

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036522**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

| | |
|---|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента 2020.11.19 | (51) Int. Cl. <i>A61K 47/40</i> (2006.01) <i>A61K 47/30</i> (2006.01) <i>A61K 47/36</i> (2006.01) <i>A61K 47/02</i> (2006.01) <i>A61K 31/335</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки 201290482 | |
| (22) Дата подачи заявки 2010.12.10 | |

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ПРИГОДНАЯ ДЛЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ, СОДЕРЖАЩАЯ МНОЖЕСТВО ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ

| | |
|------------------------|-------------------------------|
| (31) 61/285,722 | (56) US-A1-20090170753 |
| (32) 2009.12.11 | US-A1-20070031402 |
| (33) US | US-A1-20040220081 |

(43) 2013.01.30
(86) PCT/US2010/059879
(87) WO 2011/072218 2011.06.16
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Трояно Грег, Зейл Стефен И., Райт Джеймс, Ван Ген Юовен Тина, Сонг Йоунг-хо (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, пригодным для лиофилизации, содержащим множество терапевтических наночастиц, включающих блоксополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля или блоксополимер сополимера полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты и полиэтиленгликоля; и активное средство, которые после восстановления лиофилизированной фармацевтической композиции в менее чем или 100 мл дистиллированной воды включают менее чем 6000 микрочастиц/мл размером более чем 10 мкм или равных 10 мкм.

B1

036522

036522

B1

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, пригодной для лиофилизации, содержащей множество терапевтических наночастиц, где каждая включает блоксополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля или блоксополимер сополимера полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты и полиэтиленгликоля; активное средство.

Предшествующий уровень техники

Системы, которые осуществляют доставку некоторых лекарственных средств пациенту (например, нацеленные на конкретную ткань или тип клеток или нацеленные на специфическую ткань, пораженную заболеванием, но не на нормальную ткань) или контролирующее высвобождение лекарственных средств, давно признаны полезными.

Например, способы терапии, которые включают активное лекарственное средство и нацеленные, например, на конкретную ткань или тип клеток или на специфическую пораженную заболеванием ткань, но не на нормальную ткань, могут снижать количество лекарственного средства в тканях организма, которые не нуждаются в лечении. Это особенно важно при лечении состояния, такого как рак, когда желательной является доставка цитотоксической дозы лекарственного средства к злокачественным клеткам без поражения окружающих доброкачественных тканей. Кроме того, такие способы терапии могут снижать нежелательные и иногда опасные для жизни побочные эффекты, сопутствующие противоопухолевой терапии. Кроме того, такие способы лечения могут позволять лекарственным средствам достигать некоторых тканей, которых они при доставке иным способом достичь не могут.

Доставку терапевтических наночастиц можно осуществлять парентеральной инъекцией растворенной суспензии наночастиц. Оригинальная суспензия наночастиц является лиофилизированной, т.е. высушенной сублимацией, для хранения перед восстановлением. Лيوфилизированная суспензия наночастиц потенциально создает продукт для восстановления с намного лучшей стабильностью при хранении, чем его замороженный в виде суспензии аналог. Кроме того, лиофилизация может обеспечить более удобные условия хранения, при которых не требуется очень низкая постоянная температура. Однако восстановленный лиофилизат должен обладать физико-химическими и функциональными свойствами, сравнимыми или превосходящими свойства оригинальной суспензии. Редиспергирование в частицы одинакового размера без присутствия небольшого количества объединенных частиц вследствие микроагрегации или присутствия недиспергированных частиц является наиболее трудным аспектом при лиофилизации суспензии наночастиц.

Таким образом, существует необходимость в терапевтических способах на основе наночастиц и способах получения таких наночастиц, которые способны к доставке терапевтических уровней лекарственного средства для лечения заболеваний, таких как рак, и обладают превосходными характеристиками хранения.

Сущность изобретения

В одном из аспектов изобретение относится к фармацевтической композиции, пригодной для лиофилизации, содержащей следующее:

множество терапевтических наночастиц, где каждая включает блоксополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля или блоксополимер сополимера полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты и полиэтиленгликоля;

активное средство;

от 5 до 20 мас.% сахарозы;

от 5 до 20 мас.% гидроксипропил- β -циклодекстрина;

250 или 500 мМ NaCl или CaCl₂,

где при восстановлении лиофилизированной фармацевтической композиции в менее чем или 100 мл дистиллированной воды восстановленная композиция, пригодная для парентерального введения, включает следующее количество частиц/мл:

менее чем 6000 микрочастиц более чем 10 мкм или равных 10 мкм.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, пригодной для лиофилизации, содержащей

множество терапевтических наночастиц, содержащих блоксополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля или блоксополимер сополимера полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты и полиэтиленгликоля;

активное средство;

от 5 до 20 мас.% сахарозы;

от 5 до 20 мас.% гидроксипропил- β -циклодекстрина,

где при восстановлении лиофилизированной фармацевтической композиции в менее чем или 100 мл дистиллированной воды восстановленная композиция, пригодная для парентерального введения, включает следующее количество частиц/мл:

менее чем 6000 микрочастиц более чем 10 мкм.

В одном из вариантов изобретения сополимер представляет собой следующее: полимолочная кислота-блок-полиэтиленгликоль.

В другом варианте изобретения часть сополимера полимолочной кислоты имеет среднечисловую молекулярную массу от 10 до 25 кДа и часть сополимера полиэтиленгликоля имеет среднечисловую молекулярную массу от 4 до 6 кДа.

В еще одном варианте изобретения часть сополимера полимолочной кислоты имеет среднечисловую молекулярную массу 16 кДа и часть сополимера полиэтиленгликоля имеет среднечисловую молекулярную массу 5 кДа.

В одном из вариантов изобретения терапевтические наночастицы имеют диаметр от 60 до 140 нм.

В другом варианте изобретения восстановленная лиофилизированная фармацевтическая композиция в форме водного образца включает 7-12 мас.% β -циклодекстрина.

В еще одном варианте изобретения относится к восстановленной лиофилизированной фармацевтической композиции в форме водного образца объемом 10 мл, с концентрацией наночастиц более 40 мг/мл, содержащей менее чем 600 частиц/мл с размером, более или равным 10 мкм, и менее чем 60 частиц/мл с размером, более или равным 25 мкм.

Количество микрочастиц можно определять способами, такими как в USP 32<788>, путем подсчета количества частиц в режиме светотени, в USP 32<788>, путем подсчета частиц с помощью микроскопа, лазерной дифракции и/или оптического определения отдельных частиц.

Наночастицы могут включать активное средство или терапевтическое средство, например таксан, и один, два или три биосовместимых полимера. Например, описываемой в настоящем описании является терапевтическая наночастица, содержащая приблизительно от 0,2 до приблизительно 35 мас.% терапевтического средства; приблизительно от 10 до приблизительно 99 мас.% сополимера поли(молочная)кислота-блок-поли(этилен)гликоль или сополимера поли(молочная)-сополи(гликолевая)кислота-блок-поли(этилен)гликоль; и приблизительно от 0 до приблизительно 50 мас.% поли(молочной)кислоты или поли(молочной)кислоты-со-поли(гликолевой) кислоты.

Иллюстративные терапевтические средства включают антинеопластические средства, такие как таксаны, например доцетаксел, и могут включать приблизительно от 10 до приблизительно 30 мас.% терапевтического средства, например таксановое средство.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена схема способа получения эмульсии для формирования описываемых наночастиц.

На фиг. 2 представлена схема описанного способа получения эмульсии.

На фиг. 3 представлено влияние концентрации соли и сахарозы на размер частиц в восстановленной суспензии наночастиц.

На фиг. 4 представлена температура цикла для различных составов для лиофилизации.

На фиг. 5 представлены размеры, определенные посредством динамического светорассеяния (DLS) различных растворенных суспензий наночастиц, описываемых в настоящем описании.

На фиг. 6 представлено количество частиц в различных растворенных суспензиях наночастиц, описываемых в настоящем описании.

На фиг. 7 представлена температура цикла для различных составов для лиофилизации.

На фиг. 8 представлены размеры наночастиц (измеренные с использованием DLS) различных растворенных суспензий наночастиц, описываемых в настоящем описании.

На фиг. 9 представлено количество частиц в различных растворенных суспензиях наночастиц, описываемых в настоящем описании.

На фиг. 10 представлено количество частиц в различных растворенных суспензиях наночастиц, описываемых в настоящем описании.

На фиг. 11 представлено количество частиц в различных растворенных суспензиях наночастиц, описываемых в настоящем описании.

На фиг. 12 представлено высвобождение доцетаксела из различных суспензий наночастиц *in vitro*, описываемых в настоящем описании.

На фиг. 13 представлено измерение размера наночастиц в суспензии с 5% трегалозой и 10% гидроксипропилциклодекстрином посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

На фиг. 14 представлены свойства суспензии наночастиц DSC с 10% трегалозой и 10% гидроксипропилциклодекстрином.

На фиг. 15 представлены свойства суспензии наночастиц DSC с 20% трегалозой и 15% гидроксипропилциклодекстрином.

На фиг. 16 представлены свойства суспензии наночастиц DSC с 10% сахарозой и 10% гидроксипропилциклодекстрином.

Подробное описание изобретения Настоящее изобретение в основном относится к лиофилизированным композициям с полимерными наночастицами и способам получения и применения таких терапевтических композиций. Такие композиции могут быть получены восстановлением лиофилизированной композиции, и они могут включать минимальное количество больших агрегатов наночастиц и/или других материалов. Таким образом, описанные композиции могут являться подходящими для парентерального применения.

Наночастицы

Как правило, композиции могут включать наночастицы, которые содержат активное средство. Как описано в настоящем описании, "наночастица" относится к любой частице, имеющей диаметр менее чем 1000 нм, например приблизительно от 10 нм до приблизительно 200 нм. Описанные терапевтические наночастицы могут включать наночастицы с диаметром приблизительно от 60 до приблизительно 120 нм, или приблизительно от 70 до приблизительно 130 нм, или приблизительно от 60 до приблизительно 140 нм.

Описанные наночастицы могут включать приблизительно от 0,2 до приблизительно 35 мас.%, приблизительно от 3 до приблизительно 40 мас.%, приблизительно от 5 до приблизительно 30 мас.%, от 10 до приблизительно 30 мас.%, 15-25 мас.% или даже приблизительно от 4 до приблизительно 25 мас.% активного средства, такого как антинеопластическое средство, например таксановое средство (например, доцетаксел).

Наночастицы, описываемые в настоящем описании, содержат один, два, три или более биосовместимых и/или биодеградируемых полимеров. Например, рассматриваемая наночастица может содержать приблизительно от 10 до приблизительно 99 мас.% одного или более блок сополимеров, которые включают биодеградируемый полимер и полиэтиленгликоль и приблизительно от 0 до приблизительно 50 мас.% биодеградируемого гомополимера.

Иллюстративные терапевтические наночастицы могут содержать приблизительно от 40 до приблизительно 90 мас.% сополимера поли(молочная)кислота-поли(этилен)гликоль или приблизительно от 40 до приблизительно 80 мас.% сополимера поли(молочная)кислота-поли(этилен)гликоль. Такой сополимер поли(молочная)кислота-блок-поли(этилен)гликоль может включать поли(молочную кислоту) со среднечисловой молекулярной массой приблизительно от 15 до 20 кДа (или, например, приблизительно от 15 до приблизительно 100 кДа, например, приблизительно от 15 до приблизительно 80 кДа) и поли(этилен)гликоль с среднечисловой молекулярной массой приблизительно от 2 до приблизительно 10 кДа, например приблизительно от 4 до приблизительно 6 кДа. Например, описанная терапевтическая наночастица может включать приблизительно от 70 до приблизительно 95 мас.% PLA-PEG и приблизительно от 5 до приблизительно 25 мас.% процентов доцетаксела. В другом примере описанная терапевтическая наночастица может включать приблизительно от 30 до приблизительно 50 мас.% процентов PLA-PEG, приблизительно от 30 до приблизительно 50 мас.% процентов PLA или PLGA и приблизительно от 5 до приблизительно 25 мас.% процентов доцетаксела. Такая PLA ((поли)молочная кислота) может иметь среднечисловую молекулярную массу приблизительно от 5 до приблизительно 10 кДа. Такая PLGA (поли(молочная)-со-гликолевая кислота) может иметь среднечисловую молекулярную массу приблизительно от 8 до приблизительно 12 кДа.

В одном из вариантов осуществления описанные терапевтические наночастицы могут включать нацеливающий лиганд, например низкомолекулярный лиганд PSMA, эффективный для лечения заболевания или нарушения, такого как рак предстательной железы, у нуждающегося в этом индивидуума. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный лиганд конъюгируют с полимером, и наночастица содержит определенное соотношение конъюгированного с лигандом полимера (например, PLA-PEG-лиганд) с нефункционализированным полимером (например, PLA-PEG или PLGA-PEG). Наночастица может иметь оптимальное соотношение этих двух полимеров, такое, что эффективное количество лиганда связано с наночастицей для лечения заболевания или нарушения, такого как рак.

В некоторых вариантах осуществления описанные наночастицы могут дополнительно содержать приблизительно от 0,2 до приблизительно 10 мас.% PLA-PEG, функционализированных с нацеливающим лигандом, и/или могут включать приблизительно от 0,2 до приблизительно 10 мас.% процентов функционализированного с нацеливающим лигандом поли(молочная)кислота-сополи(гликолевая)кислота-блок-PEG. Такой нацеливающий лиганд в некоторых вариантах осуществления может быть ковалентно связанным с PEG, например связанным с PEG посредством алкиленового линкера, например PLA-PEG-алкилен-GL2. Например, описанная наночастица может включать приблизительно от 0,2 до приблизительно 10 мол.% PLA-PEG-GL2 или поли(молочная)кислота-сополи(гликолевая)кислота-PEG-GL2. Следует понимать, что ссылка на PLA-PEG-GL2 или PLGA-PEG-GL2 относится к молекулам, которые могут включать алкиленовый линкер (например, C₁-C₂₀, например, (CH₂)₅), связывающий PEG с GL2.

В варианте осуществления терапевтическая наночастица может содержать приблизительно от 0,2 до приблизительно 35 мас.% терапевтического средства; приблизительно от 30 до приблизительно 99 мас.% сополимера поли(молочная)кислота-поли(этилен)гликоль или сополимера поли(молочная)-сополи(гликолевая)кислота-поли(этилен)гликоль; приблизительно от 0 до приблизительно 50 мас.% поли(молочная)кислота или поли(молочная)кислота-со-поли(гликолевая)кислота; и приблизительно от 0,2 до приблизительно 10 мас.% или приблизительно от 0,2 до приблизительно 30 мас.% PLA-PEG-GL2 или поли(молочная)кислота-со-поли(гликолевая)кислота-PEG-GL2. Например, PLA-PEG-GL2 может включать поли(молочную)кислоту с среднечисловой молекулярной массой приблизительно от 10000 до приблизительно 20000 Да и поли(этилен)гликоль со среднечисловой молекулярной массой приблизительно от 4000 до приблизительно 8000.

Полимеры

В некоторых вариантах осуществления наночастицы по изобретению включают матрицу полимера и терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство и/или нацеливающая молекула (т.е. низкомолекулярный лиганд PSMA) могут связываться по меньшей мере с частью полимерной матрицы. Например, в некоторых вариантах осуществления нацеливающая молекула (например, лиганд) может быть ковалентно связана с поверхностью полимерного матрикса. В некоторых вариантах осуществления ковалентная связь обусловлена линкером. Терапевтическое средство можно связывать с поверхностью, заключать в пределы, в окружение и/или рассредоточивать на всем протяжении полимерного матрикса.

Широкий ряд полимеров и способов образования частиц известны в данной области доставки лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления изобретение направлено на наночастицы по меньшей мере с двумя макромолекулами, где первая макромолекула содержит первый полимер, связанный с низкомолекулярным лигандом (например, нацеливающей макромолекулой); и вторая макромолекула содержит второй полимер, который не связан с нацеливающей молекулой. Наночастица необязательно может включать один или несколько дополнительных, нефункционализированных полимеров.

