



(51) МПК  
*A61K 9/14* (2006.01)  
*A61K 9/22* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*A61K 47/34* (2006.01)  
*A61K 47/36* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 9/14* (2022.01); *A61K 38/00* (2022.01); *A61K 47/34* (2022.01); *A61K 47/36* (2022.01)

(21)(22) Заявка: 2018101248, 18.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
18.11.2012Дата регистрации:  
24.03.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
18.11.2011 US 61/561,525Номер и дата приоритета первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2014124682 18.11.2011

(43) Дата публикации заявки: 21.02.2019 Бюл. № 6

(45) Опубликовано: 24.03.2022 Бюл. № 9

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЧЕН Хантер (US),  
УОЛШ Скотт (US)

(73) Патентообладатель(и):

РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСҮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US 20090226530 A1, 10.09.2009. US  
2004142043 A1, 22.07.2004. US 2009269414 A1,  
29.10.2009. WO 2010111132 A2, 30.09.2010. US  
2007292475 A1, 20.12.2007.

C2

92

492

RU

R U 2 7 6 8 4 9 2 C 2

(54) ПОЛИМЕРНЫЕ БЕЛКОВЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины, а именно к способу получения фармацевтической композиции с пролонгированным высвобождением, включающему: (а) распылительную сушку водного раствора, содержащего от 25 мг/мл до 50 мг/мл белка ловушки сосудистого эндотелиального фактора роста (ловушка-VEGF), с образованием совокупности белковых частиц ловушек-VEGF с помощью диспергирования раствора белка ловушки-VEGF и его сушки с помощью распылительной сушки с образованием микроизмельченных белковых частиц, где температура на входе распылительной сушилки устанавливается на уровне выше точки кипения воды, и температура на выходе устанавливается на уровне температуры ниже точки кипения воды

и выше температуры окружающей среды, и где раствор терапевтического белка закачивается в распылительную сушилку со скоростью от 2 мл/мин до 15 мл/мин; и (б) суспензирование микроизмельченных частиц белка ловушки-VEGF в органическом растворе, содержащем биологически разрушающий полимер, выбранный из полиуретана или этилцеллюлозы и органического растворителя; и (с) распылительную сушку суспензии (б) с образованием совокупности полимерных белковых микрочастиц ловушки-VEGF, где указанная фармацевтическая композиция с пролонгированным высвобождением включает (i) белковые частицы ловушки-VEGF, покрытые биологически разрушающим полимером, или (ii) сбор полимерных белковых частиц ловушки-

R U 2 7 6 8 4 9 2 C 2

R U 2 7 6 8 4 9 2 C 2

VEGF, имеющих диаметр в диапазоне от 2 мкм до 70 мкм, а также относится к способу получения фармацевтической композиции, где указанный способ включает: (а) распыление раствора, содержащего воду и от 25 мг/мл до 50 мг/мл белка ловушки-VEGF с помощью диспергирования раствора белка ловушки-VEGF и его сушки с помощью распылительной сушки с образованием микроизмельченных белковых частиц, где температура на входе распылительной сушилки устанавливается на уровне температуры выше точки кипения воды, и температура на выходе устанавливается на уровне температуры ниже точки кипения воды и выше температуры окружающей среды, и где раствор терапевтического белка закачивается в распылительную сушилку со скоростью от 2 мл/мин до 15 мл/мин; и (б) суспензирование микроизмельченных белковых частиц в органическом растворе, содержащем

биологически разрушаемый полимер в концентрации от 100 мг/мл до 300 мг/мл и органический растворитель, где полимер представляет собой полиортоэфир (POE) или этилцеллюзозу (EC); и (с) распылительную сушку суспензии (б) при температуре, превышающей температуру кипения воды, с образованием указанной фармацевтической композиции, где микрочастицы в фармацевтической композиции с пролонгированным высвобождением высвобождают белок ловушки-VEGF в течение по меньшей мере 60 дней в физиологической водной среде при 37°C. Группа изобретений обеспечивает разработку двухэтапного способа получения микрочастиц, которые равномерно высвобождают терапевтически эффективное количество терапевтического белка в течение длительного периода времени. 2 н. и 15 з.п. ф-лы, 7 табл., 9 пр., 3 ил.



(51) Int. Cl.

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/22 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 9/14 (2022.01); A61K 38/00 (2022.01); A61K 47/34 (2022.01); A61K 47/36 (2022.01)

(21)(22) Application: 2018101248, 18.11.2012

(24) Effective date for property rights:  
18.11.2012Registration date:  
24.03.2022

Priority:

(30) Convention priority:  
18.11.2011 US 61/561,525Number and date of priority of the initial application,  
from which the given application is allocated:  
2014124682 18.11.2011

(43) Application published: 21.02.2019 Bull. № 6

(45) Date of publication: 24.03.2022 Bull. № 9

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,  
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij  
Partner"

(72) Inventor(s):

CHEN Hunter (US),  
WALSH Scott (US)

(73) Proprietor(s):

Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (US)

C2

92

49

27

68

42

RU

R U  
2 7 6 8 4 9 2  
C 2

## (54) POLYMER PROTEIN MICROPARTICLES

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceutics.

SUBSTANCE: group of inventions relates to a method of producing a prolonged release pharmaceutical composition, comprising: (a) spray drying of an aqueous solution, containing from 25 mg/ml to 50 mg/ml of protein trap of vascular endothelial growth factor (trap-VEGF), to form a set of protein trap particles-VEGF by dispersing the protein trap-VEGF solution and drying it by spray drying to form micro-milled protein particles, where the spray dryer inlet temperature is set at a level higher than the water boiling point, and the outlet temperature is set at the temperature below the water boiling point and above the ambient temperature, and wherein the therapeutic protein solution is pumped into the spray drier at rate of 2 ml/min to 15 ml/min; and (b) suspension of micro-milled particles of trap protein-VEGF in organic

solution, containing a biodegradable polymer selected from polyorthoester or ethylcellulose and an organic solvent; and (c) spray drying of suspension (b) to form a set of polymeric protein microparticles of trap-VEGF, wherein said prolonged release pharmaceutical composition comprises (i) trap-VEGF protein particles coated with a biodegradable polymer, or (ii) collection of polymeric protein particles of trap-VEGF, having a diameter in range of 2 mcm to 70 mcm, and also relates to a method of producing a pharmaceutical composition, where said method includes: (a) spraying a solution containing water and 25 mg/ml to 50 mg/ml of trap protein-VEGF by dispersing the trap-VEGF protein solution and drying it by means of spray drying to form micro-milled protein particles, where the spray dryer inlet temperature is set at the temperature above the water boiling point, and outlet temperature is set at

R U 2 7 6 8 4 9 2 C 2

temperature below water boiling point and above ambient temperature, and wherein the therapeutic protein solution is pumped into the spray drier at rate of 2 ml/min to 15 ml/min; and (b) suspending the micronized protein particles in an organic solution containing a biodegradable polymer in concentration of 100 mg/ml to 300 mg/ml and an organic solvent, where the polymer is polyorthoester (POE) or ethylcellulose (EC); and (c) spray drying suspension (b) at a temperature higher than the boiling point of water to form said pharmaceutical composition, wherein

the microparticles in the prolonged release pharmaceutical composition release the VEGF trap protein for at least 60 days in a physiological aqueous medium at 37 °C.

EFFECT: group of inventions provides the development of a two-step method of producing microparticles which uniformly release a therapeutically effective amount of a therapeutic protein for a long period of time.

17 cl, 7 tbl, 9 ex, 3 dwg

R U 2 7 6 8 4 9 2 C 2

## ОБЛАСТЬ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к получению, композиции и применению белкового терапевтического средства пролонгированного действия. Конкретно, изобретение относится к получению, композиции и применению множества покрытых полимером 5 микрочастиц белка для пролонгированного и однородного высвобождения белка в физиологическую окружающую среду или среду на водной основе с течением времени.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Пролонгированное высвобождение лечебного белка, введенного в биологическую мишень, такую как, например, сетчатка глаза или опухоль, или введенного

- 10 парентерально, является желательным для лечения многочисленных различных состояний, включая злокачественные опухоли, сердечнососудистые заболевания, сосудистые заболевания, ортопедические болезни, стоматологические заболевания, раны, аутоиммунные заболевания, желудочно-кишечные болезни и глазные болезни. Биологически совместимые и биоразрушающиеся полимеры для контролируемой и
- 15 пролонгированной доставки лекарственных препаратов используются в течение десятилетий. По мере того, как полимер со временем разрушается, лечебный лекарственный препарат медленно высвобождается.

В случае внутриглазных терапевтических средств существует значительная нереализованная медицинская потребность в композиции пролонгированного действия

- 20 для доставки белкового терапевтического средства эффективно в течение времени с насколько малым числом внутриглазных инъекций, насколько возможно. В случае других болезней, таких как рак, воспалительные заболевания и другие заболевания, существует потребность в улучшенных вживляемых композициях пролонгированного действия, содержащих белковые терапевтические средства.

- 25 Авторы заявки обнаружили, описывают здесь и заявляют способы получения и применения микрочастиц, содержащих биологически разрушающийся полимер и лечебный белок, которые способны равномерно высвобождать терапевтически эффективное количество лечебного белка в течение продолжительного периода времени.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 30 В одном аспекте изобретение предлагает микрочастицу, включающую белок, покрытый полимером. В одном варианте осуществления микрочастица имеет диаметр приблизительно от 2 мкм до 70 мкм. В одном варианте осуществления микрочастица имеет диаметр приблизительно 15 мкм.

- 35 В одном варианте осуществления белок представляет собой антигенсвязывающий белок. В одном варианте осуществления белок включает Fc домен. В одном варианте осуществления белок включает рецепторный домен. В одном варианте осуществления белок представляет собой антитело. В другом варианте осуществления белок представляет собой слитый белок-Fc-рецептор. В другом варианте осуществления белок представляет собой белок типа ловушки, который включает фрагмент когнатного 40 рецептора и Fc домен. В одном особом варианте осуществления белок представляет собой белок ловушку-VEGF. В одном варианте осуществления белок ловушка-VEGF включает последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:1.

- 45 В одном варианте осуществления полимер представляет собой биологически разрушаемый полимер. В некоторых вариантах осуществления полимер выбран из группы, состоящей из полимолочной кислоты (PLA), полигликолевой кислоты (PGA), сополимера полимолочной и полигликолевой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-со-гликолида (PLGA), PLGA-этиленоксидфумарата, PLGA-альфа-токоферилсукцината, этирифицированного до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрида поли

[1,6-бис(п-карбоксифенокси)гексана] (рСРН), сополимера гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (РНВ-РВА), сополимера полиэтиленгликоль-полимолочная кислота (PEG-PLA), поли- $\epsilon$ -капролактона (PCL),

полиалкилцианоакрилата (PAC), поли(этил)цианоакрилата (PEC),

5 полизобутилцианоакрилата, поли- $N$ -(2-гидроксипропил)метакриламида (поли(НРМА)),  
поли- $\beta$ -R-гидроксибутират (РНВ), поли- $\beta$ -R-гидроксиалканоата (РНА), поли- $\beta$ -R-  
яблочной кислоты, полимеров фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-  
фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-  
DSPE)/холестерин, полисахаридов, целлюлозы, этилцеллюлозы, метилцеллюлозы,

10 альгинатов, декстранових полимерных гидрогелей, амилозы, инулина,  
пектина и гуаровой камеди, хитозана, хитина, гепарина, гиалуроновой кислоты,  
полиротаксанов и полипсевдоротаксанов на основе циклодекстрена (CD),  
полиаспартатов, полиглутаматов, полилейцина, сополимеров лейцин-глутамат,  
полибутиленсукината (PBS), желатина, коллагенов, фибринов, фиброна,

15 полиортоэфиров, сополимеров полиортоэфир-полиамидин, сополимеров полиортоэфир-  
диамин, полиортоэфиров, включающих латентные кислоты, сополимера  
полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат и их комбинаций и сополимеров. В одном  
варианте осуществления полимер представляет собой поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL) или  
его производное или сополимер. В одном варианте осуществления полимер представляет

20 собой PLGA или его производное или сополимер. В одном варианте осуществления  
полимер представляет собой этилцеллюлозу или ее производное или сополимер. В  
одном варианте осуществления полимер представляет собой полиортоэфир или его  
производное или сополимер.

