

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046077**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.05

(21) Номер заявки
202190224

(22) Дата подачи заявки
2019.07.09

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

(54) **РЕГУЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ В ГИДРОГЕЛЯХ**

(31) **62/695,472**

(32) **2018.07.09**

(33) **US**

(43) **2021.04.16**

(86) **PCT/US2019/040940**

(87) **WO 2020/014185 2020.01.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Чен Хантер, Шлезингер Эрика,
Файндт Джеймс (US)**

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

(56) **US-A1-2013156752
US-A1-2016331738
EP-A2-2389895
US-A1-2013071462
EP-A1-2708224
US-A1-2016151535
US-A1-2017258907**

(57) Изобретение относится к способу получения гидрогеля с требуемым профилем высвобождения биологического вещества, находящегося в гидрогеле, причем до введения в гидрогель биологическое вещество представлено в твердофазной композиции, где гидрогель характеризуется требуемым периодом высвобождения, который включает: (a) предварительное определение массового отношения биологического вещества и вспомогательного вещества в диапазоне от 60 до 90% и предварительное определение по меньшей мере одного из следующих параметров: (a) количество нуклеофильных групп в первом предшественнике; (b) количество электрофильных групп во втором предшественнике; (c) молекулярная масса первого предшественника; (d) молекулярная масса второго предшественника; (e) массовое отношение биологического вещества и вспомогательного вещества к гидрогелю; (f) массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции и (g) отношение площади поверхности к объему гидрогеля.

B1

046077

046077

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/695472, поданной 9 июля 2018 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу получения гидрогеля с требуемым профилем высвобождения биологического вещества, находящегося в гидрогеле.

Уровень техники

Для терапевтических агентов необходимы средства эффективной доставки. Доставка лекарственного соединения относится к введению фармацевтического соединения для достижения терапевтического эффекта у людей или животных. Подходящими являются механизмы доставки, обеспечивающие высвобождение агента в течение некоторого времени. Технологии доставки лекарственных соединений могут способствовать модификации профиля высвобождения лекарственного соединения, его абсорбции, распределения или выведения лекарственного соединения для успешного улучшения эффективности и безопасности продукта, а также удобства для пациента и соблюдения режима лечения.

Сущность изобретения

Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения гидрогеля с требуемым профилем высвобождения биологического вещества, находящегося в гидрогеле, причем до введения в гидрогель биологическое вещество представлено в твердофазной композиции, где гидрогель характеризуется требуемым периодом высвобождения, составляющим от одной недели до шести месяцев, в течение которого происходит высвобождение по меньшей мере 90% биологического вещества, и при этом указанный способ включает: (а) предварительное определение массового отношения биологического вещества и вспомогательного вещества в диапазоне от 60 до 90%, и предварительное определение по меньшей мере одного из следующих параметров: (а) количество нуклеофильных групп в первом предшественнике; (b) количество электрофильных групп во втором предшественнике; (с) молекулярная масса первого предшественника; (d) молекулярная масса второго предшественника; (е) массовое отношение биологического вещества и вспомогательного вещества к гидрогелю; (f) массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции; и (g) отношение площади поверхности к объему гидрогеля; (b1) определение молярного отношения нуклеофильной группы к электрофильной группе в отдельности до тех пор, пока не будет достигнут желаемый профиль высвобождения с использованием прогностической модели; или (b2) определение молярного отношения нуклеофильной группы к электрофильной группе в комбинации с любыми вышеуказанными параметрами, которые не были предварительно определены на стадии (а), до тех пор, пока не будет достигнут требуемый профиль высвобождения с использованием прогностической модели; и поперечное сшивание первого предшественника и второго предшественника при определенном указанном молярном отношении вокруг твердофазной композиции в безводных условиях, где молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет от 1,1 до 2, и где первый предшественник и второй предшественник представляют собой молекулы, которые могут быть шиты друг с другом, образуя гидрогель.

В некоторых вариантах реализации молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет от 1,5 до 2,0.

В некоторых вариантах реализации молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет менее 1.

В некоторых вариантах реализации молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет от 1,3 до 1,8.

В некоторых вариантах реализации биологическое вещество представляет собой рекомбинантный белок, такой как антитело и белок Tгар (гибридный белок с доменами рецептора-ловушки).

В некоторых вариантах реализации электрофильная группа включает сукцинимидную группу, группу сукцинимидного сложного эфира, n-гидроксисукцинимидную, малеимидную, сукцинатную, нитрофенилкарбонатную, альдегидную, винилсульфоновую, азидную, гидразидную, изоцианатную, диизоцианатную, тозилную, трезильную или карбонилдиимидазольную группу.

В некоторых вариантах реализации нуклеофильная группа включает группу первичного амина или первичного тиола.

В некоторых вариантах реализации количество нуклеофильных групп в первом предшественнике составляет от 2 до 10, например, 4 или 8.

В некоторых вариантах реализации количество электрофильных групп во втором предшественнике составляет от примерно 2 до примерно 10, например 4 или 8.

В некоторых вариантах реализации первый предшественник содержит (аминопропил)_mполиоксиэтилен, где m равен от примерно 2 до примерно 10.

В некоторых вариантах реализации молекулярная масса первого предшественника составляет от примерно 1 до примерно 100 кДа.

В некоторых вариантах реализации второй предшественник содержит (сукцинимидилоксиглутарил)_nполиоксиэтилен, где n равен от примерно 2 до примерно 10.

В некоторых вариантах реализации молекулярная масса второго предшественника составляет от примерно 1 до примерно 100 кДа.

В некоторых вариантах реализации массовое отношение биологического вещества к гидрогелю составляет от примерно 10 до примерно 90%. В некоторых вариантах реализации массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции составляет от примерно 30 до примерно 95%.

В некоторых вариантах реализации предложенный способ дополнительно включает получение твердофазной композиции посредством распылительной сушки, измельчения, кристаллизации, осаждения, распылительной сублимационной сушки (англ. spray freezing), сушки сверхкритической жидкости, электрораспыления или микросборки (англ. microtemplating).

В некоторых вариантах реализации способ получения твердофазной композиции представляет собой распылительную сушку.

В некоторых вариантах реализации твердофазная композиция содержит частицы диаметром ≤ 20 мкм.

В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения включает период высвобождения примерно от двух месяцев до шести месяцев, в течение которого происходит высвобождение по меньшей мере 90% биологического вещества.

В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения включает период высвобождения примерно от одной недели до двух месяцев, в течение которого происходит высвобождение по меньшей мере 90% биологического вещества.

В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения демонстрирует почти линейное высвобождение в течение по меньшей мере одной недели.

В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения включает участок отсроченного высвобождения, сигмоидальную форму, линейный участок, почти линейный участок, логарифмический участок, экспоненциальный участок или их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации поперечное сшивание происходит в присутствии органического растворителя, который является безводным и гидрофобным.

В некоторых вариантах реализации указанный органический растворитель представляет собой метилхлорид, этилацетат, диметилкарбонат, хлороформ или их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации стадию определения осуществляют с помощью прогностической модели.

В некоторых вариантах реализации молярное отношение оказывает постоянный эффект на профиль высвобождения в прогностической модели.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлено схематическое пояснение характерного сигмоидального профиля высвобождения моноклонального антитела (mAb) из гидрогеля.

На фиг. 2 представлена диаграмма, демонстрирующая влияние молярного отношения на профиль высвобождения. Экспериментальные профили высвобождения сглажены по логистической 5-параметрической (L5P) кривой. Все нагруженные белком гидрогели из поперечно-сшитого ПЭГ (X-ПЭГ), показанные на данной фигуре, представляют собой mAb IgG1-X-ПЭГ с содержанием белка 81,9 мас./мас.% в высушенном распылением композиции, ПЭГ-компоненты ПЭГ-NHS HGEO с молекулярной массой 40 кДа и ПЭГ-NH HGEO с молекулярной массой 15 кДа, с молярным отношением 1,1, 1,3 и 1,8 и нагрузкой по твердому веществу 60, 60 и 70% соответственно.

На фиг. 3 представлена диаграмма, демонстрирующая, что структура молекулы оказывает минимальное влияние на профиль высвобождения. Экспериментальные профили высвобождения сглажены по L5P кривой. Все нагруженные белком гидрогели, показанные на данной фигуре, содержат высушенное распылением композиции с содержанием белка 90 мас./мас.%, ПЭГ-компоненты ПЭГ-NHS HGEO с молекулярной массой 40 кДа и ПЭГ-NH HGEO с молекулярной массой 15 кДа, с нагрузкой по твердому веществу 60 мас./мас.%, молярным отношением примерно 1,8-1,9 и отношением площади поверхности к объему примерно 3 мм^{-1} - 4 мм^{-1} . Высвобождение из mAb IgG4-X-ПЭГ показано не закрашенными кружками, а высвобождение из mAb IgG1-X-ПЭГ показано закрашенными кружками. Поскольку оба mAb имеют сходные размеры, что является главным свойством, влияющим на диффузию через пористую матрицу, то можно ожидать, что кинетика высвобождения из гидрогеля не будет зависеть от структуры молекулы.

На фиг. 4 представлена диаграмма, демонстрирующая влияние содержания белка в высушенном распылением композиции на профиль высвобождения. Все нагруженные белком гидрогели, показанные на данной фигуре, содержат mAb IgG1 с нагрузкой 60% и молярным отношением 1,5, и ПЭГ-компоненты ПЭГ-NHS HGEO с молекулярной массой 40 кДа и ПЭГ-NH HGEO с молекулярной массой 15 кДа с содержанием белка 90 мас./мас.% и отношением площади поверхности к объему 4 мм^{-1} (квадраты) или с содержанием белка 50 мас./мас.% и отношением площади поверхности к объему 35 мм^{-1} (ромбы). Данные не нормализованы по отношению площади поверхности к объему, но при сравнении этого набора данных с фиг. 6 очевидно, что наблюдаемое различие в профиле высвобождения не обусловлено только

отношением площади поверхности к объему, поскольку тренды противоположны. Таким образом, наблюдаемое различие в группе полученных данных обусловлено содержанием белка в высушенной распылении композиции и/или совокупным эффектом отношения площади поверхности к объему и содержания белка в высушенной распылении композиции.

На фиг. 5 представлена диаграмма, демонстрирующая влияние нагрузки по твердому веществу на профиль высвобождения. Все нагруженные белком гидрогели, показанные на данной фигуре, имеют молярное отношение 1,5, содержат ПЭГ-компоненты ПЭГ-NHS HGEO с молекулярной массой 40 кДа и ПЭГ-NH HGEO с молекулярной массой 15 кДа и имеют содержание белка 50 мас./мас.% с mAb IgG4 с нагрузкой по твердому веществу 30%, отношением площади поверхности к объему 79 мм^{-1} (квадраты) или с mAb IgG1 с нагрузкой по твердому веществу 60% и отношением площади поверхности к объему 35 мм^{-1} (ромбы). На фиг. 3 показано, что строение молекулы оказывает минимальное влияние на профиль высвобождения. На фиг. 5 и 6 показано, что увеличение отношения площади поверхности к объему оказывает непосредственное влияние на первоначальное "взрывное" (англ. burst) высвобождение. Таким образом, различие фазы растворения на профилях высвобождения для приведенных наборов данных, представленных на указанной фигуре, обусловлено влиянием нагрузки по твердому веществу. Общее влияние на профиль высвобождения является результатом комбинированного эффекта нагрузки по твердому веществу и отношения площади поверхности к объему.

На фиг. 6 представлена диаграмма, иллюстрирующая влияние фактора формы, описанного отношением площади поверхности к объему, на профиль высвобождения, в частности, первоначальное "взрывное" высвобождение. Все нагруженные белком гидрогели, показанные на данной фигуре, содержат ПЭГ-компоненты ПЭГ-NHS HGEO с молекулярной массой 40 кДа и ПЭГ-NH HGEO с молекулярной массой 15 кДа, mAb IgG1, имеют содержание белка 80%, нагрузку по твердому веществу 80% и молярное отношение 1,7 с низким отношением площади поверхности к объему в форме пластин, 12 мм^{-1} (квадраты), или с высоким отношением площади поверхности к объему в форме микрочастиц, $> 30 \text{ мм}^{-1}$ (ромбы).

На фиг. 7 представлена диаграмма, демонстрирующая возможность изменения нескольких факторов вместе с регулированием профиля высвобождения для достижения почти линейного высвобождения на протяжении 1-3 месяцев. Все нагруженные белком гидрогели, показанные на данной фигуре, содержат ПЭГ-компоненты ПЭГ-NHS HGEO с молекулярной массой 40 кДа и ПЭГ-NH HGEO с молекулярной массой 15 кДа, mAb IgG1, имеют содержание белка 82% в форме пластин с молярным отношением 1,8 и нагрузкой по твердому веществу 60% (ромбы), с молярным отношением 1,7 и нагрузкой по твердому веществу 80% (квадраты) или с молярным отношением 1,5 и нагрузкой по твердому веществу 90% (треугольники).

На фиг. 8 представлена диаграмма, демонстрирующая почти линейное высвобождение для пяти различных гидрогелевых композиций, нагруженных белком, с четырьмя различными mAb и одним белком Tgr (т.е. гибридным белком с доменами рецептора-ловушки). Все нагруженные белком гидрогелевые композиции, показанные на данной фигуре, содержат ПЭГ-компоненты ПЭГ-NHS HGEO с молекулярной массой 40 кДа и ПЭГ-NH HGEO с молекулярной массой 15 кДа.

На фиг. 9 представлена диаграмма, демонстрирующая, как можно регулировать профили высвобождения в формате микрочастиц с большим отношением площади поверхности к объему в сторону более линейного и более продолжительного высвобождения посредством изменения комбинации факторов, включая молярное отношение, содержание белка и нагрузку по твердому веществу. Все нагруженные белком гидрогелевые композиции, показанные на данной фигуре, содержат ПЭГ-компоненты ПЭГ-NHS HGEO с молекулярной массой 40 кДа и ПЭГ-NH HGEO с молекулярной массой 15 кДа, а также mAb IgG1, и получены в форме микрочастиц.

На фиг. 10 представлен модельный анализ исследования, выполненного в примере 2. Эффективность $>0,95$ при $AC < 6$ означает большую прогностическую силу модели.

На фиг. 11 показано, что высвобождение обусловлено тремя главными механизмами: диффузия, растворение и истощение (англ. depletion). Первоначальное высвобождение (взрывное) в значительной степени обусловлено гидратацией геля и диффузией белка из внешней части матрицы; диффузия ограничена поперечным сшиванием, которое препятствует гидратации инкапсулированного белка в матрице. При растворении, после гидролиза поперечных связей в водной среде, происходит обнажение дополнительной части белка, его гидратация и высвобождение из матрицы до истощения лекарственной нагрузки. Кинетика высвобождения может быть отрегулирована до требуемой продолжительности и требуемой формы посредством изменения комбинаций ММ ПЭГ и молярного отношения.

На фиг. 12 представлена диаграмма рассеяния фактических от прогнозных значений измеренного времени до 99% высвобождения в зависимости от спрогнозированного времени до 99% высвобождения на основании параметров модели. Критерий согласия прогностической модели для 99% высвобождения определен с помощью $RSquare Adj$ ($>96\%$).

На фиг. 13 показано, что все три главных фактора имеют статистически значимое влияние ($p < 0,05$) на время до полного высвобождения (99%). Величина каждого эффекта в порядке ранжирования: 1. Молярное отношение (постоянный фактор-отрицательная корреляция); 2. Молекулярная масса ПЭГ-NHS

(категориальный фактор, т.е. непостоянный или дискретный) и 3. Молекулярная масса ПЭГ-NH (категориальный фактор). ПЭГ-NH с молекулярной массой 40 кДа (выделенный серыми кружками) оказывает наибольший эффект из испытанных реагентов ПЭГ-NH. ПЭГ-NHS с молекулярной массой 15 кДа (выделенный незакрашенными кружками) оказывает наибольший эффект из испытанных реагентов ПЭГ-NHS.

На фиг. 14 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,6, молекулярной массы (ММ) ПЭГ-NH 10 кДа и ММ ПЭГ-NHS 10 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 42,5 дней для 99% высвобождения.

На фиг. 15 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,71, ММ ПЭГ-NH 40 кДа и ММ ПЭГ-NHS 15 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 14 дней для 99% высвобождения.

На фиг. 16 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,54, ММ ПЭГ-NH 40 кДа и ММ ПЭГ-NHS 15 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 21 день для 99% высвобождения.

