

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292695** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.02.14

(51) Int. Cl. *A61K 39/215* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.22

(54) **УСТРОЙСТВА ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ АКТИВНОГО АГЕНТА,
СОДЕРЖАЩИЕ ПОКРЫТЫЕ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА
МИКРОВЫСТУПЫ**

(31) 63/013,809

(72) Изобретатель:

(32) 2020.04.22

Амери Махмуд, Льюис Хэйли (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2021/028715

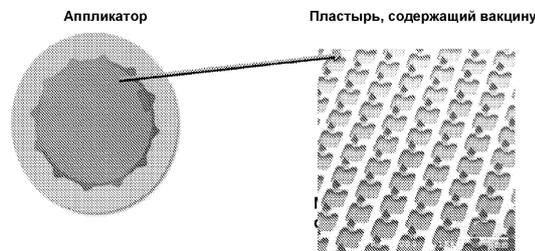
Нилова М.И. (RU)

(87) WO 2021/216925 2021.10.28

(71) Заявитель:

**ЭМЕРДЖЕКС ЮЭСЭЙ
КОРПОРЕЙШН (US)**

(57) В изобретении описаны системы и способы для трансдермальной или внутрикожной доставки вакцин, более конкретно доставки вакцин, обеспечивающих продукцию специфичных в отношении коронавируса или другого вируса антител в сыворотке вакцинированных млекопитающих, в частности, для предотвращения COVID-19.



202292695
A1

202292695
A1

УСТРОЙСТВА ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ АКТИВНОГО АГЕНТА, СОДЕРЖАЩИЕ ПОКРЫТЫЕ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА МИКРОВЫСТУПЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/013 809, поданной 22 апреля 2020 г., которая включена в настоящую заявку посредством ссылки в полной мере, допускаемой законом.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к области трансдермальной (чрескожной) или внутрикожной доставки вакцин, более конкретно, к доставке вакцин, приводящей к продукции специфических в отношении коронавируса или другого вируса антител в сыворотке вакцинированных млекопитающих.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Вакцина против гриппа представляет собой вакцину для ежегодной вакцинации, которая защищает людей от заболевания гриппом – вирусным респираторным заболеванием, которое легко распространяется. Вакцину против гриппа обычно вводят с использованием инъекции или интраназального спрея. В условиях недавней пандемии коронавируса ученые активно исследуют вакцины для предотвращения COVID-19. В ряде работ описаны серьезные угрозы общественному здоровью, вызванные COVID-19, и доступные на сегодняшний день варианты лечения. См., например, Kalorama Information, “COVID-19 Update: Molecular Diagnostics, Immunoassays, Vaccines, Telehealth and Other Areas” (7 апреля 2020 г.).

[0004] Среди таких вариантов лечения растворимые матрицы с микроиглами используются для доставки рекомбинантных вакцин против коронавируса. См., например, E. Kim *et al.*, *Microneedle array delivered recombinant coronavirus vaccines: Immunogenicity and rapid translational development*, EBioMedicine (2020), <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102743>. Однако такие растворимые микроиглы имеют ряд недостатков, включая низкую механическую прочность и их отламывание, а также склонность к потере остроты вершины из-за ограничений процесса формовки. Кроме того, такие растворимые микроиглы характеризуются большей толщиной (например, 500 микрометров или более), что усложняет их приспособление к поверхностям кожи пациентов. Кроме того, такой процесс изготовления в лабораторных масштабах нельзя перенести на крупномасштабное производство, которое является намного более сложным, в частности, с точки зрения обеспечения и контроля качества процесса и продукта.

[0005] Таким образом, в данной области техники существует потребность в эффективном способе введения вакцины путем трансдермальной доставки, при котором пластырь можно аккуратно и ровно наносить (прикладывать) без создания проблем, связанных с остатками препарата вакцины на матрице, или проблем, связанных с недостатками процесса изготовления, таких как неравномерное нанесение препарата на матрицу или сложность с приклеиванием препарата к пластырю. Много попыток было предпринято для применения трансдермального пластыря с микроиглами для эффективной доставки биоактивного агента/лекарственного средства; однако достижение быстрого высвобождения биоактивных агентов из систем с микроиглами, оптимизация и разработка микроигл с эффективными формами и размерами при одновременном содержании достаточной дозы биоактивного агента оказалось труднодостижимым. Таким образом,

существует необходимость в решении проблем вязкости, нагрузки биоактивного агента, поверхностного натяжения, формы и размера микроигл и общих дефектов изготовления.

[0006] Кроме того, существует необходимость в вакцинных продуктах, которые можно вводить самостоятельно без необходимости посещать кабинет врача или другое многолюдное место, которое подвергает пациентов и медицинских работников риску воздействия вируса. Другие требования включают исключение острых игл, которые обычно используются для подкожной и внутримышечной инъекции, и связанных с ними рисков биологической опасности, короткое время ношения и стабильность продуктов при комнатной температуре для исключения необходимости использования холодной цепи хранения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение удовлетворяет указанным выше требованиям и относится к композициям, устройствам, способам лечения, наборам и способам изготовления фармацевтических продуктов, применимым для лечения различных состояний здоровья, включая вакцинацию против коронавируса и гриппа.

[0008] Более конкретно, изобретение направлено на введение вакцины против коронавируса и/или вакцины против гриппа в качестве биоактивного агента (активного фармацевтического ингредиента) нуждающемуся в этом субъекту. Настоящее изобретение направлено на трансдермальное или внутрикожное введение или введение через кожу другим способом терапевтически эффективной дозы вакцины против коронавируса и/или вакцины против гриппа, которая является легко применимой и мобильной для возможности быстрого введения, т.е. путем внутрикожного введения посредством введения с помощью микроигл. В одном варианте реализации трансдермальная доставка вакцины против

коронавируса и/или вакцины против гриппа в целом включает модуль с пластырем (модуль с пластырем), содержащий элемент с микровыступами, который содержит множество микровыступов (или «игл», или «микроигл», или «матрицу»), которые покрыты вакциной, находятся в контакте по текучей среде с резервуаром, содержащим вакцину, или другим образом содержат указанную вакцину. Модуль с пластырем также содержит адгезивный компонент, и, в предпочтительном варианте реализации изобретения, элемент с микровыступами и адгезивный компонент размещены в удерживающем кольце. Микровыступы наносятся на кожу (прикладываются к коже) для доставки вакцины в кровотоки или, более конкретно, выполнены с возможностью проникновения через роговой слой или прокалывания рогового слоя эпидермиса на глубину, достаточную для введения терапевтически эффективного количества в кровотоки. В одном варианте реализации введение покрытых вакциной микроигл в кожу управляется ручным аппликатором, который обеспечивает достаточную удельную энергию удара за менее чем примерно 10 миллисекунд.

[0009] Предпочтительно элемент с микровыступами содержит биосовместимый препарат покрытия, содержащий вакцину в дозе, достаточной для достижения терапевтического эффекта, например, продукции специфичных к коронавирусу антител IgG и других соответствующих антител в сыворотке крови вакцинированных млекопитающих по результатам измерения методом ИФА (ELISA) и анализов нейтрализации вируса.

[0010] Покрытие может дополнительно содержать одно или более вспомогательных веществ или носителей для облегчения введения вакцины через кожу. Например, биосовместимый препарат покрытия содержит вакцину и водорастворимый

носитель и сначала наносится в жидком виде на микровыступы и затем высушивается с образованием твердого биосовместимого покрытия. Пластыри с вакциной, описанные в настоящей заявке, легко вводить самостоятельно, для них требуется короткое время ношения (например, 5-30 минут), они обеспечивают щадящий режим дозирования по сравнению с аналогами указанных вакцин, предназначенными для внутримышечной (ВМ) или подкожной (ПК) инъекции, являются одноразовыми и приводят к вакцинации/сероконверсии по меньшей мере у 50% пациентов после применения указанного пластыря. Кроме того, пластыри не содержат консервантов и вызывают минимальные нежелательные явления.

[00011] Дополнительные варианты реализации устройств, композиций, способов и т.д. согласно настоящему изобретению будут очевидны из следующего далее описания, графических материалов, примеров и формулы изобретения. Как может быть очевидно из предшествующего и следующего далее описания, каждый признак, описанный в настоящей заявке, и каждая комбинация двух или более таких признаков включена в объем настоящего изобретения, при условии что признаки, включенные в такую комбинацию, не являются взаимно несовместимыми. Кроме того, любой признак или комбинация признаков может быть конкретно исключена из любого варианта реализации или аспекта. Дополнительные аспекты и варианты реализации изложены в следующем далее описании и формуле изобретения, в частности, для рассмотрения вместе с сопутствующими примерами и графическими материалами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00012] Приведенные выше признаки вариантов реализации изобретения можно легко понять со ссылкой на следующее далее подробное описание изобретения при его рассмотрении вместе со ссылкой на сопутствующие графические материалы, в которых:

[00013] На Фигуре 1 изображена трансдермальная система доставки с микровыступами компании-заявителя Zosano: (a) аппликатор; (b) покрытый препаратом пластырь; (c) матрица с микровыступами и (d) детализированный чертеж вершины микровыступа.

[00014] Фигура 2 представляет собой линейный график, показывающий вязкость раствора трех препаратов вакцин: 50 мг/мл НА и сахароза (◆); 40 мг/мл НА и сахароза (■); 35 мг/мл НА и сахароза (▲).

[00015] На Фигуре 3 представлена серия микрофотографий, показывающих морфологию покрытия матрицы, покрытой вакциной против гриппа, как следует далее: (a) вид сверху среза покрытой матрицы; (b) вид сбоку одного микровыступа; (c) вид сверху одного микровыступа и (d) вид спереди одного микровыступа.

[00016] На Фигуре 4 показаны результаты анализа методом ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга внутрипроизводственных вакцинных материалов с использованием овечьих антител против НА: (a) невозстанавливающие условия и (b) восстанавливающие условия.

[00017] Фигура 5 представляет собой гистограмму стабильности систем, которые были получены для фазы I клинического исследования и хранились в течение 12 месяцев при температуре 5°C и 25°C.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00018] Различные аспекты и варианты реализации изобретения описаны в настоящей заявке. Указанные аспекты и варианты реализации могут, однако, быть реализованы во многих различных формах и не ограничивают настоящее изобретение; вместо этого указанные варианты реализации предложены таким образом, что описание изобретения является исчерпывающим и полным для информирования специалиста в данной области техники о том, как создавать и применять композиции, устройства, способы лечения, наборы и способы изготовления фармацевтических продуктов, описанные в настоящей заявке. Терминология, используемая в настоящей заявке, приведена в целях описания композиций, устройств, способов лечения, наборов и способов изготовления, описанных в настоящей заявке, и не является ограничивающей, если иное специально не указано, поскольку объем изобретения ограничивается исключительно формулой изобретения, прилагаемой к настоящей заявке, и формулами изобретения, прилагаемыми к продолжающим и выделенным заявкам, происходящим из настоящей заявки. Все книги, публикации, патенты и патентные заявки, цитированные в настоящей заявке, таким образом, полностью включены посредством ссылки в настоящую заявку.

[00019] Как будет очевидно из приведенного выше и следующего ниже описания, каждый признак, описанный в настоящей заявке, и каждая комбинация двух или более таких признаков, включена в объем настоящего изобретения, при условии что указанные признаки, включенные в такую комбинацию, не являются взаимно несовместимыми. Например, рассматривается любой вариант реализации изобретения, применение которого согласуется с любым другим вариантом реализации изобретения и, таким образом, указанный вариант включен в настоящее описание. Другие аспекты и варианты реализации

изложены в следующем далее описании и формуле изобретения, и также могут быть рассмотрены вместе с сопутствующими примерами и графическими материалами.

[00020] Упоминание в настоящей заявке и прилагаемой формуле изобретения объектов в единственном числе включает указание множественное число указанных объектов, если иное явно не следует из контекста. Например, указание на «способ» включает один или более способов и/или этапов типа, описанного в настоящей заявке, и/или способов и/или этапов, которые будут очевидны специалистам в данной области техники при прочтении настоящего изобретения.

А. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00021] Если не указано иное, все термины и фразы, используемые в настоящей заявке, включают значения, которые указанные термины и фразы получили в данной области техники, если противоположное явно не указано или явно не следует из контекста, в котором употребляется указанный термин или фраза. Любые способы и материалы, сходные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящей заявке, можно использовать при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения, включая конкретные способы и материалы, описанные в настоящей заявке.

[00022] Если не указано иное, отдельные числовые значения указаны как приблизительные значения, как если бы указанным значениям предшествовало слово «примерно» или «приблизительно». Подобным образом, числовые значения в различных диапазонах, указанных в настоящей заявке, если иное не указано специально, указаны как приблизительные значения, как если бы минимальному и максимальному значению в пределах указанных диапазонов предшествовало слово «примерно» или «приблизительно». Таким образом, можно использовать отклонения вверх и вниз от указанных диапазонов с

достижением по существу таких же результатов, как для значений в пределах указанных диапазонов. В настоящей заявке термины «примерно» и «приблизительно» в отношении числового значения имеют свое прямое и стандартное значение, известное специалисту в области техники, к которой описанный предмет наиболее близко относится, или области техники, соответствующей обсуждаемому диапазону или элементу. Значение расширения точной числовой границы зависит от факторов, известных специалисту в данной области техники. Например, некоторые из факторов, которые могут рассматриваться, включают критичность элемента и/или эффект, который данное значение отклонения будет оказывать на эффективность заявленного предмета, а также другие аспекты, известные специалисту в данной области техники. В настоящей заявке применение различающихся значений значащих разрядов для различных числовых значений не ограничивает функцию употребления слов «примерно» или «приблизительно» – расширение или сужение конкретного числового значения или диапазона. Как правило, термины «примерно» или «приблизительно» расширяют границы числового значения. Предполагается, что раскрытые диапазоны представляют собой непрерывные диапазоны, включающие каждое значение между минимальным и максимальным значением, а также расширенный диапазон, полученный путем применения термина «примерно» или «приблизительно». Следовательно, предполагается, что приведенные в настоящей заявке диапазоны значений служат в качестве способа сокращения указания индивидуально на каждое отдельное значение, попадающее в указанный диапазон, и каждое указанное отдельное значение включено в настоящую заявку, как если бы оно было отдельно приведено в настоящей заявке.

[00023] Термин «биосовместимое покрытие» в настоящей заявке означает и включает покрытие, образованное из «препарата покрытия», которое обладает достаточными адгезионными характеристиками и отсутствием нежелательных взаимодействий (или минимальными нежелательными взаимодействиями) с биологически активным агентом (также известным как активный фармацевтический ингредиент, или терапевтический агент, или антиген, или лекарственное средство).

[00024] Термин «коронавирус» относится к семейству зоонозных вирусов, которые поражают людей и вызывают инфекции дыхательных путей, такие как общие симптомы простуды и более тяжелые или даже фатальные состояния, например, тяжелую пневмонию и РДСВ. Примеры коронавирусов включают альфа-коронавирус, бета-коронавирус, hCoV-229E, hCoV-NL63, hCoV-OC43, HCoV-NKUI, SARS-CoV, MERS-CoV, и SARS-CoV-2. В некоторых вариантах реализации коронавирус представляет собой бета-коронавирус, содержащий геномную последовательность SARS-CoV-2. Согласно другим вариантам реализации изобретения, геномная последовательность коронавируса по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SARS-CoV-2. Согласно другому аспекту, геномная последовательность коронавируса по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности CoV, подобного SARS летучей мыши (bat-SL-CoVZC45, MG772933.1). Способы лечения, описанные в настоящей заявке, применимы для вакцинации против всех таких коронавирусных инфекций и вызываемых ими симптомов.

[00025] Термин «вакцина против коронавируса» в настоящей заявке означает любую вакцину против коронавируса. Например, любую вакцину, которая приводит к продукции специфичных в отношении коронавируса антитела IgG или других соответствующих антител в сыворотке вакцинированных млекопитающих по результатам измерения с помощью ИФА и анализов нейтрализации вируса, включая, но не ограничиваясь указанными, вакцины, содержащие коронавирусный спайковый белок (S-белок, белок шипов), субъединицу SARS-CoV-S1, субъединицу MERS-S1, и вакцины на стадии разработки, перечисленные в любом другом месте в настоящей заявке.

[00026] Термин «COVID-19» относится к инфекции дыхательных путей, вызванной новым возникшим коронавирусом, SARS-CoV-2, который был впервые обнаружен в г. Ухань, Китай, в декабре 2019 г. Клинические синдромы COVID-19 варьируют от умеренной или неосложненной болезни, такой как лихорадка, слабость, кашель (с образованием или без образования мокроты), анорексия, недомогание, мышечная боль, боль в горле, одышка, заложенность носа, головная боль или, реже, диарея, тошнота и рвота, до тяжелого заболевания, которое требует госпитализации и кислородной поддержки или поступления в реанимационное отделение и может требовать искусственной вентиляции легких. В тяжелых случаях COVID-19 может осложняться повреждением легких, РДСВ, сепсисом и септическим шоком, мультиорганной недостаточностью, включая острое повреждение почек и повреждение сердца. Наиболее частый диагноз у пациентов с тяжелым течением COVID-19 представляет собой тяжелую пневмонию.

[00027] Термин «вспомогательные вещества» относится к инертным веществам, которые обычно используются в качестве разбавителя, наполнителя, консерванта,

связующего вещества, стабилизирующего агента и т.д. для биоактивных агентов, и включает, но не ограничивается указанными, белки (например, сывороточный альбумин и т.д.), аминокислоты (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, глицин, гистидин, лейцин и т.д.), жирные кислоты и фосфолипиды (например, алкилсульфонаты, каприлат и т.д.), поверхностно-активные вещества (например, ДСН, полисорбат, неионное поверхностно-активное вещество и т.д.), сахараиды (например, сахарозу, мальтозу, трегалозу и т.д.) и полиолы (например, маннит, сорбит и т.д.).
Дополнительные фармацевтические вспомогательные вещества см. также в источнике Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed., LWW Publisher (2005).

[00028] Слово «внутрикожный» или «трансдермальный» в настоящей заявке представляет собой общий термин, который относится к доставке активного агента (например, терапевтического агента, такого как антиген, лекарственное средство, фармацевтический препарат, пептид, полипептид или белок) через кожу в локальную ткань или системный кровоток по существу без разрезания или прокалывания кожи, такого как разрезание хирургическим ножом или прокалывание кожи подкожной иглой. Внутрикожная доставка агента включает доставку путем пассивной диффузии, а также доставку на основе внешних источников энергии, таких как электричество (например, ионофорез) и ультразвук (например, фонофорез).

[00029] Термин «внутрикожный ток» или «трансдермальный ток» в настоящей заявке, означает скорость внутрикожной или трансдермальной доставки активного агента или лекарственного средства.

