

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291613 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.11

(22) Дата подачи заявки
2020.11.25

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/14 (2017.01)
A61K 47/18 (2017.01)

(54) СОСТАВЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕВОДНЫХ ЭМУЛЬСИЙ

(31) 62/940,009

(32) 2019.11.25

(33) US

(86) PCT/US2020/062228

(87) WO 2021/108548 2021.06.03

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

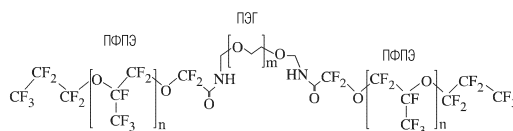
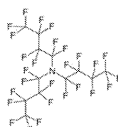
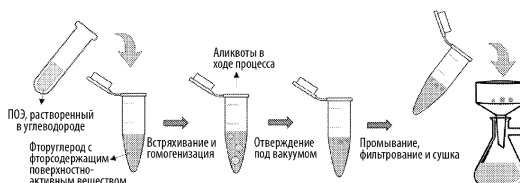
(72) Изобретатель:

Чжао Имин, Чен Хантер (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены неводные эмульсионные способы получения полимерных или покрытых полимером микрочастиц. Один способ дает композицию микрочастиц с длительным высвобождением с помощью объединения белкового порошка и полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора и добавления первого раствора ко второму раствору, при этом второй раствор содержит фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество для образования неводной эмульсии, содержащей множество капель углеводородной эмульсии во фторуглеродной жидкости. Последующий процесс отверждения микрочастиц включает этапы удаления углеводородного растворителя из образовавшихся капель эмульсии, что может быть достигнуто путем выпаривания углеводорода в условиях окружающей среды при перемешивании, или ускоренного отверждения в вакууме, или путем добавления гидрофторэфира во фторуглерод в качестве соразтворителя. Удаление фторуглеродной жидкости и промывание дополнительной фторуглеродной жидкостью для выделения микрочастиц с длительным высвобождением, при этом микрочастицы с длительным высвобождением содержат одно или более ядер белка и оболочку из полимера.



Pico-surf 1 (PFPE-PG-PFPE)

A1

202291613

202291613

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574488EA/032

СОСТАВЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕВОДНЫХ ЭМУЛЬСИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Аспекты изобретения, в общем, относятся к составам лекарственных средств из микросфер и способам их получения с использованием неводных эмульсионных систем.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Доставка терапевтического белка с замедленным высвобождением к биологически релевантной мишени желательна для лечения медицинских состояний, таких как рак, сердечно-сосудистые заболевания, сосудистые заболевания, ортопедические заболевания, стоматологические заболевания, раны, аутоиммунные заболевания, желудочно-кишечные расстройства и заболевания глаз. Биосовместимые и биоразлагаемые полимеры и другие имплантируемые устройства доставки для контролируемой и замедленной доставки лекарственных средств используются уже несколько десятилетий. Например, в некоторых устройствах доставки на полимерной основе терапевтическое лекарственное средство медленно высвобождается по мере разложения полимера с течением времени.

Замедленное высвобождение может быть желательным для соблюдения пациентом режима лечения. В частности, уменьшение количества инъекций может быть полезным, особенно в тех случаях, когда инъекцию должен делать врач, например, в случае внутриглазных терапевтических средств. Существует неудовлетворенная медицинская потребность в составах с замедленным высвобождением для эффективной доставки лекарственных средств с течением времени с минимальным количеством инъекций. В случае других заболеваний, например, рака и воспалительных заболеваний, существует потребность в улучшенных имплантируемых составах с замедленным высвобождением, содержащих стабильные и эффективные белковые терапевтические средства.

Терапевтические макромолекулы, такие как антитела и рецепторные Fc-слитые белки, должны быть составлены таким образом, чтобы не только сделать молекулы подходящими для введения пациентам, но и сохранить их стабильность при хранении и в месте введения. Например, терапевтические белки (например, антитела и слитые белки) в водном растворе склонны к разрушению, агрегации и/или нежелательным химическим модификациям, если раствор не составлен должным образом. Стабильность белкового терапевтического средства в жидком составе зависит не только от видов наполнителей, используемых в составе, а также от количества и соотношения этих наполнителей по отношению друг к другу, но также и от концентрации растворимого белка. При приготовлении терапевтического белкового состава необходимо также принимать во внимание соображения, не связанные со стабильностью. Примеры таких дополнительных соображений включают вязкость раствора и концентрацию терапевтического белка, которую может обеспечить данный состав. При составлении терапевтического белка для замедленного высвобождения необходимо проявлять большую осторожность, чтобы

получить состав, который остается стабильным во времени, при хранении и физиологической температуре, содержит адекватную концентрацию антител и обладает другими свойствами, которые позволяют удобно вводить состав пациентам.

Некоторые составы с замедленным высвобождением производятся с использованием различных способов инкапсуляции, включая внутреннее разделение фаз, межфазную полимеризацию, формирование множественных эмульсий, послойную адсорбцию полиэлектролитов и методы мягкого шаблонирования. Множественные эмульсии вода-в-масле-в-воде (В/М/В) являются наиболее распространенным типом множественных эмульсий и позволяют инкапсулировать водные/гидрофильные ядра непосредственно в водной суспензии. К сожалению, водные эмульсионные системы имеют определенные проблемы при использовании для инкапсулирования биологически активных агентов в составы с замедленным высвобождением. Например, осаждение белков происходит на водно-органической поверхности раздела с сопутствующим снижением их иммунореактивности (Raghuvanshi, R., et al., Pharm Dev Technol, 3(2):269-76 (1998)). В некоторых водных эмульсионных системах вода может диффундировать в органическую фазу и гидролизовать белок. После гидролиза белковые капли начинают сливаться и выходить в водную среду, агрегировать или осаждаться. После затвердевания в микрочастице появляются пустоты и водные каналы, в которых когда-то был белок, но вышел в водную среду.

Неводные эмульсии могут заменить обычные водные эмульсии, если присутствие воды нежелательно. Однако в литературе или предшествующем уровне техники имеется мало сообщений о неводных эмульсиях. Известны два типа неводных эмульсионных систем на углеводородной основе: 1) два несмешивающихся органических растворителя, стабилизированных блок-сополимерами (например, гексан/диметилформамид); и 2) несмешивающиеся с маслом полярные растворители (например, формамид, ацетонитрил), заменяющие воду с использованием существующих поверхностно-активных веществ. Ранее эмульсии вода-в-перфторированном масле (В/Ф) были исследованы и широко применялись в микрожидкостной технике на основе капель для биологических анализов на одной клетке или одной молекуле. В этих исследованиях ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ использовался в качестве фторсодержащего поверхностно-активного вещества (ФПАВ) для стабилизации капель воды во фторуглеродных растворителях.

Хотя доступно множество пар несмешивающихся растворителей, обычно один полярный и один неполярный, задача состоит в том, чтобы найти пару, подходящую для синтеза полимерных микросфер. Типичные биоразлагаемые полимеры, т.е. поли(лактид-со-гликолид) (ПЛГК), полимолочная кислота (ПМК), поли(ортоэфир) (ПОЭ) в основном растворимы в растворителях средней полярности, таких как хлороформ, дихлорметан, этилацетат и т. д. Это ограничивает выбор непрерывной фазы. Кроме того, совместимость с технологическим процессом, токсичность, безопасность и остаточные количества растворителей являются проблемами при использовании этих органических

растворителей и должны учитываться при использовании в качестве фармацевтического продукта.

Фторуглероды можно использовать в качестве непрерывной фазы в неводной эмульсионной системе благодаря следующим общим свойствам:

1. Фторуглероды не являются ни «гидрофобными», ни «гидрофильными», они не смешиваются с большинством органических (углеводородных) растворителей, что делает их идеальными в качестве непрерывной фазы для углеводородных капельных эмульсий.

2. Фторуглероды не растворяют белки и другие гидрофильные молекулы, полимеры на основе углеводов и органические вспомогательные вещества, то есть эти типы молекул не растворяются во фторуглеродах.

3. Фторуглероды имеют низкую вязкость.

4. Фторуглероды химически инертны и могут быть относительно менее токсичными или коррозионными по сравнению с обычно используемыми углеводородными растворителями.

5. Фторуглероды летучи и пригодны для повторного использования.

В предыдущей литературе сообщалось о различных типах эмульсионных систем, содержащих фторуглерод, полученный с помощью методов микрогидродинамики, таких как вода-во-фторуглероде (В/Ф), двойная эмульсия вода-во-фторуглероде-в-воде (В/Ф/В), тройная эмульсия вода-во-фторуглероде-в-масле-в-воде (В/Ф/М/В), двойная эмульсия фторуглерод-в-углеводороде-в-воде (Ф/У/В) и двойная эмульсия углеводород-во-фторуглероде-в-воде (У/Ф/В). Некоторые из этих эмульсий были использованы для синтеза полимерных микросфер. Однако все они по-прежнему представляют собой эмульсионные системы на водной основе, использующие воду в качестве дисперсной или непрерывной фазы.

Следовательно, целью изобретения является создание неводных эмульсионных систем для производства составов лекарственных средств и способы их применения.

Другой целью изобретения является создание составов с замедленным высвобождением с улучшенной стабильностью белка и стабильным замедленным высвобождением.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены неводные эмульсионные способы получения полимерных и покрытых полимером микрочастиц. В одном варианте реализации изобретения предложен способ получения композиции микрочастиц с длительным высвобождением или контролируемым высвобождением путем объединения белкового порошка и биоразлагаемого или биоразрушаемого полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора и добавления первого раствора ко второму раствору, при этом второй раствор содержит фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество для образования неводной эмульсии, содержащей множество капель углеводородной эмульсии во фторуглеродной жидкости. В некоторых вариантах реализации изобретения эмульсия образована объемной эмульсией. Способ

дополнительно включает этапы удаления углеводородного растворителя и удаления фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц с длительным высвобождением или контролируемым высвобождением, при этом микрочастицы с длительным высвобождением содержат одно или более ядер белкового порошка и оболочку из биоразлагаемого или биоразрушаемого полимера. Фторуглеродные и углеводородные жидкости могут быть удалены при перемешивании неводной эмульсии и выпаривании фторуглеродных и углеводородных жидкостей при атмосферном давлении окружающей среды или в вакууме. В некоторых вариантах реализации изобретения фторуглеродная жидкость содержит гидрофторэфир (ГФЭ), или после эмульгирования к неводной эмульсии добавляли дополнительное количество ГФЭ для быстрой экстракции углеводорода во фторуглеродную жидкость для ускорения отверждения микросфер. В некоторых вариантах реализации изобретения белковый порошок представляет собой микронизированный белковый порошок. В некоторых вариантах реализации изобретения микрочастицы промывают для удаления любого остаточного углеводородного растворителя, фторуглеродной жидкости, фторсодержащего поверхностно-активного вещества или их комбинации, остающихся на микрочастицах. Типичная фторуглеродная жидкость включает перфторсодержащее C5-C18-соединение, включая, но не ограничиваясь этим, FC-40. В некоторых вариантах реализации изобретения фторуглеродная жидкость содержит ГФЭ. Типичные углеводородные растворители включают, но не ограничиваются ими, дихлорметан, хлороформ, этилацетат и их комбинации. Типичное фторсодержащее поверхностно-активное вещество представляет собой тройной блок-сополимер перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир (ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ). Типичный биоразрушаемый полимер представляет собой полиортоэфир (ПОЭ). В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой анти тело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок. В одном варианте реализации изобретения белок представляет собой высушенный распылением белок T_{гап} (от англ. РНК-связывающий белок аттенуации) ФРСЭ (от англ. Фактор роста сосудистого эндотелия). В некоторых вариантах реализации изобретения микрочастицы имеют диаметр от 1,0 до 100 мкм или от 1,0 до 200 мкм. В одном варианте реализации изобретения микрочастицы, образованные раскрытыми неводными эмульсионными способами, представляют собой текучие композиции микрочастиц. Раскрытые текучие композиции микрочастиц могут быть суспендированы в фармацевтически приемлемом вспомогательном веществе, например, солевом растворе с pH-буфером, или суспендированы в масляном носителе, таком как триглицериды со средней длиной цепи. Текучие композиции микрочастиц можно вводить парентерально, например, с помощью шприца с иглой 27G.

В другом варианте реализации изобретения предложен способ получения множества покрытых полимером микросфер путем эмульгирования дисперсной фазы, содержащей от 1,0 до 30,0% мас./об. высушенного распылением белка, суспендированного в углеводородном растворе, при этом углеводородный раствор

содержит от 5,0 до 40% мас./об. ПОЭ, в непрерывную фазу с образованием капель эмульсии дисперсной фазы, при этом непрерывная фаза содержит фторуглеродный раствор, содержащий от 0,1 до 5,0% мас./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества и необязательно ГФЭ. Способ дополнительно включает отверждение капель эмульсии путем удаления углеводородных жидкостей при перемешивании эмульсии с образованием множества покрытых полимером микросфер и, необязательно, промывки микрочастиц для удаления углеводородных растворов, фторуглеродных растворов, фторсодержащих поверхностно-активных веществ или их комбинации. В одном варианте реализации изобретения углеводородные и фторуглеродные растворы удаляют выпариванием при атмосферном давлении окружающей среды или в вакууме.

В еще одном варианте реализации изобретения предложен способ получения покрытых полимером микрочастиц путем объединения углеводородного раствора, содержащего растворенный полимер, с высушенным распылением белковым порошком для получения дисперсной фазы и объединения дисперсной фазы с непрерывной фазой для получения капель эмульсии дисперсной фазы в непрерывной фазе, при этом непрерывная фаза содержит фторуглеродную жидкость и от 0,2 до 5,0% мас./об. ФПАВ и необязательно ГФЭ. Способ включает удаление углеводородного и фторуглеродного раствора путем перемешивания эмульсии под вакуумом для отверждения микрочастиц, а затем сбор покрытых полимером микрочастиц. Способ также включает необязательный этап промывки собранных микрочастиц.

