



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110799** (13) **C2**

(51) МПК (2016.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61P 29/00**

**C07K 14/535** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2013 03086</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Даваньїно Джуан (US), Кха Кетрін Нгань (US), Клотц Алан Воскемп (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>22.09.2011</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285, United States of America (US)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.02.2016</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/385,629</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>US 5919757 A, 06.07.1999 WO 2008/122415 A1, 16.10.2008 EP 0988861 A1, 29.03.2000</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>23.09.2010</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>10.06.2013, Бюл.№ 11</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.02.2016, Бюл.№ 4</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>РСТ/US2011/052692, 22.09.2011</b>		

**(54) СТАБІЛЬНА ВОДНА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА МІСТИТЬ БИЧАЧИЙ ГРАНУЛОЦИТАРНИЙ КОЛОНІЄСТИМУЛЮВАЛЬНИЙ ФАКТОР**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується стабільної водної композиції, яка містить bG-CSF-T133pAF-20K PEG, цитратний або сукцинатний буфер, аргінін і факультативно - протиіон для аргініну, причому ця композиція містить менше ніж 0,001 % поверхнево-активної речовини, та її застосування для лікування тварин.

UA 110799 C2



Гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (G-CSF) є членом мультигенної родини, що включає гени гормону росту. G-CSF стимулює проліферацію специфічних клітин-попередників кісткового мозку і їх диференціацію в гранулоцити. Крім того, G-CSF є потужним стимулом для проліферації і визрівання нейтрофілів *in vivo* (Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84: 2484-2488; дивись також Heidari et al., Vet. Immunol. Immunopathol. 2001; 81:45-57). G-CSF також здатен індукувати функціональну активацію або "праймування" зрілих нейтрофілів *in vitro* (Weisbart R.H. et al., Annals of Internal Medicine 1989; 110:297-303). Було показано, що G-CSF праймує людські гранулоцити і посилює вивільнення супероксиду, стимульоване хемотактичним пептидом, N-формілметіоніллейцилфенілаланіном (S. Kitagawa, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987; 144:1143-1146, та CF. Nathan, Blood 1989; 74:301-306), та активує IgA-опосередкований фагоцитоз людськими нейтрофілами (Weisbart R.H., et al., Nature 1988; 332: 647-649).

Було встановлено, що G-CSF є придатним для лікування симптомів, для яких збільшення кількості нейтрофілів буде забезпечувати сприятливий вплив. G-CSF є також корисним окремо або в комбінації з іншими сполуками (такими як інші цитокіни) для росту або розмноження клітин в культурі, наприклад, для трансплантатів кісткового мозку.

Були описані клонування кДНК і експресія рекомбінантного людського G-CSF (hG-CSF), і рекомбінантний hG-CSF демонструє більшість (якщо не всі) біологічних властивостей природної молекули (Souza L. et al., Science 232, 61-65 (1986)). Аналіз послідовності кДНК і геномних клонів ДНК дозволив встановити амінокислотну послідовність і показав, що довжина білка становить 204 амінокислоти із сигнальною послідовністю з 30 амінокислот. Довжина зрілого білка становить 174 амінокислоти, і він не має потенційних N-сполучених центрів глікозилювання, а лише декілька можливих центрів для O-сполученого глікозилювання.

Фармацевтичні препарати, які містять hG-CSF, є відомими в цій галузі і охоплюють численні композиції. Наприклад, різні композиції hG-CSF описані у Piedmonte et al., Advanced Drug Delivery Reviews, 60: 50-58 (2008), Herman et al., Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs, Rodney Pearlman and Y. John Wang, eds., Plenum Press, New York (1996), патенти США № 5,919,757 на ім'я Michaelis et al., та патенти США № 6,908,610 на ім'я Sato et al. Поверхнево-активні речовини традиційно включають до складу композицій, які містять hG-CSF, і вони можуть запобігати взаємодії hG-CSF, розташованого на потенційно дестабілізуювальних поверхнях розділу, з поверхнями, з якими зустрічаються під час обробки, а також запобігати зміні його конформаційної стабільності.

Були описані також клонування кДНК і експресія рекомбінантного бичачого G-CSF (bG-CSF). Наприклад, полінуклеотидна і поліпептидна послідовність зрілого bG-CSF описана у патенті США № 5,849,883, в якому також описані способи клонування, виділення і очищення поліпептиду і його аналогів. Зрілий bG-CSF має 174 амінокислоти в довжину і 82% гомологію з hG-CSF. Heidari et al., *supra*, описує експресію, очищення і біологічні активності bG-CSF.

Введення b-CSF великій рогатій худобі може забезпечити сприятливу терапевтичну дію. Відповідно, бажано використовувати терапевтичний потенціал фармацевтичної композиції, яка містить bG-CSF. Однак результатом розробки фармацевтичних композицій, які містять b-CSF, за традиційними способами, відомими в цій галузі, є одержання небажаних властивостей продукту, таких як агрегування і дестабілізування поліпептиду bG-CSF та/або такої композиції.

Отже, існує потреба в стабільній фармацевтичній композиції, яка містить bG-CSF, з бажаними властивостями, такими як мінімальний рівень агрегування і дестабілізування продукту. Відповідно, цей винахід пропонує стабільні водні фармацевтичні композиції з поліпептидом bG-CSF або його варіантом, які демонструють бажані властивості, а також забезпечують відповідні переваги.

Цей винахід пропонує стабільні водні композиції, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант, буферну речовину та допоміжну речовину, при цьому згадана композиція по суті не містить поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату. Цей винахід також пропонує способи застосування ліофілізованої або порошкоподібної форми і способи одержання композиції.

Стабільні водні композиції бичачого гранулоцитарного колонієстимулювального фактора ("bG-CSF") за цим винаходом містять поліпептид bG-CSF або його варіант. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "бичачий поліпептид G-CSF" (який альтернативно позначається як "поліпептид bG-CSF", "бичачий G-CSF" або "bG-CSF") та його варіанти, буде охоплювати ті поліпептиди і білки та їх варіанти, які мають щонайменше одну біологічну активність CSF, аналоги bG-CSF, мутанти bG-CSF, змінений глікозильований bG-CSF, PEG-кон'югований bG-CSF, ізоформи bG-CSF, міметики bG-CSF, фрагменти bG-CSF, гібридні білки bG-CSF, гібридні білки, олігомери і мультимери, гомологи, глікозильовані варіанти, варіанти, сплайсовані варіанти і мутеїни, незалежно від їхньої біологічної активності, а також незалежно від методу їх

синтезування або одержання, включаючи, але без обмеження ними, одержані рекомбінантними методами (продуковані з кДНК, геномної ДНК, синтетичної ДНК або нуклеїнової кислоти іншої форми), *in vitro*, *in vivo*, мікроін'єкцією нуклеїновокислотних молекул, синтетичними, трансгенними і ген-активованими методами. На додаток до цього, термін "поліпептид bG-CSF" або його варіант охоплює поліпептиди bG-CSF, які містять одну або декілька амінокислотних замінів, додань або делецій. Приклади аналогів бичачого bG-CSF дивись у патенті США № 5,849,883. Послідовність зрілого поліпептиду bG-CSF довжиною 174 амінокислоти виглядає так:

**TPGLPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLRHS  
LGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGGFLYQGLLQALAGISPELAPTLDTLQ  
LDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLH  
RFLELAYRGLRYLAEP.**

Крім того, поліпептид bG-CSF з початковим метіоніновим амінокислотним залишком виглядає так:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR  
HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGGFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT  
LQLDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL  
HRFLELAYRGLRYLAEP.**

Були описані заміни в найрізноманітніших положеннях амінокислот в bG-CSF. Заміни, в тому числі, але без обмеження ними, ті заміни, які модулюють фармацевтичну стабільність, підвищують агоністичну активність, підвищують стійкість до протеаз, перетворюють поліпептид на антагоніст тощо, охоплюються терміном "поліпептид bG-CSF або його варіант".

Термін "поліпептид bG-CSF або його варіант" також охоплює глікозильований bG-CSF, такий як, але без обмеження ними, поліпептиди, глікозильовані в будь-якому амінокислотному положенні, N-сполучені глікозильовані форми поліпептиду або O-сполучені глікозильовані форми поліпептиду. Варіанти, які містять одиничні нуклеотидні заміни, також розглядаються як біологічно активні варіанти поліпептиду bG-CSF. Варіанти, які містять одиничні нуклеотидні заміни, також розглядаються як біологічно активні варіанти bG-CSF. Крім того, охоплюються також сплайсовані варіанти. Термін "поліпептид bG-CSF або його варіант" також охоплює гетеродимери bG-CSF, гомодимери, гетеромультимери або гомомультимери будь-якого одного або декількох bG-CSF чи будь-якого іншого поліпептиду, білка, вуглеводу, полімеру, невеликої молекули, лінкеру, ліганду або іншої активної молекули будь-якого типу, сполучену хімічним шляхом або експресовану у вигляді гібридного білка (дивись, наприклад, патенти США № 6,261,550; № 6,166,183; № 6,204,247; № 6,261,550 та № 6,017,876), а також поліпептидні аналоги, які містять, наприклад, специфічні делеції або інші модифікації, але зберігають біологічну активність (дивись, наприклад, патенти США № 6,261,550; № 6,004,548 і № 6,632,426). Поліпептиди bG-CSF та їх варіанти описані, наприклад, в заявці на патент США 12/507,237 (наразі публікації патентної заявки США 2010/0035812), яка включена до цього опису шляхом посилання. За деякими варіантами здійснення цього винаходу одна або декілька штучно закодованих амінокислот введена(-і) до складу bG-CSF в одному або декількох із таких положень: 8, 62, 69, 125, 133, 136 та будь-якій їх комбінації (зрілий поліпептид bG-CSF або відповідні амінокислоти у поліпептиді bG-CSF з початковим метіоніновим амінокислотним залишком). За деякими варіантами здійснення цього винаходу штучно закодованою амінокислотою, пара-ацетилфенілаланіном (pAF), замінена природно закодована амінокислота в одному з таких положень: S8, S62, L69, G125, T133, A136 та будь-якій їх комбінації (зрілий поліпептид bG-CSF або відповідні амінокислоти у поліпептиді bG-CSF з початковим метіоніновим амінокислотним залишком).

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-S8pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR  
HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGGFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT  
LQLDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL  
HRFLELAYRGLRYLAEP,**

в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні S8.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-S62pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR  
HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGGLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT  
LQLDVTFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL  
HRFLELAYRGLRYLAEP,**

в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні S62.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-L69pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR  
HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGGLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT  
LQLDVTFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL  
HRFLELAYRGLRYLAEP,**

5

в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні L69.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-G125pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR  
HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGGLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT  
LQLDVTFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL  
HRFLELAYRGLRYLAEP,**

10

в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні G125.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-T133pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR  
HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGGLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT  
LQLDVTFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL  
HRFLELAYRGLRYLAEP,**

15

в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні T133.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-A136pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR  
HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLQLHGGLFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT  
LQLDVTFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL  
HRFLELAYRGLRYLAEP,**

в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні A136.

20 Композиція за цим винаходом може містити поліпептид bG-CSF або його варіант, який є сполученим із лінкером, полімером або біологічно активною молекулою. Лінкери, полімери та біологічно активні молекули описані в заявці на патент США 12/507,237 (на цей час публікації патентної заявки США 2010/0035812). Термін "зв'язок" або "лінкер" вжитий у цьому описі для позначення груп або зв'язків, які зазвичай утворюються в результаті хімічної реакції, і які, як правило, є ковалентними зв'язками. Термін "гідролітично стабільні зв'язки" означає, що зв'язки є по суті стабільними у воді і не реагують із водою при застосовуваних значеннях pH, у тому числі, але без обмеження, за фізіологічних умов, протягом тривалого періоду часу, можливо, навіть необмежено довго. Термін "гідролітично нестабільні або розкладні зв'язки" означає, що зв'язки розкладаються у воді або у водних розчинах, в тому числі, наприклад, крові. Термін "ферментативно нестабільні або розкладні зв'язки" означає, що зв'язок може бути зруйнований одним або декількома ферментами. Як відомо у цій галузі, PEG і споріднені полімери можуть містити розкладні зв'язки у полімерному каркасі або в лінкерній групі між полімерним каркасом та однією або декількома кінцевими функціональними групами полімерної молекули. Наприклад, складноефірні зв'язки, утворені в результаті реакції PEG-карбонових кислот або активованих PEG-карбонових кислот зі спиртовими групами на біологічно активній речовині, як правило, гідролізуються за фізіологічних умов з вивільненням згаданої речовини. Інші гідролітично розкладні зв'язки охоплюють, але без обмеження ними, карбонатні зв'язки; імінові

25

30

35

зв'язки, утворені в результаті реакції аміну та альдегіду; фосфатноскладноефірні зв'язки, утворені в результаті реакції спирту з фосфатною групою; гідразонові зв'язки, які є продуктом реакції гідразиду та альдегіду; ацеталеві зв'язки, які є продуктом реакції альдегіду і спирту; ортоскладноефірні зв'язки, які є продуктом реакції форміату та спирту; пептидні зв'язки, утворені аміногрупою, в тому числі, але без обмеження, розташованою на кінці полімеру, такого як PEG, і карбоксильною групою пептиду; та олігонуклеотидні зв'язки, утворені фосфорамідитною групою, в тому числі, але без обмеження, розташованою на кінці полімеру, та 5'-гідроксильною групою олігонуклеотиду.

