

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044400**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

| | |
|---|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента 2023.08.24 | (51) Int. Cl. <i>A61K 38/08</i> (2006.01) <i>A61K 38/10</i> (2006.01) <i>A61P 25/28</i> (2006.01) <i>A61P 25/22</i> (2006.01) <i>A61P 25/08</i> (2006.01) <i>A61P 9/10</i> (2006.01) <i>A61P 25/16</i> (2006.01) <i>A61P 25/14</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки 202090802 | |
| (22) Дата подачи заявки 2017.09.30 | |

(54) ПЕПТИДНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ВОЗБУЖДАЮЩЕЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТЬЮ

| | |
|--|--|
| (43) 2020.08.05 | (56) WO-A1-2017185249 CN-A-107312069 CN-A-101970011 CN-A-103533949 WO-A1-2016140527 CN-A-103159832 |
| (86) PCT/CN2017/104751 | |
| (87) WO 2019/061395 2019.04.04 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец: БИОСЕЛЗ (БЕЙДЗИН) БИОТЕК КО., ЛТД. (CN) | |
| (72) Изобретатель: Хань Хуаминь, Тянь Юйцзя, Цзя Хунцзюнь (CN) | |
| (74) Представитель: Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU) | |

(57) Предложена фармацевтическая композиция, содержащая пептид, имеющий аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант, регулирующий рН агент и наполнитель, где указанный пептид представляет собой активный пептид для лечения повреждений центральной нервной системы. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая химерный пептид, регулирующий рН агент и наполнитель, где указанный химерный пептид содержит активный пептид и участвующий в интернализации пептид. Также предложено медицинское применение такой фармацевтической композиции, содержащей активный пептид или химерный пептид.

044400
B1

044400
B1

Область техники

Настоящая заявка в целом относится к области медицины. В частности, в настоящей заявке предложены композиции для лечения повреждений центральной нервной системы и их применение.

Предшествующий уровень техники

Инсульты представляют собой распространенные острые цереброваскулярные болезни у людей среднего возраста и пожилых людей, и имеется тенденция к повреждению более молодых. В современном мире цереброваскулярные болезни относятся к трем самым опасным для людей заболеваниям (раковые заболевания, кардио-цереброваскулярные болезни и диабету). По оценкам, ежегодно в Китае от цереброваскулярных болезней умирает около трех миллионов человек. Это число от 4 до 5 раз выше, чем в США и европейских странах, в 3,5 раза выше, чем в Японии, и даже выше, чем в некоторых развивающихся странах, таких как Таиланд и Индия. Коэффициент заболеваемости этой болезнью увеличивается на 8,7% в год. Частота рецидивов превышает 30%, а частота рецидивов в течение пяти лет достигает 54%. Из оставшихся в живых после инсульта 75% утрачивают свою трудоспособность в большей или меньшей степени, а 40% становятся инвалидами.

Инсульты можно условно подразделить на две категории, а именно, ишемические инсульты и геморрагические инсульты, и пациенты с ишемическими инсультами составляют 85% от общего числа пациентов с инсультами. В настоящее время терапевтические лекарственные средства для лечения ишемических инсультов включают главным образом вазодилататоры (такие как персантин), лекарственные средства, улучшающие микроциркуляцию и увеличивающие объем крови (такие как низкомолекулярный декстран), тромболитические лекарственные средства (такие как урокиназа), антикоагулянтные лекарственные средства, лекарственные средства, предотвращающие агрегацию тромбоцитов (такие как аспирин), средства китайской медицины, нейропротекторные агенты и так далее. Однако, поскольку большинство из этих лекарственных средств имеют недостатки, такие как значительные побочные эффекты, возможные риски или недостаточная терапевтическая эффективность, исследование патогенеза инсульта и разработка лекарственных средств, направленных на устранение причин патогенеза, имеют важное социальное значение для предупреждения и лечения возникновения и развития цереброваскулярных болезней.

Инсульты характеризуются гибелью нервных клеток в участках локальной ишемии, церебральной геморрагии и/или травмы. Гибель или повреждение нейронов, вызываемые церебральной ишемией, протекает(ют) в виде каскадного процесса повреждений, т.е. после возникновения церебральной ишемии происходит снижение перфузии тканей кровью, повышение уровня возбуждающих нейромедиаторов, что в свою очередь активирует N-метил-D-аспартатные (NMDA) рецепторы и рецепторы α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), вызывает открытие ионных каналов и приток ионов кальция и далее активирует большое количество ферментов для запуска сигнального каскада, что приводит к повреждению нервных клеток многочисленными путями. Расположенный далее в сигнальном каскаде белок 95 постсинаптического уплотнения (PSD-95) запускает серию ишемических повреждений посредством взаимодействия с различными белками и ввиду этого является критическим фактором для повреждений, вызываемых церебральной ишемией, а также перспективной мишенью для лекарственной терапии. Поэтому разработка ингибиторов PSD-95 имеет большое медицинское значение с точки зрения повреждений нервной системы, вызываемых различными видами возбуждающей нейротоксичности, включая инсульт.

Кроме того, исследования показали, что возбуждающий нейротрансмиттер NMDA играет важную роль при тревожном расстройстве, эпилепсии и различных нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь Паркинсона или болезнь Гентингтона. Например, исследования показали, что чрезмерное возбуждение центральной глутаматергической системы может вызывать тревожное расстройство, поскольку NMDA-рецептор (NMDAR) является главным элементом, отвечающим за возбуждаемую глутаминовой кислотой нейротоксичность. Приступ эпилепсии включает три различных, но длительных патофизиологических процесса, включая иницирование, поддержание и развитие судорожного разряда, а также подавление судорожного разряда. Во время этого процесса важную роль играют возбуждающие нейромедиаторы, такие как глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота. При болезни Альцгеймера в механизм нейротоксичности данного заболевания вовлечен PSD-95 посредством пути GluR6-PSD-95-MLK3 (глутаматный рецептор 6-PSD-95-киназа 3 смешанного происхождения). Кроме того, при болезни Гентингтона PSD-95 является медиатором нейротоксичности, вызываемой NMDA-рецепторами и мутантными гентингинами. Поэтому разработка ингибиторов PSD-95 также важна для лечения, облегчения симптомов и предупреждения указанных выше заболеваний.

Пептидные лекарственные средства имеют ограничения, обусловленные условиями хранения лекарственных средств, и характеризуются ограниченной способностью противостоять воздействию окружающей среды. При хранении пептидов в условиях высоких температур и в течение длительных периодов времени могут происходить изменения pH, что может приводить к разложению, снижению чистоты, существенным изменениям внешнего вида и к сокращению срока годности при хранении, что тем самым влияет на эффективность лекарственного средства. Кроме того, существуют высокие требования к транспортировке пептидных лекарственных средств, что ограничивает крупномасштабное коммерческое

применение пептидных лекарственных средств. Таким образом, существует потребность в технических усовершенствованиях пептидных лекарственных средств.

Краткое описание сущности изобретения

Согласно первому аспекту в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая пептид, регулирующий pH агент и наполнитель, где пептид содержит аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант.