[00030] Термин «элемент с микровыступами» или «матрица с микроиглами» и т.д. в настоящей заявке в целом подразумевает группу микровыступов, содержащую

множество микровыступов, предпочтительно упорядоченных в матрице, для проникновения через роговой слой или прокалывания рогового слоя эпидермиса. Элемент с микровыступами может быть образован путем травления или штамповки множества микровыступов из тонкого листа металла или другого прочного материала и сворачивания или сгибания указанных микровыступов за пределами плоскости листа с образованием конфигурации. Элемент с микровыступами может быть альтернативно изготовлен с использованием других материалов, включая пластики или полимеры, такие как полиэфирэфиркетон (PEEK). Элемент с микровыступами может быть образован с помощью других известных методов, таких как формовка путем шприцевания или микроформовка, использование микроэлектромеханических систем (MEMS) или образование одной (или более) ленты (лент), содержащей микровыступы по краю каждой ленты (лент), как описано в патентах США № 6 083 196; 6 091 975; 6 050 988; 6 855 131; 8 753 318; 9 387 315; 9 192 749; 7 963 935; 7 556 821; 9 295 714; 8 361 022; 8 633 159; 7 419 481; 7 131 960; 7 798 987; 7 097 631; 9 421 351; 6 953 589; 6 322 808; 6 083 196; 6 855 372; 7 435 299; 7 087 035; 7 184 826; 7 537 795; 8 663 155 и публикациях заявок на патенты США № US20080039775; US20150038897; US20160074644; и US20020016562. Как будет очевидно специалисту в данной области техники, когда используется матрица с микровыступами, доставляемую дозу терапевтического агента также можно варьировать или контролировать путем изменения размера матрицы с микровыступами, плотности микровыступов и т.д.

[00031] Термины «микровыступы» и «микроиглы» при использовании взаимозаменяемо в настоящей заявке относятся к прокалывающим элементам, которые выполнены с возможностью проникновения, прокалывания или прорезания в и/или через роговой слой эпидермиса в подлежащий слой эпидермиса или слои эпидермиса и дермы

кожи жизнеспособного животного, в частности, млекопитающего, и более конкретно, человека. В одном варианте реализации прокалывающие элементы имеют длину выступа менее 1000 микрон. Согласно дополнительному варианту реализации изобретения, длина выступа прокалывающего элемента составляет менее 500 микрон, более предпочтительно, менее 400 микрон. Кроме того, микровыступы имеют ширину в диапазоне от приблизительно 25 до 500 микрон и толщину в диапазоне от приблизительно 10 до 100 микрон. Микровыступы могут быть образованы в различных формах, таких как иглы, лезвия, штифты, буры и их комбинации.

[00032] Термины «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо в настоящей заявке и относятся к позвоночному, предпочтительно, млекопитающему. Млекопитающие включают людей, но не ограничиваются ими.

[00033] «Скорость высвобождения» биоактивного агента в настоящей заявке относится к количеству агента, высвобождаемого из формы дозирования или фармацевтической композиции, за единицу времени, например, микрограммы агента, высвобождаемые за час (мкг/ч), или миллиграммы агента, высвобождаемые за час (мг/ч). Скорости высвобождения агента для форм дозирования обычно измеряют как *in vitro* скорость растворения, т.е. количество агента, высвобождаемое из формы дозирования или фармацевтической композиции за единицу времени, измеренное при подходящих условиях и в подходящей жидкости.

[00034] Термин «стабильный» в настоящей заявке относится к лекарственной форме агента и означает, что лекарственная форма агента не подвергается ненадлежащему химическому или физическому изменению, включая разложение, разрушение или инактивацию. «Стабильный» в настоящей заявке в отношении покрытия также означает

механическую стабильность, т.е. отсутствие ненадлежащего смещения или потери с поверхности, на которую нанесено указанное покрытие.

[00035] Термин «терапевтически эффективный» или «терапевтически эффективное количество» в настоящей заявке относится к количеству биологически активного агента, необходимому для стимулирования или инициирования желаемого благоприятного результата. Количество биологически активного агента, используемое в покрытиях согласно изобретению, будет представлять собой такое количество, которое необходимо для доставки количества биологически активного агента, необходимого для достижения желаемого результата. На практике оно будет широко варьировать в зависимости от конкретного биологически активного агента, который доставляют, объема доставки и кинетики растворения и высвобождения для доставки биологически активного агента в ткани кожи.

В. СИСТЕМА ВНУТРИКОЖНОЙ ДОСТАВКИ

[00036] Устройство и способ для внутрикожной доставки вакцины против коронавируса и/или вакцины против гриппа в соответствии с настоящим изобретением содержит систему внутрикожной доставки, содержащую элемент (или систему) с микроиглами, содержащий множество микроигл (или их матрицу), которые выполнены с возможностью проникновения (прокалывания) через роговой слой эпидермиса в подлежащий слой эпидермиса или слои эпидермиса и дермы.

[00037] В одном варианте реализации система внутрикожной доставки представляет собой технологию трансдермальной или внутрикожной доставки активного агента, которая содержит одноразовый пластырь, состоящей из элемента с микровыступами, расположенного в центре на адгезивной подложке, и аппликатора.

Элемент с микровыступами содержит титановые (или выполненные из другого прочного материала, включая пластиковый или полимерный материал типа полиэфирэфиркетона (ПЕЕК)) микроиглы, которые покрыты готовым сухим препаратом активного агента. Пластырь установлен на удерживающем кольце с получением модуля-пластыря. Модуль с пластырем устанавливается с возможностью удаления в ручной аппликатор с получением системы внутрикожной доставки. Аппликатор обеспечивает приложение пластыря с определенной скоростью и энергией приложения к сайту внутрикожного введения. Аппликатор может быть выполнен с возможностью однократного применения или быть многоразовым. Примеры такой технологии описаны в публикации заявки на патент США № US20190070103, принадлежащей заявителю.

[00038] Более конкретно, пластырь может содержать матрицу, содержащую от примерно 3 до 6 см² титановых микроигл размером приблизительно 200-350 микрон в длину, покрытых гидрофильным препаратом соответствующего биоактивного агента (например, вакциной против коронавируса и/или вакциной против гриппа), и присоединенных к адгезивной подложке. Максимальное количество активного агента, которое можно наносить в виде покрытия на матрицы пластыря с микроиглами, зависит от активного агента или фрагмента в препарате, массы вспомогательных веществ в указанном препарате и доступной для покрытия площади поверхности матрицы с микроиглами. Например, можно применять пластыри с матрицами микроигл размером примерно 1 см², 2 см², 3 см², 4 см², 5 см² и 6 см². Пластырь прикладывают с помощью ручного аппликатора, который вдавливают микроиглы в кожу по существу на равномерную глубину при каждом прикладывании в непосредственной близости от капиллярного русла, делая возможным растворение и всасывание покрытия, содержащего активный агент, при этом не затрагивая

нервные окончания в коже. Типичное время ношения пластыря составляет примерно 5 - 45 минут или менее, что снижает вероятность раздражения кожи. Номинальная энергия аппликатора, составляющая от примерно 0,20 до 0,60 джоулей, в целом способна обеспечивать хороший баланс между ощущением при ударе и проникновением матрицы. Абсолютная кинетическая энергия в момент удара может быть меньше этих номинальных значений из-за неполного распрямления пружины аппликатора, потери энергии, вызванной отделением пластыря от его удерживающего кольца, и другим потерям, которые могут составлять в общем приблизительно 25% от номинального значения.

1. Дизайн матрицы

[00039] Ряд переменных играет роль в типе матрицы, используемой для конкретного активного агента. Например, различные формы (например, формы, сходные с острием стрелы, крюком, конусом или памятником Вашингтону) могут обеспечивать более высокую допустимую нагрузку активного агента, а длина микровыступов может быть повышена для достижения большей движущей силы для проникновения. Роговой слой эпидермиса имеет толщину примерно 10-40 микрон, и микровыступы должны иметь подходящий размер, толщину и форму для проникновения и осуществления активной доставки агента через роговой слой эпидермиса. Микровыступы проникают через роговой слой эпидермиса, а подложка соприкасается с поверхностью кожи.

[00040] В некоторых вариантах реализации является полезным достижение более толстого покрытия на микровыступах, которые будут проникать через роговой слой эпидермиса, при исключении нанесения покрытия на подложку или основание («проходы») матрицы, которые не будут проникать через роговой слой эпидермиса. Большая площадь поверхности делает возможным более толстое покрытие без его распространения на

основание или проходы матрицы. В некоторых случаях покрытие наносят только на микровыступы. Кроме того, более высокая ударная сила, требуемая для более объемного выступа с покрытием, может компенсироваться большей длиной и более низкой плотностью выступов на см².

[00041] Примеры систем внутрикожной доставки, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают технологии доставки активного агента, описанные в патентах США № 6 083 196; 6 091 975; 6 050 988; 6 855 131; 8 753 318; 9 387 315; 9 192 749; 7 963 935; 7 556 821; 9 295 714; 8 361 022; 8 633 159; 7 419 481; 7 131 960; 7 798 987; 7 097 631; 9 421 351; 6 953 589; 6 322 808; 6 083 196; 6 855 372; 7 435 299; 7 087 035; 7 184 826; 7 537 795; 8 663 155 и публикациях патентов США № US20080039775; US20150038897; US20160074644 и US20020016562. В описанных системах и приборе используются прокалывающие элементы различных форм и размеров для прокалывания самого наружного слоя (т.е. рогового слоя эпидермиса) кожи, что, таким образом, усиливает внутрикожный ток агента. Прокалывающие элементы в целом отходят перпендикулярно от тонкого плоского элемента субстрата, такого как подушка или лист. Прокалывающие элементы обычно являются маленькими, длина некоторых микровыступов составляет всего от примерно 25 до 400 микрон, и толщина микровыступа составляет от примерно 5 до 50 микрон. Указанные маленькие прокалывающие/надрезающие элементы производят соответственно малые микропроколы/микронадрезы в роговом слое эпидермиса для усиления трансдермальной/внутрикожной доставки агента. Активный агент для доставки связан с одним или более микровыступов, предпочтительно путем покрытия микровыступов препаратом на основе вакцины против вируса с образованием твердого сухого покрытия, или, необязательно, путем применения резервуара, который контактирует

с роговым слоем эпидермиса после формирования микропроколов, или путем образования микровыступов из твердых препаратов на основе противовирусной вакцины, которые растворяются после нанесения. Микровыступы могут быть сплошными или полыми и могут дополнительно обладать признаками устройства, выполненного с возможностью приема и/или повышения объема покрытия, такими как отверстия, борозды, неровности поверхности или подобные модификации, где указанные признаки обеспечивают увеличенную площадь поверхности, на которую можно нанести большее количество покрытия. Микроиглы могут быть сделаны из нержавеющей стали, титана, никель-титановых сплавов или сходных биосовместимых материалов, таких как полимерные материалы.

[00042] Настоящее изобретение, таким образом, включает пластыри и матрицы с микроиглами, обладающие следующими признаками:

[00043] Размер пластыря: от примерно 1 до 20 см², или от примерно 2 до 15 см², или от примерно 4 до 11 см², или примерно 3 см², или примерно 5 см², или примерно 10 см².

[00044] Размер субстрата: от примерно 0,5 до 10 см², или от примерно 2 до 8 см², или от примерно 3 до 6 см², или примерно 3 см², или примерно 3,13 см², или примерно 6 см².

[00045] Размер матрицы: от примерно 0,5 до 10 см², или от примерно 2 до 8 см², или от примерно 2,5 до 6 см², или примерно 2,7 см², или примерно 5,5 см², или примерно 2,74 см², или примерно 5,48 см².

[00046] Плотность (микровыступов/см²): по меньшей мере примерно 10 микровыступов/см², или в диапазоне от примерно 200 до 2000 микровыступов/см², или от

примерно 500 до 1000 микровыступов/см², или от примерно 650 до 800 микровыступов/см², или примерно 725 микровыступов/см².

[00047] **Количество микровыступов/матрица:** от примерно 100 до 4000, или от примерно 1000 до 3000, или от примерно 1500 до 2500, или от примерно 1900 до 2100, или примерно 2000, или примерно 1987, или от примерно 200 до 8000, или от примерно 3000 до 5000, или от примерно 3500 до 4500, или от примерно 4900 до 4100, или примерно 4000, или примерно 3974.

[00048] **Длина микровыступа:** от примерно 25 до 600 микрон (микрометров), или от примерно 100 до 500 микрон, или от примерно 300 до 450 микрон, или от примерно 320 до 410 микрон, или примерно 340 микрон, или примерно 390 микрон, или примерно 387 микрон. Согласно другим вариантам реализации изобретения, длина составляет менее чем 1000 микрон, или менее чем 700 микрон, или менее чем 500 микрон. Соответственно, микроиглы проникают через кожу на глубину от примерно 25 до 1000 микрон.

[00049] **Длина вершины:** от примерно 100 до 250 микрон, или от примерно 130 до примерно 200 микрон, или от примерно 150 до 180 микрон, или от примерно 160 до 170 микрон, или примерно 165 микрон.

[00050] **Ширина микровыступа:** от примерно 10 до 500 микрон, или от примерно 50 до 300 микрон, или от примерно 75 до 200 микрон, или от примерно 90 до 160 микрон, или от примерно 250 до 400 микрон, или примерно 300 микрон, или примерно 100 микрон, или примерно 110 микрон, или примерно 120 микрон, или примерно 130 микрон, или примерно 140 микрон, или примерно 150 микрон.

[00051] **Толщина микровыступа:** от примерно 1 микрона до примерно 500 микрон, или от примерно 5 микрон до 300 микрон, или от примерно 10 микрон до 100

микрон, или от примерно 10 микрон до 50 микрон, или от примерно 20 микрон до 30 микрон, или примерно 25 микрон.

[00052] Угол при вершине: от примерно 10 до 70 градусов, или от примерно 20 до 60 градусов или от примерно 30 до 50 градусов, или от примерно 35 до 45 градусов, или примерно 40 градусов.

[00053] Общее количество активного агента на матрицу: от примерно 1 мкг до 500 мкг, или от примерно 10 мкг до 400 мкг, или от примерно 25 мкг до 300 мкг, или по меньшей мере 50 мкг, или по меньшей мере 75 мкг, или по меньшей мере 100 мкг.

[00054] Количество неактивного ингредиента на матрицу: от примерно 0,1 до 10 мг, или от примерно 0,2 до 4 мг, или от примерно 0,3 мг до 2 мг, или примерно 0,6 мг, или примерно 0,63 мг, или примерно 1,3 мг, или примерно 1,26 мг. Альтернативно, количество неактивного ингредиента в один-три раза меньше количества активного агента, или составляет от примерно 0,033 мг до примерно 3,33 мг.

[00055] Толщина покрытия: от примерно 50 микрометров до примерно 500 микрометров, или от примерно 100 микрометров до примерно 350 микрометров, или от примерно 50 микрометров до примерно 200 микрометров.

[00056] Количество активного агента на микровыступ: количество антигена на микровыступ может варьировать от примерно 13 нг до примерно 250 нг, или от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мкг, или от примерно 0,1 до 10 мкг, или от примерно 0,5 до 2 мкг, или от примерно 1 мкг, или составлять примерно 0,96 мкг.

[00057] В одном варианте реализации плотность микроигл на элементе с микроиглами составляет по меньшей мере примерно 10 микровыступов/см², более

предпочтительно, в диапазоне по меньшей мере от примерно 200 до 750 микровыступов/см².

[00058] В одном варианте реализации длина микровыступов составляет менее 1000 микрон. Согласно дополнительному варианту реализации изобретения, длина микровыступов составляет менее 700 микрон. Согласно другим вариантам реализации изобретения, длина микровыступов составляет менее 500 микрон. Предпочтительно, длина микровыступа составляет между 300 и 400 микрон в длину. Кроме того, ширина микровыступов составляет в диапазоне от примерно 100 до примерно 150 микрон, и толщина составляет в диапазоне от примерно 10 до примерно 40 микрон.

[00059] В одном варианте реализации элемент с микровыступами создан из нержавеющей стали, титана, никель-титановых сплавов или сходных биосовместимых материалов, таких как полимерные материалы.

[00060] В одном варианте реализации элемент с микровыступами содержит биосовместимое покрытие, которое нанесено по меньшей мере на микроиглы. Количество антигена вакцины может составлять между примерно 25 и примерно 500 мкг на матрицу.

[00061] В другом варианте реализации пластырь имеет площадь, составляющую от примерно 5 см², и присоединен к титановому субстрату с площадью от примерно 3,1 см² и толщиной от примерно 25 микрометров. Субстрат состоит из матрицы с микровыступами с площадью, составляющей от примерно 2,74 см², содержащей примерно 1987 микровыступов в плотности примерно 725 микровыступов/см². Сухой препарат, содержащийся на каждом микровыступе, может иметь форму, приближенную к форме мяча для американского футбола, с постепенно уменьшающейся толщиной от максимального значения, составляющего от примерно 270 мкм, и содержит от примерно 0,002 мкг до

примерно 0,25 мкг антигена вакцины против коронавируса на микровыступ и от примерно 5 мкг до примерно 500 мкг антигена на пластырь.

[00062] Согласно другому варианту реализации изобретения, пластырь имеет площадь, составляющую примерно 5 см^2 , и адгезирован на титановом субстрате, имеющем размер примерно 6 см^2 и толщину примерно 25 мкм. Субстрат состоит из матрицы с площадью примерно $5,5 \text{ см}^2$, содержащей примерно 4000 микровыступов в плотности примерно 725 микровыступов/ см^2 . Сухой препарат, содержащийся на каждом микровыступе, имеет форму, приближенную к форме мяча для американского футбола с постепенно уменьшающейся толщиной от максимального значения, составляющего примерно 270, и содержит от примерно 0,00125 мкг до примерно 0,125 мкг антигена вакцины против коронавируса. Микровыступы имеют длину примерно 387 ± 13 мкм, ширину примерно 120 ± 13 мкм и толщину примерно $25,4 \pm 2,5$ мкм. Микровыступы являются прямоугольными с треугольной вершиной для облегчения проникновения. Угол при вершине составляет 40 ± 5 градусов, и длина вершины составляет примерно 165 ± 25 микрон. Дополнительные примеры такой технологии описаны в публикации заявки на патент США № US20190070103, принадлежащей заявителю.

[00063] Точная комбинация объема, длины и плотности, которая приводит к получению желаемого проникновения, будет варьировать и может зависеть от активного агента, его дозы, заболевания или состояния, подлежащего лечению, и частоты введения. Таким образом, эффективность доставки активного агента для конкретной матрицы (т.е. количество активного агента, доставляемого в кровоток) будет варьировать между примерно 40% и 100%, или составлять примерно 40%, или примерно 50%, или примерно 60%, или примерно 70%, или примерно 80%, или примерно 90%, или примерно 100%.

2. Ударный аппликатор

[00064] Как показано на Фигурах 4(A)-(B), 5(A)-(E) публикации заявки на патент США № US20190070103, принадлежащей заявителю, система внутрикожной доставки активного агента согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать ударный аппликатор, имеющий корпус и подвижный поршень внутри указанного корпуса, где поверхность поршня прижимает пластырь к коже, вызывая прокалывание микровыступами рогового слоя эпидермиса. Аппликатор выполнен с возможностью прикладывания матрицы с микроиглами к роговому слою эпидермиса с удельной энергией удара, составляющей по меньшей мере 0,05 джоулей на см² за 10 миллисекунд или менее, или примерно 0,26 джоулей на см² за 10 миллисекунд или менее, или примерно 0,52 джоулей на см² за 10 миллисекунд или менее.

