

Цей винахід належить до структур білок : фосфоліпід, які застосовують для стабілізації вторинної та тритинної структур білків, що здатні до переходу у розплавлену сферичну структуру. Зокрема, цей винахід стосується композицій Ф - СКЛ (фактор, стимулюючий колонію зернистого лейкоциту) : фосфоліпід, які мають збільшену стійкість, показують збільшений строк зберігання і здатні до використання у високотемпературних технологіях виготовлення лікарських засобів і як нові наповнювачі.

Було виявлено, що деякі білки мають здатність до переходу у розплавлену сферичну структуру (РСС). Див. Van der Goot, F. G., Nature 354 : 408 - 410 (1991). Білки у розплавленій сферичній структурі виявляють вторинну структуру, яка порівнянна зі структурою природного білка, однак у них відсутня стійка тритинна структура. Див. Pitsyn et. al., FEBS Letters 262 : 1, 20 - 24 (1990). У ряді випадків перехід у розплавлену сферичну структуру супроводжується розкриттям попередньо схованих гідрофобних ділянок білка. Шляхом розкриття критичних гідрофобних залишків РСС може бути посередником при агрегуванні та осадженні білків. Конформацію РСС можна виявити шляхом порівняння кругового дихроїзму у далекій ультрафіолетовій (УФ) ділянці зі спектром ароматичних бокових ланцюгів (круговий дихроїзм у близькій УФ ділянці і флуоресценція). Розплавлена сферична структура виявляє спектральні зміни у ароматичній групі при відсутності змін кругового дихроїзму у далекій УФ - ділянці. Див. Bychkova et. al., FEBS Letters 238 : 231 - 234 (1988) ; Van der Goot F. G., Nature 354 : 408 - 410 (1991).

Фактор, стимулюючий колонію зернистого лейкоциту (Ф - СКЛ), становить собою один з відомих білків, здатних до переходу у РСС перед агрегуванням. Людський рекомбінантний Ф - СКЛ (рлф - СКЛ) селективно стимулює нейрофілі типу білих кров'яних клітин, що використовують для боротьби з інфекцією. За нашого часу рекомбінантний Ф - СКЛ, Filgrastim, має перспективу для застосування у терапевтичних цілях. Структуру Ф - СКЛ при різних умовах інтенсивно досліджували Lu et. al., J. Biol. Chem. Vol. 267 : 8770 - 8777 (1992). Завдяки своїм гідрофобним характеристикам створення композицій, що містять Ф - СКЛ, з поширеним строком зберігання утруднено.

Композиції певних гідрофобних білків гублять активність із-за створення димеру і агрегатів вищого порядку (макродіапазону) при довгостроковому зберіганні. Протягом зберігання також трапляються інші хімічні зміни, наприклад, дезамінування та окиснення. Крім того, композиція, що містить Ф - СКЛ, повинна забезпечити захист проти денатурації і, зокрема, підтримку стійкості вторинної та тритинної структури білка.

Людський ФМ - СКЛ становить собою глікопротеїн з молекулярною вагою 22 кілодальтон (кДа), постійно потрібний для проліферації *in vitro* клітин -попередників макрофагів і зернистих лейкоцитів. Інші біологічні активності можуть включати регуляцію функціональної активності різновидностей зрілих клітин; див. Gough et. al., Nature 309 : 763 - 767 (1984), і збільшення хемотаксису у напрямку визначених хемоатрактантів; див. Williams et. al., Hematology, 4th ed. (1990). ФМ -СКЛ також стимулює виготовлення моноцитів і тому його можна використовувати для терапії моноцитарних розладів, наприклад, моноцитопоетину.

Людський ФМ - СКЛ можна одержувати і очищати із ряду джерел. Процедури виготовлення рекомбінантного людського ФМ - СКЛ первісно було описано Burgess et. al., Blood 69 : 1, 43 : 51 (1987). У патенті США №5 047 504, який у цьому описі є посиланням, наведено спосіб комерційно великомасштабного виготовлення ФМ - СКЛ у неглікозилованій формі, як продукт експресії прокаріотної клітини - хазіяїна.

Фактор росту і розвитку мегакаріоцита (ФРПМ) становить собою нещодавно клонований цитокін, який певно є головним регулятором рівней циркулюючих тромбоцитів. Див. Bartley T. D. et. al., Nature 369 : 565 - 568 (1994); de Sauvage F. J. et. al., Nature 369 : 533 - 538 (1994); Miyazake H. et. al., Exp. Hematol. 22 : 838 (1994); Kuter D. J/ et. al., PNAS USA, 91 : 11104 - 11108 (1994). ФРПМ також має назви тромбопоетін (ТПО), *mpl* - ліганд і мегапоетін. Зрілий людський ФРПМ становить собою білок, який має усього 332 амінокислоти. Відповідна кДНК показана на Фіг.29 цього опису.

Рекомбінантний ФРПМ, виготовлений у клітинах яєчника китайського хом'яка (ЯКХ) і клітинах Е.соїї, показав наявність біологічної активності, яка специфічно стимулює або збільшує кількість мегакаріоцитів і/або тромбоцитів *in vivo* у мишок, пацюків і мавп. Див., наприклад, Hunt P. et al., Blood 84 (10) : 390A (1994). Молекули людського ФРПМ, які відсікнуті таким чином, щоб мати принаймні 151 амінокислоту, починаючи з амінокислоти, розташованої на позиції 1 (фіг.29), залишаються біологічно активними *in vivo*. Також можливо видаляти до перших шести амінокислот на N - кінці білка послідовності людського ФРПМ, причому зазначений ФРПМ утримується біологічно активним. Таким чином, здається, що біологічна активність утримується усередині амінокислот від 7 до 151 (включно) зрілої амінокислотної послідовності людського ФРПМ, показаної на Фіг.29.

Природний ФРПМ становить собою глікозиловану молекулу. Глікозилована структура природного ФРПМ пов'язана з двома ключовими доменами, які знаходяться у ФРПМ. Послідовність першого домену, що складається з перших приблизно 151 амінокислоти людського ФРПМ, відповідного' активній ділянці молекули, має помітну гомологію з еритропоетіном (ЕПО), цитокіном, здатним до стимулювання продукування еритроцитів, і має назву "ЕПО - подібний " домен людського ФРПМ. Решта амінокислот зрілого білка складає так званий домен "N - зв'язаного карбогідрату", оскільки вони включають більшість, а мабуть і усі сайти для N - зв'язаного глікозилювання. У людському ФРПМ є шість N - зв'язаних сайтів глікозилювання, які усі містяться у N - зв'язаному домені глікозилювання. Обидва домени містять у собі O - зв'язані сайти глікозилювання. У молекулі є приблизно 12 - 14 O - зв'язаних ланцюгів глікозилювання. Експерименти з ДНК людського ФРПМ, рекомбінантно експресованого у клітини ЯКХ, свідчать про те, що у ЕПО -подібному домені принаймні два O - зв'язаних сайти на позиціях 1 (Ser) і 37 (Thr) є глікозилованими.

Хоч білки, наприклад Ф - СКЛ і ФРПМ, можуть бути стабілізованими за певних зазначених умов, однак є необхідність збільшити строк зберігання цих та інших білків завдяки стабілізації вторинної і тритинної структури зазначених білків. Одним із шляхів стабілізації білків, який було випробувано у минулому, є використання ліпосом. Ліпосоми становлять собою повністю зачинені ліпідні двошарові мембрани, які утворені водонерозчинними полярними ліпідами, зокрема, фосфоліпідами. Ліпосомні пухирці можуть мати єдиний мембранний подвійний шар (моношарові), або можуть мати багато мембранних подвійних шарів (мультишарові). Подвійний шар складається з двох ліпідних моношарів, які мають гідрофільну (полярну)

"головну" ділянку і гідрофобну (неполярну) "хвостову" ділянку, де гідрофобні хвости орієнтуються у напрямку до центру подвійного шару, тоді як гідрофільні голови орієнтуються у напрямку до водної фази. Стабільність, жорсткість і проникність ліпосом можуть бути змінені шляхом змінювання фосфоліпідного складу за рахунок зміни температури, приєднання стиролу або введення зарядженого амфіфілу. Основна структура ліпосом може бути виконана шляхом різних технологій, відомих у цій галузі.

У процесі свого утворення ліпосоми можуть утягувати водні розчини до водних каналів і виділяти їх з різною інтенсивністю. На основі досліджень було встановлено, що ліпосоми можуть вводити ензими до клітин та змінювати їх метаболізм. (Див. Gregoriadis, New Engl. J. Med. 295 : 704 - 710, 765 - 770 (1976). Ліпосоми були провісниками відповіді на шляху пошуків цілевого доставляння лікарського засобу. У результаті була проведена велика кількість досліджень у фармацевтичній промисловості, включаючи використання ліпосом, як повільно висвободжуючих сховищ для ліків, вітамінів та білків, ізольованих усередині гідрофобних шарів або гідрофобного ядра ліпосом.

Успішне використання ліпосом, як носіїв лікарських засобів, обмежено, оскільки досліджувачи, які спробували провести таке використання, зустріли деякі проблеми. Наприклад, ліпосоми відомі як міцні імунологічні додатки до затриманих антигенів і необхідно додержуватися обережності, коли ензими або інші білки ксеногенного походження затримуються у ліпосомах. Крім того, важко здійснювати контроль за швидкістю дифузії лікарського засобу. Це є функцією властивої нестабільності ліпосом і присутності певних компонентів крові, які прискорюють дифузії деяких ліків. Крім того, завдяки своїй природі деякі речовини погано утягуються до ліпосом і, таким чином, швидко дифундують у кровообіг. Кінець кінцем, існує проблема дослідження будь-яких клітин або органу, крім печені або селезінки. Широкий огляд ліпосом, речовин, які упрощаються у ліпосоми, і проблем, пов'язаних з використанням ліпосом, як носіїв ліків, наведен Gregory Gregoriadis у розділі 14 "Ліпосоми" у книзі "Носії ліків у біології та медицині", с.287 - 341 (Academic Press, N.Y., 1979).

Хоч було багато повідомлень, що стосувалися використання ліпосом як носіїв ліків, але у питанні, яке стосується використання ліпосом для збільшення строку зберігання терапевтичних пептидів або білків шляхом стабілізації структури пептиду і/або білка, нової інформації було небагато. У патенті PCT/US90/05163 за назвою "Терапевтичні пептиди і білки" (Hostetler et al.) описано застосування порожніх ліпосом як фармацевтично прийняттого розчинника для солюбілізації поліпептидів і/або білків з метою запобігання нагромадження поліпептидів і/або білків на поверхні поділу повітря/вода і запобігання адсорбції поліпептидів і/або білків на поверхні контейнера. Hostetler et al. відкрили, що негативно заряджений фосфоліпід може бути додан до приблизно 50 молярних процентів і що фосфатидилхолін, нейтральний фосфоліпід, є переважною ліпосомою. Hostetler et al. не розглядають розчинника, призначеного для стабілізування структури поліпептида і/або білка.

У патенті PCT/US91/07694 (Hung et al.), що має назву "Виготовлення і характеристика ліпосомних композицій фактора некрозу новоутворень" описані молекули ліпофільного модифікованого фактора некрозу новоутворень (ГНН), які зв'язані з поверхнею або інкапсуловані усередині ліпосом. Показано, що молекули ліпосомної ліпофільної ГНН мають підвищену стабільність *in vivo*. Стабільність указує на зменшення або на тенденцію до зменшення здатності ГНН -ліпосоми перепускати ГНН у систему *in vivo*. Найкращими ліпосомами були нейтральні ліпіди. Hung et al. не описують композиції ГНН, де наповнювачі справляють стабілізуючу дію на структуру білка.

У відомих літературних джерелах не можна знайти відомостей, що стосуються контактування білка, наприклад, Ф - СКЛ або ФРРМ з негативно зарядженим ліпідним пухирцем, що таким чином безпосередньо стабілізує білок, забезпечуючи захист проти термічно - індукованого агрегування, денатурації, втрати активності і розгортання вторинної структури. Існує необхідність утворення таких композицій, які забезпечують перевагу у процесі операцій по виготовленню ліків, які потребують високих температур (наприклад, введення Ф - СКЛ і ФРРМ у полімери), а також які можна використовувати як нові наповнювачі для засобів доставки ліків (наприклад, для орального введення пегілованого Ф - СКЛ). Цей винахід забезпечує створення зазначених композицій.

Винахід передбачає додавання до білка гідрофобних середовищ, наприклад, лізофосфоліпідів або інших ліпосом за умовами перебування у розплавленій сферичній структурі, які безпосередньо стабілізують вторинну і третинну структуру білка, захищаючи, таким чином, білок від термічно індукованого агрегування, денатурації і втрати активності. Зокрема, цей винахід спрямовано на утворення стійких композицій Ф - СКЛ : фосфоліпід і ФРРМ : фосфоліпід. Дивовижно, що найкращі композиції Ф - СКЛ : фосфоліпід і ФРРМ : фосфоліпід можуть піддаватися циклічній обробці у діапазоні температур 10 - 95°C з повним відновлюванням вторинної структури білка після охолодження. Зазначені композиції придатні для використання у операціях, що пов'язані з технологією виготовлення ліків, що потребують високих температур, а також для використання як нових наповнювачів для засобів доставки ліків. Крім того, зазначені композиції мають продовжений строк зберігання у порівнянні з чистим білком, а взаємодія білка з пухирцем фосфоліпиду забезпечує відсутність адсорбції білка у скляні пробірки. У переважному варіанті виконання винаходу комплекс білок : фосфоліпід містить негативно заряджену ліпосому, яку вибирають із отаких речовин: діолеїлфосфатидилгліцерин (ДОФГ), диміристоїлфосфатидилгліцерин (ДМФГ), дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (ДПФГ), монтежюфосфатидилгліцерин, діолеїлфосфатидилетаноламін (ДОФЕ), монтежюфосфатидил етанол амін, діолеїлфосфатидилова кислота (ДОФК), диміристоїлфосфатидилова кислота (ДМФК), дипальмітоїлфосфатидилова кислота (ДПФК), діолеїлфосфатидилсерин (ДОФС), диміристоїлфосфатидилсерин (ДМФС), монтежюфосфатидилсерин, лізофосфатидилгліцерин, лізофосфатидилетаноламін, лізофосфатидилсерин. Особливо найкращим є негативно заряджений ненагдований фосфоліпід ДОФГ. Крім того, винахід передбачає підтримування величини рН у діапазоні 3,0 - 7,5 і співвідношення ліпід : білок, що принаймні дорівнює 10 : 1. Додаткові елементи, що забезпечують найкращі варіанти цього винаходу, включають використання хімічно модифікованих білків у комплексі білок : фосфоліпід, а також використання одного або більш отаких елементів: агента, що регулює ізотонічність;

буферного агента і агента, що регулює рН. Спеціалістам у цій галузі зрозуміло, що винахід стосується стійких композицій білок : фосфоліпід, які містять різні комбінації зазначених додаткових елементів.

На Фіг.1 зображено спектр флуоресцентного світіння у присутності рлф - СКЛ (крива 1) та при відсутності (крива 2) пухирців ДОФГ. Концентрація рлф - СКЛ складає 0,2мг/мл. Співвідношення ДОФГ : рлф - СКЛ (крива 1) дорівнює 100 : 1 (моль : моль).

На Фіг.2 показан вплив збільшення співвідношення ліпід : білок на флуоресценцію рлф - СКЛ. F_0 становить собою первісну флуоресценцію (без ліпиду), а F означає флуоресценцію після додавання ліпиду для досягнення наведеного молярного співвідношення ліпід : рлф - СКЛ. На Фіг.2 (а) показано співвідношення F/F_0 (А) і максимальна довжина хвилі світіння (В) для суміші ДОФГ : рлф - СКЛ. На Фіг.2 (в) показано співвідношення F/F_0 (А) і максимальна довжина хвилі світіння (В) для суміші ДОФГ : рлф - СКЛ.

На Фіг.3 показані діаграми Штерна - Вольмера, що стосуються гасіння флуоресценції рлф - СКЛ за допомогою йодиду кальцію (KI) при відсутності (А) та у присутності (В) пухирців ДОФГ. Експерименти по гасінню виконували шляхом додавання аліквот KI до рлф - СКЛ (0,2мг/мл) і ДОФГ : рлф - СКЛ (100 :1, моляр).

На Фіг.4 зображено гасіння флуоресценції триптофану рлф - СКЛ після додавання пірендеканової кислоти. Довжина хвилі світіння дорівнювала 327нм. Співвідношення ДОФГ : рлф - СКЛ дорівнювало 100 : 1 (моляр).

На Фіг.5 зображена діаграма, що показує порівняння змін інтенсивності флуоресценції після додавання ліпиду для рлф - СКЛ при відсутності і у присутності різних ліпідів. У кожному випадку співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 : 1 (моляр).

На Фіг.6 зображена діаграма, що показує порівняння зсувів максимумів світіння для рлф - СКЛ при відсутності та у присутності різних ліпідів. У кожному випадку співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 : 1 (моляр).

На Фіг.7 показан вплив ДМФХ (крива 2), ДМФГ (крива 3), ДМФК (крива 4) на круговий дихроїзм (КД) рлф - СКЛ (крива 1). У кожному випадку співвідношення ліпід : білок дорівнювало 50 :1 (моляр) у воді, рН = 6,0.

На Фіг.8 показан вплив збільшення температури на КД рлф - СКЛ (140 :1, моляр) (крива 2). Концентрація рлф - СКЛ дорівнювала 80мкг/мл у воді, рН = 6,0. Температуру змінювали від 10°C до 90°C при швидкості зміни 100°C у годину.

На Фіг.9 показані термограми диференціального скануючого калориметрування для рлф - СКЛ (крива 1) і ДОФГ : рлф - СКЛ (45 :1, моляр) (крива 2). Концентрація рлф - СКЛ у зразках дорівнювала 1мг/мл (рН = 7,0 у воді). Швидкість сканування дорівнювала 90°C у годину.

На Фіг.10 показан вплив циклічної зміни температури на КД рлф - СКЛ (крива 1) і ДОФГ : рлф - СКЛ (140 : 1, моляр) (крива 2). Зразки швидко нагрівали до температури 95°C та охолоджували до температури 10°C, як це показано стрілками. Концентрація рлф - СКЛ у зразках становила 80мкг/мл, рН = 6,0.

На Фіг.11 показан вплив циклічної зміни температури на КД рлф - СКЛ (крива 1) і ДОФГ : рлф - СКЛ (150 : 1, моляр) (крива 2). Зразки нагрівали до температури 95°C та охолоджували до температури 10°C. Концентрація рлф - СКЛ у зразках становила 80мкг/мл, рН = 6,0.

На Фіг.12 показан вплив циклічної зміни температури на КД рлф - СКЛ (крива 1) і ДОФГ : рлф - СКЛ (150 : 1, моляр) (крива 2). Зразки нагрівали до температури 95°C та охолоджували до температури 10°C. Концентрація рлф - СКЛ у зразках становила 80мкг/мл, рН = 6,0.

На Фіг.13 показана діаграма, що характеризує здатність різних ліпідів стабілізувати рлф - СКЛ протягом процесів заморожування - сушіння. Співвідношення ліпід : білок становило 100 : 1 у кожному випадку. Стабільність ґрунтувалась на затримці *in vitro* активності при аналізі костного мозку. Чистий рлф - СКЛ не зберігається при процесах заморожування - сушіння, таким чином, застосований контрольний зразок становить собою необроблений рлф - СКЛ при відсутності ліпиду.

На Фіг.14 показан вплив різних ліпідів на активність рлф - СКЛ *in vivo*. Активність (згідно з лейкоцитарною формулою крові, ЛФК) вимірювали після внутрішньошкірної ін'єкції, що вводили хом'якам. Доза рлф - СКЛ дорівнювала 100мкг/мл, коли співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 : 1.

На Фіг.15 показан вплив різних ліпідів на активність рлф - СКЛ *in vivo*. Активність (згідно з лейкоцитарною формулою крові, ЛФК) вимірювали після внутрішньошкірної ін'єкції, що вводили хом'якам. Доза рлф - СКЛ дорівнювала 100мкг/мл, коли співвідношення ліпід : білок дорівнювало 50 : 1.

На Фіг.16 зображена діаграма, яка показує результат порівняння зміни інтенсивності F для ЯКХ - Ф - СКЛ при відсутності і у присутності ДОФГ при зміні рН. У кожному випадку співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 : 1 (моляр).

На Фіг.17 наведен графік, що показує порівняння зсувів максимумів світіння для ЯХО - Ф - СКЛ при відсутності і у присутності ДОФГ при зміні рН. У кожному випадку співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 : 1 (моляр).

На Фіг.18 показан вплив циклічної зміни температури на КД ПЕГ(поліетиленгліколь) - Ф - СКЛ () і ДМФГ : ПЕГ - Ф - СКЛ (17 : 1, моляр) (---). Зразки нагрівали до 90°C та охолоджували до 10°C.

На Фіг.19 показано: (а) вплив циклічної зміни температури на КД ФМ - СКЛ у фізіологічному розчині з фосфатним буфером (ФБР), рН = 7,0. ФМ - СКЛ при температурі 10°C () порівнюють з ФМ - СКЛ, який нагрівали до 90°C, а далі охолоджували до 10°C (---); (б) вплив циклічної зміни температури на КД ДПФГ : ПЕГ - Ф - СКЛ (17 : 1, моляр). ДПФГ : ФМ - СКЛ при 10°C () порівнювали з ДПФГ : ФМ - СКЛ, що нагрівали до 90°C, а далі охолоджували до 10°C (---).

На Фіг.20 показано : (а) результати відгуку загальної ЛФК на внутрішньододенальне вливання рлф - СКЛ у присутності та при відсутності ДОФГ. Доза рлф - СКЛ дорівнювала 750мкг/кг при співвідношенні ліпід : білок 100 : 1; (в) результати відгуку загальної ЛФК на внутрішньододенальне вливання ПЕГ - Ф - СКЛ при відсутності та у присутності ДОФГ. Доза ПЕГ - Ф - СКЛ дорівнювала 750мкг/кг при співвідношенні ліпід : білок 100 : 1.

На Фіг.21 показано вплив ДОФГ на рівні сироватки у ПЕГ - Ф - СКЛ після внутрішньододенального насосного вливання. Доза ПЕГ - Ф - СКЛ дорівнювала 750мкг/кг при співвідношенні ліпід : білок 100 : 1.

На Фіг.22 зображено спектр флуоресцентного світіння ФРРМ при відсутності та у присутності пухирців

ДМФГ. Концентрація ФРРМ дорівнювала 0,1мг/мл. ФРРМ становив собою ФРРМ 1 - 163, виділений з клітин *E. coli*. Співвідношення ДМФГ : ФРРМ дорівнювало 100 : 1 (моль : моль).

На Фіг.23 показано вплив збільшення співвідношення ліпід : білок на флуоресценцію ФРРМ. ФРРМ становив собою ФРРМ 1-163, виділений з клітин *E. coli*. Максимальну довжину хвиль світіння для сумішів ДОФГ : ФРРМ при рН 5,0 показано індексом (А), а при рН 7,0 - індексом (В).

На Фіг.24 показані графіки Штерна-Вольмера, що стосуються гасіння флуоресценції ФРРМ за допомогою КІ при відсутності (А) та у присутності (В) пухирців ДОФГ. ФРРМ становив собою ФРРМ 1 - 163, виділений з клітин *E. coli*. Експерименти по гасінню виконували шляхом додавання аліквотних проб КІ до ФРРМ (0,1мг/мл) і ДОФГ : ФРРМ (100 : 1, моляр).

На Фіг.25 показан вплив циклічної зміни температури на КД ФРРМ (А) та ДОФГ : ФРРМ (100 : 1, моляр) (В). ФРРМ становив собою ФРРМ 1 - 163, виділений з клітин *E. coli*. Процент залишкової спіральності відноситься до кількості, виявленій при температурі 10°C після кожного циклу (один цикл означає швидкий нагрів зразків до температури 95°C та їх охолодження до температури 10°C).

На Фіг.26 показана ступінь денатурації ФРРМ (+/- ДМФГ) у присутності сечовини з різною концентрацією та зображено круговий дихроїзм СЕЗ (середня еліптичність залишків) для ФРРМ (А) і ДМФГ : ФРРМ (В), а також максимальне флуоресцентне світіння ФРРМ (С) і ДМФГ : ФРРМ (Д), ФРРМ становить собою ФРРМ 1 - 163, виділений з клітин *E. coli*. Співвідношення ДМФГ : ФРРМ дорівнювало 100 : 1 (моль : моль).