В некоторых воплощениях функциональный вариант представляет собой вариант, образуемый посредством одной или более чем одной консервативной замены в сегменте LDTEI в SEQ ID NO: 1, предпочтительно консервативной замены, выбранной из группы, состоящей из замены между D и E, замены среди L, V и I и замены между T и S.

В некоторых воплощениях функциональный вариант представляет собой вариант, образуемый посредством замены сегмента LDTEI в SEQ ID NO: 1 на последовательность, выбранную из группы, состоящей из LDTEL, LDTEV, LDTDI, LDTDL, LDTDV, LDSEI, LDSEL, LDSEV, LDSDI, LDSDL, LDSDV, LETEI, LETEV, LETDI, LETDL, LETDV, LETDL, LETDL, LETDL, LETDL, IDTEI, IDTEL, IDTEV, IDTDI, IDTDL, IDTDV, IETEI, IETEL, IETEV, IETDI, IETDL, IETDL и IETDV.

В некоторых воплощениях пептид представляет собой химерный пептид, содержащий аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант, и участвующий в интернализации пептид, где участвующий в интернализации пептид облегчает захват химерного пептида клеткой.

В некоторых воплощениях участвующий в интернализации пептид содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2).

В некоторых воплощениях химерный пептид содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRRYEKLTTLDTGGV (SEQ ID NO: 3).

В некоторых воплощениях регулирующий pH агент выбран из группы, состоящей из гистидинового буфера, аргининового буфера, буфера на основе сукцината натрия, буфера на основе сукцината калия, буфера на основе цитрата натрия, глюконатного буфера, ацетатного буфера, фосфатного буфера, трибуфера и любой их комбинации, предпочтительно регулирующий pH агент представляет собой буфер на основе лимонной кислоты/двузамещенного фосфата натрия или гистидиновый/аргининовый буфер и более предпочтительно регулирующий pH агент представляет собой гистидиновый/аргининовый буфер.

В некоторых воплощениях pH композиции составляет от примерно 5,5 до 8, предпочтительно от примерно 6 до 7,5, более предпочтительно от примерно 6 до 7, еще более предпочтительно от примерно 6,5 до 7 и наиболее предпочтительно составляет примерно 6,5.

В некоторых воплощениях количество гистидина/аргинина в гистидиновом/аргининовом буфере составляет, по массе, от примерно 1 до 10%, предпочтительно от примерно 3 до 10%.

В некоторых воплощениях наполнитель выбран из группы, состоящей из трегалозы, маннита, глюкозы, лактозы, циклодекстрина, декстрана-40, сорбита, сахарозы, глицина и любой их комбинации, предпочтительно наполнитель выбран из группы, состоящей из трегалозы, маннита, глюкозы, лактозы и любой их комбинации, и более предпочтительно наполнитель представляет собой трегалозу.

В некоторых воплощениях соотношение масс пептида и трегалозы составляет от примерно 1:0,05 до 1:10, предпочтительно от примерно 1:0,5 до 1:5, более предпочтительно от примерно 1:0,8 до 1:3 и наиболее предпочтительно составляет примерно 1:1.

В некоторых воплощениях наполнитель представляет собой трегалозу, а регулирующий pH агент представляет собой гистидиновый/аргининовый буфер.

В некоторых воплощениях соотношение масс пептида и трегалозы составляет примерно 1:1.

В некоторых воплощениях pH композиции составляет примерно $6,5 \pm 0,5$.

В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит криопротектор и/или поверхностно-активное вещество, предпочтительно, криопротектор представляет собой полиэтиленгликоль, и/или поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, предпочтительно полисорбат 20 или полисорбат 80.

В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит ингибитор дезамидирования.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция находится в форме предварительно лиофилизированной композиции, или в форме лиофилизированной композиции, или в форме восстановленной композиции, приготовленной путем объединения лиофилизированной композиции с водным раствором.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция предназначена для использования в лечении, уменьшении интенсивности симптомов или предупреждении заболевания, выбранного из группы, состоящей из повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированного(ой) с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревожного расстройства и эпилепсии, у млекопитающего либо для использования в качестве нейропротекторного агента.

Согласно второму аспекту в настоящей заявке предложен способ лечения, облегчения симптомов или предупреждения заболевания, выбранного из группы, состоящей из повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированного(ой) с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревожного расстройства и эпилепсии, у млекопитающего, включающий введение субъек-

ту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции согласно первому аспекту.

Согласно третьему аспекту в настоящей заявке предложено применение фармацевтической композиции согласно первому аспекту в приготовлении лекарственного средства для лечения, облегчения симптомов или предупреждения заболевания, выбранного из группы, состоящей из повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированного(ой) с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревожного расстройства и эпилепсии, у млекопитающего либо в приготовлении нейропротекторного агента.

В некоторых воплощениях любого из вышеупомянутых аспектов заболевание представляет собой инсульт или повреждение нервной системы, вызываемое инсультом.

В некоторых воплощениях любого из вышеупомянутых аспектов инсульт включает ишемический инсульт, геморрагический инсульт и геморрагический инсульт, преобразованный из ишемического инсульта. Предпочтительно, инсульт представляет собой ишемический инсульт.

В некоторых воплощениях любого из вышеупомянутых аспектов повреждение нервной системы представляет собой повреждение нервной системы, вызываемое возбуждающей нейротоксичностью.

В некоторых воплощениях любого из вышеупомянутых аспектов повреждение или боль локализуется в периферической нервной системе или центральной нервной системе.

В некоторых воплощениях любого из вышеупомянутых аспектов повреждение нервной системы, вызываемое возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного мозга или спинного мозга, нейронального повреждения в центральной нервной системе (ЦНС), в том числе острого повреждения ЦНС, ишемического инсульта или повреждения спинного мозга, гипоксии, ишемического или механического повреждения и повреждения, вызываемого нейродегенеративным заболеванием, тревожным расстройством, эпилепсией или инсультом.

В некоторых воплощениях нейродегенеративное заболевание включает болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь Паркинсона или болезнь Гентингтона.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны результаты анализа методом аффинной адсорбции с целью обнаружения взаимодействия между P5 и доменом PDZ1/2. На дорожке M представлены маркеры молекулярной массы белков; на дорожке 1 показан образец His+PDZ1/2+P5; на дорожке 2 показан только один P5; на дорожке 3 показан образец His+P5; на дорожке 4 показан образец His+PDZ1/2. Как показано на дорожке 1, элюированная фракция содержит как P5, так и PDZ1/2, что является подтверждением способности P5 связываться с доменом PDZ1/2.

На фиг. 2 показаны изображения окрашенных хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТС) срезов головного мозга крыс в модели окклюзии средней мозговой артерии (МСаО), подвергнутых лечению полипептидом P5: а) группа нормальных животных; б) группа имитации; в) группа модельных животных; д) группа, получающая положительное контрольное лекарственное средство (раствор для инъекций Epi-biru); е) NA-1 в дозе 10 мг/кг массы тела; ф) YE-NA-1 в дозе 10 мг/кг массы тела; г) P5 в дозе 10 мг/кг массы тела; h) P5 в дозе 3 мг/кг массы тела; и) P5 в дозе 1 мг/кг массы тела; j) профилактическое введение P5 в дозе 10 мг/кг массы тела; к) профилактическое введение P5 в дозе 3 мг/кг массы тела; л) профилактическое введение P5 в дозе 1 мг/кг массы тела.