[00065] Как показано на Фигурах 2(A) и 2(B) публикации заявки на патент США № US20190070103, система внутрикожной доставки содержит пластырь, содержащий адгезивную подложку на одной поверхности и блестящую металлическую поверхность на другой стороне, состоящую из матрицы с покрытыми активным агентом микроиглами. Пластырь можно наносить на кожу (прикладывать к коже) путем прижимания блестящей металлической поверхности к коже либо вручную, либо, предпочтительно, с помощью аппликатора. Предпочтительно, аппликатор прикладывает пластырь к коже с удельной энергией удара, составляющей 0,26 джоулей на см² за 10 миллисекунд, или менее. Как показано на Фигурах 2A, 2B, 3A и 3B публикации заявки на патент США № US20190070103, пластырь может поддерживаться и быть соединен со структурой удерживающего кольца, образующей модуль с пластырем. Удерживающее кольцо выполнено с возможностью посадки на адаптер ударного аппликатора и присоединения пластыря к указанному аппликатору с возможностью удаления. Структура удерживающего

кольца может содержать внутреннее кольцо и внешнее кольцо, которые сконструированы для получения адгезивного пластыря и матрицы с микроиглами. На Фигурах 5(A)-(E) публикации заявки на патент США № US20190070103 показан один вариант реализации заявленного изобретения, в котором пользователь обеспечивает соединение ударного аппликатора с удерживающим кольцом, на которое уже установлен пластырь и матрицы с микроиглами. Как показано, сразу после соединения удерживающего кольца и ударного аппликатора пользователь может разблокировать указанный ударный аппликатор путем поворота крышки аппликатора. На Фигуре 5(C) публикации заявки на патент США № US20190070103 показано, что пользователь может затем прижать аппликатор к поверхности кожи для дозирования пластыря и нанесения его на кожу. Пластырь присоединяется к коже пациента с возможностью его удаления, и удерживающее кольцо остается присоединенным к аппликатору. Как показано на Фигурах 4(A) и 4(B) публикации заявки на патент США № US20190070103, удерживающее кольцо обратимо присоединяется к ударному аппликатору таким образом, что ударный аппликатор может повторно использоваться во время последующих событий дозирования дополнительным модулем-пластырем и потенциально для других активных ингредиентов и заболеваний.

[00066] Согласно другому варианту реализации изобретения, пластырь и аппликатор представлены в виде выполненной за одно целое единицы вместе с упаковкой, которая обеспечивает стабильность и стерильность препарата. Пользователь извлекает систему из упаковки и наносит пластырь, как описано в настоящей заявке. Используемый аппликатор затем утилизируется в обычный мусор. Данный вариант реализации изобретения обеспечивает систему, которая является менее сложной, имеет меньший размер и вес и которую легче применять.

[00067] Настоящее изобретение также может применяться вместе с широким разнообразием активных трансдермальных систем (в отличие от пассивных устройств с ручной внутрикожной доставкой, описанных в настоящей заявке), так как изобретение не имеет никаких ограничений в этом отношении.

[00068] Некоторые трансдермальные системы активной доставки используют электротранспорт. Иллюстративные системы активной доставки агента с помощью электротранспорта описаны в патентах США № 5 147 296; 5 080 646; 5 1693 82 и 5 169 383. Один широко используемый процесс электротранспорта, ионофорез, включает электрообусловленный транспорт заряженных ионов. Электроосмос – другой тип процесса электротранспорта, включенный в трансдермальный транспорт незаряженных или нейтрально заряженных молекул (например, трансдермальный отбор образцов глюкозы), включает перемещение растворителя с агентом через мембрану под влиянием электрического поля. Другой тип электротранспорта – электропорация – включает пропускание агента через поры, образованные в результате приложения электрического импульса (высоковольтного импульса) к мембране. Во многих примерах одновременно может происходить более одного из перечисленных процессов в различной степени. Соответственно, термин «электротранспорт» приводится в настоящей заявке в его самой широкой приемлемой интерпретации и включает электрообусловленный или усиленный транспорт по меньшей мере одного заряженного или незаряженного агента или их смеси, независимо от конкретного механизма (механизмов), с помощью которого в реальности транспортируется агент.

[00069] Кроме того, любой другой способ усиления транспорта, включая, но не ограничиваясь указанными, усиление химического проникновения, лазерную абляцию,

нагрев, ультразвук или пьезоэлектрические устройства, можно использовать вместе с изобретением в соответствии с настоящей заявкой.

3. Вакцины как активные агенты и биосовместимое покрытие

[00070] Препараты покрытия, нанесенного на элемент с микровыступами, которые, как описано выше, образуют твердые покрытия, состоят из жидкого препарата, предпочтительно, препарата на водной основе, содержащей по меньшей мере один биологически активный агент, который может быть растворен в биосовместимом носителе или суспендирован вместе с указанным носителем. Препарат затем наносят на микровыступы, сушат, стерилизуют и упаковывают. Биологически активный агент может представлять собой вакцину против гриппа или вакцину против коронавируса, такую как субъединичная вакцина против SARS-Cov-2.

[00071] Настоящее изобретение включает по меньшей мере 78 подтвержденных вакцин-кандидатов против COVID-19, 5 из которых уже вошли в фазу клинических исследований (источник Kalogama, выше). Такие примеры вакцин против коронавируса, применимых согласно настоящему изобретению, включают (но не ограничиваются указанными) следующие вакцины:

1. Вакцина MRNA-127 от компании Moderna.
2. Вакцина INO-4800 от компании Inovio Pharmaceuticals.
3. Вакцина LV-SMENP-DC от Шеньчженьского генно-иммунного медицинского института.
4. Вакцина Ad5-nCoV от компании CanSino Biologics.
5. Вакцина от компании Глахо в сотрудничестве с компанией Clover Biopharmaceuticals (S-trimer COVID-19) и Коалицией по инновациям в сфере эпидемической готовности (Coalition for Epidemic Preparedness, CEPI) (на основе молекулярного захвата).
6. Вакцина от компании Sanofi в сотрудничестве с компанией Translate Bio.

7. Вакцина от компании Emergent BioSolutions в соглашении с компанией Vaxart.
8. Вакцина MF59 от компании Seqiris.
9. Вакцина IR101C от компании Immune Response BioPharma (IRBP).
10. Вакцина от компании Johnson & Johnson.
11. Вакцина от компании Mitsubishi Tanabe/Medicago.
12. Вакцина от Института сывороток Индии в партнерстве с компанией Codagenix.
13. Поликлональный гипериммунный глобулин против SARS-CoV-2 от компании Takeda.
14. Вакцина от компании Sengenics.
15. Вакцина от компании Akers Biosciences.
16. Вакцина, разрабатываемая Питтсбургским университетом.
17. Вакцина от компаний Inovio и Ology Biosciences.
18. Вакцина от компании Dynavax в партнерстве с компанией Clover.
19. Вакцина, разрабатываемая Айовским университетом и Университетом Джорджии.
20. Вакцина от компаний Applied DNA и Takis Biotech.
21. Вакцина от компаний Sanofi и GSK.

Более подробная сводка вакцин против COVID-19 и часть настоящего описания суммированы ниже.

Выбранные вакцины, разрабатываемые против COVID-19 (источник: Kalomara, выше)

Разработчик	Вакцина	Платформа	Фаза
Moderna	MRN-1273	мРНК	1
Inovio	INO-4800	ДНК	1
Shenzhen Geno-Immune	LV-SMENP-DC Covid-19 aAPC	Модифицированный лентивирусный вектор	1
		Патоген-специфичные искусственные АПК	1

Разработчик	Вакцина	Платформа	Фаза
CanSino	Ad5-nCoV	Рекомбинантная	2
GSK/Clover	COVID-12-S-trimer	Белковая субъединичная	PC
IntelliStem	IPT-001	Пептидная	PC
Celularity/Sorrento Therapeutics	CYNK-001	Клеточно-опосредованная	PC
Sanofi/BARDA		Рекомбинантная	PC
Bharat Biotech/FluGen	CoroFlu	Самоограничивающийся вирус	PC
NovaVax		Рекомбинантная наночастица	PC
Vaxart/Emergent		Пероральный рекомбинантный VAAST	PC
Seqiris	MF59	Адьювант	PC
IRBP	RespiResponse IR101C	Клеточно-опосредованная	PC
Dynavax	CpG 1018	Адьювант	PC
GSK	AS03	Адьювант	PC
J&J		Нереплицирующийся вирусный вектор	PC
Medicago		VLP	PC
Serum Inst/Codagenix		Живая ослабленная	PC
Takeda	TAK-888	Происходящая из плазмы	PC
Altimune		Нереплицирующийся вирусный вектор	PC
CureVac		mРНК	PC

Разработчик	Вакцина	Платформа	Фаза
Generex		Белковая субъединичная	PC
Ibio/Beijing CC Pharming		Белковая субъединичная/растительная	PC
ImmunoPrecise Antibosies		Селектированные В-клетки	PC
LineaRx/Takis		ДНК	PC
Tonix	TNX-1800	Реплицирующийся вирусный вектор	PC
Acturus		РНК Eng	PC
Entos	Fusogenix	ДНК	PC
Heat		Белковая субъединица	PC
Zydus Cadila		ДНК	PC
AnGes		ДНК	PC
BioNTech/Pfizer	BNT 162	мРНК	PC
VBI		пан-коронавирус	PC
ISR	ISR-50		PC
Sk Biopharma			PC
Sinovac		ДНК	PC
Greffex		Нереплицирующийся вирусный вектор	PC
Cobra Biologics		ДНК	PC
GeoVax/BravoVax		Нереплицирующийся вирусный вектор	PC
Akers/Premas		D-крипты	PC

Разработчик	Вакцина	Платформа	Фаза
Moderna	MRN-1273	мРНК	1
Inovio	INO-4800	ДНК	1
Shenzhen Geno-Immune	LV-SMENP-DC Covid-19 aAPC	Модифицированный лентивирусный вектор	1
		Патоген-специфичные искусственные АПК	1
CanSino	Ad5-nCoV	Рекомбинантная	2
GSK/Clover	COVID-12-S-trimer	Белковая субъединичная	PC
IntelliStem	IPT-001	Пептидная	PC
Celularity/Sorrento Therapeutics	CYNK-001	Клеточно-опосредованная	PC
Sanofi/BARDA		Рекомбинантная	PC
Bharat Biotech/FluGen	CoroFlu	Самоограничивающийся вирус	PC
NovaVax		Рекомбинантная наночастица	PC

[00072] Настоящее изобретение также относится к новым вакцинам против гриппа, таким как Novavax, Inc.'s NanoFlu™, - рекомбинантная тетравалентная сезонная вакцина-кандидат против гриппа от компании с ее запатентованным адъювантом Matrix-M™ для применения у взрослых возрастом 65 и старше (Kalomaga, выше).

[00073] Такие указанные выше вакцины/антигены совместимы с препаратами в виде покрытий на водной основе, описанными в настоящей заявке, и могут наноситься на

матрицы с микровыступами в терапевтически эффективном количестве в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке.

[00074] Концентрация биологически активного ингредиента и вспомогательных веществ в препарате покрытия на водной основе строго контролируются для достижения желаемого количества активного ингредиента при приемлемой толщине покрытия для исключения затекания препарата покрытия на основу матрицы с микроиглами, поддержания равномерности покрытия и обеспечения стабильности. В одном варианте реализации активный агент присутствует в препарате покрытия в концентрации, составляющей между примерно 1% по массе и примерно 60% по массе, или между примерно 15% и 60% по массе, или между примерно 35% и 45% по массе.

[00075] Другие параметры препарата покрытия включают:

- Антиген вакцины может быть стабилизирован с использованием дисахарида, например, сахарозы или трегалозы, в отношении дисахарида к антигену, составляющем примерно 0,5, 1 или 2 к 1 по массе. Другие дисахариды, которые могут применяться, представляют собой лактозу и мальтозу в количестве, достаточном для стабилизации белка.
- Толщина покрытия варьирует от примерно 50 микрон до примерно 100 микрон.
- Вязкость препарата на водной основе, содержащей антиген или комбинацию антигенов, может варьировать от примерно 50 до примерно 300 сП.
- Другие вспомогательные вещества включают винную кислоту, лимонную кислоту и гистидин.

- Диапазон pH составляет от 4,4 до 7,4.

[00076] Препарате может дополнительно содержать кислоту в концентрации, составляющей между примерно 0,1% по массе и примерно 20% по массе. Такая кислота может быть выбрана из винной кислоты, лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты, малеиновой кислотой, аскорбиновой кислоты, молочной кислоты, соляной кислоты, отдельно или в комбинации. Согласно другому варианту реализации изобретения, в препарате покрытия отношение активного агента к кислоте составляет примерно 1:1, примерно 2:1, примерно 3:1, примерно 4:1 или примерно 5:1. Настоящее изобретение дополнительно включает препарат покрытия, содержащую примерно 33% по массе основы вакцины против коронавируса и примерно 11% по массе винной кислоты. В некоторых вариантах реализации кислота представляет собой одну из винной кислоты, лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты или малеиновой кислоты и присутствует в количестве от примерно 0,33% до 10% по массе, или от примерно 8,33% до примерно 16,67% по массе, или примерно 13,33% по массе, или примерно 15% по массе, или примерно 6,67% по массе. В некоторых вариантах реализации препарат покрытия содержит 45% по массе активного агента, 15% по массе кислоты и 40% по массе воды.

[00077] Вакцина/антиген может присутствовать в препарате покрытия в концентрации, составляющей между примерно 1% по массе и примерно 50 % по массе, и слабая кислота (винная кислота, лимонная кислота, яблочная кислота или малеиновая кислота) присутствует в препарате покрытия в количестве, составляющем между примерно 6,67 % по массе и примерно 16,67 % по массе.

[00078] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, препараты покрытия согласно настоящему изобретению не содержат консервантов.

[00079] Поверхностно-активные вещества могут быть включены в препарат покрытия. Поверхностно-активные вещества, подходящие для включения в препарате покрытия, включают, но не ограничиваются указанными, полисорбат 20 и полисорбат 80. Поверхностно-активные вещества обычно применяются для улучшения доставки активного агента в качестве усилителей проникновения. Однако заявителем было обнаружено, что применение поверхностно-активных веществ приводило к неровностям поверхности препарата покрытия, что указывает на неравномерность пленки и является очень неблагоприятным. Заявителем было обнаружено, что можно избежать необходимости в поверхностно-активных веществах и других усилителях проникновения путем применения заявленного изобретения, в частности, с помощью заявленных пластырей для трансдермальной доставки вакцины против коронавируса или вакцины против гриппа. Более того, заявителем было неожиданно обнаружено, что при покрытии микроигл не происходило подтекания, а покрытие в достаточной степени адгезировало к микровыступам во время процесса изготовления матриц с микроиглами, несмотря на отсутствие поверхностно-активного вещества.

[00080] Антиоксиданты могут быть включены в препарат покрытия. Антиоксиданты, подходящие для включения в препарат покрытия, включают, но не ограничиваются указанными, метионин, аскорбиновую кислоту и ЭДТА.

[00081] Препарат покрытия также содержит жидкость, предпочтительно воду, в количестве, достаточном (qs ad) для обеспечения 100% препарата до ее высушивания на микроиглах. рН жидкого препарата покрытия может быть ниже примерно 8. В других случаях рН составляет между примерно 3 и 7,4 или примерно от 3,5 до 4,5. Предпочтительно, рН препарата покрытия составляет ниже примерно 8. Более

предпочтительно, рН препарата покрытия составляет между 3 и 7,4. Еще более предпочтительно, рН препарата покрытия составляет между 3,5 и 5,5.

[00082] Жидкие препараты покрытия в соответствии с настоящим изобретением в целом обладают способностью обеспечивать стабильное покрытие микроигл с соответствующим содержанием и морфологией и приводят к образованию стабильной твердого (высушенного) препарата, содержащего менее 5% воды, предпочтительно, менее 3%. Жидкие препараты наносят на матрицы с микроиглами и вершины их микровыступов с помощью устройства, предназначенного для нанесения покрытия, которое позволяет тщательно контролировать глубину погружения вершин микровыступов в жидкую пленку. Примеры подходящих методов покрытия описаны в патенте США № 6 855 372, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки. Соответственно, как было описано, вязкость жидкости играет роль в процессе покрытия элемента с микровыступами (см. Ameri, M.; Fan, S C.; Maa, Y F (2010); *"Parathyroid hormone PTH(1-34) formulation that enables uniform coating on a novel transdermal microprojection delivery system;"* Pharmaceutical Research, 27, pp. 303-313; см. также Ameri M, Wang X, Maa Y F (2010); *"Effect of irradiation on parathyroid hormone PTH(1-34) coated on a novel transdermal microprojection delivery system to produce a sterile product adhesive compatibility;"* Journal of Pharmaceutical Sciences, 99, 2123-34).

[00083] Вязкость препаратов покрытия, содержащих вакцину против коронавируса, составляет менее чем примерно 500 сантипуаз (сП) и более чем 3 сП, или менее чем примерно 400 сП и более чем 10 сП, или менее чем примерно 300 сП и более чем 50 сП, или менее чем 250 сП и более чем примерно 100 сП. В некоторых вариантах реализации вязкость жидкого препарата до нанесения покрытия составляет по меньшей

мере 20 сП. Согласно другим вариантам реализации изобретения, вязкость составляет примерно 25 сП, или примерно 30 сП, или примерно 35 сП, или примерно 40 сП, или примерно 45 сП, или примерно 50 сП, или примерно 55 сП, или примерно 60 сП, или примерно 65 сП, или примерно 70 сП, или примерно 75 сП, или примерно 80 сП, или примерно 85 сП, или примерно 90 сП, или примерно 95 сП, или примерно 100 сП, или примерно 150 сП, или примерно 200 сП, или примерно 300 сП, или примерно 400 сП, или примерно 500 сП. Согласно другим вариантам реализации изобретения, вязкость составляет более чем примерно 25 сП, или более чем примерно 30 сП, или более чем примерно 35 сП, или более чем примерно 40 сП, или более чем примерно 45 сП, или более чем примерно 50 сП, или более чем примерно 55 сП, или более чем примерно 60 сП, или более чем примерно 65 сП, или более чем примерно 70 сП, или более чем примерно 75 сП, или более чем примерно 80 сП, или более чем примерно 85 сП, или более чем примерно 90 сП, или более чем примерно 95 сП, или более чем примерно 100 сП, или более чем примерно 150 сП, или более чем примерно 200 сП, или более чем примерно 300 сП, или более чем примерно 400 сП, или менее чем примерно 500 сП. В предпочтительном варианте реализации, вязкость препарата покрытия составляет более чем примерно 80 сП и менее чем примерно 350 сП; согласно другому предпочтительному варианту реализации изобретения, вязкость составляет более чем примерно 100 сП и менее чем примерно 350 сП; и согласно другому предпочтительному варианту реализации изобретения, вязкость составляет более чем примерно 100 сП и менее чем примерно 250 сП.

