



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 26640 (13) C1
(51) A 61 K 9/127, A 61 K 38/19ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ ЛІПОСОМНИЙ ПУХИРЕЦЬ ТА ВВЕДЕНИЙ У НЬОГО БІЛКОВИЙ МЕДИКАМЕНТ, І СПОСІБ ЇЇ ПРИГОТУВАННЯ

1

2

- (21) 95073159
(22) 29.09.94
(24) 11.10.99
(31) 08/132413
(32) 06.10.93
(33) US
(86) /US94/11081 (29.09.94)
(46) 11.10.99. Бюл. № 6
(56) 1. WO № 92/04009, 19.03.92.
2. EP № 0456842, 21.11.91.
3. EP № 0457837, 27.11.91.
4. Gregoriadis G., "Liposomes", Drug Carriers in Biology and Medicine, N.-j. Academic Press, 1979, v. 14, p. 287-341.
(72) Колліна Девід (US), Ча Янхик (US)
(73) Амген Інк. (US)
(57) 1. Композиція, що містить ліпосомний пухирець та введений у нього білковий медикament, що відрізняється тим, що в якості ліпосомного пухирця містить негативно заряджений фосфоліпід, а в якості білкового медикamentу – протеїн, здатний до переходу в розпрямлене стані глобули, при співвідношенні ліпідів до протеїну не менше 10:1.
2. Композиція по п. 1, що відрізняється тим, що вона має рН 3,0–7,5.
3. Композиція по п. 1, що відрізняється тим, що в якості ліпосомного пухирця містить фосфоліпід, вибраний з групи, що включає: діолеїлфосфатидилглицерол (DOPG), диміристоїлфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмітоїлфосфатидилглицерол (DPPG), яичний фосфатидилглицерол, діолеїлфосфатидилетаноламін (DOPE), яичний фосфатидилетаноламін, діолеїлфосфатидову кислоту (DOPA), диміристоїлфосфатидову кислоту (DMPA), дипальмітоїлфосфатидову кислоту (DPPA), діолеїлфосфатидилсерин (DOPS), диміристоїл-

фосфатидилсерин (DMPS), дипальмітоїлфосфатидилсерин (DPPS), яичний фосфатидилсерин, лізофосфатидилглицерол, лізофосфатидилетаноламін і лізофосфатидилсерин.

4. Композиція по п. 1, що містить в якості названого протеїну цитокін.

5. Композиція по п. 4, що містить цитокін, що є гематопоетичним фактором.

6. Композиція по п. 5, що відрізняється тим, що гематопоетичний фактор вибраний з групи, що включає гранулоцит колонієстимулюючий фактор (G-CSF) і гранулоцит макрофаг колонієстимулюючий фактор (GM-CSF).

7. Композиція по п. 5, що відрізняється тим, що гематопоетичним фактором є G-CSF.

8. Композиція по п. 7, що відрізняється тим, що G-CSF є природним людським G-CSF або продуктом прокаріотної або еукаріотної експресії клітин-хазяїна.

9. Композиція по п. 7, що відрізняється тим, що G-CSF є хімічно модифікованим.

10. Композиція по п. 9, що відрізняється тим, що хімічна модифікація G-CSF проведена поліетиленгліколем.

11. Композиція по п. 1, що відрізняється тим, що вона додатково містить фармацевтично прийнятний носій.

12. Композиція по п. 1, що відрізняється тим, що вона додатково містить в якості названого протеїну рекомбінантний G-CSF (rhG-CSF), отриманий за допомогою E. coli, а в якості ліпосомного пухирця – DOPG при співвідношенні DOPG і rhG-CSF, відповідно-

(19) UA (11) 26640 (13) C1

но, 50:1 и дополнительно содержит 10 мМ ацетата натрия, и имеет pH 4,5.

13. Способ приготовления композиции, содержащей липосомный пузырек с введенным в него белковым медикаментом, отличающийся тем, что в качестве липосомного пузырька используют отрицательно заряженный фосфолипид, а в качестве белкового медикамента в него вводят протеин, способный к переходу в распрямленное состояние глобулы.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанная композиция имеет pH 3,0–7,5 и отношение липида к протеину не менее 10:1.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что в качестве липосомного пузырька используют фосфолипид, выбранный из группы, включающей: диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG), яичный фосфатидилглицерол, диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), яичный фосфатидилэтанолламин, диолеилфосфатидовую кислоту (DOPA), димиристоилфосфатидовую кислоту (DMPA), дипальмитоилфосфатидовую кислоту (DPPA), диолеилфосфатиделсерин (DOPS), димиристоилфосфатидилсерин (DMPS), дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS), яичный фос-

фатидилсерин, лизофосфатидилглицерон, лизофосфатидилэтанолламин и лизофосфатидилсерин.

16. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанным протеином является цитокин.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что названный цитокин является гематopoэтическим фактором.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что названный гематopoэтический фактор выбран из группы, состоящей из G-CSF и GM-CSF.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что названным гематopoэтическим фактором является G-CSF.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что G-CSF является природным человеческим G-CSF или продуктом прокариотной или эукариотной экспрессии клетки-хозяина.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что G-CSF является химически модифицированным.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что химическая модификация G-CSF проведена полиэтиленгликолем.

23. Способ по п. 13, отличающийся тем, что в композицию дополнительно вводят фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение относится к протеину: структурам фосфолипида, которые используют для стабилизации вторичной и третичной структуры протеинов, способных к переходу в распрямленное глобулярное состояние. В особенности, это изобретение относится к G-CSF: фосфолипидным композициям с повышенной стабильностью и способностью к использованию в G-CSF рецептурах и новых поставляющих проводниках G-CSF.

Обнаружено несколько видов протеинов, способных к переходу в распрямленное глобулярное состояние (MGS) (Van der Goot, F.G., Nature 354, 408–410 (1991)). Протеины в распрямленном глобулярном состоянии проявляют вторичную структуру, сравнимую со структурой природного протеина, однако у них отсутствует жесткая третичная структура (Pitsyn et al., FEBS Letters 262:1, 20–24 (1990)). В некоторых

случаях переход в это состояние сопровождается раскрытием ранее скрытых гидрофобных звеньев протеина. При раскрытии критических гидрофобных остатков, MGS может находиться в промежуточном состоянии между агрегированием и осаждением протеинов. MGS-конформация может быть обнаружена при сравнении кругового дихроизма в дальнем УФ диапазоне со спектром ароматических боковых цепей (ближний УФ круговой дихроизм и флуоресценция). Распрямленное глобулярное состояние показывает спектральные изменения ароматических групп в отсутствие изменений дальнего УФ кругового дихроизма (Bychkova et al. FEBS Letters 238:231–234 (1988)) и может быть вовлеченным в мембранную проницаемость некоторыми видами протеинов (Bychkova et al. FEBS Letters 238:231–234 (1988); Van der Goot, F.G., Nature 354, 408–410 (1991)).

Для перехода в MGS до агрегирования известны два вида протеинов: гранулоцит колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцит макрофаг колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В то время, как эти два вида протеинов могут быть стабилизированы при некоторых определенных условиях, существует необходимость продления жизни этих материалов стабилизацией вторичной и третичной структуры протеинов.

Человеческий рекомбинантный G-CSF селективно стимулирует нейтрофилы, вид белых кровяных клеток, используемых для борьбы с инфекцией. Общепринято, Filgrastim, что рекомбинантный G-CSF является пригодным для использования в терапии. Структура G-CSF в различных условиях подверглась интенсивному изучению (Lu et al., J. Biol. Chem. Vol. 267, 8770-8777 (1992)). Ввиду гидрофобного характера трудно получить G-CSF с продолжительной жизнеспособностью. Рецептуры некоторых гидрофобных протеинов теряют свою активность в результате образования димера или агрегатов более высокого порядка (макроагрегатов) в процессе продолжительного хранения. Другие химические превращения, такие как деамидация и окисление, также могут возникнуть в процессе хранения. Кроме того, G-CSF формулятор должен защищать против денатурации и, в особенности, быть склонным к стабилизации вторичной и третичной структуры протеина.

Человеческий GM-CSF является 22-kDa гликопротеином, непрерывно требуемым для быстрого размножения *in vitro* клеток-предшественников макрофагов и гранулоцитов. Он также контролирует обратимое превращение этих клеток-предшественников при образовании гранулоцитов и макрофагов. Другие виды биологической активности могут включать регулирование функциональной активности зрелых клеточных видов (Gough et al., Nature, 309, 763-767 (1984)) и увеличение хемотаксиса по отношению к опознанным химоаттрактантам (Williams et al., Hematology, 4th ed. (1990)). GM-CSF также стимулирует образование моноцитов и поэтому может быть использован при лечении моноцитарных расстройств, таких как моноцитопения.

Человеческий GM-CSF может быть получен и очищен из нескольких источников. Способы получения рекомбинантного человеческого GM-CSF были описаны ранее Burgess et al., Blood, 69:1, 43-51 (1987). Согласно цитируемому здесь патенту US 5047504 (Boone) предлагается получение

в промышленном масштабе GM-CSF в негликозилированной форме как продукт выделения прокариотной клетки-хозяина.

Одним из путей, предпринятым ранее при работе с такими протеинами, как G-CSF и GM-CSF, явилось использование липосом. Липосомы представляют собой полностью закрытые липидные двухслойные мембраны, образованные водонерастворимыми полярными липидами, особенно фосфолипидами.

Пузырьки липосом могут иметь один единственный мембранный двойной слой (однослойные) или множество мембранных двойных слоев (многослойные). Двойной слой состоит из двух липидных монослоев, имеющих гидрофильную (полярную) "головную" зону и гидрофобную (неполярную) "хвостовую" зону, в которой гидрофобные хвосты ориентированы по направлению к центру двойного слоя, в то время как гидрофильные головы ориентированы по направлению к водной фазе. Стабильность, жесткость и проницаемость липосом может изменяться путем изменений фосфолипидной композиции или температуры, включением стирола или введением заряженных амфифилов. Основная структура липосом может быть получена различными известными методами.

В процессе своего образования липосомы могут захватывать растворенные в воде вещества в водных каналах и освобождать их с различной скоростью. После обнаружения способности липосом к введению энзимов в клетки и к изменению их метаболизма (Gregoriadis, New Engl. J. Med. 295, 704-710, 765-770 (1976)) липосомы были объявлены средством, отвечающим требованию целенаправленной доставки медикаментов. В результате наблюдается усиленное развитие исследований в фармацевтической индустрии, включающих использование липосом в качестве медленных поставщиков лекарств, витаминов и протеинов, секвентированных в гидрофобных слоях или в гидрофобном ядре липосом.

Успешное использование липосом в качестве переносчиков медикаментов было ограничено, т.к. исследователи, предпринимавшие попытки в направлении такого применения липосом, встретились с рядом проблем. Например, известна способность липосом действовать в качестве сильных иммунологических помощников по отношению к захваченным антигенам, и должны быть приняты меры предосторожности в том случае, когда липосомами захвачены энзимы или протеины ксеногенного происхождения. Кроме того, трудно

контролировать скорость диффузии медикамента. Это является следствием природной нестабильности липосом и присутствия некоторых компонентов крови, которые ускоряют диффузию некоторых медикаментов. Помимо этого, по своей природе некоторые вещества слабо захватываются липосомами и поэтому быстро высвобождаются при кровообращении. Наконец, существует проблема нацеливания на любые клетки или органы, кроме печени или селезенки. Замечательным обзором по липосомам, веществам, которые были введены в липосомы и проблемам, связанным с использованием липосом в качестве переносчиков медикаментов, является Gregory Gregoriadis, "Liposomes", *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Chapter 14, 287-341 (Academic Press, N. Y., 1979).

В то время как в области попыток использования липосом в качестве переносчиков медикаментов опубликовано много работ, мало публикаций появилось в области использования липосом с целью увеличения периода жизни терапевтических пептидов или протеинов путем стабилизации структуры пептидов и/или протеинов. В PCT/US90/05163 "Терапевтические пептиды и протеины", Hostetler et al. описано использование пустых липосом в качестве фармацевтически пригодных разбавителей для растворения полипептидов и/или протеинов с целью предотвращения аккумуляции полипептидов и/или протеинов на поверхности раздела воздух/вода и для предотвращения адсорбции полипептидов и/или протеинов на поверхности контейнера. Hostetler et al. описывает, что отрицательно заряженные фосфолипиды могут быть добавлены в количестве до около 50 мол. %, и что предпочтительными липосомами являются фосфатидилхолин, нейтральный фосфолипид. Hostetler et al. не описывает разбавителя, способного стабилизировать структуру полипептида и/или протеина.

В PCT/US91/07694 "Получение и характеристика липосомных рецептур фактора некрозного новообразования (TNF)", Hung et al., описана липофильная молекула фактора некрозного новообразования, связанная с поверхностью или инкапсулированная внутри липосомы. Липосомные липофильные TNF молекулы описаны как имеющие повышенную стабильность *in vivo*. Стабильность рассматривается как уменьшение или как тенденция к уменьшению TNF-липосомы выделять TNF в систему *in vivo*. Предпочтительными

липосомами были нейтральные липиды. Heing et al. не описывают композиции TNF, в которой наполнители (excipients) оказывают стабилизирующее действие на структуру протеина.

В литературных источниках отсутствуют какие-либо сведения, касающиеся контактирования протеина, например G-CSF, с отрицательно заряженными пузырьками (полостями) липид, в результате которого непосредственно стабилизируется протеин против термической агрегации, денатурации, потери активности и разворачивается вторичная структура. Существует потребность в таких композициях, которые могут быть использованы в технологических процессах, требующих высоких температур, а также в качестве новых поставщиков (например, оральное применение лекарств, закрепленных в G-CSF). Настоящее изобретение касается таких композиций.

Настоящее изобретение направлено на добавление гидрофобных эксципиентов, например, лизофосфолипидов или других липосом, к протеину в условиях расплавленного глобулярного состояния для стабилизации вторичной и третичной структуры протеина, защищая таким образом протеин против термической агрегации, денатурации и потери активности. В особенности целью изобретения являются стабильные G-CSF:фосфолипидные композиции. Неожиданно оказалось, что предпочтительные G-CSF композиции могут быть несколько раз подвергнуты циклическому изменению температуры в диапазоне 10-95°C с последующим полным восстановлением вторичной структуры протеина после охлаждения. Эти композиции имеют двойное преимущество: быть полезными при технологических процессах, требующих высоких температур, а также при использовании в новых поставщиках G-CSF.

В предпочтительном варианте, комплекс протеин:фосфолипид включает отрицательно заряженную липосому, выбранную из группы: диолеилфосфатидилглицерол (DOPG), димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG), яичный фосфатидилглицерол, диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), яичный фосфатидилэтанолламин, диолеилфосфатидовая кислота (DOPA), димиристоилфосфатидовая кислота (DMPA), дипальмитоилфосфатидовая кислота (DPPA), диолеилфосфатидилсерин (DOPS), димиристоилфосфатидилсерин (DMPS), дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS), яич-

ный фосфатидилсерин, лизофосфатидилглицерол, лизофосфатидилэтаноламин и лизофосфатидилсерин.

DOPG, отрицательно заряженный ненасыщенный фосфолипид, является особенно предпочтительным. Согласно изобретению pH поддерживают в пределах 3,0–7,5, а отношение липид:протеин не менее 10:1.

Дополнительным элементом, согласно предпочтительному варианту изобретения, является использование химически модифицированных протеинов в составе комплекса протеин:фосфолипид, а также использование одного или нескольких из следующих агентов: агент, устанавливающий изотонию, буферный агент и агент, устанавливающий pH. Специалисту понятно, что изобретение включает стабильные композиции протеин:фосфолипид с различным сочетанием дополнительных элементов.

На фиг. 1 изображен спектр флуоресцентной эмиссии rhG-CSF в присутствии (кривая 1) и в отсутствии (кривая 2) пузырьков DOPG. Концентрация DOPG:rhG-CSF равна 0,2 мг/мл. Молярное отношение DOPG:rhG-CSF (кривая 1) равно 100:1.

На фиг. 2(а) показано влияние увеличения отношения липид:протеин на rhG-CSF флуоресценцию. F_0 означает исходную флуоресценцию (без липида) и F означает флуоресценцию после добавления липида для достижения указанного молярного отношения $F/F_0(n)$ и максимум длины волны эмиссии (Δ) для смесей DOPG:rhG-CSF. На фиг. 2(в) показано отношение $F/F_0(n)$ и максимум длины волны эмиссии (Δ) для смесей DOPG:rhG-CSF.

На фиг. 3 показана кривая Стерна-Волмера (Stern-Volmer) затухания rhG-CSF флуоресценции посредством KJ в отсутствии (о) и в присутствии (о) пузырьков DOPG. Эксперимент по затуханию проводился добавлением равных порций KJ к rhG-CSF (0,2 мг/мл) и DOPG:rhG-CSF 100:1.

На фиг. 4 показано затухание rhG-CSF флуоресценции триптофана при добавлении пирендекановой кислоты (pyrene decanoic acid). Длина волны эмиссии равна 327 нм. Молярное отношение DOPG:rhG-CSF равно 100:1.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий в сравнении изменения F интенсивности для rhG-CSF в отсутствии и в присутствии различных липидов. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий в сравнении сдвиги мак-

симумов эмиссии для rhG-CSF в отсутствии и в присутствии различных липидов. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 7 показано влияние DMPC (кривая 2), DMPG (кривая 3) и DMPA (кривая 4) на CD rhG-CSF (кривая 1). В каждом случае молярное отношение липид:протеин в воде равно 50:1, pH 6,0.

На фиг. 8 показано влияние повышения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (140:1 молярное) (кривая 2). Концентрация rhG-CSF в воде равна 80 мг/мл, pH 6,0. Температура изменялась в пределах 10–90°C со скоростью 100°C/ч.

На фиг. 9 показана дифференциальная сканирующая калориметрическая термограмма для rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (45:1 молярное) (кривая 2). Концентрация rhG-CSF в образцах равна 1 мг/мл, pH 7,0 в воде. Скорость сканирования 90°C/ч.

На фиг. 10 показано влияние циклического изменения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (140:1 молярное) (кривая 2). Образцы быстро нагревали до 95°C и охлаждали до 10°C как показано стрелками. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

На фиг. 11 показано влияние циклического изменения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DMPG:rhG-CSF (150:1 молярное) (кривая 2). Образцы нагревают до 95°C и охлаждают до 10°C. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

На фиг. 12 показано влияние температурных циклов на CD rhG-CSF (кривая 1) и DPPG:rhG-CSF (150:1 молярное) (кривая 2). Образцы нагревают до 95°C и охлаждают до 10°C. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

Фиг. 13 изображает график, показывающий способность различных липидов к стабилизации rhG-CSF в процессе замораживания-сушки. Отношение липид:протеин в каждом случае равно 100:1. Стабильность определялась по сохранению активности *in vitro* в образце костного мозга. Один rhG-CSF не выдерживает процесса замораживания-сушки, поэтому контрольным образцом является необработанный rhG-CSF в отсутствии липида.

На фиг. 14 показано влияние различных липидов на активность *in vitro* rhG-CSF. Активность (в расчете на WBC) измеряли после подкожной инъекции хомячков. Доза rhG-CSF равна 100 мг/кг при отношении липид:протеин 100:1.

На фиг. 15 показано влияние различных липидов на активность *in vitro* rhG-CSF. Активность (в расчете на WBC) измеряли после подкожной инъекции хомячков. Доза rhG-CSF равна 100 мг/кг при отношении липид:протеин 50:1.

На фиг. 16 изображен график, показывающий сравнительное изменение CHO-G-CSF в отсутствие и в присутствии DOPG при различном pH. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 17 изображен график, показывающий сравнение сдвигов максимумов эмиссии для CHO-G-CSF в отсутствие и в присутствии DOPG при различном pH. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 18 показано влияние температурных циклов на CD PEG-G-CSF (-) и DMPG:PE-G-CSF (17:1 молярное) (- -). Образцы нагревают до 90°C и охлаждают до 10°C.

На фиг. 19 показано: а) влияние температурных циклов на CD GM-CSF в PBS, pH 7,0. GM-CSF при 10°C (-) сравнительно с GM-CSF, который нагревают до 90°C и охлаждают до 10°C (- -); б) влияние температурных циклов на CD DPPG:PEG-G-CSF (17:1 молярное). DPPG:GM-CSF при 10°C (-) сравнивают с DPPG:GM-CSF, который нагревают до 90°C и затем охлаждают до 10°C (- -).

Композиция по изобретению иллюстрируется нижеследующими примерами. Примеры показывают различные аспекты изобретения и включают данные испытаний по стабильности и биологической активности различных протеин: фосфолипидных композиций. Взаимодействие протеинов с липидными пузырьками непосредственно стабилизирует протеиновую структуру протеина, оказывая, таким образом, стабилизирующее воздействие на протеин даже в условиях, приводящих к денатурации протеина в отсутствие липида. Предполагается использовать различные протеины, способные переходить в распрямленное глобулярное состояние. Примерами предполагаемых протеинов являются цитокины, включая различные гематopoэтические (hematopoietic) факторы, такие как упомянутые выше G-CSF, GM-CSF, M-CSF, интерфероны (альфа, бета и гамма), интерлейкины (1-11), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов, клеточный фактор (stem cell factor), фактор роста нерва, BDNF, NT3, полученный из тромбоцита фактора роста, и фактор роста опухолевых новообразований (альфа,

бета). Другие протеины могут быть оценены по способности к переходу в MGS. Если такой протеин способен к превращению в MGS, то такой протеин может затем быть приведен в контакт с пузырьками отрицательно заряженной липосомы и определен эффект стабилизации.

В общем случае G-CSF может быть в нативной форме, выделенной в чистом виде из организма млекопитающих, или, альтернативно, может быть продуктом химического синтеза или продуктом эукариотной или прокариотной экспрессии клетки хозяина экзогенной последовательности ДНК, полученной геномным или cДНК клонированием или генным синтезом. Подходящие прокариотные хозяева включают различные бактериальные клетки (например, *E. coli*). Подходящие эукариотные хозяева включают дрожжи (например, *S. cerevisiae*) и клетки млекопитающих (например, яичника китайского хомячка, обезьяны). В зависимости от используемого хозяина, продукт G-CSF выражения может быть гликозилирован млекопитающими или другими эукариотными карбогидратами, или может быть негликозилирован. Изобретение предполагает использование любых или всех таких форм G-CSF, хотя предпочтительным, с точки зрения наибольшей коммерческой практичности, является рекомбинантный G-CSF, особенно полученный *E. coli*.

G-CSF, который подвергают химической модификации с целью использования в настоящем изобретении, может быть также либо природным человеческим G-CSF (nhG-CSF), либо продуктом рекомбинантного процесса нуклеиновой кислоты, такого, как выражение прокариотной или эукариотной клетки хозяина.

В общем случае, предполагаемой химической модификацией является присоединение химической половины к самой молекуле G-CSF.

Обзорной статьей, описывающей модификацию протеина и слияние протеинов является Francis, Focus on Growth Factors 3; 4-10 (май 1992) (опубликовано Mediscript, Mountview Court, Frun Barnet Lane, London N20 0LD, UK). Например, EP 0401384 "Chemically Modified Granulocyte Colony Stimulating Factor, в которой описаны материалы и методы приготовления G-CSF, к которой присоединены молекулы полиэтиленгликоля. Присоединение может быть непосредственным связыванием с протеином или к половине, действующей в качестве мостика для активного агента. Наиболее предпочтительной, как

наиболее стабильной, является ковалентная связь. Химическая модификация может способствовать контролируемому, длительному или расширенному эффекту G-CSF. Это может приводить, например, к контролю времени, необходимого для достижения химически модифицированным G-CSF свернутого в клубок положения. Примером химического модификатора является полиэтиленгликолевые композиции, включая их производные.

По изобретению предполагается использовать любые химически модифицированные G-CSF препараты, эффективные при применении. Эффективность может быть определена различными методами, известными специалисту. Предпочтительными являются пегилированный (pegylated) G-CSF, в особенности полученный *E.coli* G-CSF и, еще более предпочтительно, три-тетра пегилированный полученный *E.coli* G-CSF. G-CSF описан как наиболее стабильный в кислой среде, несмотря на то, что при pH 2,5–5,0 происходит конформационное изменение, сопровождающееся потерей третичной структуры и повышением содержания альфа спиральной формы (Narhi et al., J. Protein Chem. 10, 359–367 (1991)). Это конформационное изменение характерно для распрявленного глобулярного состояния (MGS). Так, как это происходит в случае работы препарата с другими протеинами, способными к превращению в MGS, препарат, имеющий дело с G-CSF, должен принимать защитные меры против термического распрямления вторичной и третичной структуры для предотвращения агрегации и денатурации. GM-CSF, пригодный для использования по изобретению, может быть нативной формой, выделенной в чистом виде из организма млекопитающих, или продуктом прокариотной или эукариотной экспрессии клетки хозяина экзогенной последовательности ДНК, полученной геном или cДНК клонированием, или генным синтезом. Подходящие прокариотные хозяева включают различные бактериальные клетки (например, *E.coli*). Подходящие эукариотные хозяева включают дрожжи (например, *S. cerevisiae*) и клетки млекопитающих (например, яичника китайского хомячка, обезьяны). В зависимости от используемого хозяина, продукт GM-CSF выражения может быть гликозилирован млекопитающим или другими эукариотными углеводными, или может быть негликозилирован. Изобретение предполагает использование любых и всех таких форм GM-CSF, хотя предпочтительным яв-

ляется рекомбинантный GM-CSF, в особенности полученный *E.coli*, по соображениям коммерческой практичности.

Липидные пузырьки, используемые в композициях по изобретению, являются отрицательно заряженными липосомами, способными к взаимодействию с протеином. Предпочтительными являются следующие липосомы: диолеилфосфатидилглицерол (DOPG); димиристсилфосфатидилглицерол (DMPG); дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG); яичный фосфатидилглицерол; диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE); яичный фосфатидилэтанолламин; диолеилфосфатидовая кислота (DOPA); димиристсилфосфатидовая кислота (DMPA); дипальмитоилфосфатидовая кислота (DPPA); диолеилфосфатидилсерин (DOPS); димиристсилфосфатидилсерин (DMPS); дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS); яичный фосфатидилсерин; лизофосфатидилглицерол; лизофосфатидилэтанолламин; лизофосфатидилсерин.

В предпочтительном варианте с использованием *E.coli* полученного rhGM-CSF, липосомным пузырьком является DMPG с отношением DMPG:GM-CSF 17:1, при pH 7,0 в растворе фосфатного буфера (PBS).

В предпочтительном варианте с использованием химически модифицированного (пегилированного) *E.coli* полученного rhG-CSF, rhG-CSF является три-тетра связанным, липосомным пузырьком является DMPG с отношением DMPG:PEG-G-CSF 17:1, при pH 4,5.

Хотя изобретение описывается и иллюстрируется в отношении к специфическим протеин:липидной композиции и методам обработки, специалисту очевидно, что могут существовать различные соответствующие композиции и методы обработки, без отклонения от цели изобретения.

Следующие примеры иллюстрируют более подробно различные аспекты изобретения.

Пример 1. Производили первоначальные эксперименты для исследования возможности введения рекомбинантного человеческого G-CSF (rhG-CSF) в липидный пузырек. rhG-CSF получали при использовании рекомбинантной ДНК технологии, согласно которой *E.coli* клетки были подвергнуты трансфекции посредством ДНК-последовательности, кодирующей человеческий G-CSF, как описано в патенте US № 4810643 на имя Souza. rhG-CSF готовили в виде раствора с концентрацией 4 мг/мл в разбавленной HCl, pH

4,0. Все липиды были получены из Avanti Polar Lipids (Albaster, Ala) и выдержаны при -20°C в атмосфере азота при конечной концентрации 100 мг/мл в хлороформе.

Приготовление G-CSF:фосфолипидных комплексов.

С целью приготовления липидных пузырьков для сочетания с G-CSF 30 $\mu\text{мол}$ соответствующего липида помещают в стеклянную трубку и сушат в потоке газообразного азота до образования тонкой пленки. Липидную пленку высушивают не менее двух часов под вакуумом для удаления любых следов хлороформа. Липидную пленку гидрируют в 1 мл либо дистиллированной деионизированной воды (ddH_2O), фосфатном буферном растворе, pH 7,2 (Cibro/BRL "D-PBS") либо в 150 mM NaCl. Затем образцы были обработаны ультразвуком в ультразвуковой установке типа ванны (лаборатория Supplies, Hicksville, N.Y.). Ультразвуковую обработку продолжали до тех пор, пока образцы не приобрели оптическую прозрачность (обычно в пределах 10–15 мин). Образцы хранили при 4°C под азотом вплоть до использования. Конечная концентрация липида составляла 30 mM. Альтернативно, липидные пузырьки могут быть приготовлены высушиванием под азотом 300 $\mu\text{мол}$ липида как описано выше. Сухие липидные пленки гидрировали в 10 мл соответствующего водного раствора как описано выше. Образцы были затем микроэмульгированы в эмульгаторе (Microfluidics Model 110S, Microfluidics, Inc., Cambridge, MA), работающем при 10000 пси. Образцы подвергали 10 циклам рециркуляции в приборе. Микроэмульгированные образцы затем хранили при 4°C как описано выше.

G-CSF:фосфолипидные комплексы готовили смешением G-CSF (как описано выше) со специфичным липидом (как описано выше). Смешение осуществляют в вихревом смесителе, перемешиванием или бережным встряхиванием. Готовят образцы с различным мольным соотношением липид:G-CSF для оценки мембранной проницаемости и стабилизации протеина. Например, для приготовления 3 мл образца (в воде), содержащего 0,2 мг/мл G-CSF при мольном отношении липид:G-CSF 40:1, 150 $\mu\text{л}$ исходного раствора G-CSF соединяют с 44 $\mu\text{л}$ липида (30 mM исходный раствор в воде, приготовленный при воздействии ультразвука), и добавляют воду до конечного объема образца 3 мл. Рекомендуемая пятиминутная инкубация (но

не обязательная) была осуществлена перед использованием и испытанием образца.

G-CSF может быть также соединен с гидрированным липидом перед микроэмульгированием. Последующее микроэмульгирование смеси (как описано выше) приводит к внедрению G-CSF в липидную мембрану.

Анализ G-CSF:фосфолипидных комплексов.

1. Триптофанный эмиссионный спектр.

Существует две группы триптофана в rhG-CSF, являющиеся очень чувствительными к условиям локальной окружающей среды. Поэтому проводили анализ для определения rhG-CSF триптофанной флуоресценции в условиях контактирования rhG-CSF с липосомой. Голубой сдвиг максимума флуоресцентной эмиссии предполагает, что триптофаны находятся в более гидрофобной окружающей среде, и, следовательно, rhG-CSF внедрен в липидную мембрану. Отличным образом триптофанного флуоресцентного анализа является Principles of Fluorescence Microscopy, J. Lakowicz, Chap. 11 (Plenum Press, New York, 1983).

Триптофанную флуоресценцию G-CSF:липидных комплексов (как описано выше) анализировали возбуждением образцов при длине волны 280 нм и в процессе сканирования эмиссии от 285 нм до 420 нм с приращением (инкрементом) в 1 нм при скорости 1 нм/с. Образец имел объем 3 мл при конечной концентрации G-CSF 0,2 мг/мл для всех образцов. Отношение липид:G-CSF варьировалось. Все измерения флуоресценции проводили с использованием PTJ Alphascan флуорометра (South Brunswick, N.Y.). Все измерения осуществлялись при 25°C и эту температуру поддерживали использованием держателя кюветы с водной рубашкой, связанного с циркулирующей водной ванной. Собирали эмиссионный спектр и анализировали, используя данные программного обеспечения PTJ. На фиг. 1 показан спектр флуоресценции rhG-CSF в присутствии и в отсутствие небольших однослойных пузырьков, состоящих из DOPG. rhG-CSF имеет максимум эмиссии в области 334 нм в отсутствие пузырьков DOPG. В присутствии DOPG и при соотношении липид:протеин 100:1 rhG-CSF триптофанная флуоресценция показывает сдвиг максимума флуоресценции в голубую область эмиссии в область 327 нм и сильное увеличение интенсивности флуоресценции.

Короткая длина волны флуоресцентной эмиссии в присутствии DOPG предполагает большую гидрофобность триптофаном в окружающей среде, чем нативный протеин. Как показано на фиг. 2, сдвиг флуоресценции зависит от мольного отношения DOPG:G-CSF, и мембранное внедрение обнаруживается как только достигается соотношение DOPG:G-CSF 10:1.

2. Испытания иодидного тушения.

Иодид является эффективным тушителем триптофанной флуоресценции, но он не может проникать через липидные мембраны. Поэтому, эффективное тушение триптофанной флуоресценции иодидом показывает доступность групп основной мас-се водного растворителя, в то время как защита от иодидного гашения наблюдается в случае, когда триптофаны протеина изолированы от водного растворителя.

В этих экспериментах использованы G-CSF и DOPG:G-CSF композиции (отношение липид:протеин 100:1). После того, как первоначальное считывание (F_0) на образцах было произведено и зарегистрировано, измеряли интенсивность флуоресценции после введения возрастающих количеств иодида калия (KJ) (5 M исходный раствор). Образцы и KJ растворы были приготовлены с содержанием 1 mM Na_2SO_3 (конечная концентрация) как описано Lee et al., *Biochem. Biophys. - Acta*, 984: 174-182 (1989) и Le Doan et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 858: 1-5 (1986). Добавление Na_2SO_3 препятствует образованию J_2 , который может распределяться между неполярными участками протеинов и мембранами. Данные испытаний были проанализированы с помощью уравнения Stern-Volmer ($F_0/F = 1 + K_s [KJ]$), где F_0 и F представляют собой интенсивности флуоресценции образцов соответственно в отсутствие и в присутствии KJ при концентрации [KJ]. K_s является константой тушения Stern-Volmer для KJ тушения G-CSF триптофанных радикалов (Lehrer, S., *Biochemistry* 10: 3254-3263 (1979)).

На фиг. 3 показаны данные кривой Stern-Volmer. В отсутствие пузырьков DOPG, rhG-CSF флуоресценция эффективно гасится KJ. В присутствии DOPG данные Stern-Volmer расположены на прямой, что указывает на то, что иодид имеет слабую доступность к обоим триптофанам. Данные показывают, что группы триптофана, доступные для иодида в отсутствие DOPG, становятся недоступными для иодида в присутствии DOPG. Поэтому часть rhG-CSF, содержащая этот триптофан, должна быть внедренной в двойной слой DOPG.

3. Измерение превращения энергии.

Как уже указывалось ранее, между донорами триптофана и растворимыми в липиде акцепторами флуоресценции, такими как пирендекановая кислота, может произойти передача энергии, так как спектр возбуждения этой пробы значительно перекрывает спектр эмиссии триптофана (Friere et al., *Biochemistry*, 22: 1675-1680 (1983)). В случае внедрения протеина в липидную мембрану, передача энергии от триптофана к пирену приведет к затуханию флуоресценции триптофана. В этом эксперименте непрерывно измеряют интенсивность эмиссии триптофана различных комплексов G-CSF:липид перед (F_0) и после (F) добавления различных количеств пирендекановой кислоты (исходный раствор в тетрагидрофуране с концентрацией 30 $\mu\text{g}/\text{мл}$). Образцы непрерывно перемешивают в процессе добавления пирендекановой кислоты для лучшего смешения пирендекановой кислоты с образцом. Отношение F/F_0 пропорционально количеству передачи энергии между G-CSF триптофанами и гидрофобным акцептором энергии - пирендекановой кислотой.

На фиг. 4 показан характер затухания rhG-CSF в присутствии DOPG (отношение липид:протеин 100:1) как функция добавленного количества пирендекановой кислоты. Затухание флуоресценции начинается при очень небольших концентрациях пирендекановой кислоты (<1 мол. %), так что эффект флуоресцентной пробы на мембранную структуру и поведение является минимальным. Поскольку предполагают, что пирендекановая кислота может очень быстро проникать в липидный двойной слой, настоящие данные показывают, что RhG-CSF довольно глубоко внедряется в DOPG мембраны, что вызывает эффективную передачу энергии от триптофана к пиреновому акцептору. Процесс передачи энергии был подтвержден исследованием спектра возбуждения пирендекановая кислота - меченые DOPG пузырьки в присутствии и в отсутствие rhG-CSF.

Вышеуказанный анализ показывает, что rhG-CSF может тесно взаимодействовать с ненасыщенными фосфолипидами подобно DOPG. В присутствии DOPG пузырьков rhG-CSF триптофан является защищенным от водорастворимого тушителя флуоресценции, но является поддающимся затуханию флуоресценции в результате передачи энергии гидрофобной флуоресцентной пробе.