Фиг. 3 представляет собой гистограмму, демонстрирующую статистические данные для объема церебрального инфаркта после терапевтического и профилактического введения полипептида P5 в различных дозах крысам в модели МСаО. $**p < 0,01$.

На фиг. 4 показано распределение полипептида P5 в образцах головного мозга крыс.

На фиг. 5 показаны изображения ТТС-окрашенных образцов головного мозга крыс.

На фиг. 6 показаны изображения окрашенных гематоксилином и эозином (HE) парафиновых срезов образцов головного мозга крыс. А) группа нормальных животных; В) группа имитации; С) группа модельных животных; D) группа, получающая положительное контрольное лекарственное средство; E) группа, получающая NA-1; F) группа, получающая YE-NA-1; G) группа, получающая P5; H) группа, получающая P5 в профилактических целях.

На фиг. 7 показано влияние разных наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе P5 (№ 0, № 1 и № 2) в 0-е сутки.

На фиг. 8 показано влияние разных наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе P5 (№ 3, № 4 и № 5) в 0-е сутки.

На фиг. 9 показано влияние разных наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе P5 (№ 0, № 1 и № 2) через 1 неделю.

На фиг. 10 показано влияние разных наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе P5 (№ 3, № 4 и № 5) через 1 неделю.

На фиг. 11 показаны полученные через 1 неделю результаты использования гистидина/аргинина для подведения рН композиции (т.е. в эксперименте II по скринингу диапазона рН).

На фиг. 12 показаны полученные через 2 недели результаты использования гистидина/аргинина для подведения рН композиции (т.е. в эксперименте II по скринингу диапазона рН).

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения разработали пептиды для лечения повреждений центральной нервной системы. Для лучшего применения этих пептидов в промышленной практике авторы изобретения на основании обширных исследований разработали композиции, содержащие пептид, наполнитель и буфер для регулирования pH. Такие композиции могут обладать по меньшей мере одним из перечисленных далее преимуществ.

1. Композиции представляют собой белую рыхлую лиофилизированную массу с фармацевтически привлекательным внешним видом. Наличие наполнителя оказывает благоприятное действие с точки зрения улучшения температуры разложения (белой рыхлой лиофилизированной массы), обеспечивая защиту при лиофилизации и повышая стабильность белков в процессе долгосрочного хранения.

2. Стабильность пептида повышается посредством предоставления аморфной стеклообразной матрицы, связывающейся с белком водородными связями, для замены молекул воды, которые должны быть удалены во время сушки. Это облегчает поддержание конформации пептида, сводит к минимуму разложение пептида в ходе цикла лиофилизации и улучшает долговременную устойчивость конечного продукта.

3. Данные композиции устойчивы к воздействию окружающей среды и не разлагаются в течение относительно длительного периода хранения. Внешний вид композиций, чистота композиций и содержание в них примесей могут соответствовать требованиям для клинического применения.

Определения

Если не указано иное, термины, использованные в настоящей заявке, имеют значение, как оно обычно понимается специалистом средней квалификации в данной области техники.

Однобуквенные или трехбуквенные сокращения для аминокислот, использованные в настоящей заявке, согласуются с международными правилами.

Термин "химерный пептид" означает пептид, имеющий два пептидных компонента, которые в естественных условиях не связаны друг с другом. Эти два пептидных компонента могут образовывать слитый белок или могут быть соединены посредством химической связи.

Термин "домен PDZ" относится к модульному белковому домену, состоящему приблизительно из 90 аминокислот, характеризующемуся высокой идентичностью последовательности (например, по меньшей мере на 60%) с синаптическим белком PSD-95, с Discs-Large (DLG) белком коннексином из дрозофиллы и эпителиальным белком плотных контактов Z01. Домен PDZ также известен как гомологичные повторы Discs-Large белка ("DHR") и повторы GLGF. В домене PDZ обычно сохраняется коровая консенсусная последовательность (Doyle, D. A., 1996, Cell, 85: 1067-76). Типичные содержащие домен PDZ белки и последовательности домена PDZ описаны в заявке США № 10/714,537.

Термин "NMDA-рецептор" или "NMDAR" относится к мембрано-ассоциированному белку, который, как известно, взаимодействует с NMDA. Эти рецепторы могут быть у человека или у не являющегося человеком животного (например, у мышей, крыс, кроликов или обезьян).

Термин "специфическое связывание" относится к связыванию двух молекул (например, лиганда и рецептора), характеризующемуся тем, что одна молекула (например, лиганд) способна связываться с другой конкретной молекулой (например, рецептором) даже в присутствии многих других различных молекул, т.е. к способности одной молекулы предпочтительно связываться с другой молекулой в смеси гетерогенных молекул. Специфическое связывание лиганда с рецептором также может быть подтверждено, если связывание детектируемого меченого лиганда с рецептором ослабляется в присутствии избытка немеченых лигандов (т.е. при проведении анализа конкурентного связывания).

Термин "статистически значимый" означает значение $p < 0,05$, предпочтительно $< 0,01$, наиболее предпочтительно $< 0,001$.

Термин "функциональный вариант" относится к варианту, имеющему такую(ое) же или схожую(ее) биологическую(ое) функцию и свойство, что и исходный вариант. В качестве неограничивающего примера, "функциональный вариант" может быть получен посредством выполнения одной или нескольких консервативных замен в исходном варианте.

Термин "участвующий в интернализации пептид", также известный как облегчающий проникновение в клетку пептид, широко используется в области белковых лекарственных средств, и его действие направлено на облегчение захвата и поглощения клетками активного пептида, связанного с участвующим в интернализации пептидом. В качестве неограничивающего примера, участвующим в интернализации пептидом может быть пептид Tat (трансактиватор транскрипции). Одним из неограничивающих примеров пептидов Tat является YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2).

Согласно первому аспекту в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая пептид, регулирующий pH агент и наполнитель, где пептид содержит аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант. В данном описании пептид также обозначается как "активный пептид", который действует в качестве активной группировки в химерных пептидах по настоящему изобретению для лечения повреждений центральной нервной системы или для использования в качестве нейропротекторного агента.