В одном варианте осуществления микрочастица включает ядро микроизмельченного

25 белка с размером меньше чем десять микрон и полимерный верхний слой. В одном  
варианте осуществления ядро микроизмельченного белка, по меньшей мере, на 50%  
покрыто полимером, означая, что не более чем 50% поверхности ядра  
микроизмельченного белка остается незащищенным. В одном варианте осуществления,  
по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере,

30 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 99% или 100% поверхности ядра  
микроизмельченного белка покрыто полимером.

В одном варианте осуществления микрочастица с размером более чем 10 микрон  
включает (а) ядро микроизмельченного белка с размером менее чем 10 микрон, где  
белок представляет собой любой один или более белков, выбранных из группы,

35 включающей антитело или фрагмент антитела, рецептор или его растворимый фрагмент,  
растворимый фрагмент рецептора Т-клетки, растворимый фрагмент МНС, слитый  
белок-Fc-рецептор, белок типа ловушки и белок ловушка-VEGF; и (б) полимерное  
покрытие, где полимер представляет собой любой один или более биосовместимый  
полимер, биологически разрушающий полимер, биоразлагаемый полимер, полимолочную

40 кислоту (PLA), полигликоловую кислоту (PGA), сополимер полимолочной и  
полигликоловой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-ко-гликолид (PLGA), PLGA-  
этиленоксидфумарат, PLGA-альфа-токоферилсукиннат, этирифицированный до  
полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксифенокси)  
гексана] (рСРН), сополимер гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой

45 кислотой (РНВ-РВА), сополимер полиэтиленгликоль-полимолочная кислота (PEG-  
PLA), поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL), полиалкилцианоакрилат (PAC), поли(этил)  
цианоакрилат (PEC), полизобутилцианоакрилат, поли- $N$ -(2-гидроксипропил)  
метакриламид (поли(НРМА)), поли- $\beta$ -R-гидроксибутират (РНВ), поли- $\beta$ -R-

гидроксиалканоат (РНА), поли- $\beta$ -R-яблочную кислоту, полимеры фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-DSPE)/холестерин, полисахарины, целлюлозу, этилцеллюлозу, метилцеллюлозу, альгинаты, декстран и декстрановые 5 полимерные гидрогели, амилозу, инулин, пектин и гуаровую камедь, хитозан, хитин, гепарин, гиалуроновую кислоту, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (CD), полиаспартаты, полиглутаматы, полилейцин, сополимеры лейцин-глутамат, полибутиленсукцинат (PBS), желатин, коллагены, фибрин, фиброн, полиортэфиры, сополимер полиортэфир-полиамидин, сополимеры полиортэфир-10 диамин, полиортэфиры, включающие латентные кислоты, сополимер полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат и их комбинации и сополимеры.

В одном варианте осуществления микрочастица со средним диаметром приблизительно от 15 микрон до 30 микрон включает (а) ядро микроизмельченного белка с размером приблизительно от 10 до 12 микрон, где белок представляет собой 15 белок ловушку-VEGF, и (б) полимерное покрытие, где полимер представляет собой любой один или более полимеров из группы, включающей PCL, PLGA, этилцеллюлозу и полиортэфир, и их сополимеры или производные.

В одном аспекте изобретение предлагает множество микрочастиц, размер которых находится в диапазоне приблизительно от двух микрон до 70 микрон, и которые 20 включают ядро микроизмельченного белка с размером приблизительно от двух микрон до 30 микрон, и полимерный верхний слой.

В одном варианте осуществления белок представляет собой антигенсвязывающий белок. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой любой один или более белков, выбранных из группы, включающей антитело или 25 фрагмент антитела, рецептор или его растворимый фрагмент, растворимый фрагмент рецептора Т-клетки, растворимый фрагмент МНС, слитый белок-Fc-рецептор, белок типа ловушки и белок ловушку-VEGF. В одном варианте осуществления белок включает Fc домен. В одном варианте осуществления белок представляет собой антитело. В другом варианте осуществления белок представляет собой белок типа ловушки, который 30 включает фрагмент когнитивного рецептора и Fc домен. В одном особом варианте осуществления белок представляет собой белок ловушку-VEGF. В особом варианте осуществления, белок ловушка-VEGF включает последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления полимер представляет собой биосовместимый 35 полимер. В одном варианте осуществления полимер представляет собой биоразлагаемый полимер. В одном варианте осуществления полимер представляет собой биологически разрушаемый полимер. В некоторых вариантах осуществления полимер выбран из группы, состоящей из полимолочной кислоты (PLA), полигликоловой кислоты (PGA), сополимера полимолочной и полигликоловой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-согликолида (PLGA), PLGA-этиленоксидфумарата, PLGA-альфа-токоферилсукцината, этерифицированного до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрида поли [1,6-бис(п-карбоксифенокси)гексана] (pCPN), сополимера гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (РНВ-РВА), сополимера полиэтиленгликоль-полимолочная кислота (PEG-PLA), поли- $\epsilon$ -капролактона (PCL), 40 полиалкилцианоакрилата (PAC), поли(этил)цианоакрилата (PEC), полиизобутилцианоакрилата, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламида (поли(НРМА)), поли- $\beta$ -R-гидроксибутирата (РНВ), поли- $\beta$ -R-гидроксиалканоата (РНА), поли- $\beta$ -R-яблочной кислоты, полимеров фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-

- фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-DSPE)/холестерина, полисахаридов, целлюлозы, этилцеллюлозы, метилцеллюлозы, альгинатов, декстрана и декстранных полимерных гидрогелей, амилозы, инулина, пектина и гуаровой камеди, хитозана, хитина, гепарина, гиалуроновой кислоты,
- 5 полиротаксанов и полипсевдоротаксанов на основе циклодекстрина (CD), полиаспартатов, полиглутаматов, полилейцина, сополимеров лейцин-глутамат, полибутиленсукцината (PBS), желатина, коллагенов, фибринов, фиброна, полиортэфиров, сополимеров полиортэфир-полиамидин, сополимеров полиортэфир-диамин, полиортэфиров, включающих латентные кислоты, сополимера
- 10 полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат и их комбинаций и сополимеров. В одном варианте осуществления полимер представляет собой поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL) или его производное или сополимер. В одном варианте осуществления полимер представляет собой PLGA или его производное или сополимер. В одном варианте осуществления полимер представляет собой этилцеллюлозу или ее производное или сополимер. В
- 15 одном варианте осуществления полимер представляет собой полиортэфир, включающий латентную кислоту.

В одном варианте осуществления ядро микроизмельченного белка большинства микрочастиц множества микрочастиц, по меньшей мере, на 50% покрыто полимером, означая, что не более чем 50% поверхности ядра микроизмельченного белка остается 20 незащищенным. В одном варианте осуществления, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 99% или 100% поверхности ядра микроизмельченного белка покрыто полимером.

В одном варианте осуществления множество микрочастиц, размер которых находится 25 в диапазоне приблизительно от двух микрон до 70 микрон, включает (а) ядро микроизмельченного белка с размером приблизительно от двух микрон до 30 микрон, где белок представляет собой любой один или более белков, выбранных из группы, включающей антитело или фрагмент антитела, рецептор или его растворимый фрагмент, растворимый фрагмент рецептора Т-клетки, растворимый фрагмент МНС, слитый 30 белок-Fc-рецептор, белок типа ловушки и белок ловушку-VEGF; и (б) полимерный верхний слой, где полимер представляет собой любой один или более биосовместимый полимер, биологически разрушаемый полимер, биоразлагаемый полимер, полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), сополимер полимолочной и полигликолевой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-со-гликолид (PLGA), PLGA- 35 этиленоксидфумарат, PLGA-альфа-токоферилсукцинат, этерифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL), полиалкилцианоакрилат, полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксиленокси)гексана] (pCPN), сополимер гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (PHB-PVA), сополимер полиэтиленгликоль-полимолочная кислота (PEG-PLA), поли(этил) 40 цианоакрилат (PEC), полизобутилцианоакрилат, поли-N-(2-гидроксипропил) метакриламид (поли(NPMA)), поли- $\beta$ -R-гидроксибутират (PHB), поли- $\beta$ -R-гидроксиалканоат (PHA), поли- $\beta$ -R-яблочную кислоту, полимеры фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-DSPE)/холестерин, полисахариды, 45 целлюлозу, этилцеллюлозу, метилцеллюлозу, альгинаты, декстран и декстранные полимерные гидрогели, амилозу, инулин, пектин и гуаровую камедь, хитозан, хитин, гепарин, гиалуроновую кислоту, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (CD), полиаспартаты, полиглутаматы, полилейцин, сополимеры лейцин-

глутамат, полибутиленсукцинат (PBS), желатин, коллагены, фибрины, фиброн, полиортэфиры, сополимер полиортэфир-полиамидин, сополимеры полиортэфир-диамин, полиортэфиры, включающие латентные кислоты, сополимер полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат и их комбинации и сополимеры.

- 5 В одном варианте осуществления множество микрочастиц, размер которых находится в диапазоне приблизительно от двух микрон до 70 микрон, со средним размером приблизительно от 15 микрон до 30 микрон, включает (а) ядро микроизмельченного белка с размером приблизительно от двух микрон до 30 микрон, со средним размером приблизительно от 10 микрон до 12 микрон, где белок представляет собой белок ловушку-VEGF; и (б) полимерный верхний слой, где полимер представляет собой любой один или более полимеров, выбранных из группы, включающей PLA, PCL, PLGA, этилцеллюзу и полиортэфир, и их сополимеры или производные.
- 10

В одном аспекте изобретение предлагает способ получения микрочастицы, которая включает ядро из белка и полимерный верхний слой. В одном варианте осуществления полученная микрочастица имеет диаметр приблизительно от двух микрон до 70 микрон, или средний диаметр приблизительно от 15 микрон до 30 микрон. В одном варианте осуществления способ получения микрочастицы включает (1) получение частицы белка; (2) суспендривание частицы белка в растворе, включающем полимер и растворитель; и (3) удаление растворителя, в котором формируется частица, включающая ядро из белка, покрытое полимерным верхним слоем.

- 15
- 20
- 25
- 30
- 35

В одном варианте осуществления частица белка из стадии (1) представляет собой микроизмельченную частицу белка, которую получают распылительной сушкой раствора, включающего белок. В некоторых вариантах осуществления раствор белка подвергают распылительной сушке посредством обработки ультразвуком с одинарным наконечником, обработки ультразвуком с двойным наконечником или электрораспылением. В некоторых вариантах осуществления полученная в результате микроизмельченная частица белка, которая формирует ядро полученной микрочастицы, имеет диаметр приблизительно от двух микрон до 30 микрон, со средним диаметром приблизительно от 10 микрон до 12 микрон.

В некоторых вариантах осуществления белок, который формирует ядро, представляет собой антигенсвязывающий белок. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой любой один или более белков, выбранных из группы, включающей антитело (например, IgG) или фрагмент антитела, рецептор или его растворимый фрагмент, растворимый фрагмент рецептора Т-клетки, растворимый фрагмент МНС, слитый белок-Fc-рецептор, белок типа ловушки и белок ловушки-VEGF. В особом варианте осуществления белок представляет собой ловушку-VEGF, включающую последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:1.

- 35
- 40
- 45

В одном варианте осуществления растворитель удаляют из стадии (3), создавая дисперсию смеси белок-полимер-растворитель из стадии (2) и давая возможность растворителю испариться из капель, созданных дисперсией. В одном варианте осуществления дисперсию создают распылительной сушкой, которую можно осуществить обработкой ультразвуком с двойным наконечником, обработкой ультразвуком с одинарным наконечником или электрораспылением. В одном варианте осуществления растворитель удаляют из капель, используя тепло или воздух, или химической экстракцией.