Вместе взятые данные показывают, что rhG-CSF может внедряться в мембраны,

состоящие из DOPG. Мембранное внедрение можно обнаружить при достижении отношения липид:G-CSF 10:1, и это число может представлять собой число липидов, окружающих внедренную часть протеина.

П р и м е р 2. Определяют способность rhG-CSF к взаимодействию с другими фосфолипидами сравнением отношения интенсивностей F/F_0 и максимумом эмиссии как описано выше. В каждом случае молярное отношение липид:rhG-CSF равняется 100:1.

На фиг. 5 показаны значения отношения F/F_0 для rhG-CSF в отсутствие и в присутствии различных липидов. На фиг. 6 показаны значения максимума эмиссии для тех же самых композиций. Данные на фиг. 5 и 6 показывают, что в дополнение к DOPG, rhG-CSF может внедряться в DMPG, DPPG, и менее эффективно в фосфатидилэтаноламины (PE's) и в фосфатидилсерин (PS's). Кроме того, установлено, что NG-DOPE (DOPE образец с более отрицательно заряженной PE головной группой) более способствует внедрению rhG-CSF, чем DOPE. DOPC, DMPC и DPPC являются нейтральными липидами, и эти пузырьки мало влияют или вовсе не влияют на максимум эмиссии или интенсивность флуоресценции rhG-CSF, что указывает на отсутствие взаимодействия с этими фосфолипидами (фиг. 5 и 6, и фиг. 7, кривая 2).

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что протеин, способный переходить в распрямленное глобулярное состояние, может внедряться в различные липидные пузырьки. Однако, это rhG-CSF:липидное взаимодействие происходит только тогда, когда используют отрицательно заряженные липидные пузырьки. Среди отрицательно заряженных липидных пузырьков, пузырьки с небольшим отрицательным зарядом должны вызывать более сильное rhG-CSF взаимодействие.

П р и м е р 3. Определяют влияние rhG-CSF взаимодействия на стабильность протеина. Для этого измеряют круговой дихроизм на приборе Jasco J-720, снабженном штативом термостатированных клеток типа Peltier и магнитной мешалкой. Измеряют круговой дихроизм при 222 нм конечной концентрации rhG-CSF 80 $\mu\text{г/мл}$, pH 6,0. На калориметре Microcal MC-2 производят измерения дифференциальной сканирующей калориметрии. Сканируют образцы rhG-CSF (1 мг/мл , в воде) или DOPG:rhG-CSF (45:1 моль/моль, в воде) со скоростью 90°C/ч. Данные хранят и

анализируют при помощи программного обеспечения Microcal.

Исследуют температурные изменения альфа-спирали G-CSF посредством измерения кругового дихроизма (222 нм) как функции повышения температуры. Развертывание спирали rhG-CSF под действием температуры при pH 6,0 показано на фиг. 8. Кривая показывает, что довольно большое превращение наблюдается при ~ 60–70°C, что приводит к потере альфа-спиральной формы. После такого превращения rhG-CSF необратимо высаждается из раствора. Температурный интервал процесса развертывания спирали подобен температуре плавления rhG-CSF при pH 7,0, как это было установлено методом дифференциальной сканирующей калориметрии и показано на фиг. 9.

Напротив, DOPG:rhG-CSF образцы показывают постепенную потерю альфа-спиральности с повышением температуры и, в противоположность одному rhG-CSF, развертывание спирали DOPG:rhG-CSF под действием температуры не является совместным (фиг. 8). Такой вывод также следует из отсутствия перехода плавления, как это показывает дифференциальная сканирующая калориметрия (фиг. 9). Примечательно, что DOPG:rhG-CSF образцы могут восстанавливать альфа-спиральность после нагрева до 95°C и могут быть подвергнуты циклическому изменению температуры между 95 и 10°C с полным восстановлением спиральной формы после охлаждения (фиг. 10). rhG-CSF сам по себе в таких условиях необратимо развертывается и высаждается из раствора.

Кроме того, исследовали влияние DMPG и DPPG на G-CSF круговой дихроизм. Использовали отношение липид:rhG-CSF 150:1, и, как и в случае с DOPG, DMPG и DPPG также стабилизируют вторичную структуру rhG-CSF (фиг. 11–13). Эти данные показывают, что взаимодействие rhG-CSF с DOPG, DMPG и DPPG улучшает стабильность протеина в условиях, при которых rhG-CSF сам по себе нестабилен. Это взаимодействие стабилизирует вторичную и третичную структуру rhG-CSF.

П р и м е р 4. Определяют влияние взаимодействия rhG-CSF:DOPG в соответствии с биологической активностью rhG-CSF. Исследуют активность *in vitro* rhG-CSF посредством G-CSF зависящего поглощения [^3H]-тимидина клетками костного мозга мыши как описано в Zsebo et al., Immunobiology 172: 175–184 (1986). Все

испытания проводились трижды. Активность *in vivo* определяли посредством мышечной инъекции хомячкам (доза rhG-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) и подсчетом количества белых кровяных телец (WBC).

1. Активность *in vitro*.

А. Определяют специфичную активность rhG-CSF в присутствии и в отсутствие DOPG. Также испытывают термообработанные образцы rhG-CSF и DOPG:rhG-CSF. Результаты испытаний сведены в таблицу.

Как видно из данных таблицы, выделение в DOPG двойной слой не снижает биологической активности rhG-CSF. После нагрева до 85°C в течение 10 мин активность rhG-CSF не поддается определению и протеин осаждается. После такой же обработки DOPG:rhG-CSF сохраняет ~ 85% активности rhG-CSF без нагревания и полностью восстанавливает вторичную структуру после охлаждения.

В. Изучалась способность различных липидов стабилизировать rhG-CSF в процессе сушки вымораживанием. Образцы rhG-CSF в сочетании с различными липидами подвергали сушке вымораживанием и испытывали на активность как описано выше. При смешении с rhG-CSF DOPG, DMPG и DPPG обеспечивают ~ 100% сохранение биоактивности rhG-CSF после сушки вымораживанием (фиг. 14). Сам по себе rhG-CSF не выдерживает процесса сушки вымораживанием.

2. Активность *in vitro*.

Определяют активность (подсчетом WBC) rhG-CSF в отсутствие и в присутствии липида. Активность измеряют после мышечной инъекции (доза rhG-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) на день 0. Исследовали пять различных комплексов липид:rhG-CSF, и в каждом случае комплекс липид:rhG-CSF сохраняет активность *in vivo* (фиг. 15 и 16). Описанные исследования показывают, что внедрение в отрицательно заряженный двойной слой липида не оказывает отрицательного воздействия на биологическую активность rhG-CSF. Кроме того, оказалось, что защитное воздействие липида защищает rhG-CSF в течение процесса сушки вымораживанием.

Пример 5. Испытывают способность химически модифицированного (пегилированного) G-CSF (PEG-G-CSF) и G-CSF, полученного как продукт эукариотной экспрессии клетки-хозяина (CHO-G-CSF), к взаимодействию с отрицательно заряженными липидными пузырьками. В случае CHO G-CSF определение проводили на основе сравнения отношения ин-

тенсивностей F/F_0 и максимумов эмиссии (как описано выше в примере 1). В каждом случае молярное отношение липид:протеин равнялось 100:1. В случае же PEG-G-CSF определение проводили на основе анализа кругового дихроизма.

CHO-G-CSF получали по технологии рекомбинантной ДНК, согласно которой клетки яичника китайского хомячка подвергали трансфекции посредством кодирования последовательности ДНК человеческого G-CSF как это описано в патенте США № 48810643 на имя Souza. CHO-G-CSF приготавливали в виде раствора в PBS с концентрацией 0,6 мг/мл, pH 7,0. Показано, что CHO-G-CSF взаимодействует с DOPG подобно rhG-CSF. Каждый образец показывает увеличение интенсивности флуоресценции в присутствии DOPG и сдвиг максимума эмиссии в голубую область в присутствии DOPG (фиг. 17 и 18). Следовательно, взаимодействие DOPG не является следствием некой специфичности рекомбинантной формы G-CSF.

В этом эксперименте использовали PEG-G-CSF в виде три-тетра пегилированного E.coli полученного G-CSF (используют PEG 6000). Образцы DMPG:PEG-G-CSF (молярное отношение 17:1) готовили как описано выше. Найдено, что образцы DMPG:PEG-G-CSF полностью восстанавливают вторичную структуру после нагревания (фиг. 19). Несмотря на присутствие молекул PEG, модифицированный протеин был способен к взаимодействию с липидом так же, как негативный протеин.

Приведенные данные показывают, что эффект стабилизации, связанный с взаимодействием G-CSF с отрицательно заряженными липидными пузырьками, не является присущим только rhG-CSF, полученному как продукт прокариотной эмиссии клетки-хозяина. Химически модифицированный протеин, способный к превращению в MGS, после контактирования с липидным пузырьком, также проявляет стабилизирующее воздействие.

Пример 6. Изучают влияние DMPG и DPPG на GM-CSF. GM-CSF представлял собой рекомбинантный человеческий GM-CSF согласно патенту США № 5047504 на имя Boone. Его готовили в виде раствора с концентрацией 1 мг/мл в фосфатном буферном растворе, pH 7,0. Отношение липид:GM-CSF равно 17:1. Измеряли термическую стабильность посредством анализа кругового дихроизма как описано выше. DMPG и DPPG могут приводить к лучшей термической стабильности GM-CSF, то есть к восстановлению вто-

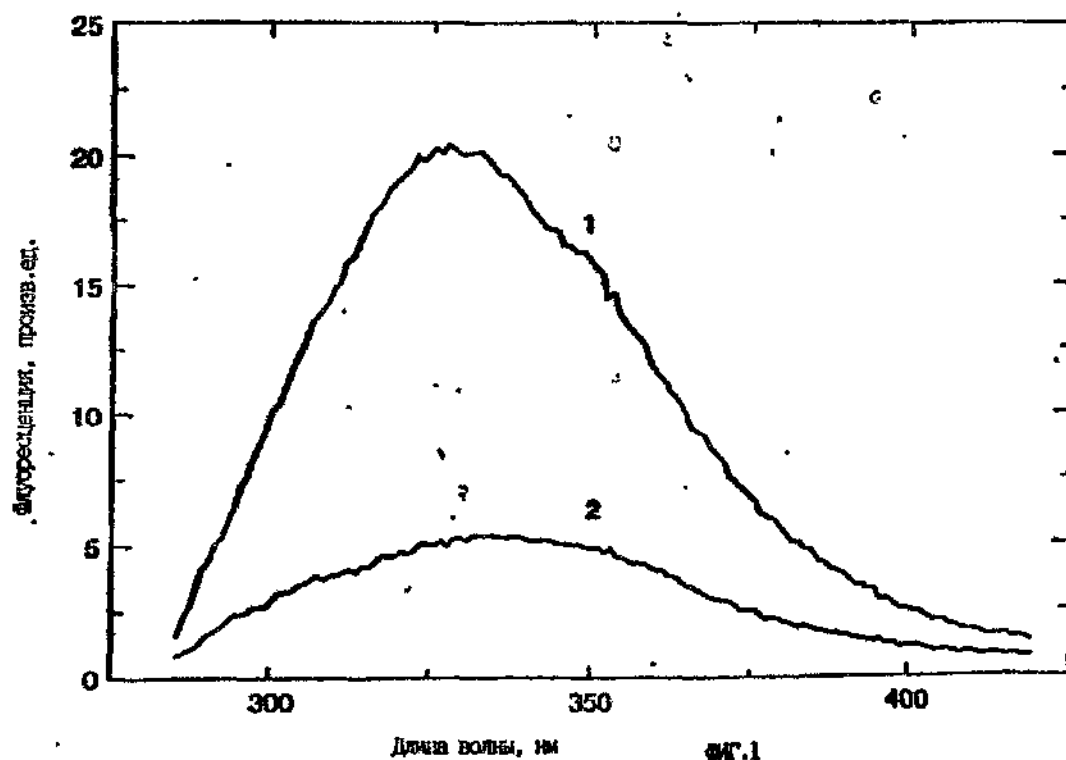
ричной структуры после нагрева (фиг. 20а и 20b). Данные этого исследования показывают пример другого образца протеина, способного к превращению в рас-

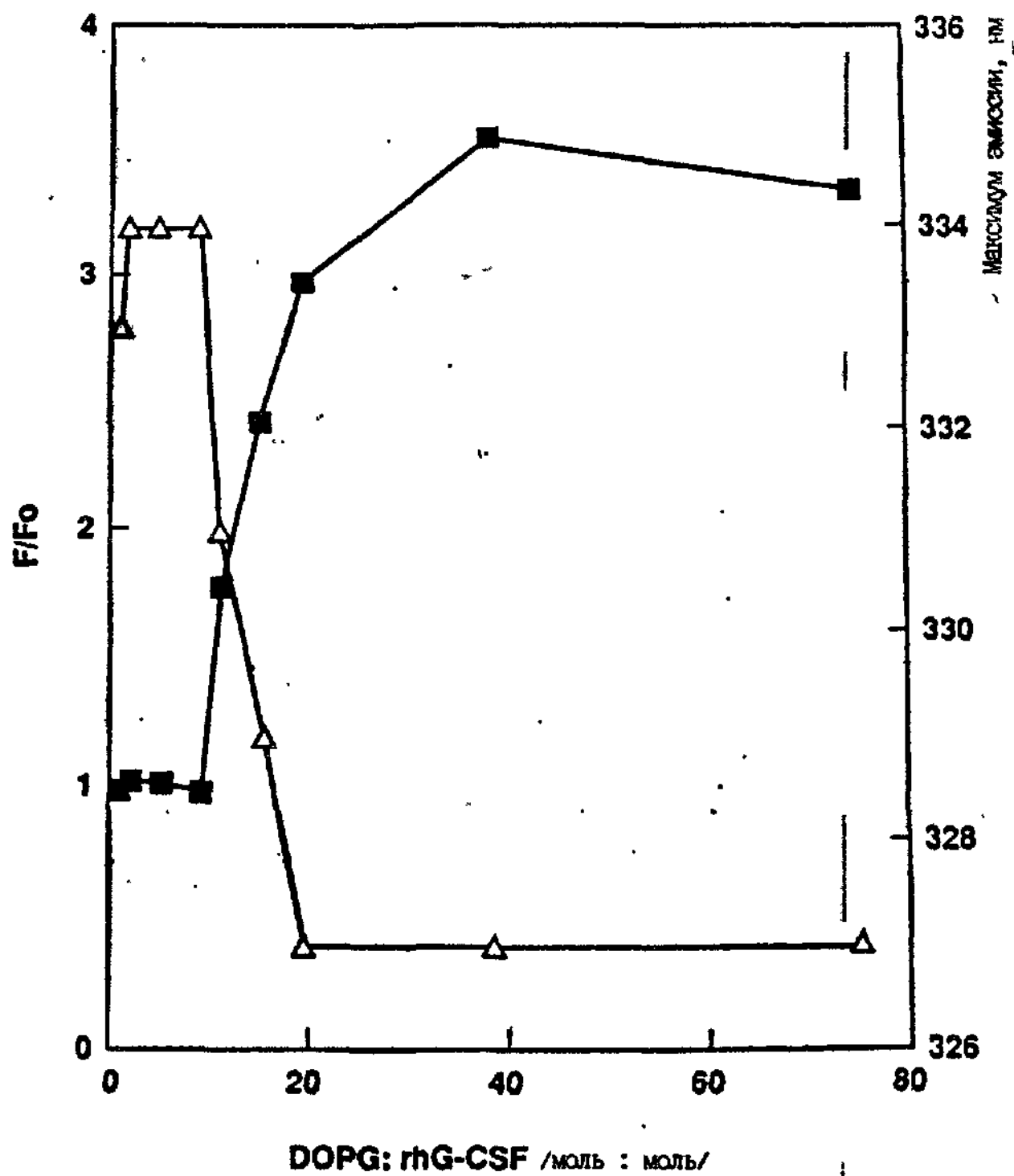
рямленное глобулярное состояние и к взаимодействию с отрицательно заряженным липидным пузырьком, для повышения термической стабильности протеина.

5

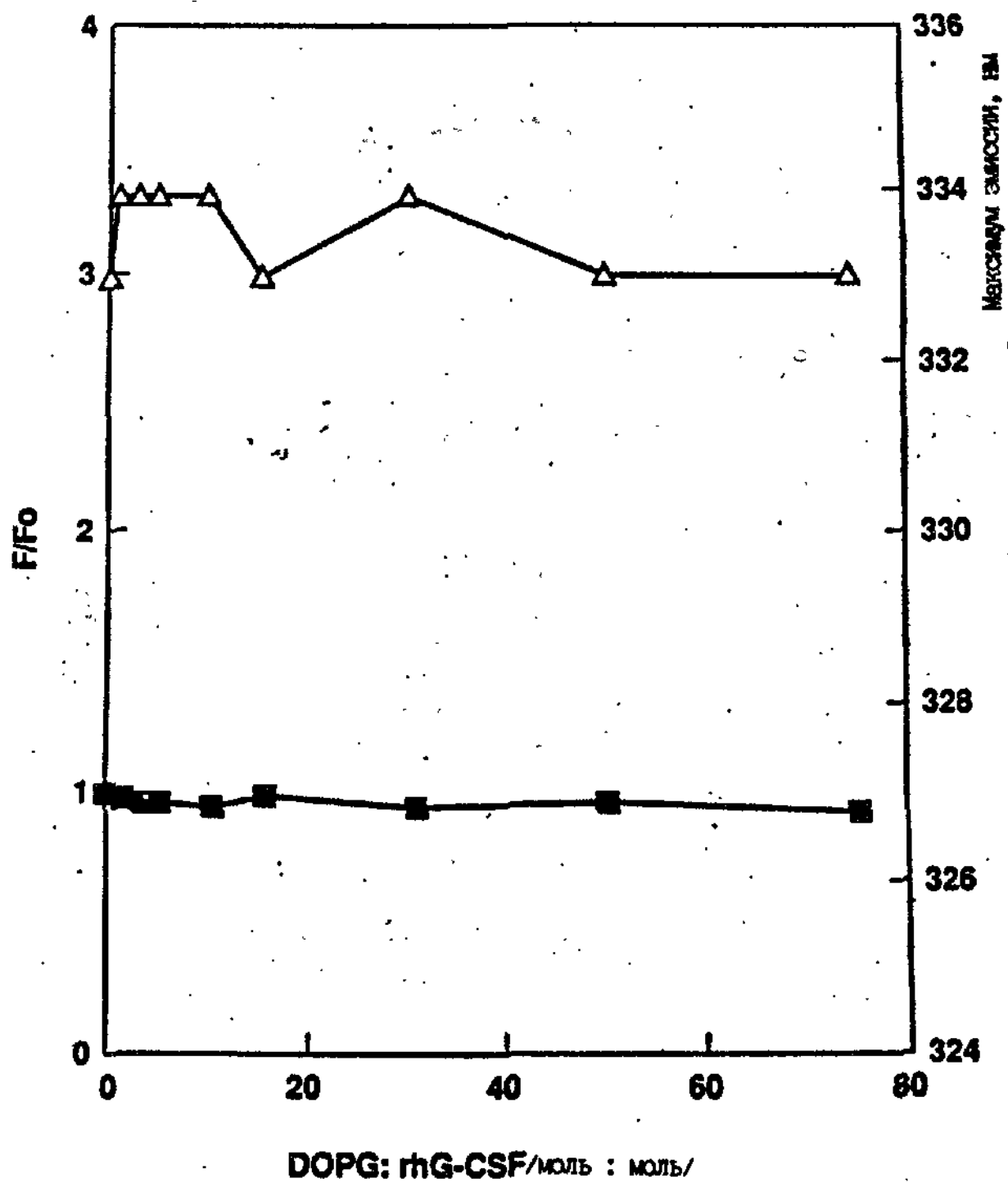
Образец	Специфическая активность (У/мг/протеин)
rhG-CSF	$0,66 \pm 0,09$
rhG-CSF (нагретый) ^a	Не определяется
DOPG:rhG-CSF ^b	$0,61 \pm 0,11$
DOPG:rhG-CSF ^b (нагретый)	$0,52 \pm 0,08$

П р и м е ч а н и я: а – образцы инкубировали в течение 10 мин при 85°C на водяной бане перед испытанием;
 б – мольное отношение DOPG:rhG-CSF равно 50:1.



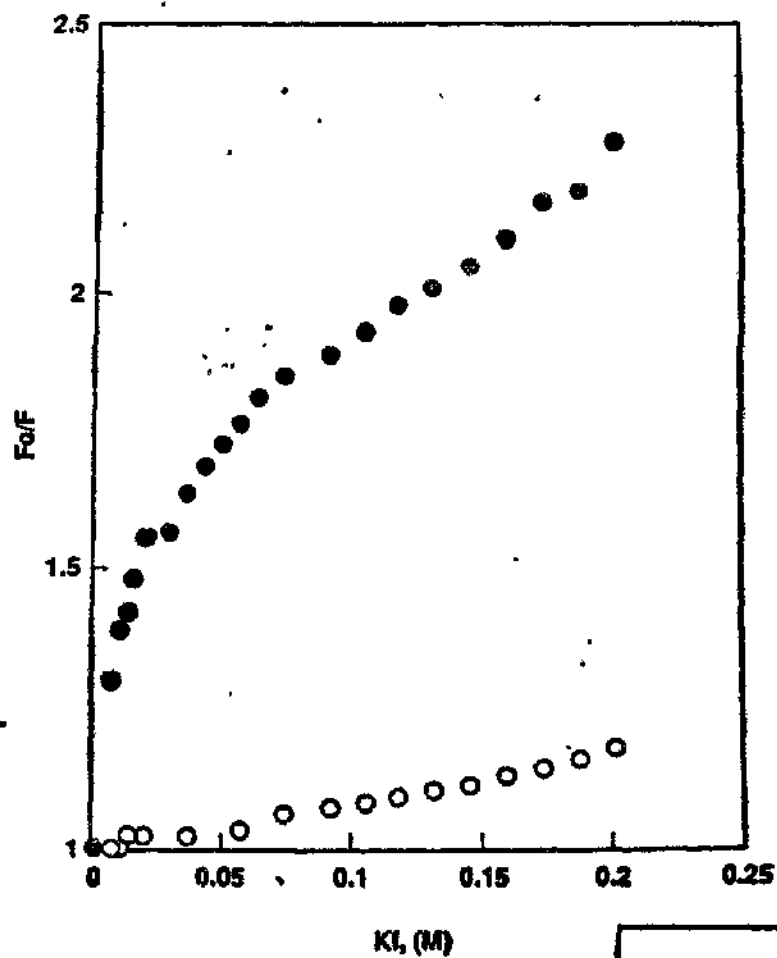


Фиг.2/а/

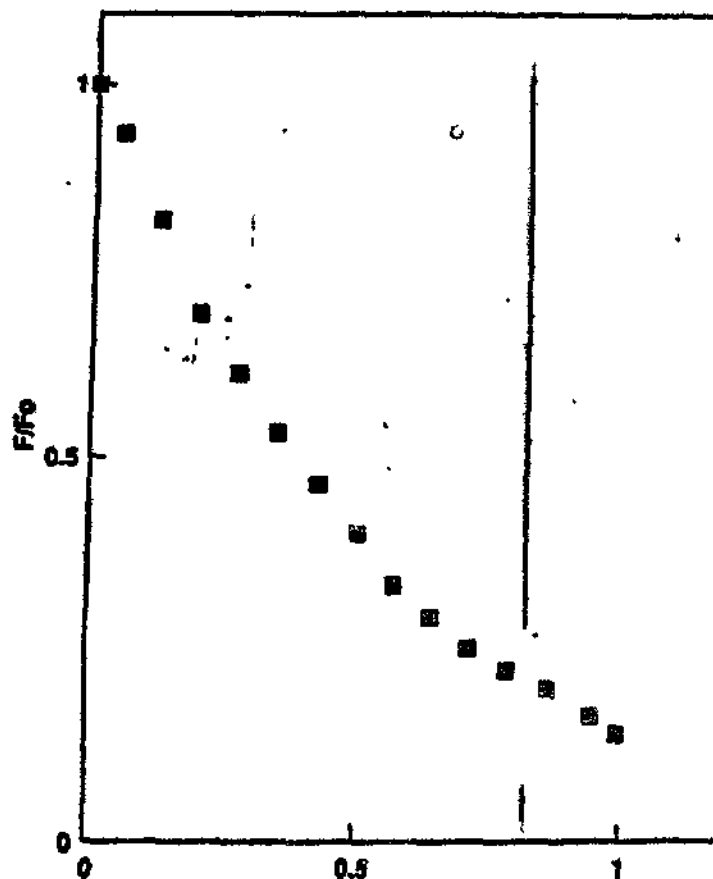


ФИГ.2 /в/

26640

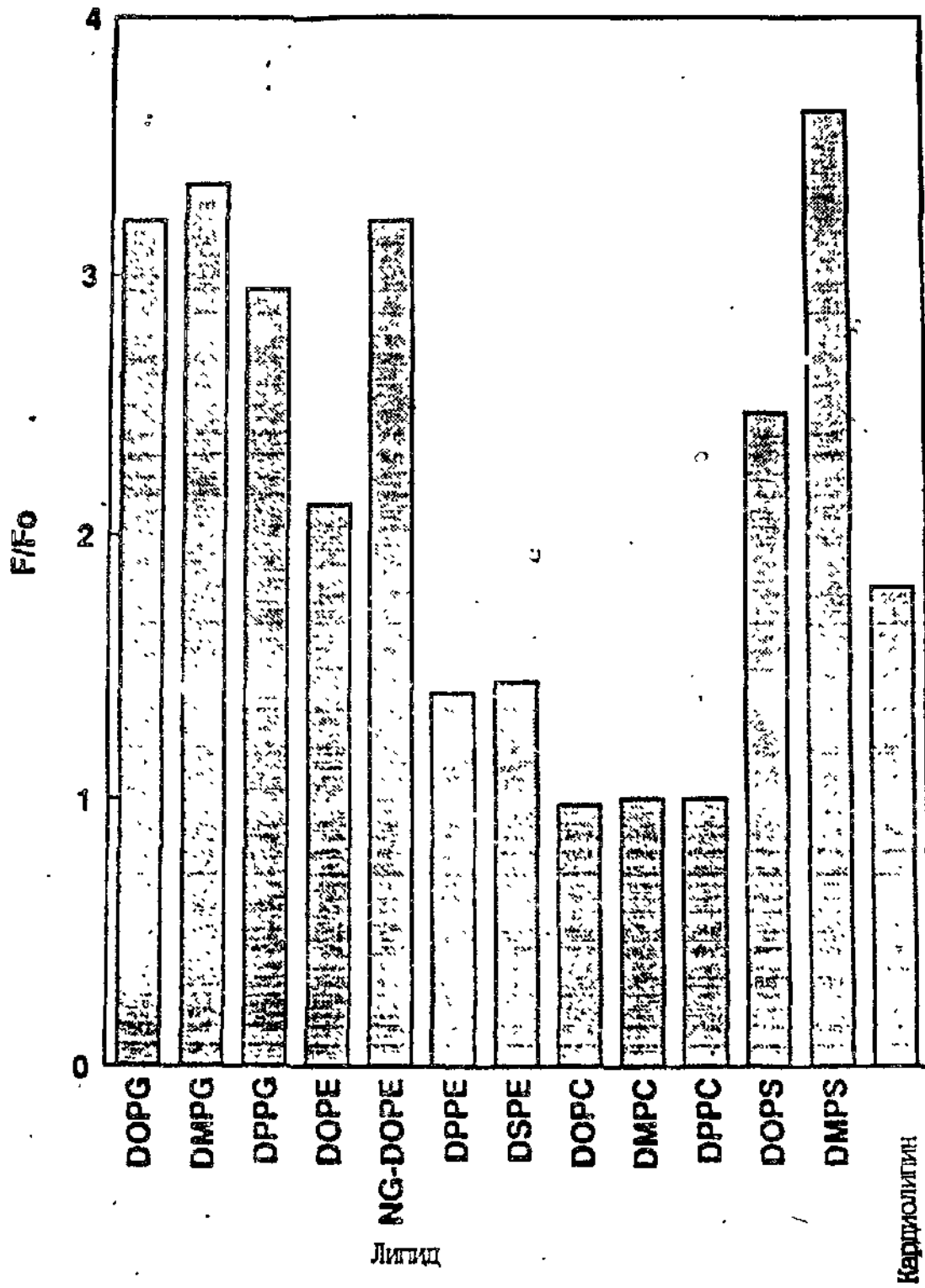


26Г.3

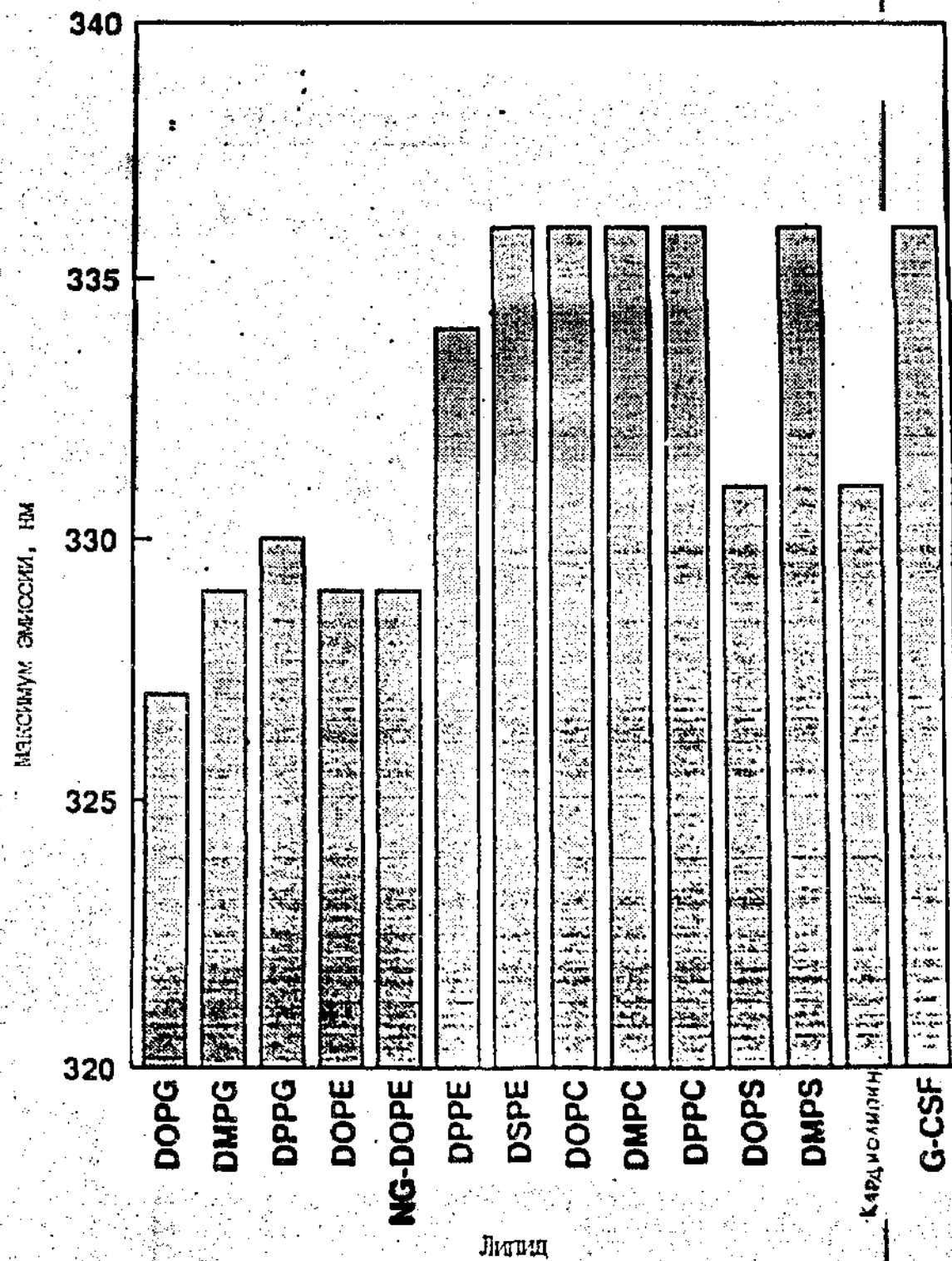


Моя.3, гирендановая кислота

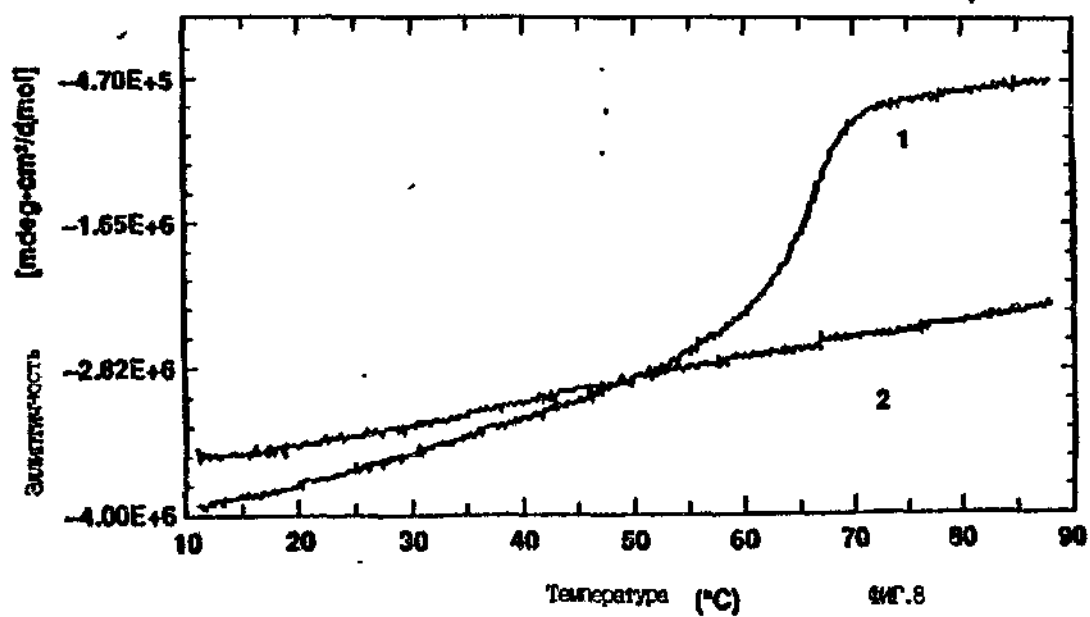
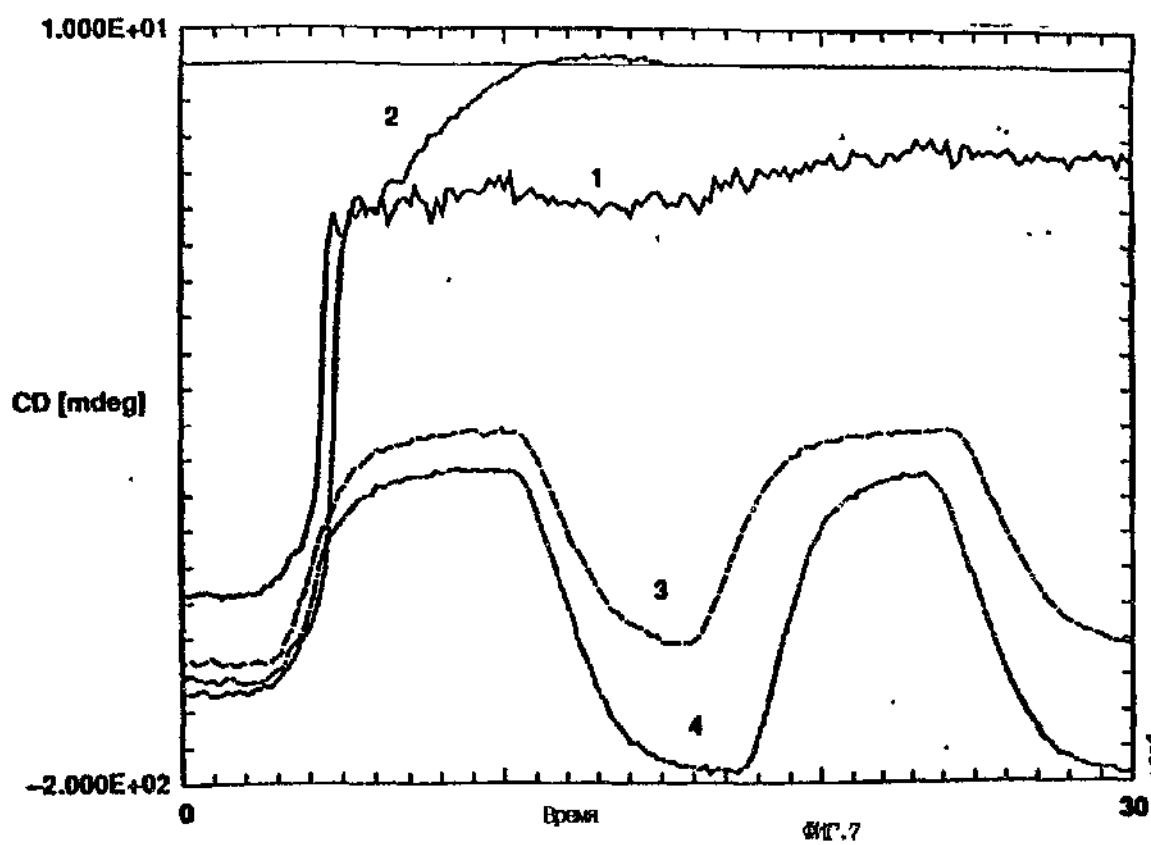
26Г.4

