

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038755**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.14

(21) Номер заявки
201891147

(22) Дата подачи заявки
2016.11.11

(51) Int. Cl. **A61K 47/50** (2017.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)

(54) АГРЕГИРУЮЩИЕ МИКРОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЗАМЕДЛЕННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО АГЕНТА ДЛЯ ВНУТРИГЛАЗНОЙ ДОСТАВКИ

(31) **62/254,707; 62/257,608; 62/276,530**

(32) **2015.11.12; 2015.11.19; 2016.01.08**

(33) **US**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/US2016/061706**

(87) **WO 2017/083779 2017.05.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГРЕЙБАГ ВИЖН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Юй Юнь, Кейс Джошуа, Ян Мин,
Клилэнд Джеффри Л. (US)**

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(56) **WO-A2-1996020698**
US-A1-20150140106

VAN DE VEN et al. Rapid tumorotropic accumulation of systemically injected plateloid particles and their biodistribution. Journal of Controlled Release, 158, 148-155, 2012. [retrieved on 17 February 2017]. Retrieved from the Internet. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062689>> see entire document
WO-A1-2015172149

(57) В изобретении предлагаются поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы для обеспечения замедленного высвобождения терапевтического агента для внутриглазной доставки. Микрочастицы содержат по меньшей мере один биоразлагаемый полимер, поливиниловый спирт и терапевтический агент, инкапсулированный в биоразлагаемый полимер, причем микрочастицы имеют средний диаметр между 10 и 60 мкм. Также микрочастицы содержат от около 0,001 до около 1% поливинилового спирта и их поверхность была модифицирована, чтобы содержать меньше поливинилового спирта, чем микрочастица до модификации поверхности, причем поверхность модифицирована при температуре менее чем около 18°C; и способны агрегировать *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм *in vivo*, способной обеспечивать замедленную внутриглазную доставку терапевтического агента *in vivo* в течение по меньшей мере одного месяца. Также предлагаются способы получения микрочастиц и инъекционные материалы, которые включают микрочастицы. В случае применения для глаз может быть достигнута длительная устойчивая внутриглазная доставка без нарушения зрения и при сведении к минимуму нежелательных воспалительных ответов.

B1**038755****038755****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке на патент США № 62/254707, поданной 12 ноября 2015 года; заявке на патент США № 62/257608, поданной 9 ноября 2015 года; и заявке на патент США № 62/276530, поданной 8 января 2016 года, которые включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к нагруженной лекарственным средством твердой (например, непористой) микрочастице с обработанной поверхностью, которая агрегирует *in vivo* с образованием более крупной консолидированной частицы для лекарственной терапии. В одном варианте осуществления частицы применяют для лечения заболеваний глаз. Также, предлагаются способы получения микрочастиц с обработанной поверхностью и инъекционные препараты, включающие микрочастицы с обработанной поверхностью. В случае применения для глаз может быть достигнута длительная устойчивая внутриглазная доставка, которая сводит к минимуму нарушение зрения и нежелательные воспалительные ответы.

Предпосылки создания изобретения

Структуру глаза можно разделить на два сегмента: передний и задний. Передний сегмент содержит переднюю треть глаза и включает структуры перед стекловидным телом: роговую оболочку, радужную оболочку, цилиарное тело и хрусталик. Задний сегмент включает задние две трети глаза и включает склеру, сосудистую оболочку, пигментный эпителий сетчатки, нервные волокна сетчатки, зрительный нерв и стекловидное тело.

Важные заболевания, поражающие передний сегмент глаза, включают глаукому, аллергический конъюнктивит, передний увеит и катаракту. Заболевания, поражающие задний сегмент глаза, включают сухую и влажную форму возрастной макулярной дегенерации (AMD), цитомегаловирусную (CMV) инфекцию, диабетическую ретинопатию, хориоидальную неоваскуляризацию, острую макулярную нейро-ретинопатию, макулярный отек (такой как кистозный макулярный отек и диабетический макулярный отек), болезнь Бехчета, поражения сетчатки, диабетическую ретинопатию (включая пролиферативную диабетическую ретинопатию), окклюзионное поражение артерии сетчатки, окклюзию центральной вены сетчатки, заболевание увеального тракта, отслоение сетчатки, травму глаз, повреждение, вызванное лазерным лечением глаза или фотодинамической терапией, фотокоагуляцией, радиационную ретинопатию, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзия ветки вены сетчатки, переднюю ишемическую оптическую нейропатию, неретинопатическую диабетическую дисфункцию сетчатки и пигментный ретинит. Глаукома иногда также считается заболеванием заднего сегмента глаза, потому что терапевтической целью лечения глаукомы является предупреждение или уменьшение потери зрения из-за повреждения или потери клеток сетчатки или клеток зрительного нерва.

Типичные пути введения лекарственного средства в глаз включают местное, системное, интравитреальное, внутриглазное, введение в камеру глаза, субконъюнктивальное, субтеноновое, ретробульбарное и заднее окологлоулярное (Gaudana, R., et al., "Ocular Drug Delivery", The American Association of Pharmaceutical Scientist Journal, 12(3)348-360, 2010).

Для доставки терапевтических агентов в глаз было разработано несколько типов систем доставки. Такие системы доставки включают обычные (раствор, суспензия, эмульсия, мазь, вставки и гели), везикулярные (липосомы, ниосомы, диски и фармакосомы), передовые материалы (склеральные пробки, генная доставка, siRNA и стволовые клетки) и системы с контролируемым высвобождением (имплантаты, гидрогели, дендримеры, ионтофорез, коллагеновые экраны, полимерные растворы, терапевтические контактные линзы, носители на основе циклодекстрина, микроиглы, микроэмульсии и частицы (микрочастицы и наночастицы)).

Лечение заболеваний заднего сегмента остается сложной задачей для ученых, занимающихся технологиями получения лекарственных средств. Доставка лекарственного средства в задний сегмент глаза обычно достигается посредством интравитреальной инъекции, периокулярного пути, имплантата или системного введения. Доставка лекарственного средства в задний сегмент посредством периокулярного пути может включать применение раствора лекарственного средства в непосредственной близости от склеры, что приводит к высоким концентрациям в сетчатке и стекловидном теле.

Интравитреальную инъекцию часто осуществляют с помощью иглы 30-калибра или меньше. Хотя интравитреальные инъекции обеспечивают высокие концентрации лекарственного средства в стекловидной камере и сетчатке, они могут быть связаны с различными кратковременными осложнениями, такими как отслоение сетчатки, эндофтальмит и интравитреальные кровоизлияния. Опыт показывает, что инъекция частиц малого размера может привести к быстрому рассеиванию частиц, которые могут препятствовать зрению (испытываемые пациентом как "плавающие пятна" или "плавающие помутнения"), и быстрому удалению частиц из участка инъекции (что может происходить через лимфатическую дренажную систему или путем фагоцитоза). Кроме того, иммуногенность может возникать при распознавании макрофагами и другими клетками и медиаторами иммунной системы.

Осложнения, связанные с периокулярными инъекциями, включают повышение внутриглазного давления, катаракту, гипометрию, косоглазие и декомпенсацию роговицы. Трансклеральная доставка с

периокулярным введением рассматривается как альтернатива интравитреальным инъекциям. Тем не менее, глазные барьеры, такие как склера, сосудистая оболочка, пигментный эпителий сетчатки, лимфатический поток и общий кровоток, снижают эффективность. Системное введение, которое не является успешным, принимая во внимание соотношение объема глаза ко всему телу, может привести к потенциальной системной токсичности.

Ряд компаний разработали микрочастицы для лечения заболеваний глаз. Например, фирма Allergan раскрыла биоразлагаемую микросферу для доставки терапевтического агента, составленного в носителе с высокой вязкостью, подходящем для внутриглазной инъекции или лечения не глазного нарушения (публикация США 2010/0074957 и публикация США 2015/0147406, в которой заявлен приоритет серий заявок от 16 декабря 2003 года). В одном варианте осуществления в заявке '957 описана биосовместимая внутриглазная система доставки лекарственного средства, которая включает множество биоразлагаемых микросфер, терапевтический агент и вязкий носитель, при этом носитель имеет вязкость по меньшей мере около 10 cps при скорости сдвига 0,1/с при 25°C.

Также, фирма Allergan раскрыла композитный материал для доставки лекарственного средства, который можно вводить путем инъекции в глаз пациента, который включает множество микрочастиц, диспергированных в среде, при этом микрочастицы содержат лекарственное средство и биоразлагаемое или биоэродируемое покрытие, а среда включает лекарственное средство, диспергированное в депо-образующем материале, при этом композиция среды может представлять собой гель или отверждаться при инъекции в глаз (WO 2013/112434 A1, с приоритетом от 23 января 2012 года). Фирма Аллерган утверждает, что данное изобретение можно применять для обеспечения депо-средств для имплантации системы доставки твердого лекарственного средства с замедленным высвобождением в глаз без разреза. Как правило, депо при инъекции превращается в материал, имеющий вязкость, затрудняющую или делающую невозможным введение путем инъекции.

Кроме того, фирма Allergan раскрыла биоразлагаемые микросферы диаметром 40-200 мкм со средним диаметром 60-150 мкм, которые эффективно удерживаются в передней камере глаза без возникновения гиперемии (US 2014/0294986). Микросферы содержат лекарственное средство, эффективное в отношении патологического состояния глаза, с высвобождением в течение более 7 дней после введения в переднюю камеру глаза. Предполагается, что введение этих крупных частиц преодолест недостатки инъекции частиц размером 1-30 мкм, которые обычно плохо переносятся.

Компания Regentec Limited подала ряд патентных заявок, касающихся получения пористых частиц, которые могут быть использованы в качестве тканевого скаффолда (WO 2004/084968 и публикация США 2006/0263335 (поданная 27 марта 2003 года) и публикация США 2008/0241248 (поданная 20 сентября 2005 года) и WO 2008/041001 (поданная 7 октября 2006 года)). Пористость частиц должна быть достаточной для приема клеток, подлежащих удерживанию в частице. Клетки могут быть посажены на матрицу во время или до имплантации матрицы, или позже в случае рекрутинга из эндогенных клеток *in situ*. Компания Regentec также опубликовала статью, касающуюся тканевого скаффолда с пористыми частицами (Qutachi et al. "Injectable and porous PLGA microspheres that form highly porous scaffolds at body temperature", *Acta Biomaterialia*, 10, 5080-5098, (2014)).

Кроме того, компания Regentec Limited также подала заявки на патенты, касающиеся получения крупных пористых частиц, которые можно применять для доставки лекарственных средств (WO 2010/100506 и публикация США 2012/0063997 (поданная 5 марта 2009 года)). Пористость частиц обеспечивает быструю доставку терапевтического агента. Частицы предназначены для формирования скаффолда, который заполняет пространство, в которое их вводят, под воздействием активирующего фактора, такого как изменение температуры.

Дополнительные ссылки, касающиеся высокопористых микрочастиц, включают публикации Rahman and Kim. Rahman et al. "PLGA/PEG-hydrogel composite scaffolds with controllable mechanical properties" *J. of Biomedical Materials Research*, 101, 648-655, (2013), в которых описаны гидрогели с пористостью около 50% и их соответствующие механические свойства. В работе Kim et al. "Biodegradable polymeric microspheres with "open/closed" pores for sustained release of human growth hormone" *J. of Controlled Release*, 112, 167-174, (2006)) описаны полимеры PLGA с порами для доставки человеческого гормона роста.

В EP 2125048, поданной фирмой Locate Therapeutics Limited (поданной 1 февраля 2007 года), а также WO 2008/093094, публикации США 2010/0063175 (поданной 1 февраля 2007 года) и WO 2008/093095 (поданной 1 февраля 2007 года), поданной фирмой Regentec Limited, описано получение частиц, которые необязательно являются пористыми, но под воздействием активирующего фактора (такого как температура) формируют тканевый скаффолд, полезный в отношении восстановления поврежденной или утраченной ткани у хозяина.

В патенте США 9161903, выданном 20 октября 2015 года фирме Warsaw Orthopedic, публикации США 2016/0038407, поданной фирмой Warsaw Orthopedic Inc., раскрыта текучая композиция для инъекции в участок ткани-мишени под кожей, которая представляет собой текучую композицию, отверждаемую в участке ткани-мишени или вблизи него.

В работе Bible et al. "Attachment of stem cells to scaffold particles for intra-cerebral transplantation", *Nat.*

Protoc, 10, 1440-1453, (2009) описан подробный процесс получения микрочастиц PLGA, которые не скапливаются или не агрегируют.

В публикация патентной заявки США 2011/0123446, поданной фирмой Liquidia Technologies, под названием "Degradable compounds and methods of use thereof, particularly with particle replication in non-wetting templates" описаны разлагаемые полимеры, которые используют силильное ядро и могут формировать быстро разлагаемые матрицы.

Дополнительные ссылки, касающиеся частиц для доставки в глаза, включают следующие. В работе Ayalasomayajula, S.P. and Kompella, U.B. раскрыто субконъюнктивальное введение микрочастиц цецекоксиб-поли(лактид-ко-гликолида) (PLGA) у крыс (Ayalasomayajula, S.P. and Kompella, U.B., "Subconjunctivally administered celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in a rat model", *Em. J. Pharm.*, 511, 191-198 (2005)). В работе Danbiosyst UK Ltd. раскрыта микрочастица, содержащая смесь биоразлагаемого полимера, водорастворимого полимера массой 8000 Дальтон или выше и активного агента (патент США 5869103). Фирма Poly-Med, Inc. раскрыла композиции, содержащие массу гидрогеля и носитель, содержащий биологический активный агент, осажденный на носитель (патент США 6413539). Фирма MacroMed Inc. раскрыла применение системы доставки агента, содержащей микрочастицу и биоразлагаемый гель (патент США 6287588 и патент США 6589549). Фирма Novartis раскрыла офтальмологические депо-препараты для перокулярного или субконъюнктивального введения, где фармакологически приемлемый полимер представляет собой полилактид-со-гликолидный эфир полиола (публикация США 2004/0234611, публикация США 2008/0305172, публикация США 2012/0269894 и публикация США 2013/0122064). Фирма Universidad De Navarra раскрыла пероральные пегилированные наночастицы для переноса биологически активных молекул, содержащих легированный биоразлагаемый полимер (патент США № 8628801).

Фирма Surmodics, Inc. раскрыла микрочастицы, содержащие матрицы для доставки лекарственного средства (патент США 6663674). Фирма Minu, L.L.C. раскрыла применение агента в форме микрочастиц или наночастиц для содействия трансмембранному транспорту. Фирмы Emory University и Georgia Tech Research Corporation раскрыли частицы, диспергированные в неньютоновской жидкости, которая содействует миграции терапевтических частиц из участка введения в супрахориоидальное пространство в участок лечения (U.S. 2016/0310417). Фирма Pfizer раскрыла наночастицы в виде инъекционных депо-препаратов (публикация США 2008/0166411). Фирма Abbott раскрыла фармацевтическую лекарственную форму, которая содержит фармацевтически приемлемый полимер для доставки ингибитора тирозинкиназы (публикация США 2009/0203709). Фирма Brigham and Woman's Hospital, Inc. раскрыла модифицированные полимеры поли(молочной-со-гликолевой кислоты), содержащие терапевтические агенты, ковалентно связанные с полимером (U.S. 2012/0052041). Фирма BIND Therapeutics, Inc. раскрыла терапевтические наночастицы, содержащие около 50-99,75 мас.% диблоксополимера поли(молочной)кислоты и поли(этилен)гликоля или диблоксополимера поли(молочной-со-гликолевой кислоты) и поли(этилен)гликоля, при этом терапевтическая наночастица содержит около 10-30 мас.% поли(этилен)гликоля (публикация США 2014/0178475). Дополнительные публикации, принадлежащие фирме BIND Therapeutics, Inc., включают публикацию США 2014/0248358 и публикацию США 2014/0249158. Фирма Allergan раскрыла применение биоразлагаемых микросфер, содержащих лекарственное средство, для лечения патологического состояния глаз (публикация США 2010/0074957, публикация США 2014/0294986, публикация США 2015/0147406, EP 1742610 и WO 2013/112434). Также, фирма Allergan раскрыла биосовместимый имплантат, содержащий компонент простамид, который может существовать в форме частиц, и биоразлагаемый полимер, обеспечивающий медленное высвобождение лекарственного средства в течение периода времени, составляющего от 1 недели до 6 месяцев, для лечения заболевания глаз, такого как глаукома (заявка США 2015/0157562 и заявка США 2015/0099805). Фирма Jade Therapeutics раскрыла препараты, содержащие активный агент и полимерную матрицу, которые могут быть доставлены непосредственно в целевую ткань или помещены в подходящее устройство для доставки (публикация США 2014/0107025). Фирма Bayer Healthcare раскрыла местную офтальмологическую фармацевтическую композицию, содержащую сунитиниб и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель (WO 2013/188283). Фирма pSivida Us, Inc. раскрыла биоразлагаемые частицы, выделяющие лекарственное средство, содержащие микропористую или мезопористую кремниевую подложку, для внутриглазного применения (патент США 9023896). Дополнительные патенты, принадлежащие фирме pSivida Us, Inc., включают: патент США 8871241; патент США 8815284; патент США 8574659; патент США 8574613; патент США 8252307; патент США 8192408 и патент США 7998108. Фирма ForSight Vision4, Inc. раскрыла терапевтические устройства для имплантации в глаз (патент США 8808277). Дополнительные патенты, принадлежащие фирме ForSight Vision4, Inc., включают: патент США 9125735; патент США 9107748; патент США 9066779; патент США 9050765; патент США 9033911; патент США 8939948; патент США 9905963; патент США 8795712; патент США 8715346; патент США 8623395; патент США 8414646; патент США 8399006; патент США 8298578; патент США 8277830; патент США 8167941; патент США 7883520; патент США 7828844 и патент США 7585075. Институт Nagoya Industrial Science Research Institute недавно раскрыл применение липосом для доставки лекарственного средства в задний сегмент глаза (патент США 9114070).

Для лечения заболеваний глаз и, в частности, заболеваний заднего сегмента лекарственное средство должно доставляться на терапевтических уровнях и в течение достаточного периода времени для достижения эффективности. Эту, казалось бы, простую цель трудно достигнуть на практике.

Целью настоящего изобретения является обеспечение композиций и способов для лечения офтальмологических нарушений. Другой целью является обеспечение микрочастиц, доставляющих лекарственное средство, предназначенных для введения терапевтических агентов с замедленным высвобождением, как правило, *in vivo*.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагаются твердые биоразлагаемые микрочастицы с мягко обработанной поверхностью, которые при инъекции *in vivo* агрегируют в более крупную частицу (гранулу) таким образом, что уменьшаются нежелательные побочные эффекты частиц меньшего размера, и являются подходящими для длительной (например, до или, альтернативно, в течение по меньшей мере трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или семи месяцев или дольше) доставки терапевтического агента с замедленным высвобождением. В одном варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с мягко обработанной поверхностью являются подходящими для инъекции в глаза, в результате чего частицы агрегируют с образованием гранулы, которая остается вне зрительной оси, значительно не нарушая зрение. Частицы могут агрегировать в одну или несколько гранул. Размер агрегата зависит от концентрации и объема вводимых суспензий микрочастиц и разбавителя, в котором микрочастицы суспендированы.

В одном варианте осуществления изобретение относится к поверхностно-модифицированным твердым агрегирующим микрочастицам для обеспечения замедленного высвобождения терапевтического агента для внутриглазной доставки, содержащие по меньшей мере один биоразлагаемый полимер, поливиниловый спирт и терапевтический агент, инкапсулированный в биоразлагаемый полимер, причем микрочастицы имеют средний диаметр между 10 и 60 мкм, и причем микрочастицы: (i) содержат от около 0,001% до около 1% поливинилового спирта и их поверхность была модифицирована, чтобы содержать меньше поливинилового спирта, чем микрочастица до модификации поверхности, причем поверхность модифицирована при температуре менее чем около 18°C; и (ii) способны агрегировать *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм *in vivo*, способной обеспечивать замедленную внутриглазную доставку терапевтического агента *in vivo* в течение по меньшей мере одного месяца.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, описанные здесь, являются подходящими для внутриглазной инъекции. В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы являются подходящими для способа доставки, выбранного из группы, состоящей из интравитреальной, интрастромальной, интракамеральной, субтеноновой, субретинальной, ретробульбарной, перибульбарной, супрахориоидальной, конъюнктивальной, субконъюнктивальной, эписклеральной, задней окологсклеральной, перикорнеальной инъекции и инъекции в слезно-носовой канал. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна гранула способна обеспечить замедленную внутриглазную доставку терапевтического агента в течение по меньшей мере двух месяцев, в течение по меньшей мере трех месяцев, в течение по меньшей мере четырех месяцев, в течение по меньшей мере пяти месяцев, в течение по меньшей мере шести месяцев или в течение по меньшей мере семи месяцев.

В одном варианте осуществления модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 14 до около 12. В одном варианте осуществления модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 12 до около 10. В одном варианте осуществления модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 10 до около 8. В одном варианте осуществления модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 6 до около 8. В одном варианте осуществления модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 6,5 до около 7,5. В одном варианте осуществления модификацию поверхности осуществляют при температуре ниже 16°C, ниже 10°C, ниже 8°C или ниже 5°C.

В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой фармацевтическое лекарственное средство. В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой сунитиниб или его фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой сунитиниб малат. В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой ингибитор тирозинкиназы. В одном варианте осуществления терапевтический агент выбран из дорзоламида, бринзоламида, бримонидина, тимолола, иматиниба, gefitiniba, эрлотиниба, лапатиниба, сорафениба, пазопаниба, дазатиниба, нилотиниба, кризотиниба, руксолитиниба, вандетаниба, вемурафениба, бозутиниба, кабозантиниба, регорафениба и понатиниба.

В одном варианте осуществления микрочастицы имеют средний диаметр от около 20 до около 30 мкм. В одном варианте осуществления микрочастицы имеют средний диаметр от 25 до 35 мкм. В одном варианте осуществления микрочастицы имеют средний диаметр от около 20 до около 40 мкм. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна гранула имеет диаметр по меньшей мере 600 мкм, по меньшей мере 700 мкм, по меньшей мере 1 мм, по меньшей мере 1,5 мм, по меньшей мере 2 мм, по

меньшей мере 3 мм, по меньшей мере 4 мм или по меньшей мере 5 мм.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одна гранула способна высвобождать не более чем около 10 или 15 мас. % терапевтического агента *in vivo* за период времени, составляющий 24 ч. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна гранула способна высвобождать не более чем около 10 или 15 мас.% процентов терапевтического агента *in vivo* за период времени, составляющий 12 ч.

В одном варианте осуществления микрочастицы имеют нагрузку терапевтическим агентом, составляющую 1-40 мас.%. В одном варианте осуществления микрочастицы имеют нагрузку терапевтическим агентом, составляющую 5-25 мас.%. В одном варианте осуществления микрочастицы имеют нагрузку терапевтическим агентом, составляющую 5-15 мас.%. В одном варианте осуществления по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид). В одном варианте осуществления по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем. В одном варианте осуществления микрочастицы содержат более чем один биоразлагаемый полимер. В одном варианте осуществления по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой как поли(лактид-со-гликолид), так и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем. В одном варианте осуществления по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем. В одном варианте осуществления по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид), поли(молочную кислоту) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем. В одном варианте осуществления по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(молочную кислоту). В одном варианте осуществления по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(молочную кислоту), ковалентно связанную с полиэтиленгликолем. В одном варианте осуществления по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой как поли(молочную кислоту), так и поли(молочную кислоту), ковалентно связанную с полиэтиленгликолем. В одном варианте осуществления что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(молочную кислоту) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем. В одном варианте осуществления модификацию поверхности осуществляют на влажных микрочастицах.

В одном варианте осуществления поверхностно обработанные частицы способны высвобождать терапевтический агент в течение более длительного периода времени по сравнению с микрочастицей с не обработанной поверхностью. В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы вызывают меньше воспаления, чем микрочастицы с не обработанной поверхностью. В одном варианте осуществления

В другом варианте осуществления изобретение относится к инъекционному материалу, который включает/содержит микрочастицы согласно настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе для введения *in vivo*. Инъекционный материал может включать соединение, которое ингибирует агрегацию микрочастиц до инъекции, и/или усилитель вязкости, и/или соль. В одном варианте осуществления инъекционный материал содержит поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы при концентрации в диапазоне от около 50 до около 700 мг/мл. В некоторых примерах инъекционный материал содержит поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы при концентрации не более 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 или 700 мг/мл. В одном варианте осуществления инъекционный материал содержит поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы при концентрации около 200-400 мг/мл, 150-450 мг/мл или 100-500 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления инъекционный материал имеет концентрацию до около 150, 200, 300 или 400 мг/мл.

Настоящее изобретение, кроме того, включает способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц, который включает:

(i) первую стадию получения микрочастиц, содержащих по меньшей мере один биоразлагаемый полимер, путем растворения или диспергирования полимера(ов) и терапевтического агента в одном или более растворителях с образованием раствора или дисперсии полимера или терапевтического агента, смешивания раствора или дисперсии полимера и терапевтического агента с водной фазой, содержащей поливиниловый спирт, с получением насыщенных растворителем микрочастиц, и затем удаления растворителя(ей) с получением полимерных микрочастиц, которые содержат терапевтический агент, полимер и поливиниловый спирт; и

(ii) вторую стадию мягкой обработки только поверхности микрочастиц, полученных на стадии (i), для уменьшения содержания поливинилового спирта, по сравнению с микрочастицей до модификации поверхности, при температуре 18°C или ниже, в течение около 120 мин или меньше; и

(iii) выделение микрочастиц с обработанной поверхностью.

Способ может быть осуществлен на непрерывной производственной линии или посредством одной стадии или поэтапно. В одном варианте осуществления влажные биоразлагаемые микрочастицы могут применяться без выделения для получения твердых биоразлагаемых микрочастиц с обработанной по-

верхностью. В одном варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с обработанной поверхностью значительно не агрегируют в процессе получения. В другом варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с обработанной поверхностью значительно не агрегируют при ресуспендировании и наборе в шприц. В некоторых вариантах осуществления шприц имеет калибр около 30, 29, 28, 27, 26 или 25 с нормальной или тонкой стенкой.

В еще одном варианте осуществления предлагается способ лечения офтальмологического нарушения, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, твердых агрегирующих микрочастиц с модифицированной в мягких условиях поверхностью, которые включают эффективное количество терапевтического агента, при этом поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы вводят путем инъекции в глаз и агрегируют *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм, которая обеспечивает замедленную доставку терапевтического агента в течение по меньшей мере одного месяца таким образом, что гранула остается по существу вне зрительной оси, значительно не нарушая зрение. В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы вносят в инъекционный материал, содержащий фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления офтальмологическое нарушение представляет собой влажную или сухую форму возрастной макулярной дегенерации. В одном варианте осуществления офтальмологическое нарушение представляет собой глаукому. В одном варианте осуществления офтальмологическое нарушение выбрано из хориоидальной неоваскуляризации, острой макулярной нейроретинопатии, макулярного отека, кистозного макулярного отека и диабетического макулярного отека, болезни Бехчета, поражения сетчатки, диабетической ретинопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии, окклюзионного поражения артерии сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, заболевания увеального тракта, отслоения сетчатки, травмы глаз, повреждения, вызванного лазерным лечением глаза или фотодинамической терапией, фотокоагуляцией, радиационной ретинопатии, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзии ветки вены сетчатки, передней ишемической оптической нейропатии, неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки, воспаления глаз, инфекции глаз, и пигментного ретинита, и глазного заболевания, связанного с цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекцией. В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые не агрегируют в более крупную гранулу *in vivo*, составляют около 10% или менее, около 7% или менее, около 5% или менее или около 2% или менее от общей вводимой массы. В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы не вызывают иммунного ответа в глазу. В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой фармацевтическое лекарственное средство или биологическое лекарственное средство.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана агрегация микрочастиц с необработанной поверхностью (NSTMP) (S-1 и S-5) и микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) (S-3 и S-8) после внесения в PBS и инкубации при 37°C в течение 2 ч. NSTMP, S-1 и S-5, начинали диспергироваться сразу же, когда пробирки переворачивали после 2-х часовой инкубации, тогда как STMP, S-3 и S-8, оставались агрегированными на дне пробирок без диспергирования на протяжении всего периода наблюдения (около 10 мин). Образцы слева направо представляют собой следующие S-1, S-3, S-5 и S-8 (пример 5).

На фиг. 2 показана агрегация микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) (S-3 и S-8) после внесения в HA и инкубации при 37°C в течение 2 ч. Образцы слева направо представляют собой следующие S-1, S-3, S-5 и S-8 (пример 5).

На фиг. 3 показан результат *in vitro* агрегации и диспергирования частиц после 2-х часовой инкубации в PBS при 37°C с последующим встряхиванием для открепления агрегатов от дна пробирок. Верхний ряд слева направо образцы: S-1, S-2, S-3, S-4; нижний ряд слева направо образцы: S-5, S-6, S-7 и S-8 (пример 5).

На фиг. 4 показана *in vitro* агрегация репрезентативных микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP), обработанных PBS/EtOH (образец S-21), после 2-часовой инкубации в PBS при 37°C с последующим встряхиванием путем постукивания по столу и пощелкивания пальцем по пробирке (пример 6).

На фиг. 5 показан *in vitro* профиль ускоренного высвобождения лекарственного средства репрезентативной партии микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) (S-12) (пример 12). По оси x показано время, измеренное в днях, и по оси y показано кумулятивное высвобождение в процентах.

На фиг. 6 показаны профили высвобождения лекарственного средства *in vitro* для образцов S-1, S-2 и S-3 в PBS с 1% Tween 20 при 37°C (пример 13). По оси x показано время, измеренное в днях, и по оси y показан процент кумулятивного высвобождения.

На фиг. 7 показан профиль высвобождения лекарственного средства *in vitro* S-13, S-14, S-15 и S-16 в PBS с 1% Tween 20 при 37°C (пример 15). По оси x показано время, измеренное в днях, и по оси y показан процент кумулятивного высвобождения.

На фиг. 8А показана агрегация *in vitro* микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) в 5-кратно разбавленном ProVisc при концентрации 100 мг/мл в 4 мл PBS после инкубации при 37°C в течение 2 ч (верхний) и после инкубации при 37°C в течение 2 ч с последующим встряхиванием при 250

об/мин в течение 2 мин на орбитальном встряхивателе (нижний) (пример 17).

На фиг. 8В показана агрегация *in vitro* микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) в 5-кратно разбавленном ProVisc при концентрации 100 мг/мл в 4 мл НА (раствор 5 мг/мл) после инкубации при 37°C в течение 2 ч (верхний) и после инкубации при 37°C в течение 2 ч с последующим встряхиванием при 250 об/мин в течение 2 мин на орбитальном встряхивателе (нижний) (пример 17).

На фиг. 8С показана агрегация *in vitro* микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) в 5-кратно разбавленном ProVisc при концентрации 200 мг/мл в 4 мл PBS после инкубации при 37°C в течение 2 ч с последующим встряхиванием при 250 об/мин в течение 2 мин на орбитальном встряхивателе (нижний) (пример 17).