В одном варианте осуществления полимер является биологически разрушающим, биоразлагаемым и/или биосовместимым. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой любой один или более полимеров, выбранных из группы, состоящей

из полимолочной кислоты (PLA), полигликолевой кислоты (PGA), сополимера полимолочной и полигликолевой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-со-гликолида (PLGA), PLGA-этиленоксидфумарата, PLGA-альфа-токоферилсукцината, этерифицированного до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрида поли[1,6-бис(п-карбоксиfenокси)гексана] (pCPH), сополимера гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (PHB-PVA), сополимера полиэтиленгликоль-полимолочная кислота (PEG-PLA), поли- $\epsilon$ -капролактона (PCL), полиалкилцианоакрилата (PAC), поли(этил)цианоакрилата (PEC), полиизобутилцианоакрилата, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламида (поли(NPMA)),  
 10 поли- $\beta$ -R-гидроксибутират (PHB), поли- $\beta$ -R-гидроксиалканоата (PHA), поли- $\beta$ -R-яблочной кислоты, полимеров фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-DSPE)/холестерина, полисахаридов, цеплюлозы, этилцеллюлозы, метилцеллюлозы, альгинатов, декстрановых полимерных гидрогелей, амилозы, инулина,  
 15 пектина и гуаровой камеди, хитозана, хитина, гепарина, гиалуроновой кислоты, полиротаксанов и полипсевдоротаксанов на основе циклодекстрин (CD), полиаспартатов, полиглутаматов, полилейцина, сополимеров лейцин-глутамат, полибутиленсукцината (PBS), желатина, коллагенов, фибринов, фиброина, полиортэфиров, сополимера полиортэфир-полиамидин, сополимеров полиортэфир-диамин, полиортэфиров, включающих латентные кислоты, сополимер  
 20 полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат и их комбинаций и сополимеров. В одном варианте осуществления полимер представляет собой поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL) или его производное или сополимер. В одном варианте осуществления полимер представляет собой PLGA или его производное или сополимер. В одном варианте осуществления  
 25 полимер представляет собой этилцеллюлозу или ее производное или сополимер. В одном варианте осуществления полимер представляет собой полиортэфир или его производное, который содержит кислотолабильные элементы. В другом варианте осуществления полимер представляет собой PLA.

В одном аспекте изобретение предлагает способ получения микрочастицы,  
 30 включающий стадии (1) формирования микроизмельченной частицы белка, имеющей диаметр приблизительно от двух микрон до 30 микрон, причем средний диаметр составляет приблизительно от 10 микрон до 12 микрон, распылительной сушкой раствора, содержащего белок, где белок представляет собой антигенсвязывающий белок. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой любой один или более белков, выбранных из группы, включающей антитело или фрагмент антитела, рецептор или его растворимый фрагмент, растворимый фрагмент рецептора Т-клетки, растворимый фрагмент МНС, слитый белок-Fc-рецептор, белок типа ловушки и белок ловушки-VEGF (например, белок, имеющий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:1); (2) сусpendирования микроизмельченной частицы белка в растворе, включающем полимер и растворитель, где полимер представляет собой любой один или более полимер, выбранный из группы, включающей биологически разрушаемый полимер, биоразлагаемый полимер, биосовместимый полимер, полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), сополимер полимолочной и полигликолевой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-со-гликолид (PLGA),  
 40 PLGA-этиленоксидфумарат, PLGA-альфа-токоферилсукцинат, этерифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксиfenокси)гексана] (pCPH), сополимер гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (PHB-PVA), сополимер полиэтиленгликоль-полимолочная кислота (PEG-

PLA), поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL), полиалкилцианоакрилат (PAC), поли(этил)цианоакрилат (PEC), полизобутилцианоакрилат, поли- $N$ -(2-гидроксипропил)метакриламид (поли(NPMA)), поли- $\beta$ -R-гидроксибутират (PHB), поли- $\beta$ -R-гидроксиалканоат (PHA), поли- $\beta$ -R-яблочную кислоту, полимеры фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-DSPE)/холестерин, полисахарины, целлюлозу, этилцеллюлозу, метилцеллюлозу, альгинаты, декстран и декстранные полимерные гидрогели, амилозу, инулин, пектин и гуаровую камедь, хитозан, хитин, гепарин, гиалуроновую кислоту, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (CD), полиаспартаты, полиглутаматы, полилейцин, сополимеры лейцин-глутамат, полибутиленсукинат (PBS), желатин, коллагены, фибрин, фиброн, полиортэфиры, сополимеры полиортэфир-полиамидин, сополимеры полиортэфир-диамин, полиортэфиры, включающие латентные кислоты, сополимер полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат и их комбинации и сополимеры; и (3) удаления растворителя распылительной сушки супензии "частица микроизмельченного белка-полимер-растворитель" и отгонки растворителя с применением тепла или воздуха, или экстракцией растворителем, где формируется микрочастица, имеющая диаметр приблизительно от двух микрон до 70 микрон, причем средний диаметр составляет приблизительно от 15 микрон до 30 микрон, и включающая ядро из белка и полимерный верхний слой.

В некоторых вариантах осуществления распылительную сушку из стадии (1) или стадии (3) осуществляют посредством обработки ультразвуком с двойным наконечником, обработки ультразвуком с одинарным наконечником или электрораспылением.

В одном варианте осуществления способ получения микрочастиц включает стадии (1) формирования микроизмельченной частицы ловушки-VEGF, имеющей диаметр приблизительно от 10 микрон до 12 микрон распылительной сушки раствора, содержащего белок ловушки-VEGF; (2) супензирования микроизмельченной частицы ловушки-VEGF в растворе, содержащем полиортэфир, включающий латентную кислоту, и совместимый растворитель, или этилцеллюлозу и совместимый растворитель; и (3) удаление растворителя (а) распылительной сушки супензии микроизмельченная частица ловушка-VEGF-полиортэфир-латентная кислоты-растворитель или супензии микроизмельченная частица ловушка-VEGF-этилцеллюлоза-растворитель и (б) отгонкой растворителя с помощью тепла или воздуха, или экстракцией растворителем, где формируется микрочастица, имеющая диаметр приблизительно от 15 микрон до 30 микрон, и включающая ядро ловушки-VEGF и полимерный верхний слой из полиортэфира и его сополимеров или производных.

В одном аспекте изобретение предлагает композицию пролонгированного действия, содержащую лечебный белок, для высвобождения или обеспечения стационарной концентрации лечебного белка с течением времени. Композиция пролонгированного действия включает множество микрочастиц, размер которых находится в диапазоне приблизительно от двух микрон до 70 микрон, каждая из которых включает ядро микроизмельченного белка с размером приблизительно от двух до 30 микрон, и полимерный верхний слой.

В одном варианте осуществления лечебный белок представляет собой антигенсвязывающий белок. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой любой один или более белков, выбранных из группы, включающей антитело (например, IgG) или фрагмент антитела,

рецептор или его растворимый фрагмент, растворимый фрагмент рецептора Т-клетки, растворимый фрагмент МНС, слитый белок-Fc-рецептор, белок типа ловушки и белок ловушки-VEGF (например, один из которых имеет первичную структуру SEQ ID NO: 1). В одном варианте осуществления лечебный белок включает Fc домен. В одном 5 варианте осуществления белок представляет собой антитело. В другом варианте осуществления белок представляет собой IgG. В другом варианте осуществления лечебный белок представляет собой слитый белок-Fc-рецептор. В другом варианте осуществления лечебный белок представляет собой белок типа ловушки, который включает фрагмент когнитивного рецептора и Fc домен. В одном особом варианте 10 осуществления лечебный белок представляет собой белок ловушки-VEGF. В еще одном варианте осуществления ловушка-VEGF включает последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления полимерный верхний слой включает биосовместимый полимер. В одном варианте осуществления полимерный верхний слой 15 включает биоразлагаемый полимер. В одном варианте осуществления полимерный верхний слой включает биологически разрушающийся полимер. В некоторых вариантах осуществления полимерный верхний слой включает полимер, выбранный из группы, состоящей из полимолочной кислоты (PLA), полигликолевой кислоты (PGA), сополимера полимолочной и полигликолевой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-ко-гликолида (PLGA), 20 PLGA-этиленоксидфумарата, PLGA-альфа-токоферилсукцинат, этерифицированного до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангирида поли[1,6-бис(п-карбоксифенокси)гексана] (pCPN), сополимера гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (PHB-PVA), сополимера полиэтиленгликоль-полимолочная кислота (PEG-PLA), поли-ε-капролактона (PCL), 25 полиалкилцианоакрилата (PAC), поли(этил)цианоакрилата (PEC), полизобутилцианоакрилата, поли-*N*(2-гидроксипропил)метакриламида (поли(NPMA)), поли-β-R-гидроксибутирата (PHB), поли-β-R-гидроксиалканоата (PHA), поли-β-R-яблочной кислоты, полимеров фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-30 DSPE)/холестерина, полисахаридов, целлюлозы, этилцеллюлозы, метилцеллюлозы, альгинатов, декстрана и декстранных полимерных гидрогелей, амилозы, инулина, пектина и гуаровой камеди, хитозана, хитина, гепарина, гиалуроновой кислоты, полиротаксанов и полипсевдоротаксанов на основе циклодекстрина (CD), 35 полиаспартатов, полиглутаматов, полилейцина, сополимеров лейцин-глутамат, полибутиленсукцинат (PBS), желатина, коллагенов, фибринов, фиброна, полиортэфиров, сополимера полиортэфир-полиамидин, сополимеров полиортэфир-диамин, полиортэфиров, включающих латентные кислоты, сополимера полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат и их комбинаций и сополимеров. В одном варианте осуществления полимер представляет собой поли-ε-капролактон (PCL) или 40 его производное или сополимер. В одном варианте осуществления полимерный верхний слой включает PLGA. В одном варианте осуществления полимерный верхний слой включает этилцеллюлозу. В одном варианте осуществления полимерный верхний слой включает один или более полимеров, выбранных из группы, включающей PLA, PLGA, этилцеллюлозу и полиортэфир, и их сополимеры или производные. 45 В одном варианте осуществления множество микрочастиц включает группу микрочастиц, имеющих некоторый диапазон толщин полимерного верхнего слоя, так что индивидуальные микрочастицы из группы микрочастиц разрушаются с различными скоростями, что дает возможность однородной скорости высвобождения лечебного

белка.

В одном варианте осуществления множество микрочастиц включает смесь непокрытых микроизмельченных частиц белка и микрочастиц, имеющих некоторый диапазон толщин полимерного верхнего слоя, что дает возможность высвобождения 5 лечебного белка с периодическими интервалами, исходя из толщины верхнего слоя.

В одном варианте осуществления множество микрочастиц включает смесь микрочастиц, имеющих полимерный верхний слой с различными уровнями гидрофобности, чтобы контролировать время или продолжительность деструкции и последующего высвобождения. В одном варианте осуществления каждая из микрочастиц 10 включает внутренний полимерный слой и внешний полимерный слой, где внешний полимерный слой ограничивает гидратацию внутреннего полимерного слоя, чтобы контролировать высвобождение лечебного белка.

В одном варианте осуществления лечебный белок высвобождается из множества микрочастиц со скоростью приблизительно от 0,01 мг/неделю до 0,30 мг/неделю в 15 течение, по меньшей мере, 60 дней, когда микрочастицы находятся в водной среде. В одном варианте осуществления водная среда представляет собой буферный раствор *in vitro*. В одном варианте осуществления водная среда представляет собой среду *in vivo*. В одном варианте осуществления водная среда представляет собой среду *ex vivo*. В одном варианте осуществления водная среда представляет собой стекловидное тело.