На фиг. 17 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,68, ММ ПЭГ-NH 10 кДа и ММ ПЭГ-NHS 15 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 21 день для 99% высвобождения. На фиг. 16-17 показано, что такой же период высвобождения может быть достигнут при выборе других комбинаций реагентов ПЭГ и молярных отношений.

На фиг. 18 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,84, ММ ПЭГ-NH 40 кДа и ММ ПЭГ-NHS 15 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 8,88 дня для 99% высвобождения.

На фиг. 19 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,30, ММ ПЭГ-NH 15 кДа и ММ ПЭГ-NHS 10 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 58,9 дня для 99% высвобождения. На фиг. 18-19 показано, что при изменении молярного отношения и реагентов ПЭГ, может быть достигнут период высвобождения от примерно 8 до 59 дней.

На фиг. 20 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,30, ММ ПЭГ-NH 40 кДа и ММ ПЭГ-NHS 15 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 30,9 дня для 99% высвобождения. На фиг. 18 и 20 показано, что при изменении только молярного отношения может быть достигнут период высвобождения в пределах допустимого диапазона для данной комбинации ПЭГ.

На фиг. 21 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,83, ММ ПЭГ-NH 20 кДа и ММ ПЭГ-NHS 20 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 30 дней для 99% высвобождения.

На фиг. 22 представлена диаграмма, демонстрирующая, что в соответствии с прогностической моделью комбинация молярного отношения 1,46, ММ ПЭГ-NH 10 кДа и ММ ПЭГ-NHS 15 кДа может обеспечивать получение гидрогеля с периодом высвобождения 30 дней для 99% высвобождения. На фиг. 21 и 22 показано, что такой же период высвобождения может быть достигнут при выборе других комбинаций реагентов ПЭГ и молярных отношений.

Подробное описание изобретения

Поперечно-сшитые ПЭГ гидрогели, в которые включены микронизированные твердофазные белки, являются перспективными для устойчивого высвобождения в течение порядка нескольких недель или месяцев при высокой стабильности белка. На основании продемонстрированной нагрузочной емкости до 88 мас./мас.% от общей нагрузки по твердому веществу, такой подход является рациональным для молекул с низкими и средними дозами с продолжительностью высвобождения порядка нескольких месяцев, например, примерно от 1 недели до 6 месяцев. Для разработки такой системы в качестве базовой системы доставки, подходящей для различных профилей высвобождения целевого продукта, регулируемой для устойчивого высвобождения, определены важные параметры композиции, влияющие на кинетику высвобождения, и указанные параметры изучены в многофакторных исследованиях. Внедрен способ нелинейного моделирования профиля высвобождения, учитывающий форму, типичную для профилей высвобождения разлагаемых гидрогелей, и указанный способ использован для оценки влияния параметров композиции на высвобождение белка.

Настоящее изобретение отчасти основано на обнаружении того факта, что следующие параметры важны для воздействия на профиль высвобождения биологического вещества, находящегося в гидрогеле: (а) молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе, причем первый предшественник содержит две или более нуклеофильных групп, и второй предшественник содержит две или более электрофильных групп; (b) количество нуклеофильных групп в первом предшественнике; (c) количество электрофильных групп во втором предшественнике; (d) молекулярная масса первого предшественника; (e) молекулярная масса второго предшественника; (f) массовое отношение биологического вещества и вспомогательного вещества к гидрогелю; (g) массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции; и (h) отношение площади поверхности к объему гидрогеля. Изменяя по

меньшей мере один из указанных параметров при заданном значении других параметров, можно получить ряд гидрогелевых композиций с нагрузкой биологическим веществом, имеющих разные профили высвобождения.

В некоторых вариантах реализации можно использовать количественную прогностическую модель для определения указанных параметров для требуемого профиля высвобождения. Например, используя прогностическую модель, можно заранее определить один или более из вышеуказанных параметров и изменить один или более рассматриваемых параметров для оценки их влияния на профиль высвобождения. Рассматриваемый параметр можно изменять до достижения требуемого профиля высвобождения. Среди прочего, прогностическая модель обеспечивает возможность: (1) достижения одинакового периода высвобождения при выборе разных комбинаций предшественников и молекулярных масс; (2) достижения определенного периода высвобождения, например 8-59 дней, за счет изменения как молярного отношения, так и предшественников; и (3) достижения периода высвобождения в пределах допустимого диапазона для данной комбинации предшественников посредством изменения только молярного отношения.

Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения гидрогеля с требуемым профилем высвобождения биологического вещества, находящегося в гидрогеле, причем до введения в гидрогель биологическое вещество представлено в твердофазной композиции, где гидрогель характеризуется требуемым периодом высвобождения, составляющим от одной недели до шести месяцев, в течение которого происходит высвобождение по меньшей мере 90% биологического вещества, и при этом указанный способ включает: (а) предварительное определение массового отношения биологического вещества и вспомогательного вещества в диапазоне от 60 до 90%, и предварительное определение по меньшей мере одного из следующих параметров: (а) количество нуклеофильных групп в первом предшественнике; (b) количество электрофильных групп во втором предшественнике; (с) молекулярная масса первого предшественника; (d) молекулярная масса второго предшественника; (е) массовое отношение биологического вещества и вспомогательного вещества к гидрогелю; (f) массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции; и (g) отношение площади поверхности к объему гидрогеля; (b1) определение молярного отношения нуклеофильной группы к электрофильной группе в отдельности до тех пор, пока не будет достигнут желаемый профиль высвобождения с использованием прогностической модели; или (b2) определение молярного отношения нуклеофильной группы к электрофильной группе в комбинации с любыми вышеуказанными параметрами, которые не были предварительно определены на стадии (а), до тех пор, пока не будет достигнут требуемый профиль высвобождения с использованием прогностической модели; и поперечное сшивание первого предшественника и второго предшественника при определенном указанном молярном отношении вокруг твердофазной композиции в безводных условиях, где молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет от 1,1 до 2, и где первый предшественник и второй предшественник представляют собой молекулы, которые могут быть сшиты друг с другом, образуя гидрогель.

Предшественники не являются гидрогелями, но могут быть поперечно сшиты друг с другом с образованием гидрогеля. Поперечные связи могут быть образованы за счет ковалентных связей или физических связей. Примерами физических связей являются ионные связи, гидрофобная ассоциация сегментов молекулы предшественника и кристаллизация сегментов молекулы предшественника. Предшественники можно стимулировать для взаимодействия с образованием поперечно-сшитого гидрогеля. Предшественники могут быть способны к полимеризации и могут содержать сшивающие агенты, которые часто, но не всегда, являются способными к полимеризации предшественниками. Способные к полимеризации предшественники и, следовательно, предшественники, которые содержат функциональные группы, которые могут взаимодействовать друг с другом с образованием матриц и/или полимеров, состоят из повторяющихся звеньев. Предшественники могут быть полимерами.

Для образования ковалентно сшитых гидрогелей предшественники ковалентно сшиваются друг с другом. В целом, полимерные предшественники представляют собой полимеры, которые соединяются с другими полимерными предшественниками в двух или более точках, и каждая точка представляет собой связь с тем же или с другим полимером. Предшественники с по меньшей мере двумя реакционноспособными центрами (например, при свободнорадикальной полимеризации) могут служить в качестве сшивающих агентов, поскольку каждая реакционноспособная группа может участвовать в образовании другой растущей полимерной цепи. В случае функциональных групп без реакционноспособного центра, среди прочего, для поперечного сшивания необходимы три или более таких функциональных групп в предшественниках по меньшей мере одного типа. Например, многие электрофильно-нуклеофильные реакции протекают с расходом электрофильных и нуклеофильных функциональных групп, поэтому необходима третья функциональная группа, чтобы предшественник мог образовывать поперечную связь. Таким образом, указанные предшественники могут содержать три или более функциональных групп и могут быть поперечно-сшиты предшественниками с двумя или более функциональными группами. Поперечно-сшитая молекула может быть поперечно-сшита ионными или ковалентными связями, физическими силами или другими силами притяжения. Однако ковалентная поперечная связь обычно обеспечивает стабильность и предсказуемость в отношении строения продукта реагента.

В некоторых вариантах реализации каждый предшественник является многофункциональным, что означает, что он содержит две или более электрофильных или нуклеофильных функциональных групп, так что нуклеофильная функциональная группа одного предшественника может взаимодействовать с электрофильной функциональной группой другого предшественника с образованием ковалентной связи. По меньшей мере один из предшественников содержит более двух функциональных групп, так что в результате электрофильно-нуклеофильных реакций такие предшественники объединяются с образованием поперечно-сшитых полимерных продуктов.

Предшественники могут быть низкомолекулярными соединениями, такими как акриловая кислота или винилкапролактам, более крупными соединениями, содержащими полимеризуемые группы, такими как полиэтиленгликоль с концевыми акрилатными группами (ПЭГ-диакрилат), или другими полимерами, содержащими этиленненасыщенные группы, такими как соединения, описанные в патенте США № 4938763, Dunn et al., в патентах США № 5100992 и 4826945, Cohn et al., или в патентах США № 4741872 и 5160745, DeLuca et al., полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в той степени, в которой они не противоречат описанию в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации каждый предшественник содержит только нуклеофильные или только электрофильные функциональные группы, при условии, что в реакции поперечного сшивания используют и нуклеофильные, и электрофильные предшественники. Так, например, если сшивающий агент содержит нуклеофильные функциональные группы, такие как амины, то функциональный полимер может содержать электрофильные функциональные группы, такие как N-гидроксисукцинимидные. С другой стороны, если сшивающий агент содержит электрофильные функциональные группы, такие как сульфосукцинимиды, то функциональный полимер может содержать нуклеофильные функциональные группы, такие как аминные или тиольные. Таким образом, можно использовать такие функциональные группы, как белки, поли(аллиламин) или ди- или полифункциональный поли(этиленгликоль) с концевыми аминогруппами.

Предшественники могут содержать биологически инертные и гидрофильные фрагменты, например, ядро. В случае разветвленного полимера ядро относится к непрерывному фрагменту молекулы, связанному с ответвлениями, исходящими из ядра, причем каждое ответвление заканчивается функциональной группой. Гидрофильный предшественник или фрагмент предшественника имеет растворимость по меньшей мере 1 г/100 мл в водном растворе. Гидрофильный фрагмент может представлять собой, например, простой полиэфир, например, полиалкиленоксиды, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленоксид (ПЭО), полиоксиэтилен, полиэтиленоксид-со-полипропиленоксид (11110), сополиэтиленоксидные блок-сополимеры или статистические сополимеры и поливиниловый спирт (ПВС), поли(винилпирролидон) (ПВП), поли(аминокислоты), декстран или белок. Предшественники могут содержать фрагмент полиалкиленгликоля и могут содержать в своей основе полиэтиленгликоль с содержанием по меньшей мере примерно 80 или 90% по массе полимера, содержащего полиэтиленоксидные повторяющиеся звенья. Простые полиэфиры и, более конкретно, поли(оксиалкилены) или поли(этиленгликоль), или полиэтиленгликоль обычно являются гидрофильными. Как известно в данной области техники, термин ПЭГ используют для обозначения ПЭО с гидроксильными концевыми группами или без них.

Могут быть получены предшественники с гидрофобным фрагментом, при условии, что полученный гидрогель удерживает требуемое количество воды. В некоторых случаях предшественник, тем не менее, растворим в воде, поскольку он содержит также гидрофильный фрагмент. В других случаях предшественник образует дисперсию в воде (суспензию), но, тем не менее, способен взаимодействовать с образованием поперечно-сшитого материала. Некоторые гидрофобные фрагменты могут содержать множество алкильных, полипропиленовых или других групп. Некоторые предшественники с гидрофобными фрагментами доступны в продаже под торговыми названиями PLURONIC® F68, JEFFAMINE® или TEC-TRONIC®. Гидрофобная молекула или гидрофобный фрагмент сополимера или т.п. представляет собой фрагмент, который является достаточно гидрофобным, чтобы обеспечивать агрегацию молекулы (например, полимера или сополимера) с образованием мицелл или микрофаз, содержащих гидрофобные домены, в водной непрерывной фазе, или фрагмент, который при испытании его как такового, является достаточно гидрофобным для осаждения из или иным образом изменения фазового состояния в объеме водного раствора воды с pH от примерно 7 до примерно 7,5 при температуре от примерно 30 до примерно 50°C.

Предшественники могут содержать множество ответвлений, например, 2-100 ответвлений, и каждое ответвление имеет конец, с учетом того, что некоторые предшественники могут представлять собой дендримеры или другие материалы с высокой степенью разветвленности. Конец каждого ответвления может содержать нуклеофильную или электрофильную группу. Ответвление предшественника гидрогеля относится к линейной цепи химических групп, которые связывают способную к поперечному сшиванию функциональную группу с полимерным ядром. Некоторые варианты реализации представляют собой предшественники, содержащие от 3 до 300 ответвлений; специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах диапазонов, указанных в явном виде, на-

пример, от 4 до 16, от 8 до 100 или по меньшей мере 6 ответвлений.

В некоторых вариантах реализации первый предшественник может содержать примерно 2-10, нуклеофильных групп.

В некоторых вариантах реализации второй предшественник может содержать примерно 2-10 электрофильных групп.

Таким образом, гидрогели могут быть получены, например, из предшественника с множеством ответвлений с первым набором функциональных групп и другого предшественника с множеством ответвлений, содержащего второй набор функциональных групп. Например, предшественник с шестью или семью ответвлениями может содержать гидрофильные ответвления, например, полиэтиленгликоль с концевыми группами первичного амина с молекулярной массой ответвлений от примерно 1000 до примерно 40000 Дальтон (Да); специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах границ, указанных в явном виде. Такие предшественники могут быть смешаны с относительно более низкомолекулярными предшественниками, например, с соединениями с молекулярной массой от примерно 100 Да до примерно 5000 Да, или не более примерно 800 Да, 1000 Да, 2000 Да или 5000 Да, содержащими по меньшей мере примерно три функциональные группы или от примерно 3 до примерно 16 функциональных групп; специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах значений, указанных в явном виде. Такие низкомолекулярные соединения могут быть или не быть полимерами, и могут быть природными или синтетическими.

В некоторых вариантах реализации предшественники могут быть дендримерами. Дендримеры представляют собой радиально симметричные полимеры с высокой степенью разветвленности, в которых атомы расположены во многих ответвлениях и подответвлениях, исходящих из центрального ядра. В некоторых вариантах реализации предшественники не являются дендримерами.

В качестве предшественников можно использовать пептиды. Обычно предпочтительны пептиды, содержащие менее примерно 10 остатков, хотя можно использовать более длинные последовательности (например, белки). Специалистам в данной области техники понятно, что включены все диапазоны и значения в пределах границ, указанных в явном виде, например, 1-10, 2-9, 3-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7. Некоторые аминокислоты содержат нуклеофильные группы (например, группы первичного амина или тиольные группы) или группы, которые могут быть при необходимости дериватизованы для внедрения нуклеофильных групп или электрофильных групп (например, карбоксильных или гидроксильных групп).

Некоторые гидрогели получают с использованием предшественника, содержащего полиэтиленгликоль. Полиэтиленгликоль (ПЭГ, также называемый полиэтиленоксидом в случае высокой молекулярной массы) относится к полимеру с повторяющейся группой $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, где n равен по меньшей мере 3. Таким образом, полимерный предшественник, содержащий полиэтиленгликоль, содержит по меньшей мере три такие повторяющиеся группы, связанные друг с другом в линейной последовательности. Содержание полиэтиленгликоля в полимере или ответвлении рассчитывают суммированием всех полиэтиленгликолевых групп в полимере или ответвлении, даже если они прерываются другими группами. Так, ответвление, содержащее полиэтиленгликоль с ММ по меньшей мере 1000 Да, содержит достаточное количество групп $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, чтобы суммарная ММ составляла по меньшей мере 1000 Да. В соответствии с принятой в данной области техники терминологией, полиэтиленгликолевый полимер не обязательно относится к молекуле с концевой гидроксильной группой. Молекулярную массу сокращенно записывают в тысячах, используя символ к, например, 15 кДа означает молекулярную массу 15000 Да. Сукцинимидилсукцинат, сукцинимидилглутарат, сукцинимидиладипинат и сукцинимидилазелаинат представляют собой сложные сукцинимидиловые эфиры, которые содержат сложноэфирную группу, разлагающуюся в воде в результате гидролиза. Таким образом, "гидролитически разлагаемый" относится к материалу, который самопроизвольно разлагается *in vitro* в избытке воды без участия каких-либо ферментов или клеток, опосредующих разложение. Время для разложения относится к эффективному исчезновению материала, заметному невооруженным взглядом. ПЭГ и/или гидрогели, а также композиции, содержащие их, могут быть представлены в форме, которая является фармацевтически приемлемой, что означает высокую степень очистки и отсутствие примесей, например, пирогенов.