В еще одном варианте реализации изобретения предложен способ получения микрочастиц путем объединения первого раствора, содержащего полимер в углеводородном растворителе, со вторым раствором, содержащим фторуглеродный растворитель и фторсодержащее поверхностно-активное вещество, и перемешивания объединенных растворов с получением эмульсии. Способ включает этапы удаления углеводородного растворителя под вакуумом при перемешивании объединенных растворов для отверждения микрочастиц и сбора микрочастиц. Способ необязательно включает промывку микрочастиц и сушку микрочастиц.

В другом варианте реализации изобретения предложены покрытые полимером микрочастицы, полученные описанными в данном документе неводными эмульсионными способами. В некоторых вариантах реализации изобретения микрочастицы имеют небольшое количество пор или каналов на поверхности полимера или внутренней матрице микрочастиц или совсем не имеют их.

В еще одном варианте реализации изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая покрытые полимером микрочастицы, полученные с использованием описанных в данном документе неводных эмульсионных способов.

В некоторых вариантах реализации изобретения размер микрочастиц можно довести до целевого диаметра или размера путем изменения композиций составов и параметров способа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А изображена схема, показывающая процесс производства пустых ПОЭ микросфер с помощью объемной эмульсии на основе У/Ф - Схема 1. На Фиг. 1В изображена химическая структура FC-40. На Фиг. 1С изображена химическая структура фторсодержащего поверхностно-активного вещества ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ (Pico-Surf™ 1), трехблочного сополимера перфторполиэфира/поли(этиленгликоля). Pico-Surf™ 1 является коммерчески доступным, например, в виде 5% (мас./мас.) в FC-40.

На Фиг. 2А изображена микрофотография пустых ПОЭ микросфер, сформированных с помощью У/Ф эмульсии. На Фиг. 2В изображена микрофотография, показывающая агрегацию ПОЭ, обнаруженную при низком содержании ФПАВ.

На Фиг. 3А, 3В и 3С изображены микрофотографии пустых ПОЭ микросфер, сформированных с помощью У/Ф эмульсии при низкой, средней и высокой скорости гомогенизации.

На Фиг. 4 (Схема 2) изображена схема, показывающая процесс инкапсуляции ВРБ в ПОЭ микросферы с помощью объемной эмульсии на основе Т/У/Ф.

На Фиг. 5 (Схема 3) изображена схема, показывающая эмульсионную систему углеводород-во-фторуглероде для инкапсуляции белка ВРБ.

На Фиг. 6А и 6В изображены флуоресцентные изображения этилацетатных капель, содержащих ПОЭ и высушенный распылением белок с флуоресцентной меткой (Ф-ВРБ), диспергированных в FC-40. Следует обратить внимание, что Ф-ВРБ сохранил свой первоначальный размер и морфологию внутри капли.

На Фиг. 7А изображена микрофотография Ф-ВРБ Trap ФРСЭ инкапсулированных микросфер, полученная при светлопольном освещении. На Фиг. 7В изображено флуоресцентное изображение Ф-ВРБ Trap ФРСЭ инкапсулированных микросфер (полоса=20 мкм). На Фиг. 7С изображено флуоресцентное изображение Ф-ВРБ Trap ФРСЭ инкапсулированных микросфер (полоса=10 мкм).

На Фиг. 8А-8Д изображено флуоресцентное изображение Ф-ВРБ Trap ФРСЭ инкапсулированных ПОЭ микросфер, помещенных в водную среду. Следует обратить внимание, что Ф-ВРБ сохранил свой первоначальный размер и морфологию внутри капли.

На Фиг. 9 изображен линейный график объемной плотности (%) в зависимости от размера (мкм) для микрочастиц, полученных с использованием дихлорметана (ДХМ) или этилацетата (EtAc) в неводных эмульсионных способах.

На Фиг. 10А и 10В изображены микрофотографии микрочастиц, загруженных 10% и 30% мас./мас. Ф-ВРБ Trap ФРСЭ, соответственно.

На Фиг. 11А и 11В изображены репрезентативные флуоресцентные изображения Ф-ВРБ Trap ФРСЭ инкапсулированных ПОЭ микросфер, загруженных 10% и 30% мас./мас. ВРБ, соответственно. Следует обратить внимание, что Ф-ВРБ сохранил свой первоначальный размер и морфологию внутри капли.

На Фиг. 12А-12С изображены изображения микрочастиц, загруженных 5%, 10% и 30% мас./мас. ВРБ, на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ), показывающие

увеличение количества белка на поверхности микрочастиц по мере увеличения загрузки ВРБ.

На Фиг. 13А и 13В изображены СЭМ-изображения высушенного распылением белка с $Dv50$ 2,18 мкм и 5,63 мкм.

На Фиг. 14А, 14В и 14С изображены изображения при светлопольном освещении, флуоресценции и СЭМ для Ф-ВРБ Тгар ФРСЭ, инкапсулированного в ПМК микросферы.

На Фиг. 15А и 15В изображены изображения при светлопольном освещении и флуоресценции для Ф-ВРБ Тгар ФРСЭ, инкапсулированного в ПМГК микросферы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

Следует понимать, что это раскрытие не ограничивается композициями и способами, описанными в данном документе, а также описанными экспериментальными условиями, поскольку они могут варьироваться. Также необходимо понимать, что терминология, применяемая в данном документе, приводится только с целью описания конкретных вариантов реализации изобретения, и не предполагает носить ограничительный характер, поскольку объем данного изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, употребляемые в данном документе, имеют то же самое значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя для практической реализации или апробации данного изобретения можно использовать любые композиции, способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе. Все упомянутые публикации полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Использование терминов в единственном числе и подобных ссылок в контексте описания заявленного в данном документе изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если только иное указано в данном документе или явно противоречит контексту.

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

Использование термина «около» предназначено для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 10%; в других вариантах реализации изобретения значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 5%; в других вариантах реализации изобретения значения могут находиться в диапазоне выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 2%; в других вариантах реализации изобретения значения могут находиться в диапазоне выше

или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 1%. Предыдущие диапазоны предназначены для разъяснения контекста, и никаких дополнительных ограничений не подразумевается. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Применение всех без исключения примеров или иллюстративных формулировок (например, «такой как»), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не указано иное. Никакие формулировки в описании не должны толковаться как указывающие на какие-либо не заявленные элементы как существенные для практической реализации изобретения.

«Белок» относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды, а также может включать такие модификации, как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксилирование и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, и белки включают, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных методов культивирования клеток и обычно вводятся в клетку с помощью методов генной инженерии (например, таких как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, безинтронная последовательность и т.д.), в которой он может находиться в виде эписомы или быть интегрирован в геном клетки.

«Антитело» относится к иммуноглобулиновым молекулам, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, именуемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вставками более консервативных областей, именуемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин,

который может связываться более чем с одним различным эпитопом. Биспецифические антитела в общем описаны в патенте США № 8586713, который включен в данную заявку посредством ссылки.

«Fc-слитые белки» содержат часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые иначе не встречаются вместе в природе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая Fc-домен), описано, например, в Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535, 1991; Byrn et al., *Nature* 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992. «Рецепторные Fc-слитые белки» содержат один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах реализации изобретения содержит шарнирную область, за которой следуют домены СН2 и СН3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более лигандом (лигандами). Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 или ловушка ФРСЭ.

«Микронизированная белковая частица» или «белковая частица» означает частицу, содержащую множество молекул белка с низким, очень низким или близким к нулю количеством воды (например, <3% воды по массе). Используемая в данном документе микронизированная белковая частица обычно имеет сферическую форму и имеет ЭДО в диапазоне от 2 микрон до около 35 микрон. Микронизированная белковая частица не ограничивается какой-либо конкретной белковой единицей и подходит для приготовления и доставки терапевтического белка. Обычные терапевтические белки включают, среди прочего, антигенсвязывающие белки, такие как, например, фрагменты рецептора, антитела (включая IgG) и производные или фрагменты антител, другие Fc-содержащие белки, включая Fc-слитые белки и рецепторы Fc-слитых белков, включая белки типа Trap (Huang, C., *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 692-99 (2009)), такие как Trap ФРСЭ.

II. Получение составов микросфер с использованием углеводородно-фторуглеродных эмульсий

Предложены системы и способы составления фармацевтических композиций с использованием безводных эмульсионных систем. Описанные безводные эмульсионные способы преодолевают несколько проблем существующих водных эмульсионных систем. Например, сравнительные исследования между описанными безводными эмульсионными системами и существующими водными эмульсионными системами, представленными в данном документе, показывают, что составы, полученные с использованием водных эмульсионных систем, просачивают лекарственное средство, например, белковое лекарственное средство, из капель эмульсии в непрерывную водную фазу во время производства. Эта утечка лекарственного средства из капель эмульсии приводит к низкой эффективности инкапсуляции. Описанные в данном документе способы на основе

неводной эмульсии инкапсулируют молекулы лекарственного средства, включая, но не ограничиваясь ими, гидрофильные лекарственные средства, такие как белки, с повышенной эффективностью инкапсуляции по сравнению с водными эмульсионными системами, которые сохраняют исходную структуру белковых частиц, или их комбинации. Описанные безводные эмульсионные системы и способы могут давать инкапсулированные лекарственные составы с помощью объемных способов (т.е. перемешивания, гомогенизации, обработки ультразвуком) и других традиционных способов. Системы и способы также могут быть применены к широкому спектру полимерных материалов, полезного содержания твердых веществ и способов эмульгирования. В Таблице 1 показаны результаты сравнения различных проб эмульсий, демонстрирующие, что неводные эмульсионные системы обеспечивают значительное улучшение инкапсуляции микрочастиц по сравнению с водными эмульсионными системами.

Таблица 1: Обзор способов и основных результатов

Система растворителя	Способ эмульгирования	Дисперсная фаза	Непрерывная фаза	Основное результаты
T/M/V	Объем (перемешивание или гомогенизация)	ДХМ	Вода, 1% ПВС	Полые или пустые сферы, плохая герметизация

Система растворителя	Способ эмульгирования	Дисперсная фаза	Непрерывная фаза	Основное результаты
Т/У/Ф	Объем (перемешивание)	Этилацетат	FC-40, 0,2-2% Pico-surf™ 1	Микросферы являются текучими, ресуспендируемыми и инкапсулирующими белок до включительно 30% по массе. Микронизированный белок сохранил свой первоначальный размер частиц и морфологию. Инкапсулированный белок сохранил высокую чистоту. Микросферы имеют гладкую поверхность без пор и каналов.

А. Эмульсии твердое-в-углеводороде-во-фторуглероде (Т/У/Ф)

Типичный неводный Т/У/Ф эмульсионный способ включает этапы объединения сухого протеинового порошка и биоразлагаемого и/или биоразрушаемого полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора и добавления первого раствора ко второму раствору, полученному из фторуглеродной жидкости и фторсодержащего поверхностно-активного вещества. Объединение первого и второго растворов осуществляют таким образом, чтобы образовать неводную эмульсию, содержащую множество капель углеводородной эмульсии во фторуглеродной жидкости, например, путем перемешивания, обработки ультразвуком, кавитации, гомогенизации или встряхивания. Способ включает этапы удаления углеводородного растворителя и удаления фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц, имеющих одно или более ядер из микронизированного белка и оболочку из биоразлагаемого полимера. В одном варианте реализации изобретения эмульсию перемешивают, а углеводородные и фторуглеродные жидкости выпаривают в вакууме. Полученные микрочастицы могут быть необязательно промыты для удаления углеводородного растворителя, фторуглеродной

жидкости, фторсодержащего поверхностно-активного вещества или их комбинации. Эмульсия может быть образована с использованием технологии объемной эмульсии.

В одном варианте реализации изобретения предложен способ получения композиции микрочастиц с длительным высвобождением путем объединения протеинового порошка и биоразлагаемого или биоразрушаемого полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора и добавления первого раствора ко второму раствору, при этом второй раствор содержит фторуглеродную жидкость, фторсодержащее поверхностно-активное вещество и необязательно ГФЭ для образования неводной эмульсии, содержащей множество капель углеводородной эмульсии, содержащих белковый порошок во фторуглеродной жидкости. Эмульсия может быть получена с использованием гомогенизации, встряхивания, обработки ультразвуком, кавитации, перемешивания или их комбинации. Способ дополнительно включает этап удаления углеводородного растворителя и фторуглеродной жидкости при перемешивании эмульсии. Углеводородные и фторуглеродные жидкости могут быть удалены выпариванием, необязательно в условиях вакуума. В других вариантах реализации изобретения микрочастицы могут быть собраны фильтрованием. Удаление углеводородных и фторуглеродных жидкостей отверждает микрочастицы, которые затем могут быть собраны. В некоторых вариантах реализации изобретения к фторуглероду может быть добавлен ГФЭ, чтобы способствовать извлечению углеводорода из дисперсной фазы во фторуглеродную непрерывную фазу для более быстрого процесса отверждения. ГФЭ смешивается как с фторуглеродом, так и с углеводородом и, таким образом, может выступать в качестве соразтворителя для повышения растворимости углеводорода во фторуглеродной фазе. Микрочастицы с длительным высвобождением, полученные способом неводной эмульсии, содержат белок, инкапсулированный в матрицу из биоразлагаемого или биоразрушаемого полимера. В некоторых вариантах реализации изобретения микрочастицы имеют единую структуру ядро-оболочка. В других вариантах реализации изобретения микрочастицы имеют множество ядер, диспергированных в полимере. В еще других вариантах реализации изобретения совокупность микрочастиц включает микрочастицы, имеющие одноядерную структуру, инкапсулированные полимерной оболочкой, и микрочастицы, имеющие многоядерные структуры в полимерной оболочке. Фторуглеродная жидкость может представлять собой перфторсодержащее C5-C18-соединение, включая, но не ограничиваясь им, FC-40, а углеводородный раствор выбирают из группы, состоящей из этилацетата, хлороформа, толуола, тетрагидрофурана, дихлорметана или их комбинаций. В одном варианте реализации изобретения фторсодержащее поверхностно-активное вещество представляет собой перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир, коммерчески доступный как Pico-Surf™ 1. В некоторых вариантах реализации изобретения биоразрушаемый полимер представляет собой ПОЭ. В других вариантах реализации изобретения полимер выбирают из группы, состоящей из полимолочной кислоты и поли(молочной-со-гликолевой кислоты). Как правило, белок

представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок, рекомбинантный белок или его фрагмент или укороченную версию. Обычно белок микронизируют, например, сушкой распылением, сушкой электрораспылением, обратимым осаждением, лиофилизацией, микротемплатированием или их комбинацией. В одном варианте реализации изобретения белок представляет собой белок Trap ФРСЭ или его укороченную форму. Другие белки, которые можно использовать в раскрытых способах, описаны ниже. Микрочастицы, полученные раскрытыми способами, имеют полимерную оболочку, лишенную пор или каналов. Полимерная оболочка не перфорирована. В некоторых вариантах реализации изобретения микрочастицы имеют диаметр от 1 до 200 мкм.

