

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036623**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.01

(21) Номер заявки
201890979

(22) Дата подачи заявки
2016.10.14

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)

(54) СТАБИЛЬНЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) **62/242,412**

(32) **2015.10.16**

(33) **US**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/US2016/057019**

(87) **WO 2017/066554 2017.04.20**

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

(72) Изобретатель:
Чен Хантер, Шлезингер Эрика (US)

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

(56) SANDRA HERRMANN ET AL.: "New Insight into the Role of Polyethylene Glycol Acting as Protein Release Modifier in Lipidic Implants", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 24, no. 8, 23 March 2007 (2007-03-23), pages 1527-1537, XP019507255, ISSN: 1573-904X, DOI: 10.1007/S11095-007-9271-Y the whole document

ATHA D.H. ET AL.: "MECHANISM OF PRECIPITATION OF PROTEINS BY POLY ETHYLENE GLYCOLS ANALYSIS IN TERMS OF EXCLUDED VOLUME", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 256, no. 23, 1 January 1981 (1981-01-01), pages 12108-12117, XP002454548, the whole document
US-A1-2012095439

(57) Изобретение относится к двухфазной фармацевтической лекарственной форме, которая остается стабильной при физиологической температуре для замедленного высвобождения терапевтического белка, содержащей от 25 до 150 мг/мл полиэтиленгликоля 3350 (ПЭГ 3350) и от 100 до 1400 мг/мл белка VEGF-Trap, где менее 50% белка присутствует в жидкой фазе с ПЭГ, и остаток белка присутствует в твердой фазе в равновесии с жидкой фазой, где твердая фаза исключена из жидкой фазы с помощью ПЭГ, и полупроницаемую мембрану, где полупроницаемая мембрана окружает жидкую фазу и предпочтительно сохраняет ПЭГ, позволяя белку диффундировать через мембрану, где жидкая фаза имеет доступ к окружающей среде с более низкой концентрацией белка через полупроницаемую мембрану.

B1**036623****036623****B1**

Область техники

Изобретение относится к двухфазной фармацевтической лекарственной форме, которая является стабильной в течение длительного периода времени. Изобретение конкретно относится к двухфазной фармацевтической лекарственной форме, которая остается стабильной при физиологической температуре для замедленного высвобождения терапевтического белка.

Уровень техники

Доставка терапевтического белка с замедленным высвобождением в направлении биологически релевантной мишени является необходимым для лечения заболеваний, таких как рак, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания сосудов, ортопедическая патология, стоматологическая патология, раны, аутоиммунные заболевания, желудочно-кишечные расстройства и глазные болезни. Биосовместимые и био-разлагаемые полимеры и другие имплантируемые устройства доставки для контролируемой и замедленной доставки лекарственных средств используются в течение десятилетий. Например, в некоторых устройствах доставки на полимерной основе, когда полимер со временем разлагается, терапевтическое лекарственное средство медленно высвобождается.

Замедленное высвобождение может быть желательным для соблюдения режима лечения пациента. В частности, уменьшение количества инъекций может иметь особую практическую значимость, особенно в тех случаях, когда врач должен делать инъекцию, например, как в случае применения внутриглазных терапевтических средств. Существует неудовлетворенная медицинская потребность в препаратах с замедленным высвобождением для эффективной доставки лекарственных средств в динамике по времени с минимальным, по мере возможности, количеством инъекций. В случае других заболеваний, например при раке и заболеваниях воспалительного характера, существует потребность в усовершенствованных имплантируемых лекарственных формах препаратов с замедленным высвобождением, содержащих стабильные и эффективные белковые терапевтические средства.

Терапевтические макромолекулы, такие как антитела и рецептор-Fc-слитые белки, должны быть приготовлены таким образом, чтобы не только сделать молекулы пригодными для введения пациентам, но также поддерживать их стабильность во время хранения и в месте введения. К примеру, терапевтические белки (например, антитела) в жидком растворе подвергаются деградации, агрегации и/или нежелательным химическим модификациям, если раствор не будет должным образом приготовлен. Стабильность белкового терапевтического средства в жидкой композиции зависит не только от типов вспомогательных веществ, которые используются в лекарственной форме, но и от количества и пропорций этих вспомогательных веществ относительно друг друга, а также от концентрации растворимого белка. Кроме того, помимо стабильности, при подготовке терапевтической белковой лекарственной формы также должны приниматься во внимание другие факторы. Примеры таких дополнительных факторов включают вязкость раствора и концентрацию антитела, которая может быть обеспечена в соответствии с данной лекарственной формой. Таким образом, к приготовлению терапевтического белка для замедленного высвобождения следует подходить с особой тщательностью для того, чтобы получить лекарственную форму, которая остается стабильной в динамике по времени, а также при хранении и физиологической температуре, содержит достаточную концентрацию антитела и обладает другими свойствами, которые обеспечивают возможность удобного введения данной лекарственной формы пациентам.

Несмотря на то, что в лекарственных формах с малыми молекулами может использоваться полиэтиленгликоль (ПЭГ), использование ПЭГ с более крупными белками, как известно, вызывает осаждение. ПЭГ используется для осаждения белков для облегчения очистки, концентрирования и обмена буфера. ПЭГ также используется для кристаллизации белка при проведении биофизического анализа. ПЭГ также используется в небольших количествах (например, как правило, не более чем 3% мас./об.) в качестве вспомогательного вещества для защиты белков от стресса, вызываемого перемешиванием. Известно также, что осаждение белков с помощью ПЭГ агрегирует белки и может быть вредным для функции белка.

Сущность изобретения

В одном аспекте данного изобретения представлена двухфазная фармацевтическая лекарственная форма, которая содержит от 25 до 150 мг/мл полиэтиленгликоля 3350 (ПЭГ 3350) и от 100 до 1400 мг/мл белка VEGF-Tгар, где менее 50% белка присутствует в жидкой фазе с ПЭГ, и остаток белка присутствует в твердой фазе в равновесии с жидкой фазой, где твердая фаза исключена из жидкой фазы с помощью ПЭГ, и полупроницаемую мембрану, где полупроницаемая мембрана окружает жидкую фазу и предпочтительно сохраняет ПЭГ, позволяя белку диффундировать через мембрану, где жидкая фаза имеет доступ к окружающей среде с более низкой концентрацией белка через полупроницаемую мембрану. Белок как в растворимой фазе, так и в нерастворимой фазе является стабильным в течение по меньшей мере 30 дней при физиологической температуре, и белок растворимой фазы имеет доступ к среде с меньшей концентрацией белка. В одном варианте реализации изобретения доступ белка к окружающей среде обеспечивает полупроницаемая мембрана или другая пористая структура.

В одном аспекте данного изобретения представлена двухфазная фармацевтическая лекарственная форма, которая содержит от 25 до 150 мг/мл полиэтиленгликоля 3350 (ПЭГ 3350) и от 100 до 1400 мг/мл белка VEGF-Tгар, при этом менее чем 50% от общего количества белка находится в растворимой фазе, а оставшаяся часть белка находится в нерастворимой фазе. Белок как в растворимой фазе, так и в нерас-

творимой фазе является стабильным в течение по меньшей мере 30 дней при физиологической температуре, и белок растворимой фазы имеет доступ к среде с меньшей концентрацией белка. В одном варианте реализации изобретения доступ белка к окружающей среде обеспечивает полупроницаемая мембрана или другая пористая структура.

В одном аспекте данного изобретения представлена двухфазная фармацевтическая лекарственная форма для использования при лечении пациента, который нуждается в входящем в состав лекарственном средстве. В одном варианте реализации изобретения двухфазная фармацевтическая лекарственная форма содержит от 25 до 150 мг/мл полиэтиленгликоля 3350 (ПЭГ 3350) и от 100 до 1400 мг/мл белка VEGF-Trap. Менее чем 50% лекарственного средства находится в растворимой фазе вместе с определенным количеством ПЭГ. Остальная часть лекарственного средства находится в нерастворимой фазе. Растворимое лекарственное средство имеет доступ через полупроницаемую мембрану другой пористой структуры к окружающей среде, которая имеет более низкую концентрацию лекарственного средства (например, ткани пациента или водянистая текучая среда за пределами устройств) и диффундирует к своей целевой области в организме пациента. В некоторых вариантах реализации изобретения двухфазная фармацевтическая лекарственная форма содержится в резервуарном устройстве, при этом растворимое лекарственное средство имеет доступ к окружающей среде через порт, такой как полупроницаемая мембрана. Лекарственное средство в соответствии с этим аспектом данного изобретения является стабильным в течение по меньшей мере 30 дней в физиологических условиях, и в связи с тем, что лекарственное средство диффундирует из двухфазной фармацевтической лекарственной формы, количество лекарственного средства в лекарственной форме снижается до уровня ниже его начальной концентрации.

Графические материалы

На фиг. 1 проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий влияние различных вспомогательных веществ на концентрацию растворимого белка. Ось X отображает концентрацию вспомогательного вещества в миллиграммах на миллилитр (мг/мл). Белые квадраты ($\square$) графически обозначают вспомогательное вещество декстран 6000; белые ромбы ($\diamond$) графически обозначают вспомогательное вещество декстран 40000; окрашенные ромбы ($\blacklozenge$) графически обозначают вспомогательное вещество полиэтиленгликоль с молекулярной массой 3350 (ПЭГ 3350); окрашенные квадраты ($\blacksquare$) графически обозначают вспомогательное вещество полиэтиленгликоль с молекулярной массой 8000 (ПЭГ 8000); а окрашенные треугольники ($\blacktriangle$) графически обозначают вспомогательное вещество полиэтиленгликоль с молекулярной массой 20000 (ПЭГ 20000). Ось Y отображает логарифм концентрации белка в мг/мл.

На фиг. 2 проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий влияние концентрации полиэтиленгликоля в мг/мл (по оси X) на растворимость белка, выраженную в мг/мл (по оси Y).

На фиг. 3 проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий влияние различных молекулярно-массовых форм вспомогательного вещества ПЭГ на концентрацию растворимого белка. Ось X отображает концентрацию вспомогательного вещества в миллиграммах на миллилитр (мг/мл). Сплошная линия обозначает вспомогательное вещество ПЭГ 3350; линия из точек обозначает вспомогательное вещество ПЭГ 8000; и пунктирная линия обозначает вспомогательное вещество ПЭГ 20000. Ось Y отображает логарифм концентрации белка в мг/мл.

На фиг. 4 проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий стабильность двухфазного белка при водной концентрации 4,5 мг/мл (общая концентрация 30 мг/мл) в присутствии различных молекулярно-массовых форм ПЭГ в концентрации 80 мг/мл в зависимости от времени инкубации при температуре 37°C в забуференном фосфатом физиологическом растворе (pH 7,2). Сплошная линия обозначает вспомогательное вещество ПЭГ 3350; пунктирная линия обозначает вспомогательное вещество ПЭГ 8000; и линия из точек обозначает вспомогательное вещество ПЭГ 20000. Ось X отображает время инкубации в неделях. На оси Y отображен относительный процент белка, имеющего естественную конформацию (ожидаемый гидродинамический радиус).

На фиг. 5 проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий стабильность растворимого белка в присутствии различных количеств ПЭГ 3350 в зависимости от времени инкубации при температуре 37°C. Сплошная линия и окрашенный квадрат ($\blacksquare$) графически обозначают контроль с белком в концентрации 4,5 мг/мл и без ПЭГ; сплошная линия и окрашенный круг ($\bullet$) графически обозначают контроль с белком в концентрации 10 мг/мл и без ПЭГ; пунктирная линия и окрашенный треугольник ($\blacktriangle$) графически обозначают ПЭГ 3350 в концентрации 80 мг/мл и растворимый белок в концентрации 4,5 мг/мл; и пунктирная линия и окрашенный квадрат ($\blacksquare$) графически обозначают ПЭГ 3350 в концентрации 65 мг/мл и растворимый белок в концентрации 10 мг/мл. Ось X отображает время инкубации в неделях. На оси Y отображен относительный процент белка, имеющего естественную конформацию (ожидаемый гидродинамический радиус).

На фиг. 6А проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий стабильность растворимого белка в монофазной системе и растворимого белка в двухфазной системе в присутствии ПЭГ 3350 в зависимости от времени инкубации при температуре 37°C. Точки данных с окрашенным квадратом ($\blacksquare$) графически обозначают контрольный образец с белком в концентрации 4,5 мг/мл и без ПЭГ; точки данных с окрашенным треугольником ($\blacktriangle$) графически обозначают растворимый белок в монофазной системе в концентрации 4,5 мг/мл и ПЭГ 3350 в концентрации около 80 мг/мл; точки данных с окрашенным

кругом (●) графически обозначают растворимый белок в двухфазной системе в концентрации 4,5 мг/мл, ПЭГ 3350 в концентрации около 80 мг/мл и нерастворимый белок в двухфазной системе в концентрации 25,5 мг/мл. Ось X отображает время инкубации в неделях. На оси Y отображен относительный процент белка, имеющего естественную конформацию (ожидаемый гидродинамический радиус).

На фиг. 6В проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий стабильность растворимого белка в монофазной системе и растворимого белка в двухфазной системе в присутствии ПЭГ 3350 в зависимости от времени инкубации при 37°C. Точки данных с окрашенным кругом (●) графически обозначают контрольный образец с белком в концентрации 10 мг/мл и без ПЭГ; точки данных с окрашенным квадратом (■) графически обозначают растворимый белок в монофазной системе в концентрации 10 мг/мл и ПЭГ 3350 в концентрации около 65 мг/мл; точки данных с окрашенным ромбом (◆) графически обозначают растворимый белок в двухфазной системе в концентрации 10 мг/мл, ПЭГ 3350 в концентрации около 65 мг/мл и нерастворимый белок в двухфазной системе в концентрации 20 мг/мл. Ось X отображает время инкубации в неделях. На оси Y отображен относительный процент белка, имеющего естественную конформацию (ожидаемый гидродинамический радиус).

На фиг. 7 проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий стабильность нерастворимого белка в присутствии ПЭГ 3350 в концентрации 150 мг/мл в зависимости от времени инкубации при температуре 37°C. Нерастворимый белок в концентрации 30 мг/мл в присутствии ПЭГ 3350 в концентрации 150 мг/мл графически обозначен короткой пунктирной линией с окрашенными ромбами (◆). Нерастворимый белок в концентрации 60 мг/мл в присутствии ПЭГ 3350 в концентрации 150 мг/мл графически обозначен сплошной линией с окрашенными квадратами (■).