На фиг. 8D показана агрегация *in vitro* микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) в 5-кратно разбавленном ProVisc при концентрации 200 мг/мл в 4 мл НА (раствор 5 мг/мл) после инкубации при 37°C в течение 2 ч с последующим встряхиванием при 250 об/мин в течение 2 мин на орбитальном встряхивателе (нижний) (пример 17).

На фиг. 9 показаны снимки агрегатов частиц *ex vivo* глазу коровы через 2 ч после инъекции (пример 18).

На фиг. 10А показаны снимки агрегатов частиц в стекловидном теле (слева) и снаружи стекловидного тела (справа) после инъекции STMP, S-10, суспендированных в PBS, в центральное стекловидное тело глаз кролика (пример 19).

На фиг. 10В показаны снимки агрегатов частиц в стекловидном теле (слева) и снаружи стекловидного тела (справа) после инъекции STMP, S-10, суспендированных в 5-кратно разбавленном ProVisc, в центральное стекловидное тело глаз кролика (пример 19).

На фиг. 11А показаны полученные через 1 месяц репрезентативные снимки гистологических срезов глаз кролика, в которые инъектировали микрочастицы с обработанной поверхностью (STMP) (пример 20).

На фиг. 11В показаны полученные через 1 месяц репрезентативные снимки гистологических срезов глаз кролика, в которые инъектировали микрочастицы с не обработанной поверхностью (NSTMP) (пример 20).

На фиг. 12 показано распределение по размеру репрезентативной партии микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) (S-12) (пример 22). По оси x показан диаметр частиц в микрометрах и по оси y показан объемный процент.

На фиг. 13А показаны выбранные профили РК для сунитиниба в сетчатке после билатеральной инъекции сунитиниба малата (свободное лекарственное средство) в дозе 0,0125 мг/глаз или 0,00125 мг/глаз у пигментированных кроликов (пример 24). По оси x показано время, измеренное в часах, и по оси y показана концентрация сунитиниба в нг/г.

На фиг. 13В показаны профили РК для сунитиниба в стекловидном теле после билатеральной инъекции сунитиниба малата (свободное лекарственное средство) в дозе 0,0125 мг/глаз или 0,00125 мг/глаз у пигментированных кроликов (пример 24). По оси x показано время, измеренное в часах, и по оси y показана концентрация сунитиниба в нг/г.

На фиг. 13С показаны профили РК для сунитиниба в плазме после билатеральной инъекции сунитиниба малата (свободное лекарственное средство) в дозе 2,5 мг/глаз, 0,25 мг/глаз или 0,025 мг/глаз у пигментированных кроликов (пример 24). По оси x показано время, измеренное в часах, и по оси y показана концентрация сунитиниба в нг/г.

На фиг. 14 показаны уровни сунитиниба (нг/г) у кроликов, которым инъектировали 10 мг STMP, содержащих 1 мг сунитиниба, на протяжении 7 месяцев после дозирования. Кроликов умерщвляли в 4 месяца и уровни сунитиниба (нг/г) определяли в стекловидном теле, сетчатке, плазме и RPE-хороиде. Уровни сунитиниба были выше K_i для сунитиниба против VEGFR и PDGFR (пример 20). По оси x показано время после дозирования в месяцах, и по оси y показана концентрация сунитиниба, измеренная в нг/г.

На фиг. 15 показаны уровни сунитиниба (нг/г) у кроликов, которым инъектировали 2 мг STMP, содержащих 0,2 мг сунитиниба (10 масс.% STMP), на протяжении 4 месяцев после дозирования. Кроликов умерщвляли в 4 месяца и уровни сунитиниба (нг/г) определяли в стекловидном теле, сетчатке, плазме и RPE-хороиде. Уровни сунитиниба были выше K_i для сунитиниба против VEGFR и PDGFR в RPE-хороиде и сетчатке (пример 20). По оси x показано время после дозирования в месяцах, и по оси y показана концентрация сунитиниба, измеренная в нг/г.

На фиг. 16 показаны уровни сунитиниба (нг/г) у кроликов, которым инъектировали 10 мг STMP, содержащих 0,2 мг сунитиниба (2 мас.% STMP). Кроликов умерщвляли в 4 месяца и уровни сунитиниба (нг/г) определяли в стекловидном теле, сетчатке, плазме и RPE-хороиде. Уровни сунитиниба были выше K_i для сунитиниба против VEGFR и PDGFR в RPE-хороиде и сетчатке (пример 20). По оси x показано время после дозирования в месяцах, и по оси y показана концентрация сунитиниба, измеренная в нг/г.

На фиг. 17 показана агрегация микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) (с S-28 по S-37 и S-12) после внесения в PBS и инкубации при 37°C в течение 2 часов. После инкубации в течение 2-х часов микрочастицы без обработанной поверхности (NSTMP), S-27, становились диспергированными, когда тестируемую пробирку помещали на орбитальный встряхиватель при 400 об/мин на 30 с, при этом

микрочастицы с обработанной поверхностью (STMP), с S-28 по S-37 и S-12, оставались агрегированными в тех же самых условиях встряхивания. Образцы слева направо, с верхнего ряда до нижнего ряда S-28, S-29, S-30, S-31, S-32, S-33, S-34, S-35, S-36, S-37, S-12 и S-27 (пример 10).

На фиг. 18 показана агрегация микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) (с S-39 по S-45) после внесения в PBS и инкубации при 37°C в течение 2 часов. После инкубации в течение 2-х часов микрочастицы без обработанной поверхности (NSTMP), S-38, становились диспергируемыми, когда тестируемую пробирку помещали на орбитальный встряхиватель при 400 об/мин на 30 сек, при этом микрочастицы с обработанной поверхностью (STMP), с S-39 по S-45, оставались агрегированными в тех же условиях встряхивания. Образцы слева направо, с верхнего ряда до нижнего представляют собой S-39, S-40, S-41, S-42, S-43, S-44 и S-45 (пример 10).

На фиг. 19 показан график, отражающий РК после однократной IVT инъекции STMP, содержащей 1 мг сунитиниба малата, у кроликов. Кроликов умерщвляли через 10 дней и 3 месяца и уровни сунитиниба (нг/г) определяли в стекловидном теле, сетчатке и RPE-хороиде. Уровни сунитиниба были выше K_1 для сунитиниба против VEGFR и PDGFR в RPE-хороиде и сетчатке (пример 29). По оси x представлено время после дозирования в месяцах и по оси y показана концентрация сунитиниба, измеренная в нг/г.

Подробное описание

В настоящем изобретении предлагаются твердые биоразлагаемые микрочастицы с мягко обработанной поверхностью, которые при инъекции *in vivo* агрегируют в более крупную частицу (гранулу) таким образом, что уменьшаются нежелательные побочные эффекты частиц меньшего размера, и являются подходящими для длительной (например, до или, альтернативно, в течение по меньшей мере трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или семи месяцев или дольше) доставки терапевтического агента с замедленным высвобождением. В одном варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с мягко обработанной поверхностью являются подходящими для инъекции в глаза, в результате чего частицы агрегируют с образованием гранулы, которая остается вне зрительной оси, значительно не нарушая зрение. Частицы могут агрегировать в одну или несколько гранул. Размер агрегата зависит от концентрации и объема вводимых суспензий микрочастиц и разбавителя, в котором микрочастицы суспендированы.

В одном варианте осуществления изобретение относится к таким поверхностно-модифицированным твердым агрегирующим микрочастицам, которые включают по меньшей мере один биоразлагаемый полимер, при этом поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы имеют твердую сердцевину, включают терапевтический агент, имеют модифицированную поверхность, обработанную в мягких условиях при температуре около 18°C или ниже для удаления поверхностного поверхностно-активного вещества, являются достаточно малыми для инъекции *in vivo* и способны агрегировать *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм *in vivo* для обеспечения доставки лекарственного средства с замедленным высвобождением *in vivo* в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или семи месяцев или более. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы являются подходящими, например, для интравитреальной инъекции, имплантата, включая глазной имплантат, периокулярной доставки или доставки *in vivo* вне глаза.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, описанные здесь, после инъекции *in vivo* агрегируют *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм *in vivo* для обеспечения доставки лекарственного средства с замедленным высвобождением *in vivo* в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или семи месяцев или более.

В другом варианте осуществления изобретение относится к инъекционному материалу, который включает микрочастицы согласно настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе для введения *in vivo*. Инъекционный материал может включать соединение, которое ингибирует агрегацию микрочастиц до инъекции, и/или усилитель вязкости, и/или соль. В одном варианте осуществления инъекционный материал содержит поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы при концентрации в диапазоне от около 50 до около 700 мг/мл. В некоторых примерах инъекционный материал содержит поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы при концентрации не более 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650 или 700 мг/мл. В одном варианте осуществления инъекционный материал содержит поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы при концентрации около 200-400 мг/мл, 150-450 мг/мл или 100-500 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления инъекционный материал имеет концентрацию до около 150, 200, 300 или 400 мг/мл.

Настоящее изобретение, кроме того, включает способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц, который включает:

(i) первую стадию получения микрочастиц, содержащих один или более биоразлагаемых полимеров, путем растворения или диспергирования полимера(ов) и терапевтического агента в одном или более растворителях с образованием раствора или дисперсии полимера или терапевтического агента, смешивания раствора или дисперсии полимера и терапевтического агента с водной фазой, содержащей поверхно-

стно-активное вещество, с получением насыщенных растворителем микрочастиц, и затем удаления растворителя(ей) с получением полимерных микрочастиц, которые содержат терапевтический агент, полимер и поверхностно-активное вещество; и

(ii) вторую стадию мягкой обработки поверхности микрочастиц, полученных на стадии (i), при температуре около 18, 15, 10, 8 или 5°C или ниже, необязательно, в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100, 11, 120 или 140 мин агентом, который удаляет поверхностное поверхностно-активное вещество, поверхностный полимер или поверхностный олигомер таким способом, который не вызывает значительного образования внутренних пор; и

(iii) выделение микрочастиц с обработанной поверхностью.

Способ может быть осуществлен на непрерывной производственной линии или посредством одной стадии или постадийно. В одном варианте осуществления влажные биоразлагаемые микрочастицы могут применяться без выделения для получения твердых биоразлагаемых микрочастиц с обработанной поверхностью. В одном варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с обработанной поверхностью значительно не агрегируют в процессе получения. В другом варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с обработанной поверхностью значительно не агрегируют при ресуспендировании и наборе в шприц. В некоторых вариантах осуществления шприц имеет калибр около 30, 29, 28, 27, 26 или 25 с нормальной или тонкой стенкой.

В еще одном варианте осуществления предлагается способ лечения офтальмологического нарушения, который включает введение хозяину, нуждающемуся в этом, твердых агрегирующих микрочастиц с модифицированной в мягких условиях поверхностью, которые включают эффективное количество терапевтического агента, при этом поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы поступают путем инъекции в глаз и агрегируют *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм, которая обеспечивает доставку лекарственного средства с замедленным высвобождением в течение по меньшей мере приблизительно одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи или более месяцев таким образом, что гранула остается по существу вне зрительной оси, значительно не нарушая зрение. В одном варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с обработанной поверхностью высвобождают от около 1 до около 20%, от около 1 до около 15%, от около 1 до около 10% или от около 5 до около 20%, например, до около 1, 5, 10, 15 или 20% терапевтического агента в течение первых двадцати четырех часов. В одном варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с обработанной поверхностью высвобождают меньшее количество терапевтического агента *in vivo* по сравнению с необработанными твердыми биоразлагаемыми микрочастицами в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней или даже около 1, 2, 3, 4 или 5 месяцев. В одном варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с обработанной поверхностью вызывают меньшее воспаление *in vivo* по сравнению с необработанными твердыми биоразлагаемыми микрочастицами во время курса лечения.

В данном изобретении рассматривается проблема внутриглазной терапии с использованием малых частиц, нагруженных лекарственным средством (например, средний диаметр 20-40 мкм, 10-30 мкм, 20-30 мкм или 25-30 мкм или, например, средний диаметр (Dv) не более чем около 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35 или 40 мкм), склонных к рассеиванию в глазу из-за движения тела и/или водянистой влаги в стекловидном теле. Диспергированные микрочастицы могут вызывать нарушение и ухудшение зрения из-за плавающих помутнений, воспаления и т.д. Микрочастицы согласно изобретению агрегируют *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм, и сводят к минимуму нарушение зрения и воспаление. Кроме того, агрегированная гранула микрочастиц с обработанной поверхностью является биоразлагаемой, поэтому агрегированную гранулу микрочастиц с обработанной поверхностью необязательно удалять хирургическим путем.

В одном варианте осуществления обработка поверхности включает обработку микрочастиц водным основанием, например, гидроксидом натрия и растворителем (таким как спирт, например, этанол или метанол, или органический растворитель, такой как DMF, DMSO или этилацетат), как описано выше. Чаще используют основание гидроксид, например, гидроксид калия. Также, может быть использовано органическое основание. В других вариантах осуществления обработку поверхности, как описано выше, осуществляют в водном растворе кислоты, например, соляной кислоты. В одном варианте осуществления обработка поверхности включает обработку микрочастиц забуференным фосфатом физиологическим раствором и этанолом.

В некоторых вариантах осуществления обработку поверхности осуществляют при температуре не выше 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18°C, при пониженной температуре около 5-18°C, около 5-16°C, около 5-15°C, около 0-10°C, около 0-8°C или около 1-5°C, около 5-20°C, около 1-10°C, около 0-15°C, около 0-10°C, около 1-8°C или около 1-5°C. Каждая комбинация каждого из этих условий считается независимо раскрытой, как если бы каждая комбинация была указана отдельно.

Значение pH для обработки поверхности будет, разумеется, изменяться в зависимости от того, проводится ли обработка в основных, нейтральных или кислотных условиях. При проведении обработки в основном значении pH может варьировать в диапазоне от около 7,5 до около 14, включая значения не больше, чем около 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14. При проведении обработки в кислоте значение pH может

варьировать в диапазоне от около 6,5 до около 1, включая значения не ниже 1, 2, 3, 4, 5 или 6. При проведении обработки в нейтральных условиях значение pH обычно варьирует в диапазоне от около 6,4 или 6,5 до около 7,4 или 7,5.

Ключевым аспектом настоящего изобретения является то, что обработка, независимо от ее проведения в основных, нейтральных или кислых условиях, включает выбор комбинации времени, температуры, pH-агента и растворителя, которая обеспечивает мягкую обработку, не вызывающую значительного повреждения частицы, при которой образуются поры, отверстия или каналы. Каждая комбинация каждого из этих условий считается независимо раскрытой, как если бы каждая комбинация была указана отдельно.

Условия обработки должны обеспечивать лишь мягкую обработку поверхности таким способом, который позволяет частицам оставаться в виде твердых частиц, быть подходящими для инъекции без возникновения агрегации или скапливания, и образовывать по меньшей мере одну агрегатную частицу размером по меньшей мере 500 мкм.

В одном варианте осуществления обработка поверхности включает обработку микрочастиц водным раствором с pH от 6,6 до 7,4 или 7,5 и этанолом при пониженной температуре в интервале от около 1 до около 10°C, от около 1 до около 15°C, от около 5 до около 15°C или от около 0 до около 5°C. В одном варианте осуществления обработка поверхности включает обработку микрочастиц водным раствором с pH от 6,6 до 7,4 или 7,5 и органическим растворителем при пониженной температуре в интервале от около 0 до около 10°C, от около 5 до около 8°C или от около 0 до около 5°C. В одном варианте осуществления обработка поверхности включает обработку микрочастиц водным раствором с pH от 1 до 6,6 и этанолом при пониженной температуре в интервале от около 0 до около 10°C, от около 0 до около 8°C или от около 0 до около 5°C. В одном варианте осуществления обработка поверхности включает обработку микрочастиц органическим растворителем при пониженной температуре в интервале от около 0 до около 18°C, от около 0 до около 16°C, от около 0 до около 15°C, от около 0 до около 10°C, от около 0 до около 8°C или от около 0 до около 5°C. Пониженная температура обработки (ниже комнатной температуры и, как правило, ниже 18°C) помогает обеспечить "мягкую" обработку поверхности частиц.

Фармацевтические и биологические терапевтические агенты могут быть доставлены контролируемым образом с использованием изобретения. В одном варианте осуществления фармацевтический агент представляет собой ингибитор тирозинкиназы, такой как сунитиниб. Одной из целей изобретения является обеспечение замедленного высвобождения фармацевтически активных соединений в глазу и, в частности, в задней части глаза, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере около одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи месяцев или более, таким образом, чтобы поддерживать по меньшей мере концентрацию лекарственного средства в глазу, которая является эффективной для лечения нарушения. В одном варианте осуществления лекарственное средство вводят в микрочастицу с обработанной поверхностью, которая обеспечивает замедленное высвобождение, являющееся по существу линейным. В другом варианте осуществления высвобождение не является линейным; однако даже самая низкая концентрация высвобождения в течение заданного периода времени находится на уровне терапевтически эффективной дозы или выше.

В одном варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает поли(молочную-со-глицоловую кислоту) (PLGA). В другом варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает полимер или сополимер, который содержит по меньшей мере PLGA и PLGA-полиэтиленгликоль (PEG) (называемый как PLGA-PEG). В одном варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает поли(молочную кислоту) (PLA). В другом варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает полимер или сополимер, который содержит по меньшей мере PLA и PLA-полиэтиленгликоль (PEG) (называемый как PLA-PEG). В одном варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает поликапролактон (PCL). В другом варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает полимер или сополимер, который содержит по меньшей мере PCL и PCL-полиэтиленгликоль (PEG) (называемый как PCL-PEG). В другом варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает по меньшей мере PLGA, PLGA-PEG и поливиниловый спирт (PVA). В другом варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает по меньшей мере PLA, PLA-PEG и поливиниловый спирт (PVA). В другом варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью включает по меньшей мере PCL, PCL-PEG и поливиниловый спирт (PVA). В других вариантах осуществления любая комбинация PLA, PLGA или PCL может быть смешана с любой комбинацией PLA-PEG, PLGA-PEG или PCL-PEG с PVA или без PVA, и каждая комбинация каждого из этих условий считается независимо раскрытой, как если бы каждая из них была указана отдельно.

В одном варианте осуществления поливиниловый спирт представляет собой частично гидролизованный поливинилацетат. Например, поливинилацетат является по меньшей мере на около 78% гидролизированным, так что поливинилацетат является по существу гидролизированным. В одном примере поливинилацетат является гидролизированным по меньшей мере на около 88-98%, так что поливинилацетат является по существу гидролизированным.

В одном варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью, включающая фар-

мацевтически активное соединение, содержит от около 80 или 89 процентов до около 99 процентов PLGA, например, по меньшей мере, около 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов PLGA. В других вариантах осуществления PLA или PCL используют вместо PLGA. В еще других вариантах осуществления используют комбинацию PLA, PLGA и/или PCL.

В некоторых примерах микрочастица с обработанной поверхностью содержит от около 0,5 до около 10% PLGA-PEG, от около 0,5 до около 5% PLGA-PEG, от около 0,5 до около 4% PLGA-PEG, от около 0,5 до около 3% PLGA-PEG, или от около 0,1% до около 1, 2, 5 или 10 % PLGA-PEG. В других вариантах осуществления PLA-PEG или PCL-PEG используют вместо PLGA-PEG. В других вариантах осуществления любую комбинацию PLGA-PEG, PLA-PEG или PCL-PEG используют в полимерной композиции с любой комбинацией PLGA, PLA или PCL. Каждая комбинация считается специально описанной, как если бы она была представлена здесь отдельно. В одном варианте осуществления полимерная композиция включает до около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 или 14% выбранного пегилированного полимера.

В некоторых примерах микрочастица содержит от около 0,01 до около 0,5% PVA (поливиниловый спирт), от около 0,05 до около 0,5% PVA, от около 0,1 до около 0,5% PVA или от около 0,25 до около 0,5% PVA. В некоторых примерах микрочастица содержит от около 0,001 до около 1% PVA, от около 0,005 до около 1% PVA, от около 0,075 до около 1% PVA или от около 0,085 до около 1% PVA. В некоторых примерах микрочастица содержит от около 0,01 до около 5,0% PVA, от около 0,05 до около 5,0% PVA, от около 0,1 до около 5,0% PVA, от около 0,5 до около 5,0% PVA. В некоторых примерах микрочастица содержит от около 0,10 до около 1,0% PVA или от около 0,50 до около 1,0%. В некоторых вариантах осуществления микрочастица содержит до около 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40 или 0,5% PVA. Можно использовать PVA с любой молекулярной массой, которые достигают желаемых результатов. В одном варианте осуществления PVA имеет молекулярную массу до около 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления PVA представляет собой частично гидролизированный поливинилацетат, включая, но без ограничения, до около 70, 75, 80, 85, 88, 90 или даже 95% гидролизованного поливинилацетата. В одном варианте осуществления PVA представляет собой около 88% гидролизированный поливинилацетат. В одном варианте осуществления полимер ПВА имеет массу молекулы от 20000 до 40000 г/моль. В одном варианте осуществления полимер PVA имеет молекулярную массу от 24000 до 35000 г/моль.

В одном варианте осуществления полимер PLGA имеет молекулярную массу от 30000 до 60000 г/моль (также килодальтон, кДа или кД). В одном варианте осуществления полимер PLGA имеет молекулярную массу от 40000 до 50000 г/моль (например, 40000, 45000 или 50000 г/моль). В одном варианте осуществления полимер PLA имеет молекулярную массу от 30000 до 60000 г/моль (например, 40000; 45000 или 50000 г/моль). В одном варианте осуществления полимер PCL используется в том же диапазоне кДа, как описано для PLGA или PLA.

В одном варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью содержит фармацевтически активное соединение. Эффективность инкапсулирования фармацевтически активного соединения в микрочастице может широко варьироваться в зависимости от конкретных условий образования микрочастиц и свойств терапевтического агента, например, от около 20% до около 90%, от около 40% до около 85%, от около 50% до около 75%. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсулирования составляет, например, до около 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80%.

Количество фармацевтически активного соединения в микрочастице с обработанной поверхностью зависит от молекулярной массы, активности и фармакокинетических свойств фармацевтически активного соединения.

В одном варианте осуществления фармацевтически активное соединение присутствует в количестве от по меньшей мере 1,0 мас.% до около 40 мас.%, исходя из общей массы микрочастицы с обработанной поверхностью. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически активное соединение присутствует в количестве от по меньшей мере 1,0 мас.% до около 35 мас.%, от по меньшей мере 1,0 мас.% до около 30 мас.%, от по меньшей мере 1,0 мас.% до около 25 мас.% или от по меньшей мере 1,0 мас.% до около 20 мас.%, исходя из общей массы микрочастицы с обработанной поверхностью. Неограничивающими примерами массы активного вещества в микрочастице являются по меньшей мере около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 масс.%. В одном примере микрочастица содержит около 10 мас.% активного соединения.

В одном варианте осуществления в изобретении предлагается способ получения микрочастицы, содержащей микрочастицу и фармацевтически активное соединение, инкапсулированное в микрочастице; при этом способ включает:

(a) получение раствора или суспензии (органическая фаза), содержащей: (i) PLGA или PLA; (ii) PLGA-PEG или PLA-PEG; (iii) фармацевтически активное соединение; и (iv) один или более органических растворителей;

(b) получение эмульсии в водном растворе поливинилового спирта (PVA) (водная фаза) путем добавления органической фазы в водную фазу и перемешивания со скоростью от около 3000 до около 10000 об/мин в течение от около 1 до около 30 мин;

(c) отверждение эмульсии, содержащей насыщенные растворителем микрочастицы, включающие

фармацевтически активное соединение, путем перемешивания при примерно комнатной температуре по существу до полного испарения растворителя;

(d) центрифугирование микрочастицы, включающей фармацевтически активное соединение;

(e) удаление растворителя и промывку водой микрочастицы, включающей фармацевтически активное соединение;

(f) фильтрацию микрочастицы, включающей фармацевтически активное соединение, для удаления агрегатов или частиц, размер которых превышает требуемый размер;

(g) необязательно лиофилизацию микрочастицы, содержащей фармацевтически активное соединение, и хранение микрочастицы в виде сухого порошка таким образом, чтобы сохранить стабильность в течение около 6, 8, 10, 12, 20, 22 или 24 месяцев или более.

I. Терминология.

Хотя в настоящем документе используются специфические термины, они используются только в общем и описательном смысле, а не в целях ограничения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистом в области, к которой относится описанный выше объект изобретения.

Соединения описаны с использованием стандартной номенклатуры. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение.

Артикли "a" и "an" не означают ограничения количества, а скорее относятся к присутствию по меньшей мере одного из названных наименований.

Указание диапазонов значений служит лишь в качестве сокращенного способа индивидуального обращения к каждому отдельному значению, попадающему в диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно указано в настоящем документе. Конечные точки всех диапазонов включены в диапазон и независимо комбинируются. Все описанные здесь способы могут быть выполнены в подходящем порядке, если здесь не указано иное или иным образом явно противоречит контексту. Использование примеров или иллюстративного языка (например, "такой как") предназначено просто для лучшей иллюстрации изобретения и не означает ограничения объема изобретения, если не заявлено иное.

Термин "носитель" относится к разбавителю, вспомогательному веществу или наполнителю.

"Лекарственная форма" означает единицу введения композиции, которая включает микрочастицу с обработанной поверхностью и терапевтически активное соединение. Примеры лекарственных форм включают инъекции, суспензии, жидкости, эмульсии, имплантаты, частицы, сферы, кремы, мази, ингаляционные формы, трансдермальные формы, буккальные формы, сублингвальные формы, местные формы, гель, мукозальные формы и т.п. "Лекарственная форма" также может включать, например, микрочастицу с обработанной поверхностью, содержащую фармацевтически активное соединение в носителе.

Термин "микрочастица" означает частицу, размер которой измеряется в микрометрах (мкм). Обычно микрочастица имеет средний диаметр от около 1 мкм до около 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления микрочастица имеет средний диаметр от около 1 до около 60 мкм, например, от около 1 до около 40 мкм; от около 10 до около 40 мкм; от около 20 до около 40 мкм; от около 25 до около 40 мкм; от около 20 до около 35 мкм. Например, микрочастица может иметь средний диаметр 20-40 мкм. Используемый здесь термин "микросфера" означает, по существу, сферическую микрочастицу.

"Пациент" или "хозяин" или "субъект" представляет собой, как правило, человека, однако в более широком смысле может представлять собой млекопитающее. В альтернативном варианте осуществления это может относиться, например, к корове, овце, козе, лошади, собаке, кошке, кролику, крысы, мыши, птице и т.п.

Термин "мягкая" или "мягко" при использовании для описания модификации поверхности микрочастиц означает, что модификация (как правило, удаление поверхностно-активного вещества с поверхности, в отличие от внутренней сердцевины частицы) является менее строгой, выраженной или обширной, чем при осуществлении при комнатной температуре в тех же условиях. Как правило, модификацию поверхности твердых микрочастиц согласно настоящему изобретению осуществляют таким способом, при котором не происходит образования значительных каналов или больших пор, которые будут значительно ускорять деградацию микрочастицы *in vivo*, но, в то же время, служат для умягчения и уменьшения гидрофильности поверхности для содействия агрегации *in vivo*.

Термин "твердый", используемый для характеристики микрочастицы с мягко обработанной поверхностью, означает, что частица является по существу непрерывной по структуре материала, в отличие от гетерогенной со значительными каналами и крупными порами, нежелательным образом сокращающими время биodeградации.

II. Агрегирующие микрочастицы с мягко обработанной поверхностью и способы.

В настоящем изобретении предлагаются твердые биоразлагаемые микрочастицы с мягко обработанной поверхностью, которые при инъекции *in vivo* агрегируют в более крупную частицу (гранулу) таким образом, что уменьшаются нежелательные побочные эффекты более мелких частиц, и являются подходящими для длительной (например, до трех месяцев или по меньшей мере трех месяцев, до четы-

рех месяцев, до пяти месяцев, до шести месяцев, до семи месяцев или в течение более длительного периода) доставки терапевтического агента с замедленным высвобождением. В одном варианте осуществления твердые биоразлагаемые микрочастицы с мягко обработанной поверхностью являются подходящими для инъекции в глаза, при которой частицы агрегируют с образованием гранулы и, таким образом, остаются вне зрительной оси, значительно не нарушая зрение. Частицы могут агрегировать в одну или более гранул. Размер агрегата зависит от массы (веса) вводимых частиц.

Биоразлагаемые микрочастицы с мягко обработанной поверхностью, предлагаемые в настоящем документе, отличаются от "каркасных" микрочастиц, используемых для повторного роста ткани через поры, которые могут занимать клетки или тканевый материал. Напротив, рассматриваемые микрочастицы разработаны так, что представляют собой твердые материалы достаточно низкой пористости, что позволяет им агрегировать с образованием более крупной объединенной частицы, которая эродирует в первую очередь путем эрозии поверхности, для длительной контролируемой доставки лекарственного средства.

Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы согласно настоящему изобретению являются подходящими, например, для интравитреальной инъекции, имплантата, периокулярной доставки или доставки *in vivo* вне глаза.

Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы согласно настоящему изобретению также являются подходящими для системной, парентеральной, трансмембранной, трансдермальной, буккальной, подкожной, эндосинусальной, внутрибрюшинной, внутрисуставной, внутрихрящевой, внутримозговой, внутрикороной, зубной, междисковой, внутримышечной, внутриопухолевой, местной или вагинальной доставки любым способом, полезным для доставки *in vivo*.

В одном варианте осуществления изобретение, таким образом, относится к поверхностно-модифицированным твердым агрегирующим микрочастицам, которые включают по меньшей мере один биоразлагаемый полимер, при этом поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы имеют твердую сердцевину, включают терапевтический агент, имеют модифицированную поверхность, обработанную в мягких условиях при температуре около 18°C или ниже для удаления поверхностного поверхностно-активного вещества, являются достаточно малыми для инъекции *in vivo* и агрегируют *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм *in vivo* таким способом, который обеспечивают доставку лекарственного средства с замедленным высвобождением *in vivo* в течение по меньшей мере одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи месяцев или более. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы являются подходящими, например, для интравитреальной инъекции, имплантата, включая глазной имплантат, периокулярной доставки или доставки *in vivo* вне глаза.

Альтернативно, обработку поверхности осуществляют при температуре около 10°C, 8°C или 5°C, или ниже.

Обработку поверхности можно проводить при любом значении pH, которое достигает желаемой цели. Неограничивающие примеры значений pH находятся в диапазоне от около 6 до около 8, от около 6,5 до около 7,5, от около 1 до около 4; от около 4 до около 6; и от около 6 до около 8. В одном варианте осуществления обработку поверхности проводят при pH в диапазоне от около 8 до около 10. В одном варианте осуществления обработку поверхности можно проводить при pH в диапазоне от около 10,0 до около 13,0. В одном варианте осуществления обработку поверхности можно проводить при pH в диапазоне от около 12 до около 14. В одном варианте осуществления обработку поверхности можно проводить с использованием органического растворителя. В одном варианте осуществления обработку поверхности можно проводить с использованием этанола. В других вариантах осуществления обработку поверхности проводят в растворителе, выбранном из метанола, этилацетата и этанола. Неограничивающими примерами являются этанол с водным органическим основанием; этанол и водное неорганическое основание; этанол и гидроксид натрия; этанол и гидроксид калия; водный кислый раствор в этаноле; водная соляная кислота в этаноле; и водный хлорид калия в этаноле.