Согласно существующим исследованиям, некоторые активные пептиды, которые ингибируют взаимодействие между NMDAR и PSD-95, имеют в своей основе структуру NMDAR. Например, NMDAR2B

(идентификационный номер (ID) в GenBank 4099612) имеет 20 аминокислот FNGSSNGHVY-EKLSLESDV на своем С-конце и мотив PL (связывающийся с лигандом домена PDZ), состоящий из ESDV. Некоторые известные активные пептиды содержат на С-конце часть аминокислотной последовательности из NMDAR2B, тем самым конкурентно ингибируя взаимодействие PSD-95 с NMDAR2B. На основании исследований высказано предположение, что сегмент ESDV или LESDV в упомянутых выше пептидах играет важную роль в ингибировании взаимодействия между NMDAR и PSD-95. Не будучи связанными с какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения неожиданным образом обнаружили, что активный пептид YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1), описанный в настоящей заявке (который не содержит двух остатков SS после KL по сравнению с С-концевой аминокислотной последовательностью описанного выше NMDAR2B и имеет аминокислотную последовательность YEKL, простирающуюся от N-конца мотива PL), усиливает взаимодействие активного пептида с доменом PDZ1/2. В то же время сегмент LDTEI на С-конце пептида по сравнению с мотивом YEKL может быть модифицирован, и ожидается, что такая модификация не затронет активности активного пептида или даже может повысить его активность. Соответственно, в некоторых воплощениях функциональный вариант, предложенный в данном изобретении, представляет собой вариант, образуемый посредством одной или более чем одной консервативной замены в сегменте LDTEI в SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях консервативная замена выбрана из группы, состоящей из замены между D и E, замены среди L, V и I и замены между T и S.

В некоторых конкретных воплощениях функциональный вариант представляет собой вариант, образуемый посредством замены сегмента LDTEI в SEQ ID NO: 1 на последовательность, выбранную из группы, состоящей из LDTEL, LDTEV, LDTDI, LDTDV, LDSEI, LDSEL, LDSEV, LDSDI, LDSDL, LDSDV, LETEI, LETEL, LETEV, LETDI, LETDL, LETDL, LETDL, LETDL, LETDL, LETDL, LETDL, IDTEI, IDTEL, IDTEV, IDTDI, IDTDL, IDTDV, IETEI, IETEL, IETEV, IETDI, IETDL, IETDL и IETDV.

В некоторых воплощениях функциональные варианты, описанные в настоящей заявке, также содержат аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или даже больше пептидам, которые упомянуты выше. В данной области техники известно, что "идентичность" между двумя белками может быть определена путем выравнивания аминокислотной последовательности первого белка с последовательностью второго белка, который содержит консервативные аминокислотные замены по сравнению с первым белком. Уровень идентичности между двумя белками можно определить, используя компьютерные алгоритмы и способы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Идентичность двух аминокислотных последовательностей предпочтительно определяют, используя алгоритм BLASTP (средство поиска основного локального выравнивания для пептидов).

В некоторых воплощениях функциональные варианты, описанные в настоящей заявке, включают варианты, имеющие замены, делеции, добавки и/или вставки аминокислотных остатков в 1, 2, 3, 4, 5 или более положений по сравнению с пептидами, которые упомянуты выше, отличаясь тем самым от конкретных пептидов, описанных выше.

Как описано выше, функциональный вариант может отличаться от конкретного описанного выше пептида одной или несколькими заменами, делециями, добавками и/или вставками. Такие варианты могут иметь природное происхождение или могут быть получены путем синтеза. Например, одну или более чем одну из описанных выше пептидных последовательностей, раскрытых в настоящей заявке, можно модифицировать, и ее биологические активности можно оценить с использованием любого из разнообразных методов, хорошо известных в данной области техники, которые описаны в настоящей заявке.

В некоторых воплощениях пептид представляет собой химерный пептид, содержащий аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант, и участвующий в интернализации пептид, где участвующий в интернализации пептид способен облегчать захват химерного пептида клеткой.

Специалистам в данной области техники следует понимать, что основная цель включения активного пептида и участвующего в интернализации пептида в химерный пептид заключается в улучшении доставки активного пептида к мишени, на которую он действует. Поэтому участвующие в интернализации пептиды, подходящие для настоящей заявки, не ограничиваются конкретными типами при условии достижения цели, заключающейся в проникновении в клетку или интернализации. Специалистам в данной области техники также следует понимать, что поскольку мишени действия активного пептида расположены главным образом внутри нервных клеток, предпочтительно, чтобы участвующий в интернализации пептид подходил в особенности для нервных клеток. В некоторых воплощениях участвующим в интернализации пептидом может быть пептид Tat. В некоторых воплощениях аминокислотной последовательностью пептида Tat является YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2). В некоторых воплощениях химерный пептид содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRRYEKLLDTEI (SEQ ID NO: 3).

Должно быть очевидно, что участвующий в интернализации пептид может быть присоединен к активному пептиду через амидную связь с образованием слитого пептида, но они также могут быть соединены другим подходящим способом, например, в результате которого образуется химическая связь. Ре-

акция сочетания двух компонентов может быть осуществлена с применением агента сочетания или конъюгирующего агента. В продаже имеется большое количество таких реагентов и информацию о них можно найти в S.S. Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991). Некоторые примеры реагентов для перекрестного сшивания включают N-сукцинимид-3-(2-пиридиндитио)пропионат (SPOP) или N,N'-(1,3-фенилен)бисмалеимид; N,N'-этилиден-бис-(иодацетамид) или другие подобные реагенты, имеющие от 6 до 11 углеродных метиленовых мостиков, (которые относительно специфичны к тиоловым группам) и 1,5-дифтор-2,4-динитробензол (который образует необратимым образом связь, взаимодействуя с аминогруппой и с тирозиновой группировкой). Другие реагенты для перекрестного сшивания включают P,P'-дифтор-m,m'-динитродифенилсульфон (который образует необратимым образом поперечную связь, взаимодействуя с аминогруппой и фенольной группой); диметил-диэтиламингексаноат (специфичный к аминогруппе); фенол-1,4-дисульфонилазид (который взаимодействует главным образом с аминогруппой); 1,6-гексаметилендиизоцианат или -диизотиоцианат либо фенилазо-п-диизоцианат (который взаимодействует главным образом с аминогруппой); глутаровый альдегид (который взаимодействует с некоторыми различными боковыми цепями) и бис-диазотированный бензидин (который взаимодействует главным образом с тирозином и гистидином).

Кроме того, описанные выше пептиды возможно могут быть модифицированными (например, ацетилированными, фосфорилированными и/или гликозилированными) для повышения их аффинности к ингибиторам, усиления способности ингибиторов пересекать клеточные мембраны или повышения их стабильности.

Активный пептид и слитый пептид, в котором активный пептид сшит с участвующим в интернализации пептидом по настоящему изобретению, могут быть синтезированы методами твердофазного синтеза или рекомбинантными методами. Пептидомиметики могут быть синтезированы с использованием ряда протоколов и методов, описанных в научной и патентной литературе, как например, в *Organic Syntheses Collective Volumes*, Gilman et al. (ed.) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) *Mol. Biotechnol.*, 9: 205-223; Hruba (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1: 114-119; Ostergaard (1997) *Mol. Divers.*, 3: 17-27; Ostresh (1996) *Methods Enzymol.*, 267:220-234.

В некоторых воплощениях регулирующий pH агент выбран из группы, состоящей из гистидинового буфера, аргининового буфера, буфера на основе сукцината натрия, буфера на основе сукцината калия, буфера на основе цитрата натрия, глюконатного буфера, ацетатного буфера, фосфатного буфера, трибуфера и любой их комбинации. В некоторых воплощениях регулирующий pH агент выбран из группы, состоящей из буфера на основе лимонной кислоты/двузамещенного фосфата натрия и гистидинового/аргининового буфера. В некоторых воплощениях регулирующий pH агент выбран из группы, состоящей из гистидинового/аргининового буфера.