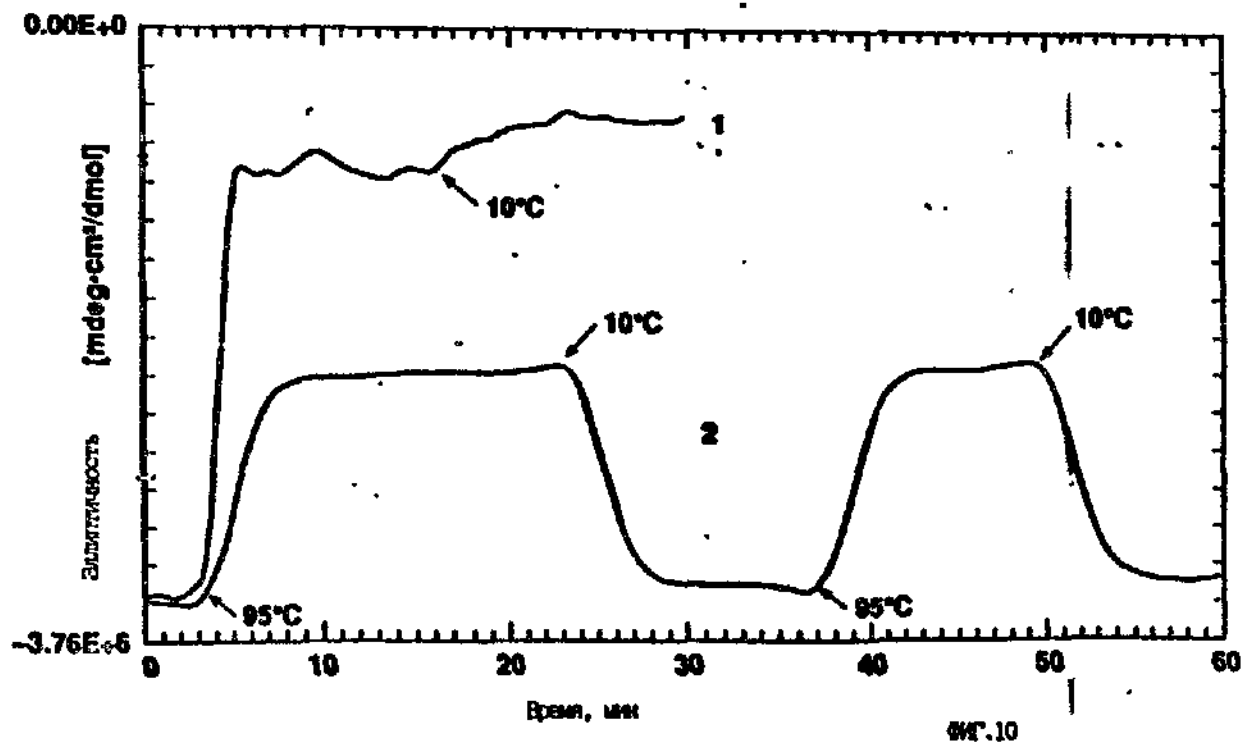
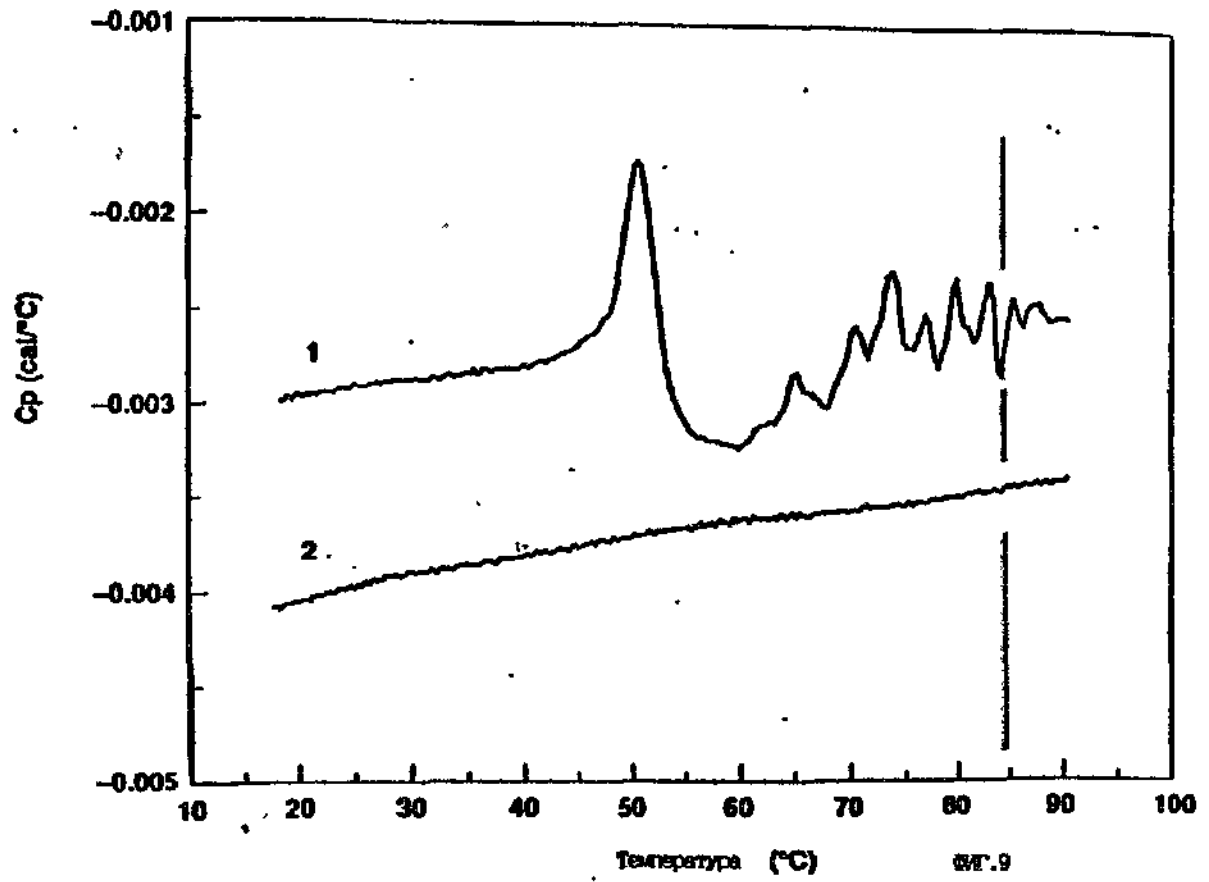


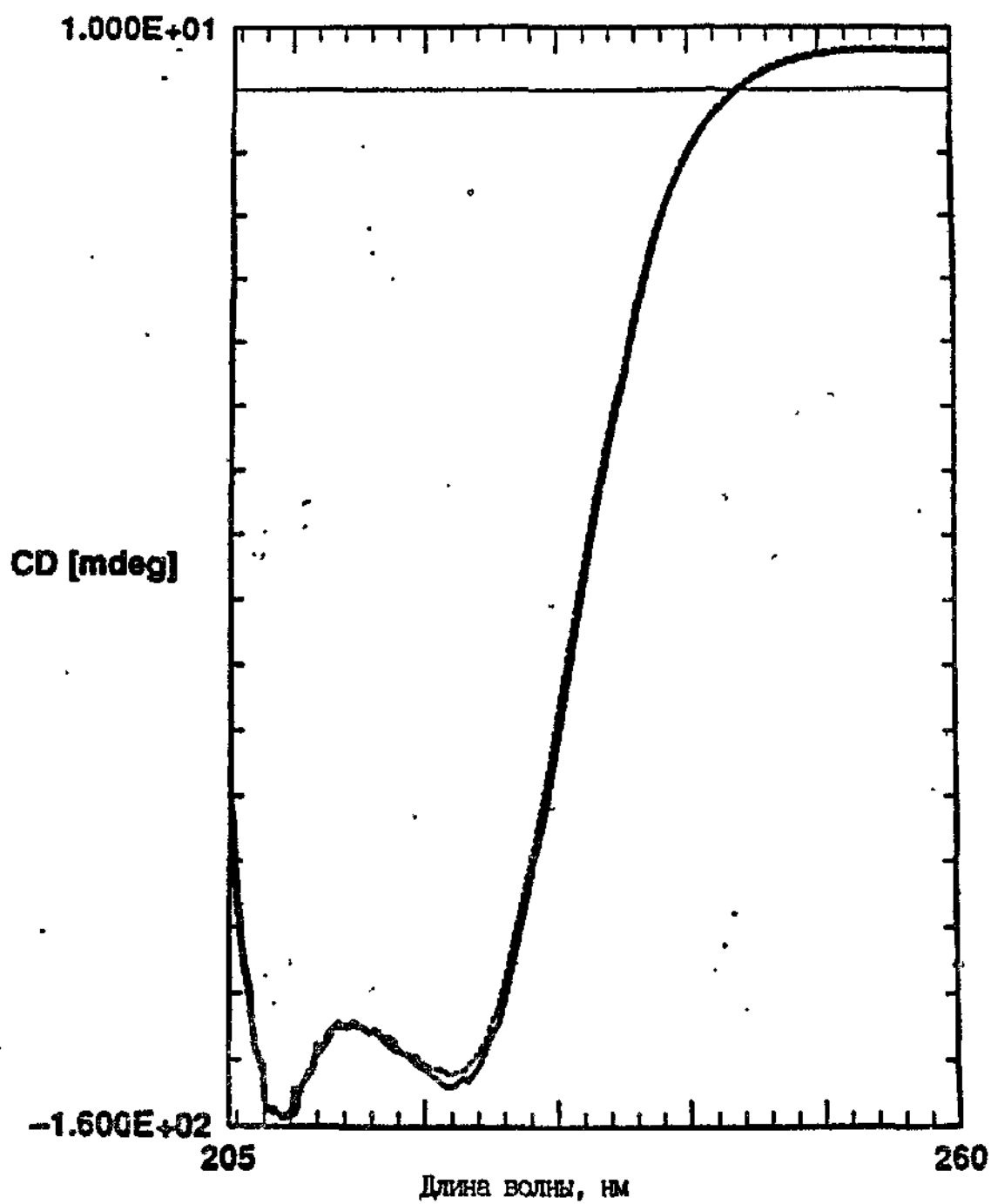
Фиг. 5



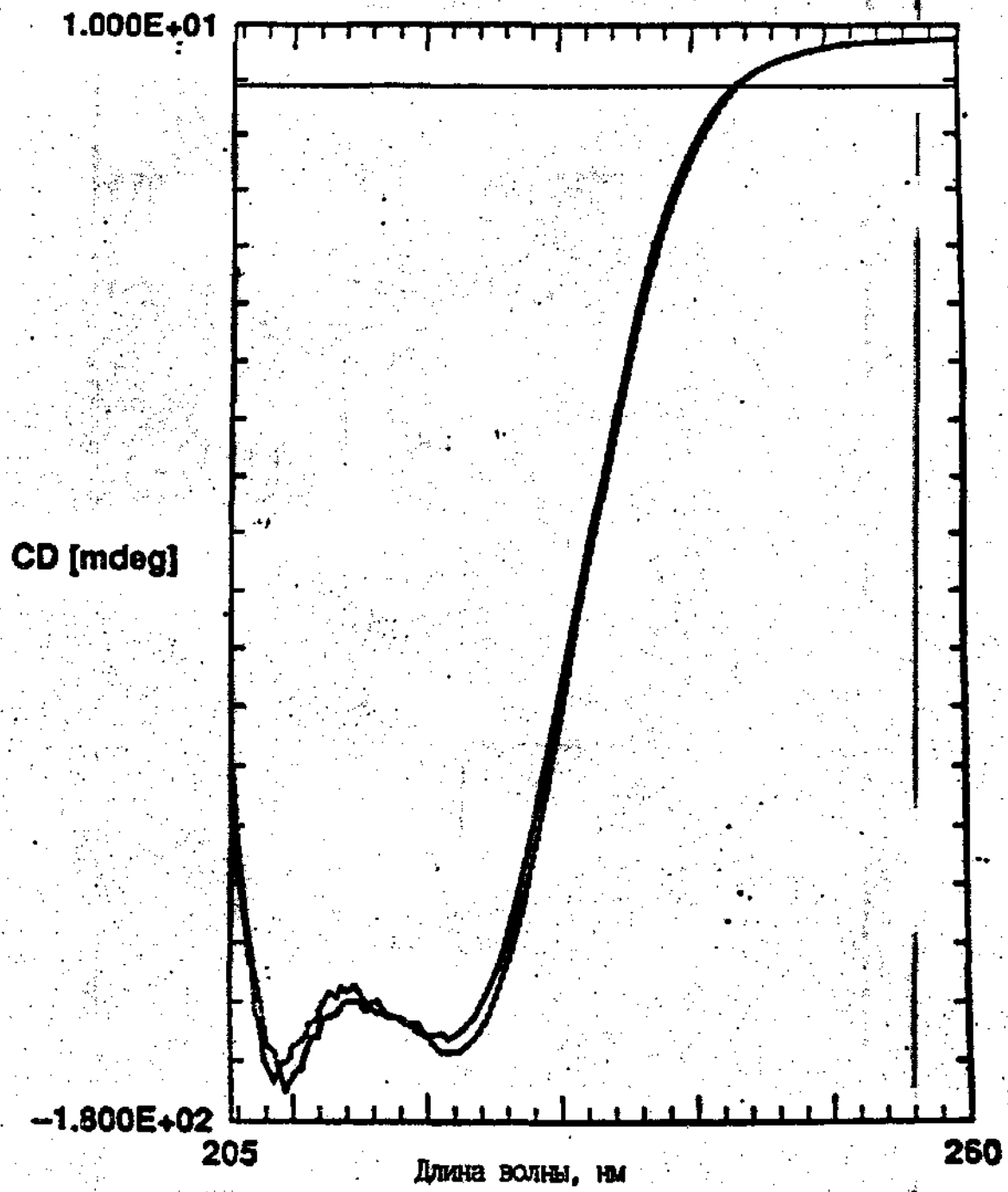
Фиг. 6



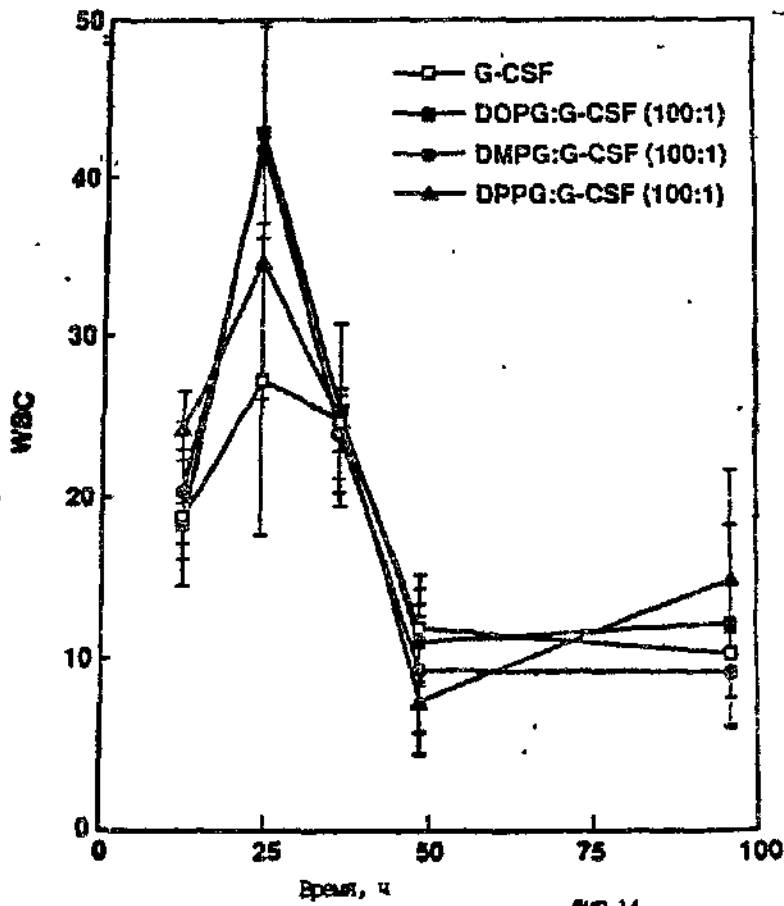
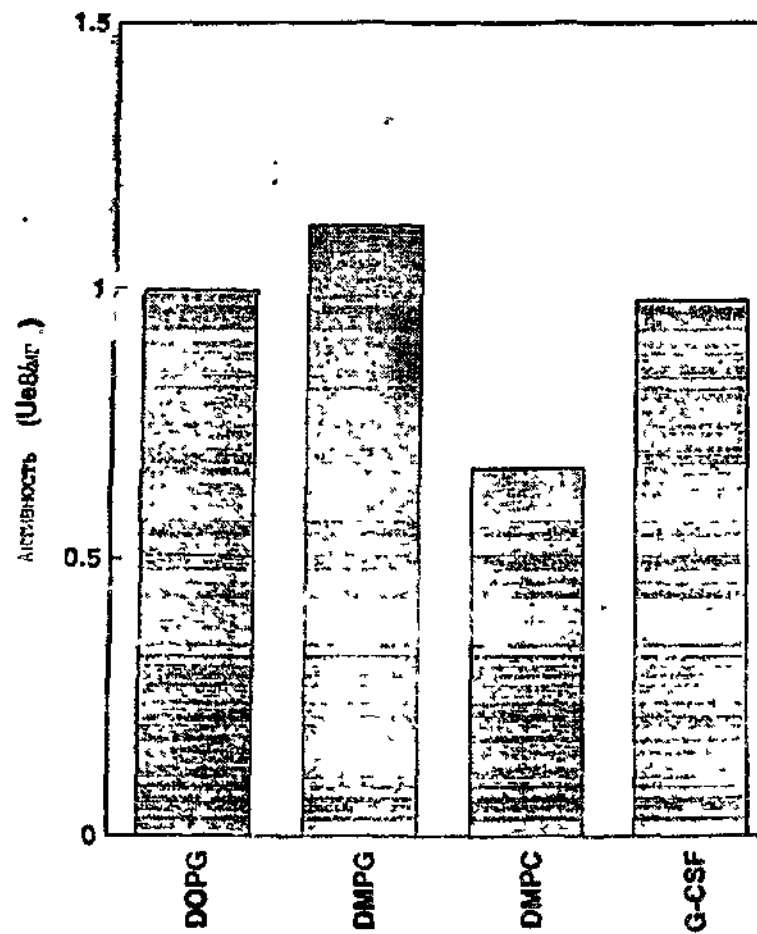




ФИГ.11



ФИГ. 12



Фиг. 13

Неодобрано на 15.07.13

Фиг. 14



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 26640 (13) C1
(51)6 A 61 K 9/127, A 61 K 38/19ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ ЛІПОСОМНИЙ ПУХИРЕЦЬ ТА ВВЕДЕНИЙ У НЬОГО БІЛКОВИЙ МЕДИКАМЕНТ, І СПОСІБ ЇЇ ПРИГОТУВАННЯ

1

2

(21) 95073159

(22) 29.09.94

(24) 11.10.99

(31) 08/132413

(32) 06.10.93

(33) US

(86) /US94/11081 (29.09.94)

(46) 11.10.99. Бюл. № 6

(56) 1. WO № 92/04009, 19.03.92.

2. EP № 0456842, 21.11.91.

3. EP № 0457837, 27.11.91.

4. Gregoriadis G., "Liposomes", Drug Carriers in Biology and Medicine, N.-j. Academic Press, 1979, v. 14, p. 287-341.

(72) Коллінз Девід (US), Ча Янсик (US)

(73) Амген Інк. (US)

(57) 1. Композиция, содержащая липосомный пузырек и введенный в него белковый медикамент, отличающаяся тем, что в качестве липосомного пузырька содержит отрицательно заряженный фосфолипид, а в качестве белкового медикамента – протеин, способный к переходу в распрямленное состояние глобулы, при соотношении липида к протеину не менее 10:1.

2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что она имеет pH 3,0-7,5.

3. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что в качестве липосомного пузырька содержит фосфолипид, выбранный из группы, включающей: диолеилфосфатидилглицерол (DOPG), димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG), яичный фосфатидилглицерол, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), яичный фосфатидилэтаноламин, диолеилфосфатидовую кислоту (DOPA), димиристоилфосфатидовую кислоту (DMPA), дипальмитоилфосфатидовую кислоту (DPPA), диолеилфосфатидилсерин (DOPS), димиристоил-

фосфатидилсерин (DMPS), дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS), яичный фосфатидилсерин, лизофосфатидилглицерол, лизофосфатидилэтаноламин и лизофосфатидилсерин.

4. Композиция по п. 1, содержащая в качестве названного протеина цитокин.

5. Композиция по п. 4, содержащая цитокин, являющийся гематопоэтическим фактором.

6. Композиция по п. 5, отличающаяся тем, что гематопоэтический фактор выбран из группы, включающей гранулоцит колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцит макрофаг колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

7. Композиция по п. 5, отличающаяся тем, что гематопоэтическим фактором является G-CSF.

8. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что G-CSF является природным человеческим G-CSF или продуктом прокариотной или эукариотной экспрессии клетки-хозяина.

9. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что G-CSF является химически модифицированным.

10. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что химическая модификация G-CSF проведена полиэтиленгликолем.

11. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

12. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит в качестве названного протеина рекомбинантный G-CSF (rhG-CSF), полученный с помощью E. coli, а в качестве липосомного пузырька – DOPG при соотношении DOPG и rhG-CSF, соответствен-

(19) UA (11) 26640 (13) C1

но, 50:1 и дополнительно содержит 10 мМ ацетата натрия, и имеет pH 4,5.

13. Способ приготовления композиции, содержащей липосомный пузырек с введенным в него белковым медикаментом, отличающийся тем, что в качестве липосомного пузырька используют отрицательно заряженный фосфолипид, а в качестве белкового медикамента в него вводят протеин, способный к переходу в распрямленное состояние глобулы.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанная композиция имеет pH 3,0–7,5 и отношение липида к протеину не менее 10:1.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что в качестве липосомного пузырька используют фосфолипид, выбранный из группы, включающей: диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG), яичный фосфатидилглицерол, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), яичный фосфатидилэтаноламин, диолеилфосфатидовую кислоту (DOPA), димиристоилфосфатидовую кислоту (DMPA), дипальмитоилфосфатидовую кислоту (DPPA), диолеилфосфатиделсерин (DOPS), димиристоилфосфатидилсерин (DMPS), дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS), яичный фос-

фатидилсерин, лизофосфатидилглицерон, лизофосфатидилэтаноламин и лизофосфатидилсерин

16. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанным протеином является цитокин.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что названный цитокин является гематopoэтическим фактором.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что названный гематopoэтический фактор выбран из группы, состоящей из G-CSF и GM-CSF.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что названным гематopoэтическим фактором является G-CSF.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что G-CSF является природным человеческим G-CSF или продуктом прокариотной или эукариотной экспрессии клетки-хозяина.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что G-CSF является химически модифицированным.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что химическая модификация G-CSF проведена полиэтиленгликолем.

23. Способ по п. 13, отличающийся тем, что в композицию дополнительно вводят фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение относится к протеину: структурам фосфолипида, которые используют для стабилизации вторичной и третичной структуры протеинов, способных к переходу в распрямленное глобулярное состояние. В особенности, это изобретение относится к G-CSF: фосфолипидным композициям с повышенной стабильностью и способностью к использованию в G-CSF рецептурах и новых поставляющих проводниках G-CSF.

Обнаружено несколько видов протеинов, способных к переходу в распрямленное глобулярное состояние (MGS) (Van der Goot, F.G., *Nature* 354, 408–410 (1991)). Протеины в распрямленном глобулярном состоянии проявляют вторичную структуру, сравнимую со структурой природного протеина, однако у них отсутствует жесткая третичная структура (Pitsyn et al., *FEBS Letters* 262:1, 20–24 (1990)). В некоторых

случаях переход в это состояние сопровождается раскрытием ранее скрытых гидрофобных звеньев протеина. При раскрытии критических гидрофобных остатков, MGS может находиться в промежуточном состоянии между агрегированием и осаждением протеинов. MGS-конформация может быть обнаружена при сравнении кругового дихроизма в дальнем УФ диапазоне со спектром ароматических боковых цепей (ближний УФ круговой дихроизм и флуоресценция). Распрямленное глобулярное состояние показывает спектральные изменения ароматических групп в отсутствие изменений дальнего УФ кругового дихроизма (Bychkova et al. *FEBS Letters* 238:231–234 (1988)) и может быть вовлеченным в мембранную проницаемость некоторыми видами протеинов (Bychkova et al. *FEBS Letters* 238:231–234 (1988); Van der Goot, F.G., *Nature* 354, 408–410 (1991)).

Для перехода в MGS до агрегирования известны два вида протеинов: гранулоцит колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцит макрофаг колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В то время, как эти два вида протеинов могут быть стабилизированы при некоторых определенных условиях, существует необходимость продления жизни этих материалов стабилизацией вторичной и третичной структуры протеинов.

Человеческий рекомбинантный G-CSF селективно стимулирует нейтрофилы, вид белых кровяных клеток, используемых для борьбы с инфекцией. Общепринято, Filgrastim, что рекомбинантный G-CSF является пригодным для использования в терапии. Структура G-CSF в различных условиях подверглась интенсивному изучению (Lu et al., J. Biol. Chem. Vol. 267, 8770-8777 (1992)). Ввиду гидрофобного характера трудно получить G-CSF с продолжительной жизнеспособностью. Рецептуры некоторых гидрофобных протеинов теряют свою активность в результате образования димера или агрегатов более высокого порядка (макроагрегатов) в процессе продолжительного хранения. Другие химические превращения, такие как деамидация и окисление, также могут возникнуть в процессе хранения. Кроме того, G-CSF формулятор должен защищать против денатурации и, в особенности, быть склонным к стабилизации вторичной и третичной структуры протеина.

Человеческий GM-CSF является 22-kDa гликопротеином, непрерывно требуемым для быстрого размножения *in vitro* клеток предшественников макрофагов и гранулоцитов. Он также контролирует необратимое превращение этих клеток-предшественников при образовании гранулоцитов и макрофагов. Другие виды биологической активности могут включать регулирование функциональной активности зрелых клеточных видов (Gough et al., Nature, 309, 763-767 (1984)) и увеличение химоаттаксиса по отношению к опознанным химоаттрактантам (Williams et al., Hematology, 4th ed. (1990)). GM-CSF также стимулирует образование моноцитов и поэтому может быть использован при лечении моноцитарных расстройств, таких как моноцитопения.

Человеческий GM-CSF может быть получен и очищен из нескольких источников. Способы получения рекомбинантного человеческого GM-CSF были описаны ранее Burgess et al., Blood, 69:1, 43-51 (1987). Согласно цитируемому здесь патенту US 5047504 (Boone) предлагается получение

в промышленном масштабе GM-CSF в неликозилированной форме как продукт выражения прокариотной клетки-хозяина.

Одним из путей, предпринятым ранее при работе с такими протеинами, как G-CSF и GM-CSF, явилось использование липосом. Липосомы представляют собой полностью закрытые липидные двухслойные мембраны, образованные водонерастворимыми полярными липидами, особенно фосфолипидами.

Пузырьки липосом могут иметь один единственный мембранный двойной слой (однослойные) или множество мембранных двойных слоев (многослойные). Двойной слой состоит из двух липидных монослоев, имеющих гидрофильную (полярную) "головную" зону и гидрофобную (неполярную) "хвостовую" зону, в которой гидрофобные хвосты ориентированы по направлению к центру двойного слоя, в то время как гидрофильные головы ориентированы по направлению к водной фазе. Стабильность, жесткость и проницаемость липосом может изменяться путем изменений фосфолипидной композиции или температуры, включением стирола или введением заряженных амфифилов. Основная структура липосом может быть получена различными известными методами.

В процессе своего образования липосомы могут захватывать растворенные в воде вещества в водных каналах и освобождать их с различной скоростью. После обнаружения способности липосом к введению энзимов в клетки и к изменению их метаболизма (Gregoriadis, New Engl. J. Med. 295, 704-710, 765-770 (1976)) липосомы были объявлены средством, отвечающим требованию целенаправленной доставки медикаментов. В результате наблюдается усиленное развитие исследований в фармацевтической промышленности, включающих использование липосом в качестве медленных поставщиков лекарств, витаминов и протеинов, секвитированных в гидрофобных слоях или в гидрофобном ядре липосом.

Успешное использование липосом в качестве переносчиков медикаментов было ограничено, т.к. исследователи, предпринимавшие попытки в направлении такого применения липосом, встретились с рядом проблем. Например, известна способность липосом действовать в качестве сильных иммунологических помощников по отношению к захваченным антигенам, и должны быть приняты меры предосторожности в том случае, когда липосомами захвачены энзимы или протеины ксеногенного происхождения. Кроме того, трудно

контролировать скорость диффузии медикамента. Это является следствием природной нестабильности липосом и присутствия некоторых компонентов крови, которые ускоряют диффузию некоторых медикаментов. Помимо этого, по своей природе некоторые вещества слабо захватываются липосомами и поэтому быстро высвобождаются при кровообращении. Наконец, существует проблема нацеливания на любые клетки или органы, кроме печени или селезенки. Замечательным обзором по липосомам, веществам, которые были введены в липосомы и проблемам, связанным с использованием липосом в качестве переносчиков медикаментов, является Gregory Gregoriadis, "Liposomes", Drug Carriers in Biology and Medicine, Chapter 14, 287-341 (Academic Press, N. Y., 1979).

В то время как в области попыток использования липосом в качестве переносчиков медикаментов опубликовано много работ, мало публикаций появилось в области использования липосом с целью увеличения периода жизни терапевтических пептидов или протеинов путем стабилизации структуры пептидов и/или протеинов. В PCT/US90/05163 "Терапевтические пептиды и протеины", Hostetler et al. описано использование пустых липосом в качестве фармацевтически пригодных разбавителей для растворения полипептидов и/или протеинов с целью предотвращения аккумуляции полипептидов и/или протеинов на поверхности раздела воздух/вода и для предотвращения адсорбции полипептидов и/или протеинов на поверхности контейнера. Hostetler et al. описывает, что отрицательно заряженные фосфолипиды могут быть добавлены в количестве до около 50 мол. %, и что предпочтительными липосомами являются фосфатидилхолин, нейтральный фосфолипид. Hostetler et al. не описывает разбавителя, способного стабилизировать структуру полипептида и/или протеина.

В PCT/US91/07694 "Получение и характеристика липосомных рецептур фактора некрозного новообразования (TNF)", Hung et al., описана липофильная молекула фактора некрозного новообразования, связанная с поверхностью или инкапсулированная внутри липосомы. Липосомные липофильные TNF молекулы описаны как имеющие повышенную стабильность *in vivo*. Стабильность рассматривается как уменьшение или как тенденция к уменьшению TNF-липосомы выделять TNF в систему *in vivo*. Предпочтительными

липосомами были нейтральные липиды. Heing et al. не описывают композиции TNF, в которой наполнители (excipients) оказывают стабилизирующее действие на структуру протеина.

В литературных источниках отсутствуют какие-либо сведения, касающиеся контактирования протеина, например G-CSF, с отрицательно заряженными пузырьками (полостями) липид, в результате которого непосредственно стабилизируется протеин против термической агрегации, денатурации, потери активности и разветвляется вторичная структура. Существует потребность в таких композициях, которые могут быть использованы в технологических процессах, требующих высоких температур, а также в качестве новых поставщиков (например, оральное применение лекарств, закрепленных в G-CSF). Настоящее изобретение касается таких композиций.

Настоящее изобретение направлено на добавление гидрофобных эксципиентов, например, лизофосфолипидов или других липосом, к протеину в условиях расплавленного глобулярного состояния для стабилизации вторичной и третичной структуры протеина, защищая таким образом протеин против термической агрегации, денатурации и потери активности. В особенности целью изобретения являются стабильные G-CSF:фосфолипидные композиции. Неожиданно оказалось, что предпочтительные G-CSF композиции могут быть несколько раз подвергнуты циклическому изменению температуры в диапазоне 10-95°C с последующим полным восстановлением вторичной структуры протеина после охлаждения. Эти композиции имеют двойное преимущество: быть полезными при технологических процессах, требующих высоких температур, а также при использовании в новых поставщиках G-CSF.

В предпочтительном варианте, комплекс протеин:фосфолипид включает отрицательно заряженную липосому, выбранную из группы: диолеилфосфатидилглицерол (DOPG), димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG), яичный фосфатидилглицерол, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), яичный фосфатидилэтаноламин, диолеилфосфатидовая кислота (DOPA), димиристоилфосфатидовая кислота (DMPA), дипальмитоилфосфатидовая кислота (DPPA), диолеилфосфатидилсерин (DOPS), димиристоилфосфатидилсерин (DMPS), дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS), яич-

ный фосфатидилсерин, лизофосфатидилглицерол, лизофосфатидилэтаноламин и лизофосфатидилсерин.

DOPG, отрицательно заряженный ненасыщенный фосфолипид, является особенно предпочтительным. Согласно изобретению pH поддерживают в пределах 3,0–7,5, а отношение липид:протеин не менее 10:1.

Дополнительным элементом, согласно предпочтительному варианту изобретения, является использование химически модифицированных протеинов в составе комплексов протеин:фосфолипид, а также использование одного или нескольких из следующих агентов: агент, устанавливающий изотонию, буферный агент и агент, устанавливающий pH. Специалисту понятно, что изобретение включает стабильные композиции протеин:фосфолипид с различным сочетанием дополнительных элементов.

На фиг. 1 изображен спектр флуоресцентной эмиссии rhG-CSF в присутствии (кривая 1) и в отсутствии (кривая 2) пузырьков DOPG. Концентрация DOPG:rhG-CSF равна 0,2 мг/мл. Молярное отношение DOPG:rhG-CSF (кривая 1) равно 100:1.

На фиг. 2(а) показано влияние увеличения отношения липид:протеин на rhG-CSF флуоресценцию. F_0 означает исходную флуоресценцию (без липида) и F означает флуоресценцию после добавления липида для достижения указанного молярного отношения $F/F_0(n)$ и максимум длины волны эмиссии (Δ) для смесей DOPG:rhG-CSF. На фиг. 2(в) показано отношение $F/F_0(n)$ и максимум длины волны эмиссии (Δ) для смесей DOPG:rhG-CSF.

На фиг. 3 показана кривая Стерна-Волмера (Stern-Volmer) затухания rhG-CSF флуоресценции посредством KJ в отсутствии (о) и в присутствии (о) пузырьков DOPG. Эксперимент по затуханию проводился добавлением равных порций KJ к rhG-CSF (0,2 мг/мл) и DOPG:rhG-CSF 100:1.

На фиг. 4 показано затухание rhG-CSF флуоресценции триптофана при добавлении пирендекановой кислоты (pyrene decanoic acid). Длина волны эмиссии равна 327 нм. Молярное отношение DOPG:rhG-CSF равно 100:1.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий в сравнении изменения F интенсивности для rhG-CSF в отсутствии и в присутствии различных липидов. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий в сравнении сдвиги мак-

симумов эмиссии для rhG-CSF в отсутствии и в присутствии различных липидов. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 7 показано влияние DMPC (кривая 2), DMPG (кривая 3) и DMPA (кривая 4) на CD rhG-CSF (кривая 1). В каждом случае молярное отношение липид:протеин в воде равно 50:1, pH 6,0.

На фиг. 8 показано влияние повышения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (140:1 молярное) (кривая 2). Концентрация rhG-CSF в воде равна 80 мг/мл, pH 6,0. Температура изменялась в пределах 10–90°C со скоростью 100°C/ч.