[00084] Сразу после нанесения препарата покрытия на микровыступы ее средняя толщина может составлять от примерно 10 до примерно 400 микрон, или от примерно 30 до примерно 300 микрон, или от примерно 100 микрон до примерно 175 микрон, или от

примерно 115 до примерно 150 микрон, или примерно 135 микрон, по результатам измерения на поверхности микровыступа. Несмотря на то, что предпочтительно, чтобы препарат покрытия покрывал микровыступ с равномерной толщиной, толщина указанного препарата может немного варьировать в результате процесса изготовления. Микровыступы в целом покрывают равномерно, поскольку они проникают через роговой слой эпидермиса. В некоторых вариантах реализации микровыступы покрыты не полностью от вершины до основания; вместо этого, покрытием покрыта часть длины микровыступа, измеренная от вершины к основанию, составляющая по меньшей мере от примерно 10% до примерно 80%, или от 20% до примерно 70%, или от примерно 30% до примерно 60%, или от примерно 40% до примерно 50% длины микровыступа.

[00085] Жидкий препарат покрытия наносят на матрицу с микровыступами таким образом, чтобы доставлялась доза активного агента в количестве от примерно 1 мкг до примерно 500 мкг на матрицу. В случае вакцины против коронавируса доза составляет от примерно 5 мкг до примерно 500 мкг, или от примерно 25 мкг до примерно 500 мкг вакцины, доставляемой в роговой слой эпидермиса, на матрицу (с помощью пластыря или другого препарата). Форма и размер микровыступа оказывает значительное влияние на допустимую нагрузку активного агента и на эффективность доставки указанного активного агента.

[00086] Согласно одному аспекту, предварительные препараты вакцин на водной основе готовят путем (а) диафильтрации/концентрирования; (b) лиофилизации и (с) восстановления.

[00087] После восстановления препараты вакцин на водной основе высушивают на микровыступах с получением твердого покрытия, в целом, путем высушивания

указанного препарата покрытия на микровыступах, как описано в публикации заявки на патент США № 2002/0128599. Препарат покрытия обычно представляет собой препарат на водной основе. Во время процесса сушки все летучие вещества, включая воду, в основном удаляются; однако конечное твердое покрытие все еще может содержать примерно 1% по массе воды, или примерно 2% по массе воды, или примерно 3% по массе воды, или примерно 4% по массе воды, или примерно 5% по массе воды. Содержание кислорода и/или воды, присутствующее в препаратах, снижают путем применения безводной инертной атмосферы и/или неполного вакуума. В твердом покрытии на матрице с микровыступами антигенный активный агент может присутствовать в количестве, составляющем менее чем примерно 500 мкг, или менее чем примерно 400 мкг, или менее чем примерно 300 мкг, или менее чем примерно 200 мкг, или менее чем примерно 100 мкг на единицу дозирования (пластырь). При добавлении вспомогательных веществ общая масса твердого покрытия может составлять менее чем примерно 5 мг на единицу дозирования или менее чем примерно 2 мг на единицу дозирования.

[00088] Элемент с микровыступами обычно находится на адгезивной подложке, которая присоединена к одноразовому полимерному удерживающему кольцу. Этот комплект упакован отдельно в пакет или полимерную оболочку. Помимо комплекта указанная упаковка содержит «мертвый объем», который составляет по меньшей мере 3 мл. Этот большой объем (по сравнению с объемом покрытия) служит в качестве частичного приемника для воды. Например, при 20° С количество воды, присутствующее в 3 мл атмосферы в результате давления ее пара, будет составлять примерно 0,05 мг при насыщении, что обычно представляет собой количество остаточной воды, которое присутствует в твердом покрытии после высушивания. Таким образом, хранение в

безводной инертной атмосфере и/или неполном вакууме будет дополнительно снижать содержание воды в покрытии, приводя к улучшению стабильности.

[00089] Согласно настоящему изобретению, покрытие можно наносить на микровыступы с помощью различных известных способов. Например, покрытие можно наносить только на те части элемента с микровыступами или микровыступов, которые прокалывают кожу (например, вершины). Покрытие затем высушивают с образованием твердого покрытия. Один такой способ покрытия включает покрытие путем погружения. Покрытие путем погружения может быть описано как способ покрытия микровыступов путем частичного или полного погружения указанных микровыступов в раствор покрытия. Путем применения способа частичного погружения можно ограничиваться покрытием только вершин микровыступов.

[00090] Дополнительный способ покрытия включает роллерное покрытие, при котором используется механизм роллерного покрытия, которой подобным образом позволяет ограничиваться покрытием вершин микровыступов. Способ роллерного покрытия описан в публикации заявки на патент США № 2002/0132054. Как подробно обсуждается в указанной публикации, описанный способ роллерного покрытия обеспечивает гладкое покрытие, которое не слезает легко с микровыступов во время прокалывания кожи.

[00091] Дополнительный способ покрытия, который можно использовать в пределах объема настоящего изобретения, включает покрытие распылением. Покрытие распылением может включать образование аэрозольной суспензии композиции покрытия. В одном варианте реализации аэрозольную суспензию с размером капель от примерно 10 до 200 пиколитров распыляют на микровыступы и затем высушивают.

[00092] Покрытие по трафарету также можно применять для покрытия микровыступов. Покрытие по трафарету можно наносить с использованием системы дозирования для распределения наносимой жидкости на поверхности микровыступа. Количество нанесенной жидкости предпочтительно составляет в диапазоне от 0,1 до 20 нанолитров/микровыступ. Примеры подходящих дозирующих устройств с точной дозировкой для жидкостей описаны в патентах США № 5 916 524; 5 743 960; 5 741 554 и 5 738 728.

[00093] Препараты или растворы покрытия микровыступов также можно наносить с помощью технологии струйной печати, в которой используются известные дозаторы с соленоидным клапаном, необязательно способа смещения жидкости и способа распределения, которые в целом контролируются применением электрического поля. Можно использовать другую технологию дозирования жидкостей из печатной промышленности или сходную технологию дозирования жидкостей, известную в данной области техники, для нанесения покрытия по трафарету согласно настоящему изобретению.

[00094] В одном варианте реализации толщина высушенных препаратов покрытия, содержащих вакцину против коронавируса или вакцину против гриппа, варьирует от примерно 10 до 100 микрон по результатам измерения на поверхности микровыступа, или от примерно 20 до 80 микрон, или от примерно 30 до 60 микрон, или от примерно 40 до 50 микрон. Желаемая толщина покрытия зависит от нескольких факторов, включая требуемую дозу и, следовательно, толщину покрытия, необходимую для доставки указанной дозы, плотность микровыступов на единицу площади листа, вязкость, растворимость и концентрацию состава покрытия и выбранный способ нанесения покрытия. Толщину покрытия, наносимого на микровыступы, также можно адаптировать

для достижения оптимальной стабильности вакцины против коронавируса. Известные адъюванты препаратов также можно добавлять к препаратам покрытия, при условии что они не оказывают нежелательного эффекта на необходимые характеристики растворимости и вязкости указанного препарата покрытия и на физическую целостность высушенного покрытия.

[00095] Покрытие наносят на микроиглы, которые выступают из основы, или «проходов», матрицы с микроиглами. Покрытие наносится на вершины микроигл и, как предполагается, не покрывает микроиглы и поверхность матрицы с микроиглами. Такое нанесение приводит к снижению количества активного агента на трансдермальный пластырь, что является предпочтительным в соответствии с руководством Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) по опасности остаточного активного агента на трансдермальных системах доставки, согласно которому предполагается, что количество остаточного активного агента в системе должно быть минимизировано. См. Отраслевое руководство Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA), *Residual Drug in Transdermal and Related Drug Delivery Systems* (август 2011 г.). Стратегия заявителя заключалась в максимизации высвобождения активного агента в кожу на единицу площади без использования избыточного количества активного агента для покрытия.

[00096] После нанесения покрытия препарат покрытия высушивают на микровыступах с помощью различных способов. Покрытый элемент с микровыступами можно сушить при комнатной температуре. Однако различные температуры и уровни влажности можно использовать для сушки препарата покрытия на микровыступах. Кроме того, покрытый элемент можно нагревать, хранить в вакууме или над осушителем,

лиофилизировать, замораживать-высушивать или обрабатывать с помощью сходных методов, используемых для удаления остаточной воды из покрытия.

[00097] Нанесение покрытия проводят при температуре окружающей среды с использованием вальца катка, вращающегося со скоростью 50 об./мин, в резервуаре с препаратом активного агента (2 мл по объему) для получения пленки с контролируемой толщиной, составляющей от примерно 50 до 100 мкм. Дополнительную информацию о процессе нанесения покрытия можно найти в патенте США № 6 855 372. Матрицы микровыступов погружают в пленку активного агента и количество покрытия контролируют по количеству погружений в пленку активного агента (циклов).

[00098] Во время процесса высушивания могут возникать проблемы, связанные с получением равномерного покрытия микровыступа с контролируемой и воспроизводимой толщиной. Одна распространенная проблема при нанесении покрытия на пластырь для трансдермальной доставки, называемая «подтеканием» или «образованием капель», возникает во время сушки покрытия, когда указанное покрытие накапливается на конце микровыступов в форме «капли». Такая каплевидная форма может притуплять острую вершину микроиглы, потенциально влияя на эффективность и равномерность проникновения. Неравномерные слои препарата на микровыступах приводят к неравномерной и иногда неприемлемой доставке активного агента. Кроме того, проблемы в процессе высушивания приводят к проблемам с контролем качества покрытия, содержащего препарат.

[00099] Жидкие препараты покрытия содержат вакцину против коронавируса/антиген коронавируса или вакцину против гриппа/антиген гриппа в количестве, составляющем от примерно 10 до примерно 1000 мкг НА/мл, или от примерно

25 до примерно 500 мкг НА/мл, или в количестве от 0,001% по массе до примерно 30% по массе, или от примерно 0,01% по массе до примерно 25% по массе, или от примерно 0,1% по массе до примерно 10% по массе, и винную кислоту в количестве, составляющем от примерно 5% по массе до примерно 25% по массе, предпочтительно от примерно 10% по массе до примерно 20% по массе, более предпочтительно, примерно 15% по массе, в жидком носителе, предпочтительно воде, более предпочтительно, деионизированной воде. В случае указанных жидких препаратов покрытия, поддержание вязкости, составляющей от примерно 150 сП до примерно 350 сП, предпочтительно, от примерно 200 сП до примерно 300 сП, более предпочтительно, от примерно 250 сантипуаз, и значения поверхностного натяжения от примерно 50 мНм⁻¹ до примерно 72 мНм⁻¹, предпочтительно, от примерно 55 мНм⁻¹ до примерно 65 мНм⁻¹, более предпочтительно, примерно 62,5 мНм⁻¹, обеспечивает устойчивость к подтеканию. Можно избежать образования капель при одновременном обеспечении того, чтобы каждое погружение микровыступов в жидкий препарат покрытия приводило к сбору достаточного объема жидкого препарата покрытия с достижением таким образом желаемой дозы активного агента при минимальном количестве погружений. Когда вязкость и поверхностное натяжение раствора покрытия являются достаточно высокими, нанесенная жидкость не стекает быстро обратно или не приобретает каплевидную форму после погружения и до высушивания.

4. Упаковка и стерилизация

[000100] Улучшенная физическая стабильность высушенных нанесенных препаратов обеспечивает не только благоприятный эффект, связанный с повышенным сроком хранения или сроком годности самого терапевтического агента, но и усиливает эффективность таким образом, что после стабилизации терапевтических агентов в

соответствии с композициями и способами получения препаратов и доставки согласно настоящему изобретению указанные терапевтические агенты могут применяться в большем диапазоне потенциальных препаратов и с более широким разнообразием способов доставки указанного терапевтического агента.

[000101] Настоящее изобретение включает препарат активного агента, где повреждение указанного препарата, вызванное кислородом и/или водой, минимизируется и/или контролируется путем изготовления и/или упаковки указанного препарата активного агента в безводной инертной атмосфере. Препарат может содержаться в безводной инертной атмосфере в присутствии осушителя, необязательно в резервуаре или упаковке, содержащей фольгированный слой.

[000102] Осушитель может представлять собой любой осушитель, известный специалисту в данной области техники. Некоторые стандартные осушители включают, но не ограничиваются указанными, молекулярное сито, оксид кальция, глиняный осушитель, сульфат кальция и силикагель. Осушитель может представлять собой осушитель, который может быть помещен вместе с препаратом, содержащим биологически активный агент, в упаковку, содержащую фольгированный слой, в инертной атмосфере.

[000103] Согласно другому аспекту, препарат активного агента упаковывают в резервуар, содержащий фольгированный слой, после нанесения указанного препарата на устройство для доставки в виде матрицы с микровыступами. Согласно данному варианту реализации изобретения, осушитель содержится в резервуаре и, предпочтительно, присоединен к крышке резервуара, которая содержит фольгированный слой, и указанный резервуар продувают безводным азотом или аргоном или другим инертным газом, таким как благородный газ, до запаивания с помощью фольгированной крышки указанного

фольгированного резервуара, содержащего устройство доставки. Любой подходящий инертный газ можно использовать согласно настоящему изобретению для создания безводной инертной атмосферы.

[000104] В одном варианте реализации в композициях и способах получения препаратов и доставки вакцины против коронавируса, подходящей для внутрикожной доставки, используют модуль с пластырем. Указанный модуль с пластырем изготавливают и/или упаковывают в безводной инертной атмосфере в присутствии осушителя. В одном варианте реализации модуль с пластырем изготавливают в безводной инертной атмосфере и/или упаковывают в резервуар, содержащий фольгированный слой и содержащий безводную инертную атмосферу и осушитель. В одном варианте реализации модуль с пластырем изготавливают и/или упаковывают в неполном вакууме. В одном варианте реализации модуль с пластырем изготавливают и/или упаковывают в безводной инертной атмосфере и неполном вакууме. В одном варианте реализации модуль с пластырем изготавливают в безводной инертной атмосфере при неполном вакууме и/или упаковывают в резервуаре, содержащем фольгированный слой, в безводной инертной атмосфере, неполном вакууме и в присутствии осушителя.

[000105] В целом, в отмеченных вариантах реализации настоящего изобретения в инертной атмосфере должно содержаться по существу нулевое количество воды. Например, газообразный азот по существу с нулевым содержанием воды (безводный газообразный азот) может быть получен путем электроуправляемого кипячения жидкого азота. Системы продувки также можно применять для снижения влажности или содержания кислорода. Диапазон значений для неполного вакуума составляет от примерно 0,01 до примерно 0,3 атмосфер.

[000106] В одном варианте реализации композиции и способы получения препаратов и доставки вакцины против коронавируса, подходящей для внутрикожной доставки с использованием устройства доставки с микроиглами, изготавливают и/или упаковывают в безводной инертной атмосфере, предпочтительно, азоте или аргоне, и в присутствии осушителя или поглотителя кислорода.

[000107] В одном варианте реализации композиции и способы получения препаратов и доставки вакцины, подходящей для внутрикожной доставки с использованием устройства для доставки с микроиглами, изготавливают и/или упаковывают в резервуар с выстилкой из фольги, содержащий безводную инертную атмосферу, предпочтительно азот, и осушитель или поглотитель кислорода.

[000108] В одном варианте реализации композиции и способы получения препаратов и доставки вакцины, подходящей для внутрикожной доставки с использованием устройства доставки с помощью микроигл, изготавливают и/или упаковывают при неполном вакууме.

[000109] В одном варианте реализации композиции и способы получения препаратов и доставки вакцины, подходящей для внутрикожной доставки с использованием устройства для доставки с микроиглами, изготавливают и/или упаковывают в резервуар с выстилкой из фольги, содержащий безводную инертную атмосферу, предпочтительно азот, в неполном вакууме, и осушитель или поглотитель кислорода.

[000110] Согласно аспекту указанного варианта реализации изобретения, вакцина также содержит биосовместимый носитель. Согласно другому варианту реализации изобретения, предложена система внутрикожной доставки, приспособленная для доставки вакцины, содержащая: (а) элемент с микровыступами, содержащий множество

микровыступов, которые выполнены с возможностью прокалывания рогового слоя эпидермиса пациента; (b) препарат в виде гидрогеля, состоящую из вакцины против коронавируса, где указанный препарат в виде гидрогеля находится во взаимодействии с элементом с микровыступами; и (c) упаковку, подвергнутую продувке инертным газом и приспособленную для контроля условий окружающей среды, запаянную вокруг элемента с микровыступами, где указанная запаянная упаковка была подвергнута воздействию излучения для стерилизации элемента с микровыступами.

[000111] Согласно другому варианту реализации изобретения, предложена система внутрикожной доставки, приспособленная для доставки вакцины, содержащая: (a) элемент с микровыступами, содержащий множество микровыступов, которые выполнены с возможностью прокалывания рогового слоя эпидермиса пациента; (b) твердую пленку, расположенную в непосредственной близости от элементов с микровыступами, где указанная твердая пленка создана путем отливки жидкого препарата, содержащей вакцину, полимерный материал, пластификатор, поверхностно-активное вещество и летучий растворитель; и (c) упаковку, подвергнутую продувке инертным газом и приспособленную для контроля условий окружающей среды, запаянную вокруг элемента с микровыступами, где указанная запаянная упаковка была подвергнута воздействию излучения для стерилизации элемента с микровыступами.

[000112] Настоящее изобретение также относится к способу конечной стерилизации модуля-пластыря, приспособленного для доставки вакцины, включающему следующие этапы: (a) обеспечение элемента с микровыступами, содержащего множество микровыступов, выполненных с возможностью прокалывания рогового слоя эпидермиса пациента, содержащего нанесенное на указанный элемент с микровыступами

биосовместимое покрытие, содержащее вакцину против коронавируса; и (b) воздействие на указанный элемент с микровыступами воздействию излучением, выбранным из группы, состоящей из гамма-излучения и электронно-лучевого излучения, где указанное излучение является достаточным для достижения желаемого уровня гарантированной стерильности. Такой уровень гарантированной стерильности может составлять 10^{-6} или 10^{-5} . Способ может дополнительно включать запаивание элемента с микровыступами с осушителем внутри упаковки, которую продували инертным газом, и воздействие на упакованный элемент с микровыступами воздействию излучением, выбранным из группы, состоящей из гамма-излучения и электронно-лучевого излучения, где указанное излучение является достаточным для достижения желаемого уровня гарантированной стерильности.

[000113] Согласно аспекту указанного варианта реализации изобретения, способ также включает этап монтирования пластыря, состоящего из элемента с микровыступами, присоединенного к адгезивной подложке, на предварительно высушенное удерживающее кольцо с образованием модуля-пластыря, и последующего запаивания элемента с микровыступами внутри упаковки. Согласно аспекту указанного варианта реализации изобретения, система также содержит осушитель, запаянный внутри упаковки с модулем-пластырем, и/или упаковку продували азотом, и/или упаковка содержит пакет, состоящий из фольгированного слоя. Предпочтительно, фольгированный слой содержит алюминий.

[000114] Этап облучения элемента с микровыступами может осуществляться при температуре примерно $-78,5 - 25^{\circ}\text{C}$, или элемент может быть подвергнут облучению при температуре окружающей среды. Доза излучения может составлять в диапазоне от примерно 5 до 50 кГр, или от примерно 10 до 30 кГр, или от примерно 15 до 25 кГр, или примерно 21 кГр, или примерно 7 кГр. Согласно одному аспекту указанного варианта

реализации изобретения, излучение доставляется к элементу с микровыступами при скорости, составляющей по меньшей мере примерно 3,0 кГр/ч.