На Фіг.27 дано графічне подання максимуму флуоресцентного світіння для (+/- ДМФГ) і ПЕГ - ФРРМ (+/- ДМФГ). ФРРМ становить собою ФРРМ 1-163, виділений з клітин *E. coli*, а ПЕГ - ФРРМ становить собою монопегілований ФРРМ 1-163, виділений з клітин *E. coli*. Співвідношення ДМФГ : ФРРМ і ДМФГ : ПЕГ -ФРРМ дорівнювало 100 :1 (моль : моль).

На Фіг.28 показана ступінь адсорбції ПЕГ - ФРРМ (+/- ДМФГ) у скляні пробірки при різних концентраціях ПЕГ - ФРРМ. ФРРМ становить собою ФРРМ 1 -163, виділений з клітин *E. coli*, а ПЕГ - ФРРМ становить собою монопегілований ФРРМ 1-163, виділений з клітин *E. coli*. Процент регенерації ПЕГ - ФРРМ (А) і ДМФГ : ПЕГ - ФРРМ (В) був досліджений шляхом підрахунку кількості радіоміченого ФРРМ, регенованого з скляних пробірок після 18 - годинної інкубації при кімнатній температурі.

На Фіг.29 показана послідовність ДНК і амінокислоти людського ФРРМ (SEQ. ID. Nos: 1і 2), включаючи сигнальний пептид (амінокислоти від -21 до -1) і послідовність зрілої амінокислоти (1 - 332).

На Фіг.30 показан приклад відновленого алкілування сайт - специфічного ФРРМ у альфа - аміногрупі N - термінального залишку з використанням монометоксиполіетиленгліколевих альдегідів для одержання істотно монопегілованого продукту.

На Фіг.31 показана активність *in vivo* ДМФГ : ФРРМ і ДМФГ : ПЕГ - ФРРМ у нормальних мишок, виходячи із підрахувань тромбоцитів. ФРРМ становить собою ФРРМ 1 - 163, виділений з клітин *E. coli*, а ПЕГ - ФРРМ становить собою монопегілований ФРРМ 1 - 163, виділений з клітин *E. coli*. Доза ДМФГ : ФРРМ і ДМФГ : ПЕГ - ФРРМ дорівнювала 100мкг/кг і 300мкг/кг, а співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 :1.

Композиції згідно з даним винаходом більш детально описано у нижче наведеному розгляді і проілюстровано прикладами, які теж наведені нижче. Зазначені приклади показують різні аспекти цього винаходу і включають результати випробування стійкості та біологічної активності різних композицій білок : фосфоліпід. Несподівано, взаємодія білків з пухирцем ліпідів безпосередньо стабілізувала білкову структуру, стабілізуючи, таким чином, білок навіть за умовами, які викликають денатурацію білка при відсутності ліпідів.

Оральне введення хімічно модифікованої композиції Ф - СКЛ : фосфоліпід також наведено у цьому описі, використовуючи Ф - СКЛ (як це описано вище), до якого прикріплені молекули поліетиленгліколю.

Для використання у цьому винаході призначені різні білки, що здатні до переходу у розплавлену сферичну структуру. Прикладами зазначених білків є цикотіні, включаючи різні гематопоетинові фактори, наприклад, раніш наведені Ф -СКЛ, ФМ - СКЛ, ФРРМ, М - СКЛ, інтерферони (альфа, бета, гамма), інтерлейкіни (1 - 11), еритропоетин (ЕПО), фактор росту нерва, фактор росту фібробласту, фактор стовбурових клітин, BDNF, NT3, фактор росту виділених тромбоцитів і фактор росту новоутворювань (альфа, бета). Інші білки можуть бути оцінені по їх здатності до переходу у РСС. Якщо білок, про який іде мова, має здатність до переходу у РСС, тоді він далі може контактувати з негативно зарядженим пухирцем ліпосоми і можна оцінювати ефект стабілізування.

У загальному випадку Ф - СКЛ, що є придатним для використання у цьому винаході, може бути природного походження, виділеним у чистому виді із організмів ссавців або, у протилежному випадку, бути продуктом процесів хімічного синтезування або експресії екзогенних послідовностей ДНК прокаріотного або еукаріотного реципієнта, одержаних шляхом клонування геномної ДНК, або кДНК, або синтезу гена. Придатними прокаріотними реципієнтами є різні бактеріальні клітини (наприклад, *E. coli*). Придатними еукаріотними реципієнтами є дріжджі (наприклад, *S. cerevisiae*) і клітини ссавців (наприклад, яєчника китайського хом'яка, мавпи). У залежності від застосованого реципієнта продукт експресії ФМ - СКЛ може бути глікозилованим за допомогою ссавцевих або інших еукаріотних карбогідратів, або може бути неглікозилованим. У цьому винаході передбачено використання будь - якої або усіх отаких відів Ф - СКЛ, хоч найкращою формою за причинами найбільш комерційної придатності є рекомбінантний ФМ - СКЛ, особливо виділений із *E. coli*.

Щоб Ф - СКЛ був хімічно модифікованим для використання в інтересах цього винаходу, він може бути природним людським Ф - СКЛ (плф - СКЛ) або продуктом придатка рекомбінантної нуклеїнової кислоти, наприклад, експресії прокаріотних або еукаріотних клітин - хазяїв. У загальному випадку передбачена хімічна модифікація становить собою прикріплення хімічної складової частини до самої молекули Ф - СКЛ. Стосовно до цього питання є огляд у статті Френкіса (Frencis, "Focus on Growth Factors", 3 : 4 - 10 (May 1992) (Mediscript, Mountview Court, Friern Barnet Lane, London, №20 OLD, UK), у якій описано модифікацію білка і злиті білки. Також, наприклад, див. патент ЄПВ №0 401 384, який має назву "Хімічно модифікований фактор, стимулюючий колонію зернистого лейкоциту", у якому наведені речовини і способи одержання Ф - СКЛ, до якого прикріплені молекули поліетиленгліколю. Зазначене прикріплення може бути виконаним завдяки зв'язку

безпосередньо з білком або з його складовою частиною, що діє як міст до активного агента. Для прикріплення найбільш стійким є ковалентний зв'язок. Хімічна модифікація може приймати участь у регулюючому, підтримуючому або розширюючому впливі Ф - СКЛ. Вона може, наприклад, впливати на регулювання кількості часу, що потрібен хімічно модифікованому Ф - СКЛ для досягнення кровообігу. Прикладом хімічного модифікатора є композиції поліетиленгліколю, включаючи його похідні.

Придатними для застосування у цьому винаході є будь-які препарати хімічно модифікованого Ф - СКЛ, які дозволяють збільшувати ефективність його введення. Ефективність може бути визначена способами, відомими спеціалістам у цій галузі. Найкращими є пегіловані Ф - СКЛ, особливо пегіловані Ф - СКЛ, виділені із клітин *E. coli*, особливо найкращими є тритетрапегіловані Ф - СКЛ, виділені із *E. coli*.

Було повідомлено, що Ф - СКЛ є найбільш стійкими у кислому середовищі, незважаючи на той факт, що у діапазоні рН 2. % - 5,0 відбувається структурна зміна, яка має наслідком послаблення тритинної структури і збільшення вмісту альфа - спіралі. Див. Northi et al., J. Protein Chem. 10 : 359 - 367 (1991). Зазначена структурна зміна характерна для розплавленої сферичної структури (PCC). Таким чином, як і у випадку створення композицій з іншими білками, здатними до переходу у PCC, створення композицій з Ф - СКЛ повинно передбачати захист від термічно індукованого розгортання вторинної та тритинної структури з метою уникнення агрегування та денатурації.

ФМ - СКЛ, який є придатним для використання у цьому винаході, може бути природного походження, виділеним у чистому виді із організмів ссавців або бути продуктом експресії екзогенних послідовностей ДНК прокаріотного або еукаріотного реципієнтів, одержаних шляхом клонування геномної ДНК, або кДНК, або синтезу гена. Придатними прокаріотними реципієнтами є різні бактеріальні клітини (наприклад, *E. coli*). Придатними еукаріотними реципієнтами є дріжджі (наприклад, *S. cerevisiae*) і клітини ссавців (наприклад, яєчника китайського хом'яка, мавпи). У залежності від застосованого реципієнта продукт експресії Ф - СКЛ може бути глікозилованим за допомогою ссавцевих або інших еукаріотних карбогідратів, або може бути неглікозилованим. У цьому винаході передбачено використання будь - якої або усіх отаких видів Ф - СКЛ, хоч найкращою формою за причинами найбільш комерційної придатності є рекомбінантний Ф - СКЛ, особливо виділений із *E. coli*.

Термін "ФРРМ", що використовують у цьому описі, означає природний ФРРМ, усикання природного ФРРМ, а також неприродні поліпептиди, які мають амінокислотну послідовність та гліколізацію, що є достатньо ідентичними природному ФРРМ, що дозволяє мати біологічну активність, яка специфічно стимулює ріст, розвиток і/або вироблення мегакаріоцитів і/або тромбоцитів.

У найкращому варіанті ФРРМ є продуктом експресії послідовності екзогенної ДНК, яка трансфектована у еукаріотну або прокаріотну клітину -хазяїн; тобто, у найкращому варіанті ФРРМ становить собою "рекомбінантний ФРРМ". Найкращим еукаріотним хазяїном є клітини ссавців, особливо клітин ЯКХ, а найкращим прокаріотним хазяїном є бактерії, особливо *E. coli*. Рекомбінантний ФРРМ головним чином виготовляють згідно з операціями, які наведені у цьому описі і у публікаціях, цитуємих у цьому описі, що стосуються клонування і експресії ФРРМ.

Молекули деяких додаткових кращик ФРРМ мають отаки амінокислотні послідовності, які наведені на Фіг.29:

ФРРМ 1-332 амінокислоти 1 - 332 на Фіг.29

ФРРМ 1-191 амінокислоти 1 - 191 на Фіг.29

ФРРМ 1-183 амінокислоти 1 - 183 на Фіг.29

ФРРМ 1-174 амінокислоти 1 - 174 на Фіг.29

ФРРМ 1-163 амінокислоти 1 - 163 на Фіг.29

ФРРМ 1-153 амінокислоти 1 - 153 на Фіг.29

ФРРМ 1-152 амінокислоти 1 - 152 на Фіг.29

ФРРМ 1-151 амінокислоти 1 - 151 на Фіг.29

ФРРМ 1-332 амінокислоти 1 - 332 на Фіг.29

ФРРМ 1-191 амінокислоти 1 - 191 на Фіг.29

ФРРМ 1-183 амінокислоти 1 - 183 на Фіг.29

ФРРМ 1-174 амінокислоти 1 - 174 на Фіг.29

ФРРМ 1-163 амінокислоти 1 - 163 на Фіг.29

ФРРМ 1-153 амінокислоти 1 - 153 на Фіг.29

ФРРМ 1-152 амінокислоти 1 - 152 на Фіг.29

ФРРМ 1-151 амінокислоти 1 - 151 на Фіг.29

У кожному із вищенаведених випадків на кінці послідовностей можуть бути включені амінокислоти Met - Lys.

У цьому винаході також передбачено використання різних аналогів ФРРМ. У значенні, яке використовують у цьому описі, термін "аналог ФРРМ" відноситься до ФРРМ з однією або більше зміною у амінокислотній послідовності ФРРМ, що спричиняє зміну у типі (N - або O - зв'язок), кількості або розташуванні сайтів для прикріплення вуглеводу. Аналог(и) ФРРМ стримує(ють) принаймні еквівалентну біологічну активність порівняно з послідовністю природної ФРРМ (наприклад, ФРРМ людини) і може мати істотно більшу активність, як це було виміряно в аналізах на біологічну активність. Одержані у результаті аналоги ФРРМ можуть мати менше або більше (найкраще більше) вуглеводних ланцюгів, ніж природні людські/рекомбінантні ФРРМ.

До аналогів, які використовують у цьому винаході, також включено аналоги, які мають одну або більше амінокислот, що відходять від карбоксикінця поліпептиду ФРРМ, де на протяжності карбоксикінця передбачено принаймні один додатковий вуглеводний сайт. Карбоксикінець поліпептиду ФРРМ змінюється залежно від певної форми використаного ФРРМ (наприклад, амінокислот ФРРМ 1 -132 або амінокислот ФРРМ 1 - 163). Додатковий вуглеводний сайт може бути додано до карбоксикінця поліпептиду будь-якого типу ФРРМ шляхом додання амінокислот до карбоксикінця поліпептиду, наприклад, амінокислот, які містять один або

більше N - або O - зв'язаних сайтів глікозилювання.

У цьому винаході також знайшли широке використання композиції на основі хімічно модифікованого ФРРМ. Взагалі, передбачена хімічна модифікація становить собою продукт ФРРМ, у якому зазначений білок ФРРМ зв'язан з принаймні однією молекулою поліетиленгліколю (тобто пегілованим ФРРМ). Пегілювання ФРРМ може бути виконано за допомогою будь-якої із відомих у цій галузі реакції пегілювання. Див., наприклад : Focus of Growth Factors 3(2) : 4 - 10 (1992); патенти ЄПВ №0 154 316 та 0 401 384; та інші публікації, які наведені у цьому описі і які стосуються пегілювання. Переважно пегілювання виконують шляхом реакції ацилювання або алкілювання з молекулою реакційноздатного поліетиленгліколю або аналогічного реакційноздатного водорозчинного полімеру.

Пегілювання за допомогою ацилювання у загальному випадку включає реакцію активного ефірного деривату поліетиленгліколю (ПЕГ) з білком ФРРМ. Для здійснення пегілювання ФРРМ можуть бути використані будь-які відомі або знайдені нещодавно молекули реакційноздатного ПЕГ. Найкращим ефіром активованого ПЕГ є ПЕГ, який етерифікован до N - гідроксисукциніміду ("N - ГС"). У значенні, що використовують у цьому описі, термін "ацилювання" передбачає включення без обмеження отаких типів зв'язків між ФРРМ і водорозчинним полімером, наприклад, ПЕГ : амід, карбамат, уретан та інші типи зв'язків. Див. Bioconjugate Chem. 5: 133 -140 (1994). Умови проведення реакції можна вибирати із будь-яких відомих у техніці пегілювання або із нещодавно відкритих, але необхідно уникати умови, наприклад, температуру, тип розчинника, рН, які можуть інактувати типи ФРРМ, що підлягають модифікації.

Пегілювання за допомогою ацилювання у загальному випадку спричиняє одержання продукту поліпегілованого ФРРМ, де лізинові епсилон - аміногрупи пегілюють через ацилозв'язуючу групу. Найкращим сполучним зв'язком є амідний зв'язок. Також найкращим є те, щоб одержаний продукт був істотно тільки (наприклад, дорівнював або перевищував 95%) моно -, ди - або трипегілованим. Проте, деякі типи, що мають більш високий рівень пегілювання (до максимального числа лізинових епсилон-амінокислотних груп ФРРМ + одна альфа-аміногрупа НБ амінокінці ФРРМ), звичайно формуються у кількості, яка залежить від використання специфічних умов реакції. При бажанні із суміші можна виділити більш очищен пегіловані зразки, зокрема зразки, що не прореагували, за допомогою стандартних способів очищення, включаючи серед інших діаліз, знесолювання ультрафільтрування, іоннообмінну хроматографію, гель - фільтрування електрофорез.

Пегілювання за допомогою алкілювання у загальному випадку включає реакцію кінцевого альдегідного деривату ПЕГ з білком, наприклад ФРРМ, у присутності відновника. Пегілювання за допомогою алкілювання може також привести до одержання поліпегілованого ФРРМ. Крім того, можливо маніпулювати умовами реакції, як це наведено у цьому описі, для сприяння пегілюванню головним чином, тільки у альфа- аміногрупі N - кінця зразків ФРРМ (інакше кажучи, монопегілованих зразків). Ілюстративна реакція відновлювального алкілювання ФРРМ для одержання монопегілованого продукту показана на Фіг.30, У будь - якому випадку монопегілювання або поліпегілювання групи ПЕГ переважно прикріплюються до білка через групу $-CH_2-NH-$. Відносно групи $-CH_2-$ можна сказати, що у значенні, яке використовується у цьому описі, такий тип зв'язку має назву "алкільного".

Дериватизування через відновлювальне алкілювання для одержання монопегілованого продукту використовує диференційну реакційну здатність різних типів первісних аміногруп (лізін відносно N-кінця), які придатні для дериватизування у ФРРМ. Зазначену реакцію виконують при величині рН (див, нижче), що дозволяє скористатися різницями у значенні величини pK_a між епсилон - аміногрупами лізинових залишків і pK_a у альфа - аміногрупі N- кінцевого залишку білка. Завдяки подібному селективному дериватизуванню регулюється прикріплення водорозчинного полімеру, який містить реакційноздатну групу, наприклад альдегід, до білка : з'єднання з полімером має місце, головним чином, на N - кінці білка і не відбувається істотна модифікація інших реакційноздатних груп, наприклад, аміногруп з лізиновим боковим ланцюгом.

Таким чином, у переважному аспекті цей винахід належить до пегілованих ФРРМ, де ПЕГ - група(и) прикріплюється через ацилову або алкільну групи. Як показано вище, зазначені продукти можуть бути монопегілованими або поліпегілованими (наприклад, що містять 2 - 6, найкраще 2-5 груп). У загальному випадку, ПЕГ - групи прикріплюються до білка у альфа - або епсилон - групах амінокислот, але також передбачено, що ПЕГ - групи можуть бути прикріпленими до будь-якої аміногрупи, яка, у свою чергу, прикріплена до білка, який є істотно реакційноздатним, щоб бути прикріпленим до ПЕГ - групи при придатних умовах реакції.

Молекули полімеру, що використовують як при ацилюванні, так і при алкілюванні, можуть бути вибрані серед водорозчинних полімерів або їх суміші. Вибраний полімер повинен бути водорозчинним так, щоб білок, до якого він прикріплюється, не осаджувався у водному середовищі, наприклад у фізіологічному розчині. Вибраний полімер повинен бути модифікованим таким чином, щоб мати одну реакційноздатну групу, наприклад активний ефір для ацилювання або альдегід для алкілювання. Найкраще, щоб ступінь полімерізації можна було регулювати, як це передбачено у існуючих способах. Найкращий реакційноздатний ПЕГ - альдегід становить собою поліетиленгліколь пропіональдегід, який є водорозчинним, або його моно - ($C1 - C10$) алкокси або арилокси похідні (див. патент США №5 252 714). Зазначений полімер може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Найкраще, щоб для терапевтичного використання препарату кінцевого продукту полімер був фармацевтично придатним. Водорозчинний полімер може бути вибран із групи, що містить, наприклад поліетиленгліколь, монометоксиполіетиленгліколь, декстран, полі(N-вініл пірролідон) поліетиленгліколь, гомополімери поліетиленгліколю, кополімер оксид поліпропілену/оксид етилену, поліоксиетиловані полііоли (наприклад, гліцерин) і полівініловий спирт. Для здійснення реакції ацилювання вибраний полімер(и) повинен мати одну реакційноздатну ефірну групу. Для даного відновлювального алкілювання вибраний полімер(и) повинен мати одну реакційноздатну альдегідну групу. У загальному випадку, водорозчинний полімер не вибирають із природних глікозильних залишків, оскільки їх звичайно одержують більш зручно за допомогою систем рекомбінантної експресії ссавців. Полімер може мати будь-яку молекулярну вагу і може бути розгалуженим або нерозгалуженим.

Особливо кращим водорозчинним полімером для використання у цьому винаході є поліетиленгліколь

(скорочено ПЕГ). У значенні, яке використовується у цьому описі, термін поліетиленгліколь включає будь-які форми ПЕГ, що застосовують для дериватизування інших білків. Наприклад, моно - (C1 – C10) алкокси - або арилокси- поліетиленгліколь. Способи виготовлення пегілованого ФРРМ звичайно включають етапи (а) реагування поліпептиду ФРРМ з поліетиленгліколем (наприклад, з реакційноздатним ефіром або альдегідною похідною ПЕГ) за умовами, при яких ФРРМ прикріплюється до однієї або більше груп ПЕГ, і (б) одержання продукту(ів) реакції. У загальному випадку, оптимальні умови здійснення реакції ацилування визначають у залежності від конкретного випадку на основі відомих параметрів і бажаного результату. Наприклад, чим більше співвідношення ПЕГ : білок, тим більше процентний вміст поліпегілованого продукту.

Другим важливим параметром, який приймається до уваги, є молекулярна вага полімеру. Звичайно, чим вище молекулярна вага полімеру, тим менше кількість молекул полімеру, які можуть бути прикріплені до білка. Таким же чином, відгалуження полімеру необхідно урахувати при оптимізації зазначених параметрів. Звичайно, чим вище молекулярна вага (або більше бокових ланцюгів), тим більше співвідношення полімер : білок. У загальному випадку, для здійснення передбачених у цьому винаході реакцій пегілування найкраща середня молекулярна вага складає від приблизно 2кДа до приблизно 100кДа (термін "приблизно" означає +/- 1кДа). Найкраща середня молекулярна вага складає від приблизно 5кДа до приблизно 50кДа, особливо найкраща від приблизно 12кДа до приблизно 25кДа і найбільш найкраща - 20кДа. Співвідношення водорозчинного полімеру і білка ФРРМ звичайно знаходиться у діапазоні від 1 : 1 до 100 : 1, найкраще (для поліпегілування) у діапазоні від 1 : 1 до 20 : 1 (для монопегілування) у діапазоні від 1 : 1 до 5 : 1.

Використовуючи зазначені вище умови, відновлювальне алкілування забезпечує селективне прикріплення полімеру до будь-якого білка ФРРМ, що має альфа-аміно групу на амінокінці, та забезпечує істотно гомогенне одержання кон'югату монополімер/білок ФРРМ. Термін "кон'югат монополімер/білок ФРРМ" використовується у цьому описі для позначення композиції, що складається із однієї молекули полімеру, яка прикріплена до молекули білка ФРРМ. Кон'югат монополімер/білок ФРРМ найкраще має молекулу полімеру, що розташована на N - кінці, але не на лізін аміно бокових групах. Найкраще, щоб препарат становив собою більше, ніж на 90% кон'югат монополімер/білок ФРРМ, і особливо найкраще - більше, ніж на 95% кон'югат монополімер/білок ФРРМ, причому залишок молекул, які розглядають, не вступили до реакції (тобто, білок, якому бракує частини полімеру). Нижченаведені приклади забезпечують одержання препарату, який становить собою принаймні приблизно на 90% кон'югат монополімер/білок і приблизно на 10% білок, який не вступив у реакцію. Кон'югат монополімер/білок має біологічну активність.

Ліпідні пухирці, які використовують у композиціях стосовно цього винаходу, становлять собою негативно заряджені ліпосоми, що здатні взаємодіяти з білком, про який йде мова. Специфічні ліпосоми, які передбачено використовувати у цьому винаході, включають діолеїлфосфатидил гліцерин (ДОФГ), диміристоїлфосфатидилгліцерин (ДМФГ), дипальмітоїлфосфатидилгліцерин (ДПФГ), монтежюфосфатидилгліцерин, діолеїлфосфатидил етанол амін (ДОФЕ), монтежюфосфатидилетаноламін, діолеїлфосфатидилова кислота (ДОФК), диміристоїлфосфатидилова кислота (ДМФК), дипальмітоїлфосфатидилова кислота (ДПФК), діолеїлфосфатидилсерин (ДОФС), диміристоїлфосфатидилсерин (ДМФС), дипальмітоїлфосфатидилсерин (ДПФС), монтежюфосфатидилсерин, лізофосфатидилгліцерин, лізофосфатидилетаноламін, лізофосфатидилсерин. Залежно від специфічної ліпосоми, яку використовують, її кількість може змінюватись.

Композиції білок : фосfolіпід найкраще включають буферний агент для підтримувannya величини рН розчину у межах необхідного діапазону. Найкращі зазначені агенти включають ацетат натрію, фосфат натрію і цитрат натрію. Також можна використовувати суміші цих буферних агентів. Кількість буферного агента, який використовується у зазначеній композиції, залежить, значною мірою, від певного буфера, який використовується, і від рН розчину. Наприклад, ацетат є більш ефективним буфером при рН, який дорівнює 5, ніж при рН, який дорівнює 6, таким чином, менше ацетату може бути використано у розчині при рН, який дорівнює 5, ніж при рН, який дорівнює 6. Найкращим діапазоном величин рН для композицій відповідно до цього винаходу є діапазон величин рН, який складає 3,0 -7,5.

