



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112192** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)
A61K 9/16 (2006.01)
C08G 81/00
C08L 87/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 01832	(72) Винахідник(и): Стендам Роб (NL), Фліпсен Теодорус Адріанус Корнеліус (NL), Хімстра Крістін (NL), Зейдема Йохан (NL)
(22) Дата подання заявки: 23.07.2012	(73) Власник(и): ІННОКОР ТЕКНОЛОДЖИС Б.В., Kadijk 7d, NL-9747 AT Groningen, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.08.2016	(74) Представник: Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 11174987.5	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EP 1 382 628 A1, 21.01.2004 EP 1 555 278 A1, 20.07.2005
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 22.07.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.06.2014, Бюл.№ 11	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2016, Бюл.№ 15	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/NL2012/050529, 23.07.2012	

(54) ЗДАТНІ ДО БІОРОЗКЛАДАННЯ НАПІВКРИСТАЛІЧНІ ТЕРМОПЛАСТИЧНІ МУЛЬТИБЛОКОВІ СПІВПОЛІМЕРИ З РОЗДІЛЕНИМИ ФАЗАМИ ДЛЯ КОНТРОЛЬОВАНОГО ВИВІЛНЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК**(57) Реферат:**

Даний винахід належить до здатного до біорозкладання напівкристалічного термопластичного мультимірного співполімеру з розділеними фазами, до способу одержання зазначеного мультимірного співполімеру, до композиції для доставляння щонайменше однієї біологічно активної сполуки та до способу доставляння біологічно активної сполуки суб'єкту, що потребує цього. Мультиміровий співполімер, згідно з даним винаходом, характеризується тим, що: а) містить щонайменше один сегмент здатного до гідролізу преполімеру (А) та щонайменше один сегмент здатного до гідролізу преполімеру (В), б) зазначений мультиміровий співполімер характеризується T_g 37 °С або менше та $T_{пл}$ 110-250 °С у фізіологічних умовах; с) сегменти зв'язані за допомогою поліфункціонального подовжувача ланцюга; d) сегменти випадковим чином розподілені за полімерним ланцюгом; е) щонайменше частина сегмента преполімеру (А) одержана з водорозчинного полімеру.

UA 112192 C2

Винахід відноситься до здатних до біорозкладання напівкристалічних термопластичних мультиблокових співполімерів з розділеними фазами, до способу одержання зазначених мультиблокових співполімерів, до композиції для доставляння щонайменше однієї біологічно активної сполуки і до способів доставляння біологічно активної сполуки суб'єкту, який потребує цього.

Пептиди і білки, які разом називають поліпептидами, відіграють життєво важливу роль у всіх біологічних процесах і в останні роки привертають до себе все більше уваги як потенційні лікарські засоби. Швидкий розвиток фармакології пептидів і білків разом із великомасштабним виробництвом цих сполук за допомогою технології рекомбінантних ДНК, окрім інших технологій, викликало величезний інтерес до зазначених сполук. На жаль, розробка пептидів і білків набагато випереджає можливості системного або місцевого доставляння зазначених сполук із використанням зручних і ефективних систем доставляння.

В останнє десятиліття підвищена увага приділяється здатним до біорозкладання полімерам для застосування у парентеральних системах тривалої дії з контрольованим вивільненням для системного або точкового доставляння лікарських засобів. Здатні до біорозкладання склади із контрольованим вивільненням можуть значно поліпшувати фармакокінетику лікарських засобів. Це особливо важливо при лікуванні хронічних захворювань, а також для сполук із вузьким "терапевтичним вікном", оскільки у результаті зниження системної концентрації в плазмі знижуються і небажані побічні ефекти. Крім того, багато нових біологічно активних сполук мають короткий період напіввиведення, що робить необхідним часте введення ін'єкцій для досягнення терапевтично ефективного рівня сполуки у плазмі. Вимоги до дотримання пацієнтами схеми лікування, а також великі витрати, пов'язані з необхідністю частого дозування біологічно активних сполук, що вводяться парентерально, підвищили інтерес до здатних до біорозкладання парентеральних лікарських форм із контрольованим вивільненням.

Полі(D, L-молочна кислота) (PDLLA) і співполімери молочної кислоти та гліколевої кислоти, також відомі як співполімери PLGA, є найбільш часто використовуваними здатними до біорозкладання полімерами для застосування в парентеральних складах у вигляді депо з контрольованим вивільненням. Співполімери PLGA успішно застосовують для розробки складів у вигляді депо з уповільненим вивільненням для доставляння невеликих молекул, таких як ризперидон, і терапевтичних пептидів, таких як лейпролід, гoserelin або октреотид.

Полімери PLGA, проте, мають декілька недоліків, які обмежують їхнє застосування та роблять менш придатними для доставляння поліпептидів. По-перше, співполімери PLGA являють собою відносно гідрофобні полімери і не забезпечують оптимальні умови для інкапсульованих білків. Білки можуть адсорбуватися на полімері, що призводить до вповільнення та неповноти вивільнення, розгортання й/або агрегації білків. По-друге, можливість впливати на вивільнення більш великих біологічно активних сполук, таких як інкапсульований поліпептид, обмежена, тому що дифузія зазначених сполук у відносно жорсткій та такій, що не піддається розбухання, матриці PLGA є незначною. Вивільнення білків зі співполімерів PLGA, таким чином, залежить від дифузії через пори, які присутні в матриці, а також від часу розкладання або розчинення матриці. Як правило, інкапсульований білок залишається всередині полімерної матриці до того моменту, коли матриця розкладеться до такої міри, що втрачає цілісність або розчиняється, це призводить до двофазних або трифазних профілів вивільнення, які залежать від розкладання, як правило, що одержують для складів у вигляді депо на основі PLGA. Нарешті, при розкладанні співполімерів PLGA утворюються кислотні фрагменти, які накопичуються у жорсткій та такій, що не піддається набуханню, матриці PLGA, що призводить до одержання кислотного мікросередовища у полімерній матриці, де pH *in situ* може становити не більше 1-2. У зазначених кислотних умовах інкапсульовані білки можуть утворювати агрегати, що призводить до неповного вивільнення білка. Крім того, низький pH може негативно впливати на структурну цілісність та біологічну активність інкапсульованого пептиду або білка і може призводити до зниження терапевтичної ефективності та підвищення імуногенності. Повідомлялося про хімічну модифікацію білків і пептидів, таку як ацилювання й утворення аддуктів.

Таким чином, існує необхідність в одержанні здатних до біорозкладання полімерів, які краще підходять для доставляння білків. Проте, однією з переваг PLGA і споріднених полімерів є їхнє успішне клінічне застосування, а також те, що їх вважають біосумісними, і як наслідок або через зниження ризику вони часто використовуються фармацевтичними компаніями для розробки складів у вигляді депо для доставляння активних сполук. Таким чином, бажана розробка нових здатних до біорозкладання полімерних систем доставляння білків із полімерів, які складаються з добре відомих біологічно безпечних і клінічно прийнятних мономерів.

Для забезпечення гідрофільної матриці з поліпшеною сумісністю з білковими лікарськими засобами, що забезпечує їхнє контрольоване вивільнення, Кіссел зі співавторами (Kissel et al., J. Contr. Rel. 1996, 39(2), 315-326) синтезували трьохблокові АВА співполімери, які містять гідрофільні В блоки полі(етиленоксиду) і гідрофобні здатні до біорозкладання А блоки, які складаються з полі(L-молочної-гліколевої кислоти). Кіссел зі співавторами повідомляли про вповільнене вивільнення різних білкових сполук із мікросфер, які складаються зі співполімерів полі(L-молочної-гліколевої кислоти)-полі(етиленгліколя)-полі(L-молочної-гліколевої кислоти) і полі(L-молочної кислоти)-полі(етиленгліколя)-полі(L-молочної кислоти), тобто полімерів типу АВА, де А являє собою гідрофобний блок, а В являє собою поліетиленгліколь. Зазначені співполімери, проте, мають обмежене співвідношення А/В, тобто вміст полі(етиленгліколя) (ПЕГ). Для запобігання проблеми ниркового кліренсу, пов'язаного зі застосуванням високомолекулярного ПЕГ молекулярна маса ПЕГ-фрагмента, який застосовується у зазначених трьохблокових АВА співполімерах, переважно не повинна перевищувати 5000 г/моль. Таким чином, для досягнення високого вмісту ПЕГ у трьохблокових полімерах, описаних Кісселом зі співавторами, при збереженні низької молекулярної маси ПЕГ гідрофобні блоки також повинні бути короткими. Це призводить до одержання полімерів із властивостями, які небажані для біоматеріалів, оскільки при низькій довжині блоків температура склування ($T_{ст}$) нижче кімнатної температури (що визначили автори винаходу), а кристалічність (у випадку полі(L-молочної кислоти) (PLLA)) є дуже низькою або відсутня (De Jong, Macromolecules, 1998, 31(19), 6397-6402), що, таким чином, призводить до одержання в'язкого матеріалу і (занадто) швидкому та погано контрольованому вивільненню включеної активної речовини.

Приклади сегментованих/блок-співполімерів із розділеними фазами наведені, наприклад, у патентах США № 5554170 А, № 5066772 А, № 5236444 А, № 5133739 А та № 4429080 А. Ці відомі матеріали являють собою біоресорбувальні співполімери складних ефірів, де жорсткі блоки, головним чином, складаються з кристалічного полігліколіду та/або полілактиду. Зазначені полімери є жорсткими і не піддаються набуханню і, таким чином, страждають від тих самих недоліків і обмежень, що і PLGA і PDLA, це робить їх не придатними для вповільненого вивільнення білків.

Проводилися дослідження вмісту лікарських засобів і здатності вивільнення здатних до біорозкладання мультиблокових співполімерів, які містять один гідролізований сегмент складного поліефіру та один гідрофільний гідролітично стабільний сегмент (наприклад, мультиблокові співполімери на основі сегментів ϵ -капролактону та сегментів полі(етиленгліколя) описані Лі зі співавторами (Lee et al., J. Control. Rel., 2001, 73(2), 315-327)). Зазначені полімери містять тільки один сегмент, який розкладається, що, таким чином, обмежує можливість керування властивостями їхнього розкладання та вивільнення.

Відомі мультиблокові співполімери, які складаються з двох типів здатних до біорозкладання преполімерів (сегментів), з іншого боку, можна одержувати винятково з послідовністю преполімерів, яка чергується, що призводить до обмеження діапазону можливих змінних (Penco et al., J. Appl. Polym. Sci. 2000, 78(10), 1721-1728).

Приклади здатних до біорозкладання мультиблокових співполімерів, які містять гідролізовані сегменти складного поліефіру з різним складом, описані в міжнародній публікації WO-A-2004/007588. Ці мультиблокові співполімери містять здатні до біорозкладання співполімери з розділеними фазами, які містять сегменти аморфного "м'якого" здатного до біорозкладання преполімеру (А), що характеризується $T_{ст}$ (температурою склування) нижче 37 °С, і сегменти напівкристалічного "жорсткого" здатного до біорозкладання преполімеру (В), що характеризується температурою фазового переходу 40-100 °С, в яких сегменти пов'язані за допомогою поліфункціонального подовжувача ланцюга. Для одержання мультиблокових співполімерів із $T_{пл}$ 40-100 °С, описаних у публікації WO-A-2004/007588, вибір преполімерів, які можна застосовувати як сегменти В, обмежений преполімерами, які складаються з полі(ϵ -капролактону) (ПКЛ) (WO-A-2004/007588), полі(валеролактону) (ПВЛ) і/або полідіоксанону (ПДС). У випадку застосування ПДС як сегмент В одержують мультиблокові співполімери з $T_{пл}$ 80-90 °С (патент США № 5711958 А). У випадку використання ПКЛ як сегмент В одержують мультиблокові співполімери з $T_{пл}$ 40-60 °С (WO-A-2004/007588). Гомополімери ПВЛ мають $T_{пл}$, схожу з гомополімерами ПКЛ (тобто ~60 °С). Таким чином, у випадку використання ПВЛ як сегмент В одержують мультиблокові співполімери з $T_{пл}$ 40-60 °С. ПДС, ПКЛ і ПВЛ мають відносно низькі значення $T_{ст}$, які становлять -10, -60 і -60 °С, відповідно. Низькі $T_{ст}$ сегментів ПДС, ПКЛ і ПВЛ обмежують діапазон $T_{ст}$ одержуваного мультиблокового співполімеру (де $T_{ст}$ визначається перемішуванням фаз аморфного сегмента А й аморфної частини напівкристалічного сегмента В), що, таким чином, обмежує можливість керування властивостями вивільнення та розкладання.

У міжнародній публікації WO-A-99/02168 описані здатні до біорозкладання мультиблокові співполімери для біомедичних застосувань, де преполімери типу АВА або АВ одержані з використанням подовжувачів ланцюга. Подовження ланцюгів преполімерів типу АВА або АВ може призводити винятково до одержання мультиблокових співполімерів, які чергуються.

5 Блокспівполімер, який чергується, може бути представлений формулою АВАВАВАВАВ у випадку подовження ланцюга АВ-преполімерів або АВААВААВААВА у випадку подовження ланцюга АВА-преполімерів.

Здатні до біорозкладання мультиблокові співполімери з розділеними фазами, які містять жорсткий та м'який сегмент, описані у патенті США № 6160084 А. У цьому документі описане застосування мультиблокових співполімерів ПКЛ-PLLA, які складаються з преполімерів, пов'язаних за допомогою триметилгексан-1,6-діізоціанату (THDI). Зазначено, що ці матеріали підходять для застосування в системах доставляння лікарських засобів, у яких потрібна пам'ять форми. У заявці на патент США № 2006/0140999 описане застосування схожих полімерів із пам'яттю форми для застосування в системах доставляння лікарських засобів, де матеріал із пам'яттю форми містить ланки, які одержані з мономерів, вибраних із групи, яка складається з капролактону, лактиду, гліколіду та діоксанону. Приклади включають мультиблокові співполімери ПДС-ПКЛ і ПДС-PLGA. Ці матеріали не можуть набухати у значній мірі в (імітованих) фізіологічних умовах, оскільки набухання призведе до втрати механічних властивостей, а, таким чином, до втрати "запам'ятованої" форми.

Інші сегментовані мультиблокові співполімери з розділеними фазами включають співполімери простих і складних поліефірів, такі як описані у патенті США № 5980948 А. Зазначені співполімери складаються з кристалічних ароматичних сегментів і м'яких сегментів, які містять ПЕГ, пов'язаних гідролізованими складноефірними зв'язками. Співполімери мають характерний недолік, який полягає в тому, що композиції з низькою здатністю до набухання, тобто композиції з високим вмістом гідрофобних ароматичних сегментів погано розкладаються внаслідок високої кристалічності та гідрофобності ароматичних сегментів. Композиції з високою здатністю до набухання, тобто композиції з високим вмістом ПЕГ, також погано розкладаються, але вже через низьку концентрацію складноефірних зв'язків. На противагу цьому, мультиблокові співполімери згідно з даним винаходом розкладаються при будь-яких співвідношеннях сегмент А/сегмент В внаслідок присутності складноефірних зв'язків як у сегменті А, так і в сегменті В. Крім того, на відміну від мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом $T_{ст}$ співполімерів простих і складних поліефірів неможливо регулювати, і вона завжди є низькою та приблизно дорівнює $T_{ст}$ ПЕГ, тобто - 30 °С.

Завданням даного винаходу є усунення одного або більше недоліків, які властиві рівню техніки.

Згідно з першим аспектом даний винахід відноситься до здатного до біорозкладання напівкристалічного термопластичного мультиблокового співполімеру з розділеними фазами, причому співполімер характеризується тим, що:

- а) містить щонайменше один сегмент гідролізованого преполімеру (А) і щонайменше один сегмент гідролізованого преполімеру (В);
- б) зазначений мультиблоковий співполімер у фізіологічних умовах має $T_{ст}$ 37 °С або менше і $T_{пл}$ 110-250 °С;
- в) сегменти пов'язані за допомогою поліфункціонального подовжувача ланцюга;
- г) сегменти випадковим чином розподілені за полімерним ланцюгом; і
- е) щонайменше частина преполімеру (А) одержана з водорозчинного полімеру.

Мультиблоковий співполімер згідно з даним винаходом може складатися щонайменше з двох різних сегментів, кожний з яких має різні фізичні характеристики, включаючи характеристики розкладання та набухання. Несподівано виявилось, що внаслідок свого унікального складу та напівкристалічної структури з розділеними фазами матеріали згідно з даним винаходом мають множину застосувань й особливо підходять для створення матриць для доставляння лікарських засобів і покриттів, через які виділяються лікарські засоби, які можна застосовувати для інкапсулювання певних терапевтичних агентів і для вповільненого вивільнення інкапсульованого терапевтичного агента місцево або у системний кровотік. Відповідно до наведеного нижче опису композиція згідно з даним винаходом є важливою з урахуванням контрольованого вивільнення біологічно активної сполуки, такої як біологічно активний поліпептид, в організм хазяїна.

Термін "розділені фази", який використовується у даному описі, відноситься до системи, зокрема до співполімеру, яка утворена двома або більше різними преполімерами, щонайменше два з яких (частково) несумісні один із одним при температурі тіла або нижче (у фізіологічних умовах, таких як організм людини). Таким чином, преполімери не утворюють гомогенну суміш

при об'єднанні ні у вигляді фізичної суміші преполімерів, ні при об'єднанні преполімерів в одній хімічній сполуці у вигляді "хімічної суміші", тобто у співполімері.

Термін "преполімер", який використовується у даному описі, відноситься до полімерних сегментів, які випадковим чином пов'язані за допомогою поліфункціонального подовжувача ланцюга та спільно утворюють мультиблоковий співполімер згідно з даним винаходом. Кожний преполімер можна одержувати шляхом полімеризації придатних мономерів, і зазначені мономері, таким чином, є хімічними ланками кожного преполімеру. Бажані властивості преполімерів, а отже і мультиблокового співполімеру згідно з даним винаходом можна контролювати шляхом вибору преполімеру з придатним складом і молекулярною масою (зокрема M_n), у результаті чого досягаються необхідні значення $T_{пл}$ або $T_{ст}$.

Термін "мультиблоковий", який використовується у даному описі, відноситься до наявності щонайменше двох сегментів преполімерів у полімерному ланцюзі.

Термін "термопластичний", який використовується у даному описі, відноситься до мультиблокового співполімеру без перехресного зшивання. При нагріванні термопластичний полімер стає текучим, після чого затвердіває при (повторному) охолодженні. Термопластичні полімери розчинні у придатних розчинниках.

Термін "гідролізований", який використовується у даному описі, відноситься до здатності взаємодіяти з водою, у результаті чого молекула розщеплюється. Гідролізовані групи включають складноефірну, карбонатну, фосфазенову, амідну й уретанову групи. У фізіологічних умовах тільки складноефірні, карбонатні та фосфазенові групи взаємодіють з водою протягом прийнятного часу.

Термін "поліфункціональний подовжувач ланцюга", який використовується у даному описі, відноситься до присутності в подовжувачі ланцюга щонайменше двох реакційноздатних груп, які забезпечують хімічне зв'язування реакційноздатних преполімерів і утворення, тим самим, мультиблокового співполімеру.

Термін "випадковий мультиблоковий співполімер", який використовується у даному описі, відноситься до мультиблокового співполімеру, в якому різні сегменти випадковим чином розподілені за полімерним ланцюгом.

Термін "водорозчинний полімер", який використовується у даному описі, відноситься до полімеру, який має гарну розчинність у водному середовищі, переважно у воді, у фізіологічних умовах. Такий полімер при співполімеризації з більш гідрофобними фрагментами дозволяє одержуваному співполімеру набухати у воді. Водорозчинний полімер може бути одержаний з діолу, діаміну або двоосновної кислоти. Для ініціювання полімеризації циклічних мономерів із розкриттям циклу підходять діол або двоосновна кислота.

Термін "здатний до набухання", який використовується у даному описі, відноситься до захоплення води полімером. Ступінь набухання можна обчислювати за співвідношенням маси співполімеру, який набух у воді, і маси сухого співполімеру.

Термін "напівкристалічний", який використовується у даному описі, відноситься до структури мультиблокового співполімеру, яка містить дві різні фази, аморфну фазу і кристалічну фазу. Переважно мультиблоковий співполімер складається з аморфної фази і кристалічної фази.

Термін "біологічно активна сполука", який використовується у даному описі, має широке визначення та відноситься до будь-яких агентів, які забезпечують терапевтичну або профілактичну дію. Зазначені агенти включають, але не обмежуються ними, протимікробні агенти (включаючи антибактеріальні та протигрибкові агенти), протівірусні агенти, протипухлинні агенти, гормони та імуногенні агенти.

Термін "біологічно активний поліпептид", який використовується у даному описі, відноситься до пептидів і білків, які мають біологічну активність в організмі ссавця, більш конкретно в організмі людини.

Застосування напівкристалічних мультиблокових співполімерів із розділеними фазами згідно з даним винаходом дозволяє подолати один або більше зазначених вище недоліків або обмежень. У результаті наявності сегментів, які одержані з водорозчинного полімеру (такі як гідрофільні сегменти ПЕГ), мультиблоковий співполімер із розділеними фазами набухає у водному середовищі з утворенням гідрогелю, який набух, забезпечуючи природне середовище для біологічно активних сполук, таких як білки. При застосуванні мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом як полімерні матриці у складі з контрольованим вивільненням для доставляння біологічно активної сполуки, здатність мультиблокових співполімерів до набухання може запобігати накопиченню продуктів кислотного розкладання, які утворюються в результаті гідролізу полімерних ланцюгів, у полімерній матриці. Замість цього зазначені продукти розкладання вивільняються з матриці, що, таким чином, запобігає утворенню кислотного мікросередовища у полімерній матриці, яке негативно впливає на інкапсульовану біологічно

активну сполуку. Крім того, у результаті здатності мультиблокових співполімерів із розділеними фазами згідно з даним винаходом до набухання будь-які інкапсульовані сполуки можуть вивільнятися поступово за рахунок дифузії, що, таким чином, запобігає появі двофазних або трифазних профілів вивільнення, як правило, які спостерігаються для здатних до

біорозкладання складних полієфірів, що не набухають, таких як полі(D,L-лактид) або полі(молочна-гліколева кислота).

У фізіологічних умовах $T_{пл}$ мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом становить 110-250 °C. Це відбувається внаслідок наявності сегмента В преполімеру. Сегмент В складається з кристалізованих полімерів, таких як PLLA, полі(D-молочна кислота) (PDLA), полігліколева кислота (PGA) або полігидроксibuтират (ПГБ), або комбінації кристалізованих полімерів. Найбільш переважно сегмент В складається з преполімеру, що складається з PLLA. Аморфна фаза мультиблокових співполімерів із розділеними фазами згідно з даним винаходом, головним чином, складається з м'яких сегментів А. Несподівано, автори даного винаходу виявили, що аморфна частина жорстких сегментів В також доповнює аморфну фазу мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом.

Вибір преполімерів, які застосовуються як сегменти В у мультиблокових співполімерах, описаних у публікації WO-A-2004/007588, обмежений преполімерами, які складаються з полі(ϵ -капролактону) (ПКЛ), полі(валеролактону) (ПВЛ) і полі(діоксанону) (ПДС), тому що $T_{пл}$ преполімеру (В) знаходиться в діапазоні 40-100 °C (якщо розглядати традиційні полімери, які використовуються для біомедичних застосувань). Згідно з даним винаходом $T_{пл}$ преполімеру (В) переважно знаходиться в діапазоні 110-250 °C. У результаті преполімер (В) може бути вибраний зі списку преполімерів, що мають різні хімічні властивості, які раніше навіть не розглядалися. Автори даного винаходу виявили, що інші хімічні властивості преполімеру (В) забезпечують одержання мультиблокових співполімерів із більш ефективними властивостями, які неможливо досягти у випадку співполімерів, описаних у WO-A-2004/007588.

При використанні ПДС як сегмент В одержують мультиблокові співполімери з $T_{пл}$ 80-90 °C (патент США № 5711958 А). При використанні ПКЛ як сегмент В одержують мультиблокові співполімери з $T_{пл}$ 40-60 °C (патент США № 5711958 А). Гомополімер ПВЛ має $T_{пл}$ 60 °C, схожу з $T_{пл}$ гомополімеру ПКЛ. При використанні сегментів ПВЛ як сегмент В одержують мультиблокові співполімери з $T_{пл}$ приблизно 40-60 °C. ПДС, ПКЛ і ПВЛ є напівкристалічними і, таким чином, окрім $T_{пл}$ характеризуються також $T_{ст}$. $T_{ст}$ аморфних фаз ПДС, ПКЛ і ПВЛ є низькими і становлять -10 °C, -60 °C і -70 °C, відповідно. Підвищення діапазону температур блоку В до 110-250 °C відкриває можливість застосування PLLA, PDLA, PGA і ПГБ. Ці полімери характеризуються більш високими $T_{ст}$, які становлять приблизно 50 °C, 35 °C і 0 °C, відповідно. Незалежно від полімеру, який застосовується як жорсткі сегменти В, зазначені жорсткі сегменти В завжди самі по собі є напівкристалічними, тобто частково аморфними. Несподівано було виявлено, що аморфна частина жорстких сегментів В (частково) змішується з аморфною фазою м'яких сегментів А, і, таким чином, обидва сегменти впливають на підсумкову $T_{ст}$ мультиблокового співполімеру. Таким чином, $T_{ст}$ аморфної фази визначається $T_{ст}$ сегмента А і $T_{ст}$ сегмента В, а також молярним співвідношенням сегментів А/В. $T_{ст}$ може змінюватися від $T_{ст}$, близької до значення преполімеру (А) (якщо використовують співвідношення преполімерів А/В, близьке до 1), до $T_{ст}$, близької до значення преполімеру (В) (якщо використовують співвідношення преполімерів А/В, близьке до нуля). Важливо відзначити, що вивільнення активних речовин, які інкапсульовані у полімерній матриці, залежить, головним чином, від $T_{ст}$ аморфної фази, оскільки дифузія активних речовин відбувається через аморфну фазу, а не через щільну кристалічну фазу. Швидкість розкладання полімеру також залежить, головним чином, від $T_{ст}$ аморфної фази, оскільки вона впливає на швидкість захоплення води і, таким чином, на швидкість гідролізу. Застосування преполімеру (В) з $T_{пл}$ 110-250 °C і відносно високою $T_{ст}$ дозволяє покривати значно більш широкий діапазон $T_{ст}$ у порівнянні з діапазоном для преполімеру (В), який має $T_{пл}$ 40-100 °C і відносно низьку $T_{ст}$. Внаслідок цього, застосування зазначених преполімерів (В) для одержання мультиблокових співполімерів із $T_{пл}$ у діапазоні 110-250 °C дозволяє одержувати полімери зі значно більше широким діапазоном властивостей вивільнення та розкладання, і, таким чином, більш ефективно контролювати вивільнення різних біологічно активних сполук.