В некоторых воплощениях pH композиции составляет от примерно 5,5 до 8 (например, примерно 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8). В некоторых воплощениях pH композиции составляет от примерно 6 до 7,5. В некоторых воплощениях pH композиции составляет от примерно 6 до 7. В некоторых воплощениях pH композиции составляет от примерно 6,5 до 7. В некоторых воплощениях pH композиции составляет примерно 6,5.

В некоторых воплощениях количество гистидина/аргинина в гистидиновом/аргининовом буфере составляет от примерно 1 до 10% по массе (например, примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10%). В некоторых воплощениях количество гистидина/аргинина в гистидиновом/аргининовом буфере составляет от примерно 3 до 10%.

В некоторых воплощениях наполнитель выбран из группы, состоящей из трегалозы, маннита, глюкозы, лактозы, циклодекстрина, декстрана-40, сорбита, сахарозы, глицина и любой их комбинации. В некоторых воплощениях наполнитель выбран из группы, состоящей из трегалозы, маннита, глюкозы, лактозы и любой их комбинации. В некоторых воплощениях наполнитель представляет собой трегалозу.

В некоторых воплощениях соотношение масс пептида и трегалозы составляет от примерно 1:0,05 до 1:10. В некоторых воплощениях соотношение масс пептида и трегалозы составляет от примерно 1:0,5 до 1:5. В некоторых воплощениях соотношение масс пептида и трегалозы составляет от примерно 1:0,8 до 1:3. В некоторых воплощениях соотношение масс пептида и трегалозы составляет примерно 1:1.

В некоторых воплощениях наполнитель представляет собой трегалозу, а регулирующий pH агент представляет собой гистидиновый/аргининовый буфер.

В некоторых воплощениях соотношение масс пептида и трегалозы составляет примерно 1:1.

В некоторых воплощениях pH композиции составляет примерно $6,5 \pm 0,5$.

В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит криопротектор и/или поверхностно-активное вещество, предпочтительно криопротектор представляет собой полиэтиленгликоль, и/или поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, предпочтительно полисорбат 20 или полисорбат 80.

В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит ингибитор дезамидирования.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция находится в форме предварительно лиофилизированной композиции, или в форме лиофилизированной композиции, или в форме восстановленной композиции, приготовленной путем объединения лиофилизированной композиции с водным раствором.

В некоторых воплощениях введение композиции может представлять собой парентеральное, внут-

ривенное, подкожное, интраартериальное введение, введение в интракраниальное пространство, интра-текальное, внутривentricularное, местное, интраназальное или внутримышечное введение. Внутривенное введение является предпочтительным.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция для парентерального введения предпочтительно является стерильной и по существу изотонической. В случае инъекций, композиция, содержащая активный пептид или химерный пептид, может быть приготовлена в водном растворе, предпочтительно в физиологически совместимом буфере, таком как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический раствор, или в ацетатном буфере (для уменьшения дискомфорта в местах инъекций). Раствор может содержать такие формирующие композицию агенты, как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Помимо описанных выше композиций композиция, содержащая активный пептид или химерный пептид, также может быть приготовлена в виде препарата резервуарного типа. Такие длительно действующие композиции можно вводить путем имплантации (например, под кожу или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Так, например, данное соединение может быть приготовлено в композиции с подходящим полимерным или гидрофобным материалом (например, приготовлено в виде эмульсии в приемлемом масле) либо с ионообменной смолой или приготовлено в виде умеренно растворимого производного, например, умеренно растворимой соли.

В некоторых воплощениях, поскольку активные пептиды или химерные пептиды, описанные в настоящей заявке, могут содержать заряженные боковые цепи или концы, они могут быть включены в любую из упомянутых выше композиций в виде свободной кислоты или основания либо в виде фармацевтически приемлемой соли. Фармацевтически приемлемые соли могут представлять собой соли, которые по существу сохраняют биологическую активность свободного основания и которые образуются в результате взаимодействия с неорганическими кислотами. Как правило, фармацевтические соли более растворимы в воде и других протонных растворителях, чем соответствующие формы свободного основания.

Активный пептид или химерный пептид используют в количестве, эффективном для осуществления предусмотренного назначения (например, для уменьшения повреждающего эффекта в результате повреждений, вызванных инсультом, и связанных с ними состояний). Терапевтически эффективное количество означает количество активного пептида или химерного пептида, достаточное для значительного ослабления повреждений, вызванных инсультами у пациентов (или в популяции модельных животных), получающих лечение активным пептидом или химерным пептидом, раскрытых в настоящей заявке, по сравнению с повреждением центральной нервной системы в контрольной популяции пациентов (или модельных животных), не подвергаемых лечению активным пептидом или химерным пептидом, раскрытых в настоящей заявке. Если подвергаемый лечению пациент достигает лучшего результата по сравнению со средним результатом (определяемым по объему инфаркта или степени утраты трудоспособности) в сопоставимой контрольной популяции пациентов, не подвергаемых лечению способами, описанными в настоящей заявке, то это количество также считается терапевтически эффективным. Терапевтически эффективным количеством также считается количество, если у подвергнутого лечению пациента отмечают степень утраты трудоспособности по шкале Рэнкина, составляющую 2 балла или меньше, а также 75 баллов или больше по шкале Бартел. Если у популяции подвергнутого лечению пациентов отмечают значительно улучшенное распределение баллов по шкале утраты трудоспособности (т.е. меньшую утрату трудоспособности) по сравнению с сопоставимыми не подвергнутыми лечению популяциями, то такая доза также считается терапевтически эффективной, см. Lees et al., N. Engl. J. Med., 2006, 354: 588-600. Терапевтически эффективный режим приема представляет собой сочетание терапевтически эффективной дозы и частоты введения, необходимых для осуществления указанного выше назначения. Обычно может быть достаточно однократной дозы.

В некоторых воплощениях предпочтительный диапазон доз содержит от 0,001 до 20 мкмоль активного пептида или химерного пептида на кг массы тела пациента в интервале 6 часов после приступа инсульта, возможно от 0,03 до 3 мкмоль активного пептида или химерного пептида на кг массы тела пациента. В некоторых способах вводят 0,1-20 мкмоль активного пептида или химерного пептида на кг массы тела пациента в интервале 6 часов. В некоторых способах вводят 0,1-10 мкмоль активного пептида или химерного пептида на кг массы тела пациента вводят в интервале 6 часов и более предпочтительно вводят примерно 0,3 мкмоль активного пептида или химерного пептида на кг массы тела пациента в интервале 6 часов. В других случаях диапазон доз составляет от 0,005 до 0,5 мкмоль активного пептида или химерного пептида на кг массы тела пациента. Дозу для крыс, рассчитанную на один кг массы тела, можно пересчитать для людей, путем деления на 6,2, чтобы адаптировать к разным соотношениям площади поверхности и массы. Выраженная в граммах подходящая доза активного пептида или химерного пептида для применения на людях может составлять от 0,01 до 100 мг/кг массы тела пациента, или, более предпочтительно, от 0,01 до 30 мг/кг массы тела пациента, или от 0,01 до 10 мг/кг, или от 0,01 до 1 мг/кг.