Любой полимер можно использовать в соответствии с настоящим изобретением. Полимеры могут являться природными или неприродными (синтетическими) полимерами. Полимеры могут являться гомополимерами или сополимерами, включающими два или более мономеров. В отношении последовательности сополимеры могут представлять собой случайные сополимеры, блок-сополимеры или включать комбинацию случайных последовательностей и блок-последовательностей. Как правило, полимеры в соответствии с настоящим изобретением представляют собой органические полимеры.

Как применяют в настоящем описании, термин "полимер" представлен в его типичном значении, как используют в данной области, т.е. молекулярная структура, содержащая один или несколько повторяющихся единиц (мономеров), соединенных ковалентными связями. Все повторяющиеся единицы могут являться идентичными или, в некоторых случаях, может быть представлен более чем один тип повторяющихся единиц, присутствующих в пределах полимера. В некоторых случаях полимер может быть получен биологическим способом, т.е. биополимером.

Неограничивающие примеры включают пептиды или белки. В некоторых случаях дополнительные молекулы могут также присутствовать в полимере, например биологические молекулы, такие, как описано ниже. Если более чем один тип повторяющихся единиц представлен в пределах полимера, то полимер указывают как "сополимер". Следует понимать, что в любом варианте осуществления используемый полимер, полимер подлежащий использованию, может в некоторых случаях представлять собой сополимер. Повторяющиеся единицы, образующие сополимер, можно располагать любым образом. Например, повторяющиеся единицы можно располагать в случайном порядке, в чередующемся порядке или в виде блок-сополимера, т.е. содержащем одну или несколько областей, где каждая содержит первую повторяющуюся единицу (например, первый блок) и одну или несколько областей, где каждая содержит вторую повторяющуюся единицу (например, второй блок) и т.д. Блок-сополимеры могут иметь два (диблок-сополимер), три (триблок-сополимер) или большее количество различных блоков.

Описанные частицы могут включать сополимеры, которые в некоторых вариантах осуществления включают два или более полимера (такие, как описано в настоящем описании), которые связаны вместе друг с другом посредством, как правило, ковалентного связывания двух или более полимеров. Таким образом, сополимер может содержать первый полимер и второй полимер, которые конъюгируют друг с другом с образованием блок-сополимера, где первый полимер может представлять собой первый блок блок-сополимера и второй полимер может представлять собой второй блок блок-сополимера. Разумеется, специалистам в данной области будет понятно, что блок-сополимер в некоторых случаях может содержать множество блоков полимера и что "блок-сополимер", как применяют в настоящем описании, не ограничен только блок-сополимерами, имеющими только один первый блок и один второй блок. Например, блок-сополимер может содержать первый блок, включающий первый полимер, второй блок, включающий второй полимер, и третий блок, включающий третий полимер или первый полимер, и т.д. В некоторых случаях блок-сополимеры могут содержать любое число первых блоков первого полимера и вторых блоков второго полимера (и в отдельных случаях, третий блок, четвертый блок и т.д.). Кроме того, следует отметить, что блок-сополимеры в некоторых случаях можно также формировать из других блок-сополимеров. Например, первый блок-сополимер можно конъюгировать с другим полимером (который может представлять собой гомополимер, биополимер, другой блок-сополимер и т.д.) для образования нового блок-сополимера, состоящего их множества типов блоков, и/или конъюгировать с другой молекулой (например, с неполимерными молекулами).

В некоторых вариантах осуществления полимер (например, сополимер, например, блок-сополимер) может являться амфифильным, т.е. иметь гидрофильную часть и гидрофобную часть или относительно гидрофильную часть и относительно гидрофобную часть. Гидрофильный полимер может представлять собой полимер, который в основном притягивает воду, и гидрофобный полимер может представлять собой такой полимер, который в основном отталкивает воду. Гидрофильный или гидрофобный полимер можно идентифицировать, например, посредством получения образца полимера и оценки его угла взаи-

модействия с водой (как правило, полимер будет иметь угол взаимодействия с водой менее чем 60° , тогда как гидрофобный полимер будет обладать углом взаимодействия с водой более чем приблизительно 60°). В некоторых случаях гидрофильность двух или более полимеров можно измерять относительно друг друга, т.е. первый полимер может являться более гидрофильным, чем второй полимер. Например, первый полимер может иметь меньший угол взаимодействия по сравнению со вторым полимером.

В одном ряду вариантов осуществления полимер (например, сополимер, например, блок-сополимер), рассматриваемый в настоящем описании, включает биосовместимый полимер, т.е. полимер, который, как правило, не вызывает ответной неблагоприятной реакции при введении или инъекции живому субъекту, например не вызывает значительного воспаления и/или острого отторжения полимера иммунной системой, например, посредством Т-клеточного ответа. Таким образом, терапевтические частицы, рассматриваемые в настоящем описании, могут являться неиммуногенными. Как применяют в настоящем описании, термин неиммуногенный относится к эндогенному фактору роста в его природном состоянии, которое в норме не приводит к появлению циркулирующих антител или приводит к появлению минимального уровня циркулирующих антител, Т-клеток или реактивных иммунных клеток, и который в норме не вызывает у индивидуума против себя иммунного ответа.

Биосовместимость, как правило, относится к острому отторжению материала посредством по меньшей мере части иммунной системы, т.е. не являющийся биосовместимым материал, имплантированный индивидууму, провоцирует иммунный ответ у субъекта, который может являться достаточно тяжелым, так что отторжение материала иммунной системой нельзя контролировать в достаточной степени, и оно часто представлено в степени, при которой материал должен быть удален из организма субъекта. Один пример тестирования для определения биосовместимости может представлять собой взаимодействие полимера с клетками *in vitro*; биосовместимые полимеры представляют собой полимеры, которые, как правило, в умеренной концентрации не приведут к значительной гибели клеток, например, при концентрации $50 \text{ мкг}/10^6$ клеток. Например, биосовместимый полимер может вызвать менее чем приблизительно 20% гибель клеток при взаимодействии с клетками, такими как фибробласты или эпителиальные клетки, даже если подвергается фагоцитозу или иному поглощению такими клетками. Неограничивающие примеры биосовместимых полимеров, которые могут быть пригодны в различных вариантах осуществления настоящего изобретения, включают полидиоксанон (PDO), полигидроксиалканонат, полигидроксибутират, поли(глицеринсебацат), полигликолид, полилактид, PLGA, поликапролактон, или сополимеры, или производные, включающие эти и/или другие полимеры.

В определенных вариантах осуществления рассматриваемые биосовместимые полимеры могут являться биodeградируемыми, т.е. полимер способен к деградации, химической и/или биологической, в пределах физиологического окружения, такого как в организме. Как применяют в настоящем описании, "биodeградируемые" полимеры представляют собой такие полимеры, которые при введении в клетки разрушаются клеточным механизмом (биологически деградируемые) и/или химическим способом, таким как гидролиз, (химически деградируемые) в компоненты, которые клетки могут или повторно использовать, или утилизировать без оказания значительного токсического эффекта на клетки. В одном из вариантов осуществления биodeградируемый полимер и побочные продукты его деградации могут являться биосовместимыми.

Например, рассматриваемый полимер может представлять собой такой полимер, который гидролизуется спонтанно при взаимодействии с водой (например, в пределах организма индивидуума), полимер может деградировать под действием нагревания (например, при температурах приблизительно 37°C). Деградация полимера может осуществляться с различными скоростями, в зависимости от используемого полимера или сополимера. Например, время полужизни полимера (время при котором 50% полимера может деградировать до мономеров и/или других неполимерных молекул) может составлять порядка суток, недель, месяцев или лет, в зависимости от полимера. Полимеры могут являться биodeградируемыми, например посредством ферментативной активности или клеточного механизма, в некоторых случаях, например, посредством взаимодействия с лизоцимом (например, имеющий относительно низкий pH). В некоторых случаях полимеры могут разрушаться до мономеров и/или других неполимерных молекул, которые клетки могут или использовать повторно, или утилизировать без оказания значительного токсического эффекта на клетки (например, полилактид можно гидролизовать с образованием молочной кислоты, полигликолид можно гидролизовать с образованием гликолевой кислоты и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой сложные полиэфиры, включающие сополимеры, содержащие единицы из молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как поли(молочная кислота-со-гликолевая кислота) и сополимер лактида с гликолидом, все вместе обозначенные в настоящем описании как "PLGA"; и гомополимеры, содержащие единицы из гликолевой кислоты, обозначаемые в настоящем описании как "PGA", и единицы из молочной кислоты, такие как поли-L-молочная кислота, поли-D-молочная кислота, поли-D,L-молочная кислота, поли-L-лактид, поли-D-лактид и поли-D,L-лактид, все вместе обозначенные в настоящем описании как "PLA". В некоторых вариантах осуществления иллюстративные сложные полиэфиры включают, например, полигидрокси-кислоты; пегилированные полимеры и сополимеры лактида и гликолида (например, пегилированный PLA,

пегилированный PGA, пегилированный PLGA и его производные). В некоторых вариантах осуществления сложные полиэфиры включают, например, полиангидриды, сложные поли(ортоэфиры), пегилированные сложные поли(ортоэфиры), поли(капролактон), пегилированный поли(капролактон), полилизин, пегилированный полилизин, поли(этиленмин), пегилированный поли(этиленмин), поли(L-лактид-со-L-лизин), сложный поли(эфир серина), сложный поли(эфир 4-гидрокси-L-пролина), поли[α -(4-аминобутил)-L-гликолевую кислоту] и их производные.

В некоторых вариантах осуществления полимер может представлять собой PLGA. PLGA представляет собой биосовместимый и биodeградируемый сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты, и различные формы PLGA могут быть охарактеризованы посредством отношения молочная кислота:гликолевая кислота. Молочная кислота может представлять собой L-молочную кислоту, D-молочную кислоту или D, L-молочную кислоту. Скорость деградации PLGA можно регулировать изменением отношения молочная кислота:гликолевая кислота. В некоторых вариантах осуществления используемый PLGA в соответствии с настоящим изобретением может быть охарактеризован посредством отношения молочная кислота:гликолевая кислота, составляющим приблизительно 85:15, приблизительно 75:25, приблизительно 60:40, приблизительно 50:50, приблизительно 40:60, приблизительно 25:75 или приблизительно 15:85. В некоторых вариантах осуществления отношения мономеров молочной кислоты к гликолевой кислоте в полимере частицы (например, блок-сополимер PLGA или блок-сополимер PLGA-PEG) можно выбирать для оптимизации различных параметров, таких как поглощение воды, высвобождение терапевтического средства, и/или можно оптимизировать кинетику деградации полимера.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой один или несколько акриловых полимеров. В определенных вариантах осуществления акриловые полимеры включают, например, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, сополимеры метилметакрилата, этоксиэтилметакрилатов, цианоэтилметакрилата, сополимер аминоалкилметакрилата, поли(акриловая кислота), поли(метакриловая кислота), сополимер метакриловой кислоты с алкиламидом, поли(метилметакрилат), поли(метакриловая кислота полиакриламид, сополимер аминоалкилметакрилата, сополимеры глицидилметакрилата, полицианоакрилатов и комбинации, содержащие один или несколько указанных выше полимеров. Акриловый полимер может содержать полностью полимеризованные сополимеры сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот с низким содержанием четвертичных аммониевых групп.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой катионные полимеры. Как правило, катионные полимеры способны конденсировать и/или защищать отрицательно заряженные цепи нуклеиновых кислот (например, ДНК, РНК или их производные). В некоторых вариантах осуществления в описываемой частице для применения рассматривают содержащие амин полимеры, такие как поли(лизин), полиэтиленмин (PEI) и поли(амидоамин) дендримеры.

В некоторых вариантах осуществления полимеры могут представлять собой разлагаемые сложные полиэфиры, несущие катионные боковые цепи. Примеры этих сложных полиэфиров включают поли(L-лактид-со-L-лизин), сложный поли(эфир серина), сложный поли(эфир 4-гидрокси-L-пролина).

Частицы, описываемые в настоящем описании, могут содержать PEG и могут не содержать PEG. Кроме того, некоторые варианты осуществления могут быть направлены на сополимеры, содержащие поли(сложные эфиры-простые эфиры), например полимеры, имеющие повторяющиеся единицы, связанные сложноэфирной связью (например, связи R-C(O)-O-R') и простыми эфирными связями (например, связями R-O-R'). В некоторых вариантах осуществления изобретения биodeградируемый полимер, такой как гидролизуемый полимер, содержащий кислые карбоксильные группы, можно конъюгировать с повторяющимися единицами поли(этиленгликоля) с образованием поли(сложный эфир-простой эфир). Полимер (например, сополимер, например, блок-сополимер), содержащий повторяющиеся единицы поли(этиленгликоля), также может быть обозначен как "пегилированный" полимер.

Предполагают, что PEG может оканчиваться и включать концевую группу, например, если PEG не конъюгируют с лигандом. Например, PEG может оканчиваться гидроксильной группой, метоксигруппой или другой алкоксильной группой, метильной или другой алкильной группой, арильной группой, карбоновой кислотой, амином, амидом, ацетильной группой, гуанидиновой группой или имидазолом. Другие рассматриваемые концевые группы включают азид, алкин, малеинимид, альдегид, гидразид, гидроксилламин, алкоксиламин или тиоловые молекулы.

Специалистам в данной области известны способы и методики пегилирования полимера, например, с использованием EDC (гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида) и NHS (N-гидроксисукцинимид) для взаимодействия полимера с группой PEG, оканчивающейся амином, посредством методик с применением реакций метатезиса с раскрытием цикла (ROMP) или т.п.

В одном из вариантов осуществления молекулярную массу полимеров можно оптимизировать для эффективного лечения, как описано в настоящем описании. Например, молекулярная масса полимера может оказывать влияние на скорость деградации частицы (как, например, если молекулярную массу биodeградируемого полимера можно регулировать), растворимость, поглощение воды и кинетику высвобождения лекарственного средства. Например, молекулярную массу полимера можно регулировать таким образом, чтобы частица подвергалась биodeградации у пациента, подлежащего лечению, в пределах

подходящего периода времени (в диапазоне от нескольких часов до 1-2 недель, 3-4 недель, 5-6 недель, 7-8 недель и т.д.). Описанная частица может включать, например, диблок-сополимер PEG и PL(G)A, где, например, часть PEG может иметь среднечисловую молекулярную массу приблизительно 1000-20000, например, приблизительно 2000-20000, например, приблизительно от 2 до приблизительно 10000, и часть PL(G)A может иметь среднюю молекулярную массу приблизительно от 5000 до приблизительно 20000 или приблизительно 5000-100000, например, приблизительно 20000-70000, например, приблизительно 15000-50000.

Например, описываемой в настоящем описании является иллюстративная терапевтическая наночастица, которая содержит приблизительно от 10 до приблизительно 99 мас.% процентов сополимера поли(молочной)кислоты-поли(этилен)гликоля или сополимер поли(молочная)-со-поли(гликолевая) кислота-полиэтилен) гликоль, или приблизительно от 20 до приблизительно 80 мас.%, приблизительно от 40 до приблизительно 80 мас.%, или приблизительно от 30 до приблизительно 50 мас.%, или приблизительно от 70 до приблизительно 90 мас.% сополимера поли(молочная)кислота-поли(этилен)гликоль или сополимера поли(молочная)-со-поли(гликолевая)кислота-поли(этилен)гликоль. Иллюстративные сополимеры поли(молочная)кислота-поли(этилен)гликоль могут включать среднечисловую молекулярную массу приблизительно от 15 до приблизительно 20 кДа или приблизительно от 10 до приблизительно 25 кДа поли(молочной)кислоты и среднечисловую молекулярную массу приблизительно от 4 до приблизительно 6 или приблизительно от 2 до приблизительно 10 кДа поли(этилен)гликоля.

Описанные наночастицы необязательно могут содержать приблизительно от 1 до приблизительно 50 мас.% поли(молочной)кислоты или поли(молочная)кислота-со-поли(гликолевая)кислота (которая не включает PEG) или необязательно может содержать приблизительно от 1 до приблизительно 50 мас.%, или приблизительно от 10 до приблизительно 50 мас.%, или приблизительно от 30 до приблизительно 50 мас.% процентов поли(молочной)кислоты или поли(молочная)кислота-со-поли(гликолевой)кислоты. Например, поли(молочная) или поли(молочная)-со-поли(гликолевая)кислота может иметь среднюю молекулярную массу приблизительно от 5 до приблизительно 15 кДа или приблизительно от 5 до приблизительно 12 кДа. Иллюстративная PLA может иметь среднечисловую молекулярную массу приблизительно от 5 до приблизительно 10 кДа. Иллюстративная PLGA может иметь среднечисловую молекулярную массу приблизительно от 8 до приблизительно 12 кДа.