За деякими варіантами здійснення цього винаходу поліпептид bG-CSF або його варіант сполучений з водорозчинним полімером. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "водорозчинний полімер" означає будь-який полімер, який є розчинним у водних розчинниках. Результатом зв'язку водорозчинних полімерів із поліпептидом bG-CSF або його варіантом можуть бути зміни, в тому числі, але без обмеження ними, підвищений або модульований період напіввиведення із сироватки, підвищений або модульований півперіод існування лікарського засобу по відношенню до немодифікованої форми, модульована імуногенність, модульовані характеристики фізичного з'єднання, такі як агрегування і утворення мультимерів, зміни зв'язування з рецептором, зміни зв'язування з одним або декількома партнерами зв'язування і зміна димеризації або мультимеризації рецептора. Водорозчинний полімер може мати або не мати своєї власної біологічної активності і може бути застосований як лінкер для зв'язування bG-CSF з іншими речовинами, у тому числі, але без обмеження ними, з одним або декількома поліпептидами bG-CSF або їх варіантами, чи з однією або декількома біологічно активними молекулами. До прийнятних полімерів належать, але без обмеження ними, поліетиленгліколь, поліетиленглікольпропіональдегід, його моно-C1-C10-алкокси- або арилокси-похідні (описані в патенті США № 5,252,714), монометоксиполіетиленгліколь, полівінілпіролідон, полівініловий спирт, поліамінокіслоти, співполімер дивінілового простого ефіру з малеїновим ангідридом, N-(2-гідроксипропіл)метакриламід, декстран, похідні декстрану, включаючи сульфат декстрану, поліпропіленгліколь, співполімер поліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксіетильований поліол, гепарин, фрагменти гепарину, полісахариди, олігосахариди, глікани, целюлоза і похідні целюлози, у тому числі, але без обмеження ними, метилцелюлоза і карбоксиметилцелюлоза, крохмаль і похідні крохмалю, поліпептиди, поліалкіленгліколь та його похідні, співполімери поліалкіленгліколей та їх похідні, полівінілетилові прості ефіри, альфа-бета-полі-[(2-гідроксіетил)-DL-аспартамід тощо, або їх суміші. До прикладів таких водорозчинних полімерів належать, але без обмеження ними, поліетиленгліколь і сироватковий альбумін. У WO 03/074087 та WO 03/074088 описане кон'югування білків або невеликих молекул з гідроксіалкілкрохмалем (HAS). До прикладів гідроксіалкілкрохмалів належать, але без обмеження ними, гідроксіетилкрохмаль. Кон'югати гідроксіалкілкрохмалю та іншої молекули, наприклад, можуть включати ковалентний зв'язок між кінцевими альдегідними групами HAS і реакційними групами іншої молекули.

За деякими варіантами здійснення цього винаходу водорозчинним полімером є полі(етиленгліколева) складова. За деякими варіантами здійснення цього винаходу полі(етиленгліколева) складова має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 100 кДа. За іншим варіантом здійснення цього винаходу водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 50 кДа. За деякими варіантами здійснення цього винаходу водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 10 кДа до приблизно 30 кДа. За іншим варіантом здійснення цього винаходу водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 15 кДа до приблизно 25 кДа. За ще одним варіантом здійснення цього винаходу водорозчинний полімер має молекулярну масу приблизно 20 кДа. Фахівцю у цій галузі буде зрозуміло, що термін "водорозчинний полімер з молекулярною масою приблизно 20 кДа" передбачає мінливість молекулярної маси, яка становить приблизно 15% (тобто від приблизно 17 кДа до приблизно 23 кДа), виходячи із детального опису та полідисперсності згаданого полімеру.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-S8pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR  
HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLHGGFLYQGLLQALAGISP ELAPTLDT  
LQLDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL  
HRFLELAYRGLRYLAEP,**

в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні S8 і сполучена з полі(етиленгліколевою) складовою. Наприклад, якщо полі(етиленгліколева)

складова має молекулярну масу приблизно 20 кДа, поліпептид bG-CSF або його варіант за цим варіантом здійснення може бути визначений як "bG-CSF-S8pAF-20K PEG", що вказує на те, що полі(етиленгліколева) складова, молекулярна маса якої становить 20 кДа, сполучена із заміною pAF, яка була виконана у положенні S8.

- 5 За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-S62pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR**  
**HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLHGGFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT**  
**LQLDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL**  
**HRFLELAYRGLRYLAEP,**

- 10 в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні S62 і сполучена з полі(етиленгліколевою) складовою. Наприклад, якщо полі(етиленгліколева) складова має молекулярну масу приблизно 20 кДа, поліпептид bG-CSF або його варіант за цим варіантом здійснення може бути визначений як "bG-CSF-S62pAF-20K PEG", що вказує на те, що полі(етиленгліколева) складова, молекулярна маса якої становить 20 кДа, сполучена із заміною pAF, яка була виконана у положенні S62.

- 15 За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-L69pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR**  
**HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLHGGFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT**  
**LQLDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL**  
**HRFLELAYRGLRYLAEP,**

- 20 в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні L69 і сполучена з полі(етиленгліколевою) складовою. Наприклад, якщо полі(етиленгліколева) складова має молекулярну масу приблизно 20 кДа, поліпептид bG-CSF або його варіант за цим варіантом здійснення може бути визначений як "bG-CSF-L69pAF-20K PEG", що вказує на те, що полі(етиленгліколева) складова, молекулярна маса якої становить 20 кДа, сполучена із заміною pAF, яка була виконана у положенні L69.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-G125pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR**  
**HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLHGGFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT**  
**LQLDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL**  
**HRFLELAYRGLRYLAEP,**

- 25 в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні G125 і сполучена з полі(етиленгліколевою) складовою. Наприклад, якщо полі(етиленгліколева) складова має молекулярну масу приблизно 20 кДа, поліпептид bG-CSF або його варіант за цим варіантом здійснення може бути визначений як "bG-CSF-G125pAF-20K PEG", що вказує на те, що полі(етиленгліколева) складова, молекулярна маса якої становить 20 кДа, сполучена із заміною pAF, яка була виконана у положенні G125.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-T133pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELMLLR**  
**HSLGIPQAPLSSCSSQSLQLTSCNLHGGFLYQGLLQALAGISPELAPTLDT**  
**LQLDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQL**  
**HRFLELAYRGLRYLAEP,**

- 35 в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні T133 і сполучена з полі(етиленгліколевою) складовою. Наприклад, якщо полі(етиленгліколева) складова має молекулярну масу приблизно 20 кДа, поліпептид bG-CSF або його варіант за цим варіантом здійснення може бути визначений як "bG-CSF-T133pAF-20K PEG", що вказує на те, що полі(етиленгліколева) складова, молекулярна маса якої становить 20 кДа, сполучена із заміною pAF, яка була виконана у положенні T133.

40

За одним із варіантів здійснення цього винаходу поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-A136pAF, який має послідовність:

**MTPLGPARS L P Q S F L L K C L E Q V R K I Q A D G A E L Q E R L C A A H K L C H P E E L M L L R**  
**H S L G I P Q A P L S S C S S Q S L Q L T S C L N Q L H G G L F L Y Q G L L Q A L A G I S P E L A P T L D T**  
**L Q L D V T D F A T N I W L Q M E D L G A A P A V Q P T Q G A M P T F T S A F Q R R A G G V L V A S Q L**  
**H R F L E L A Y R G L R Y L A E P,**

5 в якій одиночна заміна на пара-ацетилфенілаланін (pAF) виконана у положенні A136 і сполучена з полі(етиленгліколевою) складовою. Наприклад, якщо полі(етиленгліколева) складова має молекулярну масу приблизно 20 кДа, поліпептид bG-CSF або його варіант за цим варіантом здійснення може бути визначений як "bG-CSF-A136pAF-20K PEG", що вказує на те, що полі(етиленгліколева) складова, молекулярна маса якої становить 20 кДа, сполучена із заміною pAF, яка була виконана у положенні A136.

10 У значенні, вжитому у цьому описі, терміни "стабільність" і "стабільний", вжитий вжиті разом із терміном "композиція, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант", означають термічне і хімічне розгортання, агрегування, деградування, денатурування, фрагментування або дестабілізування поліпептиду bG-CSF або його варіанта за певних умов виробництва, виготовлення, транспортування і зберігання. "Стабільні" композиції за цим винаходом  
 15 зберігають структурну цілісність, результатом чого є збереження біологічної активності, бажано більше ніж 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% або 99,5% за певних умов виробництва, виготовлення, транспортування і зберігання. Стабільність композицій можна оцінювати за ступенем агрегування, депегілування, деградування, денатурування або фрагментування способами, відомими фахівцям в цій галузі і описаними нижче.

20 У значенні, вжитому у цьому описі, термін "водний", вжитий разом із терміном "композиція, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант", означає воду, один або декілька водорозчинних органічних розчинників або їх суміш. Термін "органічний розчинник" вживають в цьому описі у його традиційному значенні для позначення рідкої органічної сполуки, як правило, мономерної органічної речовини у вигляді рідини, за варіантом, якому віддається перевага, відносно невязкої рідини, молекулярна структура якої містить атоми водню, атоми вуглецю і факультативно також інші атоми, і яка здатна розчиняти тверді речовини, гази або рідини.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть містити фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтично прийнятні носії частково визначаються складом конкретної композиції, яка вводиться, а також конкретним способом, який застосовують для введення згаданої  
 30 композиції (дивись, наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed. 1985)). До відповідних фармацевтично прийнятних носіїв належать, але без обмеження ними, буферні речовини і допоміжні речовини, наприклад, такі, що містять фізіологічний розчин, забуферений фізіологічний розчин, декстрозу, воду, гліцерин, етанол та/або їх комбінації. Прийнятними носіями можуть бути буферні речовини, які містять сукцинат, фосфат, борат, ГЕПЕС, цитрат, гістидин, імідазол, ацетат, бікарбонат та інші органічні кислоти. Прийнятними носіями можуть  
 35 бути допоміжні речовини, які містять багатоатомні цукрові спирти, амінокислоти, такі як аргінін, лізин, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аланін, орнітин, лейцин, фенілаланін, глутамінова кислота, треонін тощо, органічні цукри або цукрові спирти, такі як лактоза, трегалоза, стахіоза, маніт, сорбіт, ксиліт, рибіт, міоїнозит, галактитол, гліцерин тощо, в тому числі циклітоли, такі як інозит; поліетиленгліколь; амінокислотні полімери; сірковмісні відновники, такі як сечовина, глутатіон, тіоктова кислота, тіогліколят натрію, тіогліцерин,  $\alpha$ -монотіогліцерин і тіосульфат натрію, низькомолекулярні поліпептиди (тобто <10 залишків); білки, такі як людський сироватковий альбумін, бичачий сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; моносахариди, такі як ксилоза, маноза,  
 40 фруктоза і глюкоза, дисахариди, такі як лактоза, мальтоза та сахароза; трисахариди, такі як рафіноза, і полісахариди, такі як декстран.

Відповідно до цього винаходу як буферні речовини можуть бути використані цитрат, гістидин, малеат, сукцинат, фосфат або їх комбінації. За деякими варіантами здійснення цього винаходу цитрат або сукцинат використовується як буферна речовина в стабільних водних  
 50 композиціях. За деякими варіантами здійснення цього винаходу буферна речовина має молярність від приблизно 10 мМ до приблизно 50 мМ. За одним із варіантів здійснення цього винаходу згадана буферна речовина має молярність приблизно 30 мМ. Буферні речовини можуть бути присутні у вигляді відповідної вільної кислоти або у вигляді солей лужних, лужноземельних металів або амонію. Композиція, крім того, може містити інші поширені  
 55 фармацевтичні допоміжні речовини. Послідовність додавання різних допоміжних речовин або



активної речовини під час виробництва рідких фармацевтичних композицій майже не залежить від стабілізуючої дії при зберіганні за цим винаходом і залишається на розсуд фахівця в цій галузі.

За цим винаходом як допоміжні речовини можуть бути використані хлорид натрію, трегалоза, сорбіт, аргінін або їх комбінація. За одним із варіантів здійснення цього винаходу допоміжною речовиною є аргінін. За деякими варіантами здійснення цього винаходу аргінін має молярність від приблизно 100 мМ до приблизно 500 мМ. За іншими варіантами здійснення цього винаходу аргінін має молярність від приблизно 200 мМ до приблизно 300 мМ. За деякими варіантами здійснення цього винаходу аргінін має молярність приблизно 250 мМ.

Традиційно фармацевтичні композиції білків містять поверхнево-активні речовини. Додання поверхнево-активних речовин може захистити білки на потенційно дестабілізуючих поверхнях розділу, від поверхонь, що виникають в ході обробки, а також від зміни їхньої термодинамічної конформаційної стабільності. Поверхнево-активні речовини добре відомі у цій галузі, наприклад, поверхнево-активні речовини типу полісорбатів. Одним із прикладів поверхнево-активної речовини типу полісорбату є поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурат, також відомий під торговою маркою Tween 20®. Однак дослідження композиції bG-CSF, яка містить незначну кількість поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату, показують, що вміст агрегатів збільшується до 3,2% (за даними гель-хроматографії за розміром молекул (SEC)) після 5 діб інкубування при температурі 25°C. Таким чином, композиції за цим винаходом по суті не містять поверхнево-активної речовини, поверхнево-активної речовини типу полісорбату та/або поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "по суті не містить поверхнево-активної речовини, поверхнево-активної речовини типу полісорбату та/або поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату" стосується композиції, яка містить менше ніж 0,033%, менше ніж 0,001%, менше ніж 0,0005%, менше ніж 0,0003% або менше ніж 0,0001% поверхнево-активної речовини, поверхнево-активної речовини типу полісорбату та/або поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату. Композиції за цим винаходом по суті не містять поверхнево-активної речовини, поверхнево-активної речовини типу полісорбату та/або поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату з метою одержання стабільної композиції з бажаними властивостями, такими як мінімальне агрегування продукту і мінімальне дестабілізування, і, у відповідних випадках, знижений рівень депегілування.

