхностно-активного вещества в растворе дисперсионной фазы может составлять от около 0,1% до около 10% масс./об., от около 0,1% до около 5% масс./об., от около 1% до около 10% масс./об., от около 1% до около 5% масс./об., около 0,1% масс./об., около 0,2% масс./об., около 0,3% масс./об., около 0,4% масс./об., около 0,5% масс./об., около 0,6% масс./об., около 0,7% масс./об., около 0,8% масс./об., около 0,9% масс./об., около 1% масс./об., около 1,5% масс./об., около 2% масс./об., около 2,5% масс./об., около 3% масс./об., около 3,5% масс./об., около 4% масс./об., около 4,5% масс./об., около 5% масс./об. или около 10% масс./об.

Сшиваемые полимеры и предшественники полимеров

[81] Предшественники, подходящие для получения сшитого полимерного внешнего слоя микрочастиц гидрогеля по данному изобретению, обычно являются полифункциональными, что означает, что они содержат две или более электрофильных или нуклеофильных функциональных групп, так что нуклеофильная функциональная группа на одном предшественнике может реагировать с электрофильной функциональной группой на другом предшественнике для образования ковалентной связи. Предшественники могут содержать более двух функциональных групп, так что в результате электрофильно-нуклеофильных реакций предшественники объединяются с образованием сшитых полимерных продуктов. Такие реакции называются «реакциями сшивания». В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения может использоваться более одного предшественника, при этом первый предшественник представляет собой предшественник полимера (содержащий, например, электрофильные группы), а второй предшественник представляет собой низкомолекулярное соединение (содержащее, например, нуклеофильные группы). Следует понимать, что можно использовать один, два, три, четыре или более различных предшественников в зависимости от желаемых характеристик внешнего слоя, при условии, что по меньшей мере один из предшественников является полимерным.

[82] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения каждый предшественник содержит только нуклеофильные или только электрофильные функциональные группы при условии, что в реакции сшивания используются как нуклеофильные, так и электрофильные предшественники. Так, например, если сшивающий агент (имеющий относительно низкую молекулярную массу) имеет нуклеофильные функциональные группы, такие как амины, функциональный полимер (имеющий относительно высокую молекулярную массу) может иметь электрофильные функциональные группы, такие как N-гидроксисукцинимиды. С другой стороны, если сшивающий агент имеет электрофильные функциональные группы, такие как сульфосукцинимиды, то функциональный полимер может иметь нуклеофильные функциональные группы, такие как амины. Таким образом, можно использовать функциональные полимеры, такие как белки, поли(аллиламин) или ди- или полифункциональный полиэтиленгликоль с концевыми аминогруппами («ПЭГ»).

[83] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения количество нуклеофильных групп в первом предшественнике может составлять около 2-30, около 2-25, около 2-20, около 2-15, около 2-10, около 5-30, около 5-20, около 5-15, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29 или около 30.

[84] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения количество электрофильных групп во втором предшественнике может составлять около 2-30, около 2-25, около 2-20, около 2-15, около 2-10, около 5-30, около 5-20, около 5-15, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29 или около 30.

[85] Сшиваемые полимеры или предшественники полимеров могут иметь биологически инертные и водорастворимые ядра. В случае разветвленного полимера ядро относится к непрерывной части молекулы, соединенной с плечами, отходящими от ядра, при этом конец каждого плеча имеет функциональную группу. Когда ядро представляет собой водорастворимую полимерную область, подходящие полимеры, которые можно использовать, включают простые полиэфиры, например полиалкиленоксиды, такие как полиэтиленгликоль («ПЭГ»); полиэтиленоксид («ПЭО»); сополимер полиэтиленоксида с полипропиленоксидом («ППО»); блок-сополимеры или статистические сополимеры полиэтиленоксида и поливинилового спирта («ПВС»); поли(винилпирролидинон) («ПВП»); поли(аминокислоты); декстран; и тому подобное. Когда ядро имеет маломолекулярную природу, можно использовать любую из множества гидрофильных функциональных групп, чтобы сделать предшественник растворимым в воде. Например, функциональные группы, такие как гидроксил, амин, сульфонат и карбоксилат, которые растворимы в воде, могут быть использованы для придания предшественнику растворимости в воде. Кроме того, сложный эфир N-гидроксисукцинимид («NHS») субаровой кислоты нерастворим в воде, но путем добавления сульфонатной группы к сукцинимидному кольцу сложный эфир NHS субаровой кислоты можно сделать водорастворимым, не влияя на его реакционную способность по отношению к аминогруппам.

[86] Для получения биосовместимого сшитого полимера, который является биоразлагаемым или абсорбируемым, можно использовать один или более предшественников, имеющих биоразрушаемые связи, присутствующие между функциональными группами. Биоразрушаемая связь необязательно также может служить водорастворимым ядром одного или более предшественников. В альтернативном варианте или в дополнение функциональные группы предшественников могут быть выбраны таким образом, чтобы продукт реакции между ними приводил к биоразрушаемой связи. Для каждого подхода биоразрушаемые связи могут быть выбраны таким образом, что

полученный биоразлагаемый, биосовместимый сшитый полимер будет разлагаться или абсорбироваться в течение желаемого периода времени. Могут быть выбраны биоразрушаемые связи, которые в физиологических условиях разрушаются до образования нетоксичных продуктов.

[87] Биоразрушаемая связь может быть химически или ферментативно гидролизуемой или абсорбируемой. Примеры химически гидролизуемых биоразрушаемых связей включают связи в полимерах, сополимерах и олигомерах гликолида, dl-лактида, l-лактида, капролактона, диоксанона и триметиленкарбоната. Примеры ферментативно гидролизуемых биоразрушаемых связей включают пептидные связи, расщепляемые металлопротеиназами и коллагеназами. Дополнительные примеры биоразрушаемых связей включают связи в полимерах и сополимерах поли(гидроксикислот), поли(ортокарбонатов), поли(ангидридов), поли(лактонов), поли(аминокислот), поли(карбонатов) и поли(фосфонатов).

[88] Некоторые функциональные группы, такие как спирты или карбоновые кислоты, обычно не реагируют с другими функциональными группами, такими как амины, в физиологических условиях (например, при уровне pH 7,2-11,0, 37 °C). Однако такие функциональные группы можно сделать более реакционноспособными, используя активирующую группу, такую как N-гидроксисукцинимид. В данной области техники известно несколько способов активации таких функциональных групп. Подходящие активирующие группы включают карбонилдиимдазол, сульфонилхлорид, арилгалогениды, сложные эфиры сульфосукцинимидила, сложный эфир N-гидроксисукцинимидила, сложный эфир сукцинимидила, эпоксид, альдегид, малеимиды, имидоэфиры и т.п. Сложные эфиры N-гидроксисукцинимидила или N-гидроксисульфосукцинимидные группы являются подходящими группами для сшивания белков или полимеров, функционализированных амином, таких как полиэтиленгликоль с концевой аминогруппой («АПЭГ»).

[89] Подходящие биосовместимые сшитые полимеры из водорастворимых предшественников, имеющих электрофильные и нуклеофильные группы, способные реагировать и сшиваться *in situ*, и способы их получения и применения описаны, например, в заявке на патент США № 8,535,70, который включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения биоразлагаемый сшиваемый предшественник полимера представляет собой ПЭГ-NHS.

[90] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения вместо полимерных предшественников, которые могут сшиваться с использованием химической реакции, могут использоваться сшиваемые полимеры, которые сшиваются с использованием физического взаимодействия. Используемый в контексте данного документа термин «сшиваемый полимер» охватывает предшественников полимеров и физически взаимодействующих сшиваемых полимеров, любой из которых может быть подходящим для использования в способе по данному изобретению.

[91] Продолжительность высвобождения и профиль высвобождения терапевтического агента зависят от таких факторов, как плотность поперечных связей в полимерном внешнем слое, диффузии белка из матрицы и растворение самой матрицы. Свойства полимерного внешнего слоя можно регулировать с помощью нескольких факторов, включая разветвление сшиваемого полимера (с 4 или 8-цепями), длину цепей сшиваемого полимера и молярное соотношение (MR) группы -NHS к группе -NH.

[92] Молярное соотношение нуклеофильной группы к электрофильной группе может определять плотность образования поперечных связей. Молярное соотношение 1 приводит к самой высокой плотности образования поперечных связей. Молярное соотношение более или менее 1 может привести к более низкой плотности образования поперечных связей, чем молярное соотношение, равное единице. Плотность образования поперечных связей увеличивается по мере увеличения молярного соотношения, пока не достигнет значения 1, затем плотность образования поперечных связей уменьшается по мере увеличения молярного соотношения выше значения 1. Лекарственный препарат, включенный в гидрогель, может высвобождаться быстрее, когда плотность образования поперечных связей ниже. В результате путем регулирования молярного соотношения нуклеофильной группы к электрофильной группе можно регулировать кинетику высвобождения лекарственного препарата.

[93] Молярное соотношение может эффективно модулировать как плотность поперечных связей (количество ковалентных поперечных связей, образующих сеть), так и размер пор сетки в матрице гидрогеля. Уменьшая плотность образования поперечных связей, можно увеличить эффективный размер пор матрицы, что приведет к более быстрой диффузии лекарственного препарата через матрицу. Кроме того, уменьшение плотности образования поперечных связей может увеличить количество доменов в гидрогеле, в котором локальная концентрация сшиваемого полимера, окружающего белковую частицу, недостаточна для удержания белка в твердом состоянии при гидратации, что приводит к увеличению «взрывного» высвобождения, а также скорости диффузии при расчете на массу. Таким образом, по мере увеличения молярного соотношения кинетика «взрывного» высвобождения и высвобождения в диффузионно-контролируемом режиме может увеличиваться.

[94] Кроме того, Chen et al. (публикация заявки на патент № US2020/0038328A1, которая включена в данный документ посредством ссылки), наблюдали увеличение наклона профиля высвобождения в контролируемом растворением режиме при увеличении молярного соотношения. Это можно объяснить уменьшением степени образования поперечных связей с увеличением молярного соотношения, поскольку существует большее несоответствие между количеством нуклеофильных групп и электрофильных групп, доступных для взаимодействия и образования поперечных связей. Скорость роста полимера определяют скоростью гидролиза поперечных связей, что приводит к увеличению набухания гидрогеля и сопутствующему снижению локальных концентраций сшиваемого полимера, что приводит к дополнительному растворению

белковых частиц. Набухание гидрогеля также коррелирует с пористостью гидрогеля, которая увеличивается по мере растворения белка. По мере увеличения молярного соотношения и растворения белка при гидратации увеличивается эффективная пористость гидрогеля, что приводит к большему набуханию, более быстрому гидролизу и более высокой скорости роста в диффузионно-контролируемом режиме. Кроме того, точка перегиба кривой, определяющая переход между диффузионно-контролируемым режимом и контролируемым растворением режимом, будет обратно коррелировать с молярным соотношением. Поскольку эффективные скорости диффузии увеличиваются с увеличением молярного соотношения, время, необходимое для увеличения диффузии до такой степени, что она больше не является фазой, ограничивающей скорость, уменьшается, и, таким образом, точка перегиба кривой смещается к более ранним временным точкам. Если рассматривать всесторонне, изменение молярного соотношения само по себе может позволить настроить профиль высвобождения от почти линейного до сигмоидального в зависимости от желаемого результата.

[95] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения молярное соотношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет более 1. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения молярное соотношение нуклеофильной группы к электрофильной группе менее 1. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения молярное соотношение нуклеофильной группы к электрофильной группе может находиться в диапазоне от около 0,1 до около 3,0, например, от около 0,1 до около 0,9, от около 0,1 до около 0,8, от около 0,1 до около 0,7, от около 0,1 до около 0,6, от около 0,2 до около 0,9, от около 0,2 до около 3,0, от около 0,2 до около 2,8, от около 0,2 до около 2,5, от около 0,5 до около 2,5, от около 0,5 до около 2,0, от около 0,8 до около 2,5, от около 0,8 до около 2,0, от около 1,1 до около 2,0, от около 1,1 до около 2,5, от около 1,1 до около 3,0, от около 1,5 до около 3,0, от около 1,5 до около 2,5, от около 1,5 до около 2,0 или от около 1,3 до около 1,8. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения молярное соотношение нуклеофильной группы к электрофильной группе может составлять около 0,1, около 0,2, около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,1, около 1,2, около 1,3, около 1,4, около 1,5, около 1,6, около 1,7, около 1,8, около 1,9, около 2,0, около 2,1, около 2,2, около 2,3, около 2,4, около 2,5, около 2,6, около 2,7, около 2,8, около 2,9 или около 3,0.