[000115] В одном варианте реализации покрытые вакциной микроиглы подвергают воздействию дозы излучения в диапазоне приблизительно 7-30 кГр. Более предпочтительно, в диапазоне 15-30 кГр, до достижения уровня гарантированной стерильности, составляющего от 10⁻⁵ до 10⁻⁶.

[000116] Настоящее изобретение относится к препаратам вакцин, которые при нанесении на элементы с микроиглами согласно настоящему изобретению являются стабильными при комнатной температуре в течение по меньшей мере 6 месяцев, или по меньшей мере 9 месяцев, или по меньшей мере 12 месяцев, или по меньшей мере 18 месяцев, или по меньшей мере 24 месяцев после облучения, как описано выше.

[000117] Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, высушенный препарат вакцины на микроиглах сохраняет по меньшей мере в течение 6 месяцев приблизительно 100% изначальной чистоты, или приблизительно 99% изначальной чистоты, или приблизительно 98% изначальной чистоты, или приблизительно 97% изначальной чистоты, или приблизительно 96% изначальной чистоты, или приблизительно 95% изначальной чистоты, или приблизительно 90% изначальной чистоты. В соответствии с другими аспектами, указанная чистота сохраняется в течение по меньшей мере 9 месяцев, или по меньшей мере 12 месяцев, или по меньшей мере 18 месяцев, или по меньшей мере 24 месяцев после упаковки.

[000118] В одном варианте реализации способ изготовления модуля-пластыря для устройства внутрикожной доставки, приспособленного для доставки вакцины, включает следующие этапы: обеспечение элемента с микроиглами, содержащего множество

микроигл, которые выполнены с возможностью проникновения через роговой слой или прокалывания рогового слоя эпидермиса пациента, содержащего биосовместимое покрытие, нанесенное на указанный элемент с микроиглами, где указанное покрытие образовано из нанесенным на него препаратом покрытия, содержащей вакцину, дисахарид и винную кислоту, лимонную кислоту, яблочную кислоту или малеиновую кислоту; запаивание элемента с микроиглами с осушителем внутри упаковки, продутой азотом и приспособленной для контроля условий окружающей среды вокруг микроигл, и воздействие на элемент с микроиглами излучением, выбранным из группы, состоящей из гамма-излучения, электронно-лучевого излучения и рентгеновского излучения, где указанное излучение является достаточным для достижения желаемого уровня гарантированной стерильности.

[000119] В соответствии с другим вариантом реализации изобретения, способ доставки стабильных препаратов биологически активного агента включает следующие этапы: (i) обеспечение элемента с микровыступами, содержащего множество микровыступов, (ii) обеспечение стабилизированного препарата биологически активного агента; (iii) образование биосовместимого препарата покрытия, которая содержит препарат стабилизированного биологически активного агента, (iv) покрытие элемента с микровыступами биосовместимым препаратом покрытия с образованием биосовместимого покрытия; (v) стабилизацию биосовместимого покрытия путем высушивания и (vi) нанесение покрытого элемента с микровыступами на кожу субъекта.

[000120] Дополнительно оптимальную стабильность и срок хранения агента достигают с помощью биосовместимого покрытия, которое является твердым и по существу сухим. Однако кинетика растворения покрытия и высвобождения агента может

варьировать значительно в зависимости от ряда факторов. Следует понимать, что помимо стабильности при хранении биосовместимое покрытие должно обеспечивать желаемое высвобождение терапевтического агента.

[000121] В настоящую заявку включены способы конечной стерилизации трансдермального устройства, приспособленного для доставки вакцины против коронавируса, включающие следующие этапы: обеспечение элемента с микровыступами, содержащего множество микровыступов, которые выполнены с возможностью проникновения через роговой слой или прокалывания рогового слоя эпидермиса пациента, содержащего биосовместимое покрытие, нанесенное на указанный элемент с микровыступами, где указанное покрытие образовано из нанесенного на указанный элемент препарата покрытия, содержащей вакцину; и воздействие на элемент с микровыступами воздействием излучением, выбранным из группы, состоящей из гамма-излучения и электронно-лучевого излучения, где указанное излучение является достаточным для достижения желаемого уровня гарантированной стерильности. Дополнительный аспект указанного способа включает дополнительный этап запаивания элемента с микровыступами внутри упаковки, приспособленной для контроля условий окружающей среды вокруг указанного элемента с микровыступами. Согласно одному аспекту, упаковка содержит фольгированный пакет. Дополнительный аспект указанного способа включает дополнительный этап запаивания осушителя внутри упаковки. Дополнительно способ включает этап установки элемента с микровыступами на предварительно высушенное удерживающее кольцо до запаивания указанного элемента с микровыступами внутри упаковки. Дополнительный аспект указанного способа включает

этап продувки упаковки инертным газом до запаивания указанной упаковки. В одном варианте реализации инертный газ содержит азот.

В. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[000122] Комбинации активный агент-устройство согласно настоящему изобретению можно применять для лечения различных заболеваний и состояний, включая вакцинацию против COVID-19, других коронавирусов и гриппа. Пациент может самостоятельно вводить пластырь с микроматрицей, покрытой вакциной, содержащий от примерно 5 мкг до примерно 500 мкг вакцины/антигена, с использованием устройства-аппликатора, описанного в другом месте в настоящей заявке. Пластырь наносят на выбранный участок кожи, в целом, плоский и не содержащий избыточного количества волос, такой как плечо, область около запястья, бедро, грудь или спина. Время ношения пластыря может варьировать от примерно 1 минуты до примерно 30 минут, или от примерно 5 минут до примерно 20 минут, или составлять примерно 10 минут. После этого пациент удаляет пластырь и выбрасывает его в мусор.

[000123] Пациент может получать пластырь в кабинете врача, аптеке, по почте или от работодателя. Пластырь не требует замораживания, предназначен для однократного применения и является одноразовым без необходимости использования шприцов, биоконтейнеров и т.д.

[000124] В одном варианте реализации когда пластырь с вакциной согласно настоящему изобретению вводят популяции пациентов, статистически значимое количество таких пациентов становятся успешно вакцинированными. Согласно другим вариантам реализации изобретения, по меньшей мере у 10% таких пациентов в сыворотке крови образуются защитные антитела, или по меньшей мере у 20%, или по меньшей мере у

30%, или по меньшей мере у 40%, или по меньшей мере у 50%, или по меньшей мере у 60%, или по меньшей мере у 70%, или по меньшей мере у 80%, или по меньшей мере у 90% таких пациентов в сыворотке крови образуются защитные антитела.

[000125] В соответствии с другими аспектами, покрытые вакциной пластыри, описанные в настоящей заявке, обеспечивают щадящий режим дозирования по сравнению с аналогами вакцин для внутримышечного или подкожного введения. Например, для пластырей согласно настоящей заявке требуется по меньшей мере на 5%, или по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30% меньше вакцины/антигена по сравнению с их аналогами для внутримышечного или подкожного введения.

ПРИМЕРЫ

[000126] Пример 1 – Подход к получению препарата, который обеспечивает нанесение стабильной трехвалентной вакцины против гриппа на трансдермальный пластырь с микровыступами

[000127] Как описано ниже, был успешно разработан трансдермальный пластырь с трехвалентной вакциной против гриппа, обладающий тремя ключевыми преимуществами по сравнению с препаратом трехвалентной вакцины против гриппа для внутримышечной (ВМ) инъекции: (1) отсутствие консервантов; (2) хранение при комнатной температуре и (3) щадящий режим дозирования. Что более важно, данные системы на основе пластыря доказали свою стабильность и эффективность в доклинических и клинических исследованиях.

[000128] Трехвалентная вакцина против гриппа, характеризующаяся двумя штаммами типа А и одним штаммом типа В вируса гриппа с 15 мкг гемагглютинина (НА)

в качестве поверхностного антигена для каждого штамма, в настоящее время продается в США в виде двух препаратов – инактивированного препарата форме (Fluzone®, Sanofi Pasteur; Fluvirin®, Novartis Vaccine; Fluvarix®, и FluLaval™ GlaxoSmithKline; Afluria®, CSL) и в виде живой ослабленной вакцины в виде назального спрея (FluMist®, Medimmune). Трехвалентная форма для инъекций доступна в виде стерильной суспензии, приготовленной из трех отдельных одновалентных штаммов вируса гриппа и вводится с помощью стандартной иглы и шприца, которые могут вызывать нежелательные болевые реакции и повышение расходов из-за нерешаемых проблем безопасности, связанных с острыми элементами. Кроме того, жидкие продукты для инъекций должны храниться при условиях заморозки, требующих дорогостоящего хранения с холодной цепью на протяжении процесса изготовления. В целях стерильности препарат для инъекций может содержать тимеросал на основе ртути в качестве консерванта в многодозовых флаконах. Несмотря на то что назальный спрей FluMist® предлагает альтернативу инъекциям с помощью иглы/шприца, он все же представляет собой жидкий препарат, требующий хранения с использованием холодной цепи при 2-8°C. В целом, существует острая необходимость в поиске альтернативных вариантов иммунизации вакциной против гриппа без использования игл, способных обеспечивать дополнительную эффективность расходов, заключающуюся в хранении без холодной цепи, и дополнительной безопасности, заключающейся в форме дозирования без консервантов.

[000129] Кожа содержит многочисленные антиген-презентирующие клетки (АПК), клетки Лангерганса (КЛ) в живом эпидермисе и дендритные клетки в дерме. АПК играют критичную роль в захватывании антигенов в коже, миграции в дренирующие лимфатические узлы и презентировании процессированных антигенов CD8+ и CD4+ T-

хелперным клеткам. Таким образом, как теперь очевидно из настоящего изобретения, вакцинация через кожу, т.е. трансдермальная иммунизация, создает возможность щадящего режима дозирования, что обеспечивает дополнительные преимущества, связанные с безопасностью пациента и снижением расходов. Эффективность иммунной системы кожи отвечает за успех и безопасность стратегий вакцинации через кожу путем внутрикожной вакцинации живой ослабленной вакциной против натуральной оспы и вакциной против бешенства с использованием одной пятой-одной десятой части от стандартных внутримышечных доз.

[000130] Все указанные выше требования привели к разработке новой системы доставки на основе трансдермального пластыря с микровыступами для трехвалентной вакцины против гриппа. Указанная трансдермальная система доставки с микровыступами способна проникать через поверхностный барьер кожи без боли или неудобства. Небольшой покрытый препаратом пластырь имеет площадь 5 см^2 и запаян в удерживающем пластырь кольце. Пластырь наносят с помощью ручного многоразового аппликатора (Фигура 1a). Пластырь содержит титановую матрицу с микровыступами ($\sim 1,300$ микровыступов на 2 см^2 , Фигура 1b), присоединенную к центру адгезивной подложки. Препарат вакцины нанесен на вершину каждого микровыступа. Пластырь и удерживающее кольцо прижимают к коже. Покрытые препаратом микровыступы проникают через поверхностный слой кожного барьера в эпидермальный/дермальный слои (на глубину 50-150 микрометров), где препарат вакцины быстро растворяется и высвобождается в кожу.

[000131] Нерасфасованная вакцина, т.е. данный жидкий продукт для инъекций, модифицировали и помещали на матрицу с микровыступами с помощью нового процесса нанесения покрытия, который требует высокой концентрации вакцины и других

физических свойств (описанных ниже). Одновалентные штаммы вируса гриппа представляют собой жидкости с низкой концентрацией, образующие сложные препараты в результате сложного процесса изготовления вакцины. Каждый штамм вируса гриппа размножали в аллантоисной жидкости куриных яиц с зародышами. Из аллантоисной жидкости частицы вируса гриппа концентрировали, очищали, разрушали с помощью детергента (Triton X-100), а затем инактивировали путем добавления формальдегида и/или дезоксихолата натрия для получения «расщепленного вируса» или «расщепленного вириона» для каждого из трех штаммов. Инактивированные штаммы суспендировали и объединяли в трехвалентный раствор, который должен храниться в условиях заморозки на протяжении процесса изготовления и транспортировки. Тимеросал или 2-феноксэтанол (2-PE) в норме добавляют в качестве консерванта в многодозовые флаконы. Таким образом, нерасфасованная вакцина может содержать нерастворимые частицы (не растворимые в воде липиды, липидно-белковые комплексы и агрегированные белки), Triton X-100, низкомолекулярные соединения и буферы.

[000132] Данный Пример 1 описывает процесс получения предварительных препаратов и препаратов, способный приводить к повышению концентрации вакцины в 200-500 раз и определяющий критичные параметры покрытия для изготовления системы доставки в виде пластыря. Пластыри, покрытые не содержащей консерванты трехвалентной вакциной против гриппа, оценивали на длительную стабильность и тестировали в доклинических исследованиях и в Фазе I клинических испытаний на человеке для демонстрации возможности исключения холодовой цепи, хранения при комнатной температуре и эффективной иммуногенности при щадящем режиме дозирования по сравнению с внутримышечным способом введения.

[000133] МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

[000134] Материалы

[000135] Экстракты одновалентного расщепленного вириона штамма вируса гриппа были получены путем инкубирования в яйце. Каждый раствор одновалентного штамма дополнительно обрабатывали перед применением, как описано ниже, в соответствии с разделом Методы. Сахарозу (номер партии 27412А, высокой степени чистоты, с низкой эндотоксичностью) и трегалозу (номер партии 26554А, высокой степени чистоты, с низкой эндотоксичностью) получали из компании Ferro-Pfanstiehl (Кливленд, Огайо) и использовали при получении. Поверхностно-активные вещества получали от различных поставщиков и использовали при получении – Tween 80, номер партии 58217 (ICN Biomedicals Inc., Аврора, Огайо); Zwittergent 3-14, номер партии В36399 (Calbiochem, Сан Диего, Калифорния); Triton X100, номер партии QC2755S4D1 (89521, Union Carbide Corporation, Хьюстон, Техас); Pluronic F68, номер партии 16Н1147 (Sigma, Сент-Луис, Миссури).

[000136] Система доставки в виде пластыря состоит из титановой матрицы с микровыступами площадью 2 см² (Кемас, Азуса, Калифорния) с общим количеством микровыступов 1300, где длина микровыступа составляет 225 микрометров, длина и ширина вершины микровыступа составляет 100 микрометров и 115 микрометров соответственно, и угол при вершине составляет 60 градусов (см. Фигуру 1d). Система доставки также состоит из поликарбонатного кольца (Jatco, Юнион-Сити, Калифорния), адгезивного пластыря размером 5 см² (Medical Tape 1523, 3М, Сент-Пол, Миннесота) и алюминиевого фольгированного пакета (Mangar, Нью-Британ, Пенсильвания).

[000137] Методы

[000138] Реометрия

[000139] Вязкость концентрированных препаратов покрытия определяли с использованием конического и плоского вискозиметра (Brookfield Eng. Lab., CAP 2000). Для каждого измерения требовалось 70 мкл жидкого образца. Вязкость определяли при нескольких скоростях сдвига и нескольких температурах для каждого жидкого образца.

[000140] Измерения краевого угла смачивания

[000141] Краевой угол смачивания между препаратом покрытия и титановыми субстратами определяли с использованием измерителя краевого угла смачивания (Tantec Inc., Schaumburg, IL) на основе метода измерения полуугла путем нанесения жидкой капли объемом 5 мкл на металлический титановый лист.

[000142] Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

[000143] СЭМ использовали для определения морфологии и распределения покрытия на микровыступах. Титановые матрицы с покрытием прикрепляли к алюминиевым стержням с помощью двустороннего углеродного скотча и помещали в вакуумную камеру для СЭМ (Hitachi, S-2460N).

[000144] Одномерная радиальная иммунодиффузия (ОРИД)

[000145] Анализ с помощью одномерной радиальной иммунодиффузии адаптировали для количественной оценки содержания НА вируса гриппа в исходных материалах, растворе покрытия и покрытых матрицах. В этом способе на основе пассивной

диффузии образец раствора и референсная вакцина после обработки детергентом диффундируют радиально из лунок и реагируют со специфичными антителами, которые равномерно распределены в гелевом матриксе. Взаимодействие антиген-антитело выявляют на основе измерения кольца преципитации вокруг лунки с антигеном (НА). Диаметр кольца продолжает увеличиваться до достижения равновесного состояния. При равновесном состоянии диаметр кольца преципитации пропорционален концентрации НА. После полной диффузии измеряют кольца преципитации для каждого раствора образца и референсной вакцины. Содержание гемагглютинина в образце определяют против ого референсного образца, предложенного Референс-центром по мониторингу гриппа и калиброванного в единицах мкг/мл.

[000146] Иммуноферментный анализ (ИФА)

[000147] Непрямой метод ИФА был разработан для выявления специфичных антител против гриппа в сыворотках бесшерстных морских свинок (hairless guinea pigs, HGP). Ранее не прямой ИФА был разработан для определения титра антител против овальбумина у HGP, иммунизированных покрытыми овальбумином матрицами. Для матриц, покрытых вакциной против гриппа, был разработан сходный анализ для специфичного определения конечного титра сывороток, полученных от HGP, иммунизированных вакциной против гриппа. Конечный титр определяют как обратное разведение образца сыворотки иммунизированных HGP, определенное с помощью нелинейной регрессии, при оптической плотности (OD), превышающей на три стандартных отклонения среднюю OD контрольных сывороток неиммунизированных HGP (n = 10).

[000148] Анализ с помощью бицинхониновой кислоты (BCA)

[000149] Содержание белка в необработанном материале, растворе покрытия и покрытых матрицах измеряли с помощью ВСА-анализа с использованием набора, полученного от компании Pierce (Рокфорд, Иллинойс). Ряд стандартов в серийных разведениях готовили непосредственно из необработанного материала вакцины. Неизвестные образцы разбавляли водой до концентрации, находящейся в пределах стандартного рабочего диапазона анализа. Стандарты и образцы наносили в 96-луночный планшет и помещали на считыватель для планшетов (Molecular Devices, SpectraMax 250), встряхивали в течение 30 секунд и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Поглощение измеряли при длине волны 562 нм и средние значения стандартов приводили к 4-параметрическому уравнению следующего вида:

$$y = \frac{(A - D)}{(1 + x/C)^B} + D$$

[000150] Метод Лоури

[000151] Общее содержание белка в некоторых образцах измеряли с помощью модифицированного метода Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве белкового стандарта. Метод Лоури основан на образовании комплекса синего окраса, образованного в результате реакции белка с ионами меди и последующего восстановления реагента Фолина-Чокальтеу комплексом белок-медь. Интенсивность синего окраса является пропорциональной количеству белка, присутствующего в образце, и измеряется с помощью спектрофотометра при длине волны 750 нм.