Термін "біологічно активна молекула" у значенні, вжитому у цьому описі, означає будь-яку речовину, яка може вплинути на будь-які фізичні або біохімічні властивості біологічної системи, шляху, молекули або взаємодії, пов'язаної(-ого) з (мікро)організмом, в тому числі, але без обмеження ними, вірусами, бактеріями, бактеріофагами, транспозонами, пріонами, комахами, грибами, рослинами, тваринами і людьми. Зокрема, у значенні, вжитому у цьому описі, біологічно активні молекули включають, але ними не обмежуються, будь-які речовини, призначені для діагностики, лікування, пом'якшення наслідків, терапії або профілактики захворювання людей або інших тварин, або, в іншому разі, підвищення фізичного або психічного благополуччя людей або тварин. Прикладами біологічно активних молекул є, але без обмеження ними, пептиди, білки, ферменти, дрібномолекулярні лікарські препарати, вакцини, імуногени, тверді лікарські форми, м'які лікарські форми, вуглеводи, неорганічні атоми або молекули, барвники, ліпіди, нуклеозиди, радіонукліди, олігонуклеотиди, токсоди, токсини, прокаріотичні і еукаріотичні клітини, віруси, полісахариди, нуклеїнові кислоти та їхні частини, одержані з вірусів, бактерій, комах, тварин або будь-яких інших клітин або типів клітин, ліпосоми, мікрочастинки і міцели.

До фармацевтичних композицій за цим винаходом належать композиції, які також факультативно містять один або декілька інших активних інгредієнтів, на додаток до поліпептиду bG-CSF або його варіанта. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "активний інгредієнт" або "терапевтичний інгредієнт" означає терапевтично активну сполуку, а також будь-які проліки цієї сполуки і фармацевтично прийнятні солі, гідрати і сольвати згаданої сполуки і згаданих проліків. Інші активні інгредієнти можна комбінувати з поліпептидом bG-CSF або його варіантом, і їх можна вводити окремо або в одній і тій самій фармацевтичній композиції. Кількість інших активних інгредієнтів для введення може бути легко визначена фахівцем у цій галузі на підставі результатів терапії із застосуванням bG-CSF.

До фармацевтичних композицій за цим винаходом належать композиції, які також факультативно містять один або декілька інших неактивних інгредієнтів, на додаток до поліпептиду bG-CSF або його варіанта. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "неактивний інгредієнт" означає терапевтично неактивну сполуку, а також будь-які проліки цієї сполуки і фармацевтично прийнятні солі, гідрати і сольвати згаданої сполуки і згаданих проліків. Інші неактивні інгредієнти можна комбінувати з поліпептидом bG-CSF або його варіантом, і їх можна

вводити окремо або в одній і тій самій фармацевтичній композиції. Кількість інших неактивних інгредієнтів для введення може бути легко визначена фахівцем у цій галузі на підставі результатів терапії із застосуванням bG-CSF.

Кількість поліпептиду bG-CSF або його варіанта в стабільних водних композиціях є достатньою для досягнення терапевтичного ефекту. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, яка забезпечує одержання бажаного корисного ефекту твариною, і охоплює як лікувальне, так і профілактичне введення. Згадана кількість буде варіювати від одного пацієнта до іншого і буде залежати від численних факторів, включаючи загальний фізичний стан пацієнта і головну причину стану, який потрібно лікувати. Кількість поліпептиду bG-CSF або його варіанта, що застосовується для терапії, забезпечує прийнятну швидкість зміни і підтримує бажану реакцію на сприятливому рівні. Терапевтично ефективна кількість композицій за цим винаходом може бути легко встановлена фахівцем у цій галузі з використанням загальнодоступних матеріалів і процедур. Наприклад, кількість поліпептиду bG-CSF або його варіанта в композиції може становити від приблизно 0,5 г/л до приблизно 12 г/л, за варіантом, якому віддається перевага, - приблизно 5 г/л.

За цим винаходом стабільні водні композиції поліпептиду bG-CSF або його варіанта можуть мати різні значення pH. За деякими варіантами здійснення цього винаходу стабільна водна композиція може мати значення pH від приблизно 5,7 до приблизно 6,6. За одним із варіантів здійснення цього винаходу стабільної водна композиція має значення pH від приблизно 6,0 до приблизно 6,3. Бажане значення pH композиції регулюють шляхом додавання основ, таких як гідроксиди лужних металів, гідроксиди лужноземельних металів або гідроксид амонію. За варіантом, якому віддається перевага, для регулювання значення pH застосовують гідроксид натрію. Регулювання бажаного значення pH може в принципі бути досягнуто шляхом додавання основних розчинів. Загалом, можуть бути застосовані солі сильних основ зі слабкими кислотами, такі як ацетат натрію, цитрат натрію, динатрійгідрофосфат або дикалійгідрофосфат. Якщо фармацевтичний розчин допоміжної речовини має основне значення pH, воно регулюється шляхом титрування кислотою до досягнення бажаного значення pH у межах 4-5 або 7-8. Як кислоти розглядаються фізіологічно стерині неорганічні або органічні кислоти, такі як соляна кислота, фосфорна кислота, оцтова кислота, лимонна кислота або звичайні розчини речовин, які мають кислий pH. У зв'язку з цим, деякими прикладами речовин є солі сильних кислот зі слабкими основами, наприклад, дигідрофосфат натрію або дигідрофосфат калію.

Як показано в наведених нижче прикладах, композиції bG-CSF за цим винаходом демонструють бажано низькі концентрації агрегатів поліпептиду bG-CSF або його варіанта при зберіганні в жорстких умовах і при зберіганні в умовах прискореного псування. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "зберігання в жорстких умовах" означає, що вплив умов зберігання оцінюють після інкубування зразків композицій при температурі 25°C протягом 5 діб. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "зберігання в умовах прискореного псування" означає, що вплив умов зберігання оцінюють після інкубування зразків композицій при температурі 40°C протягом 1 доби. Для цілей цього винаходу умови зберігання також можуть передбачати зберігання за інших різних температур і періодів часу. Наприклад, вплив умов зберігання може бути оцінений після інкубування зразків композицій при температурі 25°C протягом 28 діб або після інкубування зразків композицій при температурі 40°C протягом 3 діб.

Концентрацію агрегатів поліпептиду bG-CSF або його варіанта аналізують після зберігання у жорстких умовах і зберігання у умовах прискореного псування. За деякими варіантами здійснення цього винаходу композиції bG-CSF за цим винаходом при зберіганні в жорстких умовах мають концентрацію агрегатів поліпептиду bG-CSF або його варіанта меншу ніж приблизно 2,1% (мас.). За іншими варіантами здійснення цього винаходу композиції bG-CSF за цим винаходом при зберіганні в жорстких умовах мають концентрацію агрегатів поліпептиду bG-CSF або його варіанта меншу ніж приблизно 1,5% (мас.). За деякими варіантами здійснення цього винаходу композиції bG-CSF за цим винаходом при зберіганні в умовах прискореного псування мають концентрацію агрегатів поліпептиду bG-CSF або його варіанта меншу ніж приблизно 1,5% (мас.). За іншими варіантами здійснення цього винаходу композиції bG-CSF за цим винаходом при зберіганні в жорстких умовах мають концентрацію агрегатів поліпептиду bG-CSF або його варіанта меншу за приблизно 1,5% (мас.).

Крім того, для оцінювання властивостей стабільності композиції за цим винаходом можуть бути використані дослідження із застосуванням примусового перемішування або дослідження із застосуванням заморожування-відтавання. Наприклад, дослідження із застосуванням примусового перемішування може складатися з перемішування зразка композиції у хімічній склянці при заданій швидкості, наприклад, 60 об/хв, за допомогою магнітної мішалки. Перемішування може відбуватися протягом певного періоду часу, наприклад, протягом двох

годин, для того, щоб визначити характеристики зразка композиції. Цикл заморожування-відтавання може складатися із заморожування зразка композиції протягом 1 год при температурі близько  $-75^{\circ}\text{C}$  і відтавання при кімнатній температурі протягом приблизно 1 год до зникнення льоду.

Крім того, як показано в наведених нижче прикладах, композиції bG-CSF за цим винаходом при зберіганні в жорстких умовах та при зберіганні в умовах прискореного псування можуть демонструвати бажані властивості дестабілізування та/або депегілування поліпептиду bG-CSF або його варіанта. У значенні, вжитому у цьому описі, термін "депегілування" може означати стабільність приєднання пегілувальних складових до поліпептиду bG-CSF або його варіанта, тобто чи залишаються такі пегілувальні складові зв'язаними з поліпептидом з перебігом часу, наприклад, під час зберігання у водному розчині, чи вони мають схильність до відділення, наприклад, в результаті гідролізу складноефірних зв'язків.

За деякими варіантами здійснення цього винаходу стабільні водні композиції поліпептиду bG-CSF або його варіанта можна одержати, застосовуючи цитрат як буферну речовину і аргінін як допоміжну речовину. За одним із варіантів здійснення цього винаходу водну композицію можна одержати, використовуючи моногідрат лимонної кислоти (Fisher, C/6200/60 або еквівалент) як буферну речовину і L-аргінін (Sigma, A8094 або еквівалент) як допоміжну речовину. Водну композицію можна одержати шляхом додання  $1,6 \pm 0,1$  г моногідрату лимонної кислоти і  $10,9 \pm 0,1$  г L-аргініну до 200 мл високоякісної води. Потім значення pH можна відрегулювати на рівні  $6,0 \pm 0,1$  за допомогою соляної кислоти, і цю суміш можна розбавити до 250 мл, використовуючи високоякісну воду. Одержана композиція може містити 30 мМ цитрату, 250 мМ аргініну і поліпептид bG-CSF або його варіант при pH 6,0.

Водні композиції за цим винаходом можуть бути використані для виробництва ліофілізатів, одержуваних із застосуванням традиційних способів ліофілізації, або порошків. Композиції за цим винаходом відновлюють шляхом розчинення ліофілізатів у воді або інших водних розчинах. Термін "ліофілізація", також відомий як сушіння сублімацією, означає традиційно застосовувану методику одержання білків, яка призначена для видалення води з білкового препарату, який становить інтерес. Ліофілізація являє собою процес, за яким матеріал, призначений для сушіння, спочатку заморожують, а потім лід або заморожений розчинник видаляють сублімацією у вакуумному середовищі. До складу композиції перед ліофілізацією може бути введена допоміжна речовина для підвищення стабільності під час ліофілізації та/або для підвищення стабільності ліофілізованого продукту при зберіганні. Дивись, наприклад, Pikal M. *Biorpharm.* 3(9)26-30 (1990) та Arakawa et al. *Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991).

Фахівцям у цій галузі також відоме розпилювальне сушіння фармацевтичних інгредієнтів. Дивись, наприклад, Broadhead J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals", in *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992). Розпилювальному сушінню, окрім дрібномолекулярних фармацевтичних препаратів, піддавали також різноманітні біологічні матеріали, у тому числі ферменти, сироватки, плазму, мікроорганізми і дріжджі. Розпилювальне сушіння є корисним методом сушіння, оскільки за його допомогою рідкий фармацевтичний препарат може бути перетворений на тонкоподрібнений порошок без пилу або агломератів впродовж однієї стадії. Основний метод складається з таких чотирьох етапів: а) розпилювання розчину, що подається, до стану аерозолу; б) контактування аерозолу з повітрям; в) сушіння аерозолу і d) відділення висушеного продукту від сушильного повітря. Наприклад, в патентах США № 6,235,710 та № 6,001,800 описане виготовлення рекомбінантного еритропоєтину шляхом розпилювального сушіння.

Цей винахід охоплює також способи застосування композиції, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант. bG-CSF має різноманітні біологічні активності, в тому числі, але без обмеження ними, зв'язування зі своїм рецептором, що спричинює димеризацію його рецептора, стимулювання продукування нейтрофілів і стимулювання проліферації і диференціювання клітин. Приклади деяких зі згаданих біологічних активностей гранулоцитарного колонієстимулювального фактора і bG-CSF описані вище і в патентах США № 6,676,947; № 6,579,525; № 6,531,121; № 6,521,245; № 6,489,293; № 6,368,854; № 6,316,254; № 6,268,336; № 6,239,109; № 6,165,283; № 5,986,047; № 5,830,851; № 5,043,156 та № 5,773,569. Композиції, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант, за цим винаходом є придатними для лікування широкого спектра розладів або запобігання цим розладам. Термін "запобігання" означає зниження ймовірності того, що реципієнт буде піддаватись загрозі захворювання або розвитку будь-якого з патологічних станів, описаних у цьому описі, і включає профілактичне введення. Термін "запобігання" є особливо застосовним до пацієнта, який є сприйнятливим до конкретного патологічного стану. Термін "лікування" означає втручання у перебіг захворювання або стану, і запобігання розвитку клінічних ефектів хвороби, зміну напрямку їх розвитку, пом'якшення її

подальшого прогресування хвороби або зменшення інтенсивності симптомів, пов'язаних зі згаданим захворюванням або станом.

Результатом введення продуктів G-CSF є утворення лейкоцитів. Таким чином, введення композиції, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, за цим винаходом може бути корисним для запобігання інфікуванню тварин, які перебувають під загрозою зараження. Композицію, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, за цим винаходом можна вводити інфікованим тваринам. До інфекційних захворювань, які можна лікувати композицією, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, за цим винаходом, належать, але без обмеження ними, мастит і транспортна лихоманка. Композицію, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, за цим винаходом можна вводити тварині, наприклад, впродовж періоду часу від двох тижнів до однієї доби до пологів, і факультативно композиція може бути введена додатково у день пологів або впродовж періоду часу до одного тижня після пологів. За деякими варіантами здійснення цього винаходу твариною, якій вводять композицію, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, за цим винаходом, є корова, і пологи називають "отеленням". За одним із варіантів здійснення цього винаходу композицію, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, за цим винаходом можна вводити коровам у передпологовий та післяпологовий період для профілактики маститу.