[96] Что касается молярного соотношения, количество нуклеофильных групп в первом предшественнике и/или количество электрофильных групп во втором предшественнике также может определять плотность образования поперечных связей. Как правило, при данном молярном соотношении, чем больше число нуклеофильных или электрофильных групп, тем выше плотность образования поперечных связей. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ включает выбор 8-цепочечных реагентов ПЭГ-NH и 8-цепочечных ПЭГ-NHS для периода высвобождения 60 дней или дольше. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ

включает выбор 4-цепочечных реагентов ПЭГ-NH и 4-цепочечных ПЭГ-NHS для периода высвобождения менее 60 дней.

[97] Другим параметром, который можно использовать для регулирования кинетики высвобождения микрочастицы гидрогеля, является молекулярная масса первого и/или второго сшиваемого полимера. При заданном молярном соотношении, чем ниже молекулярная масса сшиваемого полимера, тем меньше размер пор сетки. Молекулярные массы первого и второго сшиваемых полимеров оказывают непостоянное или дискретное влияние на профиль высвобождения. Используемый в контексте данного документа термин «непрерывный» или «дискретный» означает, что между уровнями нельзя выполнить интерполяцию. Например, комбинация первого и второго сшиваемых полимеров (например, реагентов ПЭГ) с заданной молекулярной массой может определять диапазон возможных периодов высвобождения. Другие факторы, такие как молярное соотношение, можно использовать для точного регулирования профиля высвобождения или периода высвобождения.

[98] Другим параметром, который можно использовать для регулирования кинетики высвобождения, является массовое соотношение лекарственного препарата и эксципиентов к гидрогелю. Массовое соотношение лекарственного препарата и эксципиентов к гидрогелю также упоминается в данном документе как «нагрузка твердыми веществами». Это относится к массовому соотношению лекарственного препарата и эксципиентов к общей массе лекарственного препарата, эксципиентов и полимера, включающего гидрогель, содержащий лекарственный препарат. Увеличение нагрузки твердыми веществами может изменить форму профиля высвобождения, в первую очередь из-за более быстрого высвобождения во время начальной фазы диффузии до точки перегиба кривой. Также, вероятно, существует обратная корреляция между началом фазы растворения (точка перегиба кривой) и нагрузкой твердыми веществами. Не желая быть связанными теорией, отметим, что с увеличением нагрузки твердыми веществами ожидается более быстрое высвобождение во время начальной фазы диффузии, поскольку большее количество лекарственного препарата будет находиться в микроокружении с относительно низкой концентрацией сшиваемого полимера, в котором растворимость лекарственного препарата менее ограничена. Лекарственный препарат в таких областях может растворяться при начальной гидратации матрицы, увеличивая скорость диффузии, зависящей от концентрации. Кроме того, для лекарственного препарата в форме белковых частиц увеличение количества белковых частиц, растворенных при начальной гидратации, будет создавать пустоты в матрице и приводить к увеличению пористости матрицы. Более пористая матрица также будет увеличивать эффективную скорость диффузии через объемную матрицу и высвобождение при достижении поверхности. Не желая быть связанными теорией, отметим, что обратная корреляция между точкой перегиба кривой и нагрузкой твердыми веществами также может быть гипотетически объяснена увеличением скорости диффузии, наблюдаемой при увеличении нагрузки твердыми веществами. Точка перегиба кривой означает переход

между диффузионно-контролируемым режимом и контролируемым растворением режимом. По мере увеличения нагрузки твердыми веществами скорость диффузии начинается резко и увеличивается быстрее, что приводит к сокращению продолжительности времени до того, как диффузия перестанет ограничивать скорость. В диффузионно-контролируемом режиме диффузия растворенного лекарственного препарата через матрицу представляет собой скорость-лимитирующий этап высвобождения лекарственного препарата. По мере растворения большего количества белковых частиц в матрице образуются пустоты, и пористость матрицы увеличивается, что приводит к увеличению скорости диффузии. В контролируемом растворением режиме диффузия через матрицу больше не является скоростью-лимитирующим этапом. Данная точка достигается тем быстрее, чем больше нагрузка твердыми веществами.

[99] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения концентрация сшиваемых полимеров или предшественников полимеров в суспензии диспергированной фазы может составлять от около 1% до около 50% масс./об., от около 1% до около 35% масс./об., от около 1% до около 20% масс./об., от около 5% до около 50% масс./об., от около 5% до около 35% масс./об., от около 5% до около 20% масс./об., около 1% масс./об., около 2% масс./об., около 3% масс./об., около 4% масс./об., около 5% масс./об., около 6% масс./об., около 7% масс./об., около 8% масс./об., около 9% масс./об., около 10% масс./об., около 15% масс./об., около 20% масс./об., около 25% масс./об., около 30% масс./об., около 35% масс./об., около 40% масс./об., около 45% масс./об. или около 50% масс./об.

[100] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложен способ получения микросфер с полимерным покрытием путем объединения (1) диспергированной фазы, содержащей от 1,0% до 30,0% масс./об. высушенного распылением белка, суспендированного в растворе углеводорода, при этом раствор углеводорода содержит от 5,0% до 35% масс./об. одного или более сшиваемых полимеров в углеводородном растворителе, с (2) дисперсионной фазой для образования капель эмульсии диспергированно фазы, при этом дисперсионная фаза содержит раствор фторуглерода, содержащий от 0,1% до 5,0% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества. Способ дополнительно включает отверждение капель эмульсии путем удаления раствора углеводорода с образованием отвержденных микросфер, покрытых сшитым полимером.

[101] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фторуглеродный раствор может представлять собой фторуглерод с высокой вязкостью, такой как перфторсодержащее соединение C5-C18, включая, но не ограничиваясь, FC-40 или FC-70, а углеводородный раствор может быть выбран из группы, включающей этилацетат, хлороформ, толуол, тетрагидрофуран, дихлорметан или их комбинации. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фторсодержащее поверхностно-активное вещество может представлять собой перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир, коммерчески доступный как Pico-SurfTM 1.

Способ может также включать встряхивание эмульсии под вакуумом для удаления углеводорода, добавление гидрофторэфира (ГФЭ) для ускорения отверждения микросфер и/или фильтрацию для удаления фторуглеродных растворов.

[102] В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения высушенные распылением белки могут быть инкапсулированы в микрогели сшитого полиэтиленгликоля. Сшивание ПЭГ может быть достигнуто путем смешивания предшественника ПЭГ, содержащего нуклеофильные группы, такого как, например, ПЭГ-NH, с предшественником ПЭГ, содержащим электрофильные группы, таким как, например, ПЭГ-NHS. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения добавление нефункционализованного ПЭГ к реакционной смеси можно использовать для модулирования скорости реакции образования поперечных связей, поскольку нефункционализированный ПЭГ поддерживает вязкость углеводородной фазы при снижении концентрации предшественника функционализованного ПЭГ. Таким образом, изменение соотношения функционализованного предшественника ПЭГ и модулятора образования поперечных связей (чистого нефункционализованного ПЭГ) можно использовать для достижения желаемого времени гелеобразования.

[103] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения концентрация модулятора образования поперечных связей в суспензии диспергированной фазы может составлять от около 1% до около 50% масс./об., от около 1% до около 35% масс./об., от около 1% до около 20% масс./об., от около 5% до около 50% масс./об., от около 5% до около 35% масс./об., от около 5% до около 20% масс./об., около 1% масс./об., около 2% масс./об., около 3% масс./об., около 4% масс./об., около 5% масс./об., около 6% масс./об., около 7% масс./об., около 8% масс./об., около 9% масс./об., около 10% масс./об., около 15% масс./об., около 20% масс./об., около 25% масс./об., около 30% масс./об., около 35% масс./об., около 40% масс./об., около 45% масс./об. или около 50% масс./об.

[104] В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложены способы получения микрочастиц, покрытых сшитым полимером, путем приготовления углеводородного раствора, содержащего растворенный(е) сшиваемый(е) полимер(ы) и высушенный распылением белковый порошок для получения диспергированной фазы. Способ дополнительно включает объединение диспергированной фазы с дисперсионной фазой для получения капель эмульсии диспергированной фазы в дисперсионной фазе, при этом дисперсионная фаза содержит фторуглеродную жидкость и от 0,1% до 5,0% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества, сбор покрытых полимером микрочастиц. Углеводородный раствор может содержать углеводородный растворитель, выбранный из группы, включающей этилацетат, дихлорметан, хлороформ или их комбинацию. Раствор фторуглерода может представлять собой фторуглерод высокой вязкости. В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения раствор фторуглерода может содержать FC-40 или FC-70, а фторсодержащее поверхностно-активное вещество может представлять собой перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир, коммерчески доступный как Pico-SurfTM 1.

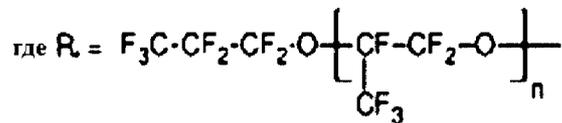
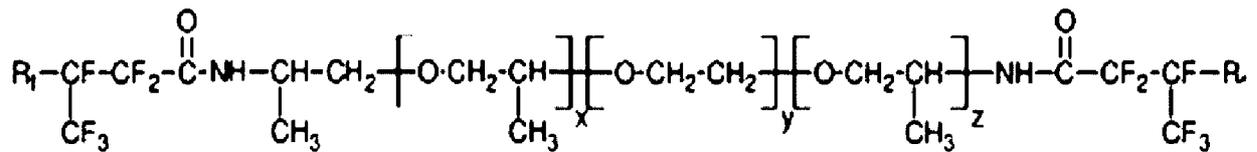
Углеводородный растворитель

[105] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения углеводородный растворитель (также называемый углеводородной жидкостью) выбирают таким образом, чтобы полимерные материалы, например биоразлагаемые или биоразрушаемые сшиваемые полимеры, были растворимы в углеводороде. В некоторых вариантах реализации данного изобретения углеводородный растворитель выбран из группы, включающей дихлорметан, хлороформ, толуол, этилацетат, тетрагидрофуран или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации данного изобретения углеводородный растворитель может содержать ацетонитрил, диметилформамид, диметилсульфоксид, ацетон, этанол, метанол, пентан, пропанол, гексан или их комбинацию.

Фторсодержащие жидкости

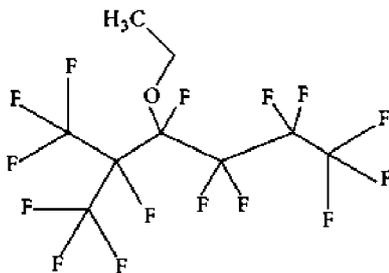
[106] Иллюстративная фторсодержащая жидкость представляет собой фторуглеродную жидкость, включая, но не ограничиваясь, FlourinertTM FC-40 (средняя молекулярная масса=650 г/моль) 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N,N-бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)бутан-1-амин, FluorinertTM FC-70 (средняя молекулярная масса=821 г/моль) (перфтортрипентиламин) или их комбинацию. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фторуглеродная жидкость представляет собой или содержит гидрофторэфир (ГФЭ). Иллюстративный ГФЭ включает, но не ограничивается, NOVECTM 7000 (1-метоксигептафторпропан), NOVECTM 7100 (метоксинонафторбутан), NOVECTM 7200 (этоксинонафторбутан) или NOVECTM 7500 (2-(трифторметил)-3-этоксидодекафторгексан). В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фторуглеродная жидкость содержит FC-40, FC-70, NovacTM 7500, NovacTM 7100, NovacTM 7000 или их комбинации. В некоторых вариантах реализации данного изобретения второй раствор или раствор дисперсионной фазы содержит фторсодержащее поверхностно-активное вещество (ФПАВ) в дополнение к фторсодержащей жидкости. Иллюстративное ФПАВ представляет собой тройной блок-сополимер перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир (ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ), который коммерчески доступен как Pico-SurfTM 1. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фторуглеродная жидкость или второй раствор, или раствор дисперсионной фазы содержит FC-40 и Pico-SurfTM 1.

[107] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения ФПАВ представляет собой:



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

[109] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения ГФЭ имеет следующую химическую структуру, соответствующую 2-(трифторметил)-3-этоксидекафторгексану:



[110] В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фторуглеродная жидкость или второй раствор, или раствор дисперсионной фазы содержит FC-70, имеющий структуру, изображенную на Фиг. 1В.

[111] Другие ГФЭ, подходящие для использования в способах согласно данному изобретению, включают класс молекул, в которых все атомы водорода находятся на атомах углерода без замещения фтором и отделены от фторированных атомов углерода эфирным кислородом, *m.e.* RfORh. ГФЭ имеют молекулярную структуру, которая может быть линейной, разветвленной или циклической, или их комбинацией (например, алкилциклоалифатической), и предпочтительно не содержат этиленовые двойные связи, имея в общей сложности от около 4 до около 20 атомов углерода. Такие ГФЭ известны и легко доступны либо в виде практически чистых соединений, либо в виде смесей. Благодаря липофильности и фторофильности ГФЭ, они смешиваются как с фторуглеродом, так и с углеводородом. При добавлении к эмульсии углеводород/фторуглерод они могут действовать как сорастворитель для извлечения углеводорода во фторуглеродную фазу и ускорения процесса отверждения.