Нерастворимый белок в концентрации 120 мг/мл в присутствии ПЭГ 3350 в концентрации 150 мг/мл графически обозначен линией из точек с окрашенными треугольниками (▲). Ось X отображает время инкубации в неделях. На оси Y отображен процент белка, который имеет высокую молекулярную массу относительно общего белка. После инкубации в течение 2 недель при температуре 37°C нерастворимый белок восстанавливался не полностью, и точные уровни агрегированной величины не определялись.

На фиг. 8 проиллюстрирован линейный график, иллюстрирующий влияние и прогнозируемое влияние концентрации белка на скорость агрегации белка и образование высокомолекулярных соединений. На оси X отображена концентрация белка в мг/мл. На оси Y отображено процентное изменение образования высокомолекулярных соединений в неделю.

На фиг. 9 проиллюстрировано схематическое изображение резервуарного устройства, которое содержит наружный корпус, окружающий (охватывающий) резервуарную камеру, в которой находится двухфазная лекарственная форма. Корпус содержит порт для того, чтобы обеспечить возможность выхода лекарственного средства из резервуара.

На фиг. 10 проиллюстрирована растворимость афлиберцепта (ФРЭС ловушки), выраженная в мг/мл, в зависимости от концентрации ПЭГ 3350. Белые круги (○) графически обозначают растворимость восстановленного твердого (сухого) афлиберцепта (включая сахарозу) плюс сухого ПЭГ, впоследствии гидратированного. Окрашенные круги (●) графически обозначают растворимость жидкой лекарственной формы ПЭГ и афлиберцепта без сахарозы.

На фиг. 11 проиллюстрирована растворимость афлиберцепта, выраженная в десятичном логарифме концентрации (мг/мл), в зависимости от концентрации ПЭГ 3350. Квадраты (□) графически обозначают смешение сухого афлиберцепта (включая сахарозу) и сухого ПЭГ, впоследствии гидратированного. Ромбы (◇) графически обозначают смешение раствора ПЭГ и раствора афлиберцепта без сахарозы.

На фиг. 12 проиллюстрирована скорость высвобождения афлиберцепта, выраженная в миллиграммах, высвобождаемых в день на квадратный миллиметр площади поверхности пористой структуры, в зависимости от концентрации растворимого афлиберцепта.

На фиг. 13 проиллюстрирована скорость высвобождения афлиберцепта, выраженная в миллиграммах, высвобождаемых в день на мг/мл растворимого афлиберцепта, в зависимости от площади поверхности пористой структуры.

На фиг. 14 проиллюстрированы кумулятивное высвобождение афлиберцепта, выраженное в миллиграммах (ромбы [◇]), и стабильность афлиберцепта, выраженная в виде процента нативной конформации, определяемой с помощью эксклюзионной хроматографии (квадраты [□]) в зависимости от времени при физиологической температуре и pH. На панели А проиллюстрированы результаты для ПЭГ 3350 в концентрации 100 (±3) мг/мл (n=2). На панели В проиллюстрированы результаты для ПЭГ 3350 в концентрации 70 (±3) мг/мл (n=4).

На фиг. 15 проиллюстрирована стабильность высвобождаемого афлиберцепта в зависимости от времени. Ось X отображает время в виде количества дней при физиологической температуре. Ось Y отображает относительное количество нативного афлиберцепта, оставшегося в образце (процент чистоты). Окрашенные треугольники (▲) графически обозначают афлиберцепт, высвобождаемый из лекарственной формы, содержащей ПЭГ 3350 в концентрации 80 мг/мл ±20 мг/мл. Окрашенные круги (●) графически обозначают афлиберцепт, высвобождаемый из лекарственной формы, содержащей только сахарозу (без ПЭГ).

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Кроме того, также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения определяется формулой изобретения.

Если не определено иным способом, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют одни и те же значения, которые широко понимаются специалистами в данной области, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы в практике или испытаниях данного изобретения, в данных обстоятельствах описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в настоящий документ посредством ссылки.

Двухфазная система.

Приготовление белковых биотерапевтических препаратов с высокой концентрацией создает значительные проблемы для биофармацевтической промышленности. Белки при высокой концентрации (например, >50 мг/мл), в большинстве случаев являются нестабильными и имеют предрасположенность к увеличению скорости агрегации. Это является особенно проблематичным для лекарственных средств с замедленным высвобождением в тех случаях, когда требуются высокие уровни содержания лекарственного средства. В связи с тем, что лекарственные средства с замедленным высвобождением предназначены для высвобождения лекарственного средства в течение длительных периодов времени в физиологических средах, лекарственное средство должен быть стабильным и биологически активным в течение этого длительного периода.

Данное изобретение включает в себя смешивание полиэтиленгликоля (ПЭГ) и белка для получения стабильного белка в форме твердого осадка в равновесии с жидкой насыщенной растворимой формой белка, в которой растворимая фаза имеет доступ к окружающей среде с меньшей концентрацией белка, т.е. система является открытой, а не закрытой. В теории, в то же время не ограничиваясь каким-либо механизмом, теоретически белок является стабильным в обеих фазах, а белок в нерастворимой фазе снабжает растворимую фазу, которая, в свою очередь, стимулирует диффузию белка через полупроницаемую мембрану. Стабильность белка относится к белку, который диффундирует за пределы резервуара. В одном аспекте данного изобретения открытая двухфазная система обеспечивает возможность полупроницаемой мемbrane или другой пористой структуре предпочтительно удерживать ПЭГ, в то же время обеспечивая возможность диффузии белка.

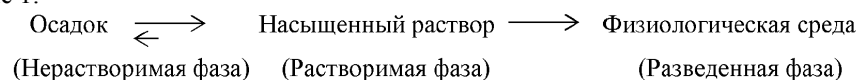
Примером открытой системы является устройство с пористыми стенками, которое обеспечивает возможность для растворимой формы белка иметь доступ к внешней среде и позволяет в динамике по времени высвобождение растворимой формы белка. В некоторых вариантах реализации изобретения растворимая фаза имеет доступ к окружающей среде через порт, такой как полупроницаемая мембрана или другая пористая структура. Полупроницаемая мембрана в соответствии с предметом данного изобретения обеспечивает возможность свободно пропускать через нее воду и белок. В некоторых вариантах реализации изобретения полупроницаемая мембрана содержит нанопоры и/или микропоры. В некоторых вариантах реализации изобретения полупроницаемая мембрана представляет собой полимерную пленку с нанопорами и/или микропорами.

В некоторых вариантах реализации изобретения конечная концентрация ПЭГ составляет 25 мг/мл или более. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация белка в нерастворенной и растворенной форме составляет 100 мг/мл или более. В некоторых вариантах реализации изобретения белок объединяют с ПЭГ в твердой форме, такой как лиофилизированный белок или высушенный распылением белок.

Данное изобретение включает двухфазную систему для доставки стабильного лекарственного средства в течение длительного периода времени. Термин "двухфазная" означает то, что лекарственное средство существует в двух фазах: нерастворимой (осажденной), или твердой фазе, и растворимой, или жидкой фазе. Нерастворимая фаза служит в качестве резервуара для лекарственных средств, а растворимая фаза служит в качестве активной формы лекарственного средства, которое диффундирует в физиологическую систему и контактирует с физиологической мишенью. В закрытой двухфазной системе, такой как, например, во флаконе, растворимая фаза представляет собой насыщенный раствор лекарственного средства, которое находится в равновесии с осадком. Тем не менее, в открытой двухфазной системе, в связи с тем, что растворимое лекарственное средство, которое имеет доступ к наружной водной окружающей среде, диффундирует из насыщенной растворимой фазы, часть осажденного лекарственного средства растворяется и поступает в насыщенную растворимую фазу для замещения растворимого лекарственного средства, которое диффундирует в окружающую среду. Белок в осажденной фазе медленно растворяется для поддержания равновесия с насыщенной фазой, т.е. осажденная фаза пополняет растворимую фазу, а растворимая фаза диффундирует в физиологическую систему для взаимодействия с мишенью для лекарственного средства (уравнение 1). С помощью регулирования концентрации вспомогательного вещества в виде осадителя (т.е. ПЭГ), регулируется растворимая концентрация лекарственного

средства в насыщенной растворимой фазе.

Уравнение 1.



В одном варианте реализации изобретения двухфазная система имплантируется в целевую физиологическую среду. Например, двухфазная система может быть доставлена в стекловидное тело в тех случаях, когда целевая ткань для лекарственного средства представляет собой сетчатку, макулу или другую внутреннюю структуру глазного яблока. Для других целей система может быть имплантирована подкожно, гиподермально или внутрибрюшинно.

Двухфазная система частично заключена в барьер. Под термином "частично заключена" подразумевается, что барьер обеспечивает возможность диффузии растворенного лекарственного средства за пределы двухфазной системы. Барьер обеспечивает возможность лекарственному средству диффундировать за пределы двухфазной системы и контактировать с целевой областью, но предотвращает быструю диффузию вспомогательного вещества в виде осадителя. Барьер может быть спроектирован и настроен таким образом, чтобы обеспечить определенные скорости высвобождения лекарственного средства. Например, барьер может представлять собой мембрану, содержащую поры, которые допускают прохождение лекарственного средства. Количество и/или размер или архитектура пор, а также общая площадь полупроницаемой мембраны или другой пористой структуры могут быть спроектированы таким образом, чтобы регулировать скорость высвобождения лекарственного средства.

Вспомогательное вещество в виде осадителя может быть выбрано из известных осадителей белка на основе характеристик устройства для элюирования лекарственного средства. Распространенные осадители включают лиотропные соли, такие как сульфат аммония, смешивающиеся растворители, подобные ацетону, и неионные макромолекулы, такие как декстран и ПЭГ. Выбор осадителя, как и в случае ограждающего барьера, находится в зависимости от растворимости лекарственного средства и предпочтительной концентрации лекарственного средства в растворимой фазе. Например, декстраны, несмотря на то, что, как сообщается, используются для осаждения белков, не ограничивают растворимость белков в том же диапазоне концентраций вспомогательных веществ, что и ПЭГ. На фиг. 1 проиллюстрировано сравнение воздействия ПЭГ 3350 (окрашенные ромбы [◆]), ПЭГ 8000 (окрашенные квадраты [■]), ПЭГ 20000 (окрашенный треугольник [▲]), декстран 6000 (белый квадрат [□]) и декстран 40000 (белый ромб [◇]) на растворимость белка. Следует обратить внимание на то обстоятельство, что обе молекулярно-массовые формы декстрана оставляют больше белка в растворимой фазе, чем ПЭГ при аналогичных концентрациях вспомогательного вещества. Более высокие концентрации декстрана являются необходимыми для достижения того же уровня осаждения белка, что и более низкие концентрации ПЭГ. В одном варианте реализации изобретения ПЭГ является предпочтительным для образования двухфазной лекарственной формы с большим резервуаром для замедленного высвобождения меньших доз лекарственного средства в течение более длительного периода времени.

В одном варианте реализации изобретения ПЭГ выбирают в качестве вспомогательного вещества в виде осадителя для имплантируемой на длительный период времени открытой двухфазной терапевтической белковой лекарственной формы. Концентрация белка в растворимой фазе двухфазной системы может быть контролируемой с помощью регулирования концентрации ПЭГ. Например, смешивание белка с молекулярной массой 150 кДа в концентрации около 16 мг/мл с ПЭГ в концентрации от около 25 мг/мл до около 150 мг/мл обеспечивает диапазон концентрации белка в растворимой фракции от около 14 мг/мл до менее чем 1 мг/мл (фиг. 2). Это влияние ПЭГ на растворимость белка зависит от массовой концентрации ПЭГ, а не от молярной концентрации ПЭГ. Другими словами, такое же воздействие на растворимость белка (т.е. концентрацию белка в насыщенной растворимой фазе) наблюдалось для таких же количеств по массе ПЭГ 3350, ПЭГ 8000 и ПЭГ 20000 (фиг. 3). Это означает, что ПЭГ 20000 в концентрации 80 мг/мл имеет такое же воздействие на один и тот же белок, что и ПЭГ 3350 в концентрации 80 мг/мл.

Несмотря на то, что концентрация лекарственного средства в растворимой фазе зависит от концентрации вспомогательного вещества и не зависит от общего содержания лекарственного средства, количество лекарственного средства в нерастворимой фазе включает все лекарственное средство, которое является избыточным для лекарственного средства в насыщенной растворимой фазе. По этой причине количество лекарственного средства в нерастворимой фазе зависит как от концентрации ПЭГ, так и от общего количества или конечной концентрации лекарственного средства.

Ожидается, что ПЭГ повлияет не только на растворимость белка, но также и на стабильность белка. Несмотря на то, что конкретные молекулярно-массовые разновидности ПЭГ оказывают очень малое влияние или вообще не влияют на стабильность полностью растворенного белка в монофазной системе, это оказывает влияние на стабильность полностью растворенного белка в двухфазной системе. ПЭГ с более низкой молекулярной массой, например ПЭГ 3350, оказывает меньшее отрицательное влияние на стабильность белка с молекулярной массой 100-150 кДа в растворимой фазе двухфазной системы, чем виды ПЭГ с более высокой молекулярной массой, например ПЭГ 8000 или ПЭГ 20000 (фиг. 4).

Несмотря на то, что ПЭГ 3350 оказывает меньшее отрицательное влияние на стабильность белка в растворимой фазе, чем формы с более высокой молекулярной массой, он при этом еще дестабилизирует белок в закрытой системе. Как проиллюстрировано на фиг. 5, стабильность белка снижается в присутствии ПЭГ 3350 по отношению к ПЭГ в монофазной системе при полном растворении. Дестабилизирующее воздействие ПЭГ на белок более явно выражено в закрытой двухфазной системе (фиг. 6А и 6В), что указывает на то, что стабильность белка снижается при хранении в нерастворимой фазе, а не в растворенной фазе в закрытой системе, но при указанных концентрациях нет никакого преимущества ни в полностью растворенной, ни в двухфазной системе.