В некоторых воплощениях вводимое количество активного пептида или химерного пептида зависит от подвергаемого лечению субъекта, массы субъекта, выраженности боли, режима введения и коррективов, назначаемых лечащим врачом. Лечение может быть повторено, когда симптомы обнаруживаются или даже не обнаруживаются. Лечение может быть предоставлено в виде монотерапии или в виде ком-

бинации с другими лекарственными средствами.

В некоторых воплощениях терапевтически эффективная доза активного пептида или химерного пептида, описанного в настоящей заявке, способна обеспечить терапевтическую пользу, не вызывая значительной токсичности. Токсичность химерного пептида можно определить на клеточных культурах или экспериментальных животных, используя стандартные фармацевтические методики, например, путем определения LD₅₀ (дозы, вызывающей гибель 50% объектов в популяции) или LD₁₀₀ (дозы, вызывающей гибель 100% популяции). Соотношение доз для получения токсического эффекта и терапевтического эффекта представляет собой терапевтический индекс. Предпочтительны химерные пептиды или пептидомиметики, демонстрирующие высокие терапевтические индексы (см., например, Fingl и др., 1975, в *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, часть 1, страница 1).

В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию используют для лечения, облегчения симптомов или предупреждения повреждения нервной системы либо заболевания или боли, вызванного(ой) повреждением нервной системы, или используют в качестве нейропротекторного агента. В некоторых воплощениях повреждение нервной системы представляет собой повреждение, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, при этом такое повреждение локализуется в периферической нервной системе или центральной нервной системе.

В некоторых воплощениях повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного мозга или спинного мозга, повреждения нейрона в центральной нервной системе (ЦНС), в том числе острого повреждения ЦНС, ишемического инсульта или повреждения спинного мозга, гипоксии, ишемического или механического повреждения и повреждения, вызванного нейродегенеративным заболеванием, тревожным расстройством, эпилепсией или инсультом. В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию используют для лечения, облегчения симптомов или предупреждения повреждения нервной системы, вызванного ишемическим инсультом.

Инсульт представляет собой состояние, вызванное нарушением кровотока в ЦНС. Возможные причины включают эмболию, кровоизлияние и тромбоз. Некоторые нервные клетки отмирают сразу вследствие нарушения кровотока. Эти клетки высвобождают составляющие их молекулы (включая глутаминовую кислоту), которые в свою очередь активируют NMDA-рецептор, что повышает уровни внутриклеточного кальция и уровни внутриклеточных ферментов, и это приводит к гибели большего числа нервных клеток (каскадному усилению возбуждающей нейротоксичности). Отмирание тканей ЦНС называется инфарктом. Объем инфаркта (т.е. объем погибших нервных клеток в головном мозге, гибель которых вызвана инсультом) можно использовать в качестве индикатора степени патологических повреждений, вызванных инсультом. Симптоматические эффекты зависят как от объема инфаркта, так и от места локализации инфаркта в головном мозге. Индекс утраты трудоспособности можно использовать в качестве показателя симптоматических повреждений, например, показатель исходов инсульта по шкале Рэнкина (Rankin, *Scott. Med. J.*, 2: 200-15 (1957)) и индекс Бартел.

Шкала Рэнкина основана на непосредственной оценке системного состояния пациента и выглядит следующим образом:

- 0: полностью отсутствуют симптомы;
- 1: симптомы имеются, но наблюдается несущественная утрата трудоспособности; пациент способен выполнять всю повседневную работу и все обычные действия;
- 2: незначительная утрата трудоспособности; пациент не в состоянии выполнять все предыдущие действия, но способен ухаживать за собой без посторонней помощи;
- 3: умеренная утрата трудоспособности, требующая некоторой помощи, но пациент в состоянии ходить без посторонней помощи;
- 4: умеренно тяжелая утрата трудоспособности, пациент не в состоянии ходить без посторонней помощи и не способен удовлетворять свои собственные телесные потребности без посторонней помощи;
- 5: тяжелая утрата трудоспособности; пациент прикован к постели, имеет недержание мочи и кала, а также требует постоянного ухода и внимания.

Определение индекса Бартел основывается на ряде вопросов о способности пациента выполнять 10 основных видов повседневной жизнедеятельности, которые оцениваются в баллах от 0 до 100, при этом более низкие баллы указывают на большую степень утраты трудоспособности (Mahoney et al., *Maryland State Medical Journal*, 14: 56-61 (1965)).

Альтернативно, степень тяжести/исход инсульта можно измерить, используя шкалу оценки инсульта Национального института здравоохранения (NIH), которая доступна во всемирной компьютерной сети по адресу ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_Scale_Booklet.pdf. Эта шкала основана на способности пациента выполнять 11 наборов функций и включает оценку уровней осознания, двигательных функций, ощущений и речевых функций пациента.

Ишемический инсульт более четко определяется как тип инсульта, вызываемого блокированием кровотока в головном мозге. Возможная патология таких закупорок чаще всего связана с появлением жировых отложений вдоль стенок кровеносных сосудов. Это состояние называется атеросклерозом. Та-

кие жировые отложения могут быть причиной двух типов обструкции. Церебральный тромбоз относится к образованию тромба в закупоренной части кровеносного сосуда. Термин "эмболия головного мозга" обычно означает, что в мозговую артерию вместе с кровотоком попадают различные циркулирующие в крови эмболы (такие как пристеночный тромб в сердце, атеросклеротическая бляшка, жир, опухолевые клетки, волокнистая хрящевая ткань или воздух), что блокирует кровеносные сосуды. Когда для компенсации недостаточно коллатерального кровообращения, это вызывает ишемический некроз ткани головного мозга, которую артерия снабжает кровью, и очаговое неврологическое нарушение. Второй важной причиной эмболии является нерегулярное сердцебиение, называемое фибрилляцией предсердий. Оно вызывает состояние, при котором в сердце может образоваться сгусток крови, а затем он смещается и переносится в головной мозг. Другими возможными причинами ишемического инсульта являются кровоизлияние, тромбоз, разрыв артерий или вен, остановка сердца, шок по любым причинам (включая кровоизлияние) и причины, обусловленные ятрогенными факторами, такие как повреждения кровеносных сосудов головного мозга или кровеносных сосудов, идущих в головной мозг, в результате непосредственного хирургического вмешательства, или операция на сердце. На ишемический инсульт приходится приблизительно 83% от всех случаев инсульта.

Некоторые другие неврологические расстройства также могут вызывать гибель нейронов через NDMAR-опосредуемую возбуждающую нейротоксичность. Эти расстройства включают нейродегенеративные заболевания, тревожное расстройство, эпилепсию, гипоксию, повреждение ЦНС, нерелевантное инсульту, такое как травматическое повреждение головного мозга и повреждение спинного мозга. Соответственно, в некоторых воплощениях фармацевтическую композицию используют для лечения, облегчения симптомов или предупреждения нейродегенеративных заболеваний, тревожного расстройства или эпилепсии, при этом нейродегенеративные заболевания могут включать болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь Паркинсона или болезнь Гентингтона.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция находится в форме предварительно лиофилизированной композиции, или лиофилизированной композиции, или восстановленной композиции, полученной путем объединения лиофилизированной композиции с водным раствором.