[112] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения

углеводородный растворитель, фторуглерод или и тот, и другой удаляют выпариванием, необязательно под вакуумом, при перемешивании эмульсии. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы собирают с помощью фильтрования, необязательно фильтрования под вакуумом.

[113] Процентное содержание ГФЭ во фторуглеродной фазе может составлять 0-40% об./об., в зависимости от липофильности и фторофильности различных ГФЭ. Увеличение процента ГФЭ увеличивает скорость извлечения углеводов. Тем не менее, процент ГФЭ не должен быть слишком высоким, так как размер и морфологию микрочастицы может стать труднее контролировать.

Разрушаемые или биоразлагаемые модуляторы образования поперечных связей в полимерах

[114] Чтобы сохранить вязкость углеводородной фазы при снижении концентрации функционализованного сшиваемого полимера, в углеводородную фазу можно добавить модулятор образования поперечных связей. Это снизит скорость реакции образования поперечных связей и продлит время гелеобразования. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения модулятор образования поперечных связей представляет собой нефункционализированный разрушаемый или биоразлагаемый полимер.

[115] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения модулятор образования поперечных связей представляет собой полимер, выбранный из группы, включающей разветвленный или линейный полиэтиленгликоль (ПЭГ), полимолочную кислоту (ПМК), полигликолевую кислоту (ПГК), поли(лактид-со-гликолид) (PLGA), поли-D,L-лактид-со-гликолид (PLGA), PLGA-этиленоксид фумарат, PLGA-альфа-токоферилсукцинат, этерифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGSPS), полиангидрид поли[1,6-бис(р-карбоксифеноксигексана)] (рСРН), сополимер гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (РНВ-PVA), сополимер полиэтиленгликоля и поли(молочной кислоты) (ПЭГ-ПМК), поли-ε-капролактон (ПКЛ), полиалкилцианоакрилат (РАС), поли(этил)цианоакрилат (РЕС), полиизобутилцианоакрилат, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид (поли(НРМА)), поли-β-R-гидроксibuтират (РНВ), поли-β-R-гидроксиалканонат (РНА), поли-β-R-яблочную кислоту, фосфолипид-холестериновые полимеры, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтанолламин (DOPC/ПЭГ-DSPE)/холестерин, полисахариды, целлюлозу, этилцеллюлозу, метилцеллюлозу, альгинаты, декстран и гидрогелевые полимеры декстрана, амилозу, инулин, пектин и гуаровую камедь, хитозан, хитин, гепарин, гиалуроновую кислоту, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (ЦД), полиаспартаты, полиглутаматы, полилюцин, сополимеры лейцина и глутамата, полибутиленсукцинат, желатин, коллагены, фибрины, фибрин, полиортоэфир, сополимер полиортоэфира и полиамидина, сополимеры полиортоэфира и диамина, полиортоэфир, включающие латентные кислоты, сополимер поли(этиленгликоль)/поли(бутилентерефталат) и их комбинации и их

сополимеры.

[116] Используемый в контексте данного документа термин «полимер» относится к макромолекуле, содержащей повторяющиеся мономеры, соединенные ковалентными химическими связями. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения полимеры могут быть биосовместимыми, биоразлагаемыми и/или биоразрушаемыми. Биосовместимый и/или биоразлагаемый полимер может быть встречающимся в природе или синтетическим.

[117] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения разрушаемые или биоразлагаемые полимеры могут быть частью сети полимеров, соединенных поперечными связями. Поперечные связи могут иметь ковалентную, ионную, аффинную или физическую основу. Поперечные ковалентные связи, присутствующее в иллюстративных вариантах реализации данного изобретения согласно данному раскрытию, могут возникать в полимерах или предшественниках полимеров с несколькими реакционноспособными функциональными группами, которые смешиваются и иницируются для взаимодействия друг с другом с образованием матриц. Для получения микрочастиц гидрогеля (микрогелей) с использованием эмульсий типа У/В реакции образования поперечных связей должны иницироваться в основном после процесса эмульгирования и протекать в каплях углеводородной эмульсии с образованием стабильно сшитых и отчетливых частиц микрогеля. Таким образом, контроль кинетики реакции образования поперечных связей или скорости гелеобразования помогает получать отдельные сшитые частицы микрогеля с желаемыми характеристиками.

Белковые лекарственные препараты

[118] Как правило, любой активный ингредиент может быть включен в микрочастицы по данному изобретению. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения активный ингредиент представляет собой лекарственный препарат. В конкретных иллюстративных вариантах реализации данного изобретения активный ингредиент представляет собой белок. Такие белки могут включать, но не ограничиваются, антитела, рецепторы, слитые белки, антагонисты, ингибиторы, ферменты (например, используемые в ферментозаместительной терапии), факторы и кофакторы, цитокины, хемокины, репрессоры, активаторы, лиганды, репортерные белки, белки селекции, белковые гормоны, белковые токсины, структурные белки, запасные белки, транспортные белки, нейротрансмиттеры и сократительные белки. Обычно белок микронизируют с помощью, например, высушивания распылением, высушивания электрораспылением, обратимого осаждения, замораживания орошением, сборки на микроподложке или их комбинации. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок представляет собой белок-ловушку для VEGF или его усеченную форму. Другие примеры белков, которые можно использовать в раскрытых способах, описаны ниже.

[119] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения составы микрочастиц, полученные описанными способами и с помощью безводной

эмульсионной системы, содержат лекарственный препарат. Иллюстративные лекарственные препараты включают, но не ограничиваются, белки, слитые белки и их фрагменты, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок представляет собой белок-ловушку для VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig VEGF-рецептора Flt1, слитый с доменом 3 Ig VEGF-рецептора Flk1, слитым с Fc из hIgG1, например, как описано в патентах США № 7,087,411, 7,279,159 и 8,144,840, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки). В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок-ловушка для VEGF представляет собой усеченную форму белка-ловушки для VEGF, как описано в патенте США № 7,396,664, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[120] Антитела (также называемые «иммуноглобулинами») являются примерами белков, имеющих несколько полипептидных цепей и обширные посттрансляционные модификации. Канонический белок иммуноглобулина (например, IgG) состоит из четырех полипептидных цепей - двух легких и двух тяжелых. Каждая легкая цепь связана с одной тяжелой цепью посредством цистеиндисульфидной связи, и две тяжелые цепи связаны друг с другом посредством двух цистеиндисульфидных связей. Иммуноглобулины, продуцируемые в системах млекопитающих, также гликозилированы по различным остаткам (например, по остаткам аспарагина) с различными полисахаридами и могут отличаться от вида к виду, что может влиять на антигенность терапевтических антител. Butler and Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", *Curr. Opin. Biotech.* 30:107-112 (2014).

[121] Константная область тяжелой цепи антитела содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), со вставками более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR тяжелой цепи могут обозначаться аббревиатурой HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи могут обозначаться аббревиатурой LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Термин «высокоаффинное» антитело относится к тем антителам, которые имеют аффинность связывания с их мишенью по меньшей мере 10^{-9} M, по меньшей мере 10^{-10} M; не менее 10^{-11} M; или по меньшей мере 10^{-12} M, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™ или с помощью определения аффинности в растворе способом твердофазного ИФА.

[122] Легкие цепи антител содержат последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включают

легкие каппа и лямбда цепи человека. Вариабельные домены легкой цепи (VL) обычно содержат три CDR легкой цепи и четыре каркасные (FR) области, если не указано иное. Обычно полноразмерная легкая цепь содержит от amino-конца до карбокси-конца доменов VL, который содержит FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые можно использовать в данных изобретениях, включают такие, которые, например, не связываются избирательно ни с первым, ни со вторым антигеном, селективно связывающимся с антигенсвязывающим белком. Подходящие легкие цепи включают те, которые могут быть идентифицированы путем скрининга наиболее часто используемых легких цепей в существующих библиотеках антител (реальные библиотеки или *in silico*), в которых легкие цепи существенно не влияют на аффинность и/или селективность антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Подходящие легкие цепи включают те, которые могут связывать один или оба эпитопа, которые связаны с антигенсвязывающими областями антигенсвязывающего белка.

[123] Вариабельные домены антител содержат аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (модифицированную по желанию), которая содержит следующие аминокислотные области в последовательности от N-конца до C-конца (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Вариабельный домен» содержит аминокислотную последовательность, способную складываться в канонический домен (VH или VL), имеющий структуру двойного бета-слоя, при этом бета-слои соединены дисульфидной связью между остатком первого бета-слоя и второго бета-слоя.

[124] Области, определяющие комплементарность антитела («CDR»), содержат аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью генов иммуноглобулина организма, которая в норме (т.е. в диком типе) появляется между двумя каркасными областями в вариабельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или T-клеточного рецептора). CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии или реаранжированной или нереаранжированной последовательностью, и, например, наивной или зрелой B-клеткой, или T-клеткой. В некоторых случаях (например, для CDR3) CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например, последовательностями зародышевой линии), которые не являются перекрывающимися (например, в последовательности нуклеиновой кислоты, которая не была реаранжирована), но являются перекрывающимися в последовательности нуклеиновой кислоты B-клетки, например, в результате сплайсинга или соединения последовательностей (например, рекомбинации VDJ с образованием CDR3 тяжелой цепи).

[125] Каждый из вышеперечисленных компонентов антитела может быть получен согласно способу по данному изобретению.

[126] Биспецифические антитела включают антитела, способные избирательно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две

разные тяжелые цепи, при этом тяжелые цепи специфически связываются с разными эпитопами, будь то на двух разных молекулах (например, антигенах), или на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один или два, три или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на разных мишенях (например, на одном и том же или на разных белках). Биспецифические антитела можно получить, например, путем объединения тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют (от N-конца к С-концу) домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, а также легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может ассоциироваться с любой тяжелой цепью, либо может ассоциироваться с любой из тяжелых цепей и может связывать один или более эпитопов, связанных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или может ассоциироваться с любой из тяжелых цепей и обеспечивать связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами, и может быть получено согласно данному изобретению.

[127] Например, для вариантов антител данное изобретение может быть использовано в исследованиях и производстве для диагностики и терапии на основе всех основных классов антител, а именно IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. IgG представляет собой предпочтительный класс, например IgG1 (включая IgG1 λ и IgG1 κ), IgG2 и IgG4. Иллюстративные антитела, которые могут быть получены согласно данному изобретению, включают алирокумаб, атоливимаб, мафтивимаб, одесивимаб, одесививмаб-ebgn, казиривимаб, имдевимаб, цемплимаб, цемплимаб-gwlc, дупилумаб, эвинакумаб, эвинакумаб-dgnb, фасимумаб, несвакумаб, тревогрумаб, ринукумаб и сарилумаб.