Неограничивающие примеры нуклеофильных групп включают аминную, гидроксильную, карбоксильную и тиольную. В некоторых вариантах реализации нуклеофильная группа представляет собой аминную группу. Аминная группа может представлять собой группу первичного амина, вторичного амина, третичного амина или циклического амина. В некоторых вариантах реализации первый предшественник содержит (аминопропил) $_m$ полиоксиэтилен, где m составляет от примерно 2 до примерно 10. Например, m равен 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах реализации первый предшественник может представлять собой пентаэритрит-тетра(аминопропил)полиоксиэтилен, гексаглицерин-окта(аминопропил)полиоксиэтилен или их комбинацию. Молекулярная масса первого предшественника может составлять от примерно 1 до примерно 100 кДа, например от примерно 5 до примерно 100 кДа, от примерно 10 до примерно 100 кДа или от примерно 20 до примерно 100 кДа.

Неограничивающие примеры электрофильных групп включают сульфонилхлоридную, хлоркарбонатные группы, группу n -гидроксисукцинимидилового эфира, сукцинимидилового эфира, сульфасукци-

нимидиловых эфиров, сукцинимидную, группу сукцинимидного эфира, n-гидроксисукцинимидную, малеимидную, сукцинатную, нитрофенилкарбонатную, альдегидную, винилсульфоновую, азидную, гидразидную, изоцианатную, диизоцианатную, тозилную, трезильную или карбонилдиимидазольную группу, а также описанные в патентах США № 5410016 и 6149931, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в той степени, до которой они не противоречат описанию в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации электрофильная группа представляет собой группу n-гидроксисукцинимидилового эфира или n-гидроксисукцинимидную группу. В некоторых вариантах реализации второй предшественник содержит (сукцинимидилоксиглутарил)_nполиоксиэтилен, где n составляет от примерно 2 до примерно 10. Например, n равен 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах реализации второй предшественник может представлять собой пентаэритрит-тетра(сукцинимидилоксиглутарил)полиоксиэтилен, пентаэритрит-тетра(сукцинимидилоксисукцинил)полиоксиэтилен, пентаэритрит-тетра(сукцинимидилкарбокисептил)полиоксиэтилен, гексаглицерин-окта(сукцинимидилоксиглутарил)полиоксиэтилен, гексаглицерин-окта(сукцинимидилоксисукцинил)полиоксиэтилен или их комбинацию. Молекулярная масса второго предшественника может составлять от примерно 1 до примерно 100 кДа, например, от примерно 5 до примерно 100 кДа, от примерно 10 до примерно 100 кДа или от примерно 20 до примерно 100 кДа.

В некоторых вариантах реализации электрофильная группа представляет собой группу n-гидроксисукцинимидилового эфира или n-гидроксисукцинимидную группу, и нуклеофильная группа представляет собой группу первичного амина.

Некоторые функциональные группы, такие как спиртовые группы или группы карбоновых кислот, обычно не взаимодействуют с другими функциональными группами, такими как аминные группы, в физиологических условиях (например, при pH 7,2-11,0, 37°C). Однако реакционная способность таких функциональных групп может быть повышена с помощью активирующих групп, таких как N-гидроксисукцинимидная группа. Некоторые активирующие группы включают карбонилдиимидазольную, сульфонилхлоридную, арилгалогенидные группы, группы сульфасукцинимидиловых эфиров, N-гидроксисукцинимидилового эфира, сукцинимидилового эфира, эпоксидную, альдегидную, малеимидные группы, группы сложных имидоэфиров и т.п.

Функциональные группы могут представлять собой, например, электрофилы, способные взаимодействовать с нуклеофилами, группы, способные взаимодействовать с определенными нуклеофилами, например, первичными аминами, группы, которые образуют амидные связи с материалами в биологических жидкостях, группы, которые образуют амидные связи с карбоксилатами, активированными кислотными функциональными группами, или их комбинации. Функциональные группы могут представлять собой, например, сильные электрофильные функциональные группы, которые означают электрофильные функциональные группы, которые эффективно образуют ковалентную связь с первичным амином в водном растворе при pH 9,0 при комнатной температуре и давлении, и/или электрофильные группы, которые взаимодействуют посредством реакции типа Михаэля. Сильный электрофил может быть такого типа, который не участвует в реакции типа Михаэля, или такого типа, который участвует в реакции типа Михаэля. Примерами сильных электрофилов, которые не участвуют в реакции типа Михаэля, являются: сукцинимиды, сукцинимидиловые эфиры или сложные NHS-эфиры. Примеры электрофилов типа Михаэля представляют собой акрилаты, метакрилаты, метилметакрилаты и другие ненасыщенные полимеризуемые группы. Дополнительные варианты реализации предшественников и функциональных групп представлены в публикации US 9205150, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе может определять плотность поперечного сшивания. Молярное отношение, равное единице, приводит к наибольшей плотности поперечного сшивания. Молярное отношение более или менее единицы может приводить к меньшей плотности поперечного сшивания, чем при молярном отношении, равном единице. Плотность поперечного сшивания увеличивается с ростом молярного отношения до достижения значения, равного единице, затем плотность поперечного сшивания снижается с увеличением молярного отношения за пределами значения, равного единице. При более низкой плотности поперечного сшивания может происходить более быстрое высвобождение биологического вещества, внедренного в гидрогель. Например, см. результаты, представленные на фиг. 2. Как следствие, при изменении молярного отношения нуклеофильной группы к электрофильной группе можно регулировать кинетику высвобождения биологического вещества. Не ограничиваясь теорией, молярное отношение эффективно модулирует и плотность поперечного сшивания (т.е. количество ковалентных поперечных связей, образующих сетчатую структуру), и размер пор в сетчатой структуре в объеме гидрогелевой матрицы. Снижая плотность поперечного сшивания, можно увеличивать эффективный размер пор матрицы, что обуславливает более быструю диффузию белка через матрицу. Кроме того, снижение плотности поперечного сшивания может увеличивать количество доменов в гидрогеле, в которых локальная концентрация ПЭГ, окружающего частицу белка, является недостаточной для удерживания белка в твердом состоянии при гидратации, что приводит к усилению взрывного высвобождения, а также к увеличению скорости диффузии в пересчете на массу. Таким образом, можно ожидать, что при увеличении молярного отношения будет происходить увеличение

взрывного высвобождения и кинетики высвобождения в режиме, контролируемом диффузией. Кроме того, при увеличении молярного отношения наблюдается увеличение угла наклона профиля высвобождения в режиме, контролируемом растворением. Это может быть объяснено снижением степени поперечного сшивания при увеличении молярного отношения, поскольку существует более выраженное несоответствие между количеством нуклеофильных групп и электрофильных групп, доступных для взаимодействия и поперечного сшивания. Скорость роста определяется скоростью гидролиза поперечных связей, что приводит к усилению набухания гидрогеля и одновременному снижению локальных концентраций ПЭГ, что приводит к дополнительному растворению частиц белка. Набухание гидрогеля также коррелирует с пористостью гидрогеля, которая увеличивается в процессе растворения белка. По мере увеличения молярного отношения и растворения белка при гидратации будет увеличиваться и эффективная пористость гидрогеля, что приводит к большему набуханию, более быстрому гидролизу и более высокой скорости роста в режиме, контролируемом растворением. Кроме того, точка перегиба, определяющая переход между режимами, контролируемыми диффузией и растворением, обратно пропорциональна молярному отношению. Поскольку эффективная скорость диффузии увеличивается с ростом молярного отношения, то время, необходимое для увеличения диффузии до такой степени, что она уже не является лимитирующей скоростью стадией, сокращается и, как следствие, точка перегиба смещается на более ранние моменты времени. При всестороннем рассмотрении изменение только молярного отношения может обеспечивать возможность изменения профиля высвобождения с почти линейного на сигмоидальный, в зависимости от требуемого результата.

В некоторых вариантах реализации молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет более 1. В некоторых вариантах реализации молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет менее 1. В некоторых вариантах реализации молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе может составлять от примерно 1,5 до 2,5.

В прогностической модели молярное отношение оказывает постоянный эффект на профиль высвобождения. В данном контексте термин "постоянное" означает, что существует возможность интерполяции между значениями. Следовательно, молярные отношения можно непрерывно изменять для достижения поступательного изменения периодов высвобождения. В некоторых вариантах реализации период высвобождения в профиле высвобождения можно регулировать с показателем примерно -41 день на одно изменение молярного отношения, если молярное отношение больше 1, например, составляет от примерно 1,3 до примерно 1,8. В некоторых вариантах реализации период высвобождения в профиле высвобождения можно регулировать с показателем примерно 103 дня на одно изменение молярного отношения, если молярное отношение меньше 1, например, составляет от примерно 0,77 до примерно 0,56.

Что касается молярного отношения, то количество нуклеофильных групп в первом предшественнике и/или количество электрофильных групп во втором предшественнике также может определять плотность поперечного сшивания. Как правило, при данном молярном отношении, чем больше количество нуклеофильных или электрофильных групп, тем выше плотность поперечного сшивания. В некоторых вариантах реализации предложенный способ включает выбор реагентов ПЭГ NH с 8 ответвлениями и ПЭГ NHS с 8 ответвлениями для периода высвобождения, составляющего 60 дней или более. В некоторых вариантах реализации предложенный способ включает выбор реагентов ПЭГ NH с 4 ответвлениями и ПЭГ NHS с 4 ответвлениями для периода высвобождения, составляющего менее 60 дней.

Другой параметр, который можно использовать для регулирования кинетики высвобождения, представляет собой молекулярную массу первого и/или второго предшественника. При данном молярном отношении, чем меньше молекулярная масса предшественника, тем меньше размер пор сетчатой структуры. Молекулярные массы первого и второго предшественников оказывают непостоянный или дискретный эффект на профиль высвобождения в прогностической модели, описанной в настоящем документе. В данном контексте термин "непостоянный" или "дискретный" означает, что нет возможности интерполяции между значениями. Например, комбинация первого и второго предшественников (например, реагентов ПЭГ) с известными молекулярными массами может определять диапазон возможных периодов высвобождения. Для точного регулирования профиля высвобождения или периода высвобождения можно использовать другие факторы, такие как молярное отношение. Например, как показано в таблице 9, комбинация ПЭГ NH с молекулярной массой 10 кДа и ПЭГ NHS с молекулярной массой 15 кДа определяет период высвобождения в диапазоне 9-31 день; изменяя молярное отношение в диапазоне от 1,3 до 1,8, можно непрерывно изменять период высвобождения от 31 дня до 9 дней. В прогностической модели молярное отношение, молекулярная масса первого предшественника и молекулярная масса второго предшественника являются независимыми параметрами.

В некоторых вариантах реализации предложенный способ включает: (а) выбор диапазона молярных отношений, где первое молярное отношение определено как минимум, и второе молярное отношение определено как максимум, и молекулярных масс первого и второго предшественников, с получением диапазона периодов высвобождения, где первый период высвобождения определен как максимум, и второй период высвобождения определен как минимум, причем первое молярное отношение равно 1 или более, и при этом требуемый период высвобождения находится в указанном диапазоне периодов высвобождения; и (б) определение требуемого молярного отношения в соответствии с одной из следующих

формул:

Требуемое молярное отношение = Первое молярное отношение + (Первый период высвобождения - Требуемый период высвобождения)/41 и

Требуемое молярное отношение = Второе молярное отношение + (Второй период высвобождения - Требуемый период высвобождения)/41.

В некоторых вариантах реализации диапазон молярных отношений составляет от примерно 1,3 до примерно 1,8, или его поддиапазон. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 1,3, и второе молярное отношение может составлять более примерно 1,3 и не более чем примерно 1,8, например, примерно 1,4, примерно 1,5, примерно 1,6, примерно 1,7 или примерно 1,8. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 1,4, и второе молярное отношение может составлять более примерно 1,4 и не более чем примерно 1,8, например, примерно 1,5, примерно 1,6, примерно 1,7 или примерно 1,8. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 1,5, и второе молярное отношение может составлять более примерно 1,5 и не более чем примерно 1,8, например, примерно 1,6, примерно 1,7 или примерно 1,8. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 1,6, и второе молярное отношение может составлять более примерно 1,6 и не более чем примерно 1,8, например, примерно 1,7 или примерно 1,8. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 1,7, и второе молярное отношение может составлять более примерно 1,7 и не более чем примерно 1,8, например, примерно 1,8.

В некоторых вариантах реализации предложенный способ включает: (а) выбор диапазона молярных отношений, где первое молярное отношение определено как максимум, и второе молярное отношение определено как минимум, и молекулярных масс первого и второго предшественников, с получением диапазона периодов высвобождения, где первый период высвобождения определен как максимум, и второй период высвобождения определен как минимум, причем первое молярное отношение равно 1 или менее, и при этом требуемый период высвобождения находится в указанном диапазоне периодов высвобождения; и (b) определение требуемого молярного отношения в соответствии с одной из следующих формул:

Требуемое молярное отношение = Первое молярное отношение - (Первый период высвобождения - Требуемый период высвобождения)/103 и

Требуемое молярное отношение = Второе молярное отношение - (Второй период высвобождения - Требуемый период высвобождения)/103.

В некоторых вариантах реализации диапазон молярных отношений составляет от примерно 0,77 до примерно 0,56, или его поддиапазон. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 0,77 и второе молярное отношение может составлять менее примерно 0,77 и не менее чем примерно 0,56, например, примерно 0,7, примерно 0,65, примерно 0,6 или примерно 0,56. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 0,7, и второе молярное отношение может составлять менее примерно 0,7 и не менее чем примерно 0,56, например, примерно 0,65, примерно 0,6 или примерно 0,56. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 0,65, и второе молярное отношение может составлять менее примерно 0,65 и не менее чем примерно 0,56, например, примерно 0,6 или примерно 0,56. В некоторых вариантах реализации первое молярное отношение может составлять примерно 0,6, и второе молярное отношение может составлять менее примерно 0,6 и не менее чем примерно 0,56, например, примерно 0,56.

Другой параметр, который можно использовать для регулирования кинетики высвобождения, представляет собой массовое отношение биологического вещества и вспомогательного вещества к гидрогелю. Массовое отношение биологического вещества и вспомогательных веществ к гидрогелю также упомянуто в данном контексте как "нагрузка по твердому веществу". Оно относится к массовому отношению биологического вещества и вспомогательного вещества к общей массе биологического вещества, вспомогательного вещества и полимера, содержащего гидрогель, нагруженный белком. Было обнаружено, что увеличение нагрузки по твердому веществу может обеспечивать изменение формы профиля высвобождения, главным образом благодаря более быстрому высвобождению во время первоначальной фазы диффузии до точки перегиба. Также вероятно обратная корреляция между началом фазы растворения (т.е. точкой перегиба) и нагрузкой по твердому веществу. Не ограничиваясь теорией, при увеличении нагрузки по твердому веществу можно ожидать более быстрое высвобождение на первоначальной фазе диффузии, поскольку существует большее количество белка в микроокружении относительно низкой концентрации ПЭГ, где растворимость белка менее ограничена. В таких областях белок растворяется при первоначальной гидратации матрицы, увеличивая скорость диффузии, зависящей от концентрации. Кроме того, увеличение количества частиц белка, растворенных при первоначальной гидратации, обуславливает образование пустот в матрице и приводит к увеличению пористости матрицы. Более пористая матрица также обуславливает увеличение эффективной скорости диффузии через объем матрицы и высвобождение по достижении поверхности. Не ограничиваясь теорией, обратная корреляция между точкой перегиба и нагрузкой по твердому веществу также может быть гипотетически объяснена увеличением скорости диффузии, наблюдаемым при увеличении нагрузки по твердому веществу. Точка перегиба

означает переход между режимом, контролируемым диффузией, и режимом, контролируемым растворением. При увеличении нагрузки по твердому веществу скорость диффузии становится больше и увеличивается быстрее, что приводит к сокращению времени до момента, когда диффузия перестает быть лимитирующей скоростью. В режиме, контролируемом диффузией, диффузия растворенного белка через матрицу является лимитирующей скоростью стадией высвобождения белка. По мере увеличения количества растворенных частиц белка происходит образование пустот в матрице и увеличение пористости матрицы, что приводит к увеличению скорости диффузии. В режиме, контролируемом растворением, диффузия через матрицу уже не является лимитирующей скоростью стадией. Указанное состояние достигается быстрее при увеличении нагрузки по твердому веществу. Например, на фиг. 5 показано влияние нагрузки по твердому веществу на скорость и профиль высвобождения.