В другом варианте реализации изобретения предложен способ получения покрытых полимером микросфер путем объединения (1) дисперсной фазы, имеющей от 1,0 до 30,0% мас./об. высушенного распылением белка, суспендированного в углеводородном растворе, при этом углеводородный раствор содержит от 5,0 до 30% мас./об. ПОЭ, в (2) непрерывной фазе с образованием капель эмульсии дисперсной фазы, при этом непрерывная фаза содержит фторуглеродный раствор, содержащий от 0,1 до 5,0% масс./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества. Способ включает отверждение капель эмульсии путем удаления углеводородного раствора с образованием отвержденных покрытых полимером микросфер. В одном варианте реализации изобретения фторуглеродный раствор может представлять собой перфторсодержащее C5-C18-соединение, включая, но не ограничиваясь им, FC-40, а углеводородный раствор выбирают из группы этилацетата, хлороформа, толуола, тетрагидрофурана, дихлорметана или их комбинаций. В одном варианте реализации изобретения фторсодержащее поверхностно-активное вещество представляет собой перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир, коммерчески доступный как Pico-Surf™ 1. Способ включает этап перемешивания эмульсии под вакуумом для удаления углеводородного и фторуглеродного растворов.

В еще одном варианте реализации изобретения предложен способ получения покрытых полимером микрочастиц путем объединения углеводородного раствора, содержащего растворенный полимер, и высушенного распылением белкового порошка для получения дисперсной фазы. Способ включает объединение дисперсной фазы с непрерывной фазой для получения капель эмульсии дисперсной фазы в непрерывной фазе, при этом непрерывная фаза содержит фторуглеродную жидкость и от 0,1 до 5,0% мас./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества, и сбор покрытых полимером микрочастиц. Углеводородный раствор может быть выбран из группы, состоящей из этилацетата, дихлорметана, хлороформа или их комбинации. В одном варианте реализации изобретения фторуглеродный раствор содержит FC-40, а поверхностно-активное вещество представляет собой перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир, коммерчески доступный как Pico-Surf™ 1.

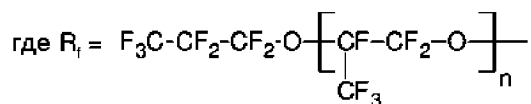
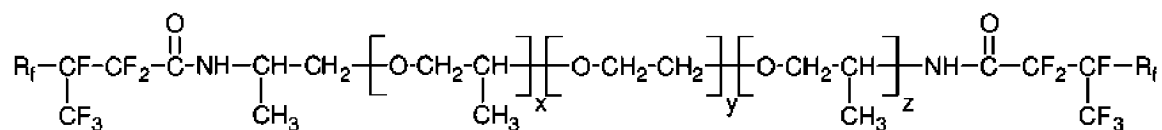
1. Углеводородные растворители

В некоторых вариантах реализации изобретения углеводородный растворитель (также именуемый углеводородной жидкостью) выбирают таким образом, чтобы полимерные материалы, например, биоразлагаемые или биоразрушаемые полимеры, были растворимы в углеводороде. В некоторых вариантах реализации изобретения углеводородный растворитель выбирают из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения углеводородный растворитель может содержать ацетонитрил, диметилформамид, диметилсульфоксид, ацетон, этанол, метанол, пентан, пропанол, гексан или их комбинацию.

2. Фторсодержащие жидкости

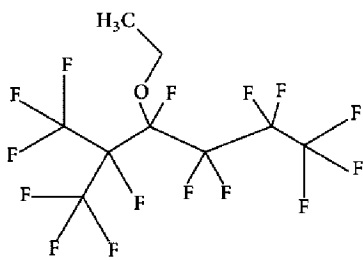
Типичная фторсодержащая жидкость представляет собой фторуглеродную жидкость, включающую, но не ограничивающуюся ими, Fluorinert™ FC-40 (средняя ММ=650 г/моль), 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N, N-бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)бутан-1-амин (Фиг. 1B), Fluorinert™ FC-70 (средняя ММ=821 г/моль) или их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения фторуглеродная жидкость представляет собой или содержит гидрофторэфир (ГФЭ). Пример ГФЭ включает, но не ограничивается ими, NOVEC™ 7000 (1-метоксигептафторпропан), NOVEC™ 7100 (метоксинонафторбутан), NOVEC™ 7200 (этоксинонафторбутан), NOVEC™ 7500 (2-(трифторметил)-3-этоксидодекафторгексан). В других вариантах реализации изобретения фторуглеродная жидкость содержит FC-40, FC-70, Novec™ 7500, Novec™ 7100, Novec™ 7000 или их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения второй раствор содержит фторсодержащее поверхностно-активное вещество (ФПАВ) в дополнение к фторсодержащей жидкости. Типичное ФПАВ представляет собой тройной блок-сополимер перфторполиэфир-*b*-полиэтиленгликоль-*b*-перфторполиэфир (ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ), который является коммерчески доступным как Pico-Surf™ 1. В одном варианте реализации изобретения фторуглеродная жидкость или второй раствор содержат FC-40 и Pico-Surf™ 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения ФПАВ представляет собой



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

В одном варианте реализации изобретения ГФЭ имеет следующую химическую структуру:



2-(трифторметил)-3-этоксидекафторгексан.

Другие ГФЭ, подходящие для использования в способе, представляют собой класс молекул, в которых все атомы водорода находятся на атомах углерода без замещения фтором и отделены от фторированных углеродов эфирным кислородом, т.е. RfORh. ГФЭ имеют молекулярную структуру, которая может быть линейной, разветвленной или циклической или их комбинацией (например, алкилциклоалифатической), и предпочтительно не содержат этиленовой ненасыщенности, имея в общей сложности от около 4 до около 20 атомов углерода. Такие ГФЭ известны и легко доступны либо в виде практически чистых соединений, либо в виде смесей. Благодаря липофильности и фторофильности ГФЭ они смешиваются как с фторуглеродом, так и с углеводородом. При добавлении к углеводородной/фторуглеродной эмульсии они могут выступать в качестве сорастворителя для извлечения углеводорода во фторуглеродную фазу и ускорения процесса отверждения.

В некоторых вариантах реализации изобретения углеводородный растворитель, фторуглерод или оба удаляются выпариванием, необязательно в вакууме, при перемешивании эмульсии. В некоторых вариантах реализации изобретения микрочастицы собирают фильтрованием, необязательно фильтрованием под вакуумом.

Процентное содержание ГФЭ во фторуглеродной фазе может составлять от 0 до 20% об./об., при этом увеличение процентного содержания ГФЭ увеличивает скорость извлечения углеводородов. Однако процентное содержание ГФЭ не может быть слишком высоким, так как может стать труднее контролировать размер и морфологию микросферы.

3. Разрушаемые или биоразлагаемые полимеры

В одном варианте реализации изобретения полимер представляет собой биоразлагаемый или биоразрушаемый полимер. В некоторых вариантах реализации изобретения полимер выбран из группы, состоящей из разветвленного или линейного полиэтиленгликоля (ПЭГ), полимолочной кислоты (ПМК), полигликолевой кислоты (ПГК), полимолочно-полигликолевого сополимера (ПЛГК), поли-D, L-лактид-когликолида (ПЛГК), ПЛГК-этиленоксидфумарата, ПЛГК-альфа-токоферилсукцината, этерифицированного до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрида поли[1,6-бис(п-карбоксифенокси)гексан] (пКФГ), поли(гидроксимасляной кислоты-согидроксивалериановой кислоты) (ПГМ-ПБК), сополимера полиэтиленгликоля и поли(молочной кислоты) (ПЭГ-ПМ), поли-ε-капролактона (ПКЛ), полиалкилцианоакрилата (ПАЦ), поли(этил)цианоакрилата (ПЭЦ), полиизобутилцианоакрилата, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламида (поли(ГПМА)),

поли- β -R-гидроксibuтирата (ПГБ), поли- β -R-гидроксиалканоата (ПГА), поли- β -R-яблочной кислоты, фосфолипидно-холестериновых полимеров, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламина (ДОФХ/ПЭГ-ДСФЭ)/холестерина, полисахаридов, целлюлозы, этилцеллюлозы, метилцеллюлозы, альгинатов, декстрана и декстрановых гидрогелевых полимеров, амилозы, инулина, пектина и гуаровой камеди, хитозана, хитина, гепарина, гиалуроновой кислоты, полиротаксанов и полипсевдоротаксанов на основе циклодекстрина (ЦД), полиаспартатов, полиглутаматов, полилюцина, сополимеров лейцина и глутамата, полибутиленсукцината, желатина, коллагенов, фибринов, фибрина, полиортоэфиров, сополимеров полиортоэфира и полиамидина, сополимеров полиортоэфира и диамина, полиортоэфиров, включающих латентные кислоты, сополимера поли(этиленгликоля)/поли(бутилентерефталата), их комбинаций и сополимеров. В одном варианте реализации изобретения полимер представляет собой поли- ϵ -капролактон (ПКЛ) или его производное или сополимер. В одном варианте реализации изобретения полимер представляет собой ПЛГК или ее производное или сополимер. В одном варианте реализации изобретения полимер представляет собой этилцеллюлозу или ее производное или сополимер. В одном варианте реализации изобретения полимер представляет собой полиортоэфир или его производное или сополимер. В одном варианте реализации изобретения полимер представляет собой полиэфирамид.

Используемый в данном документе термин «полимер» относится к макромолекуле, содержащей повторяющиеся мономеры, соединенные ковалентными химическими связями. Полимеры являются биосовместимыми и биоразлагаемыми. Биосовместимый и биоразлагаемый полимер может быть природным или синтетическим. Природные полимеры включают полинуклеотиды, полипептиды, такие как встречающиеся в природе белки, рекомбинантные белки, желатин, коллагены, фибрины, фиброин, полиаспартаты, полиглутаматы, полилизин, сополимеры лейцина и глутамата; и полисахариды, такие как альгинаты целлюлозы, декстран и декстрановые гидрогелевые полимеры, амилоза, инулин, пектин и гуаровая камедь, хитозан, хитин, гепарин и гиалуроновая кислота. Синтетические биосовместимые и биоразлагаемые полимеры включают полимолочную кислоту (ПМК), полигликолевую кислоту (ПГК), полимолочно-полигликолевый сополимер (ПЛГК), поли-D, L-лактид-когликолид (ПЛГК), ПЛГК-этиленоксидфумарат, ПЛГК-альфа-токоферилсукцинат, этерифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксифеноксигексана)] (пКФГ), поли(гидроксимасляную кислоту-согидроксивалериановую кислоту) (ПГМ-ПВК), сополимер полиэтиленгликоля и поли(молочной кислоты) (ПЭГ-ПМ), поли- ϵ -капролактон (ПКЛ), полиалкилцианоакрилат (ПАЦ), поли(этил)цианоакрилат (ПЭЦ), полиизобутилцианоакрилат, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид (поли(ГПМА)), поли- β -R-гидроксibuтират (ПГБ), поли- β -R-гидроксиалканоат (ПГА), поли- β -R-яблочную кислоту, фосфолипидно-холестериновые полимеры, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (ДОФХ/ПЭГ-

ДСФЭ)/холестерин, этилцеллюлозу, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (ЦД), олибутиленсукцинат (ПБС), полиортоэфир, сополимеры полиортоэфира и полиамидина, сополимеры полиортоэфира и диамина, полиортоэфир, включающие латентные кислоты для контролирования скоростей разрушения и, *среди прочего*, сополимеры поли(этиленгликоля)/поли(бутилентерефталата).

Этилцеллюлоза (ЭЦ) является хорошо известным и легкодоступным биоматериалом, используемым в фармацевтике и пищевой промышленности. Это производное целлюлозы, в котором некоторые гидроксильные группы глюкозы заменены этиловым эфиром. См. Martinac et al., J. Microencapsulation, 22(5): 549-561 (2005) и приведенные там ссылки, в которых описаны способы использования этилцеллюлозы в качестве биосовместимых полимеров при производстве микросфер. См. также US 4210529 (1980) и ссылки в нем для подробного описания этилцеллюлозы и способов получения производных этилцеллюлозы.

Поли-D, L-лактид-со-гликолид (ПЛГК) также является хорошо известным биосовместимым и биоразлагаемым полимером, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), используемым в тканевой инженерии и фармацевтических системах доставки. ПЛГК представляет собой сложный полиэфир, состоящий из мономеров гликолевой и молочной кислот. Описание синтеза ПЛГК и производства наночастиц ПЛГК см. в Astete and Sabliov, Biomater. Sci. Polym. Ed., 17(3): 247-89 (2006) и ссылки в нем.

Поли-ε-капролактон (ПКЛ) является еще одним биосовместимым и биоразлагаемым полимером, одобренным FDA для использования людьми в качестве средства доставки лекарств. ПКЛ представляет собой полиэфир ε-капролактона, который быстро гидролизует в организме с образованием нетоксичной или малотоксичной гидроксикарбоновой кислоты. Описание производства ПКЛ см. в Labet and Thielemans, Chemical Society Reviews 38: 3484-3504 (2009) и ссылки в нем. Описание производства и применения микросфер и наносфер на основе ПКЛ в качестве систем доставки см. в Sinha et al., Int. J. Pharm., 278(1): 1-23 (2004) и ссылки в нем.