В тех случаях, когда концентрация ПЭГ увеличивается в закрытой системе, стабильность белка в нерастворимой фазе уменьшается, как определено по увеличению скорости агрегации (см. фиг. 4-7). В тех случаях, когда ПЭГ присутствует в концентрациях, которые ограничивают растворимость белка до уровня менее чем 0,1 мг/мл, наблюдается необратимое осаждение белка. В аспекте данного изобретения агрегация в нерастворимой фазе системы является большей, чем в фазе раствора в закрытой системе.

Высокая концентрация белка в растворимой фазе закрытой системы снижает стабильность белка как в лекарственной формах, содержащих ПЭГ, так и в лекарственных формах без содержания ПЭГ (фиг. 6А и 6В). Например, при использовании только сахарозы (без ПЭГ) в монофазной системе при однородных условиях белок с молекулярной массой от 100 до 150 кДа в концентрации около 4,5 мг/мл имеет скорость агрегации около 0,35% (высокой молекулярной массы) ВММ/нед., скорость агрегации около 2,7% ВММ/нед. в концентрации 120 мг/мл и экстраполированную скорость агрегации около 10,2% ВММ/нед. при прогнозируемой концентрации 500 мг/мл (фиг. 8). Такая высокая скорость агрегации является неприемлемой для фармацевтических применений лекарственных форм с высокими концентрациями белка.

В отличие от закрытой системы добавление ПЭГ улучшает стабильность высококонцентрированных белков в открытой двухфазной системе. Например, скорость агрегации насыщенного растворимого белка в закрытой монофазной системе в концентрации 10 мг/мл и содержании ПЭГ в концентрации 65 мг/мл может составлять около 1,3% ВММ/нед. В закрытой двухфазной системе, содержащей белок растворимой фазы в концентрации 10 мг/мл и белок нерастворимой фазы в концентрации 20 мг/мл, содержащей ПЭГ в концентрации 65 мг/мл, скорость агрегации может составлять около 2,5% ВММ/нед., при этом в закрытой двухфазной системе, содержащей белок растворимой фазы в концентрации 10 мг/мл и белок нерастворимой фазы в концентрации 110 мг/мл, содержащей ПЭГ в концентрации 65 мг/мл, скорость агрегации может составлять около 10% ВММ/нед., но в то же время в открытой двухфазной системе, содержащей ПЭГ в концентрации 75 мг/мл и общий белок в концентрации >100 мг/мл, скорость агрегации может составлять около 0,8% ВММ/нед.

В закрытой системе, такой как, например, во флаконе, белок не высвобождается, а белковая масса не переносится из нерастворимой фазы в растворимую фазу. В открытой системе, например, в тех случаях, когда двухфазная система имплантируется в физиологическую систему, концентрация белка в нерастворимой фазе (т.е. общая масса белка в осадке) уменьшается по мере того, как белок переносится из этой фазы в насыщенную растворимую фазу в связи с тем, что белок из насыщенной фазы диффундирует в физиологическую среду. Принимая во внимание постоянное перемещение белка из нерастворимой фазы в растворимую фазу, белок в динамической открытой двухфазной системе в тех случаях, когда растворимый белок выходит из двухфазного резервуара, является более устойчивым, чем в закрытой системе или монофазном растворе.

Помимо всего прочего, на фоне количества ПЭГ и белка, которые объединяют для получения двухфазной системы, влияние ПЭГ на растворимость белка и фазовое разделение частично зависит от конкретных характеристик белка, таких как, например, размер белка и/или изоэлектрическая точка. В табл. 1 проиллюстрировано прогнозируемое или фактическое влияние различных количеств ПЭГ на растворимость рецептор-Fc-слитого белка (ловушки), белка иммуноглобулина (IgG), человеческого сывороточного альбумина (HSA) и фибриногена. Atha и др., "Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols", J. of Bio. Chem. 256(23):12108-12117 (1981) включен в данный документ в качестве ссылки для описания влияния ПЭГ на растворимость IgG#2, HSA и фибриногена.

Таблица 1

БЕЛОК	% МАССА/ ОБЪЕМ ПЭГ	РАСТВОРИМОСТЬ БЕЛКА (МГ/МЛ)	% МАССА/ ОБЪЕМ ПЭГ	РАСТВОРИМОСТЬ БЕЛКА (МГ/МЛ)
ЛОВУШКА	3,0	47	10	1,6
IGG#1	3,0	98	12	0,2
IGG#2	8,0	8	18	0,1
HSA	28	11	35	0,8
ФИБРИНОГЕН	2,5	10	7,5	0,1

Резервуарное устройство.

В некоторых вариантах реализации изобретения открытая двухфазная система для доставки пациенту биомолекулы, терапевтической биомолекулы или другого лекарственного средства помещается

внутри резервуарного устройства. Резервуарное устройство в соответствии с данным изобретением является частично открытым для окружающей среды, и скорость диффузии или перемещения лекарственного средства в растворимой фазе из двухфазной системы может быть настроена. В некоторых вариантах реализации изобретения система с резервуарным устройством, которое содержит двухфазное лекарственное средство, имплантируется в организм пациента, например, путем подкожной доставки. Устройство в соответствии с данным изобретением может вступать в контакт с физиологической микросредой, и растворенное лекарственное средство выходит из устройства и диффундирует в физиологическую микросреду с заранее определенной скоростью. Помимо всего прочего, на фоне концентрации белка в растворе данная скорость высвобождения определяется свойствами устройства, которые можно регулировать для изменения скорости доставки. Такие регулируемые свойства представляют собой размер, структуру резервуарного устройства, пористость, размер фильтра и т.д. См. "Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy" W. Mark Saltzman, in Topics in Chemical Engineering, 1-е изд., издательство Оксфордского университета, Нью-Йорк, 2001 г.; публикацию международной патентной заявки № WO 2008109886 A1, Desai и др., опубликованной 12 сентября 2008 г.; публикацию международной патентной заявки № WO 2012142318 A1, Desai и др., опубликованной 18 октября 2012 г.; публикацию патентной заявки США № 20140170204 A1, Desai и др., опубликованной 6 июня 2014 г.; и публикацию патентной заявки США № US 20150216829 A1, Desai и др., опубликованной 6 августа 2015 г., которые включены посредством ссылки в данном документе для описания скоростей доставки и свойств устройства для их достижения.

Микросреда доставки влияет на размер, форму и составляющие материалы резервуарного устройства. Например, резервуарное устройство для доставки к интима сосуда может быть подобрано по размеру и иметь определенную форму для того, чтобы входить в стенки стента, который должен быть доставлен с использованием катетера. Устройство с двухфазным лекарственным средством может быть доставлено пациенту местно, например, в виде устройства типа дермального пластыря, энтерально, например, в виде капсулы или суппозитория, или парентерально, например, в виде имплантированного устройства. Приводимые в качестве примера микросреды включают желудочно-кишечный тракт, центральную нервную систему (например, эпидуральную, внутримозговую, интрацеребровентрикулярную, интратекальную), фето-амниональную систему (например, экстраамниотическую), макулу, сетчатку или другие глазные структуры (например, интравитреальную, внутриглазную), венозно-артериальную систему (например, внутриартериальную), костную и суставную систему (например, внутрикостную, внутрисуставную), мышечную, подкожную, дермальную, перитонеальную, слизистую и т.п.

В одном варианте реализации изобретения резервуарное устройство содержит "камеру" ("резервуарную камеру") и "корпус", который охватывает камеру. Корпус содержит одно или более отверстий, порты, окна, поры, пористые структуры или проницаемый или полупроницаемый материал (в совокупности называемый "пористой структурой"). "Пористая структура" позволяет вывести лекарственное средство из резервуара, а в некоторых вариантах реализации изобретения позволяет проникновение физиологического растворителя и растворенных веществ. В некоторых вариантах реализации изобретения весь корпус содержит пористую структуру. В других вариантах реализации изобретения пористую структуру содержит только часть корпуса, которая служит в качестве подобной окну конструкции в непроницаемом корпусе. Двухфазная система лекарственного средства удерживается в резервуарной камере. В некоторых вариантах реализации изобретения нерастворимая фаза обеспечивает ядро лекарственного средства, а растворимая фаза обеспечивает кору лекарственного средства. На фиг. 9 проиллюстрирована схема приводимого в качестве примера резервуарного устройства.

Резервуарное устройство в соответствии с данным изобретением может быть изготовлено из любого материала и иметь любой размер для размещения конкретного целевого объекта. Например, устройство может быть в некоторых случаях носимым поверх тела, например, как инсулиновая помпа, и поэтому может иметь относительно большие размеры. Устройство может быть имплантировано внутри организма, например, в виде подкожного или внутриполостного размещения, для чего требуется, чтобы устройство имело малые размеры. Например, интравитреальное устройство может иметь объем порядка от около 1 до 50 мкл.

В варианте реализации данного изобретения резервуарное устройство, которое имплантируется в физиологическую систему, может быть изготовлено из биосовместимых материалов, примеры которых включают металлы, включая кремний, титан, нержавеющую сталь и никель-титановые сплавы, а также полимеры, включая полимолочную кислоту (PLA), полиглутаминовую кислоту (PGA), поликапролактон (PCL), полиортоэфир, полиангидрид, полигидроксibuтират, полигидроксивалерат, полиаминокислоту, коллаген, ацетат целлюлозы, нейлон, поликарбонат, политетрафторэтилен (ПТФЭ), полиэфирсульфон, поливинилиденфторид (ПВДФ), акрилаты, полиакрилат, метилметакрилат, полиметилметакрилат (ПММА), полицианоакрилат, силоксаны, поликарбонат, полиэфирэфиркетон (ПЭЭК), полиэтилен, полиэтилентерефталат (ПЭТФ), полиимид, полиамидимид, полипропилен, полисульфон, полиуретан и поливинилиден.

Резервуарное устройство в соответствии с данным изобретением может быть жестким или гибким, одноразовым или многоразового использования. Заявки на патент №№ 2015/0250647, 2011/046870,

2013/0324942 и патенты США №№ 9033911 и 8623395 включены в данное описание посредством ссылки для жесткого и биологически совместимого многоразового интравитреального резервуарного устройства для доставки офтальмологического лекарственного средства в глазное яблоко (например, устройство FORSIGHT™ Vision4). В одном варианте реализации изобретения устройство в соответствии с данным изобретением изготовлено из титана и является многоразового использования. В качестве многоразового устройства оно может содержать проницаемый барьер, расположенный на проксимальном конце резервуара или вблизи него, с помощью которого лекарственное средство вносится через канюлю. В таком варианте реализации изобретения пористая структура содержит спеченный металл.

Материал корпуса гибких устройств в соответствии с данным изобретением может представлять собой полимер, а полупроницаемая мембрана или другая пористая структура может представлять собой полимерную пленку, содержащую микропоры, нанопоры или другие каналы. Гибкие и одноразовые полимерные устройства и способы их изготовления описаны в Bernards (2012), публикации заявок на патент США №№ 2014/0170204 и 2015/0119807 и европейской патентной заявке № EP 2164425 A1. Патент США 2015/0119807 A1 включен в данном документе посредством ссылки для описания тонкопленочных сэндвич-структур, содержащих нанопористую пленку из поликапролактона (PCL), или комбинации микропористого PCL и непористой основы, которая может быть использована в устройстве в соответствии с данным изобретением. В таком варианте реализации изобретения лекарственная субстанция загружается между двумя слоями полимерной пленки, которые затем подвергаются термической сварке. Размер и архитектура пор, а также площадь поверхности полупроницаемой мембраны или другой пористой структуры регулируют скорость элюирования лекарственного средства из устройства. Сложенные устройства с загруженным лекарственным средством могут быть введены через игольчатую канюлю, например, в стекловидное тело.

Термин "нанопора" описывает общий диаметр поры или отверстия канала в барьере, который обеспечивает возможность доступа материала с одной стороны поры (например, внутренней среды) к материалу с другой стороны поры (например, снаружи или наружной окружающей среде). Поры, которые имеют диаметр около 100 нм или менее, как правило, считаются нанопорами.

Нанопора данного резервуарного устройства имеет диаметр от около 0,2 до около 100 нм. В некоторых вариантах реализации изобретения нанопоры имеют диаметр от около 0,2 до около 2 нм, от около 2 до около 50 нм или от около 50 до около 100 нм. В некоторых вариантах реализации изобретения нанопоры данного резервуарного устройства имеют диаметр около 10 нм, около 11 нм, около 12 нм, около 13 нм, около 14 нм, около 15 нм, около 16 нм, около 17 нм, около 18 нм, около 19 нм, около 20 нм, около 21 нм, около 22 нм, около 23 нм, около 24 нм, около 25 нм, около 26 нм, около 27 нм, около 28 нм, около 29 нм или около 30 нм.

Микропористая пленка в соответствии с данным изобретением содержит микропоры. Микропоры в соответствии с данным изобретением имеют диаметр поперечного сечения от около 1 до около 2 мкм, от около 2 до около 5 мкм, около 1 мкм, около 1,1 мкм, около 1,2 мкм, около 1,3 мкм, около 1,4 мкм, около 1,5 мкм, около 1,6 мкм, около 1,7 мкм, около 1,8 мкм, около 1,9 мкм или около 2 мкм. В некоторых вариантах реализации изобретения микропора имеет диаметр менее чем около 10 мкм. В некоторых вариантах реализации изобретения микропоры имеют размер сообщающихся пор менее чем около 1 мкм.

Резервуарное устройство в соответствии с данным изобретением может представлять собой имплантируемый саморегулирующийся механохимический насос. Такое устройство использует гибкие мембраны, встроенные с ферментами, которые реагируют на изменения в микросреде. Эти изменения заставляют мембрану набухать и, следовательно, таким образом открывать ее поры для того, чтобы обеспечить возможность доступа растворимого белка к внешней окружающей среде и последующего оттока растворимого лекарственного средства. Например, сшитая гидрогелевая мембрана может быть сконструирована для набухания в тех случаях, когда аминокислотные полимерные боковые цепи являются протонированными, что позволяет устройству открываться в ответ на изменение pH в микросреде. Затем лекарственное средство "накачивается" из резервуарной камеры в физиологическую систему. Ферменты, которые восстанавливают или окисляют конкретное химическое вещество, могут быть встроены в мембрану для того, чтобы служить источником или стоком протонов. Примеры механохимических устройств см. Kost, и др. J. Biomed. Mater. Res. 19, 1117-1133 (1985), Albin и др., J. Controlled Release 6, 267-291 (1987 г.), Ishihara и др. Polymer J. 16, 625-631 (1984 г.), и De Juan и др., заявка на патент США № 9033911, 19 мая 2015 г.