За цим винаходом композиція, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, може бути введена будь-яким звичайним способом, прийнятним для білків або пептидів, у тому числі, але без обмеження ними, парентерально, наприклад, ін'єкціями, у тому числі, але без обмеження ними, підшкірно або внутрішньовенно чи ін'єкціями або інфузіями будь-якого іншого виду. Композиції, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант, можна вводити численними шляхами, у тому числі, але без обмеження ними, пероральним, внутрішньовенним, внутрішньоочеревинним, внутрішньом'язовим, трансдермальним, підшкірним, місцевим, сублінгвальним, внутрішньосудинним, інтрамамарним або ректальним шляхом. Композиції, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант, також можна вводити за допомогою ліпосом. Такі шляхи введення та відповідні композиції, як правило, відомі фахівцям в цій галузі. Композиціям, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант, окремо або в комбінації з іншими прийнятними компонентами, може бути надана форма аерозольних композицій (тобто вони можуть бути "розпилені") для введення шляхом інгаляції. Аерозольні композиції можуть бути вміщені в прийнятні пропеленти під підвищеним тиском, такі як дихлордифторметан, пропан, азот тощо.

Композиції, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант, прийнятні для парентерального введення, такого як інтраартикулярне (в суглоби), внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньошкірне, внутрішньоочеревинне і підшкірне, включають водні і неводні ізотонічні стерильні розчини для ін'єкцій, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатики і розчинені речовини, які роблять цю композицію ізотонічною з кров'ю передбачуваного реципієнта, і водні та неводні стерильні суспензії, які можуть містити суспендувальні засоби, солюбілізатори, загусники, стабілізатори і консерванти. Композиції, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант, можуть бути вміщені в однодозові або багатодозові герметичні контейнери, такі як ампули і флакони. Композиції, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант, можуть також бути вміщені у шприци, такі як заздалегідь заповнені шприци.

Парентеральне введення та внутрішньовенне введення є можливими способами введення композицій за цим винаходом. Зокрема, для введення композицій, які містять поліпептид bG-CSF або його варіант за цим винаходом, також прийнятні шляхи введення, які вже застосовують для лікарських засобів - гомологів природних амінокислот, які входять до складу застосовуваних на цей час композицій (в тому числі, але без обмеження ними, шляхи введення, які зазвичай використовуються для еритропоєтину (EPO), соматотропного гормону (GH), гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулювального фактора (GM-CSF), інтерферонів, інтерлейкінів, антитіл, факторів росту фібробластів (FGF) та/або будь-якого іншого білка, придатного для доставляння фармацевтичними засобами).

За деякими варіантами здійснення цього винаходу композиції за цим винаходом містять поліпептид bG-CSF або його варіант у кількості від приблизно 0,5 г/л до приблизно 12 г/л. Доза, яку вводять тварині, в контексті цього винаходу є достатньою для спричинення у тварини сприятливої терапевтичної реакції з перебігом часу або іншої відповідної активності, в залежності від застосування. Доза визначається ефективністю конкретного вектора або композиції та активністю, стабільністю або часом напіввиведення із сироватки застосованого штучного амінокислотного поліпептиду та станом тварини, а також масою тіла або площею поверхні тварини, яку піддають лікуванню. Величина дози визначається також наявністю,

природою і ступенем будь-яких несприятливих побічних ефектів, які супроводжують введення конкретного вектора, композиції тощо конкретній тварині.

Доза, введена тварині в контексті цього винаходу, має бути достатньою, щоб спричинити сприятливу реакцію у суб'єкта з плином часу. Як правило, загальна фармацевтично ефективна кількість поліпептиду bG-CSF або його варіанта за цим винаходом на добову дозу, введenu парентеральним шляхом, становить від приблизно 0,01 мкг/кг маси тіла тварини до приблизно 100 мкг/кг маси тіла тварини або від приблизно 0,05 мкг/кг маси тіла тварини до приблизно 1 мг/кг маси тіла тварини, хоча цей показник може бути вибраний на розсуд лікаря. Альтернативно згадана фармацевтично ефективна кількість поліпептиду bG-CSF або його варіанта за цим винаходом на дозу, введenu парентеральним шляхом, становить від приблизно 1 мг до приблизно 25 мг або від приблизно 5 мг до приблизно 20 мг. Наприклад, фармацевтично ефективна кількість поліпептиду bG-CSF або його варіанта за цим винаходом на дозу, введenu парентеральним шляхом, може становити приблизно 14 мг. Частота введення дози також може бути вибрана на розсуд лікаря.

Фармацевтично ефективну кількість поліпептиду bG-CSF або його варіанта можна вводити тваринам у вигляді єдиної дози або як частина багатодозової схеми застосування лікарського препарату. Наприклад, поліпептид bG-CSF або його варіант можна вводити за багатодозовою схемою застосування лікарського препарату, при цьому згадана схема складається із щонайменше двох схем приймання лікарського засобу. За одним із варіантів здійснення цього винаходу багатодозова схема застосування лікарського препарату являє собою схему приймання двох доз.

За одним із варіантів здійснення цього винаходу багатодозова схема застосування лікарського препарату включає першу дозу, яку тварині вводять у строк від приблизно 1 доби до приблизно 14 діб до пологів, а другу дозу тварині вводять у строк від приблизно 4 діб до пологів до приблизно 7 діб після пологів. За іншим варіантом здійснення цього винаходу багатодозова схема застосування лікарського препарату включає першу дозу, яку тварині вводять за приблизно 7 діб до пологів, а другу дозу тварині вводять у день пологів.

Розглядаються також наведені нижче варіанти здійснення:

1. Стабільна водна композиція, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, буферну речовину і допоміжну речовину, при цьому згадана композиція по суті не містить поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату.

2. Композиція за варіантом здійснення 1, причому поліпептид bG-CSF або його варіант сполучений із лінкером, полімером або біологічно активною молекулою.

3. Композиція за варіантом здійснення 1 або варіантом здійснення 2, причому поліпептид bG-CSF або його варіант сполучений з водорозчинним полімером.

4. Композиція за варіантом здійснення 3, причому водорозчинний полімер містить полі(етиленгліколеву) складову.

5. Композиція за варіантом здійснення 3 або за варіантом здійснення 4, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 100 кДа.

6. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 3-5, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 50 кДа.

7. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 3-6, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу приблизно 20 кДа.

8. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-7, причому поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-T133pAF-20K PEG.

9. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-8, причому поліпептид bG-CSF або його варіант є присутнім у кількості від приблизно 0,5 г/л до приблизно 12 г/л.

10. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-9, причому поліпептид bG-CSF або його варіант є присутнім у кількості приблизно 5 г/л.

11. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-11, причому буферною речовиною є цитрат, гістидин, малеат, сукцинат, фосфат або їх комбінація.

12. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-11, причому буферною речовиною є цитрат або сукцинат.

13. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-12, причому буферною речовиною є цитрат.

14. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-12, причому буферною речовиною є сукцинат.

15. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-14, причому буферна речовина має молярність від приблизно 10 mM до приблизно 50 mM.

16. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-15, причому буферна речовина має молярність приблизно 30 мМ.

17. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-16, причому допоміжною речовиною є хлорид натрію, трегалоза, сорбіт, аргінін або їх комбінація.

5 18. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-17, причому допоміжною речовиною є аргінін.

19. Композиція за варіантом здійснення 18, причому аргінін має молярність від приблизно 100 мМ до приблизно 500 мМ.

10 20. Композиція за варіантом здійснення 18 або варіантом здійснення 19, причому аргінін має молярність від приблизно 200 мМ до приблизно 300 мМ.

21. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 18-20, причому аргінін має молярність приблизно 250 мМ.

22. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-21, причому згадана композиція має рН від приблизно 5,7 до приблизно 6,6.

15 23. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-22, причому згадана композиція має рН від приблизно 6,0 до приблизно 6,3.

24. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-23, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів поліпептиду bG-CSF або його варіанта меншу ніж приблизно 2,1% (мас.) після п'ятидобового інкубаційного періоду при зберіганні в жорстких умовах.

20 25. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-24, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів поліпептиду bG-CSF або його варіанта меншу ніж приблизно 1,5% (мас.) після однодобового інкубаційного періоду при зберіганні в умовах прискореного псування.

26. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 1-25, яка факультативно містить один або декілька інших терапевтичних інгредієнтів.

27. Ліофілізат або порошок композиції за будь-яким із варіантів здійснення 1-26.

28. Водний розчин, одержаний шляхом розчинення ліофілізату або порошку за варіантом здійснення 27 у воді.

30 29. Спосіб одержання композиції за будь-яким із варіантів здійснення 1-26, який включає приготування стабільного водного розчину, який містить поліпептид bG-CSF або його варіант, буферну речовину та допоміжну речовину, причому згадана композиція по суті не містить поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату.

30. Спосіб лікування тварини, яка має розлад, модульований bG-CSF, який включає введення згаданих тварині терапевтично ефективної кількості композиції за будь-яким із варіантів здійснення 1-26.

35 31. Спосіб за варіантом здійснення 30, причому згаданим розладом є інфекційне захворювання.

32. Спосіб за варіантом здійснення 31, причому згаданим інфекційним захворюванням є мастит, і згаданою твариною є корова у перед- та післяпологовий період.

40 33. Стабільна водна композиція, яка містить поліпептид bG-CSF або його варіант, цитратний або сукцинатний буфер, аргінін, і факультативно -протиіон для аргініну.

34. Композиція за варіантом здійснення 33, причому згадана композиція по суті не містить поверхнево-активної речовини типу полісорбату.

45 35. Композиція за варіантом здійснення 33 або за варіантом здійснення 34, причому поліпептид bG-CSF або його варіант сполучений з лінкером, полімером або біологічно активною молекулою.

36. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 33-35, причому поліпептид bG-CSF або його варіант сполучений з водорозчинним полімером.

50 37. Композиція за варіантом здійснення 36, причому водорозчинний полімер містить полі(етиленгліколеву) складову.

38. Композиція за варіантом здійснення 36 або за варіантом здійснення 37, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 100 кДа.

39. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 36-38, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 50 кДа.

55 40. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 36-39, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу приблизно 20 кДа.

41. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 34-40, причому згаданою поверхнево-активною речовиною типу полісорбату є поліоксіетиленова похідна монолаурату натрію.

60 42. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 34-41, причому згаданою поверхнево-активною речовиною типу полісорбату є поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурат.

43. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 33-42, причому поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-T133pAF-20K PEG.

44. Композиція за варіантом здійснення 43, причому bG-CSF-T133pAF-20K PEG є присутнім у кількості від приблизно 0,5 г/л до приблизно 12 г/л, цитратний буфер має молярність приблизно 30 мМ, аргінін має молярність приблизно 250 мМ, і значення рН композиції становить приблизно 6,0.

45. Композиція за варіантом здійснення 43 або за варіантом здійснення 44, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів bG-CSF-T133pAF-20K PEG меншу ніж приблизно 1,6% (мас.) після 28-добового інкубаційного періоду при температурі 25°C.

46. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 43-45, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів bG-CSF-T133pAF-20K PEG меншу ніж приблизно 2,8% (мас.) після 3-добового інкубаційного періоду при температурі 40°C.

47. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 43-46, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів bG-CSF-T133pAF-20K PEG приблизно 1,6% (мас.) або менше після дослідження із застосуванням примусового перемішування.

48. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 43-47, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів bG-CSF-T133pAF-20K PEG меншу ніж приблизно 1,6% (мас.) після п'яти циклів заморожування-відтавання.

49. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 33-48, причому протиіоном для аргініну є хлорид або сульфат.

50. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 33-49, яка факультативно містить один або декілька інших терапевтичних інгредієнтів.

51. Ліофілізат або порошок композиції за будь-яким із варіантів здійснення 33-50.

52. Водний розчин, одержаний шляхом розчинення ліофілізату або порошку за варіантом здійснення 51 у воді.

53. Спосіб приготування композиції за будь-яким із варіантів здійснення 33-50, який включає одержання стабільного водного розчину, який містить поліпептид bG-CSF або його варіант, цитратний буфер, аргінін і факультативно - протиіон для аргініну.

54. Спосіб за варіантом здійснення 53, причому згадана композиція по суті не містить поверхнево-активної речовини типу полісорбату.

55. Спосіб за варіантом здійснення 53 або за варіантом здійснення 54, причому поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-T133pAF-20K PEG.

56. Спосіб лікування тварини, яка має розлад, модульований bG-CSF, який включає введення згаданих тварині терапевтично ефективної кількості композиції за будь-яким із варіантів здійснення 33-50.

57. Спосіб за варіантом здійснення 56, причому згаданим розладом є інфекційне захворювання.

58. Спосіб за варіантом здійснення 57, причому згаданим інфекційним захворюванням є мастит, і згаданою твариною є корова у перед- та післяпологовий період.

59. Стабільна водна композиція, яка містить по суті поліпептид bG-CSF або його варіант, цитратний або сукцинатний буфер, аргінін, і факультативно - протиіон для аргініну.

60. Композиція за варіантом здійснення 59, причому згадана композиція по суті не містить поверхнево-активної речовини.

61. Композиція за варіантом здійснення 59 або за варіантом здійснення 60, причому поліпептид bG-CSF або його варіант сполучений з лінкером, полімером або біологічно активною молекулою.

62. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 59-61, причому поліпептид bG-CSF або його варіант сполучений з водорозчинним полімером.

63. Композиція за варіантом здійснення 62, причому водорозчинний полімер містить полі(етиленгліколеву) складову.

64. Композиція за варіантом здійснення 62 або за варіантом здійснення 63, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 100 кДа.

65. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 62-64, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу від приблизно 0,1 кДа до приблизно 50 кДа.

66. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 62-65, причому водорозчинний полімер має молекулярну масу приблизно 20 кДа.

67. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 60-66, причому згаданою поверхнево-активною речовиною є поверхнево-активна речовина типу полісорбату.

68. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 60-67, причому згаданою поверхнево-активною речовиною є поліоксєтиленова похідна монолаурату натрію.

69. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 60-68, причому згаданою поверхнево-активною речовиною є поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурат.

70. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 59-69, причому поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-T133pAF-20K PEG.

5 71. Композиція за варіантом здійснення 70, причому bG-CSF-T133pAF-20K PEG є присутнім у кількості від приблизно 0,5 г/л до приблизно 12 г/л; цитратний буфер має молярність приблизно 30 мМ, аргінін має молярність приблизно 250 мМ, і значення рН композиції становить приблизно 6,0.

10 72. Композиція за варіантом здійснення 70 або за варіантом здійснення 71, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів bG-CSF-T133pAF-20K PEG меншу ніж приблизно 1,6% (мас.) після 28-добового інкубаційного періоду при температурі 25°C.

73. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 70-72, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів bG-CSF-T133pAF-20K PEG меншу ніж приблизно 2,8% (мас.) після 3-добового інкубаційного періоду при температурі 40°C.

15 74. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 70-73, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів bG-CSF-T133pAF-20K PEG приблизно 1,6% (мас.) або менше після дослідження із застосуванням примусового перемішування.

20 75. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 70-74, причому згадана композиція має середню концентрацію агрегатів bG-CSF-T133pAF-20K PEG меншу ніж приблизно 1,6% (мас.) після п'яти циклів заморожування-відтавання.

76. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 59-75, причому протиіоном для аргініну є хлорид або сульфат.

77. Композиція за будь-яким із варіантів здійснення 59-76, яка факультативно містить один або декілька інших терапевтичних інгредієнтів.

25 78. Ліофілізат або порошок композиції за будь-яким із варіантів здійснення 59-77.

79. Водний розчин, одержаний шляхом розчинення ліофілізату або порошку за варіантом здійснення 78 у воді.

30 80. Спосіб одержання композиції за будь-яким із варіантів здійснення 59-77, який включає одержання стабільного водного розчину, який містить по суті поліпептид bG-CSF або його варіант, цитратний буфер, аргінін і факультативно - протиіон для аргініну.

81. Спосіб за варіантом здійснення 80, причому згадана композиція по суті не містить поверхнево-активної речовини.

82. Спосіб за варіантом здійснення 80 або за варіантом здійснення 81, причому поліпептидом bG-CSF або його варіантом є bG-CSF-T133pAF-20K PEG.

35 83. Спосіб лікування тварини, яка має розлад, модульований bG-CSF, який включає введення згаданий тварині терапевтично ефективної кількості композиції за будь-яким із варіантів здійснення 59-77.

84. Спосіб за варіантом здійснення 83, причому згаданим розладом є інфекційне захворювання.

40 85. Спосіб за варіантом здійснення 84, причому згаданим інфекційним захворюванням є мастит, і згаданою твариною є корова у перед- та післяпологовий період.

86. Стабільна водна композиція, яка містить по суті bG-CSF-T133pAF-20K PEG, цитратний буфер, причому згаданий цитратний буфер має молярність приблизно 30 мМ, аргінін, причому згаданий аргінін має молярність приблизно 250 мМ, і факультативно - протиіон для аргініну.

45 Приклад 1

Дослідження із застосуванням відбирання буферів та допоміжних речовин

Композиції bGCSF-T133-20K PEG без поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату на вихідному рівні можуть бути піддані скринінгу для оцінювання стабільності продукту з використанням декількох буферів і допоміжних речовин (хлорид натрію, трегалоза і аргінін). Цільове значення рН для всіх діалізних буферів становить рН 6,0. Для порівняння може бути підготовлена композиція, яка містить 10 мМ фосфату, 180 мМ маніту і 60 мМ трегалози при рН 6,0. Композиції можна оцінювати за впливом на агрегування білків і депегілування у присутності та за відсутності кисню.

Зразки можуть бути одержані шляхом діалізу 1 мл кожної композиції bGCSF-T133-20K PEG при температурі 2-8°C. Концентрація білка в діалізованих зразках може бути визначена перед нормалізацією концентрації білка до 5 мг/мл. Після діалізу і нормалізації концентрації, приблизно 3x1 мл постдіалізного і розбавленого пулу може бути перенесена у скляні флакони місткістю 5 мл. Одна партія зразків може бути перевірена для визначення вихідних умов. Друга партія може зберігатись при температурі 25°C та відносній вологості 60% протягом 5 діб до початку перевірки. Третя партія зразків може бути знегажена в ліофілізаційній камері, вміщена у



- камеру з атмосферою інертного газу (азоту), а потім зберігатись при температурі 25°C та відносній вологості 60% протягом 5 діб до початку перевірки. Якщо рівень агрегату за результатами визначення засобами гель-хроматографування за розміром молекул (SEC) через 5 діб становить  $\leq 2,0\%$ , як знегажені, так і незнегажені зразки можуть бути інкубовані при температурі 40°C протягом однієї доби.

Після п'яти діб інкубування може бути визначена концентрація білка кожного зразка. У таблиці 1 наведені концентрації білка.

Таблиця 1

Концентрації білка при проведенні дослідження із застосуванням відбирання буферів та допоміжних речовин

Зразок №	Опис зразка	Концентрація (мг/мл) через 5 діб при температурі 2-8°C	Концентрація (мг/мл) через 5 діб при температурі 25°C Незнегажений	Концентрація (мг/мл) через 5 діб при температурі 25°C Знегажений
1	10 мМ цитрату, 0,1 М аргініну	5,75	5,29	5,93
2	10 мМ цитрату, 0,15 М NaCl	6,35	6,71	5,45
3	10 мМ цитрату, 0,3 М трегалози	5,71	5,78	5,79
4	10 мМ гістидину, 0,15 М NaCl	5,39	5,19	5,42
5	10 мМ гістидину, 0,3 М трегалози	5,30	5,08	5,34
6	10 мМ гістидину, 0,1 М аргініну	5,56	5,06	5,27
7	10 мМ малеату, 0,15 М NaCl	5,50	5,40	5,73
8	10 мМ малеату, 0,3 М трегалози	4,41	4,01	4,13
9	10 мМ малеату, 0,1 М аргініну	5,69	5,41	5,39
10	10 мМ сукцинату, 0,15 М NaCl	5,94	5,88	5,83
11	10 мМ сукцинату, 0,3 М трегалози	5,57	5,79	5,66
12	10 мМ сукцинату, 0,1 М аргініну	4,96	4,92	4,78
13	10 мМ фосфату, 0,15 М NaCl	5,20	5,18	5,03
14	10 мМ фосфату, 0,3 М трегалози	5,13	5,30	5,24
15	10 мМ фосфату, 0,1 М аргініну	5,22	5,04	5,12
16	10 мМ фосфату 180 мМ маніту 60 мМ трегалози	5,28	5,22	5,21

- У Таблиці 2 наведені значення pH для кожного зразка.

Таблиця 2

Результати визначення рН при проведенні дослідження із застосуванням відбирання буферів та допоміжних речовин

Буферні системи	Значення рН діалізного буфера	Значення рН після діалізу	Значення рН через 5 діб при температурі 2-8°C	Значення рН через 5 діб при температурі 25°C	Значення рН через 5 діб при температурі 25°C Знегажений
10 мМ цитрату, 0,1 М аргініну	6,49	6,44	6,48	6,57	6,53
10 мМ цитрату, 0,15 М NaCl	6,51	6,47	6,52	6,55	6,61
10 мМ цитрату, 0,3 М трегалози	6,11	6,07	6,10	6,16	6,18
10 мМ гістидину, 0,15 М NaCl	5,86	5,85	5,91	5,91	5,95
10 мМ гістидину, 0,3 М трегалози	5,78	5,81	5,92	5,96	5,95
10 мМ гістидину, 0,1 М аргініну	6,22	6,23	6,30	6,32	6,29
10 мМ малеату, 0,15 М NaCl	6,22	6,22	6,28	6,32	6,29
10 мМ малеату, 0,3 М трегалози	6,06	6,03	6,11	6,13	6,12
10 мМ малеату, 0,1 М аргініну	6,24	6,23	6,34	6,34	6,32
10 мМ сукцинату, 0,15 М NaCl	6,14	6,13	6,19	6,26	6,31
10 мМ сукцинату, 0,3 М трегалози	6,09	6,07	6,13	6,13	6,16
10 мМ сукцинату, 0,1 М аргініну	6,14	6,14	6,30	6,34	6,34
10 мМ фосфату, 0,15 М NaCl	6,29	6,26	6,30	6,33	6,37
10 мМ фосфату, 0,3 М трегалози	5,97	5,98	6,03	6,10	6,13
10 мМ фосфату, 0,1 М аргініну	6,40	6,38	6,41	6,47	6,47
10 мМ фосфату 180 мМ маніту 60 мМ трегалози	6,09	6,04	6,14	6,11	6,12

Рівні агрегування білків і депегілування в кожній композиції можуть бути проаналізовані засобами SEC. У таблиці 3 наведені результати SEC з вказанням того, що рівні агрегування і депегілування були однаковими в усіх зразках.

5

Таблиця 3

Результати SEC при проведенні дослідження із застосуванням відбирання буферів та допоміжних речовин (після інкубування впродовж 5 діб)

Зразок	Контрольні зразки (2-8°C)			5-добове інкубування при температурі 25°C			5-добове інкубування при температурі 25°C (знегажені зразки)		
	Середній рівень агрегатів, %	Середній рівень PEG-bG-CSF, %	Середній рівень bG-CSF, %	Середній рівень агрегатів, %	Середній рівень PEG-bG-CSF, %	Середній рівень bG-CSF, %	Середній рівень агрегатів, %	Середній рівень PEG-bG-CSF, %	Середній рівень bG-CSF, %
Переддіалізна композиція bGCSF-T133-20K PEG NBJ0801-04-04	0,7	98,5	0,7	дані відсутні					
10 мМ цитрату, 0,15 М NaCl	1,2	98,3	0,5	1,6	98,0	0,5	1,6	98,0	0,4
10 мМ цитрату, 0,3 М трегалози	1,3	98,3	0,4	1,5	98,1	0,4	1,7	97,8	0,4
10 мМ цитрату, 0,1 М аргініну	1,3	98,2	0,4	1,4	98,1	0,5	1,5	98,0	0,5
10 мМ гістидину, 0,15 М NaCl	1,3	98,1	0,6	1,5	97,8	0,7	1,6	97,8	0,7
10 мМ гістидину, 0,3 М трегалози	1,3	98,2	0,5	1,7	97,8	0,5	1,9	97,6	0,5
10 мМ гістидину, 0,1 М аргініну	1,3	98,1	0,6	1,3	98,1	0,7	1,5	97,8	0,6
10 мМ малеату, 0,15 М NaCl	1,4	98,1	0,5	1,6	97,8	0,6	1,7	97,7	0,6
10 мМ малеату, 0,3 М трегалози	1,3	98,2	0,4	1,7	97,9	0,4	1,7	97,9	0,4
10 мМ малеату, 0,1 М аргініну	1,3	98,2	0,6	1,3	98,1	0,6	1,4	97,9	0,6
10 мМ сукцинату, 0,15 М NaCl	1,4	98,1	0,5	1,6	97,8	0,6	1,9	97,5	0,5
10 мМ сукцинату, 0,3 М трегалози	1,3	98,3	0,4	1,7	97,9	0,4	1,9	97,7	0,4
10 мМ сукцинату, 0,1 М аргініну	1,5	98,0	0,6	1,5	97,9	0,6	2,0	97,4	0,6
10 мМ фосфату, 0,15 М NaCl	1,1	98,2	0,7	1,3	98,0	0,7	1,4	97,9	0,7
10 мМ фосфату, 0,3 М трегалози	1,1	98,4	0,5	1,7	97,8	0,6	1,8	97,6	0,6
10 мМ фосфату, 0,1 М аргініну	1,1	98,2	0,6	1,3	98,1	0,7	1,5	97,8	0,7
10 мМ фосфату, 0,18 М маніту 0,06 М трегалози	1,2	98,3	0,5	2,0	97,5	0,5	2,1	97,4	0,5

У таблиці 4 наведені результати SEC зразків, інкубованих при температурі 40°C протягом однієї доби. Порівняння рівнів агрегатів у композиціях показує, що найнижчий рівень агрегатів мають композиції, які містять аргінін. Крім того, еталонна композиція (10 мМ фосфату, 180 мМ маніту і 60 мМ трегалози, pH 6) має найвищий рівень агрегування у зіставленні з усіма іншими композиціями в дослідженні із застосуванням відбирання.