Крім того, більш висока $T_{пл}$ мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом дозволяє одержувати нев'язкі мікросфери за допомогою способу подвійної емульсії в умовах навколишнього середовища, навіть з використанням коротких сегментів В. Обмеження довжини кристалізованого сегмента В є важливим для того, щоб мультиблокові співполімери добре розкладалися у фізіологічних умовах на відміну від кристалічних полімерів PLLA з високою молекулярною масою. На противагу цьому, неможливо одержувати мікросфери з

використанням мультиблокових співполімерів, у яких сегмент В складається з коротких ланцюгів ПКЛ, тому що короткі блоки ПКЛ не утворюють кристалічні домени при одержанні мікросфер. Як наслідок полімер залишається аморфним. Внаслідок низької $T_{ст}$ аморфного полімеру він залишається в'язким, внаслідок чого мікросфери утворюють агломерати і злипаються одна з одною під час стадії екстракції/випаровування. Тому що ПВЛ має $T_{пл}$, схожу з ПКЛ, можна очікувати, що з використанням мікроблокових співполімерів, у яких сегмент В складається з коротких ланцюгів преполімеру ПВЛ, мікросфери також одержати неможливо. У літературі відсутні згадування про мікросфери, які складаються з ПДС або співполімерів ПДС. З літератури відомо, що кристалізація ПДС при високих швидкостях охолодження та/або при низькій молекулярній масі ПДС є повільною та неповною. Ці результати дозволяють припустити, що одержання мікросфер за допомогою способу подвійної емульсії з використанням мультиблокових співполімерів, у яких сегмент В складається з короткого блоку ПДС, є недоцільним.

У теорії, стабільність мікросфер, які одержані з преполімеру (В), який має $T_{пл}$ 110-250 °С, при зберіганні в умовах навколишнього середовища є більш високою у порівнянні з преполімером (В), який має $T_{пл}$ 40-100 °С. Підвищення $T_{пл}$ призводить до підвищення $T_{кр}$ і, таким чином, підвищує ступінь кристалічності мікросфер. Збільшення кристалічності знижує рухливість молекул інкапсульованої біологічно активної сполуки у полімерній матриці та поліпшує стабільність продукту при зберіганні. З літератури відомо, що збільшена кристалічність збільшує стабільність частинок при зберіганні. Також, преполімери В, які мають $T_{пл}$ 110-250 °С, мають більш високу $T_{ст}$ у порівнянні з преполімерами (В), які мають $T_{пл}$ 40-100 °С. З літератури відомо, що для напівкристалічних, а також аморфних частинок, підвищення $T_{ст}$ призводить до збільшення стабільності при зберіганні.

Крім того, мультиблокові співполімери згідно з даним винаходом мають поліпшену швидкість розкладання у порівнянні з мультиблоковими співполімерами, в яких сегмент, що кристалізується, складається з ПКЛ, тому що сегменти В у мультиблокових співполімерах згідно з даним винаходом є менш гідрофобними у порівнянні з ПКЛ.

Синтез мультиблокових співполімерів, у яких сегмент, що кристалізується, складається з ПДС, ускладнений внаслідок обмеженої полімеризації мономеру ПДС, п-діоксанону, а також обмеженої розчинності ПДС у традиційних розчинниках. Добре відомо, що п-діоксанон має відносно низьку температуру розкладання, у результаті чого максимальний ступінь конверсії становить приблизно 80 %. На противагу цьому, мономери, які застосовують для одержання мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом, такі як лактид і гліколід, легко можна полімеризувати зі ступенями конверсії більше 95 %. Обмежена розчинність полімерів, які містять ПДС, також обмежує їхню застосовність для одержання складів із контрольованим вивільненням.

Мультиблокові співполімери згідно з даним винаходом, які складаються з сегмента В на основі PLLA, мають додаткові переваги, які полягають в тому, що як додатковий сегмент В може бути доданий PDLA, що призводить до одержання мультиблокових співполімерів із підвищеною кристалічністю та зниженою швидкістю розкладання за рахунок утворення кристалів стереокомплексу PLLA/PDLA з $T_{пл}$, яка становить до 220 °С, що приблизно на 50 °С вище $T_{пл}$ кристалічних сегментів PLLA, які складаються винятково з одного енантіомеру L-лактиду.

У мультиблокових співполімерах згідно з даним винаходом вміст сегментів, які одержані з водорозчинного полімеру, можна змінювати незалежно від довжини блоку гідрофобного (кристалічного) сегмента. Таким чином, можна досягати високого вмісту сегментів, які одержані з водорозчинного полімеру, зберігаючи необхідний ступінь кристалічності. Крім того, на відміну від трьохблокових АВА співполімерів, описаних Кісселом зі співавторами, характеристичну в'язкість (IV) мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом можна змінювати незалежно від складу. Широкі можливості зміни мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом дозволяють легко регулювати довжину, співвідношення і склад сегментів для одержання бажаних характеристик розкладання та кінетики вивільнення лікарського засобу.

Мультиблокові співполімери згідно з даним винаходом мають додаткові переваги у порівнянні з блокспівполімерами зі структурою АВА, зазначеними у прикладах, наведених у введенні. Незважаючи на те, що за рахунок застосування блокспівполімерів із блоками з різних співполімерів замість гомополімерів або випадкових співполімерів можна значно поліпшувати властивості полімеру, зазначені АВА співполімери зберігають певні недоліки.

Для одержання АВА співполімеру з мінімальною молекулярною масою послідовності А і В повинні мати певну довжину. Блоки, які входять до складу одного полімеру, можуть мати незалежні один від одного характеристики гомополімерів. Властивості співполімерів типу АВА можна регулювати винятково шляхом зміни складу блоків А і В. Іншим недоліком є те, що

блокспівполімери необхідно одержувати при відносно високих температурах ($>100^{\circ}\text{C}$) в інертних умовах для досягнення повної конверсії всіх мономерів і достатньої молекулярної маси. Перший недолік можливо усунути за рахунок застосування мультиблокових співполімерів зі значно більш короткими блоками або сегментами, пов'язаними один із одним у результаті хімічної реакції, яку проводять при температурах нижче 100°C . Властивості, такі як характеристики розкладання, можна регулювати значно краще за рахунок вибору придатної комбінації довжин, співвідношення та складу сегментів.

Крім того, внаслідок відносно високих температур, які застосовуються у способі одержання АВА блокспівполімерів (і їхніх похідних) завжди існує ймовірність переетерифікації, що призводить до змішування фаз у тій чи іншій мірі. Мультиблокові співполімери згідно з даним винаходом не страждають від такого недоліку, оскільки їх можна одержувати шляхом зв'язування преполімерів, які мають попередньо визначений склад мономерів, при відносно низьких температурах ($<100^{\circ}\text{C}$), що, таким чином, дозволяє запобігати переетерифікації та інші побічні реакції, які можуть ініціювати небажане розкладання та одержання інших побічних продуктів. Це означає, що довжина послідовності мономерів у співполімері визначається вибором складових компонентів і меншою мірою тривалості та температури проведення реакції, що зазвичай властиво синтезу випадкових співполімерів. Іншою перевагою мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом, які одержані шляхом зв'язування преполімерів із використанням поліфункціонального подовжувача ланцюга, є те, що сегменти преполімеру випадковим чином розподілені у співполімері, і це, таким чином, надає суттєво більше можливостей для регулювання властивостей. Випадковим мультиблоковим співполімером є, наприклад, АВВВВАВААВВААААА тощо. Випадкові мультиблокові співполімери згідно з даним винаходом забезпечують ряд переваг, яких неможливо досягти, використовуючи мультиблокові співполімери, що чергуються.

По-перше, випадкові мультиблокові співполімери, які одержані шляхом подовження ланцюга блоків А і В, мають необмежений діапазон співвідношень А до В. А:В може, наприклад, становити 10:90, але також може становити і 90:10. На противагу цьому, співвідношення блоків у мультиблоковому співполімері, що чергується, обмежене співвідношенням, яке використовується у полімері, що піддається подовженню ланцюга. Наприклад, у випадку подовження АВ полімеру співвідношення А:В у мультиблоковому співполімері становить 50:50. Випадкова природа мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом значно підвищує число різних складів матеріалу і, таким чином, поліпшує контроль його фізичних і хімічних властивостей. Ці поліпшення включають поліпшений контроль здатності набухання у воді, структури (поділу фаз, аморфності/кристалічності) та розкладання полімеру.

По-друге, спосіб синтезу випадкових мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом є значно менш трудомістким у порівнянні зі синтезом мультиблокових співполімерів, що чергуються. У мультиблокових співполімерах, що чергуються, перед подовженням ланцюга необхідно зв'язувати сегменти А і В у випадку двоблокових АВ співполімерів або сегменти А і С у випадку трьохблокових АСА співполімерів (або необхідно синтезувати макромолекулярний подовжувач ланцюга). У випадкових мультиблокових співполімерах проводять подовження ланцюга окремо від блоків А і В з використанням, наприклад, комерційно доступного подовжувача ланцюга.

Іншою перевагою мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом є те, що вони містять поліфункціональний (переважно аліфатичний) подовжувач ланцюга. Вибір типу та кількості подовжувача ланцюга може впливати на властивості полімеру (наприклад, подовжувач ланцюга може виступати як пластифікатор або ж він може впливати на ступінь поділу фаз). Загальне число ступенів свободи при одержанні полімерів із бажаними властивостями, таким чином, є більш високим у порівнянні з полімерами, відомими у рівні техніки.

Згідно з даним винаходом запропоновані мультиблокові співполімери з розділеними фазами, які мають достатню здатність до набухання у водному середовищі та у фізіологічних умовах при введенні і, таким чином, забезпечують водне мікросередовище для інкапсульованого пептиду або білка, а також контрольоване дифузійне вивільнення пептидів і білків. Матеріали, таким чином, мають значно знижену механічну міцність. Незважаючи на те, що зазначені матеріали можна використовувати як матеріали з пам'яттю форми у сухих умовах під час відсутності значного зниження механічної міцності перед переходом у запам'ятовувальну форму, наприклад, під впливом зовнішніх джерел тепла або світла, у гідратованому стані зазначені матеріали зазнають значних змін розмірів, окрім того відбувається істотне зниження їхньої механічної міцності, очевидно, внаслідок того, що зазначені матеріали адсорбують значну кількість води через свою гідрофільну природу, що призводить до істотного набухання та пластифікації матеріалу. У результаті цього, в

гідратованих умовах, таких як фізіологічні умови організму людини або тварини, розмір полімерних конструкцій, які одержують зі зазначених матеріалів, значно змінюється, а механічні властивості зазначених матеріалів змінюються на порядок. На противагу мультиблоковим співполімерам згідно з даним винаходом матеріали з пам'яттю форми, описані у патенті США № 5711958 А, трохи набухають у гідратованих умовах, таких як фізіологічні умови організму людини або тварини.

Складні полієфіри або полієфіркарбонати з розділеними фазами згідно з даним винаходом входять у групу перспективних біоматеріалів, їх можна застосовувати для доставляння різних лікарських засобів, тому що вони забезпечують чудовий контроль вивільнення лікарського засобу та вивільнення біологічно активних сполук, таких як поліпептиди.

Структура мультиблокового співполімеру (або конструкту, одержаного з нього) залежить від умов середовища: вимірювання ДСК (диференціальної скануючої калориметрії) можна проводити в інертних (сухих) умовах, і одержані результати можна використовувати для визначення термодинамічних властивостей сухих матеріалів. Проте, структура та властивості у фізіологічних умовах (тобто в організмі) можуть відрізнятися від структури і властивостей в умовах навколишнього середовища (сухе середовище, кімнатна температура). Також варто розуміти, що температури фазових переходів, $T_{ст}$ і $T_{пл}$, які використовуються в даному описі, відносяться до відповідних значень для матеріалу, який знаходиться *in vivo*, тобто в рівноважній атмосфері, яка насичена парами води при температурі тіла. Її можна імітувати *in vitro* за допомогою проведення вимірювань ДСК після встановлення рівноваги матеріалу й атмосфери, яка насичена парами води. У сухому стані матеріали, які застосовуються згідно з даним винаходом, можуть мати значення $T_{ст}$, які трохи перевищують значення в умовах організму ссавця, тобто при дослідженні сухих матеріалів шляхом ДСК перша точка перегину може з'являтися при більш високих температурах, наприклад, при 42 °C або 50 °C або більше. У результаті застосування *in vivo*, проте, $T_{ст}$ і/або $T_{пл}$ сухого матеріалу знижуються за рахунок поглинання води, яка надає пластичність полімеру, і підсумкова $T_{ст}$ згідно з даним винаходом повинна бути приблизно рівна температурі тіла або нижче. Підсумкова $T_{пл}$ у фізіологічних умовах повинна становити від 110 °C до 250 °C.

Наприклад, полімер, який містить ПЕГ у м'якому сегменті, може бути кристалічним у сухих умовах при температурі навколишнього середовища, але аморфним у вологих умовах, що дає непостійні значення $T_{ст}$ або два різні значення $T_{ст}$ м'якого сегмента, який одержаний з аморфного пластифікованого ПЕГ і полієфіркарбонату. Присутність розділених фаз у співполімерах згідно з даним винаходом відображається на профілі $T_{ст}$ або $T_{пл}$. Співполімери з розділеними фазами характеризуються щонайменше двома фазовими переходами, кожний з яких відбувається при температурах, схожих (але, у цілому, не рівних) з відповідними значеннями $T_{ст}$ або $T_{пл}$ преполімерів, із яких складається співполімер. $T_{ст}$ визначається як середнє значення стрибка теплоємності, яке можна виміряти, наприклад, шляхом ДСК. $T_{пл}$ є максимумом піка плавлення, що схематично зображено на Фігурі 1, на якій показана ендотерма теплового потоку для співполімеру, що характеризується $T_{ст}$ і $T_{пл}$. За визначенням значення $T_{ст}$ і $T_{пл}$ для певного преполімеру відображають значення, як яби їх вимірювали у співполімері. У випадку повного поділу фаз преполімерів $T_{ст}$ співполімеру визначається винятково $T_{ст}$ аморфного "м'якого" преполімеру. Фактично, проте, склади кристалічної й аморфної фаз мультиблокового співполімеру не повністю відповідають складам м'яких сегментів А і напівкристалічних сегментів В. Аморфна частина преполімеру, яка утворює вихідний жорсткий сегмент, змішується з преполімером (А), який утворює м'який сегмент, і, таким чином, стає складовою частиною аморфної фази. Підсумкове значення $T_{ст}$ аморфної фази відрізняється від значення преполімеру, який застосовується. Ступінь поділу фаз (а таким чином, і ступінь відхилення значень $T_{ст}$ і/або $T_{пл}$ від значень відповідних преполімерів) залежить від складу та співвідношення преполімерів і довжини сегментів у співполімері. $T_{ст}$ сегментів співполімеру, у цілому, знаходиться між значеннями $T_{ст}$ співполімеру зі змішаними фазами і значення $T_{ст}$ окремих преполімерів.

Фізико-хімічні властивості (такі як властивості розкладання, набухання та термодинамічні властивості) мультиблокових співполімерів можна легко регулювати шляхом зміни типу мономерів, які застосовують для одержання преполімерів, що утворюють м'які та жорсткі сегменти, а також довжини ланцюга та співвідношення довжин ланцюгів, окрім того за рахунок вибору типу і кількості подовжувача ланцюга. Крім того, температури фазових переходів є досить низькими, що дозволяє проводити обробку полімеру в розплаві. Співвідношення та розподіл мономерів у співполімері можна легко контролювати шляхом зміни умов полімеризації.

Зазвичай для одержання нев'язких матеріалів бажано використовувати кристалічний сегмент В. Крім того, структура з розділеними фазами, яка містить аморфні та кристалічні

домени, повинна зберігатися у фізіологічних умовах (тобто при впливі водного середовища при температурі тіла) для забезпечення контрольованого набухання полімерної матриці. Контроль ступеня набухання є суттєво важливим для контролю вивільнення інкапсульованих сполук. Кристалічні сегменти В виступають як фізичні групи, що зшиваються, які контролюють

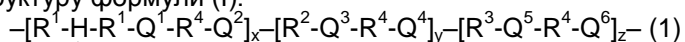
набухання більш гідрофільних м'яких сегментів. Крім рівня жорсткого сегмента В ступінь набухання полімерів залежить від вмісту та молекулярної маси/довжини водорозчинного полімеру, який входить до складу м'якого сегмента А.

Як відзначалося раніше, необхідною вимогою до сегментованого співполімеру складного полієфіру з розділеними фазами є те, що $T_{пл}$ полієфірного сегмента В повинна знаходитися в діапазоні 110-250 °С, а $T_{ст}$ сегмента А повинна бути нижче 37 °С у фізіологічних умовах. $T_{пл}$ сегмента В у мультиблоковому співполімері, у цілому, нижче температури непрореагуваного преполімеру (В) внаслідок зниження гнучкості ланцюга після вбудовування преполімеру в мультиблоковий співполімер, а також через можливе змішування фаз інших компонентів мультиблокового співполімеру з кристалічною фазою. Важливим класом сегментованих співполімерів складних полієфірів із гарним поділом фаз є співполімери на основі жорстких сегментів В, які складаються з кристалічної PLLA. Автори даного винаходу показали, що мультиблокові співполімери, які містять сегменти В на основі PLLA, у фізіологічних умовах характеризуються $T_{пл}$, що становить щонайменше 110 °С. Зазначені мультиблокові співполімери забезпечують декілька переваг. Можна домагатися широкого діапазону швидкостей розкладання. Преполімер (В), який утворює жорсткий сегмент В, складається з кристалічної PLLA, а, як відомо, такі полімери розкладаються дуже повільно. На противагу цьому, преполімер (А) являє собою полімер на основі водорозчинного полімеру й аморфного складного полієфіру. Відомо, що такі полімери розкладаються відносно швидко. Підсумкова швидкість розкладання визначається співвідношенням сегмент А/сегмент В, таким чином, її можна легко регулювати. Оскільки вивільнення, крім інших факторів, залежить від швидкості розкладання мультиблокового співполімеру, його можна регулювати також шляхом зміни співвідношення сегмент А/сегмент В. Також, ступінь кристалічності можна легко підвищувати шляхом змішування PLLA і PDLA з утворенням стереокомплексу. Утворення стереокомплексу призводить до підвищення ступеня кристалічності у порівнянні з окремим енантімером, а також до підвищення $T_{пл}$ (на ~50 °С вище у порівнянні з окремим енантімером). Крім того, $T_{ст}$ мультиблокових співполімерів, які містять сегменти В на основі PLLA, можна змінювати у широкому діапазоні від приблизно -40 до 40 °С (при вимірюванні в сухих умовах). Тому що швидкості розкладання та вивільнення, крім інших факторів, залежать від $T_{ст}$ матриці, то забезпечення широкого діапазону $T_{ст}$ дозволяє більше широко регулювати властивості вивільнення та розкладання.

У цілому, структуру з бажаним поділом фаз (що має одну температуру плавлення та щонайменше одне значення $T_{ст}$) можна одержувати шляхом зміни складу, наприклад, за рахунок вибору середньочислової молекулярної маси, M_n , преполімерів А і В. На структуру з розділеними фазами також можна впливати шляхом зміни співвідношення сегмент А/сегмент В.

Сегментовані мультиблокові співполімери згідно з даним винаходом містять м'який сегмент А, одержаний з преполімеру (А), який піддається гідролізу і, як правило, є повністю аморфним у фізіологічних умовах (в організмі). Крім того, преполімер (А) переважно має щонайменше одну температуру фазового переходу, де $T_{ст}$, яка виміряна у фізіологічних умовах (в умовах організму), становить 37 °С або менше, переважно 25 °С або менше. Цей сегмент є частиною аморфної фази мультиблокового співполімеру, при цьому аморфну фазу в даному описі називають фазою (А). Співполімери згідно з даним винаходом також містять жорсткий сегмент В, одержаний з преполімеру (В), який містить напівкристалічний гідролізований полімер, як правило, що має $T_{пл}$, яка виміряна у фізіологічних умовах (в умовах організму), що становить 110-250 °С. Сегмент В, головним чином, становить фазу (В). Преполімери А і В, які утворюють "м'які" і "жорсткі" сегменти, відповідно, зв'язані за допомогою поліфункціонального подовжувача ланцюга. Як правило, кристалічна(і) фаза(и) містить(ять) жорсткі сегменти В, а аморфна(і) фаза(и) містить(ять) м'які сегменти А й аморфну частину сегментів В. Кристалічна й аморфна фаза(и) є несумісними або тільки частково сумісними в умовах організму, тобто вони мають розділені фази. Поліфункціональний подовжувач ланцюга переважно являє собою аліфатичну молекулу.

Мультиблокові співполімери, які одержують згідно з даним винаходом, переважно мають структуру формули (I):



де R^1 являє собою частину сегмента А, який у свою чергу є частиною фази (А), і може являти собою аморфний складний полієфір, аморфний полієфір-ефірний співполімер або

аморфний полікарбонат; або аморфний преполімер, який одержують з поєднаних складноєфірних, простих ефірних і/або карбонатних груп. Н являє собою середній блок сегмента А й одержаний з водорозчинного полімеру. При кімнатній температурі блок, одержаний з водорозчинного полімеру, може бути аморфним або напівкристалічним. Проте, блок Н, введений у сегмент А, стає аморфним у фізіологічних умовах. Цей водорозчинний полімер вибраний з групи, яка складається з простих поліефірів, таких як поліетиленгліколь (ПЕГ), політетраметиленоксид (ПТМО) і поліпропіленгліколь (ППГ); полівінілового спирту (ПВС), полівінілпіролідону (ПВП), полівінілкапролактаму, полі(гідроксіетилметакрилату) (полі-(ГЕМА)), поліфосфазенів, складних поліортоефірів, поліортоефірамідів або співполімерів наведених вище полімерів. Переважно, Н являє собою ПЕГ, який є ініціатором полімеризації з розкриттям циклу циклічного мономеру, який утворює R^1 .

R^2 являє собою сегмент В і по суті або повністю становить фазу (В). R^2 може являти собою кристалічний або напівкристалічний складний поліефір, поліефір-ефірний співполімер, полікарбонат або поліангідрид; або преполімери з поєднаних складноєфірних, простих ефірних, ангідридних і/або карбонатних груп. Частина фази R^2 може бути аморфною, у цьому випадку ця частина R^2 входить до складу фази (А). R^1 і R^2 переважно не є однаковими. Змінна z дорівнює нулю або позитивному цілому числу. Змінні x і y у обидві являють собою позитивні цілі числа.

Можлива присутність сегмента R^3 . Цей сегмент одержаний з водорозчинного полімеру, вибраного з групи полімерів, зазначених у визначенні Н. У фізіологічних умовах R^3 є частиною аморфної фази (А). У випадку присутності R^3 мультиблоковий співполімер згідно з даним винаходом містить водорозчинний полімер як додатковий преполімер. Переважно цей водорозчинний полімер вибраний з групи, яка складається з простих поліефірів, таких як поліетиленгліколь (ПЕГ), політетраметиленоксид (ПТМО) і поліпропіленгліколь (ППГ); полівінілового спирту (ПВС), полівінілпіролідону (ПВП), полівінілкапролактаму, полі(гідроксиметилметакрилату) (полі-(ГЕМА)), поліфосфазенів, складних поліортоефірів, поліортоефірамідів або співполімерів зазначених вище полімерів. Наприклад, зазначений сегмент водорозчинного полімеру одержаний з ПЕГ, що має M_n 150-5000 г/моль.

R^4 одержаний з подовжувача ланцюга та складається з аліфатичної C_2-C_8 алкіленової групи, можливо заміщеної C_1-C_{10} алкіленом, де аліфатична група є лінійною або циклічною. R^4 являє собою бутиленову, $-(CH_2)_4-$, групу. C_1-C_{10} алкіленова бічна група може містити захищені S, N, Р або О-фрагменти. Подовжувачі ланцюга, які містять ароматичні групи, у цілому, не підходять, тому що подовжувачі ланцюга, які містять ароматичні групи, можуть призводити до одержання небажаних продуктів розкладання. Таким чином, переважними є аліфатичні подовжувачі ланцюга.

Q^1-Q^6 являють собою лінкерні ланки, які одержують в результаті взаємодії преполімерів з поліфункціональним подовжувачем ланцюга. Кожний з Q^1-Q^6 може бути незалежно вибраний з аміну, уретану, амідів, карбонату, складного ефіру й ангідриду. Всі лінкерні групи Q рідко є однаковими, і, як правило, це не є переважним.

Як правило, можна застосовувати один тип подовжувача ланцюга разом із трьома преполімерами з однаковими кінцевими групами, що призводить до одержання співполімеру формули (1) з шістьма схожими лінкерними групами.

У випадку якщо преполімери R^1 і R^2 мають різні кінцеві групи, у співполімері будуть присутні два типи груп Q: наприклад, між двома сегментами R^1 , що зв'язуються, Q^1 і Q^2 будуть однаковими, але при зв'язуванні R^1 і R^2 , Q^1 і Q^2 будуть різними. У прикладі формули (1) показаний продукт взаємодії біфункціонального подовжувача ланцюга та біфункціональних преполімерів.

Що стосується формули (1), складні поліефіри згідно з даним винаходом також можуть бути представлені у вигляді мультиблокових або сегментованих співполімерів із випадковим розподілом сегментів $(AB)_z$, де "А" відповідає сегменту А, а "В" відповідає сегменту В (якщо $z = 0$). В $(AB)_z$ співвідношення А/В (що відповідає x/y в формулі (1)) може бути рівне одиниці або відрізнятися від одиниці. Преполімери можна змішувати у будь-яких бажаних кількостях, зв'язування можна проводити з використанням поліфункціонального подовжувача ланцюга, тобто сполуки, що має щонайменше дві функціональні групи, за рахунок чого їх можна застосовувати для хімічного зв'язування преполімерів. Переважно поліфункціональний подовжувач ланцюга являє собою біфункціональний подовжувач ланцюга. У випадку якщо $z \neq 0$, випадковий розподіл усіх сегментів може бути відображений формулою $(ABC)_z$, де три різних преполімери (один із яких становить сегмент, одержаний з водорозчинного полімеру, такого як ПЕГ) випадковим чином розподілені у всіх можливих співвідношеннях.