На фиг. 9 показана дифференциальная сканирующая калориметрическая термограмма для rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (45:1 молярное) (кривая 2). Концентрация rhG-CSF в образцах равна 1 мг/мл, pH 7,0 в воде. Скорость сканирования 90°C/ч.

На фиг. 10 показано влияние циклического изменения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (140:1 молярное) (кривая 2). Образцы быстро нагревали до 95°C и охлаждали до 10°C как показано стрелками. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

На фиг. 11 показано влияние циклического изменения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DMPG:rhG-CSF (150:1 молярное) (кривая 2). Образцы нагревают до 95°C и охлаждают до 10°C. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

На фиг. 12 показано влияние температурных циклов на CD rhG-CSF (кривая 1) и DPPG:rhG-CSF (150:1 молярное) (кривая 2). Образцы нагревают до 95°C и охлаждают до 10°C. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

Фиг. 13 изображает график, показывающий способность различных липидов к стабилизации rhG-CSF в процессе замораживания-сушки. Отношение липид:протеин в каждом случае равно 100:1. Стабильность определялась по сохранению активности *in vitro* в образце костного мозга. Один rhG-CSF не выдерживает процесса замораживания-сушки, поэтому контрольным образцом является необработанный rhG-CSF в отсутствии липида.

На фиг. 14 показано влияние различных липидов на активность *in vitro* rhG-CSF. Активность (в расчете на WBC) измеряли после подкожной инъекции хомячков. Доза rhG-CSF равна 100 мг/кг при отношении липид:протеин 100:1.

На фиг. 15 показано влияние различных липидов на активность *in vitro* rhG-CSF. Активность (в расчете на WBC) измеряли после подкожной инъекции хомячков. Доза rhG-CSF равна 100 мг/кг при отношении липид:протеин 50:1.

На фиг. 16 изображен график, показывающий сравнительное изменение CHO-G-CSF в отсутствие и в присутствии DOPG при различном pH. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 17 изображен график, показывающий сравнение сдвигов максимумов эмиссии для CHO-G-CSF в отсутствие и в присутствии DOPG при различном pH. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 18 показано влияние температурных циклов на CD PEG-G-CSF (-) и DMPG:PE-G-CSF (17:1 молярное) (- -). Образцы нагревают до 90°C и охлаждают до 10°C.

На фиг. 19 показано: а) влияние температурных циклов на CD GM-CSF в PBS, pH 7,0. GM-CSF при 10°C (-) сравнительно с GM-CSF, который нагревают до 90°C и охлаждают до 10°C (- -); б) влияние температурных циклов на CD DPPG:PEG-G-CSF (17:1 молярное). DPPG:GM-CSF при 10°C (-) сравнивают с DPPG:GM-CSF, который нагревают до 90°C и затем охлаждают до 10°C (- -).

Композиция по изобретению иллюстрируется нижеследующими примерами. Примеры показывают различные аспекты изобретения и включают данные испытаний по стабильности и биологической активности различных протеинов: фосфолипидных композиций. Взаимодействие протеинов с липидными пузырьками непосредственно стабилизирует протеиновую структуру протеина, оказывая, таким образом, стабилизирующее воздействие на протеин даже в условиях, приводящих к денатурации протеина в отсутствие липида. Предполагается использовать различные протеины, способные переходить в распрямленное глобулярное состояние. Примерами предполагаемых протеинов являются цитокины, включая различные гематopoэтические (hematopoietic) факторы, такие как упомянутые выше G-CSF, GM-CSF, M-CSF, интерфероны (альфа, бета и гамма), интерлейкины (1-11), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов, клеточный фактор (stem cell factor), фактор роста нерва, BDNF, NT3, полученный из тромбоцита фактора роста, и фактор роста опухолевых новообразований (альфа,

бета). Другие протеины могут быть оценены по способности к переходу в MGS. Если такой протеин способен к превращению в MGS, то такой протеин может затем быть приведен в контакт с пузырьками отрицательно заряженной липосомы и определен эффект стабилизации.

В общем случае G-CSF может быть в нативной форме, выделенной в чистом виде из организма млекопитающих, или, альтернативно, может быть продуктом химического синтеза или продуктом эукариотной или прокариотной экспрессии клетки хозяина экзогенной последовательности ДНК, полученной геномным или cДНК клонированием или генным синтезом. Подходящие прокариотные хозяева включают различные бактериальные клетки (например, *E. coli*). Подходящие эукариотные хозяева включают дрожжи (например, *S. cerevisiae*) и клетки млекопитающих (например, яичника китайского хомячка, обезьяны). В зависимости от используемого хозяина, продукт G-CSF выражения может быть гликозилирован млекопитающими или другими эукариотными углеводами, или может быть негликозилирован. Изобретение предполагает использование любых или всех таких форм G-CSF, хотя предпочтительным, с точки зрения наибольшей коммерческой практичности, является рекомбинантный G-CSF, особенно полученный *E. coli*.

G-CSF, который подвергают химической модификации с целью использования в настоящем изобретении, может быть также либо природным человеческим G-CSF (nhG-CSF), либо продуктом рекомбинантного процесса нуклеиновой кислоты, такого, как выражение прокариотной или эукариотной клетки хозяина.

В общем случае, предполагаемой химической модификацией является присоединение химической половины к самой молекуле G-CSF.

Обзорной статьей, описывающей модификацию протеина и слияние протеинов является Francis, Focus on Growth Factors 3; 4-10 (май 1992) (опубликовано Mediscript, Mountview Court, Frun Barnet Lane, London N20 0LD, UK). Например, EP 0401384 "Chemically Modified Granulocyte Colony Stimulating Factor, в которой описаны материалы и методы приготовления G-CSF, к которой присоединены молекулы полиэтиленгликоля. Присоединение может быть непосредственным связыванием с протеином или к половине, действующей в качестве мостика для активного агента. Наиболее предпочтительной, как

наиболее стабильной, является ковалентная связь. Химическая модификация может способствовать контролируемому, длительному или расширенному эффекту G-CSF. Это может приводить, например, к контролю времени, необходимого для достижения химически модифицированным G-CSF свернутого в клубок положения. Примером химического модификатора является полиэтиленгликолевые композиции, включая их производные.

По изобретению предполагается использовать любые химически модифицированные G-CSF препараты, эффективные при применении. Эффективность может быть определена различными методами, известными специалисту. Предпочтительными являются пегилированный (pegylated) G-CSF, в особенности полученный *E. coli* G-CSF и, еще более предпочтительно, три-тетра пегилированный полученный *E. coli* G-CSF. G-CSF описан как наиболее стабильный в кислой среде, несмотря на то, что при pH 2,5–5,0 происходит конформационное изменение, сопровождающееся потерей третичной структуры и повышением содержания альфа спиральной формы (Narhi et al., J. Protein Chem. 10, 359–367 (1991)). Это конформационное изменение характерно для распрямленного глобулярного состояния (MGS). Так, как это происходит в случае работы препарата с другими протеинами, способными к превращению в MGS, препарат, имеющий дело с G-CSF, должен принимать защитные меры против термического распрямления вторичной и третичной структуры для предотвращения агрегации и денатурации. GM-CSF, пригодный для использования по изобретению, может быть нативной формой, выделенной в чистом виде из организма млекопитающих, или продуктом прокариотной или эукариотной экспрессии клетки хозяина экзогенной последовательности ДНК, полученной геном или cДНК клонированием, или генным синтезом. Подходящие прокариотные хозяева включают различные бактериальные клетки (например, *E. coli*). Подходящие эукариотные хозяева включают дрожжи (например, *S. cerevisiae*) и клетки млекопитающих (например, яичника китайского хомячка, обезьяны). В зависимости от используемого хозяина, продукт GM-CSF выражения может быть гликозилирован млекопитающим или другими эукариотными углеводами, или может быть негликозилирован. Изобретение предполагает использование любых и всех таких форм GM-CSF, хотя предпочтительным яв-

ляется рекомбинантный GM-CSF, в особенности полученный *E. coli*, по соображениям коммерческой практичности.

Липидные пузырьки, используемые в композициях по изобретению, являются отрицательно заряженными липосомами, способными к взаимодействию с протеином. Предпочтительными являются следующие липосомы: диолеилфосфатидилглицерол (DOPG); димиристилфосфатидилглицерол (DMPG); дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG); яичный фосфатидилглицерол; диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE); яичный фосфатидилэтанолламин; диолеилфосфатидовая кислота (DOPA); димиристолфосфатидовая кислота (DMPA); дипальмитоилфосфатидовая кислота (DPPA); диолеилфосфатидилсерин (DOPS); димиристолфосфатидилсерин (DMPS); дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS); яичный фосфатидилсерин; лизофосфатидилглицерол; лизофосфатидилэтанолламин; лизофосфатидилсерин.

В предпочтительном варианте с использованием *E. coli* полученного rhGM-CSF, липосомным пузырьком является DMPG с отношением DMPG:GM-CSF 17:1, при pH 7,0 в растворе фосфатного буфера (PBS).

В предпочтительном варианте с использованием химически модифицированного (пегилированного) *E. coli* полученного rhG-CSF, rhG-CSF является три-тетра связанным, липосомным пузырьком является DMPG с отношением DMPG:PEG-G-CSF 17:1, при pH 4,5.

Хотя изобретение описывается и иллюстрируется в отношении к специфическим протеин:липидной композиции и методам обработки, специалисту очевидно, что могут существовать различные соответствующие композиции и методы обработки, без отклонения от цели изобретения.

Следующие примеры иллюстрируют более подробно различные аспекты изобретения.

Пример 1. Производили первоначальные эксперименты для исследования возможности введения рекомбинантного человеческого G-CSF (rhG-CSF) в липидный пузырек. rhG-CSF получали при использовании рекомбинантной ДНК технологии, согласно которой *E. coli* клетки были подвергнуты трансфекции посредством ДНК-последовательности, кодирующей человеческий G-CSF, как описано в патенте US № 4810643 на имя Souza. rhG-CSF готовили в виде раствора с концентрацией 4 мг/мл в разбавленной HCl, pH

4.0. Все липиды были получены из Avanti Polar Lipids (Albaster, Ala) и выдержаны при -20°C в атмосфере азота при конечной концентрации 100 мг/мл в хлороформе.

Приготовление G-CSF:фосфолипидных комплексов.

С целью приготовления липидных пузырьков для сочетания с G-CSF 30 $\mu\text{мол}$ соответствующего липида помещают в стеклянную трубку и сушат в потоке газообразного азота до образования тонкой пленки. Липидную пленку высушивают не менее двух часов под вакуумом для удаления любых следов хлороформа. Липидную пленку гидрируют в 1 мл либо дистиллированной деионизированной воды (ddH_2O), фосфатном буферном растворе, pH 7,2 (Cibro/BRL "D-PBS") либо в 150 mM NaCl. Затем образцы были обработаны ультразвуком в ультразвуковой установке типа ванны (лаборатория Supplies, Hicksville, N.Y.). Ультразвуковую обработку продолжали до тех пор, пока образцы не приобрели оптическую прозрачность (обычно в пределах 10–15 мин). Образцы хранили при 4°C под азотом вплоть до использования. Конечная концентрация липида составляла 30 mM. Альтернативно, липидные пузырьки могут быть приготовлены высушиванием под азотом 300 $\mu\text{мол}$ липида как описано выше. Сухие липидные пленки гидрировали в 10 мл соответствующего водного раствора как описано выше. Образцы были затем микроэмульгированы в эмульгаторе (Microfluidics Model 110S, Microfluidics, Inc., Cambridge, MA), работающем при 10000 пси. Образцы подвергали 10 циклам рециркуляции в приборе. Микроэмульгированные образцы затем хранили при 4°C как описано выше.

G-CSF:фосфолипидные комплексы готовили смешением G-CSF (как описано выше) со специфичным липидом (как описано выше). Смешение осуществляют в вихревом смесителе, перемешиванием или бережным встряхиванием. Готовят образцы с различным молярным соотношением липид:G-CSF для оценки мембранной проницаемости и стабилизации протеина. Например, для приготовления 3 мл образца (в воде), содержащего 0,2 мг/мл G-CSF при молярном отношении липид:G-CSF 40:1, 150 $\mu\text{л}$ исходного раствора G-CSF соединяют с 44 $\mu\text{л}$ липида (30 mM исходный раствор в воде, приготовленный при воздействии ультразвука), и добавляют воду до конечного объема образца 3 мл. Рекомендуемая пятиминутная инкубация (но

не обязательная) была осуществлена перед использованием и испытанием образца.

G-CSF может быть также соединен с гидрированным липидом перед микроэмульгированием. Последующее микроэмульгирование смеси (как описано выше) приводит к внедрению G-CSF в липидную мембрану.

Анализ G-CSF:фосфолипидных комплексов.

1. Триптофанный эмиссионный спектр.

Существует две группы триптофана в rhG-CSF, являющиеся очень чувствительными к условиям локальной окружающей среды. Поэтому проводили анализ для определения rhG-CSF триптофанный флуоресценции в условиях контактирования rhG-CSF с липосомой. Голубой сдвиг максимума флуоресцентной эмиссии предполагает, что триптофаны находятся в более гидрофобной окружающей среде, и, следовательно, rhG-CSF внедрен в липидную мембрану. Отличным образом триптофанного флуоресцентного анализа является Principles of Fluorescence Microscopy, J. Lakowicz, Chap. 11 (Plenum Press, New York, 1983).

Триптофанную флуоресценцию G-CSF:липидных комплексов (как описано выше) анализировали возбуждением образцов при длине волны 280 нм и в процессе сканирования эмиссии от 285 нм до 420 нм с приращением (инкрементом) в 1 нм при скорости 1 нм/с. Образец имел объем 3 мл при конечной концентрации G-CSF 0,2 мг/мл для всех образцов. Отношение липид:G-CSF варьировалось. Все измерения флуоресценции проводили с использованием PTJ Alphacan флуорометра (South Brunswick, N.Y.). Все измерения осуществлялись при 25°C и эту температуру поддерживали использованием держателя кюветы с водной рубашкой, связанного с циркулирующей водной ванной. Собирали эмиссионный спектр и анализировали, используя данные программного обеспечения PTJ. На фиг. 1 показан спектр флуоресценции rhG-CSF в присутствии и в отсутствие небольших однослойных пузырьков, состоящих из DOPG. rhG-CSF имеет максимум эмиссии в области 334 нм в отсутствие пузырьков DOPG. В присутствии DOPG и при соотношении липид:протеин 100:1 rhG-CSF триптофанная флуоресценция показывает сдвиг максимума флуоресценции в голубую область эмиссии в область 327 нм и сильное увеличение интенсивности флуоресценции.

Короткая длина волны флуоресцентной эмиссии в присутствии DOPG предполагает большую гидрофобность триптофаном в окружающей среде, чем нативный протеин. Как показано на фиг. 2, сдвиг флуоресценции зависит от мольного отношения DOPG:G-CSF, и мембранное внедрение обнаруживается как только достигается соотношение DOPG:G-CSF 10:1.

2. Испытания иодидного тушения.

Иодид является эффективным тушителем триптофанной флуоресценции, но он не может проникать через липидные мембраны. Поэтому, эффективное тушение триптофанной флуоресценции иодидом показывает доступность групп основной мас-се водного растворителя, в то время как защита от иодидного гашения наблюдается в случае, когда триптофаны протеина изолированы от водного растворителя.

В этих экспериментах использованы G-CSF и DOPG:G-CSF композиции (отношение липид:протеин 100:1). После того, как первоначальное считывание (F_0) на образцах было произведено и зарегистрировано, измеряли интенсивность флуоресценции после введения возрастающих количеств иодида калия (KJ) (5 M исходный раствор). Образцы и KJ растворы были приготовлены с содержанием 1 mM Na_2SO_3 (конечная концентрация) как описано Lee et al., Biochem. Biophys. - Acta, 984: 174-182 (1989) и Le Doan et al., Biochem. Biophys. Acta, 858: 1-5 (1986). Добавление Na_2SO_3 препятствует образованию J_2 , который может распределяться между неполярными участками протеинов и мембранами. Данные испытаний были проанализированы с помощью уравнения Stern-Volmer ($F_0/F = 1 + K_s[KJ]$), где F_0 и F представляют собой интенсивности флуоресценции образцов соответственно в отсутствие и в присутствии KJ при концентрации [KJ]. K_s является константой тушения Stern-Volmer для KJ тушения G-CSF триптофанных радикалов (Lehrer, S., Biochemistry 10: 3254-3263 (1979)).

На фиг. 3 показаны данные кривой Stern-Volmer. В отсутствие пузырьков DOPG, rhG-CSF флуоресценция эффективно гасится KJ. В присутствии DOPG данные Stern-Volmer расположены на прямой, что указывает на то, что иодид имеет слабую доступность к обоим триптофанам. Данные показывают, что группы триптофана, доступные для иодида в отсутствие DOPG, становятся недоступными для иодида в присутствии DOPG. Поэтому часть rhG-CSF, содержащая этот триптофан, должна быть внедренной в двойной слой DOPG.

3. Измерение превращения энергии.

Как уже указывалось ранее, между донорами триптофана и растворимыми в липиде акцепторами флуоресценции, такими как пирендекановая кислота, может произойти передача энергии, так как спектр возбуждения этой пробы значительно перекрывает спектр эмиссии триптофана (Friere et al., Biochemistry, 22: 1675-1680 (1983)). В случае внедрения протеина в липидную мембрану, передача энергии от триптофана к пирену приведет к затуханию флуоресценции триптофана. В этом эксперименте непрерывно измеряют интенсивность эмиссии триптофана различных комплексов G-CSF:липид перед (F_0) и после (F) добавления различных количеств пирендекановой кислоты (исходный раствор в тетрагидрофуране с концентрацией 30 $\mu\text{g}/\text{мл}$). Образцы непрерывно перемешивают в процессе добавления пирендекановой кислоты для лучшего смешения пирендекановой кислоты с образцом. Отношение F/F_0 пропорционально количеству передачи энергии между G-CSF триптофанами и гидрофобным акцептором энергии - пирендекановой кислотой.

На фиг. 4 показан характер затухания rhG-CSF в присутствии DOPG (отношение липид:протеин 100:1) как функция добавленного количества пирендекановой кислоты. Затухание флуоресценции начинается при очень небольших концентрациях пирендекановой кислоты (<1 мол. %), так что эффект флуоресцентной пробы на мембранную структуру и поведение является минимальным. Поскольку предполагают, что пирендекановая кислота может очень быстро проникать в липидный двойной слой, настоящие данные показывают, что RhG-CSF довольно глубоко внедряется в DOPG мембраны, что вызывает эффективную передачу энергии от триптофана к пиреновому акцептору. Процесс передачи энергии был подтвержден исследованием спектра возбуждения пирендекановая кислота - меченые DOPG пузырьки в присутствии и в отсутствие rhG-CSF.

Вышеуказанный анализ показывает, что rhG-CSF может тесно взаимодействовать с ненасыщенными фосфолипидами подобно DOPG. В присутствии DOPG пузырьков rhG-CSF триптофан является защищенным от водорастворимого тушителя флуоресценции, но является поддающимся затуханию флуоресценции в результате передачи энергии гидрофобной флуоресцентной пробе.

Вместе взятые данные показывают, что rhG-CSF может внедряться в мембраны,

состоящие из DOPG. Мембранное внедрение можно обнаружить при достижении отношения липид:G-CSF 10:1, и это число может представлять собой число липидов, окружающих внедренную часть протеина.

П р и м е р 2. Определяют способность rhG-CSF к взаимодействию с другими фосфолипидами сравнением отношения интенсивностей F/F_0 и максимумом эмиссии как описано выше. В каждом случае молярное отношение липид:rhG-CSF равняется 100:1.

На фиг. 5 показаны значения отношения F/F_0 для rhG-CSF в отсутствие и в присутствии различных липидов. На фиг. 6 показаны значения максимума эмиссии для тех же самых композиций. Данные на фиг. 5 и 6 показывают, что в дополнение к DOPG, rhG-CSF может внедряться в DMPG, DPPG, и менее эффективно в фосфатидилэтаноламина (PE's) и в фосфатидилсерина (PS's). Кроме того, установлено, что NG-DOPE (DOPE образец с более отрицательно заряженной PE головной группой) более способствует внедрению rhG-CSF, чем DOPE. DOPC, DMPC и DPPC являются нейтральными липидами, и эти пузырьки мало влияют или вовсе не влияют на максимум эмиссии или интенсивность флуоресценции rhG-CSF, что указывает на отсутствие взаимодействия с этими фосфолипидами (фиг. 5 и 6, и фиг. 7, кривая 2).

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что протеин, способный переходить в распрямленное глобулярное состояние, может внедряться в различные липидные пузырьки. Однако, это rhG-CSF:липидное взаимодействие происходит только тогда, когда используют отрицательно заряженные липидные пузырьки. Среди отрицательно заряженных липидных пузырьков, пузырьки с небольшим отрицательным зарядом должны вызывать более сильное rhG-CSF взаимодействие.

П р и м е р 3. Определяют влияние rhG-CSF взаимодействия на стабильность протеина. Для этого измеряют круговой дихроизм на приборе Jasco J-720, снабженном штативом термостатированных клеток типа Peltier и магнитной мешалкой. Измеряют круговой дихроизм при 222 нм конечной концентрации rhG-CSF 80 $\mu\text{г/мл}$, pH 6,0. На калориметре Microcal MC-2 производят измерения дифференциальной сканирующей калориметрии. Сканируют образцы rhG-CSF (1 мг/мл , в воде) или DOPG:rhG-CSF (45:1 моль/моль, в воде) со скоростью 90°C/ч. Данные хранят и

анализируют при помощи программного обеспечения Microcal.

Исследуют температурные изменения альфа-спирали G-CSF посредством измерения кругового дихроизма (222 нм) как функции повышения температуры. Развертывание спирали rhG-CSF под действием температуры при pH 6,0 показано на фиг. 8. Кривая показывает, что довольно большое превращение наблюдается при ~ 60–70°C, что приводит к потере альфа-спиральной формы. После такого превращения rhG-CSF необратимо высаждается из раствора. Температурный интервал процесса развертывания спирали подобен температуре плавления rhG-CSF при pH 7,0, как это было установлено методом дифференциальной сканирующей калориметрии и показано на фиг. 9.

Напротив, DOPG:rhG-CSF образцы показывают постепенную потерю альфа-спиральности с повышением температуры и, в противоположность одному rhG-CSF, развертывание спирали DOPG:rhG-CSF под действием температуры не является совместным (фиг. 8). Такой вывод также следует из отсутствия перехода плавления, как это показывает дифференциальная сканирующая калориметрия (фиг. 9). Примечательно, что DOPG:rhG-CSF образцы могут восстанавливать альфа-спиральность после нагрева до 95°C и могут быть подвергнуты циклическому изменению температуры между 95 и 10°C с полным восстановлением спиральной формы после охлаждения (фиг. 10). rhG-CSF сам по себе в таких условиях необратимо развертывается и высаждается из раствора.

Кроме того, исследовали влияние DMPG и DPPG на G-CSF круговой дихроизм. Использовали отношение липид:rhG-CSF 150:1, и, как и в случае с DOPG, DMPG и DPPG также стабилизируют вторичную структуру rhG-CSF (фиг. 11–13). Эти данные показывают, что взаимодействие rhG-CSF с DOPG, DMPG и DPPG улучшает стабильность протеина в условиях, при которых rhG-CSF сам по себе нестабилен. Это взаимодействие стабилизирует вторичную и третичную структуру rhG-CSF.

П р и м е р 4. Определяют влияние взаимодействия rhG-CSF:DOPG в соответствии с биологической активностью rhG-CSF. Исследуют активность *in vitro* rhG-CSF посредством G-CSF зависящего поглощения [^3H]-тимидина клетками костного мозга мыши как описано в Zsebo et al., Immunobiology 172: 175–184 (1986). Все

испытания проводились трижды. Активность *in vivo* определяли посредством мышечной инъекции хомячкам (доза rhG-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) и подсчетом количества белых кровяных телец (WBC).

1. Активность *in vitro*.

А. Определяют специфичную активность rhG-CSF в присутствии и в отсутствие DOPG. Также испытывают термообработанные образцы rhG-CSF и DOPG:rhG-CSF. Результаты испытаний сведены в таблицу.

Как видно из данных таблицы, внедрение в DOPG двойной слой не снижает биологической активности rhG-CSF. После нагрева до 85°C в течение 10 мин активность rhG-CSF не поддается определению и протеин осаждается. После такой же обработки DOPG:rhG-CSF сохраняет ~ 85% активности rhG-CSF без нагревания и полностью восстанавливает вторичную структуру после охлаждения.

В. Изучалась способность различных липидов стабилизировать rhG-CSF в процессе сушки вымораживанием. Образцы rhG-CSF в сочетании с различными липидами подвергали сушке вымораживанием и испытывали на активность как описано выше. При смешении с rhG-CSF DOPG, DMPG и DPPG обеспечивают ~ 100% сохранение биоактивности rhG-CSF после сушки вымораживанием (фиг. 14). Сам по себе rhG-CSF не выдерживает процесса сушки вымораживанием.

2. Активность *in vitro*.

Определяют активность (подсчетом WBC) rhG-CSF в отсутствие и в присутствии липида. Активность измеряют после мышечной инъекции (доза rhG-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) на день 0. Исследовали пять различных комплексов липид:rhG-CSF, и в каждом случае комплекс липид:rhG-CSF сохраняет активность *in vivo* (фиг. 15 и 16). Описанные исследования показывают, что внедрение в отрицательно заряженный двойной слой липида не оказывает отрицательного воздействия на биологическую активность rhG-CSF. Кроме того, оказалось, что защитное воздействие липида защищает rhG-CSF в течение процесса сушки вымораживанием.

Пример 5. Испытывают способность химически модифицированного (пегилированного) G-CSF (PEG-G-CSF) и G-CSF, полученного как продукт эукариотной экспрессии клетки-хозяина (CHO-G-CSF), к взаимодействию с отрицательно заряженными липидными пузырьками. В случае CHO-G-CSF определение проводили на основе сравнения отношения ин-

тенсивностей F/F_0 и максимумов эмиссии (как описано выше в примере 1). В каждом случае мольное отношение липид:протеин равнялось 100:1. В случае же PEG-G-CSF определение проводили на основе анализа кругового дихроизма.

CHO-G-CSF получали по технологии рекомбинантной ДНК, согласно которой клетки яйчника китайского хомячка подвергали трансфекции посредством кодирования последовательности ДНК человеческого G-CSF как это описано в патенте США № 48810643 на имя Souza. CHO-G-CSF приготавливали в виде раствора в PBS с концентрацией 0,6 мг/мл, pH 7,0. Показано, что CHO-G-CSF взаимодействует с DOPG подобно rhG-CSF. Каждый образец показывает увеличение интенсивности флуоресценции в присутствии DOPG и сдвиг максимума эмиссии в голубую область в присутствии DOPG (фиг. 17 и 18). Следовательно, взаимодействие DOPG не является следствием некой специфичности рекомбинантной формы G-CSF.

В этом эксперименте использовали PEG-G-CSF в виде три-тетра пегилированного *E.coli* полученного G-CSF (используют PEG 6000). Образцы DMPG:PEG-G-CSF (мольное отношение 17:1) готовили как описано выше. Найдено, что образцы DMPG:PEG-G-CSF полностью восстанавливают вторичную структуру после нагревания (фиг. 19). Несмотря на присутствие молекул PEG, модифицированный протеин был способен к взаимодействию с липидом так же, как негативный протеин.

Приведенные данные показывают, что эффект стабилизации, связанный с взаимодействием G-CSF с отрицательно заряженными липидными пузырьками, не является присущим только rhG-CSF, полученному как продукт прокариотной эмиссии клетки-хозяина. Химически модифицированный протеин, способный к превращению в MGS, после контактирования с липидным пузырьком, также проявляет стабилизирующее воздействие.

Пример 6. Изучают влияние DMPG и DPPG на GM-CSF. GM-CSF представлял собой рекомбинантный человеческий GM-CSF согласно патенту США № 5047504 на имя Boone. Его готовили в виде раствора с концентрацией 1 мг/мл в фосфатном буферном растворе, pH 7,0. Отношение липид:GM-CSF равно 17:1. Измеряли термическую стабильность посредством анализа кругового дихроизма как описано выше. DMPG и DPPG могут приводить к лучшей термической стабильности GM-CSF, то есть к восстановлению вто-

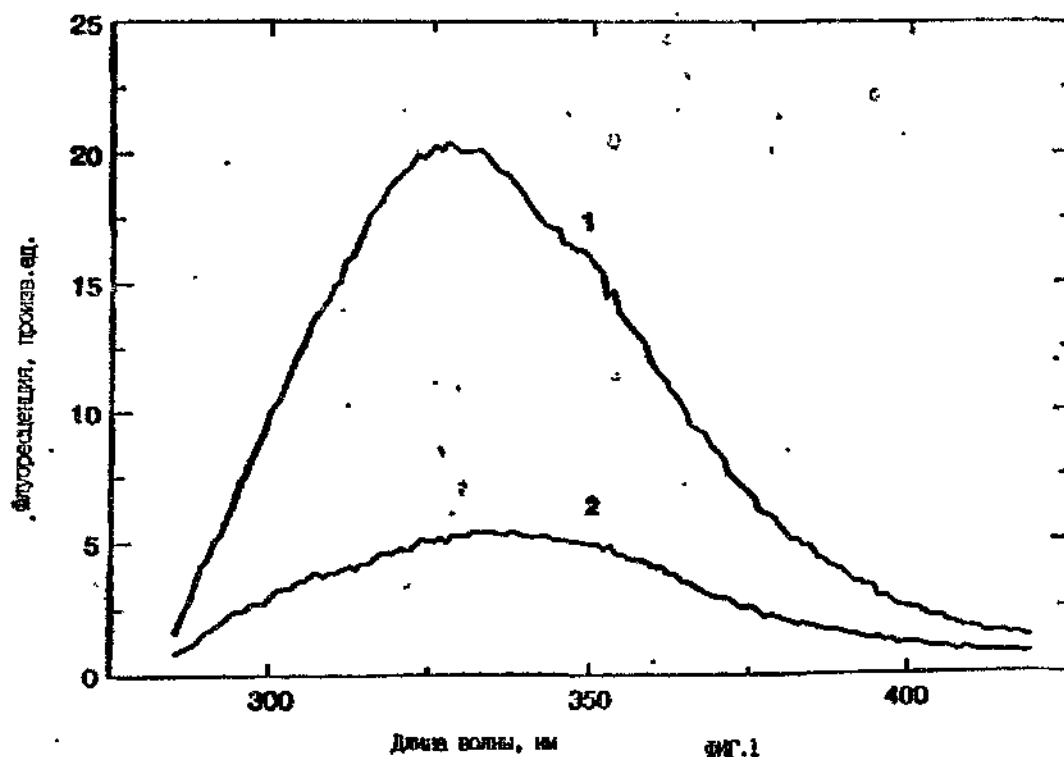
ричной структуры после нагрева (фиг. 20a и 20b). Данные этого исследования показывают пример другого образца протеина, способного к превращению в расп-

рямленное глобулярное состояние и к взаимодействию с отрицательно заряженным липидным пузырьком, для повышения термической стабильности протеина.

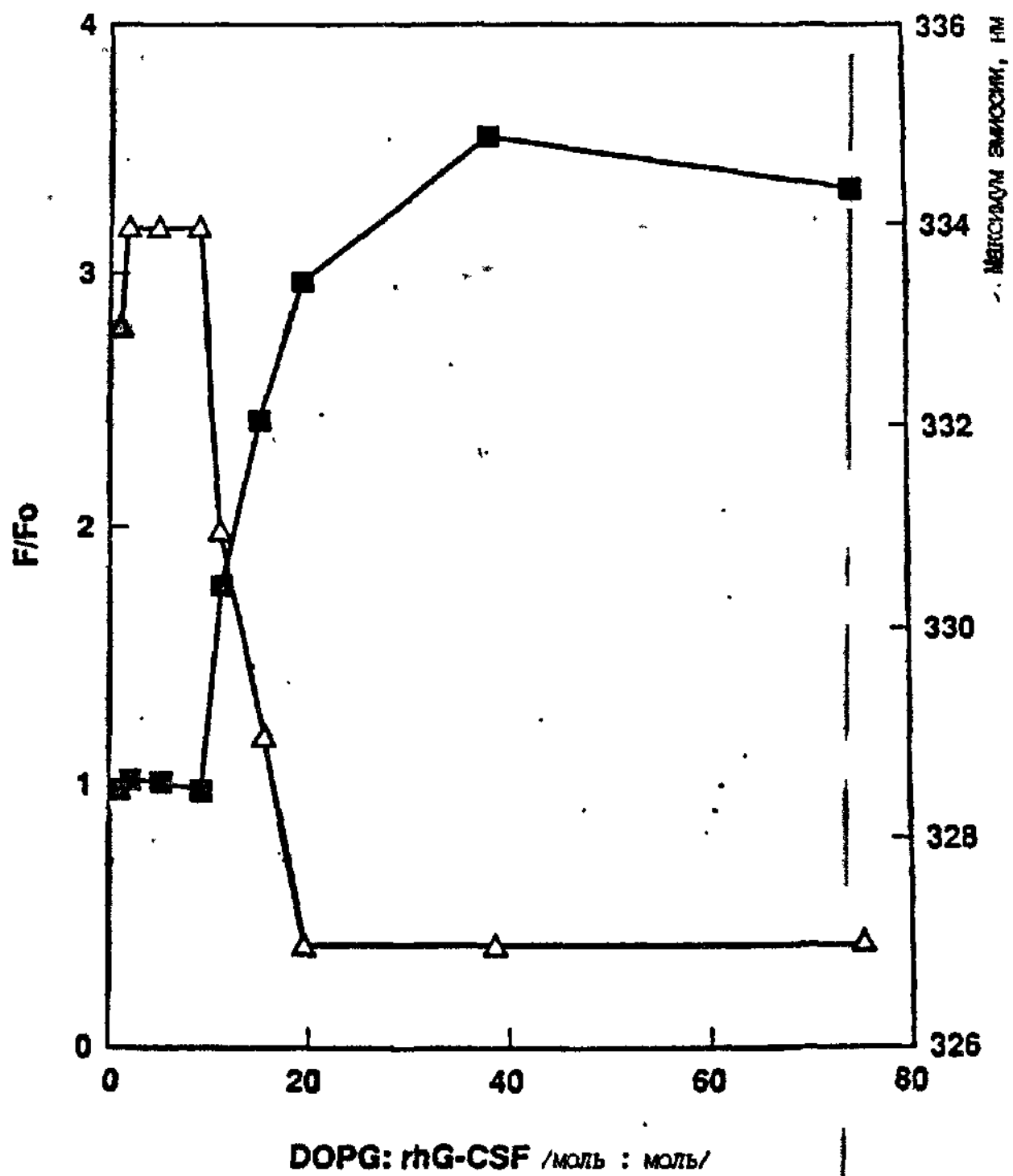
5

Образец	Специфическая активность (У/мг/протеин)
rhG-CSF	$0,66 \pm 0,09$
rhG-CSF (нагретый) ^a	Не определяется
DOPG:rhG-CSF ^b	$0,61 \pm 0,11$
DOPG:rhG-CSF ^b (нагретый)	$0,52 \pm 0,08$

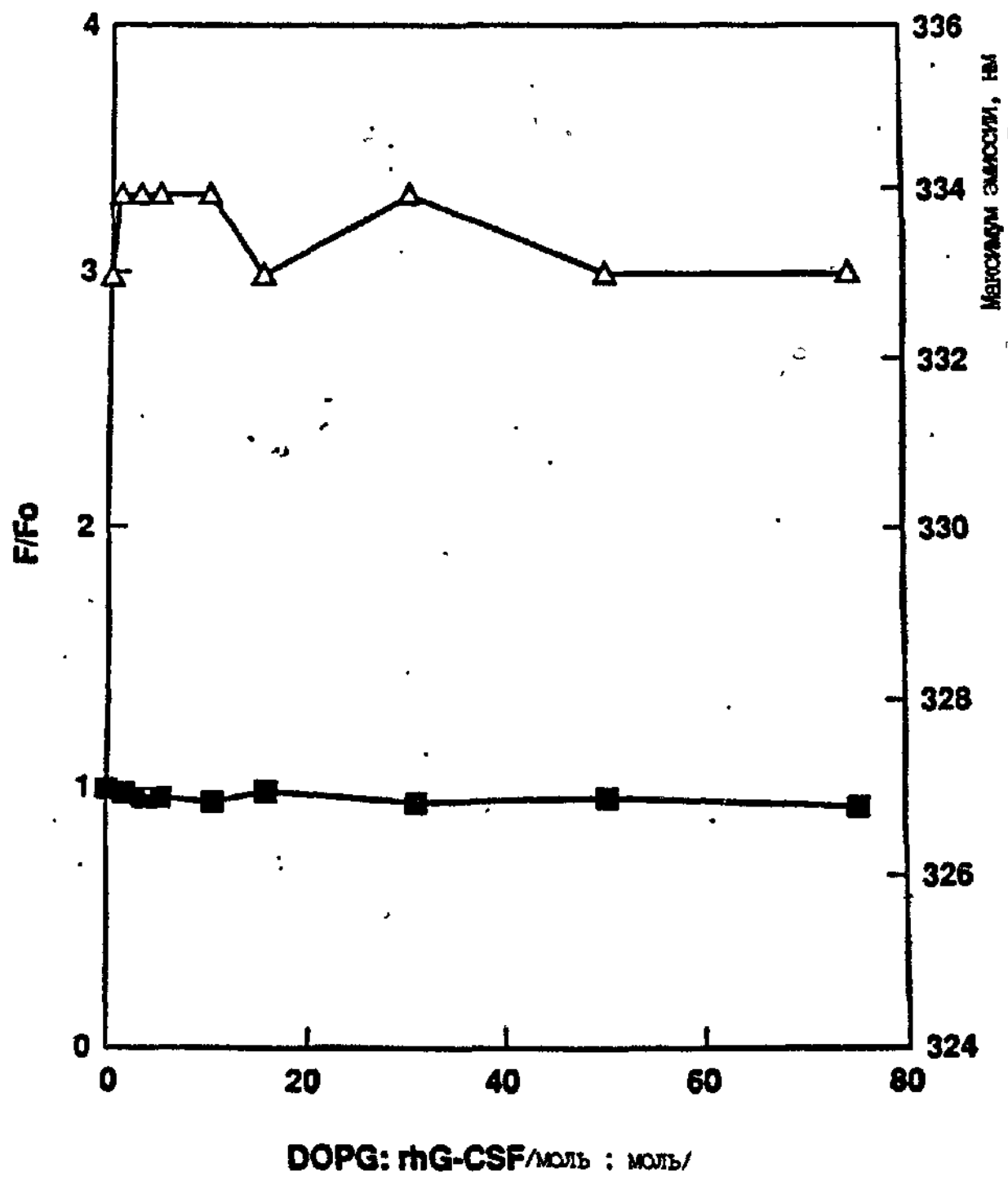
П р и м е ч а н и я: а – образцы инкубировали в течение 10 мин при 85°C на водяной бане перед испытанием;
 б – мольное отношение DOPG:rhG-CSF равно 50:1.