В некоторых вариантах реализации биологическое вещество может представлять собой пептид или белок, такой как рекомбинантный белок. Рекомбинантный белок может представлять собой антитело или его фрагмент, короткоцепочечный варибельный фрагмент (scFv), фактор роста, ангиогенный фактор или инсулин. Другие водорастворимые биологические вещества представляют собой углеводы, полисахариды, нуклеиновые кислоты, антисмысловые нуклеиновые кислоты, РНК, ДНК, малые интерферирующие РНК (миРНК) и аптамеры. В некоторых вариантах реализации биологическое вещество представляет собой агент против фактора роста сосудистого эндотелия, такой как афлиберцепт, бевацизумаб и ранибизумаб. В некоторых вариантах реализации биологическое вещество представляет собой иммуноглобулин G, такой как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах реализации биологическое вещество представляет собой биспецифическое моноклональное антитело. Существует множество форматов биспецифического моноклонального антитела, но две основные категории представляют собой IgG-подобные и He-IgG-подобные. В некоторых вариантах реализации биологическое вещество представляет собой гибридный белок с доменами рецептора-ловушки.

Водорастворимые биологические вещества могут быть получены в форме частиц до диспергирования в гидрогелях. Существует множество технологий получения белков в форме частиц, таких как распылительная сушка или осаждение, которые можно использовать, при условии, что рассматриваемый белок совместим с такой обработкой. Один вариант реализации способа получения частиц включает получение биологического вещества без существенной денатурации, например, от поставщика или из организма животного, или из рекомбинантного источника. Твердая фаза представляет собой стабильную форму белка. Белок подвергают лиофилизации или концентрированию, или используют в том виде, в котором он был получен. Затем белок превращают в мелкий порошок без денатурации, проводя его обработку в твердом состоянии и избегая высоких температур, влаги и необязательно в среде, не содержащей кислород. Порошки могут быть получены, например, распылительной сушкой, измельчением, помолотом в шаровой мельнице, криоизмельчением, микрофлюидизацией или с помощью ступки и пестика, с последующим просеиванием твердого белка. Обработку белка также можно проводить в совместимом безводном органическом растворителе, в котором не растворим рассматриваемый белок, при сохранении белка в твердой форме. Уменьшение размера частиц до требуемого диапазона может быть достигнуто, например, измельчением, помолотом в шаровой мельнице, струйным измельчением суспензии твердого белка в совместимом органическом растворителе.

Обычные вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются ими, сахарозу, пролин, трегалозу, трилейцин, маннит, изолейцин, буферы, такие как гистидин, фосфат, ацетат, и полисорбаты.

Нагрузка по твердому веществу может составлять от 0,1 до 0,9, например, 0,1-0,8, 0,1-0,7, 0,1-0,6, 0,2-0,9, 0,2-0,8, 0,2-0,7, 0,2-0,6, 0,3-0,9, 0,3-0,8, 0,3-0,7 или 0,3-0,6. В некоторых вариантах реализации нагрузка по твердому веществу может составлять примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 или 0,9.

Еще один параметр, который можно использовать для регулирования кинетики высвобождения, представляет собой массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции. Твердофазная композиция, описанная в настоящем документе, композиционно отличается от обезвоженного гидрогеля согласно настоящему изобретению. Обезвоженный гидрогель получают поперечным сшиванием первого предшественника и второго предшественника вокруг твердофазной композиции. Массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции также упомянуто в данном документе как "содержание белка". Обнаружено, что чем больше содержание белка, тем выше скорость высвобождения. Кроме того, содержание белка также может влиять на форму профиля высвобождения, изменяя точку перегиба и скорость высвобождения до точки перегиба. Содержание белка в микронизированных частицах может определять эффективную концентрацию белка в микроокружении при растворении частиц в матрице. Движущей силой диффузии в ПЭГ гидрогеле являются градиенты указанных концентраций в микроокружении в объеме матрицы. Так, для твердофазных композиций с высоким содержанием белка локальные концентрации при растворении будут выше, чем для композиций с низким содержанием белка, что создает увеличенную движущую силу для диффузии. Данное явление наблюдается по корреляции между скоростью высвобождения в режиме, контролируемом диффузией, до точки перегиба и содержанием белка. Не ограничиваясь теорией, обратная корреляция между точкой перегиба и содержанием белка может быть объяснена сокращением временных рамок, в которых увеличивается скорость диффузии, зависящая от концентрации, и лимитирующей скоростью стадией вы-

свобождения становится растворение. Например, на фиг. 4 показано влияние содержания белка на скорость и профиль высвобождения.

Предложенная твердофазная композиция содержит биологическое вещество и одно или более вспомогательных веществ. Твердофазная композиция может быть получена такими способами, как осаждение, кристаллизация, лиофилизация, распылительная сушка, измельчение, микросборка, распылительная сублимационная сушка, обратимое осаждение, сушка сверхкритической жидкости и электрораспыление. Лيوфилизированные, высушенные распылением или иным образом обработанные белки часто составляют в композицию с сахарами, такими как трегалоза или сахароза, для стабилизации белка, или используют другие процессы для подготовки белков. Допускается, что указанные сахара могут сохраняться в указанной частице в процессе образования гидрогеля. Содержание белка может составлять от 10 до 95% по массе, например 10-90%, 10-80%, 10-70%, 10-60%, 20-90%, 20-80%, 20-70%, 30-90%, 30-80% или 30-70% по массе. В некоторых вариантах реализации содержание белка может составлять примерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по массе.

Твердофазная композиция может содержать частицы, имеющие средний диаметр не более 20 мкм. В некоторых вариантах реализации твердофазная композиция может содержать частицы, имеющие средний диаметр от примерно 10 нм до 20 мкм. Например, частицы могут иметь средний диаметр от примерно 10 нм до 15 мкм, от 10 нм до 10 мкм, от 50 нм до 20 мкм, от 50 нм до 15 мкм, от 50 нм до 10 мкм, от 100 нм до 15 мкм, от 100 нм до 10 мкм, от 200 нм до 10 мкм, от 400 нм до 10 мкм, от 600 нм до 10 мкм, от 1 мкм до 10 мкм, от 2 мкм до 10 мкм, от 100 нм до 1 мкм или от 200 нм до 800 нм.

Еще один параметр, который можно использовать для регулирования кинетики высвобождения, представляет собой отношение площади поверхности к объему гидрогеля. Обнаружено, что чем больше отношение площади поверхности к объему, тем выше скорость высвобождения. Например, на фиг. 6 показано различие скорости высвобождения для двух различных форм (пластинки и микрочастицы). Указанное отношение можно менять посредством изменения фактора формы гидрогеля. Иллюстративные факторы формы включают, но не ограничиваются ими, пластинки, микрочешуйки, микрочастицы и порошок. Способы измерения площади поверхности материала известны в данной области техники, включая модель Брунауэра-Эмметта-Теллера (БЭТ). Отношение площади поверхности к объему может составлять примерно $1-150 \text{ мм}^{-1}$, например, примерно $2-100 \text{ мм}^{-1}$, примерно $5-100 \text{ мм}^{-1}$ или примерно $10-75 \text{ мм}^{-1}$.

Если заранее задан один из указанных восьми параметров, можно изменять по меньшей мере один из оставшихся семи параметров для достижения требуемого профиля высвобождения. Например, если заранее задано массовое отношение биологического вещества и вспомогательного вещества к гидрогелю, можно изменять по меньшей мере один из следующих параметров: (a) молярное отношение нуклеофильной группы и электрофильной группы; (b) количество нуклеофильных групп в первом предшественнике; (c) количество электрофильных групп во втором предшественнике; (d) молекулярная масса первого предшественника; (e) молекулярная масса второго предшественника; (f) массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции; и (g) отношение площади поверхности к объему гидрогеля.

В некоторых вариантах реализации, если заранее заданы два из указанных восьми параметров, можно изменять по меньшей мере один из оставшихся шести параметров для достижения требуемого профиля высвобождения.

В некоторых вариантах реализации, если заранее заданы три из указанных восьми параметров, можно изменять остальные пять параметров для достижения требуемого профиля высвобождения.

В некоторых вариантах реализации, если заранее заданы четыре из указанных восьми параметров, можно изменять по меньшей мере один из оставшихся четырех параметров для достижения требуемого профиля высвобождения.

В некоторых вариантах реализации, если заранее заданы пять из указанных восьми параметров, можно изменять по меньшей мере один из оставшихся трех параметров для достижения требуемого профиля высвобождения.

В некоторых вариантах реализации, если заранее заданы шесть из указанных восьми параметров, можно изменять по меньшей мере один из оставшихся двух параметров для достижения требуемого профиля высвобождения.

В некоторых вариантах реализации, если заранее заданы семь из указанных восьми параметров, можно изменять оставшийся параметр для достижения требуемого профиля высвобождения.

Для определения одного или более из указанных параметров можно использовать прогностическую модель. В некоторых вариантах реализации после определения требуемого периода высвобождения и молекулярных масс первого и второго предшественников, прогностическая модель может определять молярное отношение, которое обеспечит требуемый период высвобождения.

Требуемый профиль высвобождения может зависеть от различных факторов, включая, но не ограничиваясь ими, используемое биологическое вещество, заболелвание или состояние, подлежащее лечению, и способ введения. В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения включает период высвобождения, составляющий от примерно одной недели до шести месяцев, в течение ко-

того происходит высвобождение по меньшей мере 90% биологического вещества, например, от примерно двух месяцев до шести месяцев или от примерно одной недели до двух месяцев. Для офтальмологического применения требуемый профиль высвобождения может включать контролируемое высвобождение на протяжении примерно 14 дней. В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения демонстрирует почти линейное высвобождение в течение примерно от 1 недели до 6 месяцев. В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения демонстрирует почти линейное высвобождение в течение по меньшей мере одной недели. В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения демонстрирует почти линейное высвобождение в течение по меньшей мере двух недель. В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения демонстрирует почти линейное высвобождение в течение по меньшей мере одного месяца. В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения демонстрирует почти линейное высвобождение в течение по меньшей мере двух месяцев. В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения демонстрирует почти линейное высвобождение в течение по меньшей мере шести месяцев.

Требуемый профиль высвобождения может включать участок отсроченного высвобождения, сигмоидальную форму, линейный участок, нелинейный участок, логарифмический участок, экспоненциальный участок или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации требуемый профиль высвобождения может представлять собой сигмоидальный профиль высвобождения с увеличенной задержкой с минимальным высвобождением или без высвобождения, с последующим устойчивым высвобождением до истощения. Такой профиль высвобождения может быть желательным в комбинации с жидкой насыщающей дозой, и его можно регулировать для обеспечения начала устойчивого высвобождения после выведения из организма первоначальной насыщающей дозы до уровня ниже эффективного значения. Другой требуемый профиль высвобождения может быть достигнут при одновременном введении двух или более гидрогелей с подобранными сигмоидальными профилями для достижения импульсного профиля высвобождения. Другой требуемый профиль высвобождения может быть достигнут при одновременном введении двух или более гидрогелей с различными профилями высвобождения, причем один имеет быстрое высвобождение (например, почти линейное, логарифмическое или экспоненциальное), а другой более медленное/отсроченное (сигмоидальное) высвобождение.

Получение гидрогеля

В присутствии безводного и гидрофобного растворителя, гидрогель может быть получен поперечным сшиванием первого предшественника и второго предшественника при определенном молярном отношении вокруг твердофазной композиции, содержащей биологическое вещество. В некоторых вариантах реализации указанный безводный и гидрофобный растворитель может представлять собой метилхлорид, этилацетат, диметилкарбонат, хлороформ или их комбинацию.

Некоторые предшественники приводят во взаимодействие с помощью инициаторов. Группирующий инициатор представляет собой химическую группу, способную инициировать реакцию свободнорадикальной полимеризации. Например, она может присутствовать как отдельный компонент или как боковая группа в предшественнике. Группы-инициаторы включают термические инициаторы, фотоактивируемые инициаторы и окислительно-восстановительные (редокс) системы. Инициаторы, фотоактивируемые длинноволновым УФ и видимым излучением, включают, например, этилэозиновые группы, 2,2-диметокси-2-фенилацетофеноновые группы, другие производные ацетофенона, тиоксантоновые группы, бензофеноновые группы и камфорхиноновые группы. Примеры термореактивных инициаторов включают группы 4,4'-азобис(4-цианопентановой кислоты) и аналоги бензоилпероксидных групп. Для инициации реакций свободнорадикального поперечного сшивания при температуре тела с получением гидрогелевых покрытий с вышеупомянутыми мономерами можно использовать некоторые доступные в продаже низкотемпературные свободнорадикальные инициаторы, такие как V-044 производства компании Wako Chemicals USA, Inc., Ричмонд, штат Вирджиния.

В качестве окислителя или восстановителя в иницирующих редокс-системах можно использовать ионы металлов. Например, для инициации полимеризации или в составе полимеризационной системы можно использовать ионы железа (II) в комбинации с пероксидом или гидропероксидом. В таком случае ионы железа (II) служат как восстановитель. Альтернативно, ионы металлов могут служить в качестве окислителя. Например, ион церия (IV) (валентное состояние церия 4+) взаимодействует с различными органическими группами, включая карбоновые кислоты и уретаны, оттягивая электрон к иону металла с образованием радикала-инициатора у органической группы. В такой системе ион металла действует как окислитель. Потенциально подходящими ионами металлов для любой роли являются любые ионы переходных металлов, лантаноиды и актиноиды, которые имеют по меньшей мере две легкодоступные степени окисления. Особенно подходящие ионы металлов имеют по меньшей мере два состояния, которые отличаются только на единицу заряда. Из них чаще всего используют железо (III)/железо (II); медь (II)/медь (I); церий (IV)/церий (III), кобальт (III)/кобальт (II); ванадат V/ванадат IV; перманганат; и марганец (III)/марганец (II). Можно использовать пероксидсодержащие соединения, такие как пероксиды и гидропероксиды, включая пероксид водорода, трет-бутилгидропероксид, трет-бутилпероксид, бензоилпероксид, кумилпероксид.

Примером иницирующей системы являются комбинация пероксидного соединения в одном рас-

творе и реакционноспособного иона, такого как ион переходного металла, в другом. В таком случае нет необходимости во внешних инициаторах полимеризации, и полимеризация протекает самопроизвольно и без применения внешней энергии или использования внешнего источника энергии, когда две комплементарные реакционноспособные функциональные группы, содержащие указанные фрагменты, взаимодействуют в месте их применения.

В гидрогеле можно использовать визуализирующий агент в форме порошка; он отражает или излучает свет с длиной волны, пригодной для обнаружения человеческим глазом, поэтому потребитель, использующий гидрогель, может наблюдать объект, если он содержит эффективное количество такого агента. Агенты, для визуализации которых необходим какой-либо прибор, упомянуты в данном контексте как визуализирующие агенты, и их примеры включают радионепроницаемые контрастные агенты и ультразвуковые контрастные агенты.

Некоторые биосовместимые визуализирующие агенты представляют собой FD&C СИНИЙ 1, FD&C СИНИЙ 2 и метиленовый синий. Указанные агенты предпочтительно присутствуют в готовой смеси реакционноспособных частиц электрофильно-нуклеофильных предшественников в концентрации более 0,05 мг/мл и предпочтительно в концентрации от по меньшей мере 0,1 до примерно 12 мг/мл и более предпочтительно от 0,1 до 4,0 мг/мл, хотя потенциально можно использовать более высокие концентрации, вплоть до предела растворимости визуализирующего агента. Визуализирующие агенты могут быть ковалентно связаны с молекулярной сетчатой структурой гидрогеля, в результате чего сохраняется способность к визуализации после использования пациентом до гидролиза или растворения гидрогеля.