Преполімери, з яких одержують сегменти а і b (і можливо с) в $(AB)_r$ і $(ABC)_r$, зв'язані за допомогою поліфункціонального подовжувача ланцюга. Цей подовжувач ланцюга переважно являє собою діізоціанатний подовжувач ланцюга, але також може являти собою двоосновну кислоту або діольну сполуку. Якщо всі преполімери містять гідроксильні кінцеві групи, а застосовують діізоціанатний подовжувач ланцюга, то лінкерні ланки являють собою уретанові групи. Якщо преполімери (або один із них) мають(є) карбоксильні кінцеві групи, то лінкерні ланки являють собою амідні групи. Мультиблокові співполімери зі структурою $(AB)_r$ і $(ABC)_r$, також можна одержувати шляхом взаємодії преполімерів із кінцевими групами двоосновних карбонових кислот і діольного подовжувача ланцюга, або навпаки (преполімеру з діольними кінцевими групами і подовжувача ланцюга, який являє собою двоосновну кислоту) із застосуванням агента сполучення, такого як DCC (дициклогексилкарбодіімід), з утворенням складноєфірних лінкерних груп.

Як відзначалося вище випадкові сегментовані співполімери відносяться до співполімерів із випадковим розподілом (тобто, що не чергуються) сегментів А і В. У випадку сегментів А і В це можна виразити формулою $(AB)_r$, а у випадку сегментів А, В і С - формулою $(ABC)_r$.

Гідролізований сегмент R^1-H-R^1 у формулі (1) одержують шляхом взаємодії зі застосуванням преполімеру (А).

Преполімер (А), наприклад, можна одержувати шляхом полімеризації з розкриттям циклу. Таким чином, преполімер (А) може являти собою гідролізований співполімер, який одержують шляхом полімеризації з розкриттям циклу, що ініційована з використанням діольної сполуки або двоосновної кислоти, переважно співполімер із випадковим розподілом мономерів. Діольна сполука переважно являє собою аліфатичний діол або низькомолекулярний простий полієфір, такий як ПЕГ. Простий полієфір є частиною преполімеру (А) за рахунок того, що його застосовують як ініціатор, його можна додатково змішувати з преполімером (А), що, таким чином, призводить до одержання додаткового гідрофільного сегмента R^3 в формулі (1). Преполімер (А) може являти собою гідролізований складний полієфір, полієфір-ефірний співполімер, полікарбонат, полієфіркарбонат, поліангідрид або їх співполімери. Наприклад, преполімер (А) містить продукти взаємодії мономерів, які утворюють складні ефіри, вибраних із діолів, двоосновних карбонових кислот і гідроксикарбонових кислот. Преполімер (А) може містити продукти взаємодії циклічних мономерів і/або нециклічних мономерів. Типові циклічні мономери включають гліколід, лактид, ϵ -капролактон, δ -валеролактон, триметиленкарбонат, тетраметиленкарбонат, 1,5-діоксепан-2-он, 1,4-діоксан-2-он (пара-діоксанон) і/або циклічні ангідриди, такі як оксепан-2,7-діон. В одному з варіантів реалізації застосовують L-лактид, D-лактид і/або D,L-лактид.

За рівнем відповідності необхідної $T_{ст}$, яка становить менше 37 °С, деякі зі зазначених вище мономерів або комбінацій мономерів є більш переважними у порівнянні з іншими. Наприклад, преполімер (А), який містить як мономери лактид і/або гліколід, переважно поєднують з будь-якими іншими зазначеними циклічними співмономерами (з ϵ -капролактоном, δ -валеролактоном, триметиленкарбонатом, 1,4-діоксан-2-оном і з комбінаціями). У результаті може знижуватися $T_{ст}$. Як альтернатива, ініціатором одержання преполімеру є ПЕГ з достатньою молекулярною масою, що знижує $T_{ст}$ мультиблокового співполімеру.

Якщо преполімер (А) складається з полі(D,L-лактиду), то співвідношення L/D лактидів може відрізнятися від одиниці (відрізнятися від 50/50). Наприклад, використання співвідношення L/D від 85/15 до 15/85 призводить до одержання повністю аморфного гомополімеру. Крім того, відомо, що надлишок одного ізомеру (L або D) стосовно іншого підвищує $T_{ст}$ полі(D,L-лактиду). Незначні кількості яких-небудь інших із зазначених вище мономерів, які становлять аморфну фазу, також можуть бути присутніми у преполімері або блоці, що утворює кристалічну фазу.

Крім того, преполімер (А) може бути одержаний з (сумішей) мономерів конденсаційного типу (нециклічних), таких як гідроксикислоти (наприклад, молочна кислота, гліколева кислота, гідроксимасляна кислота), двоосновні кислоти (наприклад, глутарова, адипінова або бурштинова кислота, себацинова кислота) і діоли, такі як етиленгліколь, діетиленгліколь, 1,4-бутандіол або 1,6-гександіол, з утворенням складноєфірних і/або ангідридних гідролізованих фрагментів.

Сегмент R^2 у формулі (1) можна одержувати шляхом взаємодії преполімерів (В), які одержані зі застосовуваних як мономери L-лактиду, D-лактиду, гідроксибутирату, гліколіду або комбінації зазначених мономерів, що призводить до утворення стереокомплексу, який має температуру фазового переходу від 110 °С до 250 °С у фізіологічних умовах. Переважно сегмент В одержують в результаті взаємодії L-лактидних мономерів.

Як правило, преполімер (В) має M_n 1000 г/моль або більше, переважно 2000 г/моль або більше, більш переважно 3000 г/моль або більше. У цілому, M_n преполімеру (В) становить

10000 г/моль або менше. Вміст преполімеру (B) у співполімері переважно становить 10-90 мас. % від загальної маси мультиблокового співполімеру, більш переважно 25-70 мас. %, найбільш переважно 30-50 мас. %.

Преполімери переважно являють собою лінійні та випадкові складні полієфіри (або їх співполімери), полієфіркарбонати, полієфір-ефірні співполімери або поліангідриди з реакційноздатними кінцевими групами. Зазначені кінцеві групи можуть являти собою гідроксил або карбоксил. Переважно використовувати співполімер із двома гідроксильними кінцевими групами, але також можна застосовувати полімери з гідроксильною та карбоксильною або двома карбоксильними кінцевими групами. З урахуванням того, що полімер повинен бути лінійним, його можна одержувати з використанням біфункціонального компонента (діолу) як вихідна речовина, але у випадку застосування трьохфункціонального поліолу або поліолу з більш високою кількістю функціональних груп можна одержувати зіркоподібні складні полієфіри. Діол, що входить до складу преполімеру (A), може являти собою аліфатичний діол або низькомолекулярний простий полієфір.

Синтез преполімеру шляхом полімеризації з розкриттям циклу переважно проводять у присутності каталізатора. Придатним каталізатором є $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, а $M/I = 5000-30000$ (де M/I являє собою співвідношення мономеру й ініціатора). Синтез також можна проводити під час відсутності каталізатора.

Умови одержання складних полієфірів, полікарбонатів і поліангідридів добре відомі у даній області техніки.

Співполімери згідно з даним винаходом, у цілому, є лінійними. Проте, можна одержувати розгалужені співполімери. Зазначені нелінійні співполімери згідно з даним винаходом можна одержувати шляхом використання трьохфункціонального (або містить більшу кількість функціональних груп) подовжувача ланцюга, такого як тризоціанат. Розгалужені співполімери можуть мати поліпшені характеристики повзучості.

У кристалізованому жорсткому сегменті довжина (M_n) преполімеру повинна бути досить високою, щоб забезпечувати протікання кристалізації співполімеру. Наприклад, преполімер PLLA, який утворює жорсткий сегмент, переважно має M_n 700 г/моль або більше, більш переважно 2000 г/моль або більше, найбільш переважно 3000 г/моль або більше. Передбачається, що більш висока довжина преполімеру PLLA забезпечує структуру з розділеними фазами при більш низькому вмісті жорсткого сегмента. Співвідношення преполімерів, при якому відбувається поділ фаз, таким чином, залежить від довжин преполімерів. У цілому, довжини преполімерів, із яких одержують м'який та жорсткий сегмент співполімеру, повинні бути такими, щоб утворювалася структура з розділеними фазами, де ступінь поділу фаз (несумісності) позитивно впливає на бажані властивості біомедичного пристрою.

Преполімер (A), який утворює м'який сегмент, може мати M_n 500 г/моль або більше, переважно 1000 г/моль або більше, більш переважно 2000 г/моль або більше. Необхідно вибирати максимально можливу довжину преполімерів, необхідну для одержання структури з гарним поділом фаз, а також для забезпечення гарних механічних і термічних властивостей співполімеру, який одержують. Довжина преполімеру повинна бути досить низькою, щоб забезпечувати можливість змішування з подовжувачем ланцюга при температурі проведення полімеризації. Як правило, цього можна досягати при M_n , що становить 10000 г/моль або менше.

У цілому, вміст жорсткого сегмента в діапазоні 10-90 мас. % щодо загальної маси мультиблокового співполімеру, переважно 25-90 мас. %, забезпечує одержання гнучких термопластичних матеріалів з гарними властивостями розкладання та набухання при температурах застосування (тобто приблизно при 37 °C у випадку медичних застосувань).

Згідно з додатковим аспектом винахід відноситься до способу одержання термопластичних мультиблокових співполімерів із розділеними фазами згідно з даним винаходом, який включає реакцію подовження ланцюга преполімеру (A) і преполімеру (B) у присутності поліфункціонального подовжувача ланцюга з одержанням, тим самим, випадкового сегментованого мультиблокового співполімеру.

Сегментовані мультиблокові співполімери зі структурами $(AB)_n$ і $(ABC)_n$ можна одержувати шляхом подовження ланцюга суміші преполімерів, яка містить бажане співвідношення мономерів, що утворюють жорсткі та м'які сегменти R^1 , H і R^2 і можливо R^3 , з використанням еквівалентної кількості поліфункціонального подовжувача ланцюга, переважно аліфатичної молекули, більш переважно діізоціанату, такого як 1,4-бутандіізоціанат (BDI). Сегментовані співполімери зі структурами $(AB)_n$ або $(ABC)_n$ переважно одержують у розчині. Відповідно, преполімер(и) розчиняють в інертному органічному розчиннику, а подовжувач ланцюга додають

у чистому вигляді або у вигляді розчину. Температура полімеризації може співпадати з максимальною температурою фазового переходу преполімерів або мати менше значення. Реакції сполучення з дициклогексилкарбодіімідом (DCC) переважно проводять у розчині. Два (або три) преполімери, всі з яких містять діольні кінцеві групи або кінцеві групи двоосновних кислот, можна змішувати у розчині з подовжувачем ланцюга з кінцевими групами двоосновних кислот або діольними кінцевими групами, відповідно, після чого додають DCC.

Полімеризацію проводять протягом часу, достатнього для досягнення характеристичної в'язкості співполімеру, що становить 0,1 дл/г або більше (виміряної при 25 °C у хлороформі). Низька температура полімеризації та нетривалий час полімеризації запобігають переетерифікації, таким чином, одержують структуру з розділеними фазами, а розподіл мономерів є таким самим, як і у преполімерах, із яких складається співполімер. На противагу цьому, високомолекулярні випадкові співполімери необхідно одержувати при більш високих температурах (>100 °C) і протягом значно більш тривалого часу, щоб забезпечити повне включення всіх мономерів. За цей час відбувається переетерифікація, у результаті чого відбувається більш випадковий (тобто менш блоковий) розподіл мономерів.

Матеріали, які синтезовані шляхом подовження ланцюга в масі, також можна одержувати *in situ* в екструдері.

Якщо подовжувач ланцюга є біфункціональним, а аліфатична молекула та преполімери є лінійними, то утворюється лінійний співполімер; якщо один із реагентів (подовжувач ланцюга або щонайменше один із преполімерів) або обидва мають більше ніж дві функціональні групи, можна одержувати розгалужені структури з досить низьким ступенем конверсії. Подовжувач ланцюга може являти собою біфункціональний аліфатичний подовжувач ланцюга, переважно діізоціанат, такий як 1,4-бутандіізоціанат.

Комбінацію преполімерів або мономерів, які утворюють кристалічну або аморфну фазу, вибирають таким чином, щоб одержувати сегментовані або блокові співполімери поліефірів або поліефіркарбонатів із розділеними фазами з бажаними властивостями розкладання, набухання, фізичними і термічними властивостями. Як правило, характеристична в'язкість (виміряна при 25 °C у хлороформі) становить більше 0,1 дл/г і менше 10 дл/г, переважно 0,1-2 дл/г, більш переважно 0,2-1 дл/г.

Мультиблокові сегментовані співполімери можна одержувати у вигляді складів із різною формою та розмірами за допомогою будь-яких відомих способів, таких як, наприклад, способи емульсифікації, екструзія, лиття, формування шляхом заливання розчину, сушіння розпиленням, розпилювальне сублімаційне сушіння, електроформування або ліофільне сушіння. Останню техніку застосовують для одержання пористих матеріалів. Пористість можна регулювати шляхом додавання співрозчинників, осаджувачів і/або вилуговуючих агентів. Співполімери (тверді або пористі) можна обробляти з одержанням мікросфер, мікрочастинок, наносфер, стрижнів, плівок, покриттів, напильє, трубок, мембран, сітчастих імплантів, волокон, тампонів, оболонок і інших виробів. Продукти можуть бути твердими, порожнистими або (мікро)пористими. Для застосувань, наприклад, для догляду за ранами, відновлення шкіри, відновлення нервів, як судинні протези, для доставляння лікарських засобів, реконструкції меніска, тканинної інженерії, покриття хірургічних пристроїв, відновлення зв'язок і сухожилів, протезування зубів або ортопедичного протезування можна одержувати широкий діапазон біомедичних імплантів. Співполімери можна застосовувати окремо або можна змішувати та/або екструдувати разом із іншими абсорбуючими або неабсорбуючими полімерами.

Крім того, їх можна застосовувати у фармацевтичних цілях, наприклад, для доставляння лікарських засобів, наприклад, у вигляді мікросфер, твердих імплантів, гелів, оболонок, плівок, покриттів, напильє, трубок, мембран, сітчастих імплантів, волокон, тампонів і інших форм.

Нижче у прикладах буде показано, що матеріали згідно з даним винаходом мають поліпшені властивості, включаючи термічні, механічні, технологічні, у порівнянні зі співполімерами, описаними у рівні техніки.

Згідно з додатковим аспектом винахід відноситься до композиції для доставляння щонайменше однієї біологічно активної сполуки (наприклад, біологічно активної низькомолекулярної молекули, білка або пептиду) хазяїну, яка містить щонайменше одну біологічно активну сполуку, інкапсульовану в матриці, причому зазначена матриця містить щонайменше один термопластичний мультиблоковий співполімер із розділеними фазами, такий як визначено у даному описі.

Було виявлено, що здатний до біорозкладання мультиблоковий співполімер згідно з даним винаходом особливо підходить як носій для доставляння поліпептиду, що забезпечує

контрольоване вивільнення поліпептиду з матриці у навколишнє середовище, наприклад, в організм суб'єкта.

Існує багато варіантів регулювання властивостей вивільнення мультиблокових співполімерів згідно з даним винаходом для доставляння композиції для конкретного застосування. Швидкість вивільнення біологічно активної сполуки, наприклад, можна підвищувати шляхом:

- збільшення молекулярної маси водорозчинного полімеру в преполімері (А) при збереженні молекулярної маси преполімеру (А);

- збільшення мольного відношення преполімеру (А) до преполімеру (В);

- збільшення вмісту мономеру, який забезпечує одержання полімеру в преполімері (А) з більш високою швидкістю розкладання, наприклад, шляхом заміни ϵ -капролактону на D,L-лактид або гліколід або шляхом заміни D,L-лактиду на гліколід;

- зниження молекулярної маси преполімеру (В) при збереженні мольного відношення преполімеру (А) до преполімеру (В) (це призводить до збільшення процентного масового вмісту преполімеру (А), а також знижує Тпл преполімеру (В) і загальну кількість кристалічної фази);

- зниження молекулярної маси преполімеру (А) при збереженні молекулярної маси водорозчинного полімеру і мольного відношення преполімеру (А) до преполімеру (В); та/або

- застосування додаткового третього сегмента, одержаного з водорозчинного полімеру, за рахунок чого підвищується вміст водорозчинного полімеру.

Швидкість вивільнення можна знижувати за рахунок змін, протилежних зазначеним вище, а також шляхом

- збільшення Тпл сегмента В, наприклад, за рахунок застосування суміші PLLA і PDLA як преполімер (В) (замість однієї PLLA) з таким співвідношенням, при якому відбувається утворення стереокомплексу PLLA і PDLA;

- застосування додаткового третього сегмента, одержаного з водорозчинного полімерного діолу, де діізоціанат застосовують як подовжувач ланцюга, а вміст водорозчинного полімеру зберігається або знижується. Водорозчинний полімер у третьому сегменті складається з мультиблокового співполімеру з уретановим зв'язком, що повільно розкладається, на відміну від водорозчинного полімеру зі складноефірним зв'язком, що швидко розкладається, у преполімері (А).

Біологічно активні сполуки, які можуть міститися в матриці мультиблокового співполімеру, такий як матриця полі(D,L-молочна кислота)-ПЕГ-полі(D,L-молочна кислота)-блок-PLLA ((PDLLA-ПЕГ-PDLLA)-блок-PLLA) або матриця полі(ϵ -капролактон)-ПЕГ-полі(ϵ -капролактон)-блок-PLLA ((ПКЛ-ПЕГ-ПКЛ)-блок-PLLA), включають, але не обмежуються ними, відмінні від пептидів і білків низькомолекулярні лікарські засоби з молекулярною масою, у цілому, що становить 1000 Да або менше, а також біологічно активні пептиди.

Приклади відмінних від пептидів і білків низькомолекулярних лікарських засобів, які можуть міститися в співполімерній поліефірефірній поліуретановій матриці, такий як матриця (PDLLA-ПЕГ-PDLLA)-блок-PLLA або матриця ПКД-ПЕГ-ПКЛ-блок-PLLA, включають, але не обмежуються ними, протипухлинні агенти, протимікробні агенти, включаючи антибіотики, цефалоспорини, аміноглікозиди; макроліди; тетрацикліни, хіміотерапевтичні агенти, включаючи сульфонаміди; антисептики сечовивідних шляхів; лікарські засоби проти анаеробних інфекцій; лікарські засоби від туберкульозу; лікарські засоби від прокази, протигрибкові агенти, противірусні агенти, агенти від гелмінтозу, протизапальні агенти, агенти від подагри, анальгетики центральної дії (опіоїди), місцеві анестетики, лікарські засоби від хвороби Паркінсона, м'язові релаксанти центральної дії, гормони й антагоністи гормонів, кортикостероїди, глюкокортикостероїди, андрогени, андрогенні стероїди, анаболічні стероїди, антиандрогени, естрогени, естрогенні стероїди, антиестрогени, прогестини; лікарські засоби для щитовидної залози й антигипертензивні засоби.

При включенні низькомолекулярного лікарського засобу, такого як описано вище, у матрицю (PDLLA-ПЕГ-PDLLA)-блок-PLLA компонент ПЕГ співполімеру переважно має молекулярну масу від 200 до 1500 г/моль, більш переважно від 600 до 1000 г/моль, та його вміст у співполімері становить від 5 мас. % до 20 мас. % від маси співполімеру, переважно від 5 мас. % до 10 мас. % від маси співполімеру. У цілому, вміст PLLA у співполімері становить від 20 мас. % до 90 мас. % від маси співполімеру, переважно від 30 мас. % до 70 мас. % співполімеру. Вміст щонайменше однієї молекули низькомолекулярного лікарського засобу в матриці може становити від 0,1 мас. % до 80 мас. %, переважно від 1,0 мас. % до 40 мас. %, найбільш переважно від 5 до 20 мас. %. Якщо бажаним є підвищення гідрофільності мультиблокового співполімеру і, таким чином, збільшення швидкості розкладання співполімеру та швидкості вивільнення включеної біологічно активної сполуки, співполімер можна модифікувати шляхом часткової або повної заміни D,L-лактиду в гідрофільному сегменті на гліколід і/або шляхом застосування компонента ПЕГ з більш високою молекулярною масою або шляхом підвищення масової частки компонента ПЕГ у

сегменті преполімеру. Якщо бажаним є зниження гідрофільності полімеру і, таким чином зниження швидкості розкладання співполімеру та швидкості вивільнення включеної біологічно активної сполуки, співполімер можна модифікувати шляхом часткової або повної заміни D,L-лактиду в гідрофільному сегменті на ϵ -капролактон і/або шляхом використання компонента ПЕГ з більш низькою молекулярною масою або шляхом зниження масової частки компонента ПЕГ у сегменті преполімеру.

Поліпептид складається з амінокислот, пов'язаних пептидними зв'язками. Короткі поліпептиди також називають пептидами, тоді як більш довгі поліпептиди, як правило, називають білками. Однією з умов віднесення поліпептидних ланцюгів до пептидів, а не білків, є можливість їх синтезу зі складових амінокислот. Проте, у зв'язку з появою вдосконалених способів синтезу можна одержувати поліпептиди, які містять сотні амінокислот, включаючи повні білки, такі як убіквітин. Інша умовна межа поділу пептидів і білків становить приблизно 50 амінокислот у молекулі. Це визначення певною мірою є суб'єктивним. Довгі поліпептиди, такі як амільонічний бета-пептид, пов'язаний з хворобою Альцгеймера, можна розглядати як білки; а низькомолекулярні білки, такі як інсулін, можна розглядати як пептиди. У будь-якому випадку, для фахівців у даній області техніки буде очевидно, що по суті будь-які типи поліпептидів можна інкапсулювати, а потім вивільняти з матриці співполімеру.

В одному з варіантів реалізації композиція згідно з даним винаходом містить біологічно активний пептид або біологічно активний білок. Інкапсульовані поліпептиди переважно містять тільки природні амінокислоти, хоча як альтернатива можна застосовувати і синтетичні амінокислоти (тобто сполуки, які не містяться в природі, але які можна включати у поліпептидний ланцюг) та/або аналоги амінокислот, відомі в даній області техніки. Крім того, одну або більше амінокислот у поліпептиді можна модифікувати, наприклад, шляхом додавання хімічного фрагмента, такого як вуглеводна група, фосфатна група, фарнезилова група, ізофарнезилова група, група жирної кислоти, лінкерна група для сполучення, функціоналізації або іншої модифікації (наприклад, альфа-амідування) тощо.

У переважному варіанті реалізації модифікації пептиду призводять до одержання більш стабільного пептиду (наприклад, з більш високим періодом напіввиведення *in vivo*). Зазначені модифікації можуть включати циклізацію пептиду, включення D-амінокислот тощо. Модифікації не повинні по суті порушувати бажану біологічну активність пептиду. У конкретних варіантах реалізації модифікації пептиду призводять до одержання пептиду з більш високою біологічною активністю.

Біологічно активний поліпептид переважно вибраний з групи, яка складається з білкових/пептидних лікарських засобів, ферментів, лігандів рецепторів, нейротрансмітерів, інгібіторних пептидів, регуляторних пептидів, активаторних пептидів, цитокінів, факторів росту, моноклональних антитіл, фрагментів моноклональних антитіл, протипухлинних пептидів, антибіотиків, антигенів, вакцин і гормонів. Типові поліпептиди, які можна інкапсулювати, зазначені в патенті США №5980948A і у Crommelin et al., *Int. J. Pharm.* 2003, 266(1-2), 3-16. Очевидно, передбачається, що можна інкапсулювати два або більше різних (біологічно активних) поліпептидів.

Розмір поліпептиду(ів) може бути різним. В одному з варіантів реалізації поліпептид має молекулярну масу 10000 Да або менше. Було виявлено, що поліпептиди зазначеного розміру особливо підходять для інкапсулювання в матрицю співполімеру, яка містить ПЕГ як сегмент преполімеру (A) та/або додаткового преполімеру, де зазначений ПЕГ має середньочислову молекулярну масу від 400 до 3000 г/моль, переважно від 600 до 1500 г/моль. Як альтернатива або на додаток вміст зазначеного ПЕГ становить від 5 мас. % до 60 мас. %, від загальної маси співполімеру, переважно від 5 мас. % до 40 мас. %.

В іншому варіанті реалізації зазначений поліпептид являє собою біологічно активний білок із молекулярною масою 10000 Да або більше. Зазначені більш великі поліпептиди переважно інкапсулюють в матрицю зі співполімеру, яка містить ПЕГ як сегмент преполімеру (A) та/або додаткового преполімеру, де зазначений ПЕГ має середньочислову молекулярну масу від 600 до 5000 г/моль, переважно від 1000 до 3000 г/моль, та/або де зазначений ПЕГ міститься в кількості від 5 мас. % до 70 мас. % від загальної маси співполімеру, більш переважно від 10 мас. % до 50 мас. %.

Композиція згідно з даним винаходом може бути представлена у будь-якому вигляді або формі. В одному з варіантів реалізації мультиблокові співполімери згідно з даним винаходом переробляють у форму мікросфер, мікрочастинок, напиль, імплантату, оболонки, гелю, плівки, фольги, покриття, мембрани або стрижня.

Один із конкретних аспектів відноситься до композиції у вигляді мікросфер. У цілому, мікросфери являють собою дрібнодисперсні сферичні частинки з діаметром менше 1000 мкм,

які містять біологічно активну сполуку. Мікросфера може бути гомогенною або монолітною мікросферою, де біологічно активна сполука міститься у вигляді розчину або дисперсії в полімерній матриці. Також мікросфера може являти собою резервуар, де біологічно активна сполука укладена всередині полімеру в одноподібному або поліподібному стані. Якщо біологічно активна сполука являє собою низькомолекулярний водорозчинний лікарський засіб, то лікарський засіб спочатку можна диспергувати у гідрофобному або ліпофільному наповнювачі, після чого комбінацію диспергують у вигляді частинок, крапель або мікросуспензій в полімерній матриці. Потім із емульсії можна одержувати мікросфери.

Мікросфери можна одержувати за допомогою способів, відомих фахівцям у даній області техніки, включаючи, але не обмежуючись ними, екстракцію/випарювання розчинника, розпилювальне сушіння або розпилювальне сублімаційне сушіння.

В одному з варіантів реалізації мікросфери одержують за допомогою способу екстракції/випарювання розчинника, який включає розчинення мультиблокового співполімеру в органічному розчиннику, такому як дихлорметан, і емульсифікацію розчину мультиблокового співполімеру у водній фазі, що містить емульгатор, такий як полівініловий спирт (спосіб описаний, крім іншого, в Okada, Adv. Drug Del. Rev. 1997, 28(1), 43-70).