Фиг.1

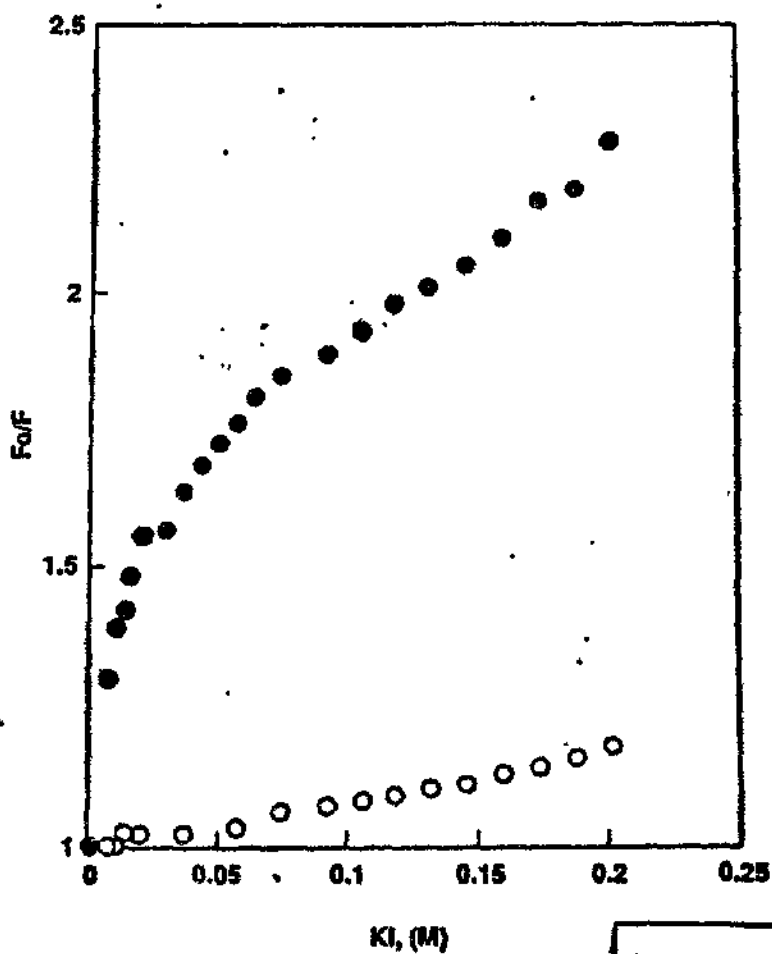


Фиг. 2/в/

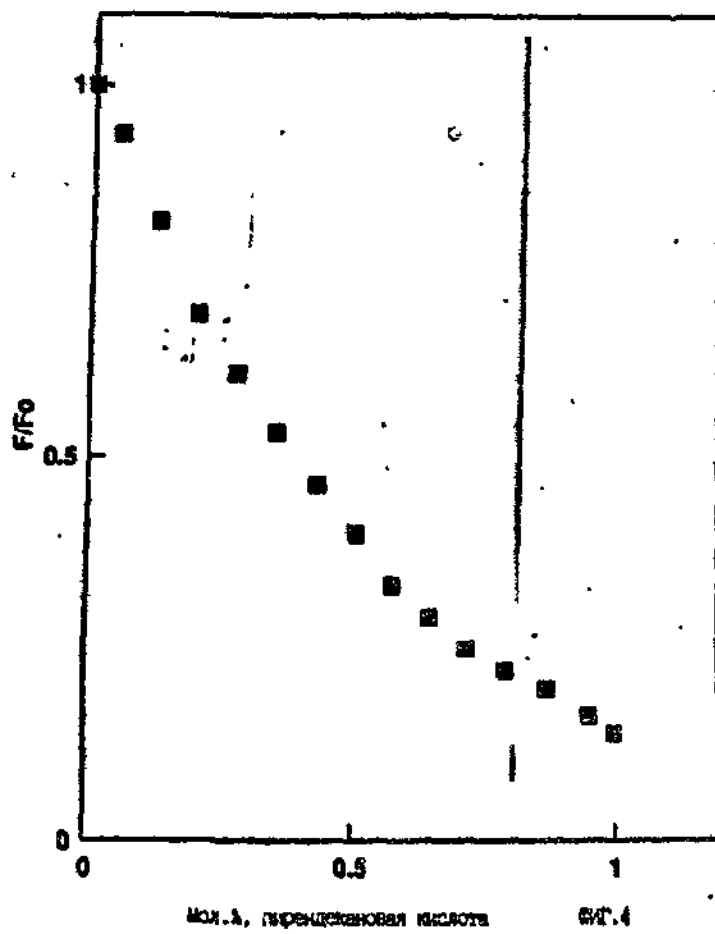


Фиг. 2 /в/

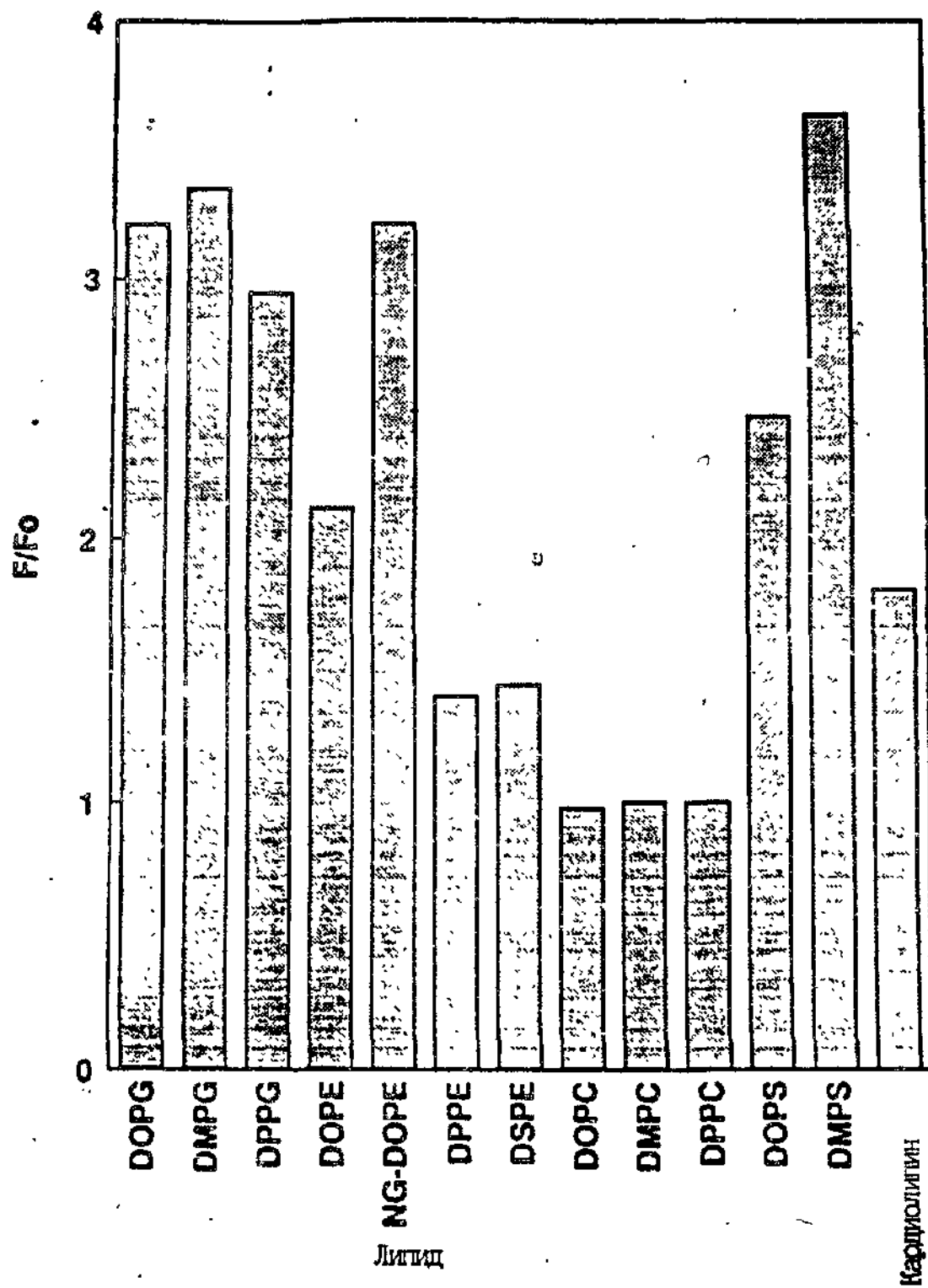
26640



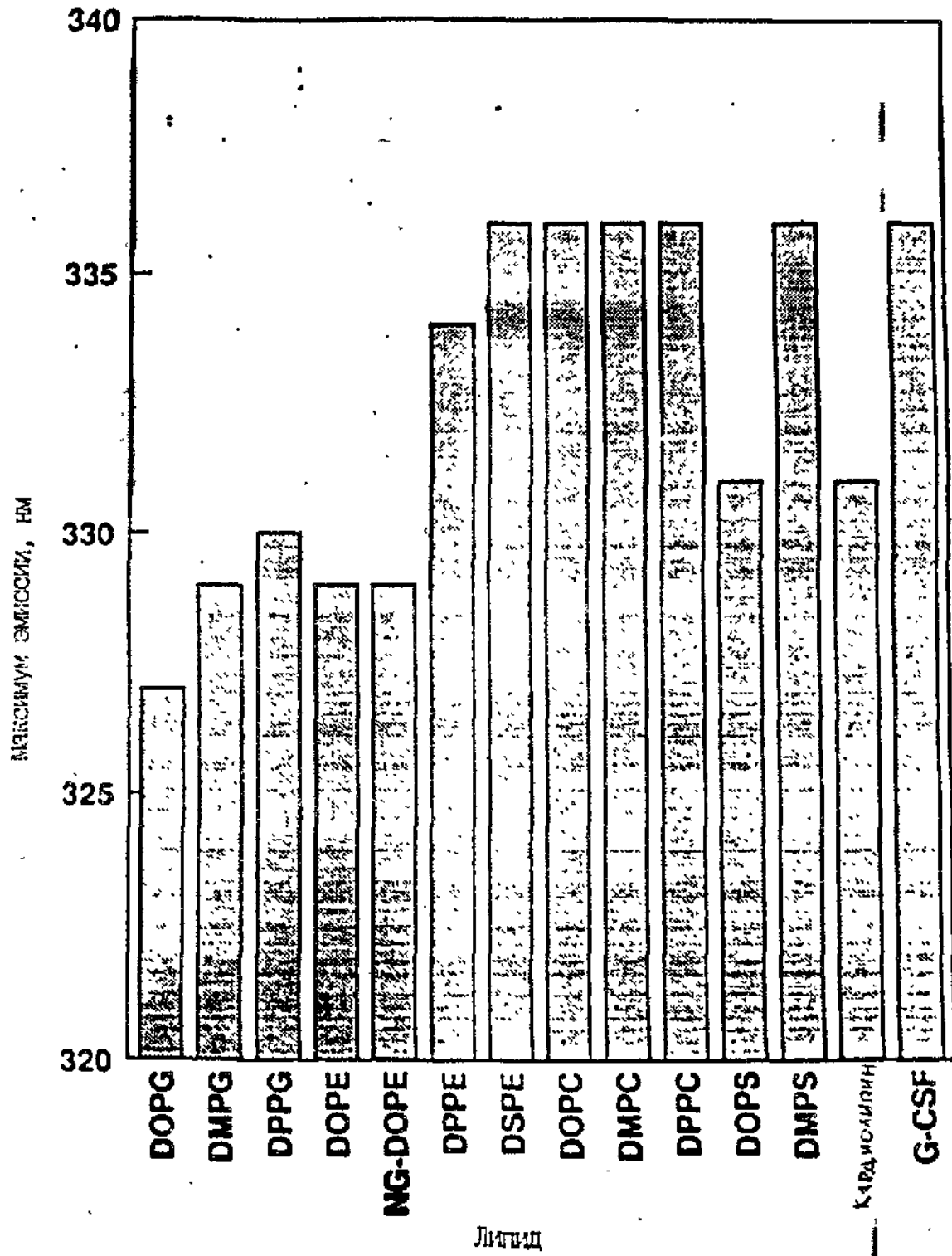
ВГ.3

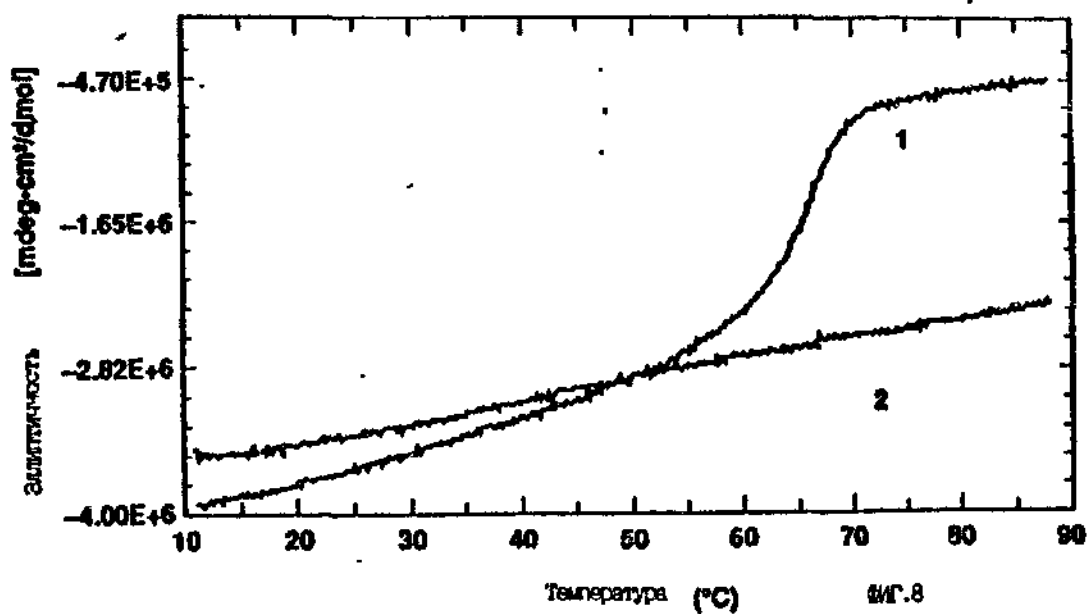
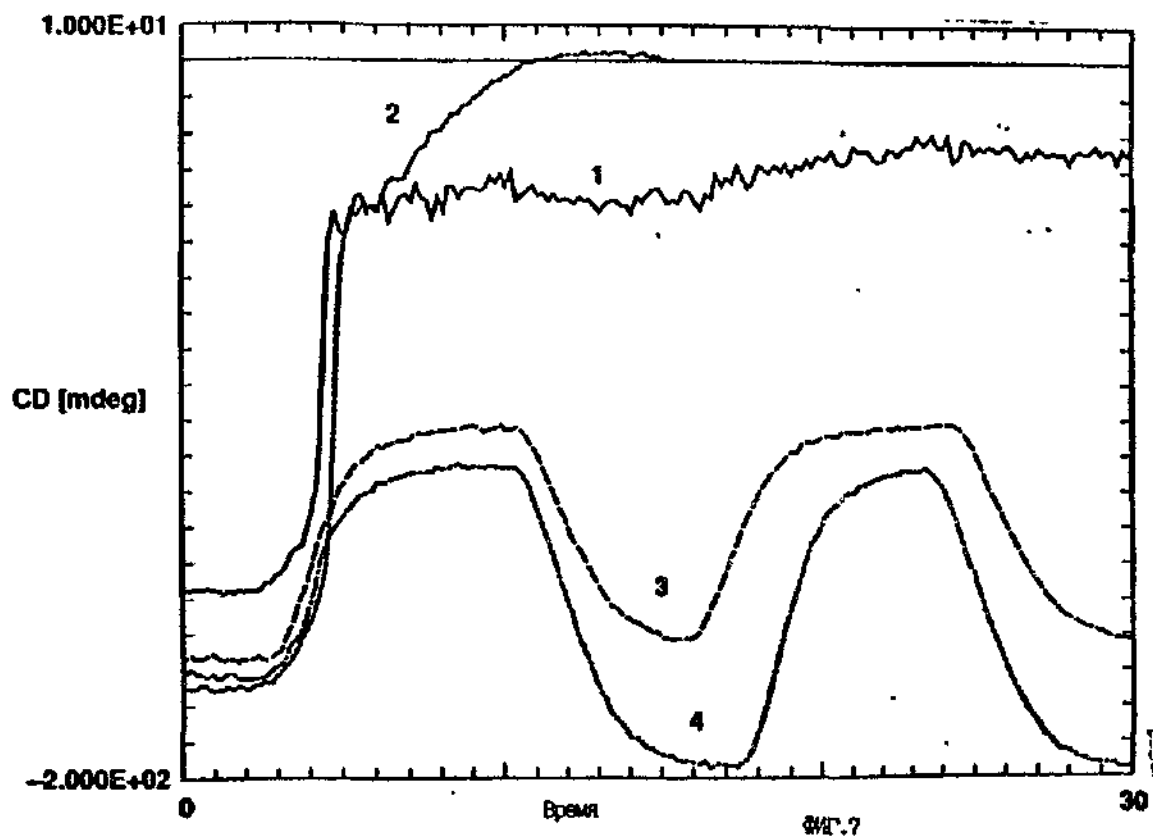


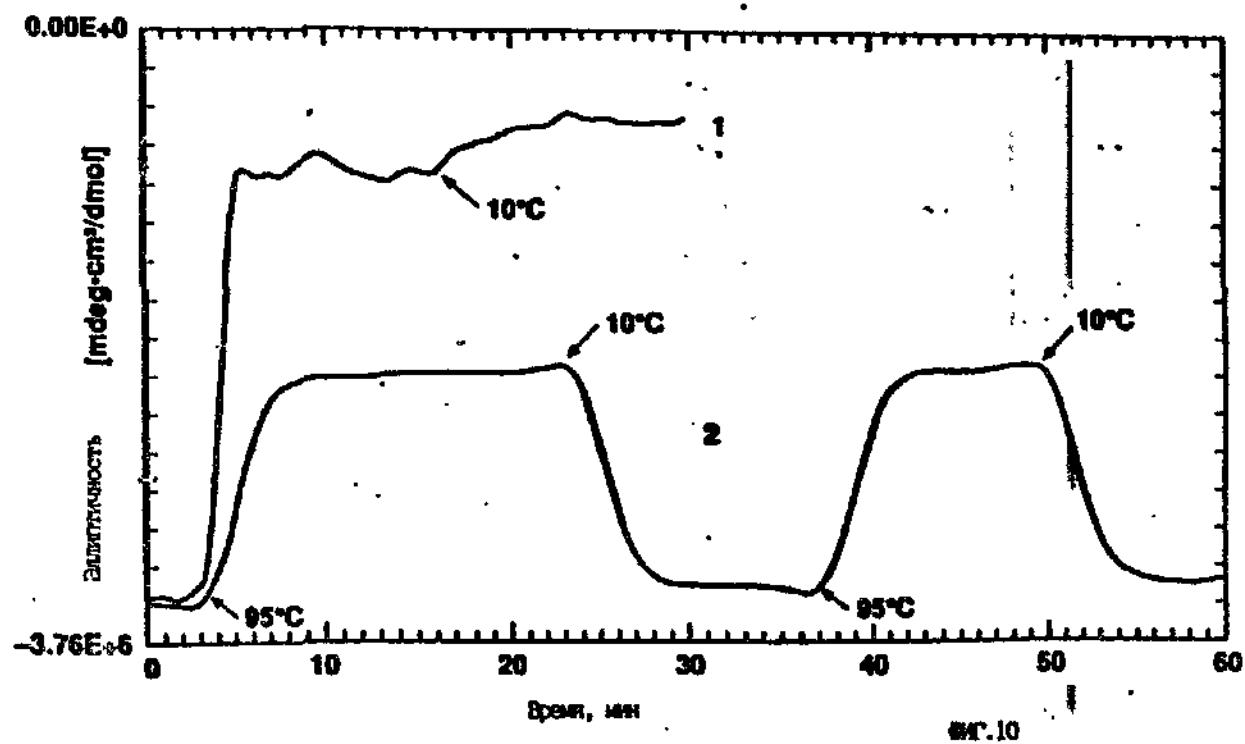
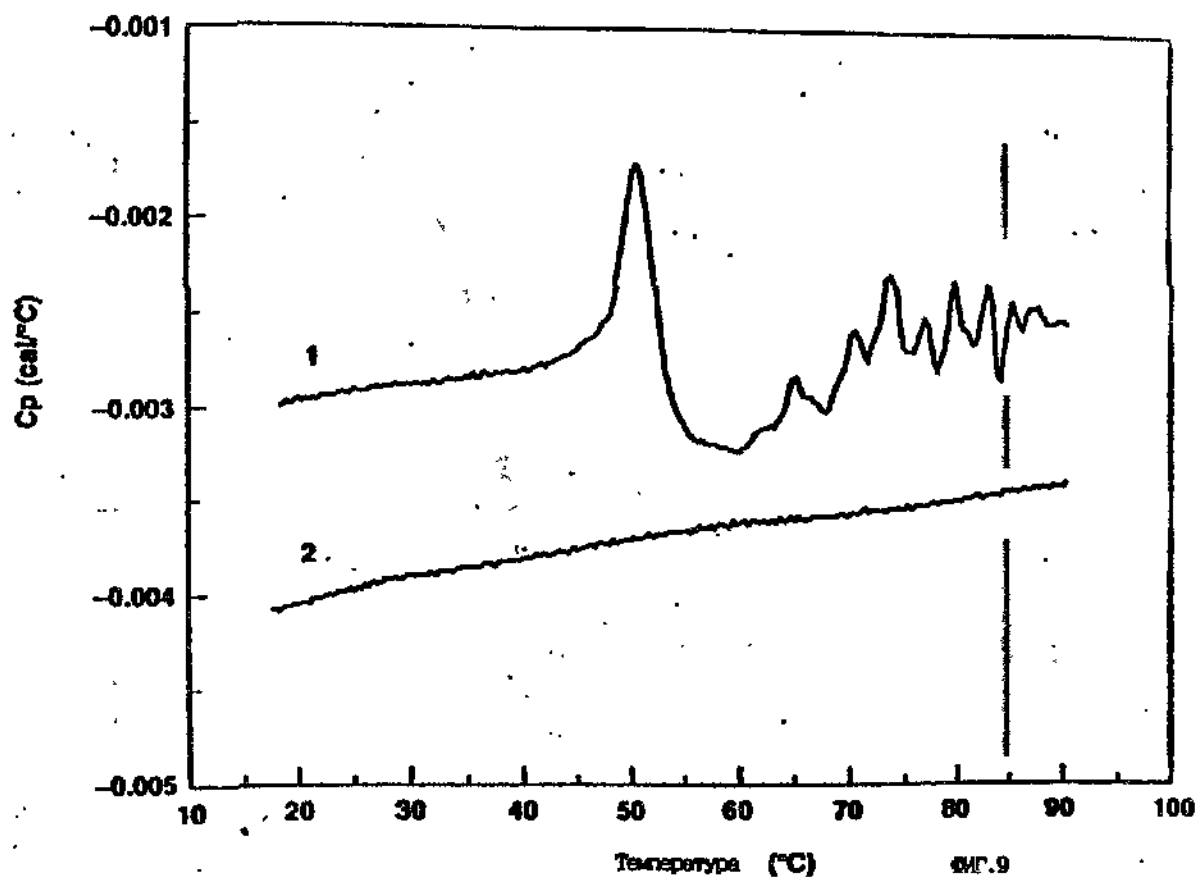
ВГ.4