Композиції відповідно до цього винаходу можуть, крім того, включати агент, який регулює ізотонію, для того, щоб зробити розчин ізотонічним і більш сумісним для ін'єкції. Найбільш кращим агентом є хлорид натрію у межах діапазону концентрації, який складає 0-150мМ.

Цей винахід охоплює також фармацевтичні композиції, які містять ефективну кількість поліпептидних продуктів відповідно до цього винаходу разом з фармацевтично придатними розчинниками, консервантами, солюбілізаторами, емульсифікаторами, ад'ювантами і/або носіями. Зазначені композиції впливають на фізичний стан, стійкість та біопридатність білка. Дивись, наприклад, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, 1435 - 1712 (Mack Publishing Co., Easton, PA., 1990), що використовується у цьому описі як посилання. Ефективна кількість білка у певному випадку залежить від різних факторів, які досвідчений у цій галузі фахівець бере до уваги, включаючи бажаний терапевтичний результат, серйозність стану або захворювання, яке необхідно вилікувати, фізичний стан суб'єкта і т.і.

У найкращому варіанті, який включає застосування рлф - СКЛ, одержаного із E. coli, використаний ліпосомний пухирець становить собою ДОФГ із співвідношенням ДОФГ : Ф - СКЛ, яке дорівнює 50 : 1, при рН = 4,5, який містить 10мМ ацетату натрію.

У найкращому варіанті, який включає застосування рлФМ - СКЛ, одержаного із E. coli, використаний ліпосомний пухирець становить собою ДОФГ із співвідношенням ДОФГ : ФМ - СКЛ, яке дорівнює 17:1, при рН 7,0, у фосфатному буферному фізіологічному розчині (ФБФР).

У найкращому варіанті, який включає застосування рлФ - СКЛ, одержаного із E. coli, який був хімічно модифікован (пегілован), рлф - СКЛ є тритетрапегілованим, використаний ліпосомний пухирець становить собою ДОФГ із співвідношенням ДОФГ : ПЕГ -Ф - СКЛ, яке дорівнює 17:1, при рН 4,5.

У найкращому варіанті, який включає застосування ФРРМ 1 - 163, одержаного із E. coli, використаний ліпосомний пухирець становить собою ДОФГ із співвідношенням ДОФГ : ФРРМ, яке дорівнює 100 : 1, при рН 5,0, у 10мМ 5%-ого сорбітолу ацетату натрію.

У найкращому варіанті, який включає застосування ФРРМ 1 - 163, одержаного із *E. coli*, який був хімічно модифікований (пегілований), ФРРМ є монопегілованим (20кДа) за допомогою відновлювального алкілювання, використаний ліпосомний пухирець становить собою ДОФГ із співвідношенням ДОФГ : ФРРМ, яке дорівнює 100 : 1, при pH 5,0, у 10мМ 5%-ого сорбітолу ацетату натрію.

У найкращому варіанті, який включає застосування ФРРМ 1 - 332, одержаного із ЯКХ, використовуваний ліпосомний пухирець становить собою ДОФГ із співвідношенням ДОФГ : ФРРМ, яке дорівнює 100 : 1, при pH 5,0, у 10мМ 5%-ого сорбітолу ацетату натрію.

Хоч цей винахід був описан і проілюстрован відносно специфічних композицій білок : ліпід та способів лікування, фахівцям у цій галузі ясно, що може існувати цілий ряд родинних композицій і способів лікування, не виходячи за межі об'єму цього винаходу.

Отакі приклади ілюструють більш детально різні аспекти цього винаходу.

Приклад 1

Первісні експерименти виконували для дослідження можливості введення рекомбінантної Ф - СКЛ людини (рлф - СКЛ) у ліпідний пухирець, рлф - СКЛ виготовляли, використовуючи технологію одержання рекомбінантної ДНК, у якій клітини *E. coli* трансфектували в послідовність ДНК, що кодує Г-СКЛ людини, як це описано у патенті США №4, 810, 643 (винахідник - Souza). рлф - СКЛ виготовляли у вигляді розчину 4 мг/мл в розчиннику HCl, pH = 4,0. Усі ліпіди були одержані за допомогою приладу Avanti Polar Lipids (Alabaster, Ala) і їх зберігали при температурі - 20°C у азотній атмосфері при кінцевій концентрації, що дорівнювала 100 мг/мл у хлороформі.

Виготовлення комплексів Ф - СКЛ : Фосфоліпід

Для одержання ліпідних пухирців з метою об'єднання з Ф - СКЛ 30 мкмолей придатного ліпиду наливали у скляну пробірку і висушували до стану тонкої плівки, використовуючи потік азоту. Ліпідні плівки висушували принаймні протягом двох годин у вакуумі з метою видалення будь-яких слідів хлороформу. Ліпідні плівки гідратували у 1мл або дистильованої деіонізованої води (ддН₂O), фосфатному буферному фізіологічному розчині, при pH 7.2 (Gibco/BRL "D-PBS"), або у 150мМ NaCl. Потім зразки обробляли ультразвуком у спеціальному пристрою на зразок ванни (Laboratory Supplies, Hicksville, N.Y.). Обробку ультразвуком продовжували, поки зразки не ставали оптично чистими (звичайно протягом 10-15 хвилин). До використання зразки зберігали при температурі 4°C у атмосфері азоту. Кінцева "ліпідна концентрація становила 30мМ. У іншому випадку, ліпідні пухирці можна було виготовляти таким чином: 300 мкмолей ліпиду сушити у атмосфері азоту, а потім висушувати так, як це зазначено вище. Висушені ліпідні плівки гідратували у 10мМ придатного водного розчину, як це описано вище. Потім зразки мікрофлюїдизували у лабораторному емульсифікаторі (Microfluidics Model 110S, Microfluidics, Inc. Cambridge, MA), при тиску, що дорівнював 10 000 фунтів на дюйм² (приблизно 70 000кПа). Зазначені зразки піддавали повторному температурному циклуванню протягом 10 циклів. Далі мікрофлюїдизовані зразки зберігали при температурі 4°C, як це описано вище.

Комплекси Ф - СКЛ : фосфоліпід виготовляли шляхом змішування Ф - СКЛ (як це описано вище) з певним ліпідом (як це описано вище). Змішування виконували шляхом вихрового руху, збовтування або слабкої вібрації. Були виготовлені розчини з різним молярним співвідношенням ліпід : Ф - СКЛ з метою оцінки введення мембрани та стабілізації білка. Наприклад, для приготування 3 мл зразка (у воді), який становить собою 0,2мг/мл Ф - СКЛ при молярному співвідношенні ліпід : Ф - СКЛ, що дорівнює 40 : 1, 150мкл вихідного Ф - СКЛ з'єднують з 44 мкл ліпиду (30 мМ сировини, виготовленої у воді за допомогою ультразвукової обробки) і додають води до досягнення кінцевого об'єму зразка, що дорівнює 3 мл. Рекомендовано здійснювати інкубування (але необов'язково) протягом п'яти хвилин і воно було здійснено перед використанням або випробуванням зразка.

Г - СКЛ можна також з'єднувати з гідратним ліпідом до здійснення операції мікрофлюїдизування. Подальше мікрофлюїдизування сумішів, як описано вище, веде до введення Ф - СКЛ у ліпідну мембрану.

Аналіз комплексів Ф - СКЛ : Фосфоліпід

1. Спектр світіння триптофану.

Існує два залишки триптофану у рлФ - СКЛ, які є досить чутливими до умов місцевого навколишнього середовища. Через те аналіз виконували з метою визначення флуоресценції триптофану рлФ - СКЛ, коли рлФ - СКЛ контактує з ліпосомою. Блакитний зсув у максимумі флуоресцентного світіння підтверджує той факт, що триптофани знаходяться у більш гідрофобному навколишньому середовищі і тому рлФ - СКЛ був залитим у ліпідних мембранах. Добрий огляд, який стосується аналізу флуоресценції триптофану, зроблен J. Lakowicz у роботі "Principles of Fluorescence Microscopy, Chap 11 (Plenum Press, New York, 1983).

Флуоресценцію триптофану комплексів Ф - СКЛ : ліпід (як це описано вище) аналізували шляхом збудження зразків при довжині хвилі, що дорівнювала 280нм, одночасному скануванні світіння у діапазоні від 285нм до 420нм з інтервалом 1нм і при швидкості сканування 1нм/сек. Об'єм зразка становив 3мл, а кінцева концентрація Ф - СКЛ для усіх зразків становила 0,2мг/мл. Співвідношення ліпід : Ф - СКЛ змінювали. Усі вимірювання флуоресценції здійснювали, використовуючи флуорометр типу PTI Alphascan (South Brunswick, NY). Усі вимірювання виконували при температурі 25°C, причому зазначену температуру підтримували на цьому рівні, використовуючи резервуар з водяною оболонкою, який був з'єднаний з водяною банею з циркулюючою водою. Спектр світіння знімали і аналізували, використовуючи математичне забезпечення, що постачає PTI.

Спектр флуоресценції рлФ - СКЛ у присутності та при відсутності невеликих одношарових пухирців, які містять ДОФГ, показан на Фіг.1. рлФ - СКЛ має максимум світіння при довжині хвилі 334нм при відсутності пухирців ДОФГ. У присутності ДОФГ при співвідношенні ліпід : білок, що дорівнює 100 : 1, флуоресценція триптофану рлФ - СКЛ має блакитний зсув при максимумі флуоресцентного світіння при довжині хвилі 327нм і різке збільшення інтенсивності флуоресценції. Невелика довжина хвилі флуоресцентного світіння у присутності ДОФГ дає можливість припустити, що триптофани знаходяться у більш гідрофобному навколишньому середовищі, ніж природний білок. Як показано на Фіг.2, зсуви флуоресценції залежать від молярного співвідношення ДОФГ : Ф -СКЛ, а мембранна інсерція виявляється одразу, коли співвідношення

ДОФГ : Ф - СКЛ досягає 10 : 1.

2. Експерименти по гасінню за допомогою йодиду.

Йодид становить собою ефективний гасник флуоресценції триптофану, але він не може проникати крізь ліпідні мембрани. Тому ефективне гасіння флуоресценції триптофану за допомогою йодидів свідчить про незахищеність залишків від водного розчинника, у той час, коли захист від йодидного гасіння є можливим при умові, що триптофани білка є виділеними із водного розчинника. У цих експериментах використовували Ф - СКЛ і композицію ДОФГ : Ф - СКЛ (при співвідношенні ліпід : білок 100 : 1). Після того, як були зібрані і записані первісні відліки (F_0), вимірювали інтенсивність флуоресценції після додавання збільшеної кількості (5М) йодиду калію (KI). Як зразок, так і розчини KI готували таким чином, щоб вони містили 1мМ Na_2SO_3 (кінцева концентрація) згідно із способом, який описан Lee et al., Biochem. Biophys. Acta. 984 : 174 - 182 (1989) I Le Doan et. al., Biochem. Biophys. Acta, 858 : 1 - 5 (1986). Додавання Na_2SO_3 захищає від утворення I_2 , який може розподілятися на неполярні ділянки білків і мембран. Дані були проаналізовані за допомогою рівнення Штерна - Вольмера ($F_0/F = 1 + K_{\text{KI}}[\text{KI}]$), де F_0 і F є інтенсивностями флуоресценції зразків при відсутності та у присутності, відповідно, KI при концентрації $[\text{KI}]$. K_{KI} становить собою постійну гасіння Штерна - Вольмера, яку використовують для розрахунку при аналізі гасіння залишків триптофану Ф - СКЛ за допомогою KI.

Графіки, побудовані по даним рівнення Штерна - Вольмера, показані на Фіг.3. При відсутності пухирців ДОФГ флуоресценція рлФ - СКЛ ефективно гаситься за допомогою KI. У присутності ДОФГ дані зазначеного графіка Штерна - Вольмера є лінійними, указуючи на те, що йодид має поганий доступ до обох триптофанів. Дані показують, що залишок триптофану, який є йодид-доступним при відсутності ДОФГ, стає йодид - недоступним у присутності ДОФГ. Тому частина рлФ - СКЛ, яка містить цей триптофан, повинна бути залита у бішар ДОФГ.

3. Вимірювання перенесення енергії

Як показано раніше, перенесення енергії може діятися між триптофановими донорами і ліпідними розчинними флуоресцентними акцепторами, наприклад, пірендеканова кислота, оскільки спектр збудження цього зонда багато перекриває спектр світіння триптофану. Див. Frierie et. al., Biochemistry 22 : 1675 -1680 (1983). Якщо білок проникає у ліпідні мембрани, перенесення енергії із триптофану до пірена веде до гасіння флуоресценції триптофану. У цьому експерименті інтенсивність світіння триптофану різних комплексів ліпід : Ф - СКЛ записували перед (F_0) і після (F) додатку різної кількості пірендеканової кислоти (30мкг/мл вихідного розчину у тетрагідрофурані). З метою стимулювання утворення суміші пірендеканової кислоти і зразка їх постійно перемішували протягом додавання пірендеканової кислоти. Співвідношення F/F_0 є пропорційним кількості перенесення енергії, яке має місце між триптофанами Ф - СКЛ і пірендекановою кислотою гідрофобного акцептора енергії.

На Фіг.4 показано профіль гасіння для рлФ - СКЛ у присутності ДОФГ (при співвідношенні ліпід/білок, що дорівнює 100 : 1), як функція доданої пірендеканової кислоти. Гасіння здійснюється при дуже низьких концентраціях пірендеканової кислоти (менш 1 молевого процента), тому вплив флуоресцентного зонда на структуру і поведінку мембрани є мінімальним. Оскільки, як можна очікувати, пірендеканова кислота швидко поділяється на ліпідні бішари, зазначені дані показують, що рлФ - СКЛ заливаються достатньо глибоко у мембрани ДОФГ, щоб дозволити ефективне перенесення енергії із триптофану до піренового акцептору. Перенесення енергії підтверджується дослідженням спектру збудження пухирців міченого пірендекановою кислотою ДОФГ у присутності і при відсутності рлФ -СКЛ.

Вищенаведений аналіз показує, що рлФ - СКЛ може тісно взаємодіяти з ненагдованим фосфоліпідом типу ДОФГ. У присутності пухирців ДОФГ, триптофан рлФ - СКЛ є захищеним від водорозчинного гасника флуоресценції, але для гасіння через перенесення енергії до гідрофобного флуоресцентного зонда це має істотне значення. Узяті разом зазначені дані показують, що рлФ - СКЛ можуть включитися до мембран, що створені із ДОФГ. Інсерція до мембрани виявляється одразу після досягнення співвідношення ліпід : Ф - СКЛ, яке дорівнює 10 : 1, і це число може характеризувати число ліпідів, які оточують інсерційну ділянку білка.

Приклад 2

У цьому прикладі здатність рлФ - СКЛ до взаємодії з іншими фосфоліпідами визначали шляхом використання порівняння максимумів інтенсивності F_0/F і світіння, як це описано вище. У кожному прикладі молярне співвідношення ліпід : рлФ - СКЛ дорівнювало 100 : 1. На Фіг.5 показано дані про F/F_0 , що стосуються рлФ - СКЛ у присутності і при відсутності різних ліпідів. На Фіг.6 показано дані, що стосуються максимального світіння для вищезазначених композицій. Дані, що наведені на Фіг.5 і Фіг.6, показують, що крім включення до ДОФГ, рлФ - СКЛ можуть включатися до ДМФГ, ДПФГ і з меншою ефективністю до фосфатидилетаноламінів (ФЕ) і фосфатидилсеринів (ФС). Крім того, було знайдено, що NG (негативні) - ДОФЕ (зразок ДОФЕ, де головну групу ФЕ робили негативною) забезпечує більш підвищену інсерцію рлФ - СКЛ, ніж ДОФЕ.

ДОФХ, ДМФХ і ДПФХ є нейтральними ліпідами і ці пухирці мали невеликий, якщо мали взагалі, вплив на максимум світіння або інтенсивність флуоресценції рлФ - СКЛ, показуючи тим самим, що він не взаємодіє з зазначеними фосфоліпідами (див. Фіг.5 і 6 та криву 2 на Фіг.7).

Вищенаведені дані показують, що білок, здатний до переходу у розплавлену сферичну структуру, може включатися у пухирці різних ліпідів. Однак, зазначена взаємодія рлФ - СКЛ : ліпід стається тільки тоді, коли використовують негативно заряджені ліпідні пухирці. Здається, що серед негативно заряджених ліпідних пухирців, пухирці, що мають більший негативний заряд, забезпечують більш сильну взаємодію ліпід : рлФ - СКЛ.

Приклад 3

У цьому прикладі визначали вплив взаємодії ДОФГ : рлФ - СКЛ відносно стійкості білка. Вимірювання кругового дихроїзму виконували на приладі Jasco - 720 з приробленою термостатованою камерою для клітин типу Peltier і магнітною мішалкою. Вимірювали круговий дихроїзм при довжині хвилі 222нм, використовуючи кінцеву концентрацію рлФ - СКЛ, що дорівнювала 80 мкг/мл при pH = 6,0. Калориметричні вимірювання при диференційному скануванні виконували з застосуванням калориметра Microcal MC - 2. Зразки рлФ - СКЛ (1мг/мл, у воді) або ДОФГ : рлФ - СКЛ, у воді (45 : 1, моль : моль) сканували з швидкістю 90°C у

годину. Дані зберігали і аналізували, використовуючи програму математичного забезпечення Microcal.

Температурно-індуковані зміни у альфа - спіральності Ф - СКЛ можуть бути супроводжені вимірюванням кругового дихроїзму на довжині хвилі 222нм як функції підвищення температури. Термічно - індуковане розгортання рлф - СКЛ при рН = 6,0 показано на Фіг.8. Крива показує, що вибуховий перехід здійснюється при температурі -60°C - -70°C, що веде до утрати альфа - спіральності. Після зазначеного переходу рлф - СКЛ необоротньо осаджували із розчину. Температурний діапазон розгортання є аналогічним температурі плавлення рлф - СКЛ при рН = 7,0, як це визначено "за допомогою диференційно скануючої калориметрії (див. Фіг.9).

У протилежність цьому зразки ДОФГ : рлф - СКЛ показують поступову утрату альфа - спіральності при підвищенні температури і, на відміну від рлф - СКЛ у чистому вигляді, температурно - індуковане розгортання ДОФГ : рлф - СКЛ певно не є кооперативним (див. Фіг.8). Цей висновок також підтверджується відсутністю плавкого переходу, що демонструється за допомогою диференційної скануючої калориметрії (Фіг.9). Цікаво, що зразки ДОФГ : рлф - СКЛ можуть відновлювати альфа - спіральність після нагрівання до 95°C і можуть циклічно повторюватись у діапазоні 95°C - 10°C з повним відновлюванням спіральності після охолодження (див. Фіг.10). При цих умовах рлф - СКЛ у чистому вигляді безповоротно розгортається і осаджується із розчину.

Були досліджені також впливи ДМФГ і ДПФГ на круговий дихроїзм Ф - СКЛ. Використовували співвідношення ліпід : рлф - СКЛ, що дорівнювало 150 : 1, і як це було у випадку з ДОФГ, ДМФГ і ДПФГ також стабілізують вторинну структуру рлф -СКЛ (Фіг.11 - 13).

Зазначені дані показують, що взаємодія рлф - СКЛ з ДОФГ, ДМФГ і ДПФГ підвищує стійкість білка при умовах, коли рлф - СКЛ у чистому вигляді є нестійким. Взаємодія безпосередньо стабілізує вторинну і тритинну структури рлф - СКЛ.

Приклад 4

У цьому прикладі визначали вплив взаємодії рлф - СКЛ : ДОФГ відносно біологічної активності рлф - СКЛ. Активність рлф - СКЛ in vitro аналізували, використовуючи залежність поглинання рлф - СКЛ [³H] -тимідину клітинами кісткового мозку мишок, як це описано Zsebo et al., Immunobiology 172 - 175 - 184 (1986). Усі дослідження, що стосуються активності, виконували потрійно. Активність in vitro визначали шляхом внутрішньошкірної ін'єкції хом'яка (доза рлф - СКЛ дорівнює 100мкг/кг) і вимірювання числа білих кров'яних клітин (БКК).

1. Активність in vitro

А. Визначали питому активність рлф - СКЛ у присутності і при відсутності ДОФГ. Також досліджували термооброблені зразки рлф - СКЛ і ДОФГ : Ф - СКЛ. Одержані результати узагальнені у Таблиці 1.

Таблиця 1

Зразок	Питома активність (Од/мг/білок)
рлф - СКЛ	0,66 +/- 0,09
рлф - СКЛ (нагрітий) ^a	Не детектували
ДОФГ : рлф - СКЛ ^b	0,61 +/- 0,11
ДОФГ : рлф - СКЛ ^b (наігрітий) ^a	0,52 +/- 0,08

^a Перед проведенням дослідження зразок інкубували протягом 10 хвилин при температурі 85°C у водяній бані.

^b Співвідношення ДОФГ : рлф - СКЛ дорівнює 50 : 1 (моль/моль).

Як показано у Таблиці 1, інсерція у бішари ДОФГ не має шкідливого впливу на біологічну активність рлф - СКЛ. Після нагрівання до 85°C протягом 10 хвилин рлф - СКЛ має недетектовану активність і білкові осадження. Після аналогічної обробки ДОФГ : рлф - СКЛ зберігає активність, що дорівнює приблизно 85% відносно активності ненагрітого рлф - СКЛ і повністю відновлює вторинну структуру після охолодження.

Б. Також досліджували здатність різних ліпідів до стабілізування рлф - СКЛ при ліофілізації. Зразки рлф - СКЛ у комбінації з різними ліпідами ліофілізували і аналізували, як це описано вище, з метою дослідження активності. ДОФГ, ДМФГ і ДПФГ при перемішуванні з рлф - СКЛ дозволяють досягнути приблизно 100-процентного зберігання біологічної активності рлф - СКЛ після ліофілізації (див. Фіг.14). рлф - СКЛ у чистому вигляді не витримує процесу ліофілізації.

2. Активність in vivo

Визначали активність (число БКК) рлф - СКЛ при відсутності і у присутності ліпиду. Активність вимірювали після внутрішньошкірної ін'єкції (доза рлф - СКЛ дорівнює 100мкг/кг) на нульовий день. Були проаналізовані п'ять різних комплексів ліпід : рлф - СКЛ і у кожному випадку комплекс ліпід : рлф - СКЛ утримував активність in vivo (Фіг.15 і 16).

Вищенаведені дослідження показують, що інсерція у негативно заряджені ліпідні бішари не має шкідливого впливу на біологічну активність рлф - СКЛ. Крім того, здається, що захисний ефект ліпиду захищає рлф - СКЛ у процесі ліофілізації.

Приклад 5

У цьому прикладі хімічно модифікований Ф - СКЛ (пегілований Ф - СКЛ (ПЕГ - Ф - СКЛ)) і Ф - СКЛ, одержаний як продукт експресії еукаріотних клітин -хазяїв (ЯКХ - Ф - СКЛ) були досліджені на їх здатність взаємодіяти з негативно зарядженими ліпідними пухирцями. Для ЯКХ -Ф - СКЛ визначення робили з використанням порівнянь максимумів інтенсивності F/F₀ і світіння (як це описано у вищенаведеному прикладі 1). У кожному випадку молярне співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 : 1. Для ПЕГ - Ф - СКЛ визначення базувалося на аналізі кругового дихроїзму.

Застосований ЯКХ - Ф - СКЛ одержували, використовуючи технологію рекомбінантної ДНК, при якій клітини яєчника китайського хом'яка (ЯКХ) трансфектували за допомогою послідовності ДНК, яка кодує Ф - СКЛ людини, як це описано у патенті США №4 810 643 (винахідник - Souza). ЯКХ - Ф - СКЛ виготовляли у вигляді розчину (0,6мг/мл, pH = 7,0). Було показано, що ЯКХ - Ф - СКЛ взаємодіє з ДОФГ таким же чином, як і рлФ - СКЛ, причому кожний зразок має збільшену інтенсивність флуоресценції у присутності ДОФГ, а також блакитний зсув у максимумі світіння у присутності ДОФГ (Фіг.17 і 18). Таким чином, взаємодія ДОФГ не є слідством деякої особливості рекомбінантної форми Ф - СКЛ.