Определения.

Изобретение включает лекарственную форму для улучшения растворимости белка в течение длительного периода времени по отношению к монофазному раствору. В еще одном аспекте данного изобретения представлено устройство доставки лекарственного средства для замедленной доставки лекарственного средства, которое остается стабильным в течение продолжительного периода времени при физиологической температуре. Также предлагается способ изготовления указанной лекарственной формы препарата для такого устройства доставки и использование указанной лекарственной формы или устройства для лечения пациента, который нуждается в входящем в состав лекарственном средстве. Лекарственная форма препарата в соответствии с данным изобретением содержит двухфазную систему, содер-

жащую "первую молекулу", которая существует в растворимой фазе и нерастворимой фазе, и "вторую молекулу", которая представляет собой вспомогательное вещество, которое уменьшает эффективную растворимость первой молекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения двухфазная система содержится в резервуарной камере, которая может быть ограничена корпусом с образованием резервуарного устройства. "Первая молекула", как правило, представляет собой биологическую молекулу, которая имеет терапевтическое применение, или другое лекарственное средство, или лекарственную субстанцию.

Термин "двухфазный" относится к состоянию молекулы, которая существует одновременно в твердой осажденной фазе и в насыщенной растворимой фазе. Двухфазная смесь молекул находится в равновесии. В двухфазной смеси в закрытой системе (например, как во флаконе или в другом контейнере, который не контактирует с физиологической системой), общее количество молекул в каждой фазе остается относительно постоянным. В двухфазной смеси в открытой системе, где растворимая форма молекулы может диффундировать из двухфазной смеси (например, в тех случаях, когда имплантируется или иным образом сообщается с физиологической или другой системой), количество молекул в двухфазной системе будет снижаться с течением времени. В открытой системе нерастворимая фракция молекулы служит в качестве резервной формы молекулы. Например, осажденный белок, окруженный насыщенным раствором того же белка, представляет собой "двухфазную систему", а белок является "двухфазным".

Термин "биомолекула" обозначает биологическую молекулу, которая содержит макромолекулы, такие как белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты и синтетические сложные молекулы, такие как аптамеры, а также небольшие молекулы, такие как, например, первичные метаболиты, вторичные метаболиты и продукты, продуцируемые в биологических системах. Биологические молекулы включают в том числе белки, полипептиды, пептиды и аминокислоты, аптамеры, липиды, нуклеозиды, нуклеотиды, а также нуклеиновые кислоты и углеводы. Биомолекулы могут встречаться в природе, т.е. продуцироваться в организмах природного происхождения, вирусах и средах или продуцироваться искусственно, т.е. могут быть получены с помощью синтетических химических средств или в биологических системах, содержащих рекомбинантные или эктопические нуклеиновые кислоты. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения биомолекула представляет собой терапевтическую биомолекулу. Терапевтическая биомолекула представляет собой "лекарственное средство" или "лекарственную субстанцию". В некоторых вариантах реализации изобретения "первая молекула" устройства представляет собой белок.

Термин "белок" означает любой аминокислотный полимер, который содержит более чем 50 аминокислот, ковалентно связанных через амидные связи. Белки содержат одну или более аминокислотных полимерных цепей, как правило, известных в данной области под названием "полипептиды". Белок может содержать один или множество полипептидов для образования единственной функционирующей биомолекулы. "Полипептиды", как правило, содержат более 50 аминокислот, в то время как "пептиды", как правило, содержат 50 аминокислот или менее.

Используемый в данном документе термин "белок" может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки ловушки и другие химерные рецептор-Fc-слитые белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, человеческие антитела и биспецифические антитела. В еще одном аспекте данного изобретения белок может содержать фрагменты антител, нанотела, химерные рекомбинантные антитела, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных систем на основе клеток, таких как баккуловирусовая система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, CHO-клетки и CHO-производные, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор, посвященный обсуждению биотерапевтических белков и их продукции, см. Ghaderi и др., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation", 28 Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 147-75 (2012 г.). В некоторых вариантах реализации изобретения белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейрамининовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, FLAG-маркер, мальтозосвязывающий белок (МСБ), хитинсвязывающий белок (CBP), Мус-эпитоп глутатион-S-трансферазы (GST), флуоресцентные метки и другие красители и т.п.

В качестве терапевтических биомолекул часто используются антитела. Используемый в данном документе термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями.

Выражение "Fc-содержащий белок" включает антитела, биспецифические антитела, иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат, по меньшей мере, функциональную часть области CH2 и CH3 иммуноглобулина. Выражение "функциональная часть" относится к областям CH2 и CH3, которые могут связывать рецептор Fc (например, FcγR; или FcRn, т.е. неонатальный рецептор Fc) и/или которые могут принимать участие в активации комплемента. Если области CH2 и CH3 содержат делеции, замены и/или вставки или другие модификации, которые не позволяют областям связывать любой рецептор Fc и также не позволяют активировать комплемент, то области CH2 и CH3 не являются функ-

циональными.

Fc-содержащие белки могут содержать модификации в иммуноглобулиновых доменах, включающие такие модификации, которые оказывают влияние на одну или более эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, которые влияют на связывание FcγR, связывание FcRn и по этой причине влияют на период полувыведения и/или активность CDC).

Антагонисты фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) включают небольшие молекулы, которые ингибируют стимулированные ФРЭС тирозинкиназы, включая, например, лапатиниб, сунитиниб, сорафениб, акситиниб и паксопаниб (Yadav, 2015 г.). Высокомолекулярные ингибиторы ФРЭС включают моноклональное антитело бевацизумаб, содержащий Fab-фрагменты ранибизумаб, ловушку афлиберцепт, ловушку конберцепт и пегилированный аптамер пегаптаниб.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения вторая молекула (известная также под названием "молекула, которая уменьшает растворимость" двухфазной системы) снижает растворимость первой молекулы (т.е. биотерапевтического или другого лекарственного средства или биомолекулы). Несмотря на то, что термин "растворимость", как правило, относится к присущему физическому свойству растворенного вещества в данном растворителе, которое зависит от таких переменных, как температура, давление и pH, в данном документе термин "растворимость" имеет более широкий смысл. Используемый в данном документе термин "растворимость" означает концентрацию растворенного вещества в растворителе. Таким образом, на растворимость влияет добавление или удаление других реагентов, таких как, в частности, соль, дополнительный растворитель и/или неионные макромолекулы или другие макромолекулы, которые служат для исключения растворителя и эффективного снижения количества растворителя, предусмотренного для растворения растворяемого вещества.

В варианте реализации изобретения термин "молекула, которая уменьшает растворимость" включает термин "неионная макромолекула" (известная также под названием "водорастворимый неионный полимер"). Эти молекулы действуют частично за счет исключения растворителя и уменьшения общего количества воды, предусмотренной для сольватации белка. Неионные макромолекулы включают, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), декстран, альгинат, пектинат, карбоксиметилцеллюлозу или крахмал, гидроксиметилцеллюлозу или крахмал, гидроксипропилцеллюлозу или крахмал, метилцеллюлозу или крахмал, полиакриловые и полиметакриловые кислоты, полиэтиленмин, полиакриламид, полиоксипиридин, поливинилпирролидон (ПВП), FICOLL®, PERCOLL® и т.п.

Понятие "полиэтиленгликоль" или "ПЭГ" относится к одной приводимой в качестве примера неионной макромолекуле, которая является пригодной в качестве молекулы, которая уменьшает растворимость биомолекулы. ПЭГ представляет собой полиэфирный полимер этиленоксида, который, как правило, используется в пищевых продуктах, медицине и косметике. ПЭГ серийно производится с разной молекулярной массой в диапазоне от 300 до 10000000 г/моль. В аспекте данного изобретения являются пригодными ПЭГ 20000, ПЭГ 8000 и ПЭГ 3350. ПЭГ, имеющий молекулярную массу 3350 г/моль (ПЭГ 3350), является предпочтительным для использования в данном изобретении. ПЭГ выпускается в различных геометриях, включая, в том числе, линейную, разветвленную (3-10 цепей, прикрепленных к центральному ядру), звездообразную (10-100 цепей, прикрепленных к центральному ядру) и гребенчатую (множество цепей, прикрепленных к основной цепи полимера).

"Декстран" представляет собой еще один неионный образец макромолекулы, который может быть пригоден в качестве молекулы, которая уменьшает растворимость биомолекулы. Декстран является глюкозаном с разветвленной цепью, который часто используется, в частности, в качестве расширителя объема. Он в целом признан безопасным и используется в других направлениях практического применения для стабилизации белков.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая молекула, в тех случаях, когда комбинируется со второй молекулой, существует в двух состояниях растворимости: (1) в растворе и (2) не в растворе. Термины "разжиженный", "растворенный", "растворимый", "солюбилизированный", "растворимая фракция", "растворимая часть", "растворимая фаза", "насыщенный раствор" относятся к части совокупности первой молекулы, которая находится в растворе. Термины "твердый", "осадок", "нерастворимая фракция", "нерастворимая часть", "нерастворяемая фракция", "нерастворимая", "нерастворимая фаза", каждый, относятся к части совокупности первой молекулы, которая не находится в растворе.

В одном аспекте открытой двухфазной системы уменьшение растворимости лекарственного средства с помощью ПЭГ повышает общую долговременную стабильность первой молекулы. Термин "стабильность" относится к сохранению приемлемой степени физической структуры (коллоидной, природной), химической структуры или биологической функции первой молекулы в течение продолжительного периода времени после депонирования в физиологически значимую среду, такую как растворимая фракция резервуарной камеры. Первая молекула может быть стабильной, даже если она не поддерживает 100% своей структуры или функции после хранения или депонирования в течение определенного периода времени. При определенных обстоятельствах, если около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% первых молекул имеют нативную конформацию, структуру или функцию, белок и лекарственная форма в растворимой фракции могут рассматриваться

как "стабильные".

Стабильность может быть измерена, в частности, путем определения процентного содержания нативной молекулы, которая остается в лекарственной форме после хранения или депонирования в течение определенного периода времени при определенной температуре. Процентное содержание нативной молекулы может быть определено с помощью, в частности, эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [SE-HPLC]), таким образом, что нативные средства не агрегируют и не деградируют. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере около 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% нативной формы первой молекулы может быть обнаружено в лекарственном средстве через определенное количество времени при определенной температуре или в физиологических условиях после депонирования (например, имплантации). Определенное количество времени, после которого измеряется стабильность, может составлять около 14 дней, около 28 дней, около 1 месяца, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 18, около 24 месяцев или более. Температура, при которой устройство, содержащее первую и вторую молекулы, может сохраняться при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от около -80°C до около 45°C, например, хранение при температуре около -80°C, около -30°C, около -20°C, около 0°C, около 4-8°C, около 5°C, около 25°C, около 35°C, около 37°C или при других физиологических температурах или около 45°C. Например, первая молекула может считаться стабильной, если через 3 месяца в физиологических условиях более чем 75%, 80%, 85% или 90% нативной молекулы обнаруживается в растворимой фракции с помощью SE-HPLC или другого эксклюзионного по размеру способа или способа определения размера. Понятие "физиологическая температура" включает температуру тела любого позвоночного. Например, физиологическая температура человека составляет около 37°C. В некоторых вариантах реализации изобретения физиологическая температура составляет от около 25 до около 45°C. В некоторых вариантах реализации изобретения физиологическая температура составляет около 25°C, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39, около 40, около 41, около 42, около 43, около 44 и около 45°C.

Стабильность может быть измерена, в частности, путем определения процентного содержания первой молекулы, такой как белок, который образует агрегат (т.е. высокомолекулярные соединения) в резервуарном устройстве в присутствии второй молекулы, такой как ПЭГ, после определенного периода времени при определенной температуре, при этом стабильность является обратно пропорциональной процентному содержанию высокомолекулярного соединения (BMM, HMW), которое образуется в растворимой фракции. Стабильность белка может быть измерена после его высвобождения из открытой двухфазной системы, где он находился в присутствии второй молекулы, такой как ПЭГ. Процентное содержание высокомолекулярных соединений BMM первой молекулы в растворимой фракции может быть определено с помощью, в частности, эксклюзионной хроматографии, как описано выше. Фармацевтическая лекарственная форма также может считаться стабильной, если через три месяца при физиологических условиях менее чем 15%, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% первой молекулы обнаруживается в форме BMM.

Стабильность может быть измерена, в частности, путем определения процентного содержания первой молекулы, такой как белок, который деградирует или иным образом обнаруживается как низкомолекулярное соединение (HMM, LMW) после высвобождения из открытой двухфазной системы, где он находился в присутствии второй молекулы, ПЭГ, через определенное количество времени при определенной температуре. Стабильность является обратно пропорциональной процентному содержанию LMW, которые образуются в растворимой фракции. Процентное содержание LMW первой молекулы в растворимой фракции может быть определено с помощью, в частности, эксклюзионной хроматографии, как описано выше. Фармацевтическая лекарственная форма также может считаться стабильной, если через три месяца при физиологических условиях менее чем 15%, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% первой молекулы обнаруживается в форме LMW.

В некоторых вариантах реализации изобретения открытая система с двухфазным лекарственным средством содержится внутри "резервуарного устройства". Термин "резервуарное устройство" охватывает любой контейнер, который содержит двухфазное лекарственное средство, частично изолирует двухфазное лекарственное средство от окружающей среды и обеспечивает возможность оттока растворимого лекарственного средства через порт с заранее определенной скоростью. Резервуарное устройство представляет собой открытую и регулируемую систему, которая содержит двухфазную систему. Закрытая двухфазная система может содержаться в другом контейнере, который не является резервуаром. Например, двухфазная система во флаконе, которая не контактирует с другим раствором, является закрытой системой в связи с тем, что растворимая молекула не может из нее диффундировать. Стабильность двухфазного лекарственного средства в течение продолжительного периода времени может быть большей в открытой системе, чем в закрытой системе.

В некоторых вариантах реализации изобретения двухфазная система содержит дополнительный ингредиент или вспомогательное вещество. "Вспомогательные вещества" включают различные вещества, которые используются для различных целей, включая буферизацию, солубилизацию, стабилизацию

и/или защиту лекарственного средства, а также поддержание или корректировку тоничности лекарственной формы. Защитные средства защищают от термического внешнего воздействия и/или физического внешнего воздействия, например от перемешивания. Буферы являются хорошо известными в данной области.