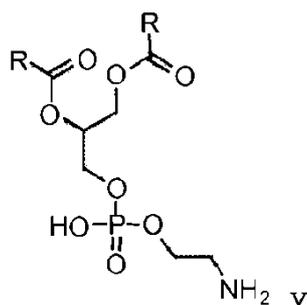
В определенных вариантах осуществления полимеры наночастиц можно конъюгировать с липидом. Полимер может представлять собой, например, липид, оканчивающийся PEG. Как описано ниже, липидную часть полимера можно использовать для самосборки с другим полимером, облегчающим формирование наночастицы. Например, гидрофильный полимер может быть конъюгирован с липидом, который будет подвергаться самосборке с гидрофобным полимером.

В некоторых вариантах осуществления липиды представляют собой масла. В основном любое масло, известное в данной области, можно конъюгировать с полимерами, используемыми в изобретении. В некоторых вариантах осуществления масло может включать одну или несколько групп жирных кислот или их солей. В некоторых вариантах осуществления группа жирной кислоты может включать легкоусвояемые, длинноцепочечные (например, C₈-C₅₀), замещенные или незамещенные углеводороды. В некоторых вариантах осуществления группа жирной кислоты может представлять собой жирную кислоту C₁₀-C₂₀ или ее соль. В некоторых вариантах осуществления группа жирной кислоты может представлять собой жирную кислоту C₁₅-C₂₀ или ее соль.

В некоторых вариантах осуществления жирная кислота может быть ненасыщенной. В некоторых вариантах осуществления группа жирной кислоты может быть мононенасыщенной. В некоторых вариантах осуществления группа жирной кислоты может являться полиненасыщенной. В некоторых вариантах осуществления двойная связь группы ненасыщенной жирной кислоты может быть представлена в конформации цис. В некоторых вариантах осуществления двойная связь ненасыщенной жирной кислоты может быть представлена в конформации транс.

В некоторых вариантах осуществления группа жирной кислоты может представлять собой одну или более из масляной, капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой, пальмитиновой, стеариновой, арахидиновой, бегеновой или лигноцеридиновой кислот. В некоторых вариантах осуществления группа жирной кислоты может представлять собой одну или более из пальмитилолиновой, олеиновой, вакценовой, линолевой, альфа-линоленовой, гамма-линолевой, арахидиновой, гадолеиновой, арахидиновой, эйкозапентаеновой, докозагексаеновой или эруковой кислот.

В одном из вариантов осуществления необязательные малые нацеливающие молекулы связаны, например ковалентно связаны, с липидным компонентом наночастицы. Например, обеспеченной в настоящем описании является наночастица, содержащая терапевтическое средство, полимерный матрикс, включающий функционализированные и нефункционализированные полимеры, липиды и низкомолекулярный нацеливающий лиганд PSMA, где нацеливающий лиганд связан, например ковалентно связан, с липидным компонентом наночастицы. В одном из вариантов осуществления липидный компонент, который связан с низкомолекулярной нацеливающей молекулой, представлен формулой V:



и его солью, где каждый R независимо представляет собой C_{1-30} алкил. В одном из вариантов осуществления формулы V липид может представлять собой 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPE) и его соли, например натриевую соль. В другом варианте осуществления изобретения относится к специфичной наночастице-мишени, содержащей терапевтическое средство, полимерный матрикс, DSPE и низкомолекулярный нацеливающий лиганд PSMA, где лиганд связан, например ковалентно связан, с DSPE. Например, наночастица по изобретению может содержать полимерный матрикс, включающий PLGA-DSPE-PEG-лиганд.

Рассматриваемая наночастица может включать соотношение связанного с лигандом полимера с нефункционализированным полимером, эффективным для лечения рака предстательной железы, где гидрофильный, связанный с лигандом полимер конъюгирует с липидом, который будет осуществлять сборку с гидрофобным полимером, таким образом, гидрофобные и гидрофильные полимеры, которые составляют наночастицу, не являются ковалентно связанными. "Самосборка" относится к процессу самопроизвольной сборки высокоупорядоченной структуры, которая основана на природном притяжении компонентов высокоупорядоченной структуры (например, молекулы) друг к другу. Это, как правило, происходит посредством случайных движений молекул и формирования связей, основанных на размере, форме, составе или химических свойствах. Например, такой способ включает обеспечение первого полимера, который подвергают взаимодействию с липидом, для образования конъюгата полимер/липид. Конъюгат полимер/липид затем подвергают взаимодействию с низкомолекулярным лигандом для получения связанного с лигандом конъюгата полимер/липид; и смешивание связанного с лигандом конъюгата полимер/липид со вторым, нефункционализированным полимером, и терапевтического средства; таким образом, формируется наночастица. В определенных вариантах осуществления первый полимер представляет собой PEG, таким образом, формируют PEG, концевой липид. В одном из вариантов осуществления липид представлен формулой V, например 2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DSPE) и его солью, например натриевой солью. Концевой липид PEG затем может быть смешан, например, с PLGA для образования наночастицы.

Нацеливающие молекулы

Обеспеченными в настоящем описании являются наночастицы, которые могут включать необязательную нацеливающую молекулу, т.е. молекулу, способную связываться или другим образом ассоциироваться с биологической структурой, например мембранным компонентом, рецептором клеточной поверхности, специфическим мембранным антигеном предстательной железы или т.п. Нацеливающая молекула, присутствующая на поверхности частицы, может обеспечить частице положение, локализованное на конкретном целевом участке, например опухоли, участке заболевания, ткани, органе, типе клеток и т.д. В связи с этим наночастица затем может являться "специфической мишенью". Лекарственное средство или другое полезное средство затем, в некоторых случаях, может быть высвобождено из частицы и обеспечить локальное взаимодействие с конкретным целевым участком.

В конкретном варианте осуществления лекарственное средство или другое полезное средство может быть высвобождено из частицы способом контролируемого высвобождения, и обеспечено локальное взаимодействие с конкретным целевым участком (например, опухолью). Как применяют в настоящем описании, термин "контролируемое высвобождение" (и варианты этого термина) (например, в отношении "системы контролируемого высвобождения") обычно подразумевает осуществление высвобождения вещества (например, лекарственного средства) в выбранном участке или контролирования иным образом скорости, интервала и/или высвобождаемого количества. Контролируемое высвобождение включает, но необязательно ограничивается этим, по существу непрерывную доставку, упорядоченную доставку (например, периодическую доставку в течение периода времени, которую прерывают через равные или неравные интервалы времени) и болюсную доставку выбранного вещества (например, в виде предопределенного, дискретного количества, если вещество доставляется в течение относительно короткого периода времени, например, нескольких секунд или минут).

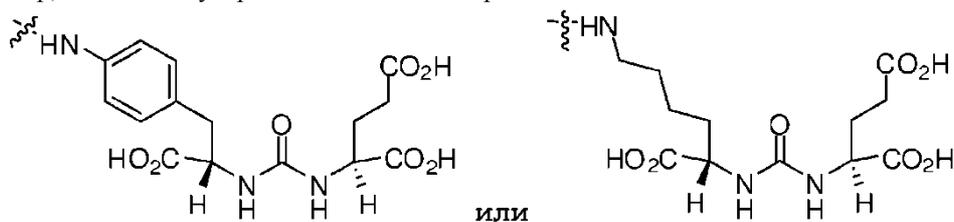
В одном из вариантов осуществления описанная наночастица включает нацеливающую молекулу, которая представляет собой низкомолекулярный лиганд, например низкомолекулярный лиганд PSMA. Как применяют в настоящем описании, термин "связывать" или "связывание" относится к взаимодействию между соответствующими парами молекул или их частями, которые демонстрируют взаимное сродство или связывающую способность, как правило, вследствие специфического или неспецифического

связывания или взаимодействия, включая, не, не ограничиваясь ими, биохимические, физиологические и/или химические взаимодействия. "Биологическое связывание" определяет тип взаимодействия, которое происходит между парами молекул, включающих белки, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, углеводы, гормоны или т.п. Термин "партнер для связывания" относится к молекуле, которая может подвергаться связыванию с конкретной молекулой. "Специфическое связывание" относится к молекулам, таким как полинуклеотиды, которые способны связываться или распознавать партнера (или ограниченное число партнеров для связывания) по существу в более высокой степени, чем с другими похожими биологическими структурами. В одном из вариантов осуществления нацеливающая молекула обладает аффинностью (как измерено посредством определения константы диссоциации) менее чем приблизительно 1 микромолярной, по меньшей мере приблизительно 10 микромолярной аффинностью или по меньшей мере приблизительно 100 микромолярной аффинностью.

Например, нацеливающая часть может дать возможность частицам локализоваться в опухоли (например, солидной опухоли) участка заболевания, ткани, органа, типах клеток и т.д. в организме субъекта в зависимости от используемой нацеливающей молекулы. Например, низкомолекулярный лиганд PSMA может быть локализован в солидной опухоли, например в опухоли молочной железы, или предстательной железы, или раковых клетках. Субъект может представлять собой человека или не являющееся человеком животное. Примеры субъектов включают, но не ограничиваясь ими, млекопитающее, такое как собака, кошка, лошадь, осел, кролик, корова, свинья, овца, коза, крыса, мышь, морская свинка, хомяк, примат, человек или т.п.

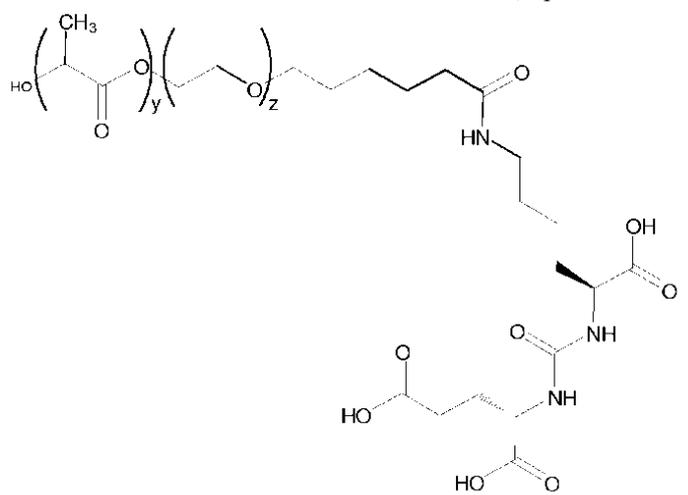
Например, нацеливающая молекула может представлять собой небольшую мишень раковой опухоли предстательной железы, например нацеливающая группа может представлять собой ингибитор пептидазы PSMA. Эти молекулы в настоящем описании также обозначают как "низкомолекулярные лиганды PSMA". При сравнении с экспрессией в нормальных тканях экспрессия специфического мембранного антигена в предстательной железе (PSMA) по меньшей мере в 10 раз выше в раковой ткани предстательной железы по сравнению с нормальной тканью, и уровень экспрессии PSMA дополнительно повышен при прогрессировании заболевания в фазу метастазирования опухоли (Silver et al. 1997, Clin. Cancer Res., 3:81).

Например, низкомолекулярный лиганд PSMA представляет собой



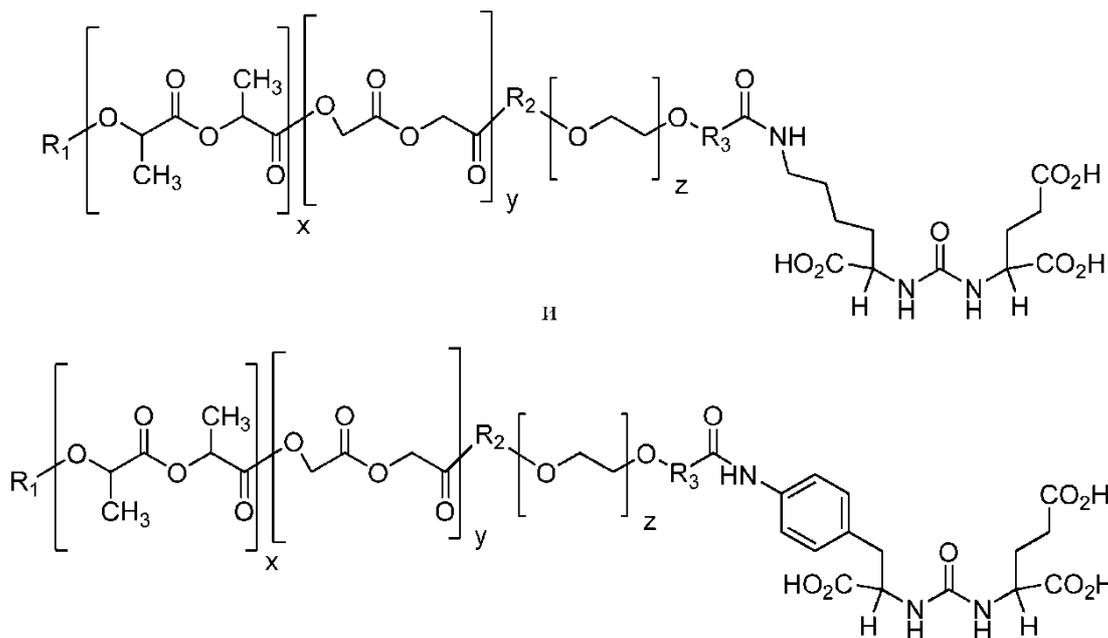
и энантимеры, стереоизомеры, ротамеры, таутомеры, диастереомеры или их рацематы. Конкретно бутиламинное соединение обладает преимуществом простоты синтеза, особенно вследствие отсутствия бензольного кольца.

Например, описанная наночастица может включать конъюгат, представленный



где y равен приблизительно 222 и z равен приблизительно 114.

Например, описанная наночастица включает полимерное соединение, выбранное из



где R_1 выбран из группы, состоящей из H и C_1 - C_{20} -алкильной группы, необязательно замещенной галогеном;

R_2 представляет собой связь, сложноэфирную связь или амидную связь;

R_3 представляет собой C_1 - C_{10} -алкилен или связь;

x равен от 50 до приблизительно 1500, например приблизительно от 170 до приблизительно 260;

y равен от 0 до приблизительно 50, например y равен 0; и

z равен приблизительно от 30 до приблизительно 456, или приблизительно от 30 до приблизительно 200, например z равен приблизительно от 80 до приблизительно 130.

Терапевтические средства

Средства, включающие, например, терапевтические средства (например, средства против злокачественной опухоли), диагностические средства (например, контрастные средства; радионуклиды; и флуоресцентные, люминесцентные и магнитные молекулы), профилактические средства (например, вакцины) и/или нутрицевтики (например, витамины, минералы и т.д.) составляют часть описываемых наночастиц. Примеры средств, подлежащих доставке в соответствии с настоящим изобретением, включают, но, не ограничиваясь ими, низкомолекулярные соединения (например, цитотоксические средства), нуклеиновые кислоты (например, средства миРНК, РНКи и микроРНК), белки (например, антитела), пептиды, липиды, углеводы, гормоны, металлы, радиоактивные элементы и соединения, лекарственные средства, вакцины, иммунологические средства и т.д. и/или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления доставляемые средства представляют собой средства, пригодные для лечения рака (например, рака предстательной железы).

Активное средство или лекарственное средство может представлять собой терапевтическое средство (например, химиотерапевтическое), так как ингибиторы mTog (например, сиролимус, темсиролимус или эверолимус), алкалоиды барвинка (например, винорелбин или винкристин), дитерпеновое производное, таксан (например, паклитаксел или его производные, такие как ДНА-паклитаксел или ПГ-паклитаксел или доцетаксел), сердечно-сосудистое средство (например, диуретик, сосудорасширяющее средство, ангиотензинпревращающий фермент, бета блокатор, антагонист альдостерона или противосвертывающее средство), кортикостероид, антимагнитин или антифолат (например, метотрексат), химиотерапевтическое средство (например, эпотилон В), алкилирующее средство (например, бендамустин), или активное средство, или лекарственное средство могут представлять собой миРНК.