Полиортоэфир (ПОЭ) представляет собой биоразрушаемый полимер, выполненный для доставки лекарственных средств. Обычно это полимер кетенацетала, предпочтительно циклического дикетенацетала, такого как, *например*, 3,9-диметилен-2,4,8,10-тетраоксаспиро[5.5]ундекан, который полимеризуется посредством конденсации гликоля с образованием ортоэфирных связей. Описание синтеза полиортоэфиров и различных типов можно найти, *например*, в US 4304767. Полиортоэфир можно модифицировать, чтобы контролировать их профиль высвобождения лекарственного средства и скорость разложения путем замены или исключения различных гидрофобных диолов и полиолов, таких как, *например*, путем замены гексантириола на декантириол; а также добавлением латентных кислот, таких как, *например*, гликолид, октандиовая кислота или тому подобное, к основной цепи для повышения чувствительности к pH. Индивидуальные формы ПОЭ могут включать гликолевую кислоту в основной цепи ПОЭ для

регулирования потери массы и высвобождения лекарственного средства. Другие модификации полиортоэфира включают интеграцию амина для повышения функциональности. Получение, описание и применение полиортоэфиров описаны в US 596854, US 4764364 США, Heller and Barr, *Biomacromolecules*, 5(5): 1625-32 (2004) и Heller, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57: 2053-62 (2005).

4. Белковые лекарственные средства

В некоторых вариантах реализации изобретения составы микрочастиц, полученные раскрытыми безводными эмульсионными способами и системой включают лекарственное средство. Примеры лекарственных средств включают, но не ограничиваются ими, белки, слитые белки и их фрагменты, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. В одном варианте реализации изобретения белок представляет собой белок Тrap ФРСЭ (например, афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора ФРСЭ Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора ФРСЭ Flk1, слитый с Fc hIgG1, например, как описано в патентах США №№ 7087411, 7279159 и 8144840, которые целиком включены в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации изобретения белок Тrap ФРСЭ представляет собой укороченную форму Тrap ФРСЭ, как описано в патенте США № 7396664, который целиком включен посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок в составе микрочастиц представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, четырехвалентную G-подобную молекулу иммуноглобулина с двойной специфичностью, именуемую иммуноглобулином с двойным переменным доменом (DVD-IG), антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой антитело IgG4. В другом варианте реализации изобретения антитело содержит химерную петлю. В еще одном варианте реализации изобретения антитело содержит химерный Fc. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело выбрано из группы, состоящей из антитела против запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела против PD1, как описано в патенте США № 9987500), лиганда-1 против запрограммированной гибели клеток (например, антитела против PD-L1, как описано в патенте США № 9938345), антитела против Dll4, антитела против ангиопоэтина-2 (например, антитела против ANG2, как описано в патенте США № 9402898), анти-

ангиопоэтин-подобного 3 антитела (например, антитела против AngPtl3, как описано в патенте США № 9018356), антитела против рецептора тромбоцитарного фактора роста (например, антитела против PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела против Erb3, антитела против рецептора пролактина (например, антитела против PRLR, как описано в патенте США № 9302015, антитела против комплемента 5 (например, антитела против C5, как описано в патенте США № 9795121), антитела против ФНО, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитела против РЭФР, как описано в патенте США № 9132192 или антитела против РЭФРvIII, как описано в патенте США № 9475875), антитела против пропротеинконвертазы субтилизина кексина-9 (например, антитела против PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или патенте США № 9540449), антитела против фактора роста и дифференцировки-8 (например, антитела против GDF8, также известного как антитело против миостатина, описанное в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, антитела против GCGR, как описано в патенте США № №№ 9587029 или 9657099), антитела против ФРСЭ, антитела против IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитела к IL4R, как описано в опубликованной заявке на патент США № US 2014/0271681A1 (отозванная) или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина 6 (например, антитела против IL6R, как описано в патентах США № №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, к интерлейкину 33 (например, антитела против IL33, как описано в патентах США №№ 9453072 или 9637535), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитела к РСВ, как описано в патенте США №№ 9447173 и 10125188 и опубликованной заявке на патент США № US2019/0031741A1), антитела против кластера дифференцировки 3 (например, антитела против CD3, как описано в патенте США № 9657102), антитела против кластера дифференцировки 20 (например, антитела против CD20, как описано в патенте США №№ 9657102 и US20150266966A1 и патенте США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки-48 (например, антитела к CD48, как описано в патенте США № № 9228014), антитела против Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела против вируса ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела против БВРВ, как описано в патенте США № 9718872), антитела против вируса Эбола (например, как описано в патенте США № 9771414), антитела против вируса Зика, антитела против гена активации лимфоцитов 3 (например, антитела против LAG3 или антитела против CD223), антитела против фактора роста нервов (например, антитело против ФРН, как описано в опубликованной заявке на патент США № US2016/0017029 (отозванная) и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела против протеина Y. В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела против CD3 x против CD20 (как описано в патенте США №№ 9657102 и US 20150266966A1), биспецифического антитела против CD3 x против

антимуцина 16 (например, биспецифического антитела против CD3 x против Muc16) и биспецифического антитела против CD3 x антиспецифического мембранного антигена простаты (например, биспецифического антитела против CD3 x против PSMA). В некоторых вариантах реализации изобретения интересующий белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-атто, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, бролуцизумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дуплимумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтансинеалироцумаба, энивакумаба, эволюкумаба, фасинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-Abda, инфликсимаба-dyub, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринуцумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок в комплексах представляет собой рекомбинантный белок, который содержит фрагмент Fc и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следуют домены CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах реализации изобретения рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более различных цепей рецептора, которые связываются либо с одним лигандом, либо с множеством лигандов. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок Trap, такой как, например, Trap IL-1 (например, рилонацепт, который содержит область связывания лиганда IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который целиком включен в данный документ посредством ссылки), или Trap ФРСЭ (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора ФРСЭ Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора ФРСЭ Flk1, слитого с Fc hIgG10). В других вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок представляет собой слитый белок ScFv-Fc, который содержит один или более из одного или более антигенсвязывающих доменов, таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи, антитела, связанного с Fc-фрагментом.

В некоторых вариантах реализации изобретения исходный белок находится в форме сухого порошка, например микронизированного сухого порошка. В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой высушенный распылением

порошок (ВРП). Использование высушенного распылением белка вместо раствора белка имеет преимущества, заключающиеся в более высокой загрузке белка в микрочастицы и лучшей стабильности белка во время процесса инкапсуляции. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы сухого белка остаются в твердом состоянии и окружены стабилизаторами в течение всего процесса инкапсуляции и условий хранения. В некоторых вариантах реализации изобретения инкапсулированный высушенный распылением белок характеризуется высоким выходом и низким уровнем агрегатов, возможно, из-за минимального взаимодействия с поверхностью, поскольку только небольшая часть поверхностных белков подвергается воздействию границы раздела. В некоторых вариантах реализации изобретения перед инкапсуляцией белок микронизируют.

В. Микрочастицы

В одном варианте реализации изобретения предложена фармацевтическая композиция, полученная с использованием раскрытой неводной эмульсионной системы. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит микрочастицы, которые имеют полимерную оболочку и микронизированное белковое ядро. В некоторых вариантах реализации изобретения микрочастицы имеют приблизительно сферическую форму. Некоторые микрочастицы и белковые ядра будут приближаться к сферичности, в то время как другие будут иметь более неправильную форму. Таким образом, используемый в данном документе термин «диаметр» означает любое из следующего: (а) диаметр сферы, описывающей ядро микрочастицы или белка, (б) диаметр наибольшей сферы, которая находится в пределах границ микрочастицы или ядра белка, (в) любой параметр между описанной сферой (а) и ограниченной сферой (б), включая среднее значение между ними, (г) длина самой длинной оси микрочастицы или ядра белка, (д) длина самой короткой оси микрочастицы или ядра белка, (е) любой параметр между длиной длинной оси (г) и длиной короткой оси (д), включая среднее значение между двумя и/или (ж) эквивалентный диаметр окружности («ЭДО»), определенный с помощью визуализации микропотоков (ВМП), анализа слежения за наночастицами (АСН), или как объемный или усредненный диаметр с помощью методов светорассеяния, таких как статическое светорассеяние (ССР), динамическое светорассеяние (ДСР) или лазерный дифракционный анализ. Диаметр обычно выражается в микрометрах (мкм или микрон). Диаметр можно определить оптическим измерением или измерением с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Микрочастицы, полученные описанными неводными эмульсионными способами, представляют собой множество молекул белка с низким, очень низким или почти нулевым количеством воды (например, <3% воды по массе). Используемый в данном документе термин «микронизированная белковая частица» имеет ЭДО в диапазоне от 2 мкм до около 35 мкм, или от 2,0 до 50 мкм, или от 5,0 до 15,0 мкм, или около 10 мкм. Микронизированная белковая частица не ограничивается какой-либо конкретной

белковой единицей и подходит для приготовления и доставки терапевтического белка, включая белки, описанные выше.

Например, белковая частица может быть микронизирована путем распылительной сушки, лиофилизации и измельчения, струйного измельчения, обратимого осаждения в нерастворителе, грануляции, постепенного осаждения (US 7998477 (2011)), осаждения в сверхкритической жидкости (US 6063910 (2000)) или образования частиц, вызванного двуокисью углерода под высоким давлением (Bustami et al., *Pharma. Res.* 17: 1360-66 (2000)). Используемый в данном документе термин «распылительная сушка» означает способ получения сухого порошка, содержащего частицы микронного размера, из взвеси или суспензии с использованием распылительной сушилки. Распылительные сушилки используют распылитель или распылительную насадку для диспергирования суспензии или взвеси в виде мелкораспыленной струи с контролируемым размером капель. Размер капель от 10 до 500 мкм можно получить с помощью распылительной сушки. По мере высыхания растворителя (воды или органического растворителя) белковое вещество высыхает в частицы микронного размера, образуя порошкообразное вещество; или, в случае белково-полимерной суспензии, во время сушки полимер затвердевает в оболочку вокруг белковой загрузки.

В некоторых вариантах реализации изобретения микронизированный белок представляет собой белок Трап ФРСЭ. Фармацевтические составы для образования микронизированных частиц белка Трап ФРСЭ могут содержать от около 10 мг/мл до около 100 мг/мл белка Трап ФРСЭ, от около 1,0 до около 50 мг/мл белка, около 10 мг/мл, около 15 мг/мл, около 20 мг/мл, около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 75 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 95 мг/мл или около 100 мг/мл белка Трап ФРСЭ.

В некоторых вариантах реализации изобретения микрочастицы, полученные с использованием описанных неводных эмульсионных систем, содержат ядро белковой частицы внутри полимерной оболочки, имеют диапазон диаметров от около 2 мкм до около 70 мкм, от около 5 мкм до около 65 мкм, от около 10 мкм до около 60 мкм, от около 15 мкм до около 55 мкм, от около 10 мкм до около 50 мкм, от около 1,0 до 15 мкм, около 20 мкм, около 25 мкм или около 30 мкм. Изменение размера в значительной степени отражает толщину полимерной оболочки, хотя диаметр белкового ядра может в некоторой степени способствовать изменению размера.

В одном варианте реализации изобретения микрочастицы, образованные раскрытыми неводными эмульсионными способами, представляют собой текучие композиции микрочастиц. Раскрытые текучие композиции микрочастиц могут быть суспендированы в фармацевтически приемлемом вспомогательном веществе, например, в физиологическом растворе с pH-буфером. Текучие композиции микрочастиц можно вводить парентерально, например, с помощью шприца, такого как шприц с иглой 27G.

Микрочастицы пригодны для модифицированного или замедленного высвобождения белковых терапевтических средств. В некоторых вариантах реализации изобретения составы микросфер вводят интравитреально, супрахориоидально или подкожно. Например, предполагается, что микрочастицы Trap ФРСЭ могут использоваться для замедленного высвобождения терапевтического белка Trap ФРСЭ, например, в стекловидном теле для лечения сосудистых заболеваний глаза или для подкожной имплантации для замедленного высвобождения Trap ФРСЭ для лечения других расстройств.

Микрочастицы по данному изобретению высвобождают белок в физиологической водной среде при температуре около 37 °С с относительно постоянной скоростью в течение длительного периода времени, по меньшей мере, до 60, 90, 120 или 150 дней.

В одном варианте реализации изобретения предложена композиция микросфер, полученная с использованием неводных эмульсионных способов, раскрытых в данном документе, причем композиция содержит >100 мг высушенного распылением белка. В одном варианте реализации изобретения неводные эмульсионные способы дают выход > 90% и производят микрочастицы с чистотой > 99%, которые имеют >10% мас./мас. загрузки и <10% взрыва для объема инъекции 50-100 мкл.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Синтез пустых микросфер с помощью объемной эмульсии на основе У/Ф.

Материалы и способы

Эмульсионные системы на масляной и водной основе часто используются для синтеза полимерных микрочастиц или наночастиц, в которых гидрофобные полимерные материалы растворяются в органической фазе и диспергируются в непрерывной водной фазе. Однако для водорастворимых полимеров, т.е. ПЭГ, карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и полимеров, которые легко гидролизуются в присутствии воды, включая полиангидриды, алифатические сложные полиэфиры с короткими средними блоками, такие как полимолочная кислота и некоторые полиаминокислоты, такие как полиглутаминовая кислота, традиционные эмульсионные системы на водной основе не идеальны. Следующие примеры демонстрируют пригодность раскрытой У/Ф эмульсионной системы для получения вышеупомянутых водорастворимых или водоразлагаемых полимерных микрочастиц. В некоторых вариантах реализации изобретения эти полимеры сначала растворяют в углеводородном растворителе, включая полярные растворители, т.е. ацетонитрил, тетрагидрофуран и менее полярные растворители, например, ДХМ, хлороформ. Затем этот раствор полимера добавляют в непрерывную фазу, жидкую фторуглеродную смесь, т.е. FC-40 с ФПАВ, например, Picosurf 1. Эмульсию получают путем перемешивания, встряхивания или других способов эмульгирования. Капли эмульсии окончательно затвердевают в полимерные сферы с помощью испарения или экстракции углеводородных растворителей.