В некоторых вариантах реализации изобретения буфер включен в заявленную двухфазную лекарственную форму. В некоторых вариантах реализации изобретения двухфазная лекарственная форма содержит буфер в концентрации от около 1 до около 100 ммоль/л, от около 5 до около 50 ммоль/л или от около 10 до около 20 ммоль/л. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер включен в заявленную двухфазную лекарственную форму в концентрации от $5 \pm 0,75$ ммоль/л до $15 \pm 2,25$ ммоль/л; от $6 \pm 0,9$ ммоль/л до $14 \pm 2,1$ ммоль/л; от $7 \pm 1,05$ ммоль/л до $13 \pm 1,95$ ммоль/л; от $8 \pm 1,2$ ммоль/л до $12 \pm 1,8$ ммоль/л; от $9 \pm 1,35$ ммоль/л до $11 \pm 1,65$ ммоль/л; $10 \pm 1,5$ ммоль/л или около 10 ммоль/л. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер представляет собой гистидиновый, фосфатный, карбонатный, сукцинатный и/или ацетатный буфер.

В некоторых вариантах реализации изобретения буфер выбирают из химического вещества, способного буферизировать в пределах диапазона значений pH от около 3 до около 9, или в пределах диапазона значений pH от около 3,7 до около 8,0. Например, двухфазная лекарственная форма может иметь значение pH около 3,4, около 3,6, около 3,8, около 4,0, около 4,2, около 4,4, около 4,6, около 4,8, около 5,0, около 5,2, около 5,4, около 5,6, около 5,8, около 6,0, около 6,2, около 6,4, около 6,6, около 6,8, около 7,0, около 7,2, около 7,4, около 7,6, около 7,8 или около 8,0.

Буфер может представлять собой комбинацию отдельных буферов, таких как, например, комбинацию гистидинового и ацетатного (гистидин-ацетатный буфер). В одном варианте реализации изобретения буфер имеет диапазон буферизации от около 3,5 до около 6 или от около 3,7 до около 5,6, такой как, например, диапазон, забуференный ацетатом. В одном варианте реализации изобретения буфер имеет диапазон буферизации от около 5,5 до около 8,5 или от около 5,8 до около 8,0, такой как, например, диапазон, забуференный фосфатом. В одном варианте реализации изобретения буфер имеет диапазон буферизации от около 5,0 до около 8,0 или от около 5,5 до около 7,4, такой как, например, диапазон, забуференный гистидином.

Вспомогательные вещества содержат стабилизаторы. В контексте данного документа стабилизатор может быть добавлен в заявленную двухфазную лекарственную форму для стабилизации белка против агрегации или другого расщепления. Стабилизаторы, которые могут входить в состав заявленной двухфазной лекарственной формы, включают полиолы, сахара, соли (например, хлорид натрия), аминокислоты и т.п. В некоторых случаях стабилизатор может также действовать в качестве регулятора тоничности, который регулирует осмотическое давление двухфазной лекарственной формы в соответствии с осмотическим давлением физиологической среды, в которую депонируется двухфазная лекарственная форма. Например, хлорид натрия и сахароза действуют в качестве регулятора тоничности. Различные отдельные стабилизаторы могут быть использованы отдельно или в сочетании с одним или более другими стабилизаторами для оптимального влияния на стабилизирование или тоничность. Например, полиол может комбинироваться с сахаром, сахар с аминокислотой, полиол с аминокислотой, соль с сахаром, соль с аминокислотой, соль с полиолом и т.п.

Полиолы представляют собой органические молекулы с более чем одной гидроксильной группой (-ОН). Полиолы включают мономеры, а также полимеры. Сахарные спирты представляют собой подгруппу полиолов. Сахарные спирты, которые могут служить в качестве пригодных стабилизаторов, включают маннит, ксилит, сорбит, изомальт, эритрит, мальтит и глицерин. Другие мономерные полиолы включают этиленгликоль, пропиленгликоль и пентаэритрит. Полимерные полиолы могут быть полиэфирами или сложными полиэфирами полиольных субъединиц. Применимые примеры полимерных полиолов включают полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль и политетраметилэтиленгликоль.

Сахара, такие как трегалоза и сахароза, могут быть использованы в качестве стабилизаторов в заявленной двухфазной лекарственной форме. В некоторых вариантах реализации изобретения сахароза включена в заявленную двухфазную лекарственную форму в концентрации от около 0,5% (мас./об.) до около 25% (мас./об.). В одном варианте реализации данного изобретения сахароза включена в заявленную двухфазную лекарственную форму в концентрации около 0,5% (мас./об.), около 1% (мас./об.), около 1,5% (мас./об.), около 2% (мас./об.), около 2,5% (мас./об.), около 3% (мас./об.), около 3,5% (мас./об.), около 4% (мас./об.), около 4,5% (мас./об.), около 5% (мас./об.), около 6% (мас./об.), около 7% (мас./об.), около 8% (мас./об.), около 9% (мас./об.), около 10% (мас./об.), около 11% (мас./об.), около 12% (мас./об.), около 13% (мас./об.), около 14% (мас./об.), около 15% (мас./об.), около 16% (мас./об.), около 17% (мас./об.), около 18% (мас./об.), около 19% (мас./об.), около 20% (мас./об.), около 21% (мас./об.), около 22% (мас./об.), около 23% (мас./об.), около 24% (мас./об.) или около 25% (мас./об.).

В двухфазную лекарственную форму в качестве стабилизаторов или веществ, которые регулируют тоничность, также могут быть включены аминокислоты. Практически используемые аминокислоты включают глицин, аргинин, аланин и пролин. В некоторых вариантах реализации изобретения аргинин используют в качестве стабилизатора и ослабителя вязкости.

В некоторых случаях в качестве вспомогательного вещества в заявленной двухфазной лекарственной форме могут быть использованы одно или более поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активные вещества обеспечивают дополнительную стабильность за счет снижения белок-белкового гидрофобного взаимодействия и образования в результате высокомолекулярных веществ (т.е. агрегатов). Приводимые в качестве примера неионные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в заявленную двухфазную лекарственную форму, включают, например, алкилполиэтиленоксид, алкилполиглюкозиды (например, октилглюкозид и децилмалтозид), жирные спирты, такие как цетиловый спирт и олеиловый спирт, кокамид MEA, кокамид DEA и кокамид TEA. Конкретные неионные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в предварительно лиофилизированный водный раствор (или раствор после восстановления), включают, например, полиоксиэтиленсорбитановые эфиры (известные также под названием полисорбаты), такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полочсамеры, такие как полочсамер 188, полочсамер 407; полиэтиленполипропиленгликоль или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полисорбат 20 также известен как ТВИН-20, сорбитанмонолаурат и полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат. Полисорбат 80 также известен как ТВИН-80, моноолеат сорбитана и полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат.

В некоторых вариантах реализации изобретения полисорбат 20 или полисорбат 80 могут быть включены в заявленную двухфазную лекарственную форму в концентрации от около 0,001% (мас./об.) до около 0,5% (мас./об.). В некоторых вариантах реализации изобретения заявленная двухфазная лекарственная форма содержит около 0,001%; около 0,0015; около 0,002; около 0,0025; около 0,003; около 0,0035; около 0,004; около 0,0045; около 0,005; около 0,0055; около 0,006; около 0,0065; около 0,007; около 0,0075; около 0,008; около 0,0085; около 0,009; около 0,0095; около 0,01; около 0,015; около 0,016; около 0,017; около 0,018; около 0,019; около 0,02; около 0,021; около 0,022; около 0,023; около 0,024; около 0,025; около 0,026; около 0,027; около 0,028; около 0,029; около 0,03; около 0,031; около 0,032; около 0,033; около 0,034; около 0,035; около 0,036; около 0,037; около 0,038; около 0,039; около 0,04; около 0,041; около 0,042; около 0,043; около 0,044; около 0,045; около 0,046; около 0,047; около 0,048; около 0,049; около 0,05; около 0,051; около 0,052; около 0,053; около 0,054; около 0,055; около 0,056; около 0,057; около 0,058; около 0,059; около 0,06; около 0,061; около 0,062; около 0,063; около 0,064; около 0,065; около 0,066; около 0,067; около 0,068; около 0,069; около 0,07; около 0,071; около 0,072; около 0,073; около 0,074; около 0,075; около 0,076; около 0,077; около 0,078; около 0,079; около 0,08; около 0,081; около 0,082; около 0,083; около 0,084; около 0,085; около 0,086; около 0,087; около 0,088; около 0,089; около 0,09; около 0,091; около 0,092; около 0,093; около 0,094; около 0,095; около 0,096; около 0,097; около 0,098; около 0,099; около 0,10; около 0,15; около 0,20; около 0,25; около 0,30; около 0,35; около 0,40; около 0,45 или около 0,50% полисорбата 20 или полисорбата 80.

Варианты реализации изобретения.

В одном аспекте данного изобретения представлена двухфазная фармацевтическая лекарственная форма, содержащая биомолекулу и молекулу, которая ограничивает растворимость биомолекулы. Биомолекула представлена в качестве двухфазной системы в лекарственной форме, при этом часть биомолекулы находится в растворимой форме (растворенной), а другая часть находится в нерастворимой форме (в виде осадка). В одном варианте реализации изобретения лекарственная форма может представлять собой закрытую систему, в которой растворимая биомолекула не имеет доступа к внешней водной среде или открытую систему, в которой растворимая биомолекула имеет доступ к среде с меньшей концентрацией биомолекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения открытой системы композиция содержится в резервуарной камере, которая помещается в резервуарное устройство и содержит пористую структуру. Резервуарное устройство является открытым для окружающей среды через полупроницаемую мембрану или другую пористую структуру и может быть имплантировано в организм пациента для доставки терапевтически эффективного количества биомолекулы к терапевтической целевой области у пациента.

В одном аспекте данного изобретения представлена двухфазная фармацевтическая лекарственная форма, которая содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ) в концентрации по меньшей мере 25 мг/мл, белок в концентрации по меньшей мере 100 мг/мл, растворимую фазу, содержащую менее чем 50% от общего количества белка и количества ПЭГ, и нерастворимую фазу, содержащую нерастворимый белок. Белок растворимой фазы является стабильным в течение по меньшей мере 30 дней при физиологической температуре и имеет доступ через полупроницаемую мембрану или другую пористую структуру к среде с меньшей концентрацией белка (т.е. к открытой системе).

В некоторых вариантах реализации изобретения двухфазная фармацевтическая лекарственная форма вводится пациенту или иным образом помещается во внешнюю окружающую среду, в которой в течение продолжительного периода времени растворимый белок диффундирует вниз по градиенту концентрации через пористую структуру в окружающую среду. Вследствие этого общее количество белка в заявленной двухфазной фармацевтической лекарственной форме в течение продолжительного периода времени уменьшается и в конечном итоге исчерпывается. По этой причине в некоторых вариантах реализации изобретения количество белка в лекарственной форме является меньшим, чем исходное количество

во в концентрации 100 мг/мл или более, в зависимости от того, насколько длительный период времени лекарственная форма имеет доступ к окружающей среде с более низкой концентрацией белка. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация общего количества белка в заявленной двухфазной фармацевтической лекарственной форме будет составлять от 0,1 до 500 мг/мл белка в течение всего срока службы устройства в соответствии с данным изобретением, которое используется у пациента.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок в заявленной двухфазной фармацевтической лекарственной форме имеет молекулярную массу от около 10 кДа (т.е. 10000 дальтон или 10000 г/моль) до около 200 кДа, от около 25 до около 160 кДа, от около 10 до около 15 кДа, от около 15 до около 20 кДа, от около 20 до около 25 кДа, от около 25 до около 30 кДа, от около 30 до около 35 кДа, от около 35 до около 40 кДа, от около 40 до около 45 кДа, от около 45 до около 50 кДа, от около 50 до около 55 кДа, от около 55 до около 60 кДа, от около 60 до около 65 кДа, от около 65 до около 70 кДа, от около 75 до около 80 кДа, от около 80 до около 85 кДа, от около 85 до около 90 кДа, от около 90 до около 95 кДа, от около 95 до около 100 кДа, от около 100 до около 105 кДа, от около 105 до около 110 кДа, от около 110 до около 115 кДа, от около 115 до около 120 кДа, от около 120 до около 125 кДа, от около 125 до около 130 кДа, от около 130 до около 135 кДа, от около 135 до около 140 кДа, от около 140 до около 145 кДа, от около 145 до около 150 кДа, от около 150 до около 155 кДа, от около 155 до около 160 кДа, от около 160 до около 165 кДа, от около 165 до около 170 кДа, от около 170 до около 175 кДа, от около 175 до около 180 кДа, от около 180 до около 185 кДа, от около 185 до около 190 кДа, от около 190 до около 195 кДа или от около 195 до около 200 кДа. В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой нанотело или белок аналогичного размера, имеющий молекулярную массу около 12-15 кДа. В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой фрагмент антитела, такой как Fab или белок аналогичного размера, имеющий молекулярную массу около 50 кДа. В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или белок аналогичного размера, имеющий молекулярную массу около 25 кДа. В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой рецептор-Fc-слитый белок или белок аналогичного размера, имеющий молекулярную массу от около 90 до 110 кДа. В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой антитело или белок аналогичного размера, имеющий молекулярную массу от около 150 до около 160 кДа.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой антагонист ФРЭС, такой как афлиберцепт, который является молекулой-ловушкой, ранибизумаб и бевацизумаб, которые являются антителами. В некоторых вариантах реализации изобретения биомолекула является антагонистом тромбоцитарного фактора роста (ТФР), который может представлять собой, например, малую молекулу - ингибитор, растворимый рецептор, молекулу-ловушку или другой белок слияния, антитело анти-ТФР, РНК или аптамер. В некоторых вариантах реализации изобретения биомолекула является антагонистом ангиопоэтина-2, который может представлять собой, например, малую молекулу - ингибитор, растворимый рецептор, молекулу-ловушку или другой белок слияния, антитело против ангиопоэтина-2, РНК или аптамер.