[000152] ДСН-ПААГ-электрофорез/Вестерн-блоттинг

[000153] Образцы белка НА вакцины против гриппа разделяли с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза на готовом геле NuPAGE, Invitrogen. Разделенные белки переносили методом блоттинга на поливинилиденфторидные (PVDF) мембраны в соответствии с инструкциями по применению элемента для блоттина XCell II «Novex Western Transfer Apparatus» (Invitrogen). PVDF мембраны после блоттинга метили разведенными первичными антителами против НА или антисывороткой против НА. Сайты неспецифического связывания блокировали с помощью фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 5% молоко и 0,1% Tween 20. Визуализацию результатов Вестерн-блоттинг осуществляли с использованием HRP-конъюгированных вторичных антител и реагента для выявления ECL от компании Amersham Pharmacia.

[000154] Анализ на Triton-X 100

[000155] Концентрацию поверхностно-активного вещества Triton-X 100 измеряли в жидких образцах с помощью двух способов – колориметрического анализа и метода ВЭЖХ. Колориметрический анализ включал образование комплекса с кобальтотиоцианатом аммония, который формировал преципитат синего цвета. Преципитат затем экстрагировали в этилендихлориде и измеряли поглощение с помощью спектрофотометрии. Метод ВЭЖХ представлял собой обращенно-фазовый метод с использованием колонки C4 и линейного градиента ацетонитрила.

[000156] Фильтрация с тангенциальным потоком (ФТП)

[000157] Использовали два типа ФТП-системы для диафильтрации и концентрирования экстракта расщепленного вириона гриппа: лабораторную систему ФТП (Millipore, Labscale), снабженную Pellicon XL, восстановленной целлюлозной мембраной

(Millipore, 50 см², с номинальным отсечением по молекулярной массе (MWCO) 30 кД), и крупномасштабную систему ФТП (Pall, Centremate™), снабженную полиэфирсульфоновой (ПЭС) мембраной (0,1 ft², MWCO 30 кДа). Фильтрацию с тангенциальным потоком использовали в качестве первого этапа для удаления солей и других низкомолекулярных соединений в качестве способа повышения содержания НА одновалентных штаммов. Стерильную воду для инъекций использовали для удаления низкомолекулярных материалов с помощью диафильтрации. Для эффективного удаления поверхностно-активного вещества, такого как Triton X-100, присутствующего в нерасфасованных препаратах одновалентных штаммов, использовали дополнительный этап ФТП-промывки. Этот этап промывки состоял из диафильтрации, предшествующего концентрированию, с использованием ¼ - 10 диаобъемов стерильной воды для инъекций. После диафильтрации и промывки объем каждого раствора вакцины снижался до 1/20 - 1/50 от исходного объема, что приводило к повышению концентрации НА до 5-10 мг НА/мл. Эта концентрация являлась предельной концентрацией, до которой можно было эффективно концентрировать вакцину с помощью ФТП-концентрирования. Дополнительное концентрирование одновалентных штаммов с помощью ФТП было невозможным из-за повышения обратного давления, наиболее вероятно вызванного засорением мембраны нерастворимыми частицами в растворе (см. раздел Обсуждение). Наблюдался высокий уровень восстановления концентрата НА из системы ФТП, составляющий обычно >95%, как определено с помощью белкового ВСА-анализа и ОРИД-активности до и после концентрирования. После ФТП-концентрирования одновалентные штаммы собирали, готовили в виде препарата и затем лиофилизировали в качестве способа дополнительного повышения концентрации НА.

[000158] Лиофилизация

[000159] Для доклинических исследований после ФТП-концентрирования растворы одновалентных штаммов наливали в стеклянные пробирки на 20 мл, подвергали быстрой заморозке с помощью жидкого азота и помещали на лиофильную сушилку коллекторного типа (Virtis, 25EL Freezemobile). Растворам позволяли замораживаться-высушиваться в течение 2-5 дней до тех пор, пока давление в камере не достигало равновесного состояния (~50 мТорр). Для клинического производства материалов из Фазы I 5 мл препарата ФТП-концентрата наливали в стеклянные пробирки на 20 мл и лиофилизировали в центробежной сушильной камере с механизмом укупоривания (Labconco, FreezeZone). Восстановление после лиофилизации было также высоким (>90%), как определено с помощью ВСА-анализа белка и ОРИД восстановленного высушенного замораживанием порошка.

[000160] Определение чистоты НА

[000161] Чистоту НА для одновалентных нерасфасованных вакцин определяли по отношению к общему белку и общему содержанию твердых веществ, присутствующих в растворе. Общий белок для одновалентного нерасфасованного препарата измеряли с помощью метода Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве референсного стандарта. %Чистоту НА по отношению к общему белку затем рассчитывали путем деления известного содержания НА образца на содержание общего измеренного белка. %Чистоту НА по отношению к общему содержанию твердых веществ определяли путем выпаривания части одновалентного нерасфасованного препарата до высыхания для

определения общей массы твердых веществ, присутствующих в растворе, и деления этого значения на известное содержание НА в образце.

[000162] Для оценки %чистоты НА в твердом веществе после очистки с помощью ФТП аликвоту 10 мл одновалентного нерасфасованного препарата концентрировали в фильтрующем приборе (Centricon, Millipore) приблизительно в 10 раз. Концентрат затем промывали и заново концентрировали с использованием двух объемов по 10 мл очищенной воды для удаления оставшихся после обработки солей и других низкомолекулярных материалов, присутствующих в необработанном материале. Концентрат затем выпаривали до высыхания и сухую массу оставшегося твердого вещества делили на количество НА, присутствующего в образце.

[000163] %Чистоту НА повторно оценивали после процесса лиофилизации путем взвешивания части высушенного замораживанием порошка и его анализа с помощью ОРИД после восстановления с помощью очищенной воды.

[000164] Матрицы с микровыступами и покрытие

[000165] Титановые матрицы с микровыступами изготавливали с помощью фото/химического травления и формовали с использованием контролируемого процесса изготовления. См., например, EP0914178B1.

[000166] Нанесение покрытия проводили при температуре окружающей среды с использованием вальца катка, вращающегося при скорости 50 об./мин, в резервуаре, содержащем препарат (2 мл по объему), с получением тонкой пленки с контролируемой толщиной, составляющей ~100 микрон. Матрицы с микровыступами погружали в

тонкую пленку и количество покрытия контролировали по количеству погружений (циклов) в пленку препарата. Интервал между каждым погружением составлял приблизительно 5 секунд, что является достаточным для высыхания нанесенного жидкого препарата в условиях окружающей среды.

[000167] РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

[000168] Параметры препарата для покрытия

[000169] Данная новая система на основе трансдермального пластыря с микровыступами содержала твердый препарат, нанесенный на матрицу с микровыступами. Таким образом, разработка жидкого препарата, который обеспечиваем процесс нанесения покрытия, предшествовала получению стабильной повышающего эффективность твердофазного препарата.

[000170] Жидкий препарат готовили таким образом, чтобы он изначально удовлетворял трем ключевым параметрам препарата покрытия – концентрации вакцины, вязкости и поверхностной активности. Более конкретно, жидкий препарат с высокой концентрацией вакцины и достаточно высокой вязкостью является предпочтительной (но не обязательной) для гарантии того, что каждое погружение микровыступов в жидкий препарат сможет привести к сбору достаточного объема жидкости для высушивания, что может обеспечивать достижение желаемой дозы вакцины при минимальном количестве погружений. Вязкость раствора покрытия должна быть достаточно высокой так, чтобы нанесенная жидкость не стекала быстро обратно после погружения, но перед высыханием. Также является важным ньютоновское поведение жидкого препарата в резервуаре, содержащем указанное лекарственное средство покрытия, т.е. постоянная вязкость при

скорости сдвига, поскольку процесс нанесения покрытия включает определенный уровень сдвига с помощью вальца катка. Поверхностная активность представляет собой параметр, определяющий гидрофильную границу раздела между жидким препаратом и титановой поверхностью, которую можно оценить количественно путем измерения краевого угла смачивания. Предпочтительный краевой угол смачивания составляет от 30 градусов до 60 градусов (по сравнению с краевым углом смачивания между водой и титановой поверхностью, составляющим от 70 градусов до 80 градусов). Поверхностно-активное вещество часто необходимо, если препарат вакцины не является достаточно гидрофильной для титановой поверхности.

[000171] Более того, повышение чистоты вакцины (антигена), т.е. снижение количества не вносящих вклад в иммуногенность соединений в препарате, является важным моментом, поскольку препарат наносится на вершину микровыступа, которая имеет ограниченную площадь поверхности. Избыточное количество препарата, нанесенное на вершину микровыступа, может притуплять микровыступ, препятствуя его проникновению в кожу. Конструктивные переменные, приведенные выше, относятся к подходам к получению предварительного препарата/получению препарата, как описано ниже.

[000172] Одновалентный нерасфасованный препарат

[000173] Каждый нерасфасованный раствор был непрозрачным при получении, что указывало на присутствие нерастворимых частиц, возможно, из-за не растворимых в воде липидов, липидно-белковых комплексов и агрегированных белков. Концентрация гемагглютининового антигена (НА) в растворе нерасфасованного препарата была низкой, ~0,1 - 0,2 мг/мл, и чистота НА варьировала обычно в диапазоне $20 \pm 5\%$ от общего

количества твердого вещества (низкомолекулярных растворенных компонентов, белков и нерастворимых частиц) и $40 \pm 10\%$ по общему содержанию белка (НА и не представляющие собой НА белки). Для нанесения НА антигена на матрицу с микровыступами нерасфасованный раствор должен быть модифицирован для повышения концентрации и чистоты НА. Поскольку не представляющие собой НА белки и частицы могут вносить вклад в иммунные ответы, чистоту НА можно улучшать только путем удаления низкомолекулярных материалов, которые включают буферы, соли и поверхностно-активные вещества, такие как Triton-X 100 (используемый для разделения вирусных частиц во время изготовления вакцины). Удаление низкомолекулярных соединений осуществляли путем диафильтрации.

[000174] Процесс фильтрации с тангенциальным потоком (ФТП)

[000175] В ФТП-системе, содержащей мембрану с MWCO 30 кДа, одновалентный нерасфасованный препарат изначально концентрировали для снижения его объема до 1/20 - 1/50 от исходного объема и промывали 10 диаобъемами 10 мМ фосфатного буфера. Однако это процесс приводил к незначительному повышению %чистоты НА, на <15%, и значительному повышению концентрации Triton-X 100 (MW 625 Дальтон). Образование высокомолекулярных мицелл Triton-X 100 являлось причиной, по которой этот процесс не приводил к эффективному удалению Triton-X 100.

[000176] Известно, что Triton-X 100 образует мицеллы с молекулярной массой 80000 дальтон с критической концентрацией мицелл (СМС), составляющей 0,13-0,56 мг/мл. Одновалентный нерасфасованный препарат обычно содержал 0,1-0,3 мг/мл Triton-X 100, которая превышает концентрацию НА и уже близка или достигает его СМС. Таким

образом, на этапе первоначального концентрирования Triton-X 100 хорошо проходил с превышением его СМС для достижения такой высокой концентрации, как 15 мг/мл, и образовывал мицеллы Triton-X, которые были слишком большими для прохода через мембрану с MWCO 30 кДа.

[000177] Таким образом, процесс был модифицирован для добавления дополнительного промывочного этапа до концентрирования. Этот процесс обеспечивал поддержание относительно низкой концентрации Triton-X 100 во время диафильтрации и позволял эффективное снижение поверхностно-активного вещества в растворе одновалентного нерасфасованного препарата. Было обнаружено, что примерно 95% Triton-X 100 могло быть удалено после использования двух диаобъемов дистиллированной воды. К сожалению, такой низкой объем поверхностно-активного вещества ухудшал восстановление НА на 5-10%. Механизм ухудшения восстановления НА неясен, но, возможно, обусловлен сниженной растворимостью белка и/или повышенной гидрофобностью мембраны для диафильтрации. Было определено, что оптимальное массовое отношение НА к Triton-X 100 составляло в диапазоне 2:1 - 5:1 и приводило к очистке большей части избыточного Triton-X 100 без значительного снижения восстановления НА. После первоначальной промывки промытый раствор концентрировали до 1/20 - 1/50 от его исходного объема, повышая концентрацию НА до 5 - 10 мг НА/мл. Твердая композиция полученного в результате ФТП концентрата содержала $45 \pm 5\%$ НА при концентрации 10 - 15 мг НА/мл; $15 \pm 5\%$ Triton-X 100 (3 - 5 мг/мл), и остаточные не представляющие собой НА белки и нерастворимые частицы, создающие оставшуюся массовую долю белого непрозрачного раствора – $40 \pm 10\%$.

[000178] Указанный раствор не обеспечивал целевой концентрации НА для покрытия, составляющей 40-50 мг/мл. К сожалению, дополнительное концентрирование в ФТП-системе достигало предела вязкости, при которой точечное выпускное и обратное давление становилось таким высоким, что могло создавать риск нарушения целостности мембраны. Таким образом, дополнительное концентрирование достигали путем лиофилизации ФТП-концентрата и последующего восстановления до желаемой концентрации НА.

[000179] Процесс лиофилизации

[000180] Перед замораживанием-высушиванием к ФТП-концентрату добавляли сахарозу или трегалозу в качестве лиопротектора (в массовом отношении лиопротектор:НА 1:1). Эффект указанных двух дисахаридных стабилизаторов оценивали, подвергая препарат 10 циклам замораживания/оттаивания (заморозка с помощью жидкого азота и немедленное оттаивание при комнатной температуре). Как определено с помощью ИФА, активность НА до и после 10 циклов замораживания/оттаивания не изменялась (данные не представлены), предполагая сохранение стабильности антигена при применении трегалозы или сахарозы. Тогда как для твердых биофармацевтических препаратов в норме требуются более высокие массовые отношения лиопротектора для достижения длительной стабильности белка, более важно ограничивать общее содержание твердого вещества в препарате для сохранения компактной по размеру морфологии покрытия на вершинах микровыступов, которая важна для эффективности проникновения вершин микровыступов. Затем к замороженному ФТП-концентрату добавляли сахарозу в массовом отношении сахароза:НА 1:1 для лиофилизации. Твердая композиция полученной лиофилизированной вакцины содержала

30+5% НА, 30+5% сахарозы, 10+5% Triton-X 100 и не относящиеся к НА белки и твердые частицы, формирующие оставшуюся фракцию, составляющую 30+15%.

[000181] Препарат покрытия

[000182] Для получения покрытия в виде жидкого раствора каждый из лиофилизированных одновалентных препаратов восстанавливали в стерильной воде для инъекций в объеме, меньшем в четыре-пять раз исходного объема до лиофилизации, для дополнительного повышения концентрации НА до 40-50 мг НА/мл. Это приводило к образованию тонкодисперсной суспензии восстановленной вакцины. Аликвоты восстановленных одновалентных растворов затем объединяли в отношении 1:1:1 НА на основе значения их ОРИД-активности с получением трехвалентного раствора покрытия, где каждый штамм присутствовал в концентрации, составляющей ~14-15 мг НА/мл. Снова готовили трехвалентный жидкий препарат покрытия для удовлетворения трем ключевым параметрам препарата покрытия – концентрации вакцины, вязкости и поверхностной активности.

[000183] Концентрация вакцины

[000184] Препарат раствора покрытия получали таким образом, чтобы концентрация вакцины в указанном растворе была максимально высокой для минимизации количества циклов нанесения покрытия, т.е. количества погружений в пленку на вращающемся барабане, требуемых для достижения целевой дозы для минимизации времени изготовления, требуемого для получения каждого пластыря. Однако вязкость и стабильность раствора покрытия ограничивали концентрацию вакцины, используемую для покрытия. В данном Примере, как было обнаружено, растворы покрытия с концентрацией

НА 60 мг НА/мл или более являлись слишком вязкими для образования сплошной тонкой пленки на барабане и застывали со временем при непрерывном поворачивании в устройстве для нанесения покрытия. По этой причине концентрацию НА поддерживали между 40 и 50 мг общего НА/мл. В следующей таблице суммированы значения концентрации и чистоты НА по отношению к общему содержанию твердых веществ на различных этапах процесса получения предварительного препарата/получения препарата.

[000185] Таблица 1. Краткое описание концентрации и чистоты НА во время процесса получения предварительного препарата.

	Одновалентный нерасфасованный препарат	ФТП-концентрат	Лиофилизированный порошок	Трехвалентный раствор покрытия
Концентрация НА (мг/мл)	0,1 - 0,2	5 - 10	-	В общем 40 - 50 (13 - 17 на штамм)
Чистота НА по отношению к общему содержанию твердых веществ (%)	20 - 30	40 - 50	20 - 30*	20 - 30

*После добавления лиопротектора

[000186] **Вязкость**

[000187] Вязкость раствора покрытия, контролируемая общей концентрацией антигена, не представляющих собой НА белков/частиц и Triton-X 100, влияет на поток тонкой пленки на вершинах микровыступов во время процесса покрытия. Каждое погружение вершины микровыступа обеспечивает сбор некоторого количества раствора

покрытия. Если вязкость раствора слишком низкая, раствор на вершине микровыступа может стекать обратно в пленку раствора покрытия до того, как он достигает высыхания. Если вязкость раствора слишком высока, жидкость будет течь слишком медленно для того, чтобы равномерно покрыть микровыступы в необходимом количестве. Было определено экспериментальным путем, что диапазон вязкости жидкого препарата составляет от 0,20 до 1,50 пуаз для приобретения приемлемой морфологии покрытия. Значения вязкости при различных скоростях сдвига для концентраций препарата вакцины против гриппа, состоящей из трех НА/сахарозы (в массовом отношении 1:1), составляющих 50, 40 и 35 мг/мл, показаны на Фигуре 2. Как ожидалось, было обнаружено, что вязкость раствора покрытия прямо связана с концентрацией НА в препарате. Концентрация НА, составляющая 50 мг/мл, приводила к желаемой вязкости раствора покрытия для нанесения покрытия при всем диапазоне скоростей сдвига и также требовала минимального количества циклов нанесения покрытия благодаря достаточно высокой концентрации.

[000188] Поверхностная активность

[000189] Раствор покрытия также должен обладать подходящей поверхностной активностью для эффективного смачивания вершин микровыступов. Смачивающая способность, зависящая от поверхностного натяжения жидкости и поверхностной энергии субстрата, является показателем способности раствора покрытия прикрепляться, адгезировать и распределяться по поверхности микровыступов и может быть определена путем измерения краевого угла смачивания. Слабая смачивающая способность будет либо препятствовать захвату жидкости, либо приводить к неравномерному локальному покрытию. Жидкий препарат, содержащий поверхностно-активные агенты, может влиять на поверхностное натяжение и улучшать поверхностную смачивающую способность путем

снижения краевого угла смачивания между раствором и субстратом. По сравнению с краевым углом смачивания чистой воды на титановом субстрате (80°), препарат покрытия (равное массовое отношение НА и сахарозы) показала хорошую смачивающую способность, где краевые углы смачивания варьировали от 26° до 36° , независимо от концентрации НА. Антиген НА и/или Triton-X 100 могли являться поверхностно-активными агентами в указанном препарате. Кроме того, к препарату покрытия добавляли некоторые поверхностно-активные вещества, такие как Tween 80, Pluronic F68 и Zwittergent 3-14 (вплоть до 1%), краевой угол смачивания на титановой поверхности оставался таким же (данные не представлены). Это наблюдение снова дает основания предполагать, что препарат покрытия обладает изначальной поверхностной активностью, которая будет благоприятно влиять на процесс нанесения покрытия.