В конкретном варианте реализации изобретения для синтеза пустых ПОЭ микросфер с помощью объемной У/Ф эмульсии, как показано на **Схеме 1 (Фиг. 1А)**, к 2 мл FC-40, содержащего 0,5% мас./мас. ФПАВ Pico-Surf™ 1 (Sphere Fluidics), добавляют 200 мкл около 10%, 20%, 30% и 40% мас./мас. ПОЭ в ДХМ. Эмульгирование достигалось за счет встряхивания. Капли эмульсии были легче, чем FC-40, и плавали на поверхности раствора. Аликвоты отбирали и помещали на предметные стекла для получения микроскопических изображений. Микросферы затвердевали при перемешивании в вакууме в течение 3 часов. Затвердевшие полимерные сферы в FC-40 сначала подвергали вакуумной фильтрации через ПЭС мембрану 0,22 мкм. FC-40 проходил сквозь фильтр, а микросферы оставались. Затем микросферы промывали дополнительным FC-40 и полностью высушили под вакуумом. В другом примере с тем же способом около 30% мас./об. ПОЭ в ДХМ использовали в углеводородной фазе и около 0,01%, 0,1% и 0,5% ФПАВ в FC40 использовали во фторуглеродной фазе для оценки влияния концентрации ФПАВ.

Результаты

В присутствии ФПАВ смесь углеводородов и фторуглеродов способна образовывать У/Ф эмульсию. В одном примере ДХМ был диспергирован в FC-40 (см. структуру FC-40 на **Фиг. 1В**) в виде У/Ф эмульсий, а ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ использовался в качестве ФПАВ (см. структуру ФПАВ на **Фиг. 1С**). Во фторуглеродную фазу FC-40 добавляли ФПАВ в возрастающих концентрациях. Испытания показали, что для предотвращения слияния капель ДХМ необходимо 0,1-5% мас./мас. ФПАВ (**Фиг. 2А**). При добавлении менее 0,1% мас./мас. ФПАВ наблюдалось более широкое распределение по размерам. Если ФПАВ не использовался, капли ДХМ не были стабильными. Диспергированные капли ДХМ быстро сливались, и две фазы вскоре разделялись. Результаты показали необходимость использования достаточного количества ФПАВ для получения стабильных У/Ф эмульсий и непрерывного перемешивания в процессе отверждения для успешного получения полимерных микросфер. (**Фиг. 2В**).

Добавление ПОЭ в ДХМ и встряхивание в FC-40 приводило к образованию капель, содержащих ПОЭ. Испарение ДХМ в условиях окружающей среды в открытом контейнере или под вакуумом привело к тому, что капли затвердели в ПОЭ микросферы (**Фиг. 2А и 2В**). Размеры микросфер были связаны с размерами капель и содержанием ПОЭ в органической фазе. Более высокая концентрация ПОЭ приводила к большему размеру микросфер (**Таблица 1**).

Таблица 1. Размеры микросфер ПОЭ сфер, полученных с различными концентрациями ПОЭ в ДХМ.

Диаметр	10% мас./об. ПОЭ	20% мас./об. ПОЭ	30% мас./об. ПОЭ	40% мас./об. ПОЭ
Dv(10) (мкм)	0,9	1,3	3,1	7,1

Dv(50) (мкм)	2,7	7,2	17	34,8
Dv(90) (мкм)	6,5	13,4	30,1	67,4

Пример 2: Влияние скорости гомогенизации.

Материалы и способы

Один (1) мл 30% или 40% мас./об. ПОЭ в ДХМ добавляли к 9 мл FC-40 с 0,5% (мас./мас.) ФПАВ FC-40 и эмульгировали с помощью ручного гомогенизатора VWR 200 с зондом генератора пилообразной формы VWR 7 мм x 95 мм на одной из трех скоростей гомогенизации: низкой (около 50% полной мощности), средней (около 60% полной мощности) и высокой (около 70% полной мощности). Образовавшиеся эмульсии перемешивали в вакууме. Образовавшиеся микросферы промывали и сушили в вакууме.

Результаты

Как показано на Фиг. 3, для 30% ПОЭ низкая скорость гомогенизации давала микросферы большего размера, а высокая скорость гомогенизации давала меньшие размеры (Таблица 2). 40% ПОЭ показал ту же тенденцию. Эти результаты показывают, что регулировка скорости гомогенизации может контролировать размер микросфер.

Таблица 2. Размеры микросфер ПОЭ сфер, полученных при различных скоростях гомогенизации.

Диаметр	Низкая скорость	Средняя скорость	Высокая скорость
Dv(10) (мкм)	2,8	2,0	1,1
Dv(50) (мкм)	16,1	13,5	5,4
Dv(90) (мкм)	31,5	31,6	12,0

Пример 3: Общие процедуры инкапсуляции белка ВРБ в ПОЭ микросферы способом объемной эмульсии на основе Т/У/Ф.

Материалы и способы

Как изображено на Фиг. 4, объемный эмульсионный синтез можно разделить на три этапа: составление, эмульгирование, отверждение. Свойства продукта будут разными, поскольку на этих трех этапах используются разные параметры. Общие процедуры описаны ниже:

Для составления 10%-30% мас./мас. от общей твердой массы ВРБ Тгар ФРСЭ (или ВРБ с флуоресцентной меткой (Ф-ВРБ) для флуоресцентной визуализации) диспергировали в 500 мкл этилацетата, содержащего 10-35% мас./об. ПОЭ, путем встряхивания и последующей обработки ультразвуком в течение 5 мин. Затем эти суспензии добавляли в 9,5 мл FC-40 с 0,1-0,5% мас./мас. ФПАВ. Эмульгирование может быть достигнуто путем перемешивания, встряхивания или гомогенизации с

использованием настольного гомогенизатора. Структуры эмульсий изображены на Фиг. 5. Сразу после эмульгирования аликвоты отбирали в процессе и помещали на предметные стекла для получения микроскопических изображений. Капли затвердевали на предметном стекле за счет испарения в условиях окружающей среды. Для отверждения микросфер применяли один из трех способов: (а) перемешивание раствора при комнатной температуре в течение ночи в открытом контейнере и выпаривание этилацетата; (б) перемешивание раствора в вакууме в течение по меньшей мере 2 часов для более быстрого испарения растворителя; (в) добавление NOVEC 7500 или смеси FC-40 и NOVEC 7500 в эмульсию при перемешивании. ГФЭ действует как соразтворитель, который помогает экстрагировать этилацетат из углеводородной фазы во фторуглеродную фазу и обеспечивает быстрый процесс отверждения (обычно в течение нескольких минут).

Наконец, затвердевшие полимерные сферы в FC-40 сначала подвергали вакуумной фильтрации через ПЭС мембрану 0,22 мкм. FC-40 проходил сквозь фильтр, а микросферы оставались. Затем микросферы промывали дополнительным FC-40 и полностью высушили под вакуумом.

Размеры микросфер измеряли методом лазерной дифракции на приборе Malvern Mastersizer 3000 с отбором проб жидкости путем диспергирования порошка продукта в 0,01% мас./об. раствора ПВС. Морфологию продукта измеряли с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Для измерения содержания белка в микросферах предварительно определенное количество микросфер сначала растворяли в 200 мкл этилацетата, а затем экстрагировали 1 л чистой воды, водную фазу собирали и центрифугировали для удаления мутной суспензии. Чистоту и концентрацию белка измеряли с помощью Э-СЭЖХ.

Для измерения взрывного высвобождения предварительно определенное количество микросфер инкубировали в 1 мл ФСБ при 37 °C в течение 1 часа. Смесь центрифугировали и супернатант подвергали Э-СЭЖХ для концентрации белка.

Результаты

Приведенные выше результаты показали образование стабильной У/Ф эмульсии в присутствии достаточного количества ФПАВ. Эта неводная эмульсия может успешно производить пустые ПОЭ сферы. Этот безводный способ был снова использован для включения ВРБ в ПОЭ микросферы. В одном примере Ф-ВРБ Тгар ФРСЭ в количестве 10% мас./мас. от общей твердой массы вводили в этилацетат (включая 20% мас./об. ПОЭ) в виде суспензии, и эту суспензию в FC-40 (содержащую 0,5 мас. % ФПАВ) эмульгировали при перемешивании и встряхивании. Сразу после эмульгирования аликвоты переносили на предметные стекла для получения микроскопических изображений. Как изображено на **Фиг. 6А и 6В**, этилацетат диспергирован в капли в FC-40, а частицы ВРБ четко заключены внутри капель этилацетата. В отличие от системы Т/М/В (данные не изображены), не было никаких признаков просачивания белка в непрерывную фторуглеродную фазу. Важно отметить, что в этой У/Ф системе частица ВРБ в капле сохраняла свою первоначальную ямчатую форму в порошкообразном

состоянии. Поскольку в У/Ф системе не было воды для восстановления ВРБ, то, таким образом, ВРБ оставался в исходной форме твердых частиц. После отверждения ПОЭ микросферы, содержащие одну или множество ВРБ частиц, можно четко наблюдать на изображениях при светлопольном освещении и флуоресцентного микроскопа (**Фиг. 7А, 7В и 7С**). После выпаривания углеводородных и фторуглеродных растворителей на предметных стеклах добавляли воду для проверки взрывного высвобождения и качества инкапсуляции. Как изображено на **Фиг. 8А-Д**, после помещения продукта в виде микросфер в воду ВРБ-инкапсулированные ПОЭ микросферы сохраняли свою целостность. Немедленного высвобождения белка не наблюдалось, а форма ВРБ частиц оставалась прежней, что указывало на то, что ВРБ частицы были хорошо защищены полимерной матрицей и экранированы от водной среды. Эти результаты свидетельствуют о том, что У/Ф эмульсия является эффективным решением для инкапсуляции белков и других гидрофильных лекарственных средств в полимерные матрицы и обладает потенциалом для достижения высокой эффективности инкапсуляции, высокого выхода при минимизации взрывного высвобождения - все это является серьезной проблемой при использовании способов В/М/В или Т/М/В на водной основе.

Раскрытые в данном документе процедуры являются примерами использования способа объемной эмульсии на основе неводных Т/У/Ф для инкапсуляции ВРБ белка в ПОЭ микросферы. Способ является воспроизводимым, масштабируемым и настраиваемым. Изменяя параметры состава и способа, можно настраивать и контролировать свойства продукта. Влияние некоторых из этих параметров раскрыто в Примерах 4.

Пример 4: Влияние углеводородных растворителей

Материалы и способы

Микрочастицы были получены, как описано в Примере 2, с использованием дихлорметана или этилацетата в качестве углеводорода. Были приготовлены 35% мас./об. ПОЭ в ДХМ и 35% мас./об. ПОЭ в этилацетате. Десять процентов (10%) мас./мас. от общей твердой массы белкового порошка суспендировали в 0,5 мл раствора ПОЭ в ДХМ или в этилацетате. Эти суспензии переносили в 9,5 мл FC-40, содержащего 0,5% по массе ФПАВ в сцинтилляционном флаконе на 20 мл. Эти смеси гомогенизировали для получения эмульсии и перемешивали в условиях домашнего вакуума в течение 1,5 часов. Образовавшиеся микросферы выделяли фильтрованием, промывали FC-40 и сушили в вакууме.

Результаты

На **Фиг. 9** изображено распределение по размерам микрочастиц, полученных с использованием того же состава и условий способа, за исключением типа углеводородного растворителя - либо дихлорметана, либо этилацетата. Микрочастицы, полученные с использованием любого из углеводородов, демонстрируют инкапсуляцию высушенного распылением белка. Использование дихлорметана приводит к образованию более крупных микрочастиц. См. Таблицу 2 ниже. Результаты показали, что при

одинаковом составе и условиях способа использования разных углеводородных растворителей дает микросферы разных размеров. ДХМ давал микросферы большего размера, чем этилацетат. Таким образом, углеводородный растворитель может быть выбран специально для контроля размера микросфер.

Таблица 3. Размеры микрочастиц наполненных ВРБ ПОЭ сфер, полученных с использованием ДХМ или этилацетата.

Диаметр	ДХМ	ЭтАц
Dv(10) (мкм)	5,2	3,2
Dv(50) (мкм)	30,7	21,2
Dv(90) (мкм)	64,9	42,3

Пример 5: Влияние количества белковой загрузки

Материалы и способы

Микрочастицы были получены, как описано в Примере 2, с изменением только количества загружаемого белка. Было приготовлено тридцать пять процентов (35%) мас./об. ПОЭ в ДХМ. 5%, 10% и 30% мас./мас. от общей твердой массы белкового порошка суспендировали в 0,5 мл раствора ПОЭ в ДХМ. Эти суспензии переносили в 9,5 мл FC-40, содержащего 0,5% по массе ФПАВ в сцинтилляционном флаконе на 20 мл. Эти смеси гомогенизировали в течение около 1 минуты для получения эмульсии, а затем в течение одной минуты в эмульсию добавляли 6 мл смеси Novex 7500 и FC-40 в соотношении 1:1 об./об. Затем после перемешивания в течение еще минуты образовавшиеся микросферы выделяли фильтрованием, промывали FC-40 и сушили под вакуумом.

Результаты

Как приведено в Таблице 3, увеличение количества белкового порошка в составе приводило к увеличению размера ПОЭ микрочастиц, измеренному с помощью анализа лазерной дифракции, а также приводило к увеличению содержания белка в конечных продуктах из ПОЭ микросфер, что наблюдалось с помощью эксперимента по экстракции белка, светлостойкой и конфокальной флуоресцентной микроскопии. На изображениях в светлом поле для загрузки 30% мас./мас. белкового порошка показаны более темные и менее прозрачные микросферы, чем при 10% мас./мас. белкового порошка, что указывает на то, что в продукте из микросфер было инкапсулировано больше лекарственного средства (Фиг. 10А и 10В). Репрезентативные конфокальные изображения из поперечных сечений микросфер подтвердили, что ВРБ был инкапсулирован в ПОЭ матрице в своей исходной форме (Фиг. 11А и 11В). Больше ВРБ частиц наблюдалось в микросферах с 30% мас./мас. Опять же, инкапсулированные ВРБ сохранили свою первоначальную ямочную форму, что указывает на то, что они были неповрежденными в течение всего процесса изготовления. Кроме того, изображения СЭМ продемонстрировали, что увеличение

загрузки белкового порошка приводило к увеличению количества белковых частиц, адсорбированных на поверхности ПОЭ микрочастиц (Фиг. 12А-12С). Таким образом, результаты показали, что до 30% белкового порошка может быть эффективно инкапсулировано внутри микросферы. Частицы белка могут адсорбироваться на поверхности микросферы при >30% мас./мас. загрузки белковым порошком из-за возможной нехватки физического пространства внутри микросферы в этом составе. Белок, адсорбированный на поверхности, может вызвать взрывное высвобождение лекарственного средства при контакте с водой, если такой эффект желателен для терапевтической эффективности. Белок не теряется в непрерывной фазе, как можно было бы ожидать в эмульсионной системе на водной основе.