В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация белка в заявленной двухфазной фармацевтической лекарственной форме субъекта составляет от около 25 до 1400 мг/мл или более. В некоторых вариантах реализации изобретения сухой белок (например, лиофилизированный или высушенный распылением) объединяют с ПЭГ. Общее количество белка, которое может вписываться в заданный объем, зависит от плотности твердого белка и количества ПЭГ и других вспомогательных веществ, включенных вместе с белком в смесь. Заявка на патент США № 2013/0324942 включена посредством ссылки для описания доз и концентраций лекарственных средств в устройстве. Объем, доступный в устройстве, в определенной степени будет ограничивать концентрацию белка, который может быть помещен в устройство. Верхняя граница будет определяться плотностью белкового порошка и ограничениями в том, сколько можно упаковать в объем резервуара (который будет зависеть от белковой лекарственной формы). Патент США № 8623395 включен в данном документе посредством ссылки для описания объемов устройства и содержания белка, такого как, например, антагонисты ФРЭС, включая афлиберцепт.

В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация белка может превышать 1400 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация белка или другой биомолекулы составляет около 25 мг/мл, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 35, 40, около 45, 50, около 55, 60, около 65, 70, около 75, около 80, около 85, 90, около 95, 100, 110, около 120, около 130, около 140, около 150, около 160, около 170, около 180, около 190, около 200, около 210, около 220, около 230, около 240, около 250, около 260, около 270, около 280, около 290, около 300, около 310, около 320, около 330, около 340, около 350, около 360, около 370, около 380, около 390, около 400, около 410, около 420, около 430, около 440, около 450, около 460, около 470, около 480, около 490, около 500, около 510, около 520, около 530, около 540, около 550, около 560, около 570, около 580, около 590, около 600, около 610, около 620, около 630, около 640, около 650, около 660, около 670, около 680, около 690, около 700, около 710, около 720, около 730, около 740, около 750, около 760, около 770, около 780, около 790, около 800, около 810, около 820, около 830, около 840, около 850, около 860, около 870, около 880, около 890,

около 900, около 910, около 920, около 930, около 940, около 950, около 960, около 970, около 980, около 990, около 1000, около 1025, около 1050, около 1075, около 1100, около 1125, около 1150, около 1175, около 1200, около 1225, около 1250, около 1275, около 1300, около 1325, около 1350, около 1375, около 1400 или около 1425 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения общая концентрация белка является большей чем 1400 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация белка в растворимой фазе заявленной двухфазной фармацевтической лекарственной формы составляет от около 0,05 до около 100 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация белка или другой биомолекулы в растворимой фазе составляет около 0,05 мг/мл, около 0,06, около 0,07, около 0,08, около 0,09, около 0,1, около 0,5, около 1, около 1,5, около 2, около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5, около 5, около 5,5, около 6, около 6,5, около 7, около 7,5, около 8, около 8,5, около 9, около 9,5, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39, около 40, около 41, около 42, около 43, около 44, около 45, около 46, около 47, около 48, около 49, около 50, около 51, около 52, около 53, около 54, около 55, около 56, около 57, около 58, около 59, около 60, около 61, около 62, около 63, около 64, около 65, около 66, около 67, около 68, около 69, около 70, около 71, около 72, около 73, около 74, около 75, около 76, около 77, около 78, около 79, около 80, около 81, около 82, около 83, около 84, около 85, около 86, около 87, около 88, около 89, около 90, около 91, около 92, около 93, около 94, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или около 100 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация белка или другой биомолекулы в растворимой фазе может составлять более чем 100 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения двухфазной лекарственной формы доля белка в растворимой фазе относительно общего количества белка в двухфазной лекарственной форме (как в растворимой, так и в нерастворимой фазах) составляет менее чем 50%. В некоторых вариантах реализации изобретения доля белка в растворимой фазе по отношению к общему количеству белка в двухфазной лекарственной форме составляет около 50%, около 49, около 48, около 47, около 46, около 45, около 44, около 43, около 42, около 41, около 40, около 39, около 38, около 37, около 36, около 35, около 34, около 33, около 32, около 31, около 30, около 29, около 28, около 27, около 26, около 25, около 24, около 23, около 22, около 21, около 20, около 19, около 18, около 17, около 16, около 15, около 14, около 13, около 12, около 11, около 10, около 9, около 8, около 7, около 6, около 5, около 4, около 3, около 2, около 1, от около 0,1 до около 1% или менее чем 0,1%.

В некоторых вариантах реализации изобретения ПЭГ содержится в композиции в концентрации от около 25 до около 150 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация ПЭГ в композиции составляет около 25 мг/мл, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90, около 95, около 100, около 105, около 110, около 115, около 120, около 125, около 130, около 135, около 140, около 145 или около 150 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения сахара включена в заявленную двухфазную лекарственную форму в концентрации от около 0,5% (мас./об.) до около 25% (мас./об.). В одном варианте реализации данного изобретения сахара включена в заявленную двухфазную лекарственную форму в концентрации около 0,5% (мас./об.), около 1% (мас./об.), около 1,5% (мас./об.), около 2% (мас./об.), около 2,5% (мас./об.), около 3% (мас./об.), около 3,5% (мас./об.), около 4% (мас./об.), около 4,5% (мас./об.), около 5% (мас./об.), около 6% (мас./об.), около 7% (мас./об.), около 8% (мас./об.), около 9% (мас./об.), около 10% (мас./об.), около 11% (мас./об.), около 12% (мас./об.), около 13% (мас./об.), около 14% (мас./об.), около 15% (мас./об.), около 16% (мас./об.), около 17% (мас./об.), около 18% (мас./об.), около 19% (мас./об.), около 20% (мас./об.), около 21% (мас./об.), около 22% (мас./об.), около 23% (мас./об.), около 24% (мас./об.) или около 25% (мас./об.).

В еще одном аспекте данного изобретения представлено устройство доставки лекарственного средства для замедленной доставки лекарственного средства, которое остается стабильным в течение продолжительного периода времени при физиологической температуре. Заявленное устройство доставки лекарственного средства содержит заявленную стабильную двухфазную фармацевтическую лекарственную форму, резервуарную камеру, которая содержит стабильную двухфазную фармацевтическую лекарственную форму, корпус, который охватывает резервуарную камеру, и полупроницаемую мембрану или другую пористую структуру в корпусе, которая обеспечивает возможность доступа белка в растворимой фазе к окружающей среде с меньшей концентрацией белка.

В одном варианте реализации изобретения заявленное устройство доставки лекарственного средства имеет объем от около 5 до около 50 мкл, от около 10 до около 25 мкл, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29, около 30, около 31, около 32, около 33, около 34, около 35, около 36, около 37, около 38, около 39, около 40, около 41, около 42, около 43, около 44, около 45, около 46, около 47, около 48, около 49 или около 50 мкл.

В одном варианте реализации изобретения заявленная резервуарная камера содержит от около 0,1

до около 10 мг заявленного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения резервуарная камера содержит общее количество белка около 0,1 мг, около 0,2, около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9 или около 10 мг.

В некоторых вариантах реализации изобретения резервуарная камера имеет такой размер, который позволяет вводить устройство в стекловидное тело глазного яблока или другие соответствующие ткани.

В некоторых вариантах реализации изобретения резервуарная камера имеет такой размер, который позволяет подкожное размещение устройства у пациента.

В одном варианте реализации изобретения заявленное устройство доставки лекарственного средства имеет объем от около 25 до около 150 мкл, около 25, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90, около 95, около 100, около 105, около 110, около 115, около 120, около 125, около 130, около 135, около 140, около 145 или около 150 мкл.

В одном варианте реализации изобретения заявленная резервуарная камера содержит от около 25 до около 180 мг заявленного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения резервуарная камера содержит общее количество белка около 25 мг, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65, около 70, около 75, около 80, около 85, около 90, около 95, около 100, около 105, около 110, около 115, около 120, около 125, около 130, около 135, около 140, около 145, около 150, около 155, около 160, около 165, около 170, около 175 или около 180 мг.

Примеры

Данное изобретение иллюстрируется следующими примерами. Изобретение не ограничивается конкретными деталями этих примеров.

Пример 1. Высвобождение и стабильность белка в двухфазной смеси белка и ПЭГ.

Были разработаны лекарственные формы афлиберцепта, содержащие белок в концентрации от 100 до 300 мг/мл, который оставался стабильным при температуре 37°C в течение >3 месяцев. Белок афлиберцепт с различной общей концентрацией в водном растворе был соединен с полиэтиленгликолем, который имеет молекулярную массу 3350 г на моль (ПЭГ 3350) с различной концентрацией в растворе. В одном эксперименте афлиберцепт в концентрации от 5 до 50 мг/мл был смешан с ПЭГ 3350 в концентрации от 45 до 150 мг/мл. Растворимость комбинаций жидкого афлиберцепта (окрашенные круги) была построена на графике в зависимости от концентрации ПЭГ 3350 (фиг. 10). Десятичный логарифм растворимости жидкого афлиберцепта был построен на графике в зависимости от концентрации ПЭГ 3350 (окрашенные ромбы, фиг. 11). Все концентрации афлиберцепта генерировали, по существу, такую же самую кривую растворимости, что и на фиг. 10.

В другом эксперименте лиофилизированный афлиберцепт смешивали с сухим ПЭГ 3350 (с сахарозой) и затем восстанавливали для достижения экспериментальной концентрации ПЭГ 3350. Результаты проиллюстрированы на фиг. 10 (белые круги) и фиг. 11 (окрашенные квадраты), которые показывают уменьшение растворимости афлиберцепта с увеличением концентрации ПЭГ. Разница в наклоне (т.е. растворимость) между восстановленным твердым белком (окрашенные квадраты на фиг. 11) и исходным жидким белком (окрашенные ромбы на фиг. 11), вероятно, обусловлена разницей в содержании сахарозы и не обусловлена физическим состоянием исходного белка, которое является твердым или жидким. Твердый афлиберцепт содержал сахарозу, в то время как в жидком афлиберцепте ее не было. Концентрация 30 мг/мл ПЭГ 3350 на растворимость афлиберцепта не влияет (например, это не менее 45 мг/мл). Была определена концентрация растворимого афлиберцепта, а также доля общего афлиберцепта, которая сохраняет свою нативную конформацию. Чистота афлиберцепта оставалась на уровне более чем 95% во всех растворах (жидком и твердом восстановленном) с концентрацией ПЭГ 3350 от 30 до 150 мг/мл, что определялось с помощью сверхвысокоэффективной эксклюзионной хроматографии (UP-SEC).

Для того чтобы проверить, возможно ли осажденный афлиберцепт (эксперимент с жидкой лекарственной формой) или исключенный из раствора афлиберцепт (эксперимент с восстановлением), впоследствии солиubilизировать с сохранением нативной конформации, смесь афлиберцепт/ПЭГ разбавляли от концентрации 150 мг/мл ПЭГ до 30 мг/мл ПЭГ, которая, как заранее было определено, не ограничивает растворимость афлиберцепта. В рамках данного эксперимента, по существу, весь афлиберцепт был восстановлен, причем более чем 98% имели нативную конформацию (табл. 2).

Таблица 2

СВОДНЫЕ ДАННЫЕ:	% ВММ	% НАТИВНЫЙ	%НММ (% НИЗКОЙ МОЛЕК. МАСС.)	% ВОССТАНОВ- ЛЕНИЕ
ЖИДКОСТЬ	1,14	98,86	0	103
ВОССТАНОВЛЕННЫЙ	1,34	98,66	0	109

Пример 2. Резервуарное устройство с контролируемым высвобождением.

Резервуарное устройство для контролируемого высвобождения белка было изготовлено из проницаемого тонкопленочного поликапролактона (PCL). Корпус устройства содержит непористый PCL, который является непроницаемым для антитела или димера рецептор Fc-слияния, и полосу пористого PCL, содержащую либо наноканалы, либо микропоры. Пористые мембраны были изготовлены либо путем шаблонирования с образованием каналов, либо с использованием ПЭГ в виде порообразующего агента с образованием извилистых пор.

Способы изготовления пор в мембранах описаны у Bernards и др., "Nanostructured thin film polymer devices for constant-rate protein delivery", 12 NanoLett 5355-61 (2012 г.); He и др., "Use of a nanoporous bio-degradable miniature device to regulate cytokine release for cancer treatment", 151(3) J. Control Release 239-45 (2011 г.); Gin и Noble, "Designing the Next Generation of Chemical Separation Membranes", 332 Science 674-676 (2011 г.); Wirtz и др., "Transport properties of template synthesized gold and carbon nanotube membranes", 1(3,4) Int. J. Nanoscience 255 (2002 г.); и Li и др., "Preparation and characterization of chitosan nanopores membranes for the transport of drugs", 420(2) Int. J. Pharm. 371-7 (2011 г.).

Наноканальная пористая мембрана PCL ("nanoPCL") содержит поры диаметром около 20 нм и отлита толщиной около 500 нм. Мембрану nanoPCL наносят на микропористый слой основы для структурной целостности. Микропористая мембрана ("mpPCL") содержит поры, имеющие диаметр поперечного сечения около 1-2 мкм с размером сообщающихся пор, установленным <1 мкм. См. Bernards, 2012 г.

Резервуарное устройство с тонкой пленкой mpPCL было изготовлено путем лития как непористой пленки PCL, так и пористой пленки PCL. Затем полосу пористой пленки соединяли между двумя секциями пористой пленки путем термической сварки стыков. Полученную композитную пленку (т.е. непористую пленку, содержащую пористую полосу) скатывали в цилиндр (трубу) с использованием шаблона в форме стержня и подвергали термической сварке на одном конце, оставляя другой конец открытым. Лекарственная субстанция (снизу) была загружена в открытый конец, а затем открытый конец подвергали термической сварке. PCL-мембрану подвергали термической сварке с использованием электрически нагретой проволоки NiChrome, контролируемой источником питания, встроенным внутри или посреди полидиметилсилоксана.

В одном устройстве 3-4 мг белка афлиберцепт загружали в трубку PCL диаметром около 1-1,5 мм и длиной около 8-10 мм.

Были исследованы параметры, влияющие на скорость высвобождения белка из устройства. Эти параметры включали мембранную конструкцию (например, nanoPCL по сравнению с mpPCL), толщину мембраны (28 мкм, 63 мкм и 106 мкм) и пористую площадь поверхности (23 мм² по сравнению с 60 мм²). Скорости высвобождения в течение 50 дней были приблизительно на порядок выше для конструкции mpPCL по сравнению с конструкцией nanoPCL. Кроме того, на скорости высвобождения значительно сказывалась площадь поверхности пористого "окна". Устройство, имеющее пористую структуру 60 мм² по площади и загруженное с 3 мг афлиберцепта, высвобождало около 105 мкг афлиберцепта в день. Устройство, имеющее пористую структуру 23 мм² по площади и загруженное с 3 мг белка афлиберцепта, высвобождало около 42 мкг афлиберцепта в день.