20 В одном варианте осуществления композиция пролонгированного действия включает множество микрочастиц, размер которых находится в диапазоне приблизительно от двух микрон до 70 микрон, и которые включают (а) ядро микроизмельченного лечебного белка с размером приблизительно от двух микрон до 30 микрон, где лечебный белок представляет собой антигенсвязывающий белок, который в некоторых случаях может 25 представлять собой любой один или более белков, выбранных из группы, включающей антитело или фрагмент антитела, рецептор или его растворимый фрагмент, растворимый фрагмент рецептора Т-клетки, растворимый фрагмент МНС, слитый белок-Fc-рецептор, белок типа ловушки и белок ловушки-VEGF; и (б) полимерный верхний слой с некоторым широким диапазоном толщины, где полимер представляет собой любой один или более 30 биосовместимый полимер, биологически разрушаемый полимер, биоразлагаемый полимер, полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), сополимер полимолочной и полигликолевой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-со-гликолид (PLGA), PLGA-этиленоксидфумарат, PLGA-альфа-токоферилсукцинат, этирифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксиfenокси) 35 гексана] (pCPN), сополимер гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (PHB-PVA), сополимер полиэтиленгликоль-полимолочинная кислота (PEG-PLA), поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL), полиалкилцианоакрилат (PAC), поли(этил) цианоакрилат (PEC), полиизобутилцианоакрилат, поли-*N*-(2-гидроксипропил) метакриламид (поли(HPMA)), поли- $\beta$ -R-гидроксибутират (PHB), поли- $\beta$ -R- 40 гидроксиалканоат (PHA), поли- $\beta$ -R-яблочную кислоту, полимеры фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-DSPE)/холестерин, полисахариды, целлюлозу, этилцеллюлозу, метилцеллюлозу, альгинаты, декстран и декстроновые полимерные гидрогели, амилозу, инулин, пектин и гуаровую камедь, хитозан, хитин, 45 гепарин, гиалуроновую кислоту, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (CD), полиаспартаты, полиглутаматы, полилейцин, сополимеры лейцин-глутамат, полибутиленсукцинат (PBS), желатин, коллагены, фибрин, фиброн, полиортэфиры, сополимер полиортэфир-полиамидин, сополимеры полиортэфир-

диамин, полиортоэфиры, включающие латентные кислоты, сополимер полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат и их комбинации и сополимеры, где микрочастицы высвобождают или обеспечивают стационарную концентрацию лечебного белка при скорости приблизительно от 0,01 мг/неделю до 0,30 мг/неделю в течение, по меньшей мере, 60 дней.

В одном варианте осуществления композиция пролонгированного действия включает множество микрочастиц, размер которых находится в диапазоне приблизительно от двух микрон до 70 микрон, причем средний размер составляет приблизительно от 15 микрон до 30 микрон, и которые включают (а) ядро микроизмельченного белка с 10 размером приблизительно от двух микрон до 30 микрон, причем средний размер составляет приблизительно от 10 микрон до 12 микрон, где белок представляет собой белок ловушки-VEGF; и (б) полимерный верхний слой с некоторым диапазоном толщины, где полимер представляет собой любой один или более полимеров из группы PLGA, этилцеллюлозы и полиортоэфира, и их сополимеров и производных, так что в 15 водной среде микрочастицы высвобождают или обеспечивают стационарную концентрацию белка ловушки-VEGF при скорости приблизительно  $0,06 \pm 0,02$  мг/неделю в течение, по меньшей мере, 60 дней.

В одном аспекте изобретение предлагает способ модуляции высвобождения белка. В одном варианте осуществления способ включает стадию получения множества 20 микрочастиц, как описано в предшествующем аспекте, после чего следует стадия помещения микрочастиц в растворитель. Растворитель в некоторых вариантах осуществления является водным. Растворитель может быть *in vitro*, например, в фосфатном забуференном растворе. Растворитель может быть *in vivo*, таким как, например, стекловидное тело.

## 25 ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1 показывает относительное количество (% объемные) частиц белка без полимерного верхнего слоя данного диаметра (ECD (мкм)) в совокупности частиц белка, полученных из 50 мг/мл белка ловушки-VEGF, 25 мг/мл белка ловушки-VEGF и 25 мг/мл белка ловушки-VEGF плюс 0,1% полисорбата 80.

Фиг.2 показывает относительное количество (% объемные определенные микропотоковой визуализацией (MFI)) микрочастиц заданного диаметра (ECD (мкм)) в совокупности микрочастиц, полученных из 50 мг/мл белка ловушки-VEGF плюс 50 мг/мл POE, 250 мг/мл POE и 50 мг/мл ЕС.

Фиг.3 показывает количество белка ловушки-VEGF в миллиграммах, 35 высвобожденного из микрочастиц, полученных из 50 мг/мл POE, 250 мг/мл POE или 50 мг/мл ЕС в течение приблизительно 60 дней.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Микрочастица и частица белкового ядра по настоящему изобретению являются в общих чертах сферическими по форме. Некоторые микрочастицы и ядра из белка будут 40 приближаться к сферичности, в то время как другие будут более неправильными по форме. Таким образом, используемый здесь термин "диаметр" обозначает каждое и любое из нижеследующего: (а) диаметр сферы, которая окружает микрочастицу или ядро из белка, (б) диаметр наиболее большой сферы, которая попадает внутрь границ микрочастицы или ядра из белка, (с) любое измерение между описывающей сферой из 45 (а) и ограничивающей сферой из (б), включая среднее значение между данными двумя величинами, (д) длину наиболее длинной оси микрочастицы или ядра из белка; (е) длину наиболее короткой оси микрочастицы или ядра из белка, (ф) любое измерение между длиной длинной оси (д) и длиной короткой оси (е), включая среднее значение между

данными двумя величинами, и/или (g) эквивалентный круговой диаметр ("ECD"), определенный микропотоковой визуализацией (MFI), анализом траекторий движения наночастиц (NTA) или методами исследования частиц с применением светотени, таким как динамическое светорассеяние (DSL). В общих чертах, см.

<sup>5</sup> Sharma et al., Micro-flow imaging: flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations, AAPS J. 2010 Sep; 12(3): 455-64.

Диаметр обычно выражают в микрометрах (мкм или микронах). Диаметр можно определить оптическим измерением.

"Микроизмельченная частица белка" или "частица белка" обозначает частицу, содержащую множество молекул белка с низкими, очень низкими или близкими к нулю количествами воды (например, <3% воды по массе). При применении в настоящем описании, микроизмельченная частица белка обычно является сферической по форме и имеет ECD, находящийся в диапазоне от 2 микрон до приблизительно 35 микрон.  
<sup>10</sup> Микроизмельченная частица белка не ограничивается какой-либо конкретной белковой структурной единицей и подходит для приготовления и доставки лечебного белка.  
<sup>15</sup> Обычные лечебные белки включают, помимо прочего, антигенсвязывающие белки, такие как, например, растворимые фрагменты рецептора, антитела (включая IgG) и производные или фрагменты антител, другие Fc-содержащие белки, включая Fc-слитые белки и сливные белки-Fc-рецепторы, включая белок типа ловушки (Huang, C., Curr. Opin. Biotechnol, 20: 692-99 (2009)), такие как, например, ловушка-VEGF.  
<sup>20</sup>

Микроизмельченную частицу белка по изобретению можно получить любым способом, известным из уровня техники для получения частиц белка микронного размера. Например, частицу белка можно изготовить, помимо прочего, распылительной сушкой (инфра), лиофилизацией, размолом на струйной мельнице, кристаллизацией с применением висячей капли (Ruth et al., Acta Crystallographica D56: 524-28 (2000)), постепенным осаждением (патент США 7 998 477 (2011)), лиофилизацией водной смеси белок-PEG (полиэтиленгликоль) (Morita et al., Pharma. Res. 17: 1367-73 (2000)), осаждением в сверхкритической среде (патент США 6 063 910 (2000)) или образованием частиц, индуцированным диоксидом углерода с высоким давлением (Bustami et al., Pharma. Res. 17: 1360-66 (2000)).  
<sup>25</sup>

Используемый в настоящем описании термин "белок" относится к молекуле, включающей два или более аминокислотных остатка, присоединенных друг к другу пептидными связями. Пептиды, полипептиды и белки также включают модификации, включающие, но не ограничивающиеся этим, гликозилирование, присоединение липида, сульфирование, гамма-карбоксилирование остатками глутаминовой кислоты, гидроксилирование и АДФ-рибозилирование. Полипептиды могут представлять собой вещества научного или коммерческого интереса, включая лекарственные препараты на основе белков. Полипептиды включают, среди прочего, антитела и химерные или сливные белки. Полипептиды получают с помощью рекомбинантных клеточных линий животных с применением методов выращивания клеток.  
<sup>30</sup>

"Антитело", как предполагается, относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL далее могут подразделяться на области гипервариабельности, называемые гипервариабельными  
<sup>35</sup>  
<sup>40</sup>  
<sup>45</sup>

участками (CDR), с расположенными в промежутках областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминокислотной терминальной группы к карбоксильной терминальной группе в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2,

5 CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает ссылку как к гликозилированным, так и к не гликозилированным имmunоглобулинам любого изотипа или подкласса.

Термин "антитело" включает, но не ограничивается этим, антитела, которые готовят, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными средствами, такие как антитела, выделяемые из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела.

10 IgG включает подгруппу антител.

"Fc слитые белки" включают часть или всю структуру двух или более белков, один из которых является Fc частью молекулы иммуноглобулина, которые не являются слитыми в своем природном состоянии. Было описано приготовление слитых белков, включающих определенные гетерологические полипептиды, слитые с различными

15 частями полипептидов, полученных из антител, (включающих Fc домен), например, (Ashkenazy et al., Proc. Natl. Acad. USA 88: 10535, 1991; Bym et al., Nature 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins" in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pp. 10.19.1-10.19.11, 1992). "Слитый белок-Fc-рецептор" включает один или более из одного или более внеклеточных доменов рецептора, связанного с Fc

20 группой, который в некоторых вариантах осуществления включает шарнирную область, за которой следует CH2 и CH3 домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления слитый белок-Fc-рецептор содержит две или более отличающиеся цепи рецептора, которые связаны с одним или более чем одним лигандом(ами). Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, IL-1 ловушка

25 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R, слитой с Fc антитела higG1; смотри патент США № 6927004, который включается здесь ссылкой во всей своей полноте), или ловушку-VEGF (например, афлиберцепт, который содержит Ig домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитого с Ig доменом 3 рецептора VEGF Flt1, слитого с Fc антитела higG1; например,

30 SEQ ID NO:1; смотри патенты США № 7087411 и 7279159, который настоящим включается здесь ссылкой во всей своей полноте).

Используемый в настоящем описании термин "полимер" относится к макромолекуле, включающей повторяющиеся мономеры, соединенные ковалентными химическими связями. Полимеры, используемые при осуществлении на практике данного изобретения

35 являются биосовместимыми и биологически разрушаемыми. Биосовместимый и биологически разрушаемый полимер может быть природным или синтетическим. Природные полимеры включают полинуклеотиды, полипептиды, такие как встречающиеся в природе белки, рекомбинантные белки, желатин, коллагены, фибрин, фибропины, полиаспартаты, полиглутаматы, полилейцин, сополимеры лейцин-глутамат

40 и полисахариды, такие как целлюлоза, альгинаты, декстран и декстрановые полимерные гидрогели, амилоза, инулин, пектин и гуаровая камедь, хитозан, хитин, гепарин и гиалуроновую кислоту. Синтетические биосовместимые или биологически разрушаемые полимеры включают полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), сополимер полимолочной и полигликолевой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-со-

45 гликолид (PLGA), PLGA-этиленоксидфумарат, PLGA-альфа-токоферилсукцинат, этирифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксифенокси)гексана] (pCPH), сополимер гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (PHB-PVA), сополимер полиэтиленгликоль-

полимолочнная кислота (PEG-PLA), поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL), полиалкилицианоакрилат (PAC), поли(этил)цианоакрилат (PEC), полизобутилцианоакрилат, поли- $N$ -(2-гидроксипропил)метакриламид (поли(NPMA)), поли- $\beta$ -R-гидроксибутират (PHB), поли- $\beta$ -R-гидроксиалканоат (PHA), поли- $\beta$ -R-яблочную кислоту, полимеры фосфолипид-холестерин, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/PEG-DSPE)/холестерин, этилцеллюозу, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (CD), полибутиленсукинат (PBS), полиортогоэфиры, сополимеры полиортогоэфир-полиамидин, сополимеры полиортогоэфир-диамин, полиортогоэфиры, включающие латентные кислоты для контроля скорости разрушения, и, помимо прочего, сополимеры полиэтиленгликоль/полибутилентерефталат.