Таблица 4. Размеры микрочастиц загруженных ВРБ ПОЭ сфер, полученных с различной загрузкой ВРБ.

Диаметр	5%	10%	30%
Dv(10) (мкм)	4,9	5,2	17,1
Dv(50) (мкм)	20,6	30,7	40,7
Dv(90) (мкм)	43,0	64,9	81,3

Пример 6: План экспериментов (ПЭ) по инкапсуляции ВРБ в ПОЭ микросферы с использованием объемного У/Ф эмульгирования.

Материалы и способы

Было проведено исследование с ПЭ для оценки влияния критических факторов синтеза в проектируемом пространстве на свойства конечных продуктов. Десять прогонов запланированного эксперимента были выполнены в соответствии с общей процедурой, описанной в Примере 2. Загрузка белкового порошка, размер частиц белкового порошка (размеры Dv (50) составляют 2,2 мкм и 5,6 мкм, см. изображения СЭМ на Фиг. 13), концентрация полимера и концентрация ГФЭ варьировались, в то время как следующий состав и условия способа оставались постоянными, например: объем углеводородной и фторуглеродной фаз, скорость гомогенизации, концентрация ФПАВ (**Таблица 4**). Измеренные отклики, включая размеры микросфер (Dv50, размах с помощью лазерной дифракции), эффективность инкапсуляции, взрывное высвобождение через 1 час при 37 °С, изображения СЭМ.

Результаты

Результаты по ПЭ обобщены в Таблице 5.

Таблица 5. План эксперимента и измеренные отклики в исследовании с ПЭ по инкапсуляции ВРБ.

План эксперимента	Измеренные отклики
-------------------	--------------------

№ прогона	Целевая загрузка белкового порошка (%)	[ПОЭ] (%; мас./об.)	[ГФЭ] (%; мас./об.)	Размер белковых частиц (DV50; мкм)	Размер микросфер (DV50, мкм)	Размах	Загрузка ВРБ продукта (%)*	Взрывное** высвобождение белка (%)
1	25	25	25	5,6	23,3	1,2	25,3	103
2	25	35	25	2,2	27,4	1,4	26,7	99
3	5	35	25	2,2	20,6	1,8	6,1	10
4	5	25	25	5,6	17,9	1,48	5,3	29
5	15	25	25	2,2	18,1	1,50	15,4	52
6	5	35	35	5,6	21,6	1,74	3,9	15
7	5	25	35	2,2	19,4	1,55	4,1	9
8	15	35	35	5,6	25,3	1,39	13,8	78
9	25	25	35	2,2	21,5	1,30	20,8	116
10	25	35	35	5,6	35,2	1,517	23,8	91

* Микросферы растворяли в этилацетате, белок экстрагировали водой и количественно определяли с помощью Э-СЭЖХ.

** Микросферы инкубировали в ФСБ при 37 °С в течение 1 часа. Высвобожденный белок количественно определяли с помощью Э-СЭЖХ.

Специально разработанная подгонка ПЭ к размеру микросфер (с $R^2=0,76$) выявила основные эффекты загрузки белкового порошка и концентрации ПОЭ (со значением $p < 0,05$, см. результаты корреляции в **Таблице 6**). Кроме того, подгонка по взрывному высвобождению ($R^2=0,92$) показывает, что только загрузка белковым порошком значительно влияет на взрывное высвобождение (при значении $p < 0,05$, см. результаты корреляции в **Таблице 7**). Результаты показывают, что увеличение количества белкового порошка в составе приведет к увеличению полезной загрузки в конечном продукте, но также повысит процент взрывного высвобождения. Взрывное высвобождение, вероятно, вызвано адсорбированными на поверхности белковыми частицами. Максимальное количество белкового порошка, поглощенного полимерной микросферой, определяется физическим пространством для данного размера микросферы. Простое увеличение концентрации белкового порошка в суспензии состава не приведет к увеличению инкапсуляции лекарственного средства сверх определенного порога, который в этом примере составлял около 30% мас./мас.

Таблица 6. Корреляции факторов с размером микросфер.

Показатель	Оценка	Стандартная погрешность	Отношение t	Prob> t	VIF
Отрезок	23,03	0,924421	24,91	<,0001*	.
Загрузка ВРБ (%) (5,25)	3,4875	1,033534	3,37	0,0118*	1
[Полимер] (%;мас./об.) (25,35)	2,99	0,924421	3,23	0,0144*	1

Таблица 7. Положительная корреляция загрузки ВРБ с взрывным высвобождением.

Показатель	Оценка	Стандартная погрешность	Отношение t	Prob> t	VIF
Отрезок	63,19048 4	4,008836	15,76	<,0001*	.
Загрузка ВРБ (%) (5,25)	43,17019	4,482105	9,63	<,0001*	1

Пример 7. Применение способа инкапсуляции на основе эмульсии Т/У/Ф к различным белкам.

Раскрытая эмульсионная система и способ на основе У/Ф могут быть базовой технологией, применимой для различных полимеров и терапевтических белков. В конкретном примере изобретения белковый порошок рекомбинантного IgG4 (ММ ~145 кДа), белковый порошок рекомбинантного IgG1 (ММ ~146 кДа) или белковый порошок рекомбинантного слитого белка (ММ ~64 кДа) инкапсулировали в ПОЭ микросферы, соответственно, посредством того же способа, что и в Примере 2. Результаты обобщены в Таблице 7. Количество инкапсулированного белкового порошка в продукте из микросфер определяли с помощью анализа экстракции и соотносили с целевым значением. Чистота белка, сохраняющаяся для рекомбинантного слитого белка IgG1 или несколько сниженная для IgG4 (менее 2%) после процесса инкапсуляции, указывает на хорошую совместимость способа.

Таблица 7. Результаты по ВРБ с различными типами белков, инкапсулированных в ПОЭ микросферы с помощью эмульсий Т/У/Ф.

Тип белка	Чистота белка в ВРБ по Э-СЭЖХ	Целевая загрузка твердых веществ в составе, % мас./мас.	Инкапсулированный белковый порошок, % мас./мас., по результатам экстракции	Инкапсулированный белок % мас./мас.*	Процент взрывного высвобождения белка**	Чистота инкапсулированного белка по Э-СЭЖХ
Рекомбинантный слитый белок	97,8%	15	13,7	8,6	0,44	98,2%
IgG4:	99,4%	15	15,0	12,0	0,24	97,6%
IgG1:	98,4%	15	16,5	11,7	0,22	98,9%
IgG1 (альтернативный состав)	96,8%	15	13,7	8,9	0,44	97,4%

* Микросферы растворяли в этилацетате, белок экстрагировали водой и количественно определяли с помощью Э-СЭЖХ.

** Микросферы инкубировали в ФСБ при 37 °С в течение 1 часа. Высвобожденный белок количественно определяли с помощью Э-СЭЖХ.

Другие биоразлагаемые полимеры, например, ПМГК и ПМК также используются в эмульсиях на основе У/Ф. В конкретном примере изобретения с помощью способа, аналогичного описанному в Примере 2, Ф-ВРБ Трар ФРСЭ с флуоресцентной меткой инкапсулировали в ПМГК (лактид:гликолид 50:50, Mw 42-65 кДа, Sigma Aldrich) и ПМК (эфир с концевой алкильной группой, Mw 18000-28000, Sigma Aldrich) микросферы, соответственно. Изображения при светлопольном освещении и изображения флуоресцентного микроскопа показали, что белковый порошок был успешно инкапсулирован внутри полимерных микросфер (Фиг. 14А-С для ПМК и Фиг.15А-В для ПМГК).

Хотя в предшествующем описании это изобретение было описано в отношении определенных вариантов его реализации, и многие детали были представлены в целях иллюстрации, специалистам в данной области техники будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты реализации и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть значительно изменены без отклонения от основных принципов изобретения.

Все ссылки, цитируемые в данном документе, полностью включены в качестве ссылки. Данное изобретение может быть реализовано в других конкретных формах, не отступая от его сущности или существенных признаков, и, соответственно, ссылка должна быть сделана на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как указывающее объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения полимерных или покрытых полимером микрочастиц, включающий:

объединение белкового порошка и полимера в углеводородном растворителе с образованием неводного первого раствора;

добавление первого раствора ко второму раствору, при этом второй раствор содержит фторуглеродную жидкость и фторсодержащее поверхностно-активное вещество;

перемешивание объединенных растворов с образованием неводной эмульсии, содержащей множество капель углеводородной эмульсии во фторуглеродной жидкости;

удаление углеводородного растворителя; и

удаление фторуглеродной жидкости для выделения микрочастиц, при этом микрочастицы содержат белок, инкапсулированный в матрице полимера.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что микрочастицы содержат единую структуру ядро-оболочка.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна микрочастица содержит множество ядер, диспергированных в полимере.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что микрочастицы содержат микрочастицы, содержащие комбинацию одноядерных структур, инкапсулированных полимером, и микрочастиц, содержащих многоядерные структуры, инкапсулированные полимером.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что фторуглеродная жидкость содержит перфторсодержащее C5-C18-соединение.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что углеводородный раствор выбирают из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что фторуглеродный раствор содержит Fluorinert™ FC-40 (средняя ММ=650 г/моль) 1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафтор-N, N-бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)бутан-1-амин.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что углеводородный растворитель содержит дихлорметан, этилацетат или их комбинацию.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что фторуглеродный раствор содержит гидрофторэфир.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что фторсодержащее поверхностно-активное вещество включает перфторполиэфир-b-полиэтиленгликоль-b-перфторполиэфир.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что полимер содержит полиортоэфир (ПОЭ).

12. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что полимер выбирают из группы, состоящей из полимолочной кислоты и поли(молочной-со-гликолевой кислоты).

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок, рекомбинантный белок или его фрагмент или укороченную версию.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что белок представляет собой белок Trap ФРСЭ.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что белок представляет собой укороченную форму белка Trap ФРСЭ.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что микрочастицы имеют диаметр от 1 до 200 мкм.

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что белковый порошок содержит частицы микронизированного белка диаметром от 0,5 до 20 мкм.

18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что белковый порошок микронизируют с помощью сушки распылением, сушки электрораспылением, обратимого осаждения, лиофилизации, микротемплатирования или их комбинации.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что эмульсию получают с использованием гомогенизации, встряхивания, обработки ультразвуком, кавитации, перемешивания или их комбинации.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что углеводородный растворитель удаляют при перемешивании объединенных растворов.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что углеводородный растворитель удаляют в вакууме для отверждения микрочастиц.

22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что углеводородный растворитель удаляют выпариванием.

23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что фторуглеродную жидкость удаляют фильтрацией, необязательно под вакуумом.

24. Способ по любому из пп. 22-23, отличающийся тем, что гидрофторэфир используют в качестве соразтворителя для экстракции углеводорода.

25. Микрочастицы, полученные способом по любому из пп. 1-23, отличающиеся тем, что микрочастицы представляют собой микрочастицы с длительным высвобождением.

26. Композиция с длительным высвобождением, содержащая микрочастицы по п. 25.

27. Микрочастицы по любому из пп. 1-26, отличающиеся тем, что микрочастицы имеют небольшое количество пор или каналов в полимерной оболочке или совсем не имеют их.

28. Способ получения полимерных или покрытых полимером микрочастиц, включающий:

объединение

(1) дисперсной фазы, содержащей от 1,0 до 30,0% мас./мас. общего количества твердого высушенного распылением белка, суспендированного в углеводородном растворе, при этом углеводородный раствор содержит от 5,0 до 35% мас./об. ПОЭ, в

(2) непрерывной фазе для образования капель эмульсии дисперсной фазы, при этом непрерывная фаза содержит фторуглеродный раствор, содержащий от 0,1 до 5,0% мас./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества;

отверждение капель эмульсии путем удаления углеводородных жидкостей с образованием отвержденных полимерных или покрытых полимером микросфер.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что неводную эмульсию перемешивают, а углеводородный раствор удаляют выпариванием при атмосферном давлении окружающей среды или под вакуумом при перемешивании.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что отвержденные полимерные или покрытые полимером микросферы собирают вакуумной фильтрацией.

31. Способ получения полимерных или покрытых полимером микрочастиц, включающий:

объединение углеводородного раствора, содержащего растворенный полимер и высушенный распылением белковый порошок, для получения дисперсной фазы;

объединение дисперсной фазы с непрерывной фазой для получения капель эмульсии дисперсной фазы в непрерывной фазе, при этом непрерывная фаза содержит фторуглеродную жидкость и от 0,1 до 5,0% мас./об. фторсодержащего поверхностно-активного вещества, и

сбор покрытых полимером микрочастиц.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что высушенный распылением белок представляет собой антитело, рекомбинантный белок, слитый белок или его фрагмент.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что белок представляет собой белок Trap ФРСЭ или укороченный белок Trap ФРСЭ.

34. Способ по п. 31, отличающийся тем, что углеводородный раствор выбирают из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана или их комбинации.

35. Способ по любому из пп. 31-34, отличающийся тем, что фторуглеродная жидкость содержит (трифторметил)бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)амин.

36. Способ по любому из пп. 31-35, отличающийся тем, что микрочастицы отверждают путем удаления углеводородного раствора при перемешивании путем выпаривания или под вакуумом.

37. Способ по п. 36, дополнительно включающий сбор отвержденных микрочастиц.