В варианте осуществления активное или терапевтическое средство можно конъюгировать (или не конъюгировать), например, с описываемым полимером, который формирует часть описываемой наночастицы, например, активное средство можно конъюгировать (например, ковалентно связывать, например, прямо или посредством связывающей молекулы) с PLA, или PGLA, или частью сополимера PLA, или PLGA, такого как PLA-PEG или PLGA-PEG.

Получение наночастицы

Другой аспект настоящего изобретения направлен на системы и способы получения описываемых наночастиц. В некоторых вариантах осуществления с использованием двух или более различных полимеров (например, сополимеров, например, блок-сополимеров) в различных отношениях и получением частиц из полимеров, например сополимеров (например, блок-сополимеров), контролируют свойства частиц. Например, один полимер, например сополимер (например, блок-сополимер) может включать

низкомолекулярный лиганд PSMA, тогда как другой полимер, например сополимер (например, блок-сополимер) может быть выбран по его биологической совместимости и/или его способности контролировать иммуногенность получаемой в результате частицы.

В одном из вариантов осуществления частицы формируют посредством получения раствора, содержащего один или несколько полимеров, и взаимодействием раствора с нерастворяющимся полимером для получения частицы. Раствор может быть смешиваемым или несмешиваемым с нерастворяющимся полимером. Например, водорастворимые жидкости, такие как ацетонитрил, могут содержать полимеры, и частицы формируются, как только ацетонитрил контактирует с водой, нерастворяющимся полимером, например, посредством выливания ацетонитрила в воду с контролируемой скоростью. Содержащийся в растворе полимер при взаимодействии с нерастворяющимся полимером может затем осаждаться с формированием частиц, таких как наночастицы. Две жидкости считают "несмешивающимися" или не смешиваемыми друг с другом, если при температуре окружающей среды и давлении одна не растворяется в другой на уровне по меньшей мере 10 мас.%. Обычно органический растворитель (например, дихлорметан, ацетонитрил, хлороформ, тетрагидрофуран, ацетон, формамид, диметилформамид, пиридины, диоксан, диметилсульфоксид и т.д.) и водная жидкость (например, вода или вода, содержащая растворенные соли или другие препараты, клетки или биологическую среду, этанол и т.д.) являются нерастворимыми по отношению друг к другу. Например, первый раствор можно выливать во второй раствор (на подходящем уровне или скорости). В некоторых случаях частицы, такие как наночастицы, можно формировать при взаимодействии первого раствора с несмешивающейся второй жидкостью, например, осаждение полимера при взаимодействии побуждает полимер формировать наночастицы, в то время как первый раствор выливают во вторую жидкость, и в некоторых случаях, например, наночастицы могут формироваться при тщательном контроле скорости введения и поддержании ее на относительно низком уровне. Специалист в данной области может легко оптимизировать контроль такого формирования частиц с использованием только общепринятого экспериментирования.

В другом варианте осуществления предоставлен способ получения наноэмульсии, такой как способ, представленный на фиг. 1 и 2. Например, терапевтическое средство, первый полимер (например, диблок сополимер, такой как PLA-PEG или PLGA-PEG, каждый из которых необязательно можно связывать с лигандом, например, GL2) и необязательный второй полимер (например, (PL(G)A-PEG или PLA) с органическим раствором, необходимый для формирования первой органической фазы. Такая первая фаза может включать приблизительно от 5 до приблизительно 50 мас.% твердого вещества, например приблизительно от 5 до приблизительно 40% твердого вещества или приблизительно от 10 до приблизительно 30% твердого вещества. Первую органическую фазу можно комбинировать с первым водным раствором для формирования второй фазы. Органический раствор может включать, например, толуол, метилэтилкетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран, этилацетат, изопропиловый спирт, изопропилацетат, диметилформамид, метилхлорид, дихлорметан, хлороформ, ацетон, бензиловый спирт, Tween 80, Span 80 или т.п. и их комбинации. В варианте осуществления органическая фаза может включать бензиловый спирт, этилацетат и их комбинации. Вторая фаза может иметь приблизительно от 1 и 50 мас.%, например приблизительно от 5-40 мас.% твердого вещества. Водный раствор может представлять собой воду, необязательно в комбинации с одним или несколькими из холата натрия, этилацетата, поливинилацетата и бензинового спирта.

Например, в масляной или органической фазе можно использовать растворитель, который является только частично смешиваемым с не растворителем (водой). Таким образом, при смешивании в достаточно низком отношении и/или при использовании воды, предварительно насыщенной органическими растворителями, масляная фаза остается в жидком состоянии. Масляную фазу можно эмульгировать в водном растворе и в виде жидких капель формировать в наночастицы с использованием, например, высокоактивных дисперсионных систем, таких как гомогенизаторы или ультразвуковые аппараты. Водная часть эмульсии, известная еще как "водная фаза", может представлять собой раствор поверхностно-активного вещества, состоящего из холата натрия, который предварительно насыщен этилацетатом и бензиловым спиртом.

Эмульгирование второй фазы для формирования эмульсионной фазы можно проводить в одну или две стадии эмульгирования. Например, можно получать первичную эмульсию и затем эмульгировать с образованием тонкодисперсной эмульсии. Первичную эмульсию можно формировать, например, с использованием простого смешивания, гомогенизатора высокого давления, ультразвукового аппарата для обработки проб, магнитной мешалки или роторно-статорного гомогенизатора. Первичную эмульсию можно формировать в тонкодисперсную эмульсию посредством использования, например, ультразвукового аппарата для обработки проб или гомогенизатора высокого давления, например, посредством использования 1, 2, 3 или более обработок посредством гомогенизатора. Например, при использовании гомогенизатора высокого давления, применяемое давление может составлять приблизительно от 1000 до приблизительно 8000 фунт/дюйм² (1 фунт/дюйм²=6894,75 Па), приблизительно от 2000 до приблизительно от 4000 фунт/дюйм², от 4000 до приблизительно 8000 фунт/дюйм² или приблизительно от 4000 до приблизительно 5000 фунт/дюйм², например приблизительно 2000 2500, 4000 или 5000 фунт/дюйм².

Или выпаривание растворителя, или разведение растворителя может быть необходимо для полного удаления растворителя и отвердевания частиц. Для лучшего контроля над кинетикой удаления и для большего масштабирования способа можно использовать разведение растворителя посредством охлаждения водой. Например, эмульсию можно разводить холодной водой до концентрации, достаточной для восстановления всего органического растворителя для образования охлажденной фазы. Охлаждение можно проводить, по меньшей мере частично, при температуре приблизительно 5°C или ниже. Например, используемая для охлаждения вода может иметь температуру, которая ниже, чем комнатная температура (например, приблизительно от 0 до приблизительно 10°C или приблизительно от 0 до приблизительно 5°C).

В некоторых вариантах осуществления не все из терапевтических средств (например, доцетаксел) инкапсулируют в частицы на этой стадии и к охлажденной фазе добавляют солубилизатор лекарственного средства для формирования растворенной фазы. Солубилизатор лекарственного средства может представлять собой например, Tween 80, Tween 20, поливинилпирролидон, циклодекстран, додецилсульфат натрия или холат натрия. Например, Tween-80 можно добавлять к охлажденной суспензии наночастиц для восстановления свободного лекарственного средства и предотвращения образования кристаллов лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления отношение солубилизатора лекарственного средства к терапевтическому средству (например, доцетаксел) составляет приблизительно от 100:1 до приблизительно 10:1.

Солубилизованная фаза может быть профильтрована для восстановления наночастиц. Например, мембраны для ультрафильтрации можно использовать для концентрирования суспензии наночастиц и, по существу, удаления органического растворителя, свободного лекарственного средства и других технологических добавок (поверхностно-активные вещества). Иллюстративное фильтрование можно проводить с использованием системы тангенциальной поточной фильтрации. Например, при использовании мембраны с размером пор, подходящим для удерживания наночастиц, но позволяющим проходить сквозь них растворам, мицеллам и органический растворитель, можно избирательно разделять наночастицы. Можно использовать иллюстративные мембраны с пропускной способностью по молекулярной массе приблизительно 300-500 кДа (~5-25 нм).

Диафильтрацию можно проводить с использованием метода постоянного объема, предназначенный для этого диафильтрат (холодная деионизованная вода при температуре, например, приблизительно от 0 до приблизительно 5°C или 0 до приблизительно 10°C) можно добавлять к первоначальной суспензии с той же скоростью, что и скорость удаления фильтрата из суспензии. В некоторых вариантах осуществления фильтрация может включать первую фильтрацию с использованием первой температуры приблизительно от 0 до приблизительно 5°C или от 0 до приблизительно 10°C и второй температуры приблизительно от 20 до приблизительно 30°C или от 15 до приблизительно 35°C. Например, фильтрация может включать получение приблизительно от 1 до приблизительно 6 диаобъемов при приблизительно от 0 до приблизительно 5°C и получение по меньшей мере одного диаобъема (например, приблизительно от 1 до приблизительно 3 или приблизительно 1-2 диаобъемов) при приблизительно от 20 до приблизительно 30°C.

После очистки и концентрирования суспензии наночастиц частицы можно пропускать сквозь один, два или более стерилизующих фильтра и/или пористых фильтра, например, используя ~0,2 мкм пористый фильтр предварительной очистки.

В другом варианте осуществления получения наночастиц формируют органическую фазу, состоящую из смеси терапевтического средства, например доцетаксела, и полимера (гомополимера, сополимера и сополимера с лигандом). Органическую фазу смешивают с водной фазой в соотношении приблизительно 1:5 (масляная фаза:водная фаза), где водная фаза состоит из поверхностно-активного вещества и определенного растворенного растворителя. Первичную эмульсию формируют посредством комбинации двух фаз путем простого смешивания или при использовании роторно-статорного гомогенизатора. Первичную эмульсию затем формируют в тонкодисперсную эмульсию, используя гомогенизатор высокого давления. Тонкодисперсную эмульсию охлаждают добавлением деионизованной воды при перемешивании. Отношение охладитель:эмульсия составляет приблизительно 8,5:1.

Затем раствор Tween (например, Tween 80) добавляют к охладителю для достижения итогового количества Tween приблизительно 2%. Это предназначено для восстановления свободного, неинкапсулированного лекарственного средства. Затем посредством или центрифугирования, или ультрафильтрации/диафильтрации выделяют наночастицы.

Следует понимать, что количество полимера и терапевтического или активного средства, которые используют при получении композиции, могут отличаться от количества полимера и терапевтического или активного средства в полученной в итоге композиции. Например, некоторые активные средства не могут полностью включиться в наночастицу, и такое свободное терапевтическое средство, например, можно отфильтровать. Например, в варианте осуществления приблизительно 20 мас.% активного средства (например, доцетаксела) и приблизительно 80 мас.% полимера (например, полимер может включать приблизительно 2,5 мол.% PLA-PEG-GL2 и приблизительно 97,5 мол.% PLA-PEG) можно использовать при получении композиции, что в результате, например, приводит к готовым наночастицам, содержащим

приблизительно 10 мас.% активного средства (например, доцетаксела) и приблизительно 90 мас.% полимера (где полимер может включать приблизительно 1,25 мол.% PLA-PEG-GL2 и приблизительно 98,75 мол.% PLA-PEG). В таких способах можно получать готовые наночастицы, подходящие для введения пациенту, которые включают приблизительно от 2 до приблизительно 20 мас.% терапевтического средства, например приблизительно 5, приблизительно 8, приблизительно 10, приблизительно 15 мас.% терапевтического средства.

Лиофилизированные фармацевтические композиции

Наночастицы, описываемые в настоящем описании, можно комбинировать с фармацевтически приемлемыми носителями для формирования фармацевтической композиции согласно другому аспекту изобретения. Как будет понятно специалисту в данной области, носители могут быть выбраны, основываясь, как описано ниже, на пути введения, расположения целевой ткани, вида лекарственного средства, подлежащего доставке, динамике доставки лекарственного средства и т.д.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту любыми известными в данной области способами, включающими пероральный и парентеральный пути. Как применяется в настоящем описании термин "пациент" относится, а также не относится к человеку, включает, например, млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, амфибий и рыб. Например, не принадлежащие к человеку могут представлять собой млекопитающее (например, грызун, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, примат или свинья). В определенных вариантах осуществления парентеральные пути являются предпочтительными, так как они позволяют избежать взаимодействия с расщепляющими ферментами, которые присутствуют в желудочно-кишечном тракте. Согласно таким вариантам осуществления, оригинальные композиции можно вводить инъекцией (например, внутривенной, подкожной или внутримышечной, интраперитонеальной инъекцией), ректально, вагинально, местно (в виде порошков, кремов, мазей или капель) или ингаляцией (в виде спреев).

В конкретном варианте осуществления наночастицы по настоящему изобретению вводят нуждающемуся в этом индивидууму системно, например парентерально или посредством внутривенной инфузии или инъекции.

В некоторых вариантах осуществления композицию, подходящую для замораживания, включающую наночастицы, описываемые в настоящем описании, и раствор, подходящий для замораживания, например сахар, такой как моно, ди или полисахарид, например раствор сахарозы и/или трегалозы, и/или соли, и/или циклодекстрина добавляют к суспензии наночастиц. Сахар (например, сахароза или трегалоза) может действовать, например, в качестве криопротектора, предотвращая агрегацию частиц при замораживании. Например, в настоящем описании предоставлена композиция наночастиц, содержащая множество описываемых наночастиц, сахарозу, ионный галогенид и воду; где наночастицы/сахароза/вода/ионный галогенид составляют приблизительно 3-40%/10-40%/20-95%/0,1-10% (мас./мас./мас./мас.) или приблизительно 5-10%/10-15%/80-90%/1-10% (мас./мас./мас./мас.). Например, такой раствор может включать наночастицы, как описано в настоящем описании, приблизительно от 5 до приблизительно 20 мас.% сахарозы и ионного галогенида, такого как хлорид натрия, в концентрации приблизительно 10-100 мМ. В другом примере в настоящем описании предоставлен состав наночастиц, содержащий множество описываемых наночастиц, трегалозу, циклодекстрин и воду; где наночастицы/трегалоза/вода/циклодекстрин составляют приблизительно 3-40%/1-25%/20-95%/1-25% (мас./мас./мас./мас.) или приблизительно 5-10%/1-25%/80-90%/10-15% (мас./мас./мас./мас.). Например, такой раствор может включать наночастицы, как описано в настоящем описании, приблизительно от 1 до приблизительно 25 мас.% трегалозы или сахарозы (например, приблизительно от 5 до приблизительно 25% трегалозы или сахарозы, например, приблизительно 10% трегалозу или сахарозу или приблизительно 15% трегалозу или сахарозу, например, приблизительно 5% сахарозу) по массе и циклодекстрин, такой как β -циклодекстрин, в концентрации приблизительно от 1 до приблизительно 25 мас.% (например, циклодекстрин приблизительно от 5 до приблизительно 20, например, 10 или приблизительно 20 или приблизительно от 15 до приблизительно 20 мас.%). Рассматриваемые составы могут включать множество описываемых наночастиц (например, наночастиц, имеющих PLA-PEG и активное средство) и приблизительно от 2 до приблизительно 15 мас.% (или приблизительно от 4 до приблизительно 6 мас.%, например, приблизительно 5 мас.%) сахарозы и приблизительно от 5 до приблизительно 20 мас.% (например, приблизительно от 7 до приблизительно 12 мас.%, например, приблизительно 10 мас.%) HP β CD.

Настоящее изобретение относится, в частности, к лиофилизированным фармацевтическим композициям, которые при восстановлении имеют минимальное количество больших агрегатов. Такие большие агрегаты могут иметь размер более чем приблизительно 0,5 мкм, более чем приблизительно 1 мкм или более чем приблизительно 10 мкм, присутствие которых может быть нежелательными в восстанавливаемом растворе. Размер агрегатов можно измерить, используя ряд технологий, включая указанные в U.S. Pharmacopeia в 32<788>, включенной, таким образом, посредством ссылки. Тесты, приведенные в USP 32<788>, включают тест подсчета количества частиц в режиме светотени, подсчета частиц с помощью микроскопа, лазерной дифракции и/или оптическим определением отдельных частиц. В одном из вариантов осуществления размер частиц в данном образце измеряют, используя лазерную дифракцию и/или оптическое определение отдельных частиц.