Таблиця 4

Результати SEC при проведенні дослідження із застосуванням відбирання буферів та допоміжних речовин (після інкубування впродовж 1 доби)

Зразок	1-добове інкубування при температурі 40°C			1-добове інкубування при температурі 40°C (знегажені зразки)		
	Середній рівень агрегатів, %	Середній рівень PEG-bG-CSF, %	Середній рівень bG-CSF, %	Середній рівень агрегатів, %	Середній рівень PEG-bG-CSF, %	Середній рівень bG-CSF, %
10 мМ цитрату, 0,15 М NaCl	6,5	93,3	0,1	7,2	92,7	0,1
10 мМ цитрату, 0,3 М трегалози	4,1	95,8	0,1	4,3	95,6	0,1
10 мМ цитрату, 0,1 М аргініну	3,9	95,9	0,2	3,3	96,5	0,2
10 мМ гістидину, 0,15 М NaCl	6,0	93,8	0,2	5,9	93,9	0,2
10 мМ гістидину, 0,3 М трегалози	8,4	91,5	0,1	9,3	90,6	0,1
10 мМ гістидину, 0,1 М аргініну	3,0	96,7	0,3	2,9	96,8	0,3
10 мМ малеату, 0,15 М NaCl	5,9	93,9	0,2	6,0	93,9	0,1
10 мМ малеату, 0,3 М трегалози	7,3	92,7	0,1	7,4	92,5	0,1
10 мМ малеату, 0,1 М аргініну	3,0	96,8	0,2	3,1	96,7	0,2
10 мМ сукцинату, 0,15 М NaCl	4,3	95,5	0,2	5,3	94,6	0,1
10 мМ сукцинату, 0,3 М трегалози	9,6	90,3	0,1	10,8	89,1	0,1
10 мМ сукцинату, 0,1 М аргініну	2,1	97,6	0,3	2,6	97,2	0,2
10 мМ фосфату, 0,15 М NaCl	5,9	94,0	0,2	5,9	93,9	0,1
10 мМ фосфату, 0,3 М трегалози	16,0	84,0	0,0	18,2	81,8	0,0
10 мМ фосфату, 0,1 М аргініну	4,5	95,2	0,2	3,8	96,0	0,2
10 мМ фосфату, 0,18 М маніту, 0,06 М трегалози	22,8	77,2	0,0	25,0	75,0	0,0

Результати цього дослідження із застосуванням відбирання показують, що всі сукцинатні, гістидинові, малеатні і цитратні композиції без поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату мають підвищення рівня агрегатів, яким можна знехтувати (менше ніж 1% за результатами SEC), після п'яти діб інкубування при температурі 25°C. Крім того, відмінностей у стабільності білків між знегаженими і незнегаженими зразками не існує. Крім того, результати SEC зразків, які зазнали зберігання в жорстких умовах (температура 40°C протягом однієї доби), показують, що рівень агрегатів у композиціях, які містять 0,1 М аргініну, є меншим у порівнянні з композиціями, до складу яких як допоміжні речовини входять хлорид натрію і трегалоза.

#### Приклад 2

Вплив поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату на композиції bG-CSF. Вплив поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату на агрегування можна оцінювати для визначення впливу на майбутні композиції для досліджень із перемішуванням. Зразки можна одержати шляхом діалізу 4 мл bGCSF-T133-20K PEG при температурі 2-8°C в буфері, що містить 10 мМ фосфату і 150 мМ NaCl при pH 6,0. Після діалізу у діалізований пул додають 1% концентрованого розчину

поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату з подальшим розбавленням буфером, що містить 10 мМ фосфату і 150 мМ NaCl при pH 6,0, до кінцевої концентрації білка 5 мг/мл. Зразки кожної композиції розділяють на аліквоти (2x1 мл), і заповнюють ними скляні флакони місткістю 1 мл з одержанням двох партій зразків. Одну партію можна зберігати при температурі 2-8°C і випробувати при початкових умовах; другу партію можна зберігати при температурі 40°C протягом однієї доби.

У таблиці 5 наведені згруповані дані SEC, які вказують, що рівень агрегування зростає зі збільшенням концентрації поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату. Результати аналізу зразків засобами SEC показують, що агрегування bGCSF-T133-20K PEG збільшується зі збільшенням концентрації поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату. Як результат, поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурат може бути виключений з майбутніх випробувань композицій, які містять bGCSF-T133-20K PEG.

Таблиця 5

Результати SEC при проведенні дослідження з поліоксіетилен(20)сорбітанмонолауратом (після 1-добового інкубування)

Буфер	Початкові умови			1-добове інкубування при температурі 40°C		
	Середній рівень агрегатів, %	Середній рівень PEG-bGCSF, %	Середній рівень bG-CSF, %	Середній рівень агрегатів, %	Середній рівень PEG-bGCSF, %	Середній рівень bG-CSF, %
Переддіалізний пул NBJ0801-04-04	0,7	99,0	0,3	дані відсутні		
10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl	0,8	98,2	1,0	2,6	96,6	0,8
10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 0,0033% Tween-20	0,8	98,1	1,0	3,7	95,6	0,7
10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween-20	0,9	98,0	1,1	9,2	90,1	0,7

### Приклад 3

План експерименту на поверхні відгуку Бокса-Бенкена (DOE # 1)

Вплив різних концентрацій аргініну разом з іншими відомими важливими умовами одержання композицій може бути підданий випробуванню для визначення головних впливів, а також їх взаємодії. Планом експерименту може бути поверхня відгуку Бокса-Бенкена, де кожен числовий коефіцієнт змінюють на низькому, центральному і високому рівнях. Крім того, тип буфера може бути категорійним коефіцієнтом. Комбінація параметрів може бути продубльована для цитрату і сукцинату, кожна з трьох центральними точками. Значення pH може бути встановлене на рівні 6,0 для всіх умов. Контрольна умова, а саме 10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl і 0,0033% поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату при pH 6, може бути включена для порівняння з відомими результатами.

Всі діалізні буфери можна одержати при pH 6,0±0,1. PEG-bGCSF може бути діалізований у буферах 18 складів, що відповідають всім буферним умовам дослідження DOE # 1. Регенерування білка на стадії діалізу може, взагалі, дорівнювати >78% і, таким чином, є незмінним серед партії діалізних зразків. Після діалізу концентрація білка діалізованого пулу може бути доведена діалізним буфером до цільового значення, наведеного у плані експерименту на поверхні відгуку Бокса-Бенкена. Завдяки цьому можна одержати 24 комбінації композицій, плюс три центральні точки з цитратом і три центральні точки з сукцинатом. Кожну композицію можна розділити на аліквоти (3x1 мл), і заповнити ними скляні флакони місткістю 1 мл з одержанням трьох партій зразків, з яких одна партія може бути випробувана при вихідних умовах з подальшим зберіганням при температурі 2-8°C, друга партія може зберігатись при температурі 25°C протягом двох тижнів, а третя партія може зберігатись при температурі 40°C протягом однієї доби.

Зміни в концентрації продукту можуть аналізуватись для оцінювання стабільності продукту. У таблиці 6 показана концентрація продукту зразків до і після інкубування. Зразки, які містять 10

мМ цитрату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл), і зразки, які містять 10 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл), мають найвище збільшення (0,5-0,6 мг/мл), тоді як різниця для всіх інших зразків є меншою.

Таблиця 6

Підсумкові дані з концентрації білка, одержані при проведенні дослідження DOE #1 (початкова і через 1 добу при температурі 40°C)

Зразок	Концентрація білка (мг/мл)		
	Початков а	Через 1 добу при температурі 40°C	Різниц я
10 мМ цитрату, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	4,89	5,16	0,27
10 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,99	2,05	0,06
10 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	7,60	8,19	0,59
10 мМ цитрату, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	4,97	4,89	-0,08
30 мМ цитрату, 100 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,99	2,01	0,02
30 мМ цитрату, 100 мМ аргініну (8 мг/мл)	8,23	8,14	-0,09
30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флаконт А	5,03	4,86	-0,17
30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флаконт В	5,07	4,93	-0,14
30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флаконт С	5,08	5,01	-0,07
30 мМ цитрату, 500 мМ аргініну (2 мг/мл)	2,00	2,01	0,01
30 мМ цитрату, 500 мМ аргініну (8 мг/мл)	8,05	7,95	-0,10
50 мМ цитрату, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	5,07	5,01	-0,06
50 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,99	2,00	0,01
50 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	8,17	8,17	0,00
50 мМ цитрату, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	4,89	4,93	0,04
10 мМ сукцинату, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	5,25	5,06	-0,19
10 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,94	1,88	-0,06
10 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	8,21	8,72	0,51
10 мМ сукцинату, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	5,03	4,91	-0,12
30 мМ сукцинату, 100 мМ аргініну (2 мг/мл)	2,04	1,75	-0,29
30 мМ сукцинату, 100 мМ аргініну (8 мг/мл)	7,97	7,79	-0,18
30 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флаконт А	4,92	4,77	-0,15
30 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флаконт В	4,87	4,85	-0,02
30 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флаконт С	4,97	4,80	-0,17
30 мМ сукцинату, 500 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,90	1,86	-0,04
30 мМ сукцинату, 500 мМ аргініну (8 мг/мл)	7,81	7,69	-0,12
50 мМ сукцинату, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	4,80	4,94	0,14
50 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,86	1,84	-0,02
50 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	7,88	7,76	-0,12
50 мМ сукцинату, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	4,91	4,92	0,00
10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 0,0033% (маса/об'єм) Tween-20 (5 мг/мл) <sup>4</sup>	5,05	5,02	-0,02

5

Зміни значення рН можуть бути проаналізовані для оцінювання стабільності зразків у залежності від значення рН. Значення рН всіх зразків

може становити 6,0-6,3. У таблиці 7 показані значення рН та різниця у зіставленні з нульовим моментом часу. Значення рН зразка є стабільним протягом всього періоду проведення дослідження DOE #1.

10

Таблиця 7

Підсумкові дані значень рН, одержані при проведенні дослідження DOE #1 (початкове і через 1 добу при температурі 40°C)

Зразок	Значення рН		
	Початкова	Через 1 добу при температурі 40°C	Різниця
10 мМ цитрату, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	6,14	6,16	0,02
10 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	6,10	6,12	0,02
10 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	6,08	6,10	0,02
10 мМ цитрату, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	6,25	6,27	0,02
30 мМ цитрату, 100 мМ аргініну (2 мг/мл)	6,15	6,19	0,04
30 мМ цитрату, 100 мМ аргініну (8 мг/мл)	6,13	6,19	0,06
30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони А	6,19	6,21	0,02
30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони В	6,31	6,21	-0,10
30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони С	6,24	6,21	-0,03
30 мМ цитрату, 500 мМ аргініну (2 мг/мл)	6,16	6,16	0,00
30 мМ цитрату, 500 мМ аргініну (8 мг/мл)	6,12	6,15	0,03
50 мМ цитрату, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	6,28	6,22	-0,06
50 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	6,19	6,18	-0,01
50 мМ цитрату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	6,19	6,16	-0,03
50 мМ цитрату, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	6,19	6,15	-0,04
10 мМ сукцинату, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	6,11	6,16	0,05
10 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	6,05	6,08	0,03
10 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	6,04	6,05	0,01
10 мМ сукцинату, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	6,17	6,17	0,00
30 мМ сукцинату, 100 мМ аргініну (2 мг/мл)	6,25	6,23	-0,02
30 мМ сукцинату, 100 мМ аргініну (8 мг/мл)	6,25	6,23	-0,02
30 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони А	6,31	6,31	0,00
30 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони В	6,30	6,30	0,00
30 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони С	6,30	6,29	-0,01
30 мМ сукцинату, 500 мМ аргініну (2 мг/мл)	6,19	6,19	0,00
30 мМ сукцинату, 500 мМ аргініну (8 мг/мл)	6,19	6,18	-0,01
50 мМ сукцинату, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	6,18	6,17	-0,01
50 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	6,22	6,19	-0,03
50 мМ сукцинату, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	6,21	6,21	0,00
50 мМ сукцинату, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	6,22	6,21	-0,01
10 мМ фосфату, 150мМ NaCl (5 мг/мл)	6,11	6,10	-0,01

Зміни рівнів агрегатів, мономерів та депегілування (за результатами SEC) можуть бути проаналізовані для оцінювання стабільності білка. Таблиця 8, таблиця 9 і таблиця 10 показують вміст агрегатів, мономерів та рівні депегілування кожного зразка композиції, відповідно.

Таблиця 8

Вміст агрегатів за результатами SEC при проведенні дослідження DOE #1

Зразок	Вміст агрегатів у разі цитрату, %			Вміст агрегатів у разі сукцинату, %		
	Початковий	Через 1 добу при температурі 40°C	Різниця	Початковий	Через 1 добу при температурі 40°C	Різниця
Переддіалізний пул NBJ0801-04-04 для буфера	1,1	дані відсутні		0,7	дані відсутні	
10 мМ буфера, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	1,1	1,5	0,4	1,3	2,9	1,6
10 мМ буфера, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,0	1,0	0,0	1,5	1,4	-0,1
10 мМ буфера, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	1,0	1,2	0,2	1,2	1,4	0,3
10 мМ буфера, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	1,0	1,3	0,2	1,0	1,4	0,2
30 мМ буфера, 100 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,2	1,3	0,0	1,6	1,7	0,1
30 мМ буфера, 100 мМ аргініну (8 мг/мл)	1,1	1,5	0,4	1,2	2,6	1,3
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони А	1,0	1,1	0,0	1,4	1,4	0,0
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони В	1,0	1,2	0,2	1,2	1,5	0,3
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони С	1,0	1,1	0,1	1,2	1,4	0,2
30 мМ буфера, 500 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,1	1,2	0,1	1,9	1,4	-0,5
30 мМ буфера, 500 мМ аргініну (8 мг/мл)	1,1	1,3	0,2	1,3	1,4	0,1
50 мМ буфера, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	1,3	1,5	0,2	1,5	2,7	1,3
50 мМ буфера, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	1,2	1,1	-0,1	1,6	1,4	-0,2
50 мМ буфера, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	1,1	1,4	0,3	1,3	1,8	0,5
50 мМ буфера, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	1,4	1,2	-0,2	1,4	1,4	0,0
10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 0,0033% Tween-20 (5 мг/мл)	Початковий вміст = 0,8%		Через 1 добу при температурі 40°C = 3,7%		Різниця = 2,8%	