Характеристики, такі як розмір частинок, пористість та вміст лікарського засобу, в одержуваних таким чином мікросферах, залежать від параметрів способу, таких як в'язкість або концентрація водної фази полівінілового спирту, концентрація розчину мультиблокового співполімеру, співвідношення розчину активної речовини у дихлорметані та водного розчину, співвідношення первинної емульсії та фази полівінілового спирту і швидкість перемішування.

При одержанні мікросфер за допомогою способу розпилювального сушіння застосовують мультиблоковий співполімер із низькою концентрацією в органічному розчиннику від 0,5 мас. % до 5 мас. %, переважно приблизно 2 мас. %. Розпилювальне сушіння, у цілому, призводить до одержання пористих частинок неправильної форми.

Після утворення мікросфер біологічно активна сполука виявляється інкапсульованою у мікросферах або мікрочастинках. У цілому, при використанні техніки екстракції/випарювання розчинника для інкапсульовання ліпофільних сполук, сполуку спочатку розчиняють у розчині мультиблокового співполімеру в органічному розчиннику, такому як дихлорметан або етилацетат. Органічний розчин потім емульгують у водному розчині полівінілового спирту, що призводить до одержання емульсії типу масло-в-воді (М/В). Органічний розчинник потім екстрагують у водній фазі та випарюють для затвердіння мікросфер.

У цілому, при використанні техніки випарювання розчинника для інкапсульовання водорозчинної сполуки, водний розчин сполуки спочатку емульгують у розчині мультиблокового співполімеру в органічному розчиннику, такому як дихлорметан. Цю первинну емульсію потім послідовно емульгують у водному розчині полівінілового спирту, що призводить до одержання емульсії типу вода-в-маслі-в-воді (В/М/В). Органічний розчинник, такий як дихлорметан або етилацетат, потім екстрагують аналогічно способу для емульсії М/В для затвердіння мікросфер. Як альтернатива, водорозчинні агенти можна диспергувати безпосередньо в розчині мультиблокового співполімеру в органічному розчиннику. Одержану дисперсію потім емульгують у водному розчині, який містить поверхнево-активну речовину, таку як полівініловий спирт, що призводить до одержання емульсії типу тверда речовина-в-маслі-в-воді (Т/М/В). Органічний розчинник потім екстрагують аналогічно способу для емульсії М/В для затвердіння мікросфер.

При використанні способів емульсифікації В/М/В і Т/М/В для інкапсульовання водорозчинної сполуки може виникати проблема одержання мікросфер із достатньою ефективністю інкапсульовання. Внаслідок розчинності сполуки у воді частина сполуки може втрачатися та переходити у водне екстрагуюче середовище, таке як водний розчин полівінілового спирту. Для зниження дифузії сполуки, з внутрішньої водної фази у зовнішню водну фазу, у внутрішній водній фазі можна застосовувати загусник, такий як желатин. Крім того, для зниження розчинності сполуки у зовнішній водній фазі в неї можна вводити добавки. Для цього можна застосовувати солі або змінювати рН.

Способи емульсифікації за типом вода-в-маслі-в-маслі (В/М/М) або тверда речовина-в-маслі-в-маслі (Т/М/М) забезпечують цікавий альтернативний спосіб одержання мікросфер з достатньою ефективністю інкапсульовання. У способі В/М/М біологічно активну сполуку за аналогією зі способом В/М/В розчиняють у водному розчині та емульгують з використанням розчину полімеру в органічному розчиннику, як правило, такому як дихлорметан або етилацетат. Потім для одержання зародкових мікрочастинок при перемішуванні повільно додають полімерний осаджувач, такий як силіконове масло, потім зародкові мікрочастинки виливають у гептан або гексан для екстракції силіконового масла й органічного розчинника та

затвердіння мікросфер. Мікрочастинки можна збирати шляхом вакуумного фільтрування, після чого їх промивають додатковим розчинником і сушать у вакуумі. У способі емульсифікації Т/М/М біологічно активну сполуку за аналогією зі способом Т/М/В у вигляді твердого порошку диспергують у розчині полімеру в органічному розчиннику, такому як дихлорметан або етилацетат. Потім для одержання зародкових мікрочастинок при перемішуванні повільно додають полімерний осаджувач, такий як силіконове масло, потім зародкові мікрочастинки виливають у гептан або гексан для екстракції силіконового масла і дихлорметану та затвердіння мікросфер.

У водний розчин білка, для запобігання втрати активності білка, під час обробки з одержанням мікросфер можна додавати стабілізатори. Прикладами зазначених стабілізаторів є альбумін сироватки людини, желатин і вуглеводи, такі як трегалоза, інулін і сахароза.

При використанні методу розпилювального сушіння водний розчин сполуки емульгують у розчині співполімеру в органічному розчиннику, такому як метиленхлорид, як описано вище в даному описі. Емульсію типу вода-в-маслі потім сушать розпиленням із використанням розпилювальної сушарки.

У додаткових варіантах реалізації композиція згідно з даним винаходом має форму оболонки, ін'єктованого гелю, імплантату (переважно ін'єктованого імплантату) або імплантату, покритого оболонкою. Композицію у формі оболонки можна застосовувати як покриття, через які виділяються лікарські засоби, наприклад, на медичному імплантаті, такому як судинний або сечовий стент, ортопедичний протез або очний імплантат.

Біологічно активні сполуки можна вводити до складу ін'єктованих твердих імплантатів шляхом екструзії. Як правило, порошкоподібні сполуки та мультиблоковий співполімер фізично перемішують, після чого одержувану суміш порошоків уводять в екструдер, нагрівають й обробляють з одержанням складів із бажаною формою та розмірами, таких як циліндричний стрижень з низьким діаметром. Замість фізичного перемішування порошкоподібних сполуки та мультиблокового співполімеру, сполуку та полімер можна спільно розчиняти у придатному розчиннику або ж можна одержувати дисперсію сполуки у розчині полімеру в придатному розчиннику, після чого проводити ліофільне сушіння та екструзію ліофілізованого порошку. Останній спосіб, у цілому, поліпшує гомогенність суміші та однорідність складу імплантату.

Відповідно до іншого аспекту винахід відноситься до способу доставляння біологічно активної сполуки суб'єкту, що потребує цього, який включає введення ефективної дози композиції, такої як визначено в даному описі, зазначеному суб'єкту.

Суб'єкт, як правило, являє собою ссавця, переважно людину. Проте, також передбачається і ветеринарне застосування. Спосіб можна використовувати у терапевтичних, профілактичних і/або косметичних цілях. Залежно від обставин можна вибирати будь-який придатний спосіб введення. Наприклад, введення може включати парентеральне, пероральне, внутрішньоартеріальне, внутрішньосуглобне, внутрішньониркове, внутрішньоочне, епідуральне, інтратекальне, внутрішньом'язове, інтраперитонеальне, внутрішньовенне, внутрішньовагінальне, ректальне, місцеве або підшкірне введення композиції. В одному з варіантів реалізації у винаході запропонований спосіб доставляння зазначеного біологічно активного поліпептиду суб'єкту, що потребує цього, який включає введення ефективної дози композиції згідно з даним винаходом зазначеному суб'єкту, причому композиція має форму мікросфер, ін'єктованого імплантату або гелю, що утворюється *in situ*, при цьому композицію вводять всередину ока, внутрішньоартеріально, внутрішньом'язово або підшкірно.

Для місцевого введення мікросфери можуть міститися в гелі, кремі або мазі, а також при бажанні можуть бути покриті захисним шаром. Таким чином, мікросфери можуть містити одну або більше біологічно активних сполук, які застосовують для лікування захворювань шкіри, таких як псоріаз, екзема, себорея та дерматит.

В іншому варіанті реалізації мікросфери можуть міститися в гелі, такому як гель гіалуронової кислоти або гель макромолекулярного полісахариду. Зазначений варіант реалізації можна застосовувати, зокрема для парентерального введення, наприклад, під час і після хірургії.

При введенні шляхом ін'єкції мікросфери можуть міститися у фармацевтичному носії, такому як вода, сольовий розчин (наприклад, 0,9 %) або розчин, який містить поверхнево-активну речовину в кількості від 0,1 % (мас./об.) до 0,5 % (мас./об.). Приклади поверхнево-активних речовин, які можна застосовувати, включають, але не обмежуються ними, поверхнево-активну речовину Tween 80. Фармацевтичний носій може додатково містити загусник, такий як карбоксиметилцелюлоза натрію.

При введенні шляхом ін'єкції середній розмір мікросфер становить від 1 мкм до 200 мкм, переважно від 5 мкм до 100 мкм, найбільш переважно від 10 мкм до 50 мкм. Зазначені мікросфери при введенні в комбінації з прийнятним фармацевтичним наповнювачем можна

застосовувати для лікування ряду захворювань або порушень залежно від інкапсульованої біологічно активної сполуки. Таким чином, ін'єктовані склади, які містять мікросфери згідно з даним винаходом, можна застосовувати для лікування системних захворювань, таких як ревматоїдний артрит, гепатит, діабет або метаболічні синдроми, і місцево локалізованих захворювань, таких як остеоартрит, захворювання нирок, запалення, місцеві хворобливі процеси, місцеві інфекції, місцеві захворювання шкіри, пухлин (або їх фрагментів, які залишаються після хірургічного видалення, як післяопераційне лікування для знищення яких-небудь пухлинних клітин, що можливо залишаються), раку простати або молочної залози, агромегалії, захворювань очей, таких як вікова макулярна дегенерація, місцевих захворювань мозку (наприклад, хвороби Паркінсона) і серцево-судинних захворювань, таких як гострий інфаркт міокарда, хронічна серцева недостатність або атеросклероз. Зазначені ін'єктовані склади також можна застосовувати для довгострокового терапевтичного лікування, такого як, наприклад, лікування з використанням кортикостероїдів, андрогенів, антиандрогенів, естрогенів, антиестрогенів, прогестагенових агентів або гормонів щитовидної залози або лікарських засобів проти туберкульозу, прокази або малярії.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1А: Термограми ДСК 50LP10L20-LL40.

Фіг. 1В: Термограми ДСК 30LP30L40-LL40.

Фіг. 1С: Термограми ДСК 50CP10C20-LL40.

Фіг. 2: Загальне вивільнення лізоциму з плівок, які складаються з 30LP10L20-LL40, 50LP10L20-LL40, 70LP10L20-LL40, 50CP10C20-LL40 і 30CP30C40-LL40. Плівки містили 10 мас. % лізоциму. Вивільнення вимірювали при 37 °C у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

Фіг. 3: Загальне вивільнення бичачого сироваткового альбуміну (БСА) з плівок, які складаються з 30LP10L20-LL40, 50LP10L20-LL40, 70LP10L20-LL40, 30LP30L40-LL40 і 30CP30C40-LL40. Плівки містили 10 мас. % БСА. Вивільнення вимірювали при 37 °C у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

Фіг. 4: Вплив складу гідрофільного блоку мультиблокових співполімерів на загальне вивільнення лізоциму з плівок. Плівки складалися з 50LP10L20-LL40, 50GP10C20-LL40 або 50CP10C20-LL40 (25 мас. % ПЕГ1000) і містили 10 мас. % лізоциму. Вивільнення вимірювали при 37 °C у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

Фіг. 5: Активність лізоциму, що вивільняється з плівок, які складаються з 30LP10L20-LL40 або 50LP10L20-LL40, що містять 10 мас. % лізоциму (37 °C, фосфатний буфер із рН 7,4), й активність лізоциму в розчинах лізоциму (0,01 мас. % у фосфатному буфері з рН 7,4) при зберіганні при 4 і 37 °C залежно від часу (n=3).

Фіг. 6: Вивільнення БСА in vitro з мікросфер, які складаються з 30LP10L20-LL40 і 50CP10C20-LL40, що містять 3-4 мас. % БСА, при 37 °C у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

Фіг. 7: Вивільнення ІФР-1 in vitro з плівок 50CP30C50-LL40 і 30CP30C40-LL40, що містять ІФР-1, які одержані шляхом формування В/М з використанням заливання розчину. Вивільнення вимірювали при 37 °C у фосфатному буфері з рН 7,2 (n=3). Тверда лінія відповідає вивільненню ІФР-1, вимірюваному шляхом СВЕРХ. Пунктирні лінії відповідають вивільненню ІФР-1, вимірюваному шляхом ELISA.

Фіг. 8: Фотографія СЕМ мікросфер 50CP10C20-LL40, які одержані за допомогою способу подвійної емульсії В/М/В, що містять 0,2 мас. % ІФР-1.

Фіг. 9: Вивільнення ІФР-1 in vitro з мікросфер, які одержані з 50CP10C20-LL40 з різними значеннями IV, що містять 0,2 % ІФР-1. Вивільнення вимірювали при 37 °C у фосфатному буфері з рН 7,2 (n=3).

Фіг. 10: Результати ДСН-ПААГ для ІФР-1, який вивільняється з мікросфер 50CP10C20-LL40 із заданим 0,2 мас. % вмістом ІФР-1, одержаних при використанні різних швидкостей Ultra-Turrax, протягом 1 і 2 тижнів.

Фіг. 11: Вивільнення білка А (ММ 15000 Да) з плівок, які складаються з 20LP10L20-LL40, 30LP6L20-LL40 і 30CP10C20-LL40 (вміст білка А 5 мас. %; товщина плівки 80-120 мкм). Вивільнення вимірювали при 37 °C у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

Фіг. 12: Фотографія СЕМ мікросфер, які складаються з 30CP10C20-LL40 (IV 0,71 дл/г), що містять 3-4 мас. % білка А, одержаних з використанням різних кількостей інуліну у внутрішній водній фазі А: 0 % інуліну, В: 2 % інуліну. 1: загальний вигляд. 2: збільшення.

Фіг. 13: Вивільнення білка А in vitro з мікросфер, які складаються з 30CP10C20-LL40 із заданим 3-4 мас. % вмістом білка А, інкапсульованого разом із 2 або 5 мас. % інуліну, при 37 °C у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

Фіг. 14: Вивільнення білка А in vitro з мікросфер, які складаються з 30CP10C20-LL40 з різними IV, із заданим 3-4 мас. % вмістом білка А, при 37 °С у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

5 Фіг. 15: Результати ДСН-ПААГ для білка А, який вивільняється з мікросфер 30CP10C20-LL40 із заданим вмістом білка А 4 мас. % та інуліну 2 мас. %, через 1 (лінія 4), 7 (лінія 7), 14 (лінія 8) і 21 (лінія 9) день. Лінія 5: маркери молекулярних мас. Лінія 6: стандарт білка А. Слід зазначити, що темні плями викликані забарвленням фосфатних буферних солей.

10 Фіг. 16: Вивільнення пептиду А (ММ 2500) in vitro з плівок, які складаються з 20LP10L20-LL40 (вміст пептиду 5 і 10 мас. %; товщина плівки 80-100 мкм). Вивільнення вимірювали при 37 °С у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

Фіг. 17: Вивільнення пептиду А (ММ 2500) in vitro з мікросфер, які складаються з 20LP10L20-LL40 (розмір частинок 30 мкм; вміст пептиду 10 мас. %). Вивільнення вимірювали при 37 °С у фосфатному буфері з рН 7,4 (n=3).

15 Фіг. 18: Вивільнення рапаміцину in vitro з мікросфер, які складаються з різних сумішей 20LP1020-LL40 і 10LP10L20-LL40.

Фіг. 19: Фотографії СЕМ мікросфер 20LP1020-LL40, що містять госерелін, які одержані за допомогою способу В/М/М.

Фіг. 20: Вивільнення госереліну in vitro з мікросфер 20LP1020-LL40, які одержані за допомогою способу В/М/М.

20 ПРИКЛАДИ

У наступних прикладах синтезували різні здатні до біорозкладання напівкристалічні мультиблокові співполімери з розділеними фазами та проводили оцінку технологічних характеристик і контрольованого вивільнення. Полімери складалися з жорсткого сегмента В на основі кристалічного L-лактиду, що має температуру плавлення ($T_{пл}$), і сегмента А на основі гідрофільного полі(етиленгліколя) (ПЕГ), що має температуру склування ($T_{ст}$) нижче температури тіла у фізіологічних умовах. У наступних прикладах ПЕГ має позначення молекулярної маси (ММ). Наприклад, ПЕГ₁₀₀₀ відноситься до ПЕГ з ММ 1000 г/моль.

ПРИКЛАД 1:

30 У даному прикладі запропоновані загальні способи одержання преполімеру (А), полі(DL-лактид-ПЕГ). Мономери зважували у тригорлій колбі в атмосфері азоту та сушили при 50 °С у випадку гліколіду та D,L-лактиду протягом щонайменше 16 годин при зниженому тиску. ПЕГ сушили при 90 °С при зниженому тиску протягом щонайменше 16 годин. ПЕГ додавали у мономер(и) в атмосфері азоту. Потім додавали октоат олова та суміш перемішували з використанням магнітної мішалки, взаємодію в суміші проводили при 140 °С протягом декількох днів. Аналіз ¹Н ЯМР проводили при 300 МГц на ЯМР спектрометрі VXR Unity Plus. Час очікування d_1 встановлювали на 20 секунд, число сканів становило 16. Спектри знімали у діапазоні від 0 до 14 ppm. Конверсію та M_n преполімеру визначали за даними ¹Н ЯМР. Зразки для ¹Н ЯМР одержували шляхом розчинення 10 мг полімеру в 1 мл дейтерованого хлороформу.

ПРИКЛАД 2:

40 У даному прикладі описане одержання полі(DL-лактид-ПЕГ₁₀₀₀) (pLP10L20) з M_n 2000 г/моль. Зважували 149,84 грама (1,04 моль) D,L-лактиду (Purac) і додавали 149,21 г (0,149 моль) ПЕГ з ММ 1000 (Ineos, категорія PU). Додавали 71,6 мг октоату олова (Sigma Corp) (мольне співвідношення мономер/катализатор = 5900) і суміш перемішували з використанням магнітної мішалки, взаємодію проводили при 140 °С протягом 245 годин. Аналіз ¹Н ЯМР показував 94,8 % конверсію мономера. Розрахункова молекулярна маса (M_n) становила 2000 г/моль. Молекулярна маса, яка визначена шляхом ¹Н ЯМР, становила 1950 г/моль.

ПРИКЛАД 3

50 У даному прикладі описане одержання полі(DL-лактид-ПЕГ₃₀₀₀) (pLP30L40) з M_n 4000 г/моль. Зважували 50,35 г (0,349 моль) D,L-лактиду (Purac) і додавали 151,08 г (50,4 ммоль) ПЕГ з ММ 3000 (Sigma Corp). Додавали 37,5 мг октоату олова (Sigma Corp) (мольне співвідношення мономер/катализатор = 4300) і суміш перемішували з використанням магнітної мішалки, взаємодію проводили при 140 °С протягом 90 годин. Аналіз ¹Н ЯМР показував 93,4 % конверсію мономера. Розрахункова молекулярна маса (M_n) становила 4000 г/моль. Молекулярна маса, яка визначена шляхом ¹Н ЯМР, становила 3940 г/моль.

55 ПРИКЛАД 4

60 У даному прикладі описане одержання преполімеру, полі(ε-капролактон-ПЕГ₁₀₀₀) (pCP10C20) з M_n 2000 г/моль. 100,81 г (0,101 моль) ПЕГ з ММ 1000 (Ineos, категорія PU) зважували у тригорлій колбі в атмосфері азоту та сушили при 90 °С протягом щонайменше 16 годин при зниженому тиску. У ПЕГ в атмосфері азоту додавали 101,76 г (0,892 моль) ε-капролактону (Arcos, попередньо висушеного та перегнаного над CaH₂ при зниженому тиску) і

суміш нагрівали до 135 °С. Додавали 57,9 мг октоату олова (Sigma Corp) (мольне співвідношення мономер/каталізатор = 6200) і суміш перемішували з використанням магнітної мішалки, взаємодію проводили при 135 °С протягом 76 годин. Аналіз ¹H ЯМР показував 100% конверсію мономера. Розрахункова молекулярна маса (M_n) становила 2010 г/моль.

Молекулярна маса, яка визначена шляхом ¹H ЯМР, становила 1950 г/моль.

ПРИКЛАД 5

У даному прикладі описане одержання преполімеру, полі(ε-капролактон-ПЕГ₃₀₀₀) (pCP30C40) з M_n 4000 г/моль. 176,60 г (58,9 ммоль) ПЕГ з ММ 3000 (Ineos, категорія PU) зважували у тригорлій колбі в атмосфері азоту та сушили при 90 °С протягом щонайменше 16 годин при зниженому тиску. У ПЕГ при зниженому тиску додавали 59,4 г (0,520 моль) ε-капролактону (Acros, попередньо висушеного та перегнаного над CaH₂ при зниженому тиску) і суміш нагрівали до 135 °С. Додавали 69,6 мг октоату олова (Sigma Corp) (мольне співвідношення мономер/каталізатор = 3000) і суміш перемішували з використанням магнітної мішалки, взаємодію проводили при 135 °С протягом 243 годин. Аналіз ¹H ЯМР показував 100 % конверсію мономера. Розрахункова молекулярна маса (M_n) становила 2010 г/моль. Молекулярна маса, яка визначена шляхом ¹H ЯМР, становила 1950 г/моль.

ПРИКЛАД 6

У даному прикладі описане одержання преполімеру, полі(L-молочної кислоти) (LL4000) з M_n = 4000 г/моль, яке ініційоване 1,4-бутандіолом (BDO). 399,89 г (2,77 моль) L-лактиду (Purac) зважували у тригорлій колбі в атмосфері азоту та сушили при 50 °С протягом щонайменше 16 годин при зниженому тиску. В L-лактид в атмосфері азоту додавали 9,36 г (0,104 моль) BDO (Acros, попередньо перегнаного при зниженому тиску). Для розчинення L-лактиду та BDO додавали 434 мл діоксану (Acros, попередньо висушеного та перегнаного над натрієвим дротом) і суміш нагрівали до 80 °С. Додавали 87,8 мг октоату олова (Sigma Corp) (мольне співвідношення мономер/каталізатор = 12800). Суміш перемішували з використанням магнітної мішалки, взаємодію проводили при 80 °С протягом 50,6 годин. Полімер виділяли з діоксану шляхом ліофільного сушіння протягом 72 годин до досягнення кінцевої температури 50 °С. Якщо полімер розчиняли у діоксані, то спочатку при зниженому тиску при 50 °С видаляли діоксан. Аналіз ¹H ЯМР показував 96,5 % конверсію мономера. Розрахункова молекулярна маса (M_n) становила 3940 г/моль. Молекулярна маса, визначена шляхом ¹H ЯМР, становила 3900 г/моль. Після ліофільного сушіння вміст діоксану визначали шляхом ¹H ЯМР (300 МГц, 50 мг полімеру розчиняли в 1 мл дейтерованого хлороформу, d₁ = 30 сек, 32 скана). Для кількісної оцінки вмісту діоксану в зразку розчиняли 5 мг дибромбензолу (Acros). Виявили, що вміст діоксану становив 1193 ppm.

ПРИКЛАД 7

У даному прикладі описані загальні способи, які застосовують для одержання мультіблокових співполімерів. Преполімери, ε-капролактон-ПЕГ-ε-капролактон (CPC) або D,L-лактид-ПЕГ-D,L-лактид (LPL) (M_n 2000 г/моль) нагрівали до 50-80 °С доти, поки вони не ставали більш текучими. Відповідні кількості преполімеру LL4000 (M_n 4000 г/моль) і преполімеру CPC або LPL зважували у скляній ампулі, яка обладнана підведенням азоту, та сушили при 50 °С протягом щонайменше 48 годин. Потім до скляної ампули приєднували механічну мішалку. 1,4-діоксан (Acros, перегнаний над натрієм) додавали до досягнення 30 мас. % концентрації полімеру, та для розчинення преполімерів вміст ампули нагрівали до 80 °С. Додавали 0,900-0,990 еквівалента (щодо кількості гідроксильних груп у преполімері) 1,4-бутандіізоціанату (Bayer, перегнаного при зниженому тиску) і реакційну суміш перемішували з використанням механічної мішалки протягом 16-22 годин. Для гасіння непрореагувавших ізоціанатних груп неперегнаний діоксан додавали до досягнення 20 мас. % концентрації полімеру. Реакційну суміш додатково розбавляли неперегнаним діоксаном до досягнення 10 мас. % концентрації полімеру. Ампулу охолоджували до кімнатної температури, реакційну суміш виливали у неглибоку ємність та заморожували при -18 °С. Потім діоксан видаляли шляхом розміщення замороженої реакційної суміші у вакуумі при 30 °С. Полімер зберігали у герметичному впакуванні при -18 °С. Аналізували термічні властивості (мДСК), вміст діоксану (газова хроматографія), характеристичну в'язкість та склад полімеру (¹H ЯМР) невеликої частини навішення. Термічний аналіз проводили шляхом модульованої диференціальної скануючої калориметрії (мДСК). У кюветі для ДСК зважували зразки по 5-10 мг. Вимірювання проводили на DSC Q1000 (TA Instruments) з використанням програми модуляції температури. Амплітуду встановлювали на 1 °С, період модуляції на 60 секунд, а швидкість нагрівання на 5 °С/хв. Зразки нагрівали від -80 °С до 100-200 °С (залежно від типу полімеру). Характеристичну в'язкість вимірювали на віскозиметрі Уббелодє (DIN) типу 0С, 0а або І, Schott Geräte, що поставляється з віскозиметром Schott AVS-450, обладнаним водяною лазнею. Вимірювання

проводили у хлороформі при кімнатній температурі. Концентрація полімеру в хлороформі була такою, що відносна в'язкість знаходилася в діапазоні від 1,2 до 2,0. Вміст діоксану визначали за допомогою ГХ-ПІД аналізу рівноважної парової фази. Вимірювання проводили на ГХ-ПІД Combi Sampler, що поставляється з колонкою Agilent, DB-624/30 м/0,53 мм. Готували зразки у ДМСО.

5 Вміст діоксану визначали з використанням калібрувальних стандартів діоксану.

ПРИКЛАД 8

У даному прикладі описане одержання 20(D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактид)₂₀₀₀-80(L-лактид)₄₀₀₀ (20LP10L20-LL40). Зважували 42,02 г преполімеру LL40 (M_n 4040 г/моль, 10,40 ммоль) і 10,16 г преполімеру D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактиду (M_n 2000 г/моль, 5,08 ммоль) і розчиняли у 100 мл 1,4-діоксану при 80 °С. Додавали 1,8466 г (13,2 ммоль) 1,4-бутандіізоціанату (0,851 еквівалента щодо кількості гідроксильних груп у преполімері) і 20 мл 1,4-діоксану. Через 17 годин реакцію гасили 88 мл неперегнаного діоксану та суміш додатково розбавляли 255 мл неперегнаного діоксану. Діоксан видаляли шляхом введення замороженої реакційної суміші у вакуум при 30 °С.