В USP 32<788> посредством теста подсчета количества частиц в режиме светотени представлены рекомендации для отбора частиц в суспензии по размеру. Для растворов, менее чем или равных 100 мл, препарат соответствует тесту, если среднее число представленных частиц не превышает 6000 на контейнер, размер которых составляет ≥ 10 мкм, и 600 на контейнер, размер которых составляет ≥ 25 мкм.

Как изложено в USP 32<788>, в тесте подсчета частиц с помощью микроскопа представлены рекомендации для определения количества частиц с использованием имеющего оптический микрометр бинокулярного микроскопа, адаптированного к 100 ± 10 -кратному увеличению. Оптический микрометр представляет собой круглую диаметральную окулярную шкалу, которая состоит из круга, разделенного на квадранты с черными делительными окружностями, обозначающими 10 и 25 мкм, при наблюдении с 100-кратным увеличением. Линейная шкала представлена ниже окулярной шкалы. Количество частиц, соответствующих 10 и 25 мкм, регистрируют визуально. Для растворов, объемом менее чем 100 мл или равных 100 мл, препарат соответствует тесту, если среднее число представленных частиц не превышает 3000 на контейнер, размер которых составляет ≥ 10 мкм, и 300 на контейнер, размер которых составляет ≥ 25 мкм.

В некоторых вариантах осуществления водный образец описываемой композиции объемом 10 мл при восстановлении содержит менее чем 600 частиц на мл, имеющих размер более чем 10 мкм или равный 10 мкм; и/или менее чем 60 частиц на мл, имеющих размер более чем 25 мкм или равный 25 мкм.

Динамическое светорассеяние (DLS) можно использовать для оценки размера частиц, но его принцип основан на броуновском движении, таким образом, техника может не детектировать некоторые более крупные частицы. Лазерная дифракция основывается на показателе рефракции между частицей и суспензионной средой. Техника способна детектировать частицы с размером, представленным от субмикронного до миллиметрового диапазона. Относительно небольшое количество (например, приблизительно 1-5 мас.%) больших частиц можно определять в суспензии наночастиц. В способе оптического определения отдельных частиц (SPOS) используют световое затемнение разведенной суспензии для подсчета отдельных частиц размером приблизительно 0,5 мкм. Исходя из концентрации частиц в оцениваемом образце можно рассчитать массовые проценты агрегатов или концентрацию агрегатов (частицы/мл).

Образование агрегатов может происходить вследствие дегидратации поверхности частиц. Эту дегидратацию можно предотвратить, используя лиопротекторы, такие как дисахариды, в суспензии перед лиофилизацией. Подходящие дисахариды включают сахарозу, лактулозу, лактозу, мальтозу, трегалозу или целлобиозу и/или их смеси. Другие рассматриваемые дисахариды включают койбиозу, нигерозу, изомальтозу, β , β -трегалозу, α , β -трегалозу, софорозу, ламинарибиозу, аминдалозу, туранозу, мальтозу, палатинозу, гентибиозу, маннобиозу, мелибиозу, мелибиулозу, рутинозу, рутинолозу и ксилобиозу. Восстановление продемонстрировало эквивалентное распределение по размеру в DLS по сравнению с исходной суспензией. Однако лазерной дифракцией можно определять частицы размером >10 мкм в некоторых восстановленных растворах. Дополнительно в SPOS также можно определять размер частиц >10 мкм в концентрации выше, чем в рекомендациях FDA (10^4 - 10^5 частиц/мл для частиц >10 мкм).

Настоящее изобретение, в частности, относится к использованию одной или нескольких ионных галогенидных солей в качестве дополнительных лиопротекторов к сахару, такому как сахароза, трегалоза или их смеси. Сахара могут включать дисахариды, моносахариды, трисахариды и/или полисахариды и могут включать другие эксципиенты, например глицерин и/или поверхностно-активные вещества. Необязательно циклодекстрин можно включать в качестве дополнительного лиопротектора. Циклодекстрин можно добавлять вместо ионной галогенидной соли. Альтернативно циклодекстрин можно добавлять в дополнение к ионной галогенидной соли.

Подходящие ионные галогенидные соли могут включать хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид цинка или их смеси. Дополнительные подходящие ионные галогенидные соли включают хлорид калия, хлорид магния, хлорид аммония, натрия бромид, кальция бромид, бромид цинка, калия бромид, магния бромид, аммоний бромид, натрия иодид, кальция иодид, иодид цинка, калия иодид, магния иодид, или аммония иодид, и/или их смеси. В одном из вариантов осуществления приблизительно от 1 до приблизительно 15 мас.% сахарозы можно использовать с ионной галогенидной солью. В одном из вариантов осуществления лиофилизированная фармацевтическая композиция может содержать приблизительно от 10 до приблизительно 100 мМ хлорида натрия. В другом варианте осуществления лиофилизированная фармацевтическая композиция может содержать приблизительно от 100 до приблизительно 500 мМ двухвалентной ионной хлоридной соли, такой как хлорид кальция или хлорид цинка. В еще одном варианте осуществления суспензия, подлежащая лиофилизации, может дополнительно содержать циклодекстрин, например, можно использовать приблизительно от 1 до приблизительно 25 мас.% циклодекстрина.

Подходящий циклодекстрин может включать α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, γ -циклодекстрин или их смеси. Иллюстративные циклодекстрины, рассматриваемые для применения в композиции, описываемой в настоящем описании, включают гидроксипропил- β -циклодекстрин (HP β CD), гидроксипропил- β -циклодекстрин, простой сульфобутиловый эфир- β -циклодекстрин, метил- β -циклодекстрин, диметил- β -циклодекстрин, карбоксиметил- β -циклодекстрин, карбоксиметилэтил- β -циклодекстрин, диэтил- β -циклодекстрин, три-О-алкил- β -циклодекстрин, гликозил- β -циклодекстрин и мальтозил- β -циклодекстрин.

В одном из вариантов осуществления приблизительно от 1 до приблизительно 25 мас.% трегалозы (например, приблизительно от 10 до приблизительно 15, например, от 5 до приблизительно 20 мас.%) можно использовать с циклодекстрином. В одном из вариантов осуществления лиофилизированная фармацевтическая композиция может содержать приблизительно от 1 до приблизительно 25 мас.% α -циклодекстрина. Иллюстративная композиция может содержать наночастицы, содержащие PLA-PEG, активное/терапевтическое средство, приблизительно от 4 до приблизительно 6% (например, приблизительно 5 мас.%) сахарозы и приблизительно от 8 до приблизительно 12 мас.% (например, приблизительно 10 мас.%) HP β CD.

В одном из аспектов изобретение относится к лиофилизированной фармацевтической композиции, содержащей полимерные наночастицы, где при восстановлении лиофилизированной фармацевтической композиции при концентрации наночастиц приблизительно 50 мг/мл в менее чем или приблизительно 100 мл водной среды восстановленная композиция, подходящая для парентерального введения, содержит менее чем 6000, таких как менее чем 3000 микрочастиц более чем 10 мкм или равных 10 мкм; и/или менее чем 600, таких как менее чем 300 микрочастиц более чем 25 мкм или равных 25 мкм.

Количество микрочастиц можно определять способами, такими как в USP 32<788>, посредством теста подсчета количества частиц в режиме светотени, в USP 32<788> посредством подсчета частиц с помощью микроскопа, лазерной дифракции и/или оптического определения отдельных частиц.

Наночастицы могут включать сополимер поли(молочная)кислота-блок-поли(этилен)гликоль или сополимер поли(молочная)-со-поли(гликолевая)кислота-блок-поли(этилен)гликоль. Например, часть поли(молочная)кислоты в сополимере может иметь средневзвешенную молекулярную массу приблизительно 16 кДа и часть поли(этилен)гликоля в сополимере может иметь средневзвешенную молекулярную массу приблизительно 5 кДа.

Восстановленная композиция может иметь минимальную агрегацию по сравнению с восстановленной композицией, которая не содержит ионную галогенидную соль и/или циклодекстрин. Восстановленная композиция может иметь индекс полидисперсности менее чем 0,2.

В аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, подходящей для парентерального применения после восстановления, включающей множество терапевтических частиц, где каждая включает сополимер, имеющей гидрофобную часть полимера и гидрофильную часть полимера; активное средство; сахар; и ионную галогенидную соль. Композиция может дополнительно содержать циклодекстрин.

Ионная галогенидная соль может быть выбрана из группы, состоящей из хлорида натрия, хлорида кальция и хлорида цинка или их смеси. В варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать приблизительно от 10 до приблизительно 100 мМ хлорида натрия. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать приблизительно от 100 до приблизительно 500 мМ хлорида кальция или хлорида цинка.

В аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, подходящей для парентерального применения после восстановления, включающей множество терапевтических частиц, где каждая включает сополимер, имеющей гидрофобную часть полимера и гидрофильную часть полимера; активное средство; сахар; и циклодекстрин.

Циклодекстрин может включать α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, γ -циклодекстрин или их смеси. В варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать приблизительно от 1 до приблизительно 25 мас.% β -циклодекстрина.

Например, сополимер может представлять собой сополимер поли(молочная)кислота-блок-поли(этилен)гликоль. После восстановления водный образец объемом 100 мл может содержать менее чем 6000 частиц с размером более или равным 10 мкм; и менее чем 600 частиц с размером более или равным 25 мкм.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтически приемлемым составам для парентерального введения, полученным способом, включающим а) предоставление композиции, включающей множество терапевтических частиц, где каждая содержит сополимер, имеющей гидрофобную часть полимера и гидрофильную часть полимера; и активное средство; б) добавление дисахарида и ионной галогенидной соли к указанной композиции; в) лиофилизацию композиции с формированием лиофилизированной композиции; г) восстановление лиофилизированной композиции для формирования состава, подходящего для парентерального введения. В варианте осуществления циклодекстрин включен в состав. В некоторых вариантах осуществления такое восстановление можно преимущественно выполнять простым перемешиванием вручную в течение нескольких минут. Свойства восстановленного продукта (например, чистота лекарственного средства и/или профиль высвобождения), по существу, могут не отличаться от композиции до лиофилизации (например, суспензии).

В еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтически приемлемому составу для парентерального введения, полученного способом, включающим: а) предоставление композиции, включающей множество терапевтических частиц, где каждая включает сополимер, имеющей гидрофобную часть полимера и гидрофильную часть полимера; и активное средство; б) добавление дисахарида и циклодекст-

перемешивания или использования роторно-статорного гомогенизатора. В результате использования роторно-статорного гомогенизатора получают гомогенный молочный раствор, тогда как при использовании магнитной мешалки получают заметно более грубую эмульсию. Наблюдают, что способ с использованием магнитной мешалки приводит в результате к образованию значимого количества капель масляной фазы, прикрепленных к стенке питающего сосуда, что указывает на то, что, несмотря на то, что размер грубой эмульсии не является параметром способа, важным для качества, она должна быть достаточно тонкодисперсной для предотвращения потери выхода или разделения фаз. Таким образом, роторно-статорный гомогенизатор используют в качестве стандартного способа образования грубой эмульсии, хотя высокоскоростная мешалка может являться подходящей при крупномасштабном производстве.

Первичную эмульсию затем формируют в тонкодисперсную эмульсию, используя гомогенизатор высокого давления. Размер частиц грубой эмульсии существенно не влияет на размер частиц после следующих обработок (103) гомогенизатором.

После 2-3 обработок размер частиц значительно не уменьшается, и успешная обработка может даже вызвать увеличение размера частиц. Органическую фазу эмульгируют в отношении 5:1 O:W со стандартной водной фазой и проводят многократную осторожную обработку, резко охлаждая небольшие порции эмульсии после каждой обработки. Указанное масштабирование отражает общее количество твердого вещества в составе.

Эффект масштабирования на размер частиц отражает зависимость от масштабирования. Зависимость показывает, что при размере партии в диапазоне 2-10 г в более больших объемах партий получают более мелкие частицы. Показано, что подобную зависимость от масштаба устраняют при рассмотрении партий размером более чем 10 г. Количество твердых веществ, используемых в масляной фазе, составляет приблизительно 30%.

В табл. А просуммированы параметры процесса эмульгирования.

Таблица А

| Параметр | Значение |
|-------------------------------------|--|
| Формирование грубой эмульсии | Мешалка с большими сдвиговыми усилиями |
| Гомогенизатор высокого давления | 2500 фунт/дюйм ² (1 фунт/дюйм ² =6894,75 Па) на камеру |
| Интерактивная камера | 4×200 мкм Z-камера |
| Количество обработок гомогенизацией | 1 обработка |
| Водная фаза (холат натрия) | 0,25-0,35% |
| Отношение W:O | 2:1 |
| [Твердые вещества] в масляной фазе | 30% |

Тонкодисперсную эмульсию затем быстро охлаждают добавлением деионизованной воды при данной температуре при перемешивании. В однократной операции охлаждения эмульсию добавляют к холодному водному охладителю с перемешиванием. Это необходимо для извлечения значительной порции растворителей масляной фазы, эффективно закалывающих наночастицы для последующей фильтрации. Охлаждение охладителя значительно увеличивает инкапсулирование лекарственного средства. Отношение охладитель:эмульсия составляет приблизительно 5:1.

Раствор 35 мас.% Tween 80 добавляют к охладителю для достижения суммарной концентрации Tween 80 приблизительно 4%. Затем эмульсию охлаждают, добавляя раствор Tween-80, который действует в качестве солюбилизатора лекарственного средства, что позволяет эффективно удалять неинкапсулированное лекарственное средство в течение фильтрации. В табл. В представлен каждый из параметров процесса охлаждения.

Таблица В. Суммарные параметры способа охлаждения

| Параметр | Значение |
|--|--|
| Начальная температура охлаждения | <5°C |
| Раствор [Tween 80] | 35% |
| Отношение Tween 80:лекарственное средство | 25:1 |
| Отношение Q:E | 10:1 |
| Состояние охладителя/температура обработки | ≤5°C (с текущим отношением Q:E 5:1, отношением Tween 80:лекарственное средство 25:1) |

Температура должна поддерживаться при достаточно низких значениях при разведении суспензии (достаточно низкая концентрация растворителей) для сохранения значения ниже T_g для частиц. Если отношение Q:E не достаточно высоко, то более высокая концентрация растворителя придает пластичность

частицам и обеспечивает просачивание лекарственного средства. С другой стороны, более низкие значения температуры обеспечивают инкапсуляцию лекарственного средства на высоком уровне при низких соотношениях Q:E (до ~3:1), что делает возможным более эффективное проведение способа.

Наночастицы затем выделяют способом тангенциальной поточной фильтрации для концентрирования суспензии наночастиц и буферной замены растворителей, свободного лекарственного средства и солюбилизатора лекарственного средства из охлаждающего раствора на воду. Регенерированную целлюлозную мембрану применяют с пропускной способностью по молекулярной массе (MWC0) 300.

Постоянный объем диафильтрации (DF) осуществляют для удаления охлаждающих растворителей, свободного лекарственного средства и Tween-80. Для осуществления постоянного объема DF буфер добавляют в сосуд для ретентата в том же объеме, что и объем при удалении фильтрата. Параметры способа для операций TFF просуммированы в табл. С. Скорость поперечного потока относится к скорости раствора, протекающего через подводящие каналы и сквозь мембрану. Этот поток является силой, которая устраняет молекулы, которые могут загрязнять мембрану и ограничивать скорость фильтрации. Трансмембранное давление представляет собой силу, которая управляет способностью молекул проникать через мембрану.