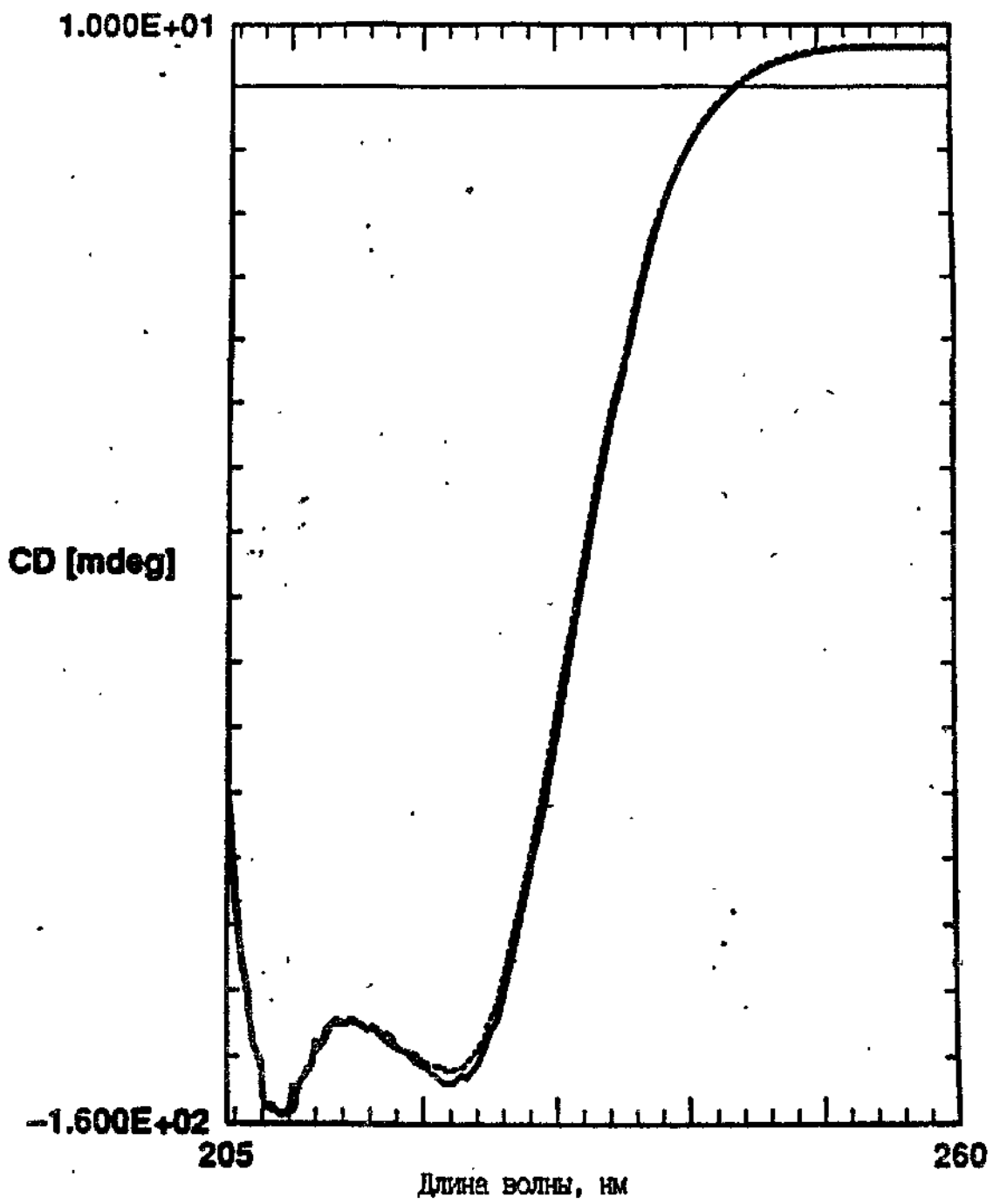


Фиг. 5

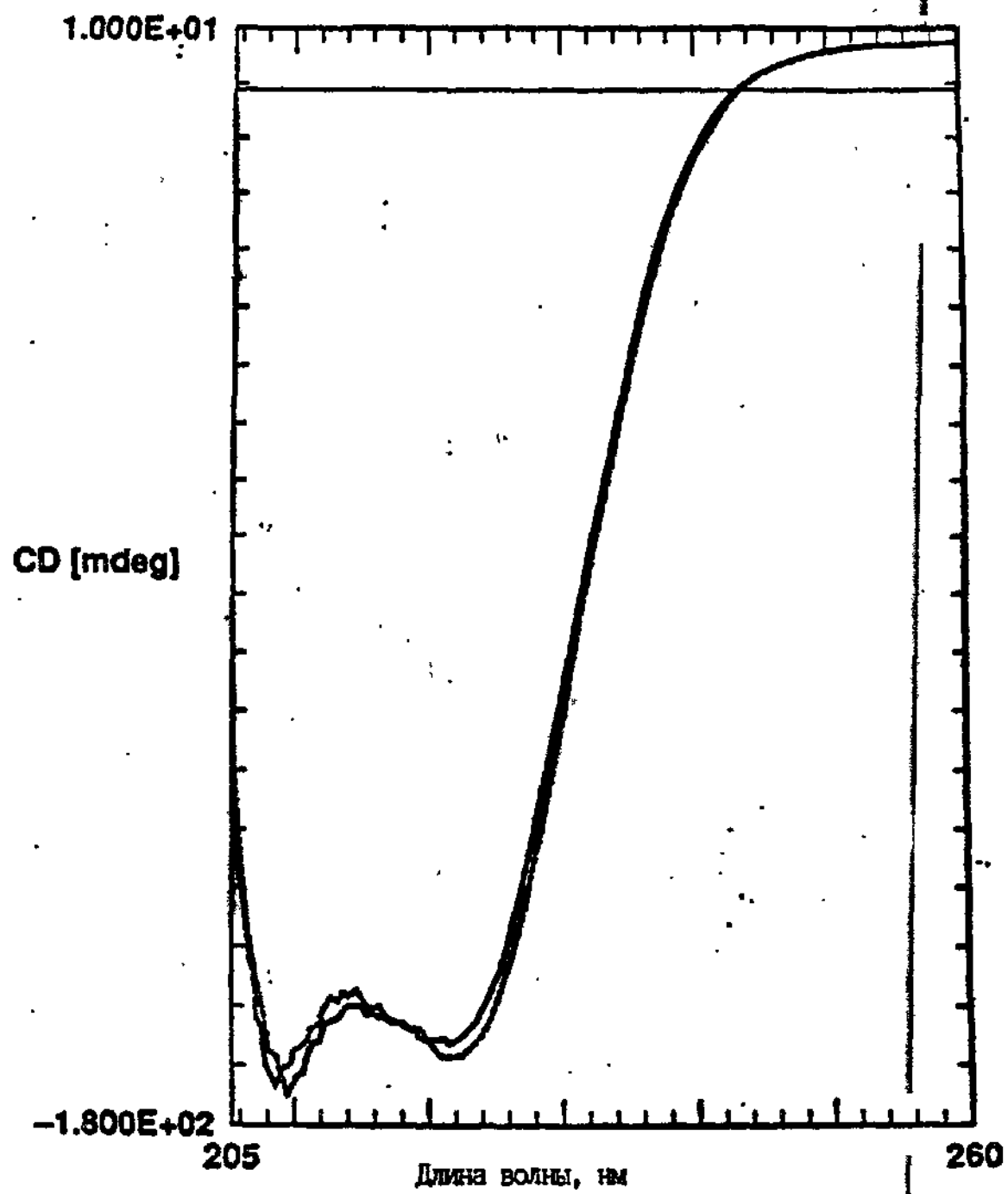




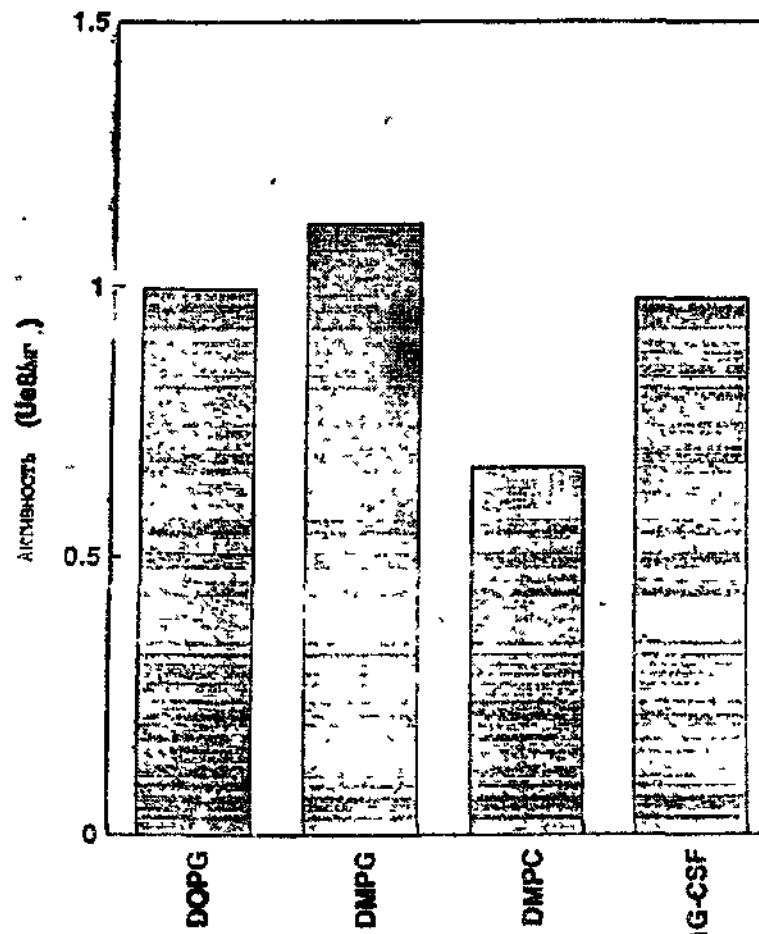




ФИГ.11

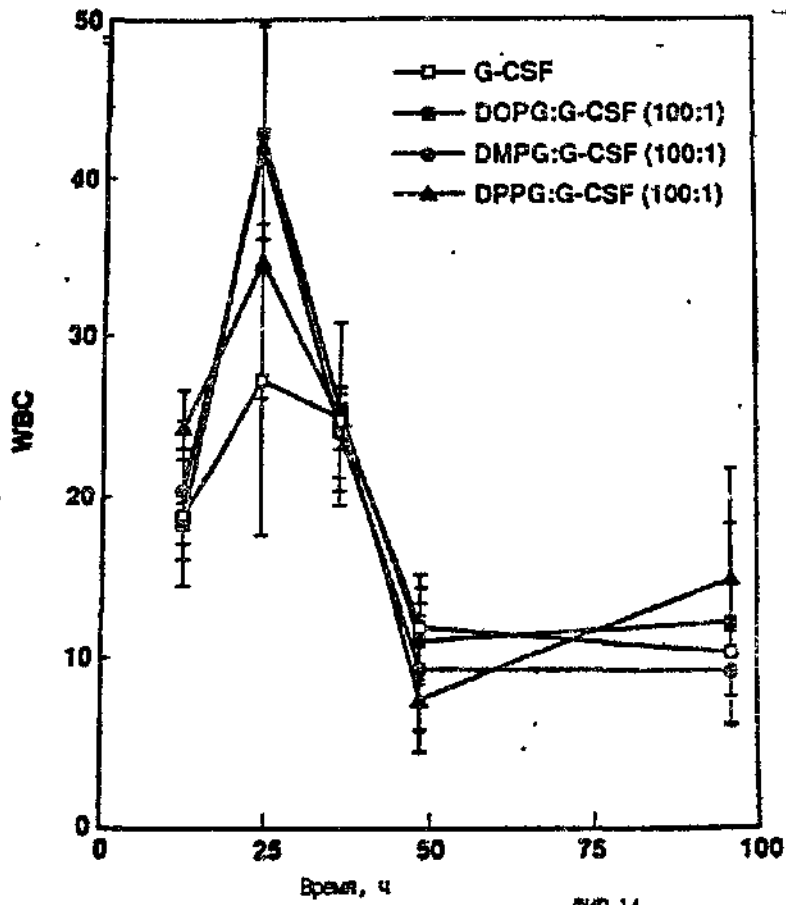


Фиг.12

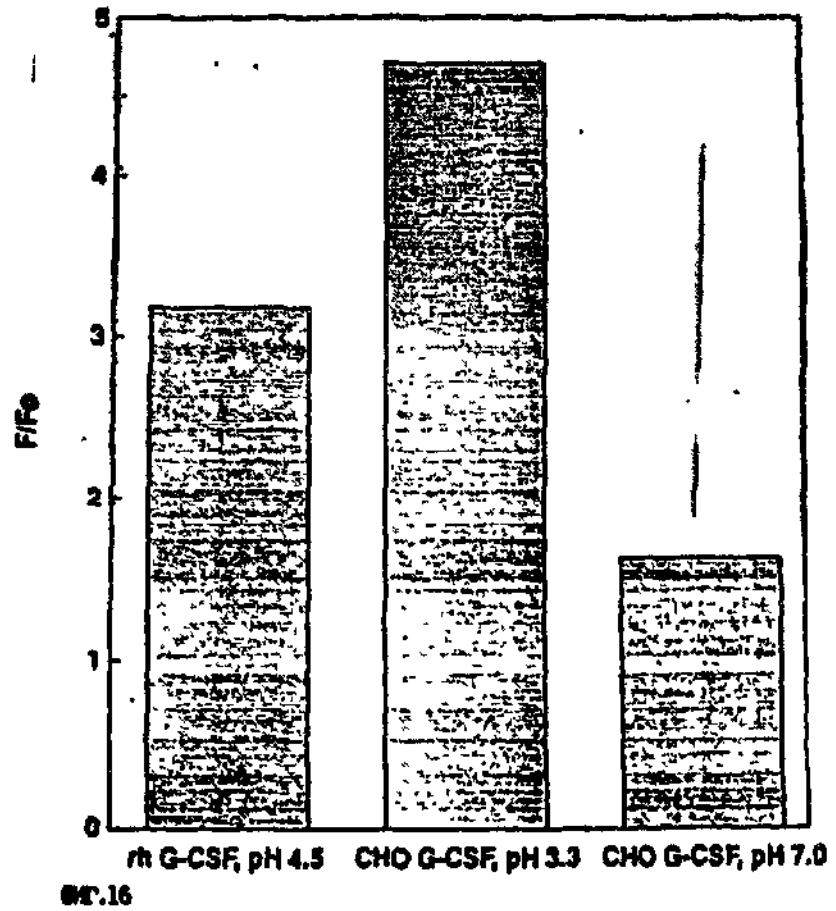
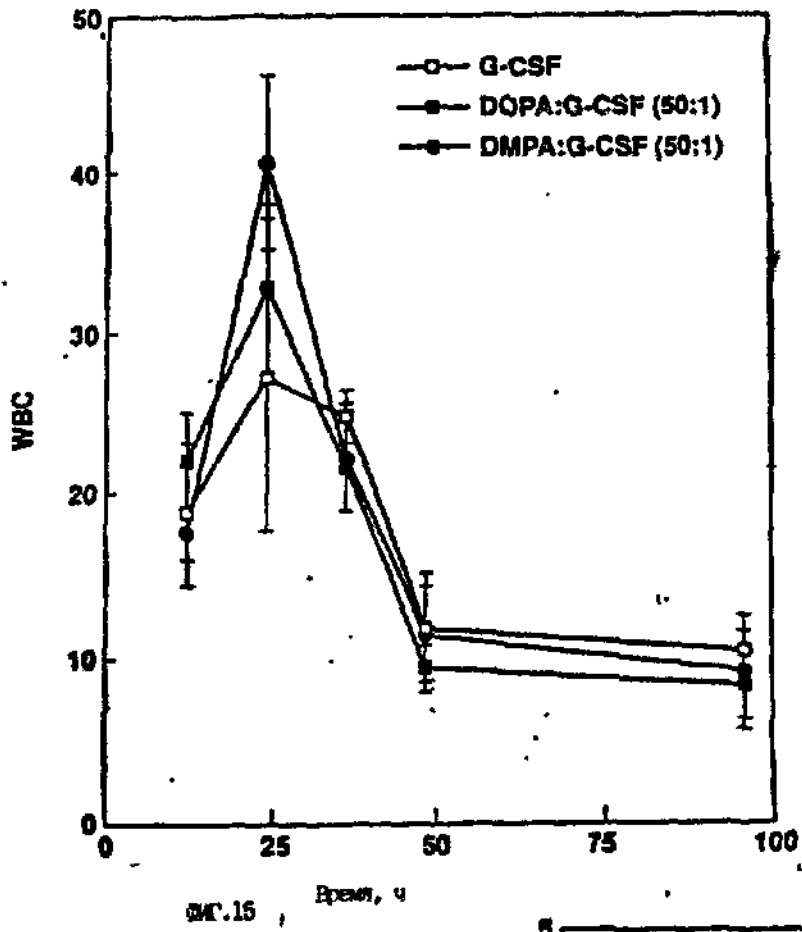


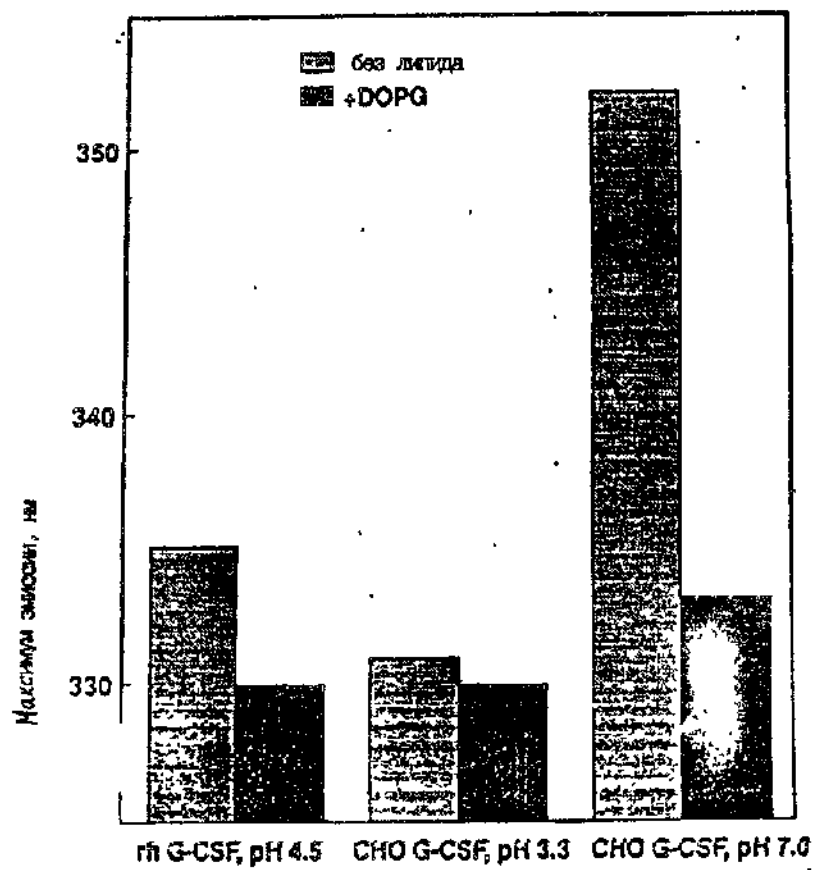
Фиг. 13

Reconstituted G-CSF

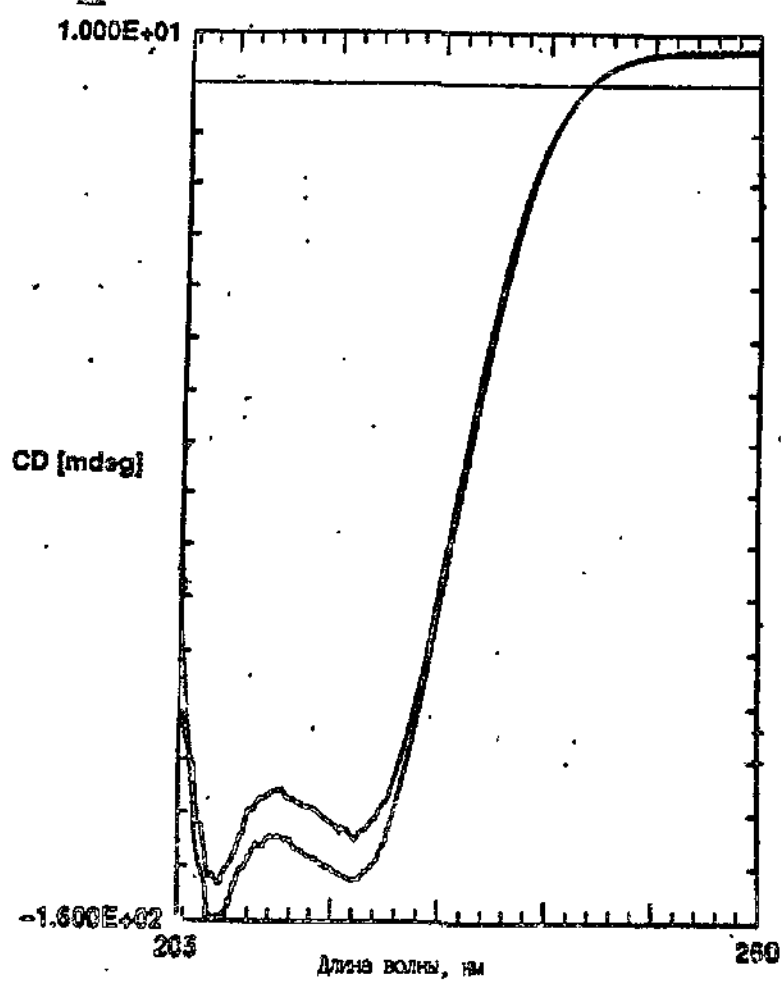


Фиг. 14





Фиг. 17



Фиг. 18



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 26640 (13) C1
(51)6 A 61 K 9/127, A 61 K 38/19ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ ЛІПОСОМНИЙ ПУХИРЕЦЬ ТА ВВЕДЕНИЙ У НЬОГО БІЛКОВИЙ МЕДИКАМЕНТ, І СПОСІБ ЇЇ ПРИГОТУВАННЯ

1

2

(21) 95073159
(22) 29.09.94
(24) 11.10.99
(31) 08/132413
(32) 06.10.93
(33) US
(86) /US94/11081 (29.09.94)
(46) 11.10.99. Бюл. № 6
(56) 1. WO № 92/04009, 19.03.92.
2. EP № 0456842, 21.11.91.
3. EP № 0457837, 27.11.91.
4. Gregoriadis G., "Liposomes", Drug Carriers in Biology and Medicine, N.-j. Academic Press, 1979, v. 14, p. 287-341.
(72) Коллінз Девід (US), Ча Янсик (US)
(73) Амген Інк. (US)
(57) 1. Композиція, що містить ліпосомний пухирець та введений у нього білковий медикament, що відрізняється тим, що в якості ліпосомного пухирця містить негативно заряджений фосфоліпід, а в якості білкового медикamentу – протеїн, здатний до переходу в розпрямлене стані глобули, при співвідношенні ліпідів до протеїну не менше 10:1.
2. Композиція по п. 1, що відрізняється тим, що вона має pH 3,0–7,5.
3. Композиція по п. 1, що відрізняється тим, що в якості ліпосомного пухирця містить фосфоліпід, вибраний з групи, що включає: діолеїлфосфатидилглицерол (DOPG), диміристоїлфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмітоїлфосфатидилглицерол (DPPG), яєчний фосфатидилглицерол, діолеїлфосфатидилетаноламін (DOPE), яєчний фосфатидилетаноламін, діолеїлфосфатидову кислоту (DOPA), диміристоїлфосфатидову кислоту (DMPA), дипальмітоїлфосфатидову кислоту (DPPA), діолеїлфосфатидилсерин (DOPS), диміристоїл-

фосфатидилсерин (DMPS), дипальмітоїлфосфатидилсерин (DPPS), яєчний фосфатидилсерин, лізофосфатидилглицерол, лізофосфатидилетаноламін і лізофосфатидилсерин.

4. Композиція по п. 1, що містить в якості названого протеїну цитокін.

5. Композиція по п. 4, що містить цитокін, що є гематопоезическим фактором.

6. Композиція по п. 5, що відрізняється тим, що гематопоезический фактор вибраний з групи, що включає гранулоцит колонієстимулюючий фактор (G-CSF) і гранулоцит макрофаг колонієстимулюючий фактор (GM-CSF).

7. Композиція по п. 5, що відрізняється тим, що гематопоезическим фактором є G-CSF.

8. Композиція по п. 7, що відрізняється тим, що G-CSF є природним людським G-CSF або продуктом прокаріотної або еукаріотної експресії клітин-хазяїна.

9. Композиція по п. 7, що відрізняється тим, що G-CSF є хімічно модифікованим.

10. Композиція по п. 9, що відрізняється тим, що хімічна модифікація G-CSF проведена поліетиленгліколем.

11. Композиція по п. 1, що відрізняється тим, що вона додатково містить фармацевтично прийнятний носій.

12. Композиція по п. 1, що відрізняється тим, що вона додатково містить в якості названого протеїну рекомбінантний G-CSF (rhG-CSF), отриманий з допомогою E. coli, а в якості ліпосомного пухирця – DOPG при співвідношенні DOPG і rhG-CSF, відповідно-

(19) UA (11) 26640 (13) C1

но, 50:1 и дополнительно содержит 10 мМ ацетата натрия, и имеет pH 4,5.

13. Способ приготовления композиции, содержащей липосомный пузырек с введенным в него белковым медикаментом, отличающийся тем, что в качестве липосомного пузырька используют отрицательно заряженный фосфолипид, а в качестве белкового медикамента в него вводят протеин, способный к переходу в распрямленное состояние глобулы.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанная композиция имеет pH 3,0–7,5 и отношение липида к протеину не менее 10:1.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что в качестве липосомного пузырька используют фосфолипид, выбранный из группы, включающей: диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG), яичный фосфатидилглицерол, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), яичный фосфатидилэтаноламин, диолеилфосфатидовую кислоту (DOPA), димиристоилфосфатидовую кислоту (DMPA), дипальмитоилфосфатидовую кислоту (DPPA), диолеилфосфатиделсерин (DOPS), димиристоилфосфатидилсерин (DMPS), дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS), яичный фос-

фатидилсерин, лизофосфатидилглицерон, лизофосфатидилэтаноламин и лизофосфатидилсерин.

16. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанным протеином является цитокин.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что названный цитокин является гематопоэтическим фактором.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что названный гематопоэтический фактор выбран из группы, состоящей из G-CSF и GM-CSF.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что названным гематопоэтическим фактором является G-CSF.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что G-CSF является природным человеческим G-CSF или продуктом прокариотной или эукариотной экспрессии клетки-хозяина.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что G-CSF является химически модифицированным.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что химическая модификация G-CSF проведена полиэтиленгликолем.

23. Способ по п. 13, отличающийся тем, что в композицию дополнительно вводят фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение относится к протеину: структурам фосфолипида, которые используют для стабилизации вторичной и третичной структуры протеинов, способных к переходу в распрямленное глобулярное состояние. В особенности, это изобретение относится к G-CSF: фосфолипидным композициям с повышенной стабильностью и способностью к использованию в G-CSF рецептурах и новых поставляющих проводниках G-CSF.

Обнаружено несколько видов протеинов, способных к переходу в распрямленное глобулярное состояние (MGS) (Van der Goot, F.G., Nature 354, 408–410 (1991)). Протеины в распрямленном глобулярном состоянии проявляют вторичную структуру, сравнимую со структурой природного протеина, однако у них отсутствует жесткая третичная структура (Pittsyn et al., FEBS Letters 262:1, 20–24 (1990)). В некоторых

случаях переход в это состояние сопровождается раскрытием ранее скрытых гидрофобных звеньев протеина. При раскрытии критических гидрофобных остатков, MGS может находиться в промежуточном состоянии между агрегированием и осаждением протеинов. MGS-конформация может быть обнаружена при сравнении кругового дихроизма в дальнем УФ диапазоне со спектром ароматических боковых цепей (ближний УФ круговой дихроизм и флуоресценция). Распрямленное глобулярное состояние показывает спектральные изменения ароматических групп в отсутствие изменений дальнего УФ кругового дихроизма (Bychkova et al. FEBS Letters 238:231–234 (1988)) и может быть вовлеченным в мембранную проницаемость некоторыми видами протеинов (Bychkova et al. FEBS Letters 238:231–234 (1988); Van der Goot, F.G., Nature 354, 408–410 (1991)).

Для перехода в MGS до агрегирования известны два вида протеинов: гранулоцит колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцит макрофаг колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В то время, как эти два вида протеинов могут быть стабилизированы при некоторых определенных условиях, существует необходимость продления жизни этих материалов стабилизаций вторичной и третичной структуры протеинов.

Человеческий рекомбинантный G-CSF селективно стимулирует нейтрофилы, вид белых кровяных клеток, используемых для борьбы с инфекцией. Общепринято, Filgrastim, что рекомбинантный G-CSF является пригодным для использования в терапии. Структура G-CSF в различных условиях подверглась интенсивному изучению (Lu et al., J. Biol. Chem. Vol. 267, 8770-8777 (1992)). Ввиду гидрофобного характера трудно получить G-CSF с продолжительной жизнеспособностью. Рецептуры некоторых гидрофобных протеинов теряют свою активность в результате образования димера или агрегатов более высокого порядка (макроагрегатов) в процессе продолжительного хранения. Другие химические превращения, такие как деамидация и окисление, также могут возникнуть в процессе хранения. Кроме того, G-CSF формулятор должен защищать против денатурации и, в особенности, быть склонным к стабилизации вторичной и третичной структуры протеина.

Человеческий GM-CSF является 22-kDa гликопротеином, непрерывно требуемым для быстрого размножения *in vitro* клеток-предшественников макрофагов и гранулоцитов. Он также контролирует обратимое превращение этих клеток-предшественников при образовании гранулоцитов и макрофагов. Другие виды биологической активности могут включать регулирование функциональной активности зрелых клеточных видов (Gough et al., Nature, 309, 763-767 (1984)) и увеличение химоаттаксиса по отношению к опознанным химоаттрактантам (Williams et al., Hematology, 4th ed. (1990)). GM-CSF также стимулирует образование моноцитов и поэтому может быть использован при лечении моноцитарных расстройств, таких как моноцитопения.

Человеческий GM-CSF может быть получен и очищен из нескольких источников. Способы получения рекомбинантного человеческого GM-CSF были описаны ранее Burgess et al., Blood, 69:1, 43-51 (1987). Согласно цитируемому здесь патенту US 5047504 (Boone) предлагается получение

в промышленном масштабе GM-CSF в негликозилированной форме как продукт выражения прокариотной клетки-хозяина.

Одним из путей, предпринятым ранее при работе с такими протеинами, как G-CSF и GM-CSF, явилось использование липосом. Липосомы представляют собой полностью закрытые липидные двухслойные мембраны, образованные водонерастворимыми полярными липидами, особенно фосфолипидами.

Пузырьки липосом могут иметь один единственный мембранный двойной слой (однослойные) или множество мембранных двойных слоев (многослойные). Двойной слой состоит из двух липидных монослоев, имеющих гидрофильную (полярную) "головную" зону и гидрофобную (неполярную) "хвостовую" зону, в которой гидрофобные хвосты ориентированы по направлению к центру двойного слоя, в то время как гидрофильные головы ориентированы по направлению к водной фазе. Стабильность, жесткость и проницаемость липосом может изменяться путем изменений фосфолипидной композиции или температуры, включением спирта или введением заряженных амфифилов. Основная структура липосом может быть получена различными известными методами.

В процессе своего образования липосомы могут захватывать растворенные в воде вещества в водных каналах и освобождать их с различной скоростью. После обнаружения способности липосом к введению энзимов в клетки и к изменению их метаболизма (Gregoriadis, New Engl. J. Med. 295, 704-710, 765-770 (1976)) липосомы были объявлены средством, отвечающим требованию целенаправленной доставки медикаментов. В результате наблюдается усиленное развитие исследований в фармацевтической промышленности, включающих использование липосом в качестве медленных поставщиков лекарств, витаминов и протеинов, секвитированных в гидрофобных слоях или в гидрофобном ядре липосом.

Успешное использование липосом в качестве переносчиков медикаментов было ограничено, т.к. исследователи, предпринимавшие попытки в направлении такого применения липосом, встретились с рядом проблем. Например, известна способность липосом действовать в качестве сильных иммунологических помощников по отношению к захваченным антигенам, и должны быть приняты меры предосторожности в том случае, когда липосомами захвачены энзимы или протеины ксеногенного происхождения. Кроме того, трудно

контролировать скорость диффузии медикамента. Это является следствием природной нестабильности липосом и присутствия некоторых компонентов крови, которые ускоряют диффузию некоторых медикаментов. Помимо этого, по своей природе некоторые вещества слабо захватываются липосомами и поэтому быстро рассасываются при кровообращении. Наконец, существует проблема нацеливания на любые клетки или органы, кроме печени или селезенки. Замечательным обзором по липосомам, веществам, которые были введены в липосомы и проблемам, связанным с использованием липосом в качестве переносчиков медикаментов, является Gregory Gregoriadis, "Liposomes", *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Chapter 14, 287-341 (Academic Press, N. Y., 1979).

В то время как в области попыток использования липосом в качестве переносчиков медикаментов опубликовано много работ, мало публикаций появилось в области использования липосом с целью увеличения периода жизни терапевтических пептидов или протеинов путем стабилизации структуры пептидов и/или протеинов. В PCT/US90/05163 "Терапевтические пептиды и протеины", Hostetler et al. описано использование пустых липосом в качестве фармацевтически пригодных разбавителей для растворения полипептидов и/или протеинов с целью предотвращения аккумуляции полипептидов и/или протеинов на поверхности раздела воздух/вода и для предотвращения адсорбции полипептидов и/или протеинов на поверхности контейнера. Hostetler et al. описывает, что отрицательно заряженные фосфолипиды могут быть добавлены в количестве до около 50 мол. %, и что предпочтительными липосомами являются фосфатидилхолин, нейтральный фосфолипид. Hostetler et al. не описывает разбавителя, способного стабилизировать структуру полипептида и/или протеина.

В PCT/US91/07694 "Получение и характеристика липосомных рецептур фактора некрозного новообразования (TNF)", Hung et al., описана липофильная молекула фактора некрозного новообразования, связанная с поверхностью или инкапсулированная внутри липосомы. Липосомные липофильные TNF молекулы описаны как имеющие повышенную стабильность *in vivo*. Стабильность рассматривается как уменьшение или как тенденция к уменьшению TNF-липосомы выделять TNF в систему *in vivo*. Предпочтительными

липосомами были нейтральные липиды. Heing et al. не описывают композиции TNF, в которой наполнители (excipients) оказывают стабилизирующее действие на структуру протеина.

В литературных источниках отсутствуют какие-либо сведения, касающиеся контактирования протеина, например G-CSF, с отрицательно заряженными пузырьками (полостями) липид, в результате которого непосредственно стабилизируется протеин против термической агрегации, денатурации, потери активности и разветвляется вторичная структура. Существует потребность в таких композициях, которые могут быть использованы в технологических процессах, требующих высоких температур, а также в качестве новых поставщиков (например, оральное применение лекарств, закрепленных в G-CSF). Настоящее изобретение касается таких композиций.

Настоящее изобретение направлено на добавление гидрофобных эксципиентов, например, лизофосфолипидов или других липосом, к протеину в условиях расплавленного глобулярного состояния для стабилизации вторичной и третичной структуры протеина, защищая таким образом протеин против термической агрегации, денатурации и потери активности. В особенности целью изобретения являются стабильные G-CSF:фосфолипидные композиции. Неожиданно оказалось, что предпочтительные G-CSF композиции могут быть несколько раз подвергнуты циклическому изменению температуры в диапазоне 10-95°C с последующим полным восстановлением вторичной структуры протеина после охлаждения. Эти композиции имеют двойное преимущество: быть полезными при технологических процессах, требующих высоких температур, а также при использовании в новых поставщиках G-CSF.

В предпочтительном варианте, комплекс протеин:фосфолипид включает отрицательно заряженную липосому, выбранную из группы: диолеилфосфатидилглицерол (DOPG), димиристоилфосфатидилглицерол (DMPG), дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG), яичный фосфатидилглицерол, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), яичный фосфатидилэтаноламин, диолеилфосфатидовая кислота (DOPA), димиристоилфосфатидовая кислота (DMPA), дипальмитоилфосфатидовая кислота (DPPA), диолеилфосфатидилсерин (DOPS), димиристоилфосфатидилсерин (DMPS), дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS), яич-

ный фосфатидилсерин, лизофосфатидилглицерол, лизофосфатидилэтаноламин и лизофосфатидилсерин.

DOPG, отрицательно заряженный ненасыщенный фосфолипид, является особенно предпочтительным. Согласно изобретению pH поддерживают в пределах 3,0–7,5, а отношение липид:протеин не менее 10:1.

Дополнительным элементом, согласно предпочтительному варианту изобретения, является использование химически модифицированных протеинов в составе комплекса протеин:фосфолипид, а также использование одного или нескольких из следующих агентов: агент, устанавливающий изотонию, буферный агент и агент, устанавливающий pH. Специалисту понятно, что изобретение включает стабильные композиции протеин:фосфолипид с различным сочетанием дополнительных элементов.

На фиг. 1 изображен спектр флуоресцентной эмиссии rhG-CSF в присутствии (кривая 1) и в отсутствии (кривая 2) пузырьков DOPG. Концентрация DOPG:rhG-CSF равна 0,2 мг/мл. Молярное отношение DOPG:rhG-CSF (кривая 1) равно 100:1.

На фиг. 2(а) показано влияние увеличения отношения липид:протеин на rhG-CSF флуоресценцию. F_0 означает исходную флуоресценцию (без липида) и F означает флуоресценцию после добавления липида для достижения указанного молярного отношения $F/F_0(n)$ и максимум длины волны эмиссии (Δ) для смесей DOPG:rhG-CSF. На фиг. 2(в) показано отношение $F/F_0(n)$ и максимум длины волны эмиссии (Δ) для смесей DOPG:rhG-CSF.

На фиг. 3 показана кривая Стерна-Волмера (Stern-Volmer) затухания rhG-CSF флуоресценции посредством KJ в отсутствии (о) и в присутствии (о) пузырьков DOPG. Эксперимент по затуханию проводился добавлением равных порций KJ к rhG-CSF (0,2 мг/мл) и DOPG:rhG-CSF 100:1.

На фиг. 4 показано затухание rhG-CSF флуоресценции триптофана при добавлении пирендекановой кислоты (pyrene decanoic acid). Длина волны эмиссии равна 327 нм. Молярное отношение DOPG:rhG-CSF равно 100:1.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий в сравнении изменения F интенсивности для rhG-CSF в отсутствии и в присутствии различных липидов. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий в сравнении сдвиги мак-

симумов эмиссии для rhG-CSF в отсутствии и в присутствии различных липидов. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 7 показано влияние DMPC (кривая 2), DMPG (кривая 3) и DMPA (кривая 4) на CD rhG-CSF (кривая 1). В каждом случае молярное отношение липид:протеин в воде равно 50:1, pH 6,0.

На фиг. 8 показано влияние повышения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (140:1 молярное) (кривая 2). Концентрация rhG-CSF в воде равна 80 мг/мл, pH 6,0. Температура изменялась в пределах 10–90°C со скоростью 100°C/ч.

На фиг. 9 показана дифференциальная сканирующая калориметрическая термограмма для rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (45:1 молярное) (кривая 2). Концентрация rhG-CSF в образцах равна 1 мг/мл, pH 7,0 в воде. Скорость сканирования 90°C/ч.

На фиг. 10 показано влияние циклического изменения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DOPG:rhG-CSF (140:1 молярное) (кривая 2). Образцы быстро нагревали до 95°C и охлаждали до 10°C как показано стрелками. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

На фиг. 11 показано влияние циклического изменения температуры на CD rhG-CSF (кривая 1) и DMPG:rhG-CSF (150:1 молярное) (кривая 2). Образцы нагревают до 95°C и охлаждают до 10°C. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

На фиг. 12 показано влияние температурных циклов на CD rhG-CSF (кривая 1) и DPPG:rhG-CSF (150:1 молярное) (кривая 2). Образцы нагревают до 95°C и охлаждают до 10°C. Концентрация rhG-CSF в образцах равна 80 мг/мл, pH 6,0.

Фиг. 13 изображает график, показывающий способность различных липидов к стабилизации rhG-CSF в процессе замораживания-сушки. Отношение липид:протеин в каждом случае равно 100:1. Стабильность определялась по сохранению активности *in vitro* в образце костного мозга. Один rhG-CSF не выдерживает процесса замораживания-сушки, поэтому контрольным образцом является необработанный rhG-CSF в отсутствии липида.

На фиг. 14 показано влияние различных липидов на активность *in vitro* rhG-CSF. Активность (в расчете на WBC) измеряли после подкожной инъекции хомячков. Доза rhG-CSF равна 100 мг/кг при отношении липид:протеин 100:1.

На фиг. 15 показано влияние различных липидов на активность *in vitro* rhG-CSF. Активность (в расчете на WBC) измеряли после подкожной инъекции хомячков. Доза rhG-CSF равна 100 мг/кг при отношении липид:протеин 50:1.

На фиг. 16 изображен график, показывающий сравнительное изменение CHO-G-CSF в отсутствие и в присутствии DOPG при различном pH. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 17 изображен график, показывающий сравнение сдвигов максимумов эмиссии для CHO-G-CSF в отсутствие и в присутствии DOPG при различном pH. В каждом случае молярное отношение липид:протеин равно 100:1.

На фиг. 18 показано влияние температурных циклов на CD PEG-G-CSF (-) и DMPG:PE-G-CSF (17:1 молярное) (- -). Образцы нагревают до 90°C и охлаждают до 10°C.

На фиг. 19 показано: а) влияние температурных циклов на CD GM-CSF в PBS, pH 7,0. GM-CSF при 10°C (-) сравнительно с GM-CSF, который нагревают до 90°C и охлаждают до 10°C (- -); б) влияние температурных циклов на CD DPPG:PEG-G-CSF (17:1 молярное). DPPG:GM-CSF при 10°C (-) сравнивают с DPPG:GM-CSF, который нагревают до 90°C и затем охлаждают до 10°C (- -).

Композиция по изобретению иллюстрируется нижеследующими примерами. Примеры показывают различные аспекты изобретения и включают данные испытаний по стабильности и биологической активности различных протеинов: фосфолипидных композиций. Взаимодействие протеинов с липидными пузырьками непосредственно стабилизирует протеиновую структуру протеина, оказывая, таким образом, стабилизирующее воздействие на протеин даже в условиях, приводящих к денатурации протеина в отсутствие липида. Предполагается использовать различные протеины, способные переходить в распрямленное глобулярное состояние. Примерами предполагаемых протеинов являются цитокины, включая различные гематopoietические (hematopoietic) факторы, такие как упомянутые выше G-CSF, GM-CSF, M-CSF, интерфероны (альфа, бета и гамма), интерлейкины (1-11), эритропоэтин (EPO), фактор роста фибробластов, клеточный фактор (stem cell factor), фактор роста нерва, BDNF, NT3, полученный из тромбоцита фактора роста, и фактор роста опухолевых новообразований (альфа,

бета). Другие протеины могут быть оценены по способности к переходу в MGS. Если такой протеин способен к превращению в MGS, то такой протеин может затем быть приведен в контакт с пузырьками отрицательно заряженной липосомы и определен эффект стабилизации.

В общем случае G-CSF может быть в нативной форме, выделенной в чистом виде из организма млекопитающих, или, альтернативно, может быть продуктом химического синтеза или продуктом эукариотной или прокариотной экспрессии клетки хозяина экзогенной последовательности ДНК, полученной геномным или cДНК клонированием или генным синтезом. Подходящие прокариотные хозяева включают различные бактериальные клетки (например, *E. coli*). Подходящие эукариотные хозяева включают дрожжи (например, *S. cerevisiae*) и клетки млекопитающих (например, яичника китайского хомячка, обезьяны). В зависимости от используемого хозяина, продукт G-CSF выражения может быть гликозилирован млекопитающими или другими эукариотными карбогидратами, или может быть негликозилирован. Изобретение предполагает использование любых или всех таких форм G-CSF, хотя предпочтительным, с точки зрения наибольшей коммерческой практичности, является рекомбинантный G-CSF, особенно полученный *E. coli*.

G-CSF, который подвергают химической модификации с целью использования в настоящем изобретении, может быть также либо природным человеческим G-CSF (nhG-CSF), либо продуктом рекомбинантного процесса нуклеиновой кислоты, такого, как выражение прокариотной или эукариотной клетки хозяина.

В общем случае, предполагаемой химической модификацией является присоединение химической половины к самой молекуле G-CSF.

Обзорной статьей, описывающей модификацию протеина и слияние протеинов является Francis, Focus on Growth Factors 3; 4-10 (май 1992) (опубликовано Mediscript, Mountview Court, Frun Barnet Lane, London N20 0LD, UK). Например, EP 0401384 "Chemically Modified Granulocyte Colony Stimulating Factor, в которой описаны материалы и методы приготовления G-CSF, к которой присоединены молекулы полиэтиленгликоля. Присоединение может быть непосредственным связыванием с протеином или к половине, действующей в качестве мостика для активного агента. Наиболее предпочтительной, как

наиболее стабильной, является ковалентная связь. Химическая модификация может способствовать контролируемому, длительному или расширенному эффекту G-CSF. Это может приводить, например, к контролю времени, необходимого для достижения химически модифицированным G-CSF свернутого в клубок положения. Примером химического модификатора является полиэтиленгликолевые композиции, включая их производные.

По изобретению предполагается использовать любые химически модифицированные G-CSF препараты, эффективные при применении. Эффективность может быть определена различными методами, известными специалисту. Предпочтительными являются пегилированный (pegylated) G-CSF, в особенности полученный *E.coli* G-CSF и, еще более предпочтительно, три-тетра пегилированный полученный *E.coli* G-CSF. G-CSF описан как наиболее стабильный в кислой среде, несмотря на то, что при pH 2,5–5,0 происходит конформационное изменение, сопровождающееся потерей третичной структуры и повышением содержания альфа спиральной формы (Narhi et al., J. Protein Chem. 10, 359–367 (1991)). Это конформационное изменение характерно для распрямленного глобулярного состояния (MGS). Так, как это происходит в случае работы препарата с другими протеинами, способными к превращению в MGS, препарат, имеющий дело с G-CSF, должен принимать защитные меры против термического распрямления вторичной и третичной структуры для предотвращения агрегации и денатурации. GM-CSF, пригодный для использования по изобретению, может быть нативной формой, выделенной в чистом виде из организма млекопитающих, или продуктом прокариотной или эукариотной экспрессии клетки хозяина экзогенной последовательности ДНК, полученной геном или cДНК клонированием, или генным синтезом. Подходящие прокариотные хозяева включают различные бактериальные клетки (например, *E.coli*). Подходящие эукариотные хозяева включают дрожжи (например, *S. cerevisiae*) и клетки млекопитающих (например, яичника китайского хомячка, обезьяны). В зависимости от используемого хозяина, продукт GM-CSF выражения может быть гликозилирован млекопитающим или другими эукариотными углеводами, или может быть негликозилирован. Изобретение предполагает использование любых и всех таких форм GM-CSF, хотя предпочтительным яв-

ляется рекомбинантный GM-CSF, в особенности полученный *E.coli*, по соображениям коммерческой практичности.