38. Микрочастицы, полученные любым из способов по пп. 31-37.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая микрочастицы по п. 38.

40. Фармацевтическая композиция по п. 39, дополнительно содержащая одно или более вспомогательных веществ.

41. Фармацевтическая композиция по п. 40, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция представляет собой композицию с длительным высвобождением.

42. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 39-41, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция составлена для парентерального введения.

43. Способ по любому из пп. 1-42, отличающийся тем, что фармацевтические композиции содержат более 100 мг высушенного распылением белка.

44. Способ по п. 9, отличающийся тем, что гидрофторэфир включает 4-этокси-1,1,1,2,2,3,3,4,5,6,6,6-дидекафтор-5-(трифторметил)гексан.

45. Способ получения микрочастиц включающий:

объединение первого раствора, содержащего полимер в углеводородном растворителе, со вторым раствором, содержащим фторуглеродный растворитель и фторсодержащее поверхностно-активное вещество;

перемешивание объединенных растворов для получения эмульсии;

удаление углеводородного растворителя под вакуумом при перемешивании объединенных растворов для отверждения микрочастиц;

сбор микрочастиц;

необязательное промывание микрочастиц;

и сушку микрочастиц.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что углеводородный растворитель выбран из группы, состоящей из дихлорметана, хлороформа, толуола, этилацетата, тетрагидрофурана, ацетонитрила, этанола, метанола, пропанола, диметилформамида, диметилсульфоксида или их комбинации.

47. Способ по любому из пп. 45 или 46, отличающийся тем, что фторуглеродный растворитель содержит (трифторметил)бис(1,1,2,2,3,3,4,4,4-нонафторбутил)амин.

48. Способ по любому из пп. 45-47, отличающийся тем, что полимер содержит ПОЭ, полимолочную кислоту, поли(молочную-со-гликолевую кислоту) или их комбинацию.

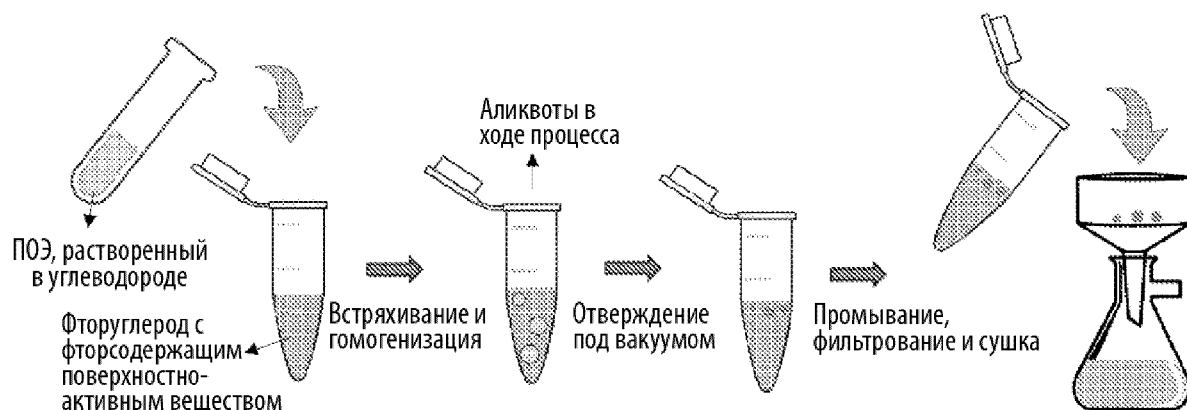
49. Способ по любому из пп. 45-49, отличающийся тем, что микрочастицы содержат полимерную оболочку и полое ядро.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что микрочастицы имеют небольшое количество пор или каналов в полимерной оболочке или совсем не имеют их.

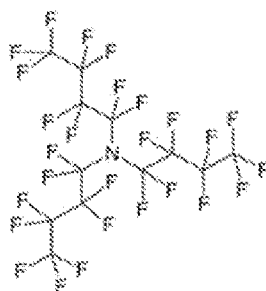
51. Способ по любому из пп. 50-51, отличающийся тем, что диаметр микрочастиц доводят до целевого диаметра путем изменения углеводородного растворителя, скорости перемешивания, концентрации полимера или их комбинации.

52. Микрочастицы по любому из пп. 45-51.

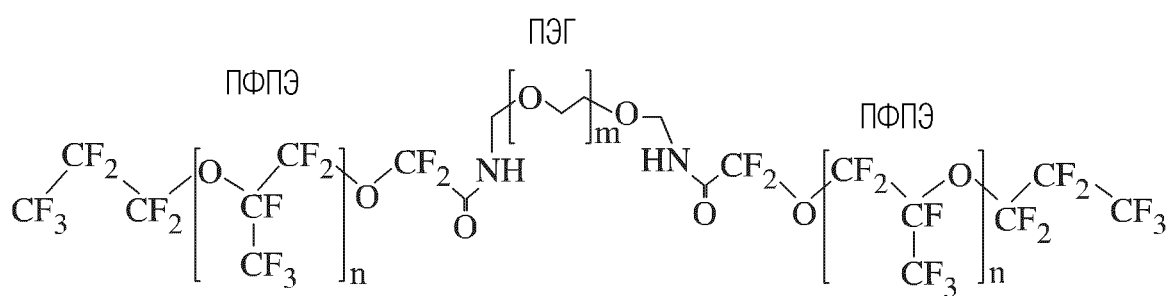
По доверенности



Фиг. 1А

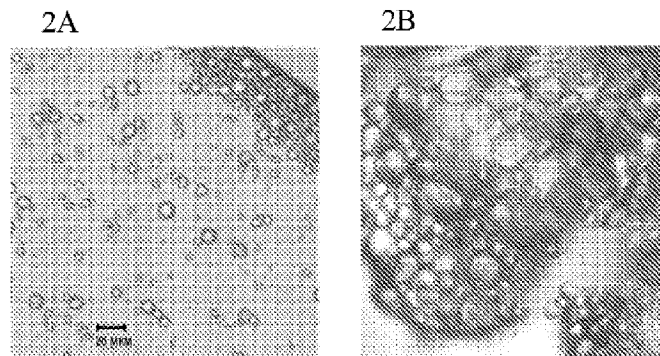


Фиг. 1В

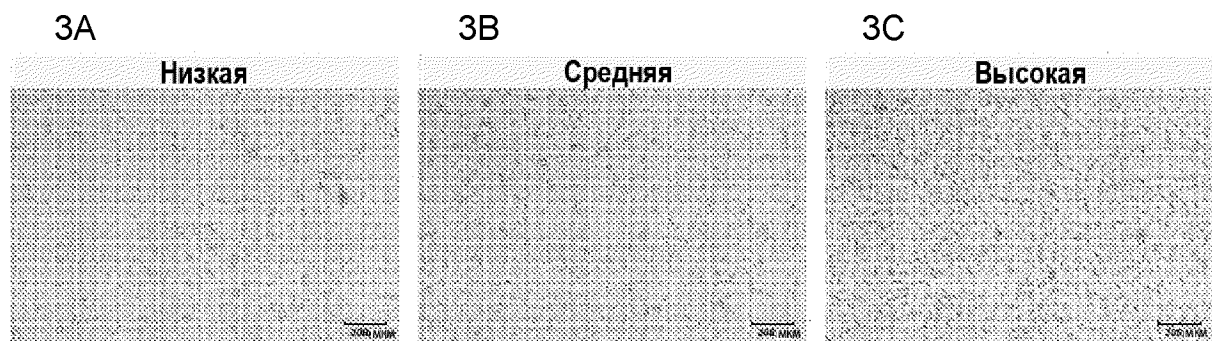


Pico-surf 1 (ПФПЭ-ПЭГ-ПФПЭ)