Таблица С. Параметры TFF

| Параметр | Оптимизированное значение |
|---|--|
| Материал мембраны | Регенерированная целлюлоза - крупноячеистая мембрана |
| Пропускная способность по молекулярной массе | 300 кДа |
| Скорость поперечного потока | 3,7-10 л/мин/м ² |
| Трансмембранное давление | ~5 фунт/дюйм ² (1 фунт/дюйм ² =6894,75 Па) |
| Концентрация суспензии наночастиц для диафильтрации | 30-50 мг/мл |
| Количество диаобъемов | 20 |
| Площадь мембраны | 5 м ² /кг |

Отфильтрованную взвесь наночастиц затем подвергают циклической термообработке для создания повышенной температуры в течение обработки. Небольшая часть (как правило, 5-10%) инкапсулированного лекарственного средства очень быстро высвобождается из наночастиц после его первого пребывания при 25°C. Вследствие этого факта в партиях, которые хранят при низкой температуре в течение всего процесса, допускают присутствие свободного лекарственного средства или кристаллов лекарственного средства, формирующихся в течение доставки или в любой части при хранении в незамороженном состоянии. При влиянии повышенной температуры на взвесь наночастиц в течение процесса это "слабо инкапсулированное" лекарственное средство можно удалить и усилить стабильность продукта за счет небольших капель при загрузке лекарственного средства. В табл. D просуммированы два примера способа, осуществляемого при 25°C. Другие эксперименты показали, что продукт является стабильным даже после ~2-4 диаобъемов при воздействии на него температуры 25°C без потери большого количества инкапсулированного лекарственного средства. 5 диаобъемов применяют как количество объемов для осуществления способа при низкой температуре, перед обработкой при 25°C.

Таблица D

| | | Партии А | Партии В |
|--|---------------------------------|-----------|-----------------|
| Нагруженное лекарственное средство | Обработка с охлаждением | 11,3% | 9,7% |
| средство | Обработка при 25°C ¹ | 8,7-9,1% | 9,0-9,9% |
| Стабильность ² | Охлаждаемая обработка | <1 суток | <1 суток |
| | Обработка при 25°C ¹ | 5-7 суток | 2-7 суток |
| Быстрое высвобождение <i>in vitro</i> ³ | Охлаждаемая обработка | ~10% | Не представлено |
| | Обработка при 25°C ¹ | ~2% | |

¹ Части партий при обработке 25°C оставляли под воздействием температуры 25°C, по меньшей мере после 5 диаобъемов для различных периодов времени. Диапазоны представлены, так как представлено множество частей партий, которые оставляли под воздействием температуры 25°C.

² Данные по стабильности представляют время, в течение которого конечный продукт может быть оставлен при 25°C при концентрации наночастиц 10-50 мг/мл до образования кристаллов, образующихся во взвеси (видимые под микроскопом).

³ Быстрое высвобождение *In vitro* означает лекарственное средство, высвобождаемое в первый момент времени (по существу, немедленно)

После процесса фильтрации суспензию наночастиц пропускают через стерилизующий разделяю-

ший фильтр (абсолютная величина 0,2 мкм). Предварительные фильтры используют для защиты стерилизующего разделяющего фильтра для использования в определении подходящей площади фильтрации/времени, затрачиваемого на процесс. Значения просуммированы в табл. Е.

Таблица Е

| Параметр | Значение О | Действие |
|-----------------------------------|---------------------------|---|
| Концентрация суспензии наночастиц | 50 мг/мл | Потери в выходе продукции являются большими при более высоком [NP], но способность к фильтрации при 50 мг/мл избавляет от необходимости концентрации в стерильных условиях после фильтрования |
| Скорость потока при фильтрации | ~1,3 л/мин/м ² | Фильтрующая способность уменьшается при увеличении скорости потока |

Предварительный фильтр имеет пористый фильтр Seitz PDD1 в Pall SUPRAcap или кассеты Stax filter. Можно использовать 0,2 м² площади поверхности фильтрации на 1 кг наночастиц для пористых фильтров и 1,3 м² площади поверхности фильтрации на 1 кг наночастиц для стерилизующих фракционирующих фильтров.

Пример 3. Лиофилизированная композиция с сахаром и солью.

Как показано на фиг. 3, суспензии наночастиц с концентрацией наночастиц >40 мг/мл (для наночастиц, полученных как в примере 2, с 16/5 PLA-PEG в качестве полимера) лиофилизированы в присутствии 10% сахарозы и добавки: NaCl₂, CaCl₂ или PBS. В данном эксперименте показано, что суспензии наночастиц в высокой концентрации наночастиц (>40 мг/мл) можно растворять без микроагрегации. Все три состава с CaCl₂ образуют с <100 частицами/мл (10 мкм+), даже в диапазоне средних (150 мМ) и высоких концентраций (200 мМ), при которых получают лиофилизат, который осаждают.

Более низкие концентрации соли демонстрируют картину, подобную картине в отсутствие соли. Более высокие концентрации соли в основном демонстрируют наличие более высокой концентрации частиц.

Пример 4. Лиофилизированная композиция с сахаром, и/или солью, и/или циклодекстрином.

Суспензии наночастиц лиофилизируют в присутствии сахара (например, сахарозы или трегалозы), соли (например, NaCl или CaCl₂) и/или циклодекстрина (например, гидроксипропил-бета-циклодекстрина - HPβCD). Например, составы получают с 250 или 500 мМ NaCl или CaCl₂; и/или с 15, 20 или 25 мас.% сахарозы или трегалозы, например 20 мас.% трегалозы, 500 мМ CaCl₂, 5% HPβCD. Конкретные составы представлены в табл. F.

В табл. F представлены результаты определения посредством AccuSizer количества и размера частиц за один раз в большом диапазоне размеров и определения количества частиц большего размера для определения агрегатов, которые присутствуют в составе. В табл. F представлено количество частиц после восстановления раствором с использованием дистиллированной воды в лиофилизованные таблетки. В табл. F образцы 3/0 представляли собой замороженные и размороженные без высушивания образцы, в то время как номера пробирок 1-4, а также высокие пробирки 1 и 2 представляли собой образцы из лиофилизированных образцов. Большинство составов, за исключением CaCl₂ 500 мМ с 15% трегалозой, продемонстрировали наличие низкого количества агрегатов частиц, и последующие тесты проводили для оптимизации составов.

Таблица F

| Состав | Восстановление | Число частиц/мл (больше чем 10 мкм) | | | | | | |
|---|------------------|-------------------------------------|-------|------|--------------------|---------|--------------------|--------------------|
| | | 3/0 контроль | 1 | 2 | 3 | 4 | Высокая пробирка 1 | Высокая пробирка 2 |
| CaCl ₂ +15% сахара | Хорошее | 282 | 527 | 333 | 940 | 396 | 1110 | 430 |
| CaCl ₂ +15% трегалоза | Высокая пробирка | 310 | 17600 | 548 | Пробирка разбилась | 1160000 | 1190 | 442 |
| CaCl ₂ +20% трегалоза +5%HPβCD | Быстрое | 945 | 446 | 670 | 486 | 3500 | 384 | 713 |
| 20% трегалоза +10% HPβCD | Быстрое | 392 | 28300 | 4210 | 899 | 2790 | 239 | 75,5 |

Пример 5. Лиофилизированная композиция с сахаром, и/или солью, и/или циклодекстрином.

Суспензию наночастиц лиофилизируют в присутствии сахара (например, трегалозы), циклодекстрина (например, гидроксипропил-бета-циклодекстрина - HPβCD) и/или соли (например, CaCl₂). Эксципиент и уровни для скрининга составов с использованием способа планирования экспериментов (DOE) перечислены ниже в табл. G. Высокие пробирки используют для всех составов, объем пробирок 5 мл (n=5-6 пробирок на состав). Первичную сушку проводят при температуре на полке -37°C.

Таблица G

| Эксципиент | Уровень 1 | Уровень 2 | Уровень 3 | Уровень 4 |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| HPβCD | 5% | 10% | N/A | N/A |
| Трегалоза | 10% | 20% | N/A | N/A |
| CaCl ₂ | 0 мМ | 100 мМ | 250 мМ | 500 мМ |

Внешний вид лиофилизированных составов и их свойства после восстановления перечислены ниже в табл. H. Для всех протестированных составов по внешнему виду составы являются, по меньшей мере, частично расплавленными.

Таблица Н

| Состав | Внешний вид после лиофилизации | Восстановление |
|--|--|--|
| 5% HPbCD | частично обратноплавленный | хорошее, настоящая суспензия |
| 10% HPbCD | частично обратноплавленный | хорошее |
| 10% Трегалоза+10% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| 10% Трегалоза+5% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| 20% Трегалоза+10% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| 20% Трегалоза+5% HPbCD | частично обратноплавленный | нет, остаются небольшие сгустки |
| CaCl ₂ 100 мМ+10% Трегалоза+10% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| CaCl ₂ 100 мМ+10% Трегалоза+5% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| CaCl ₂ 100 мМ+20% Трегалоза+10% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| CaCl ₂ 100 мМ+20% Трегалоза+5% HPbCD | В и Е наличие коллапса всего образца; А/С/D частично | нет, остаются небольшие сгустки |
| CaCl ₂ 250 мМ+10% Трегалоза+10% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| CaCl ₂ 250 мМ+10% Трегалоза+5% HPbCD | наличие коллапса; другие частично обратноплавлены | да, без перемешивания |
| CaCl ₂ 250 мМ+20% Трегалоза+10% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| CaCl ₂ 250 мМ+20% Трегалоза+5% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| CaCl ₂ 500 мМ+10% Трегалоза+10% HPbCD | частично обратноплавленный | требует многочисленного перемешивания |
| CaCl ₂ 500 мМ+10% Трегалоза+5% HPbCD | в основном наличие коллапса | не требует многочисленного перемешивания и времени |
| CaCl ₂ 500 мМ+20% Трегалоза+10% HPbCD | в основном наличие коллапса | требует многочисленного перемешивания |
| CaCl ₂ 500 мМ+20% Трегалоза+5% HPbCD | в основном наличие коллапса и частично выдувается | требует многочисленного перемешивания и времени |

Данные цикла представлены на фиг. 4 и демонстрируют параметры способа лиофилизации: температуру на полке, температуру продукта, давление в камере и время. Параметры процесса контролируют от момента первоначального помещения продукта на полки лиофилизатора, в течение загрузки лиофилизатора и до удаления продукта из лиофилизатора. Условия отражены на схеме, иллюстрирующей параметры процесса для одного из соответствующих периодов лиофилизации для скринирования concentra-

ции HPβCD.

Размер частиц в различных лиофилизированных составах измеряют динамическим светорассеянием (DLS), и они продемонстрированы на фиг. 5. Во всех протестированных составах размер наночастиц повышается после замораживания/оттаивания и лиофилизации по сравнению с предварительно замороженными образцами.

Количество микрочастиц с размером более чем 10 мкм в различных составах измеряют тестом подсчета частиц под микроскопом и демонстрируют на фиг. 6. В основном составы, содержащие более высокие концентрации циклодекстрина, демонстрируют лучшие значения при подсчете частиц.

Пример 5. Лиофилизированная композиция с сахаром и циклодекстрином.

Суспензии наночастиц лиофилизируют в присутствии сахара (например, трегалозы или сахарозы) и циклодекстрина (например, гидроксипропил-бета-циклодекстрина - HPβCD). Протестированные составы перечислены в табл. Н1. Высокие пробирки используют для всех составов с полным объемом 5 мл (n=10 пробирок на состав).

Таблица Н1

| Экципиент | Уровень 1 | Уровень 2 | Уровень 3 | Уровень 4 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| HPβCD | 10% | 15% | 20% | NA |
| Трегалоза | 0% | 5% | 10% | 20% |

| Альтернативная переменная величина | Уровень | Состав |
|------------------------------------|----------|---|
| Вид сахара | Сахароза | 1) 10% HPβCD, 10% сахароза 2) 10% HPβCD, 5% сахароза |

Внешний вид лиофилизированных составов и их свойств после восстановления представлен в табл. I. Повышенные концентрации трегалозы и циклодекстрина, по-видимому, приводят в результате к ухудшению свойств после восстановления. Во всех протестированных составах размеры DLS повышены после замораживания/оттаивания, но уменьшены после лиофилизации.

Таблица I

| Состав | DXTL концентрация (мг/мл) | Внешний вид после лиофилизации | Восстановление |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------------|--|
| 0% Трегалоза, 10% HPβCD | 4,803 | частично обратноплавленный | хорошее, требуется перемешивание вручную (<1 мин) |
| 0% Трегалоза, 15% HPβCD | 4,711 | частично обратноплавленный | хорошее, требуется перемешивание вручную (<1 мин) для диспергирования некоторых больших стустков |
| 0% Трегалоза, 20% HPβCD | 4,736 | частично обратноплавленный | требуется длительное перемешивание вручную (пара мин) |
| 5% Трегалоза, 10% HPβCD | 4,328 | частично обратноплавленный | большинство восстанавливается немедленно, но некоторым небольшим стусткам требуется дополнительное перемешивание |

| | | | |
|-----------------------------|--------|--------------------------------|---|
| 5% Трегалоза, 15% HPβCD | 4, 674 | частично обратнооплавленный | некоторые растворяются немедленно, но более чем 4 ступкам необходимо дополнительное перемешивание |
| 5% Трегалоза, 20% HPβCD | 4, 23 | частично обратнооплавленный | большинство восстанавливается немедленно, с небольшим дополнительным перемешиванием |
| 10% Трегалоза, 10% HPβCD | 4, 28 | частично обратнооплавленный | большинство восстанавливается немедленно, с небольшим дополнительным перемешиванием |
| 10% Трегалоза, 15% HPβCD | 4, 637 | частично обратнооплавленный | большинство восстанавливается немедленно, с небольшим дополнительным перемешиванием |
| 10% Трегалоза, 20% HPβCD | 4, 158 | частично обратнооплавленный | некоторые растворяются быстро, но пришлось осуществлять дополнительное перемешивание для получения ступок |
| 20% Трегалоза, 10% HPβCD | 3, 655 | частично обратнооплавленный | имелись ступки, но при перемешивании растворяются |
| 20% Трегалоза, 15% HPβCD | 3, 397 | частично обратнооплавленный | имелись ступки, но растворяются при перемешивании в течение 1,5 мин |
| 20% Трегалоза, 20% HPβCD | 4, 392 | частично обратнооплавленный | имелись ступки, но растворяются при перемешивании в течение 2 мин |
| 5% Сахароза, 10% HPβCD | 4, 614 | частично обратнооплавленный | восстанавливается хорошо в ходе перемешивания в течение 1/2 мин (возможно меньше) |
| 10% Сахароза, 10% HPβCD | 4, 686 | частично обратнооплавленный | восстанавливается хорошо в ходе перемешивания в течение 1/2 мин (возможно меньше) |

Данные цикла представлены на фиг. 7. Размер частиц в различных лиофилизированных составах измеряют динамическим светорассеянием (DLS), и он представлен на фиг. 8.

Количество микрочастиц/мл, размер которых составляет более чем 10 мкм в различных составах, измеряют посредством подсчета количества частиц с использованием микроскопа, как представлено на фиг. 9. Почти все протестированные составы составляют ниже предела USP 32 <788>. Количество микрочастиц, размер которых составляет более чем 1 мкм в различных составах, представлены на фиг. 10 и 11. В большинстве составов количество микрочастиц с размером более чем 1 мкм повышено в лиофилизированных образцах по сравнению с предварительно замороженными или образцами, которые подверглись замораживанию/оттаиванию.

Тест высвобождения *in vitro* проводят на наночастицах с доцетакселом, лиофилизированным в присутствии сахара и циклодекстрина. Результаты изображены на фиг. 12.

Дифференциальная сканирующая калориметрия также осуществлена на наночастицах с различными составами, как представлено на фиг. 13-16.