Таблиця 9

Вміст мономерів за результатами SEC при проведенні дослідження DOE #1

Зразок	Вміст мономерів у разі цитрату, %			Вміст мономерів сукцинату у разі, %		
	Початковий	Через 1 добу при температурі 40°C	Різниця	Початковий	Через 1 добу при температурі 40°C	Різниця
Переддіалізний пул NBJ0801-04-04 для буфера	98,7	дані відсутні		99,0	дані відсутні	
10 мМ буфера, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	98,8	98,4	-0,4	97,9	96,6	-1,4
10 мМ буфера, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	98,8	98,7	-0,1	97,9	98,0	0,2
10 мМ буфера, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	98,9	98,6	-0,3	97,8	97,7	-0,1
10 мМ буфера, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	98,7	98,4	-0,3	97,9	97,8	-0,1
30 мМ буфера, 100 мМ аргініну (2 мг/мл)	98,6	98,5	-0,1	98,0	97,9	-0,1
30 мМ буфера, 100 мМ аргініну (8 мг/мл)	98,7	98,3	-0,4	98,1	96,9	-1,2
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони А	98,7	98,6	-0,1	98,0	98,1	0,1
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони В	98,8	98,5	-0,2	98,2	98,0	-0,2
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони С	98,8	98,6	-0,2	98,2	98,1	-0,1
30 мМ буфера, 500 мМ аргініну (2 мг/мл)	98,7	98,5	-0,2	97,6	98,1	0,4
30 мМ буфера, 500 мМ аргініну (8 мг/мл)	98,7	98,4	-0,3	98,0	98,0	0,0
50 мМ буфер, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	98,5	98,3	-0,2	98,1	96,9	-1,2
50 мМ буфера, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	98,6	98,6	0,0	97,9	98,2	0,2
50 мМ буфера, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	98,7	98,3	-0,3	98,1	97,7	-0,4
50 мМ буфер, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	98,4	98,5	0,1	98,0	98,0	0,0
10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 0,0033% Tween-20 (5 мг/мл)	Початковий вміст = 98,1%		Через 1 добу при температурі 40°C = 95,6%		Різниця = -2,5	

Таблиця 10

Рівень депегілування за результатами SEC при проведенні дослідження DOE #1

Зразок	Рівень депегілування у разі цитрату, %			Рівень депегілування у разі сукцинату, %		
	Початковий	Через 1 добу при температурі 40°C	Різниця	Початковий	Через 1 добу при температурі 40°C	Різниця
Переддіалізний пул NBJ0801-04-04 для буфера	0,2	дані відсутні		0,3	дані відсутні	
10 мМ буфера, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	0,2	0,1	0,0	0,8	0,6	-0,3
10 мМ буфера, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	0,2	0,3	0,1	0,6	0,6	0,0
10 мМ буфера, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	0,2	0,3	0,1	1,0	0,8	-0,2
10 мМ буфера, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	0,2	0,3	0,1	1,0	0,8	-0,1
30 мМ буфера, 100 мМ аргініну (2 мг/мл)	0,2	0,2	0,0	0,4	0,4	0,0
30 мМ буфера, 100 мМ аргініну (8 мг/мл)	0,2	0,2	0,0	0,6	0,5	-0,1
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони А	0,2	0,3	0,1	0,6	0,5	-0,1
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони В	0,2	0,3	0,1	0,6	0,5	-0,1
30 мМ буфера, 300 мМ аргініну (5 мг/мл) - Флакони С	0,2	0,2	0,0	0,6	0,5	0,0
30 мМ буфера, 500 мМ аргініну (2 мг/мл)	0,2	0,3	0,1	0,5	0,5	0,0
30 мМ буфера, 500 мМ аргініну (8 мг/мл)	0,2	0,3	0,1	0,7	0,7	-0,1
50 мМ буфера, 100 мМ аргініну (5 мг/мл)	0,2	0,2	0,0	0,4	0,4	-0,1
50 мМ буфера, 300 мМ аргініну (2 мг/мл)	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	0,0
50 мМ буфера, 300 мМ аргініну (8 мг/мл)	0,2	0,2	0,0	0,6	0,6	-0,1
50 мМ буфера, 500 мМ аргініну (5 мг/мл)	0,2	0,3	0,1	0,6	0,6	0,0
10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl, 0,0033% Tween-20 (5 мг/мл)	Початковий рівень = 1,1%		Через 1 добу при температурі 40°C = 0,7%		Різниця = -0,3%	

Результати SEC показують, що рівень агрегатів у цитратних зразках залишається відносно незмінним. Сукцинатні зразки також мають низький рівень агрегатів, за винятком зразків із 100 мМ аргініну, що дозволяє зробити припущення про те, що буфери на основі сукцинату, для підтримання низького рівня агрегування білків, будуть потребувати більше ніж 100 мМ аргініну. За контрольних умов (10 мМ фосфату, 150 мМ NaCl і 0,0033% (маса/об'єм) поліоксіетилен(20)сорбітанмонолаурату при рН 6 та з концентрацією 5 мг/мл) рівень агрегатів після одностодового інкубування при температурі 40°C становить 3,7% (дивись Таблицю 8).

Депегілування являє собою ще один шлях деградування білків. У таблиці 10 показані результати SEC для депегілюваного продукту, які вказують на те, що рівень депегілування в сукцинатних зразках є вищим (0,4-0,8%) за відповідний показник у цитратних зразках (<0,3%). Рівень депегілування у фосфатному контролі є вищим, аніж в усіх зразках цитратних композицій і трохи вищим, аніж у більшості сукцинатних композицій.

Оскільки результати SEC для цитратних зразків, інкубованих при температурі 40°C протягом однієї доби, показують мінімальний рівень агрегатів, підгрупа зразків дослідження DOE #1 може бути інкубована при температурі 25°C протягом 28 діб. Зразки наведеного нижче складу можуть бути проаналізовані засобами SEC:

1. 30 мМ цитрату, 100 мМ аргініну, 2 мг/мл;
2. 30 мМ цитрату, 500 мМ аргініну, 2 мг/мл;
3. 30 мМ цитрату, 100 мМ аргініну, 8 мг/мл;
4. 30 мМ цитрату, 500 мМ аргініну, 8 мг/мл;
5. 30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну, 5 мг/мл.

Таблиця 11 показує результати SEC 28-добового експерименту. Крім того, зразки, інкубовані впродовж 28 діб, можуть бути проаналізовані засобами RP-HPLC (високоєфективна рідинна хроматографія з оберненою фазою) для встановлення відсутності продуктів деградування. Таблиця 12 показує ці результати.

Таблиця 11

Результати SEC для зразків дослідження DOE #1, інкубованих впродовж 28 діб при температурі 25°C

Зразок	28-добове інкубування при температурі 25°C		
	Середній вміст агрегатів, %	Середній вміст PEG-bGCSF, %	Середній вміст bG-CSF, %
100 мМ аргініну, 2 мг/мл	1,3	98,1	0,6
100 мМ аргініну, 8 мг/мл	1,6	98,0	0,4
300 мМ аргініну, 5 мг/мл - Флакони А	1,4	98,0	0,7
300 мМ аргініну, 5 мг/мл - Флакони В	1,3	98,1	0,6
300 мМ аргініну, 5 мг/мл - Флакони С	1,3	98,0	0,7
500 мМ аргініну, 2 мг/мл	1,4	97,8	0,8
500 мМ аргініну, 8 мг/мл	1,5	97,7	0,7

Таблиця 12

Результати RP-HPLC для зразків дослідження DOE #1, інкубованих впродовж 28 діб при температурі 25°C

Зразок	Рівень мономерів, %		
	Вихідний рівень	Через 28 днів при температурі 25°C	Різниця
100 мМ аргініну, 2 мг/мл	97,3	97,8	0,4
100 мМ аргініну, 8 мг/мл	97,0	97,4	0,4
300 мМ аргініну, 5 мг/мл - Флакони А	97,3	97,3	0,0
300 мМ аргініну, 5 мг/мл - Флакони В	97,1	95,2	-2,0
300 мМ аргініну, 5 мг/мл - Флакони С	97,1	97,4	0,3
500 мМ аргініну, 2 мг/мл	97,2	97,0	-0,2
500 мМ аргініну, 8 мг/мл	97,2	97,2	0,0

#### Приклад 4

Оцінювання протіонів та сумісності зі шприцом

Оцінювали результати порівняння хлориду та сульфату як протиіони для аргініну. Зразок може містити 30 мМ цитрату і 300 мМ аргініну при концентрації 5 мг/мл (рН 6). Крім того, сумісність продукту з поліпропіленовим шприцом MONOJECT місткістю 3 мл для розміщення лікарського препарату може бути порівняна із сумісністю зі скляними флаконами місткістю 1 мл.

- 5 Хлоридний буфер (30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну, рН 6) можна одержати з використанням цитрату натрію та аргініну-HCl, і одержаний розчин можна титрувати за допомогою 6N розчин HCl. Сульфатний буфер (30 мМ цитрату, 300 мМ аргініну, рН 6) можна одержати з використанням моногідрату лимонної кислоти, цитрату натрію та аргінінової основи, і одержаний розчин можна титрувати концентрованою сірчаною кислотою. bGCSFT133-20K PEG
- 10 може бути діалізований у два згадані буфери. Зразки можуть бути проаналізовані засобами SEC в нульовий момент часу. Одну групу зразків можна розмістити в скляні ліофілізаційні флакони місткістю 1 мл, а другу в шприци місткістю 3 мл перед інкубуванням при температурі 40°C протягом 3 діб.

Таблиця 13 показує результати SEC. Наведені результати SEC показують, що утворення агрегатів є у два-три рази вищим у зразках, що зберігаються в шприцах, порівняно із скляними флаконами. Рівень депегілування продукту залишається таким самим, що і у зразках нульового часу. Для обох протиіонів зміна рівня агрегатів у зразках, які зберігались у скляних флаконах, після 3 діб при температурі 40°C залишалась мінімальною. Хлорид може застосовуватись замість сульфату як протиіон без справляння впливу на утворення агрегатів.

20

Таблиця 13

Результати SEC при здійсненні оцінювання протиіонів та сумісності зі шприцом

Зразок	Вихідний рівень			1-добове інкубування при температурі 40°C			2-добове інкубування при температурі 40°C			3-добове інкубування при температурі 40°C		
	агрегатів, %	PEG-bGCS F, %	DG-CSF, %	агрегатів, %	PEG-bGCS F, %	bG-CSF, %	агрегатів, %	PEG-bGCS F, %	bG-CSF, %	агрегатів, %	PEG-bGCS F, %	bG-CSF, %
Перед-діалізований пул	0,5	99,2	0,3	дані відсутні								
Хлорид (скляний флакон)	1,2	98,5	0,3	1,2	98,5	0,4	1,2	98,3	0,4	1,2	98,2	0,7
Сульфат (скляний флакон)	1,6	98,1	0,3	1,2	98,5	0,3	1,2	98,3	0,5	1,4	97,9	0,6
Хлорид (шприц)	1,2	98,5	0,3	2,2	97,5	0,3	4,0	95,5	0,4	4,9	94,6	0,5
Сульфат (шприц)	1,6	98,1	0,3	2,1	97,5	0,3	3,5	96,1	0,4	4,5	95,0	0,5

#### Приклад 5

##### Трипараметричний 2-рівневий повнофакторний експеримент (DOE #2)

- 25 Друге дослідження DOE може бути проведене для оцінювання впливу рН, концентрації аргініну та концентрації білка у цитратному буфері. Таблиця 14 показує склад композицій, використаних при проведенні дослідження DOE #2.

Таблиця 14

Склад композицій, використаних при проведенні дослідження DOE #2

Зразок №	Концентрація аргініну (мМ)	pH	Концентрація продукту (мг/мл)
1	200	5,0	2
2	200	5,0	8
3	200	6,0	2
4	200	6,0	8
5	250	5,5	5
6	250	5,5	5
7	250	5,5	5
8	300	5,0	8
9	300	5,0	2
10	300	6,0	8
11	300	6,0	2

bGCSF-T133-20K PEG може бути діалізований у буферах 5 складів. Зразки 1 і 2 можуть бути діалізовані у буфері, який містить 30 мМ цитрату і 200 мМ аргініну при pH 5,0. Зразки 3 і 4 можуть бути діалізовані у буфері, який містить 30 мМ цитрату і 200 мМ аргініну при pH 5,0. Зразки 5 і 6 можуть бути діалізовані у буфері, який містить 30 мМ цитрату і 250 мМ аргініну при pH 6,0. Зразки 7 і 8 можуть бути діалізовані у буфері, який містить 30 мМ цитрату і 300 мМ аргініну при pH 6,0. Зразки 9 і 10 можуть бути діалізовані у буфері, який містить 30 мМ цитрату і 300 мМ аргініну при pH 5,5. Концентрація кожного постдіалізованого зразка може бути доведена до рівня кінцевої цільової концентрації продукту, після чого зразки можуть поділятися на аліквоти (2x1 мл) в скляних ліофілізаційних флаконах з одержанням двох партій зразків: одна партія може зберігатись при температурі 2-8°C як контроль, а друга партія може зберігатись при температурі 40°C протягом трьох діб.

Таблиця 15 показує результати SEC. Зміни вмісту агрегатів становлять від -0,1% до 2,1%. Більш високий рівень агрегатів точно корелює з більш високою концентрацією продукту. Дельта (кінцева різниця при зміні параметра) депегілування становить від 0,1% до 0,8%. Дещо більший ступінь депегілування корелює з низькою концентрацією продукту при низьких значеннях pH. При зменшенні значення pH ступінь депегілування збільшується, і ця тенденція відповідає відомим результатам спостережень при попередніх дослідженнях композицій.