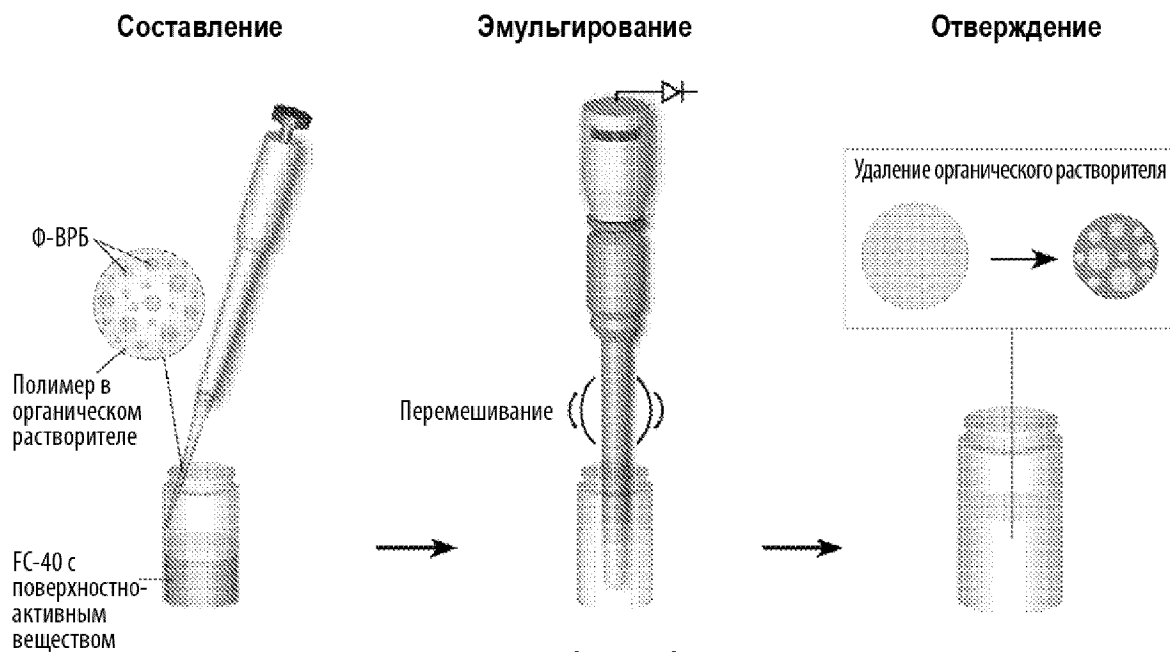
Фиг. 1С



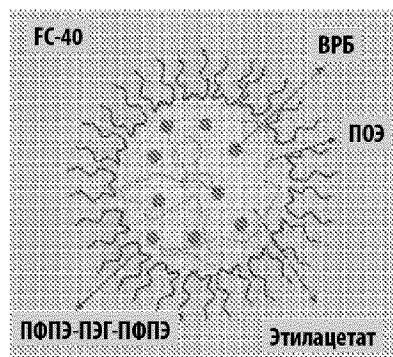
Фиг. 2А-2В



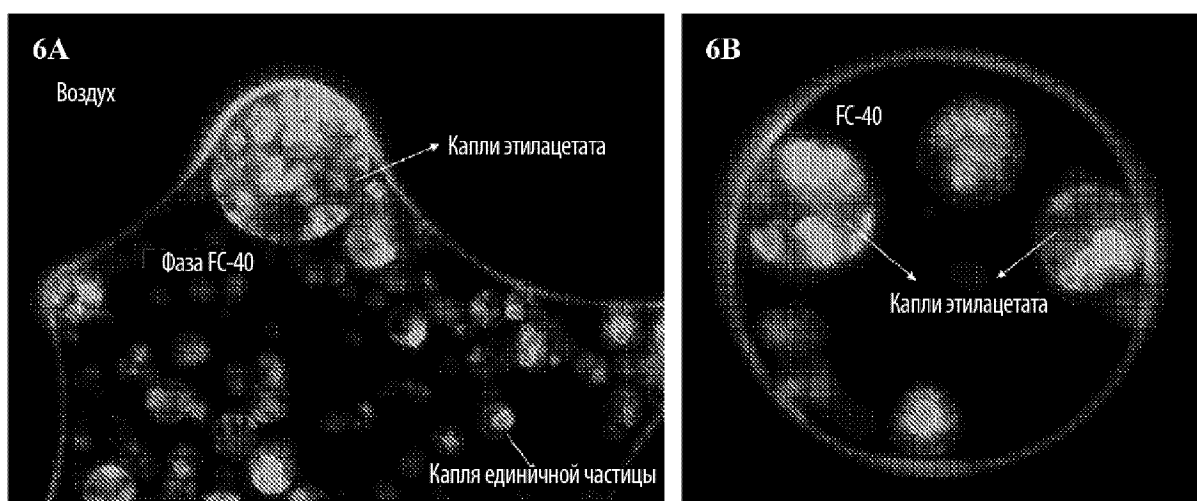
Фиг. 3А-3С



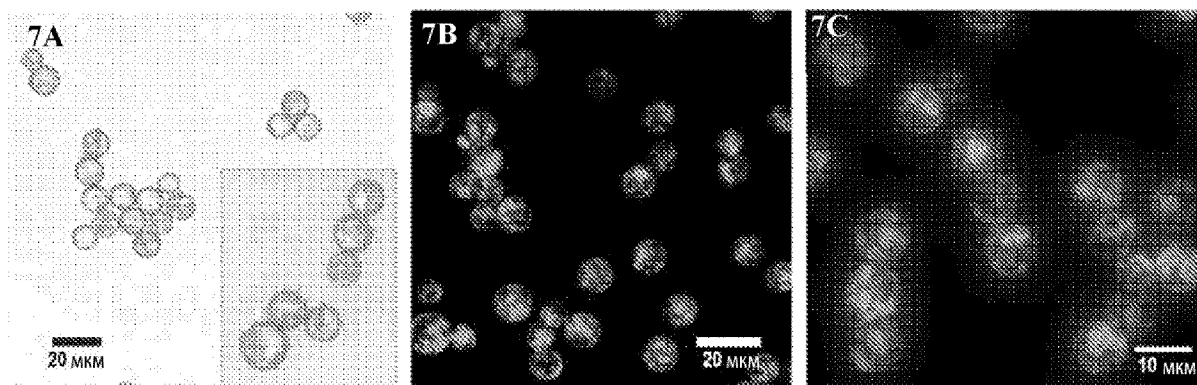
Фиг. 4



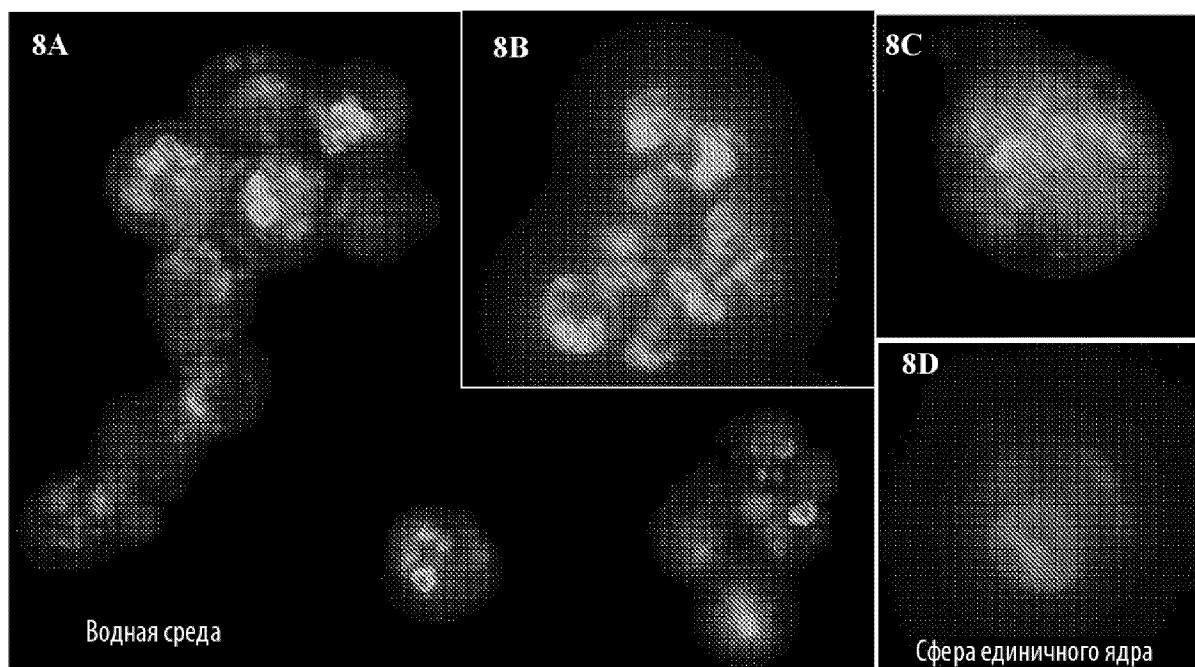
Фиг. 5



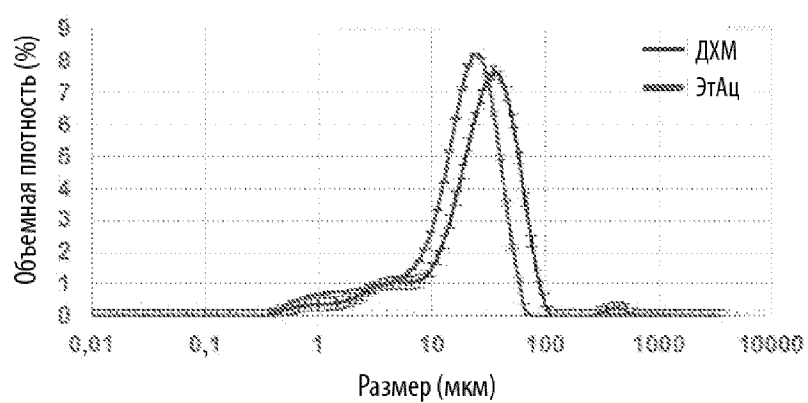
Фиг. 6A-6B



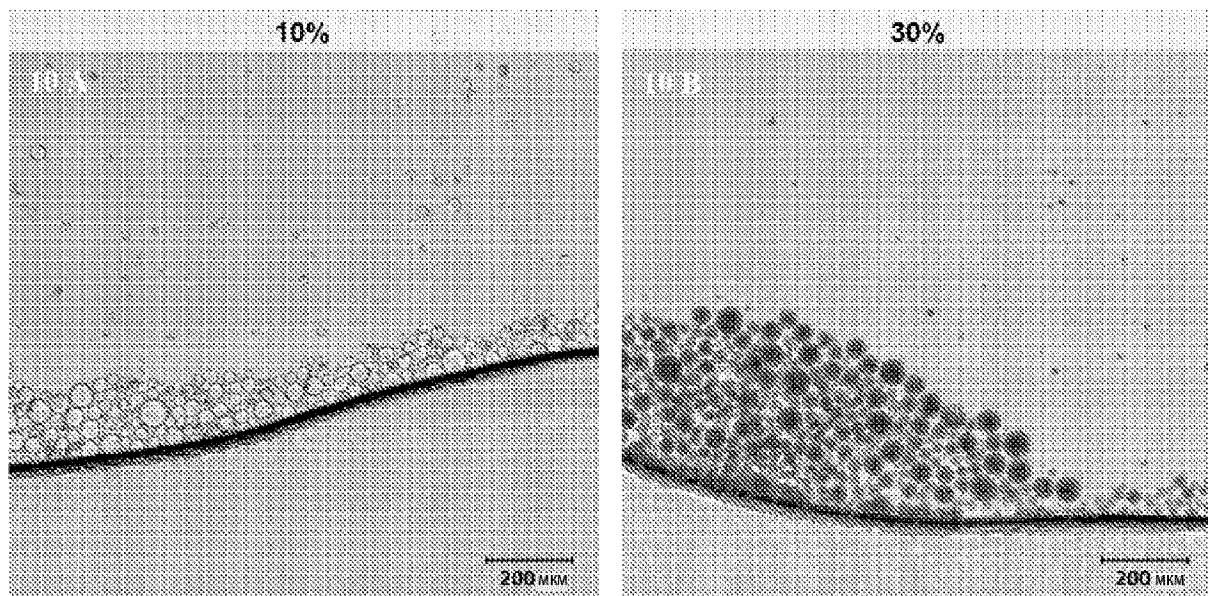
Фиг. 7A-6C



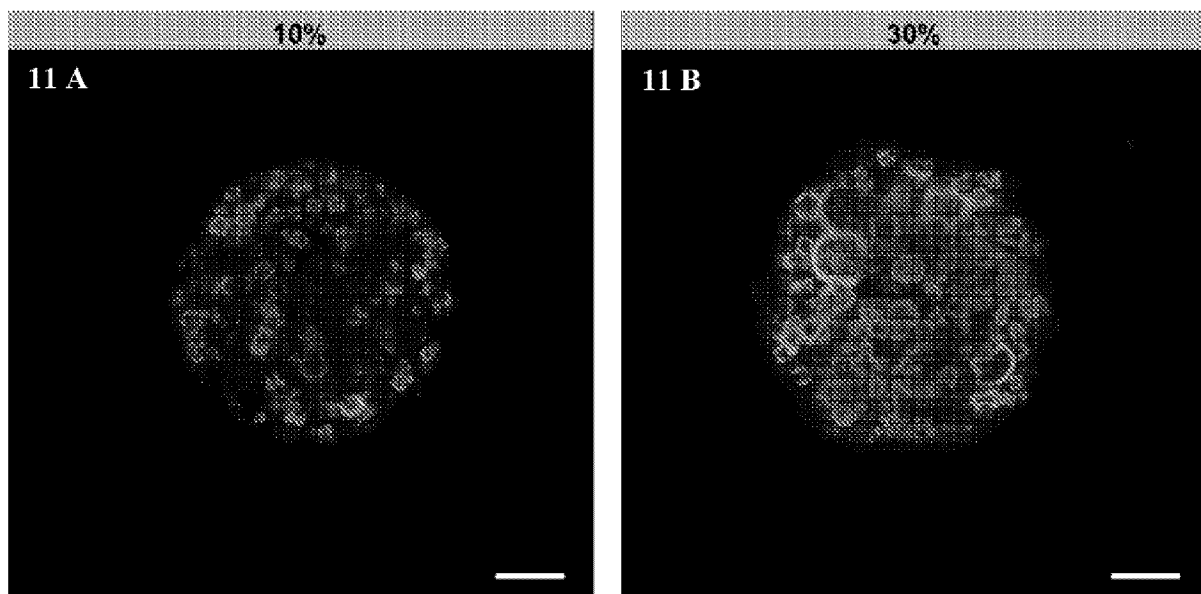
Фиг. 8A-D



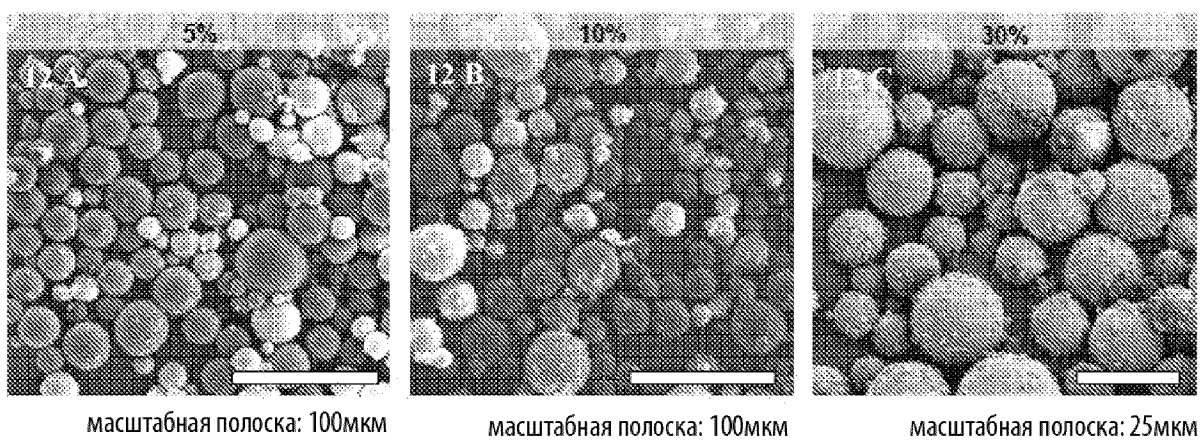
Фиг. 9



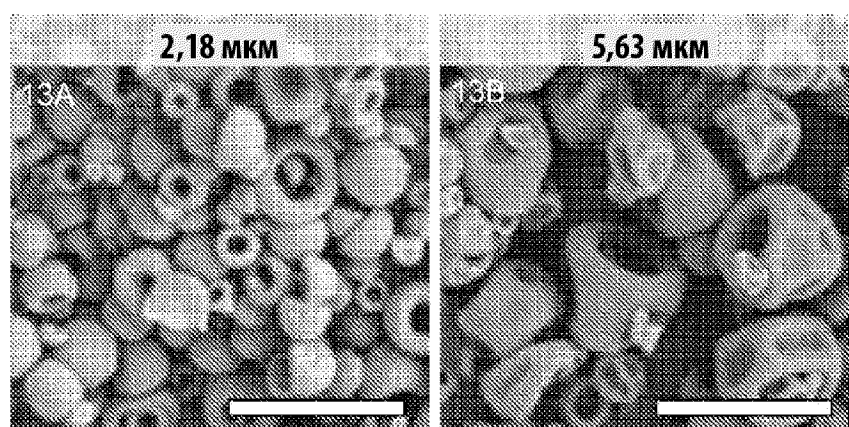
Фиг. 10А и 10В



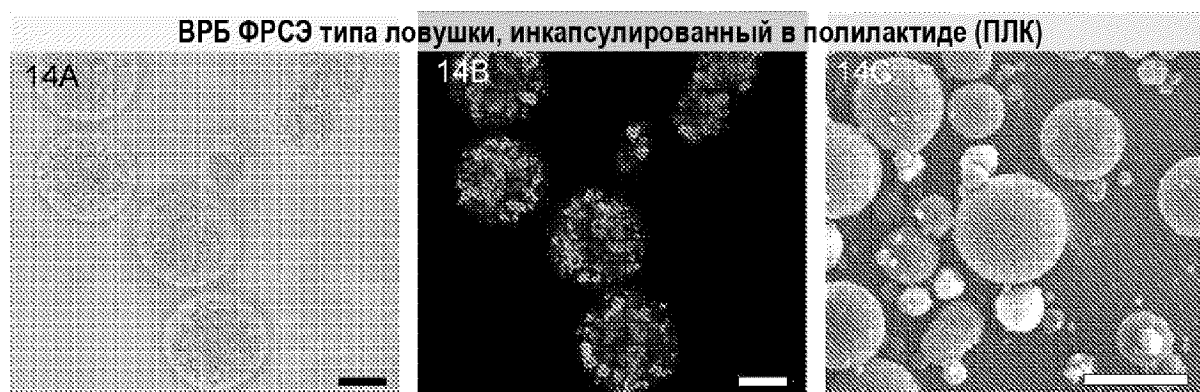
Фиг. 11А и 11В



Фиг. 12А, 12В и 12С

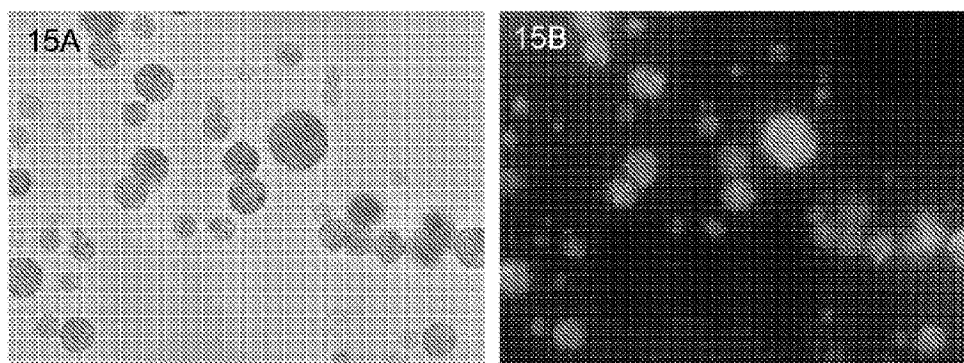


Фиг. 13А и 13В



масштабная полоска: слева, посередине: 20 мкм / справа: 50 мкм

Фиг. 14



Фиг. 15