Эквиваленты

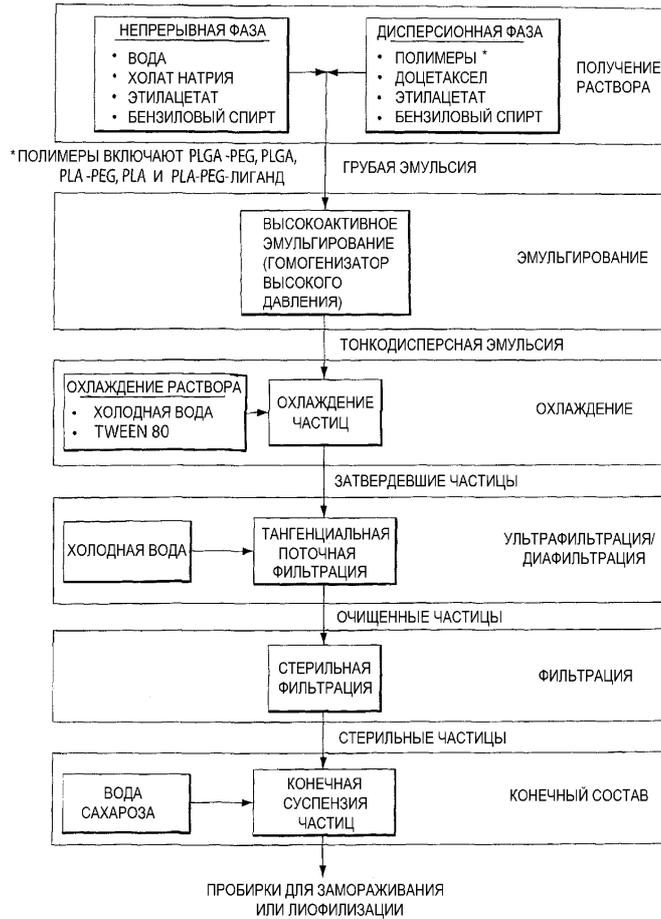
Специалисты в данной области смогут определить или в состоянии установить с использованием не более чем общепринятого экспериментирования множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Такие эквиваленты предназначены для включения посредством последующей формулы изобретения.

Включение признаков посредством ссылки

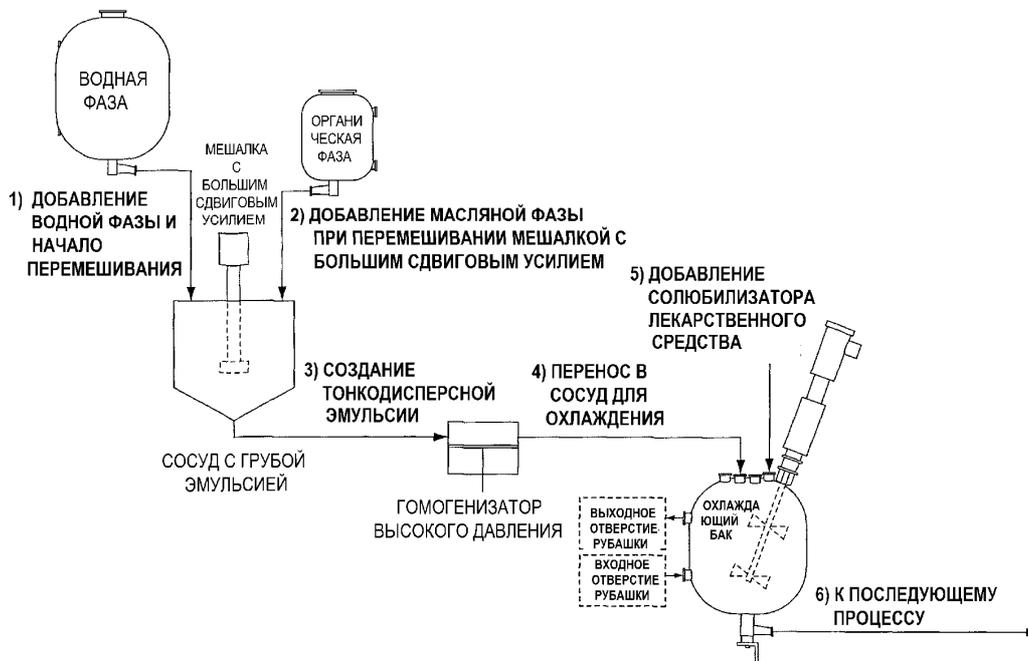
Полное содержание всех патентов, опубликованных патентных заявок, веб-сайтов и других ссылок, процитированных в настоящем описании, является, таким образом, явно включенным в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

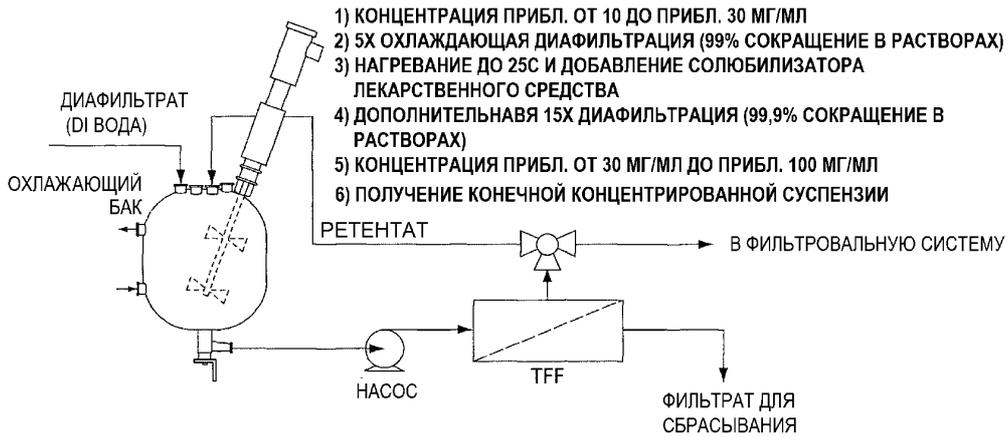
1. Фармацевтическая композиция, пригодная для лиофилизации, содержащая терапевтические наночастицы, где каждая включает блоксополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля или блоксополимер сополимера полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты и полиэтиленгликоля; активное средство; от 5 до 20 мас.% сахарозы; от 5 до 20 мас.% гидроксипропил- β -циклодекстрина; и 250 или 500 мМ NaCl или CaCl₂, где при восстановлении лиофилизированной фармацевтической композиции в 100 мл или менее дистиллированной воды восстановленная композиция, пригодная для парентерального введения, включает количество частиц/мл: менее чем 6000 микрочастиц размером более чем 10 мкм или равных 10 мкм.
2. Фармацевтическая композиция, пригодная для лиофилизации, содержащая терапевтические наночастицы, содержащие блоксополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля или блоксополимер сополимера полимолочной кислоты и полигликолевой кислоты и полиэтиленгликоля; активное средство; от 5 до 20 мас.% сахарозы; от 5 до 20 мас.% гидроксипропил- β -циклодекстрина, где при восстановлении лиофилизированной фармацевтической композиции в 100 мл или менее дистиллированной воды восстановленная композиция, пригодная для парентерального введения, включает количество частиц/мл: менее чем 6000 микрочастиц размером более чем 10 мкм.
3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где сополимер представляет собой блоксополимер полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля.
4. Фармацевтическая композиция по п.3, где часть сополимера полимолочной кислоты имеет среднечисловую молекулярную массу от 10 до 25 кДа и часть сополимера полиэтиленгликоля имеет среднечисловую молекулярную массу от 4 до 6 кДа.
5. Фармацевтическая композиция по п.4, где часть сополимера полимолочной кислоты имеет среднечисловую молекулярную массу 16 кДа и часть сополимера полиэтиленгликоля имеет среднечисловую молекулярную массу 5 кДа.
6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5, где терапевтические наночастицы имеют диаметр от 60 до 140 нм.
7. Восстановленная лиофилизированная фармацевтическая композиция по любому из пп.1-6 в форме водного образца, где при восстановлении фармацевтической композиции в водной среде водный образец восстановленной лиофилизированной фармацевтической композиции включает 7-12 мас.% гидроксипропил- β -циклодекстрина.
8. Восстановленная лиофилизированная фармацевтическая композиция по любому из пп.1-6 в форме водного образца объемом 10 мл, с концентрацией наночастиц более 40 мг/мл, содержащая менее чем 600 частиц/мл с размером более или равным 10 мкм и менее чем 60 частиц/мл с размером более или равным 25 мкм.



Фиг. 1

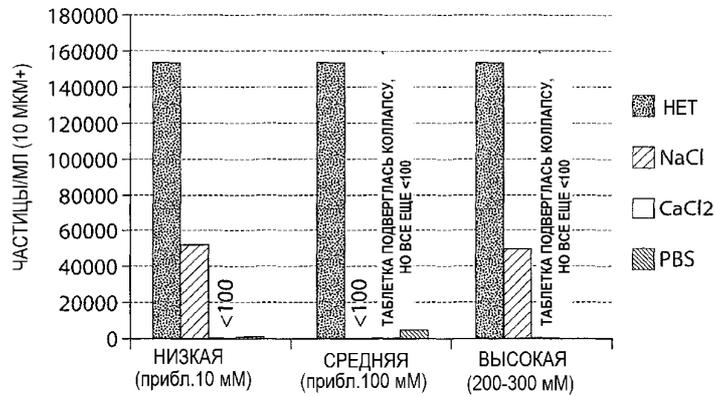


Фиг. 2А



Фиг. 2В

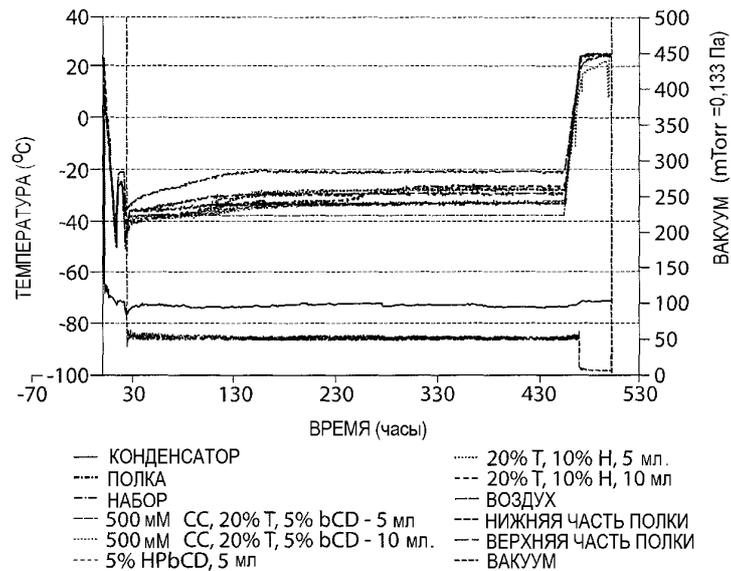
10% САХАРОЗА



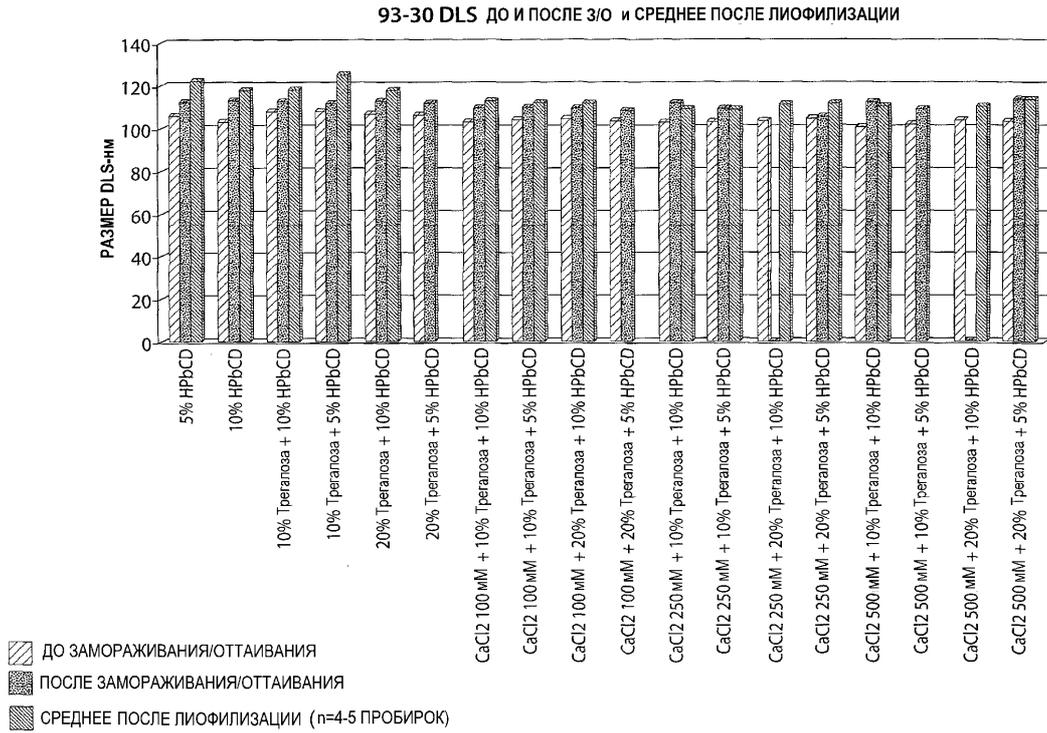
[Соль]