[128] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок в составе микрочастиц представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, четырехвалентную молекулу, подобную иммуноглобулину G, с двойной специфичностью, называемую иммуноглобулином с двойным переменным доменом (DVD-IG), антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело

IgG3 или антитело IgG4. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG2. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело представляет собой антитело IgG4. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело содержит химерную шарнирную область. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело содержит химерный Fc. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

[129] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело выбрано из группы, состоящей из антитела против белка запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела против PD1, описанного в патенте США № 9,987,500), антитела против лиганда белка запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела против PD-L1, описанного в патенте США № 9,938,345), антитела против DИ4, антитела против ангиопоэтина-2 (например, антитела против ANG2, описанного в патенте США № 9,402,898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, антитела против AngPtI3, описанного в патенте США № 9,018,356), антитела против рецептора тромбоцитарного фактора роста (например, антитела против PDGFR, описанного в патенте США № 9,265,827), антитела против Erb3, антитела против рецептора пролактина (например, антитела против PRLR, описанного в патенте США № 9,302,015), антитела против компонента комплемента 5 (например, антитела против C5, описанного в патенте США № 9,795,121), антитела против TNF, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, антитела против EGFR, описанного в патенте США № 9,132,192, или антитела против EGFRvIII, описанного в патенте США № 9,475,875), антитела против пропротеиновой конвертазе субтилизин/кексин 9 (например, антитела против PCSK9, описанного в патенте США № 8,062,640 или патенте США № 9,540,449), антитела против фактора роста и дифференцировки 8 (например, антитела против GDF8, также известного как антитело против миостатина, описанного в патентах США 8,871,209 или № 9,260,515), антитела против глюкогонового рецептора (например, антитела против GCGR, описанного в патентах США № 9,587,029 или № 9,657,099), антитела против VEGF, антитела против IL1R, антитела против рецептора интерлейкина 4 (например, антитела против IL4R, описанного в публикации заявки на патент США №US2014/0271681A1 или патентах США № 8,735,095 или № 8,945,559), антитела против рецептора интерлейкина 6 (например, антитела против IL6R, описанного в патентах США № 7,582,298, № 8,043,617 или № 9,173,880), антитела против IL1, антитела против IL2, антитела против IL3, антитела против IL4, антитела против IL5, антитела против IL6, антитела против IL7, антитела против интерлейкину 33 (например,

антитела против IL33, описанного в патентах США № 9,453,072 или № 9,637,535), антитела против респираторно-синцитиального вируса (например, антитела против RSV, описанного в патентах США № 9,447,173 и № 10,125,188, и публикации заявки на патент США № US2019/0031741A1), антитела против кластера дифференцировки 3 (например, антитела против CD3, описанного в патенте США № 9,657,102), антитела против кластера дифференцировки (например, антитела против CD20, описанного в патентах США № 9,657,102 и US20150266966A1, и в патенте США № 7,879,984), антитела против CD19, антитела против CD28, антитела против кластера дифференцировки-48 (например, антитела против CD48, описанного в патенте США № 9,228,014), антитела против Fel d1 (например, описанного в патенте США № 9,079,948), антитела для лечения SARS-CoV-2 (REGN-COV™, включающего антитела против SARS-CoV-2 - касиривимаб и имдевимаб), антитела против SARS-CoV-2, антитела против вируса ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела против MERS, описанного в патенте США № 9,718,872), коктейль антител против вируса Эболы (REGN-EB3, включающий атолтвивимаб, мафтивимаб и одесивимаб-ebgn (INMAZEB®)), антитела против вируса Эбола (например, описанного в патенте США № 9,771,414), антитела против вируса Зика, антитела против гена активации лимфоцитов 3 (например, антитела против LAG3 или антитела против CD223), антитела против фактора роста нервов (например, антитела против NGF, описанного в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и патентах США № 8,309,088 и № 9,353,176), антитела против активину А и антитела против белка Y.

[130] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения антитело может быть выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела против CD3 x CD20 (описанного в патенте США № 9,657,102 и US20150266966A1)), биспецифического антитела против CD3 x муцина 16 (например, биспецифического антитела против CD3 x Muc16) и биспецифического антитела против CD3 x простат-специфического мембранного антигена (например, биспецифического антитела против CD3 x PSMA).

[131] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок может быть выбран из группы, включающей абциксимаб, адалимумаб, адалимумаб-атто, адо-трастузумаб, афлиберцепт, алемтузумаб, алирокумаб, атезолизумаб, авелумаб, базиликсимаб, белиумаб, бенрализумаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, блинатумомаб, брентуксимаб ведотин, бродалумаб, бролуцизумаб, канакинумаб, капромаб пендетид, цертолизумаб пегол, цемиплимаб, цетуксимаб, деносумаб, динутуксимаб, дупилумаб, дурвалумаб, экулизумаб, элотузумаб, эмицизумаб-kxwh, эмтансинеалирокумаб, эвинакумаб, эволокумаб, фасинумаб, голимумаб, гуселкумаб, ибритумомаб тиуксетан, идаруцизумаб, инфликсимаб, инфликсимаб-абда, инфликсимаб-дииб, ипилимумаб, иксекизумаб, меполизумаб, нецитумумаб, несвакумаб, ниволумаб, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окрелизумаб, офатумумаб, оларатумаб, омализумаб, панитумумаб, пембролизумаб, пертузумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, реслизумаб, ринукумаб, ритуксимаб, сарилумаб, секукинумаб, силтуксимаб, тоцилизумаб,

трастузумаб, тревогрумаб, устекинумаб и ведолизумаб.

[132] Производные и фрагменты антител пригодны для получения согласно данному изобретению и включают, но не ограничиваются: фрагменты антител (например, ScFv-Fc, dAB-Fc, полуантитела), мультиспецифические (например, IgG-ScFv, IgG-dab, ScFV-Fc-ScFV, триспецифические) и Fc-слитые белки (например, Fc-слитый (N-концевой), Fc-слитый (C-концевой), моноспецифический Fc-слитый, биспецифический Fc-слитый белок). Фраза «Fc-содержащий белок» включает антитела, биспецифические антитела, производные антител, содержащие Fc, фрагменты антител, содержащие Fc, Fc-слитые белки, иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат по меньшей мере функциональную часть области CH2 и CH3 иммуноглобулина. «Функциональная часть» относится к области CH2 и CH3, которая может связываться с рецептором Fc (например, FcγR или FcRn (неонатальный рецептор Fc) и/или может участвовать в активации комплемента. Если область CH2 и CH3 содержит делеции, замены и/или вставки или другие модификации, которые делают ее неспособной связывать какой-либо рецептор Fc, а также неспособной активировать комплемент, область CH2 и CH3 не является функциональной.

[133] Антигенсвязывающие молекулы (АСМ) и конъюгаты АСМ, имеющие ненативные форматы, такие как домены Fab в ненативных конфигурациях, могут быть экспрессированы согласно данному изобретению и раскрыты в WO 2021/026409 A1. Мультиспецифические связывающие молекулы (МСМ) и конъюгаты МСМ могут быть получены согласно данному изобретению и описаны в WO 2021/091953A1 и WO 2021/030680 A1.

[134] Fc-содержащие белки могут содержать модификации в доменах иммуноглобулина, включая те случаи, когда модификации влияют на одну или более эффекторные функции связывающего белка (например, модификации, которые влияют на связывание FcγR, связывание FcRn и, таким образом, время полувыведения и/или активность КЗЦ). Такие модификации включают, но не ограничиваются, следующие модификации и их комбинации со ссылкой на нумерацию EU аминокислот константной области иммуноглобулина: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 и 439.

[135] Например, но не в порядке ограничения, связывающий белок может быть Fc-содержащим белком и продемонстрировать увеличенный период полувыведения из сыворотки (по сравнению с тем же Fc-содержащим белком без указанной модификации(й)) и иметь модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250

и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В другом примере модификация может включать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 2591 (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[136] Как указано выше, данное изобретение также подходит для получения других молекул, включая слитые белки. Эти белки могут содержать часть или все два или более белков, один из которых представляет собой Fc-фрагмент молекулы иммуноглобулина, которые не являются слитыми в своем природном состоянии. Fc-слитые белки включают Fc-слитый (N-концевой), Fc-слитый (C-концевой), моноспецифический Fc-слитый и биспецифический Fc-слитый белок. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полученных из антител полипептидов (включая Fc-домен), было описано, например, в Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 10535-39 (1991); Byrn et al., Nature 344:677-70, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11 (1992). Белки, содержащие рецептор Fc, также описаны в С. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MFMETIBODY technology," 20(6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

[137] Слитые белки Fc-рецептор содержат один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах реализации содержит шарнирную область, за которой следуют домены CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации данного изобретения Fc-слитый белок содержит две или более разных цепей рецептора, которые связываются с одним или более лигандами. Некоторые слитые белки Fc-рецептор могут содержать лиганд-связывающие домены множества различных рецепторов.

[138] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок может представлять собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В других вариантах реализации данного изобретения Fc-слитый белок представляет собой слитый белок Fc-рецептор, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанного с Fc-фрагментом. В других вариантах реализации данного изобретения Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следуют домены CH2 и CH3 IgG. В других вариантах реализации данного изобретения слитый белок Fc-рецептор содержит две или более разных цепей рецептора, которые связываются с одним лигандом или несколькими лигандами.

[139] Например, Fc-слитый белок представляет собой белок-ловушку, такой как, например, белок-ловушка для IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc из hIgG1; смотрите патент США № 6,927,004, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки) или белок-ловушку для VEGF (например,

афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig VEGF-рецептора Flt1, слитый с доменом 3 Ig VEGF-рецептора Flk1, слитым с Fc из hIgG10). В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения Fc-слитый белок может представлять собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более антигенсвязывающих доменов, таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи, антитела, связанного с Fc-фрагментом.

[140] Белки-миниловушки представляют собой белки-ловушки, в которых используется мультимеризирующий компонент (МК) вместо части Fc, и они раскрыты, например, в патентах США № 7,279,159 и № 7,087,411 и могут быть получены согласно данному изобретению.

[141] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения исходный белок находится в форме сухого порошка, например микронизированного сухого порошка. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок представляет собой высушенный распылением порошок (ВРП). Использование высушенного распылением белка вместо раствора белка имеет преимущества, заключающиеся в более высокой загрузке белка в микрочастицы и лучшей стабильности белка во время процесса инкапсуляции.

[142] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения молекулы сухого белка остаются в твердом состоянии и окружены стабилизаторами или другими эксципиентами в течение всего процесса инкапсуляции и условиях хранения. Эксципиенты в белковом порошке могут включать любые эксципиенты, улучшающие стабильность белка при хранении, например, сорбит, глицерин, маннит, трегалозу, сахарозу, аргинин, аланин, пролин, глицин, лейцин, гистидин, хлорид натрия, полисорбат 20, полисорбат 80, полиэтиленгликоль или фосфатный буфер.

[143] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения инкапсулированный высушенный распылением белок демонстрирует высокую степень извлечения и низкую агрегацию, возможно, из-за минимизированного взаимодействия с поверхностью, поскольку только небольшая часть поверхностных белков подвергается воздействию поверхности раздела фаз. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок перед инкапсуляцией подвергают микронизированию.

Микрочастицы гидрогеля (микрогели)

[144] В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложены фармацевтические композиции, полученные с использованием описанных неводных эмульсионных систем. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фармацевтическая композиция содержит микрогели, которые имеют полимерный наружный слой и микронизированное белковое ядро. В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрогель содержит микрочастицы, имеющие почти сферическую форму.

[145] Некоторые микрочастицы и белковые ядра будут приближаться к сферичности, в то время как другие имеют более неправильную форму. Таким образом,

используемый в контексте данного документа термин «диаметр» означает каждое из следующих значений: (a) диаметр сферы, описывающей микрочастицу или белковое ядро, (b) диаметр наибольшей сферы, которая вписывается в пределы микрочастицы или белкового ядра, (c) любую меру между описанной сферой (a) и ограниченной сферой (b), включая среднее значение между ними, (d) длину самой длинной оси микрочастицы или белкового ядра, (e) длину самой короткой оси микрочастицы или белкового ядра, (f) любую меру между длиной длинной оси (d) и длиной короткой оси (e), включая среднее значение между ними и/или (g) эквивалентный круговой диаметр (ECD), определенный с помощью микропоточковой визуализации (MFI), анализа траекторий движения наночастиц (NTA), или как объемный или усредненный диаметр, определенный с помощью способов светорассеяния, таких как статическое светорассеяние (SLS), динамическое светорассеяние (DLS) или анализ лазерной дифракции. Диаметр обычно выражают в микрометрах (мкм или микрон). Диаметр можно определить оптическим измерением или измерением с помощью сканирующей электронной микроскопии.

[146] Микрочастицы, полученные описанными способами на основе неводной эмульсии, содержат несколько молекул белка с низким, очень низким или почти нулевым количеством воды (например, менее 3% воды по массе). В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микронизированная белковая частица может иметь 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, 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.

[147] Например, белковая частица может быть микронизирована с помощью высушивания распылением, лиофилизации и измельчении, струйного измельчения, обратимого осаждения в не растворителе, грануляции, постепенного осаждения (см. патент США № 7,998,477), осаждения в сверхкритической жидкости (см. патент США № 6,063,910), или образования частиц, индуцированного двуокисью углерода под высоким давлением (Bustami et al., *Pharma. Res.* 17: 1360-66 (2000)). Используемая в контексте данного документа фраза «высушивание распылением» относится к способу получения сухого порошка, содержащего частицы микронного размера, из взвеси или суспензии с использованием распылительной сушилки. Распылительные сушилки используют распылительное устройство или распылительную насадку для диспергирования суспензии или взвеси в виде капель контролируемого размера.

[148] Размер капель от 10 мкм 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 полимерный наружный слой вокруг белковой нагрузки отверждается.