Примеры твердых сердцевин, включенных в настоящее изобретение, включают твердые сердцевины, содержащие биоразлагаемый полимер с пористостью менее чем 10%, с пористостью 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2%. Пористость, используемая в настоящем документе, определяется соотношением объема пустот к общему объему поверхностно-модифицированной твердой агрегирующей микрочастицы.

Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы согласно настоящему изобретению обеспечивают доставку с замедленным высвобождением в течение по меньшей мере одного месяца или по меньшей мере двух месяцев, или по меньшей мере трех месяцев, или по меньшей мере четырех месяцев, или по меньшей мере пяти месяцев, или по меньшей мере шести месяцев, или по меньшей мере семи месяцев.

Терапевтический агент, доставляемый поверхностно-модифицированной твердой агрегирующей микрочастицей, представляет собой в одном варианте осуществления фармацевтическое или биологическое лекарственное средство. В неограничивающих примерах фармацевтические лекарственные средства включают сунитиниб, другой ингибитор тирозинкиназы, противовоспалительное лекарственное средство, антибиотик, иммуносуппрессивный агент, анти-VEGF агент, анти-PDGF агент или другие терапевти-

ческие агенты, как описано ниже.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированная твердая агрегирующая микро-частица имеет средний диаметр в диапазоне 10-60 мкм, 20-50 мкм, 20-40 мкм, 20-30 мкм, 25-40 мкм или 25-35 мкм.

Кроме того, поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы раскрытого изобретения могут агрегировать с образованием по меньшей мере одной гранулы при введении *in vivo* с диаметром по меньшей мере 300 мкм, 400 мкм, 500 мкм, 600 мкм, 700 мкм, 1 мм, 1,5 мм, 2 мм, 3 мм, 4 мм или 5 мм.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микро-частицы согласно настоящему изобретению образуют гранулу *in vivo*, которая высвобождает терапевтический агент без "взрывного" эффекта, составляющего более чем около 10 или 15% от общей нагрузки, в течение периода времени, составляющего одну неделю, или пять, четыре, три, два или один день.

В некоторых вариантах осуществления длительную контролируемую доставку лекарственного средства осуществляют путем комбинирования эрозии поверхности агрегированной микрочастицы в течение нескольких месяцев (например, одного, двух, трех или четырех месяцев или более) с последующей эрозией остальных частей агрегированной микрочастицы, с последующим медленным высвобождением активного вещества из белков *in vivo*, с которыми он связан, в течение периода длительного высвобождения из агрегированной частицы. В другом варианте осуществления микрочастица значительно деградирует путем эрозии поверхности в течение периода, составляющего по меньшей мере около одного, двух, трех, четырех, пяти или шести месяцев или более.

В другом варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микро-частицы согласно настоящему изобретению имеют нагрузку лекарственным средством 1-40 мас.%, 5-25 мас.% или 5-15 мас.%.

Примеры полимерных композиций, включенных в поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы согласно настоящему изобретению, включают, но без ограничения, поли(лактид-со-гликолид), поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем, более одного биоразлагаемого полимера или сополимера, смешанных вместе, например, смесь поли(лактид-со-гликолида) и поли(лактид-со-гликолида), ковалентно связанного с полиэтиленгликолем, поли(молочную кислоту), поверхностно-активное вещество, такое как поливиниловый спирт (который может представлять собой гидролизированный поливинилацетат).

В другом варианте осуществления в изобретении предлагается инъекционный материал, который включает микрочастицы согласно настоящему изобретению в фармацевтически приемлемом носителе для введения *in vivo*. Инъекционный материал может включать соединение, которое ингибирует агрегацию микрочастиц до инъекции, и/или усилитель вязкости, и/или соль. В одном варианте осуществления инъекционный материал содержит поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микро-частицы при концентрации в диапазоне около 50-700 мг/мл, 500 мг/мл или менее, 400 мг/мл или менее, 300 мг/мл или менее, 200 мг/мл или менее, или 150 мг/мл или менее.

Настоящее изобретение, кроме того, включает способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц, который включает:

(i) первую стадию получения микрочастиц, содержащих один или более биоразлагаемых полимеров, путем растворения или диспергирования полимера(ов) и терапевтического агента в одном или более растворителях с образованием раствора или дисперсии полимера и терапевтического агента, смешивания раствора или дисперсии полимера и терапевтического агента с водной фазой, содержащей поверхностно-активное вещество, с получением насыщенных растворителем микрочастиц, и затем удаления растворителя(ей) с получением микрочастиц, которые содержат терапевтический агент, полимер и поверхностно-активное вещество; и

(ii) вторую стадию мягкой обработки только поверхности микрочастиц, полученных на стадии (i), при температуре около 18°C или ниже в течение необязательно до около 140, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 10, 8, 5, 4, 3, 2 или 1 минуты, агентом, который удаляет поверхностное поверхностно-активное вещество, поверхностные полимеры или поверхностные олигомеры таким образом, что не вызывает значительного образования внутренних пор; и

(iii) изолирование микрочастиц с обработанной поверхностью.

В определенных вариантах осуществления стадию (ii), описанную выше, осуществляют при температуре ниже 17°C, 15°C, 10°C или 5°C. Кроме того, стадию (iii) необязательно проводят при температуре ниже 25°C, ниже 17°C, 15°C, 10°C, 8°C или 5°C. Стадию (ii), например, можно проводить в течение менее 8, менее 6, менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1 мин. В одном варианте осуществления стадию (ii) проводят менее чем за 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мин.

В одном варианте осуществления способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц включает использование агента, который удаляет поверхностное поверхностно-активное вещество. Неограничивающие примеры включают, например, агенты, выбранные из: водного раствора кислоты, забуференного фосфатом физиологического раствора, воды, водного раствора NaOH, водного раствора соляной кислоты, водного раствора хлорида калия, спирта или этанола.

В одном варианте осуществления способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц включает использование агента, удаляющего поверхностное поверхностно-активное вещество, который включает, например, растворитель, выбранный из спирта, например, этанола; эфир, ацетон, ацетонитрил, DMSO, DMF, THF, диметилацетамид, дисульфид углерода, хлороформ, 1,1-дихлорэтан, дихлорметан, этилацетат, гептан, гексан, метанол, метилацетат, метил-трет-бутиловый эфир (MTBE), пентан, пропанол, 2-пропанол, толуол, N-метилпирролидинон (NMP), ацетамид, пиперазин, триэтилендиамин, диолы и CO_2 .

Агент, который удаляет поверхностное поверхностно-активное вещество, может представлять собой щелочной буферный раствор. Кроме того, агент, который удаляет поверхностное поверхностно-активное вещество, может содержать основание, выбранное из гидроксида натрия, гидроксида лития, гидроксида калия, гидроксида кальция, гидроксида магния, амида лития, амида натрия, карбоната бария, гидроксида бария, гидроксида калия, карбоната кальция, карбоната цезия, гидроксида цезия, карбоната лития, карбоната магния, карбоната калия, карбоната натрия, карбоната стронция, аммиака, метиламина, этиламина, пропиламина, изопропиламина, диметиламина, диэтиламина, дипропиламина, диизопропиламина, триметиламина, триэтиламина, трипропиламина, триизопропиламина, анилина, метиланилина, диметиланилина, пиридина, азаюлолидина, бензиламина, метилбензиламина, диметилбензиламина, DABCO, 1,5-диазабицикло[4.3.0]нон-5-ена, 1,8-диазабицикло[5.4.0]нон-7-ена, 2,6-лутидина, морфолина, пиперидина, пиперазина, протонной губки, 1,5,7-триазабицикло[4.4.0]дек-5-ена, трипеленамина, гидроксида аммония, триэтанолamina, этанолamina и Trizma.

В одном варианте осуществления способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц включает использование агента, удаляющего поверхностное поверхностно-активное вещество, например, выбранного из следующих: водный раствор кислоты, забуференный фосфатом физиологический раствор, вода или NaOH в присутствии растворителя, такого как спирт, например, этанол, эфир, ацетон, ацетонитрил, DMSO, DMF, THF, диметилацетамид, дисульфид углерода, хлороформ, 1,1-дихлорэтан, дихлорметан, этилацетат, гептан, гексан, метанол, метилацетат, метил-трет-бутиловый эфир (MTBE), пентан, этанол, пропанол, 2-пропанол, толуол, N-метилпирролидинон (NMP), ацетамид, пиперазин, триэтилендиамин, диолы и CO_2 .

В одном варианте осуществления агент, который удаляет поверхностное поверхностно-активное вещество, может содержать водный раствор кислоты. Агент, удаляющий поверхностное поверхностно-активное вещество, может содержать кислоту имеющую неорганическое происхождение, включая, но без ограничения, хлористоводородную, бромистоводородную, серную, сульфаминовую, фосфорную, азотную и т.п.; или органическое происхождение, включая, но без ограничения, уксусную, пропионовую, янтарную, гликолевую, стеариновую, молочную, яблочную, винную, лимонную, аскорбиновую, палмовую, малеиновую, гидроксималеиновую, фенилуксусную, глутаминовую, бензойную, салициловую, мезиловую, эсировую, бесиловую, сульфаниловую, 2-ацетоксибензойную, фумаровую, толуолсульфоновую, метансульфоновую, этандисульфоновую, щавелевую, изетионовую, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n равно 0-4, и т.п.

В одном варианте осуществления агент, который удаляет поверхностное поверхностно-активное вещество, не представляет собой агент, вызывающий деградацию биоразлагаемого полимера в условиях реакции. Гидрофильность микрочастиц может быть снижена путем удаления поверхностно-активного вещества.

В одном варианте осуществления способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц включает использование агента, удаляющего поверхностное поверхностно-активное вещество, который содержит растворитель, выбранный из спирта, например этанола, эфира, ацетона, ацетонитрила, DMSO, DMF, THF, диметилацетамида, дисульфида углерода, хлороформа, 1,1-дихлорэтана, дихлорметана, этилацетата, гептана, гексана, метанола, метилацетата, метил-трет-бутилового эфира (MTBE), пентана, этанола, пропанола, 2-пропанола, толуола, N-метилпирролидинона (NMP), ацетамида, пиперазина, триэтилендиамина, диолов и CO_2 . В типичном варианте осуществления в способе обработки поверхности применяют агент, удаляющий поверхностное поверхностно-активное вещество, который содержит этанол.

Эффективность инкапсулирования в способе получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц зависит от условий формирования микрочастиц и свойств терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления эффективность инкапсулирования может составлять более чем около 50%, более чем около 75%, более чем около 80% или более чем около 90%.

В одном варианте осуществления способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц включает 75/25 PLGA в качестве биоразлагаемого полимера.

В альтернативном варианте осуществления способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц осуществляют при pH ниже около 14 и выше 12, ниже 12 и выше 10, ниже около 10 и выше 8, ниже около 8 и выше около 6, нейтральном pH, ниже около 7 и выше 4, ниже около 4 и выше около 1,0.

В одном варианте осуществления стадию (ii), описанную выше, проводят в течение менее чем около 140, 120, 110, 100, 90, 60, 40, 30, 20, 10, 3, 2 или 1 мин.

В еще одном варианте осуществления предлагается способ лечения офтальмологического нарушения, который включает введение хозяину, нуждающемуся в этом, поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц, которые включают эффективное количество терапевтического агента, при этом содержащие терапевтический агент поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы поступают путем инъекции в глаз и агрегируют *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм, которая обеспечивает доставку лекарственного средства с замедленным высвобождением в течение по меньшей мере одного, двух или трех, четырех, пяти, шести, семи или более месяцев таким образом, что гранула остается по существу вне зрительной оси, значительно не нарушая зрение.

В альтернативном варианте осуществления массовый процент поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц, которые не агрегированы в более крупную гранулу *in vivo*, составляет около 10% или менее, 7% или менее, 5% или менее или 2% или менее от общей введенной массы.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы не вызывают существенного воспаления в глазу.

В другом варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы не вызывают иммунного ответа в глазу.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные микрочастицы согласно настоящему изобретению, как описано здесь, применяют для лечения заболевания, которое представляет собой глаукому, нарушение, опосредованное карбоангидразой, нарушение или аномалию, связанную с увеличением внутриглазного давления (IOP), нарушение, опосредованное синтазой оксида азота (NOS), или нарушение, требующее нейротропной, такой как регенерации/восстановления зрительных нервов. В другом варианте осуществления, в более общем случае, нарушение, подвергнутое лечению, представляет собой аллергический конъюнктивит, передний увеит, катаракту, сухую или влажную форму возрастной макулярной дегенерации (AMD) или диабетическую ретинопатию.

Предлагается еще один вариант осуществления, который включает введение микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащей эффективное количество фармацевтически активного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе, хозяину для лечения глазного или другого нарушения, который может получить благоприятный эффект в результате местной или локальной доставки. Терапия может представлять собой доставку в переднюю или заднюю камеру глаза. В конкретных аспектах микрочастицу с обработанной поверхностью, содержащую эффективное количество фармацевтически активного соединения, вводят для лечения нарушения роговицы, конъюнктивы, водной опухоли, радужки, цилиарного тела, склеры хрусталика, сосудистой оболочки, пигментного эпителия сетчатки, нейрональной сетчатки, зрительного нерва или опухоли стекловидного тела.

Любую из описанных композиций можно вводить в глаз, как описано далее здесь, в любой желаемой форме введения, в том числе посредством интравитреальных, интрастромальных, внутрикамеральных, субтеноновых, субретинальных, ретробульбарных, перibuльбарных, супрахориоидальных, субхориоидальных, конъюнктивных, субконъюнктивных, эписклеральных, задних околосклеральных, перикорнеальных, носослезных инъекций или через слизь, муцин или слизистый барьер с немедленным или контролируемым высвобождением.

В одном варианте осуществления в изобретении предлагается бета-адренергический антагонист для глазной терапии, который может высвобождаться из микрочастицы с обработанной поверхностью с сохранением эффективности в течение длительного времени, например, по меньшей мере до 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 месяцев.

В одном варианте осуществления в изобретении предлагается аналог простагландина для глазной терапии, который может высвобождаться из микрочастицы с обработанной поверхностью с сохранением эффективности в течение длительного времени, например, по меньшей мере до 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 месяцев.

В одном варианте осуществления в изобретении предлагается адренергический агонист для глазной терапии, который может высвобождаться из микрочастицы с обработанной поверхностью с сохранением эффективности в течение длительного времени, например, по меньшей мере до 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 месяцев.

В одном варианте осуществления в изобретении предлагается ингибитор карбоангидразы для глазной терапии, который может высвобождаться из микрочастицы с обработанной поверхностью с сохранением эффективности в течение длительного времени, например, по меньшей мере до 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 месяцев.

В одном варианте осуществления в изобретении предлагается парасимпатомиметический агент для глазной терапии, который может высвобождаться из микрочастицы с обработанной поверхностью с сохранением эффективности в течение длительного времени, например, по меньшей мере до 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 месяцев.

В одном варианте осуществления в изобретении предлагается дуальный анти-VEGF/анти-PDGF агент для глазной терапии, который может высвобождаться из микрочастицы с обработанной поверхно-

стью с сохранением эффективности в течение длительного времени, например, по меньшей мере до 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 месяцев.

Способы лечения или профилактики офтальмологических нарушений, включая глаукому; нарушение, опосредованное карбоангидразой; нарушение или аномалию, связанную с увеличением внутриглазного давления (IOP); нарушение, опосредованное синтазой оксида азота (NOS); нарушение, требующее нейтропротекции, такой как для регенерации/восстановления зрительных нервов; аллергический конъюнктивит; передней увеит; катаракту; сухую или мокрую форму возрастной макулярной дегенерации (AMD); или диабетическую ретинопатию, включают введение терапевтически эффективного количества микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащей фармацевтически активное соединение, хозяину, в том числе человеку, нуждающемуся в таком лечении. В одном варианте осуществления хозяином является человек.

В другом варианте осуществления эффективное количество микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащей фармацевтически активное соединение, вводят для понижения внутриглазного давления (IOP), вызванного глаукомой. В альтернативном варианте осуществления микрочастицу с обработанной поверхностью, содержащую фармацевтически активное соединение, можно применять для понижения внутриглазного давления (IOP) независимо от связи с глаукомой.

В одном варианте осуществления нарушение связано с повышением внутриглазного давления (IOP), вызванным возможным или ранее слабым соблюдением пациентом режима лечения глаукомы. В еще одном варианте осуществления нарушение связано с возможной или слабой нейтропротекцией посредством нейрональной синтазы оксида азота (NOS). Микрочастица с обработанной поверхностью, содержащая предлагаемое здесь фармацевтически активное соединение, может, таким образом, гасить или ингибировать глаукому у хозяина путем введения эффективного количества подходящим способом хозяину, обычно человеку, нуждающемуся в этом.

Также, предлагаются способы лечения нарушения, связанного с глаукомой, повышенного внутриглазного давления (IOP), повреждения зрительного нерва, вызванного высоким внутриглазным давлением (IOP) или нейрональной синтазой оксида азота (NOS), включающие введение эффективного количества микрочастиц с обработанной поверхностью, содержащих фармацевтически активное соединение.

В одном аспекте настоящего изобретения эффективное количество фармацевтически активного соединения, как описано здесь, включено в микрочастицу с обработанной поверхностью, например, для удобства доставки и/или доставки с замедленным высвобождением. Использование материалов в микрометрической шкале обеспечивает возможность изменения основных физических свойств, таких как растворимость, диффузионная способность и характеристики высвобождения лекарственного средства. Эти микрометрические агенты могут обеспечить более эффективные и/или более удобные пути введения, снизить терапевтическую токсичность, продлить жизненный цикл продукта и в конечном итоге сократить расходы на здравоохранение. В качестве систем доставки терапевтических агентов микрочастицы с обработанной поверхностью могут обеспечить таргетную доставку и замедленное высвобождение.

В другом аспекте настоящего изобретения микрочастица с обработанной поверхностью покрыта поверхностным агентом. Настоящее изобретение, кроме того, включает способ получения микрочастиц с обработанной поверхностью, содержащих фармацевтически активное соединение. Настоящее изобретение, кроме того, включает способы применения микрочастиц с обработанной поверхностью, содержащих фармацевтически активное соединение, для лечения пациента.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, включающие фармацевтически активное соединение, получают путем образования эмульсии и использования колонки с частицами, как описано, например, в US 8916196.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, включающие фармацевтически активное соединение, получают путем использования вибрирующей сетки или микросита.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, включающие фармацевтически активное соединение, получают путем использования просеивания суспензии сквозь сито.

Способы получения микросфер, описанные в настоящем документе, являются подходящими для способов получения, которые ограничивают распределение по размерам полученных частиц. В одном варианте осуществления частицы получают методом распыления материала через форсунку акустическим возбуждением (колебаниями) с получением однородных капель. Поток носителя также можно применять через форсунку, чтобы обеспечить дополнительный контроль над размером капель. Такие способы подробно описаны в следующих публикациях: Berkland, C., K. Kim, et al. (2001). "Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions." *J Control Release* 73(1): 59-74; Berkland, C., M. King, et al. (2002). "Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate." *J Control Release* 82(1): 137-147; Berkland, C., E. Pollauf, et al. (2004). "Uniform double-walled polymer microspheres of controllable shell thickness." *J Control Release* 96(1): 101-111.

В другом варианте осуществления микрочастицы однородного размера могут быть получены с помощью способов, в которых используют микросита желаемого размера. Микросита могут быть использованы непосредственно во время получения, чтобы влиять на размер образующихся микрочастиц, или, альтернативно, после получения для очистки микрочастиц до однородного размера. Микросита могут

быть либо механическими (неорганический материал), либо биологическими по своей природе (органический материал, такой как мембрана). Один из таких способов подробно описан в патенте США № 8100348.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью содержат терапевтически активное соединение и имеют размер частиц $25 < Dv50 < 40$ мкм, $Dv90 < 45$ мкм.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью содержат терапевтически активное соединение и имеют размер частиц $Dv10 > 10$ мкм.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью содержат терапевтически активное соединение и имеют только остаточные растворители, которые являются фармацевтически приемлемыми.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью содержат терапевтически активное соединение и обеспечивают общее высвобождение, составляющее более восьмидесяти процентов на день 14.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью содержат терапевтически активный агент и могут быть введены через шприц с обычной стенкой и иглой 26, 27, 28, 29 или 30 калибра в количестве 200 мг/мл без закупорки шприца.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью содержат терапевтически активный агент и могут быть введены через шприц с тонкой стенкой и иглой 26, 27, 28, 29 или 30 калибра в количестве 200 мг/мл без закупорки шприца.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащие сунитиниб, имеют размер частиц $25 < Dv50 < 40$ мкм, $Dv90 < 45$ мкм.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащие сунитиниб, имеют размер частиц $Dv10 > 10$ мкм.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащие сунитиниб, имеют только остаточные растворители, которые являются фармацевтически приемлемыми.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащие сунитиниб, обеспечивают общее высвобождение, составляющее более восьмидесяти процентов, на день 14.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащие сунитиниб, могут быть введены через шприц с обычной стенкой и иглой 26, 27, 28, 29 или 30 калибра в количестве 200 мг/мл без закупорки шприца.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащие сунитиниб, могут быть введены через шприц с тонкой стенкой и иглой 26, 27, 28, 29 или 30 калибра в количестве 200 мг/мл без закупорки шприца.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащие сунитиниб, имеют уровень эндотоксина менее 0,02 ЕЭ/мг.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащие сунитиниб, имеют уровень бионагрузки менее 10 КОЕ/г.

Биоразлагаемые полимеры

Микрочастицы с обработанной поверхностью могут включать один или более биоразлагаемых полимеров или сополимеров. Полимеры должны быть биосовместимыми, то есть их можно вводить пациенту без возникновения неприемлемого побочного эффекта. Биоразлагаемые полимеры хорошо известны специалистам в данной области и описаны в разнообразной литературе и патентах. Биоразлагаемый полимер или комбинация полимеров может быть выбрана для обеспечения целевых характеристик микрочастиц, включая соответствующий набор гидрофобных и гидрофильных качеств, кинетики полувыведения и деградации *in vivo*, совместимости с терапевтическим агентом, подлежащим доставке, соответствующего поведения в участке инъекции и т.д.

Например, специалисту в данной области должно быть понятно, что при получении микрочастицы из множества полимеров с различными соотношениями гидрофобных, гидрофильных свойств и способностями к биологическому разложению, свойства микрочастицы могут быть разработаны для таргетного применения. В качестве иллюстрации микрочастица, полученная с использованием 90% PLGA и 10% PEG, является более гидрофильной, чем микрочастица, полученная с использованием 95% PLGA и 5% PEG. Кроме того, микрочастица, полученная с более высоким содержанием менее биоразлагаемого полимера, будет, как правило, разлагаться более медленно. Эта гибкость позволяет адаптировать микрочастицы согласно настоящему изобретению к желаемому уровню растворимости, скорости высвобождения фармацевтического агента и скорости деградации.

В некоторых вариантах осуществления микрочастица включает поли(а-гидроксикислоту). Примеры поли(а-гидроксикислот) включают полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), поли(D,L-лактид-со-гликолид) (PLGA) и поли-D,L-молочную кислоту (PDLLA), сложные полиэфиры, поли(ε-капролактон), поли(3-гидроксибутират), поли(s-капроновую кислоту), поли(п-диоксанон), поли(пропиленфумарат), поли(ортоэфир), полиол/дикетен ацетали, аддитивные полимеры, полиангидриды, поли(себацониновый ангидрид) (PSA), поли(карбоксибис-карбоксифеноксифосфазен) (PCPP), поли[бис(п-карбоксифеноксид)метан] (PCPM), сополимеры SA, CPP и CPM (как описано в Tamat and Langer

in Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 3, 315-353, 1992 и Domb in Chapter 8 of The Handbook of Biodegradable Polymers, Editors Domb A J and Wiseman R M, Harwood Academic Publishers), и поли(аминокислоты).

В одном варианте осуществления микрочастица включает около по меньшей мере 90 процентов гидрофобного полимера и около не более 10 процентов гидрофильного полимера. Примеры гидрофобных полимеров включают сложные полиэфиры, такие как полимолочная кислота (PLA), полигликолевая кислота (PGA), поли(D,L-лактид-со-гликолид) (PLGA) и поли-D,L-молочная кислота (PDLLA); поликапролактон; полиангидриды, такие как полисебациновый ангидрид, поли(малеиновый ангидрид); и их сополимеры. Примеры гидрофильных полимеров включают поли(алкиленгликоли), такие как полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленоксид (PEO) и поли(этиленгликоль)амин; полисахариды; поли(виниловый спирт) (PVA); полипирролидон; полиакриламид (PAM); полиэтиленимин (PEI); поли(акриловую кислоту); поли(винилпирролидон) (PVP); или его сополимер.

В одном варианте осуществления микрочастица включает около по меньшей мере 85% гидрофобного полимера и не более 15% гидрофильного полимера.

В одном варианте осуществления микрочастица включает около по меньшей мере 80% гидрофобного полимера и не более 20% гидрофильного полимера.

В одном варианте осуществления микрочастица включает PLGA.

В одном варианте осуществления микрочастица включает сополимер PLGA и PEG.

В одном варианте микрочастица включает сополимер PLA и PEG.

В одном варианте осуществления микрочастица содержит PLGA и PLGA-PEG, и их комбинации.

В одном варианте осуществления микрочастица содержит PLA и PLA-PEG.

В одном варианте осуществления микрочастица включает PVA.

В одном варианте осуществления микрочастицы включают PLGA, PLGA-PEG, PVA или их комбинации.

В одном варианте осуществления микрочастицы включают биосовместимые полимеры PLA, PLA-PEG, PVA или их комбинации.

В одном варианте осуществления микрочастицы имеют средний размер от около 25 мкм до около 30 мкм и медианный размер от около 29 мкм до около 31 мкм перед обработкой поверхности.

В одном варианте осуществления микрочастицы после обработки поверхности имеют примерно одинаковый средний размер и медианный размер. В другом варианте осуществления микрочастицы после обработки поверхности имеют средний размер, который больше, чем медианный размер. В другом варианте осуществления микрочастицы после обработки поверхности имеют средний размер, который меньше, чем медианный размер.

В одном варианте осуществления микрочастицы имеют средний размер от около 25 мкм до около 30 мкм или от 30 мкм до 33 мкм, и медианный размер от около 31 мкм до около 33 мкм после обработки поверхности приблизительно от 0,0075 M NaOH/этанол до 0,75 M NaOH/этанол (30:70, объем/объем).

В одном варианте осуществления микрочастицы имеют средний размер от около 25 мкм до около 30 мкм или от 30 мкм до 33 мкм, и медианный размер от около 31 мкм до около 33 мкм после обработки поверхности приблизительно от 0,75 M NaOH/этанол до 2,5 M NaOH/этанол (30:70, объем/объем).

В одном варианте осуществления микрочастицы имеют средний размер от около 25 мкм до около 30 мкм или от 30 мкм до 33 мкм, и медианный размер от около 31 мкм до около 33 мкм после обработки поверхности приблизительно от 0,0075 M HCl/этанол до 0,75 M NaOH/этанол (30:70, объем/объем).

В одном варианте осуществления микрочастицы имеют средний размер от около 25 мкм до около 30 мкм или от 30 до 33 мкм и медианный размер от около 31 мкм до около 33 мкм после обработки поверхности приблизительно от 0,75 M NaOH/этанол до 2,5 M HCl/этанол (30:70, объем/объем).

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированную твердую агрегирующую микрочастицу изготавливают с использованием влажной микрочастицы.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированная твердая агрегирующая микрочастица может высвобождать терапевтический агент в течение более длительного периода времени по сравнению с микрочастицей с необработанной поверхностью.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированная твердая агрегирующая микрочастица содержит меньше поверхностно-активного вещества, чем микрочастица до модификации поверхности.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированная твердая агрегирующая микрочастица является более гидрофобной, чем микрочастица до модификации поверхности.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированная твердая агрегирующая микрочастица является менее воспалительной, чем микрочастица с необработанной поверхностью.

В одном варианте осуществления агент, который удаляет поверхностное поверхностно-активное вещество из поверхностно-модифицированной твердой агрегирующей микрочастицы, представляет собой растворитель, который частично растворяет поверхностно-модифицированную твердую агрегирующую микрочастицу или вызывает ее набухание.

В одном аспекте настоящего изобретения эффективное количество фармацевтически активного со-

единения, как описано здесь, вводят в микрочастицу с обработанной поверхностью, например, для удобства доставки и/или доставки с замедленным высвобождением. Использование материалов обеспечивает возможность изменять основные физические свойства, такие как растворимость, диффузионную способность и характеристики высвобождения лекарственного средства. Эти микрометрические агенты могут обеспечить более эффективные и/или более удобные пути введения, снизить терапевтическую токсичность, продлить жизненный цикл продукта и в конечном итоге сократить расходы на здравоохранение. В качестве терапевтических систем доставки микрочастицы с обработанной поверхностью могут обеспечить таргетную доставку и замедленное высвобождение.

Поверхностно-активные вещества

В одном варианте осуществления получение микрочастицы включает использование поверхностно-активного вещества. Примеры поверхностно-активных веществ включают, например, полиоксиэтиленгликоль, полиоксипропиленгликоль, децилглюкозид, лаурилглюкозид, октилглюкозид, октилфенол полиоксиэтиленгликоля, Triton X-100, глицериновый алкиловый эфир, глицериллаурат, кокамид MEA, кокамид DEA, додецилдиметиламинооксид и полочкамеры. Примеры полочкамеров включают полочкамеры 188, 237, 338 и 407. Эти полочкамеры доступны под торговым названием Pluronic® (доступны от фирмы BASF, Mount Olive, N.J.) и соответствуют Pluronic® F-68, F-87, F-108 и F-127, соответственно. Полочкамер 188 (соответствующий Pluronic® F-68) представляет собой блоксополимер со средней молекулярной массой от около 7000 Да до около 10000 Да или от около 8000 Да до около 9000 Да, или около 8400 Да. Полочкамер 237 (соответствующий Pluronic® F-87) представляет собой блоксополимер со средней молекулярной массой от около 6000 Да до около 9000 Да или от около 6500 Да до около 8000 Да, или около 7700 Да. Полочкамер 338 (соответствующий Pluronic® F-108) представляет собой блоксополимер со средней молекулярной массой от около 12000 Да до около 18000 Да или от около 13000 Да до около 15000 Да, или около 14600 Да. Полочкамер 407 (соответствующий Pluronic® F-127) представляет собой сложный триблоксополимер полиоксиэтилена-полиоксипропилена в соотношении от около E101 P56 E101 до около E106 P70 E106 или около E101 P56 E101 или около E106 P70 E106 со средней молекулярной массой от около 10000 Да до около 15000 Да, или от около 12000 Да до около 14000 Да, или от около 12000 Да до около 13000 Да или около 12600 Да.