Визуализирующие агенты могут быть выбраны из любых различных нетоксичных окрашенных веществ, подходящих для применения в медицинских устройствах, пригодных для имплантации, таких как красители FD&C СИНИЕ 3 и 6, эозин, метиленовый синий, индоцианиновый зеленый или цветные красители, обычно встречающиеся в синтетических хирургических шовных материалах. Для внедрения визуализирующего агента в молекулярную сетчатую структуру гидрогеля можно использовать реакционноспособные агенты визуализации, такие как NHS-флуоресцеин. Визуализирующий агент может присутствовать с любыми реакционноспособными частицами предшественника, например, со сшивающим агентом или с раствором функционального полимера. Предпочтительное окрашенное вещество может образовывать или не образовывать химическую связь с гидрогелем. Визуализирующий агент можно использовать в небольшом количестве, например, в концентрации 1 мас./об.%, более предпочтительно менее 0,01 мас./об.% и наиболее предпочтительно менее 0,001 мас./об.%; специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах диапазонов, указанных в явном виде. Указанный агент отмечает положение частицы и является показателем ее наличия и скорости растворения.

Обезвоженный гидрогель может быть получен из поперечно-сшитого гидрогеля, так что при гидратации в физиологическом растворе образуется гидрогель, который способен разлагаться в воде, что можно определить по снижению механической прочности гидрогеля и, в конечном итоге, рассеиванию *in vitro* в избытке воды вследствие гидролитического разложения групп, расщепляющихся в воде. Такое испытание является прогностическим для гидролитического растворения *in vivo*, процесса, который противоположен клеточному или протеасомному расщеплению. Однако важно, что полиангидриды или другие обычно используемые разлагаемые материалы, которые расщепляются с образованием кислотных компонентов, обычно вызывают воспаление тканей. Однако гидрогели могут исключать присутствие таких материалов и могут не содержать полиангидриды, ангидридные связи или предшественники, которые расщепляются на кислоты или двухосновные кислоты.

Например, могут быть использованы такие электрофильные группы, как N-гидроксисукцинимидилглутаратная, N-гидроксисукцинимидилсукцинатная, N-гидроксисукцинимидилкарбонатная, N-гидроксисукцинимидиладипинатная или N-гидроксисукцинимидилазелаинатная, и они содержат сложноэфирные связи, которые являются гидролитически неустойчивыми. Также можно использовать более линейные гидрофобные связи, такие как пимелитатные, суберинатные, азелаинатные или себацинатные связи, и указанные связи менее склонны к расщеплению, чем сукцинатные, глутаратные или адипинатные связи. Также можно использовать разветвленные, циклические или другие гидрофобные связи. С указанными группами могут быть получены полиэтиленгликоли и другие предшественники. Разложение поперечно-сшитого гидрогеля может протекать вследствие водного гидролиза биоразлагаемого сегмента при использовании материалов, разлагающихся в воде. Также могут быть использованы полимеры, содержащие сложноэфирные связи, для обеспечения требуемой скорости разложения, при этом группы добавляют или удаляют вблизи сложноэфирных групп для увеличения или снижения скорости разложения. Таким образом, с использованием разлагаемого сегмента может быть получен гидрогель с требуемым профилем разложения, от нескольких дней до нескольких месяцев. Например, при использовании в качестве биоразлагаемого сегмента полигликолята, может быть получен поперечно-сшитый полимер, разлагающийся в течение от примерно 1 до примерно 30 дней, в зависимости от плотности поперечного сшивания сетчатой структуры. Таким же образом, может быть получена поперечно-сшитая сетчатая структура на основе поликапролактона, разлагающаяся в течение от примерно 1 до примерно 8 месяцев. Время разложения обычно варьируется в соответствии с типом использованного разла-

гаемого сегмента, в следующем порядке: полигликолят<полилактат<политриметиленкарбонат<поликапролактон. Таким образом, с использованием разлагаемого сегмента может быть получен гидрогель с требуемым профилем разложения от нескольких дней до нескольких месяцев.

Биоразлагаемая связь в гидрогеле и/или предшественнике может быть разлагаемой под действием воды или разлагаемой под действием фермента. Иллюстративные биоразлагаемые связи, разлагаемые под действием воды, включают полимеры, сополимеры и олигомеры гликолида, dl-лактида, l-лактида, диоксанола, сложных эфиров, карбонатов и триметиленкарбоната. Иллюстративные ферментативно биоразлагаемые связи включают пептидные связи, расщепляемые металлопротеиназами и коллагеназами. Примеры биоразлагаемых связей включают полимеры и сополимеры поли(гидроксикислот), поли(ортокарбонатов), поли(ангидридов), поли(лактонов), поли(аминокислот), поли(карбонатов) и поли(фосфонатов).

Если необходимо, чтобы биосовместимая поперечно-сшитая матрица была биоразлагаемой или абсорбируемой, можно использовать один или более предшественников, содержащих биоразлагаемые связи, находящиеся между функциональными группами. Биоразлагаемая связь необязательно также может служить в качестве водорастворимого ядра одного или более предшественников, используемых для получения матрицы. Для каждого подхода биоразлагаемые связи могут быть выбраны так, чтобы полученный биоразлагаемый биосовместимый поперечно-сшитый полимер разлагался или абсорбировался в течение требуемого периода времени.

Материалы матрицы могут быть выбраны так, чтобы продукты разложения абсорбировались в систему кровообращения и по существу выводились из организма посредством почечной фильтрации. Материалы матрицы могут представлять собой гидрогели в физиологическом растворе. Один из способов заключается в выборе предшественников, которые не расщепляются в организме, со связями между предшественниками, которые разлагаются с образованием самих предшественников или предшественников с небольшими изменениями, обусловленными процессом ковалентного поперечного сшивания. Такой подход противоположен выбору материалов биологической матрицы, которые разрушаются вследствие ферментативных процессов, и/или материалов, расщепляемых макрофагами, или материалов, которые приводят к образованию побочных продуктов, которые эффективно не растворяются в воде. Материалы, которые выводятся из организма посредством почечной фильтрации, могут содержать метку и могут быть обнаружены в моче известными технологиями. Несмотря на то, что может существовать по меньшей мере один теоретический механизм потери некоторых из указанных материалов в других системах организма, нормальным является выведение материала из организма через почки. Таким образом, термин "по существу выведенный" относится к материалам, выведение которых обычно происходит через почки.

Применение

В некоторых вариантах реализации материал гидрогеля может быть введен в организм пациента, например, в ткань или орган, в том числе интраокулярно, интравитреально, надхороидально, субконъюнктивально, местно, подкожно, внутримышечно, интраперитонеально, в возможное пространство внутри организма или в естественную полость или просвет. Указанный материал обеспечивает депо для высвобождения терапевтического агента (например, биологического вещества) с течением времени. Так, варианты реализации включают объемы для введения от примерно 0,05 до примерно 500 мл (которые относятся к общему объему в случае доставки группы частиц); специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах диапазонов, указанных в явном виде, например, от 1 до 10 мл или от 5 до 50 мл. Например, интраперитонеальная или внутримышечная инъекция представляет собой подходящую область для контролируемого пролонгированного высвобождения агентов в течение нескольких часов, дней или недель.

Материалы, описанные в настоящем документе, можно использовать для доставки лекарственных соединений или других терапевтических агентов (например, визуализирующих агентов или маркеров). Одним из способов применения является введение в требуемое место смеси частиц гидрогеля и других материалов (например, терапевтического агента, буфера, ускорителя, инициатора) через иглу, канюлю, катетер или полую трубку. Смесь может быть доставлена, например, с помощью шприца с ручным управлением или шприца с механическим управлением, например, шприцевого насоса. Альтернативно, можно использовать двойной шприц или шприц с несколькими цилиндрами, или многоканальную систему для смешивания частиц гидрогеля в заданном месте или вблизи него с гидратирующей жидкостью и/или другими агентами.

Обезвоженные гидрогели могут быть обеспечены в требуемом месте в текучей форме, например, в форме сыпучих частиц. Гидрогели могут быть суспендированы в жидкости и введены в требуемое место. Частицы гидрогеля могут быть получены так, что они имеют максимальный диаметр для ручного выдавливания из шприца через катетер диаметром от 3 до 5 по Французской шкале катетеров, или через иглу от 10 до 30 калибра. Специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах диапазонов, указанных в явном виде, например, от 25 до 30 калибра. Использование тонких игл особенно преимущественно для глаз, которые являются чувствительным органом.

Введение в другие органы также является преимущественным, например, для контролирования кровотечения или другого повреждения. Частицы могут быть получены посредством создания гидрогеля с последующим разрушением его на более мелкие фрагменты. Гидрогель может быть, например, измельчен в шаровой мельнице или с помощью ступки и пестика, или нарублен или нарезан ножом или проволокой. Или гидрогель может быть измельчен в блендере или аналогичном устройстве. Гидрогель также можно продавливать через сито или получать отливку на шаблонной форме с требуемым размером и формой. Гидрогель может содержать частицы, нагруженные терапевтическим агентом. Некоторые или все частицы гидрогеля могут содержать частицы, нагруженные терапевтическим агентом. В некоторых вариантах реализации первая группа частиц, нагруженных терапевтическим агентом, которые нагружены первым терапевтическим агентом, внедрена в первую группу частиц гидрогеля, а вторая группа частиц, нагруженных терапевтическим агентом, которые нагружены вторым терапевтическим агентом, внедрена во вторую группу частиц гидрогеля. Таким образом, из одного имплантата может высвободиться множество терапевтических агентов. Варианты реализации указанных частиц включают частицы с определенной формой, такой как сфера, стержень или диск.

Варианты реализации включают введение множества частиц гидрогеля. Частицы гидрогеля могут содержать терапевтический агент. Указанные частицы могут быть получены с размером, подходящим для ручного выдавливания через иглу 25 калибра или менее. Давление, необходимое для продавливания частиц через иглу, может быть обеспечено вручную.

Вместо доставки частиц можно использовать предварительное получение геля в виде формованного изделия, с последующим введением полученного материала в организм. Например, гидрогели могут быть получены в форме сфер, стержней, цилиндров или в других формах. Варианты реализации включают твердые стержни гидрогелей для подкожной имплантации и доставки одного или более терапевтических агентов.

Гидрогели, предложенные в настоящем документе, можно использовать для наращивания ткани. Хорошо известно применение коллагена для наращивания кожи. Например, гидрогели можно использовать для кожного филлера или для наращивания ткани. Варианты реализации включают инъекцию или иное введение множества частиц в ткань или формирование гидрогеля *in situ*. Предложенный материал можно инъецировать или иным образом вводить в требуемое место.

Гидрогели, описанные в настоящем документе, можно использовать для разделения тканей для снижения дозы радиоактивного излучения, которую получает одна из этих тканей. Как описано в патенте США № 7744913, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всех отношениях, причем в случае противоречия настоящее описание является определяющим, в организм пациента можно вводить материалы-разделители (спейсеры). Некоторые варианты реализации представляют собой способ, включающий введение спейсера в положение между положением первой ткани и положением второй ткани для увеличения расстояния между положением первой ткани и положением второй ткани. Кроме того, может присутствовать стадия введения дозы радиоактивного излучения в по меньшей мере положение первой ткани или положение второй ткани. Например, способ заключается в доставке пациенту терапевтической дозы излучения, включающей введение биосовместимого, биоразлагаемого гидрогеля в форме частиц, например, группы частиц, необязательно с радионепроницаемыми компонентами, между положением первой ткани и положением второй ткани для увеличения расстояния между положением первой ткани и положением второй ткани, и обработку положения второй ткани терапевтической дозой излучения, так что присутствие устройства-наполнителя обуславливает получение меньшей дозы радиоактивности в положении первой ткани, по сравнению с дозой радиоактивности, которую получает положение первой ткани без такого спейсера. Спейсер может быть введен в форме обезвоженного гидрогеля, который образует гидрогель в организме пациента, который выводится в результате биоразложения гидрогеля-спейсера в организме пациента. Примером является случай, когда положение первой ткани связано с прямой кишкой, и положение второй ткани связано с предстательной железой. Степень снижения облучения может варьироваться. Варианты реализации включают по меньшей мере от примерно 10 до примерно 90%; специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах диапазонов, указанных в явном виде, например, по меньшей мере примерно 50%. Альтернативно, облучение может быть направлено на третью ткань, так что первая ткань или вторая ткань получает меньшее количество облучения благодаря ее отделению от другой ткани(ей). Первая ткань и вторая ткань могут быть смежными друг к другу в организме, или могут быть отделены друг от друга другими тканями. Объем спейсера для разделения тканей зависит от конфигурации тканей, подлежащих обработке, и также от тканей, подлежащих разделению друг от друга. Во многих случаях пригодным является объем примерно 20 кубических сантиметров (cm^3 или мл). В других вариантах реализации может потребоваться лишь примерно 1 cm^3 . Другие объемы входят в диапазон примерно 5-1000 cm^3 ; специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах диапазонов, указанных в явном виде, например 10-30 cm^3 . В некоторых вариантах реализации спейсеры вводят в двух дозах в разное время, чтобы обеспечить возмещение растяжения тканей и аккомодации спейсера, и, следовательно, вмещения большего объема спейсера, чем это возможно в ином случае. Ткани, подлежащие разделению с помощью спейсера, включают, например, по

меньшей мере одну из прямой кишки, предстательной железы и молочной железы, или их части. Например, первая часть молочной железы может быть отделена от второй части.

Детали настоящего изобретения изложены далее в представленном ниже сопроводительном описании. Несмотря на то, что при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения могут быть использованы такие же способы и материалы, как описаны в настоящем документе, или их эквиваленты, далее будут описаны иллюстративные способы и материалы. Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения станут понятны из описания и формулы изобретения. В описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают также формы множественного числа, если из контекста очевидно не следует иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Все патенты и публикации, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Определения

Все определения, описанные и использованные в настоящем документе, следует понимать как приоритетные по сравнению со словарными определениями, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычными значениями описанных терминов.

При использовании в данном описании и в формуле изобретения, выражение "по меньшей мере один" в отношении списка одного или более элементов следует понимать как означающее по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или более элементов в данном списке элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из всех и каждого элементов, специально перечисленных в данном списке элементов, и не исключая любые комбинации элементов в данном списке элементов. Данное определение также допускает возможность того, что могут необязательно присутствовать элементы, отличные от элементов, специально указанных в списке элементов, к которому относится выражение "по меньшей мере один", независимо от того, связаны ли они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Так, в качестве неограничивающего примера, "по меньшей мере один из А и В" (или эквивалентно "по меньшей мере один из А или В", или эквивалентно "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться, в одном варианте реализации, к по меньшей мере одному, необязательно включая более одного, А при отсутствии В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте реализации к по меньшей мере одному, необязательно включая более одного, В при отсутствии А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в другом варианте реализации к по меньшей мере одному, необязательно включая более одного А и к по меньшей мере одному, необязательно включая более одного В (и необязательно включая другие элементы); и т.д.

В формуле изобретения, а также в приведенном выше описании все переходные выражения, такие как "содержащий", "включающий", "несущий", "имеющий", "содержащий", "подразумевающий", "удерживающий", "состоящий из" и т.п. следует понимать как открытые, т.е. обозначающие "включая, но не ограничиваясь ими". Только переходные выражения "состоящий из" и "состоящий по существу из" являются закрытыми или полужакрытыми переходными выражениями, соответственно, как указано в Руководстве по проведению патентной экспертизы Патентного ведомства США, раздел 2111.03.

В данном контексте термины "профиль высвобождения" и "кинетика высвобождения" использованы взаимозаменяемо для обозначения характера высвобождения биологического вещества из гидрогеля в физиологических условиях в зависимости от времени. Профиль высвобождения может быть охарактеризован периодом высвобождения и одной или более скоростями высвобождения в течение периода высвобождения. Профиль высвобождения можно визуализировать с помощью диаграммы, содержащей время по оси X и меру биологического высвобождения по оси Y (например, процент, совокупную массу высвобожденного биологического вещества или отношение совокупной массы высвобожденного биологического вещества к общей массе гидрогеля).

В данном контексте термин "почти линейное высвобождение" относится к скорости высвобождения, пропорциональной t^n , где t представляет собой время, и n находится в диапазоне 0,5-1. Специалистам в данной области техники понятно, что предусмотрены все диапазоны и значения в пределах диапазонов, указанных в явном виде, например, от 0,5 до 0,95, от 0,5 до 0,9, от 0,5 до 0,85, от 0,6 до 0,95, от 0,6 до 0,9, от 0,6 до 0,85, от 0,6 до 0,8, от 0,7 до 0,95, от 0,7 до 0,9, от 0,7 до 0,85 или от 0,7 до 0,8. В некоторых вариантах реализации n равен 0,5. В некоторых вариантах реализации n равен 0,55. В некоторых вариантах реализации n равен 0,6. В некоторых вариантах реализации n равен 0,65. В некоторых вариантах реализации n равен 0,7. В некоторых вариантах реализации n равен 0,75. В некоторых вариантах реализации n равен 0,8. В некоторых вариантах реализации n равен 0,85. В некоторых вариантах реализации n равен 0,9. В некоторых вариантах реализации n равен 0,95. В некоторых вариантах реализации n равен 1.