Этилцеллюзоза (EC) представляет собой хорошо известный и легкодоступный биоматериал, используемый в фармацевтической и пищевой науке. Она представляет собой производное целлюзозы, в котором некоторая часть гидроксильных групп глюкозы замещена этиловым эфиром. Смотри (Martinac et al., J. Microencapsulation, 22 (5): 549-561 (2005) и содержащиеся в ней ссылки), которая описывает методы применения этилцеллюзозы в качестве биосовместимых полимеров при получении микросфер. Смотри также патент США 4 210 529 (1980)) и ссылки в нем для подробного ознакомления с этилцеллюзозой и способами получения производных этилцеллюзозы.

Поли-D,L-лактид-со-гликолид (PLGA) также представляет собой хорошо известный, одобренный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами, биосовместимый и биологически разрушающийся полимер, используемый в технологии культивирования тканей и фармацевтических системах доставки. PLGA представляет собой сложный полиэфир, включающий мономеры гликоловой кислоты и молочной кислоты. Описание синтеза PLGA и получения наночастиц PLGA можно найти в (Astete and Sabilov, Biomater. Sci. Polym. Ed., 17(3): 247-89 (2006) и содержащиеся в ней ссылки).

Поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL) представляет собой другой биосовместимый и биологически разрушающийся полимер, одобренный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами для применения в качестве устройства доставки лекарственного препарата при лечении людей. PCL представляет собой сложный полиэфир  $\epsilon$ -капролактона, который быстро гидролизуется в организме с образованием нетоксичной или мало токсичной гидроксикарбоновой кислоты. Описание получения PCL можно найти в (Labet and Thielemans, Chemical Society Reviews 38: 3484-3504 (2009) и содержащиеся в ней ссылках). Описание получения и применения микросфер и наносфер на основе PCL в качестве систем доставки можно найти в (Sinha et al., J. Pharm., 278(1):1-23 (2004) и содержащиеся в ней ссылках).

Полиортогоэфир (POE) представляет собой биоразлагаемый полимер, предназначенный для доставки лекарственных препаратов. Как правило, он представляет собой полимер кетенацетала, предпочтительно циклического дикетенацетала, такого как, например, 3,9-диметилен-2,4,8,10-тетраокса-спиро[5,5]-ундекана, который полимеризуется посредством конденсации гликоля с образованием ортоэфирных связей. Описание синтеза и различных типов полиортогоэфиров можно найти, например, в патенте США 4 304 767. Полиортогоэфиры можно модифицировать, чтобы контролировать их профиль высвобождения лекарственного препарата и скорости разложения посредством введения или выведения различных гидрофобных диолов и полиолов, например, заменяя гексантриол на декантриол; а также добавляя латентные кислоты, такие как, например, октандикарбоновую кислоту или аналогичную, к основной цепи, чтобы увеличить pH чувствительность. Другие модификации полиортогоэфира включают интегрирование

аминогруппы для увеличения функциональности. Образование, описание и применение полиортэфиров описывается в патентах США 5 968 543, 4 764 364 и (Heller and Barr, *Biomacromolecules*, 5(5):1625-32 (2004), Heller, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57:2053-62 (2005)).

Используемая в настоящем описании фраза "распылительная сушка" обозначает способ получения сухого порошка, включающего частицы микронного размера, из звезды или суспензии с помощью устройства для распылительной сушки. Устройства для распылительной сушки используют распылитель или распыляющее сопло для диспергирования суспензии или звезды в виде спрея с контролируемым размером капель. Распылительной сушкой можно генерировать капли с размером от 10 до 500 мкм. По мере того, как растворитель (вода или органический растворитель) высыхает, вещество белка высыхает в частицу микронного размера, формируя порошкообразное вещество; или в случае суспензии белок-полимер, в течение сушки полимерная оболочка затвердевает вокруг загрузки из белка.

Микрочастицы по изобретению включают ядро из белка, окруженное полимерным верхним слоем или покрытием. Вокруг, формируется микроизмельченная частица белка, которую затем диспергируют в растворе полимера (полимер, растворенный в растворителе) с получением суспензии белок-полимер. Суспензию белок-полимер затем распыляют до тонкодисперсных (микроизмельченных) капель, и растворитель высушивают с формированием микрочастицы.

В одном варианте осуществления микроизмельченную частицу белка получают, изготавливая раствор белка и затем подвергая данный раствор белка распылению и нагреванию с получением сухого порошка, включающего белок. Одним способом получения микроизмельченных частиц белка является распылительная сушка. В одном варианте осуществления белок представляет собой лечебный белок, из которого составляют композицию, включая буферные агенты, стабилизаторы и другие фармацевтически приемлемые наполнители, получая фармацевтическую композицию лечебного белка. Иллюстративные фармацевтические композиции описываются в патентах США 7365165, 7572893, 7608261, 7655758, 7807164, 2010-0279933, 2011-0171241 и PCT/US11/54856.

Количество лечебного белка, содержащегося в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, можно варьировать в зависимости от конкретных желательных свойств композиции, а также конкретных обстоятельств и целей, в которых данную композицию предполагают использовать. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать приблизительно от 1 мг/мл до 500 мг/мл белка; приблизительно от 5 мг/мл до 400 мг/мл белка; приблизительно от 5 мг/мл до 200 мг/мл белка; приблизительно от 25 мг/мл до 180 мг/мл белка; приблизительно от 25 мг/мл до 150 мг/мл белка; или приблизительно от 50 мг/мл до 180 мг/мл белка. Например, композиции по настоящему изобретению могут включать приблизительно 1 мг/мл; приблизительно 2 мг/мл; приблизительно 5 мг/мл; приблизительно 10 мг/мл; приблизительно 15 мг/мл; приблизительно 20 мг/мл; приблизительно 25 мг/мл; приблизительно 30 мг/мл; приблизительно 35 мг/мл; приблизительно 40 мг/мл; приблизительно 45 мг/мл; приблизительно 50 мг/мл; приблизительно 55 мг/мл; приблизительно 60 мг/мл; приблизительно 65 мг/мл; приблизительно 70 мг/мл; приблизительно 75 мг/мл; приблизительно 80 мг/мл; приблизительно 85 мг/мл; приблизительно 86 мг/мл; приблизительно 87 мг/мл; приблизительно 88 мг/мл; приблизительно 89 мг/мл; приблизительно 90 мг/мл; приблизительно 95 мг/мл; приблизительно 100 мг/мл; приблизительно 105 мг/мл; приблизительно 110 мг/мл; приблизительно 115 мг/мл; приблизительно 120 мг/мл;

приблизительно 125 мг/мл; приблизительно 130 мг/мл; приблизительно 131 мг/мл; приблизительно 132 мг/мл; приблизительно 133 мг/мл; приблизительно 134 мг/мл; приблизительно 135 мг/мл; приблизительно 140 мг/мл; приблизительно 145 мг/мл; приблизительно 150 мг/мл; приблизительно 155 мг/мл; приблизительно 160 мг/мл;

5 приблизительно 165 мг/мл; приблизительно 170 мг/мл; приблизительно 175 мг/мл; приблизительно 180 мг/мл; приблизительно 185 мг/мл; приблизительно 190 мг/мл; приблизительно 195 мг/мл; приблизительно 200 мг/мл; приблизительно 205 мг/мл; приблизительно 210 мг/мл; приблизительно 215 мг/мл; приблизительно 220 мг/мл; приблизительно 225 мг/мл; приблизительно 230 мг/мл; приблизительно 235 мг/мл;

10 приблизительно 240 мг/мл; приблизительно 245 мг/мл; приблизительно 250 мг/мл; приблизительно 255 мг/мл; приблизительно 260 мг/мл; приблизительно 265 мг/мл; приблизительно 270 мг/мл; приблизительно 275 мг/мл; приблизительно 280 мг/мл; приблизительно 285 мг/мл; приблизительно 290 мг/мл; приблизительно 295 мг/мл; приблизительно 300 мг/мл лечебного белка.

15 Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают один или более наполнителей. Используемый в настоящем описании термин "наполнитель" обозначает любое не терапевтическое вещество, добавленное к композиции для обеспечения желательной консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также включать

20 один или более углеводов, например, один или несколько сахаров. Сахар может представлять собой восстанавливающий сахар или невосстанавливающий сахар. "Восстанавливающие сахара" включают, например, сахара с кетоновой или альдегидной группой и содержат полуацетальную группу, которая дает возможность сахару действовать в качестве восстанавливающего агента. Конкретные примеры

25 восстанавливающих сахаров включают фруктозу, глюкозу, глицеральдегид, лактозу, арабинозу, маннозу, ксилозу, рибозу, рамнозу, галактозу и мальтозу. Невосстанавливающие сахара могут включать аномерный углерод, который является ацеталем, и является по существу не реакционно-способным по отношению к аминокислотам или полипептидам, чтобы инициировать реакцию Майяра. Конкретные

30 примеры невосстанавливающих сахаров включают сахарозу, трегалозу, сорбозу, сукралозу, мелицитозу и рафинозу. Сахарные кислоты включают, например, сахарную кислоту, глюконат и другие полигидроксисахара и их соли.

Количество сахара, содержащегося в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, будет варьироваться в зависимости от конкретных обстоятельств и целей,

35 для которых предназначено применение данных композиций. В некоторых вариантах осуществления композиции могут содержать приблизительно от 0,1% до 20% сахара; приблизительно от 0,5% до 20% сахара; приблизительно от 1% до 20% сахара; приблизительно от 2% до 15% сахара; приблизительно от 3% до 10% сахара; приблизительно от 4% до 10% сахара; или приблизительно от 5% до 10% сахара.

40 Например, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать приблизительно 0,5%; приблизительно 1,0%; приблизительно 1,5%; приблизительно 2,0%; приблизительно 2,5%; приблизительно 3,0%; приблизительно 3,5%; приблизительно 4,0%; приблизительно 4,5%; приблизительно 5,0%; приблизительно 5,5%; приблизительно 6,0%; приблизительно 6,5%; приблизительно 7,0%; приблизительно 7,5%; приблизительно 8,0%; приблизительно 8,5%; приблизительно 9,0%; приблизительно 9,5%; приблизительно 10,0%; приблизительно 10,5%; приблизительно 11,0%; приблизительно 11,5%; приблизительно 12,0%; приблизительно 12,5%; приблизительно 13,0%; приблизительно 13,5%; приблизительно 14%; приблизительно 14,5%; приблизительно 15,0%;

приблизительно 15,5%; приблизительно 16,0%; 16,5%; приблизительно 17%;  
приблизительно 17,5%; приблизительно 18%; приблизительно 18,5%; приблизительно  
19%; приблизительно 19,5%; или приблизительно 20,0% сахара (например, сахарозы).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут включать  
5 одно или более поверхностно-активных веществ. Используемый в настоящем описании  
термин "поверхностно-активное вещество" обозначает вещество, которое уменьшает  
поверхностное натяжение жидкости, в которой оно растворено, и/или снижает  
межфазное натяжение между маслом и водой. Поверхностно-активные вещества могут  
быть ионными или неионными. Иллюстративные неионные поверхности-активные  
10 вещества, которые можно включить в композиции по настоящему изобретению,  
включают, например, алкилполиэтиленоксид, алкилполиглюкозиды (например,  
октилглюкозид и децилмальтозид), жирные спирты, такие как цетиловый спирт и  
олеиловый спирт, кокамидMEA, кокамидDEA и кокамидTEA. Конкретные неионные  
поверхностно-активные вещества, которые можно включить в композиции по  
15 настоящему изобретению, включают, например, полисорбаты, такие как полисорбат  
20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80,  
полисорбат 81 и полисорбат 85; полоксамеры, такие как полоксамер 188, полоксамер  
407, полиэтиленполипропиленгликоль или полиэтиленгликоль (PEG). Полисорбат 20  
также известен как TWEEN 20, монолаурат сорбита и монолаурат  
20 полиоксиэтиленсорбита.