15 ПРИКЛАД 9

У даному прикладі описане одержання 30(D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактид)₂₀₀₀-70(L-лактид)₄₀₀₀ (30LP10L20-LL40). Зважували 34,44 г преполімеру LL40 (M_n 4020 г/моль, 8,57 ммоль) і 14,95 г преполімеру D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактиду (M_n 2040 г/моль, 7,33 ммоль) і розчиняли у 100 мл 1,4-діоксану при 80 °С. Додавали 2,7386 г (19,5 ммоль) 1,4-бутандіізоціанату (1,231 еквівалента щодо кількості гідроксильних груп у преполімері) і 20 мл 1,4-діоксану. Через 20 годин реакцію гасили 85 мл неперегнаного діоксану та суміш додатково розбавляли 240 мл неперегнаного діоксану. Діоксан видаляли шляхом введення замороженої реакційної суміші у вакуум при 30 °С.

ПРИКЛАД 10

25 У даному прикладі описане одержання 50(D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактид)₂₀₀₀-50(L-лактид)₄₀₀₀ (50LP10L20-LL40). Зважували 19,59 г преполімеру LL40 (M_n 4060 г/моль, 4,83 ммоль) і 19,57 г преполімеру D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактиду (M_n 2040 г/моль, 9,59 ммоль) і розчиняли у 78 мл 1,4-діоксану при 80 °С. Додавали 2,0018 г (14,3 ммоль) 1,4-бутандіізоціанату (0,991 еквівалента щодо кількості гідроксильних груп у преполімері) у 20 мл 1,4-діоксану. Через 20 годин реакцію гасили 67 мл неперегнаного діоксану та суміш додатково розбавляли 189 мл неперегнаного діоксану. Діоксан видаляли шляхом введення замороженої реакційної суміші у вакуум при 30 °С.

ПРИКЛАД 11

35 У даному прикладі описане одержання 70(D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактид)₂₀₀₀-30(L-лактид)₄₀₀₀ (70LP10L20-LL40). Зважували 8,59 г преполімеру LL40 (M_n 4020 г/моль, 2,14 ммоль) і 19,96 г преполімеру D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактиду (M_n 2040 г/моль, 9,78 ммоль) і розчиняли у 48 мл 1,4-діоксану при 80 °С. Додавали 1,648 г (11,8 ммоль) 1,4-бутандіізоціанату (0,986 еквівалента щодо кількості гідроксильних груп у преполімері) з 20 мл 1,4-діоксану. Через 21 годину реакцію гасили 49 мл неперегнаного діоксану та суміш додатково розбавляли 147 мл неперегнаного діоксану. Діоксан видаляли шляхом введення замороженої реакційної суміші у вакуум при 30 °С.

ПРИКЛАД 12

45 У даному прикладі описане одержання 30(D,L-лактид-ПЕГ₃₀₀₀-D,L-лактид)₄₀₀₀-70(L-лактид)₄₀₀₀ (30LP30L40-LL40). Зважували 29,96 г преполімеру LL40 (M_n 4030 г/моль, 7,43 ммоль) і 14,01 г преполімеру D,L-лактид-ПЕГ₁₀₀₀-D,L-лактиду (M_n 4000 г/моль, 3,50 ммоль) і розчиняли у 83 мл 1,4-діоксану при 80 °С. Додавали 1,52 г (10,8 ммоль) 1,4-бутандіізоціанату (0,992 еквівалента щодо кількості гідроксильних груп у преполімері) з 20 мл 1,4-діоксану. Через 21 годину реакцію гасили 74 мл неперегнаного діоксану та суміш додатково розбавляли 222 мл неперегнаного діоксану. Діоксан видаляли шляхом введення замороженої реакційної суміші у вакуум при 30 °С.

ПРИКЛАД 13

50 У даному прикладі описане одержання 50(ε-капролактон-ПЕГ₁₀₀₀-ε-капролактон)₂₀₀₀-50(L-лактид)₄₀₀₀ (50CP10C20-LL40). Зважували 24,34 г преполімеру LL40 (M_n 4030 г/моль, 6,04 ммоль) і 23,87 г преполімеру ε-капролактон-ПЕГ₁₀₀₀-ε-капролактону (M_n 2010 г/моль, 11,9 ммоль) і розчиняли у 95 мл 1,4-діоксану при 80 °С. Додавали 2,4098 г (17,2 ммоль) 1,4-бутандіізоціанату (0,960 еквівалента щодо кількості гідроксильних груп у преполімері) з 20 мл 1,4-діоксану. Через 18 годин реакцію гасили 82 мл неперегнаного діоксану та суміш додатково розбавляли 246 мл неперегнаного діоксану. Діоксан видаляли шляхом введення замороженої реакційної суміші у вакуум при 30 °С.

60 ПРИКЛАД 14

У даному прикладі описане одержання 30(ϵ -капролактон-ПЕГ₃₀₀₀- ϵ -капролактон)₄₀₀₀-70(L-лактид)₄₀₀₀ (30CP30C40-LL40). Зважували 35,84 г преполімеру LL40 (M_n 4030 г/моль, 8,89 ммоль) і 14,79 г преполімеру ϵ -капролактон-ПЕГ₃₀₀₀- ϵ -капролактону (M_n 4010 г/моль, 3,69 ммоль) і розчиняли у 100 мл 1,4-діоксану при 80 °C. Додавали 1,7428 г (12,4 ммоль) 1,4-бутандіізоціанату (0,988 еквівалента щодо кількості гідроксильних груп у преполімері) з 20 мл 1,4-діоксану. Через 18 годин реакцію гасили 83 мл неперегнаного діоксану та суміш додатково розбавляли 240 мл неперегнаного діоксану. Діоксан видаляли шляхом введення замороженої реакційної суміші у вакуум при 30 °C.

ПРИКЛАД 15

Проводили аналіз хімічного складу, молекулярної маси і залишкового вмісту діоксану в синтезованих мультиблокових співполімерах. У Таблиці 1 показані результати аналізу 20LP10L20-LL40, 30LP10L20-LL40, 50LP10L20-LL40, 70LP10L20-LL40, 20LP30L40-LL40, 50CP10C20-LL40, 30CP30C40-LL40. Фактичний склад співполімерів, визначений шляхом ¹H ЯМР за значеннями мольних співвідношень L/P і C/P, добре відповідав заявленим значенням. Усі полімери мали характеристичну в'язкість від 0,7 до 1,1 дл/г. Вміст діоксану становив менше 1000 ppm, що вказувало на ефективне видалення діоксану шляхом вакуумного сушіння.

Для підтвердження наявності структури з розділеними фазами проводили аналіз термічних властивостей мультиблокових співполімерів. Результати показані в Таблиці 2. На Фігурі 1 показані типові термограми ДСК мультиблокових співполімерів 50LP10L20-LL40 (Фігура 1A), 30LP30L40-LL40 (Фігура 1B) і 50CP10C20-LL40 (Фігура 1C). Усі мультиблокові співполімери мали температуру плавлення ($T_{пл}$), обумовлену плавленням сегмента LL40, яка становить приблизно 120-133 °C. Як очікувалося, ентальпія плавлення ($\Delta H_{пл}$) кристалічного сегмента LLA40 підвищувалася при збільшенні кількості сегмента. 70LP10L40-LL40, 50CP10C20-LL40 також мали $T_{пл}$ приблизно 85 °C, що визначається плавленням менш ідеальних кристалів LL40. Співполімери, які містять ПЕГ3000, мали $T_{пл}$ приблизно 40 °C, викликану плавленням ПЕГ. Температура склування ($T_{ст}$) мультиблокових співполімерів, у цілому, знаходиться між значеннями $T_{ст}$ преполімеру (A) та преполімеру (B), що вказує на змішування фаз аморфного преполімеру (A) та аморфної частини преполімеру (B). $T_{ст}$ мультиблокових співполімерів типу LP10L20-LL40 підвищувалася від -18 до 50 °C при збільшенні вмісту сегмента LLA40 від 30 до 80%. $T_{ст}$ зазначених мультиблокових співполімерів знаходиться між значеннями $T_{ст}$ преполімеру (A) (pLP10L20, $T_{ст}$ -37 °C) і преполімеру (B) (LL40, $T_{ст}$ ~50 °C), що пов'язано, таким чином, зі змішуванням аморфного полілактиду напівкристалічного блоку LL40 і ПЕГ. 50CP10C20-LL40 мав $T_{ст}$ -48 °C, що також пов'язано зі змішуванням аморфного ПЕГ, полікапролактону та полілактиду. У Таблиці 3 показані значення ступеня набухання мультиблокових співполімерів. Для вимірювання характеристик набухання полімерів одержували полімерні плівки шляхом заливання 13 мас. % розчину полімеру в дихлорметані (приблизно 300 мг полімеру в 1,5 мл дихлорметану) на скляну пластинку та розподілу розчину полімеру з використанням формувального ножа або шляхом лиття у форму Teflon™. Дихлорметан залишали для повільного випаровування протягом ночі, залишковий дихлорметан видаляли шляхом вакуумного сушіння при 20 °C. Одержані плівки мали товщину 100-200 мкм. Для дослідження набухання зважували 15-40 мг круглих плівок із діаметром приблизно 25 мм і занурювали їх у колбу, що містить 10 мл фосфатного буфера з pH 7,4 (ISO-15814). Зразки зберігали в печі при 37 °C. Для кожного моменту часу відбору збирали зразки, з поверхні видаляли надлишок буферного розчину, після чого зразки зважували на вагах з точністю до 4 знака після коми. Усі випробування проводили у двох повтореннях. Було показано, що ступінь набухання поступово підвищувався при збільшенні вмісту ПЕГ у співполімерах, а також при збільшенні ММ ПЕГ при практично незмінному вмісті ПЕГ.

Таблиця 1

Результати визначення хімічного складу, характеристичної в'язкості та залишкового вмісту діоксану в мультиблокових співполімерах 20LP10L20-LL40, 30LP10L20-LL40, 50LP10L20-LL40, 70LP10L20-LL40, 30LP30L40-LL40, 50CP10C20-LL40, 30CP30C40-LL40

	20LP10L20-LL40	30LP10L20-LL40	50LP10L20-LL40	70LP10L20-LL40	30LP30L40-LL40	50CP10C20-LL40	30CP30C40-LL40
Мольне співвідношення L/P розрахунок	126,1	78,2	42,1	26,3	137,4	27,8	130,1
Мольне співвідношення L/P ¹ H ЯМР	128,5	75,9	42,6	25,7	129,9	26,8	131,8
Мольне співвідношення C/P розрахунок	-	-	-	-	-	8,8	7,8
Мольне співвідношення C/P ¹ H ЯМР	-	-	-	-	-	8,2	8,8
Характерист. в'язкість (дл/г)	0,73	0,85	0,89	0,70	0,79	1,05	0,69
Вміст діоксану (ppm)	<200	256	<200	<200	<200	<200	<200

Таблиця 2

Термічні характеристики мультиблокових співполімерів (MBCP) 20LP10L20-LL40, 30LP10L20-LL40, 50LP10L20-LL40, 70LP10L20-LL40, 30LP30L40LL40, 50CP10C20-LL40, 30CP30C40-LL40 і преполімерів (PP) А і В

	20LP10L20-LL40	30LP10L20-LL40	50LP10L20-LL40	70LP10L20-LL40	30LP30L40-LL40	50CP10C20-LL40	30CP30C40-LL40
T _{ст} (°C) MBCP	50	5	-15	-18	-	-48	-
T _{пл} (°C) MBCP	134	126	123	85/120	37/132	87/126	43/133
ΔH _{пл} (Дж/г) MBCP	50	39	31	2/4	1/40	4/13	35/25
T _{ст} (°C) PP A	-37	-37	-37	-37	-39	-67	-67
T _{пл} (°C) PP A	-	-	-	-	35/42	43	43
ΔH _{пл} (Дж/г) PP A	-	-	-	-	37 (обидва піка)	91	85
T _{ст} (°C) PP B	43	46	48	46	57	57	57
T _{пл} (°C) PP B	85/131	117/134	136	117/134	137	137	137
ΔH _{пл} (Дж/г) PP B	24 (обидва піка)	28 (обидва піка)	32	28 (обидва піка)	57	57	57

Таблиця 3

Склад і набухання мультиблокових співполімерів 20LP10L20-LL40, 30LP10L20-LL40, 50LP10L20-LL40, 70LP10L20-LL40, 30LP30L40-LL40, 50CP10C20-LL40, 30CP30C40-LL40

	мас. % сегмент А	мас. % сегмент В	ММ ПЕГ	мас. % ПЕГ	Ступінь набухання (-)
20LP10L20-LL40	20	80	1000	10	xx
30LP10L20-LL40	30	70	1000	15	1,03
50LP10L20-LL40	50	50	1000	25	1,13
70LP10L20-LL40	70	30	1000	35	1,26
30LP30L40-LL40	30	70	3000	22.5	1,16
50CP10C20-LL40	50	50	1000	25	1,18
30CP30C40-LL40	30	70	3000	22.5	1,67

ПРИКЛАД 16

У даному прикладі проводили оцінку характеристик вивільнення білка з різних гідрофільних мультиблокових співполімерів із розділеними фазами з використанням бичачого сироваткового альбуміну (BCA, 69 кДа) та лізоциму (14 кДа) як модельні білки.

Плівки, які містять 10 мас. % білка, одержували шляхом змішування приблизно 150 мкл 20 мас. % розчину білка з 1,5 мл дихлорметану, що містить 300 мг полімеру, протягом 30 секунд із використанням Ultra turrax при 18000 об./хв. Емульсію розподіляли за скляною пластиною з використанням формувального ножа або виливали у форму Teflon™. Дихлорметан видаляли шляхом повільного випаровування протягом ночі, залишковий дихлорметан видаляли шляхом вакуумного сушіння при 20 °С. Одержані плівки мали товщину 80-120 мкм.

Для дослідження вивільнення зважували 20 мг плівки, які містять білок, і занурювали їх у пробірки, які містять 5 мл фосфатного буфера з рН 7,4, і зберігали в печі при 37 °С. У кожний момент часу відбору проби збирали 1 мл середовища вивільнення та поміщали його в 1 мл свіжого буфера. Вміст білка у зразках середовища вивільнення визначали шляхом дослідження з використанням біцинхонінової кислоти (BCA) (Pierce) на планшетному аналізаторі Easys Expert 96.

Біологічну активність лізоциму, який вивільняється, вимірювали за допомогою дослідження лізису бактерій. Плівки, які містять лізоцим, одержували відповідно до наведеного вище опису. 0,01 мас. % розчину лізоциму, який далі використовували як контроль, одержували шляхом зважування 2,1 мг лізоциму та додавання 20 мл фосфатного буфера. Плівки, які містять лізоцим, зважували і занурювали у пробірки, які містять 5 мл фосфатного буфера з рН 7,4. Пробірки, які містять плівки з лізоцимом, а також свіжоприготовлені розчини лізоциму, зберігали в печі при 37 °С. У кожний момент часу відбору проби збирали 1 мл середовища вивільнення та заміняли його 1 мл свіжого буфера. Вміст білка у зразках середовища вивільнення визначали з використанням BCA відповідно до наведеного вище опису. Активність (який вивільняється) лізоциму визначали за зміною мутності дисперсії бактерій (*Micrococcus lysodeikticus*, Sigma, 0,21 мкг/мл) при 450 нм протягом 3 хвилин після додавання 10 мкл зразка. Для цього використовували УФ-Вид. спектрометр (Varian). Зразки при необхідності розбавляли до досягнення концентрації лізоциму 5-100 мкг/мл. Активність лізоциму в зразках розраховували шляхом порівняння коефіцієнта нахилу одержуваних кривих (коефіцієнт нахилу визначає активність лізоциму) і коефіцієнта нахилу кривої, одержаної для свіжого розчину лізоциму.

На Фігурах 2 і 3 показане вивільнення лізоциму та бичачого сироваткового альбуміну з плівок, відповідно. Результати показують, що шляхом зміни вмісту ПЕГ і ММ ПЕГ можна змінювати швидкість та профіль вивільнення. Вивільнення лізоциму відбувалося протягом від декількох днів до приблизно 3 місяців. Вивільнення BCA внаслідок його великих розмірів було більш повільним і відбувалося протягом від декількох днів до приблизно 4 місяців. Крім того, вивільнення лізоциму можна регулювати шляхом введення різних (комбінацій) мономерів по сусідству з ПЕГ-групою гідрофільного блоку мультиблокових співполімерів. Одержані мультиблокові співполімери (50LP10L20-LL40, 50GP10C20-LL40 і 50CP10C20-LL40) містили 25 мас. % ПЕГ1000 і мали схожі значення ступеня набухання, але різну швидкість розкладання, що призводило до одержання різних профілів вивільнення інкапсульованого лізоциму (Фігура 4).

На Фігурі 5 показана активність лізоциму, який вивільняється з плівок 30LP10L20-LL40 або 50LP10L20-LL40, що містять 10 мас. % лізоциму, (фосфатний буфер, рН 7,4, 37 °С). Як контроль проводили вимірювання активності лізоциму в 0,01 мас. % розчинах лізоциму, які

зберігали при 4 або 37 °С (фосфатний буфер, pH 7,4). Результати показують, що вивільнення лізоциму з плівок при збереженні його біологічної активності відбувалося протягом приблизно одного місяця, це вказує на те, що структурна цілісність та біологічна активність лізоциму зберігалися не тільки під час процесу інкапсулювання, але також під час тривалого перебування лізоциму в гідратованій та набряклій полімерній матриці при 37 °С перед його вивільненням.

ПРИКЛАД 17

У даному прикладі для введення БСА до складу мікросфер застосовували співполімери 30LP10L20-LL40 (IV 0,85 дл/г) і 50CP10C20-LL40 (IV 1,06 дл/г) з розділеними фазами.

Мікросфери, які містять БСА, одержували з гідрофільних мультиблокових співполімерів 50CP10C20-LL40 (IV 1,06 дл/г) і 30LP10L20-LL40 (IV 0,85 дл/г) з розділеними фазами за допомогою способу випарювання розчинника з використанням процедур, описаних у Kissel et al., J. Contr. Rel. 1996, 39(2), 315-326 і Meinel et al., J. Contr. Rel. 2001, 70(1-2), 193-202. БСА (25-50 мг) розчиняли приблизно в 150 мг ультрачистої води та емульгували 2-3 мл розчину 50CP10C20-LL40 (15 % (мас./об.)) або 30LP10L20-LL40 (23 % (мас./об.)) у дихлорметані протягом 60 секунд на Ultra turrax IKA T18 при 20000 об./хв з одержанням емульсії типу вода-в-маслі (В/М). Одержану в такий спосіб первинну емульсію потім емульгували приблизно у 80-130 мл UP-води, що містить 4,0 мас. % ПВС протягом 30 секунд на Ultra turrax IKA T18 при 14000 об./хв. з одержанням емульсії типу вода-в-маслі-в-воді (В/М/В). Одержану в такий спосіб вторинну емульсію обережно перемішували протягом 2 годин при 600 об./хв при кімнатній температурі. У результаті випаровування дихлорметану полімер осаджувався з розчину з утворенням мікросфер. Через 3 години (час, необхідний для практично повного випаровування дихлорметану) мікросфери, які утворилися, збирали шляхом центрифугування, промивали їх тричі 100-200 мл 0,05 мас. % водного розчину Tween 20 в ультрачистій воді. На завершальній стадії мікросфери ліофілізували.

Для дослідження IVR (вивільнення in vitro) в 20 мг мікросфер додавали 2 мл 100 мМ фосфатного буфера (pH 7,4, 0,02 мас. % NaN_3) у випадку мікросфер із 30LP10L20-LL40 і 25 мМ NaPi буфера (pH 7,2, 105 мМ NaCl , 0,01 мас. % Tween 80, 0,02 мас. % NaN_3) у випадку мікросфер із 50CP10C20-LL40. Зразок інкубували при 37 °С, під час кожного відбору проби збирали 1,8 мл зразка та заміняли буфером вивільнення. Вміст БСА вимірювали шляхом білкового дослідження БСА у випадку мікросфер із 30LP10L20-LL40 і СВЕРХ (елюент А: 1 мас. % ТФО в UP-воді, елюент В: 0,085 мас. % ТФО в ацетонітрилі, градієнт від 95/5 (об./об.) А/В до 5/95 А/В за 25 хвилин) у випадку мікросфер із 50CP10C20-LL40.

Розподіл мікросфер за розмірами визначали з використанням аналізатора Coulter. Приблизно 1 мг мікросфер диспергували у 50-100 мл розчину Isotron II шляхом обережного перемішування, розмір частинок вимірювали на аналізаторі Coulter, обладнаному 100 мкм вимірювальним осередком.

Вміст БСА у мікросферах визначали шляхом розчинення точно зваженої кількості 5-10 мг мікросфер у 5,0 мл ацетонітрилу. Після центрифугування видаляли 4 мл надосадової рідини і додавали 5 мл PBS. Вміст БСА вимірювали шляхом СВЕРХ (елюент А: 0,1 мас. % ТФО в UP-воді, елюент В: 0,1 % ТФО в ацетонітрилі, градієнт від 90/10 (об./об.) А/В до 10/90 (об./об.) А/В за 4 хвилини).

У Таблиці 4 наведені розмір частинок, ефективність інкапсулювання (ЕЕ) одержаних мікросфер, які містять БСА. На Фігурі 6 показане вивільнення БСА in vitro з мікросфер 30LP10L20-LL40 із заданим 5 мас. % вмістом БСА та мікросфер 50CP10C20-LL40 із заданим 10 мас. % вмістом БСА. Вивільнення БСА з мікросфер 30LP10L20-LL40 відбувалося протягом приблизно 3 місяців лінійним чином без значних стрибків. Вивільнення БСА з мікросфер 50CP10C20-LL40 відбувалося протягом ~3 місяців лінійним чином без значних стрибків, після чого більш повільне вивільнення тривало ще ~1,5 місяці.

Таблиця 4

Середній розмір частинок, вміст БСА та ефективність інкапсулювання мікросфер із 50CP10C20-LL40 і 30LP10L20-LL40, які містять БСА

Назва полімеру	Середній розмір (мкм)	Вміст (мас. %)	ЕЕ (%)
50CP10C20-LL40	14	2,8	33
30LP10L20-LL40	18	4,3	85

ПРИКЛАД 18

У даному прикладі різні гідрофільні мультиблокові співполімери з розділеними фазами, які одержані відповідно до опису наведених вище прикладів, застосовували для одержання складів у вигляді плівок і мікросфер, які містять інсуліноподібний фактор росту I (ІФР-1).

Плівки, які містять ІФР-1, одержували шляхом розчинення 0,18 г полімеру в 1,46 г дихлорметану та наступної емульсифікації шляхом обробки на Ultra turrax разом із ІФР-1, розчиненим в ультратистій воді, при 18000 об./хв. протягом 30 секунд або з використанням 100 Вт ультразвуку протягом 5 секунд. Емульсію виливали у форму Teflon™. Дихлорметан залишали для випаровування протягом ночі, залишковий дихлорметан видаляли шляхом вакуумного сушіння протягом ночі. Вирізали 20 мг плівки і залишали для вивільнення при 37 °C в 1 мл фосфатного буферного сольового розчину (PBS, 25M, pH 7,2, 105 mM NaCl, 0,01 мас. % Tween 80 і 0,02 мас. % NaN₃). У попередньо визначені моменти часу відбирали зразки, відібраний об'єм заміняли свіжим буфером.

Мікросфери, які містять ІФР-1, одержували за допомогою способу емульсифікації В/М/В на основі екстракції/випарювання розчинника. 2,78 мг ІФР-1 і 51,8 мг БСА розчиняли у 143 мкл UP-води у пробірці Eppendorf та емульгували у розчині 0,47 г 50CP10C20-LL40 (IV 1,05 дл/г) у 2,62 г дихлорметану на Ultra turrax (20000 об./хв., 60 сек.). Одержану в такий спосіб первинну емульсію потім емульгували у 81 мл UP-води, що містить 4,0 мас. % ПВС, на Ultra turrax (14000 об./хв. протягом 60 секунд) і перемішували протягом 2 годин при 600 об./хв. при кімнатній температурі. Одержані мікросфери збирали на 5 мкм мембранному фільтрі та промивали 1 л UP-води, що містить 0,05 мас. % Tween 80. На завершальній стадії мікросфери ліофілізували.

Приблизно 1 мг мікросфер диспергували у 50-100 мл розчину Isotron II шляхом обережного перемішування, розмір частинок вимірювали на аналізаторі Coulter, обладнаному 100 мкм вимірювальним осередком.

Вміст ІФР-1 і БСА визначали шляхом розчинення точно зваженої кількості 5 мг мікросфер у 0,3 мл ацетонітрилу. Потім додавали 1,2 мл PBS, обережно струшували. Після центрифугування вміст ІФР-1 і БСА в надосадовій рідині визначали шляхом СВЕРХ. Процедуру проводили у трьох повтореннях.

Для підтвердження того, що мікроінкапсульований ІФР-1 та ІФР-1, який вивільняється, зберігав здатність зв'язування з антитілами захоплення та детекторними антитілами після вивільнення, а отже того, що розкладання білка на цьому рівні не відбувалося, концентрацію інсуліноподібного фактора росту I (ІФР-1) людини у зразку вимірювали з використанням комерційної варіації "сендвіч" ELISA (R&D Systems). Антитіло захоплення та детекторне антитіло, які входять до складу набору, мали специфічність до природного та рекомбінантного ІФР-1, а також до стандарту рекомбінантного ІФР-1.

Для дослідження структурної цілісності ІФР-1, який вивільняється, 100-300 нг ІФР-1, зібраного зі зразків середовища вивільнення, денатурували з використанням буфера Лемлі/β-меркаптоетанолу та наносили у попередньо виготовлений "Any KD TGX" мінігель та розділяли в умовах денатурації при 100-200 В з використанням 1x Tris/гліцин/ДСН як буфер поділу та забарвлювали протягом ночі в колоїдному забарвлювальному агенті CBV. Для визначення розміру частинок виділених білків використовували маркер Dual Xtra Protein (Bio-Rad).