Дополнительные примеры поверхностно-активных веществ, которые могут быть использованы в изобретении, включают, но без ограничения, поливиниловый спирт (который может представлять собой гидролизированный поливинилацетат), поливинилацетат, витамин E-TPGS, полочкамеры, натриевую соль холевой кислоты, диоктилсульфосукцинат натрия, гексадецилтриметил аммония бромид, сапонин, TWEEN® 20, TWEEN® 80, сложные эфиры Сахаров, серии Triton X, L-а-фосфатидилхолин (PC), 1,2-дипальмитоилфосфатидихолин (DPPC), олеиновую кислоту, сорбитан триолеат, сорбитан моноолеат, сорбитан монолаурат, полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат, полиоксиэтилен (20) сорбитан моноолеат, природный лецитин, олеиловый эфир полиоксиэтилена (2), стеариловый эфир полиоксиэтилена (2), лауриловый эфир полиоксиэтилена (4), блок-сополимеры оксиэтилена и оксипропилена, синтетический лецитин, диэтиленгликоль диолеат, тетрагидрофурурил олеат, этилолеат, изопропилмиристат, глицерилмоноолеат, глицерилмоностеарат, глицерилмонорицинолеат, цетиловый спирт, стеариловый спирт, цетилпиридиния хлорид, бензалкония хлорид, оливковое масло, глицерилмонолаурат, кукурузное масло, масло хлопкового семени, масло семян подсолнечника, лецитин, олеиновую кислоту и триолеат сорбитана.

Специалисту в данной области должно быть понятно, что некоторые поверхностно-активные вещества могут быть использованы в качестве полимеров при получении микрочастицы. Специалисту в данной области также должно быть понятно, что в некоторых случаях получения микрочастицы может сохранять незначительное количество поверхностно-активного вещества, которое позволяет дополнительно модифицировать по желанию свойства.

III. Примеры нарушений, подлежащих лечению.

В одном варианте осуществления композиция включает микрочастицу с обработанной поверхностью, которая содержит: микрочастицу с обработанной поверхностью и фармацевтически активное соединение, инкапсулированное в микрочастицу с обработанной поверхностью, необязательно в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, вспомогательным веществом или разбавителем. В одном варианте осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию для лечения глазного нарушения или заболевания.

Неограничивающие примеры глазных нарушений или заболеваний, которые можно лечить с помощью композиции, включают возрастную макулярную дегенерацию, щелочной эрозивный кератоконъюнктивит, аллергический конъюнктивит, аллергический кератит, передний увеит, болезнь Бехчета, блефарит, разрушение гематоофтальмического барьера, хориоидит, хронический увеит, конъюнктивит, контактный индуцированный линзами кератоконъюнктивит, эрозию роговицы, травму роговицы, язву роговицы, кристаллическую ретинопатию, цистойдный макулярный отек, дакриоцистит, диабетическую кератопатию, диабетический макулярный отек, диабетическую ретинопатию, сухость глаз, сухую форму возрастной макулярной дегенерации, эозинофильную гранулему, эписклерит, экссудативный макуляр-

ный отек, дистрофию Фукса, гигантоклеточный артериит, гигантский папиллярный конъюнктивит, глаукому, неудачную антиглаукомную операцию, отторжение трансплантата, герпес зостер, воспаление после операции по удалению катаракты, иридокорнеальный эндотелиальный синдром, воспаление радужной оболочки, сухой кератоконъюнктивит, воспалительное заболевание кератоконъюнктивит, кератоконус, решетчатую дистрофию, дистрофию Когана, некротический кератит, неоваскулярные заболевания, связанные с сетчаткой, увеальным трактом или роговой оболочкой, например, неоваскулярную глаукому, неоваскуляризацию роговой оболочки, неоваскуляризацию, возникшую в результате комбинированной витректомии и ленсэктомии, неоваскуляризацию зрительного нерва и неоваскуляризацию вследствие проникающей травмы глаза или контузионной травмы глаза, нейропаралитический кератит, неинфекционный увеит, герпес глаз, лимфому глаз, глазной розацеа, офтальмологические инфекции, глазной пемфигрид, неврит зрительного нерва, панувеит, папиллит, парспланит, персистирующий отек макулы, фактоанафилаксию, задний увеит, послеоперационное воспаление, пролиферативную диабетическую ретинопатию, пролиферативную серповидно-клеточную ретинопатию, пролиферативную витреоретинопатию, окклюзию центральной артерии сетчатки, отслойку сетчатки, пигментный ретинит, ретинопатию недоношенных, рубцов радужной оболочки, склерит, синдром Стивенса-Джонсона, симпатическую офтальмию, височный артериит, офтальмопатию, связанную с заболеванием щитовидной железы, увеит, весенний конъюнктивит, кератомалицию, вызванную недостаточностью витамина А, витрит и влажную форму возрастной макулярной дегенерации сетчатки.

IV. Терапевтически активные агенты, подлежащие доставке.

Широкое разнообразие терапевтических агентов может быть доставлено в течение длительного времени с замедленным высвобождением *in vivo* с использованием настоящего изобретения.

"Терапевтически эффективное количество" фармацевтической композиции/комбинации согласно данному изобретению означает количество, которое при введении пациенту является эффективным для обеспечения терапевтического эффекта, такого как ослабление симптомов выбранного нарушения, как правило, офтальмологического нарушения. В некоторых аспектах нарушение представляет собой глаукому, нарушение, опосредованное карбоангидразой, нарушение или аномалию, связанную с увеличением внутриглазного давления (IOP), нарушение, опосредованное синтазой оксида азота (NOS), нарушение, требующее нейропротекции, такой как регенерация/восстановление зрительных нервов, аллергический конъюнктивит, передний увеит, катаракты, сухую или влажную форму возрастной макулярной дегенерации (AMD), или диабетическую ретинопатию.

"Фармацевтически приемлемая соль" образуется, когда терапевтически активное соединение модифицируют путем получения его неорганической или органической, нетоксичной, кислотной- или основно-аддитивной соли. Соли могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группу, с помощью обычных химических способов. Обычно такую соль можно получить реакцией свободной кислотной формы соединения со стехиометрическим количеством соответствующего основания (такого как гидроксид, карбонат, бикарбонат или т.п. Na, Ca, Mg или K) или путем реакции свободной основной формы соединения со стехиометрическим количеством соответствующей кислоты. Такие реакции обычно проводят в воде или в органическом растворителе, или их смеси. Как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются типичными, когда это возможно на практике. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения, минеральные или органические кислотные соли основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислых остатков, таких как карбоновые кислоты; и подобные. Фармацевтически приемлемые соли включают обычные нетоксичные соли и четвертичные аммониевые соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Например, обычные нетоксичные кислотные соли включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и подобные; и соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, палмовая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, мезиловая (метансульфоновая), этиловая (этансульфоновая), бензиловая (бензолсульфоновая), сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изетионовая, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n равно 0-4, и подобных. Перечень дополнительных подходящих солей можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., P. 1418 (1985).

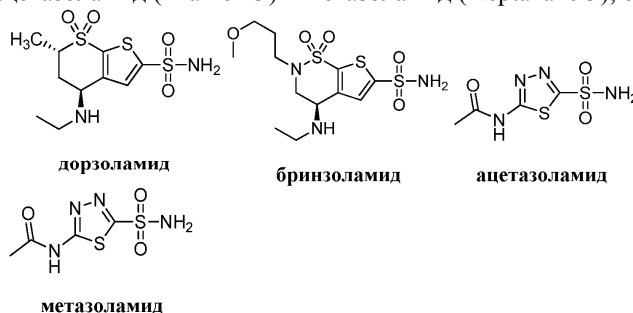
В одном варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью согласно настоящему изобретению может содержать соединение для лечения глаукомы, например, бета-адренергические антагонисты, аналог простагландина, адренергический агонист, ингибитор карбоангидразы, парасимпатомиметический агент, двойное терапевтическое средство, направленное против VEGF/PDGF, или двойной ингибитор киназы с лейциновыми застёжками (DLK). В другом варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью согласно настоящему изобретению может содержать соединение для лечения диабетической ретинопатии. Такие соединения можно вводить в более низких дозах в соответствии с изобретением, поскольку их можно вводить в участок заболевания глаз.

Примеры бета-адренергических антагонистов включают, но без ограничения, тимолол (Timoptic®), левобунолол (Betagan®), картеолол (Ocupress®) и метипранолол (OptiPranolol®).

Примеры аналогов простагландинов включают, но без ограничения, латанопрост (Xalatan®), травопрост (Travatan®), биматопрост (Lumigan®) и тафлупрост (Zioptan™).

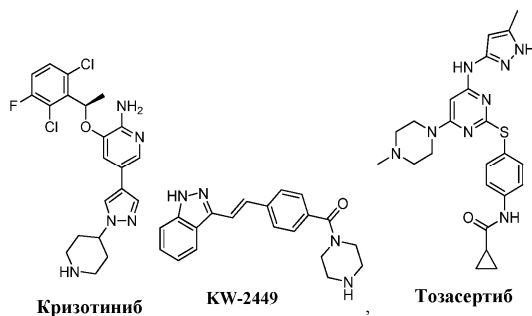
Примеры адренергических агонистов включают, но без ограничения, бримонидин (Alphagan®), эпинефрин, дипивефрин (Propine®) и апраклонидин (Lopidine®).

Примеры ингибиторов карбоангидразы включают, но без ограничения, дорзоламид (Trusopt®), бринзоламид (Azopt®), ацетазоламид (Diamox®) и метазоламид (Neptazane®), смотри структуры ниже:



Примером парасимпатомиметического средства является, но без ограничения, пилокарпин.

Ингибиторы DLK включают, но без ограничения, кризотиниб, KW-2449 и тозасертиб, смотри структуры ниже.



Лекарственные средства, применяющиеся для лечения диабетической ретинопатии, включают, но без ограничения, ранибизумаб (Lucentis®).

В одном варианте осуществления двойным терапевтическим средством, направленным против VEGF/PDGF, является сунитиниба малат (Sutent®).

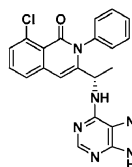
В одном варианте осуществления соединение предназначено для лечения глаукомы и может применяться в эффективном количестве для лечения хозяина, нуждающегося в лечении глаукомы.

В другом варианте осуществления соединение действует посредством механизма, отличного от механизмов, ассоциированных с глаукомой, для лечения нарушения, описанного в настоящем документе, у хозяина, как правило, человека.

В одном варианте осуществления терапевтический агент выбран из ингибитора фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), ингибитора тирозинкиназы (ВТК) Брутона или ингибитора тирозинкиназы селезенки (Syk) или их комбинации.

Ингибиторы PI3K, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, хорошо известны. Примеры ингибиторов PI3-киназы включают, но без ограничения, вортманнин, деметоксивиридин, перифозин, иделалисиб, пиктилисиб, паломид 529, ZSTK474, PWT33597, CUDC-907 и AEZS-136, дувелисиб, GS-9820, BKM120, GDC-0032 (таселисиб) (2-[4-[2-(2-изопропил-5-метил-1,2,4-триазол-3-ил)-5,6-дигидро-имидазо[1,2-d][1,4]бензоксазепин-9-ил]пиразол-1-ил]-2-метилпропанамид), MLN-1117 ((2R)-1-фенокси-2-бутанил водород (S)-метилфосфонат; или метил(оксо) {(2R)-1-фенокси-2-бутанил}окси фосфоний)), BYL-719 ((2S)-N1-[4-метил-5-[2-(2,2,2-трифтор-1,1-диметилэтил)-4-пиридирил]-2-тиазолил]-1,2-пирролидиндикарбоксамид), GSK2126458 (2,4-дифтор-N-{2-(метилокси)-5-[4-(4-пиридазинил)-6-хинолинил]-3-пиридирил}бензолсульфонамид) (омипалисиб), TGX-221 ((±)-7-метил-2-(морфолин-4-ил)-9-(1-фениламиноэтил)пиридо[1,2-a]-пиримидин-4-он), GSK2636771 дигидрохлорид (2-метил-1-(2-метил-3-(трифторметил)бензил)-6-морфолино-1H-бензо[d]имидазол-4-карбоновой кислоты), KIN-193 ((R)-2-((1-(7-метил-2-морфолино-4-оксо-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-9-ил)этил)амино)бензойная кислота), TGR-1202/RP5264, GS-9820 ((S)-1-(4-((2-(2-аминопиримидин-5-ил)-7-метил-4-могидроксипропан-1-он), GS-1101 (5-фтор-3-фенил-2-((S)-1-[9H-пурин-6-иламино]пропил)-3H-хиназолин-4-он), AMG-319, GSK-2269557, SAR245409 (N-(4-(N-(3-((3,5-диметоксифенил)амино)хиноксалин-2-ил)сульфамоил) фенил)-3-метокси-4-метилбензамид), BAY80-6946 (2-амино-N-(7-метокси-8-(3-морфолинопропокси)-2,3-дигидроимидазо[1,2-c]хиназ), AS 252424 (5-[1-[5-(4-фтор-2-гидроксифенил)фуран-2-ил]-мет-(Z)-илиден]-тиазолидин-2,4-дион), CZ 24832 (5-(2-амино-8-фтор-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиридин-6-ил)-N-трет-бутил-

пиридин-3-сульфонамид), бупарлисиб (5-[2,6-ди(4-морфолинил)-4-пиримидинил]-4-(трифторметил)-2-пиридинамин), GDC-0941 (2-(1H-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)-1-пиперазинил]метил]-4-(4-морфолинил)тиено[3,2-d]-пиримидин), GDC-0980 ((S)-1-(4-((2-(2-аминопиримидин-5-ил)-7-метил-4-морфолино)тиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)пиперазин-1-ил)-2-гидроксипропан-1-он (также известный как RG7422)), SF1126 ((8S,14S,17S)-14-(карбоксиметил)-8-(3-гуанидинопропил)-17-(гидроксиметил)-3,6,9,12,15-пентаоксо-1-(4-(4-оксо-8-фенил-4H-хромен-2-ил)морфолин-4-ий)-2-окса-7,10,13,16-тетраазаоктадекан-18-оат), PF-05212384 (N-[4-[[4-(диметиламино)-1-пиперидинил]карбонил]фенил]-N'-[4-(4,6-ди-4-морфолинил-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевина) (гедатолисиб), LY3023414, BEZ235 (2-метил-2-{4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидро-1H-имидазо[4,5-с]-хинолин-1-ил]фенил}пропаннитрил) (дактолисиб), XL-765 (N-(3-(N-(3-(3,5-диметоксифениламино)хиноксалин-2-ил)сульфамоил)фенил)-3-метокси-4-метилбензамид) и GSK1059615 (5-[[4-(4-пиридинил)-6-хинолинил]метилен]-2,4-тиазолидендион), PX886 ([[(3aR,6E,9S,9aR,10R,11aS)-6-[[бис(проп-2-енил)амино]метилен]-5-гидроксипропан-2-ил)-9a,11a-диметил-1,4,7-триоксо-2,3,3a,9,10,11-гексагидроиндено[4,5h]изохромен-10-ил]ацетат (также известный как сонолисиб)), LY294002, AZD8186, PF-4989216, пиларалисиб, GNE-317, PI-3065, PI-103, NU7441 (KU-57788), HS 173, VS-5584 (SB2343), CZC24832, TG100-115, A66, YM201636, CA10505, PIK-75, PIK-93, AS-605240, BGT226 (NVP-BGT226), AZD6482, воксталисиб, альпелисиб, IC-87114, TGI100713, CH5132799, PKI-402, копанлисиб (BAY 80-6946), XL 147, PIK-90, PIK-293, PIK-294, 3-MA (3-метиладенин), AS-252424, AS-604850, апиталисиб (GDC-0980; RG7422), и структуру, описанную в WO2014/071109, имеющую формулу:



Соединение 292

Ингибиторы ВТК, предназначенные для применения в настоящем изобретении, хорошо известны. Примеры ингибиторов ВТК включают ибрутиниб (также известный как PCI-32765) (Imbruvica™) (1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он), ингибиторы на основе дианилинопиримидина, такие как AVL-101 и AVL-291/292 (N-(3-((5-фтор-2-((4-(2-метоксиэтокси)фенил)амино)пиримидин-4-ил)амино)фенил)акриламид) (Avila Therapeutics) (публикация патента США № 2011/0117073, полное содержание которой включено в настоящий документ), дазатиниб ([N-(2-хлор-6-метилфенил)-2-(6-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-2-метилпиримидин-4-иламино) триазол-5-карбоксамид], LFM-A13 (альфа-циано-бета-гидрокси-бета-метил-N-(2,5-ибромфенил)пропенамид), GDC-0834 ([R-N-(3-(6-(4-(1,4-диметил-3-оксопиперазин-2-ил)фениламино)-4-метил-5-оксо-4,5-дигидропиразин-2-ил)-2-метилфенил)-4,5,6,7-тетрагидробензо[b]тиофен-2-карбоксамид], CGI-560 4-(трет-бутил)-N-(3-(8-(фениламино)имидазо[1,2-a]пиразин-6-ил)фенил)бензамид, CGI-1746 (4-(трет-бутил)-N-(2-метил-3-(4-метил-6-((4-(морфолин-4-карбонил)фенил)амино)-5-оксо-4,5-дигидропиразин-2-ил)фенил)бензамид), CNX-774 (4-(4-((4-(3-акриламидофенил)амино)-5-фторпиримидин-2-ил)амино)феноксид)-N-метилпиколинамид), СТА056 (7-бензил-1-(3-(пиперидин-1-ил)пропил)-2-(4-(пиридин-4-ил)фенил)-1H-имидазо[4,5-g]хиноксалин-6(5H)-он), GDC-0834 ((R)-N-(3-(6-((4-(1,4-диметил-3-оксопиперазин-2-ил)фенил)амино)-4-метил-5-оксо-4,5-дигидропиразин-2-ил)-2-метилфенил)-4,5,6,7-тетрагидробензо[b]тиофен-2-карбоксамид), GDC-0837 ((R)-N-(3-(6-((4-(1,4-диметил-3-оксопиперазин-2-ил)фенил)амино)-4-метил-5-оксо-4,5-дигидропиразин-2-ил)-2-метилфенил)-4,5,6,7-тетрагидробензо[b]тиофен-2-карбоксамид), HM-71224, ACP-196, ONO-4059 (Ono Pharmaceuticals), PRT062607 (4-((3-(2H-1,2,3-триазол-2-ил)фенил)амино)-2-(((1R,2S)-2-аминоциклогексил)амино)пиримидин-5-карбоксамид гидроксид), QL-47 (1-(1-акрилоиллиндолин-6-ил)-9-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)бензо[h][1,6]нафтиридин-2(1H)-он) и RN486 (6-циклопропил-8-фтор-2-(2-гидроксиметил-3-{1-метил-5-[5-(4-метил-пиперазин-1-ил)-пиридин-2-иламино]-6-оксо-1,6-дигидро-пиридин-3-ил}-фенил)-2H-изохинолин-1-он), и другие молекулы, способные ингибировать активность ВТК, например, такие ингибиторы ВТК, которые описаны в Akinleye et al, Journal of Hematology & Oncology, 2013, 6:59, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Ингибиторы Syk, предназначенные для применения в настоящем изобретении, хорошо известны и включают, например, сердулатиниб (Cerdulatinib) (4-(циклопропиламино)-2-((4-(4-(этилсульфонил)пиперазин-1-ил)фенил)амино)пиримидин-5-карбоксамид), энтосплетиниб (6-(1H-индазол-6-ил)-N-(4-морфолинофенил)имидазо[1,2-a]пиразин-8-амин), фостаматиниб ([6-((5-фтор-2-((3,4,5-триметокси)амино)-4-пиридинил)амино)-2,2-диметил-3-оксо-2,3-дигидро-4H-пиридо[3,2-b][1,4]оксазин-4-ил]метил дигидрофосфат), фостаматиниб в виде динатриевой соли (натрий(6-((5-фтор-2-((3,4,5-триметоксифенил)амино)пиримидин-4-ил)амино)-2,2-диметил-3-оксо-2H-пиридо[3,2-b][1,4]оксазин-4(3H)-ил)метилфосфат), BAY 61-3606 (2-(7-(3,4-диметоксифенил)имидазо[1,2-с]пиримидин-5-иламино)никотинамид HCl), RO9021 (6-((1R,2S)-2-аминоциклогексиламино)-4-(5,6-диметилпиридин-2-иламино)пиридазин-3-карбоновой кислоты амид), иматиниб (Gleevec; 4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-N-(4-метил-3-{[4-

(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил]амино}фенил)бензамид), стауроспорин, GSK143 (2-(((3R,4R)-3-аминотетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)-4-(p-толиламино)пиримидин-5-карбоксамид), PP2 (1-(трет-бутил)-3-(4-хлорфенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин), PRT-060318 (2-(((1R,2S)-2-аминоциклогексил)амино)-4-(m-толиламино)пиримидин-5-карбоксамид), PRT-062607 (4-(((3-(2H-1,2,3-триазол-2-ил)фенил)амино)-2-(((1R,2S)-2-аминоциклогексил)амино)пиримидин-5-карбоксамид) гидрохлорид), R112 (3,3'-((5-фторпиримидин-2,4-диил)бис(азанедиил))дифенол), R348 (3-этил-4-метилпиридин), R406 (6-(((5-фтор-2-((3,4,5-триметоксифенил)амино)пиримидин-4-ил)амино)-2,2-диметил-2H-пиридо[3,2-b][1,4]оксазин-3(4H)-он), пикеатаннол (3-гидроксиресвератол), YM193306 (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643), 7-азаиндол, пикеатаннол, ER-27319 (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), Соединение D (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), PRT060318 (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), лютеолин (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), апигенин (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), кверцетин (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), физетин (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), мирицетин (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки), морин (Singh et al. Discovery and Development of Spleen Tyrosine Kinase (SYK) Inhibitors, J. Med. Chem. 2012, 55, 3614-3643, полное содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки).

В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой ингибитор MEK. Ингибиторы MEK, предназначенные для применения в настоящем изобретении, хорошо известны и включают, например, траметиниб/GSKL1120212 (N-(3-{3-циклопропил-5-[(2-фтор-4-иодфенил)амино]-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагидропиридо[4,3-d]пиримидин-1(2H-ил)}фенил)ацетамид), селуметиниб (6-(4-бром-2-хлоранилино)-7-фтор-N-(2-гидроксиэтокси)-3-метилбензимидазол-5-карбоксамид), пимасертиб/AS703026/MSC 1935369 ((S)-N-(2,3-дигидроксипропил)-3-((2-фтор-4-иодфенил)амино)изоникотинамид), XL-518/GDC-0973 (1-({3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-иодфенил)амино]фенил}карбонил)-3-[(2,5)-пиперидин-2-ил]азетидин-3-ол), рефаметиниб/BAY869766/RDEA119 (N-(3,4-дифтор-2-(2-фтор-4-иодфениламино)-6-метоксифенил)-1-(2,3-дигидроксипропил)циклопропан-1-сульфонамид), PD-0325901 (N-[(2R)-2,3-дигидроксипропокс]-3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-иодфенил)амино]бензамид), TAK733 ((R)-3-(2,3-дигидроксипропил)-6-фтор-5-(2-фтор-4-иодфениламино)-8-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-4,7(3H,8H)-дион), MEK162/ARRY438162 (5-[(4-бром-2-фторфенил)амино]-4-фтор-N-(2-гидроксиэтокси)-1-метил-1H-бензимидазол-6-карбоксамид), R05126766 (3-[[3-фтор-2-(метилсульфамойламино)-4-пиридил]метил]-4-метил-7-пиримидин-2-илоксихромен-2-он), WX-554, R04987655/CH4987655 (3,4-дифтор-2-((2-фтор-4-иодфенил)амино)-N-(2-гидроксиэтокси)-5-((3-оксо-1,2-оксазинан-2-ил)метил)бензамид) или AZD8330 (2-((2-фтор-4-иодфенил)амино)-N-(2-гидроксиэтокси)-1,5-диметил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-3-карбоксамид), U0126-EtOH, PD184352 (CI-1040), GDC-0623, BI-847325, кобиметиниб, PD98059, BIX 02189, BIX 02188, биниметиниб, SL-327, TAK-733, PD318088 и дополнительные ингибиторы MEK, описанные ниже.

В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой ингибитор Raf. Ингибиторы Raf, предназначенные для применения в настоящем изобретении, хорошо известны и включают, например, вемурафиниб (N-[3-[[5-(4-хлорфенил)-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил]карбонил]-2,4-дифторфенил]-1-пропансульфонамид), сорафениба тозилат (4-[4-[[4-хлор-3-(трифторметил)-фенил]карбамоиламино]фенокси]-N-метилпиридин-2-карбоксамид; 4-метилбензолсульфонат), AZ628 (3-(2-цианопропан-2-ил)-N-(4-метил-3-(3-метил-4-оксо-3,4-дигидрохиназолин-6-иламино)фенил)бензамид), NVP-BHG712 (4-метил-3-(1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-иламино)-N-(3-(трифторметил)фенил)бензамид), RAF-265 (1-метил-5-[2-[5-(трифторметил)-1H-имидазол-2-ил]пиридин-4-ил]окси-N-[4-(трифторметил)фенил]бензимидазол-2-амин), 2-бромалдизин(2-бром-6,7-дигидро-1H,5H-пирроло[2,3-c]азепин-4,8-дион), ингибитор Raf-киназы типа IV (2-хлор-5-(2-фенил-5-(пиридин-4-ил)-1H-имидазол-4-ил)фенол), сорафениб N-оксид(4-[4-[[[4-хлор-3-(трифторметил)фенил]амино]карбонил]амино]фенокси]-N-метил-2-пиридинкарбоксамид 1-оксид), PLX-4720, дабрафениб (GSK2118436), GDC-0879, RAF265, AZ 628, SB590885, ZM336372, GW5074, TAK-632, CEP-32496, LY3009120 и GX818 (энкорафениб).

В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой ингибитор белка программируемой смерти 1 (PD-1), ингибитор лиганда 1 белка программируемой смерти (PDL1) или инги-

битор лиганда 2 белка программируемой смерти (PDL2). PD-1, PDL1 и PDL2 известны в данной области и включают, например, ниволумаб (BMS), пембролизумаб (Merck), пидилизумаб (CureTech/Teva), AMP-244 (Amplimmune/GSK), BMS-936559 (BMS) и MEDI4736 (Roche/Genentech), и MPDL3280A (Genentech).

В одном варианте осуществления терапевтический агент можно вводить с замедленным высвобождением.

В одном варианте осуществления терапевтический агент представляет собой моноклональное антитело (MAb). Некоторые моноклональные антитела (MAb) стимулируют иммунный ответ, который разрушает раковые клетки. Подобно антителам, продуцируемым естественным путем В-клетками, эти моноклональные антитела "покрывают" поверхность раковых клеток, вызывая ее разрушение иммунной системой. Например, бевацизумаб направленно воздействует на фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), белок, секретируемый опухолевыми клетками и другими клетками в микроокружении опухоли, который способствует развитию кровеносных сосудов опухоли. При связывании с бевацизумабом VEGF не может взаимодействовать с его клеточным рецептором, предотвращая передачу сигнала, приводящую к росту новых кровеносных сосудов. Аналогично, цетуксимаб и панитумумаб направленно воздействуют на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), и трастузумаб направленно воздействует на рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER-2). Моноклональные антитела (MAb), которые связываются с рецепторами фактора роста клеточной поверхности, не позволяют целевым рецепторам посылать свои нормальные сигналы, стимулирующие рост. Они также могут запускать апоптоз и активировать иммунную систему на уничтожение опухолевых клеток.

Другие агенты могут включать, но без ограничения, по меньшей мере один из тамоксифена, мидзолама, летрозола, бортезомиба, анастрозола, гoserелина, ингибитора mTOR, ингибитора PI3-киназы, как описано выше, двойного ингибитора mTOR-PI3K, ингибитора MEK, ингибитора RAS, ингибитора ALK, ингибитора HSP (например, ингибитора HSP70 и HSP 90 или их комбинации), ингибитора BCL-2, как описано выше, индуцирующих апоптоз соединений, ингибитора AKT, включая, но без ограничения, MK-2206, GSK690693, перифозин, (KRX-0401), GDC-0068, трицирибин, AZD5363, хонокоил, PF-04691502 и милтефозин, ингибитор PD-1, как описано выше, включая, но без ограничения, ниволумаб, CT-011, MK-3475, BMS936558 и AMP-514 или ингибитор FLT-3, включая, но без ограничения, P406, довитиниб, кви-зартиниб (AC220), амуватиниб (MP-470), тандутиниб (MLN518), ENMD-2076 и KW-2449 или их комбинацию. Примеры ингибиторов mTOR включают, но без ограничения, рапамицин и его аналоги, эверолимус (афинитор), темсилолимус, ридафороллимус, сироллимус и дефороллимус. Примеры ингибиторов MEK включают, но без ограничения, таметиниб/GSK1120212 (N-(3-{3-циклопропил-5-[(2-фтор-4-иодфенил)амино]-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагидропиридо[4,3-d]пиримидин-1(2H-ил)фенил)ацетамид), селуметиниб (6-(4-бром-2-хлоранилино)-7-фтор-N-(2-гидроксиэтокси)-3-метилбензимидазол-5-карбоксамид), пимасертиб/AS703026/MSK1935369 ((S)-N-(2,3-дигидроксипропил)-3-((2-фтор-4-иодфенил)амино)изоникотинамид), XL-518/GDC-0973 (1-{(3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-иодфенил)амино]фенил)карбонил)-3-[(2,5)-пиперидин-2-ил]азетидин-3-ол) (кобиметиниб), рефаметиниб/BAY869766/RDEA119 (N-(3,4-дифтор-2-(2-фтор-4-иодфениламино)-6-метоксибензил)-1-(2,3-дигидроксипропил)циклопропан-1-сульфонамид), PD-0325901 (N-[(2R)-2,3-дигидроксипропокси]-3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-иодфенил)амино] бензамид), TAK733 ((R)-3-(2,3-дигидроксипропил)-6-фтор-5-(2-фтор-4-иодфениламино)-8-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-4,7(3H,8H)дион), MEK162/ARRY438162 (5-[(4-бром-2-фторфенил)амино]-4-фтор-N-(2-гидроксиэтокси)-1-метил-1H-бензимидазол-6-карбоксамид), R05126766 (3-[[3-фтор-2-(метилсульфамойл)амино]-4-пиридил]метил]-4-метил-7-пиримидин-2-илоксихромен-2-он), WX-554, R04987655/CH4987655 (3,4-дифтор-2-((2-фтор-4-иодфенил)амино)-N-(2-гидроксиэтокси)-5-((3-оксо-1,2-оксазинан-2-ил)метил) бензамид) или AZD8330 (2-((2-фтор-4-иодфенил)амино)-N-(2-гидроксиэтокси)-1,5-диметил-6-оксо-1,6-дигидропиридин-3-карбоксамид). Примеры ингибиторов RAS включают, но без ограничения, реолизин и siG12D LODER. Примеры ингибиторов ALK включают, но без ограничения, кризотиниб, церитиниб (зикадия), AP26113 и LDK378. Ингибиторы HSP включают, но без ограничения, гелданамицин или 17-N-аллиламино-17-деметоксигелданамицин (17AAG) и радицикол.

В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой противовоспалительное средство, химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство, дополнительный терапевтический агент или иммуносупрессивный агент.