Количество поверхностно-активного вещества, содержащегося в фармацевтической  
композиции по настоящему изобретению, можно варьировать в зависимости от  
конкретных желательных свойств композиции, а также конкретных обстоятельств и  
целей, для которых предназначено применение данных композиций. В некоторых  
25 вариантах осуществления композиции могут содержать приблизительно от 0,05% до  
5% поверхностно-активного вещества или приблизительно от 0,1% до 0,2%  
поверхностно-активного вещества. Например, композиции по настоящему изобретению  
могут включать приблизительно 0,05%; приблизительно 0,06%; приблизительно 0,07%;  
приблизительно 0,08%; приблизительно 0,09%; приблизительно 0,10%; приблизительно  
30 0,11%; приблизительно 0,12%; приблизительно 0,13%; приблизительно 0,14%;  
приблизительно 0,15%; приблизительно 0,16%; приблизительно 0,17%; приблизительно  
0,18%; приблизительно 0,19%; приблизительно 0,20%; приблизительно 0,21%;  
приблизительно 0,22%; приблизительно 0,23%; приблизительно 0,24%; приблизительно  
0,25%; приблизительно 0,26%; приблизительно 0,27%; приблизительно 0,28%;  
35 приблизительно 0,29% или приблизительно 0,30% поверхностно-активного вещества  
(например, полисорбата 20).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также включать  
один или более буферных растворов. В некоторых вариантах осуществления буферный  
раствор имеет диапазон буферного действия, который полностью или частично  
40 перекрывает диапазон pH 5,5-7,4. В одном варианте осуществления буферный раствор  
имеет рKa приблизительно  $6,0 \pm 0,5$ . В некоторых вариантах осуществления буферный  
раствор включает фосфатный буферный раствор. В некоторых вариантах осуществления  
фосфат присутствует при концентрации от  $5 \text{ mM} \pm 0,75 \text{ mM}$  до  $15 \text{ mM} \pm 2,25 \text{ mM}$ ; от  $6$   
 $45 \text{ mM} \pm 0,9 \text{ mM}$  до  $14 \text{ mM} \pm 2,1 \text{ mM}$ ; от  $7 \text{ mM} \pm 1,05 \text{ mM}$  до  $13 \text{ mM} \pm 1,95 \text{ mM}$ ; от  $8 \text{ mM} \pm$   
1,2 mM до 12 mM ± 1,8 mM; от 9 mM ± 1,35 mM до 11 mM ± 1,65 mM; 10 mM ± 1,5 mM  
или приблизительно 10 mM. В некоторых вариантах осуществления буферная система  
включает гистидин при концентрации  $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ , при pH  $6,0 \pm 0,5$ .

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут иметь pH

приблизительно от 5,0 до 8,0. Например, композиции по настоящему изобретению могут иметь pH приблизительно 5,0; приблизительно 5,2; приблизительно 5,4; приблизительно 5,6; приблизительно 5,8; приблизительно 6,0; приблизительно 6,2; приблизительно 6,4; приблизительно 6,6; приблизительно 6,8; приблизительно 7,0; приблизительно 7,2; приблизительно 7,4; приблизительно 7,6; приблизительно 7,8 или приблизительно 8,0.

В одном особом варианте осуществления лечебный белок представляет собой белок ловушку-VEGF. Фармацевтические композиции для формирования микроизмельченных частиц белка ФРЕС-ловушки могут содержать приблизительно от 10 мг/мл до 100 мг/

10 мл белка ФРЕС-ловушки, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 55 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 65 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл,

15 приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 85 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 95 мг/мл или приблизительно 100 мг/мл белка ФРЕС-ловушки. Растворы могут содержать один или более буферных агентов с концентрацией приблизительно от 5 мМ до 50 мМ. В одном варианте осуществления буферный агент представляет собой приблизительно 10 мМ фосфата при pH приблизительно  $6 \pm 0,5$ . Растворы могут 20 также содержать сахарозу с концентрацией приблизительно от 1% до 10%. В одном варианте осуществления раствор содержит сахарозу с концентрацией приблизительно 2% мас./мас.

В некоторых вариантах осуществления растворов лечебного белка содержит белок ловушки-ФРЕС с концентрацией приблизительно 25 мг/мл или приблизительно 50 мг/ 25 мл в 10 мМ фосфате, при pH 6,2, 2% сахарозы и необязательно 0,1% полисорбата.

Композицию лечебного белка затем подвергают распылению и сушке с получением микроизмельченных частиц белка. Один метод получения микроизмельченных частиц белка состоит в распылительной сушке раствора белка. Распылительная сушка обычно известна из уровня техники и ее можно осуществить на таком оборудовании, как, 30 например, BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Флавил, Швейцария). В одном особом варианте осуществления растворов белка (например, но не ограничиваясь к какой бы то ни было композиции ФРЕС-ловушки, описанной выше) закачивают в устройство для распылительной сушки со скоростью приблизительно от 2 мл/мин до 15 мл/мин, или приблизительно 7 мл/мин. Температуру на входе устройства для 35 распылительной сушки устанавливают выше температуры кипения воды, например, приблизительно при 130°C. Температуру на выходе устанавливают ниже температуры кипения воды и выше комнатной температуры, например, равной 55°C. В одном конкретном варианте осуществления растворов белка (например, раствор ФРЕС-ловушки или раствор IgG) закачивают в BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 со скоростью 40 приблизительно 7 мл/мин., с температурой на входе приблизительно 130°C и температурой на выходе приблизительно 55°C, причем аспиратор устанавливают при 33 м<sup>3</sup>/ч и распыляющий газ при 530 л/ч.

Размер полученных в результате микроизмельченных частиц белка находится в диапазоне приблизительно от 1 мкм до 100 мкм в диаметре, в зависимости от конкретной 45 композиции и концентрации белка и наполнителей. В некоторых вариантах осуществления микроизмельченные частицы белка имеют диаметр приблизительно от 1 мкм до 100 мкм, приблизительно от 1 мкм до 40 мкм, приблизительно от 2 мкм до 15 мкм, приблизительно от 2,5 мкм до 13 мкм, приблизительно от 3 мкм до 10 мкм,

приблизительно 5 мкм, приблизительно 6 мкм, приблизительно 7 мкм, приблизительно 8 мкм, приблизительно 9 мкм, приблизительно 10 мкм, приблизительно 11 мкм или приблизительно 12 мкм.

Затем микроизмельченные частицы белка покрывают биосовместимым и

- 5 биологически разрушаемым полимером. Это можно осуществить суспендированием микроизмельченных частиц белка в растворе полимера. Раствор полимера по существу представляет собой полимер, растворенный в растворителе. Например, биосовместимый и биологически разрушаемый полимер можно растворить, помимо прочего, в метиленхлориде, тетрагидрофуране, этилацетате или в каком-то другом применимом
- 10 растворителе. Этилацетат широко известен в качестве безопасного растворителя и часто используется при приготовлении лекарственных препаратов, имплантатов или продуктов питания.

- 15 В некоторых вариантах осуществления полимер может представлять собой этилцеллюзу ("ЕС"), полимолочную кислоту ("PLA"), полиортоэфир ("РОЕ"), поли-D,L-лактид-со-гликолид ("PLGA") или поли-ε-капролактон ("PCL"). Полимер можно растворить в растворителе (например, этилацетате) при концентрации приблизительно от 10 мг/мл до 300 мг/мл, приблизительно от 15 мг/мл до 295 мг/мл, приблизительно от 20 мг/мл до 290 мг/мл, приблизительно от 25 мг/мл до 280 мг/мл, приблизительно от 30 мг/мл до 270 мг/мл, приблизительно от 35 мг/мл до 265 мг/мл, приблизительно от 40 мг/мл до 260 мг/мл, приблизительно от 45 мг/мл до 260 мг/мл, приблизительно от 50 мг/мл до 255 мг/мл, приблизительно от 55 мг/мл до 250 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 125 мг/мл,
- 20 25 приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 175 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 225 мг/мл или приблизительно 250 мг/мл.

- 30 Микроизмельченные частицы белка добавляют в раствор полимера при концентрации приблизительно от 10 мг/мл до 100 мг/мл, приблизительно от 15 мг/мл до 95 мг/мл, приблизительно от 20 мг/мл до 90 мг/мл, приблизительно от 25 мг/мл до 85 мг/мл, приблизительно от 30 мг/мл до 80 мг/мл, приблизительно от 35 мг/мл до 75 мг/мл, приблизительно от 40 мг/мл до 70 мг/мл, приблизительно от 45 мг/мл до 65 мг/мл, приблизительно от 50 мг/мл до 60 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл. Частицы перемешивают с образованием взвеси или супензии, которую затем подвергают распылению и сушке с получением частицы белка, покрытого полимером (т.е. микрочастиц).
- 35

- 40 В одном варианте осуществления супензию частиц белка в растворе полимера подвергают распылительной сушке, которую осуществляют в манере, аналогичной методу получения микроизмельченных частиц белка, но с сниженной температурой на входе для защиты от воспламенения органического растворителя или полимера. Вкратце, супензию частиц белка в растворе полимера закачивают в устройство для распылительной сушки при скорости приблизительно от 5 мл/мин до 20 мл/мин, или приблизительно от 12,5 мл/мин. Супензию закачивали со скоростью 12,5 мл/мин в устройство для распылительной сушки со скоростью потока всасываемого воздуха и
- 45 распыляющего газа приблизительно 530 л/ч и 35 м<sup>3</sup>/ч (мм), соответственно. Температуру на входе устанавливали равной 90°C и температуру на выходе устанавливали приблизительно 54°C. Температуру на входе устройства для распылительной сушки устанавливали выше температуры воспламенения растворителя, например,

приблизительно 90°C. Температура на выходе была ниже температуры на входе и выше температуры окружающей среды, например, приблизительно 54°C. В одном особом варианте осуществления суспензию, содержащую приблизительно 50 мг/мл частиц белка (например, ловушку-VEGF) в растворе полимера в этилацетате с концентрацией 5 приблизительно от 50 мг/мл до 250 мг/мл, закачивают в BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 со скоростью приблизительно 12,5 мл/мин, с температурой на входе приблизительно 90°C и температурой на выходе приблизительно 54°C, причем аспиратор устанавливают приблизительно при 35 м<sup>3</sup>/ч и распыляющий газ приблизительно при 530 л/ч.

Полученные в результате микрочастицы, которые содержат ядро частицы белка с полимерным верхним слоем, имеют диаметр в диапазоне приблизительно от 2 мкм до 10 мкм, приблизительно от 5 мкм до 65 мкм, приблизительно от 10 мкм до 60 мкм, приблизительно от 15 мкм до 55 мкм, приблизительно от 20 мкм до 50 мкм, приблизительно 15 мкм, приблизительно 20 мкм, приблизительно 25 мкм или 15 приблизительно 30 мкм. Разброс по размеру во многом отражает толщину полимерного верхнего слоя, хотя диаметр ядра из белка в некоторой степени может внести вклад в разброс по размеру. Изменяя исходную концентрацию раствора полимера и/или сам полимер, можно контролировать диаметр микрочастицы. Например, микрочастицы, которые изготавливали с применением 50 мг/мл полимера, имели средний размер приблизительно от 15 мкм до 20 мкм, тогда как микрочастицы, которые изготавливали 20 с применением 250 мг/мл полимера, имели средний размер приблизительно 30 мкм.

Микрочастицы по настоящему изобретению применимы в белковых терапевтических средствах медленного высвобождения или пролонгированного действия. Например, представляется, что микрочастицы ловушки-VEGF применимы в лечебном белке ловушки-VEGF пролонгированного высвобождения, например, в стекловидном теле 25 для лечения заболеваний стекловидного тела глаз или подкожной имплантации для пролонгированного высвобождения ловушки-VEGF для лечения рака или других заболеваний.