[149] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения концентрация микронизированного белкового порошка, суспендированного в суспензии

диспергированной фазы, например диспергированной фазы, содержащей раствор углекислого газа, составляет от около 1% до около 50% масс./об., от около 1% до около 30% масс./об., от около 1% до около 20% масс./об., от около 1% до около 10% масс./об., от около 1% до около 5% масс./об., от около 5% до около 30% масс./об., от около 5% до около 20% масс./об., от около 5% до около 10% масс./об., около 1% масс./об., около 2% масс./об., около 3% масс./об., около 4% масс./об., около 5% масс./об., около 6% масс./об., около 7% масс./об., около 8% масс./об., около 9% масс./об., около 10% масс./об., около 15% масс./об., около 20% масс./об., около 25% масс./об., около 30% масс./об., около 35% масс./об., около 40% масс./об., около 45% масс./об. или около 50% масс./об.

[150] В некоторых вариантах реализации данного изобретения микронизированный белок представляет собой белок-ловушку для VEGF. Фармацевтические составы для образования микронизированных частиц белка-ловушки для VEGF могут содержать от около 10 мг/мл до около 100 мг/мл белка-ловушки для 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-ловушки для VEGF. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок-ловушка для VEGF может представлять собой офтальмологический состав, пригодный для интравитреального введения в глаз, по существу аналогичный составам, раскрытым в патенте США № 8,092,803, который включен в данную заявку посредством ссылки.

[151] В иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы, полученные с использованием описанных неводных эмульсионных систем, могут иметь диапазон диаметров от около 1 мкм до около 200 мкм, от около 1 мкм до около 150 мкм, от около 1 мкм до около 100 мкм, от около 2 мкм до около 70 мкм, от около 5 мкм до около 65 мкм, от около 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 мкм до около 15 мкм, около 20 мкм, около 25 мкм или около 30 мкм. Изменение размера в значительной степени отражает толщину полимерного наружного слоя, хотя диаметр белкового ядра может в некоторой степени способствовать изменению размера.

[152] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения микрочастицы, образованные описанными способами неводной эмульсии, представляют собой текучие композиции микрочастиц. Описанные текучие композиции микрочастиц могут быть суспендированы с фармацевтически приемлемыми эксципиентами в фармацевтически приемлемом составе, например, в составе, содержащем pH-буферный раствор, водный раствор или неводный раствор.

[153] Термин «эксципиент» включает любой нетерапевтический агент, добавляемый к фармацевтической композиции для обеспечения желаемой консистенции или стабилизирующего эффекта. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел,

силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное. Текущие композиции микрочастиц можно вводить парентерально, например, с помощью шприца, такого как шприц с иглой 27G. Микрочастицы пригодны для замедленного или пролонгированного высвобождения белковых терапевтических средств.

[154] Термин «состав» включает любую комбинацию лекарственного препарата или терапевтического средства, например микрочастиц по данному изобретению, и любых дополнительных компонентов, эксципиентов или носителей, которые могут быть полезны при применении терапевтического средства. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения состав может содержать микрочастицы и рН-буферный раствор, водный раствор или неводный раствор. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения составы микрочастиц вводят интравитреально, супрахориоидально или подкожно. Например, предполагается, что микрочастицы белка-ловушки для VEGF можно использовать для пролонгированного или замедленного высвобождения терапевтического белка-ловушки для VEGF, например, при введении в стекловидное тело для лечения сосудистых заболеваний глаза или при подкожной имплантации для пролонгированного или замедленного высвобождения белка-ловушки для VEGF с целью лечения других заболеваний.

[155] Микрочастицы согласно данному изобретению высвобождают белок в физиологической водной среде при температуре около 37°C с относительно постоянной скоростью в течение продолжительного периода времени, составляющего по меньшей мере 60, 90, 120 или 150 дней (замедленное высвобождение).

[156] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложены композиции, содержащие микрочастицы, полученные с использованием описанных в данном документе способов с использованием неводной эмульсии, при этом композиция содержит более 100 мг белка, высушенного распылением. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способы с использованием неводных эмульсий имеют выход более 90% и позволяют получить микрочастицы с чистотой более 99%, которые имеют нагрузку более 10% масс./масс. и «взрывное» высвобождение более 10% при 50-100 мкл объема инъекции.

[157] Фармацевтические составы, содержащие микрочастицы, приготовленные согласно данному изобретению, могут содержаться в любой емкости, подходящей для хранения лекарственных средств и других терапевтических композиций. Например, иллюстративные фармацевтические составы могут содержаться в запечатанной и стерилизованной пластиковой или стеклянной емкости определенного объема, такой как пробирка, ампула, шприц, картридж или флакон. Для содержания составов по данному изобретению можно использовать различные типы флаконов, включая, например, прозрачные и непрозрачные (например, янтарного цвета) стеклянные или пластиковые флаконы. Аналогично, любой тип шприца можно использовать для содержания или введения фармацевтических составов по данному изобретению.

[158] Фармацевтические составы, содержащие микрочастицы, приготовленные согласно данному изобретению, могут содержаться в шприцах с «нормальным содержанием вольфрама» или шприцах с «низким содержанием вольфрама». Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, процесс изготовления стеклянных шприцев обычно включает использование горячего вольфрамового стержня, который прокалывает стекло, тем самым создавая отверстие, через которое можно всасывать и выталкивать жидкости из шприца. Этот процесс приводит к отложению следовых количеств вольфрама на внутренней поверхности шприца. Последующая промывка и другие этапы обработки могут быть использованы для уменьшения количества вольфрама в шприце. Используемый в контексте данного документа термин «нормальное содержание вольфрама» означает, что шприц содержит количество, равное или более 500 частей на миллиард (част./млрд) вольфрама. Термин «низкое содержание вольфрама» означает, что шприц содержит менее 500 част./млрд вольфрама. Например, шприц с низким содержанием вольфрама согласно данному изобретению может содержать около менее 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или менее част./млрд вольфрама.

[159] Резиновые поршни, используемые в шприцах, и резиновые пробки, используемые для закрытия отверстий флаконов, могут иметь покрытие для предотвращения контаминации лекарственного содержимого шприца или флакона или для сохранения их стабильности. Таким образом, фармацевтические составы по данному изобретению, согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения, могут содержаться в шприце, который содержит поршень с покрытием, или во флаконе, закрытом резиновой пробкой с покрытием. Например, поршень или пробка могут быть покрыты фторуглеродной пленкой. Примеры пробок или поршней с покрытием, пригодных для использования с флаконами и шприцами, содержащими фармацевтические составы по данному изобретению, упомянуты, например, в патентах США № 4,997,423; 5,908,686; 6,286,699; 6,645,635; и 7,226,554, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[160] Примеры резиновых пробок и поршней с покрытием, которые можно использовать в контексте данного изобретения, имеются в продаже под торговой маркой «FluoroTec®» от West Pharmaceutical Services, Inc. (Лайонвилл, Пенсильвания). FluoroTec® представляет собой пример фторуглеродного покрытия, используемого для минимизации или предотвращения прилипания лекарственного препарата к резиновым поверхностям.

[161] Иллюстративные фармацевтические составы могут содержаться в шприце с низким содержанием вольфрама, который содержит поршень с фторуглеродным покрытием.

[162] Иллюстративные фармацевтические составы можно вводить пациенту парентеральными путями, такими как инъекция (например, подкожная, внутривенная, внутримышечная, внутривенная и т.д.) или через чрескожное, муконазальное,

назальное, ингаляционное или пероральное введение. Для подкожной доставки фармацевтических составов по данному изобретению можно использовать многочисленные многоразовые шприц-ручки или автоинъекторы. Примеры включают, но не ограничиваются, Autopen® (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручки Disetronic Pen (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), Humalog® Mix75/25® Pen, Humalog® Pen, Humulin® 70/30 pen (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NovoPen® I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NovoPen® Junior (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), BD™ pen (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OptiPen®, OptiPen Pro®, OptiPen Starlet™ и OptiClik® (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия).

[163] Примеры одноразовых шприц-ручек или автоинъекторов, применяемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению, включают, но не ограничиваются, шприц-ручку SoloSTAR® pen (Sanofi-Aventis), FlexPen® (Novo Nordisk) и KwikPen™ (Eli Lilly), автоинжектор SureClike™ Autoinjector (Amgen, Таузенд-Оукс, Калифорния), Pelet® (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EpiPen® (Dey, LP) и шприц-ручку Humira® Pen (Abbott Labs, Эбботт-Парк, Иллинойс).

[164] В данном документе также рассматривается использование микроинфузора для доставки фармацевтических составов, содержащих микрочастицы, приготовленные согласно данному изобретению. Используемый в контексте данного документа термин «микроинфузор» означает устройство для подкожной доставки, предназначенное для медленного введения больших объемов (например, до около 2,5 мл или более) терапевтического состава в течение длительного периода времени (например, в течении около 10, 15, 20, 25, 30 и более минут). См., например, патент США № 6,629,949; патент США № 6,659,982; и Meehan et al., J. Controlled Release 46:107-116 (1996). Микроинфузоры особенно полезны для доставки больших доз терапевтических белков, содержащихся в высокой концентрации (например, около 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл) или вязких растворов.

ПРИМЕРЫ

[165] Следующие неограничивающие примеры предназначены для иллюстрации синтеза пустых микрогелей, микрогелей лекарственных препаратов, составов, содержащих микрогели лекарственных препаратов, и способов получения микрогелей лекарственных препаратов с использованием неводных эмульсионных систем. Таблица 1 включает материалы, использованные в следующих примерах. В иллюстративном варианте реализации данного изобретения твердая композиция высушенного распылением флуоресцентно-меченного белка-ловушки для VEGF содержит 69,8% масс./масс. белка-ловушки для VEGF, 0,7% масс./масс., меченого Alexa 488 белка-ловушки для VEGF, 13,1% масс./масс. гликозилированного белка-ловушки для VEGF, 2,1% масс./масс. фосфата натрия, 14,1% масс./масс. сахарозы и 0,2% масс./масс. полисорбата 80. Следует понимать, что концентрации эксципиентов в высушенном распылением порошке могут варьироваться, не влияя на эффективность способа по

данному изобретению, и что способ по данному изобретению можно использовать с высушенным распылением порошком, содержащим любой белок с любой комбинацией эксципиентов.

Таблица 1. Материалы для изготовления микрочастиц гидрогеля

Материал	Описание	Производство	№ партии/элемента
Высушенный Распылением Флуоресцентно- меченный Alexa- 488 Белок- Ловушка для VEGF	69,3% масс./масс. белка-ловушки для VEGF и 0,7% масс./масс. меченого Alexa 488 белка-ловушки для VEGF	FDG, Regeneron, Тарритаун	Н/Д
HGEO-150PA	8-цепочечный NH-ПЭГ, 14450 MW [гексаглицерин окта(аминопропил)полиоксиэтилен]	NOF Group	M147604
HGEO-400GS	8-цепочечный NH-ПЭГ, глутарил, 45573 MW [гексаглицерин окта(сукцинимидилоксиглутарил)по лиоксиэтилен]	NOF Group	M83620
Дихлорметан	органический растворитель	Sigma Aldrich	270997-1L
ПЭГ 1000	Поли(этиленгликоль), 1000	Sigma Aldrich	8.07488
ПЭГ 2000	Поли(этиленгликоль) BioUltra, 2000	Sigma Aldrich	84797-250G-F
ПЭГ 8000	BioUltra, для молекулярной биологии, 8000	Sigma Aldrich	81268
ПЭГ 20 кДа	BioUltra, 20000	Sigma Aldrich	95172-250G-F
FC-40	Fluorinert™ FC-40	Sigma Aldrich	F9755
FC-70	Fluorinert™ FC-70	Sigma Aldrich	F9880
Pico Surf 1	Фторсодержащее поверхностно- активное вещество	Sphere Fluidics	C014

Пример 1: Синтез пустых микрогелей сшитого ПЭГ с использованием неводных эмульсионных систем

[166] Синтез пустых микрогелей сшитого ПЭГ с помощью объемной эмульсии типа У/Ф, неводной эмульсионной системы, как изображено на Фиг. 1А, может быть осуществлен путем смешивания исходного раствора NHS:NH:ПЭГ8кДа, содержащего 40 кДа ПЭГ-NHS 32% масс./об. в дихлорметане (ДХМ), ПЭГ-NH 12% масс./об. в ДХМ и 8

кДа (нефункционализованный линейный) ПЭГ 35% масс./об. в ДХМ, в соотношении 20 мкл:20 мкл:260 мкл в микропробирке объемом 1,5 мл. Затем содержимое микропробирки объемом 1,5 мл можно быстро перенести в 6 мл FC-40, содержащего 0,5% масс./масс. фторсодержащего поверхностно-активного вещества, Pico SurfTM 1. Затем ДХМ в растворе FC-40 можно эмульгировать путем перемешивания на вортексе или гомогенизации. Реакция образования поперечных связей продолжается и завершается в отдельных каплях, и капли эмульсии, наконец, отверждаются в микрогели ПЭГ после удаления ДХМ.