В одном варианте осуществления химиотерапевтический препарат выбран, но без ограничения, из следующих препаратов: мезилат иматиниба (Gleevec®), дазатиниб (Sprycel®), нилотиниб (Tasigna®), босутиниб (Bosulif®), трастузумаб (Герцептин®), трастузумаб-DM1, пертузумаб (Perjeta™), лапатиниб (Tykerb®), гефитиниб (Iressa®), эрлотиниб (Tarceva®), цетуксимаб (Erbix®), панитумумаб (Vectibix®), вандетаниб (Caprelsa®), вемурафениб (Zelboraf®), вориностат (Zolanza®), ромидеписин (Istodax®), бексаротен (Tagretin®), алитретиноин (Panretin®), третиноин (Vesanoid®), карфилизомид (Kyprolis™), пралатрексат (Foloty®), бевацизумаб (Avastin®), зив-афлиберцепт (Zaltrap®), сорафениб (Nexavar®), сунитиниб (Sutent®), пазопаниб (Votrient®), регорафениб (Stivarga®) и кабозантиниб (Cometriq™).

Дополнительные химиотерапевтические агенты включают, но без ограничения, радиоактивную молекулу, токсин, также называемый как цитотоксин или цитотоксический агент, который включает любой

агент, который является пагубным для жизнеспособности клеток, и липосомы или другие везикулы, содержащие химиотерапевтические соединения. Общие противораковые фармацевтические агенты включают: винкристин (Oncovin®) или липосомальный винкристин (Marqibo®), даунорубин (дауномицин или Cerubidine®) или доксорубин (Adriamycin®), цитарабин (цитозин-арабинозид, ара-С или Cytosar®), L-аспарагиназу (Elspar®) или PEG-L-аспарагиназу (пегаспаргаза или Oncaspar®), этопозид (VP-16), тенипозид (Vumon®), 6-меркаптопурин (6-МР или Purinethol®), метотрексат, циклофосфамид (Cytosan®), преднизон, дексаметазон (декадрон), иматиниб (Gleevec®), дазатиниб (Sprycel®), нилотиниб (Tasigna®), бозутиниб (Bosulif®) и понатиниб (Iclusig™). Примеры дополнительных подходящих химиотерапевтических агентов включают, но без ограничения, 1-дегидротестостерон, декарбазин, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, актиномицин D, адриамицин, алдеслейкин, алкилирующий агент, аллопуринол-натрий, альтретамин, амифостин, анастрозол, антрамицин (AMC), антимиотический агент, цис-дихлордиамин платина (II) (DDP) цисплатин, диаминодихлорплатина, антрациклин, антибиотик, антиметаболит, аспарагиназа, живые BCG (внутрипузырное введение), бетаметазона натрия фосфат и ацетат бетаметазона, бикалутамид, блеомицина сульфат, бусульфан, лейковорин кальция, калихеамицин, капецитабин, карбоплатин, ломустин (CCNU), кармустин (BSNU), хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, колхицин, конъюгированные эстрогены, циклофосфамид, циклотосфамид, цитарабин, цитарабин, цитохалазин В, цитоксан, дакарбазин, дактиномицин, дактиномицин (ранее актиномицин), даунорубин HCL, цитрат даунорубина, денилейкин дифтитокс, дексразоксан, дибромманнит, дигидроксид антрациндиион, доцетаксел, доласетрон мезилат, доксорубин HCL, дронабинол, L-аспарагиназа E.coli, эметин, эпозитин-а, L-аспарагиназа Egrwinia, этерифицированные эстрогены, эстрадиол, эстрамусти́н фосфат натрия, этидиум бромид, этинилэстрадиол, этидронат, этопозид, цитроворум-фактор, этопози́да фосфат, филграстим, флукурин, флуконазол, флударабина фосфат, фторурацил, флутамид, фолиновая кислота, гемцитабин HCL, глюкокортикоиды, гозерелина ацетат, грамицидин D, гранисетрон HCL, гидроксимочевина, идарубин HCL, ифосфамид, интерферон α -2b, иринотекан HCL, летрозол, лейковорин кальция, леупролид ацетат, левамизол HCL, лидокаин, ломустин, майтансиноид, мехлорэтамин HCL, медроксипрогестерон ацетат, мегестрол ацетат, мелфалан HCL, меркаптипурин, месна, метотрексат, метилтестостерон, митрамицин, митомицин С, митотан, митоксантрон, нилутамид, октреоти́да ацетат, ондансетрон HCL, паклитаксел, дина́трия пами́дронат, пентостатин, пилокарпин HCL, плимидин, полифепрозан 20 с кармусти́ном имплантат, порфирин натрия, прокаин, прокарбазин HCL, пропранолол, ритуксимаб, сарграгостим, стрептозотозин, тамоксифен, таксол, тенипозид, тенопозид, тестолактон, тетракаин, тиоэпа хлорамбуцил, тиогуанин, тиотепа, топотекан HCL, торемифена цитрат, трастузумаб, третиноин, валрубин, винбластин сульфат, винкристина сульфат и винорелбина тартрат.

Дополнительные терапевтические агенты могут включать бевацизумаб, сутиниб, сорафениб, 2-метоксиэстрадиол или 2ME2, финасунат, ваталаниб, вандетаниб, афлиберцепт, волоциксимаб, этарацизумаб (MEDI-522), цилегитид, эрлотиниб, цетуксимаб, панитумумаб, гефитиниб, трастузумаб, довити́ниб, фигитумумаб, атацицепт, ритуксимаб, алемтузумаб, алдеслейкин, атлизумаб, тоцилизумаб, темси́ролимус, эверолимус, лукатумумаб, дацетузумаб, HLL1, huN901-DM1, атипримод, натализумаб, бортезоми́б, карфилзоми́б, мари́зоми́б, танеспи́мицин, саквина́вир мезилат, ритона́вир, нелфина́вир мезилат, индина́вир сульфат, белино́стат, панобино́стат, мапатумумаб, лексатумумаб, дуланермин, АВТ-737, обли́мерсен, плитиде́псин, талма́пимод, P276-00, энза́стаурин, типифа́миб, перифо́зин, иматини́б, дазати́ниб, ленали́домид, тали́домид, симва́статин, це́лекокси́б, базадо́ксифен, AZD4547, рило́тумумаб, оксали́платин (э́локсати́н), PD0332991 (па́лбоци́клиб), рибоци́клиб (LEE011), амеба́цикли́б (LY2835219), HDM201, фу́лвостра́нт (фа́слодекс), экзе́местан (а́ромазин), PIM447, ру́ксоли́тини́б (INC424), BGJ398, не́цитумума́б, пеме́трексед (Али́мта) и ра́муци́румаб (IMC-1121B).

В одном аспекте настоящего изобретения применяют иммуносупрессивный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из ингибитора кальциневрина, например, циклоспорина или аскоми́цина, например, циклоспорина А (NEORAL®), FK506 (такролимус), пимекролимуса; ингибитора mTOR, например, рапамидина или его производного, например, сиролиму́са (RAPAMUNE®), эверолимуса (Cе́rtican®), темси́ролимуса, зотаролимуса, биолимуса-7, биолимуса-9, рапало́га, например, рида́форолимус, азатио́прина, Campath 1H; модулятора S1P-рецептора, например, финголи́мода или его аналога, антитела против IL-8, микофе́нольной кислоты или ее соли, например, натриевой соли или ее пролекарства, например, микофе́нолата мо́фети́ла (CELLCEPT®), OKT3 (ORTHOCLONE OKT3®), преднизона, АТ-ГАМ®, THYMOGLOBULIN®, бреквина́ра натрия, OKT4, T10B9.A-3A, 33B3.1, 15-дезо́ксиспергуа́лина, тресперимуса, ле́флуно́мида ARAVA®, CTLA4-Ig, анти-CD25, анти-IL2R, бази́ликсима́ба (SIMULECT®), да́клизума́ба (ZENAPAX®), мизорби́на, метотре́ксата, дексаметазона, ISAtx-247, SDZ ASM 981 (пимекролимус, Elidel®), CTLA4lg (аба́тацепт), белата́цепта, LFA3lg, этане́рцепта (имеющегося в продаже под названием Enbrel® фирмы Immunex), ада́лимума́ба (Humira®), инфли́ксима́ба (Remicade®), антитела против LFA-1, ната́лизума́ба (Antegren®), энли́мома́ба, гавили́мома́ба, антитимо́цитарного иммуноглобу́лина, сипли́зума́ба, але́фацепта, эфа́лизума́ба, пента́са, месала́зина, аса́кола, фосфа́та ко́деина, бенори́лата, фе́нбу́фена, на́просина, ди́клофе́нака, это́дола́ка и индоме́тацина, аспирина и ибу́профе́на.

Примеры типов терапевтических агентов могут включать противовоспалительные лекарственные

средства, противомикробные агенты, агенты против ангиогенеза, иммуносупрессанты, антитела, стероиды, глазные антигипертензивные препараты и их комбинации. Примеры терапевтических агентов включают амикацин, анекортана ацетат, антрацендион, антрациклин, азол, амфотерицин В, бевацизумаб, камптотецин, цефуроксим, хлорамфеникол, хлоргексидин, хлоргексидин диглюконат, клотримазол, цефалоспорины клотримазол, кортикостероиды, дексаметазон, дезаметазон, эконазол, эфтазидим, эпиподофиллотоксин, флуконазол, флуцитозин, фторпиримидины, фторхинолины, гатифлоксацин, гликопептиды, имидазолы, итраконазол, ивермектин, кетоконазол, левофлоксацин, макролиды, миконазол, миконазола нитрат, моксифлоксацин, натамицин, неомицин, нистатин, офлоксацин, полигексаметиленбигуанид, преднизолон, преднизолона ацетат, пегаптаниб, аналоги платины, полимицин В, пропимидин изетионат, пиримидиновый нуклеозид, ранибизумаб, лактат скваламина, сульфонамиды, триамцинолон, триамцинолона ацетонид, триазолы, ванкомицин, анти-VEGF препараты, способные блокировать сосудистый эндотелиальный фактор роста, антитела против VEGF, фрагменты антител против VEGF, алкалоид барвинка, тимолол, бетаксолол, травопрост, латанопрост, биматопрост, бримонидин, дорзоламид, ацетазоламид, пилокарпин, ципрофлоксацин, азитромицин, гентамицин, тобрамицин, цефазолин, вориконазол, ганцикловир, цидофовир, фоскарнет, диклофенак, непафенак, кеторолак, ибупрофен, индометацин, фторметаллон, римексолол, анекортав, циклоспорин, метотрексат, такролимус и их комбинации.

Примерами иммуносупрессивных агентов являются ингибитор кальциневрина, например, циклоспорин или аскомицин, например, циклоспорин А (NEORAL®), FK506 (такролимус), пимекролимус, ингибитор mTOR, например, рапамицин или его производное, например сиролимус (RAPAMUNE®), эверолимус (Certican®), темсиролимус, зотаролимус, биолимус-7, биолимус-9, рапалог, например, ридафоролимус, азатиоприн, Campath 1H, модулятор S1P-рецептора, например, финголимод или его аналог, анти-IL-8 антитело, микофенольная кислота или ее соль, например, натриевая соль, или ее пролекарство, например, микофенолата мофетил (CELLCEPT®), OKT3 (ORTHOCLONE OKT3®), преднизон, AT-GAM®, THYMOGLOBULIN®, бреквинар натрия, OKT4, T10B9. A-3A, 33B3.1, 15-дезоксиспергуалин, тресперимус, лефлуномид ARAVA®, CTLAI-Ig, анти-CD25, анти-IL2R, базиликсимаб (SIMULECT®), даклизумаб (ZENAPAX®), мизорбин, метотрексат, дексаметазон, ISAtx-247, SDZ ASM 981 (пимекролимус, Elidel®), CTLA4lg (абатацепт), белатацепт, LFA3lg, этанерцепт (имеется в продаже под названием Enbrel® фирмы Immunex), адалимумаб (Humira®), инфликсимаб (Remicade®), антитело против LFA-1, натализумаб (Antegren®), энлимумаб, гавилимомаб, антигитомоцитарный иммуноглобулин, сиплизумаб, алефацепт, эфализумаб, пентаса, месалазин, асакол, кодеина фосфат, бенорилат, фенбуфен, напросин, диклофенак, этодолак и индометацин, аспирин и ибупрофен.

Один из аспектов изобретения представляет собой способ лечения нарушения, включающий введение хозяину, нуждающемуся в этом, поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц, содержащих эффективное количество терапевтического агента, при этом содержащие терапевтический агент поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы поступают путем инъекции в организм и агрегируют *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм, которая обеспечивает доставку лекарственного средства с замедленным высвобождением в течение по меньшей мере одного месяца.

V. Фармацевтически приемлемые носители.

Любой подходящий фармацевтически приемлемый носитель, например, офтальмологически приемлемый вязкий носитель, может быть использован в соответствии с изобретением. Носитель присутствует в количестве, эффективном для обеспечения требуемой вязкости в системе доставки лекарственного средства. Предпочтительно вязкий носитель присутствует в количестве от около 0,5 мас.% до около 95 мас.% от массы частиц, доставляющих лекарственное средство. Конкретное количество используемого вязкого носителя зависит от ряда факторов, включая, например, и без ограничения, используемый конкретный вязкий носитель, молекулярную массу используемого вязкого носителя, вязкость, которую желательно получить для данной системы доставки лекарственного средства, и/или используемые и подобные факторы. Примеры полезных вязких носителей включают, но без ограничения, гиалуроновую кислоту, гиалуронат натрия, карбомеры, полиакриловую кислоту, производные целлюлозы, поликарбофил, поливинилпирролидон, желатин, декстрин, полисахариды, полиакриламид, поливиниловый спирт (который может представлять собой частично гидролизированный поливинилацетат), поливинилацетат, его производные и их смеси.

Носитель также может представлять собой водный носитель. Примером водных носителей является, но без ограничения, водный раствор или суспензия, такая как физиологический раствор, плазма, аспират костного мозга, буферы, такие как буферный солевой раствор Хэнкса (HBSS), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), буфер Рингера, ProVisc®, разбавленный ProVisc®, ProVisc®, разбавленный PBS, буфер Кребса, PBS Дульбекко, нормальный PBS; раствор гиалуроната натрия (НА, 5 мг/мл в PBS), имитированные биологические жидкости, концентрат тромбоцитов из плазмы и среда для культивирования тканей или водный раствор или суспензия, содержащая органический растворитель.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой PBS.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой НА, 5 мг/мл в PBS.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой ProVisc®, разбавленный водой.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой ProVisc®, разбавленный в PBS.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой ProVisc®, 5-кратно разбавленный водой.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой ProVisc®, 5-кратно разбавленный PBS.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой ProVisc®, 10-кратно разбавленный водой.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой ProVisc®, 10-кратно разбавленный PBS.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой ProVisc®, 20-кратно разбавленный водой.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой ProVisc®, 20-кратно разбавленный PBS.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой НА, 1,25 мг/мл в изотоническом буферном растворе с нейтральным pH.

Носитель может необязательно содержать один или более суспендирующих агентов. Суспендирующий агент может быть выбран из карбоксиметилцеллюлозы (СМС), маннита, полисорбата, полипропиленгликоля, полиэтиленгликоля, желатина, альбумина, альгината, гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC), гидроксизтилметилцеллюлозы (HEMC), бентонита, трагаканта, декстрина, кунжутного масла, миндального масла, сахарозы, аравийской камеди и ксантановой камеди, и их комбинаций.

Носитель может необязательно содержать один или более пластификаторов. Таким образом, носитель может также включать пластификатор. Пластификатор может представлять собой, например, полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль, поли(молочную кислоту) или поли(гликолевую кислоту) или ее сополимер, поликапролактон и низкомолекулярные олигомеры этих полимеров, или обычные пластификаторы, такие как адипаты, фосфаты, фталаты, сабакаты, азелаты и цитраты. Носитель может также включать другие известные фармацевтические вспомогательные вещества для улучшения стабильности агента.

В одном варианте осуществления может быть также включено одно или более дополнительных вспомогательных веществ или агентов, усиливающих доставку, например, поверхностно-активные вещества и/или гидрогели для дополнительного влияния на скорость высвобождения.

VI. Замедленное высвобождение фармацевтически активного соединения.

Скорость высвобождения фармацевтически активного соединения может быть связана с концентрацией фармацевтически активного соединения, растворенного в микрочастице с обработанной поверхностью. В некоторых вариантах осуществления полимерная композиция микрочастицы с обработанной поверхностью включает нетерапевтические агенты, которые выбраны для обеспечения желаемой растворимости фармацевтически активного соединения. Выбор полимерной композиции может быть сделан для обеспечения требуемой растворимости фармацевтически активного соединения в микрочастице с обработанной поверхностью, например, гидрогель может способствовать растворимости гидрофильного материала. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы могут быть добавлены в полимер для увеличения желаемой растворимости фармацевтически активного соединения в микрочастице с обработанной поверхностью. В некоторых вариантах осуществления добавки могут быть использованы для контроля кинетики высвобождения фармацевтически активного соединения, например, добавки могут быть использованы для контроля концентрации фармацевтически активного соединения путем повышения или понижения растворимости фармацевтически активного соединения в полимере, чтобы таким образом контролировать кинетику высвобождения фармацевтически активного соединения. Растворимость можно контролировать путем включения соответствующих молекул и/или веществ, которые повышают и/или понижают растворимость растворенной формы фармацевтически активного соединения в микрочастице с обработанной поверхностью. Растворимость фармацевтически активного соединения может быть связана с гидрофобными и/или гидрофильными свойствами микрочастицы с обработанной поверхностью и фармацевтически активного соединения. Масла и гидрофобные молекулы могут быть добавлены к полимеру(ам) для повышения растворимости фармацевтически активного соединения в микрочастице с обработанной поверхностью.

Вместо или в дополнение к контролю скорости миграции на основе концентрации фармацевтически активного соединения, растворенного в микрочастице с обработанной поверхностью, можно контролировать площадь поверхности полимерной композиции для достижения желаемой скорости миграции лекарственного средства из микрочастицы с обработанной поверхностью, содержащей фармацевтически активное соединение. Например, большая площадь открытой поверхности будет увеличивать скорость миграции фармацевтически активного соединения к поверхности, а меньшая площадь открытой поверхности будет уменьшать скорость миграции фармацевтически активного соединения к поверхности. Пло-

щадь открытой поверхности может быть увеличена различными способами, например, обработкой открытой поверхности с получением пористой поверхности, имеющей открытые каналы, соединенные со слезой или слезной пленкой, созданием вогнутостей и выпуклостей на открытой поверхности. Открытая поверхность может быть сделана пористой путем добавления солей, которые растворяются и оставляют пористую полость после растворения соли. В настоящем изобретении эти тенденции могут быть использованы для уменьшения скорости высвобождения активного вещества из полимерной композиции путем избегания этих путей, способствующих более быстрому высвобождению. Например, можно уменьшить площадь поверхности или избежать образования каналов.

В случае использования более одного типа полимера каждая микрочастица с обработанной поверхностью может иметь отличающееся свойство отверждения или схватывания. Например, микрочастицы с обработанной поверхностью могут быть получены из сходных полимеров, но могут иметь разные значения pH гелеобразования или разные температуры плавления, или температуры стеклования.

Для того, чтобы микрочастицы с обработанной поверхностью образовывали консолидированный агрегат, температура вокруг частиц, например, у человека или животного, не относящегося к человеку, при введении композиции приблизительно равна или превышает температуру стеклования (T_g) полимерных частиц. При таких температурах полимерные частицы будут поперечно сшиваться с одной или более другими полимерными частицами с образованием консолидированного агрегата. Под поперечной сшивкой подразумевается, что соседние полимерные частицы соединяются вместе. Например, частицы могут сшиваться из-за переплетения полимерных цепей на поверхности одной частицы с полимерными цепями на поверхности другой частицы. Между соседними частицами может происходить адгезия, когезия или слияние.

Как правило, инъекционные микрочастицы с обработанной поверхностью, которые образованы из полимера или полимерной смеси, имеют температуру стеклования (T_g), близкую к температуре тела или немного выше нее (такую как около 30–45°C, например, около 35–40°C, например, около 37–40°C). Соответственно, при комнатной температуре микрочастицы с обработанной поверхностью имеют температуру ниже их T_g и ведут себя как дискретные частицы, но в организме микрочастицы с обработанной поверхностью размягчаются и взаимодействуют/прилипают друг к другу. Как правило, агломерация начинается в пределах от 20 секунд до около 15 минут после повышения температуры от комнатной до температуры тела.

Микрочастицы с обработанной поверхностью могут быть получены из полимера, который имеет T_g около 35–40°C, например, около 37–40°C, при этом полимер представляет собой поли(а-гидроксикислоту) (такую как PLA, PGA, PLGA или PDLLA, или их комбинацию) или ее смесь с PLGA-PEG. Как правило, эти частицы будут агломерироваться при температуре тела. Инъекционные микрочастицы с обработанной поверхностью могут содержать только частицы поли(а-гидроксикислоты) или могут быть включены другие типы частиц. Микрочастицы могут быть образованы из смеси поли(D,L-лактид-со-гликолида) (PLGA), PLGA-PEG и PVA, которая имеет T_g при температуре тела или выше. В одном варианте осуществления при температуре тела микрочастицы с обработанной поверхностью будут взаимодействовать с образованием консолидированного агрегата. Инъекционная микрочастица может содержать только микрочастицы с обработанной поверхностью, образованные из PLGA/PLGA-PEG/PVA, или могут быть включены другие типы частиц.

Композиция может содержать смесь чувствительных к температуре микрочастиц с обработанной поверхностью и не чувствительных к температуре микрочастиц с обработанной поверхностью. Не чувствительные к температуре микрочастицы с обработанной поверхностью представляют собой частицы с температурой стеклования, которая выше температуры, при которой предполагается применять композицию. Как правило, в композиции, содержащей смесь чувствительных к температуре микрочастиц с обработанной поверхностью и не чувствительных к температуре частиц, соотношение чувствительных к температуре и не чувствительных к температуре микрочастиц с обработанной поверхностью составляет около 3:1 или ниже, например, 4:3. Чувствительные к температуре микрочастицы с обработанной поверхностью предпочтительным образом способны к сшиванию друг с другом, когда температура композиции повышается до температуры стеклования этих микрочастиц или выше. Контролируя соотношение чувствительных к температуре микрочастиц с обработанной поверхностью к не чувствительным к температуре микрочастицам с обработанной поверхностью, можно манипулировать пористостью полученного консолидированного агрегата. Микрочастицы с обработанной поверхностью могут быть твердыми, то есть с твердой наружной поверхностью, или они могут быть пористыми. Частицы могут иметь неправильную форму или быть по существу сферическими.

Микрочастицы с обработанной поверхностью могут иметь размер по самому длинному измерению или диаметру, если они являются по существу сферическими, менее чем около 100 мкм и более чем около 1 мкм. Микрочастицы с обработанной поверхностью могут иметь размер по самому длинному измерению или диаметру менее чем 100 мкм. Микрочастицы с обработанной поверхностью могут иметь размер по самому длинному измерению или диаметру от около 1 мкм до около 40 мкм, чаще от около 20 мкм до около 40 мкм. Полимерные частицы желаемого размера будут проходить через сито или фильтр с порами размером около 40 мкм.

Формирование консолидированного агрегата из композиции после введения человеку или животному, не относящемуся к человеку, как правило, занимает от около 20 с до около 24 ч, например, от около 1 мин до около 5 ч, от около 1 мин до около 1 ч, менее чем около 30 мин, менее чем около 20 мин. Как правило, отверждение происходит через период времени, составляющий около от 1 мин до 20 мин после введения.

Как правило, композиция содержит от около 20 до около 80% инъекционного материала в виде микрочастиц с обработанной поверхностью и от около 20 до около 80% носителя; от около 30 до около 70% инъекционного материала в виде микрочастиц с обработанной поверхностью и от около 30 до около 70% носителя; например, композиция может содержать от около 40 до около 60% инъекционного материала в виде микрочастиц с обработанной поверхностью и от около 40 до около 60% носителя; композиция может содержать около 50% инъекционного материала в виде микрочастиц с обработанной поверхностью, и около 50% носителя. Все вышеуказанное процентное содержание относится к массовым процентам.

Микрочастицы с обработанной поверхностью нагружают фармацевтически активным соединением, например, в микрочастицу с обработанной поверхностью или в виде покрытия на микрочастице с обработанной поверхностью.

Система согласно изобретению может обеспечить замедленное высвобождение фармацевтически активного соединения в течение некоторого времени, например, высвобождение может быть замедленным в течение по меньшей мере около 2 ч, по меньшей мере около 4 ч, по меньшей мере около 6 ч, по меньшей мере около 10 ч, по меньшей мере около 12 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере, 48 ч, по меньшей мере недели, более чем одной недели, по меньшей мере месяца, по меньшей мере двух месяцев, по меньшей мере трех месяцев, по меньшей мере четырех месяцев, по меньшей мере пяти месяцев, по меньшей мере шести месяцев или по меньшей мере семи месяцев.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые образуют гранулу *in vivo*, высвобождают терапевтический агент без "взрывного" эффекта более чем около 1-5% от общей нагрузки за период, составляющий 24 ч.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые образуют гранулу *in vivo*, высвобождают терапевтический агент без "взрывного" эффекта более чем около 10% от общей нагрузки за период времени, составляющий 24 ч.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые образуют гранулу *in vivo*, высвобождают терапевтический агент без "взрывного" эффекта более чем около 15% от общей нагрузки за период времени, составляющий 24 ч.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые образуют гранулу *in vivo*, высвобождают терапевтический агент без "взрывного" эффекта более чем около 20% от общей нагрузки за период времени, составляющий 24 ч.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые образуют гранулу *in vivo*, высвобождают терапевтический агент без "взрывного" эффекта более чем около 1-5% от общей нагрузки за период времени, составляющий 12 ч.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые образуют гранулу *in vivo*, высвобождают терапевтический агент без "взрывного" эффекта более чем около 10% от общей нагрузки в течение периода времени, составляющего 12 ч.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые образуют гранулу *in vivo*, высвобождают терапевтический агент без "взрывного" эффекта более чем около 15% от общей нагрузки в течение периода времени, составляющего 12 ч.

В одном варианте осуществления поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые образуют гранулу *in vivo*, высвобождают терапевтический агент без "взрывного" эффекта более чем около 15% от общей нагрузки в течение периода времени, составляющего 12 ч.

В одном варианте осуществления фармацевтически активное соединение высвобождается в количестве, эффективном для обеспечения желаемого местного или системного физиологического или фармакологического эффекта.

В одном варианте осуществления доставка фармацевтически активного соединения означает, что фармацевтически активное соединение высвобождается из консолидированного агрегата в окружающую среду вокруг консолидированного агрегата, например, витреальную жидкость.

В одном варианте осуществления микрочастица с обработанной поверхностью, содержащая фармацевтически активное соединение согласно настоящему изобретению, обеспечивает скорость высвобождения фармацевтически активного соединения нулевого или первого порядка из консолидированного агрегата после его образования. Скорость высвобождения нулевого порядка представляет собой постоянное высвобождение фармацевтически активного соединения в течение определенного периода времени; такое высвобождение трудно достигнуть с использованием известных способов доставки.

VII. Получение микрочастиц с обработанной поверхностью.

Образование микрочастиц

Микрочастицы могут быть образованы с использованием любого подходящего способа получения полимерных микрочастиц, известного в данной области. Способ, используемый для образования частиц, будет зависеть от множества факторов, включая характеристики полимеров, присутствующих в лекарственном средстве или полимерной матрице, а также желаемого размера частиц и распределения по размерам. Тип лекарственного средства (лекарственных средств), вводимого в микрочастицы, также является фактором, поскольку некоторые лекарственные средства неустойчивы в присутствии определенных растворителей, в определенных температурных диапазонах и/или в определенных диапазонах pH.

Частицы, имеющие средний размер частиц от 1 до 100 мкм, являются полезными в композициях, описанных в настоящем документе. В типичных вариантах осуществления частицы имеют средний размер от 1 микрона до 40 микрон, чаще от около 10 до около 40 мкм, чаще от около 20 до около 40 мкм. Частицы могут иметь любую форму, но обычно имеют сферическую форму.

В ситуациях, когда желательна монодисперсная популяция частиц, эти частицы могут быть образованы с использованием способа, который обеспечивает получение монодисперсной популяции микрочастиц. Альтернативно, могут быть использованы способы получения полидисперсных распределений микрочастиц, и частицы могут быть разделены с использованием способов, известных в данной области, таких как просеивание, после образования частиц, чтобы обеспечить популяцию частиц, имеющих желаемый средний размер частиц и распределение частиц по размерам.

Общие методы получения микрочастиц включают, но без ограничения, испарение растворителя, образование частиц из расплава, удаление растворителя, сушку распылением, инверсию фазы, коацервацию и низкотемпературное литье. Подходящие способы получения частиц кратко описаны ниже. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, включая агенты, модифицирующие pH, разрыхлители, консерванты и антиоксиданты, могут быть необязательно включены в частицы во время формирования частиц.

В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью получают с использованием процессов непрерывного химического производства. В одном варианте осуществления микрочастицы с обработанной поверхностью получены с использованием ступенчатых производственных процессов.

В одном варианте осуществления микрочастицы, содержащие терапевтический агент, могут быть получены, как описано в PCT/US2015/065894. В одном варианте осуществления микрочастицы получают путем:

(i) растворения или диспергирования терапевтического агента или его соли в органическом растворителе, необязательно с щелочным агентом;

(ii) смешивания раствора/дисперсии, полученной на стадии (i), с полимерным раствором, имеющим вязкость по меньшей мере около 300 сП (или, по меньшей мере, около 350, 400, 500, 600, 700 или 800 сП, или более);

(iii) смешивания полимерного раствора/дисперсии терапевтического агента, полученной на стадии (ii), с водным неокислотным или щелочным раствором (например, со значением pH, равным по меньшей мере около 7, 8 или 9 и, как правило, не выше около 10), необязательно с поверхностно-активным веществом или эмульгатором, с образованием насыщенной растворителем микрочастицы, инкапсулированной терапевтическим агентом;

(iv) выделение микрочастиц.

В одном варианте осуществления терапевтическим агентом является сунитиниб.

Было обнаружено, что может быть полезным включать щелочной агент в органический растворитель. Однако, как описано в PCT/US2015/065894, было обнаружено, что добавление кислоты в органический растворитель может улучшить нагрузку лекарственным средством микрочастицы. Примеры демонстрируют, что микрочастицы, состоящие из сложных полиэфиров, таких как PLGA, PEG-PLGA (PLA) и PEG-PLGA/PLGA, проявляют замедленное высвобождение терапевтического агента или его фармацевтически приемлемой соли. Полимерные микрочастицы, состоящие из PLGA и PEG, ковалентно конъюгированного с PLGA (M_w 45 кДа) (PLGA45k-PEG5k), нагруженные терапевтическим агентом, изготавливали с использованием метода испарения растворителя из одинарной эмульсии. Улучшение нагрузки было достигнуто за счет увеличения щелочности терапевтического агента в растворе до 16,1% с помощью PEG-PLGA, которая может быть дополнительно увеличена путем добавления DMF, по сравнению с только 1% без добавления щелочи. Нагрузку терапевтическим агентом дополнительно увеличивали путем увеличения pH водного раствора, а также раствора полимера. Еще более значительное увеличение нагрузки терапевтического агента в микрочастицах достигалось за счет увеличения концентрации или вязкости полимера. В одном варианте осуществления терапевтическим агентом является сунитиниб.