[000190] Металл титан, как известно, образует на поверхности тонкие оксидные пленки (главным образом на основе TiO_2) и его поверхностная активность является динамичной в зависимости от толщины, микроструктуры и состава указанной тонкой пленки. Абсорбция на поверхности органических соединений из окружающего воздуха также значительно влияет на поверхностную активность, гидрофильность или гидрофобность. Для оценки эффекта поверхностной энергии металла титана на смачивающую способность препарата указанный металл титан предварительно обрабатывали путем нагрева при $250^\circ C$ в течение 1 часа. Высокотемпературный нагрев может приводить к сжиганию загрязнителей и придавать поверхности более высокую степень гидрофильности. В самом деле, для предварительно нагретого титана было показано значительное снижение краевого угла смачивания чистой водой – 50° по сравнению с 80° для необработанной поверхности титана, что предполагает существенное

повышение гидрофильности (или поверхностной энергии) предварительно нагретой поверхности титана. Интересно, что краевые углы смачивания для препарата покрытия на предварительно нагретых титановых поверхностях оставалась неизменной (от 26° до 36°), что дает основания полагать, что свойства препарата покрытия пересиливали поверхностную активность титанового субстрата. В целом, раствор покрытия проявлял сильные смачивающие свойства, на которые минимально влиял субстрат покрытия, и показал превосходные покрывающие способности.

[000191] Физическая стабильность препарата покрытия

[000192] Несмотря на подходящие для покрытия физические свойства препарата покрытия, содержащей 50 мг/мл НА/сахарозу, указанный препарат представляет собой, однако, молочно-белый суспензионный раствор. Эта тонкодисперсная суспензия с отсутствием видимых частиц может содержать в основном наночастицы. Данные суспензионный раствор считался физически стабильным, поскольку не наблюдалось фазы разделения (осаждения частиц) после хранения указанного раствора при замораживании в течение месяца. Более того, не наблюдалось явного осаждения частиц после центрифугирования раствора в течение 2 минут при 7000 об./мин. Подобно стабильной эмульсии по типу «масло в воде» или по типу «вода в масле», которая обычно стабилизируется эмульгатором (или поверхностно-активным веществом), суспензия наночастиц, возможно, стабилизируется детергентом Triton-X 100.

[000193] Процесс нанесения покрытия

[000194] Прибор для нанесения покрытия содержал резервуар для раствора покрытия и барабан из нержавеющей стали, который контактировал с раствором покрытия.

Барабан вращался для создания непрерывной тонкой пленки (толщиной ~100 мкм) препарата покрытия, в которую погружали вершины микровыступов на титановых матрицах. С точным контролем глубины погружения только вершины микровыступов покрывали препаратом покрытия. Благодаря относительно малому объему препарата, покрывающего вершины микровыступов, высокого содержания твердого вещества препарата и очень большой площади поверхности матрицы ожидается, что жидкое покрытие на поверхности микровыступа будет высыхать на воздухе менее чем за 5 секунд после нанесения покрытия в условиях окружающей среды. Нанесенное количество вакцины контролировали по количеству погружений матрицы в тонкую пленку и отслеживали с помощью ВСА и/или ОРИД.

[000195] На Фигуре 3 показана типичная морфология покрытия на вершине микровыступа. Покрытие было равномерно распределено по всем микровыступам (Фигура 3a) и располагалось на вершине микровыступа (Фигура 3b-d – вид сбоку, вид сверху и вид спереди одного микровыступа).

[000196] Поскольку раствор покрытия подвергается высоким усилиям сдвига во время процесса нанесения покрытия, препарат должен быть приемлемо стабильным с точки зрения физической стабильности тонкой пленки, используемой для покрытия, и химической стабильности антигена в растворе. Физическую стабильность препарата покрытия определяли путем отслеживания вязкости раствора при продолжительном сдвиге, имитированном в реометре. Физическая нестабильность препарата покрытия, подвергавшейся постоянному усилию сдвига, наблюдалась для некоторых биофармацевтических препаратов, о чем свидетельствует образование геля и разрыв тонкой пленки, приводящий к повышенной вязкости раствора. За химической стабильностью

следили периодически во время одночасового цикла нанесения покрытия с помощью *in vitro* анализа активности, ОРИД. Как вязкость, так и активность по результатам ОРИД оставались неизменными во время непрерывного прикладывания усилия сдвига в течение одного часа.

[000197] Несмотря на то, что процесс получения предварительного препарата и покрытия был разработан для нерасфасованной одновалентной вакцины, был получен препарат трехвалентной вакцины, которая описана ниже.

[000198] Изготовление трехвалентной вакцины против гриппа

[000199] Три одновалентных штамма – A/New Caledonia (H1N1), A/Panama (H3N2) и B/Shandong – в концентрации, варьирующей от 125 до 500 мкг НА/мл, использовали для Фазы I клинического производства трехвалентных систем трансдермальной доставки. Приблизительно 2 литра каждого одновалентного штамма нерасфасованного препарата вирусного экстракта диафильтровали и затем концентрировали до 10 мг НА/мл на ФТП-приборе. Затем получали препараты отдельных концентрированных растворов одновалентных штаммов с массовым отношением НА:сахароза 1:1 и замораживали-высушивали с получением формы порошка. Три высушенных замораживанием порошка затем восстанавливали и объединяли с получением трехвалентного раствора покрытия (1:1:1) в концентрации, составляющей 42 мг НА/мл (14 мг НА/мл для каждого одновалентного штамма). Этот раствор покрытия обладал приемлемой вязкостью и смачивающей способностью для нанесения целевой дозы, составляющей 30 мкг НА трехвалентной вакцины (т.е. ~10 мкг на одновалентный штамм) с минимальным количеством погружений на матрицу. После покрытия приемлемые системы упаковывали

в продутые азотом термозапаянные фольгированные пакеты и хранили при 2-8°C. Репрезентативные системы выбирали из клинической серии, прошедшей клинические испытания, и тестировали на соответствие для выпуска партии с помощью ОРИД-анализа. Все тестированные системы удовлетворяли спецификациям для выпуска партии, составляющим > 8 мкг НА/пластырь. Средние значения для 20 систем, случайным образом выбранных из партии, составляли: 11,0 мкг А/New Caledonia, 13,3 мкг А/Panama и 12,2 мкг В/Shangdong с относительными стандартными отклонениями в пределах 6%.

[000200] Вопросы стабильности

[000201] Крайне важным является поддержание стабильности антигена на протяжении процесса получения предварительных препаратов (диафильтрации/концентрирования, лиофилизации и восстановления). В отличие от всех стрессов, связанных с обработкой, беспокойство вызывал эффект высокой концентрации Triton-X 100, присутствующей в препарате покрытия, на антигенность НА, поскольку концентрация Triton-X 100 была повышена более чем в 10 раз – от 0,1 - 0,3 мг/мл до 3 - 5 мг/мл (см. Раздел ФТП-процесс).

[000202] Для оценки этого эффекта проводили анализ с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга вакцины А/Panama после проведения ряда этапов получения предварительного препарата (Фигура 4), включая высушенную замораживанием вакцину, восстановленную в отсутствие поверхностно-активных веществ и в присутствии трех поверхностно-активных веществ в высокой концентрации – ДСН (10%), Triton-X 100 (10%), или Zwittergent 3-14 (5 и 10%). Очевидно, что при невосстанавливающих условиях для гелей, окрашенных Кумасси бриллиантовым синим (гели после ДСН-ПААГ-

электрофореза слева), все дорожки, присутствующие в исходной вакцине, также присутствовали в восстановленных образцах, что предполагает отсутствие поддающейся выявлению деградации для любой из оцениваемых препаратов. При переносе с гелей на мембрану для анализа с помощью Вестерн-блоттинга (Фигура 4, гели справа), снова не было замечено различий между различными препаратами и исходной одновалентной вакциной. Серии дорожек, отражающие связывание между НА белком и антителами против НА, встречались главным образом в области высокой молекулярной массы. По результатам совпадений дорожек и интенсивности дорожек НА (по сравнению с исходной вакциной) препараты, которые были высушены замораживанием и подвергнуты воздействию сильных поверхностно-активных веществ в высокой концентрации, сохраняли антигенность. При восстанавливающих условиях во всех препаратах наблюдались дорожки, сходные с дорожками в исходной вакцине на гелях после ДСН-ПААГ-электрофореза. Паттерны дорожек на гелях для Вестерн-блоттинга также хорошо совпадали между всеми препаратами.

[000203] Длительную стабильность конечного продукта оценивали с использованием систем, полученных во время Фазы I клинического производства. Продутые азотом термозапаянные фольгированные пакеты помещали в камеры с контролируемой влажностью при температуре 5 °C и 25 °C и хранили в течение вплоть до 12 месяцев для оценки стабильности. Значения активности НА для каждого штамма, определенные с помощью ОРИД, использовали в качестве анализа для определения стабильности и сравнивали с данными высвобождения для выпуска партии T=0 для каждого из трех одновалентных штаммов. Данные (Фигура 5), представленные как процент от исходной активности для трехвалентной вакцины на Фигуре 5, дают основания

предполагать, что через 12 месяцев сохранялась хорошая стабильность НА (>85% от изначальной стабильности) как при 5°C, так и при 25 °C, что указывает на потенциальную стабильность при комнатной температуре указанного продукта.

[000204] Эффективность иммуногенности системы с покрытием, содержащей вакцину против гриппа

[000205] Доклинические данные по иммуногенности были получены на бесшерстных морских свинках, которые имеют структуру кожи, сходную с человеком. Положительные иммунные ответы на указанной животной модели эффективности подтолкнули заявителя к решению перейти к Фазе I исследований на человеке с использованием препарата в виде пластыря. Процент сероконверсии с достижением ингибирования гемагглютинаина (НАИ) при введении с помощью трансдермального способа (7-8 мкг НА на штамм для двух вариантов дизайна пластыря) был выше по сравнению с внутримышечным способом (ВМ) способом введения (15 мкг НА на штамм) (Таблица 2). Эти данные предполагают, что даже при меньшем на 50% содержании антигена иммунные ответы (на 28 день после первичной иммунизации), вызванные пластырем, были эквивалентны или превосходили ответы, вызванные ВМ инъекцией.

[000206] Таблица 2: Краткое описание доклинических результатов по иммуногенности

Способ доставки	Время ношения пластыря	Доза трехвалентного НА (1:1:1)	Первичная иммунизация (28 день), %сероконверсия (п/общее количество)		
			Ингибирование НА (≥10)		
			Штамм А/Н1N1	Штамм А/Н3N2	Штамм В
ВМ	Не применимо	45 мкг	90 (9/10)	30 (3/10)	40 (4/10)
Пластырь, вариант дизайна №1	15 мин	21 мкг	100 (10/10)	60 (6/10)	90 (9/10)

Пластырь, вариант дизайна №2	15 мин	25 мкг	100 (10/10)	50 (5/10)	60 (6/10)
------------------------------------	--------	--------	-------------	-----------	-----------

[000207] Клиническая валидация эффективности и безопасности устройства с микроиглами для доставки вакцины на человеке

[000208] Фазу 1 клинического исследования (одноцентрового открытого рандомизированного) проводили для сравнения эффективности трехвалентных антигенов гриппа, вводимых с помощью пластыря с микроиглами, по сравнению с доставкой трехвалентной вакцины с помощью стандартного внутримышечного введения. Для проведения настоящего исследования здоровым мужчинам и женщинам (в возрасте 18-40 лет; ~30 субъектов/группа) проводили лечение пластырем с микроиглами, покрытыми каждым антигенным штаммом (A/New Caledonia (H3N2), A/Panama (H3N2), B/Shandong); по 12 мкг каждого штамма) или коммерческой вакциной, доставляемой ВМ путем (по 15 мкг каждого штамма). После нанесения пластырь носили в течение 5 или 15 минут.

[000209] Результаты, полученные на выборке для анализа иммуногенности, представлены в таблице 3 для всех трех групп для каждого штамма.

[000210] Таблица 3: Результаты по иммуногенности (НІ – 1/разведение) в соответствии с Критериями Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМЕА), примечания к Руководству по выборки для анализа иммуногенности

	Требования ЕМЕА, в течение 18 - 60 лет*	Время ношения пластыря 5 минут N=32 ¶	Время ношения пластыря 15 минут N =29 ¶	ВМ N =29 ¶
Выборка для анализов		27	27	28

	Требования ЕМЕА, в течение 18 - 60 лет*	Время ношения пластыря 5 минут N=32 ¶	Время ношения пластыря 15 минут N =29 ¶	BM N =29 ¶
иммуногенности для всех трех штаммов (n)				
Штамм: A/H1N1				
Индекс сероконверсии ¹ или значительное повышение титра HI ² на 21 день	>40%	81,5 (61,9 - 93,7)	96,3 (91,0 - 99,9)	89,3 (71,8 -97,7)
Геометрическое среднее повышения титров\	2,5	18,0 (10,5 - 30,7)	50,1 (31,3 - 80,2)	27,2 (15,3 – 48,4)
Процент субъектов, в сыворотке крови которых образуются защитные антитела** на 21 день	>70%	88,9 (70,8 - 97,6)	100 (87,2 – 100)	92,9 (76,5 -99,1)
Штамм: A/H3N2				
Индекс сероконверсии ¹ или значительное повышение титра HI ² на 21 день	>40%	44,4 (25,5 – 64,7)	51,9 (31,9 – 71,3)	71,4 (51,3 – 86,3)
Геометрическое среднее повышения титров\	2,5	4,91 (2,61 – 9,24)	4,10 (2,56 -6,57)	8,72 (4,45 – 17,1)
Процент субъектов, в сыворотке крови которых	>70%	100 (87,2 – 100)	96,3 (81,0 – 99,9)	100 (8,7 -100)

	Требования ЕМЕА, в течение 18 - 60 лет*	Время ношения пластыря 5 минут N=32 ¶	Время ношения пластыря 15 минут N =29 ¶	BM N =29 ¶
образуются защитные антитела ** на 21 день				
Штамм: В				
Индекс сероконверсии ¹ или значительное повышение of HI titer ² на 21 день	>40%	74,1 (53,7 – 88,9)	74,1 (53,7 -88,9)	67,9 (47,6 -84,1)
Геометрическое среднее повышения титров\	2,5	13,7 (8,81 – 21,3)	13,9 (8,41 – 23,0)	10,4 (6,15 – 17,5)
Процент субъектов, в сыворотке крови которых образуются защитные антитела ** на 21 день	>70%	81,5 (61,9 - 93,7)	77,8 (57,7 – 91,4)	75,0 (55,1 – 89,3)

[000211] *Руководство ЕМЕА: Комитет по патентованным лекарственным продуктам (CPMP), примечания к Руководству по гармонизации требований для вакцин против гриппа, март 1997 г.; ¹Доля субъектов с титром до вакцинации <10 (1/разведение) и титром после вакцинации >=40 (1/разведение); ²Доля субъектов с титром до вакцинации <10 и титром после вакцинации >=4-кратный титр; \ в «Руководстве»: среднее геометрическое повышения между 0 и 21 днем; **Доля субъектов, у которых титр после вакцинации достигал >=40 (1/разведение); ¶ Статистические данные с 95% доверительным интервалом.

[000212] Три критерия ЕМЕА были удовлетворены для всех штаммов через 21 день после вакцинации для всех трех лечебных групп. Результаты по иммуногенности для обеих групп, получающих лечение пластырем с микроиглами, были в целом сходны с результатами для группы, получавшей ВМ введение. Оказалось, что время ношения пластыря не оказывало сильного влияния на уровень гуморального ответа. Данные по содержанию общего IgE (неспецифического) были сходными между тремя группами и варьировали между 24,7 и 41,6 кЕ/л. Для IgA и IgG (против штамма А/Н1N1) значения на 0 день (до вакцинации) были сходными между группами. Через 21 день после вакцинации как IgA, так и IgG, были в 5-11 раз выше по сравнению с 0 днем, различий между группами не наблюдалось. Группы, получавшие лечение пластырем с микроиглами, показали иммунный ответ, сходный с контрольной группой, получавшей ВМ введение.

[000213] ЗАКЛЮЧЕНИЕ

[000214] Трансдермальный пластырь с трехвалентной вакциной против гриппа был успешно разработан и доказал свою эффективность в доклинических исследованиях и в фазе I клинических испытаний на человеке. Был разработан уникальный процесс получения предварительного препарата, состоящий из диафильтрации/начального концентрирования с помощью системы ФТП, лиофилизации и восстановления для приготовления растворов с высокой концентрацией НА (~40-50 мг НА/мл) для покрытия. Этот процесс получения предварительного препарата был высоко эффективным и приводил к очень низкой потере антигена (выход процесса >85%). Следующий раствор покрытия, полученный после процесса получения предварительного препарата, оптимизировали таким образом, чтобы он обладал приемлемой физической и химической стабильностью для нанесения на вершины титановых микровыступов. Препарат в виде пластыря показал

три ключевых преимущества по сравнению с доступными в настоящее время препаратами: отсутствие консервантов, хранение при комнатной температуре и щадящий режим дозирования. Учитывая успех применения описанного выше трансдермального пластыря, специалисту в данной области техники будет очевидно, что такие методы можно экстраполировать на любую вакцину, которая может быть представлена в виде раствора покрытия (с использованием сходных или отличных вспомогательных веществ) и наноситься на матрицы с микровыступами в терапевтически эффективных количествах.

[000215] Пример 2 — Вакцина против коронавируса с использованием синтетических пептидных антигенов на трансдермальном пластыре с микровыступами

[000216] Пластыри с вакциной против коронавируса готовили в целом в соответствии с Примером 1, за исключением того, что антиген представлял собой синтетические пептиды. В данном неограничивающем примере такие синтетические пептиды представляли собой пять пептидных антигенов. Пять пептидов смешивали в отношении 1:1:1:1:1. Затем смесь наносили на пластырь с микровыступами в дозе, составляющей от примерно 50 до примерно 100 мкг на пептид. Препарат смеси получали при значении pH от примерно 3 до примерно 9,5. Пять пептидов представляли собой следующие пептиды:

HP201-215	DLFGIWSKVYDPLYC
NS3974	YNGSICVIGTPLSRFMGF
Core57	AKRRRRHRRDQGGWRRSP
Core78	VDPYVRQGLQILLPSAAY
Core113	GTLGWTADLLHHVPLVGP

[000217] Пластыри оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза/Вестерн-блоттинга и доклинические данные по иммуногенности получали на бесшерстных морских свинках, в целом, в соответствии с процедурами, описанными в Примере 1.

[000218] Клинические испытания на человеке также проводят в целом в соответствии с протоколом Примера 1.

[000219] Заявитель ожидает, что при введении пластыря с вакциной из Примера 2 популяции пациентов будет достигаться успешное вакцинирование статистически значимого количества таких пациентов. Согласно другим вариантам реализации изобретения, по меньшей мере у 10% таких пациентов в сыворотке крови будут образоваться защитные антитела, или по меньшей мере у 20%, или по меньшей мере у 30%, или по меньшей мере у 40%, или по меньшей мере у 50%, или по меньшей мере у 60%, или по меньшей мере у 70%, или по меньшей мере у 80%, или по меньшей мере у 90% таких пациентов в сыворотке крови будут образоваться защитные антитела.