ПЕГ - Ф - СКЛ, який застосовували у цих експериментах, становив собою тритетрапегілований Ф - СКЛ, виділений із клітин *E. coli* (використовуючи ПЕГ 6 000). Зразки ДМФГ : ПЕГ -Ф - СКЛ (17 : 1, моль/моль) виготовляли за допомогою вищенаведених процедур. Було знайдено, що зразки ДМФГ : ПЕГ - Ф - СКЛ повністю відновлюють вторинну структуру після нагрівання (Фіг. 19). Незважаючи на присутність молекул ПЕГ, дериватизований білок мав здатність до взаємодії з ліпідом таким же чином, як і природний білок.

Вищенаведені дані показують, що ефекти стабілізації, пов'язані з взаємодією Ф - СКЛ з негативно зарядженим ліпідним пухирцем, не є особливістю тільки рлФ - СКЛ, одержаного як продукт експресії прокаріотної клітини - хазяїна. Хімічно модифікований білок, здатний до переходу у РСС і який контактує з пухирцем ліпосоми, у даному випадку ПЕГ - Ф - СКЛ : ДМФГ, також показав ефекти стабілізації.

Приклад 6

У цьому прикладі досліджували вплив ДМФГ і ДПФГ на ФМ - СКЛ. Зазначений ФМ - СКЛ становив собою рекомбінантний людський ФМ - СКЛ, описаний у патенті США № 5 047 504 (винахідник - Воопе), який був виготовлений у вигляді розчину у фосфатному буферному фізіологічному розчині (ФБФ) (1мг/мл, pH = 7,0). Було використано співвідношення ліпід : ФМ - СКЛ, що дорівнювало 17 : 1. Теплову стійкість вимірювали, застосовуючи вищенаведений аналіз кругового дихроїзму. ДМФГ і ДПФГ можуть привести до кращої теплової стійкості ФМ - СКЛ, тобто до відновлювання вторинної структури після нагрівання (Фіг.20а і 20в).

Ці дані характеризують інший приклад білка, здатного до переходу у розплавлену сферичну структуру, взаємодіючого з негативно зарядженим ліпідним пухирцем з метою забезпечення кращої теплової стійкості білка.

Приклад 7

У цьому прикладі комплекс ДОФГ : ПЕГ - Ф - СКЛ використовували для оцінки можливості збільшення терапевтичного ефекту, що справляє Ф - СКЛ після зовнішнього застосування. Для цього експерименту ДОФГ готували, як це описано у прикладі 1, а ПЕГ - Ф - СКЛ готували, як це описано у прикладі 5. 100мкМ ліпиду (797 мкл) зневоджували у вакуумі, а далі з метою одержання 100 мМ - ого розчину ліпиду додавали 1мл води . Зазначений розчин оброблювали ультразвуком протягом 5 хвилин у ультразвуковій водяній ванні (Модель G 112SP1T від лабораторії Lab. Supply Inc., Hicksville, N.Y.) або доки ліпідний розчин не ставав прозорим. Додавали 9мкМ розчину ДОФГ (90мкл) до 90нМ природного рлФ - СКЛ або ПЕГ - Ф - СКЛ у 1мМ HeI . Розчин завіхрювали і доводили до кінцевого об'єму, що дорівнював 2мл, за допомогою 1мМ HCl . Для внутрішньододенального застосування у пацюків речовину розміщували у осмотичний насос, який імплантували до тварини. Вивільнення речовини відбувалося протягом 24 годин.

Результати загального аналізу БКК для тварин, які одержали як рлф - СКЛ, так і ПЕГ - Ф - СКЛ у присутності та при відсутності ліпиду, показані на Фіг.21. На Фіг.21а показано, що вливання природного Ф - СКЛ не дає можливості стимулювати реакцію БКК порівняно з векторним управлінням. Додаток робить невеликий вплив на терапевтичний відгук тварин на рлФ - СКЛ.

Реакція пацюків на пегілований Ф - СКЛ показана на Фіг.21 в. Можна бачити, що Ф - СКЛ у чистому вигляді стимулює реакцію БКК. Ріст БКК продовжувався 48 годин перед тим, як повернутися на основну лінію. ПЕГ - Ф - СКЛ, рецептований за допомогою ДОФГ, також стимулює реакцію БКК, причому ця реакція приблизно у два рази більше ніж для чистого ПЕГ -Ф - СКЛ. Такі результати підтверджуються вимірюваннями рівнями сироватки ПЕГ - Ф - СКЛ після вливання.

Зазначені дані показують, що включення аніонного ліпиду, наприклад ДОФГ, до оральної композиції ПЕГ - Ф - СКЛ певно збільшує терапевтичний відгук, що обумовлений дериватизованим білком. Заглиблений механізм цього явища у теперішній час ще не зрозуміло.

Приклад 8

У цьому прикладі досліджували вплив ДМФГ на ФРРМ. ФРРМ становив собою рекомбінантний людський ФРРМ 1-163, одержаний з *E. coli*, виготовлений у вигляді 1,0мг/мл розчину у 10мМ ацетату натрію, 5% сорбітолу при pH = 5,0. Комплекси ДМФГ : ФРРМ готували так, як це описано у Прикладі 1.

Аналіз комплексів ДМФГ : ФРРМ

1. Спектр світіння триптофану

У ФРРМ є єдиний залишок триптофану (позиція 51), який використовували для контролю взаємодії ФРРМ з пухирцями ДМФГ. Флуоресценцію триптофану комплексів ДМФГ : ФРРМ аналізували так, як це описано у Прикладі 1, використовуючи концентрацію ФРРМ, що дорівнювала 0,1мг/мл. Спектр флуоресценції ФРРМ у присутності та при відсутності невеликих одношарових пухирців, що містили ФРРМ, показан на Фіг.22. ФРРМ має максимум світіння на довжині хвилі 336нм при відсутності пухирців ДМФГ. У присутності ДМФГ і при співвідношенні ліпід : білок 100 : 1 флуоресценція триптофану ФРРМ виявляє блакитний зсув у максимумі флуоресцентного світіння до 328нм. Низька довжина хвилі флуоресцентного світіння у присутності ДМФГ дає можливість припустити, що триптофани у навколишньому середовищі є більш гідрофобними , ніж природний білок. Як показано на Фіг.23, зсуви флуоресценції залежать від молярного співвідношення ДМФГ : ФРРМ, причому інсерцію у мембрану можливо виявити після того, як буде досягнуто співвідношення ДМФГ : ФРРМ 8 - 30 : 1. Зміна флуоресценції є максимальною при молярному співвідношенні, що дорівнює або більше 100 : 1 і ФРРМ явно виявляє більш високу філогенетичну близькість для пухирців ДМФГ, коли величина pH зменшується з 7,0 до 5,0. Це дає можливість припустити, що титрування певних амінокислот (наприклад, гістаміну) можна використовувати для збільшення або ослаблення взаємодії.

2. Експерименти по гасінню за допомогою йодидів

У цих експериментах ФРРМ і композицію ДМФГ : ФРРМ (при співвідношенні ДМФГ і ФРРМ, яка дорівнювала 100 :1) використовували для проведення експериментів по гасінню за допомогою йодидів, як це описано у Прикладі 1. Діаграми Штерна - Вольмера показані на Фіг.24. При відсутності пухирців ДМФГ флуоресценцію ФРРМ ефективно гасять за допомогою KI. У протилежність цьому у присутності ДМФГ триптофан не піддається впливу йодидів, указуючи на те, що ділянка ФРРМ, яка містить зазначений триптофан, повинна бути залитою у бішарі ДМФГ.

Вищенаведений аналіз показує, що як і у випадку з Ф - СКЛ і ФМ - СКЛ, ФРРМ може тісно взаємодіяти з ненагдованим фосфоліпідом типу ДМФГ. У присутності пухирців ДМФГ триптофан ФРРМ захищається від водорозчинного гасника флуоресценції. Узяті разом наведені дані показують, що ФРРМ може включатися у мембрани, що містять ДМФГ. Мембранну інсерцію можливо виявляти одразу ж після досягнення співвідношення ДМФГ : ФРРМ, яке дорівнює 8 : 1, і це число може означати число ліпідів, які оточують вставну ділянку білка.

Приклад 9

У цьому прикладі визначали вплив взаємодії ДМФГ : ФРРМ відносно стійкості білка. Оцінювали теплову стійкість, стійкість у присутності сечовини і стабільність терміну зберігання ФРРМ (+/- ДМФГ). При кожному дослідженні використовували молярне співвідношення ДМФГ : ФРРМ, що дорівнювало 100 : 1.

1. Теплостійкість.

Відсліджували круговий дихроїзм (КД на довжині хвилі 222 нм) чистого ФРРМ або ФРРМ, який був включеним до пухирців ДМФГ, як функцію циклічної зміни температури між 95°C і 10°C, як це описано у Прикладі 3, Фіг.10. Процент КД, що залишився, відноситься до кількості виявленого КД (при 10°C) після кожного циклу (один цикл становить собою зміну температури від 10°C до 95°C і знову до 10°C) порівняно з КД ненагрітого зразка композиції, що вимірюється. Хоч ФРРМ після 3 кілів нагріву втрачає більше 70% своєї спіральності, комплекс ДМФГ : ФРРМ повністю відновлює свою первісну альфа-спіральність при тих самих умовах (див. Фіг.25).

2. Стійкість у присутності сечовини

Сечовина є хаотропічним реагентом, який може розгортати і денатурувати білки. Рівновагове денатурування ФРРМ (+/- ДМФГ) контролювали за допомогою флуоресценції, тобто вимірювали тритинну структуру, і за допомогою кругового дихроїзму, тобто вимірювали вторинну структуру. Як зображено на Фіг. 26, по мірі втрати тритинної структури білка, залишки триптофану більше зазнають вплив водної фази і довжина хвилі світіння ФРРМ зрушується до більшої довжини хвилі; і по мірі втрати вторинної структури середня еліпсність залишку (СЕЗ) стає менш негативною, тоді як альфа - спіральність втрачається. При відсутності ДМФГ 50% втрат тритинної структури чиниться при кількості сечовини, що дорівнює приблизно 3М, у той час, коли потрібно 8М сечовини, щоб мати 50% втрат зазначеної структури при відсутності ДМФГ. Аналогічно для одержання 50% втрат СЕЗ ФРРМ потрібно 7М сечовини при відсутності ДМФГ порівняно з 9М сечовини у присутності ДМФГ.

3. Стабільність строку зберігання

ФРРМ 1 - 163, одержаний з E. coli (+/- ДМФГ), зберігали при умовах, що показані у вищенаведеній Таблиці 2, а далі досліджували за допомогою ексклюзивної хроматографії (РЕХ), що виконували на колонці Toso - Haas G3000SWXL з рухомою фазою, яка містить 100мМ фосфатного буферу, 10% етанолу, 0,2% Tween - 20, при рН = 6,9. Зразки розчинювали за допомогою етанолу і Tween - 20 до тієї самої концентрації, що використовували у рухомій фазі, та у кожному досліді вводили 10-20мкг зразка. Температуру колонки підтримували на рівні 40°C. Будь - який агрегований ФРРМ, який формує елюати раніш ніж неагрегований білок і виражається кількісно шляхом вимірювання площі під кривою агрегатного шпиль і мономерного шпиль. Дані відповідають проценту загального ФРРМ у агрегатному шпиль.

Таблиця 2

% агрегування, виміряний шляхом РЕХ

Зразок	Температура	5 тижнів	11 тижнів
ФРРМ	-80°C	0	0,2
	4°C	0,4	0,6
	37°C	18	39,2
ДМФГ : ФРРМ	-80°C	0	0,14
	4°C	0	0
	37°C	1,9	2,5

Як показано у Таблиці 2, ДМФГ різко зменшує створення агрегатів при зберіганні. Таким чином, ДМФГ може бути використано для збільшення строку зберігання ФРРМ.

Зазначені дані показують, що взаємодія ФРРМ з пухирцями ДМФГ збільшує стійкість білка при умовах, коли чистий ФРРМ є нестійким. Взаємодія безпосередньо стабілізує вторинну і тритинну структури ФРРМ у присутності денатурантів типу сечовини і значно збільшує строк зберігання ФРРМ при різних температурах.

Приклад 10

У цьому прикладі досліджували хімічно модифікований ФРРМ 1-163 (монопегілований (20кДа) ФРРМ 1-163 (ПЕГ - ФРРМ)) на його здатність до взаємодії з негативно зарядженими ліпідними пухирцями. Для визначення ПЕГ -ФРРМ використовували порівняння максимумів інтенсивності і світіння F/F₀ (як це описано у вищенаведених прикладах 1 і 8). У кожному випадку молярне співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 : 1.

Застосований у цих експериментах ПЕГ - ФРРМ становив собою монопегілований (20кДа) ФРРМ 1 - 163, одержаний із клітин E. coli, використовуючи альдегід метокси поліетиленгліколю (MeПЕГ) (середня

молекулярна вага 20кДа) через відновлювальне алкілювання. Гомогенність кон'югатів ПЕГ - ФРРМ визначали за допомогою електрофорезу у натрій додецил сульфат поліакриламідному гелі з використанням 4 - 20% градієнтних гелів промислового виробництва. Виявили одну головну смугу, що відповідає позиції білка з вагою 46,9кДа.

Далі за допомогою вищеописаних процедур готували зразки ДМФГ : ПЕГ -ФРРМ (100 : 1, моль/моль). Було знайдено, що зразки ДМФГ : ПЕГ - ФРРМ повністю відновлювали вторинну структуру після нагрівання (Фіг.27). Незважаючи на присутність молекул ПЕГ, дериватизований білок був здатним до взаємодії з ліпідом таким же чином, як і природний білок.

Ці дані показують, що зсуви максимумів світіння, пов'язані з взаємодією ФРРМ з негативно зарядженим ліпідним пухирцем не є особливістю тільки ФРРМ, одержаного як продукт експресії прокаріотних клітин - хазяїв. Як було показано для хімічно модифікованого рлф - СКЛ, ДМФГ : ФРРМ також показали зсуви світіння; дані показують, що хімічно модифікований ФРРМ може включатися у мембрани, які містять ДМФГ.

Приклад 11

У цьому прикладі оцінювали вплив ДМФГ : ПЕГ - ФРРМ відносно до проблеми адсорбції ФРРМ у скляні пробірки. Приблизно 11пг/мл [¹²⁵I] - ПЕГ - ФРРМ комбінували з неміченим ПЕГ - ФРРМ різної концентрації з метою досягнення зафіксованої кінцевої концентрації ПЕГ - ФРРМ (див. Фіг.28). У тих випадках, коли це зафіксовано, ДМФГ був включеним до процесу розчинення (див. також Фіг.27). 1мл препаратів розміщували у скляну пробірку з об'ємом 3см³ (Kimble). Процент відновлення ПЕГ - ФРРМ аналізували шляхом підрахунку кількості радіомічених ФРРМ, що були регенеровані із скляних пробірок після 18-ти годинного інкубування при кімнатній температурі. Як показано на Фіг.28, ПЕГ - ФРРМ легко адсорбує до скляних контейнерів по мірі зменшення концентрації білка, причому адсорбція є особливо високою при концентрації, яка знаходиться у діапазоні 6,1 - 50мкг/мл. У протилежність цьому зразки ДМФГ : ПЕГ - ФРРМ майже не мають адсорбції до скла у діапазоні концентрації ПЕГ - ФРРМ, що дорівнює 0,1 - 50мкг/мл.

Приклад 12

У цьому прикладі визначали вплив взаємодії ДМФГ : ФРРМ 1 - 163 і ДМФГ : ПЕГ - ФРРМ 1-163 відносно біологічної активності ФРРМ 1 - 163 і ПЕГ - ФРРМ 1 - 163. ФРРМ 1-163 був виділений із E. coli, співвідношення ліпід : білок дорівнювало 100 :1. Вимірювали кількість тромбоцитів із миші, у яку вводили 100мкг/кг і 300мкг/кг ФРРМ, ПЕГ - ФРРМ, ДМФГ : ФРРМ або ДМФГ : ПЕГ - ФРРМ. Одержані результати наведені на Фіг.31. Показану концентрацію кожного типу вводили внутрішньовенно один раз у день протягом 8 діб до звичайної самки миші Balb/c. Протягом 24 годин після останньої ін'єкції збирали проби крові із невеликого поперечного розрізу у хвостовій вені. Клітини крові аналізували за допомогою електронного аналізатора клітин крові (Baxter Diagnostics, Inc. Irvine, CA). Дані становлять собою середню величину по показникам, одержаним від 4 тварин, +/- стандартне відхилення. На інші параметри клітин крові, наприклад, загальна кількість білих кров'яних клітин або кількість червоних кров'яних клітин, зазначені операції не впливали (дані не показані). Одержані результати свідчать, що пегілування ФРРМ 1 - 163, виділеного з E. coli, збільшувало активність in vivo молекули. Більш важливим є те, що вищезазначені дослідження показують, що інсерція у бішари негативно зарядженого ліпиду не виявляє шкідливого впливу на біологічну активність типів різних ФРРМ.

Список послідовностей

(1) Загальна інформація

(i) Заявник: AMGEN INC.

(ii) Назва винаходу: стійкі композиції білок : фосфоліпід і способи їх одержання

(iii) Кількість послідовностей: 2

(iv) Адреса для листування:

(A) Адресат: AMGEN INC.

(B) Вулиця: 1840 Dehavilland Drive

(C) Місто: Thousand Oaks

(D) Штат: California (E) Країна: USA

(F) Поштовий індекс: 91320-1789

(v) Комп'ютерні дані:

(A) Тип носія: гнучкий диск

(B) Комп'ютер: IBM PC сумісний

(C) Операційна система: PC-DOS/MS-DOS

(D) Математичне забезпечення: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) Дані по заявці:

(A) Номер заявки:

(B) Дата подання:

(C) Класифікація:

(2) Інформація про послідовність SEQ ID NO :1;

(i) Характеристики послідовності : (A) Довжина : 1342 п.н.

(B) Тип : нуклеїнова кислота

(C) Нитковідність: одониткова

(D) Топологія : лінійна

(ii) Тип молекули: кДНК

(ix) Ознака

(A) Назва/ключ: CDS

(B) Місцеположення: 99...621

(xi) Опис послідовності: SEQ ID NO: 1:

CAGGGAGCCA CGCCAGCCAA GACACCCCGG CCAGAATGGA GCTGACTGAA TTGCTCCTCG	60
TTGTCATGCT TCTCCTAACT GCAAGGCTAA CGCTGTCC AGC CCG GCT CCT CCT	113
Ser Pro Ala Pro Pro	
1 5	
GCT TGT GAC CTC CGA GTC CTC AGT AAA CTG CTT CGT GAC TCC CAT GTC	161
Ala Cys Asp Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val	
10 15 20	
CTT CAC AGC AGA CTG AGC CAG TGC CCA GAG GTT CAC CCT TTG CCT ACA	209
Leu His Ser Arg Leu Ser Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr	
25 30 35	
CCT GTC CTG CTG CCT GCT GTG GAC TTT AGC TTG GGA GAA TGG AAA ACC	257
Pro Val Leu Leu Pro Ala Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr	
40 45 50	
CAG ATG GAG GAG ACC AAG GCA CAG GAC ATT CTG GGA GCA GTG ACC CTT	305
Gln Met Glu Glu Thr Lys Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu	
55 60 65	
CTG CTG GAG GGA GTG ATG GCA GCA CGG GGA CAA CTG GGA CCC ACT TGC	353
Leu Leu Glu Gly Val Met Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys	
70 75 80 85	
CTC TCA TCC CTC CTG GGG CAG CTT TCT GGA CAG GTC CGT CTC CTC CTT	401
Leu Ser Ser Leu Leu Gly Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu	
90 95 100	
GGG GCC CTG CAG AGC CTC CTT GGA ACC CAG CTT CCT CCA CAG GGC AGG	449
Gly Ala Leu Gln Ser Leu Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg	
105 110 115	
ACC ACA GCT CAC AAG GAT CCC AAT GCC ATC TTC CTG AGC TTC CAA CAC	497
Thr Thr Ala His Lys Asp Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His	
120 125 130	
CTG CTC CGA GGA AAG GTG CGT TTC CTG ATG CTT GTA GGA GGG TCC ACC	545
Leu Leu Arg Gly Lys Val Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr	
135 140 145	
CTC TGC GTC AGG CGG GCC CCA CCC ACC ACA GCT GTC CCC AGC AGA ACC	593
Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr	
150 155 160 165	
TCT CTA GTC CTC ACA CTG AAC GAG CTC C CAAACAGGAC TTCTGGATTG	641
Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu	
170	
TTGGAGACAA ACTTCACTGC CTCAGCCAGA ACTACTGGCT CTGGGCTTCT GAAGTGGCAG	701
CAGGGATTCA GAGCCAAGAT TCCTGGTCTG CTGAACCAAA CCTCCAGGTC CCTGGACCAA	761
ATCCCCGGAT ACCTGAACAG GATACACGAA CTCTTGAATG GAACTCGTGG ACTCTTTCCT	821

GGACCCCTCAC GCAGGACCCT AGGAGCCCCG GACATTTCCCT CAGGAACATC AGACACAGGC	881
TCCCTGCCAC CCAACCTCCA GCCTGGATAT TCTCCTTCCC CAACCCATCC TCCTACTGGA	941
CAGTATACGC TCTTCCCTCT TCCACCCACC TTGCCCCACC CTGTGGTCCA GCTCCACCCC	1001
CTGCTTCCTG ACCCTTCTGC TCCAACGCCC ACCCCTACCA GCCCTCTTCT AAACACATCC	1061
TACACCCACT CCCAGAATCT GTCTCAGGAA GGGTAAGGTT CTCAGACACT GCCGACATCA	1121
GCATTGTCTC GTGTACAGCT CCCTTCCCTG CAGGGCGCCC CTGGGAGACA ACTGGACAAG	1181
ATTTCCCTACT TTCTCTGAA ACCCAAAGCC CTGGTAAAAG GGATACACAG GACTGAAAAG	1241
GGAATCATTT TCACTGTAC ATTATAAACC TTCAGAAGCT ATTTTTTTAA GCTATCAGCA	1301
ATACTCATCA GAGCAGCTAG CTCTTTGGTC TATTTTCTGC A	1342

(2) Інформація про послідовність SEQ ID NO : 2:

(i) Характеристики послідовності

(A) Довжина: 174 п.н.