Липидные пузырьки, используемые в композициях по изобретению, являются отрицательно заряженными липосомами, способными к взаимодействию с протеином. Предпочтительными являются следующие липосомы: диолеилфосфатидилглицерол (DOPG); димиристилфосфатидилглицерол (DMPG); дипальмитоилфосфатидилглицерол (DPPG); яичный фосфатидилглицерол; диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE); яичный фосфатидилэтанолламин; диолеилфосфатидовая кислота (DOPA); димиристолфосфатидовая кислота (DMPA); дипальмитоилфосфатидовая кислота (DPPA); диолеилфосфатидилсерин (DOPS); димиристолфосфатидилсерин (DMPS); дипальмитоилфосфатидилсерин (DPPS); яичный фосфатидилсерин; лизофосфатидилглицерол; лизофосфатидилэтанолламин; лизофосфатидилсерин.

В предпочтительном варианте с использованием *E.coli* полученного rhGM-CSF, липосомным пузырьком является DMPG с отношением DMPG:GM-CSF 17:1, при pH 7,0 в растворе фосфатного буфера (PBS).

В предпочтительном варианте с использованием химически модифицированного (пегилированного) *E.coli* полученного rhG-CSF, rhG-CSF является три-тетра связанным, липосомным пузырьком является DMPG с отношением DMPG:PEG-G-CSF 17:1, при pH 4,5.

Хотя изобретение описывается и иллюстрируется в отношении к специфичным протеин-липидной композиции и методам обработки, специалисту очевидно, что могут существовать различные соответствующие композиции и методы обработки, без отклонения от цели изобретения.

Следующие примеры иллюстрируют более подробно различные аспекты изобретения.

Пример 1. Производили первоначальные эксперименты для исследования возможности введения рекомбинантного человеческого G-CSF (rhG-CSF) в липидный пузырек. rhG-CSF получали при использовании рекомбинантной ДНК технологии, согласно которой *E.coli* клетки были подвергнуты трансфекции посредством ДНК-последовательности, кодирующей человеческий G-CSF, как описано в патенте US № 4810643 на имя Souza. rhG-CSF готовили в виде раствора с концентрацией 4 мг/мл в разбавленной HCl, pH

4,0. Все липиды были получены из Avanti Polar Lipids (Albaster, Ala) и выдержаны при -20°C в атмосфере азота при конечной концентрации 100 мг/мл в хлороформе.

Приготовление G-CSF:фосфолипидных комплексов.

С целью приготовления липидных пузырьков для сочетания с G-CSF 30 $\mu\text{мол}$ соответствующего липида помещают в стеклянную трубку и сушат в потоке газообразного азота до образования тонкой пленки. Липидную пленку высушивают не менее двух часов под вакуумом для удаления любых следов хлороформа. Липидную пленку гидрируют в 1 мл либо дистиллированной деионизированной воды (ddH_2O), фосфатном буферном растворе, pH 7,2 (Cibro/BRL "D-PBS") либо в 150 mM NaCl. Затем образцы были обработаны ультразвуком в ультразвуковой установке типа ванны (лаборатория Supplies, Hicksville, N.Y.). Ультразвуковую обработку продолжали до тех пор, пока образцы не приобрели оптическую прозрачность (обычно в пределах 10–15 мин). Образцы хранили при 4°C под азотом вплоть до использования. Конечная концентрация липида составляла 30 mM. Альтернативно, липидные пузырьки могут быть приготовлены высушиванием под азотом 300 $\mu\text{мол}$ липида как описано выше. Сухие липидные пленки гидрировали в 10 мл соответствующего водного раствора как описано выше. Образцы были затем микроэмульгированы в эмульгаторе (Microfluidics Model 110S, Microfluidics, Inc., Cambridge, MA), работающем при 10000 пси. Образцы подвергали 10 циклам рециркуляции в приборе. Микроэмульгированные образцы затем хранили при 4°C как описано выше.

G-CSF:фосфолипидные комплексы готовили смешением G-CSF (как описано выше) со специфичным липидом (как описано выше). Смешение осуществляют в эхревом смесителе, перемешиванием или бережным встряхиванием. Готовят образцы с различным мольным соотношением липид:G-CSF для оценки мембранной проницаемости и стабилизации протеина. Например, для приготовления 3 мл образца (в воде), содержащего 0,2 мг/мл G-CSF при мольном отношении липид:G-CSF 40:1, 150 $\mu\text{л}$ исходного раствора G-CSF соединяют с 44 $\mu\text{л}$ липида (30 mM исходный раствор в воде, приготовленный при воздействии ультразвука), и добавляют воду до конечного объема образца 3 мл. Рекомендуемая пятиминутная инкубация (но

не обязательная) была осуществлена перед использованием и испытанием образца.

G-CSF может быть также соединен с гидрированным липидом перед микроэмульгированием. Последующее микроэмульгирование смеси (как описано выше) приводит к внедрению G-CSF в липидную мембрану.

Анализ G-CSF:фосфолипидных комплексов.

1. Триптофаный эмиссионный спектр.

Существует две группы триптофана в rhG-CSF, являющиеся очень чувствительными к условиям локальной окружающей среды. Поэтому проводили анализ для определения rhG-CSF триптофанной флуоресценции в условиях контактирования rhG-CSF с липосомой. Голубой сдвиг максимума флуоресцентной эмиссии предполагает, что триптофаны находятся в более гидрофобной окружающей среде, и, следовательно, rhG-CSF внедрен в липидную мембрану. Отличным образом триптофанного флуоресцентного анализа является Principles of Fluorescence Microscopy, J. Lakowicz, Chap. 11 (Plenum Press, New York, 1983).

Триптофанную флуоресценцию G-CSF:липидных комплексов (как описано выше) анализировали возбуждением образцов при длине волны 280 нм и в процессе сканирования эмиссии от 285 нм до 420 нм с приращением (инкрементом) в 1 нм при скорости 1 нм/с. Образец имел объем 3 мл при конечной концентрации G-CSF 0,2 мг/мл для всех образцов. Отношение липид:G-CSF варьировалось. Все измерения флуоресценции проводили с использованием PTJ Alphacan флуорометра (South Brunswick, N.Y.). Все измерения осуществлялись при 25°C и эту температуру поддерживали использованием держателя кюветы с водной рубашкой, связанного с циркулирующей водной ванной. Собирали эмиссионный спектр и анализировали, используя данные программного обеспечения PTJ. На фиг. 1 показан спектр флуоресценции rhG-CSF в присутствии и в отсутствие небольших однослойных пузырьков, состоящих из DOPG. rhG-CSF имеет максимум эмиссии в области 334 нм в отсутствие пузырьков DOPG. В присутствии DOPG и при соотношении липид:протеин 100:1 rhG-CSF триптофанная флуоресценция показывает сдвиг максимума флуоресценции в голубую область эмиссии в область 327 нм и сильное увеличение интенсивности флуоресценции.

Короткая длина волны флуоресцентной эмиссии в присутствии DOPG предполагает большую гидрофобность триптофаном в окружающей среде, чем нативный белок. Как показано на фиг. 2, сдвиг флуоресценции зависит от мольного отношения DOPG:G-CSF, и мембранное внедрение обнаруживается как только достигается соотношение DOPG:G-CSF 10:1.

2. Испытания иодидного тушения.

Иодид является эффективным тушителем триптофанной флуоресценции, но он не может проникать через липидные мембраны. Поэтому, эффективное тушение триптофанной флуоресценции иодидом показывает доступность групп основной массы водного растворителя, в то время как защита от иодидного гашения наблюдается в случае, когда триптофаны белка изолированы от водного растворителя.

В этих экспериментах использованы G-CSF и DOPG:G-CSF композиции (отношение липид:белок 100:1). После того, как первоначальное считывание (F_0) на образцах было произведено и зарегистрировано, измеряли интенсивность флуоресценции после введения возрастающих количеств иодида калия (KJ) (5 M исходный раствор). Образцы и KJ растворы были приготовлены с содержанием 1 mM Na_2SO_3 (конечная концентрация) как описано Lee et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 984: 174-182 (1989) и Le Doan et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 858: 1-5 (1986). Добавление Na_2SO_3 препятствует образованию J_2 , который может распределяться между неполярными участками белков и мембранами. Данные испытаний были проанализированы с помощью уравнения Stern-Volmer ($F_0/F = 1 + K_s[KJ]$), где F_0 и F представляют собой интенсивности флуоресценции образцов соответственно в отсутствие и в присутствии KJ при концентрации [KJ]. K_s является константой тушения Stern-Volmer для KJ тушения G-CSF триптофаных радикалов (Lehrer, S., *Biochemistry* 10: 3254-3263 (1979)).

На фиг. 3 показаны данные кривой Stern-Volmer. В отсутствие пузырьков DOPG, rhG-CSF флуоресценция эффективно гасится KJ. В присутствии DOPG данные Stern-Volmer расположены на прямой, что указывает на то, что иодид имеет слабую доступность к обоим триптофанам. Данные показывают, что группы триптофана, доступные для иодида в отсутствие DOPG, становятся недоступными для иодида в присутствии DOPG. Поэтому часть rhG-CSF, содержащая этот триптофан, должна быть внедренной в двойной слой DOPG.

3. Измерение превращения энергии.

Как уже указывалось ранее, между донорами триптофана и растворимыми в липиде акцепторами флуоресценции, такими как пирендекановая кислота, может произойти передача энергии, так как спектр возбуждения этой пробы значительно перекрывает спектр эмиссии триптофана (Friere et al., *Biochemistry*, 22: 1675-1680 (1983)). В случае внедрения белка в липидную мембрану, передача энергии от триптофана к пирену приведет к затуханию флуоресценции триптофана. В этом эксперименте непрерывно измеряют интенсивность эмиссии триптофана различных комплексов G-CSF:липид перед (F_0) и после (F) добавления различных количеств пирендекановой кислоты (исходный раствор в тетрагидрофуране с концентрацией 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Образцы непрерывно перемешивают в процессе добавления пирендекановой кислоты для лучшего смешения пирендекановой кислоты с образцом. Отношение F/F_0 пропорционально количеству передачи энергии между G-CSF триптофанами и гидрофобным акцептором энергии - пирендекановой кислотой.

На фиг. 4 показан характер затухания rhG-CSF в присутствии DOPG (отношение липид:белок 100:1) как функция добавленного количества пирендекановой кислоты. Затухание флуоресценции начинается при очень небольших концентрациях пирендекановой кислоты (<1 мол. %), так что эффект флуоресцентной пробы на мембранную структуру и поведение является минимальным. Поскольку предполагают, что пирендекановая кислота может очень быстро проникать в липидный двойной слой, настоящие данные показывают, что rhG-CSF довольно глубоко внедряется в DOPG мембраны, что вызывает эффективную передачу энергии от триптофана к пиреновому акцептору. Процесс передачи энергии был подтвержден исследованием спектра возбуждения пирендекановая кислота - меченые DOPG пузырьки в присутствии и в отсутствие rhG-CSF.

Вышеуказанный анализ показывает, что rhG-CSF может тесно взаимодействовать с ненасыщенными фосфолипидами подобно DOPG. В присутствии DOPG пузырьки rhG-CSF триптофан является защищенным от водорастворимого тушителя флуоресценции, но является поддающимся затуханию флуоресценции в результате передачи энергии гидрофобной флуоресцентной пробе.

Вместе взятые данные показывают, что rhG-CSF может внедряться в мембраны,

состоящие из DOPG. Мембранное внедрение можно обнаружить при достижении отношения липид:G-CSF 10:1, и это число может представлять собой число липидов, окружающих внедренную часть протеина.

П р и м е р 2. Определяют способность rhG-CSF к взаимодействию с другими фосфолипидами сравнением отношения интенсивностей F/F_0 и максимумом эмиссии как описано выше. В каждом случае молярное отношение липид:rhG-CSF равняется 100:1.

На фиг. 5 показаны значения отношения F/F_0 для rhG-CSF в отсутствие и в присутствии различных липидов. На фиг. 6 показаны значения максимума эмиссии для тех же самых композиций. Данные на фиг. 5 и 6 показывают, что в дополнение к DOPG, rhG-CSF может внедряться в DMPG, DPPG, и менее эффективно в фосфатидилэтаноламинами (PE's) и в фосфатидилсеринами (PS's). Кроме того, установлено, что NG-DOPE (DOPE образец с более отрицательно заряженной PE головной группой) более способствует внедрению rhG-CSF, чем DOPE. DOPC, DMPC и DPPC являются нейтральными липидами, и эти пузырьки мало влияют или вовсе не влияют на максимум эмиссии или интенсивность флуоресценции rhG-CSF, что указывает на отсутствие взаимодействия с этими фосфолипидами (фиг. 5 и 6, и фиг. 7, кривая 2).

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что протеин, способный переходить в распрямленное глобулярное состояние, может внедряться в различные липидные пузырьки. Однако, это rhG-CSF:липидное взаимодействие происходит только тогда, когда используют отрицательно заряженные липидные пузырьки. Среди отрицательно заряженных липидных пузырьков, пузырьки с небольшим отрицательным зарядом должны вызывать более сильное rhG-CSF взаимодействие.

П р и м е р 3. Определяют влияние rhG-CSF взаимодействия на стабильность протеина. Для этого измеряют круговой дихроизм на приборе Jasco J-720, снабженном штативом термостатированных клеток типа Peltier и магнитной мешалкой. Измеряют круговой дихроизм при 222 нм конечной концентрации rhG-CSF 80 $\mu\text{г/мл}$, pH 6,0. На калориметре Microcal MC-2 производят измерения дифференциальной сканирующей калориметрии. Сканируют образцы rhG-CSF (1 мг/мл , в воде) или DOPG:rhG-CSF (45:1 моль/моль, в воде) со скоростью 90°C/ч. Данные хранят и

анализируют при помощи программного обеспечения Microcal.

Исследуют температурные изменения альфа-спирали G-CSF посредством измерения кругового дихроизма (222 нм) как функции повышения температуры. Развертывание спирали rhG-CSF под действием температуры при pH 6,0 показано на фиг. 8. Кривая показывает, что довольно большое превращение наблюдается при ~60–70°C, что приводит к потере альфа-спиральной формы. После такого превращения rhG-CSF необратимо высаждается из раствора. Температурный интервал процесса развертывания спирали подобен температуре плавления rhG-CSF при pH 7,0, как это было установлено методом дифференциальной сканирующей калориметрии и показано на фиг. 9.

Напротив, DOPG:rhG-CSF образцы показывают постепенную потерю альфа-спиральности с повышением температуры и, в противоположность одному rhG-CSF, развертывание спирали DOPG:rhG-CSF под действием температуры не является совместным (фиг. 8). Такой вывод также следует из отсутствия перехода плавления, как это показывает дифференциальная сканирующая калориметрия (фиг. 9). Примечательно, что DOPG:rhG-CSF образцы могут восстанавливать альфа-спиральность после нагрева до 95°C и могут быть подвергнуты циклическому изменению температуры между 95 и 10°C с полным восстановлением спиральной формы после охлаждения (фиг. 10). rhG-CSF сам по себе в таких условиях необратимо развертывается и высаждается из раствора.

Кроме того, исследовали влияние DMPG и DPPG на G-CSF круговой дихроизм. Использовали отношение липид:rhG-CSF 150:1, и, как и в случае с DOPG, DMPG и DPPG также стабилизируют вторичную структуру rhG-CSF (фиг. 11–13). Эти данные показывают, что взаимодействие rhG-CSF с DOPG, DMPG и DPPG улучшает стабильность протеина в условиях, при которых rhG-CSF сам по себе нестабилен. Это взаимодействие стабилизирует вторичную и третичную структуру rhG-CSF.

П р и м е р 4. Определяют влияние взаимодействия rhG-CSF:DOPG в соответствии с биологической активностью rhG-CSF. Исследуют активность *in vitro* rhG-CSF посредством G-CSF зависящего поглощения [^3H]-тимидина клетками костного мозга мыши как описано в Zsebo et al., Immunobiology 172: 175–184 (1986). Все

испытания проводились трижды. Активность *in vivo* определяли посредством мышечной инъекции хомячкам (доза rhG-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) и подсчетом количества белых кровяных телец (WBC).

1. Активность *in vitro*.

А. Определяют специфичную активность rhG-CSF в присутствии и в отсутствие DOPG. Также испытывают термообработанные образцы rhG-CSF и DOPG:rhG-CSF. Результаты испытаний сведены в таблицу.

Как видно из данных таблицы, выделение в DOPG двойной слой не снижает биологической активности rhG-CSF. После нагрева до 85°C в течение 10 мин активность rhG-CSF не поддается определению и протеин осаждается. После такой же обработки DOPG:rhG-CSF сохраняет ~ 85% активности rhG-CSF без нагревания и полностью восстанавливает вторичную структуру после охлаждения.

В. Изучалась способность различных липидов стабилизировать rhG-CSF в процессе сушки вымораживанием. Образцы rhG-CSF в сочетании с различными липидами подвергали сушке вымораживанием и испытывали на активность как описано выше. При смешении с rhG-CSF DOPG, DMPG и DPPG обеспечивают ~ 100% сохранение биоактивности rhG-CSF после сушки вымораживанием (фиг. 14). Сам по себе rhG-CSF не выдерживает процесса сушки вымораживанием.

2. Активность *in vitro*.

Определяют активность (подсчетом WBC) rhG-CSF в отсутствие и в присутствии липида. Активность измеряют после мышечной инъекции (доза rhG-CSF 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) на день 0. Исследовали пять различных комплексов липид:rhG-CSF, и в каждом случае комплекс липид:rhG-CSF сохраняет активность *in vivo* (фиг. 15 и 16). Описанные исследования показывают, что внедрение в отрицательно заряженный двойной слой липида не оказывает отрицательного воздействия на биологическую активность rhG-CSF. Кроме того, оказалось, что защитное воздействие липида защищает rhG-CSF в течение процесса сушки вымораживанием.

Пример 5. Испытывают способность химически модифицированного (пегилрованного) G-CSF (PEG-G-CSF) и G-CSF, полученного как продукт эукариотной экспрессии клетки-хозяина (CHO-G-CSF), к взаимодействию с отрицательно заряженными липидными пузырьками. В случае CHO G-CSF определение проводили на основе сравнения отношения ин-

тенсивностей F/F_0 и максимумов эмиссии (как описано выше в примере 1). В каждом случае молярное отношение липид:протеин равнялось 100:1. В случае же PEG-G-CSF определение проводили на основе анализа кругового дихроизма.

CHO-G-CSF получали по технологии рекомбинантной ДНК, согласно которой клетки яичника китайского хомячка подвергали трансфекции посредством кодирования последовательности ДНК человеческого G-CSF как это описано в патенте США № 48810643 на имя Souza. CHO-G-CSF приготавливали в виде раствора в PBS с концентрацией 0,6 мг/мл, pH 7,0. Показано, что CHO-G-CSF взаимодействует с DOPG подобно rhG-CSF. Каждый образец показывает увеличение интенсивности флуоресценции в присутствии DOPG и сдвиг максимума эмиссии в голубую область в присутствии DOPG (фиг. 17 и 18). Следовательно, взаимодействие DOPG не является следствием некой специфичности рекомбинантной формы G-CSF.

В этом эксперименте использовали PEG-G-CSF в виде три-тетра пегилрованного *E.coli* полученного G-CSF (используют PEG 6000). Образцы DMPG:PEG-G-CSF (молярное отношение 17:1) готовили как описано выше. Найдено, что образцы DMPG:PEG-G-CSF полностью восстанавливают вторичную структуру после нагревания (фиг. 19). Несмотря на присутствие молекул PEG, модифицированный протеин был способен к взаимодействию с липидом так же, как негативный протеин.

Приведенные данные показывают, что эффект стабилизации, связанный с взаимодействием G-CSF с отрицательно заряженными липидными пузырьками, не является присущим только rhG-CSF, полученному как продукт прокариотной эмиссии клетки-хозяина. Химически модифицированный протеин, способный к превращению в MGS, после контактирования с липидным пузырьком, также проявляет стабилизирующее воздействие.

Пример 6. Изучают влияние DMPG и DPPG на GM-CSF. GM-CSF представлял собой рекомбинантный человеческий GM-CSF согласно патенту США № 5047504 на имя Boone. Его готовили в виде раствора с концентрацией 1 мг/мл в фосфатном буферном растворе, pH 7,0. Отношение липид:GM-CSF равно 17:1. Измеряли термическую стабильность посредством анализа кругового дихроизма как описано выше. DMPG и DPPG могут приводить к лучшей термической стабильности GM-CSF, то есть к восстановлению вто-

ричной структуры после нагрева (фиг. 20a и 20b). Данные этого исследования показывают пример другого образца протеина, способного к превращению в рас-

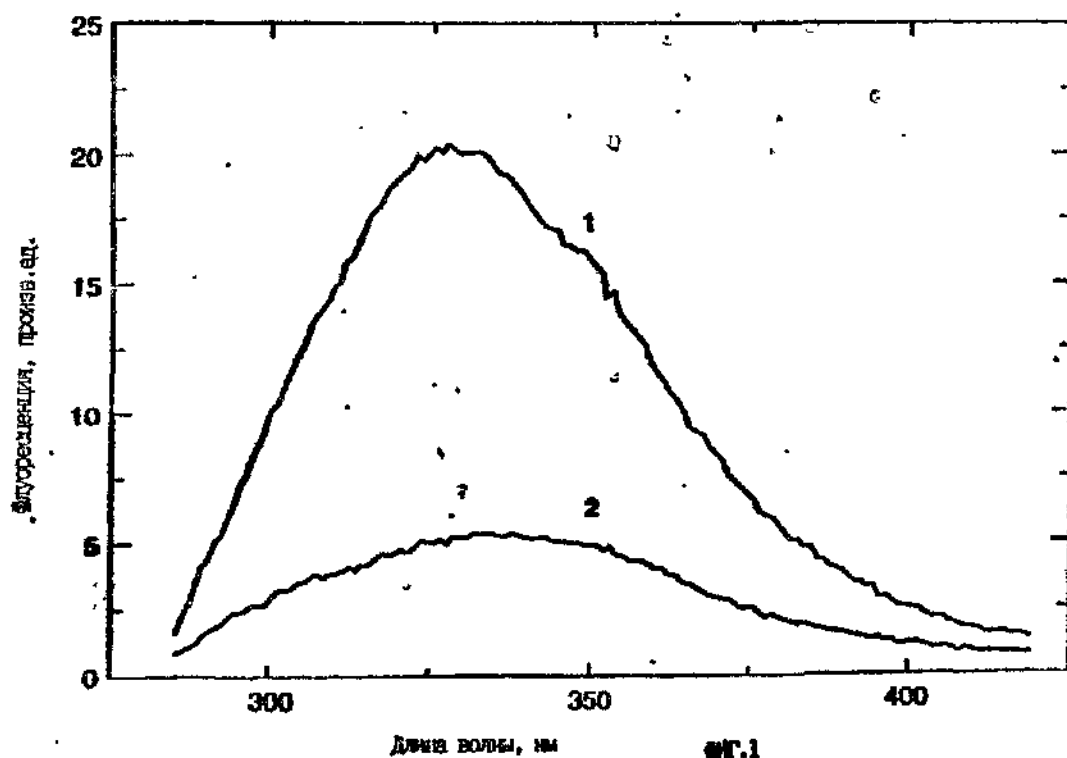
рямленное глобулярное состояние и к взаимодействию с отрицательно заряженным липидным пузырьком, для повышения термической стабильности протеина.

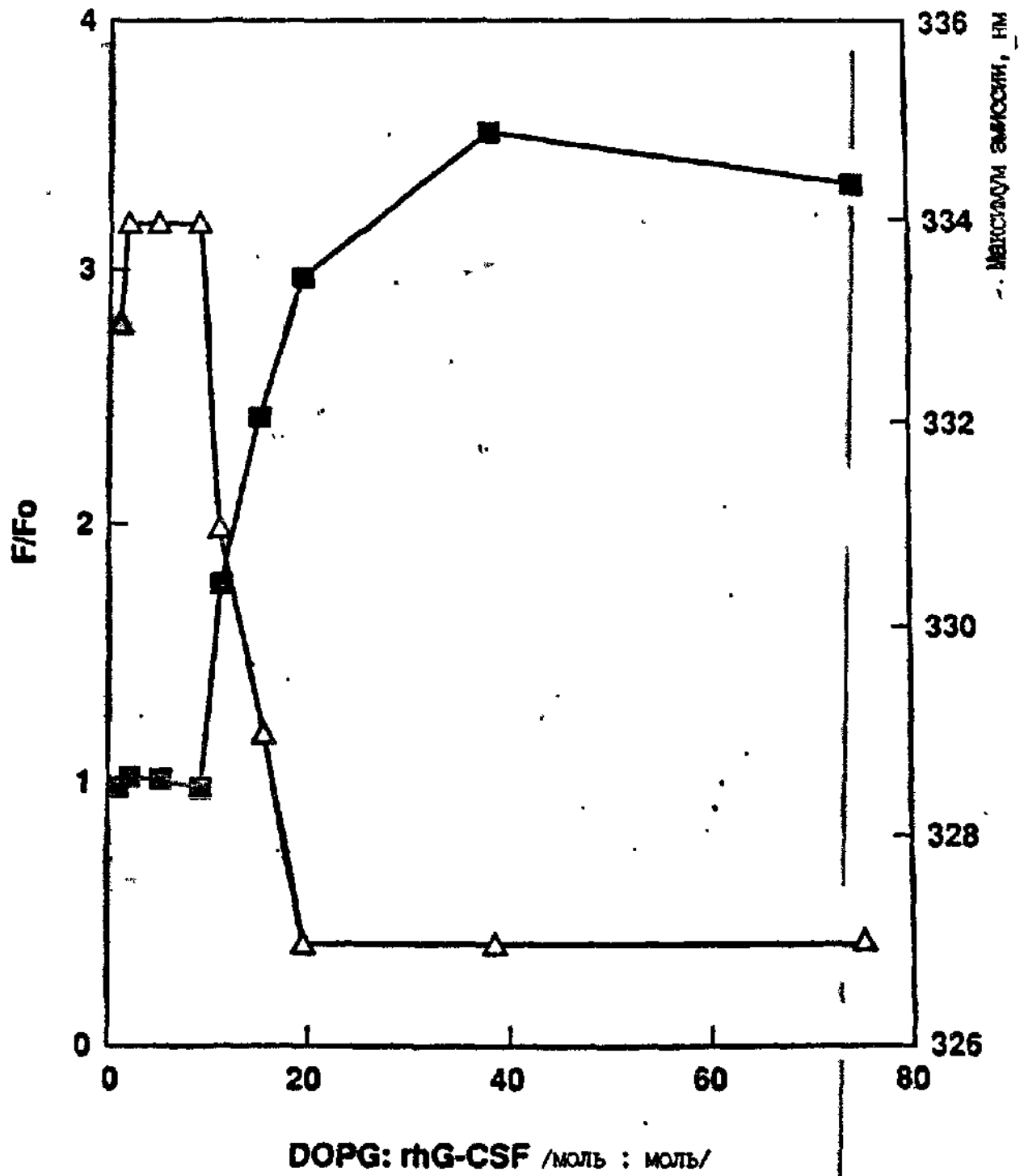
5

Образец	Специфическая активность (У/мг/протеин)
rhG-CSF	$0,66 \pm 0,09$
rhG-CSF (нагретый) ^a	Не определяется
DOPG:rhG-CSF ^b	$0,61 \pm 0,11$
DOPG:rhG-CSF ^b (нагретый)	$0,52 \pm 0,08$

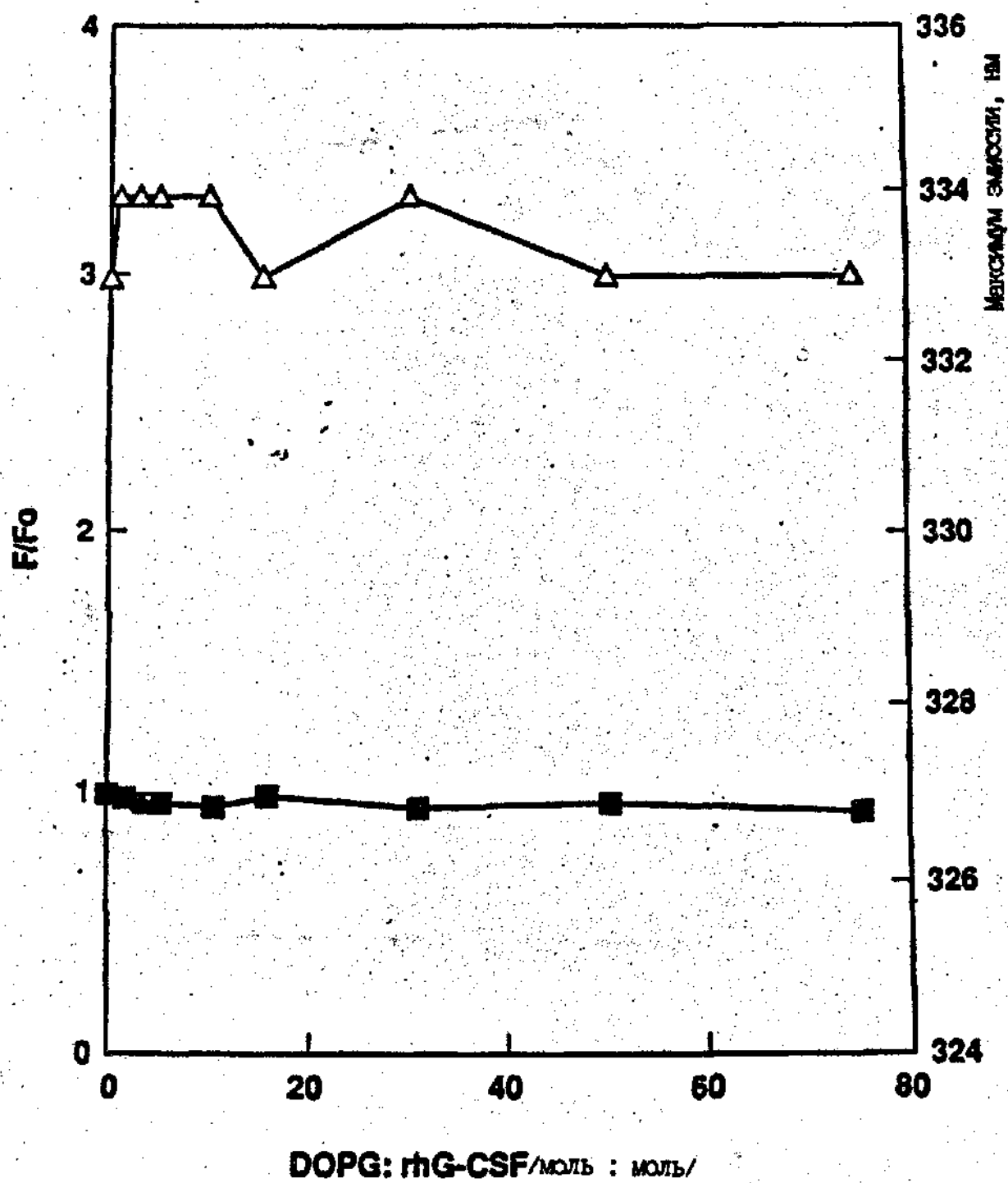
П р и м е ч а н и я: а – образцы инкубировали в течение 10 мин при 85°C на водяной бане перед испытанием;

б – мольное отношение DOPG:rhG-CSF равно 50:1.