Фиг. 3

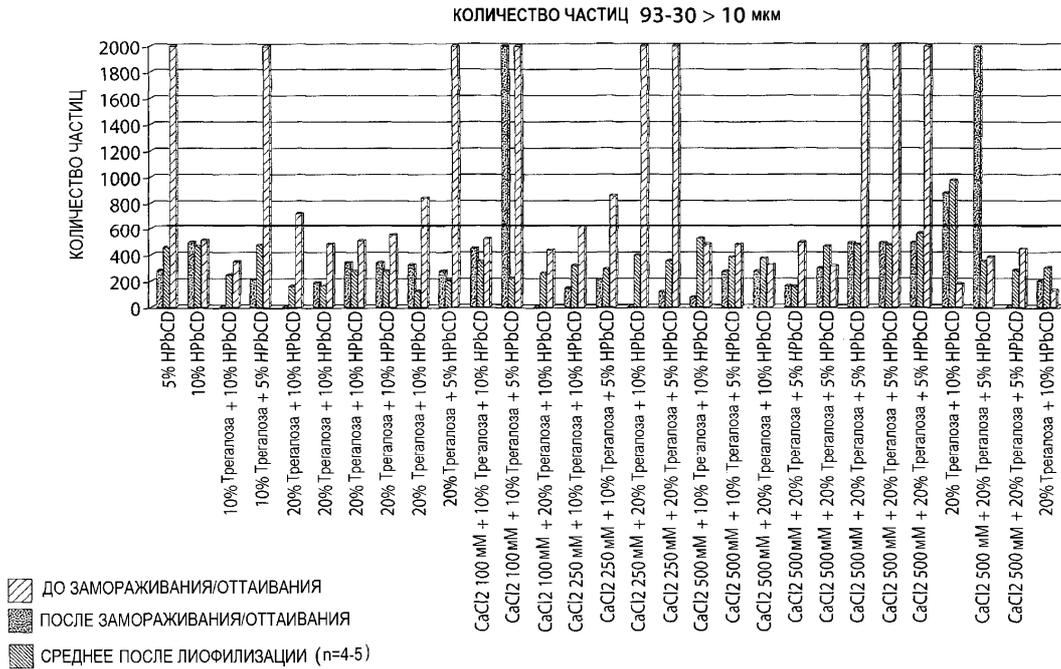
НАПРАВЛЕНИЕ ЦИКЛА ЛИОФИЛИЗАЦИИ 93-30



Фиг. 4

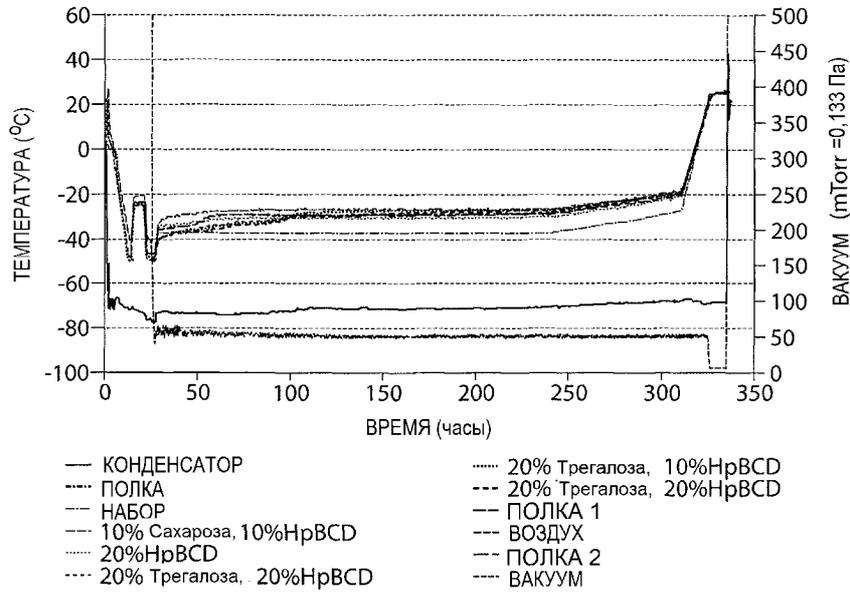


Фиг. 5



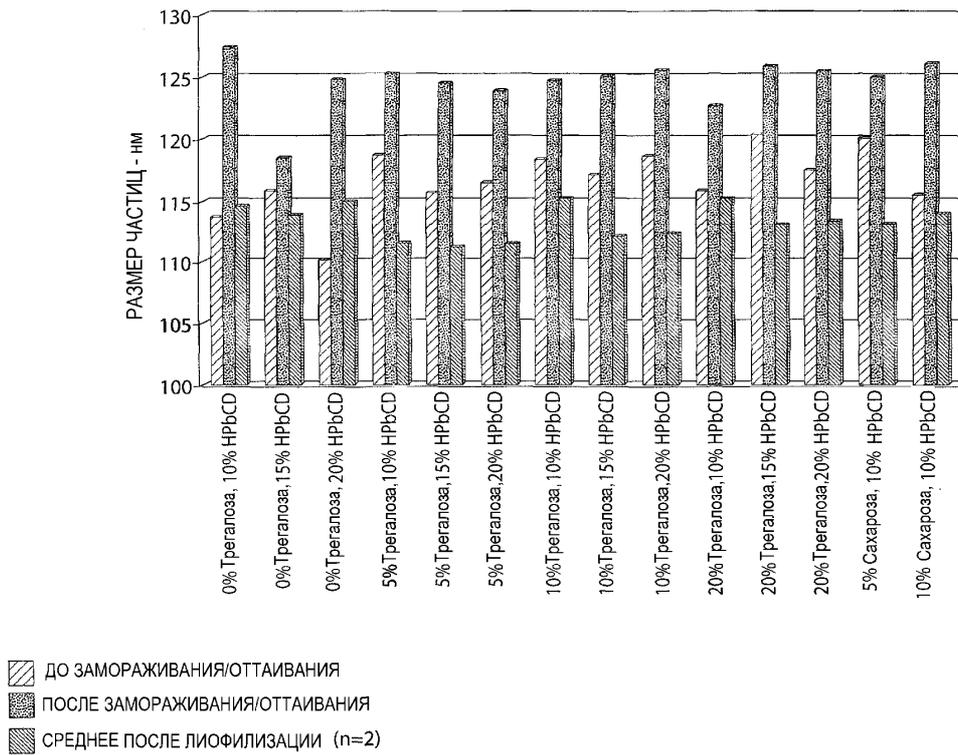
Фиг. 6

НАПРАВЛЕНИЕ ЦИКЛА ЛИОФИЛИЗАЦИИ 93-54

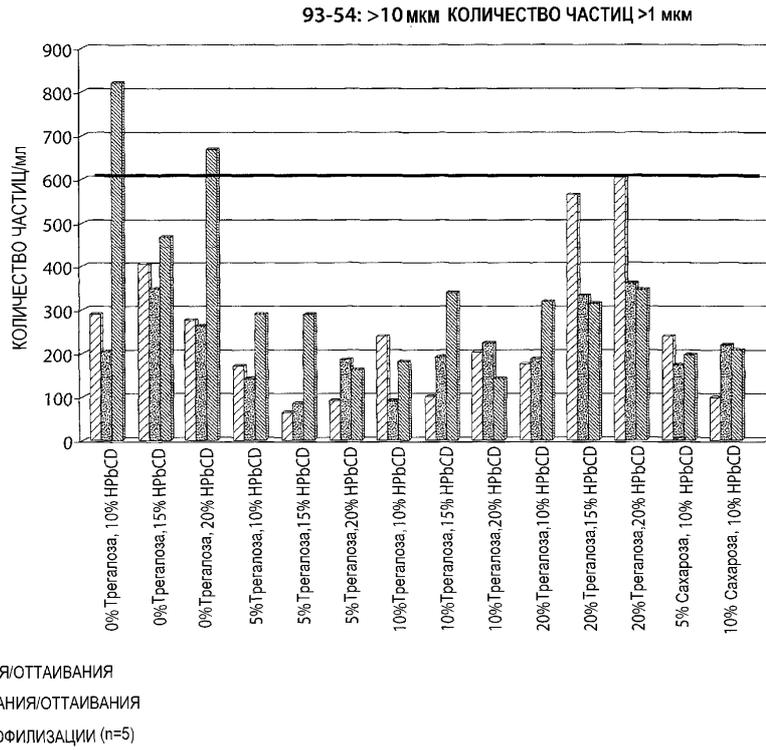


Фиг. 7

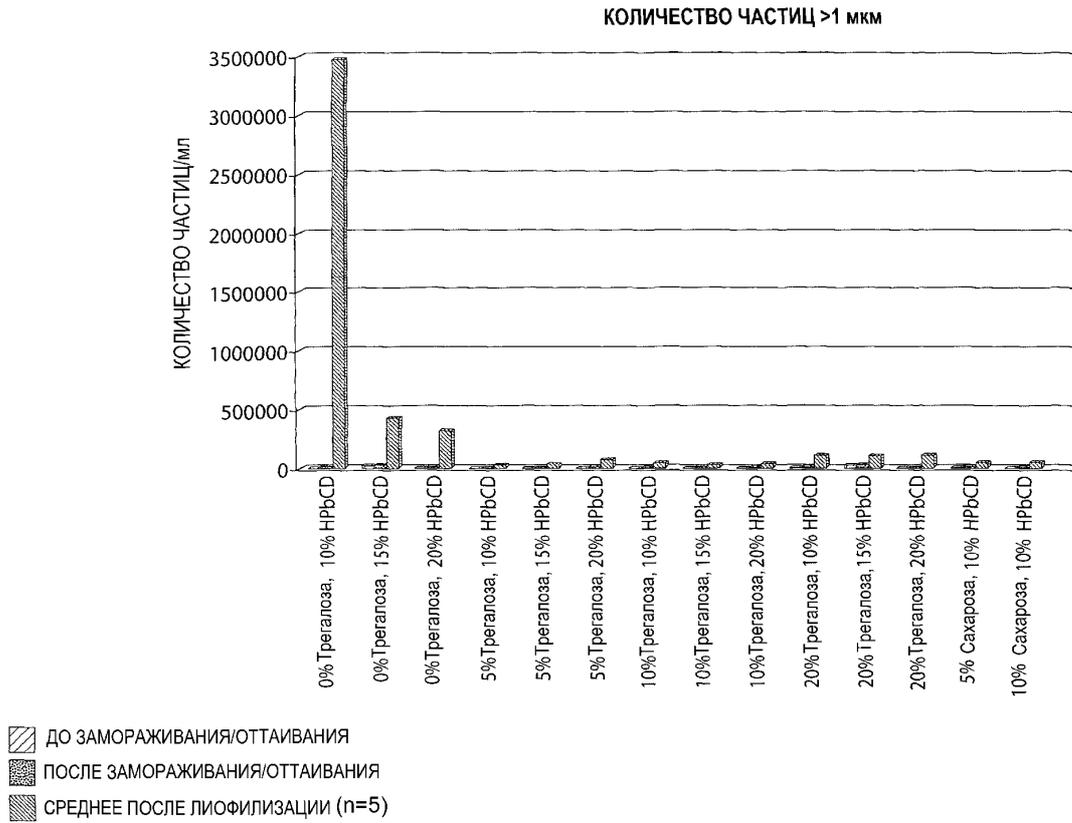
РАЗМЕР ЧАСТИЦ 93-54 DLS



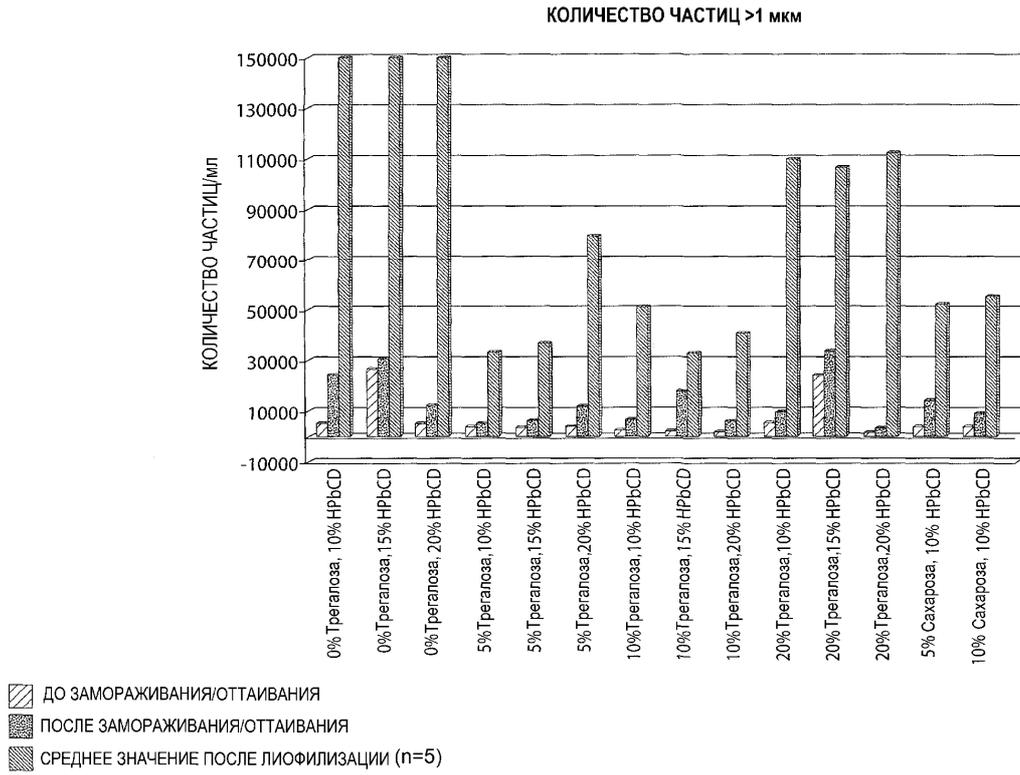
Фиг. 8



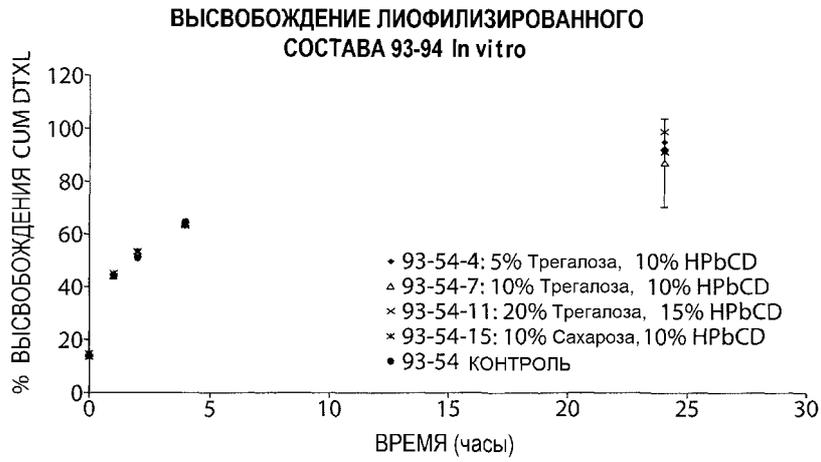
Фиг. 9



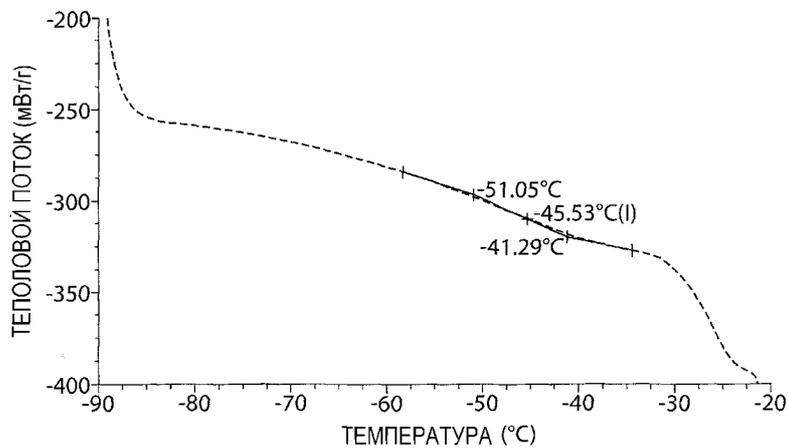
Фиг. 10



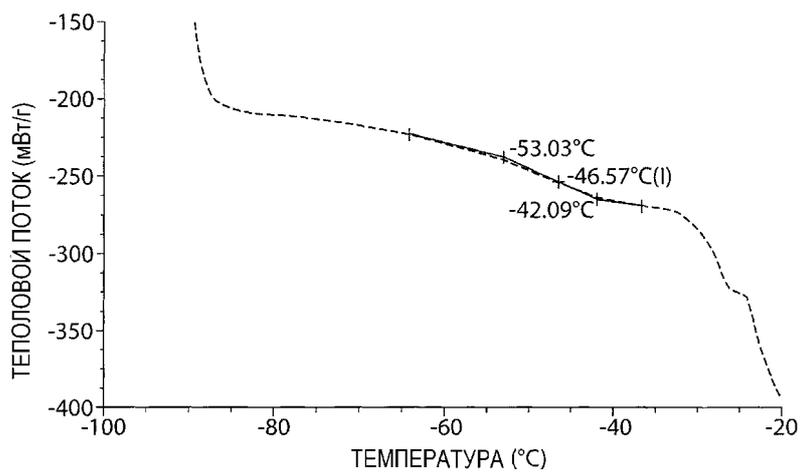
Фиг. 11



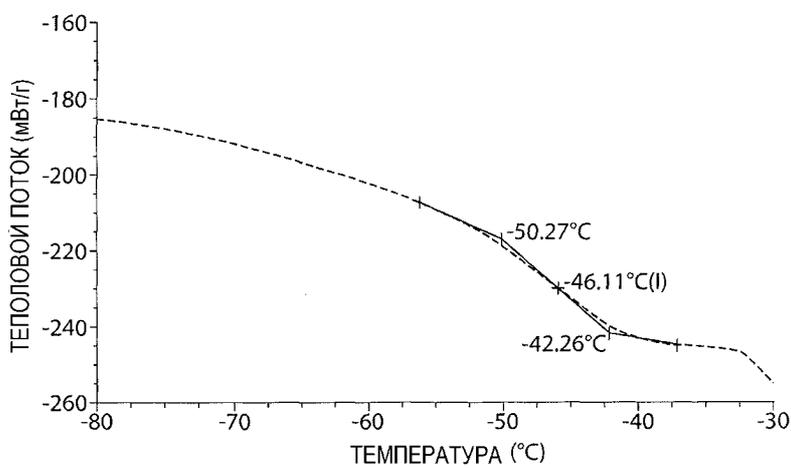
Фиг. 12



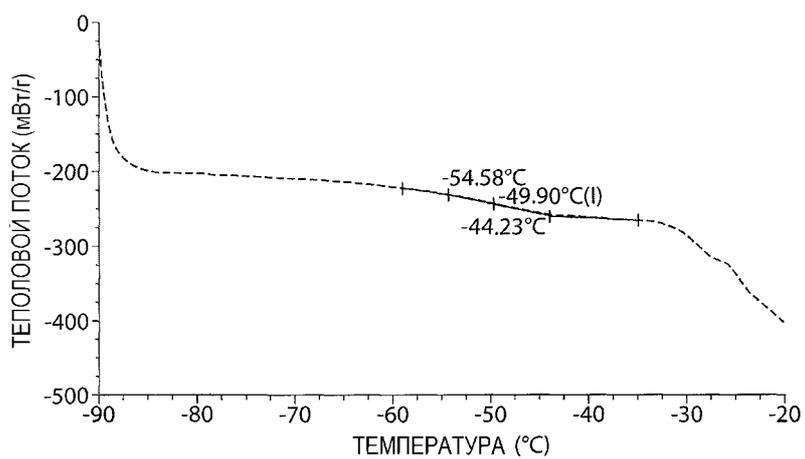
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