(B) Тип: амінокислота

(C) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: білок

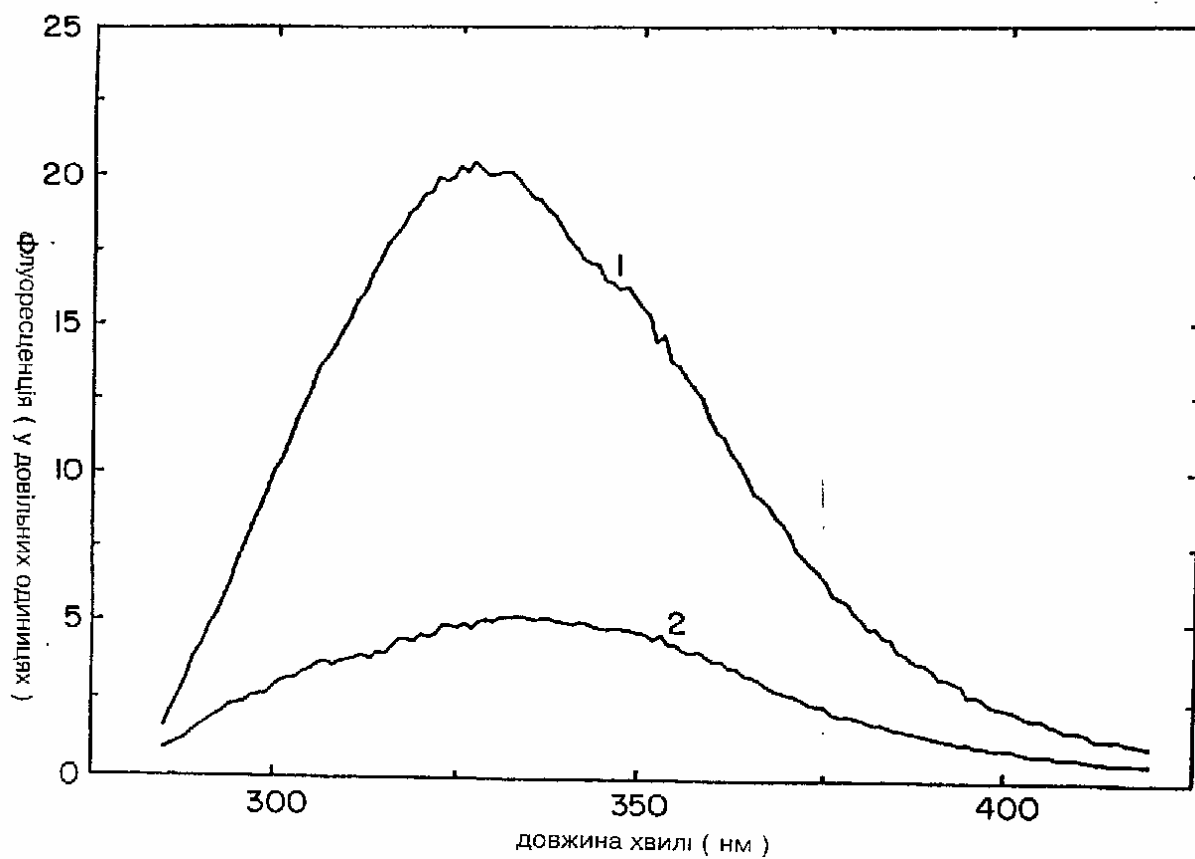
(xi) Опис послідовності SEQ ID NO :2 :

Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Cys	Asp	Leu	Arg	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Leu	1	5	10	15
Arg	Asp	Ser	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	Leu	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Val	20	25	30	
His	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	35	40	45	
Gly	Glu	Trp	Lys	Thr	Gln	Met	Glu	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Leu	50	55	60	
Gly	Ala	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Met	Ala	Ala	Arg	Gly	Gln	65	70	75	80
Leu	Gly	Pro	Thr	Cys	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Gln	85	90	95	
Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Gln	Leu	100	105	110	
Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	His	Lys	Asp	Pro	Asn	Ala	Ile	Phe	115	120	125	
Leu	Ser	Phe	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Gly	Lys	Val	Arg	Phe	Leu	Met	Leu	130	135	140	

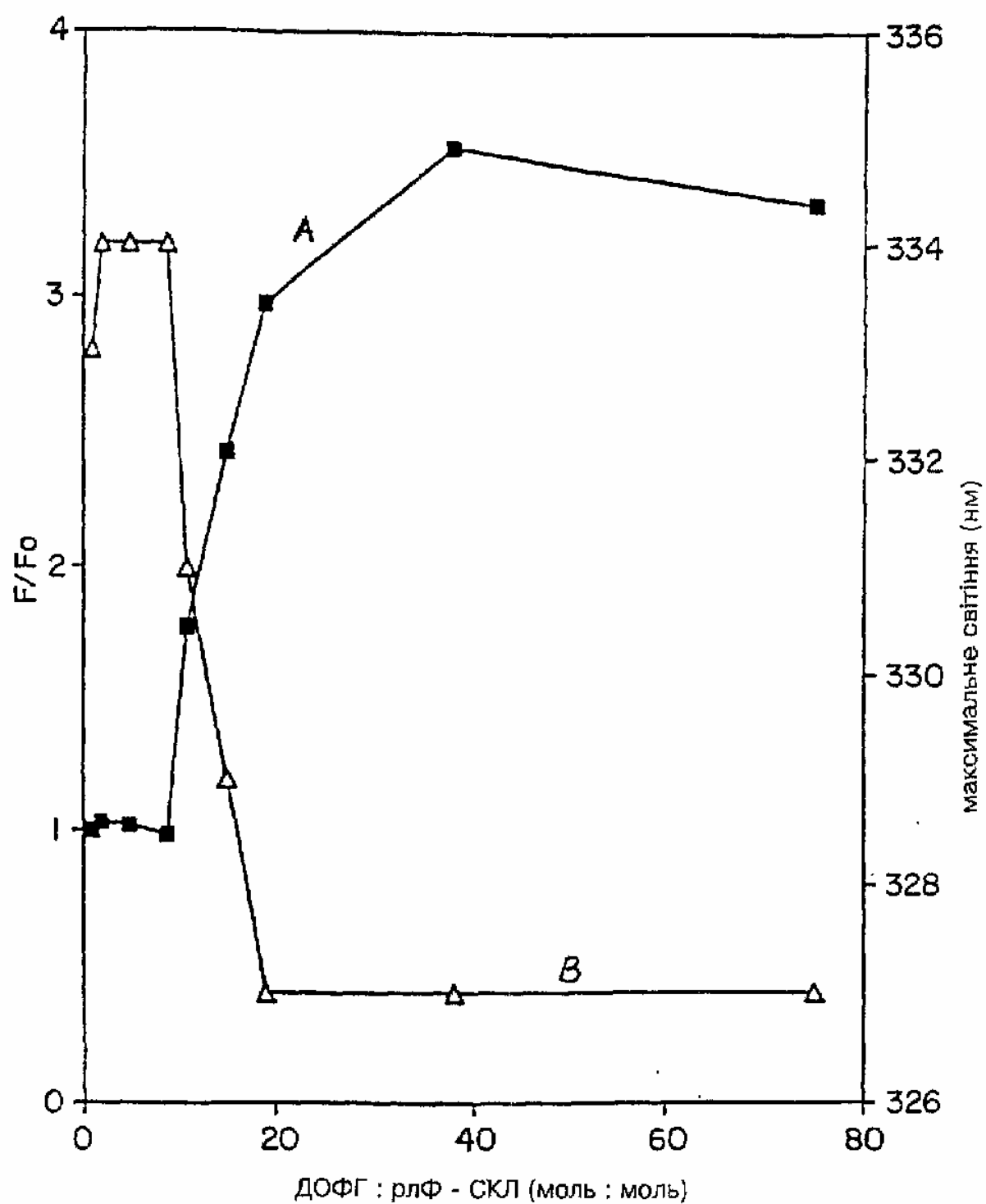
Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala Pro Pro Thr Thr Ala
 145 150 155 160

Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu Asn Glu Leu
 165 170

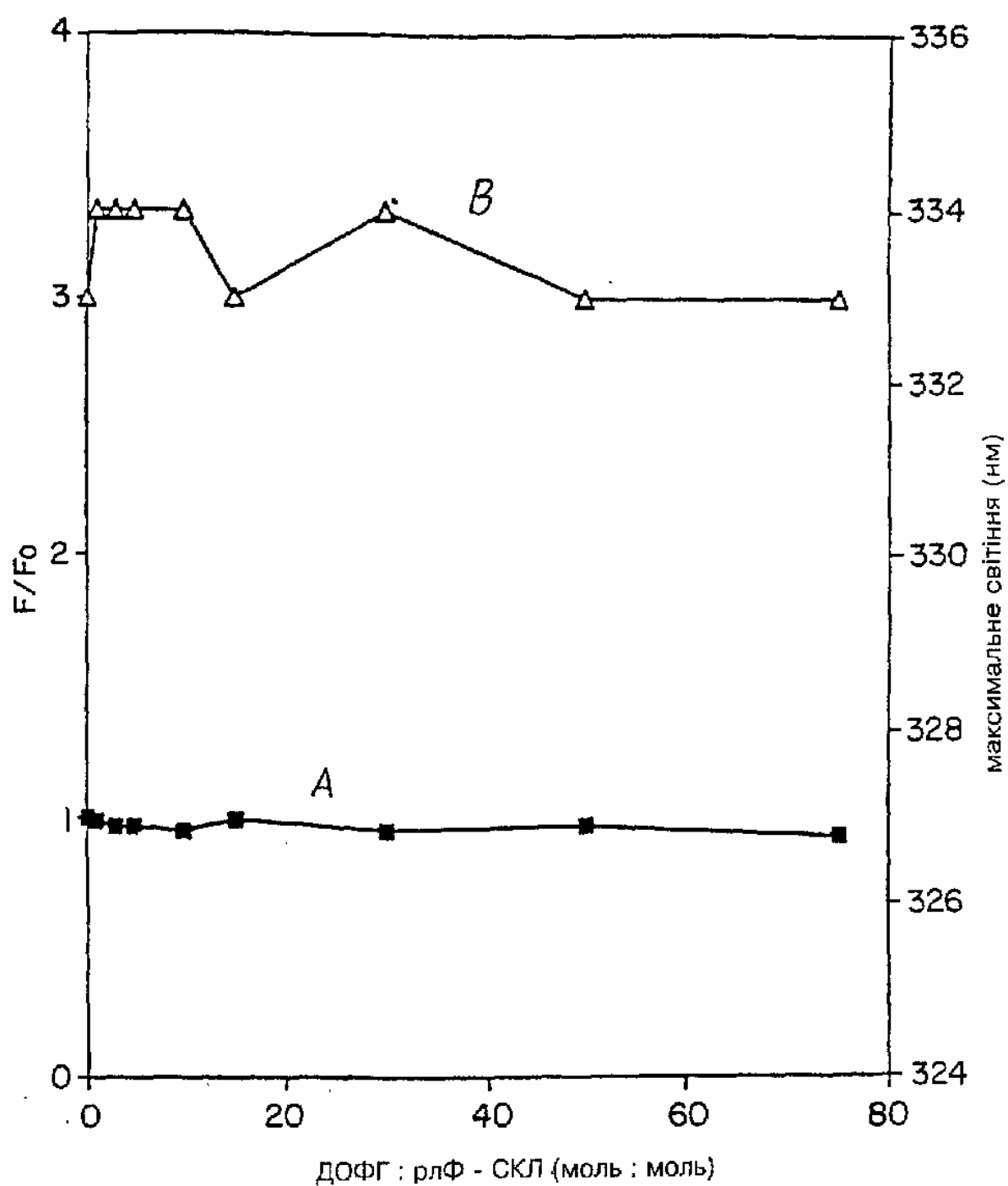
ФІГ. 1



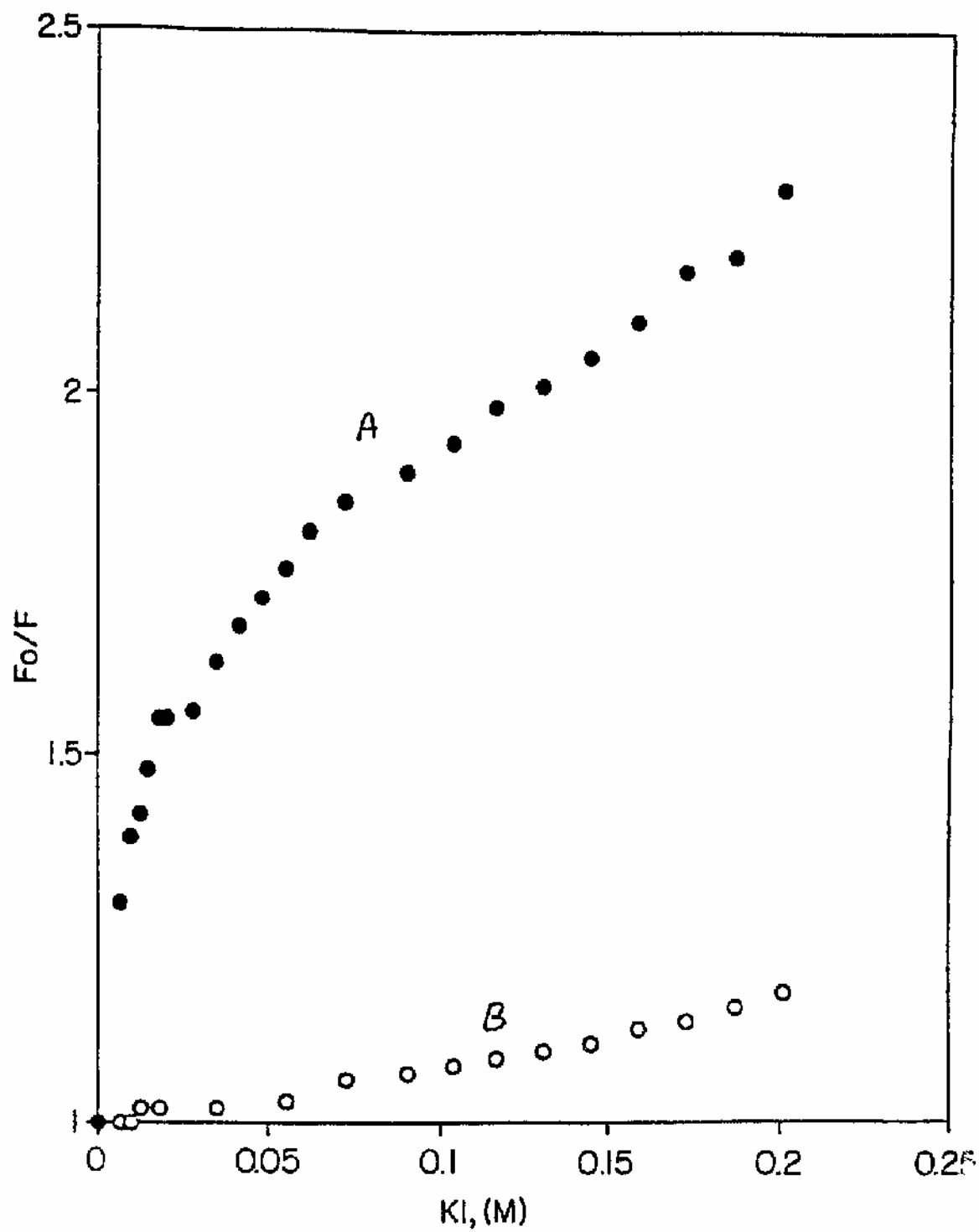
ФІГ. 2А



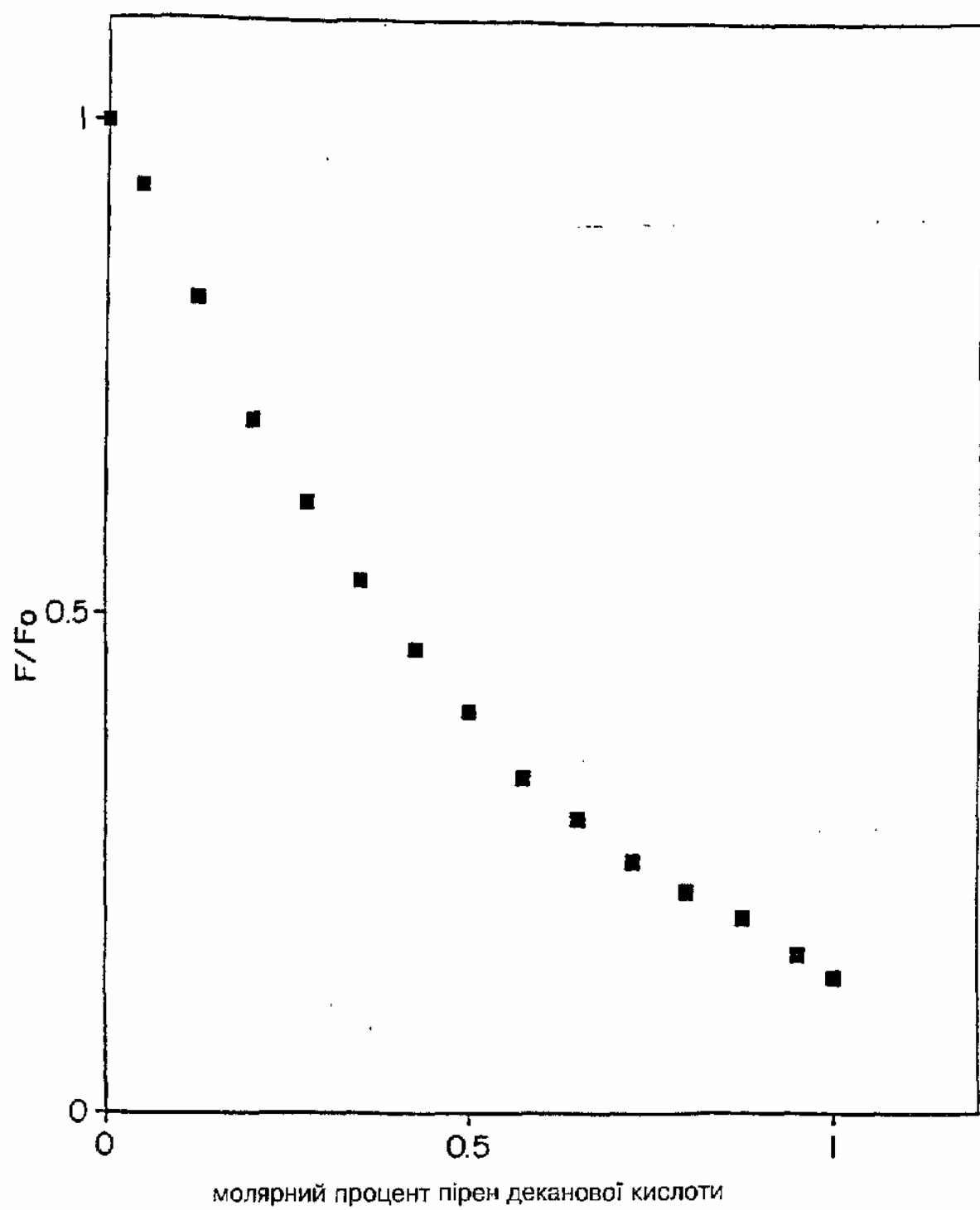
ФІГ. 2В



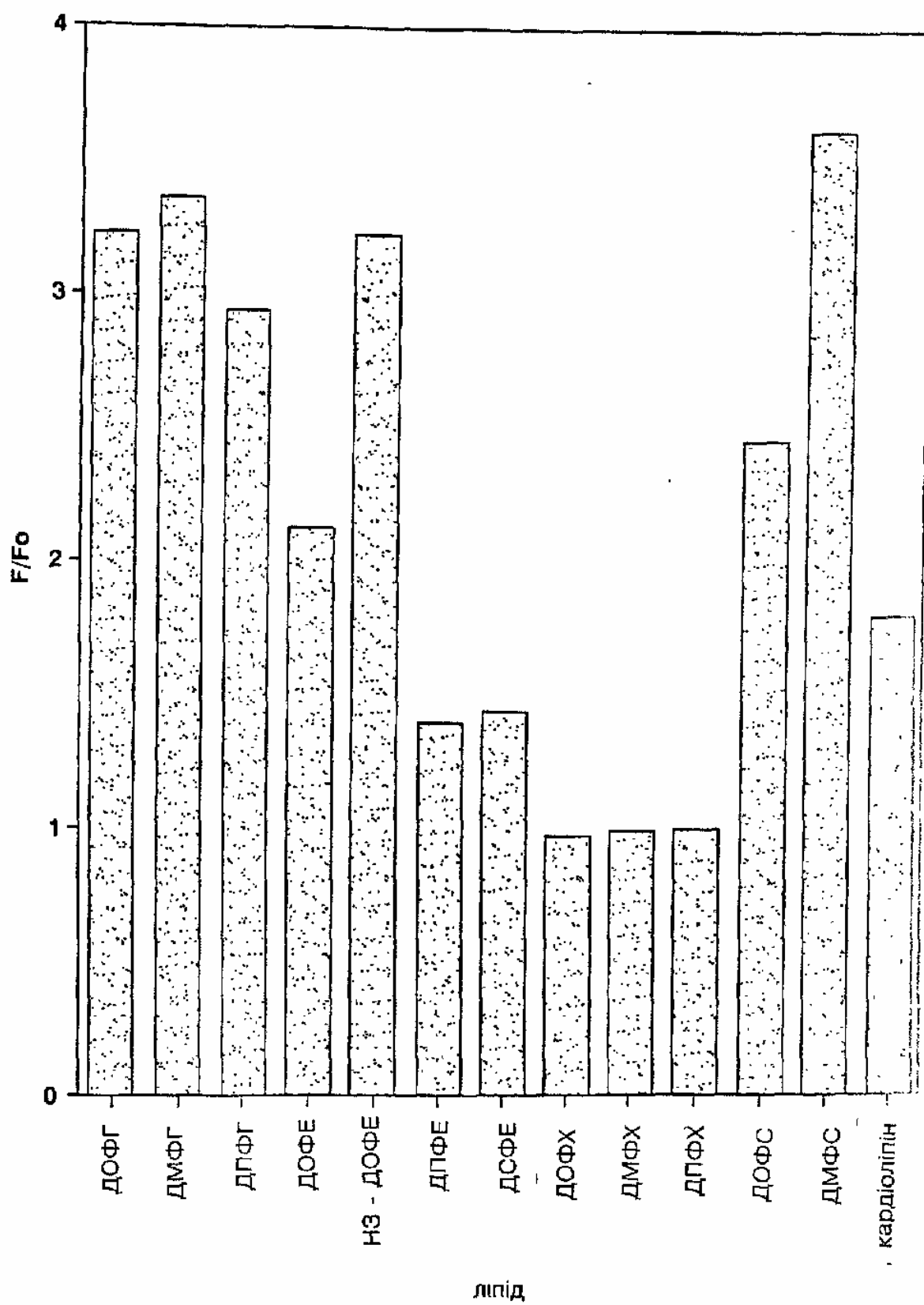
Фиг. 3



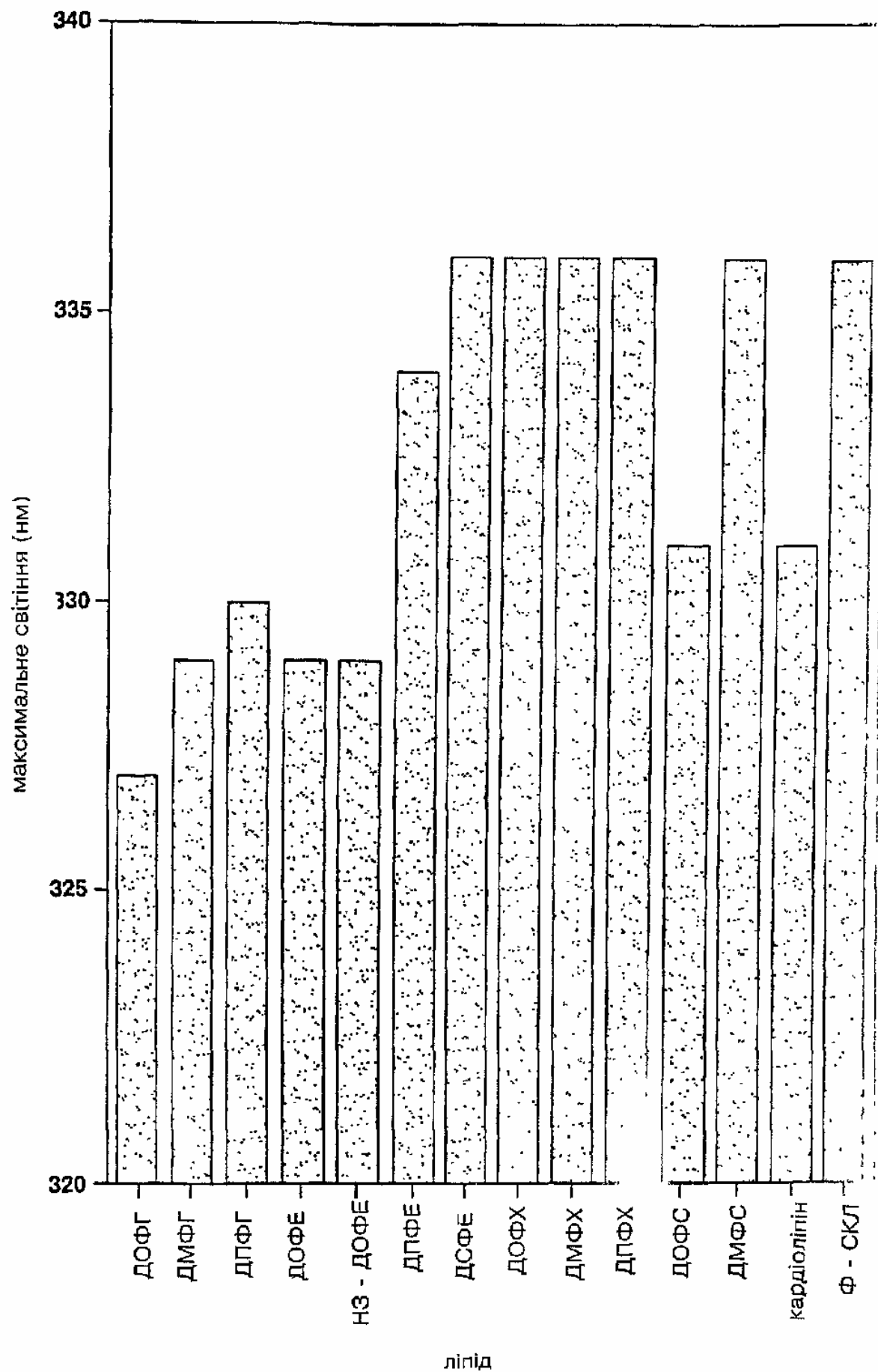
ФІГ. 4



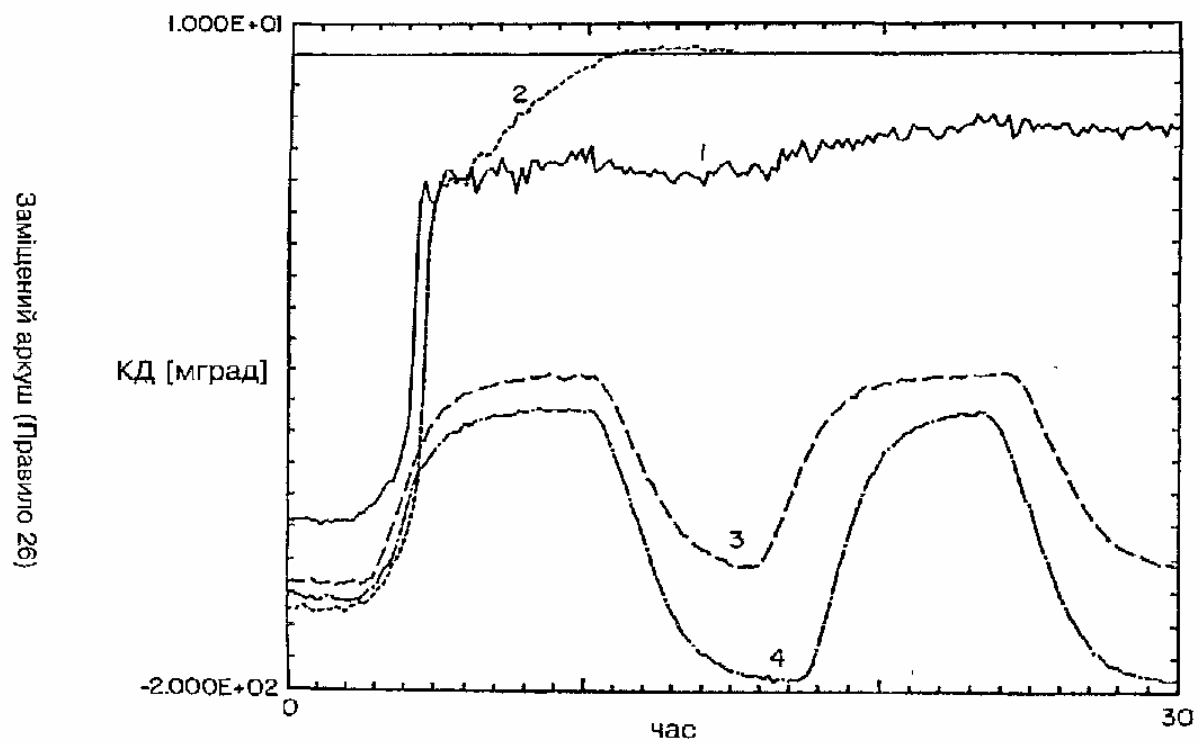
ФІГ. 5



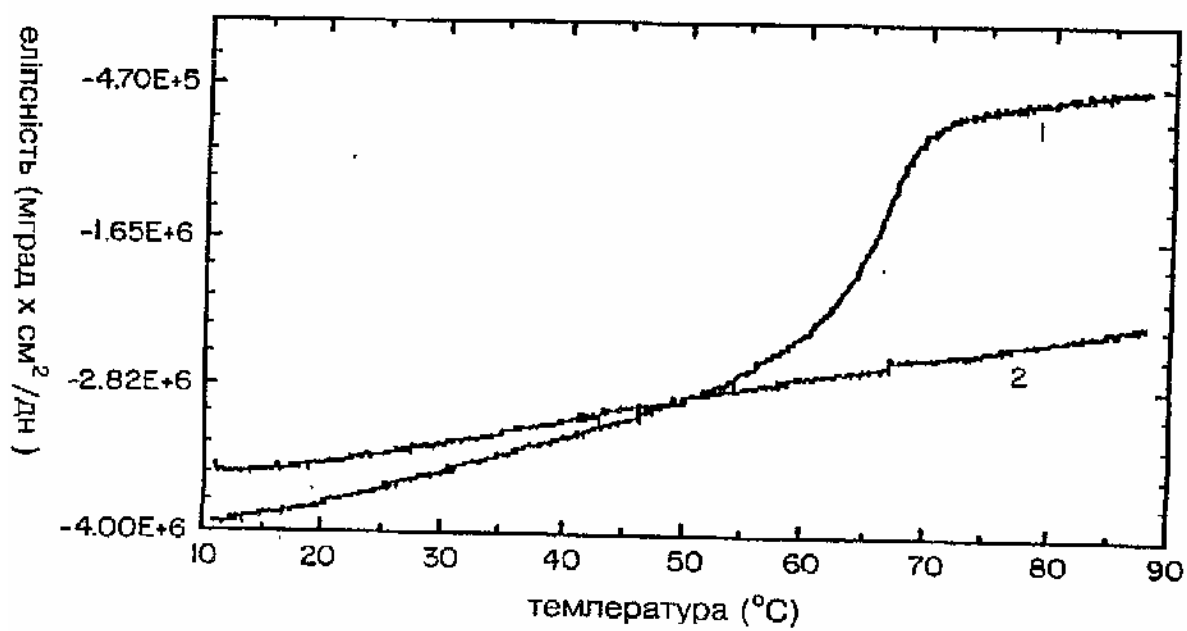
ФІГ. 6



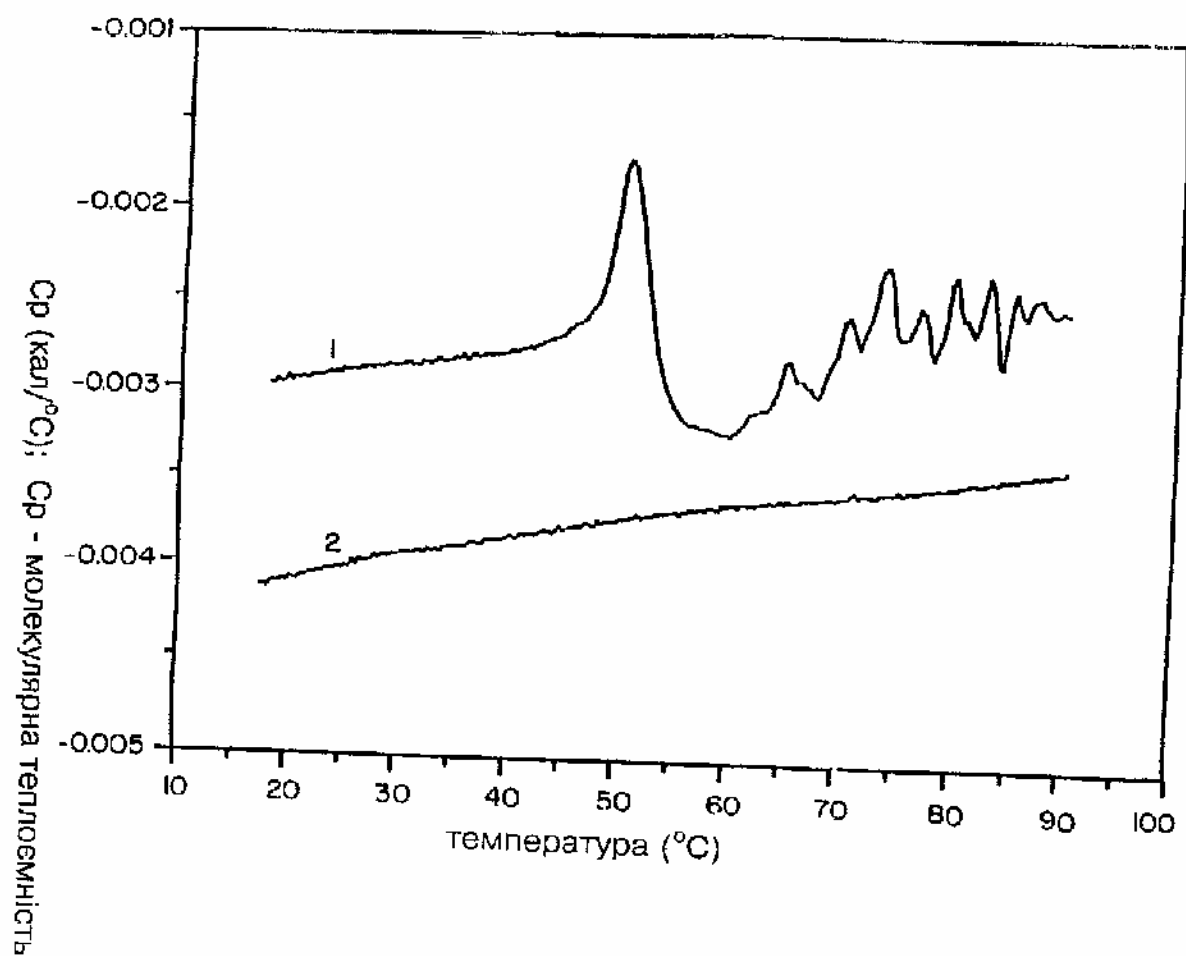
ФІГ. 7



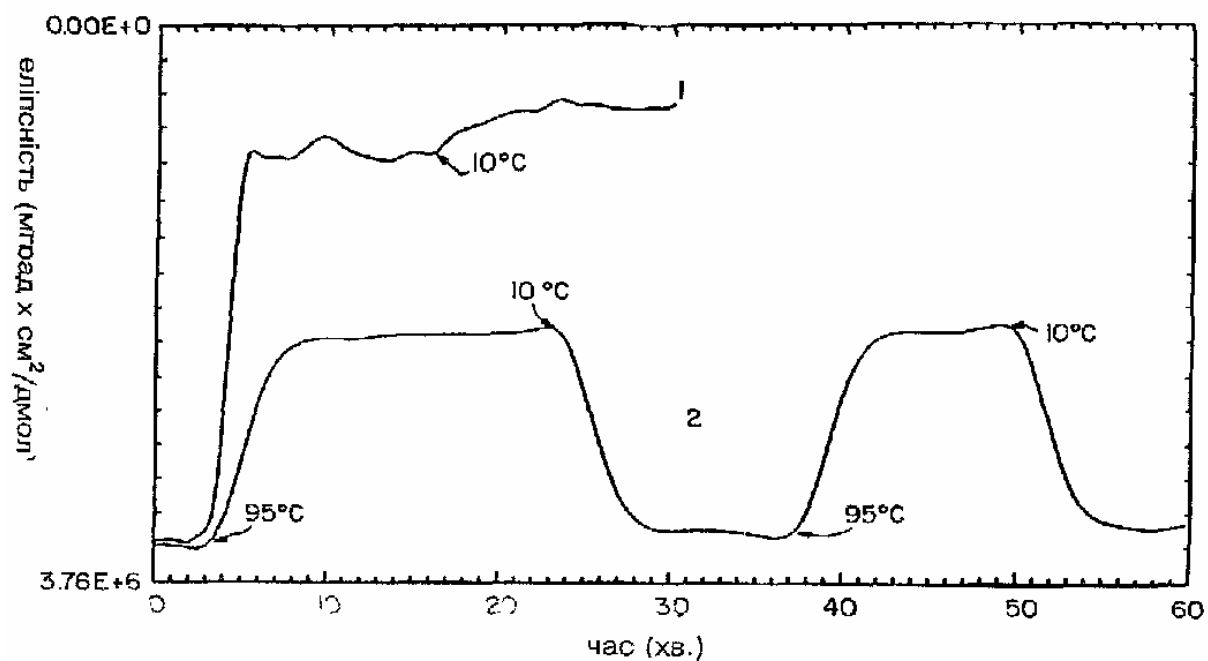
ФІГ. 8



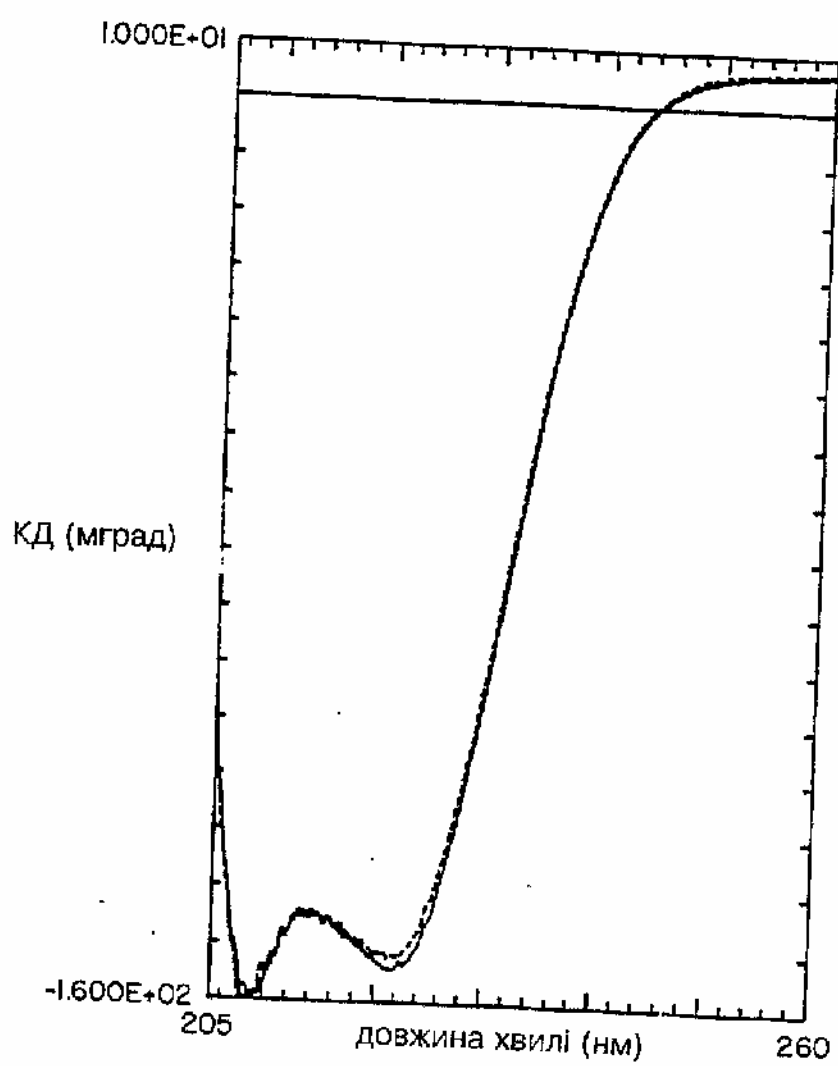
ФІГ. 9



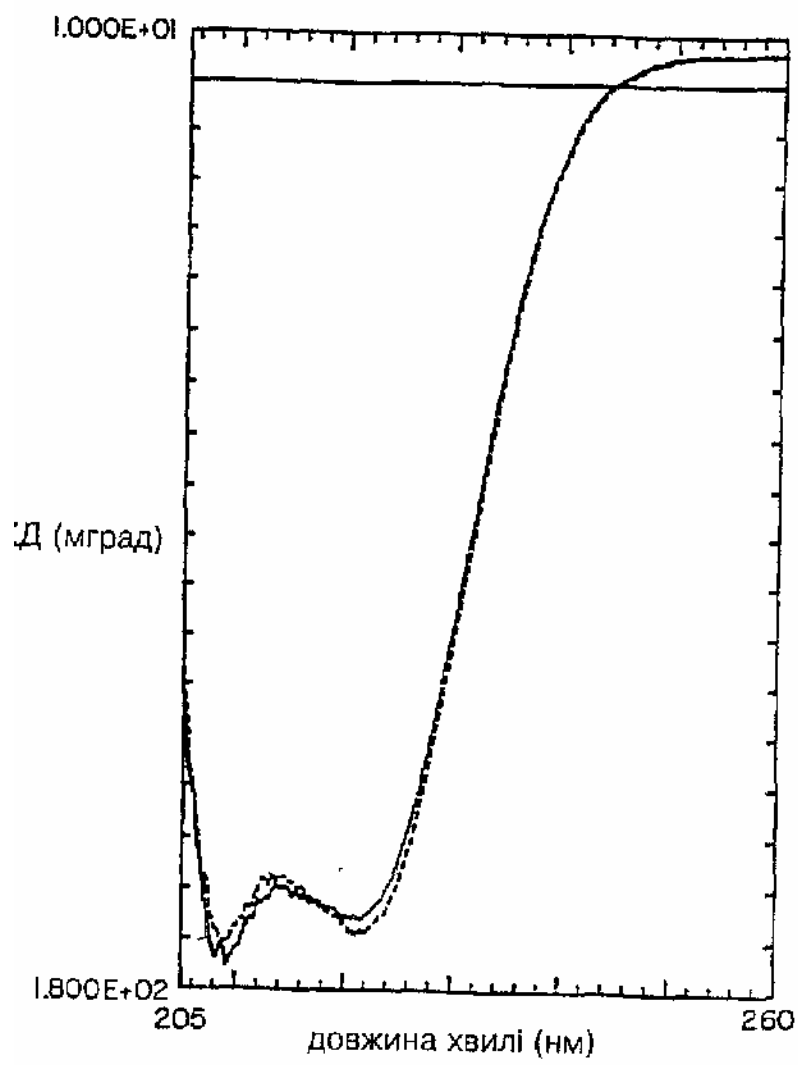
ФІГ. 10



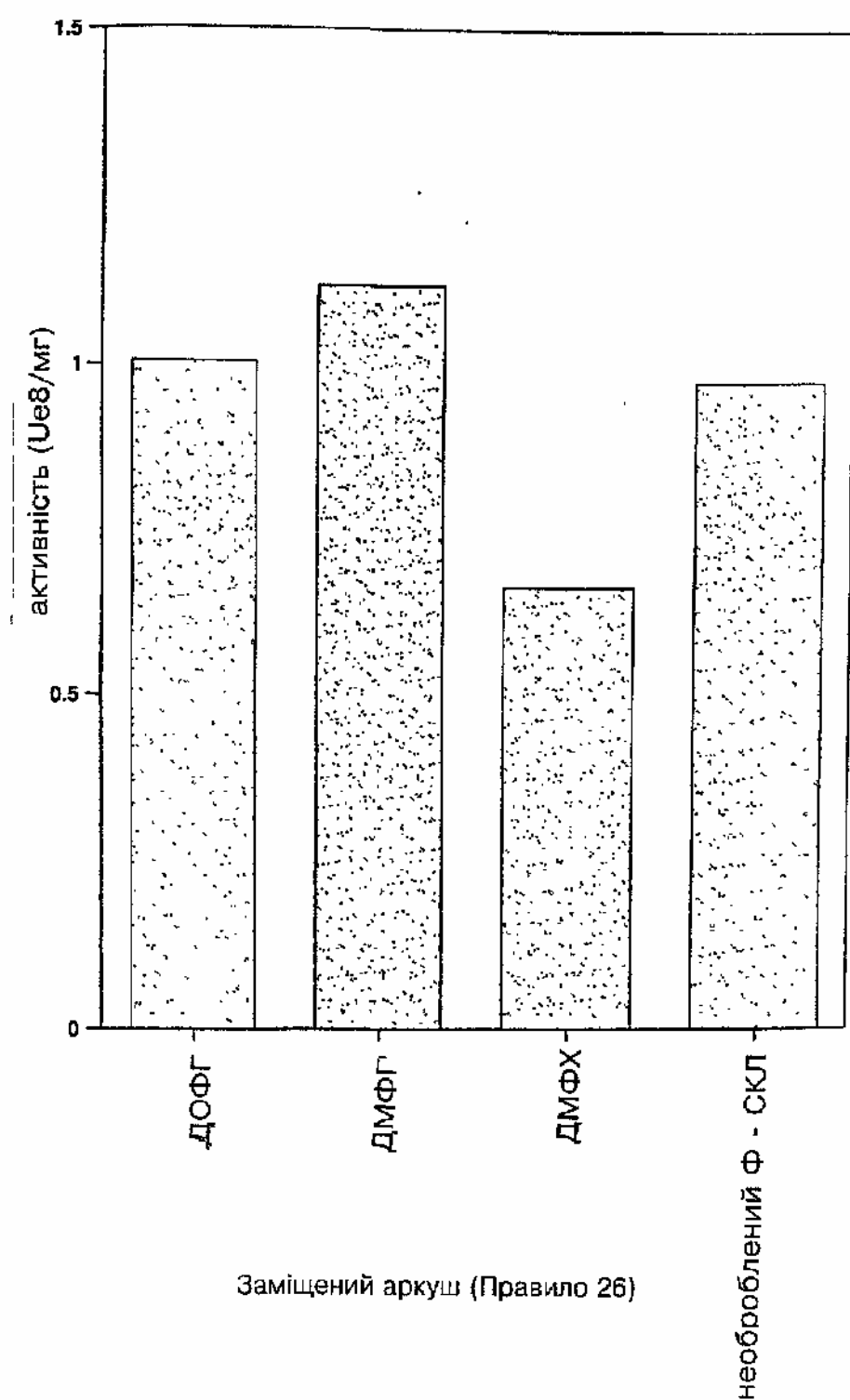
ФІГ. 11



ФІГ. 12

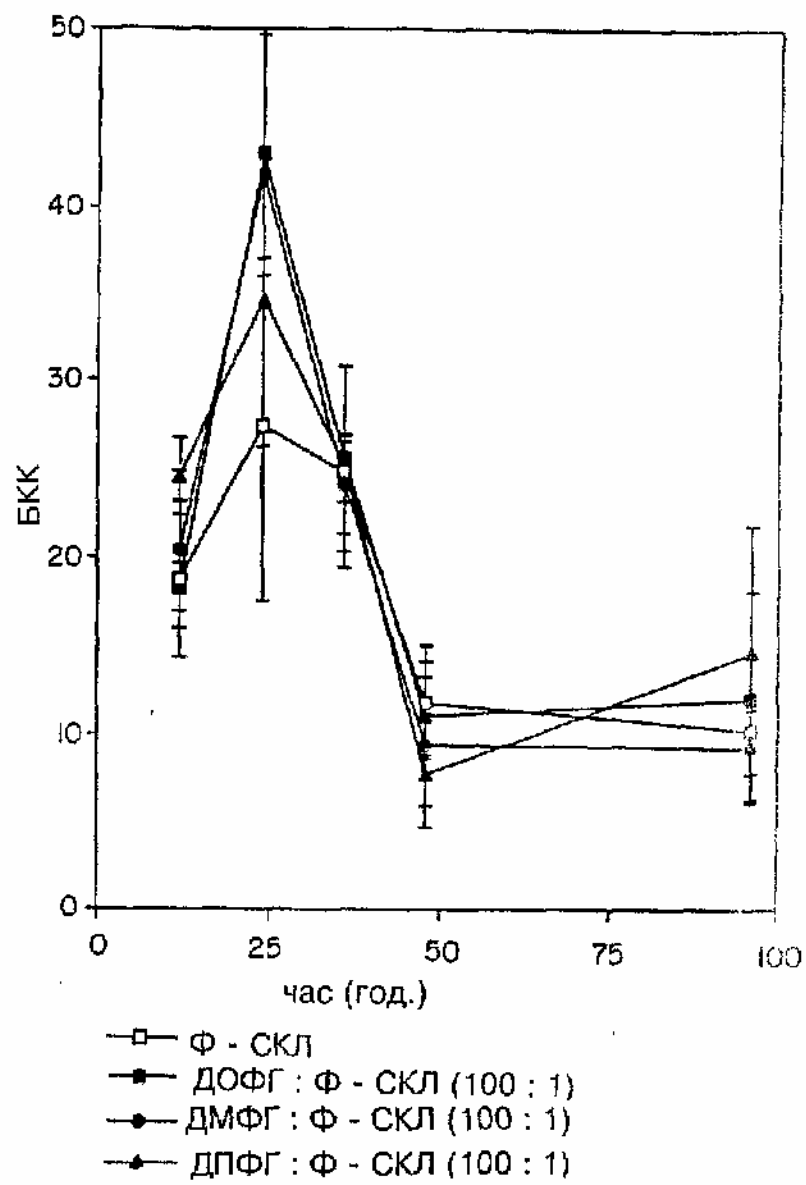


ФІГ. 13

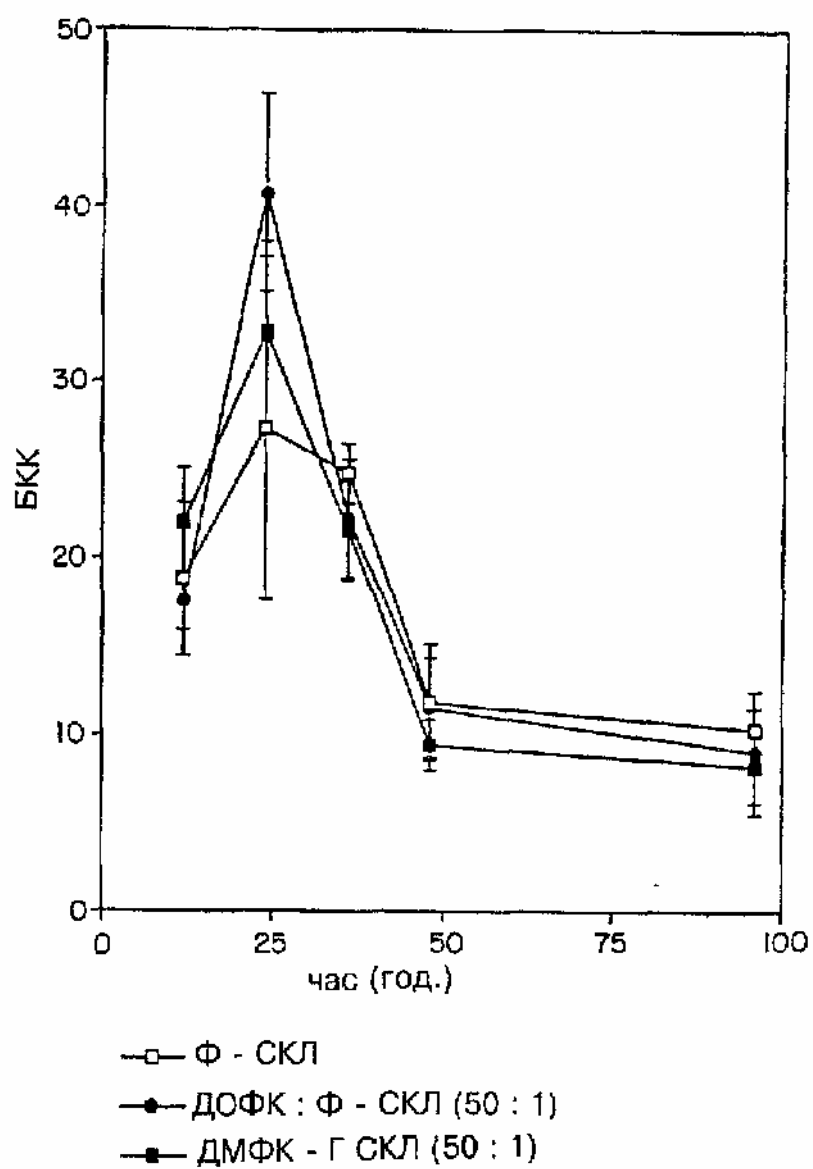


Заміщений аркуш (Правило 26)