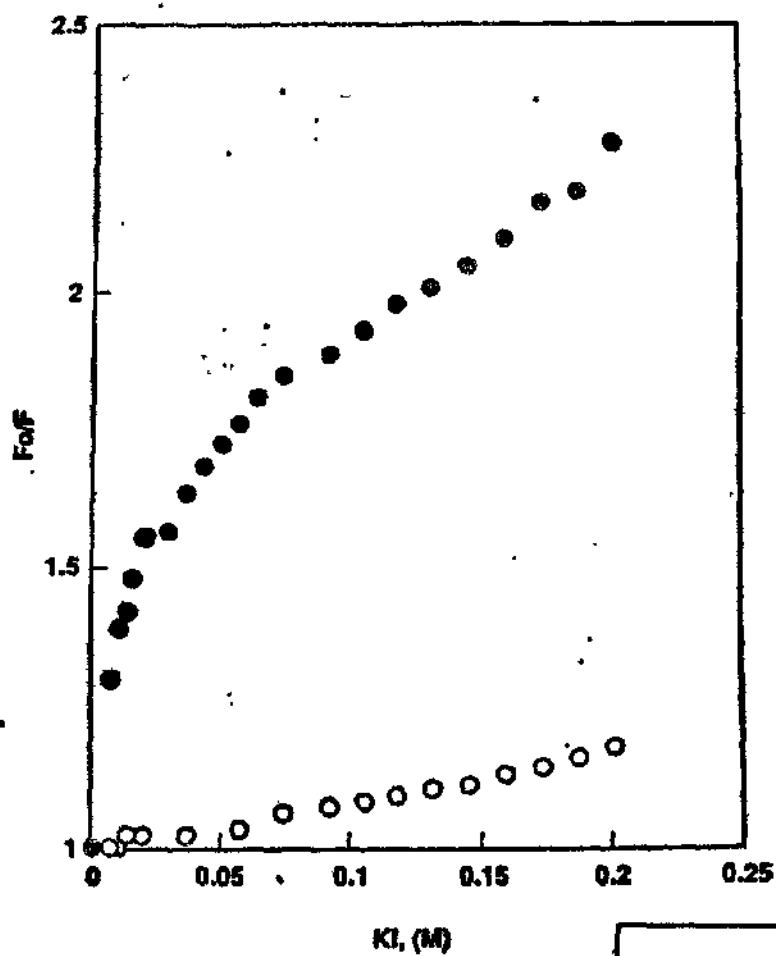


ФИГ.2/в/



Фиг. 2 /в/

26640



Фиг. 3



Мол. %, глутаминовая кислота

Фиг. 4

F/F₀

0 1 2 3 4

DOPG

DMPG

DPPG

DOPE

NG-DOPE

DPPE

DSPE

DOPC

DMPC

DPPC

DOPS

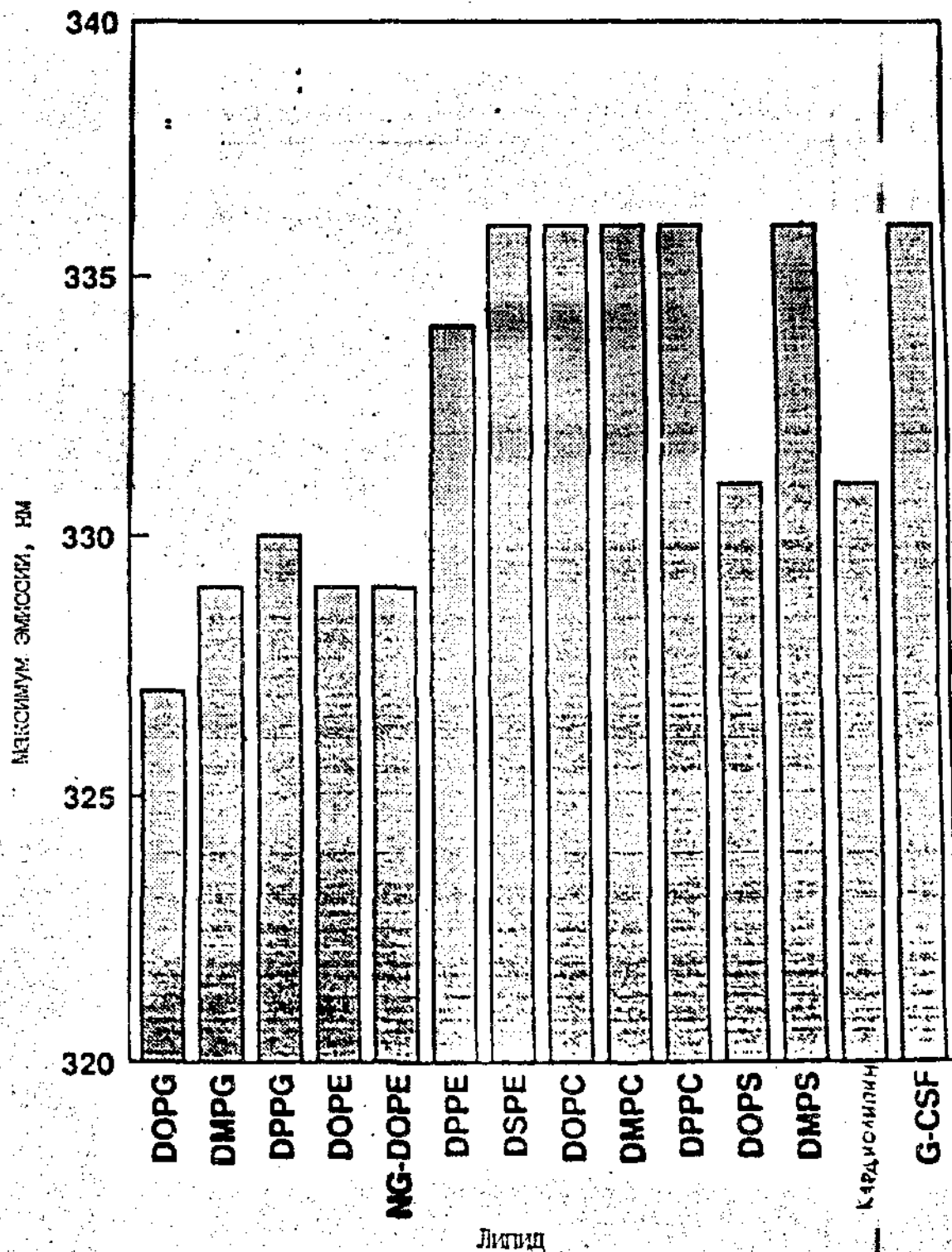
DMPS

Кардиолипид

Липид

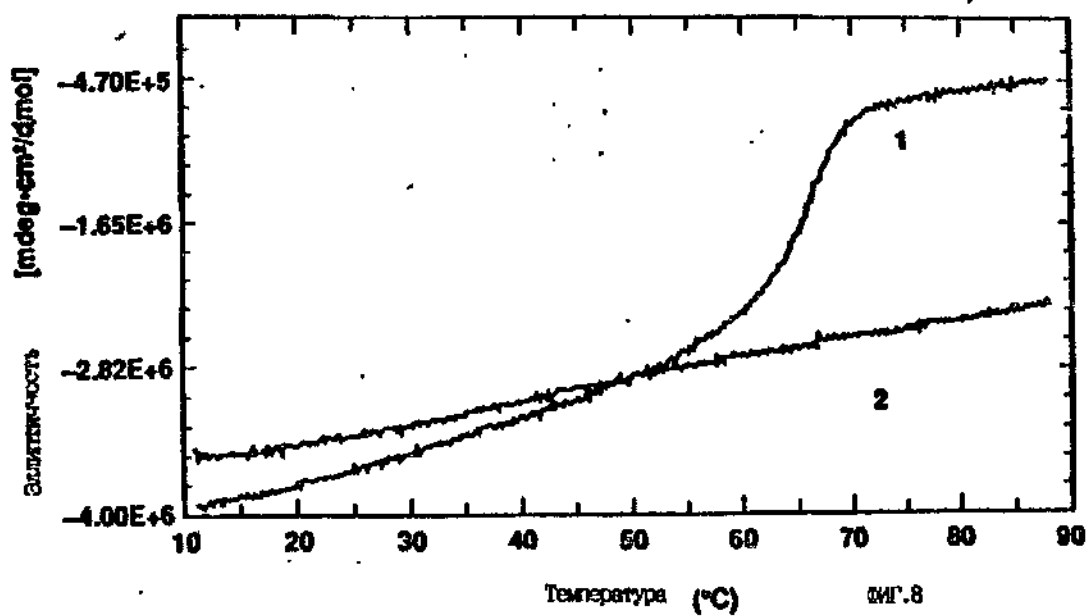
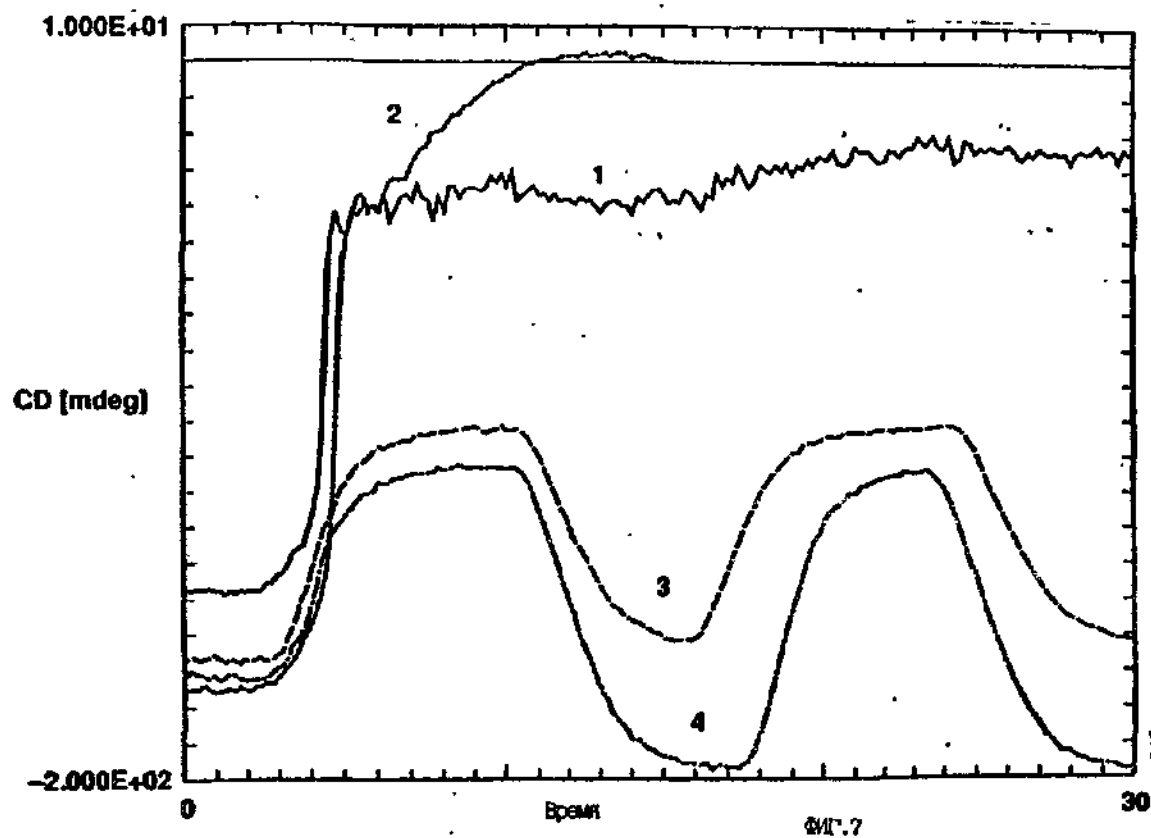
Фиг. 5

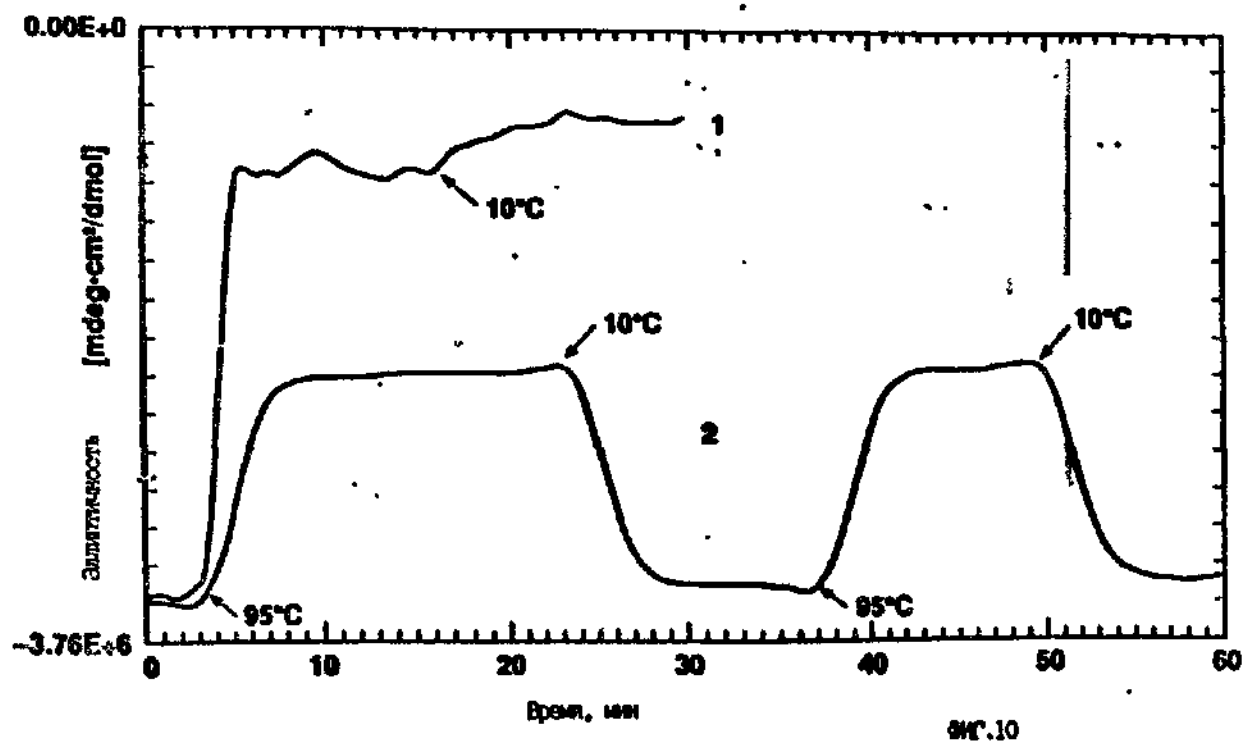
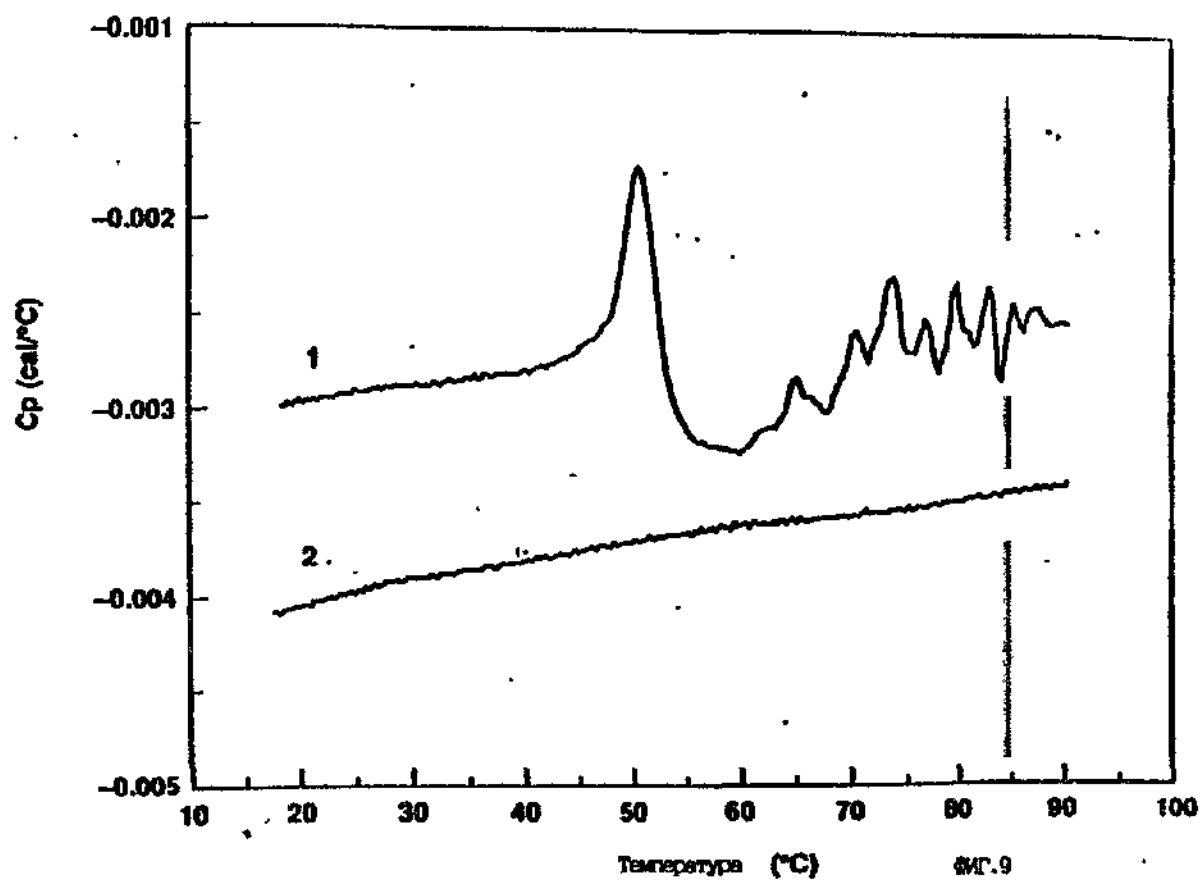
26640

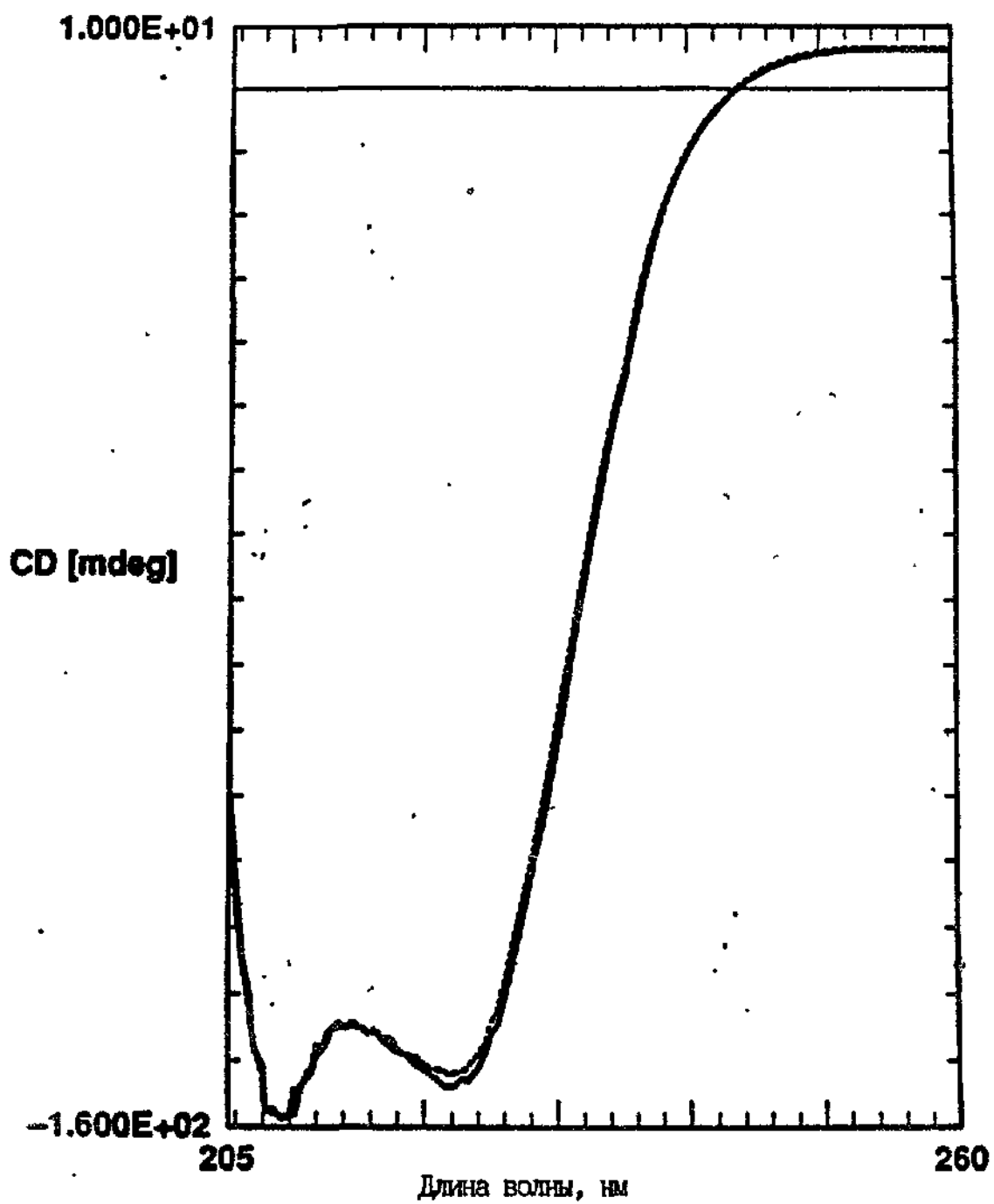


ЛИПИД

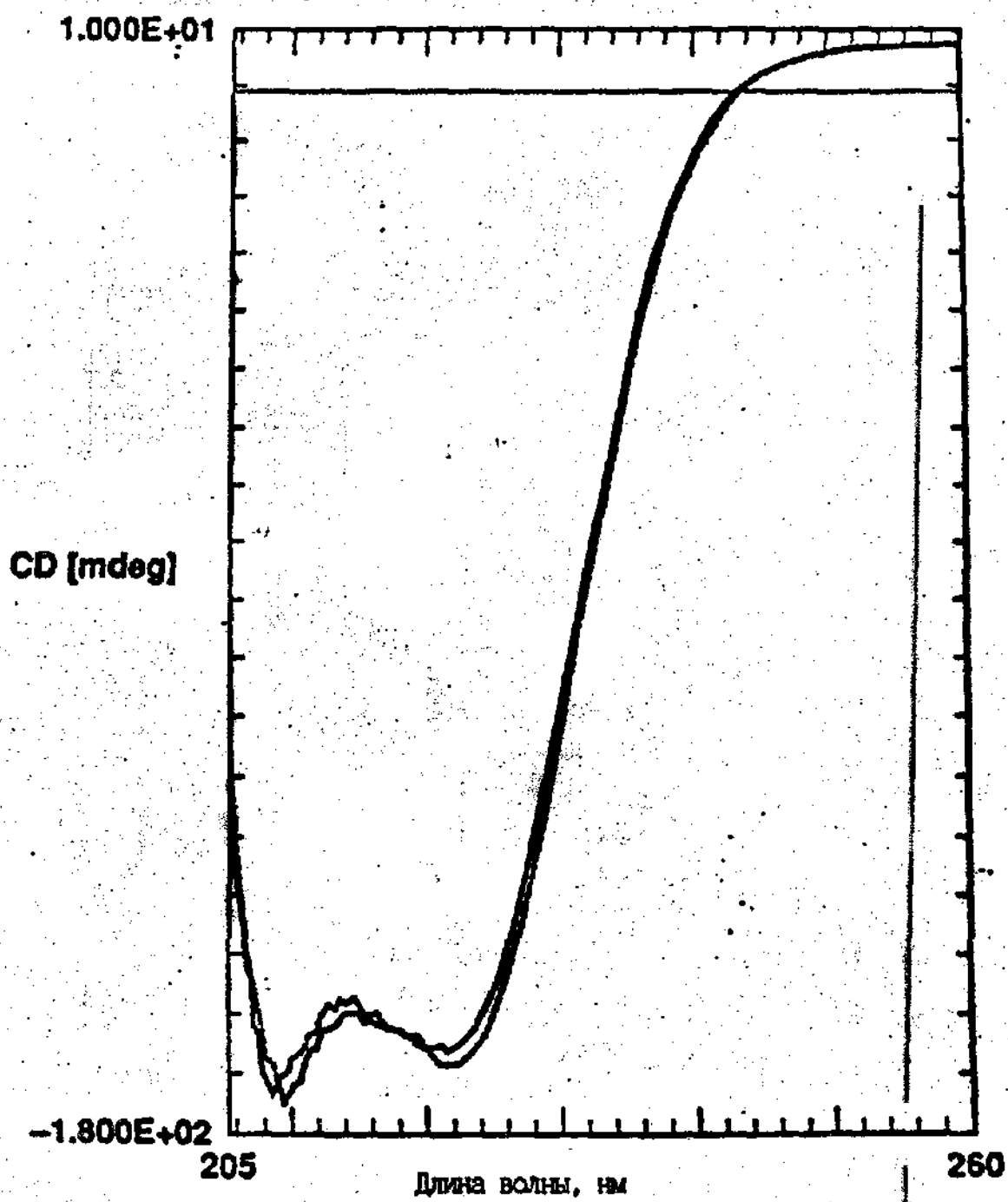
Фиг. 6



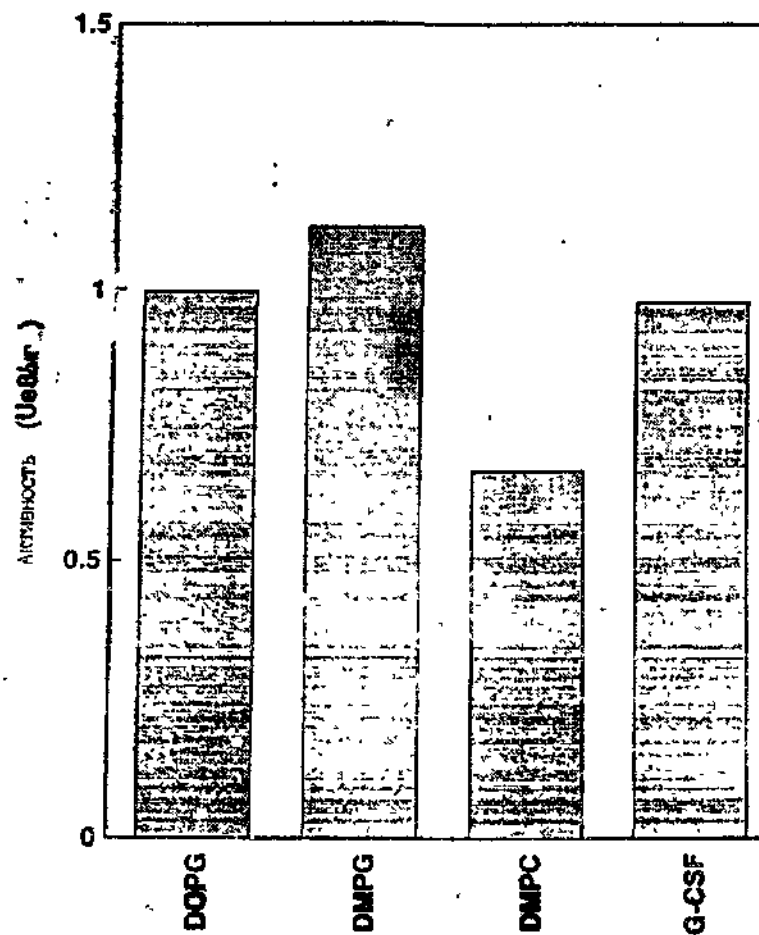




ФИГ.11

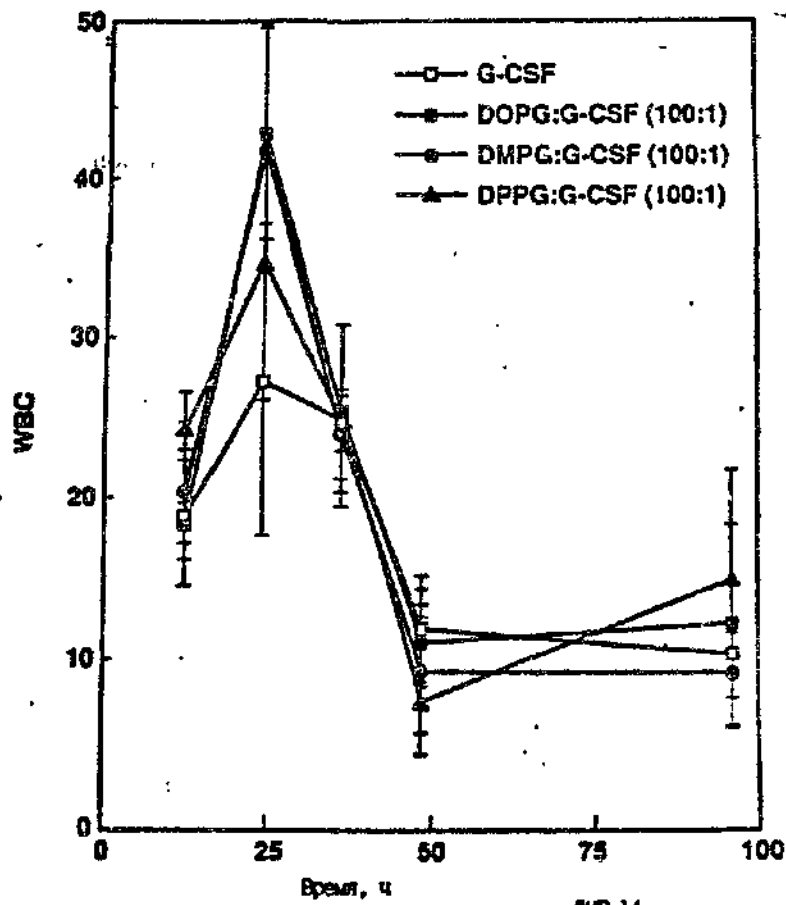


ФИГ.12

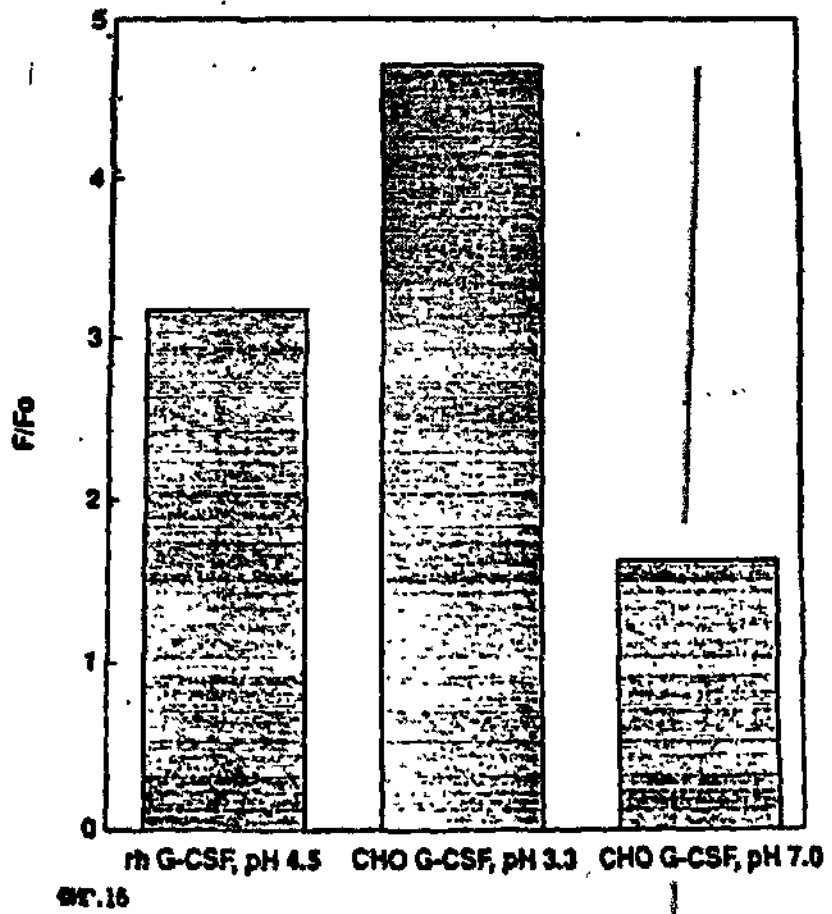
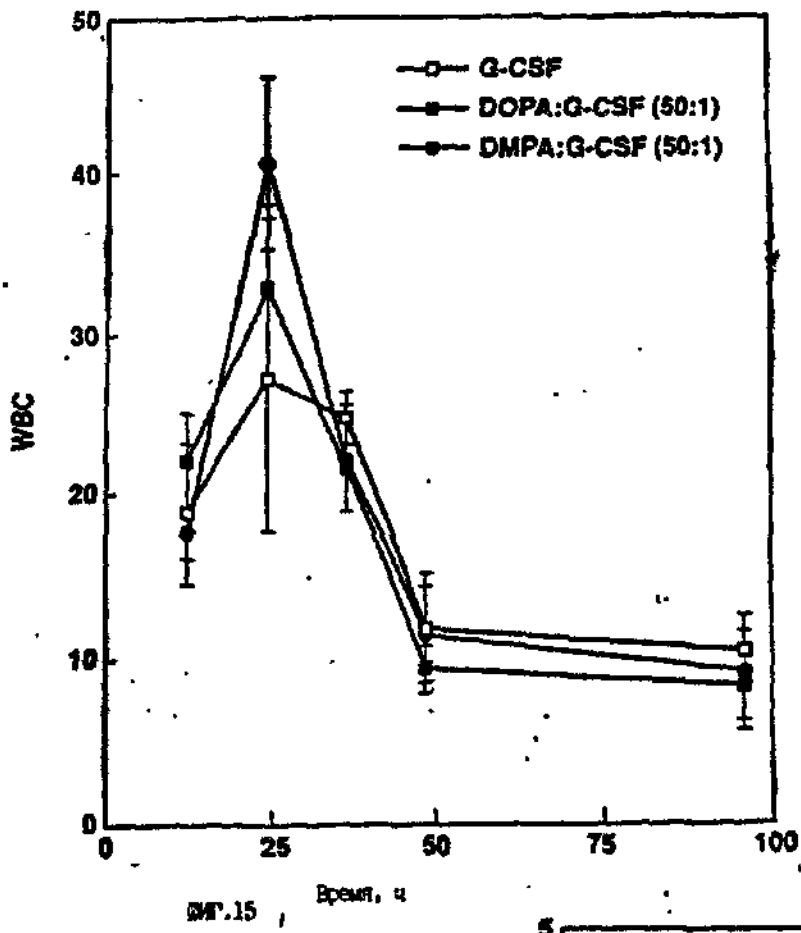


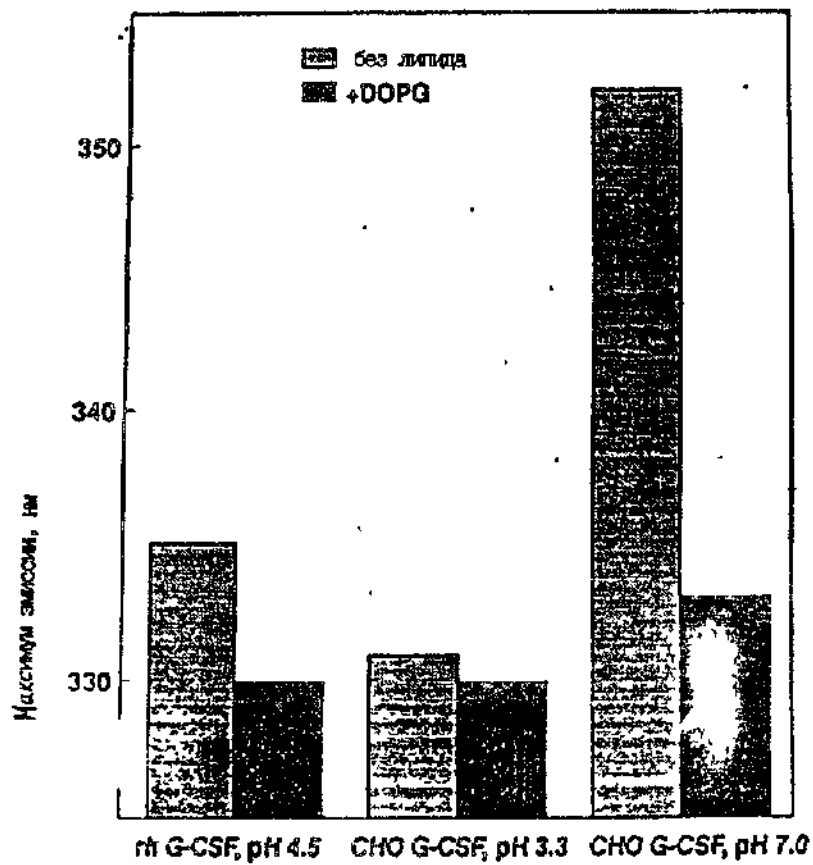
Фиг. 13

Необработанный G-CSF



Фиг. 14





MT.17

1.000E+01

CD [mdeg]

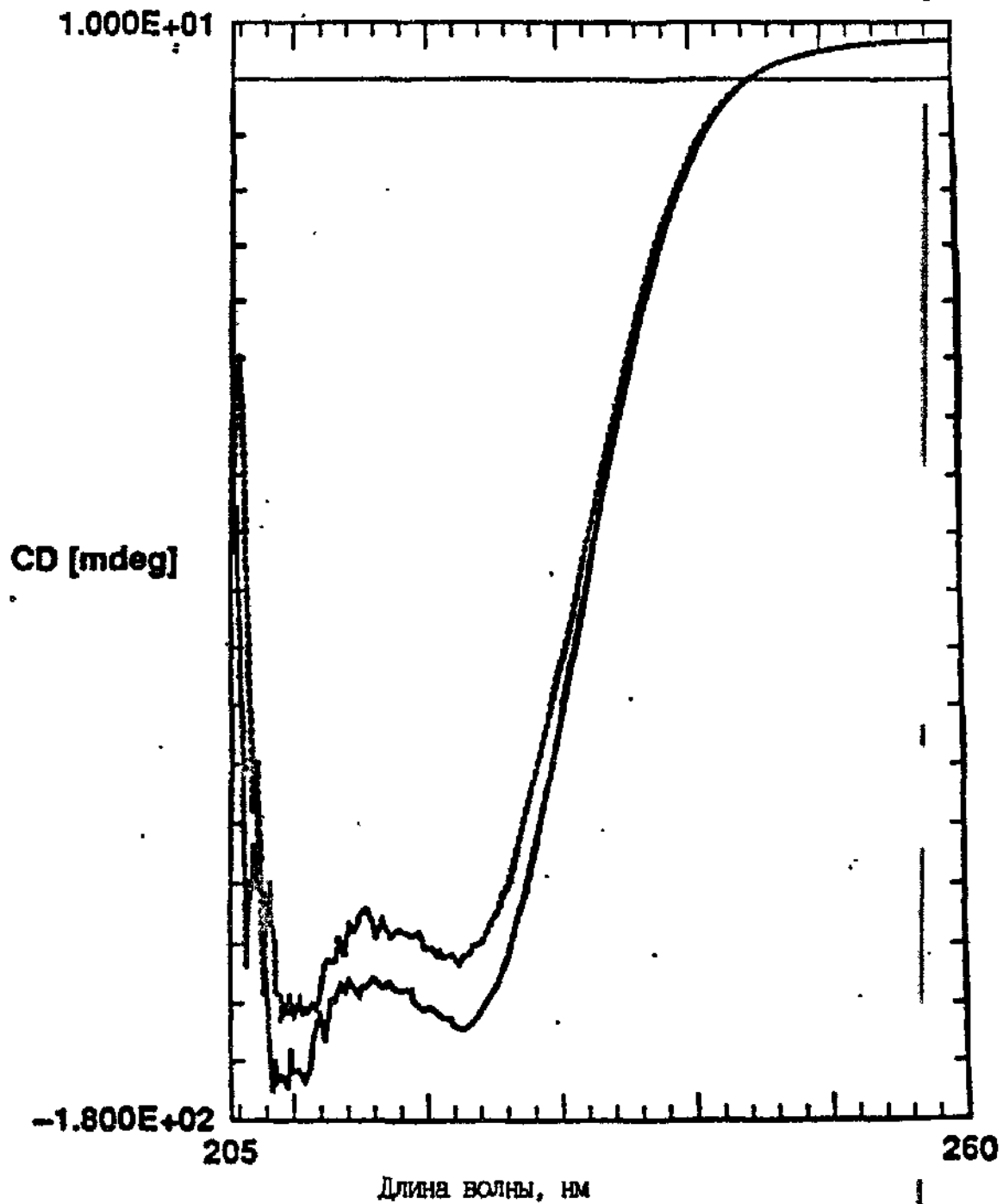
-1.500E+02

MT.18

203

Длина волны, nm

250



ФИГ.19

Упорядник	Техред М. Келемеш	Коректор М.Самборська
-----------	-------------------	-----------------------

Замовлення 520

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