Термин "примерно" относится к диапазону значений, которые могут быть на 15%, 10%, 8%, 5%, 3%, 2%, 1% или 0,5% больше или меньше указанного значения. Например, "примерно 10%" может составлять от 8,5% до 11,5%. В одном варианте реализации термин "примерно" относится к диапазону значений, которые на 5% больше или меньше указанного значения. В другом варианте реализации термин "примерно" относится к диапазону значений, которые на 2% больше или меньше указанного значения. В другом варианте реализации термин "примерно" относится к диапазону значений, которые на 1% больше

или меньше указанного значения.

Термины в единственном числе, использованные в данном описании, относятся к одному или более (т.е. к по меньшей мере одному) грамматическому объекту описания. Например, "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

Термин "и/или" использован в данном описании для обозначения либо "и", либо "или", если не указано иное.

Формулу изобретения не следует считать ограниченной описанным порядком или элементами, если это не указано. Следует понимать, что различные изменения формы и деталей могут быть сделаны специалистом в данной области техники без отступления от сущности и объема прилагаемой формулы изобретения. Заявлены все варианты реализации, которые входят в сущность и объем следующей формулы изобретения и ее эквивалентов.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами и примерами синтеза, которые не следует толковать как ограничивающие объем или сущность настоящего изобретения конкретными способами, описанными в данном документе. Следует понимать, что приведенные примеры представлены для иллюстрации некоторых вариантов реализации, и что они не подразумевают никакого ограничения объема данного изобретения. Кроме того, следует понимать, что можно прибегнуть к различным другим вариантам реализации, модификациям и эквивалентам, которые сами могут быть предусмотрены специалистами в данной области техники без отступления от сущности данного изобретения и/или объема прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1.

В настоящем документе описаны иллюстративные примеры того, как указанные параметры по отдельности, а также в комбинации влияют на кинетику высвобождения, и как их можно использовать для достижения конкретного профиля требуемого продукта. В качестве модельных моноклональных антител использовали mAb IgG1 и mAb IgG4 для большинства результатов, представленных в данном отчете, причем набор данных также включает биспецифическое mAb и белок Tgar. В целом, результаты, представленные в настоящем документе, могут быть распространены на другие моноклональные антитела (mAb) или белки, подобные по размеру тем mAb, которые использованы в настоящем документе.

Гидрогелевую систему доставки белка получали посредством взаимодействия двух разветвленных ПЭГ реагентов с комплементарными реакционноспособными концевыми группами в присутствии высушенного распылением белка, суспендированного в органическом растворителе. При взаимодействии ПЭГ реагенты образуют поперечно-сшитую сетчатую структуру, в которую включен высушенный распылением белок, остающийся в твердом состоянии. Затем удаляли растворитель из полученной полимерной матрицы, нагруженной mAb, с получением твердого обезвоженного лекарственного продукта в форме гидрогеля с нагрузкой mAb, называемого mAb-X-ПЭГ. Органический растворитель выбирали по совместимости с высушенным распылением белком, который должен быть нерастворим в указанном растворителе и стабильным, а также по технологическим соображениям. Во всех экспериментах, представленных в настоящем документе, в качестве растворителя для реакции использовали дихлорметан (ДХМ), и его выбирали благодаря его совместимости с выбранными белками, а также летучести, обеспечивающей простую сушку матрицы mAb-X-ПЭГ при комнатной температуре под вакуумом. Матрица mAb-X-ПЭГ может быть получена в форме пластинок или отлита в виде пленки или в форму; после высушивания твердую матрицу можно дополнительно нарезать в виде определенной формы и/или частиц с определенной геометрией.

При гидратации лекарственного продукта mAb-X-ПЭГ происходит набухание матрицы, представляющей собой гидрогель. При гидратации часть полезной нагрузки, высушенного распылением mAb, растворяется и диффундирует из матрицы. На указанной первоначальной фазе высвобождения белка из матрицы основано на диффузии и зависит от квадратного корня из времени. Остальная часть белка, на который действует высокая концентрация ПЭГ в локальном микроокружении в полимерной матрице, остается в твердом состоянии до прогрессирования растворения гидрогеля до того момента, когда концентрация ПЭГ в локальном микроокружении падает до значения, обеспечивающего возможность растворения белка. Таким образом, в гидратированной среде с течением времени происходит разрушение поперечных связей в ПЭГ матрице вследствие гидролиза, что приводит к растворению белка и последующей диффузии из полимерной матрицы. На данной фазе высвобождения растворение матрицы является лимитирующей скоростью стадией, и высвобождение белка экспоненциально зависит от времени. Наконец, при разложении матрицы до точки, где уже нет оставшегося твердого белка, высвобождение остального белка в растворе в матрице снова начинает зависеть от диффузии через оставшуюся матрицу. Указанные фазы высвобождения белка из матрицы обуславливают характерную сигмоидальную форму профиля высвобождения (фиг. 1).

На фазе I на фиг. 1 при гидратации происходит солубилизация части введенного белка, находящегося на поверхности или в областях с низкой плотностью ПЭГ. Частицы белка на поверхности или вблизи нее мгновенно высвобождаются, обеспечивая "взрывное" высвобождение. Об этом можно судить по увеличению взрывного высвобождения, коррелирующего с увеличением отношения площади поверхно-

сти к объему (массе). Белок, растворенный при гидратации, предположительно в областях с низкой плотностью ПЭГ, но не на поверхности, доступен для высвобождения на фазе "диффузии". Об этом можно судить по увеличению количества белка, высвобожденного во время фазы диффузии, при увеличении молярного отношения NH:NHS. Не ограничиваясь теорией, при увеличении молярного отношения образуется меньше поперечных связей, и области с плотностью ПЭГ, достаточно низкой для обеспечения возможности растворения частиц белка, становятся преобладающими. На данной фазе после диффузии следует фиковская диффузия, движущей силой которой является концентрация солюбилизованного белка, но она замедляется пористой сетчатой структурой, обусловленной поперечным сшиванием ПЭГ, и, следовательно, скорость высвобождения на данной фазе диффузии может зависеть от степени и структуры поперечного сшивания ПЭГ.

На фазе II на фиг. 1 начинается фаза растворения, когда расщепление поперечных связей ПЭГ достигает той степени, при которой она становится лимитирующей скоростью стадий высвобождения белка из матрицы. Не ограничиваясь теорией, расщепление поперечных связей ПЭГ является процессом первого порядка, и при его протекании можно ожидать снижение плотности ПЭГ в матрице, обеспечивающее возможность солюбилизации частиц белка, а также увеличение скорости диффузии белка через матрицу ПЭГ, поскольку происходит раскрытие пористой сетчатой структуры. Точка на профиле высвобождения, где наблюдается контролируемое растворением высвобождение, находится в том месте, где общая скорость диффузии белка из матрицы больше, чем скорость эффективного растворения поперечных связей. Форма профиля высвобождения на фазе растворения прямо коррелирует с процессом растворения первого порядка. Скорость высвобождения и продолжительность фазы растворения предположительно зависят от степени поперечного сшивания (молярного отношения NH:NHS), скорости расщепления и общего количества белка, оставшегося в матрице после начала данной фазы.

На фазе III на фиг. 1 происходит фаза истощения, когда лимитирующей скоростью снова становится фиковская диффузия. На данной фазе весь белок предположительно растворен в матрице, и движущая сила диффузии для высвобождения снижается, поскольку происходит истощение оставшегося белка в матрице. Об этом свидетельствует характерная форма (линейная в зависимости от квадратного корня из времени) профиля высвобождения непосредственно перед плато, означающим истощение. В зависимости от белковой нагрузки и кинетики и продолжительности высвобождения на фазе диффузии и растворения, указанная фаза может происходить задолго до полного растворения геля.

В табл. 1 перечислены параметры композиции, теоретически связанные с кинетикой высвобождения в гидрогелевой системе доставки лекарственного вещества, нагруженной белком. Указанные параметры разделены на три категории: факторы, основанные на выборе полимерных реагентов, факторы, связанные с высушенной распылением белковой композицией, и факторы, определенные при получении mAb-X-ПЭГ. Приведенный список учитывает только параметры, имеющие отношение к композиции, и не включает технологические параметры, такие как растворитель, концентрации реагентов, условия реакции и т.д. Для всех исследований, включенных в данный эксперимент, технологические параметры были постоянными.

Таблица 1. Параметры композиции mAb-X-ПЭГ

Полимерные реагенты (ПЭГ-NH и ПЭГ-NHS)	Высушенная распылением белковая композиция	Получение и форма гидрогеля
<ul style="list-style-type: none"> Разветвленность (4 ответвления / 8 ответвлений) Молекулярная масса Концевая группа (регулирует скорость гидролиза поперечных связей) 	<ul style="list-style-type: none"> Содержание белка Размер/распределение частиц Строение молекулы Свойства порошка 	<ul style="list-style-type: none"> Степень поперечного сшивания («молярное отношение NH:NHS») Нагрузка по твердому веществу Отношение площадь поверхности : объем (фактор формы)

Обоснованием для концентрации усилий на использовании способа получения гидрогеля с белковой нагрузкой и высушенной распылением белковой композиции, а также для ограничения выбора полимерных реагентов (т.е. ММ и одинаковой химической структуры функциональной концевой группы) является упрощение, с точки зрения СМС (химии, производства и контроля, англ. chemistry, manufacturing, and control) и с нормативно-правовой точки зрения, сложности указанной платформы посредством ограничения количества ПЭГ реагентов до двух. Однако следует отметить, что подобное регулирование может быть достигнуто в данной системе посредством использования других характеристик полимеров (например, химической структуры концевой функциональной группы) для изменения диффузии белка в матрице и скорости растворения гидрогелевой матрицы.

Учет параметров высушенной распылением композиции при рассмотрении кинетики высвобождения является ключевым фактором для разработки платформы такой системы доставки. Несмотря на то, что можно использовать высушенную распылением композицию для достижения требуемой кинетики высвобождения, указанная композиция также может быть обусловлена стабильностью белка. Несмотря на то, что при введении в гидрогелевую матрицу молекулы могут иметь схожие характеристики в отношении кинетики высвобождения, известно, что стабильность белка специфична для конкретной молеку-

лы, и для различных белков может потребоваться изменение композиции, высушенной распылением, для сохранения стабильности в процессе изготовления или при хранении в форме промежуточной лекарственной субстанции или гидрогеля, нагруженного белком. Таким образом, в каждом случае важно понимать, как высушенные распылением композиции влияют на кинетику высвобождения. Это также верно для отношения площади поверхности к объему в качестве параметра производства гидрогеля. Несмотря на то, что в некоторых случаях можно использовать отношение площади поверхности к объему для достижения требуемой кинетики высвобождения, она также может быть продиктована или ограничена фактором формы, требуемым для введения (например, для обеспечения возможности введения через шприц или в форме имплантата).

Материалы и способы

Таблица 2. Высушенные распылением белковые композиции, реагенты и материалы, использованные при изготовлении гидрогеля, нагруженного белком, и в исследованиях *in vitro* высвобождения (IVR, англ. *in vitro release*)

	Материал	Содержание белка в высушенном распылением порошке
Белковые композиции, высушенные распылением	mAb IgG1	80% мас./мас.
	mAb IgG1	90% мас./мас.
	mAb IgG1	50% мас./мас.
	mAb IgG4	40% мас./мас.
	mAb IgG4	80% мас./мас.
	mAb IgG4	90% мас./мас.
	mAb IgG4	50% мас./мас.
	биспецифическое mAb	80% мас./мас.
	Белок Тгар	70% мас./мас.
ПЭГ реагенты	ПЭГ-NH	NH-ПЭГ с 8 ответвлениями, ММ 14450 Да [гексаглицерин-окта(аминопропил)полиоксиэтилен]
	ПЭГ-NHS	NHS-ПЭГ с 8 ответвлениями, глутарил, ММ 45573 Да [гексаглицерин-окта(сукцинимидилоксиглутарил)полиоксиэтилен]
Растворитель реакции	ДХМ	Дихлорметан
Среда для IVR	PBS, pH 7,4	4 mM PO ₄ , 155 mM NaCl, 0,03% PS20, pH 7,4

Таблица 3. Многофакторное исследование I пространства проектных параметров mAb-X-ПЭГ

Фактор	Испытанный диапазон
Молярное отношение	0,9-1,8 NH:NHS
Нагрузка по твердому веществу	0,6-0,9 мас./мас.
Содержание белка	0,4-0,8 мас./мас.
Молекула	mAb IgG1, mAb IgG4

В табл. 3 представлены диапазоны и факторы, включенные в многофакторный анализ влияния параметров гидрогелевой композиции, нагруженной белком, на кинетику высвобождения белка. В данном исследовании не регулировали отношение площади поверхности к объему. Описание образцов представлено в табл. 4.

Таблица 4. Многофакторное исследование I пространства проектных параметров гидрогеля, нагруженного белком

ID образца	Молекула	Общая нагрузка по твердому веществу (мас./мас.)	Содержание высушенного распылением белка (мас./мас.)	Фактическое молярное отношение (NH:NHS)
MAB2RS001F1	mAb IgG4	0,9	0,4	1,2
MAB2RS001F2	mAb IgG4	0,9	0,4	1,2
MAB2RS003F1	mAb IgG4	0,9	0,4	1,5
MAB2RS005F5	mAb IgG4	0,9	0,8	1,4
MAB2RS005F6	mAb IgG4	0,9	0,8	1,6
MAB2RS006F4	mAb IgG4	0,8	0,8	0,8
MAB2RS006F5	mAb IgG4	0,9	0,8	1,4
MAB2RS006F6	mAb IgG4	0,9	0,8	1,6
MAB1RS004F1B	mAb IgG1	0,6	0,8	1,2
MAB1RS004F1C	mAb IgG1	0,6	0,8	1,2
MAB1RS017F1A	mAb IgG1	0,6	0,8	1,1
MAB1RS017F1B	mAb IgG1	0,6	0,8	1,3
MAB1RS017F1C	mAb IgG1	0,7	0,8	1,8
MAB1RS017F2A	mAb IgG1	0,7	0,8	1,0
MAB1RS017F2B	mAb IgG1	0,7	0,8	1,0
MAB1RS017F2C	mAb IgG1	0,7	0,8	1,0
MAB1RS017F3A	mAb IgG1	0,8	0,8	1,0
MAB1RS017F3B	mAb IgG1	0,9	0,8	1,5

Таблица 5. Многофакторное исследование II пространства проектных параметров гидрогеля, нагруженного белком

Фактор	Испытанный диапазон
Молярное отношение	1,1-2,0 NH:NHS
Нагрузка по твердому веществу	0,2-0,7 мас./мас.
Содержание белка	0,5-0,9 мас./мас.
Молекула	mAb IgG1, mAb IgG4
Отношение площади поверхности к объему	3-79 (мм ⁻¹)

В табл. 5 представлены диапазоны и факторы, включенные в многофакторный анализ влияния параметров гидрогелевой композиции, нагруженной белком, на кинетику высвобождения mAb. Диапазоны распространены из исследования I, и отношение площадь поверхности:объем включено в качестве фактора. Описание образцов представлено в табл. 6.

Таблица 6. Многофакторное исследование II пространства проектных параметров гидрогеля, нагруженного белком

ID образца	Молекула	Содержание высушенного распылением белка (мас./мас.)	Фактическое молярное отношение (NH:NHS)	Общая нагрузка по твердому веществу (мас./мас.)	S:V мм ⁻¹	Категория S:V
mAb2A	mAb IgG4	0,5	1,1	0,7	35	Высокая
mAb2B	mAb IgG4	0,9	2,0	0,7	24	Высокая
mAb2C	mAb IgG4	0,5	1,5	0,2	79	Высокая
mAb2D	mAb IgG4	0,9	1,8	0,7	6	Средняя
mAb2F	mAb IgG4	0,5	2,0	0,2	3	Низкая
mAb2G	mAb IgG4	0,5	1,1	0,7	3	Низкая
mAb2D 2	mAb IgG4	0,9	1,8	0,7	4	Низкая
mAb2E	mAb IgG4	0,9	1,2	0,2	4	Низкая
mAb1-A	mAb IgG1	0,9	1,2	0,2	53	Высокая
mAb1-B	mAb IgG1	0,5	1,1	0,7	4	Средняя
mAb1-C	mAb IgG1	0,5	2,0	0,2	4	Средняя
mAb1-D	mAb IgG1	0,9	1,5	0,7	4	Средняя
mAb1-E	mAb IgG1	0,5	1,5	0,7	35	Высокая
mAb1-F	mAb IgG1	0,5	2,0	0,2	52	Высокая
mAb1-G	mAb IgG1	0,9	1,9	0,7	3	Низкая
mAb1-H	mAb IgG1	0,9	1,2	0,2	3	Низкая

Протокол получения mAb-X-ПЭГ представлен ниже.