[167] При сборе пустых микрогелей сшитого ПЭГ могут образовываться крупные полимерные агрегаты, которые выпадают в осадок из эмульсии. Капли меньшего размера могут сохранять форму, в то время как капли большего размера (около > 10 мкм) склонны к флокуляции и слиянию до завершения реакции образования поперечных связей и отверждения микрогелей.

[168] Чтобы предотвратить флокуляцию и последующую агрегацию микрогелей, вместо FC-40 в описанном выше протоколе можно использовать более вязкую дисперсионную фазу. Согласно закону Стокса известно, что одним из способов снижения скорости разделения фаз является увеличение вязкости дисперсионной фазы. Следовательно, для изготовления микрогелей можно использовать другой коммерчески доступный фторуглерод, FluorinertTM FC-70 (перфтортрипентиламин), с гораздо более высокой вязкостью, 24 сП (по сравнению с FC-40, имеющим 4,1 сП). Использование более вязкого фторуглерода приводило к меньшей агрегации и успешному образованию микрогелей (данные не представлены).

Пример 2. Оптимизация скорости гелеобразования с помощью модулятора образования поперечных связей

[169] Как описано в Примере 1, образование поперечных связей может быть достигнуто путем смешивания предшественника, содержащего нуклеофильные группы (ПЭГ-NH), с предшественником, содержащим электрофильные группы (ПЭГ-NHS). Поскольку реакция начнется сразу после смешивания, скорость реакции следует снизить, чтобы было достаточно времени для последующего процесса эмульгирования. Авторы изобретения обнаружили, что реакция 15 кДа ПЭГ-NHS и 40 кДа ПЭГ-NH при смешивании зависит от концентрации. Скорость гелеобразования была очень высокой при высоких концентрациях ПЭГ, и реакционная смесь больше не могла подвергаться микронизированию вскоре после смешивания. Разбавление концентрации полимера снижает скорость образования поперечных связей. Однако это также снижает вязкость диспергированной фазы, что может привести к образованию микрогелей меньшего размера, которые менее эффективны при инкапсулировании высушенного распылением белка (ВРБ).

[170] Таким образом, иллюстративные варианты реализации способа по данному изобретению включают регулирование скорости реакции образования поперечных связей при поддержании достаточно высокой вязкости диспергированной фазы для образования более крупных капель во время эмульгирования, что приводит к получению более

крупных микрогелей и обеспечению эффективной инкапсуляции белка. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения желаемый баланс свойств достигается за счет оптимизации количества модулятора образования поперечных связей. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения модулятор образования поперечных связей представляет собой линейный нефункционализированный ПЭГ, который можно добавлять к реакционной смеси для поддержания вязкости углеводородной фазы при одновременном снижении концентрации функционализованного предшественника ПЭГ.

[171] Чтобы оптимизировать соотношение функционализованного предшественника и чистого нефункционализованного модулятора образования поперечных связей, были проведены эксперименты для оценки скорости гелеобразования, что позволило получить достаточное количество данных для экстраполяции наших результатов. Сначала приготовили следующие исходные растворы: 40 кДа ПЭГ-NHS 32% масс./об. в ДХМ, ПЭГ-NH 12% масс./об. в ДХМ и 8 кДа (нефункционализированный линейный) ПЭГ 35% масс./об. в ДХМ. Затем раствор ПЭГ-NH и 8 кДа ПЭГ смешивали в микропробирке типа Эппендорф объемом 1,5 мл путем встряхивания. Наконец, добавляли различные растворы ПЭГ-NHS для получения смесей объемом 300 мкл. После встряхивания для гомогенизации смеси и начала реакции микропробирку постоянно наклоняли, чтобы проверить, не перестала ли течь смесь, что указывало бы на образование геля. Время гелеобразования для различных соотношений ПЭГ-NHS:ПЭГ-NH:ПЭГ 8 кДа представлено в Таблице 2.

[172] Как представлено в Таблице 2 ниже, снижение концентрации функционализованного сшиваемого полимера или предшественника полимера и замена функционализованного сшиваемого полимера или предшественника полимера на модулятор образования поперечных связей (чистые нефункционализированные линейные цепи ПЭГ) может увеличить время гелеобразования, чтобы обеспечить последующий процесс эмульгирования.

Таблица 2. Различные предшественники ПЭГ и нефункционализированный ПЭГ для оптимизации времени гелеобразования

ПЭГ-NHS:ПЭГ-NH:ПЭГ 8кДа (об.:об.:об. мкл)	Приблизительное время гелеобразования
150:150:0	< 1 секунды, сразу после смешивания
100:100:100	< 1 секунды, сразу после смешивания
50:50:200	В течение 5 секунд после смешивания
30:30:240	Гелеобразование в течение около 10-20 секунд
20:20:260	Постепенное гелеобразование в течение >

	300 секунд
--	------------

ПРИМЕР 3. Инкапсуляция высушенного распылением белка в сшитые микрогели ПЭГ

[173] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения можно достичь инкапсуляции высушенного распылением белка в микрогелях сшитого ПЭГ, как изображено на Фиг. 3. Производство микрогелей осуществляли, сначала приготовив исходный раствор 20 кДа ПЭГ 35% масс./об. в ДХМ, HGEО-400GS (ПЭГ-NHS) 32% масс./об. в ДХМ и HGEО-150РА (ПЭГ-NH) 12% масс./об. в ДХМ. Затем 260 мкл 20 кДа ПЭГ и 20 мкл ПЭГ-NH смешивали с раствором перед добавлением 10 мг микронизированного белкового порошка (например, ВРП белка-ловушки для VEGF) в микропробирку объемом 1,5 мл, перемешивали на вортексе и подвергали воздействию ультразвука в течение 10 минут для получения суспензии. Затем к суспензии добавляли 20 мкл ПЭГ-NHS перед перемешиванием на вортексе для гомогенизации. Содержимое микропробирки объемом 1,5 мл затем добавляли к 6 мл FC-70, содержащего 0,5% масс./масс. PS-1. Затем смесь эмульгировали путем перемешивания на вортексе или гомогенизации. Эмульсию помещали в вакуум при легком перемешивании более чем на 3 часа для завершения реакции образования поперечных связей и удаления ДХМ. Затем микрогели фильтровали под вакуумом и промывали через мембрану PES 0,45 мкм. Вакуумную фильтрацию могут использовать для дополнительной сушки микрогелей перед окончательным сбором. Продукты дополнительно сушили в вакууме в течение длительного периода времени для уменьшения содержания остаточных растворителей.

[174] Порошок микрогелей, изготовленный с помощью описанной выше процедуры, можно легко суспендировать и диспергировать в ФСБ, содержащем поверхностно-активное вещество, такое как 0,1% ПВС, или суспендировать в неводном жидком носителе, таком как триглицериды со средней длиной цепи. Для идентификации и визуализации местоположения загруженных белковых частиц, белок-ловушка для VEGF (например, афлиберцепт) может быть помечен красителем, сложным эфиром TFP - Alexa 488, путем неспецифической конъюгации. Белок-ловушка для VEGF, содержащий 1% белка, меченного Alexa 488, затем может быть высушен распылением в ВРП, чтобы частицы ВРП были видны с помощью флуоресцентной микроскопии.

[175] Сшитые микрогели ПЭГ, инкапсулирующие частицы ВРП, содержащие флуоресцентно-меченный белок-ловушку для VEGF, получали, как описано выше, и суспендировали в ФСБ буфере, содержащем 0,1% ПВС, поверхностно-активное вещество, используемое для предотвращения агрегации и стимулирования дисперсии в водном растворе или в FC-70, и визуализировали с помощью микроскопа.

[176] На Фиг. 4А и 4В представлены изображения микрогелей, нагруженных ВРП, повторно суспендированных в FC-70, полученные с помощью светлопольного и флуоресцентного микроскопа. Наблюдалось распределение микрогелей размером от 15 мкм до 60 мкм со средним размером около 26 мкм (посредством анализа изображений с

использованием программного обеспечения Leica LAS X), а также наблюдалась фракция мелких частиц (< 5 мкм). Флуоресцентный сигнал от ВРП хорошо совпадал с изображениями частиц, полученными с помощью светлопольного микроскопа, подтверждая эффективную инкапсуляцию частиц ВРП в микрогеле. Изображения с большим увеличением, как представлено на Фиг. 5А и 5В, демонстрируют, что микрогели были почти сферическими, с частицами ВРП (размером 2-5 мкм), равномерно распределенными внутри микрогелей. Частицы ВРП в микрогелях сохранили свою первоначальную форму, напоминая изюм, что указывает на то, что весь процесс инкапсуляции согласно способу по данному изобретению оказывает минимальное влияние на целостность частиц ВРП.

[177] На Фиг. 6А, 6В и 7 представлены изображения, полученные с использованием светлопольного и флуоресцентного микроскопа, сшитых микрогелей ПЭГ, суспендированных в ФСБ. Данные изображения демонстрируют, что, хотя ПЭГ растворим в воде, сшитые микрогели ПЭГ сохраняли свою сферическую структуру в водном буфере, не разрушаясь, что указывает на успешное сшивание предшественников ПЭГ и образование микрогелей. Флуоресцентные сигналы от ВРП совпадали с частицами микрогеля, что свидетельствовало о том, что, хотя матрица ПЭГ, возможно, набухла под воздействием воды водного буфера, белки все еще оставались внутри микрогеля. Эти результаты свидетельствуют о том, что полученные сшитые микрогели ПЭГ, инкапсулирующие белок-ловушку для VEGF, обладают свойствами, необходимыми для потенциального применения с замедленным высвобождением.

[178] Хотя в вышеприведенном описании данного изобретения описаны некоторые аспекты данных способов в связи с некоторыми вариантами их реализации, а многие детали приведены для наглядности, специалистам в данной области техники будет очевидно, что концепции и принципы, описанные в данном документе, могут быть расширены до дополнительных вариантов реализации данного изобретения, и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть значительно изменены без отступления от основных принципов данного раскрытия.

Все источники, цитируемые в данном документе, включая патенты и заявки США, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Данное раскрытие может быть реализовано в других конкретных формах, без отступления от его сущности или существенных признаков, и, соответственно, ссылка должна быть сделана на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как указывающее объем раскрытия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения микрочастиц гидрогеля, включающий:

(а) объединение по меньшей мере одного сшиваемого полимера, по меньшей мере одного модулятора образования поперечных связей и порошка, содержащего по меньшей мере один белок, с углеводородным растворителем для образования суспензии диспергированной фазы;

(б) добавление указанной суспензии диспергированной фазы к раствору дисперсионной фазы, при этом указанный раствор содержит фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество, с образованием объединенной суспензии диспергированной фазы и раствора дисперсионной фазы;

(с) смешивание указанной объединенной суспензии диспергированной фазы и раствора дисперсионной фазы с образованием неводной эмульсии, содержащей множество капель углеводорода, включающей указанный по меньшей мере один сшиваемый полимер и указанный порошок, дополнительно содержащий по меньшей мере один белок во фторуглеродной жидкости; и

(d) удаление углеводородного растворителя и фторуглеродной жидкости из указанной неводной эмульсии с образованием выделенных микрочастиц гидрогеля, при этом указанные микрочастицы гидрогеля содержат по меньшей мере один указанный белок, инкапсулированный в матрицу указанного сшитого полимера.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный модулятор образования поперечных связей представляет собой нефункционализованный линейный полимер ПЭГ.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация по меньшей мере одного указанного модулятора образования поперечных связей в суспензии диспергированной фазы составляет от около 5,0% до около 35% масс./об.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная фторуглеродная жидкость представляет собой фторуглерод высокой вязкости.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный раствор дисперсионной фазы содержит перфторсодержащее соединение C5-C18.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный раствор дисперсионной фазы содержит FC-70 или перфтортрипентиламин.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный углеводородный растворитель выбран из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана и их комбинации.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный раствор дисперсионной фазы содержит перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный сшиваемый полимер содержит ядро, выбранное из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, диоксида, сополимера диоксида и полипропиленоксида, блок-сополимеров или статистических сополимеров

полиэтиленоксида, поливинилового спирта, поли(винилпирролидинона), поли(аминокислот), декстрана и любой их комбинации.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный сшиваемый полимер включает первый сшиваемый полимер, содержащий по меньшей мере одну нуклеофильную функциональную группу, и второй сшиваемый полимер, содержащий по меньшей мере одну электрофильную функциональную группу.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что молярное соотношение по меньшей мере одной указанной нуклеофильной функциональной группы к по меньшей мере одной указанной электрофильной функциональной группе составляет от около 1:1 до около 1:2.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный сшиваемый полимер содержит первый предшественник ПЭГ-NH и второй предшественник ПЭГ-NHS.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный первый предшественник ПЭГ-NH или указанный второй предшественник ПЭГ-NHS представляет собой 4- или 8-цепочечное соединение.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный белок представляет собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок, рекомбинантный белок или его фрагмент, или усеченную версию.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный белок представляет собой белок-ловушку для VEGF.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный белок-ловушка для VEGF представляет собой усеченную форму белка-ловушки для VEGF.