На Фігурі 7 показане вивільнення ІФР-1 in vitro з полімерних плівок 50CP30C40-LL40 і 30CP30C40-LL40, які містять 0,6 мас. % ІФР-1, визначене шляхом СВЕРХ та ELISA. Вивільнення ІФР-1 з плівок 50CP30C40-LL40 проходило протягом 7 днів, тоді як вивільнення ІФР-1 з полімерних плівок 30CP30C40-LL40 проходило повільно, загальне вивільнення через 28 днів становило приблизно 40 %. Тому що загальне вивільнення ІФР-1, вимірюване шляхом СВЕРХ, практично збігалось зі загальним вивільненням ІФР-1, вимірюваним шляхом ELISA, був зроблений висновок про відсутність негативного впливу на структуру та біологічну активність ІФР-1, який вивільняється.

Мікросфери із заданим 0,5 мас. % вмістом ІФР-1 одержували з 50CP10C20-LL40 з IV 1,05 і 0,68 дл/г за допомогою способу подвійної емульсифікації. Мікросфери мали гладку поверхню (Фігура 8), ефективність інкапсулювання перебувала в діапазоні від 40 до 60 %. Середній об'ємний діаметр частинок (d_{50}), виміряний на аналізаторі Coulter, обладнаному 100 мкм вимірювальним осередком, становив 54,4 мкм, а CV (коефіцієнт варіацій) становив 61 %. На Фігурі 9 показане вивільнення ІФР-1 in vitro зі зазначених мікросфер. Для мікросфер, які складаються з 50CP10C20-LL40 з IV 0,68 дл/г, повне вивільнення ІФР-1 проходило за 2 дні. Вивільнення ІФР-1 з мікросфер, які складаються з 50CP10C20-LL40 з IV 1,05 дл/г, було більш повільним, повне вивільнення відбувалося за 6 днів. За результатами ДСН-ПААГ (Фігура 10), у яких були відсутні які-небудь ознаки розкладання або агрегації білка, можна зробити висновок про відсутність негативного впливу на структуру ІФР-1, який вивільняється.

ПРИКЛАД 19

У даному прикладі різні гідрофільні мультиблокові співполімери з розділеними фазами (20LP10L20-LL40 (IV 0,58 дл/г), 30LP6L20-LL40 (IV 0,60 дл/г) і 30CP10C20-LL40 (IV 0,71 дл/г)), які одержані відповідно до опису наведених вище прикладів, що використовували для одержання складів у вигляді плівок, які містять біологічно активний поліпептид із високою розчинністю у воді, що має молекулярну масу 15 кДа (Білок А). Крім того, мультиблокові співполімери 30CP10C20-LL40 з різними IV (0,81, 0,71 і 0,65 дл/г) використовували для введення Білка А до складу мікросфер.

Плівки, які містять білок А, одержували за допомогою способу з використанням заливання розчину. 10 мг білка А розчиняли у 123 мг UP-води та емульгували у розчині 0,18 г полімеру в 1,46 г дихлорметану з використанням Ultra turrax (18000 об./хв., 60 сек). Одержану в такий спосіб первинну емульсію виливали у форму Teflon™ і залишали для випаровування дихлорметану протягом ночі. Залишковий дихлорметан видаляли шляхом вакуумного сушіння.

Мікросфери, які містять білок А, одержували за допомогою способу емульсифікації В/М/В, заснованого на екстракції/випарюванні розчинника. У пробірці Eppendorf 21 мг білка А (для заданого вмісту 5 мас. %) розчиняли у 156 мкл UP-води, що можливо містить інουλін, та емульгували у розчині 0,4 г полімеру в 2,1 г дихлорметану з використанням Ultra turrax (20000 об./хв., 60 сек.). Одержану в такий спосіб первинну емульсію потім емульгували у 70 мл UP-води, що містить 4,0 мас. % ПВС, з використанням Ultra turrax (14000 об./хв. протягом 60 секунд) і перемішували протягом 2 годин при 600 об./хв. при кімнатній температурі. Одержані мікросфери збирали на 5 мкм мембранному фільтрі та промивали тричі 100 мл UP-води, що містить 0,05 мас. % Tween 80. На завершальній стадії мікросфери ліофілізували.

Приблизно 10 мг мікросфер диспергували у 50-100 мл розчину Isotron II шляхом обережного перемішування, розмір частинок вимірювали на аналізаторі Coulter, обладнаному 100 мкм вимірювальним осередком.

Вміст білка А визначали шляхом розчинення точно зваженої кількості 5 мг мікросфер у 0,3 мл ацетонітрилу. Після центрифугування видаляли надосадову рідину, а залишковий АСН випарювали. Додавали 1,95 мл PBS. Вміст білка А вимірювали шляхом СВЕРХ (елюент А: 0,1 мас. % ТФО в UP-воді, елюент В: 0,1 мас. % ТФО в ацетонітрилі, градієнт від 80/20 (об./об.) А/В до 10/90 А/В за 3 хвилини).

Для візуалізації на СЕМ невелику кількість мікросфер приклеювали до вугільної провідної стрічки і наносили покриття із золота протягом 3 хвилин. Візуалізацію зразка проводили з використанням 10 кВ пучка електронів.

Кінетику вивільнення білка А in vitro з плівок і мікросфер вимірювали у 100 мМ фосфатному буфері з рН 7,4 (20 мг плівки у 2 мл). Зразки інкубували при 37 °С. Під час кожного відбору проби збирали 1,8 мл зразка та заміняли 1,8 мл фосфатного буфера. Вміст білка А вимірювали шляхом СВЕРХ (елюент А: 0,1 мас. % ТФО в UP-воді, елюент В: 0,1 мас. % ТФО в ацетонітрилі, градієнт від 80/20 (об./об.) А/В до 10/90 А/В за 3 хвилини).

ДСН-ПААГ проводили у поновлюючих умовах з використанням 4-20 % гелів Tris-HCl. При дослідженні зразків і стандартного зразка білка А наносили 20 мкл розчину білка у щілину. У випадку маркера у щілину наносили 2 мкл. Кількість білка, яка додається в щілину, становила 75 або 150 нг. Зразки одержували шляхом розведення 12 мМ PBS із рН 7,4 або UP-водою до досягнення концентрації білка А 150 або 300 нг/20 мкл. Потім додавали робочий розчин Лемлі (буфер Лемлі, який містить 1 % меркаптоетанолу) у відношенні 1:1 (об./об.). Зразки нагрівали до ~90 °С протягом 5 хвилин і наносили в гель. Гелі фіксували в електрофоретичному осередку та додавали рухомий буфер (Tris/гліцин/ДСН, рН 8,3). Зразки і стандарти наносили в гель, цикл проведення фореzu гелю при 100 кВ становив 15 хвилин. Потім напругу встановлювали на 200 кВ, і фореzu гелю проводили до досягнення гарного поділу стандартів молекулярної маси. Гелі промивали UP-водою та забарвлювали срібним реагентом.

На Фігурі 11 показане вивільнення білка А in vitro з 20LP10L20-LL40 (10 мас. % ПЕГ ММ 1000), 30LP6L20-LL40 (9 мас. % ПЕГ ММ 600) і 30CP10C20-LL40 (15 мас. % ПЕГ ММ 1000). Вивільнення білка А з плівок на основі 30CP10C20-LL40 проходило відносно швидко, загальне вивільнення білка А досягало 100 % через 3 місяці. Шляхом заміни ПЕГ1000 на ПЕГ600, що призводить до зниження ступеня набухання, можна сповільнювати вивільнення білка А, за рахунок цього домагалися досягнення кінетики вивільнення, яка контролюється дифузією, практично першого порядку, що давало загальне вивільнення ~75 % через 4 місяці. Зниження швидкості вивільнення білка А також можна домагатися за рахунок зниження масової частки гідрофільного блоку LP10L20 у полімері. За рахунок використання 20LP10L20-LL40 (10 мас. % ПЕГ1000) можна додатково сповільнювати вивільнення, і після початкового невеликого миттєвого вивільнення, яке становить менше 15 %, домагалися добре контрольованої кінетики

вивільнення білка А, загальне вивільнення становило ~65 % за 6 місяців. Дані явно вказують на те, що за рахунок вибору полімеру можна контролювати кінетику вивільнення білка А.

Мікросфери, які містять білок А, одержували з 30CP10C20-LL40, вміст білка А становив 3-4 мас. %. Для збільшення швидкості вивільнення білка А в капсули необов'язково додавали 2 або 5 мас. % інуліну. Вплив молекулярної маси полімеру на кінетику вивільнення білка визначали шляхом дослідження кінетики вивільнення білка А з мікросфер, які складаються з полімерів 30CP10C20-LL40 з різною характеристичною в'язкістю. Всі одержувані мікросфери, які містять білок А, мали сферичну форму. У мікросферах, в які додатково інкапсулювали інулін, пористість поверхні підвищувалася при збільшенні вмісту інуліну, що показано на зображеннях СЕМ на Фігурі 12. У Таблиці 5 наведені розмір частинок і ефективність інкапсулювання (ЕЕ) білка А в мікросферах. На Фігурі 13 показано, що після невеликого початкового миттєвого вивільнення, вивільнення білка А відбувалося з постійною швидкістю. При зниженні вмісту інуліну спостерігали зменшення миттєвого вивільнення та підвищення лінійності вивільнення. Під час відсутності інуліну кількість, яка вивільняється за 3 місяці, становила ~70 %, тоді як при інкапсулюванні 2 або 5 мас. % інуліну вивільнення становило 90-100 %. Вивільнення білка А з плівок 30CP10C20-LL40, які містять 2 або 5 мас. % інкапсульованого інуліну, було схожим. Дані вивільнення показані аж до ~4 місяців. Передбачувана тривалість вивільнення білка А з мікросфер 30CP10C20-LL40 становить приблизно 6 місяців.

На Фігурі 14 показана кінетика вивільнення білка А з плівок 30CP10C20-LL40 з різною характеристичною в'язкістю (IV) полімеру. Швидкість вивільнення білка А підвищувалася при збільшенні IV полімеру. У випадку полімерів 30CP10C20-LL40 з IV 0,71 або 0,81 дл/г спостерігали вповільнене вивільнення білка А, загальне вивільнення становило 60-70 % через 2 місяці. Кінетика вивільнення білка А з мікросфер, які складаються з 30CP10C20-LL40 з IV 0,58 дл/г, значно відрізнялася. Початкова швидкість вивільнення аж до одного місяця була нижче, але на інтервалі від 1 до 3 місяців вивільнення білка А збільшувалося, після чого воно знову вповільнювалося, що давало загальну тривалість вивільнення приблизно 5 місяців. Дані явно вказують на те, що вивільнення білка А з мікросфер може бути лінійним протягом щонайменше 4 місяців, а кінетику вивільнення можна контролювати шляхом інкапсулювання цукрів, таких як інулін, а також змінюючи характеристичну в'язкість полімеру.

Структурну цілісність білка А, який вивільняється з мікросфер, досліджували шляхом ДСН-ПААГ. Аналіз ДСН-ПААГ підтверджував, що білок А, який вивільняється протягом щонайменше 21 дня, складався, головним чином, з білка у вихідному вигляді (Фігура 15). Ці результати показують, що мікросфери 30CP10C20-LL40 забезпечують придатну матрицю для довгострокового вивільнення білка А, що не виявляє негативний вплив на його структуру.

Таблиця 5

Огляд характеристик мікросфер із заданим 3-4 мас. % вмістом білка А

№ MSP (мікросфера)	IV полімеру (дл/г)	Вміст інкапсульованого інуліну (мас. %)	Розмір частинок (мкм)	Вміст білка А (мас. %)	ЕЕ білка А (%)
1	0,71	0	52	3,7	100
2	0,71	2	57	3,3	90
3	0,71	5	55	1,8	54
4	0,57	0	33	4,0	100
5	0,81	0	43	0,7	24

ПРИКЛАД 20

У даному прикладі гідрофільні мультиблокові співполімери 20LP10L20-LL40 (IV 0,73 дл/г) з розділеними фазами, які одержані відповідно до опису, що наведений вище у прикладах, використовували для одержання складів у вигляді плівок і мікросфер, які містять біологічно активний поліпептид з молекулярною масою 2,5 кДа (пептид А).

Плівки, які містять пептид А, одержували за допомогою способу заливання розчину. 10 (у випадку 5 мас. % вмісту) або 20 мг (у випадку 10 мас. % вмісту) пептиду А розчиняли у 123 мг UP-води та емульгували у розчині 0,18 г 20LP10L20-LL40 (IV 0,76 дл/г) в 1,46 г дихлорметану з

використанням Ultra turrax (18000 об./хв., 30 сек.). Одержану в такий спосіб первинну емульсію виливали у форму Teflon і залишали для випаровування дихлорметану протягом ночі. Залишковий дихлорметан видаляли шляхом вакуумного сушіння.

Мікросфери, які містять пептид А, одержували за допомогою способу подвійної емульсії, заснованого на випарюванні розчинника. 50 мг пептиду А розчиняли у PBS і емульгували у розчині 0,5 г 20LP10L20-LL40 (IV 0,73 дл/г) в 2 г дихлорметану з використанням Ultra turrax (24000 об./хв., 60 сек.). Одержану в такий спосіб первинну емульсію потім емульгували у 200 мл UP-води, що містить 4,0 мас. % полівінілового спирту, з використанням Ultra turrax (14000 об./хв. протягом 30 секунд) і перемішували протягом 3 годин при 600 об./хв. при кімнатній температурі. Одержані мікросфери центрифугували, надосадову рідину видаляли і мікросфери промивали тричі 200 мл UP-води, що містить 0,05 мас. % Tween 20. На завершальній стадії мікросфери ліофілізували. Розподіл частинок за розмірами вимірювали на аналізаторі Coulter. Приблизно 10 мг мікросфер диспергували у 50-100 мл розчину Isotron II шляхом обережного перемішування, розмір частинок вимірювали у 100 мкм вимірювальному осередку.

Вміст пептиду А в мікросферах визначали шляхом розчинення точно зваженої кількості 5-10 мг мікросфер у 5,0 мл ацетонітрилу. Після центрифугування видаляли 4 мл надосадової рідини і додавали 5 мл PBS. Вміст пептиду А вимірювали шляхом ВЕРХ (елюент А: 1 мас. % ТФО в UP-воді, елюент В: 0,085 мас. % ТФО в ацетонітрилі, градієнт від 95/5 (об./об.) А/В до 5/95 А/В за 25 хвилин).

Кінетику вивільнення пептиду А in vitro з плівок і мікросфер вимірювали у PBS при 37 °С. Плівки або мікросфери (5-20 мг), які містять пептид А, зважували у пробірці та додавали 2 мл PBS. Пробірки інкубували при 37 °С, зразки відбирали у попередньо визначені моменти часу. У кожний момент відбору проби збирали 75-90 % середовища вивільнення та заміняли його свіжим PBS. Вміст пептиду А в зразках середовища вивільнення визначали шляхом ВЕРХ (елюент А: 1 мас. % ТФО в UP-воді, елюент В: 0,085 мас. % ТФО в ацетонітрилі, градієнт від 95/5 (об./об.) А/В до 5/95 А/В за 25 хвилин).

На Фігурі 16 показане вивільнення пептиду А in vitro з плівок 20LP10L20-LL40. Вивільнення пептиду А з плівок 20LP10L20-LL40 з 5 мас. % вмістом пептиду А відбувалося лінійним чином без значних стрибків протягом щонайменше 5 місяців. У випадку плівок 20LP10L20-LL40 з більш високим вмістом пептиду А (10 мас. %) миттєве вивільнення підвищувалося до 15 %. Через приблизно 2 місяці вивільнення було аналогічним із плівками з 5 мас. % вмістом.

Мікросфери 20LP10L20-LL40, які містять пептид А, мали середній розмір частинок 30 мкм і вміст пептиду А 10,3 мас. %, а також ефективність інкапсулювання 100 %. На фігурі 17 показано, що для MSP, які містять пептид А, миттєве вивільнення становило приблизно 10 мас. %, а потім кінетика вивільнення мала нульовий порядок протягом щонайменше 40 днів.

ПРИКЛАД 21

У даному прикладі гідрофільні мультиблокові співполімери 20LP10L20-LL40 (Приклад 8) і 10LP10L20-LL40 з розділеними фазами використовували для одержання мікросфер, які містять рапаміцин (ММ 914 Да). Компонент поліетиленгліколя в полімерах мав молекулярну масу 1000 г/моль.

Мікросфери із заданим 20 мас. % вмістом рапаміцину одержували за допомогою способу випарювання розчинника із застосуванням однієї емульсії типу масло-в-воді (М/В). Полімери розчиняли у дихлорметані в різних співвідношеннях до досягнення концентрації приблизно 20 мас. % і додавали необхідну кількість рапаміцину. Розчин полімеру/рапаміцину потім емульгували у 200 мл UP-води, що містить 4,0 мас. % полівінілового спирту (ПВС), з використанням Ultra turrax (14000 об./хв. протягом 30 секунд), а потім перемішували з використанням магнітної мішалки протягом 3 годин при 300 об./хв. при кімнатній температурі. Дисперсію мікросфер концентрували шляхом центрифугування та мікросфери промивали тричі 50 мл водного 0,05 мас. % розчину Tween 20. На завершальній стадії мікросфери ліофілізували.

Розподіл частинок за розмірами визначали на аналізаторі Coulter. Приблизно 10 мг мікросфер диспергували у 50-100 мл розчину Isotron II шляхом обережного перемішування, розмір частинок вимірювали з використанням 100 мкм вимірювального осередку.

Вміст рапаміцину в мікросферах визначали шляхом розчинення точно зваженої кількості 5-10 мг мікросфер у 5,0 мл ацетонітрилу. Після центрифугування видаляли 4 мл надосадової рідини і додавали 5 мл PBS. Вміст рапаміцину вимірювали шляхом ВЕРХ (елюенти: ацетонітрил/вода 70/30 (об./об.); 278 нм).

Кінетику вивільнення рапаміцину in vitro з мікросфер визначали при 37 °С у 10 мМ PBS, pH 7,4, що містить 0,5 мас. % ДСН. Мікросфери (5-20 мг), які містять рапаміцин, зважували у пробірці та додавали 2 мл середовища вивільнення. Пробірки інкубували при 37 °С, відбір проб проводили у попередньо визначені моменти часу. У кожний момент відбору проби збирали 75-

90 % середовища вивільнення та заміняли його свіжим PBS. Вміст рапаміцину в зразках середовища вивільнення визначали шляхом ВЕРХ.

Одержані в такий спосіб мікросфери з рапаміцином мали середній розмір 35 мкм, вміст рапаміцину становив від 17 до 20 мас. %, що відповідає ефективності інкапсулювання від 89 % до 100 %. На Фігурі 18 показане вивільнення рапаміцину з мікросфер, які складаються з різних сумішей 20LP10L20-LL40 і 10LP10L20-LL40. Вивільнення рапаміцину з мікросфер на основі 20LP10L20-LL40 відбувалося відносно швидко, тоді як вивільнення рапаміцину з мікросфер на основі 10LP10L20-LL40 проходило дуже повільно. Шляхом змішування двох полімерів одержували мікросфери з проміжними профілями вивільнення.

ПРИКЛАД 22

У даному прикладі мікросфери, які містять госсереліну ацетат, одержували з гідрофільного мультимікрофазного співполімеру 20LP10L20-LL40 з розділеними фазами за допомогою способу з використанням емульсії типу вода-в-маслі-в-маслі. 62,6 мг госсереліну ацетату розчиняли у 150 мкл UP-води (29,4 мас. %) та емульгували з використанням розчину 0,5 г полімеру 20LP10-LL40 у 7,4 г дихлорметану в сцинтиляційному флаконі (Ultra turrax, 20000 об./хв., 60 сек). Потім повільно додавали 13,5 г полімерного осаджувача (силіконове масло, 350 сСт) (2-5 хвилин) при постійному перемішуванні (12000 об./хв.) з утворенням зародкових мікрочастинок. Зародкові мікрочастинки потім виливали у 550 мл гептану при кімнатній температурі (співвідношення дихлорметану та гептану в розчиннику становило 13,5:1). Посудину для екстракції закривали для запобігання надлишкового випаровування екстракційного середовища. Приблизно через 3 години екстракції мікрочастинки збирали шляхом вакуумного фільтрування, додатково промивали гептаном і сушили у вакуумі. Мікросфери мали середній розмір 67 мкм, вміст госсереліну становив 8,3 %, що відповідає ефективності інкапсулювання 88 %.

Розподіл частинок за розмірами визначали на аналізаторі Coulter. Приблизно 10 мг мікросфер диспергували у 50-100 мл розчину Isotron II шляхом обережного перемішування, розмір частинок вимірювали з використанням 100 мкм вимірювального осередку.

Вміст госсереліну в мікросферах визначали шляхом розчинення точно зваженої кількості 5-10 мг мікросфер у 5,0 мл ацетонітрилу. Після центрифугування видаляли 4 мл надосадової рідини і додавали 5 мл PBS. Вміст госсереліну вимірювали шляхом ВЕРХ (елюенти: вода/ацетонітрил/трифтороцтова кислота 72/28/0,1, 220 нм).

Кінетику вивільнення госсереліну *in vitro* з мікросфер визначали у PBS (192 мМ, рН 7,4, що містить 0,01 % Tween 80 і 0,02 % азиду натрію) при 37 °С. Мікросфери (5-20 мг), які містять госсерелін, зважували у пробірці та додавали 2 мл середовища вивільнення. Пробірки інкубували при 37 °С, відбір проб проводили у попередньо визначені моменти часу. У кожний момент відбору проби збирали 75-90 % середовища вивільнення та заміняли його свіжим PBS. Вміст госсереліну в зразках середовища вивільнення визначали шляхом ВЕРХ.

Одержані в такий спосіб мікросфери 20LP10-LLa40 з госсереліном мали вигляд сфери з гладкою поверхнею (Фігура 19), середній розмір 71 мкм (CV 47 %), вміст госсереліну становив 8,3 мас. %, що відповідає ефективності інкапсулювання 88 %. На Фігурі 18 показане вивільнення госсереліну з мікросфер.

ПРИКЛАД 23

У даному прикладі мікросфери, які містять лізоцим, одержували з гідрофільного мультимікрофазного співполімеру 30CP10L20-LL40 з розділеними фазами за допомогою способу з використанням емульсії типу тверда речовина-в-маслі-в-маслі (Т/М/М). 0,43 г 30CP10L20-LL40 розчиняли у 7,4 г дихлорметану в сцинтиляційному флаконі (5,4 мас. %), у розчин полімеру додавали 0,074 г висушених розпиленням і стабілізованих інуліном мікрочастинок лізоциму (співвідношення лізоцим/інулін: 1/2 (мас./мас.)) з розміром 1-2 мкм, дисперсію гомогенізували на Ultra turrax (20000 об./хв., 60 сек.). Потім для одержання зародкових мікрочастинок при постійному перемішуванні (12000 об./хв.) повільно додавали (2-5 хвилин) 11,46 г полімерного осаджувача (силіконове масло, 350 сСт). Зародкові мікрочастинки потім виливали у 550 мл гептану при кімнатній температурі (співвідношення дихлорметану та гептану в розчиннику становило 13,5:1). Посудину для екстракції закривали для запобігання надлишкового випаровування екстракційного середовища. Приблизно через 3 години екстракції мікрочастинки збирали шляхом вакуумного фільтрування, додатково промивали гептаном і сушили шляхом вакуумного фільтрування. Мікросфери мали середній розмір 59 мкм, вміст госсереліну становив 4,1-5,6 %, що відповідає ефективності інкапсулювання 80-100 %.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами, який характеризується тим, що:
 - а) він містить щонайменше один сегмент здатного до гідролізу преполімеру (А) та щонайменше один сегмент здатного до гідролізу преполімеру (В),
 - б) зазначений мультиблоковий співполімер характеризується T_g 37 °С або менше та $T_{пл}$ 110-250 °С у фізіологічних умовах;
 - в) сегменти зв'язані за допомогою поліфункціонального подовжувача ланцюга;
 - г) сегменти випадковим чином розподілені за полімерним ланцюгом;
 - е) щонайменше частина сегмента преполімеру (А) одержана з водорозчинного полімеру.
2. Здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами за п. 1, який **відрізняється** тим, що зазначений подовжувач ланцюга являє собою біфункціональний аліфатичний подовжувач ланцюга, переважно діізоціанат, такий як 1,4-бутандіізоціанат.
3. Здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що преполімер (А) містить продукти взаємодії циклічних мономерів і/або нециклічних мономерів, причому зазначені нециклічні мономери переважно вибрані з групи, яка складається з бурштинової кислоти, глутарової кислоти, адипінової кислоти, себацінової кислоти, молочної кислоти, гліколевої кислоти, гідроксимасляної кислоти, етиленгліколю, діетиленгліколю, 1,4-бутандіолу та/або 1,6-гександіолу, а зазначені циклічні мономери переважно вибрані з групи, яка складається з гліколіду, лактиду, ϵ -капролактону, δ -валеролактону, триметиленкарбонату, тетраметиленкарбонату, 1,5-діоксепан-2-ону, 1,4-діоксан-2-ону (пара-діоксанону) та/або циклічних ангідридів, таких як оксепан-2,7-діон.
4. Здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що зазначений водорозчинний полімер вибраний з групи, яка складається з простих поліефірів, таких як поліетиленгліколь (ПЕГ), політетраметиленоксид (ПТМО) і поліпропіленгліколь (ППГ); полівінілового спирту (ПВС), полівінілпіролідону (ПВП), полівінілкапролактаму, полі(гідроксіетилметакрилату) (полі-(ГЕМА)), поліфосфазенів, складних поліортоефірів, поліортоефірамідів або співполімерів зазначених вище полімерів, при цьому зазначений водорозчинний полімер переважно одержаний з полі(етиленгліколю) (ПЕГ), що має M_n 150-5000 г/моль.
5. Здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що містить як додатковий преполімер водорозчинний полімер.
6. Здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що зазначений сегмент преполімеру (В) містить здатний до кристалізації полімер, який одержаний з гідроксіалканоату, гліколіду, L-лактиду або D-лактиду, переважно зазначений сегмент преполімеру (В) містить преполімери з L-лактиду та преполімери з D-лактиду в таких кількостях і співвідношенні, що відбувається утворення стереокомплексу L-лактиду та D-лактиду, переважно зазначений преполімер (В) являє собою полі(L-молочну кислоту) з M_n 1000 г/моль або більше, переважно 2000 г/моль або більше, більш переважно 3000 г/моль або більше.
7. Здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-6, ступінь набухання якого у фізіологічних умовах варіює від 1 до 4, більш переважно від 1 до 2, найбільш переважно від 1 до 1,5.
8. Здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що характеристична в'язкість зазначеного співполімеру становить щонайменше 0,1 дл/г і переважно від 0,2 до 2 дл/г.
9. Спосіб одержання здатного до біорозкладання напівкристалічного термопластичного мультиблокового співполімеру з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-8, який включає:
 - i) проведення реакції подовження ланцюга преполімеру (А) та преполімеру (В) у присутності поліфункціонального подовжувача ланцюга, де преполімери (А) і (В) обидва мають кінцеві групи діолу або двоосновної кислоти, а подовжувач ланцюга має кінцеві групи двоосновної карбонової кислоти або діолу; або
 - ii) проведення реакції подовження ланцюга з використанням агента сполучення, де преполімери (А) і (В) обидва мають кінцеві групи діолу або двоосновної кислоти, а агент сполучення переважно являє собою дициклогексилкарбодіімід.