I. Получение реагентов:

Добавляли ПЭГ реагенты в отдельные пробирки.

Добавляли ДХМ.

Тщательно смешивали до растворения ПЭГ реагентов.

Добавляли раствор ПЭГ-NH в каждую пробирку с белком, высушенным распылением.

Вращали и обрабатывали ультразвуком для суспендирования белка в растворе ПЭГ-NH.

После каждой стадии записывали массу.

II. Реакция поперечного сшивания:

Добавляли суспензию ПЭГ-NH/белок и смешивали с одновременным разливом.

Определяли молярное отношение (NH:NHS) на основании массы раствора ПЭГ-NHS и суспензии ПЭГ-NH/белок, добавленной в процессе получения, предполагая однородные растворы/суспензии.

Оставляли при комнатной температуре без крышки в вакуумной камере или под вытяжкой на ночь для испарения растворителя.

Выводы

На фиг. 2-6 показаны примеры влияния независимых факторов на профили высвобождения.

На фиг. 7-8 показаны примеры использования важных параметров композиции для изменения профилей высвобождения.

На фиг. 9 показан пример регулирующих факторов для противодействия влиянию изменения фактора формы с пластинок на микрочастицы на кинетику высвобождения. Микрочастицы получали измельчением и просеиванием, и они были неоднородными. Задачей было снижение взрывного высвобождения и достижение высвобождения на протяжении 45-56 дней.

Пример 2.

В данном примере изучали влияние трех факторов на профиль высвобождения гидрогеля: молярного отношения NH:NHS, молекулярной массы ПЭГ-NH и молекулярной массы ПЭГ-NHS. Молекулярные отношения выбирали из >1,0 и в диапазоне 1,3-1,8, чтобы достичь требуемой продолжительности <60 дней. В исследование включали доступные в продаже группы ПЭГ NH и NHS с 4 ответвлениями. Молярное отношение рассматривали как непрерывный фактор, а молекулярную массу ПЭГ-NH или ПЭГ-NHS рассматривали категориально. Проектные параметры представлены в табл. 7.

Таблица 7. Проектные параметры

Название фактора	Роль	Значения			
		1,3		1,8	
Молярное отношение (NH:NHS)	Непрерывная	1,3		1,8	
ММ ПЭГ-NH (4 ответвления)	Категориальная	10 кДа	15 кДа	20 кДа	40 кДа
ММ ПЭГ-NHS (4 ответвления)	Категориальная	10 кДа	15 кДа	20 кДа	40 кДа

Постоянные параметры в табл. 7: нагрузка по белку (mAb IgG1) 50%, нагрузка по твердому веществу 60% и SA:V ~23 мм⁻¹.

Ниже в табл. 8 представлены различные эксперименты, выполненные для создания прогностической модели.

Таблица 8

№ эксперимента	Молярное отношение	Реагент ПЭГ NH (кДа)	Реагент ПЭГ NHS (кДа)
1	1,8	10	15
2	1,3	10	20
3	1,8	15	20
4	1,3	15	15
5	1,3	20	20
6	1,3	20	10
7	1,3	40	40
8	1,8	40	15
9	1,8	40	10
10	1,6	10	15
11	1,6	20	10
12	1,6	20	40
13	1,6	40	40

На фиг. 10 представлен анализ модели. Эффективность >0,95 при AC<6 означает большую прогностическую силу модели.

Таблица 9. Иллюстративные возможности регулирования параметров

ММ ПЭГ-NH (кДа)	ММ ПЭГ-NHS (кДа)	Диапазон молярного отношения	Диапазон высвобождения (время до 99% высвобождения)
10	15	1,3-1,8	9-31 день
40	20	1,3-1,8	22-44 дня
15	10	1,3-1,8	37-59 дней

Как показано ниже в табл. 10, точность данной модели для четырех выбранных точек составляет >99,8%. Общая точность прогностического уравнения в данном примере композиции составляет >99,9%. Прогностическая точность (т.е. R-квадратичная) для всех сглаживаний композиций, использованных в модели, составляет >98%.

Таблица 10. Прогностическая модель почти совпадает с экспериментальными данными

% Высвобождения	Измеренное время (дни)	Прогнозное время (дни)	Отклонение (дни)
23,3	30,9	31,3	-0,4
51,5	42,0	41,7	-0,3
72,5	45,0	45,1	-0,1
99,7	49,0	49,0	0

В табл. 11 обобщены композиции X-ПЭГ с 4 ответвлениями с использованием различных молярных отношений, молекулярной массы ПЭГ NH и молекулярной массы ПЭГ NHS при постоянном содержании белка (IgG1 mAb1), вспомогательного вещества и отношении площадь поверхности:объем (SA:V) для достижения определенного периода высвобождения <60 дней.

Таблица 11

Период высвобождения (дни)	ММ ПЭГ NH (кДа)	ММ ПЭГ NHS (кДа)	Молярное отношение (NH:NHS)	Нагрузка по твердому веществу (% мас./мас.)
9	40	15	1,83	60
14	40	15	1,71	60
21	40	15	1,54	60
21	10	15	1,67	60
30	20	20	1,83	60
30	40	15	1,46	60
58	15	10	1,30	60

Пример 3.

В табл. 12 показано, что комбинации и соотношения смесей растворителей можно изменять для регулирования времени реакции X-ПЭГ для обеспечения возможности масштабирования производства. Время реакции определяют как время от первоначального смешивания растворителя/растворов ПЭГ до времени, когда гидрогель становится монолитной твердой структурой.

Таблица 12

Растворитель А	Растворитель В	Смесь растворителей А и В, % об./об.	Содержание ПЭГ реагента в растворителе А/В, мг/мл	Время реакции (секунды)
Метиленхлорид (ДХМ)	Этилацетат (ЕА)	90% ДХМ 10% ЕА	15	95
Метиленхлорид (ДХМ)	Этилацетат (ЕА)	50% ДХМ 50% ЕА	15	113
Метиленхлорид (ДХМ)	Н/Д	100% ДХМ	15	120
Метиленхлорид (ДХМ)	Хлороформ (Chl)	90% ДХМ 10% Chl	15	143
Метиленхлорид (ДХМ)	Хлороформ (Chl)	50% ДХМ 50% Chl	15	159

Эквиваленты

Несмотря на то, что данное изобретение описано вместе с конкретными вариантами реализации, изложенными выше, специалистам в данной области техники понятны их многочисленные альтернативы, модификации и другие варианты. Все такие альтернативы, модификации и варианты считаются входящими в сущность и объем данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гидрогеля с требуемым профилем высвобождения биологического вещества, находящегося в гидрогеле, причем до введения в гидрогель биологическое вещество представлено в твердофазной композиции, где гидрогель характеризуется требуемым периодом высвобождения, составляющим от одной недели до шести месяцев, в течение которого происходит высвобождение по меньшей мере 90% биологического вещества, и при этом указанный способ включает:

(а) предварительное определение массового отношения биологического вещества и вспомогательного вещества в диапазоне от 60 до 90% и предварительное определение по меньшей мере одного из следующих параметров:

- (a) количество нуклеофильных групп в первом предшественнике;
- (b) количество электрофильных групп во втором предшественнике;
- (c) молекулярная масса первого предшественника;
- (d) молекулярная масса второго предшественника;
- (e) массовое отношение биологического вещества и вспомогательного вещества к гидрогелю;
- (f) массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции и
- (g) отношение площади поверхности к объему гидрогеля;

(b1) определение молярного отношения нуклеофильной группы к электрофильной группе в отдельности до тех пор, пока не будет достигнут желаемый профиль высвобождения с использованием прогностической модели; или

(b2) определение молярного отношения нуклеофильной группы к электрофильной группе в комбинации с любыми вышеуказанными параметрами, которые не были предварительно определены на стадии (а), до тех пор, пока не будет достигнут требуемый профиль высвобождения с использованием прогностической модели; и

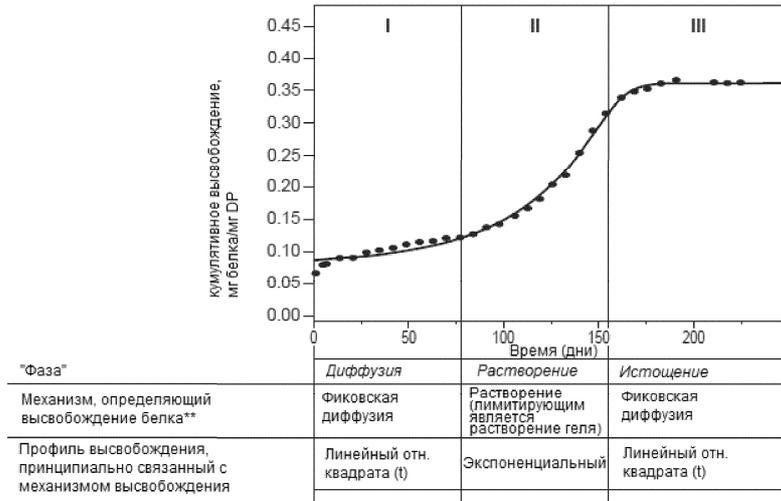
поперечное сшивание первого предшественника и второго предшественника при определенном указанном молярном отношении вокруг твердофазной композиции в безводных условиях,

где молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет от 1,1 до 2 и

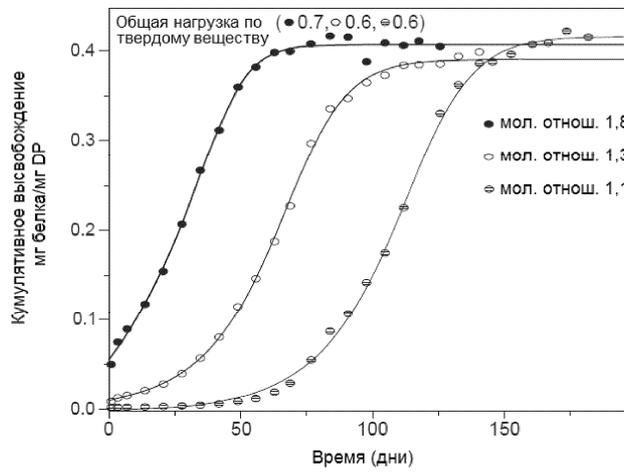
где первый предшественник и второй предшественник представляют собой молекулы, которые могут быть сшиты друг с другом, образуя гидрогель.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет от 1,5 до 2,0.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что молярное отношение нуклеофильной группы к электрофильной группе составляет от 1,3 до 1,8.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что биологическое вещество представляет собой рекомбинантный белок.
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что рекомбинантный белок представляет собой антитело или белок Тгар (гибридный белок с доменами рецептора-ловушки).
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что нуклеофильная группа включает группу первичного амина или первичного тиола.
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что электрофильная группа включает сукцинимидную группу, группу сложного эфира сукцинимида, *n*-гидроксисукцинимидную, малеимидную, сукцинатную, нитрофенилкарбонатную, альдегидную, винилсульфовую, азидную, гидразидную, изоцианатную, диизоцианатную, тозилльную, трезильную или карбонилдиимидазольную группу.
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество нуклеофильных групп в первом предшественнике составляет от примерно 2 до примерно 10.
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество нуклеофильных групп в первом предшественнике равно 4 или 8.
10. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество электрофильных групп во втором предшественнике составляет от примерно 2 до примерно 10.
11. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество электрофильных групп во втором предшественнике равно 4 или 8.
12. Способ по п.1, отличающийся тем, что первый предшественник содержит (аминопропил)_mполиоксиэтилен, где *m* находится в диапазоне от примерно 2 до примерно 10.
13. Способ по п.1, отличающийся тем, что молекулярная масса первого предшественника составляет от примерно 1 кДа до примерно 100 кДа.
14. Способ по п.1, отличающийся тем, что второй предшественник содержит (сукцинимидилоксиглутарил)_nполиоксиэтилен, где *n* находится в диапазоне от примерно 2 до примерно 10.
15. Способ по п.1, отличающийся тем, что молекулярная масса второго предшественника составляет от примерно 1 до примерно 100 кДа.
16. Способ по п.1, отличающийся тем, что массовое отношение биологического вещества к гидрогелю составляет от примерно 10 до примерно 90%.
17. Способ по п.1, отличающийся тем, что массовое процентное содержание биологического вещества в твердофазной композиции составляет от примерно 30 до примерно 95%.
18. Способ по п.1, дополнительно включающий получение твердофазной композиции способом, выбранным из группы, состоящей из распылительной сушки, измельчения, кристаллизации, осаждения, распылительной сублимационной сушки, сушки сверхкритической жидкости, электрораспыления и микросборки.
19. Способ по п.18, отличающийся тем, что способ получения твердофазной композиции представляет собой распылительную сушку.
20. Способ по п.18, отличающийся тем, что твердофазная композиция содержит частицы диаметром равным или меньшим 20 мкм.
21. Способ по п.1, отличающийся тем, что требуемый профиль высвобождения включает период высвобождения примерно от двух месяцев до шести месяцев, в течение которого происходит высвобождение по меньшей мере 90% биологического вещества.
22. Способ по п.1, отличающийся тем, что требуемый профиль высвобождения включает период высвобождения примерно от одной недели до двух месяцев, в течение которого происходит высвобождение по меньшей мере 90% биологического вещества.
23. Способ по п.1, отличающийся тем, что требуемый профиль высвобождения демонстрирует почти линейное высвобождение биологического вещества в течение по меньшей мере одной недели.
24. Способ по п.1, отличающийся тем, что требуемый профиль высвобождения включает участок отсроченного высвобождения, сигмоидальную форму, линейный участок, почти линейный участок, логарифмический участок, экспоненциальный участок или их комбинацию.
25. Способ по п.1, отличающийся тем, что поперечное шивание происходит в присутствии органического растворителя, который является безводным и гидрофобным.
26. Способ по п.25, отличающийся тем, что органический растворитель представляет собой метилхлорид, этилацетат, диметилкарбонат, хлороформ или их комбинацию.
27. Способ по п.1, отличающийся тем, что молярное отношение оказывает постоянный эффект на профиль высвобождения в прогностической модели.
28. Способ по п.1, отличающийся тем, что молекулярные массы первого и второго предшественников оказывают непостоянный эффект на профиль высвобождения в прогностической модели.