В то время как площадь поверхности окна повлияла на скорость высвобождения, толщина мембраны такого влияния не оказывала. А значит из этого следует, что изменяя площадь поверхности пористой структуры можно контролировать скорость высвобождения белка независимо от размера устройства. В этом примере ограничение растворимости афлиберцепта до 10 мг/мл поддерживало постоянную концентрацию в резервуаре, позволяя контролировать скорость высвобождения белка путем манипулирования с пористой областью.

Пример 3. Высвобождение белка из резервуарного устройства.

Скорость высвобождения белка из резервуарного устройства PCL зависит от концентрации растворимого белка и площади поверхности пористой структуры. Устройства PCL были загружены двухфазной комбинацией ПЭГ 3350/афлиберцепт и подвергались воздействию водной среды. Высвобожденный из устройства афлиберцепт был измерен в динамике по времени.

В одном эксперименте концентрация афлиберцепта в растворимой фазе колебалась от около 5 до около 45 мг/мл в зависимости от концентрации ПЭГ 3350. Площадь поверхности пористой структуры поддерживалась постоянной около 23 мм². В рамках данного изобретения в тех случаях, когда концентрация афлиберцепта в растворимой фазе составляла около 6 мг/мл, скорость высвобождения составляла около 0,32 мкг/день-мм². В тех случаях, когда концентрация афлиберцепта в растворимой фазе составляла около 46 мг/мл, скорость высвобождения составляла около 3,3 мкг/день-мм² (фиг. 12).

В другом эксперименте концентрация афлиберцепта в растворимой фазе поддерживалась постоянной около 7 мг/мл с концентрацией 70 мг/мл ПЭГ 3350; а площадь поверхности пористой структуры варьировалась от около 13 до около 45 мм². В рамках данного изобретения в тех случаях, когда площадь поверхности пористого окна составляла около 13 мм², белок высвобождался со скоростью около 0,49 мкг/день на мг/мл. В тех случаях, когда площадь поверхности пористого окна составляла около 45 мм², белок высвобождался со скоростью около 4,9 мкг/день на мг/мл (фиг. 13).

Стабильность и скорость высвобождения растворимого афлиберцепта из двухфазной смеси афлиберцепта в устройстве PCL оценивали в течение продолжительного периода времени при температуре

37°C в буферном физиологическом изотоническом растворе. PCL-устройства имели площадь пористой структуры от около 30 до 45 мм². Каждое устройство было загружено афлиберцептом в количестве от около 2,7 до 3,7 мг. В одном эксперименте концентрация ПЭГ 3350 составляла около 100 мг/мл, а концентрация афлиберцепта в растворимой фазе составляла около 2 мг/мл (фиг. 14А).

В другом эксперименте концентрация ПЭГ 3350 составляла около 70 мг/мл, а концентрация афлиберцепта в растворимой фазе составляла около 7 мг/мл (фиг. 14В). Через 35 дней в модельных физиологических условиях не наблюдалась значительная разница между скоростями высвобождения в резервуарах с концентрациями 70 мг/мл ПЭГ и 100 мг/мл ПЭГ. Средняя скорость высвобождения составила около 40±10 мкг/день в обеих сериях экспериментов (фиг. 15А и 15В).

В другом эксперименте концентрация ПЭГ 3350 составляла 80±20 мг/мл, а общая концентрация (растворимая и нерастворимая) афлиберцепта составляла от около 60 до около 210 мг/мл. Скорость высвобождения растворимого афлиберцепта из устройства составляла от около 0,03 до около 0,055 мг в день (табл. 3). Стабильность растворимого афлиберцепта, высвобождаемого из устройства, в динамике по времени оценивали путем количественного определения относительного количества мономера афлиберцепта, оставшегося в каждом временном образце. Относительное количество мономера афлиберцепта представлено в виде процента (%) чистоты на фиг. 15. Мономер был определен количественно с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. Процент чистоты афлиберцепта, высвобождаемого из устройства, содержащего ПЭГ 3350 (80±20 мг/мл), сравнивался с процентом чистоты афлиберцепта, высвобождаемого из устройства, содержащего только сахарозу и не содержащего ПЭГ. Около 85% афлиберцепта, высвобожденного из устройства в течение 61 дня, оставалось мономерным. Результаты проиллюстрированы на фиг. 15.

Таблица 3

Загрузка ПЭГ (мг)	Загрузка лекарственного средства (мг)	Площадь устройства (мм ²)	Объем гидратации (мл)	Площадь пористой структуры (мм ²) мг/мл ПЭГ	ПЭГ мг/мл	Лекарственное средство мг/мл	Высвобождение лекарственного средства мг/сут.
1, 2	3, 7	66	0, 018	33	67	206	0, 032
2, 9	3, 2	90	0, 042	45	69	76	0, 045
2, 9	2, 8	80	0, 046	40	63	61,	0, 031
4	3, 0	75	0, 040	38	99	74	0, 055
3, 3	2, 9	82	0, 032	41	104	91	0, 038

Пример 4. Двухфазная лекарственная форма, содержащая наномикропористое устройство.

Отдельный фрагмент микропористой или нанопористой пленки PCL был соединен между двумя частями непористой пленки PCL с использованием термической сварки. Термическая сварка осуществлялась путем совмещения пленки над никель-хромовой проволокой, встроенной между двумя пластинами из полидиметилсилоксана (PDMS). Проволока нагревалась путем пропускания тока через проволоку. Затем пленку наматывали вокруг цилиндрической формы, диаметр которой был выбран на основе размеров целевого устройства. Затем пленку подвергали тепловой сварке вдоль продольной оси цилиндра и на одном конце цилиндра для создания полого цилиндра с одним открытым концом. Лиофилизированный белок был спрессован в цилиндрическую пеллету и загружен в резервуар через открытый конец. ПЭГ 3350 был также пеллетирован и загружен через открытый конец цилиндра.

Для определения загруженной массы устройство взвешивалось перед каждым этапом загрузки и после него. Затем устройство было загерметизировано вдоль открытого конца с использованием того же способа термической сварки. Загрузка ПЭГ 3350 была рассчитана на основе загруженной массы и объема гидратации, которая была определена путем вычисления разницы в массе устройства до гидратации и после нее.

Загруженные устройства были инкубированы в растворе, подобном сбалансированному солевому раствору (BSS-подобном) при значении pH 7,2 при температуре 37°C. В каждой точке по времени устройство удаляли из BSS-подобной среды, а затем помещали в свежую аликвоту BSS-подобной среды и возвращали в инкубацию. Среда с высвобождением, из которой было удалено устройство, была сохранена для анализа. В каждой точке по времени образцы анализировали с помощью UP-SEC (сверхвысокоэффективной эксклюзионной хроматографии) для количественного определения высвобожденного количества белка и % чистоты белка. Процент чистоты (%) высвобожденного белка проиллюстрирован на фиг. 15. Скорость высвобождения белка коррелирует непосредственно с концентрацией растворимого белка (фиг. 12).

При увеличении концентрации ПЭГ растворимость белка снижалась, а стабильность белка возрас-

тала до минимальной растворимой концентрации около 0,05 мг/мл. Посредством ограничения растворимости белка в резервуаре устройства ПЭГ ограничивала движущую силу диффузии, т.е. снижение концентрации белка в растворимой фазе в резервуаре уменьшало разницу концентраций белка между физиологической средой и лекарственной формой и уменьшало скорость высвобождения белка из резервуара устройства. Посредством ограничения растворимости ПЭГ также поддерживал постоянную концентрацию белка в резервуаре устройства до тех пор, пока общее количество оставшегося белка не стало меньше предела растворимости для белка.

Пример 5. Высвобождение рецептор-Fc-слитого белка *in vivo*.

Микропористые устройства PCL, загруженные ПЭГ и около 1,6 мг двухфазного афлиберцепта, были имплантированы интравитреально у африканских зеленых обезьян (группа 2). Контрольные обезьяны получили микропористые устройства PCL, не содержащие афлиберцепт (группа 1). Образцы тканей были собраны из контрольной группы (группа 1) и экспериментальной группы (группа 2) в разные дни после имплантации. Количество афлиберцепта в каждом образце определяли с использованием ELISA (ферментного иммуносорбентного анализа), с ФРЭС в качестве молекулы захвата.

В образцах плазмы, собранных у животных, которые получили устройство без лекарственного средства (группа 1), или в исходных образцах плазмы у животных, которые впоследствии получили устройство, загруженное афлиберцептом (группа 2), не было обнаружено свободного или связанного афлиберцепта. Свободный афлиберцепт был обнаружен по меньшей мере в одном образце плазмы, собранном у животного группы 2. Связанный афлиберцепт был обнаружен в образцах плазмы, собранных у трех из четырех животных группы 2, показывающих, что активный белок высвобождается из устройства и способен связываться с эндогенным ФРЭС в целевых тканях.

Свободный афлиберцепт был обнаружен в образцах внутриглазной жидкости, собранных у всех четырех животных в группе 2. В стекловидном теле был обнаружен связанный афлиберцепт по меньшей мере у одного из животных в группе 2, а свободный афлиберцепт был обнаружен в образцах сосудистой оболочки глазного яблока и сетчатки по меньшей мере одного животного в группе 2. Свободный афлиберцепт не был обнаружен в образцах внутриглазной жидкости, сосудистой оболочки глазного яблока, сетчатки или стекловидного тела, собранных у животных в группе 1.

Эти результаты показывают, что афлиберцепт высвобождается *in vivo* в глазном яблоке и перемещается в целевую среду из микропористого устройства с двухфазным афлиберцептом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма, содержащая от 25 до 150 мг/мл полиэтиленгликоля 3350 (ПЭГ 3350); от 100 до 1400 мг/мл белка VEGF-Trap, где менее 50% белка присутствует в жидкой фазе с ПЭГ, и остаток белка присутствует в твердой фазе в равновесии с жидкой фазой, где твердая фаза исключена из жидкой фазы с помощью ПЭГ, и полупроницаемую мембрану, где полупроницаемая мембрана окружает жидкую фазу и предпочтительно сохраняет ПЭГ, позволяя белку диффундировать через мембрану, где жидкая фаза имеет доступ к окружающей среде с более низкой концентрацией белка через полупроницаемую мембрану.
2. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.1, отличающаяся тем, что концентрация белка составляет от 100 до 500 мг/мл.
3. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.1, отличающаяся тем, что указанная жидкая фаза содержит указанный белок в концентрации от 0,05 до 50 мг/мл.
4. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.1, отличающаяся тем, что указанный белок имеет молекулярную массу от 25 до 160 кДа.
5. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.1, отличающаяся тем, что указанный белок в жидкой фазе является стабильным в течение по меньшей мере 60 дней при физиологической температуре.
6. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.1, отличающаяся тем, что по меньшей мере 85% указанного белка в жидкой фазе сохраняет нативную молекулярную массу в течение 60 дней при физиологической температуре, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии.
7. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.1, отличающаяся тем, что указанный белок в жидкой фазе является более стабильным, чем эквивалентная концентрация жидкой фазы без ПЭГ или в закрытой двухфазной системе.
8. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.1, отличающаяся тем, что указанная окружающая среда является физиологической окружающей средой.
9. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.1, в которой VEGF-Trap представляет собой афлиберцепт.
10. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма, при этом, что указанная двухфазная фармацевтическая лекарственная форма содержит:

а) полиэтиленгликоль 3350 (ПЭГ 3350) в концентрации, которая ограничивает растворимость белка до менее чем 50 мг/мл и более чем 0,5 мг/мл;

б) от 100 до 1400 мг/мл белка VEGF-Трап, где менее 50% белка VEGF-Трап присутствует в жидкой фазе с ПЭГ, а остаток белка присутствует в твердой фазе в равновесии с жидкой фазой, и

с) полупроницаемую мембрану, окружающую жидкую фазу;

где указанный растворимый белок может диффундировать через полупроницаемую мембрану в физиологическую систему и ПЭГ преимущественно сохраняется в мембране.

11. Лекарственная форма по п.10, отличающаяся тем, что указанный ПЭГ является полностью растворимым, находится только в жидкой фазе и находится в меньшей концентрации в указанной жидкой фазе, чем указанный белок в указанной твердой фазе.

12. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.10, в которой VEGF-Трап представляет собой афлиберцепт.

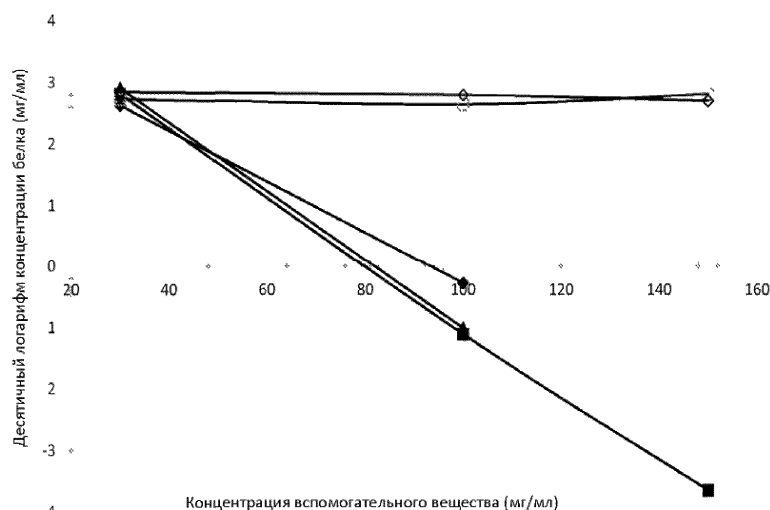
13. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма для применения при лечении пациента, нуждающегося в входящем в состав лекарственном средстве, при этом указанная двухфазная фармацевтическая лекарственная форма содержит:

а) от 25 до 150 мг/мл полиэтиленгликоля 3350 (ПЭГ 3350);

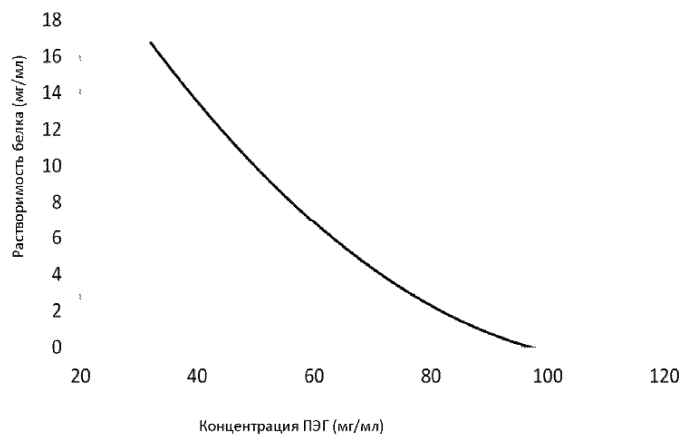
б) от 100 до 1400 мг/мл указанного входящего в состав лекарственного средства, где менее 50 мг/мл входящего в состав лекарственного средства присутствует в жидкой фазе с ПЭГ, а остальное входящее в состав лекарственное средство присутствует в твердой фазе в равновесии с жидкой фазой;

при этом указанное входящее в состав лекарственное средство представляет собой белок VEGF-Трап, и указанная жидкая фаза имеет доступ через пористую структуру к окружающей среде в организме указанного пациента с более низкой концентрацией указанного белка.