Согласно второму аспекту в настоящей заявке предложен способ лечения, облегчения симптомов или предупреждения повреждения нервной системы и заболевания или боли, ассоциированного(ой) с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревожного расстройства или эпилепсии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, как она описана в первом аспекте.

В некоторых воплощениях повреждение нервной системы, вызываемое возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного мозга или спинного мозга, повреждения нейрона в центральной нервной системе (ЦНС), в том числе острого повреждения ЦНС, ишемического инсульта или повреждения спинного мозга, гипоксии, ишемического или механического повреждения и повреждения, вызываемого нейродегенеративным заболеванием, тревожным расстройством, эпилепсией или инсультом.

В некоторых воплощениях нейродегенеративное заболевание включает болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь Паркинсона или болезнь Гентингтона.

В некоторых воплощениях субъектом является субъект, страдающий от ишемического инсульта. В некоторых воплощениях введение фармацевтической композиции, которая описана в первом аспекте, может уменьшать объем участка церебрального инфаркта, вызываемого церебральной ишемией.

Согласно третьему аспекту в настоящей заявке предложено применение фармацевтической композиции, которая описана в первом аспекте, в изготовлении лекарственного средства для лечения, облегчения симптомов или предупреждения повреждения нервной системы и заболевания или боли, ассоциированного(ой) с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревожного расстройства или эпилепсии, либо в изготовлении нейропротекторного агента.

В некоторых воплощениях повреждение нервной системы, вызываемое возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного мозга или спинного мозга, повреждения нейрона в центральной нервной системе (ЦНС), в том числе острого повреждения ЦНС, ишемического инсульта или повреждения спинного мозга, гипоксии, ишемического или механического повреждения и повреждения, вызываемого нейродегенеративным заболеванием, тревожным расстройством, эпилепсией или инсультом.

В некоторых воплощениях нейродегенеративное заболевание включает болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь Паркинсона или болезнь Гентингтона.

В некоторых воплощениях лекарственное средство используют для лечения, облегчения симптомов или предупреждения повреждения нервной системы, вызываемое ишемическим инсультом.

Следует понимать, что приведенное выше подробное описание ставит своей целью только помочь специалистам в данной области техники более четко понять настоящую заявку, но оно не предназначено для ограничения каким-либо образом настоящей заявки. Специалисты в данной области техники могут

выполнить различные модификации и изменения к описанным воплощениям.

Примеры

Следующие примеры приведены только для иллюстрации некоторых воплощений настоящего изобретения без какой-либо цели ограничения сущности изобретения.

Пример 1. Скрининг молекул активного пептида.

На основании описанных результатов исследования был выбран трансмембранный пептид Tat YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), и его лигировали с различным количеством аминокислот, получая библиотеку пептидов. Молекулы химерных пептидов в библиотеке пептидов тестировали на предмет взаимодействия с доменом PDZ1/2, экспрессированным и очищенным *in vitro*, и проводили предварительный скрининг полипептидов в отношении силы взаимодействия.

Присоединенная к неподвижной фазе молекула (лиганд) представляла собой белок PDZ1/2 с молекулярной массой приблизительно 20 кДа в концентрации 2 мг/мл. Молекула подвижной фазы (аналит) представляла собой предназначенный для скрининга полипептид с молекулярной массой приблизительно 2 кДа в концентрации 10 мг/мл. Для фиксации применяли чип CM5 (чип с карбоксиметилированным декстраном), используя прибор Biorad 3000. В качестве буфера для электрофореза использовали PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) с 0,005% твина 20. Фиксацию осуществляли с применением метода аминсочетания. Концентрация лиганда составляла 10 мкг/мл. Буфером для фиксации служил буфер на основе 10 mM раствора ацетата натрия, pH 4,0. Количество, которое фиксировали в проточной ячейке 2, составляло 1400 RU. Используемая скорость потока составляла 10 мкл/мл, и лиганд загружали в течение 1 минуты. Для регенерации использовали 10 mM раствор Gly при pH 2,0-2,5. Регенерацию проводили при скорости потока 30 мкл/мин. Время загрузки составляло 30 с.

Кинетический анализ проводили, используя следующие условия:

контрольный канал: проточная ячейка 1;

буфер для электрофореза: PBS;

режим: кинетический анализ Wizard;

градиенты концентрации: 6,25 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 400 нМ;

время загрузки: 1 мин;

время диссоциации: 2 мин; и

скорость потока: 30 мкл/мин.

Аппроксимацию данных осуществляли, используя программное обеспечение для аппроксимации Biaevaluation 4.1. Аппроксимационная модель представляла собой модель связывания в отношении 1:1. Значение константы диссоциации (KD) обратно пропорционально силе взаимодействия.

В результате проведения скрининга получен химерный пептид, проявляющий сильную способность к взаимодействию с доменом PDZ1/2 и получивший название P5. Последовательность химерного пептида показана ниже:

P5: YGRKKRRQRRRYEKLLDTEI (SEQ ID NO: 3).

Чтобы провести непосредственное сравнение с аналогичным химерным пептидом из приведенных исследований, применяли контрольный химерный пептид NA-1 со следующей последовательностью:

NA-1: YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO: 4).

Помимо этого, с целью сравнения P5 с NA-1 в отношении их структурных различий, дополнительно применяли химерный пептид YE-NA-1, имеющий два остатка YE, добавленные к N-концу активного пептида в составе химерного пептида NA-1, и его последовательность показана ниже:

YE-NA-1: YGRKKRRQRRRYEKLLSSIESDV (SEQ ID NO: 5).

Химерные пептиды NA-1, YE-NA-1 и P5 подвергали параллельному тестированию на предмет взаимодействия с доменом PDZ1/2, как упомянуто выше, и результаты показаны ниже в табл. 1.

Таблица 1

Детектирование силы взаимодействия каждого из трех химерных пептидов с доменом PDZ1/2

| Химерные пептиды | NA-1 | YE-NA-1 | P5 |
|------------------|----------|----------|----------|
| KD (M) | 7,53E-08 | 5,44E-08 | 2,99E-08 |

Как показано в табл. 1, химерные пептиды YE-NA-1 и P5 с большей силой взаимодействовали с доменом PDZ1/2, чем контрольный химерный пептид NA-1, и лучшими оказались показатели у P5. Таким образом, авторы изобретения предположили, что два дополнительных аминокислотных остатка YE на N-конце активного пептида оказывали определенное улучшающее действие на взаимодействие полипептида с доменом PDZ1/2. Кроме того, в P5 отсутствовали два остатка серина (SS), обладающие слабой гидрофобностью по сравнению с карбоксильным концом YE-NA-1. Основываясь на этом, авторы изобретения предположили, что это может дополнительно усиливать взаимодействие полипептида с доменом PDZ1/2.

Для дальнейшего тестирования в последующих экспериментах был выбран химерный пептид P5, и в некоторых экспериментах в качестве контролей использовали NA-1 и YE-NA-1.

Пример 2. Анализ с соосаждением для проверки взаимодействия P5 с доменом PDZ1/2.