10. Застосування здатного до біорозкладання напівкристалічного термопластичного мультиблокового співполімеру з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-8 для доставляння лікарських засобів, переважно у вигляді мікросфер, мікрочастинок, наночастинок, наносфер, стрижнів, імплантатів, гелів, оболонок, плівок, покриттів, напилень, трубок, мембран, сітчастих імплантатів, волокон або тампонів.
11. Композиція для доставляння щонайменше однієї біологічно активної сполуки хазяїну, яка містить щонайменше одну біологічно активну сполуку, інкапсульовану в матрицю, причому зазначена матриця містить щонайменше один здатний до біорозкладання напівкристалічний термопластичний мультиблоковий співполімер з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-8.
12. Композиція за п. 11, яка **відрізняється** тим, що зазначена щонайменше одна біологічно активна сполука являє собою непептидний небілковий низькомолекулярний лікарський засіб або біологічно активний поліпептид.
13. Композиція за п. 12, яка **відрізняється** тим, що зазначений непептидний небілковий низькомолекулярний лікарський засіб включає один або більше засобів, вибраних із групи, яка складається з протипухлинного агента, протимікробного агента, цефалоспоринолу, аміноглікозиду, макролідів, тетрацикліну, хіміотерапевтичного агента, антисептика сечовивідних шляхів, лікарського засобу проти анаеробних інфекцій, лікарського засобу від туберкульозу; лікарського засобу від прокази, протигрибкового агента, противірусного агента, агента від гелмінтозу, протизапального агента, агента від подагри, анальгетика центральної дії (опіоїду), місцевого анестетика, лікарського засобу від хвороби Паркінсона, м'язового релаксанту центральної дії, гормону або антагоніста гормонів, кортикостероїду, глюкокортикостероїду, андрогену, андрогенного стероїду, анаболічного стероїду, антиандрогену, естрогену, естрогенного стероїду, антиестрогену, прогестину; лікарського засобу для щитовидної залози й антитиреоїдного засобу.
14. Композиція за п. 12, яка **відрізняється** тим, що зазначений біологічно активний поліпептид включає один або більше поліпептидів, вибраних із групи, яка складається з білкового/пептидного лікарського засобу, ферменту, ліганду рецепторів, нейротрансмітера, інгібіторного пептиду, регуляторного пептиду, активаторного пептиду, цитокіну, фактора росту, моноклонального антитіла, фрагмента моноклональних антитіл, протипухлинного пептиду, антибіотика, антигену, вакцини та гормону.
15. Композиція за будь-яким із пп. 11-13, яка **відрізняється** тим, що зазначена біологічно активна сполука являє собою непептидну небілкову низькомолекулярну молекулу з M_n 1000 Да або менше, і переважно зазначений мультиблоковий співполімер містить полі(етиленгліколь) як сегмент преполімеру (A) та/або як додатковий преполімер, при цьому зазначений полі(етиленгліколь)
- i) має молекулярну масу від 200 до 1500 г/моль, переважно від 600 до 1000 г/моль; і/або
- ii) міститься в кількості від 5 мас. % до 20 мас. %, переважно від 5 мас. % до 10 мас. %.
16. Композиція за будь-яким із пп. 11, 12 або 14, яка **відрізняється** тим, що зазначена біологічно активна сполука являє собою біологічно активний поліпептид із молекулярною масою 10000 Да або менше, і переважно зазначений мультиблоковий співполімер містить полі(етиленгліколь) як сегмент преполімеру (A) та/або як додатковий преполімер, причому зазначений полі(етиленгліколь)
- i) має молекулярну масу від 400 до 3000 г/моль, переважно від 600 до 1500 г/моль; і/або
- ii) міститься в кількості від 5 мас. % до 60 мас. %, переважно від 5 мас. % до 40 мас. %.
17. Композиція за будь-яким із пп. 11, 12 або 14, яка **відрізняється** тим, що зазначена біологічно активна сполука являє собою біологічно активний поліпептид із молекулярною масою 10000 Да або більше, і переважно зазначений мультиблоковий співполімер містить полі(етиленгліколь) як сегмент преполімеру (A) та/або як додатковий преполімер, причому зазначений полі(етиленгліколь)
- i) має молекулярну масу від 600 до 5000 г/моль, переважно від 1000 до 3000 г/моль; і/або
- ii) міститься в кількості від 5 мас. % до 70 мас. %, більш переважно від 10 мас. % до 50 мас. %.
18. Композиція за будь-яким із пп. 11-17 у вигляді мікросфер, мікрочастинок, наночастинок, наносфер, стрижнів, імплантатів, гелів, оболонок, плівок, покриттів, напилень, трубок, мембран, сітчастих імплантатів, волокон або тампонів.
19. Композиція за будь-яким із пп. 11-18 у вигляді мікросфер і/або мікрочастинок, яка **відрізняється** тим, що середній діаметр мікросфер і/або мікрочастинок переважно знаходиться

в діапазоні 0,1-1000 мкм, більш переважно в діапазоні 1-100 мкм, ще більш переважно в діапазоні 10-50 мкм.

20. Композиція за п. 19, яка **відрізняється** тим, що біологічно активна сполука розчинена або диспергована у полімерній матриці.

5 21. Композиція за п. 19, яка **відрізняється** тим, що мікросфера містить резервуар, де біологічно активна сполука міститься в оточенні полімеру в одноядерному або поліядерному стані.

22. Композиція за будь-яким із пп. 11-21 для лікування ревматоїдного артриту, гепатиту, діабету, метаболічних синдромів, остеоартриту, захворювання нирок, запалення, місцевих хворобливих процесів, місцевих інфекцій, місцевих захворювань шкіри, пухлин (або їх фрагментів, які залишаються після хірургічного видалення, як післяопераційне лікування для знищення яких-небудь пухлинних клітин, що можливо залишаються), раку простати або

10 молочної залози, агромегалії, захворювань очей, таких як вікова макулярна дегенерація, місцевих захворювань мозку, таких як хвороба Паркінсона, і серцево-судинних захворювань, таких як гострий інфаркт міокарда, хронічна серцева недостатність або атеросклероз.

15 23. Спосіб доставляння біологічно активної сполуки суб'єкту, що потребує цього, який включає введення ефективної дози композиції за будь-яким із пп. 11-21 зазначеному суб'єкту.

24. Спосіб одержання композиції за будь-яким із пп. 19-21, який включає послідовні стадії

а) емульсифікації водного розчину водорозчинної біологічно активної сполуки у розчині здатного до біорозкладання напівкристалічного термопластичного мультиблокового співполімеру з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-8 в органічному розчиннику, такому як дихлорметан або етилацетат;

20 б) наступної емульсифікації емульсії, одержаної на стадії а), у водному розчині, що містить поверхнево-активну речовину, таку як полівініловий спирт, з одержанням емульсії типу вода-в-маслі-в-воді (В/М/В); та

25 с) екстракції органічного розчинника зі затвердінням мікросфер.

25. Спосіб одержання композиції за будь-яким із пп. 19-21, який включає послідовні стадії

а) диспергування біологічно активної сполуки у вигляді твердого порошку в розчині здатного до біорозкладання напівкристалічного термопластичного мультиблокового співполімеру з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-8 в органічному розчиннику, такому як дихлорметан

30 або етилацетат;

б) емульсифікації дисперсії, одержаної на стадії а), у водному розчині, що містить поверхнево-активну речовину, таку як полівініловий спирт, з одержанням емульсії типу тверда речовина-в-маслі-в-воді (Т/М/В); та

с) екстракції органічного розчинника із затвердінням мікросфер.

35 26. Спосіб одержання композиції за будь-яким із пп. 19-21, який включає послідовні стадії:

а) емульсифікації водного розчину водорозчинної біологічно активної сполуки у розчині здатного до біорозкладання напівкристалічного термопластичного мультиблокового співполімеру з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-8 в органічному розчиннику, такому як дихлорметан або етилацетат;

40 б) додавання полімерного осаджувача, такого як силіконове масло, в емульсію, одержану на стадії а), з одержанням зародкових мікрочастинок; і

с) екстракції полімерного осаджувача та органічного розчинника із затвердінням мікросфер.

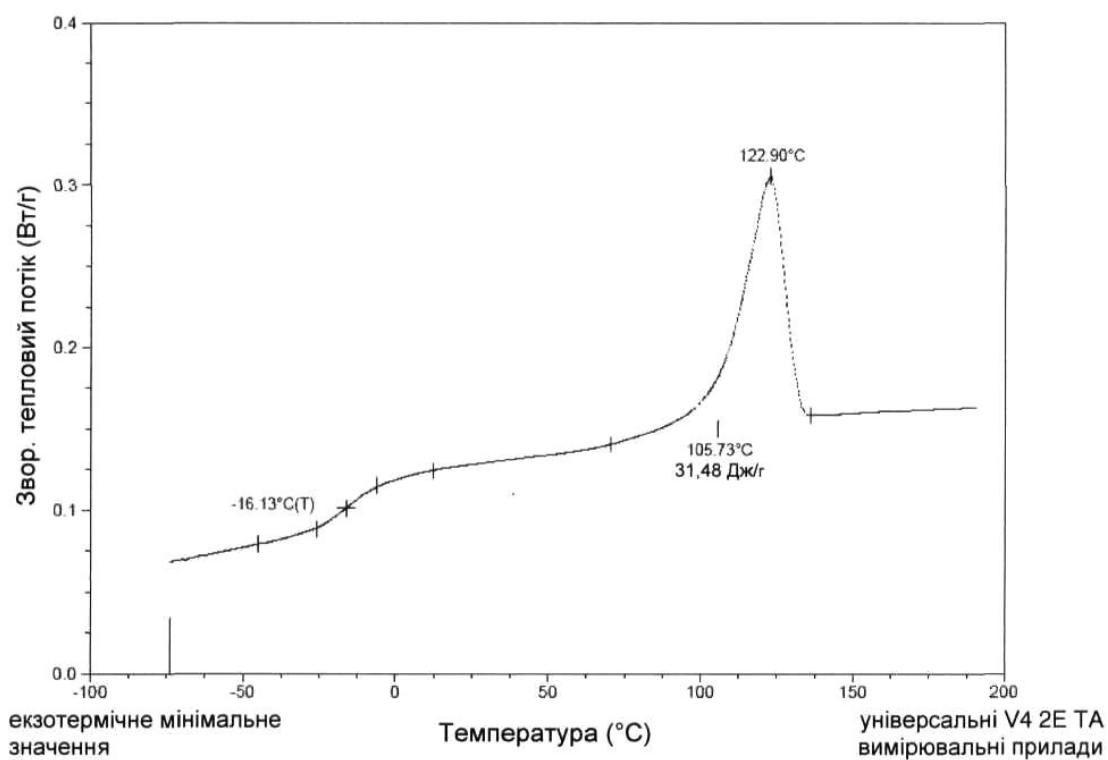
27. Спосіб одержання композиції за будь-яким із пп. 19-21, який включає послідовні стадії

45 а) диспергування біологічно активної сполуки у вигляді твердого порошку в розчині здатного до біорозкладання напівкристалічного термопластичного мультиблокового співполімеру з розділеними фазами за будь-яким із пп. 1-8 в органічному розчиннику, такому як дихлорметан або етилацетат;

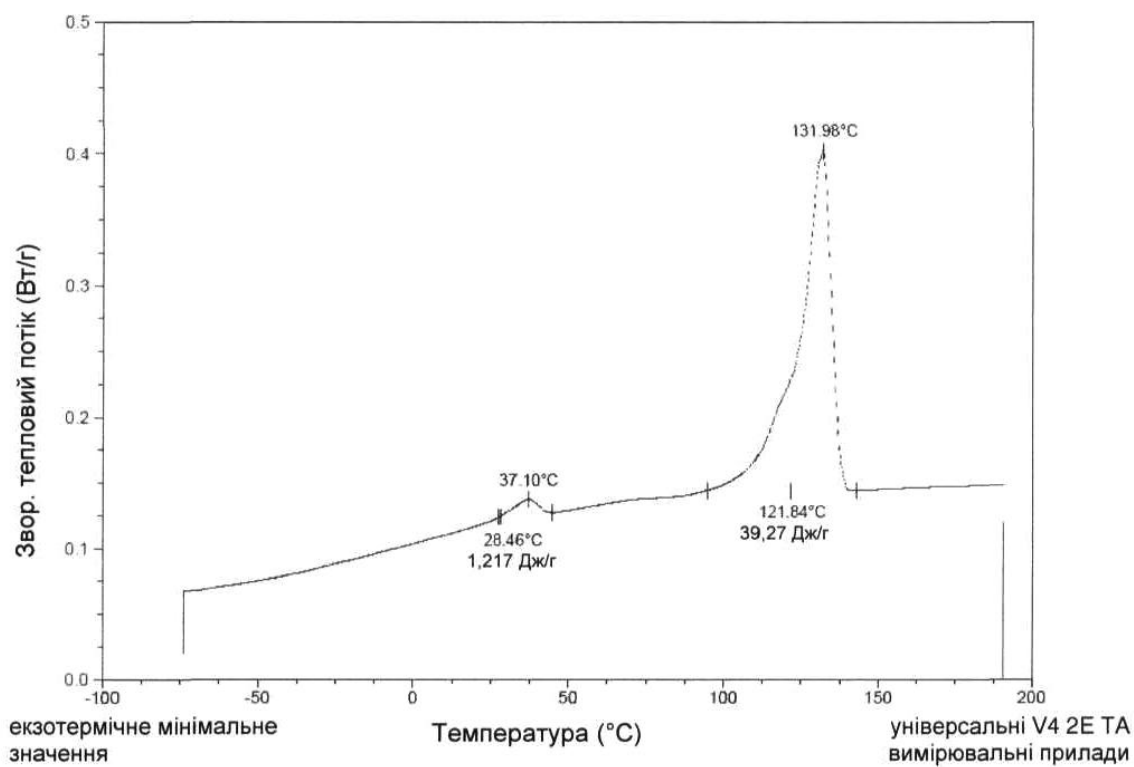
б) додавання полімерного осаджувача, такого як силіконове масло, в емульсію, одержану на стадії а), з одержанням зародкових мікрочастинок; і

50 с) екстракції полімерного осаджувача та органічного розчинника із затвердінням мікросфер.