Испарение растворителя

В этом способе лекарственное средство (или полимерную матрицу и лекарственное средство) растворяли в летучем органическом растворителе, таком как метиленхлорид, ацетон, ацетонитрил, 2-бутанол, 2-бутанон, трет-бутиловый спирт, бензол, хлороформ, циклогексан, 1,2-дихлорэтан, диэтиловый эфир, этанол, этилацетат, гептан, гексан, метанол, метил-трет-бутиловый эфир, пентан, петролейный

эфир, изопропанол, н-пропанол, тетрагидрофуран или их смеси. Затем органический раствор, содержащий лекарственное средство, суспендировали в водном растворе, содержащем поверхностно-активное вещество, такое как поли(виниловый спирт). Полученную эмульсию перемешивали до тех пор, пока большая часть органического растворителя не испарится, и не останутся твердые микрочастицы. Полученные микрочастицы промывали водой и сушили в течение ночи в лиофилизаторе. С помощью этого способа могут быть получены микрочастицы разных размеров и морфологии.

Микрочастицы, которые содержат лабильные полимеры, такие как некоторые полиангидриды, могут деградировать в процессе получения из-за присутствия воды. Для этих полимеров могут быть использованы следующие два способа, которые выполняют в полностью безводных органических растворителях.

Технология эмульсии типа масло-в-масле

Удаление растворителя также может быть использовано для получения частиц из лекарственных средств, которые являются гидролитически нестабильными. В этом способе лекарственное средство (или полимерную матрицу и лекарственное средство) диспергируют или растворяют в летучем органическом растворителе, таком как метиленхлорид, ацетон, ацетонитрил, бензол, 2-бутанол, 2-бутанон, трет-бутиловый спирт, хлороформ, циклогексан, 1,2-дихлорэтан, диэтиловый эфир, этанол, этилацетат, гептан, гексан, метанол, метил-трет-бутиловый эфир, пентан, петролейный эфир, изопропанол, н-пропанол, тетрагидрофуран или их смеси. Затем эту смесь суспендируют путем перемешивания в органическом масле (таким как силиконовое масло, касторовое масло, парафиновое масло или минеральное масло) с образованием эмульсии. Из эмульсии образуются твердые частицы, которые затем могут быть выделены из супернатанта. Внешняя морфология сфер, полученных с помощью этой технологии, сильно зависит от особенностей лекарственного средства.

Технология эмульсии типа масло-в-воде

В этом способе лекарственное средство (или полимерную матрицу и лекарственное средство) диспергировали или растворяли в летучем органическом растворителе, таком как метиленхлорид, ацетон, ацетонитрил, бензол, 2-бутанол, 2-бутанон, трет-бутиловый спирт, хлороформ, циклогексан, 1,2-дихлорэтан, диэтиловый эфир, этанол, этилацетат, гептан, гексан, метанол, метил-трет-бутиловый эфир, пентан, петролейный эфир, изопропанол, н-пропанол, тетрагидрофуран или их смеси. Затем эту смесь суспендировали путем перемешивания в водном растворе поверхностно-активного вещества, такого как поли(виниловый спирт), с образованием эмульсии. Образовавшиеся из эмульсии твердые частицы затем могут быть выделены из супернатанта. Внешняя морфология сфер, полученных с помощью этой технологии, сильно зависит от особенностей лекарственного средства.

Как описано в PCT / US2015/065894, микрочастицы с терапевтическим агентом могут быть получены с использованием метода эмульсии типа масло-в-воде. В одном примере микрочастицы сунитиниба получали путем растворения 100 мг PEG-PLGA (5K, 45) в 1 мл метиленхлорида и растворения 20 мг сунитиниба малата в 0,5 мл DMSO и триэтиламина. Затем растворы смешивали вместе, гомогенизировали со скоростью 5000 об/мин в течение 1 мин в водном растворе, содержащем 1% поливиниловый спирт (PVA), и перемешивали в течение 2 ч. Частицы собирали, промывали дважды дистиллированной водой и сушили вымораживанием. В другом примере микрочастицы сунитиниба также получали в соответствии с PCT/US2015/065894 путем растворения 200 мг PLGA (2A, Alkermers) в 3 мл метиленхлорида и 40 мг сунитинибабата в 0,5 мл DMSO и триэтиламина. Затем растворы смешивали вместе и гомогенизировали при 5000 об/мин в течение 1 мин в 1% PVA, и перемешивали в течение 2 ч. Частицы собирали, промывали дважды дистиллированной водой и сушили вымораживанием.

Сушка распылением

В этом способе лекарственное средство (или полимерную матрицу и лекарственное средство) растворяли в органическом растворителе, таком как метиленхлорид, ацетон, ацетонитрил, 2-бутанол, 2-бутанон, трет-бутиловый спирт, бензол, хлороформ, циклогексан, 1,2 дихлорэтан, диэтиловый эфир, этанол, этилацетат, гептан, гексан, метанол, метил-трет-бутиловый эфир, пентан, петролейный эфир, изопропанол, н-пропанол, тетрагидрофуран или их смеси. Раствор закачивали через микроиниализирующую насадку под действием потока сжатого газа, и полученный аэрозоль суспендировали в нагретом циклоне воздуха, обеспечивая испарение растворителя из микрокапель с образованием частиц. Используя этот способ, могут быть получены частицы размером 0,1-10 мкм.

Инверсия фаз

Частицы могут быть образованы из лекарственных средств с использованием метода инверсии фаз. В этом методе лекарственное средство (или полимерную матрицу и лекарственное средство) растворяют в растворителе, и раствор заливают в сильный не растворитель для лекарственного средства для спонтанного образования в благоприятных условиях микрочастиц или наночастиц. Этот метод может быть использован для получения наночастиц в широком диапазоне размеров, включая, например, размер в диапазоне от около 100 нанометров до около 10 микрон, обычно с узким распределением частиц по размерам.

Коацервация

Способы образования частиц с использованием коацервации известны в данной области, например,

в GB-B-929 406; GB-B-929 40 1; и патентах США №№ 3266987, 4794000 и 4460563. Коацервация включает разделение раствора лекарственного средства (или полимерной матрицы и лекарственного средства) на две несмешивающиеся жидкие фазы. Одна фаза представляет собой плотную фазу коацервата, которая содержит высокую концентрацию лекарственного средства, тогда как вторая фаза содержит низкую концентрацию лекарственного средства. В пределах плотной фазы коацервата лекарственное средство образует наноразмерные или микроразмерные капли, которые затвердевают в частицы. Коацервация может быть индуцирована изменением температуры, добавлением не-растворителя или добавлением микросоли (простая коацервация) или добавлением другого полимера, образуя, таким образом, интерполимерный комплекс (комплексная коацервация).

Низкотемпературное литье

Способы литья при очень низкой температуре микросфер с контролируемым высвобождением описаны в патенте США № 5019400, выданном Gombotz et al. В этом способе лекарственное средство (или полимерную матрицу и сунитиниб) растворяют в растворителе. Затем смесь распыляют в сосуд, содержащий жидкий не-растворитель, при температуре ниже точки замерзания раствора лекарственного средства, который замораживает капли лекарственного средства. По мере нагревания капель и растворителя для лекарственного средства, растворитель в капелях оттаивает и экстрагируется в не-растворитель, при этом происходит отверждение микросфер.

Масштабирование

Способы получения микрочастиц, описанные в примерах, могут быть масштабированы способами, известными в данной области. Примеры таких способов включают патент США 4822534; патент США 5271961; патент США 5945126; патент США 6270802; патент США 6п361п798; Патент США 8708159; и публикацию патента США 2010/0143479. В патенте США 4822534 описан способ получения твердых микросфер, который включает использование дисперсий. Эти дисперсии могут быть получены промышленным способом и допускают увеличение масштаба. В патенте США 5271961 описано получение белковых микросфер, которые включают использование низких температур, обычно ниже 45°C. В патенте США 5945126 описан способ получения микрочастиц в полномасштабном производстве при этом сохраняя однородность по размеру, наблюдаемую в лабораторном масштабе. В патенте США 6270802 и патенте США 6361798 описан крупномасштабный способ получения полимерных микрочастиц при сохранении стерильного поля. В патенте США 8708159 описана обработка микрочастиц в масштабе с использованием гидроциклона. В публикации США 2010/0143479 описан способ получения микрочастиц в крупном масштабе специально для микрочастиц с замедленным высвобождением.

Фирма XSpray раскрыла устройство и использование сверхкритических жидкостей для получения частиц размером меньше 10 мкм (патент США № 8167279). Дополнительные патенты, принадлежащие XSpray, включают патент США 8559442 и патент США 8559443. Фирма Sun Pharmaceuticals раскрыла способ получения микросфер или микрокапсул, WO 2006/123359, включенный в настоящий документ путем ссылки. В качестве примера, Способ А охватывает пять стадий, которые включают: 1) получение первой дисперсной фазы, содержащей терапевтически активный ингредиент, биоразлагаемый полимер и органический растворитель; 2) смешивание первой дисперсной фазы с водной фазой с образованием эмульсии; 3) распыление эмульсии в сосуд, оснащенный с возможностью удаления органического растворителя, и 4) пропускание полученных микросфер или микрокапсул через первый и второй экран, собирая, таким образом, микросферы или микрокапсулы, фракционированные по размеру, и 5) сушку микросфер или микрокапсул.

В работе Xu, Q. et al. раскрыто получение монодисперсных биоразлагаемых полимерных микрочастиц с использованием микрожидкостного устройства с фокусировкой потока (Xu, Q., et al "Preparation of Monodispersed Biodegradable Polymer Microparticles Using a Microfluidic Flow-Focusing Device for Controlled Drug Delivery", Small, Vol 5(13): 1575-1581, 2009).

В работе Duncanson, W.J. et al. раскрыто использование микрожидкостных устройств для создания микросфер (Duncanson, W.J. et al. "Microfluidic Synthesis of Monodisperse Porous Microspheres with Size-tunable Pores", Soft Matter, Vol 8, 10636-10640, 2012).

В патенте США № 8916196, принадлежащем Evonik, описано устройство и способ получения микрочастиц на основе эмульсии, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением.

VIII. Способ получения микрочастиц с обработанной поверхностью.

Сокращения:

DCM, CH ₂ Cl ₂	Дихлорметан
DL	Нагрузка лекарственным средством
DMSO	Диметилсульфоксид
EtOH	Этанол
HA	Гиалуронат натрия
hr, h	Час
min	Минута
NaOH	Гидроксид натрия
NSTMP	Микрочастицы с не обработанной поверхностью
PBS	Забуференный фосфатом Дульбекко физиологический раствор
PCL	Поликапролактон
PEG	Полиэтиленгликоль
PLA	Поли(молочная кислота)
PLGA	Поли(молочная-со-гликолевая кислота)
PVA	Поливиниловый спирт
Rpm	Оборотов в минуту
RT, r.t.	Комнатная температура
SD	Стандартное отклонение
STMP	Микрочастицы с обработанной поверхностью
UV	УФ-излучение

Общие способы

Все неводные реакции выполняли в атмосфере сухого аргона или азота с использованием безводных растворителей. Структура исходных материалов, интермедиатов и конечных продуктов подтверждали с помощью стандартных аналитических методов, включая ЯМР-спектроскопию и масс-спектрометрию.

Материалы

Гидроксид натрия (NaOH, номер по каталогу: S318-1, Fisher Chemical), этанол (EtOH, номер по каталогу: A405-20, Fisher Chemical), забуференный фосфатом Дульбекко физиологический раствор (PBS, номер по каталогу: SH3085003, GE Healthcare HyClone™), гиалуронат натрия (HA, номер по каталогу: AC251770010, Acros Organics) и Tween 20 (номер по каталогу: BP337-100, Fisher BioReagents) получали от фирмы Fisher Scientific. Поливиниловый спирт (PVA) (гидролизированный на 88%, MW приблизительно 25 кДа) (номер по каталогу: 02975) получали от фирмы Polysciences, Inc. Суитиниба малат получали от фирмы LC Laboratories (номер по каталогу: S-8803). ProVisc® (10 мг/мл, 0,85 мл, номер по каталогу: 21989, Alcon) получали от фирмы Besse Medical. Полимер поли(молочную-со-гликолевую кислоту) (PLGA), полимер поли(молочную кислоту) (PLA) и диблоксополимеры PLGA и полиэтиленгликоля (PLGA-PEG) получали от фирмы Evonik Corporation (RESOMER Select 5050 DLG mPEG 5000 (10 масс.% PEG)). Для лиофилизации применяли систему FreeZone 4.5 liter benchtop freeze dry system.

ProVisc® OVD (Ophthalmic Viscosurgical Device) представляет собой стерильную, апиrogenную, высокомолекулярную, не вызывающую воспаления, высокоочищенную фракцию гиалуроната натрия, растворенного в забуференном фосфатом физиологическом растворе. Одобрен FDA и показан для применения в качестве офтальмологической хирургической помощи. Гиалуронат натрия является производным гиалуронана для клинического применения. Гиалуронан, также известный как гиалуроночная кислота, представляет собой природный гликозаминогликан, содержащийся в организме, в том числе во внутрислизистой жидкости и стекловидном теле глаза.

Пример 1. Получение биоразлагаемых микрочастиц с необработанной поверхностью (NSTMP), содержащих PLGA.

Полимерные микрочастицы, содержащие PLGA и диблоксополимер PLGA и PEG с суитиниба малатом или без него, получали с использованием метода испарения растворителя из одинарной эмульсии. Вкратце, PLGA (560 мг) и PLGA-PEG (5,6 мг) совместно растворяли в дихлорметане (DCM) (4 мл). Суитиниба манат (90 мг) растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO) (2 мл). Раствор полимера и раствор

лекарственного средства смешивали с образованием гомогенного раствора (органическая фаза). Для пустых NSTMP использовали DMSO (2 мл) без лекарственного средства. Для нагруженных лекарственным средством NSTMP органическую фазу добавляли к водному 1%-ному раствору PVA в PBS (200 мл) и гомогенизировали при 5000 об/мин с использованием лабораторного смесителя L5M-A (Silverion Machines Inc., East Longmeadow, MA) с получением эмульсии. Для пустых NSTMP использовали 1%-ный раствор PVA в воде (200 мл).

Затем эмульсия (насыщенные растворителем микрочастицы) отверждалась путем перемешивания при комнатной температуре в течение более 2 ч для обеспечения испарения DCM. Микрочастицы собирали путем седиментации и центрифугирования, промывали три раза в воде и фильтровали через стерильный клеточный фильтр Falcon® с размером пор 40 мкм (Corning Inc., Corning, NY). Микрочастицы с необработанной поверхностью (NSTMP) использовали напрямую в процессе обработки поверхности или сушили путем лиофилизации и хранили в виде сухого порошка при -20°C до использования.

Пример 2. Обработка поверхности микрочастиц с необработанной поверхностью (NSTMP) с использованием NaOH(aq)/EtOH.

Предварительно охлажденный раствор, содержащий 0,25 М NaOH (водн.) и этанол в предварительно определенном соотношении, добавляли к микрочастицам в стеклянный сосуд при перемешивании в ледяной ванне при температуре приблизительно 4°C с образованием суспензии при 100 мг/мл. Затем суспензию перемешивали в течение предварительно определенного времени (например, 3, 6 или 10 мин) на льду и заливали в предварительно охлажденный фильтровальный аппарат для удаления раствора NaOH (водн.) в EtOH. Затем микрочастицы промывали предварительно охлажденной водой и переносили в 50 мл центрифужную пробирку. Затем частицы суспендировали в предварительно охлажденной воде и хранили в холодильнике в течение 30 мин для осаждения частиц. После удаления супернатанта частицы ресуспендировали и фильтровали через 40-мкм клеточный фильтр для удаления крупных агрегатов. Затем частицы дважды промывали водой при комнатной температуре и сушили замораживанием в течение ночи. Подробная информация по составлению и условиям экспериментов по обработке поверхности с использованием NaOH(водн.)/EtOH представлена в табл. 1.

Таблица 1. Подробное описание партий микрочастиц с поверхностью, обработанной NaOH(водн.)/EtOH

Микрочастицы до обработки поверхности	Размер партии (мг)	Соотношение 0,25 М NaOH (водн.) к EtOH (об./об.)	Время обработки (мин)	ID STMP
S-1 (99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG) DL=18.0%	200	30/70	3	S-2
	200		6	S-3
	200		10	S-4
S-5 (90% PLGA 7525 4A, 10% PLGA-PEG) DL=18.9%	200	50/50	3	S-6
	200		6	S-7
	200	30/70	6	S-8
S-9 (99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG) DL=18.3%	1000	30/70	3	S-10
S-11 (99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG) DL=11.1%	2300	30/70	3	S-12
S-13 (99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG) DL=11.9%	3600	30/70	3	S-14
S-15 (99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG) DL=2.15%	2000	30/70	3	S-16
S-17 (99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG) DL=2.21%	2000	30/70	3	S-18

DL = нагрузка лекарственным средством.

Пример 3. Оценка *in vitro* способности частиц к агрегации.

Микрочастицы с обработанной поверхностью (STMP) суспендировали в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) при концентрации 200 мг/мл. Тридцать или пятьдесят микролитров суспензии вносили в 1,5-2,0 мл PBS или раствора гиалуроната натрия (НА, 5 мг/мл в PBS), предварительно нагретого при 37°C, в микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл с использованием инсулинового шприца на 0,5 мл с постоянной иглой 27 калибра (Terumo of Easy Touch brand). Затем микроцентрифужную пробирку инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 2 ч. Способность к агрегации микрочастиц оценивали путем визуального наблюдения и/или получения изображения в условиях легкого перемешивания путем переворачивания и/или постукивания по столу и пощелкивания пальцем по пробиркам, содержащим микрочастицы. В качестве контроля использовали микрочастицы с необработанной поверхностью (NSTMP).

Предполагается, что успешный процесс обработки поверхности приведет к получению STMP, которые сохраняют удовлетворительную суспендируемость, легкость забора в шприц через иглу и введения через иглу. Более важным является то, что после внесения в PBS или гиалуронат натрия и 2-х часовой инкубации при 37°C ожидается, что STMP будут образовывать консолидированный агрегат(ы), который не разрушается на маленькие агрегаты или свободные плавающие частицы в условиях легкого перемешивания, что является ключевой особенностью, которая отличает STMP от NSTMP и STMP с низкой способностью к агрегации.

Пример 4. Влияние температуры во время обработки поверхности на свойства микрочастицы.

Влияние температуры на обработку поверхности исследовали путем сравнения частиц, обработанных при комнатной температуре, и при 4°C. Процедура обработки поверхности при комнатной температуре была идентична процедуре, описанной в примере 2, за исключением того, что ее проводили при комнатной температуре вместо 4°C.

Когда процесс обработки поверхности осуществляли при комнатной температуре в смеси 0,25 M NaOH и EtOH (об./об.: 30/70 или 70/30), частицы быстро и необратимо агрегировали во время обработки поверхности. Напротив, частицы, обработанные при 4°C в смеси NaOH/EtOH при таком же объемном соотношении, не агрегировали во время процесса обработки поверхности и сохраняли удовлетворительную суспендируемость и легкость забора в шприц через иглу при восстановлении. Для обработки поверхности при комнатной температуре в 0,25 M NaOH без EtOH, частицы не агрегировали во время 1-часовой обработки поверхности. Кроме того, STMP, обработанные в NaOH, не агрегировали после инкубации при 37°C. Напротив, STMP, обработанные при температуре около 4°C, не агрегировали во время обработки поверхности, но агрегировали после инкубации при 37°C. После лиофилизации и восстановления в разбавителе частиц, STMP показали легкость забора в шприц через иглу 27 калибра и введение без блокады иглы.

Пример 5. Влияние содержания PEG на способность к агрегации микрочастиц с обработанной поверхностью.

Таблица 2. NSTMP и STMP, имеющие различное процентное содержание PLGA:PLGA-PEG

Препарат, №	PLGA (масс.%)	PLGA-PEG (масс.%)	Условие обработки поверхности
S-1	99%	1%	Нет
S-3	99%	1%	0,25 M NaOH/EtOH (30/70, об./об.), 6 мин
S-5	90%	10%	Нет
S-8	90%	10%	0,25 M NaOH/EtOH (30/70, об./об.), 6 мин

Две партии NSTMP (S-1 и S-5) и две партии STMP (S-3 и S-8), имеющие различное массовое процентное содержание PLGA/PLGA-PEG, подвергали обработке поверхности, следуя процедуре, описанной ниже, и оценивали их способность к агрегации в PBS и геле на основе НА.

Как показано выше в табл. 2, препарат S-3 содержал 1% PLGA-PEG, и S-8 содержал 10% PLGA-PEG. Образцы S-3 и S-8 индивидуально обрабатывали в смеси 0,25M NaOH и EtOH при объемном соотношении 30/70 при 4°C в течение 6 мин. После внесения в PBS и инкубации при 37°C в течение 2 ч микроцентрифужные пробирки переворачивали, и способность к агрегации частиц оценивали путем визуального наблюдения. Как показано на фиг. 1, NSTMP S-1 и S-5 начинали диспергироваться сразу же после переворачивания пробирок, при этом STMP S-3 и S-8 оставались агрегированными на дне пробирок без диспергирования на протяжении всего периода наблюдения (около 10 мин).

Аналогичный второй эксперимент проводили путем внесения тех же суспензий частиц в растворы НА и инкубации образцов при 37°C в течение 2 ч. Сразу же после переворачивания пробирок ни одна из частиц не стала диспергированной, включая NSTMP; см. фиг. 2. По-видимому, это обусловлено более высокой вязкостью НА, что предотвращает частицы от быстрого диспергирования в растворе геля. В

отличие от S-1, который оставался агрегированным на протяжении эксперимента, S-5 начинал становиться диспергированным в НА через 2 мин после переворачивания пробирки. Без привязки к какой-либо теории полагают, что это может быть связано с более высоким содержанием PEG в S-1, что влияет на взаимодействие между частицами и между поверхностями частиц и НА, и поэтому диспергирование S-5 в НА было менее затрудненным, чем S-1. Хотя S-8 оставался агрегированным после внесения и инкубации в PBS, он оказался более диспергируемым в растворе НА. Напротив, S-3, который содержит меньше PEG, чем S-8, был способен агрегировать в обоих растворах, PBS и НА. Эти данные указывают на то, что на агрегацию и диспергирование STMP может влиять как композиция частиц, так и свойства среды, в которую вносят STMP.

В третьем эксперименте образцы, содержащие S-1, S-2, S-3, S-4, S-5, S-6, S-7 и S-8, инкубировали в PBS при 37°C в течение 2 ч. После оценки способности к агрегации путем переворачивания пробирок, более сильное встряхивание применяли путем постукивания пробирок по столу, что вызывало открепление агрегатов частиц от дна пробирок. Целостность агрегатов затем изучали и сравнивали в различных препаратах. Как показано на фиг. 3, S-3 (1 процент PLGA-PEG) оставался в виде объединенного единичного агрегата после открепления от дна пробирки. Для сравнения, хотя большинство частиц в S-8 (10% PLGA-PEG) оставались в виде одного крупного агрегата, много диспергированных малых агрегатов или частиц наблюдалось в пробирке. Анализ с более сильным перемешиванием обеспечил дальнейшую дифференцировку способности к агрегации различных препаратов частиц. В целом, данные дают основание предположить, что STMP с более низким содержанием PEG, как правило, образуют прочные и более консолидированные агрегаты, чем STMP с более высоким содержанием PEG.

Пример 6. Влияние обработки поверхности с использованием PBS/EtOH на микрочастицы.

Поскольку NaOH является сильным основанием, которое может вызывать частичную деградацию полимеров и приводить к быстрой модификации свойств поверхности частиц, нейтральный забуференный фосфатом солевой раствор (PBS) при pH 7,4 оценивали в качестве альтернативы NaOH и изучали эффект обработки поверхности с использованием PBS/EtOH на микрочастицы. Процедура обработки поверхности была идентичной процедуре, описанной в примере 2, за исключением того, что раствор NaOH был заменен на PBS (pH 7,4). Эксперимент проводили в ледяной бане при температуре около 4°C. Подробная информация по составу и условиям обработки представлена в табл. 3. Способность к агрегации микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) тестировали, следуя процедуре, описанной в примере 3.

Таблица 3. Композиция препарата и условия обработки поверхности с использованием PBS/EtOH

ID частицы до обработки	Композиция	Нагрузка лекарств. средством	Размер партии (мг)	PBS/EtOH (об./об.)	Время обработки (мин)	ID STMP
S-11	99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG	11,1%	200	30/70	3	S-21
S-19		11,8%	500			S-22
			500			S-23
			500		6	S-24
S-20		0%	200		6	S-25
			200		12	S-26

Результаты теста на способность к агрегации показали, что аналогично обработке поверхности с использованием NaOH/EtOH, все STMP, обработанные PBS/EtOH, были способны образовывать агрегат после внесения в PBS и инкубации в течение 2 ч при 37°C. Агрегаты оказались стабильными и устойчивыми к слабому перемешиванию; см. фиг. 4, снимок S-21. Отсутствовало явное различие в способности частиц к агрегации в анализе агрегации *in vitro* (процедуру проводили, как описано в примере 3) между этими STMP и STMP, образованными путем обработки в NaOH/EtOH. Нагруженные лекарственным средством STMP и пустые STMP были способны к агрегации в PBS, исходя из чего можно предположить, что процесс обработки поверхности вероятно обладает хорошей совместимостью с различными препаратами частиц, содержащим или не содержащим лекарственное средство.

Пример 7. Модификация условий обработки поверхности с использованием NaOH(водн.)/EtOH.

Для дальнейшей оптимизации условий обработки поверхности с использованием NaOH(водн.)/EtOH, изучали влияние различных параметров, таких как концентрация NaOH, соотношение водный раствор/EtOH и время обработки, на обработку поверхности (табл. 4). Следует отметить, что в этом примере общую молярную концентрацию NaOH во всей смеси водный раствор/EtOH использовали в качестве переменной, независимо от соотношения водного раствора к EtOH, вместо использования только молярности NaOH в водной фазе, как в примере 2. Например, 0,25M NaOH(водн.)/EtOH (об./об.: 30/70) в примере 2 эквивалентно 0,075M NaOH в смеси водный раствор/EtOH (об./об.: 30/70). Таким образом, объемное соотношение водного раствора к EtOH было модифицировано с 30/70 на 50/50 и 70/30 с таким же общим количеством NaOH в смеси. Кроме того, количество NaOH было уменьшено в 10 или 100 раз без

изменения соотношения водного раствора к EtOH. Другое время обработки было выбрано для достижения сопоставимой эффективности обработки поверхности. Процедура обработки поверхности на микро-частицах была такая же, как в примере 2.

Таблица 4. Подробное описание партий STMP, модифицированных NaOH(водн.)/EtOH

Микрочастицы до обработки поверхности	Размер партии (мг)	Концентрация NaOH в смеси H ₂ O/EtOH (M)	Соотношение H ₂ O/EtOH (об./об.)	Время обработки (мин)	ID STMP
S-27 (99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG) DL = 11,3%	200	0,075	50/50	10	S-28
	200		50/50	20	S-29
	200		70/30	15	S-30
	200		70/30	30	S-31
	200	0,0075	30/70	3	S-32
	200		30/70	10	S-33
	200	0,00075	30/70	3	S-34
	200		30/70	10	S-35

Пример 8. Влияние обработки поверхности с использованием HCl/EtOH на микрочастицы.

Поскольку ранее тестировали обработку поверхности с использованием водного раствора, имеющего щелочное значение pH (пример 2 и пример 7) или нейтральное значение pH (пример 6), в примере 8 оценивали влияние водного раствора, имеющего кислое значение pH. В качестве репрезентативной кислоты была выбрана HCl. Как показано в табл. 5, микрочастицы обрабатывали в течение 3 мин в 0,075M или 0,0075M HCl в смеси H₂O/EtOH (об./об.: 30/70), соответственно. Процедура обработки поверхности HCl/EtOH была такая же, как в примере 2, за исключением того, что HCl (водн.) использовали вместо NaOH (водн.).

Таблица 5. Подробное описание партий STMP, обработанных HCl/EtOH

Микрочастицы до обработки поверхности	Размер партии (мг)	Концентрация HCl в смеси H ₂ O/EtOH (M)	Соотношение H ₂ O/EtOH (об./об.)	Время обработки (мин)	Конечные частицы с обработанной поверхностью
S-27 (99% PLGA 7525 4A, 1% PLGA-PEG) DL = 11,3 %	200	0,075	30/70	3	S-36
	200	0,0075	30/70	3	S-37

Пример 9. Обработка поверхности на влажных микрочастицах.

В дополнение к проведению обработки поверхности на NSTMP сначала путем ресуспендирования сухого порошка NSTMP в водном растворе, как проиллюстрировано в предыдущих примерах, также оценивали возможность осуществления обработки поверхности на NSTMP перед сушкой (то есть "влажных" микрочастицах). Ожидалось, что будет легче ввести стадию обработки поверхности с использованием "влажных" NSTMP в полный процесс крупномасштабного производства STMP, чем стадию с использованием сухого порошка NSTMP. После получения "влажных" NSTMP перед лиофилизацией, как показано в примере 1, аликвоту суспензии лиофилизировали для определения массы частицы на объем. Затем суспензию частиц концентрировали или разбавляли соответствующим образом для достижения желаемой концентрации и охлаждали до желаемой температуры. Затем к суспензии добавляли другие реагенты, необходимые для обработки поверхности, для достижения желаемых условий (например, концентрации каждого химического реагента), как описано в табл. 6, для начала процесса обработки поверхности. Остальной процесс обработки поверхности является таким же, как описано для сухих частиц в примере 2. Подробная информация по партиям и условия экспериментов представлена в табл. 6.

Таблица 6. Подробное описание партий и экспериментальных условий обработки поверхности на "влажных" микрочастицах

Микрочастицы до обработки поверхности	Размер партии (мг)	Растворитель для конечной обработки поверхности			Время обработки (мин)	ID STMP
		Растворенное вещество (основание, кислота или соль)	Концентрация растворенного вещества в смеси H ₂ O/EtOH (M)	Соотношение H ₂ O/EtOH (об./об.)		
S-38 (99%)	450	NaOH	0,075	30/70	3	S-39
PLGA 7525 4A,	450		0,0075	30/70	10	S-40
1% PLGA-PEG)	450		0,075	70/30	15	S-41
DL = 11.6 %	450		0,00075	70/30	30	S-42
	450	HCl	0,0075	30/70	3	S-43
	450	KCl	0,075	30/70	20	S-44
	450		0,35	30/70	20	S-45

Пример 10. Оптимизированный способ оценки способности частиц к агрегации *in vitro*.

Для улучшения способа оценки способности частиц к агрегации *in vitro*, орбитальный встряхиватель использовали вместо перемешивания вручную, используемого в примере 3.