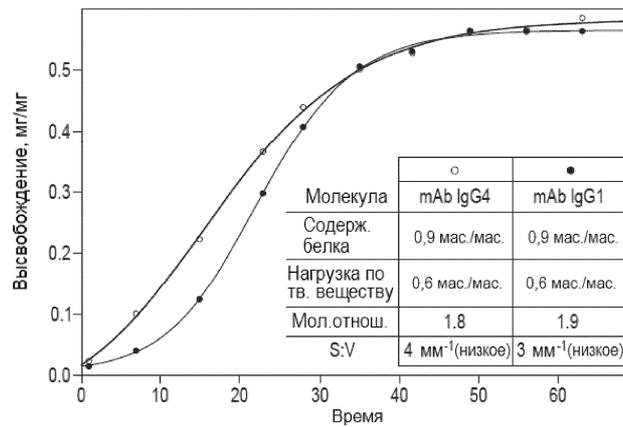
Пример сигмоидального высвобождения белка из матрицы хПЭГ*



Фиг. 1

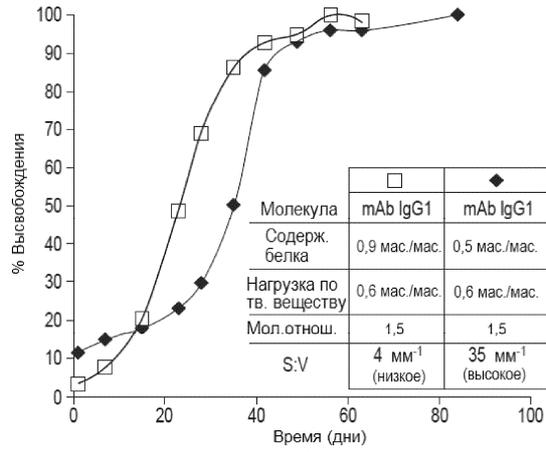


Фиг. 2

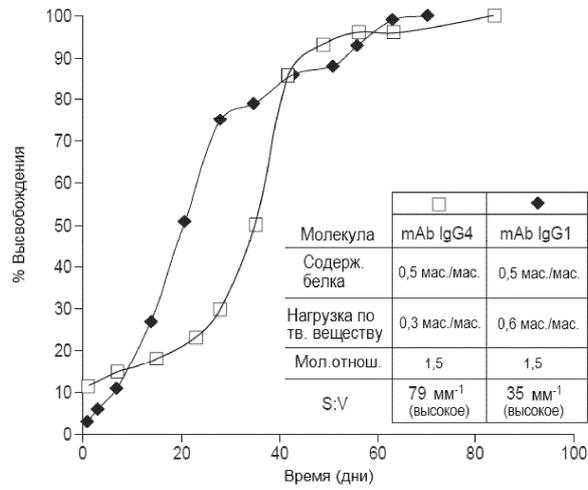


Фиг. 3

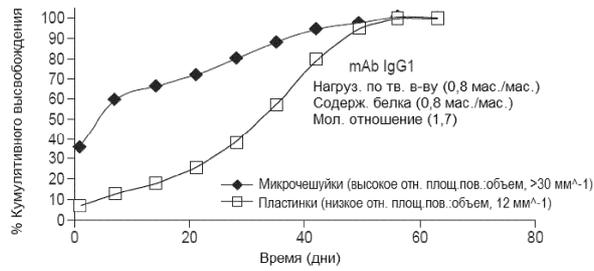
046077



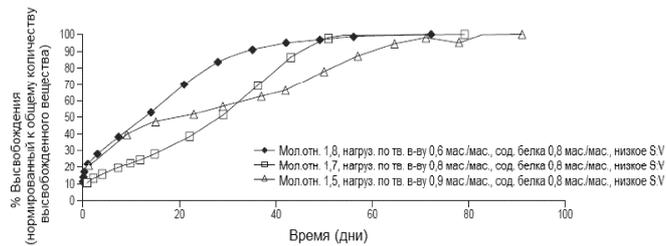
Фиг. 4



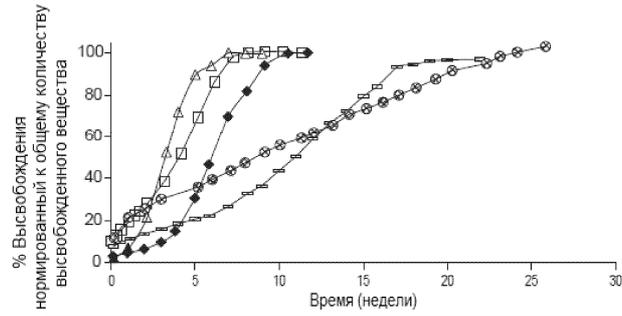
Фиг. 5



Фиг. 6

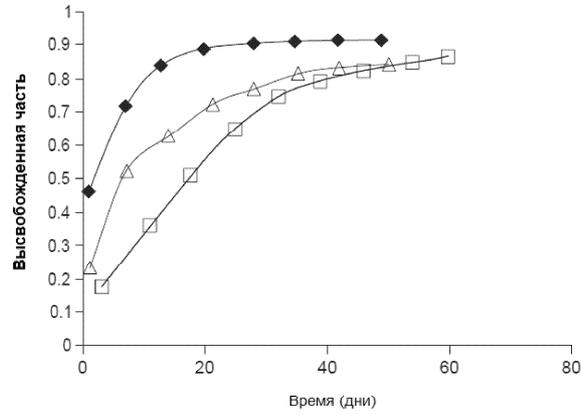


Фиг. 7



Молекула	Мол.отн. (NH:NHS)	Нагруз. по тв. в-ву (мас./мас.)	Сод. белка (мас./мас.)	Нагруз. по белку (мас./мас.)	форма	
□	mAb IgG1	1.7	0.8	0.8	0.6	Пленка (высокое S:V)
△	mAb IgG1	1.9	0.6	0.9	0.5	Пластинки (низкое S:V)
▭	mAb IgG4	1.6	0.8	0.8	0.6	Пластинки (низкое S:V)
⊗	биспецифич. mAb	1.5	0.5	0.8	0.4	Пластинки (низкое S:V)
◆	Белок Tgr	1.0	0.5	0.7	0.4	Пленка (высокое S:V)

Фиг. 8



Мол.отнош. (NH:NHS)	Нагруз. по тв. в-ву (мас./мас.)	Содержание белка (мас./мас.)	Ожидаемое S:V (микрочастицы)	
△	1.6	0.7	0.8	высокое >60 мм ⁻¹
◆	1.6	0.8	0.8	высокое >60 мм ⁻¹
□	1.8	0.7	0.9	высокое >60 мм ⁻¹

Фиг. 9

Анализ эффективности

Уровень значимости 0.05

Ожидаемая ср.-кв. ошибка 1

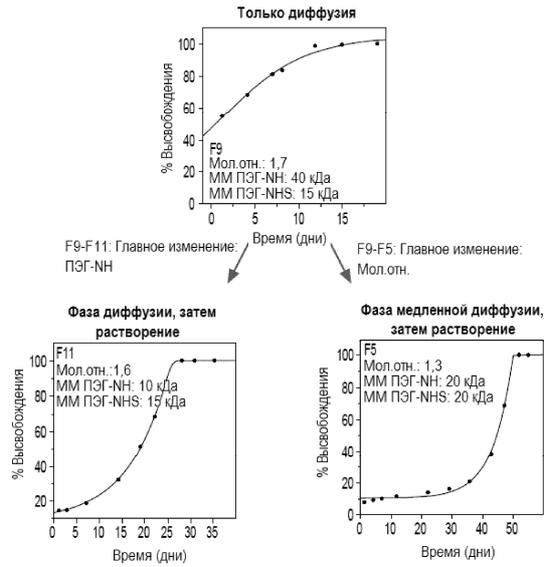
Параметр	Ожидаемый коэффициент	Эффективность
Отрезок	1	0.896
Мол. отношение	2	1.000
Реагент ПЭГ NH (4 ответвления) 1	2	0.971
Реагент ПЭГ NH (4 ответвления) 2	2	0.971
Реагент ПЭГ NH (4 ответвления) 3	2	0.971
Реагент ПЭГ NHS (4 ответвления) 1	2	0.971
Реагент ПЭГ NHS (4 ответвления) 2	2	0.971
Реагент ПЭГ NHS (4 ответвления) 3	2	0.971

Эффект	Сила
--------	------

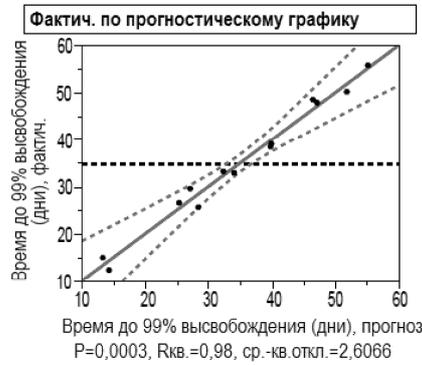
Реагент ПЭГ NH (4 ответвления) 1

Реагент ПЭГ NHS (4 ответвления) 1

Фиг. 10

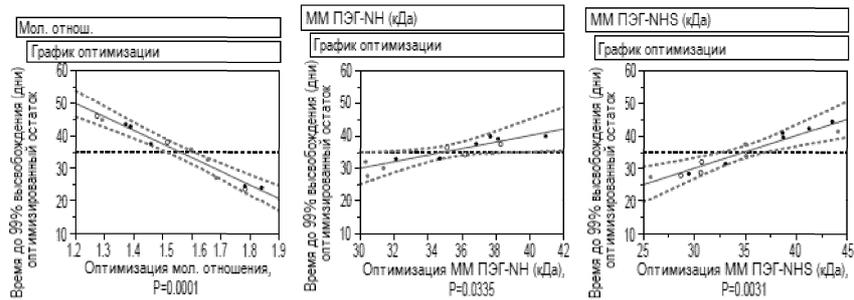


Фиг. 11

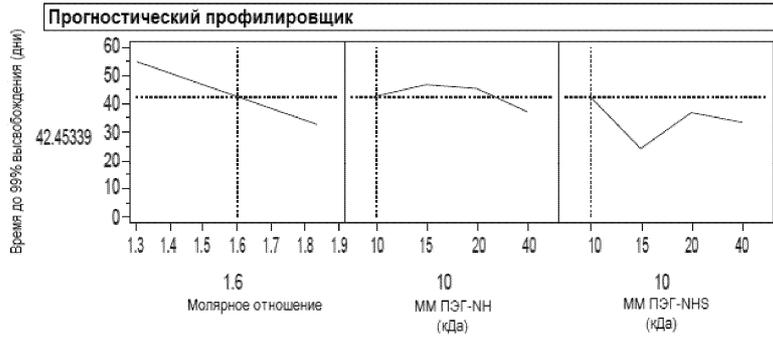


Обобщение сглаживания:	
Rкв.	0.984224
Rкв. корр.	0.962137
Ср.-кв. откл.	2.6066
Средний ответ	34.98908
Наблюдения (или сумма весов)	13

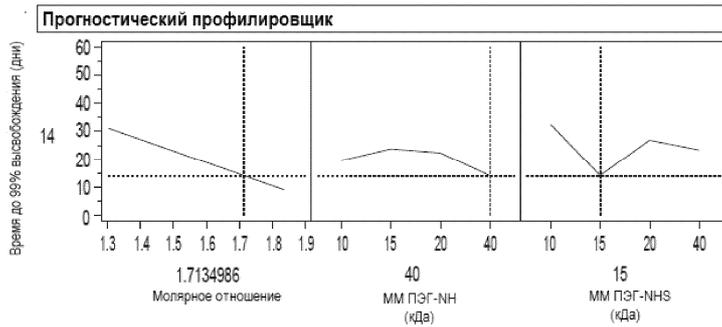
Фиг. 12



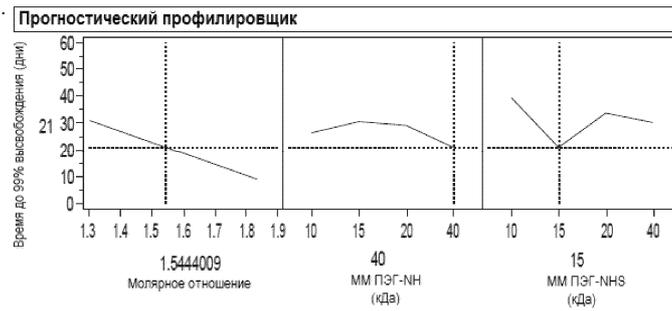
Фиг. 13



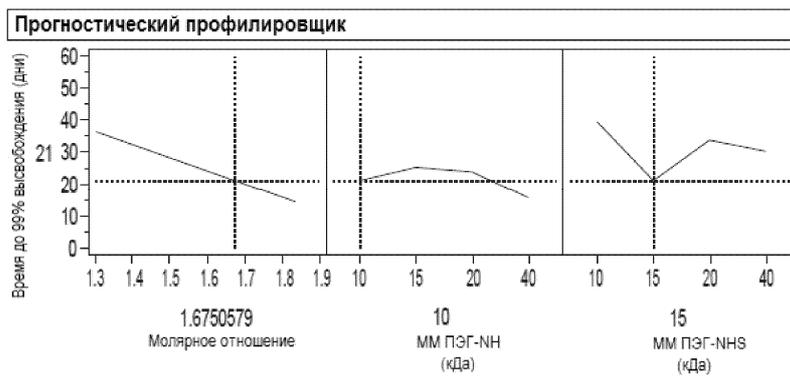
Фиг. 14



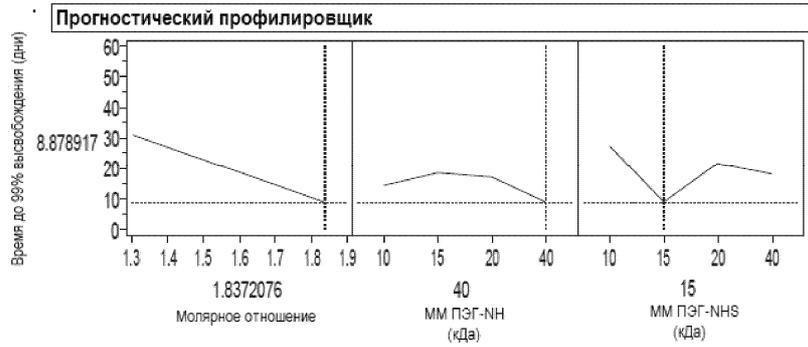
Фиг. 15



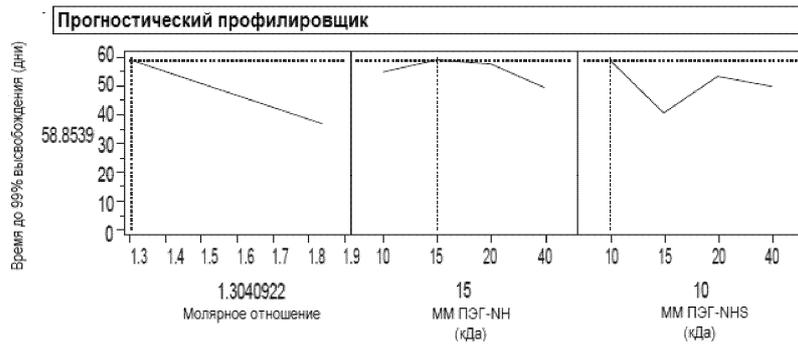
Фиг. 16



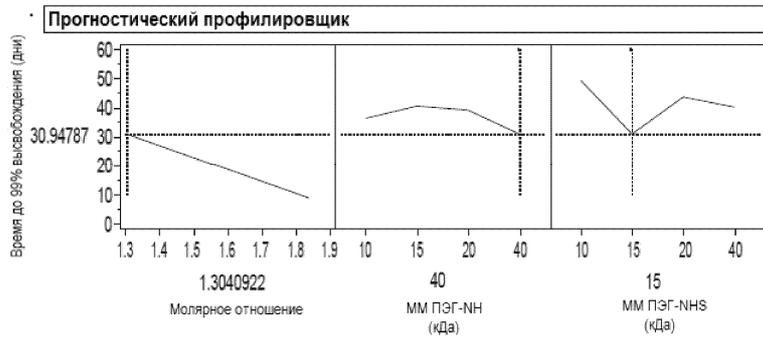
Фиг. 17



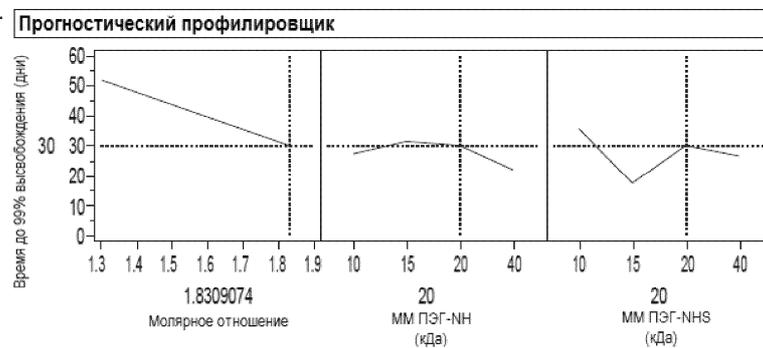
Фиг. 18



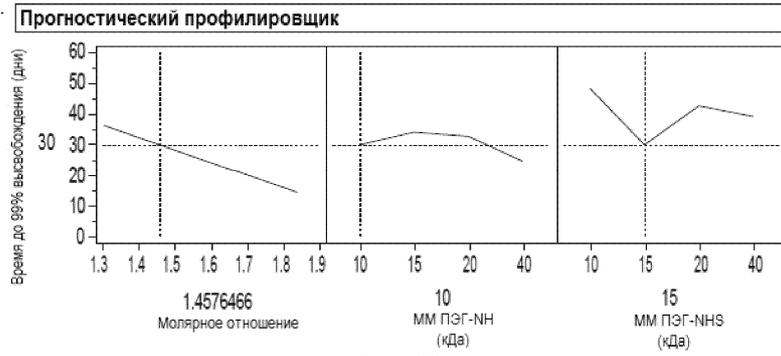
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22