17. Способ по п. 14, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный белок выбран из группы, состоящей из афлиберцепта, рилонацепта, алирокумаба, дупилумаба, сарилумаба, цемиплимаба, антител против лихорадки Эбола и антител против SARS-CoV-2.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные выделенные микрочастицы гидрогеля имеют диаметр от около 1 мкм до около 200 мкм.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный порошок микронизируют с помощью использования высушивания распылением, высушивания электрораспылением, обратимого осаждения, замораживания орошением, сборки на микроподложке или их комбинации.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное смешивание включает гомогенизацию, перемешивание на вортексе, воздействие ультразвуком, кавитацию, перемешивание или их комбинацию.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные микрочастицы гидрогеля представляют собой микрочастицы замедленного высвобождения.

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация указанного порошка в указанной суспензии диспергированной фазы составляет от около 1,0% до около 30% масс./об.

23. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация по меньшей мере одного указанного сшиваемого полимера в суспензии диспергированной фазы составляет от около 5,0% до около 35% масс./об.

24. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация указанного фторсодержащего поверхностно-активного вещества в указанном растворе дисперсионной фазы составляет от около 0,1% до около 5,0% масс./об.

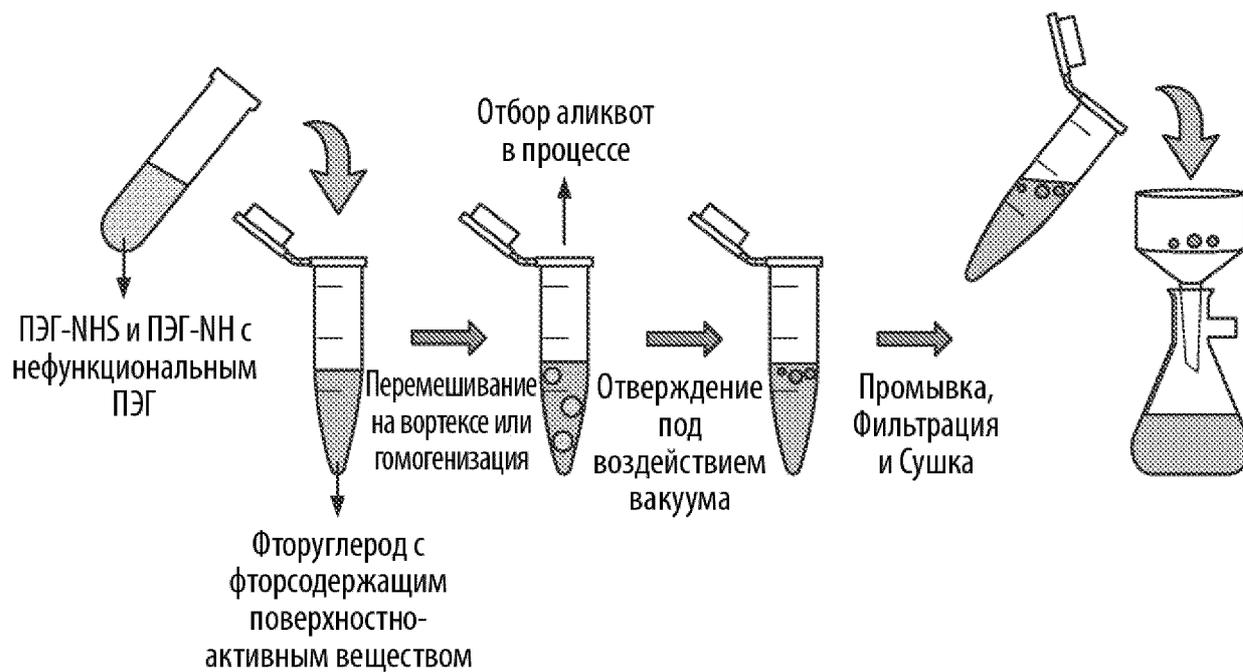
25. Способ по п. 1, дополнительно включающий суспендирование указанных выделенных микрочастиц гидрогеля в фармацевтически приемлемом составе.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что состав содержит рН-буференный раствор, водный раствор или неводный раствор.

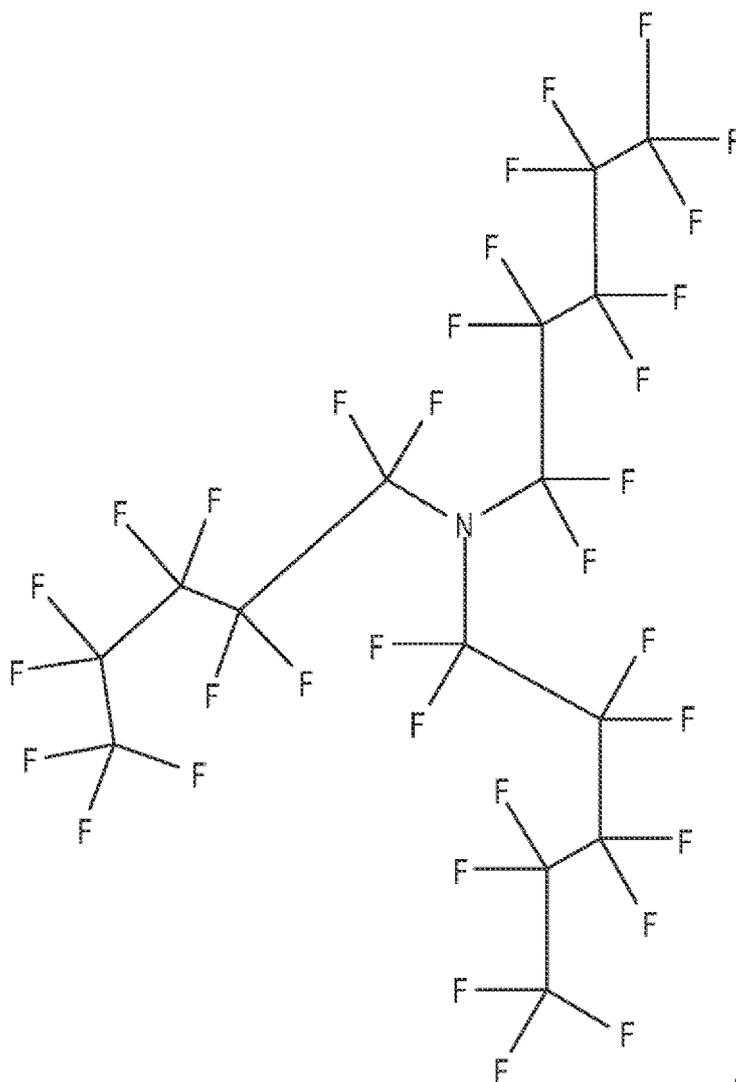
27. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный порошок дополнительно содержит по меньшей мере один эксципиент.

28. Частица гидрогеля, полученная способом по п. 1.

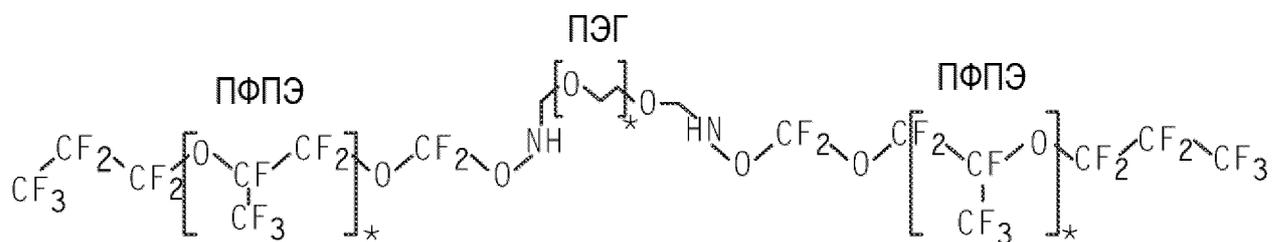
По доверенности



Фиг. 1А

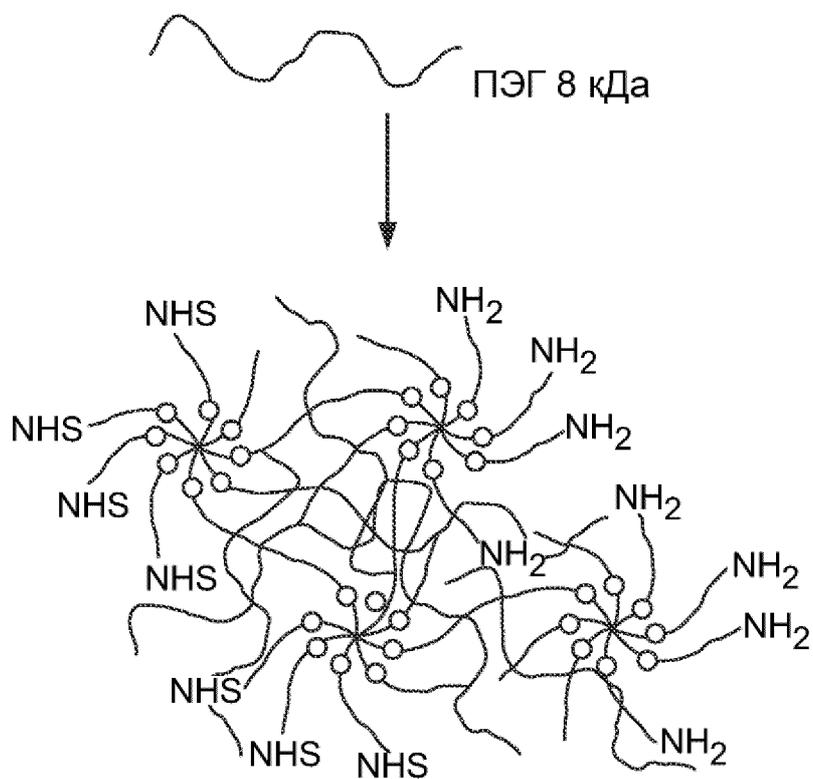
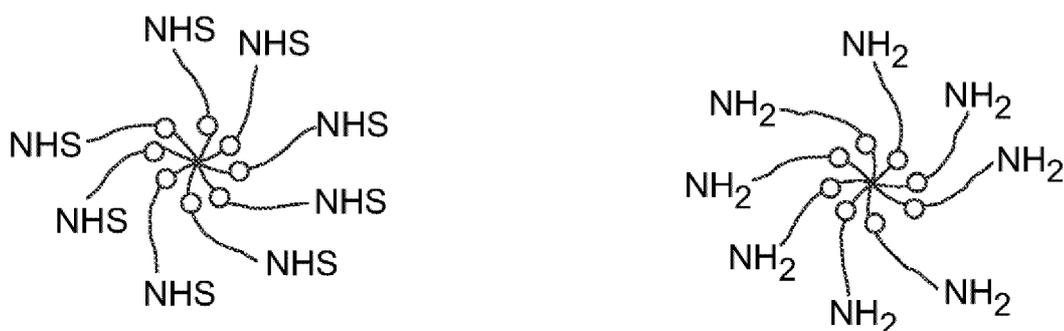


Фиг. 1В

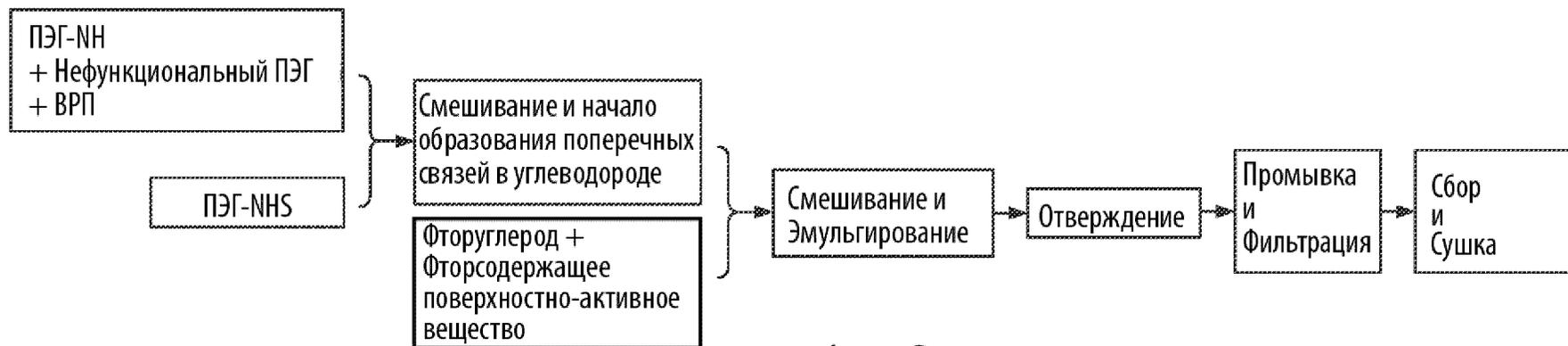


Pico-Surf 1 (ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ)