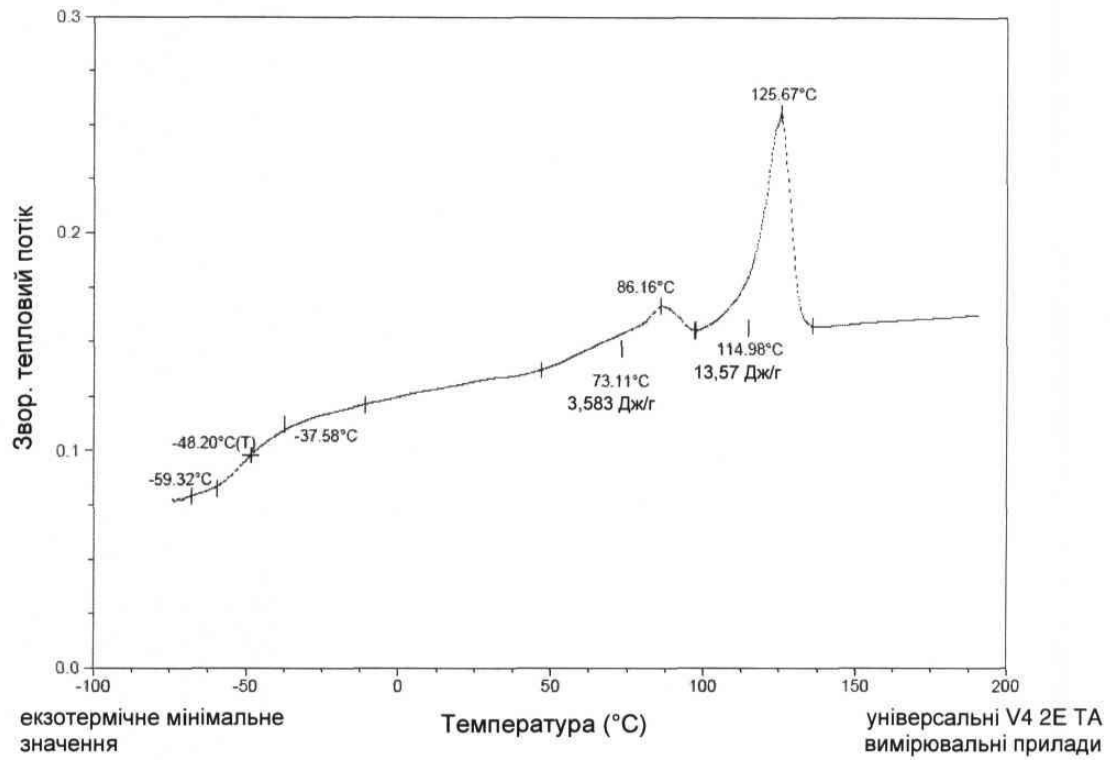
Фігура 1А



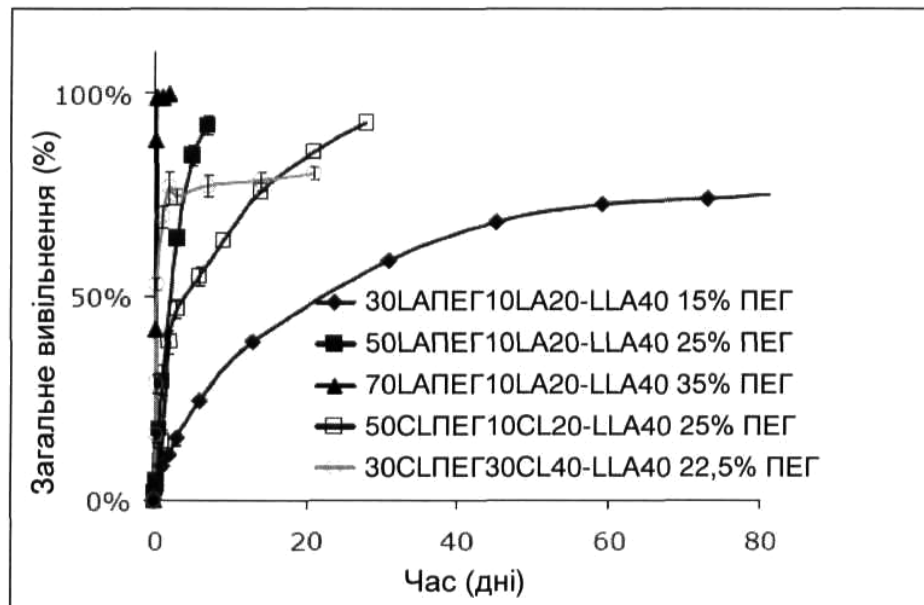
Фігура 1В



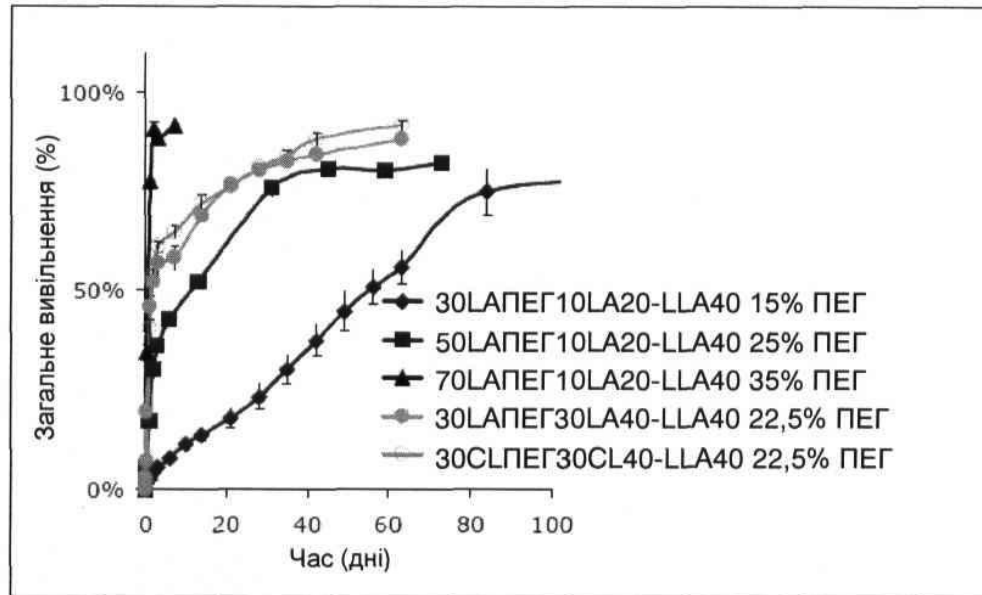
Фігура 1С



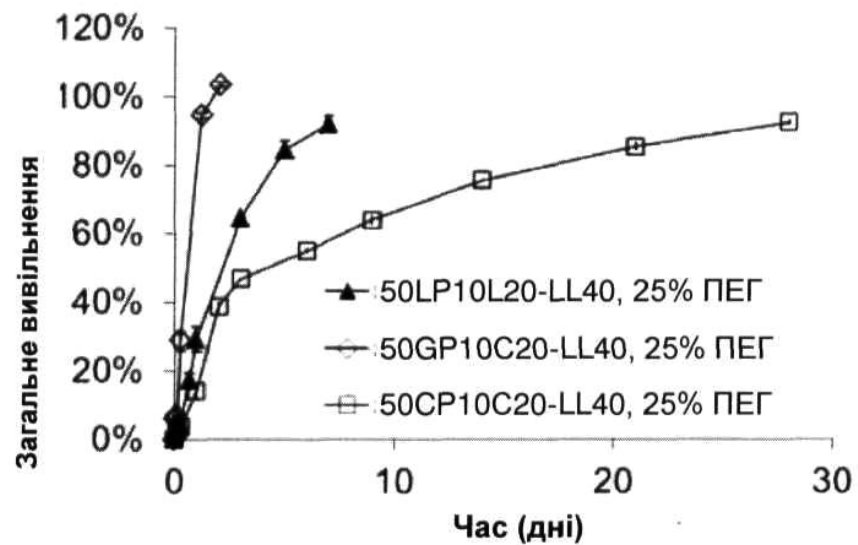
Фігура 2



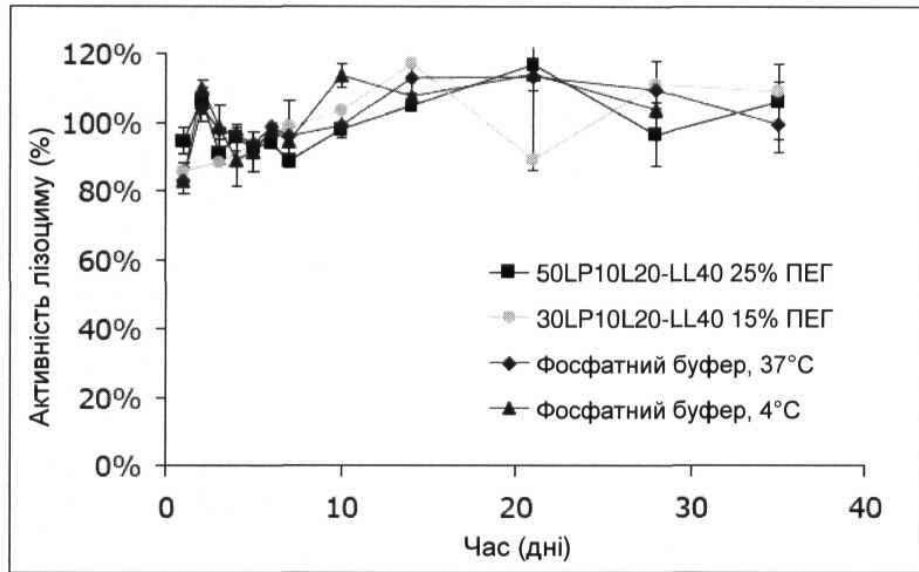
Фігура 3



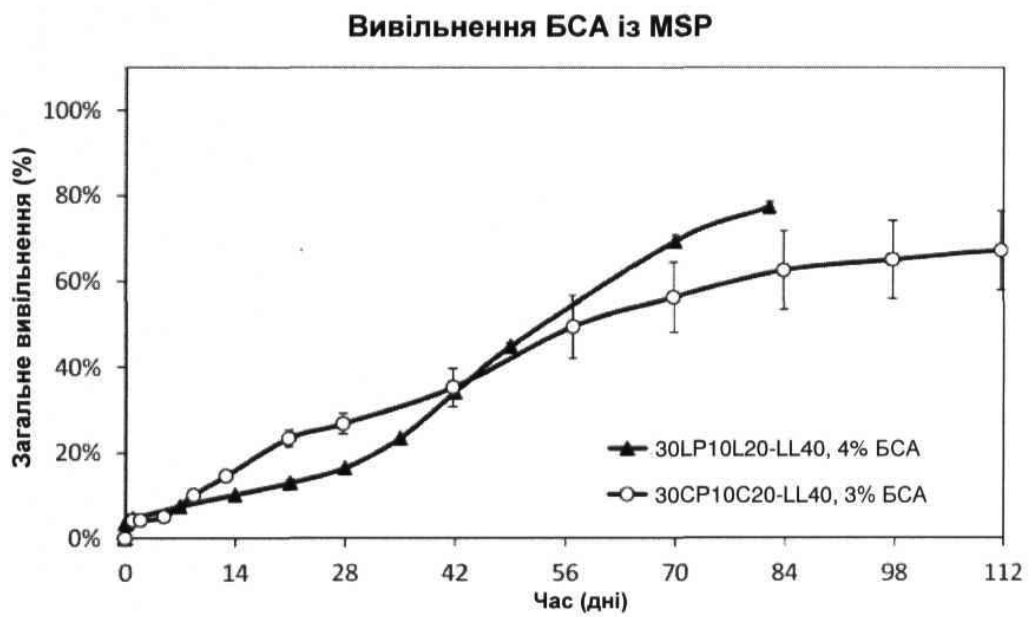
Фігура 4



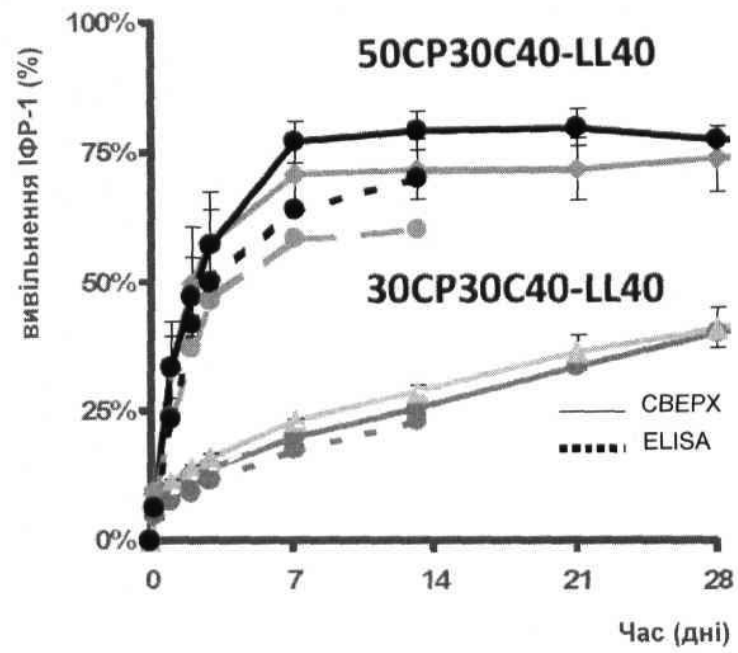
Фігура 5



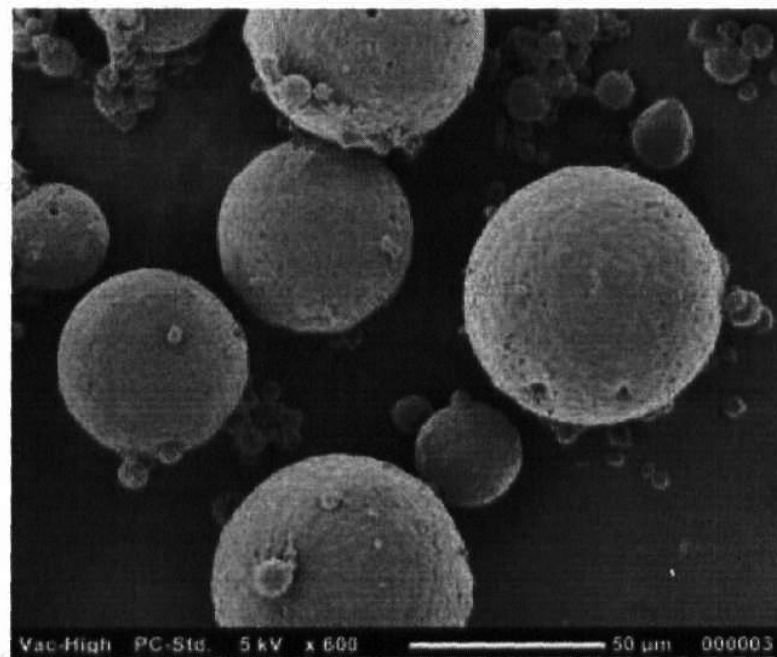
Фігура 6



Фігура 7

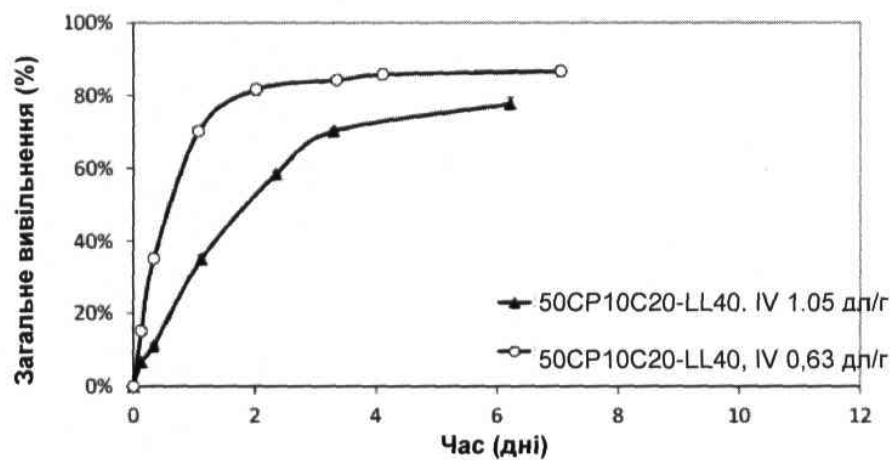


Фігура 8

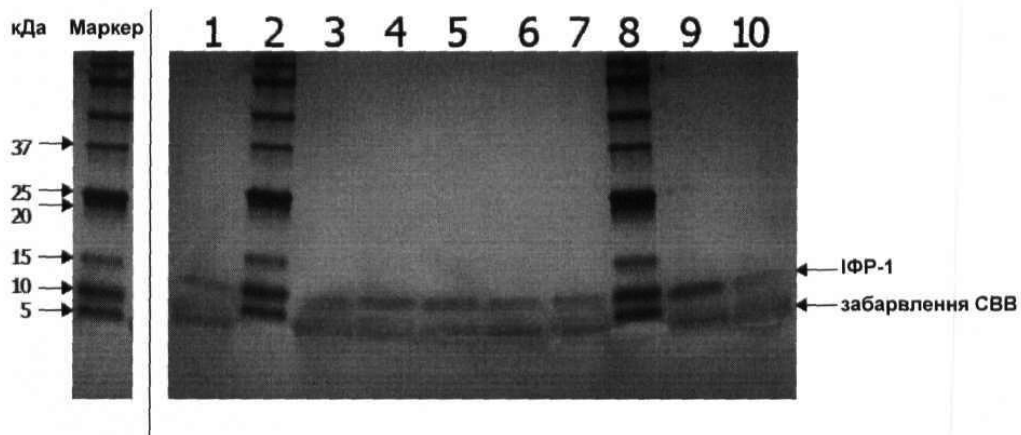


Фігура 9

Загальне вивільнення ІФР-1 із MSP з 0,5% вмістом ІФР-1

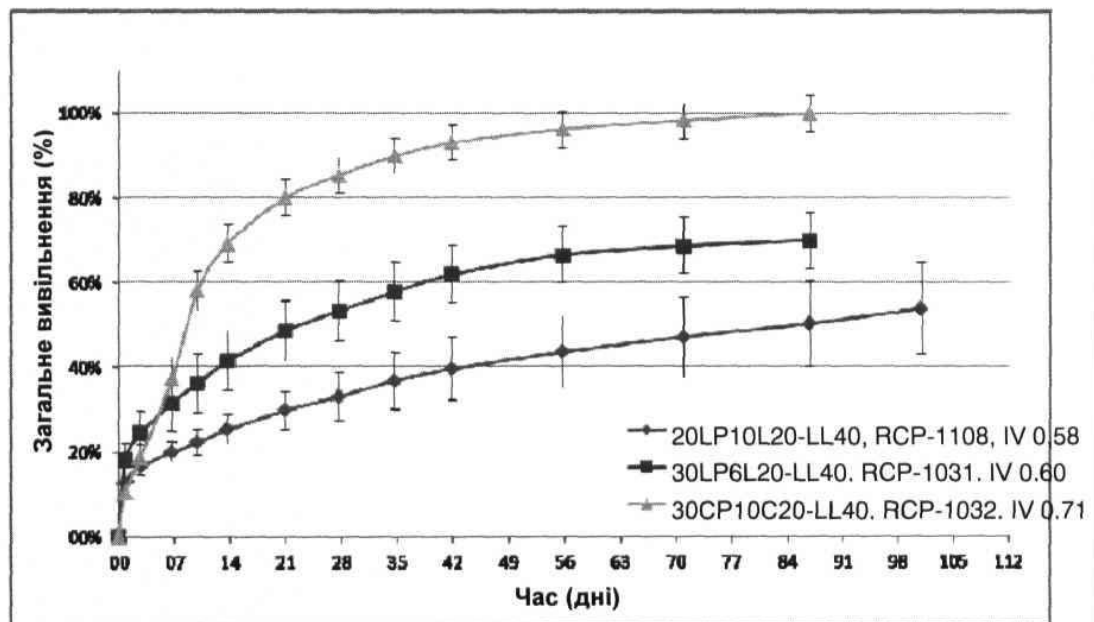


Фігура 10

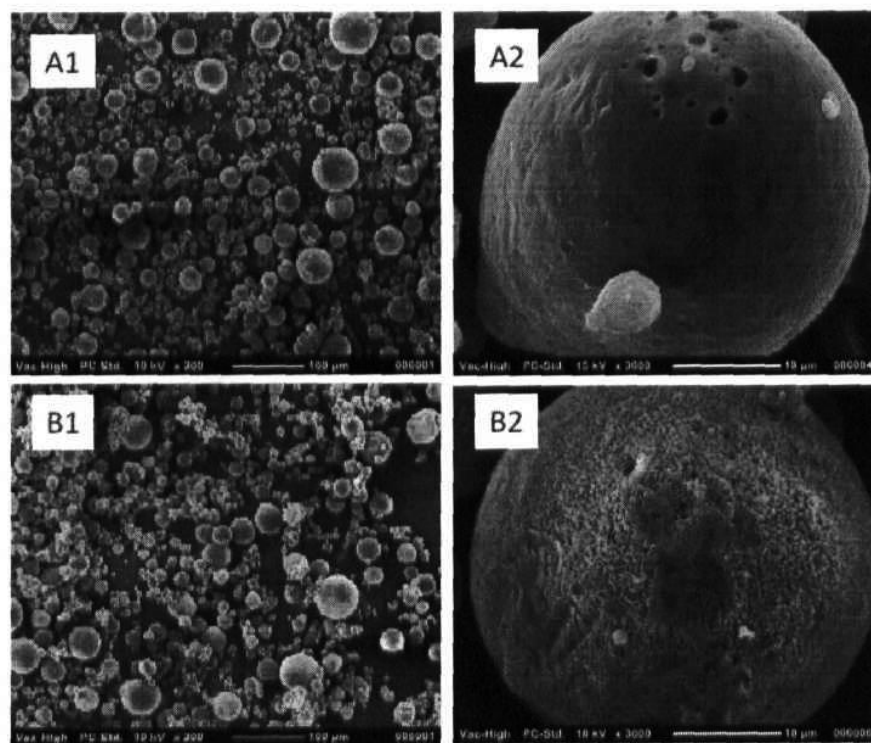


Лінія	Зразок	Лінія	Зразок
1	свіжий ІФР-1	6	УТ, середн., 1 тиждень
2	Маркер	7	УТ, середн., 2 тижні
3	УТ, 1 тиждень	8	Маркер
4	УТ, низ., 1 тиждень	9	УТ, вис., 1 тиждень
5	УТ, низ., 2 тижні	10	ІФР-1 свіжий

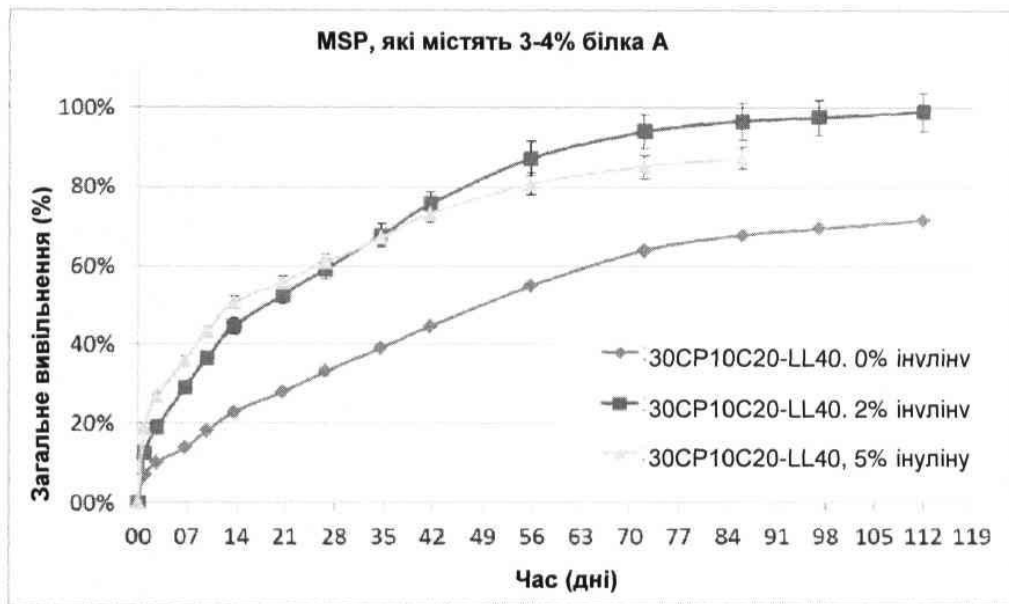
Фігура 11



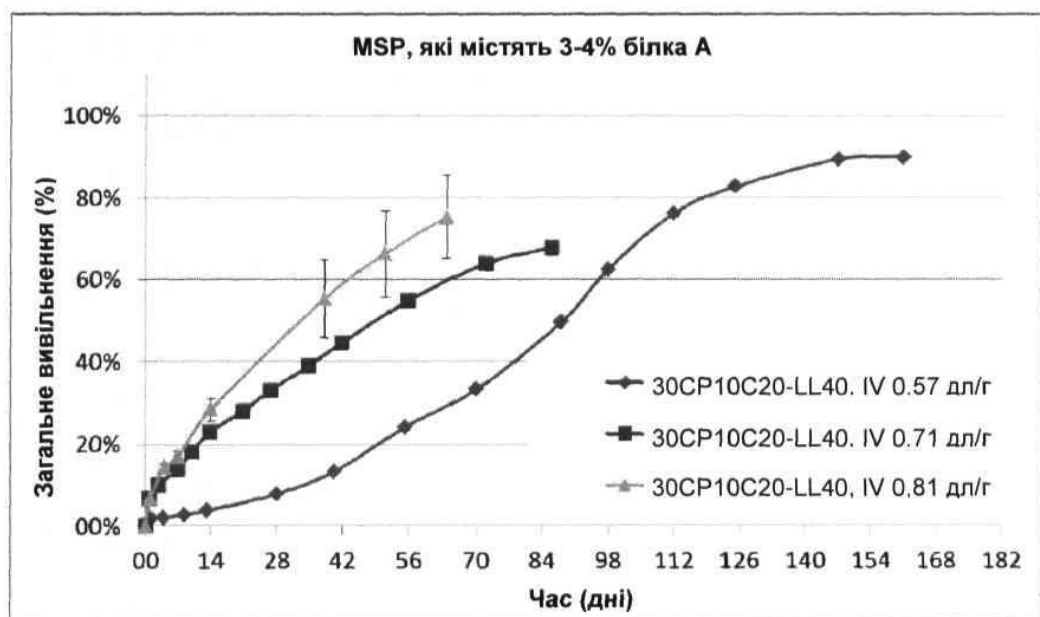
Фігура 12



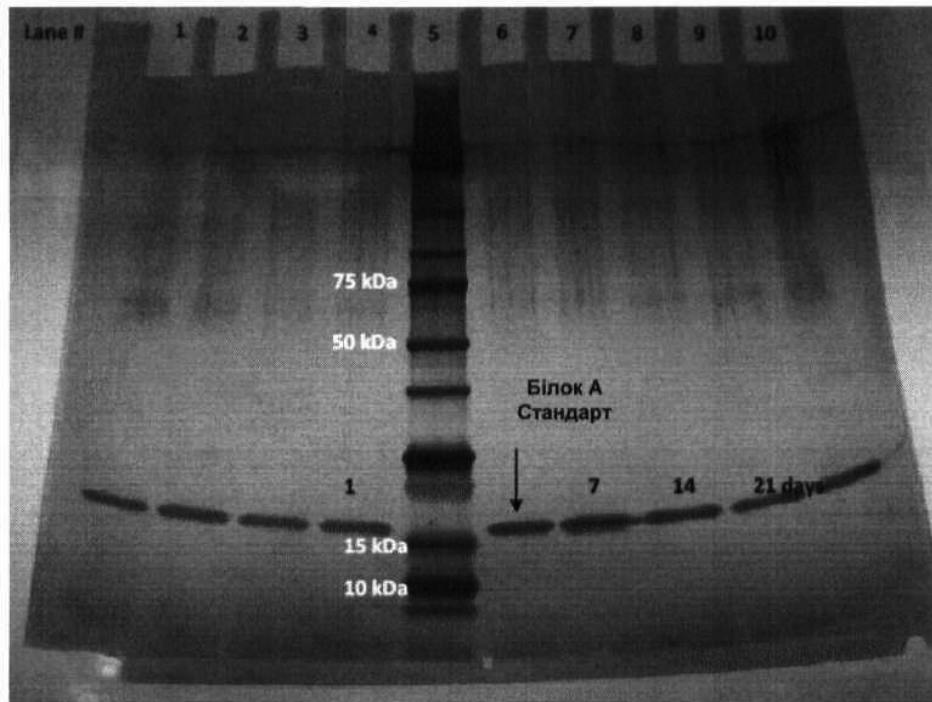
Фігура 13



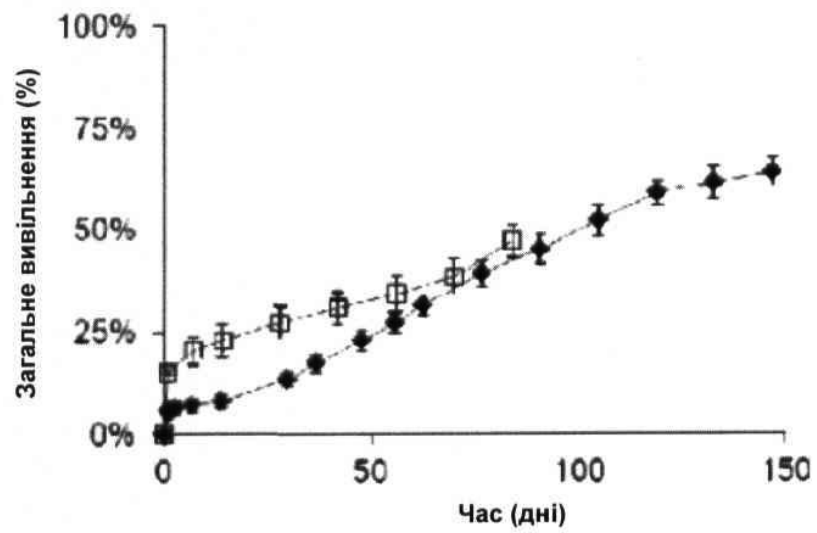
Фігура 14



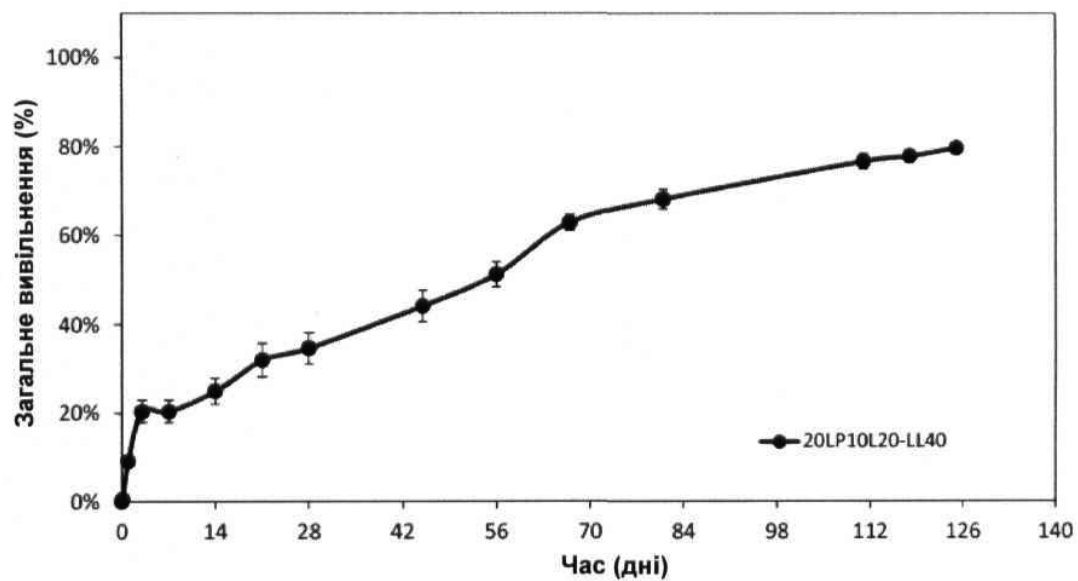
Фігура 15



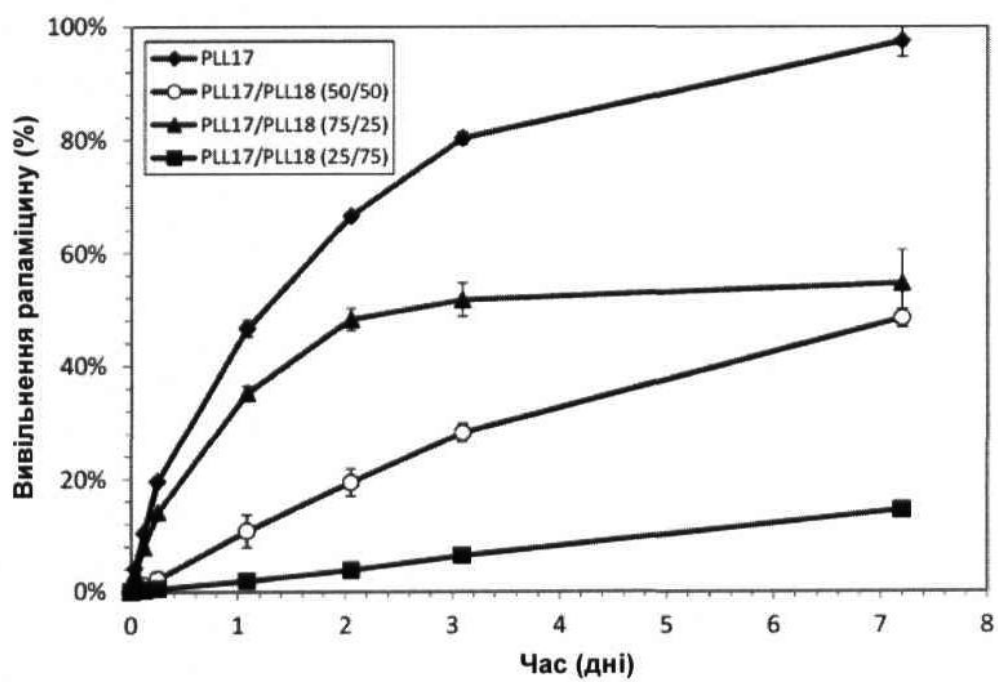
Фігура 16



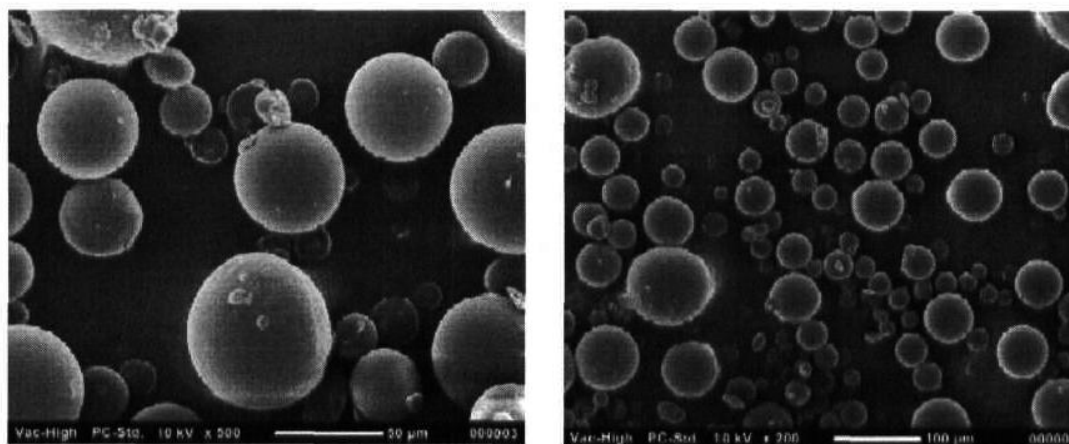
Фігура 17



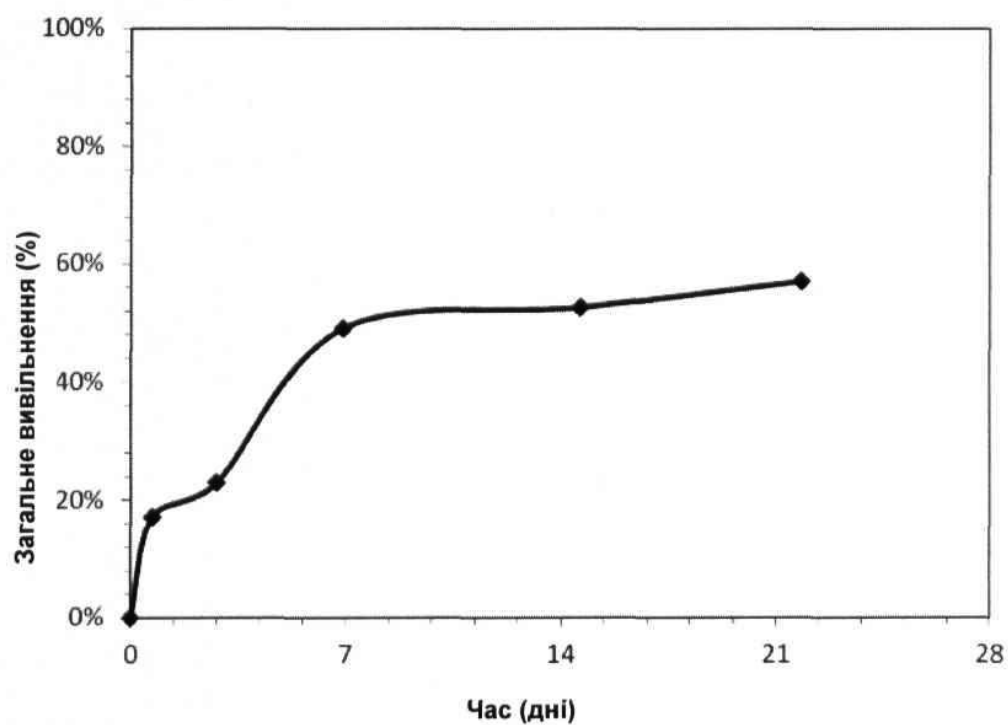
Фігура 18



Фігура 19



Фігура 20



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601