Микрочастицы по настоящему изобретению высвобождают белок в физиологическую водную среду приблизительно при 37°C при относительно постоянной скорости в течение продолжительного периода времени, вплоть до, по меньшей мере, 60 дней. В общем, данные микрочастицы, полученные с более высокой концентрацией полимера (например, 250 мг/мл) имеют тенденцию показывать относительно линейный профиль высвобождения белка, тогда как микрочастицы, полученные с более низкой концентрацией полимера (например, 50 мг/мл) имеют тенденцию показывать исходный выброс, за которым следует начало отложенного "взрывного" высвобождения. Более того, микрочастицы, сформированные из полимера с более высокой концентрацией, показывали более медленную скорость высвобождения белка, по сравнению с микрочастицами, полученными из полимера с более низкой концентрацией. Качество белка, высвобождаемого из микрочастиц с течением времени соответствовало качеству исходного материала белка. Имело место незначительное разрушение белка, либо оно 40 отсутствовало вовсе.

## ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры предлагаются с тем, чтобы обеспечить специалистов в данной области полным раскрытием и описанием, как осуществить и использовать 45 способы и композиции по изобретению, и они не имеют намерения ограничивать объем патентной защиты, который авторы заявки рассматривают в качестве своего изобретения. Были осуществлены попытки обеспечить точность, что касается используемых цифр (например, количеств, размеров и т.д.), но некоторые

экспериментальные ошибки и отклонения должны быть приняты во внимание.

В следующих ниже примерах белок ловушка-VEGF ("VGT"), который является димером полипептида, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, служит в качестве примера слитого белка-Fc-рецептора.

#### 5 ПРИМЕР 1: МИКРОИЗМЕЛЬЧЕННЫЕ БЕЛКИ

Растворы, содержащие 25 мг/мл белка ловушки-VEGF ("VGT"), 25 мг/мл VGT плюс 0,1% полисорбата 80 и 50 мг/мл VGT в 10 мМ фосфата, 2% сахарозы, pH 6,2, каждый, независимо распыляли с помощью устройства для распылительной сушки (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Флавил, Швейцария), с формированием капель, 10 содержащих ловушку-VEGF. Для испарения воды из капель использовали тепло, в результате получая порошок, содержащий ловушку-VEGF. Температуру на входе устанавливали равной 130°C, а температуру на выходе - приблизительно 55°C. Аспиратор устанавливали приблизительно при 33 м<sup>3</sup>/ч и распыляющий газ приблизительно при 530 л/ч. Раствор VGT закачивали со скоростью приблизительно 7 мл/мин.

15 Размер полученных в результате частиц VGT измеряли микропотоковой визуализацией (MFI) и динамическим светорассеянием (DLS). Фигура 1 показывает распределение частиц по размерам, определенное методом MFI для частиц VGT, полученных из концентраций 25 мг/мл VGT, 25 мг/мл VGT плюс 0,1% полисорбата 80, и 50 мг/мл VGT. Для всех концентраций эквивалентный круговой диаметр (ECD) частиц VGT находился 20 в диапазоне приблизительно от 1 мкм до 39 мкм, причем размер основной массы частиц находился в диапазоне приблизительно от 2 мкм до 14 мкм. Для раствора VGT с концентрацией 25 мг/мл частицы образовывали кластеры в диапазоне приблизительно от 2,5 мкм до 8,8 мкм, с модой приблизительно 6 мкм. Для раствора 25 мг/мл VGT плюс 0,1% полисорбата 80 частицы образовывали кластеры в диапазоне приблизительно от 2,5 мкм до 9,7 мкм, с модой приблизительно 6 мкм. Для раствора VGT с концентрацией 25 25 мг/мл частицы образовывали кластеры в диапазоне приблизительно от 2,7 мкм до 12,8 мкм, с модой приблизительно 7 мкм. Средние диаметры для каждой композиции, определенные методами MFI и DLS, показаны в таблице 1.

30 Частицы VGT повторно растворяли в воде для инъекций и исследовали с помощью гель-фильтрации, т.е. эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC), чтобы определить чистоту белка. Никаких изменений в чистоте не было отмечено после микроизмельчения относительно исходного материала (см. таблицу 3).

Таблица 1

35 Средние размеры частиц белка (мкм), определенные методами микропотоковой визуализации (MFI) и динамического светорассеяния (DLS)

Композиция	Средний размер по методу микропотоковой визуализации (мкм)	Средний размер по методу динамического светорассеяния (мкм)
50 мг/мл ловушку-VEGF	7	7,6
25 мг/мл ловушку-VEGF	6	5,9
25 мг/мл ловушку-VEGF, 0,1% полисорбата 80	6	7,1

#### ПРИМЕР 2: МИКРОИЗМЕЛЬЧЕННЫЕ СУСПЕНЗИИ БЕЛКА В ОРГАНИЧЕСКОМ ПОЛИМЕРНОМ РАСТВОРЕ

Различные полимеры использовались или рассматриваются для применения при получении полимерного верхнего слоя микрочастиц. Данные полимеры включают, помимо прочего, этилцеллюлозу ("EC"), полиортогидрофиль ("POE"), поли-D,L-лактид-согликолид ("PLGA") и поли-ε-капролактон ("PCL").

Покрытие этилцеллюлозой

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF суспендировали в растворе 50 мг/мл

этилцеллюлозы в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-50-EC".

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 100 мг/мл этилцеллюлозы в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-100-EC".

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 250 мг/мл этилцеллюлозы в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-250-EC".

#### Покрытие полиортоэфиром

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 50 мг/мл полиортоэфира, содержащего приблизительно 5% латентной кислоты, в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-50-POE".

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 250 мг/мл полиортоэфира, содержащего приблизительно 5% латентной кислоты, в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-250-POE".

#### Покрытие поли-D,L-лактид-со-гликолидом

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 50 мг/мл PLGA в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-50-PLGA".

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 200 мг/мл PLGA в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-200-PLGA".

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 250 мг/мл PLGA в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-250-PLGA".

#### Покрытие поли-ε-капролактоном

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 50 мг/мл PCL в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-50-PCL".

Микроизмельченные частицы ловушки-VEGF супензировали в растворе 250 мг/мл PCL в этилацетате при концентрации приблизительно 50 мг/мл VGT; в настоящем описании обозначено "сuspензия VGT-250-PCL".

PCL имеет низкую  $T_{\text{стекл.}}$  и может не подходить для термической сушки, как описано ниже, но его можно использовать для экстракции растворителем в водной бане, например, с поливиниловым спиртом (ПВС).

### ПРИМЕР 3: ДИСПЕРСИЯ ТОНКОДИСПЕРСНЫХ КАПЕЛЬ БЕЛОК-ПОЛИМЕР И УДАЛЕНИЕ РАСТВОРИТЕЛЯ

Каждую супензию VGT полимер, которую изготавливали в соответствии с примером 2 (смотри выше), подвергали распылительной сушке, используя BÜCHI Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Флавил, Швейцария). Вкратце, каждую супензию распыляли с получением микрокапель, которые затем подвергали распылительной сушке для удаления растворителя и формирования микрочастиц белка, покрытого полимером. Супензию закачивали со скоростью 12,5 мл/мин в устройство для распылительной сушки со скоростью потока всасываемого воздуха и распыляющего газа приблизительно 530 л/ч и 35 м<sup>3</sup>/ч, соответственно. Температуру на входе устанавливали равной 90°C и температуру на выходе устанавливали приблизительно

54°C.

#### ПРИМЕР 4: ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ МИКРОЧАСТИЦ БЕЛОК-ПОЛИМЕР

Подвергнутые распылительной сушке частицы белка, покрытого полимером, полученные согласно представленному в качестве примера способу, генерируют множество микрочастиц, имеющих диапазон эквивалентных круговых диаметров приблизительно от 2,5 мкм до 65 мкм (фиг.2). Разброс по размеру во многом отражает толщину полимерного верхнего слоя, хотя диаметр ядра из белка в некоторой степени может внести вклад в разброс по размеру.

Диаметр микрочастиц коррелирует с исходной концентрацией раствора полимера

(таблица 2, фиг.2). Микрочастицы, которые изготавливали с применением 50 мг/мл полимера, имели средний размер приблизительно 17 мкм ± 2,8 мкм. Микрочастицы, которые изготавливали с применением 250 мг/мл полимера, имели средний размер приблизительно 29 мкм.

#### ПРИМЕР 5. СТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА ПОСЛЕ РАСПЫЛИТЕЛЬНОЙ СУШКИ

Стабильность белка ловушки-VEGF оценивали, используя количественную эксклюзационную хроматографию (SE-UPLC), которая позволяет количественную оценку более мелких продуктов разложения и более крупных продуктов агрегации относительно неповрежденного мономера. Результаты приводятся в таблице 3. По существу, белок оставался стабильным на всем протяжении процессов распылительной сушки и

нанесения покрытия распылением.

Также определяли среднее отношение белка к полимеру по массе для полученных микрочастиц. Совокупность микрочастиц, полученных с варьированием полимеров и концентрации полимера, выделяли и подвергали количественной обращенно-фазовой высокоеффективной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Результаты представлены в таблице 3. Данные можно интерпретировать для подтверждения теории, что более высокая исходная концентрация полимера дает более толстый верхний слой на микрочастице.

Таблица 2

Значения эквивалентного кругового диаметра

Материал	Диапазон (мкм)	Средняя величина (мкм)	Мода (мкм)
Ловушка-VEGF ("VGT") (50 мг/мл)	2,5-29,4	10-12	8,3
VGT (50 мг/мл) + POE (50 мг/мл)	2,5-6,4	15	9,4
VGT (50 мг/мл) + POE (250 мг/мл)	2,5-49,4	29	28,5
VGT (50 мг/мл) + EC (50 мг/мл)	2,5-49,6	19	16,5

Таблица 3

Стабильность и загрузка белка

Материал	VGT исходный материал	VGT, экстрагированный из покрытых полимеров <sup>1</sup>	
		% Нативного	% Нативного <sup>2</sup>
VGT исходный материал	97,7	-	-
Ресуспендированный VGT	97,6	-	-
VGT (50 мг/мл) + POE (50 мг/мл)	-	96,3	14,6
VGT (50 мг/мл) + POE (250 мг/мл)	-	97,7	1,8
VGT (50 мг/мл) + EC (50 мг/мл)	-	97,1	6,1

<sup>1</sup> Исходя из экстрагированной ловушки-VEGF после 1 часа ресуспендирования для удаления непокрытой ловушки-VEGF.

<sup>2</sup> Среднее значение процентного содержания нативного белка по данным SE-UPLC (n=4).

<sup>3</sup> Среднее значение массовых процентов загрузки VGT к полимеру по данным ОФ ВЭЖХ (n=4).

#### ПРИМЕР 6. ВЫСВОБОЖДЕНИЕ БЕЛКА ИЗ МИКРОЧАСТИЦ

Высвобождение белка из микрочастиц определяли, супендируя различные партии микрочастиц в буферном растворе (10 mM фосфата, 0,03% полисорбата 20, pH 7,0) и измеряя количество и качество белка, высвобожденного в раствор с течением времени

при инкубировании при 37°C. При 1-2 недельных интервалах микрочастицы осаждали мягким центрифугированием и 80% надосадочной жидкости, содержащей высвобожденный белок, собирали для последующего анализа. Заменяли эквивалентное количество свежего буферного раствора и микрочастицы повторно супензировали 5 мягким встряхиванием и возвращали в инкубационную камеру с температурой 37°C. Количество и качество белка в надосадочной жидкости оценивали эксклюзионной хроматографией.

В общем, микрочастицы, полученные с более высокой концентрацией полимера (например, 250 мг/мл), имели тенденцию показать относительно линейный профиль 10 высвобождения белка, тогда как микрочастицы, полученные с более низкой концентрацией полимера (например, 50 мг/мл), имели тенденцию показать начальный выброс, за которым следует начало отложенного "взрывного" высвобождения. Данные, показывающие пролонгированное выделение белка, которое оставалось стабильным, вплоть до 60 дней, изображены на фигуре 3 (данные по высвобождению). В таблице 4 15 суммируются данные линейной скорости высвобождения.