Пятьдесят микролитров суспензии STMP в PBS при 200 мг/мл вносили в 2 мл PBS, предварительно нагретого при 37°C, в круглодонную стеклянную пробирку диаметром 16 мм с использованием инсулинового шприца на 1 мл с постоянной иглой 27 калибра (Terumo or Easy Touch brand). Затем пробирку инкубировали в водяной бане при 37°C в течение 2 ч. Способность частиц к агрегации оценивали путем визуального наблюдения и/или получения изображения после встряхивания в течение 30 с при 400 об/мин на орбитальном встряхивателе (Thermo Scientific™ Multi-Platform Shakers: номер по каталогу 13-687-700). Пробирку, содержащую частицы/агрегаты, затем переворачивали горизонтально для визуальной оценки способности частиц к агрегации. В качестве контроля использовали NSTMP.

Как показано на фиг. 17, все STMP в примерах 7 и 8 образовывали агрегаты после 2-х часовой инкубации и агрегаты оставались в основном в неизменном виде после 30 с встряхивания на орбитальном встряхивателе. Напротив, NSTMP в S-27 стали полностью диспергированными после такого же перемешивания. Препарат S-12, описанный в примере 2, также был включен в эту оценку для сравнения способности к агрегации микрочастиц, обработанных в различных условиях. Результаты дают основание предположить, что все модифицированные условия обработки поверхности в примерах 7 и 8 привели к получению STMP со способностью к агрегации, аналогичной способности к агрегации S-12.

Как показано на фиг. 18, все STMP (S-39, S-40, S-41, S-42, S-43, S-44, S-45) в примере 9 формировали агрегаты после 2-х часов инкубации, и агрегаты оставались в основном без изменений после 30 секунд встряхивания на орбитальном встряхивателе, при этом NSTMP (S-38) становились полностью диспергированными после такого же перемешивания. Оказалось, что S-42, S-44 и S-45 агрегировали лучше, чем другие образцы STMP, как показано на фиг. 18, а также обработка поверхности на сухой частице, как показано на фиг. 17. Результаты демонстрируют успешность и возможность осуществления обработки поверхности на влажных микрочастицах.

Пример 11. Определение нагрузки лекарственным средством.

Нагрузку лекарственным средством определяли с помощью спектрофотометрии в УФ и видимой областях спектра. Микрочастицы, содержащие сунитиниб (общая масса 10 мг), растворяли в безводном DMSO (1 мл) и дополнительно разбавляли до тех пор, пока концентрация лекарственного средства не была в линейном диапазоне стандартной кривой УФ-поглощения лекарственного средства. Концентрацию лекарственного средства определяли путем сравнения УФ-поглощения со стандартной кривой. Нагрузку лекарственным средством определяется как массовое соотношение лекарственного средства к микрочастицам.

Пример 12. Исследование высвобождения лекарственного средства *in vivo*.

Микрочастицы, содержащие сунитиниб (общая масса 10 мг), суспендировали в PBS (4 мл), содержащем 1% Tween 20, в стеклянном флаконе объемом 6 мл и инкубировали при 37°C при встряхивании со скоростью 150 об/мин. В заданные моменты времени 3 мл супернатанта отбирали после того, как частицы оседали на дно флакона и заменяли 3 мл свежей среды высвобождения. Содержание лекарственного средства в супернатанте определяли с помощью спектрофотометрии в УФ и видимой областях спектра или HPLC. Альтернативно, описанную выше процедуру можно проводить при 50°C для определения ускоренной скорости высвобождения лекарственного средства *in vitro*, как показано на фиг. 5.

Пример 13. Исследования эффектов обработки поверхности на микрочастицы.

Помимо способности к агрегации также изучали влияние обработки поверхности на другие свойства микрочастиц для полной оценки возможности осуществления обработки поверхности. Как показано в табл. 7, в целом, выход и нагрузка лекарственным средством STMP (в примере 2), обработанных в течение более длительных периодов времени, были немного ниже по сравнению с STMP, обработанными в течение более короткого периода времени, на основании чего можно предположить, что при 0,25M NaOH/EtOH (об./об.: 3:7) временной интервал для получения STMP с высоким выходом и нагрузкой является узким (порядка нескольких минут). Однако в модифицированных условиях, представленных в примере 7, время обработки может быть дополнительно увеличено до десятков минут без уменьшения нагрузки лекарственным средством и выхода (табл. 7), а также способности к агрегации (пример 10). STMP, обработанные HCl(водн.)/EtOH в примере 8, сохраняли нагрузку лекарственным средством (DL) до обработки поверхности с относительно высоким выходом (S-36 и S-37). Кроме того, STMP (S-42, S-44 и S-45), полученные путем обработки поверхности на влажных микрочастицах в примере 9, также сохраняли DL до обработки поверхности с сопоставимым выходом, как STMP, полученные путем обработки поверхности на сухих частицах в примере 7 и 8.

Таблица 7. Выход и нагрузка лекарственным средством STMP

Образец	Выход	Нагрузка лекарственным средством (DL) до обработки поверхности	Нагрузка лекарственным средством после обработки поверхности
S-2	51%	18.0%	14.2%
S-3	50%	18.0%	15.3%
S-4	36%	18.0%	6.3%
S-6	30%	18.9%	15.0%
S-7	35%	18.9%	14.7%
S-8	28%	18.9%	11.6%
S-10	67%	18.3%	18.6%
S-12	68%	11.1%	11.6%
S-14	70%	11.9%	12.0%
S-16	56%	2.15%	2.11%
S-28	43%	11,3%	11,8%
S-29	49%	11,3%	11,0%
S-30	60%	11,3%	10,1%
S-31	61%	11,3%	10,6%
S-32	44%	11,3%	12,0%
S-33	48%	11,3%	11,5%
S-34	49%	11,3%	11,5%
S-35	58%	11,3%	12,0%
S-36	61%	11,3%	10,3%
S-37	69%	11,3%	11,6%
S-42	44%	11.6%	11,2%
S-44	50%	11.6%	12,0%
S-45	43%	11.6%	12,1%

На фиг. 6 показаны репрезентативные профили высвобождения лекарственного средства *in vitro* NSTMP (S-1) и соответствующих STMP (S-2 и S-3), полученных из одной и той же партии NSTMP. В целом, профили высвобождения являются сходными для микрочастиц до и после обработки поверхности, за исключением того, что начальная скорость высвобождения STMP была ниже, чем у NSTMP. Это говорит о том, что в условиях обработки поверхности молекулы лекарственного средства, которые связаны с поверхностью микрочастиц или находятся вблизи нее, возможно, были удалены в процессе обработки поверхности.

Пример 14. Смачиваемость микрочастиц с обработанной поверхностью.

Смачиваемость репрезентативных партий STMP и NSTMP характеризовали с использованием метода Уошберна. Вкратце, две стеклянные капиллярные трубки с фильтрами в основаниях отдельно за-

полняли эквивалентными массами сухого порошка STMP и NSTMP. Дно капиллярных трубок затем вставляли в химический стакан с водой, и вода втягивалась в трубки в течение времени за счет капиллярного действия. Увеличение массы трубки и высоты воды в трубах определяли как функцию времени. Скорость поглощения воды была относительно быстрой в трубке, содержащей NSTMP, но относительно медленной для STMP. Аналогичным образом, в конце испытания увеличение массы трубок было намного выше для NSTMP, чем для STMP, что указывает на то, что модификация поверхности приводит к уменьшению смачиваемости микрочастиц, вероятно, из-за удаления поверхностно-активного вещества или как поверхностно-активного вещества, так и полимера с поверхности частиц.

Пример 15. Получение образцов S-10, S-12, S-14, S-16 и S-18 и исследование их профилей высвобождения лекарственного средства.

Образцы с S-10 по S-16 и S-18 изготавливали в более крупном масштабе от 1 до 3,6 г. В табл. 6 выше показан выход и нагрузка лекарственным средством этих партий. Следует отметить, что нагрузка лекарственным средством существенно не изменялась при обработке поверхности. Средний размер частиц образцов этих STMP был аналогичен размеру соответствующих NSTMP до обработки поверхности (данные не показаны). Как показано на фиг. 7, профили высвобождения STMP, полученных в более крупном масштабе (S-14 и S-16), были аналогичны соответствующим NSTMP, что указывает на то, что процесс обработки поверхности имел минимальный эффект на общее высвобождение лекарственного средства.

Пример 16. Легкость введения через иглу и однородность дозирования микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP).

Суспензию STMP (ST-1-5, нагрузка лекарственным средством приблизительно 10 процентов) при концентрации приблизительно 200 мг/мл получали путем суспендирования микрочастиц в 5-кратно разбавленном растворе ProVisc®, содержащем 2 мг/мл НА. После инкубационного периода, составляющего 2 ч, при комнатной температуре 10 мкл суспензии STMP наполняли в шприц Гамильтона 50 мкл с прикрепленной иглой 27-го калибра. После непродолжительного потряхивания для полного суспендирования STMP шприц удерживали горизонтально в течение 2 мин и вертикально в течение 2 мин перед введением в микроцентрифужную пробирку. Введение повторяли, используя 3 разных шприца, и каждый шприц тестировали 3 раза. Затем STMP в каждой пробирке растворяли в DMSO и дозу лекарственного средства определяли с помощью спектрофотометрии в УФ и видимом диапазоне спектра. Как показано в табл. 8, наблюдалась великолепная однородность дозирования между введениями с использованием одного и того же шприца и между разными шприцами, что указывает на то, что суспензия STMP в разбавленном ProVisc® оставалась стабильной при комнатной температуре в течение достаточного количества времени для обеспечения однородного дозирования сравнительно малого объема инъекции (например, 10 мкл).

Таблица 8. Легкость введения через иглу и однородность дозирования STMP

№ образца	УФ-считыв.	Доза (мг)	Ср. доза на шприц n=3 (мг)	Станд. откл. (мг)	Станд. откл. (%)	Ср. доза n=9 (мг)	Станд. откл. (мг)	Станд. откл. (%)
Шприц 1-a	1,019	,1966	,1974	,0140	7,0942			
Шприц 1-b	,953	,1838						
Шприц 1-c	1,098	,2118						
Шприц 2-a	1,136	,2191	,2058	,0122	5,9332	,2031	,0129	6,3345
Шприц 2-b	1,052	,2029						
Шприц 2-c	1,012	,1952						
Шприц 3-a	1,052	,2029	,2062	,0156	7,5633			
Шприц 3-b	1,157	,2232						
Шприц 3-c	,998	,1925						

Пример 17. Влияние концентрации микрочастиц и разбавителя частиц на агрегацию микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP).

Для исследования влияния концентрации и разбавителя частиц на агрегацию STMP, суспензии STMP (50 мкл) в 5-кратно разбавленном ProVisc® при 2 различных концентрациях микрочастиц (100 мг/мл и 200 мг/мл) вносили в 4 мл раствора PBS или HA и инкубировали при 37°C в течение 2 ч.

Как показано на верхней панели фигур 8C и фиг. 8D, STMP при концентрации 200 мг/мл в разбавленном ProVisc® формировали консолидированный агрегат как в PBS, так и в HA после 2-х часов инкубации при 37°C. По сравнению с 200 мг/мл STMP, суспендированных в PBS, агрегация 200 мг/мл STMP в разбавленном ProVisc® оказалась более медленной, но агрегат становился более консолидированным с течением времени, что дает основание предположить, что, молекулы HA в разбавителе частиц могут затруднять контакт между STMP и замедлять процесс агрегации. С другой стороны, благодаря своим вязкоупругим свойствам, HA может помочь сохранить частицы локализованными и обеспечить достаточное время для STMP для образования агрегата. Оказалось также, что агрегаты частиц, образованные в HA, имели более сферическую морфологию, чем те, которые были образованы в PBS, что дает основание предположить, что при использовании вязкоупругого раствора в качестве разбавителя частиц необходимо определить оптимальный диапазон концентрации разбавителя для улучшения общей эффективности агрегации STMP.

Через 2 ч после инкубации прочность агрегатов тестировали путем встряхивания пробирок при 250 об/мин на орбитальном встряхивателе. Как показано на нижней панели на фиг. 8C и фиг. 8D, агрегаты были способны выдерживать напряжение сдвига, созданное при встряхивании, без диспергирования или с минимальным диспергированием микрочастиц.

Для сравнения, хотя STMP при концентрации 100 мг/мл образуют агрегат в PBS (верхняя панель, фиг. 8A), агрегат оказался менее плотным, чем агрегат 200 мг/кг STMP в PBS (верхняя панель, фиг. 8C) и имел тенденцию к дезагрегации на индивидуальные микрочастицы при встряхивании (нижняя панель, фиг. 8A). Кроме того, STMP при концентрации 100 мг/мл оказались неспособными образовывать один консолидированный агрегат в HA в конце 2-часового периода инкубации (верхняя панель, фиг. 8B), и многие STMP становились диспергированными в HA при встряхивании при 250 об/мин (нижняя панель, фиг. 8B). Аналогично молекулам HA в разбавителе частиц, молекулы HA в тестируемой среде могут, кроме того, уменьшать контакт между частицами и снижать шанс образования консолидированного агрегата. Результаты дают основание предположить, что способность к агрегации STMP уменьшается при более низкой концентрации микрочастиц, возможно вследствие увеличенного среднего расстояния между частицами и пониженного шанса прямого контакта между частицами. Агрегация может быть также, кроме того, затруднена другими молекулами, такими как HA, в тестируемой среде.

Таким образом, на агрегацию STMP может влиять концентрация частиц, разбавитель частиц и окружение, в которое частицы доставляются. В целом, данные демонстрируют, что в соответствующих условиях STMP имеют удовлетворительную способность к агрегации в различных разбавителях частиц и тестируемой среде.

Пример 18. Агрегация микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) в глазах коровы *ex vivo*.

Для оценки способности к агрегации STMP после интравитреальной инъекции *ex vivo* использовали энуклеированные глаза коровы (J.W. Treuth & Sons, Catonsville, MD). Глаза хранили на льду перед использованием. Вкратце, 30 мкл 200 мг/мл STMP, S-10, суспендированных в 5-кратно разбавленном ProVisc®, инъецировали в стекловидный канал глаз коровы с использованием инсулинового шприца 0,5 мл (Terumo) с иглой 27-го калибра и выполняли три инъекции в каждый глаз коровы в различных локализациях. После 2 ч инкубации при 37°C глаза рассекали и агрегаты STMP исследовали с использованием препаровальной лупы. Как показано на фиг. 9, введенные путем инъекции STMP формировали консолидированные агрегаты в стекловидном теле коровы, и не наблюдалось выраженного диспергирования частиц.

Пример 19. Агрегация микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) в глазах кроликов *in vivo*.

Для исследования агрегации микрочастиц с обработанной поверхностью в глазах кролика *in vivo*, 50 мкл 200 мг/мл STMP, S-10, суспендированных в PBS (фиг. 10A) или 5-кратно разбавленных ProVisc® (фиг. 10B), инъецировали в стекловидный канал глаз кроликов Dutch Belted с использованием инсулинового шприца 0,5 мл (Terumo) с иглой 27-го калибра. Через четыре дня после введения кроликов умерщвляли, и глаза извлекали и немедленно замораживали. Замороженные глаза разрезали на половинки, а заднюю половину глаза оттаивали при комнатной температуре в течение 3 мин, чтобы можно было изолировать стекловидное тело от глазной чаши, как показано на левой фотографии на фиг. 10A и фиг. 10B. Замороженное стекловидное тело, содержащее частицы, помещали в кассету для полного оттаивания стекловидного тела. Агрегаты STMP в стекловидном теле могут быть легко отделены от стекловидного тела с помощью щипцов, что доказывает образование консолидированных агрегатов STMP в глазах кролика.

Пример 20. Распределение, переносимость и фармакокинетика инкапсулированных сунитинибом

микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) после интравитреальной (IVT) инъекции у кроликов.

Распределение и переносимость STMP и NSTMP исследовали у пигментированных кроликов New Zealand (F1) после интравитреальной инъекции микрочастиц. ProVisc® разбавляли 5-кратно в PBS и использовали в качестве разбавителя для получения суспензий частиц с концентрацией около 200 мг/мл для инъекции. В табл. 9 представлено подробное описание исследуемых групп и условий.

Полное обследование зрения проводили на протяжении до 7 месяцев после дозирования с использованием биомикроскопа с щелевой лампой и непрямого офтальмоскопа для оценки морфологии поверхности глаза, воспаления переднего сегмента и заднего сегмента, формирования катаракты и изменений сетчатки. Ретинальные линзы использовали для изучения локализации, морфологии и распределения микросфер в стекловидном теле. Гистологический анализ также выполняли на энуклеированных и фиксированных глазах на протяжении 7 месяцев. В заранее определенные моменты времени на протяжении до 7 месяцев анализировали уровни лекарственного средства сунитиниба (нг/г) в различных тканях глаза (например, стекловидном теле, сетчатке и RPE/хориоиде) и плазме. На фиг. 11A показано репрезентативное гистологическое изображение, полученное через месяц после инъекции микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP), и на фиг. 11B показаны репрезентативные гистологические изображения, полученные через 1 месяц после инъекции микрочастиц с необработанной поверхностью (NSTMP).

Таблица 9. Подробное описание исследуемых групп кроликов и условий дозирования

Тип микросферы		Группа #	Масса микросферы	*SM Доза	Нагрузка лек.средством микросферы	Инъекционный объем
С обработкой поверхности	Нагруженные лек.средством	#1	2 мг	0,2 мг	10%	10 мкл
		#2	10 мг	1,0 мг	10%	50 мкл
		#3	10 мг	0,2 мг	2%	50 мкл
	Пустые	#7	2 и 10 мг	Нет	Нет	10 мкл (Левый глаз) 50 мкл (Правый глаз)
Без обработки поверхности	Нагруженные лек.средством	#4	2 мг	0,2 мг	10%	10 мкл
		#5	10 мг	1,0 мг	10%	50 мкл
		#6	10 мг	0,2 мг	2%	50 мкл
	Пустые	#8	2 и 10 мг	Нет	Нет	10 мкл (Левый глаз) 50 мкл (Правый глаз)

*SM =доза сунитиниба малата.

Сразу же после дозирования микросферы оставались локализованными в участке инъекции в стекловидном теле в качестве депо для всех инъекций. Через 1 и 2 месяца осмотр глазного дна с использованием ретинальных линз показал, что в глазах, в которые была произведена инъекция STMP, большинство инъецированных частиц оставались консолидированными в стекловидном теле без диспергирования, и не наблюдалось нарушения или отклонения зрения. Напротив, диспергирование частиц чаще наблюдалась в глазах, в которые была произведена инъекция NSTMP.

Гистологический анализ на протяжении до 7 месяцев показал, что в целом инъекции хорошо переносились, при этом наблюдались минимальные признаки воспаления глаз или токсичности. Никаких признаков токсичности в отношении сетчатки (истончение и дегенерация и т.д.) не наблюдалось при любом лечении. При применении STMP единственными глазами, в которых наблюдалось воспаление, были глаза со связанной с инъекцией травмой/катарактой хрусталика и ассоциированным вторичным хрусталик-индуцированным увеитом, который, как полагают, связан с процедурой инъекции, а не с STMP; никаких других признаков воспаления в глазах с введенными микросферами с обработанной поверхностью не наблюдалось (фиг. 11, слева). В некоторых из глаз, дозированных NSTMP, наблюдалось слабое воспа-

ление в стекловидном теле, возможно связанное с NSTMP (фиг. 11, справа). Результаты дают основание предположить, что обработка поверхности не только уменьшает вероятность диспергирования частиц в стекловидном теле, которое может вызвать нарушение или отклонение зрения, но также может уменьшить потенциальное внутриглазное воспаление, связанное с микросферами, и улучшить общую безопасность лечения.

Как показано на фиг. 14, 15 и 16, уровни сунитиниба в сетчатке или RPE/хориоиде у кроликов, получавших STMP, содержащие 1 мг или 0,2 мг сунитиниба малата, были выше K_i для сунитиниба против VEGFR и PDGFR через 1, 2 и 4 месяцев, соответственно. Низкие уровни сунитиниба были обнаружены в плазме только через 1 и 2 месяца.

Пример 21. Определение чистоты лекарственного средства и примесей в частицах.

Образец S-12 (10,5 мг) отмеряли во флакон желтого цвета. Добавляли N,N-диметилацетамид (0,3 мл) и ацетонитрил (0,6 мл) для растворения частиц. Добавляли воду (2,1 мл) и смесь тщательно перемешивали. Конечная концентрация частиц в смеси N,N-диметилацетамид/ацетонитрил/вода (об./об. 1:2:7) составила 3,5 мг/мл. Чистота активного соединения в STMP S-12 определена с помощью HPLC и представлена в табл. 10. Результаты показывают, что обработка поверхности не повлияла на чистоту инкапсулированного лекарственного средства.

Таблица 10. Анализ HPLC чистоты лекарственного средства в STMP

Номер пика	Время удерживания	Площадь (%)
1	0,24	0,157
2	0,78	0,283
3	0,82	0,044
4	1,00	99,39
5	1,12	0,046
6	1,41	0,084

Пример 22. Измерение среднего размера и распределения по размерам микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP).

Несколько миллиграмм S-12 суспендировали в воде. Средний размер частиц и распределения определяли с использованием прибора Coulter Multisizer IV (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). Распределение, показанное на фиг. 12, имеет следующие статистические данные: D10 20,98 мкм, D50 32,32 мкм, D90 41,50 мкм, среднее значение 31,84 мкм и стандартное отклонение 8,07 мкм.

Пример 23. Определение уровня эндотоксина в суспензии частиц.

Микрочастицы (5-10 мг, S-12) добавляли в стерильный флакон в боксе биологической безопасности. Частицы суспендировали в PBS, не содержащем эндотоксин. Используя набор для определения эндотоксина ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript USA Inc., Piscataway, NJ) и инструкции, предоставленные изготовителем, измеряли общий уровень эндотоксина образца. S-12 имел низкий уровень эндотоксина, составляющий менее чем 10 мКЕЭ/мг.

Пример 24. Исследования токсичности.

Проводили исследование, не соответствующее требованиям GLP, непосредственных эффектов интравитреальной инъекции (IVT) для оценки переносимости и токсичности сунитиниба малата (свободного лекарственного средства, не связанного с белками плазмы крови) для глаз на протяжении до 7 дней после однократной IVT инъекции. Сунитиниба малат составляли в забуференном фосфатом физиологическом растворе и инъецировали билатерально (0,1 мл) в дозе 0,125 мг или 1,25 мг на глаз. При дозе 1,25 мг/глаз гистологически значимые результаты, связанные с сунитинибом, включали остаточный исследуемый препарат, хрусталиковые вакуоли/дегенерацию, воспалительную клеточную инфильтрацию от легкой до минимальной стекловидного тела, дегенерацию сетчатки, отслоение и некроз. Никаких токсикологически значимых обнаружений не наблюдалось при дозе 0,125 мг/глаз, которая считается дозой, не вызывающей обнаруживаемых нежелательных эффектов (NOAEL).

На фиг. 13A, фиг. 13B и фиг. 13C показаны отдельные фармакокинетические (ПК) профили для сунитиниба малата в сетчатке, стекловидном теле и плазме, соответственно, от пигментированных кроликов.

Пример 25. Получение микрочастиц сунитиниба (без обработки поверхности).

PLGA (555 мг) и PLGA-PEG5K (5,6 мг) растворяли в DCM (4 мл). Сунитиниба малат (90 мг) растворяли в DMSO (2 мл). Затем растворы полимера и лекарственного средства смешивали. Полученную реакционную смесь фильтровали через 0,22-мкм PTFE шприцевой фильтр. Полученную реакционную смесь разбавляли 1% PVA в PBS (200 мл) в 250 мл химическом стакане и затем гомогенизировали при 5000 об/мин в течение 1 мин. (Раствор полимера/лекарственного средства заливали в водную фазу с использованием условий гомогенизации и гомогенизировали при 5000 об/мин в течение 1 мин). Реакционную смесь затем перемешивали при 800 об/мин при комнатной температуре в течение 3 ч в боксе биологической безопасности. Частицы оставляли оседать в химическом стакане в течение 30 мин и приблизи-

тельно 150 мл супернатанта декантировали. Суспензию микрочастиц подвергали центрифугированию при $56\times g$ в течение 4,5 мин, растворитель удаляли, и микрочастицы затем промывали три раза водой. Размер микрочастиц и распределение по размерам определяли с использованием Coulter Multisizer IV перед лиофилизацией. Микрочастицы лиофилизировали с использованием лиофилизатора FreeZone 4.5 Liter Benchtop Lyophilizer объемом 4,5 л. На протяжении всего процесса избегали воздействия света.

Пример 26. Общая процедура получения микрочастиц сунитиниба с обработанной поверхностью.

Сухой порошок микрочастиц взвешивали и помещали в небольшой химический стакан и добавляли магнитный элемент. Химический стакан помещали на ледяную баню и охлаждали до температуры около 4°C . Раствор NaOH/EtOH готовили путем смешивания NaOH в воде (0,25 М) с EtOH в соотношении 3:7 (об./об.) и охлаждения до около 4°C . Холодный раствор NaOH/EtOH добавляли при перемешивании в химический стакан, содержащий микрочастицы, с получением суспензии частиц 100 мг/мл. Суспензию перемешивали в течение 3 мин при температуре около 4°C и заливали в фильтровальный аппарат для быстрого удаления раствора NaOH/EtOH. (Перед использованием фильтровальную установку необходимо предварительно охладить в морозильнике при -20°C .) После фильтрации микрочастицы промывали в фильтровальной установке ледяной деионизированной водой и переносили в 50 мл центрифужные пробирки. Каждую 50 мл центрифужную пробирку заполняли холодной водой с получением 40 мл суспензии частиц при концентрации 5-10 мг/мл. Центрифужные пробирки помещали в регенератор и частицы оставляли для оседания на 30 мин. Затем декантировали супернатант. Частицы ресуспендировали в холодной воде и фильтровали через 40 мкм клеточный фильтр для удаления любых крупных агрегатов. Частицы собирали путем центрифугирования ($56\times g$ в течение 4,5 мин) и дважды промывали водой. Продукт лиофилизировали с использованием лиофилизатора FreeZone 4.5 Liter Benchtop Lyophilizer. Процесс обработки поверхности проводили при температуре около приблизительно 4°C , и на протяжении всего процесса избегали воздействия света.

Пример 27. Способ определения ускоренного высвобождения лекарственного средства *in vitro* при 50°C .

Микрочастицы (10 мг) добавляли в стеклянные сцинтилляционные флаконы. Во флаконы добавляли четыре миллилитра среды высвобождения (1% Tween 20 в $1\times\text{PBS}$ при pH 7,4), и смеси перемешивали на вортексе. Флаконы встряхивали на орбитальном встряхивателе при 150 об/мин в инкубаторе общего назначения Fisher при 50°C . В заранее определенные моменты времени соответствующий флакон охлаждали, и частицы оставляли для оседания на 10 мин. Затем среду высвобождения (3 мл) осторожно удаляли из верхней части флакона и заменяли свежей средой высвобождения (3 мл). Затем флакон возвращали на орбитальный встряхиватель, и количество лекарственного средства в среде высвобождения измеряли с помощью УФ-спектроскопии. Концентрацию лекарственного средства определяли путем сравнения со стандартной кривой для лекарственного средства.

Пример 28. Получение биоразлагаемых микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP), содержащих PLA.

Сначала изготавливали NSTMP аналогично методике, описанной в примере 1. Вкратце, PLA и PLGA-PEG совместно растворяли в дихлорметане (DCM), и сунитиниба малат растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO). Раствор полимера и раствор лекарственного средства смешивали с образованием гомогенного раствора (органической фазы). Для пустых микрочастиц использовали DMSO без лекарственного средства. Органическую фазу добавляли к 1% водному раствору PVA и гомогенизировали при 5000 об/мин в течение 1 мин с использованием лабораторного смесителя L5M-A (Silverson Machines Inc., East Longmeadow, MA) с получением эмульсии. Эмульсию (насыщенные растворителем микрочастицы) затем отверждали путем перемешивания при комнатной температуре в течение более 2 ч, чтобы обеспечить испарение DCM. Микрочастицы собирали путем седиментации и центрифугирования, промывали три раза в воде и фильтровали через 40-мкм стерильный клеточный фильтр Falcon® (Corning Inc., Corning, NY). Микрочастицы без обработки поверхности (NSTMP) либо использовали непосредственно в процессе обработки поверхности, либо сушили лиофилизацией и хранили в виде сухого порошка при -20°C до использования.

Предварительно охлажденный раствор, содержащий NaOH и этанол, добавляли к микрочастицам в стеклянный флакон при перемешивании на ледяной бане при температуре приблизительно 4°C с образованием суспензии. Затем суспензию перемешивали в течение заданного периода времени на льду и заливали в предварительно охлажденный фильтрующий аппарат для удаления раствора NaOH (водный раствор)/EtOH. Микрочастицы дополнительно промывали предварительно охлажденной водой и переносили в 50-мл центрифужную пробирку. Затем STMP суспендировали в предварительно охлажденной воде и хранили в холодильнике в течение 30 мин, чтобы обеспечить оседание частиц. После удаления надосадочной жидкости частицы ресуспендировали и фильтровали через 40-мкм фильтр для клеток для удаления крупных агрегатов. Затем частицы дважды промывали водой при комнатной температуре и сушили замораживанием в течение ночи.

Таблица 11. Подробное описание получения STMP, содержащих PLA

STMP ID	NSTMP				Обработка поверхности		
	Полимер	Лек.средство	Водная фаза	Спешивание	Раствор	Конц. частиц	Время обработки
S-46	800 мг PLA 100 4А и 8 мг PLGA-PEG в 4 мл DCM	100 мг сунитиниба малата в 1 мл DMSO	200 мл 1% PVA в PBS	5000 об/мин, 1 мин	0,075 M NaOH и 50% EtOH	200 мг/мл	3 мин
S-47	800 мг PLA 100 4А и 8 мг PLGA-PEG в 4 мл DCM	1 мл DMSO	200 мл 1% PVA в воде	5000 об/мин, 1 мин	0,075 M NaOH и 50% EtOH	200 мг/мл	3 мин
S-48	640 мг PLA 100 4А и 6,4 мг PLGA-PEG в 4 мл DCM	2 мл DMSO	200 мл 1% PVA в воде	5000 об/мин, 1 мин	0.075 M NaOH and 50% EtOH	200 мг/мл	3 мин

Способность к агрегации *in vitro* STMP характеризовали аналогично тому, как описано в примере 3. Вкратце, STMP суспендировали в PBS при 200 мг/мл и 30-50 мкл суспензии вносили в 1,5-2,0 мл PBS, предварительно нагретого до 37°C. После инкубации при 37°C в течение 2 ч способность к агрегации микрочастиц оценивали путем визуального наблюдения и/или получения изображения после слабого механического перемешивания. В целом, все STMP, описанные в табл. 11, были способны к агрегации после инкубации при 37°C в течение 2 ч.

Пример 29. Распределение, переносимость и фармакокинетика инкапсулированных сунитинибом STMP, содержащих PLA, после интравитреальной инъекции (IVT) у кроликов

Инкапсулированные сунитинибом STMP, содержащие PLA, суспендировали в ProVisc®, разведенном 5-кратно в PBS, для достижения целевой дозы 1 мг сунитиниба малата в 50 мкл суспензии частиц. Переносимость и фармакокинетику исследовали у пигментированных кроликов New Zealand (F1) после интравитреальной инъекции суспензии STMP. В предварительно определенные моменты времени после дозирования проводили полное обследование глаз и анализировали уровни содержания сунитиниба (нг/г) в различных тканях глаза (например, стекловидном теле, сетчатке и RPE/хориоиде) (фиг. 19).