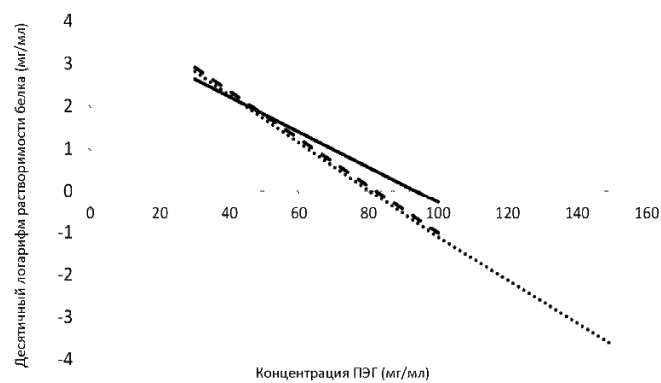
14. Двухфазная фармацевтическая лекарственная форма по п.13, в которой VEGF-Трап представляет собой афлиберцепт.



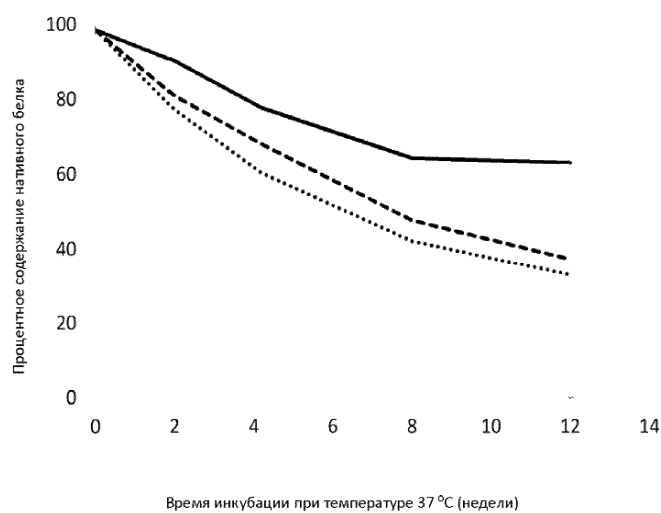
Фиг. 1



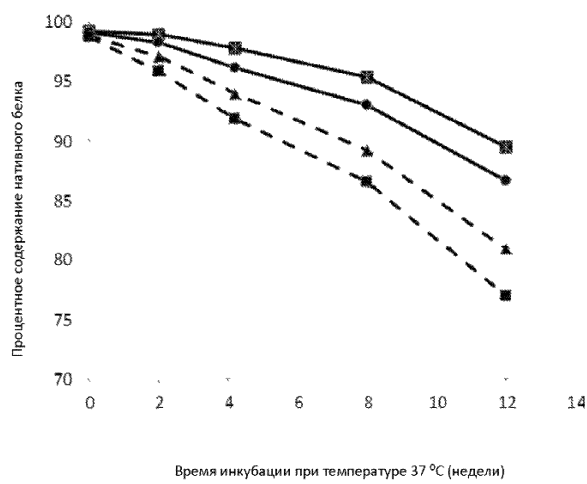
Фиг. 2



Фиг. 3

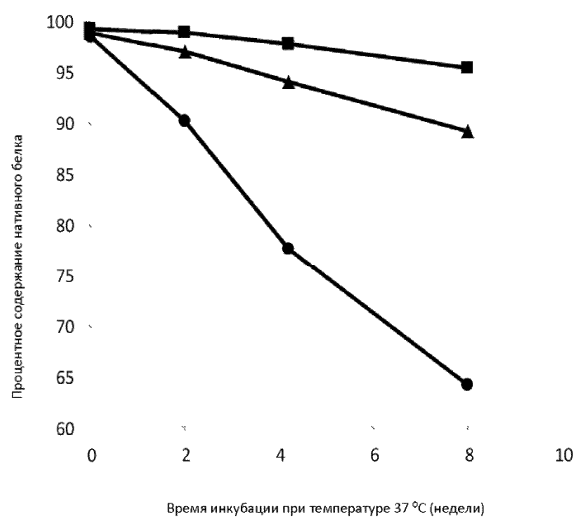


Фиг. 4

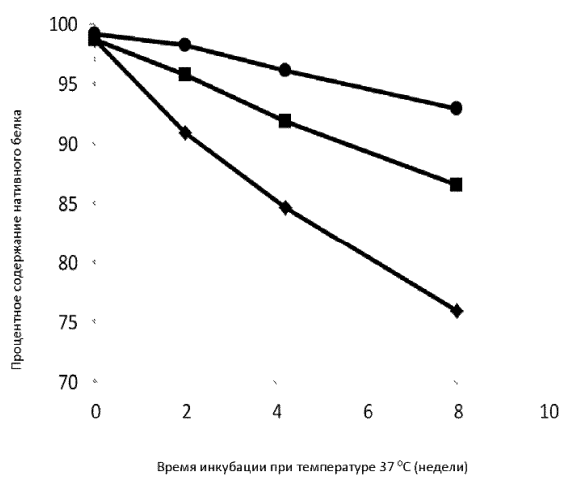


Фиг. 5

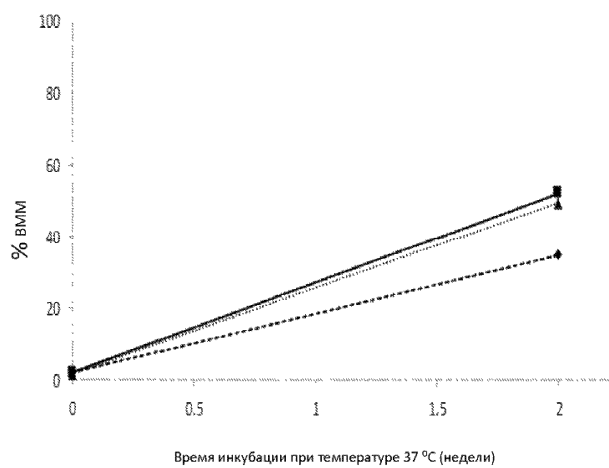
036623



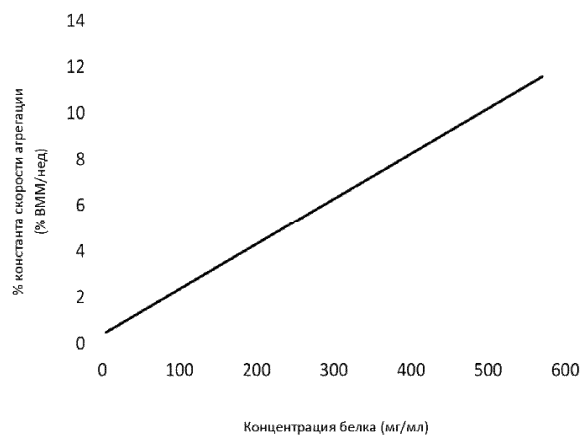
Фиг. 6А



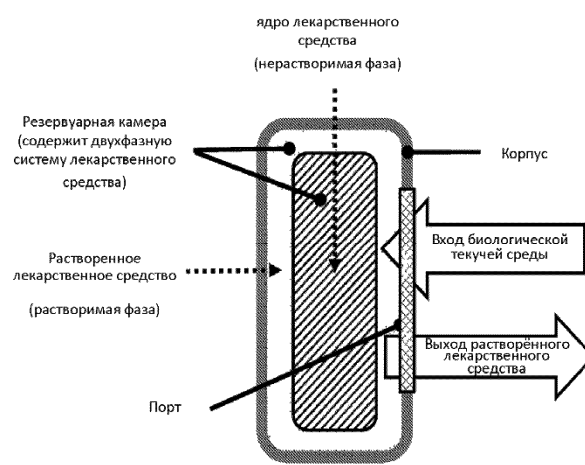
Фиг. 6В



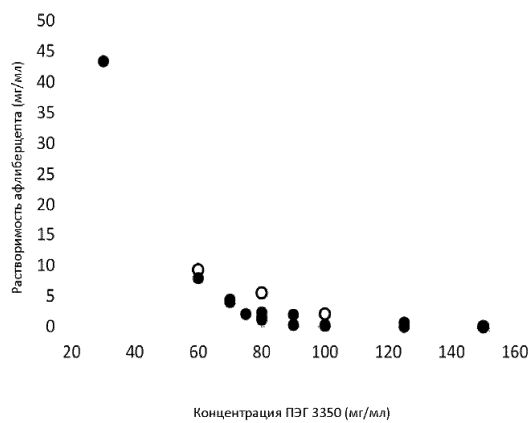
Фиг. 7



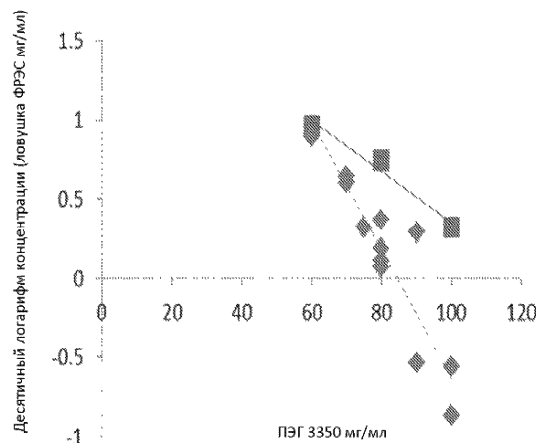
Фиг. 8



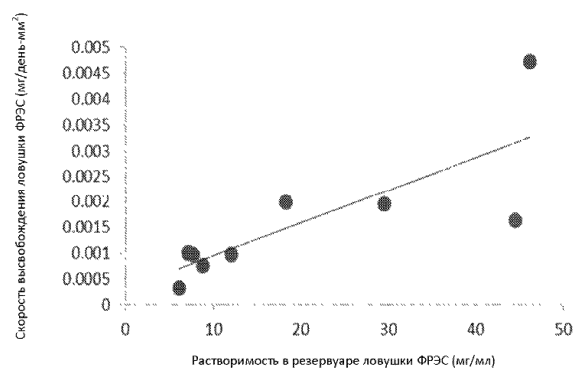
Фиг. 9



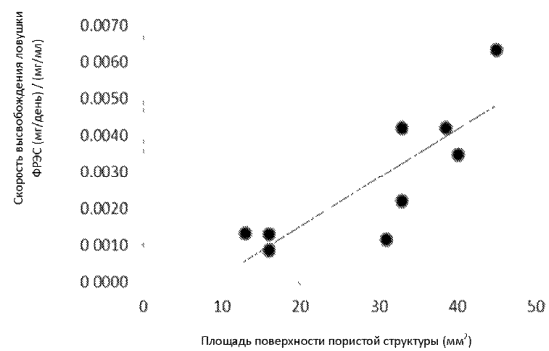
Фиг. 10



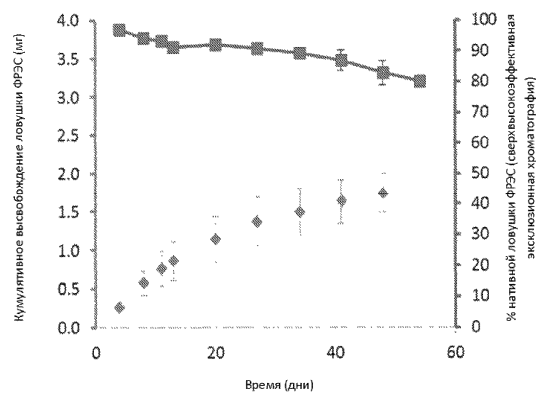
Фиг. 11



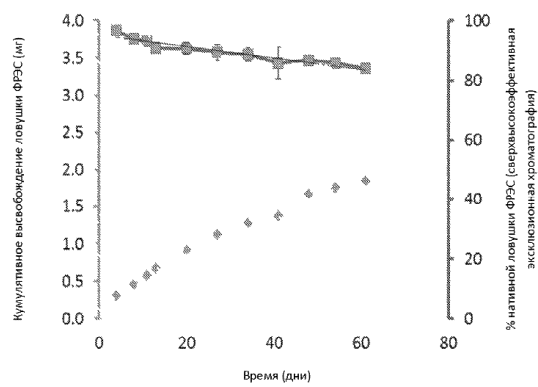
Фиг. 12



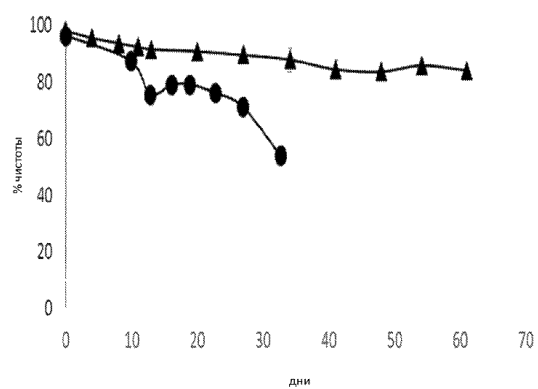
Фиг. 13



Фиг. 14А



Фиг. 14В



Фиг. 15