Таблица 4	
Динамика высвобождения белка	
Материал	Высвобождение белка ловушки-VEGF (мг VGT/неделю)
VGT (50 мг/мл) + POE (50 мг/мл)	0,14 ± 0,16
VGT (50 мг/мл) + POE (250 мг/мл)	0,06 ± 0,02
VGT (50 мг/мл) + EC (50 мг/мл)	0,031 ± 0,02

#### ПРИМЕР 7: РАЗМЕРОМ ЧАСТИЦЫ МОЖНО МАНИПУЛИРОВАТЬ ПОСРЕДСТВОМ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИМЕРА И ПОТОКА РАСПЫЛЯЮЩЕГО ГАЗА

25 Распределение частиц по размерам контролировали концентрацией полимера и потоком распыляющего газа для измельчения. Увеличенная концентрация полимера сдвигала распределение по направлению к более крупным частицам (200 мг/мл PLGA при 45 мм потока распыляющего газа относительно 100 мг/мл PLGA при 45 мм потока распыляющего газа; смотри таблицу 5). Аналогичным образом, более низкий поток 30 распыляющего газа для измельчения в результате приводил к более крупным каплям и, таким образом, к более крупным частицам (100 мг/мл PLGA при 25 мм потока распыляющего газа относительно 100 мг/мл PLGA при 45 мм потока распыляющего газа; смотри таблицу 5).

Таблица 5				
Размер частиц (все измерения являются приблизительными)				
[PLGA] (мг/мл)	Скорость потока газа (м <sup>3</sup> /час)	Диапазон размера частиц (микроны)	Мода размера частиц (микроны)	Процентное содержание общего объема частиц с размером 15 микрон
Только белок	отсутствует	2,5-25	3,5	1,5%
40 100	25	2,5-40	9,4	3,7%
100	45	2,5-30	9,4	3,7%
200	45	2,5-30	10,2-15,4	5,4%

#### ПРИМЕР 8: РАЗМЕР ЧАСТИЦ И ВЫСВОБОЖДЕНИЕ БЕЛКА ЧЕРЕЗ РАЗЛИЧНЫЕ ПОЛИМЕРЫ

На ловушку-VEGF или IgG распылением наносили покрытие низкомолекулярной (202S) полимолочной кислоты (PLA-LMW), высокомолекулярной (203S) полимолочной кислоты (PLA-HMW), полиангидрида поли[1,6-бис(п-карбоксиленокси)гексана] (pCPN), сополимера гидроксимасляной кислоты с гидроксивалериановой кислотой (PHB-PVA), блок-сополимера полиэтиленгликоль-полимолочная кислота (PEG-PLA) и поли-D,L-

лактид-со-гликолида (PLGA). 25 мг/мл подвергнутого распылительной сушке белка объединяли с 50-100 мг/мл полимера. Анализ высвобождения *in vitro* проводили в 10 mM фосфатном буферном растворе, pH 7,2 при 37°C. Результаты показаны в таблице 6.

5

Таблица 6			
Зависящие от полимера размер частиц и высвобождение белка (все измеряемые величины являются приблизительными)			
Полимер	Белок	Относительное число частиц с размером 15 микрон	Время до 100% высвобождения белка
PLA-LMW	Ловушка-VEGF	$0,8 \times 10^2$	3 дня
PLA-HMW	Ловушка-VEGF	$0,8 \times 10^2$	3 дня
pCPH	Ловушка-VEGF	$1 \times 10^2$	3 дня
RHB-PVA	Ловушка-VEGF	$5 \times 10^2$	1 день
PEG-PLA	Ловушка-VEGF	$0,6 \times 10^2$	6 часов
PLGA	IgG	$1 \times 10^2$	8 дней

10

#### ПРИМЕР 9: СТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА В РАЗЛИЧНЫХ ПОЛИМЕРАХ

15

Ловушку-VEGF и IgG экстрагировали из их соответствующих полимерных покрытий и измеряли их чистоту с помощью эксклюзионной-сверхэффективной жидкостной хроматографии. Результаты суммируются в таблице 7. Для протестированных полимеров белки, как правило, были совместимы со способом нанесения покрытия распылением. Белок оставался стабильным в течение, по меньшей мере, 14 дней для тех полимеров, которые продолжали высвобождать белок.

20

Таблица 7					
Белок	Полимер	% Чистоты по данным эксклюзионной хроматографии			
		После нанесения покрытия распылением	1 день высвобождения <i>in vitro</i> (IVR)	дня IVR	14 дней IVR
Ловушка-VEGF	POE (AP141)	97,7	98,3	98,2	96,7
Ловушка-VEGF	PLA-LMW	97,0	97,4	92,8	-
Ловушка-VEGF	PLA-HMW	93,9	97,3	95,4	-
Ловушка-VEGF	PEG-PLA	89,9	91,2	-	-
Ловушка-VEGF	pCPH	89,2	94,2	84,8	-
Ловушка-VEGF	RHB-PVA	97,4	96,2	-	-
Ловушка-VEGF	PLGA	96,6	97,8	-	93,6
IgG	PLGA	99,2	98,0	-	92,0

35

#### (57) Формула изобретения

1. Способ получения фармацевтической композиции с пролонгированным высвобождением, включающий:

40

(а) распылительную сушку водного раствора, содержащего от 25 мг/мл до 50 мг/мл белка ловушки сосудистого эндотелиального фактора роста (ловушка-VEGF), с образованием совокупности белковых частиц ловушек-VEGF с помощью диспергирования раствора белка ловушки-VEGF и его сушки с помощью распылительной сушки с образованием микроизмельченных белковых частиц, где температура на входе распылительной сушилки устанавливается на уровне выше точки кипения воды, и температура на выходе устанавливается на уровне температуры ниже точки кипения воды и выше температуры окружающей среды, и где раствор терапевтического белка закачивается в распылительную сушилку со скоростью от 2 мл/мин до 15 мл/мин; и

45

(б) сусpenдирование микроизмельченных частиц белка ловушки-VEGF в органическом растворе, содержащем биологически разрушаемый полимер, выбранный из

полиортоэфира или этилцеллюлозы и органического растворителя; и

(с) распылительную сушку суспензии (б) с образованием совокупности полимерных белковых микрочастиц ловушки-VEGF,

где указанная фармацевтическая композиция с пролонгированным высвобождением

5 включает (i) белковые частицы ловушки-VEGF, покрытые биологически разрушающим полимером, или (ii) сбор полимерных белковых частиц ловушки-VEGF, имеющих диаметр в диапазоне от 2 мкм до 70 мкм.

2. Способ по п.1, где водный раствор, содержащий белок ловушки-VEGF, не лиофилизируют.

10 3. Способ по п.1 или 2, где совокупность полимерных белковых микрочастиц ловушки-VEGF не лиофилизована.

4. Способ по любому из пп.1-3, где стадия распылительной сушки (а) включает (i) распыление водного раствора, содержащего белок ловушки-VEGF; и (ii) подачу тепла в распыленный водный раствор, содержащий белок ловушки-VEGF.

15 5. Способ по п.4, где тепло подается при температуре, превышающей температуру кипения воды.

6. Способ по п.5, где температура, превышающая температуру кипения воды, составляет 130°C.

7. Способ по любому из пп.1-6, где стадия (б) включает (i) суспендирование указанной 20 совокупности белковых частиц ловушки-VEGF в органическом растворителе, включающем полимер и органический растворитель; и (ii) распылительную сушку суспензии с образованием совокупности полимерных белковых микрочастиц ловушки-VEGF.

8. Способ по п.7, где стадия распылительной сушки (б) включает (ii) распыление 25 суспензии и затем подачу тепла на распыленную суспензию при температуре, превышающей температуру воспламенения органического растворителя, для выпаривания органического растворителя.

9. Способ по п.8, где температура, превышающая температуру воспламенения органического растворителя, составляет 90°C.

30 10. Способ по любому из пп.7-9, где органический растворитель выбран из группы, состоящей из метиленхлорида, тетрагидрофурана и этилацетата.

11. Способ по любому из пп.1-10, где указанный водный раствор содержит 25-50 мг/мл указанного белка ловушки-VEGF и один или более наполнителей, выбранных из группы, состоящей из сахара, буфера и поверхностно-активного вещества.

35 12. Способ по любому из пп.7-11, где указанный полимер находится в концентрации 10 мг/мл - 300 мг/мл в указанном органическом растворителе.

13. Способ по любому из пп.7-12, где указанную совокупность белковых частиц ловушки-VEGF суспендируют в указанном органическом растворителе в концентрации 10 мг/мл - 100 мг/мл.

40 14. Способ по любому из пп.7-13, где указанную совокупность белковых частиц ловушки-VEGF суспендируют в указанном органическом растворителе в концентрации 50 мг/мл и указанная концентрация указанного полимера в указанном органическом растворителе составляет 50 мг/мл, 100 мг/мл, 200 мг/мл или 250 мг/мл.

15. Способ получения фармацевтической композиции, где указанный способ включает:

45 (а) распыление раствора, содержащего воду и от 25 мг/мл до 50 мг/мл белка ловушки-VEGF с помощью диспергирования раствора белка ловушки-VEGF и его сушки с помощью распылительной сушки с образованием микроизмельченных белковых частиц, где температура на входе распылительной сушилки устанавливается на уровне

температуры выше точки кипения воды, и температура на выходе устанавливается на уровне температуры ниже точки кипения воды и выше температуры окружающей среды, и где раствор терапевтического белка закачивается в распылительную сушилку со скоростью от 2 мл/мин до 15 мл/мин; и

5 (b) сусpendирование микроизмельченных белковых частиц в органическом растворе, содержащем биологически разрушаемый полимер в концентрации от 100 мг/мл до 300 мг/мл и органический растворитель, где полимер представляет собой полиортэфир (POE) или этилцеллюзу (EC); и

10 (c) распылительную сушку супензии (b) при температуре, превышающей температуру кипения воды, с образованием указанной фармацевтической композиции, где микрочастицы в фармацевтической композиции с пролонгированным высвобождением высвобождают белок ловушку-VEGF в течение по меньшей мере 60 дней в физиологической водной среде при 37°C.

15 16. Способ по п.15, где указанная фармацевтическая композиция не подвергается лиофилизации.

17. Способ по любому из пп.1-16, где указанный белок ловушки-VEGF представляет собой афлиберцепт.

20

25

30

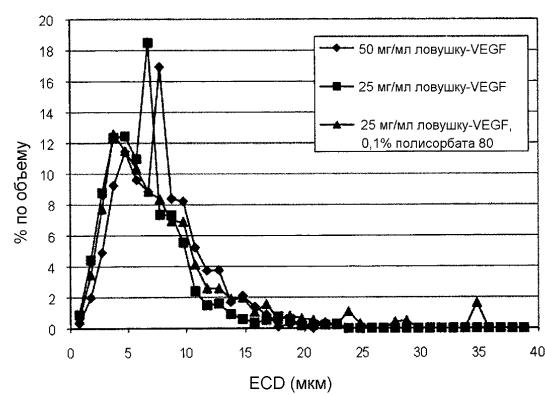
35

40

45

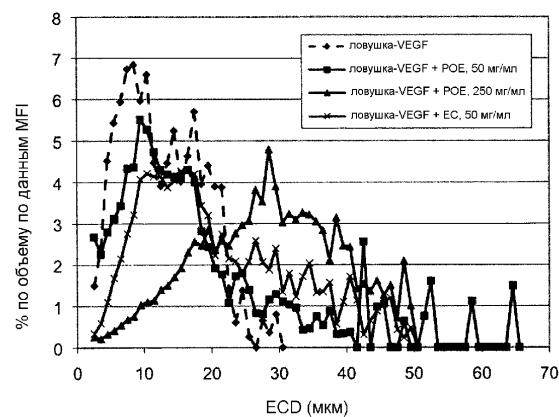
1/3

Фиг.1



2/3

Фиг.2



3/3

Фиг.3