[000220] В соответствии с другими аспектами, покрытые вакциной пластыри из Примера 2 будут обеспечивать щадящий режим дозирования по сравнению с аналогами вакцин для внутримышечной (ВМ) или подкожной (ПК) инъекции. Например, для пластырей в соответствии с настоящей заявкой будет требоваться по меньшей мере на 5%, или по меньшей мере на 10%, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30% меньше вакцины/антигена по сравнению с их аналогами для внутримышечной (ВМ) или подкожной (ПК) инъекции.

Следует понимать, что несмотря на то что изобретение было описано вместе с конкретными вариантами его реализации, приведенное выше описание, а также примеры, приведены в

качестве иллюстрации и не ограничивают объем настоящего изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации в пределах объема настоящего изобретения будут очевидны специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система внутрикожной доставки, содержащая множество микровыступов, выполненных с возможностью проникновения через роговой слой или прокалывания рогового слоя эпидермиса пациента-человека, при этом на указанные микровыступы нанесено покрытие из твердого препарата, покрывающее примерно от 10% до 80% длины каждого микровыступа при измерении от вершины к основанию, где указанное покрытие содержит терапевтически эффективное количество вакцины и где по меньшей мере 95% вакцины высвобождается из указанной системы в пределах примерно 20 минут после прикладывания указанной системы к роговому слою эпидермиса пациента-человека.
2. Система по п. 1, характеризующаяся тем, что по меньшей мере 95% вакцины высвобождается в пределах примерно 10 минут.
3. Система по п. 1, характеризующаяся тем, что по меньшей мере 95% вакцины высвобождается в пределах примерно 5 минут.
4. Система по п. 1, характеризующаяся тем, что вакцина представляет собой вакцину против коронавируса.
5. Система по п. 1, характеризующаяся тем, что терапевтически эффективное количество составляет от примерно 5 мкг до примерно 500 мкг.
6. Система по п. 1, характеризующаяся тем, что терапевтически эффективное количество составляет от примерно 25 мкг до примерно 300 мкг.
7. Система по п. 1, дополнительно содержащая дисахарид.
8. Система по п. 7, характеризующаяся тем, что дисахарид представляет собой сахарозу.

9. Система по п. 7, характеризующаяся тем, что дисахарид представляет собой трегалозу.
10. Система по п. 1, характеризующаяся тем, что указанная система является стабильной при комнатной температуре в течение по меньшей мере 6 месяцев.
11. Система по п. 1, характеризующаяся тем, что указанная система является стабильной при комнатной температуре в течение по меньшей мере 12 месяцев.
12. Способ вакцинирования пациента-человека, против заболевания коронавирусом или гриппом, включающий следующие этапы:
- a. обеспечение системы внутрикожной доставки, содержащей:
 - i. одноразовый модуль с пластырем, содержащий множество микровыступов, расположенных на матрице размером от примерно 3 см^2 до примерно 6 см^2 , где плотность микровыступов в указанной матрице составляет от примерно 200 до примерно 2000 микровыступов/ см^2 и где указанные микровыступы выполнены с возможностью проникновения через роговой слой или прокалывания рогового слоя эпидермиса пациента-человека,
 - ii. микровыступы, на которые нанесено покрытие из твердого препарата, где указанное покрытие содержит терапевтически эффективное количество вакцины,
 - iii. микровыступы, имеющие ширину от примерно 10 мкм до примерно 500 мкм и угол при вершине от примерно 30 до примерно 70 градусов, и

в. прикладывание указанных микровыступов к выбранной области кожи пациента,

где по меньшей мере 95% вакцины высвобождается из указанной системы в пределах примерно 20 минут после прикладывания к роговому слою эпидермиса.

13. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что заболевание представляет собой COVID-19.

14. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что по меньшей мере 95% вакцины высвобождается в пределах примерно 10 минут.

15. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что по меньшей мере 95% вакцины высвобождается в пределах примерно 5 минут.

16. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что вакцина представляет собой вакцину против коронавируса.

17. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет от примерно 5 мкг до примерно 500 мкг.

18. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет от примерно 25 мкг до примерно 300 мкг.

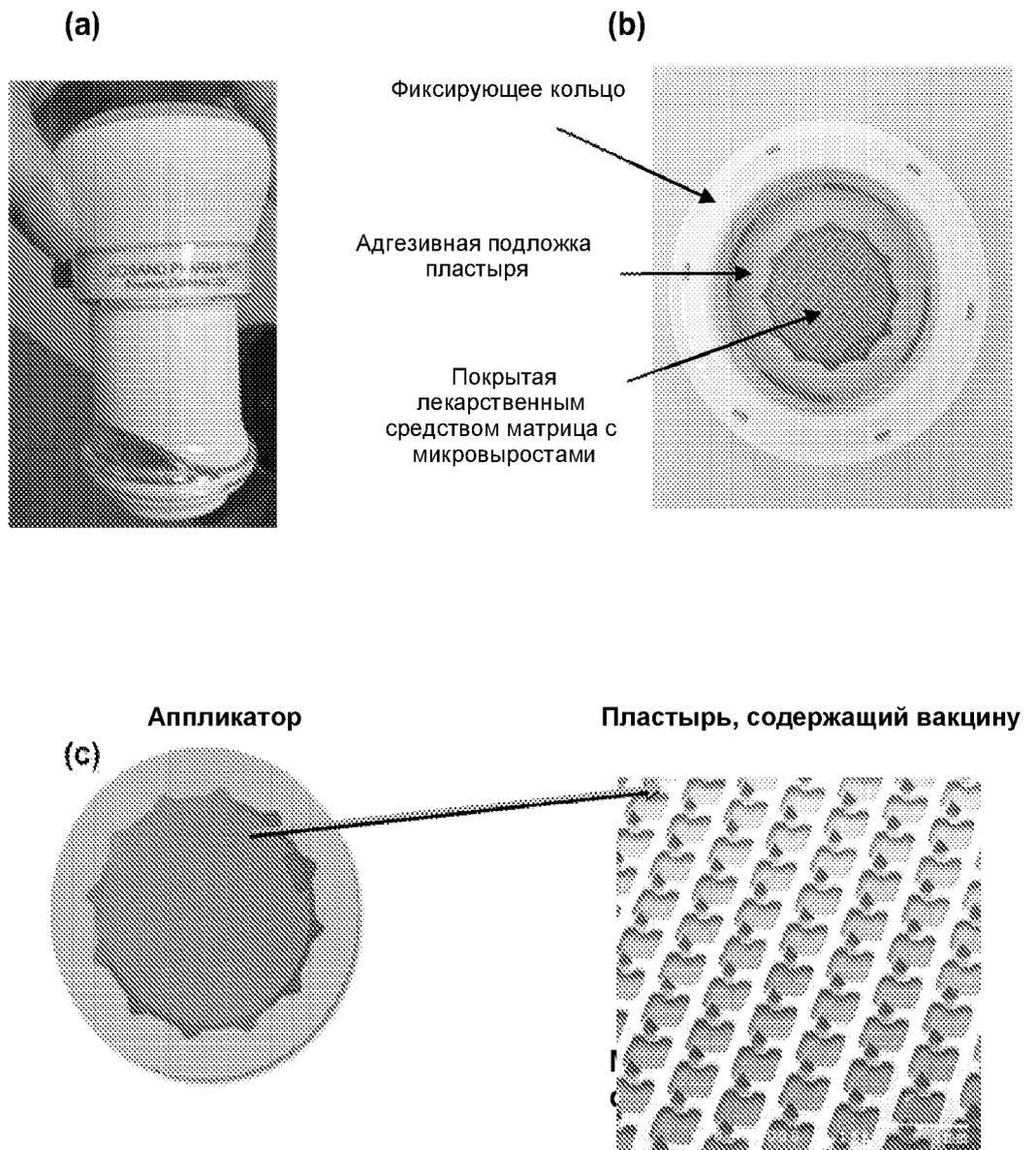
19. Способ по п. 12, дополнительно включающий дисахарид.

20. Способ по п. 19, характеризующийся тем, что дисахарид представляет собой сахарозу.

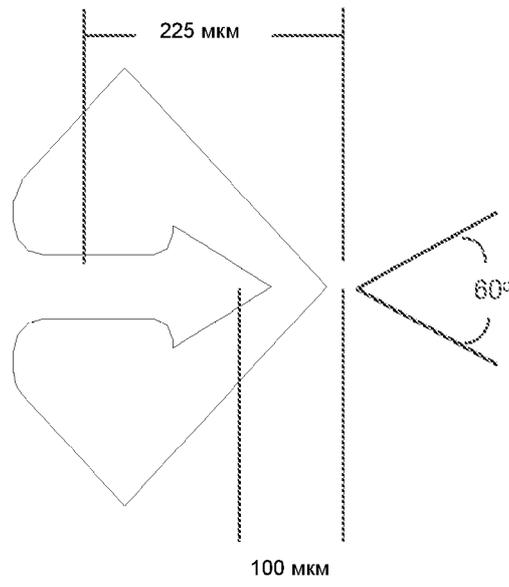
21. Способ по п. 19, характеризующийся тем, что дисахарид представляет собой трегалозу.

22. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что система является стабильной при комнатной температуре в течение по меньшей мере 6 месяцев.
23. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что система является стабильной при комнатной температуре в течение по меньшей мере 12 месяцев.
24. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что система выполнена с возможностью самостоятельного применения.
25. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что применение системы у популяции пациентов обеспечивает статистически значимое количество успешно вакцинированных пациентов.
26. Способ по п. 25, характеризующийся тем, что в сыворотке крови по меньшей мере 25% пациентов образуются защитные антитела.
27. Способ по п. 25, характеризующийся тем, что в сыворотке крови по меньшей мере 50% пациентов образуются защитные антитела.
28. Способ по п. 25, характеризующийся тем, что в сыворотке крови по меньшей мере 75% пациентов образуются защитные антитела.
30. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что время ношения составляет от примерно 5 до 30 минут.

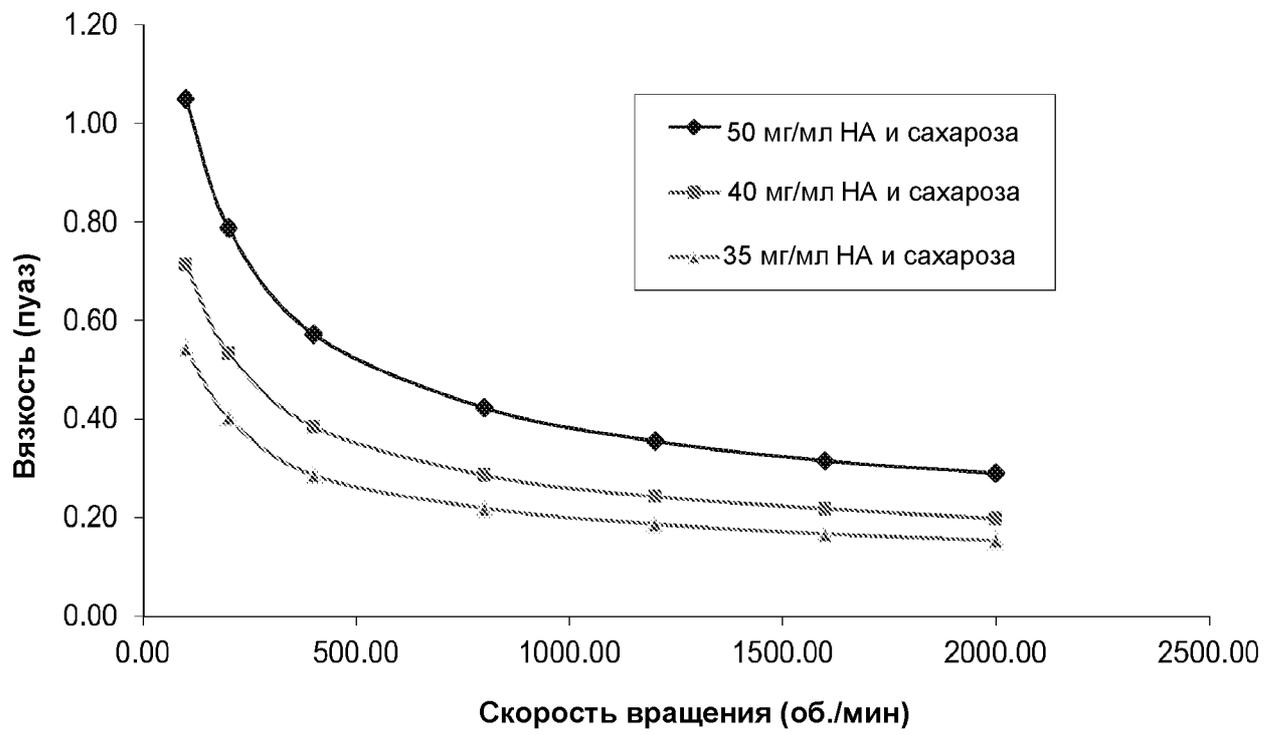
Фигура 1



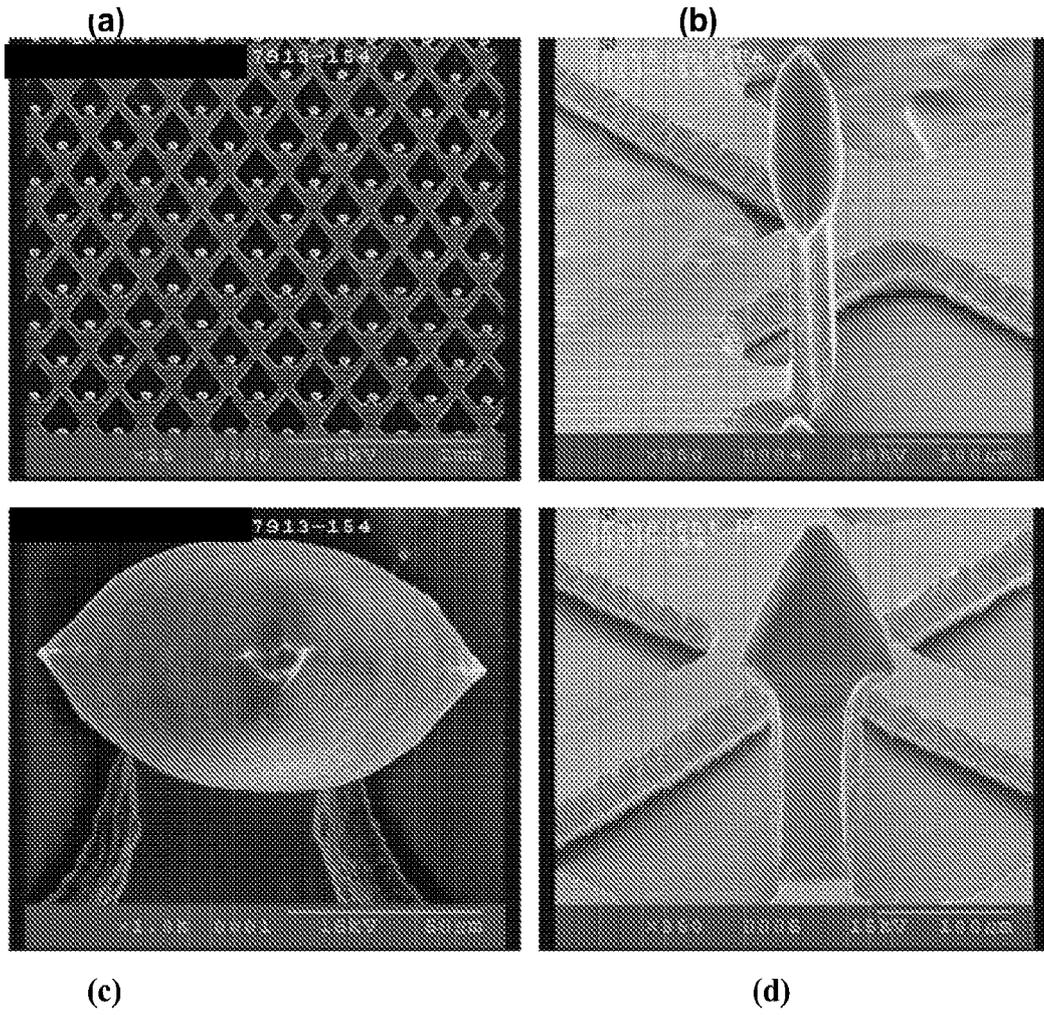
(d)



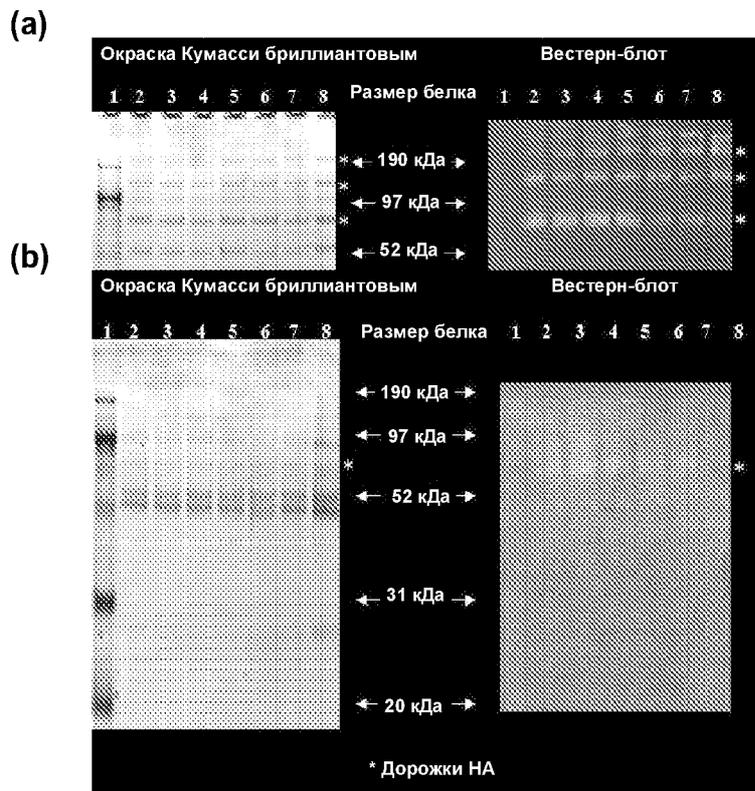
Фигура 2



Фигура 3:



Фигура 4



№ дорожки	Препарат
1	Маркер молекулярных масс
2	Замороженная-высушенная лекарственная форма (FD) (2,5 мкг)
3	FD/восстановленная в присутствии 10% Zwittergent 3-14 (2,5 мкг)
4	FD/восстановленная в присутствии 5% Zwittergent 3-14/pH 10 (2,5 мкг)
5	FD/восстановленная в присутствии 10% Triton X 100/pH 10 (2,5 мкг)
6	FD/восстановленная в присутствии 10% ДСН (2,5 мкг)
7	Исходная вакцина (2,5 мкг)
8	Исходная вакцина (5,0 мкг)

Фигура 5