Обследования глаз через 6 месяцев показали, что STMP хорошо переносились глазами кроликов и оставались консолидированным в стекловидном теле без диспергирования, и не наблюдалось нарушения или отклонения зрения. Как показано на фиг. 19, уровни сунитиниба в сетчатке или RPE/хориоиде кроликов, получавших STMP, содержащие 1 мг сунитиниба малата, были выше K_i для сунитиниба против VEGFR и PDGFR через 10 дней и 3 месяца.

Пример 30. Получение микрочастиц с обработанной поверхностью (STMP) в более крупном масштабе (100 г и выше).

NSTMP изготавливали с использованием метода эмульгирования масла в воде в непрерывном потоке. Масштаб пилотных партий составлял 100-200 г. Сначала получали дисперсную фазу (DP) и непрерывную фазу (CP). Для плацебо-микрочастиц дисперсную фазу (DP) получали путем совместного растворения полимеров PLGA и PLGA-PEG в DCM. Непрерывная фаза (CP) представляла собой 0,25% раствор PVA в воде. Для микрочастиц, нагруженных лекарственными средствами, дисперсную фазу (DP) получали путем растворения сунитиниба малата в DMSO и смешивания с раствором полимера в DCM. Непрерывная фаза (CP) представляла собой 0,25% раствор PVA в PBS (pH приблизительно 7). Подробное описание параметров составления приведено в табл. 12. Эмульсию получали путем смешивания DP и CP с использованием встроенного смесителя с высоким усилием сдвига. Растворители в дисперсной фазе (DP) разбавляли непрерывной фазой (CP), что вызывало отверждение капель эмульсии и образование полимерных микрочастиц. Микрочастицы затем промывали водой с использованием принципа обмена объема с добавлением свежей воды и удаления воды, содержащей растворитель, с помощью фильтра с полыми волокнами. Затем промытые микрочастицы суспендировали в растворе, содержащем NaOH и этанол, для модификации поверхности NSTMP. Эту стадию выполняли в сосуде с рубашкой, и температуру суспензии поддерживали около 8°C. Тестировали несколько условий обработки поверхности, как показано в табл. 12. После дополнительной промывки в воде и анализа концентрации микрочастиц и лекарственного средства в обрабатываемых образцах, суспензию STMP доводили до целевой концентрации перед заполнением стеклянных флаконов. В некоторых партиях к конечной суспензии добавляли маннит. Затем флаконы лиофилизировали и герметично закрывали. Процесс получения может быть завершен асептически, и конечный продукт во флаконах также может быть окончательно стерилизован электронным пучком или гамма-облучением.

Таблица 12. Состав и параметры обработки STMP, полученных в крупном масштабе

NSTMP						Обработка пов-ти			Всп. вещ-во
DP					Скорость перемешивания (об/мин)				
PLGA 7525 4A (г)	PLGA-PEG5k (г)	DCM (г)	Сунитиниб малат (г)	DMSO (г)		Время (мин)	EtOH	NaOH (мМ)	
86	0,86	640	16,5	260	4000	30	30%	0,53	
86	0,86	640	16,5	260	4000	60	30%	75	
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	40%	0,075	
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	40%	0,75	
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	40%	0,75	
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	40%	0,75	
86	0,86	640			3600	30	50%	0,75	
86	0,86	640			3600	30	40%	0,75	
86	0,86	640		260	3300	30	50%	0,75	
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	40%	0,75	
86	0,86	640			3600	30	60%	0,75	
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	40%	0,75	
86	0,86	640			3600	30	70%	0,75	
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	50%	0,75	Маннит
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	60%	0,75	Маннит
86	0,86	640	15,3	260	4000	30	70%	0,75	Маннит
172	1,72	1280	30,6	520	4000	30	70%	0,75	Маннит
172	1,72	1280			3600	30	70%	0,75	
172	1,72	1280			3600	25	70%	0,75	
172	1,72	1280	30,6	520	4000	30	60%	0,75	Маннит
172	1,72	1280	30,6	520	4000	30	60%	0,75	Маннит
172	1,72	1280			3600	25	70%	0,75	Маннит
172	1,72	1280	30,6	520	3800	30	60%	0,75	Маннит
172	1,72	1280	30,6	520	4000	30	60%	0,75	
172	1,72	1280	30,6	520	4000	30	60%	0,75	

Способность к агрегации STMP *in vitro* характеризовали способом, аналогичным способу, описанному в примере 3. Вкратце, STMP суспендировали в PBS при 200 мг/мл, и 30-50 мкл суспензии вносили в 1,5-2,0 мл PBS, предварительно нагретого до 37°C. После инкубации при 37°C в течение 2 ч оценивали способность к агрегации микрочастиц путем визуального наблюдения и/или получения изображения после легкого механического перемешивания. В целом, все STMP, обработанные раствором, содержащим 0,75 мМ NaOH и EtOH при 40% или выше, обладали способностью к агрегации после инкубации при 37°C. После получения суспензии в растворе гиалуроната и внесения в PBS, STMP, обработанные более высокой концентрацией EtOH, показали более высокую тенденцию к флотации в PBS, что свидетельствует о пониженной смачиваемости и повышенной гидрофобности поверхности в результате обработки поверхности.

Данная заявка описана со ссылкой на варианты осуществления изобретения. Однако специалисту в данной области будет понятно, что различные модификации и изменения могут быть сделаны без отступления от объема изобретения, изложенного в настоящем документе. Соответственно, описание следует рассматривать в иллюстративном, а не в ограничивающем смысле, и все такие модификации предназначены для включения в объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы для обеспечения замедленного высвобождения терапевтического агента для внутриглазной доставки, содержащие по меньшей мере один биоразлагаемый полимер, поливиниловый спирт и терапевтический агент, инкапсулированный в биоразлагаемый полимер, причем микрочастицы имеют средний диаметр между 10 и 60 мкм, и причем микрочастицы:

(i) содержат от около 0,001% до около 1% поливинилового спирта и их поверхность была модифицирована, чтобы содержать меньше поливинилового спирта, чем микрочастица до модификации поверхности, причем поверхность модифицирована при температуре менее чем около 18°C; и

(ii) способны агрегировать *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм *in vivo*, способной обеспечивать замедленную внутриглазную доставку терапевтического агента *in vivo* в течение по меньшей мере одного месяца.

2. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, подходящие для внутриглазной инъекции.

3. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, подходящие для способа доставки, выбранного из группы, состоящей из интравитреальной, интрастромальной, интракамеральной, субтеноновой, субретинальной, ретробульбарной, перибульбарной, супрахориоидальной, конъюнктивной, субконъюнктивной, эписклеральной, задней окологсклеральной, перикорнеальной инъекции и инъекции в слезно-носовой канал.

4. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна гранула способна обеспечить замедленную внутриглазную доставку терапевтического агента в течение по меньшей мере двух месяцев, в течение по меньшей мере трех месяцев, в течение по меньшей мере четырех месяцев, в течение по меньшей мере пяти месяцев, в течение по меньшей мере шести месяцев или в течение по меньшей мере семи месяцев.

5. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 14 до около 12.

6. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 12 до около 10.

7. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 10 до около 8.

8. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 6 до около 8.

9. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что модификацию поверхности осуществляют при pH в диапазоне от около 6,5 до около 7,5.

10. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что модификацию поверхности осуществляют при температуре ниже 16°C, ниже 10°C, ниже 8°C или ниже 5°C.

11. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что терапевтический агент представляет собой фармацевтическое лекарственное средство.

12. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что терапевтический агент представляет собой сунитиниб или его фармацевтически приемлемую соль.

13. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что терапевтический агент представляет собой ингибитор тирозинкиназы.

14. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от 20 до 30 мкм.

15. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от 25 до 35 мкм.

16. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от 20 до 40 мкм.

17. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна гранула имеет диаметр по меньшей мере 600 мкм, по меньшей мере 700 мкм, по меньшей мере 1 мм, по меньшей мере 1,5 мм, по меньшей мере 2 мм, по меньшей мере 3 мм, по меньшей мере 4 мм или по меньшей мере 5 мм.

18. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна гранула способна высвобождать не более чем около 10 или 15 мас.% терапевтического агента *in vivo* за период времени, составляющий 24 ч.

19. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна гранула способна высвобождать не более чем около 10 или 15 мас.% терапевтического агента *in vivo* за период времени, составляющий 12 ч.

20. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют нагрузку терапевтическим агентом, составляющую 1-40 мас.%.

21. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют нагрузку терапевтическим агентом, составляющую 5-25 мас.%.

22. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют нагрузку терапевтическим агентом, составляющую 5-15 мас.%.

23. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид).

24. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

25. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что микрочастицы содержат более чем один биоразлагаемый полимер.

26. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся

тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

27. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(молочную кислоту).

28. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(молочную кислоту), ковалентно связанную с полиэтиленгликолем.

29. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(молочную кислоту) и поли(молочную кислоту), ковалентно связанную с полиэтиленгликолем.

30. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(молочную кислоту) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

31. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что модификацию поверхности осуществляют на влажных микрочастицах.

32. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что поверхностно обработанные частицы способны высвободить терапевтический агент в течение более длительного периода времени по сравнению с микрочастицей с не обработанной поверхностью.

33. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы вызывают меньше воспаления, чем микрочастицы с не обработанной поверхностью.

34. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что терапевтический агент представляет собой сунитиниб малат.

35. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что терапевтический агент выбран из дорзоламида, бринзоламида, бримонидина, тимолола, иматиниба, gefitinibi, эрлотиниба, лапатиниба, сорафениба, пазопаниба, дазатиниба, нилотиниба, кризотиниба, руксолитиниба, вандетаниба, вемурафениба, бозутиниба, кабозантиниба, регорафениба и понатиниба.

36. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.34 или 35, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

37. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.36, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от около 20 до около 30 мкм.

38. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.36, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от около 20 до около 40 мкм.

39. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.1, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид), поли(молочную кислоту) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

40. Инъекционный материал, который содержит микрочастицы по любому из пп.1-39 в фармацевтически приемлемом носителе, для введения *in vivo*.

41. Инъекционный материал по п.40, дополнительно содержащий усилитель вязкости, содержащий гиалуронат натрия.

42. Способ получения поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц по п.1, который включает следующие стадии:

(i) первую стадию получения микрочастиц, содержащих по меньшей мере один биоразлагаемый полимер, путем растворения или диспергирования полимера(ов) и терапевтического агента в одном или более растворителях с образованием раствора или дисперсии полимера и терапевтического агента, смешивания раствора или дисперсии полимера и терапевтического агента с водной фазой, содержащей поливиниловый спирт, с получением насыщенных растворителем микрочастиц, и затем удаления растворителя(ей) с получением микрочастиц, которые содержат терапевтический агент и поливиниловый спирт; и

(ii) вторую стадию мягкой обработки только поверхности микрочастиц, полученных на стадии (i), для уменьшения содержания поливинилового спирта по сравнению с микрочастицей до модификации поверхности, при температуре 18°C или ниже, в течение около 120 мин или меньше; и (iii) выделение микрочастиц с обработанной поверхностью.

43. Способ по п.42, отличающийся тем, что один или более из биоразлагаемых полимеров представляет собой поли(лактид-со-гликолид).

44. Способ по п.42, отличающийся тем, что один или более из биоразлагаемых полимеров представляет собой поли(молочную кислоту).

45. Способ по п.42, отличающийся тем, что стадию (ii) осуществляют при температуре ниже 17°C, ниже 15°C, ниже 10°C или ниже 5°C.

46. Способ по п.42, отличающийся тем, что стадию (iii) осуществляют при температуре ниже 25°C, ниже 15°C, ниже 10°C или ниже 5°C.

47. Способ по п.42, отличающийся тем, что стадию (ii) осуществляют в течение около 8 мин, около 6 мин, около 4 мин или около 3 мин.

48. Способ по п.42, отличающийся тем, что агент, который удаляет поверхностный поливиниловый спирт, содержит NaOH.

49. Способ по п.42, отличающийся тем, что агент, который удаляет поверхностный поливиниловый спирт, содержит буферный раствор с щелочным значением pH.

50. Способ по п.42, отличающийся тем, что агент, который удаляет поверхностный поливиниловый спирт, содержит этанол.

51. Способ по п.42, отличающийся тем, что микрочастицы обладают эффективностью инкапсулирования терапевтического агента в микрочастицы, которая составляет более чем около 50%, более чем около 75%, более чем около 80% или более чем около 90%.

52. Способ по п.42, отличающийся тем, что биоразлагаемый полимер содержит поли(лактид-со-гликолид) (PLGA) с соотношением лактида к гликолиду 75:25.

53. Способ по п.42, отличающийся тем, что способ осуществляют при значении pH ниже около 8 и выше около 6.

54. Способ по п.42, отличающийся тем, что способ осуществляют при значении pH ниже около 7,6 и выше около 6,5.

55. Способ по п.42, отличающийся тем, что стадию (ii) осуществляют в течение времени, составляющего менее 90 мин, около менее 60 мин, около менее 30 мин или около менее 10 мин.

56. Способ лечения офтальмологического нарушения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, поверхностно-модифицированных твердых агрегирующих микрочастиц по любому из пп.1-39, при этом поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы вводятся путем инъекции в глаз и агрегируют *in vivo* с образованием по меньшей мере одной гранулы размером по меньшей мере 500 мкм, которая обеспечивает замедленную доставку терапевтического агента в течение по меньшей мере одного месяца таким образом, что гранула остается, по существу, вне зрительной оси, значительно не нарушая зрение.

57. Способ по п.56, отличающийся тем, что поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы вносят в инъекционный материал, содержащий фармацевтически приемлемый носитель.

58. Способ по п.56, отличающийся тем, что офтальмологическое нарушение представляет собой влажную или сухую форму возрастной макулярной дегенерации.

59. Способ по п.56, отличающийся тем, что офтальмологическое нарушение представляет собой глаукому.

60. Способ по п.56, отличающийся тем, что офтальмологическое нарушение выбрано из хориоидальной неоваскуляризации, острой макулярной нейроретинопатии, макулярного отека, кистозного макулярного отека и диабетического макулярного отека, болезни Бехчета, поражений сетчатки, диабетической ретинопатии, пролиферативной диабетической ретинопатии, окклюзионного поражения артерии сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, заболевания увеального тракта, отслоения сетчатки, травмы глаз, повреждения, вызванного лазерным лечением глаза или фотодинамической терапией, фотокоагуляцией, радиационной ретинопатии, нарушения эпиретинальной мембраны, окклюзии ветки вены сетчатки, передней ишемической оптической нейропатии, неретинопатической диабетической дисфункции сетчатки, воспаления глаз, инфекции глаз, пигментного ретинита, и глазного заболевания, связанного с цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекцией.

61. Способ по п.56, отличающийся тем, что поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы, которые не агрегируют в более крупную гранулу *in vivo*, составляют около 10% или менее, около 7% или менее, около 5% или менее или около 2% или менее от общей вводимой массы.

62. Способ по п.56, отличающийся тем, что поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы не вызывают иммунный ответ в глазу.

63. Способ по п.56, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой фармацевтическое лекарственное средство или биологическое лекарственное средство.

64. Способ по п.63, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой сунитиниб или его фармацевтически приемлемую соль.

65. Способ по п.64, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой сунитиниб малат.

66. Способ по п.56, отличающийся тем, что субъектом является человек.

67. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.12, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

68. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.12, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид), поли(молочную кислоту) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

69. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.67 или 68, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от 25 мкм до 35 мкм.

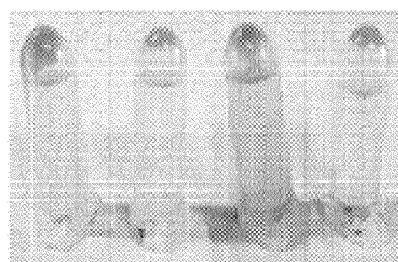
70. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.67 или 68, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от 20 мкм до 40 мкм.

71. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.34, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

72. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.34, отличающиеся тем, что по меньшей мере один биоразлагаемый полимер представляет собой поли(лактид-со-гликолид), поли(молочную кислоту) и поли(лактид-со-гликолид), ковалентно связанный с полиэтиленгликолем.

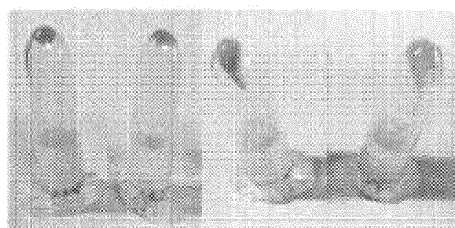
73. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.71 или 72, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от 25 мкм до 35 мкм.

74. Поверхностно-модифицированные твердые агрегирующие микрочастицы по п.71 или 72, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют средний диаметр от 20 мкм до 40 мкм.



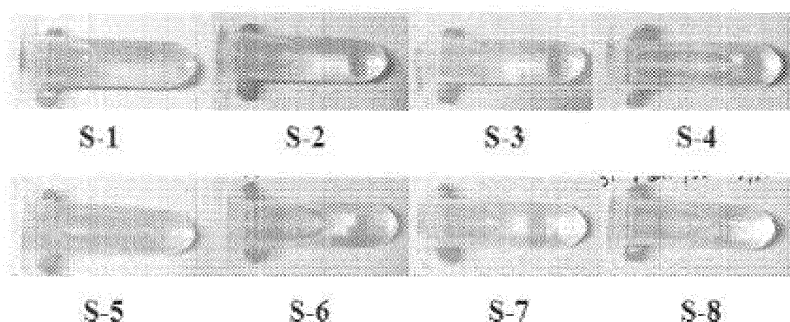
S-1 S-3 S-5 S-8

Фиг. 1



S-1 S-3 S-5 S-8

Фиг. 2

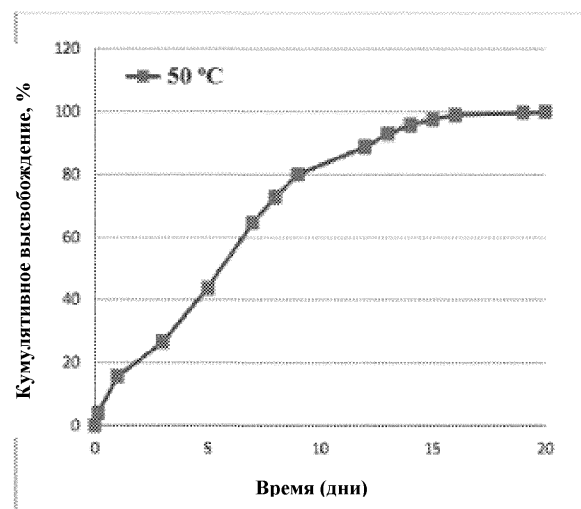


Фиг. 3

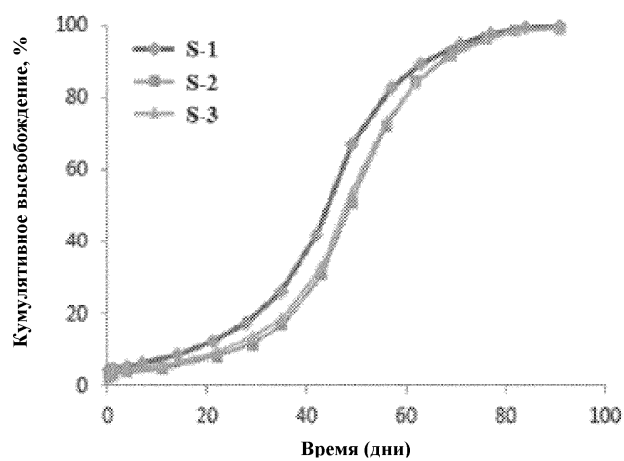


S-21

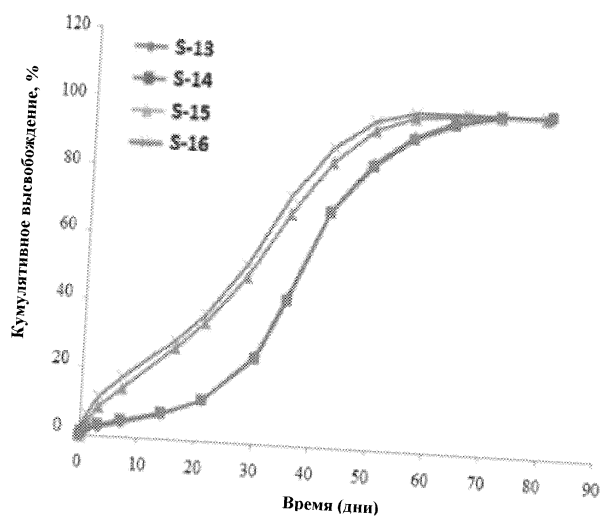
Фиг. 4



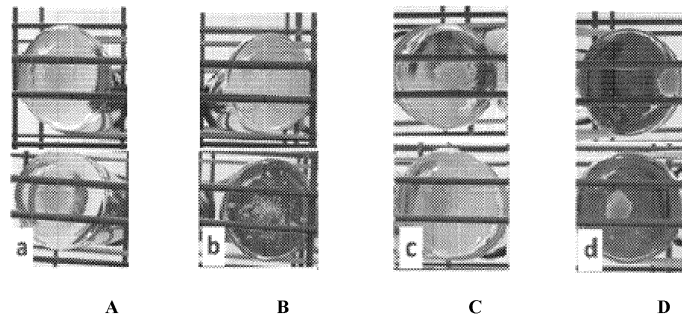
Фиг. 5



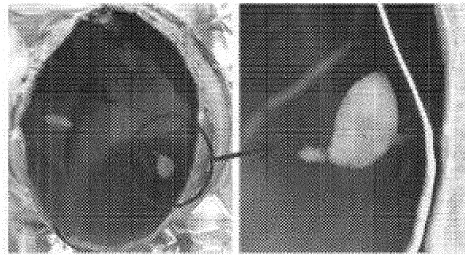
Фиг. 6



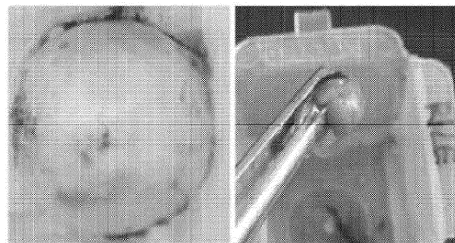
Фиг. 7



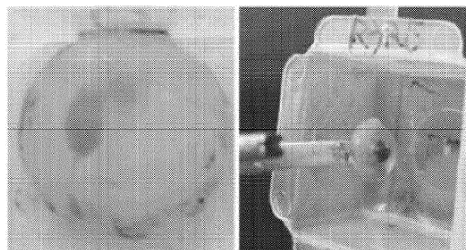
Фиг. 8



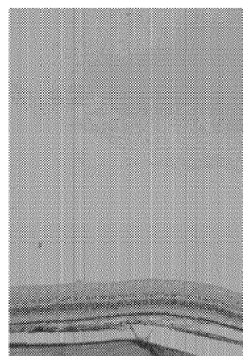
Фиг. 9



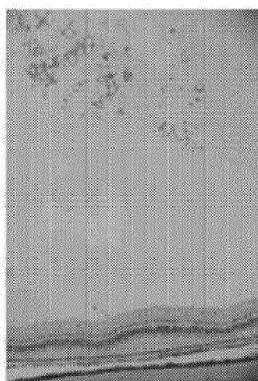
Фиг. 10А



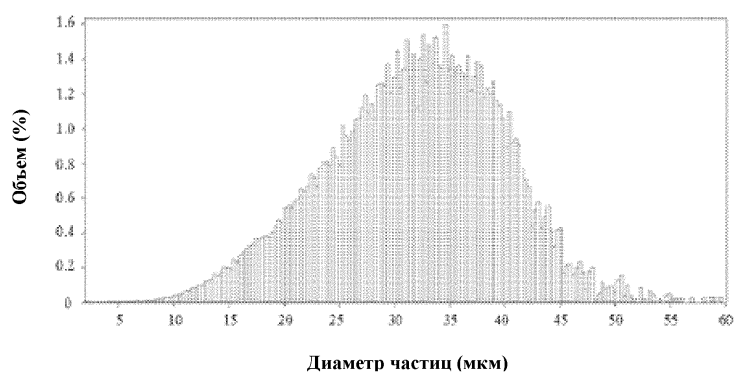
Фиг. 10В



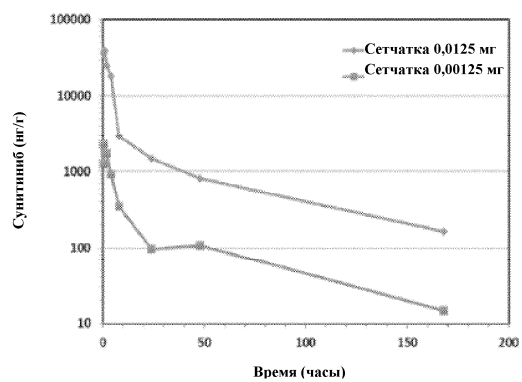
Фиг. 11А



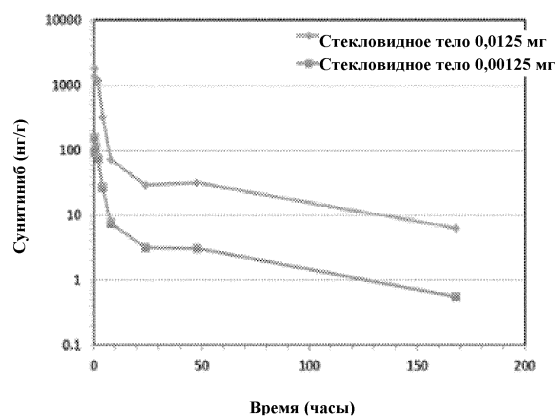
Фиг. 11В



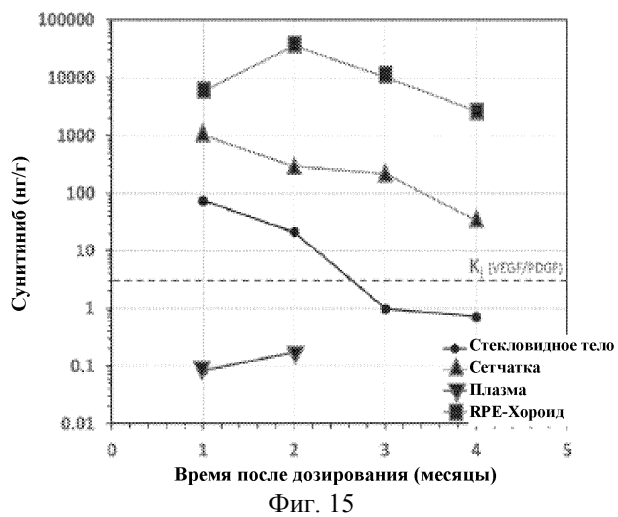
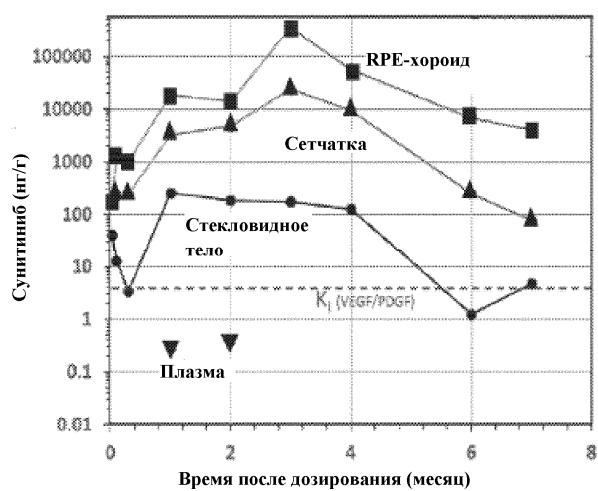
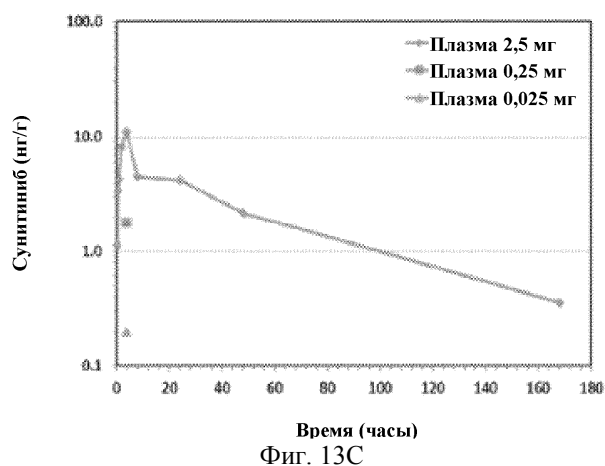
Фиг. 12

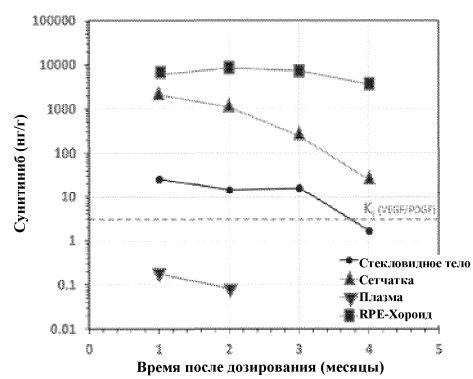


Фиг. 13А

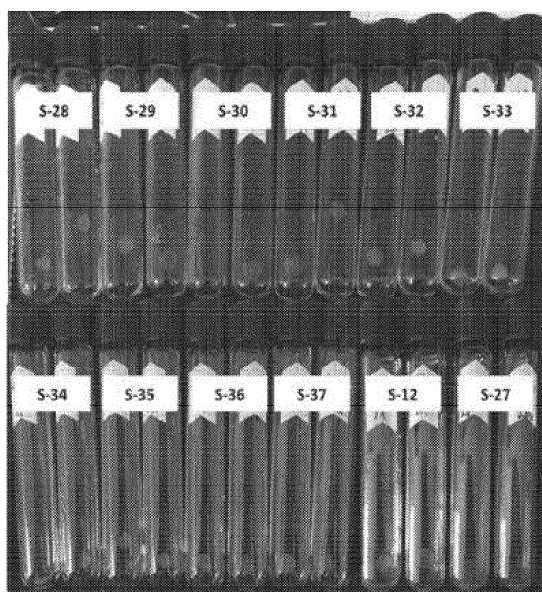


Фиг. 13В

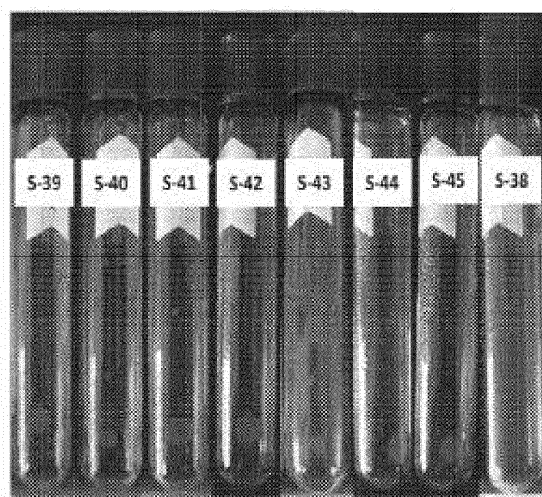




Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