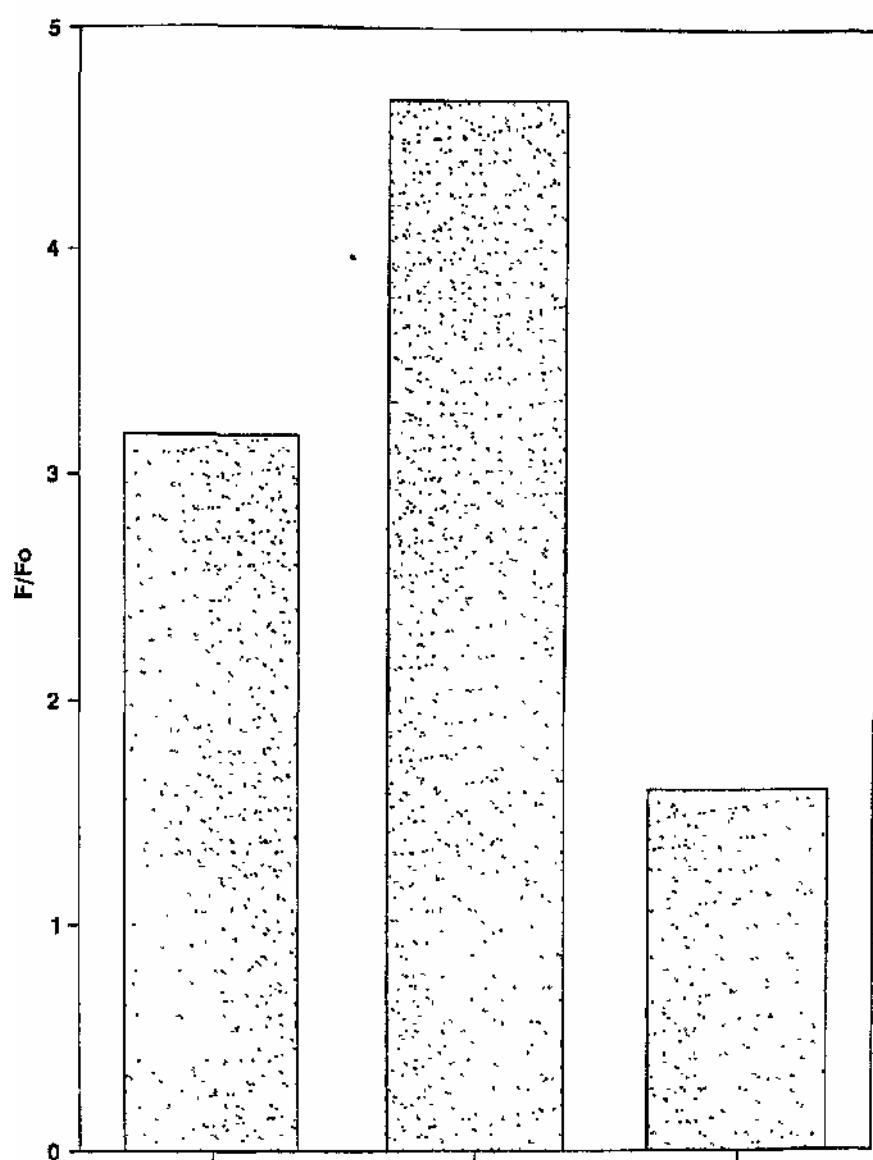
ФІГ. 14



ФІГ. 15

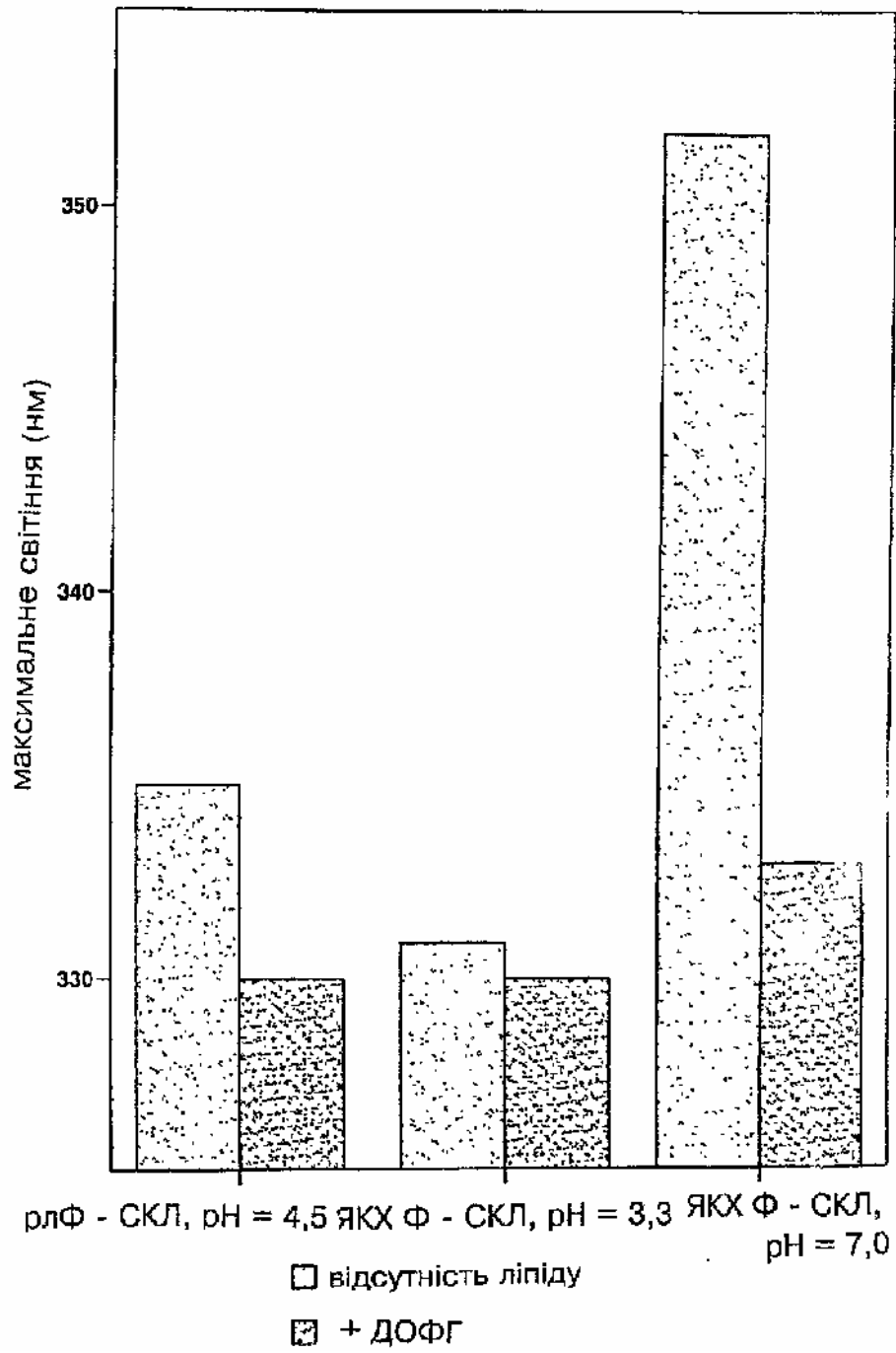


ФІГ. 16

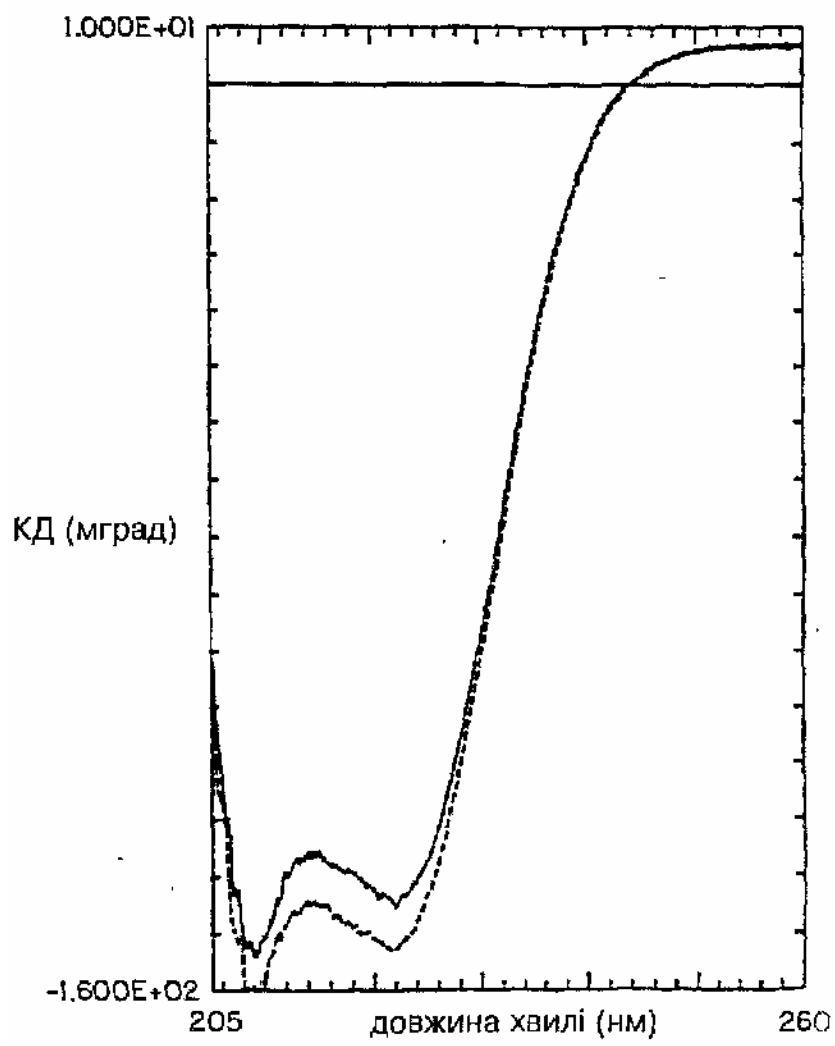


1. $\text{лФ} - \text{СКЛ}, \text{pH} = 4,5$ 2. $\text{ЯКХ Ф} - \text{СКЛ}, \text{pH} = 3,3$ 3. $\text{ЯКХ Ф} - \text{СКЛ}, \text{pH} = 7,0$