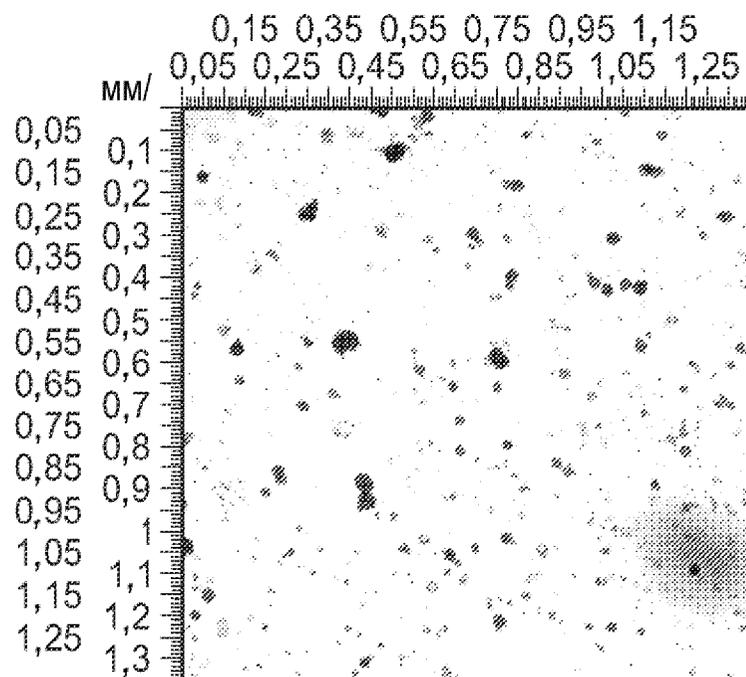
Фиг. 1С



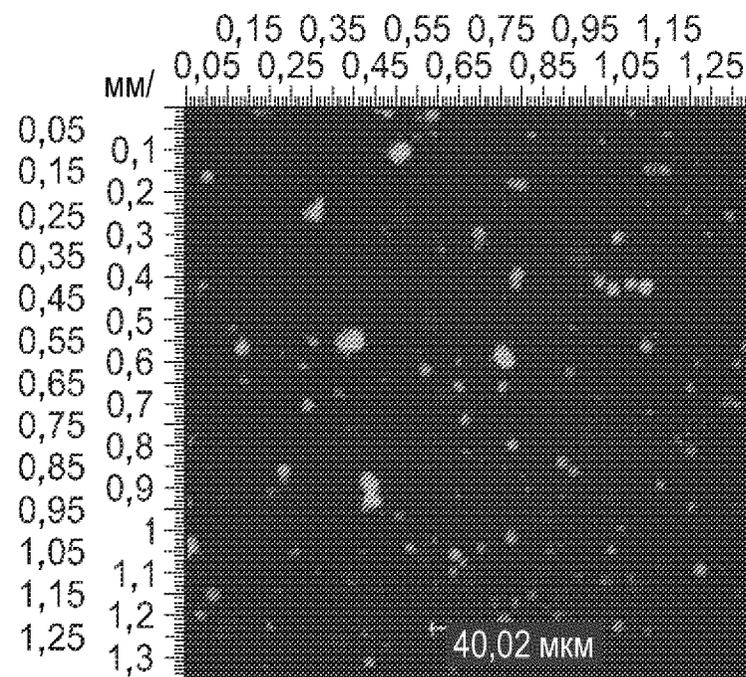
Фиг. 2



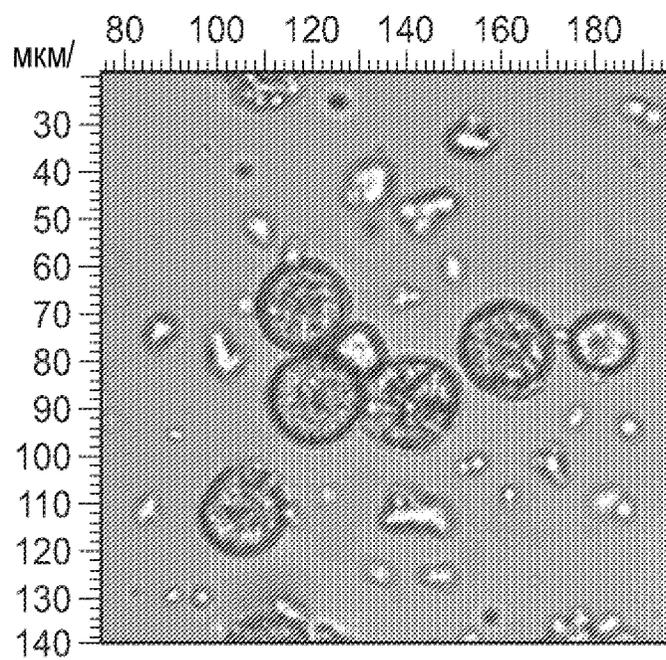
Фиг. 3



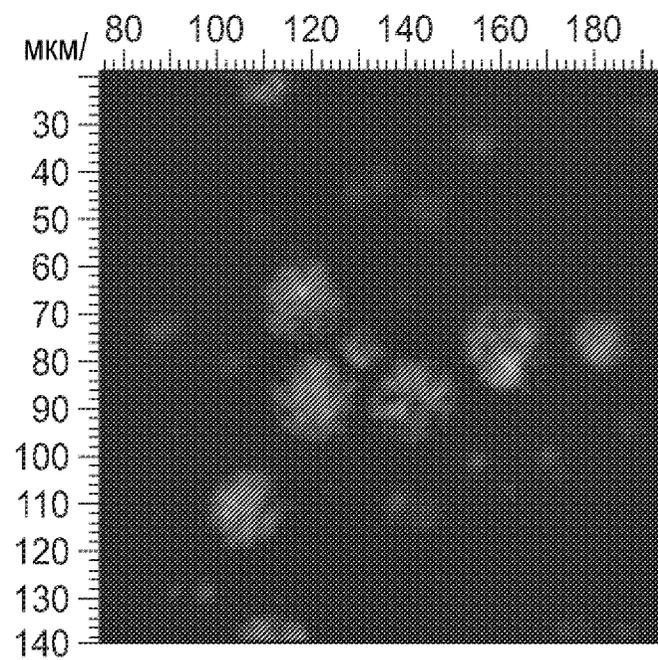
Фиг. 4А



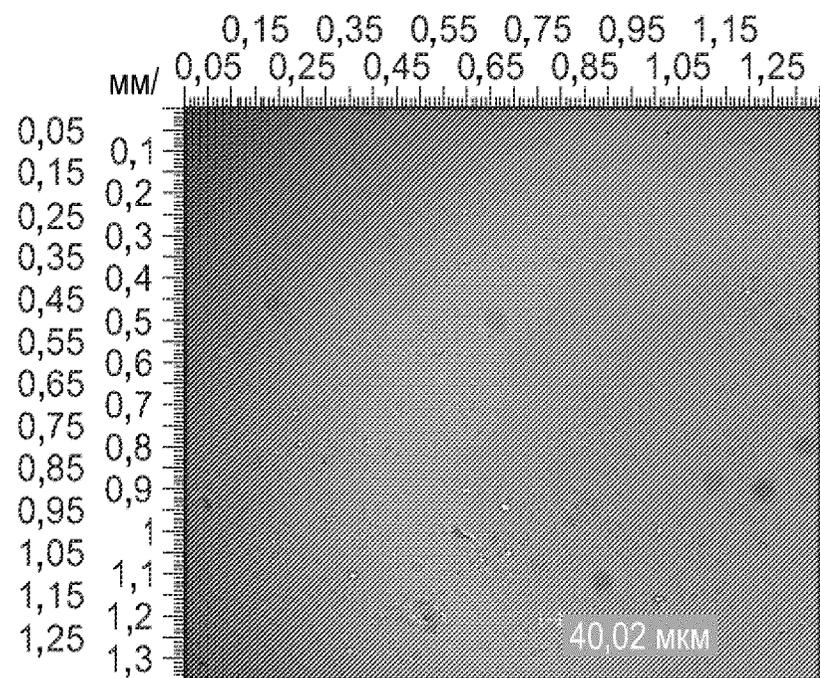
Фиг. 4В



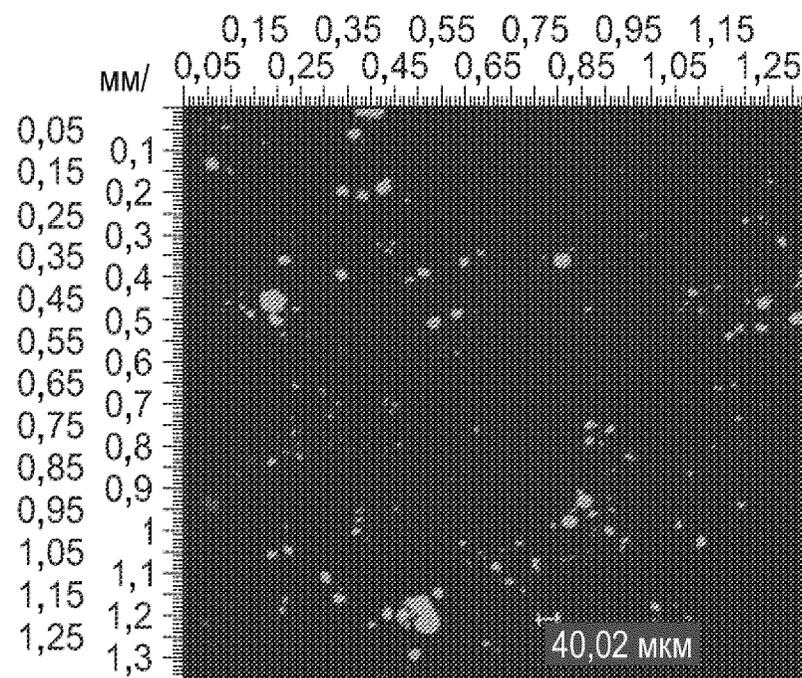
Фиг. 5А



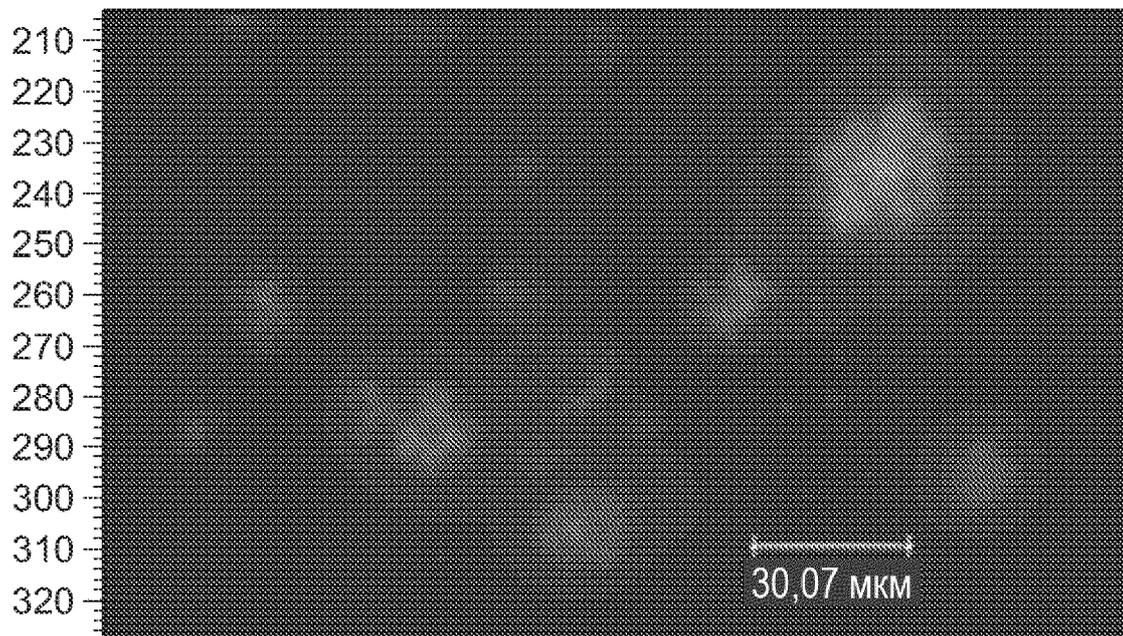
Фиг. 5В



Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7