Таблиця 15

Підсумкові результати SEC при проведенні дослідження DOE #2

Серія №	Вміст агрегатів, %			Вміст мономерів, %			Рівень депегілування, %		
	Вихідний рівень	При температурі 40°C впродовж 3 днів	Різниця	Вихідний рівень	При температурі 40°C впродовж 3 днів	Різниця	Вихідний рівень	При температурі 40°C впродовж 3 днів	Різниця
1	1,0	1,2	0,2	98,7	97,8	-0,9	0,3	1,0	0,7
2	0,8	2,8	2,0	98,9	96,6	-2,3	0,3	0,7	0,4
3	1,4	1,3	-0,1	98,4	98,3	-0,1	0,2	0,4	0,2
4	0,9	2,6	1,7	98,8	97,1	-1,8	0,2	0,3	0,1
5	0,9	2,0	1,1	98,8	97,4	-1,4	0,3	0,6	0,3
6	1,0	2,0	1,0	98,7	97,4	-1,3	0,3	0,6	0,3
7	1,0	1,8	0,8	98,8	97,7	-1,1	0,3	0,6	0,3
8	1,1	1,2	0,1	98,6	97,7	-0,9	0,3	1,1	0,8
9	0,7	2,8	2,1	99,0	96,4	-2,6	0,3	0,8	0,5
10	1,2	1,2	0,0	98,6	98,4	-0,2	0,2	0,5	0,2
11	0,9	2,2	1,3	98,8	97,3	-1,5	0,3	0,4	0,1

Приклад 6

Дослідження із застосуванням перемішування

Дослідження із застосуванням примусового перемішування може бути проведене для оцінювання стабільності білка в композиціях. Зразки можна одержати шляхом діалізу bGCSF-T133-20K PEG (16,6 мг/мл білка у 10 мМ ацетату натрію, 5% сорбіту, рН 4,0) проти 30 мМ цитрату і 250 мМ аргініну при рН 6,0. Частина діалізованого матеріалу може бути розбавлена до цільової концентрації 5 мг/мл із застосуванням буфера (30 мМ цитрату і 250 мМ аргініну при рН 6,0). Одержаний пул у подальшому фільтрують через 0,22 мкм фільтр, а потім піддають примусовому перемішуванню у хімічній склянці шляхом перемішування при 60 об/хв за допомогою магнітної мішалки протягом двох годин при кімнатній температурі. Зразки можна відбирати кожні 30 хв.

Всі зразки є прозорими, безбарвними і без видимих макрочастинок в усі моменти часу. Дані з концентрації білка, оптичної густини при 550 нм і значення рН для кожного моменту часу наведені в Таблиці 16.

Таблиця 16

Підсумкові дані з концентрації білка,  $A_{550}$  і значення рН, одержані при проведенні дослідження із застосуванням перемішування

Зразок	Аналіз при 280 нм			Оптична густина $A_{550}$	рН
	Концентрація білка (мг/мл)	Середнє квадратичне відхилення (%)	Відносне середнє квадратичне відхилення (%)		
$T_0$	4,9	0,03	0,60%	0,00942	6,0
Контрольний зразок, $T_{30 \text{ хв}}$	5,0	0,01	0,30%	-0,00015	6,0
Перемішуваний зразок, $T_{30 \text{ хв}}$	4,9	0,04	0,70%	0,00972	6,0
Контрольний зразок, $T_{60 \text{ хв}}$	4,9	0,03	0,60%	0,00407	6,0
Перемішуваний зразок, $T_{60 \text{ хв}}$	4,9	0,02	0,40%	0,03547	6,0
Контрольний зразок, $T_{90 \text{ хв}}$	5,0	0,05	1,00%	0,09031	6,0
Перемішуваний зразок, $T_{90 \text{ хв}}$	4,9	0,03	0,60%	0,08798	6,0
Контрольний зразок, $T_{120 \text{ хв}}$	5,0	0,03	0,60%	0,08761	6,0
Перемішуваний зразок, $T_{120 \text{ хв}}$	4,9	0,03	0,60%	0,08775	6,0

Концентрація білка впродовж перемішування залишається стабільною. Значення рН впродовж експерименту залишається незмінним. Як показано у Таблиці 7, склад продукту, за результатами SEC, також залишається незмінним впродовж експерименту. В цілому, результати цього дослідження показують, що білок залишається стабільним протягом всього періоду примусового перемішування.

Таблиця 7

Підсумкові результати SEC при проведенні дослідження із застосуванням перемішування

Зразок	Вміст агрегатів, %	Вміст PEG-bGCSF, %	Вміст bG-CSF, %
$T_0$	1,6	98,1	0,3
Контрольний зразок, $T_{30 \text{ хв}}$	1,6	98,2	0,3
Перемішуваний зразок, $T_{30 \text{ хв}}$	1,6	98,2	0,3
Контрольний зразок, $T_{60 \text{ хв}}$	1,6	98,1	0,3
Перемішуваний зразок, $T_{60 \text{ хв}}$	1,6	98,2	0,3
Контрольний зразок, $T_{90 \text{ хв}}$	1,6	98,2	0,3
Перемішуваний зразок, $T_{90 \text{ хв}}$	1,6	98,2	0,3
Контрольний зразок, $T_{120 \text{ хв}}$	1,6	98,1	0,3
Перемішуваний зразок, $T_{120 \text{ хв}}$	1,6	98,2	0,3

## Приклад 7

Дослідження із застосуванням заморожування-відтавання

- 5 Дослідження із застосуванням заморожування-відтавання можна проводити з метою визначення концентрації білка і значення pH різних зразків. Білок в зразках можна піддавати до п'яти циклів заморожування і відтавання. Зразки можуть бути відфільтровані через 0,22 мкм фільтри і розлиті в флакони місткістю 15 мл. Одна аліквота може бути відділена як контроль. Щодо трьох аліквот, що залишилися, кожен цикл заморожування-відтавання може складатися із заморожування розчину білка протягом однієї години при температурі  $-75 \pm 5^\circ\text{C}$  і відтавання при
- 10 кімнатній температурі протягом приблизно однієї години до зникнення льоду. Флакон зі зразком можна тричі обережно обертати для змішування зразка. Одна аліквота може бути відділена після першого, другого і п'ятого циклів заморожування і відтавання для тестування.

- Всі зразки є прозорими, безбарвними і без видимих макрочастинок в усі моменти часу. Дані з концентрації білка, оптичної густини при 550 нм і значення pH для кожного моменту часу наведені в Таблиці 18.
- 15

Таблиця 18.

Таблиця 18

Підсумкові дані з концентрації білка,  $A_{550}$  і значення pH, одержані при проведенні дослідження із застосуванням заморожування-відтавання

Зразок	Аналіз при 280 нм			Оптична густина $A_{550}$	pH
	Концентрація білка (мг/мл)	Середнє квадратичне відхилення (%)	Відносне середнє квадратичне відхилення (%)		
Цикл 0	20,6	0,5	2,20%	0,11563	5,9
Цикл 1	21,9	1,4	6,40%	0,09471	5,9
Цикл 2	22,6	0,3	1,40%	0,12685	5,9
Цикл 5	21,3	1,0	4,60%	0,13357	5,9

- Концентрація білка після кожного циклу заморожування-відтавання залишається стабільною. Крім того, значення pH залишається незмінним впродовж п'яти циклів заморожування-відтавання. Як показано у Таблиці 19, склад продукту, за результатами SEC, також залишається однаковим в усі моменти часу.
- 20

Таблиця 19

Підсумкові результати SEC при проведенні дослідження із застосуванням заморожування-відтавання

Зразок	Вміст агрегатів, %	Вміст PEG-bGCSF, %	Вміст bG-CSF, %
Цикл 0	1,6	98,1	0,3
Цикл 1	1,5	98,1	0,4
Цикл 2	1,6	98,0	0,4
Цикл 5	1,5	98,1	0,4

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ELI LILLY & COMPANY

<120> КОМПОЗИЦІЇ, ЯКІ МІСТЯТЬ БИЧАЧИЙ ГРАНУЛОЦИТАРНИЙ КОЛОНІЄСТИМУЛЮВАЛЬНИЙ ФАКТОР ТА ЙОГО ВАРІАНТИ

<130> X18988

<150> 61/385,629

<151> 2010-09-23

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 174

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 1

```

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1           5           10           15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln
          20           25           30

Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met
          35           40           45

Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys
50           55           60

Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His Gly
65           70           75           80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser
          85           90           95

Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp
          100          105          110

Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro
          115          120          125

Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe
          130          135          140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe
145          150          155          160

Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165          170

```

<210> 2



<211> 175  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<400> 2

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20          25          30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
          35          40          45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
          50          55          60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65          70          75          80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85          90          95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100          105          110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
          115          120          125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
          130          135          140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145          150          155          160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165          170          175
  
```

<210> 3  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> де Xaa - пара-ацетилфенілаланін (pAF)

<400> 3

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Xaa Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20          25          30
  
```

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
35 40 45  
Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser  
50 55 60  
Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His  
65 70 75 80  
Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile  
85 90 95  
Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr  
100 105 110  
Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala  
115 120 125  
Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala  
130 135 140  
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160  
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 4  
<211> 175  
<212> PRT  
<213> Bos taurus  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (63)..(63)  
<223> де Xaa - пара-ацетилфенілаланін(pAF)  
<400> 4

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
1 5 10 15  
Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu  
20 25 30  
Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
35 40 45  
Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Xaa Ser  
50 55 60  
Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His  
65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile  
85 90 95  
Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr  
100 105 110  
Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala  
115 120 125  
Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala  
130 135 140  
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160  
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 5  
<211> 175  
<212> PRT  
<213> Bos taurus  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (70)..(70)  
<223> де Хаа - пара-ацетилфенілаланін (pAF)  
<400> 5

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

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 6  
<211> 175  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (126)..(126)  
<223> де Хаа - пара-ацетилфенілаланін (pAF)

<400> 6

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu  
20 25 30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
35 40 45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser  
50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His  
65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile  
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr  
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Xaa Ala Ala  
115 120 125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala  
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 7  
<211> 175  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (134)..(134)
<223> де Хаа - пара-ацетилфенілаланін (pAF)

<400> 7

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20          25          30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
          35          40          45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50          55          60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65          70          75          80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85          90          95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100          105          110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
          115          120          125

Pro Ala Val Gln Pro Xaa Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
          130          135          140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145          150          155          160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165          170          175

<210> 8
<211> 175
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<221> misc_feature
<222> (137)..(137)
<223> де Хаа - пара-ацетилфенілаланін (pAF)

<400> 8

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15

```

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu  
20 25 30  
Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
35 40 45  
Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser  
50 55 60  
Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His  
65 70 75 80  
Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile  
85 90 95  
Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr  
100 105 110  
Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala  
115 120 125  
Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Xaa Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala  
130 135 140  
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160  
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 9

<211> 175

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)..(9)

<223> де Xaa - пара-ацетилфенілаланін, сполучений з поліетилентгліколевою складовою

<400> 9

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Xaa Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
1 5 10 15  
Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu  
20 25 30  
Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
35 40 45  
Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser  
50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His  
65 70 75 80  
Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile  
85 90 95  
Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr  
100 105 110  
Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala  
115 120 125  
Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala  
130 135 140  
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160  
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 10  
<211> 175  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (63)..(63)  
<223> Хаа може бути будь-якою природною амінокислотою

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (64)..(64)  
<223> де Хаа - пара-ацетилфенілаланін, сполучений з поліетиленгліколевою складовою

<400> 10

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
1 5 10 15  
Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu  
20 25 30  
Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
35 40 45  
Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Xaa Ser  
50 55 60  
Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His  
65 70 75 80  
Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile  
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr  
100 105 110  
Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala  
115 120 125  
Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala  
130 135 140  
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160  
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 11

<211> 175

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> misc\_feature

<222> (70)..(70)

<223> де Xaa - пара-ацетилфенілаланін, сполучений з поліетиленгліколевою складовою

<400> 11

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



Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 12  
<211> 175  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (126)..(126)  
<223> де Xaa - пара-ацетилфенілаланін, сполучений з  
поліетиленгліколевою складовою

<400> 12

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu  
20 25 30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
35 40 45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser  
50 55 60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His  
65 70 75 80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile  
85 90 95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr  
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Xaa Ala Ala  
115 120 125

Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala  
130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg  
145 150 155 160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro  
165 170 175

<210> 13  
<211> 175  
<212> PRT  
<213> Bos taurus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (134)..(134)  
 <223> де Xaa - пара-ацетилфенілаланін, сполучений з  
 поліетилентгліколевою складовою

<400> 13

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1          5          10          15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
          20          25          30

Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
          35          40          45

Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
          50          55          60

Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65          70          75          80

Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
          85          90          95

Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
          100          105          110

Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
          115          120          125

Pro Ala Val Gln Pro Xaa Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
          130          135          140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145          150          155          160

Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
          165          170          175

```

<210> 14  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (137)..(137)  
 <223> де Xaa - пара-ацетилфенілаланін, сполучений з  
 поліетилентгліколевою складовою

<400> 14

```

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1      5      10      15
Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu
20     25     30
Gln Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35     40     45
Met Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser
50     55     60
Cys Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Thr Ser Cys Leu Asn Gln Leu His
65     70     75     80
Gly Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile
85     90     95
Ser Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr
100    105    110
Asp Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala
115    120    125
Pro Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Xaa Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala
130    135    140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg
145    150    155    160
Phe Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165    170    175

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Стабільна водна композиція, яка містить bG-CSF-T133pAF-20K PEG, цитратний або сукцинатний буфер, аргінін і факультативно - протиіон для аргініну, причому ця композиція містить менше ніж 0,001 % поверхнево-активної речовини.
2. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що протиіон для аргініну являє собою хлорид або сульфат.
- 10 3. Композиція за п. 1 або п. 2, яка **відрізняється** тим, що поверхнево-активна речовина являє собою поверхнево-активну речовину типу полісорбату.
4. Композиція за будь-яким із пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що bG-CSF-T133pAF-20K PEG присутній у кількості від приблизно 0,5 г/л до приблизно 12 г/л, згаданий буфер є цитратним буфером, який має молярність приблизно 30 мМ, аргінін має молярність приблизно 250 мМ,
- 15 причому значення рН композиції становить від приблизно 5,7 до приблизно 6,6.
5. Композиція за будь-яким із пп. 1-4, яка факультативно містить один або декілька інших терапевтичних інгредієнтів.
6. Спосіб лікування тварини, яка має розлад, модульований bG-CSF, який включає введення згаданий тварині терапевтично ефективної кількості композиції за будь-яким із пп. 1-5.
- 20 7. Спосіб за п. 6, який **відрізняється** тим, що згаданим розладом є мастит і згаданою твариною є корова у перед- та післяпологовий період.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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

---

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