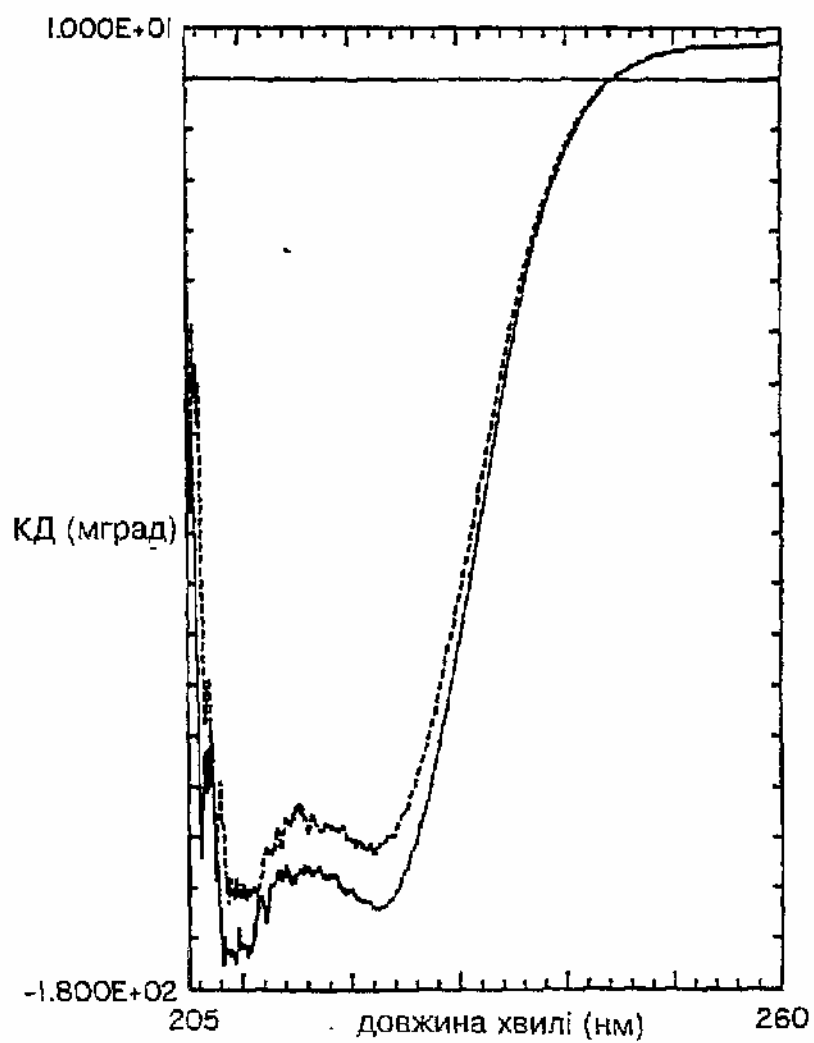
ФІГ. 17



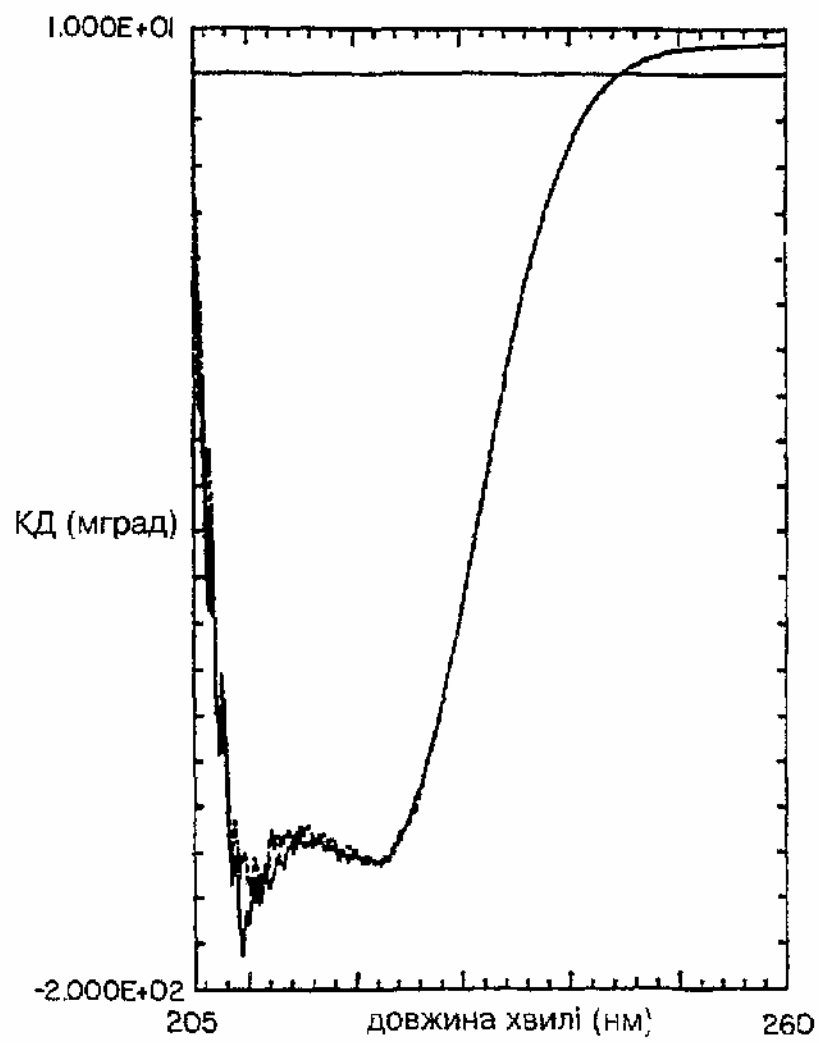
ФІГ. 18



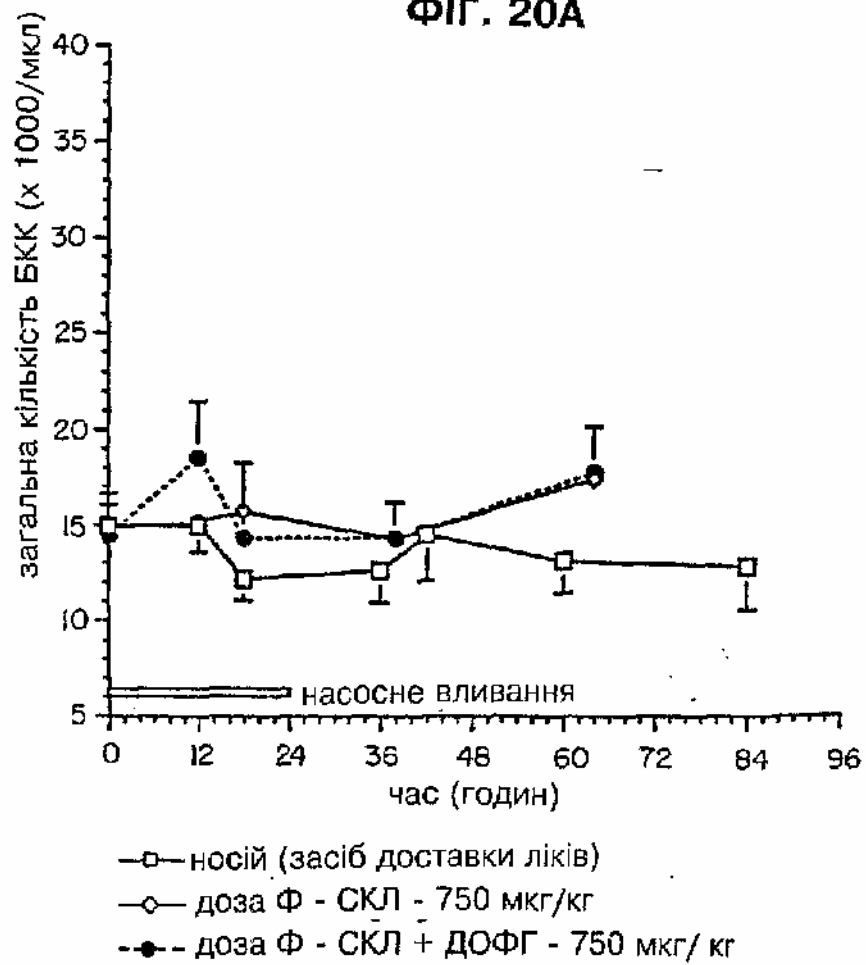
ФІГ. 19А



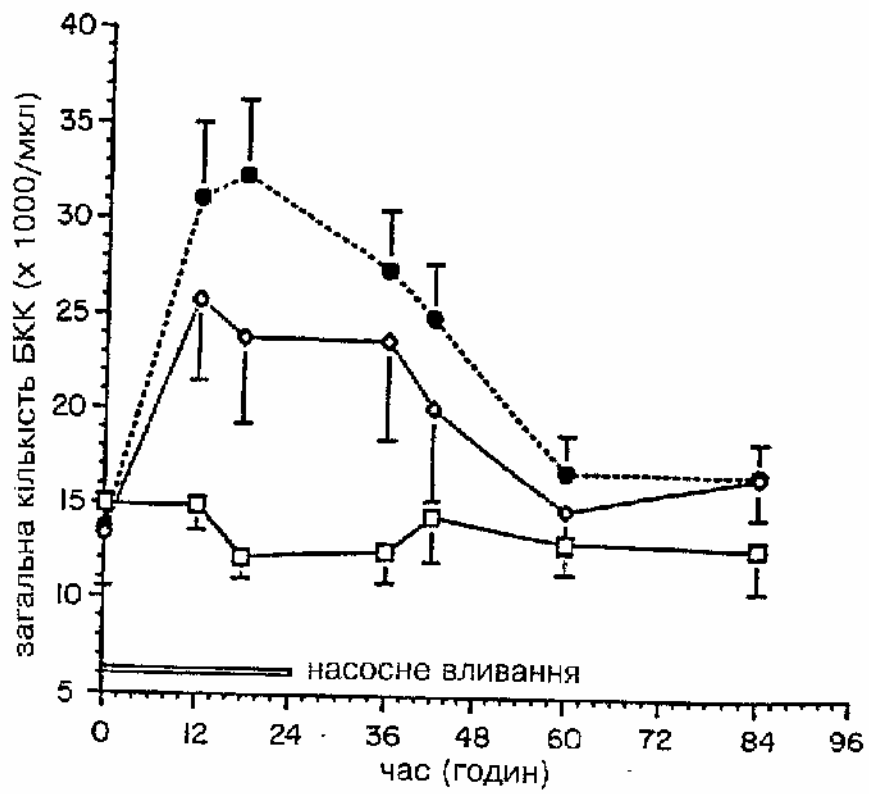
ФІГ. 19В



ФІГ. 20А

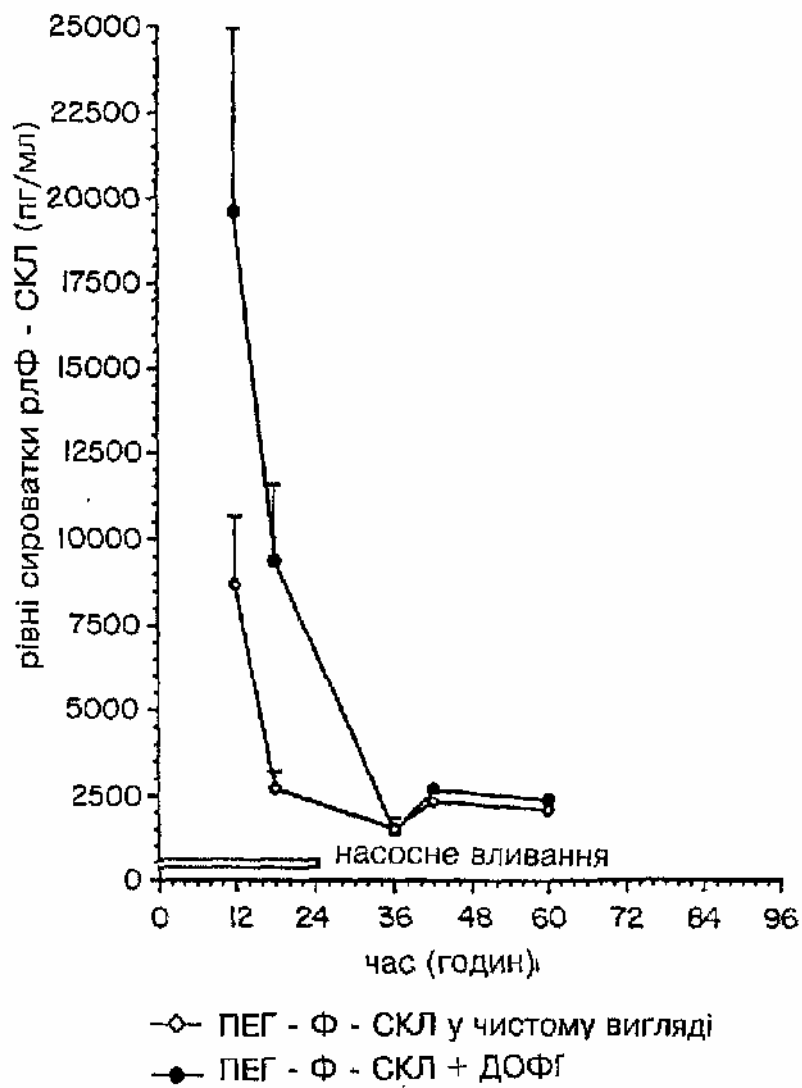


ФІГ. 20В

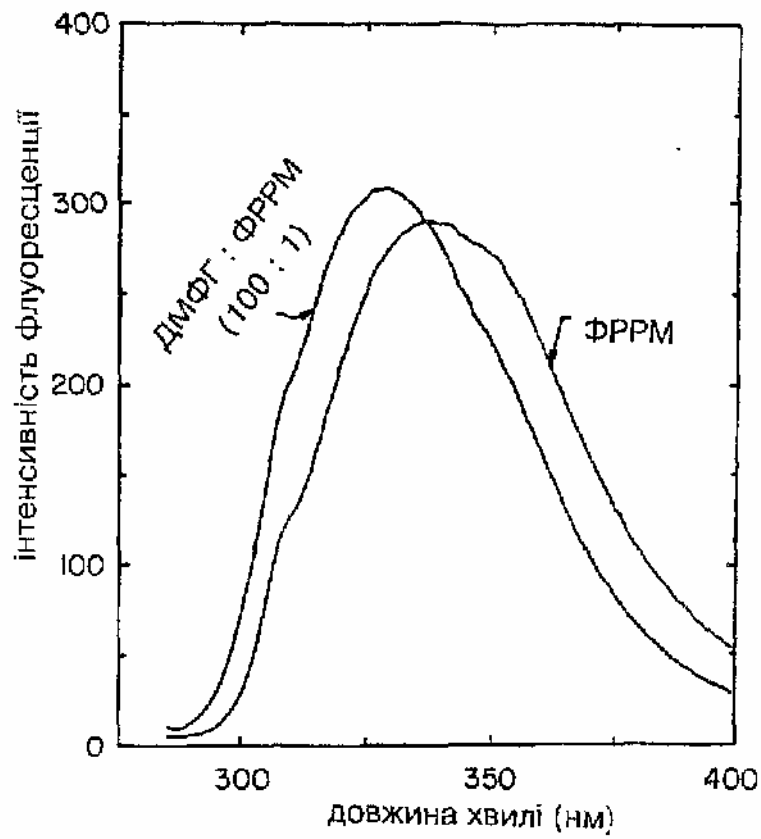


- носій (засіб доставки ліків)
- доза Ф - СКЛ - 750 мкг/кг
- доза Ф - СКЛ + ДОФГ - 750 мкг/кг

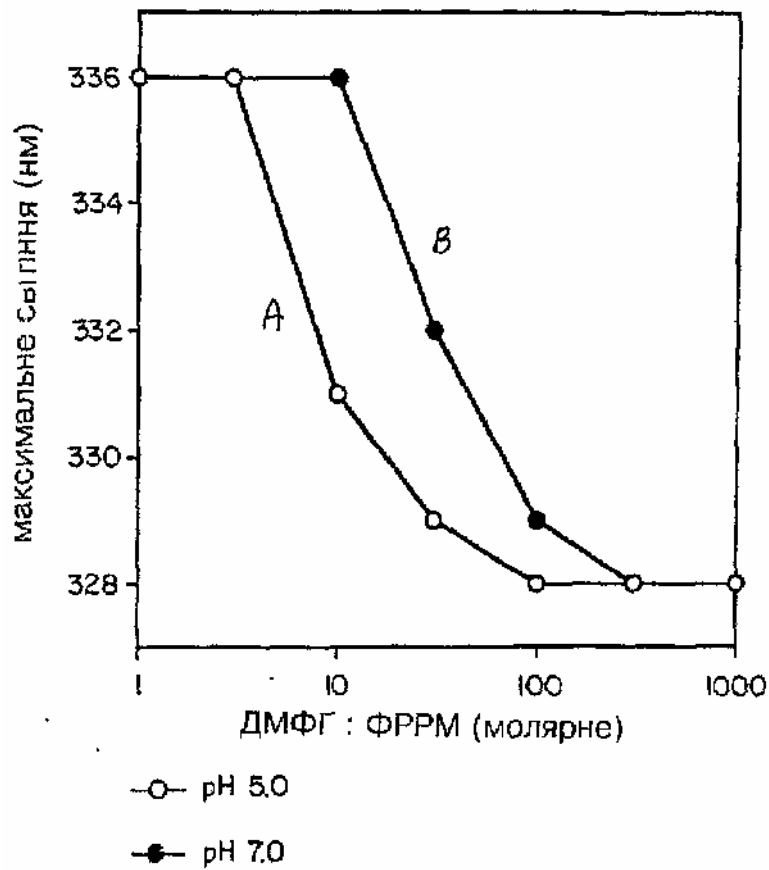
ФІГ. 21



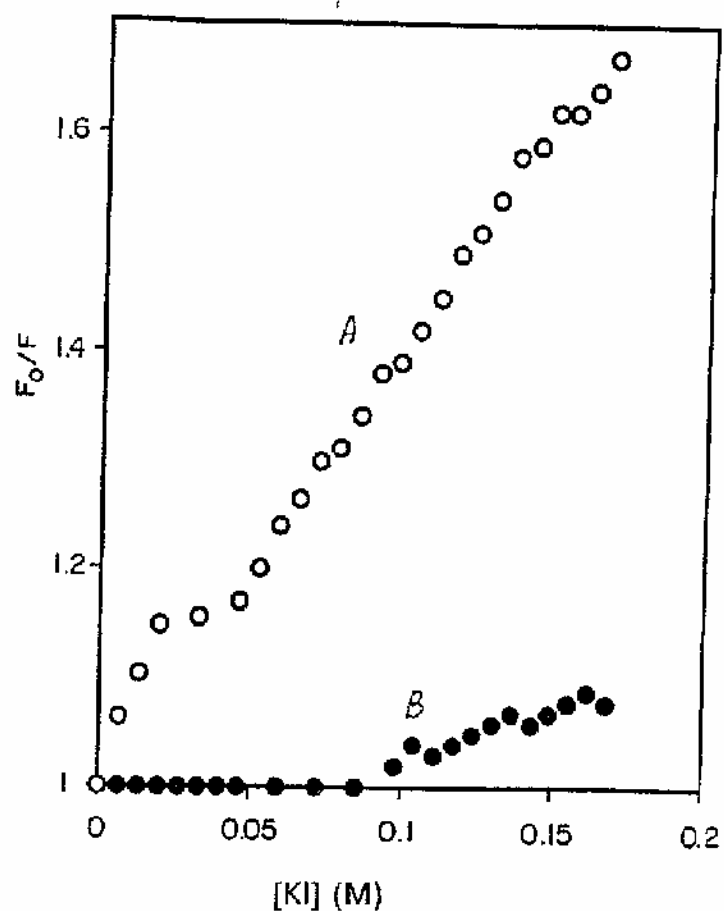
ФІГ. 22



ФІГ. 23



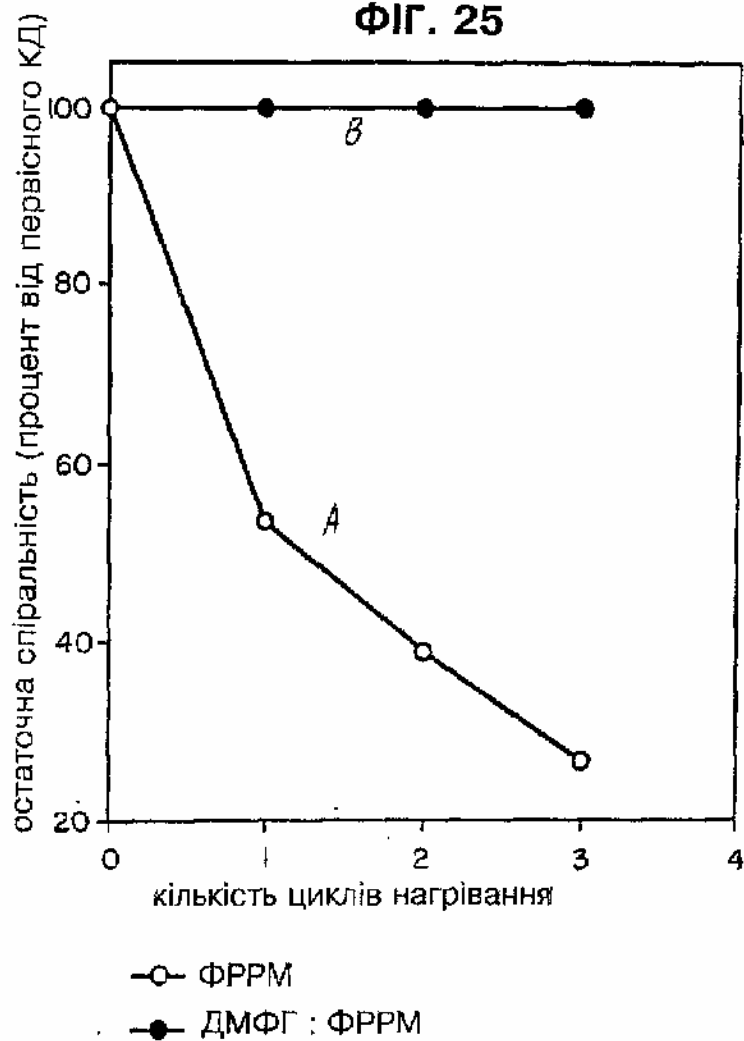
Фиг. 24



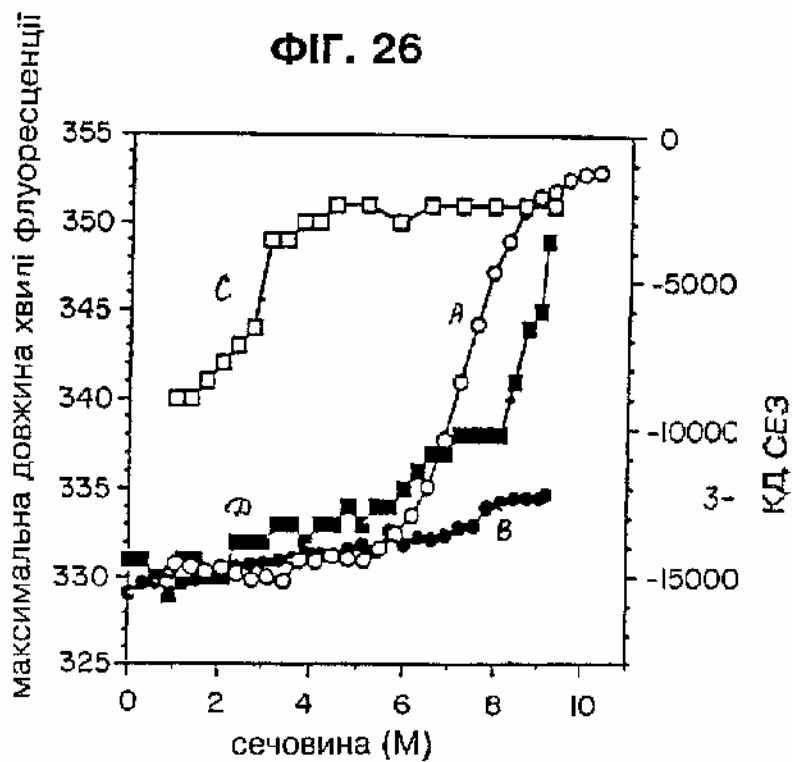
○ ФРРМ

● ДМФГ : ФРРМ (100 : 1)

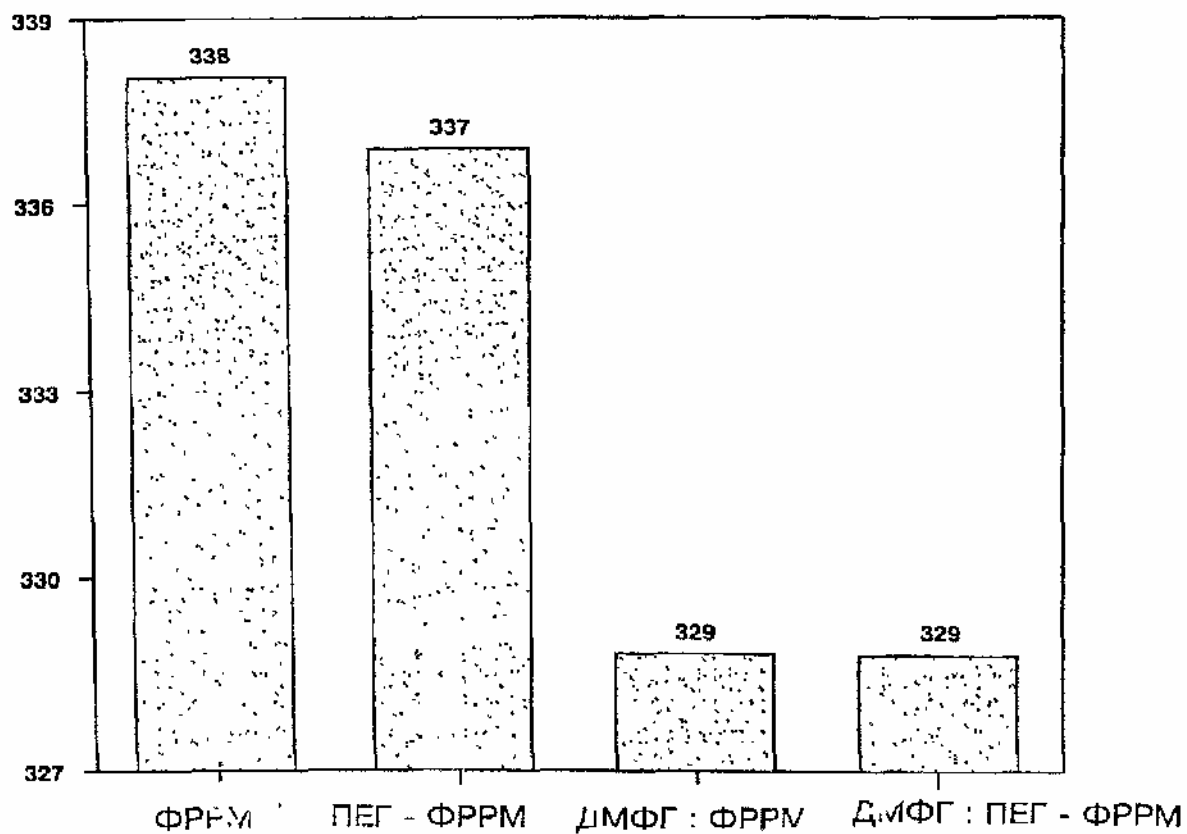
ФІГ. 25



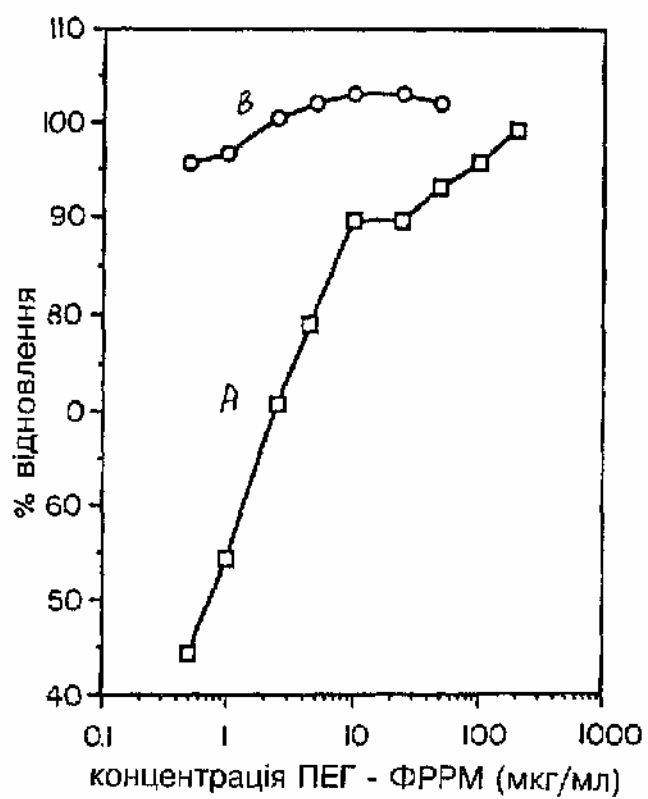
ФІГ. 26



ФІГ. 27



ФІГ. 28



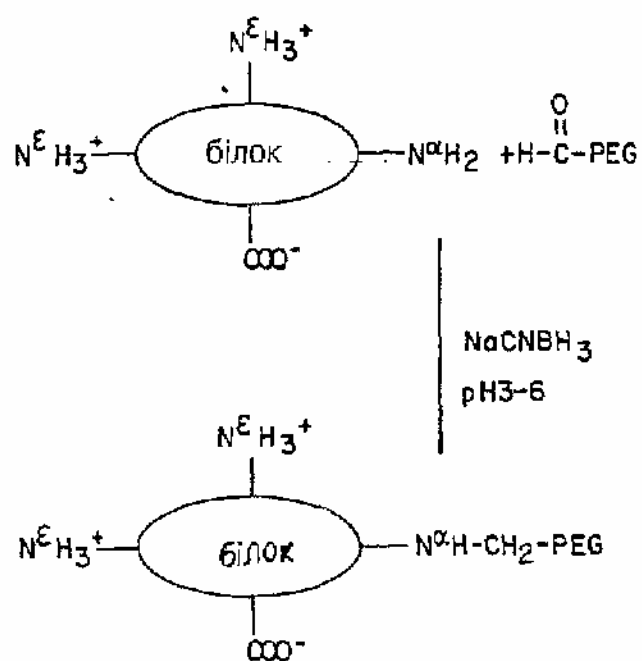
Фиг. 29А

1	CAGGGAGCCACGCCAGCCAAGACACCCCGG	53
-21	MetGluLeuThrGluLeuLeuLeu	-14
70	GTGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGT	119
-13	ValValMetLeuLeuLeuThrAlaArgLeuThrLeuSerSerProAlaProProAlaCys	7
120	GACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGTGACTCCCATGTCCCTTCACAGCAGACTGAGC	179
8	AspLeuArgValLeuSerLysLeuLeuArgAspSerHisValLeuHisSerArgLeuSer	27
180	CAGTGGCCAGAGGTTACCCCTTTGCTTACACCTGTCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGC	239
28	GlnCysProGluValHisProLeuProThrProValLeuLeuProAlaValAspPheSer	47
240	TTGGGAGAATGGAAAACCCAGATGGAGGAGACCAAGGCACAGGACATTCTGGGAGCAGTG	299
48	LeuGlyGluTrpLysThrGlnMetGluGluThrLysAlaGlnAspIleLeuGlyAlaVal	67
300	ACCCCTCTGCTGGAGGGAGTGATGGCAGCACGGGACAACCTGGGACCCACTTGCCTCTCA	359
68	ThrLeuLeuLeuGluGlyValMetAlaAlaArgGlyGlnLeuGlyProThrCysLeuSer	87
360	TCCCTCCTGGGGCAGCTTTCTGGACAGSTCCGTCTCCTTCCTTGGGGCCCTGCAGAGCCTC	419
88	SerLeuLeuGlyGlnLeuSerGlyGlnValArgLeuLeuLeuGlyAlaLeuGlnSerLeu	107
420	CTTGAACCCAGCTTCCTCACAGGGCAGGACCACAGCTCACAAGGATCCCAATGCCATCC	479
108	LeuGlyThrGlnLeuProProGlnGlyArgThrThrAlaHisLysAspProAsnAlaIle	127
480	TTCTGAGCTTCCAACACCTGCTCCGAGGAAAGGTGCGTTTCTGATGCTTGTAGGAGGG	539
128	PheLeuSerPheGlnHisLeuLeuArgGlyLysValArgPheLeuMetLeuValGlyGly	147
540	TCCACCCCTCTGCGTCAGGCGGGCCCCACCCACCACAGCTGTCCCCAGCAGAACCTCTCTA	599
148	SerThrLeuCysValArgArgAlaProProThrThrAlaValProSerArgThrSerLeu	167

Фиг. 29В

GTCTTCACACTGAACGAGCTCCCAAACAGGACTTCTGGATTGTTGGAGACAAACTTCACT	659
ValLeuThrLeuAsnGluLeuProAsnArgThrSerGlyLeuLeuGluThrAsnPheThr	187
GCCTCAGCCAGAATACTGGCTCTGGGCTTCTGAAGTGGCAGCAGGGATTTCAGAGCCAAG	719
AlaSerAlaArgThrThrGlySerGlyLeuLeuLysTrpGlnGlnGlyPheArgAlaLys	207
ATTCTGGTCTGCTGAACCAAACCTCCAGGTCCTTGGACCAAATCCCCGGATACCTGAAC	779
IleProGlyLeuLeuAsnGlnThrSerArgSerLeuAspGlnIleProGlyTyrLeuAsn	227
AGGATACACGAACCTCTGAATGGAACCTCGTGGACTCTTTCTGGACCCTCACGCAGGACC	839
ArgIleHisGluLeuLeuAsnGlyThrArgGlyLeuPheProGlyProSerArgArgThr	247
CTAGGAGCCCCGGACATTTCTCAGGAACATCAGACACAGGCTCCCTGCCACCCAACTC	899
LeuGlyAlaProAspIleSerSerGlyThrSerAspThrGlySerLeuProProAsnLeu	267
CAGCCTGGATATTCTCCTTCCCCAACCCATCCTCTACTGGACAGTATACGCTCTTCCCT	959
GlnProGlyTyrSerProSerProThrHisProProThrGlyGlnTyrThrLeuPhePro	287
CTTCCACCCACCTTGCCCAACCCCTGTGGTCCAGCTCCACCCCTGCTTCTGACCCCTTCT	1019
LeuProProThrLeuProThrProValValGlnLeuHisProLeuLeuProAspProSer	307
GCTCCAACGCCCAACCCCTACCAGCCCTCTTCTAAACACATCCTACACCCACTCCCAGAAT	1079
AlaProThrProThrProThrSerProLeuLeuAsnThrSerTyrThrHisSerGlnAsn	327
CTGTCTCAGGAAGGGTAAGGTTCTCAGACACTGCCGACATCAGCATTTGTCTCGTGACAG	1139
LeuSerGlnGluGlyEnd	
CTCCCTTCCCTGCAGGGCGCCCTGGGAGACAACCTGGACAAGATTTCTACTTTTCTCCTG	1199
AAACCCAAAGCCCTGGTAAAAGGGATACACAGGACTGAAAAGGGAATCATTTTCACTGT	1259
ACATTATAAACCTTCAGAAGCTATTTTAAAGCTATCAGCAATACTCATCAGAGCAGCT	1319
AGCTCTTTGGTCTATTTTCTGCA	1342

ФІГ. 30



ФІГ. 31