Для подтверждения того, что P5 может взаимодействовать с доменом PDZ1/2, проводили анализ анализом с соосаждением.

Колонку уравнивали 100 мкл His-гранул и 1 мл буфера для металл-хелатной аффинной хроматографии (МСАС)-0 в течение 5 мин и встряхивали при 4°C. Смесь центрифугировали при 5000 г в течение 1 минуты при 4°C и супернатант отбрасывали. К смеси добавляли 1 мг белка PDZ1/2 и добавляли буфер до достижения объема 1 мл. Смесь вращали в течение 1 часа при 4°C для осуществления связывания. Смесь центрифугировали при 5000 г в течение 1 минуты при 4°C и супернатант отбрасывали. Смесь промывали три раза, каждый раз используя 1 мл буфера МСАС-0, в течение 5 минут (при 4°C, промывая со встряхиванием). К смеси добавляли 1 мг белка P5 и добавляли буфер до достижения объема 1 мл. Смесь вращали в течение 2 часов при 4°C для осуществления связывания. Смесь центрифугировали при 5000 г в течение 1 минуты при 4°C и супернатант отбрасывали. Смесь промывали три раза, каждый раз используя 1 мл буфера для лизиса, в течение 5 минут (при 4°C, промывая со встряхиванием). После промывки добавляли 20 мкл МСАС-300. После центрифугирования отбирали элюат для анализа посредством электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Результаты эксперимента показаны на фиг. 1.

Как показано на фиг. 1, и P5, и домен PDZ1/2 содержались в единой элюированной фракции, соответствующей химерному пептиду P5, что тем самым является подтверждением способности химерного пептида P5 связываться с доменом PDZ1/2.

Пример 3. Терапевтический эффект химерного пептида в крысиной модели МСАО.

Метод подготовки и стандарт оценки МСАО.

Модель очаговой церебральной ишемии-реперфузии получали в соответствии с методом перевязывания для создания обратимой окклюзии средней мозговой артерии (МСАО), предложенным Лонги с модификациями, учитывающими анатомическую структуру головного мозга крыс. Крыс подвергали анестезии посредством внутривенного введения 10%-ного хлоральгидрата в дозе 0,3 мл/кг. После анестезирования делали разрез по средней линии шейной области и открывали доступ к общей сонной артерии (ССА), наружной сонной артерии (ЕСА) и птеригопалатиновой артерии. Рабочую часть (0,5 см) моноволоконной нейлоновой лески (0,26 мм) покрывали парафином и на расстоянии 20 мм делали отметку. Всем крысам леску вставляли через разрез правой ССА, а птеригопалатиновую артерию временно пережимали для предотвращения неправильной вставки. Длина применяемой для окклюзии лески составляла примерно 18-20 мм от места разветвления ССА в зависимости от массы животного, тем самым осуществляли окклюзию средней мозговой артерии с правой стороны. Затем кожу зашивали, и самый конец применяемой для окклюзии лески частично фиксировали на коже. По окончании периода ишемии продолжительностью 2 часа применяемую для окклюзии леску осторожно извлекали для осуществления реперфузии. Стадии данной процедуры для контрольной группы имитации были такими же, что и группе с хирургическим вмешательством, за исключением введения нейлоновой лески. Температуру тела поддерживали при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в продолжение периода ишемии и в течение 2 ч после реперфузии. Показателем успешного выполнения данной модели является то, что крысы после пробуждения от анестезии демонстрировали парализованную левую конечность, неустойчивость в стоячем положении и разворачивание в одну сторону при подъеме их хвостов вверх.

Признаки неврологической патологии оценивали по 5-бальному методу Лонги и Бедерсона через 24 ч после пробуждения животных от анестезии:

- 0: отсутствие какого-либо симптома повреждения нервов;
- 1: неспособность полностью вытягивать противоположную переднюю лапу;
- 2: разворачивание в противоположную сторону;
- 3: опрокидывание в противоположную сторону;
- 4: неспособность к самостоятельному хождению и потеря сознания.

Чем более высоким был балл, тем более тяжелой была форма поведенческого расстройства у животного.

Экспериментальные животные и материалы.

В качестве животных использовали самцов взрослых крыс Sprague Dawley (SD; Vittal) массой тела 220-250 г со статусом беспатогенности (SPF).

Используемые инструменты включали одни прямые ножницы, двое ножниц для глазной хирургии, четыре изогнутых зажима, хирургические нити №4, №5, трехгранные иглы размером 6×17, применяемая для окклюзии леска (диаметром 0,26 мм) и одноигльные держатели. Используемые агенты включали Enbipru-содержащий раствор хлорида натрия для инъекций (Shijiazhuang Group NBP Pharmaceutical Co., Ltd.), хлоральгидрат, фуросемид (20 мг/флакон), гентамицина сульфат (80 мг/флакон), ватные тампоны и медицинские поддоны. Тестируемые пептиды синтезировали в Kingsray Biotech Inc..

Разделение на экспериментальные группы.

Экспериментальных животных разделяли на группу отрицательного контроля, группу имитации, группу модельных животных, группу, получающую положительное контрольное лекарственное средство

Enbipu, группу NA-1, группу YE-NA-1 и группу P5. Физиологический раствор, положительное лекарственное средство Enbipu, NA-1 (10 мг/кг), YE-NA-1 (10 мг/кг) и P5 (10 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг), соответственно, вводили инъекцией каждой отдельной группе крыс через хвостовую вену через 1 ч после ишемии. Группе нормальных животных и группе имитации никакого лекарственного средства не вводили.

Расчет объема инфаркта.

После подсчета баллов крыс умерщвляли путем декапитации. Ткани головного мозга быстро извлекали и помещали в холодильник при -20°C . Через 10 мин ткани помещали в условия комнатной температуры. Образцы головного мозга помещали в форму для получения срезов головного мозга крыс. После извлечения обонятельной луковицы, мозжечка и нижнего отдела ствола головного мозга в образцах головного мозга делали по 5 фронтальных разрезов, получая шесть прилегающих друг к другу необработанных фронтальных срезов толщиной 2 мм в профиле. Далее эти секции головного мозга быстро помещали в 5 мл раствора, содержащего 2% ТТС, и инкубировали при 37°C в течение 30 мин в темноте, в течение которых срезы головного мозга переворачивали один раз каждые 5 минут. При окрашивании с использованием ТТС ткань нормальных животных будет становиться розово-красной, а поврежденная инфарктом ткань не будет окрашиваться и будет оставаться белой. Каждую группу срезов головного мозга аккуратно расставляли и фотографировали. Фотографии обрабатывали, используя системное программное обеспечение для анализа изображений, и проводили статистический анализ. Рассчитывали площадь зоны инфаркта для каждого среза головного мозга и умножали ее на толщину каждого среза головного мозга (2 мм). Результаты, полученные при умножении площади зоны инфаркта индивидуального среза головного мозга на толщину, суммировали, получая объем церебрального инфаркта для каждого животного. Объемы выражали в процентном отношении с учетом каждого полушария головного мозга для устранения эффектов отека головного мозга.

Результаты эксперимента.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 2. Статистическую гистограмму данных объема церебрального инфаркта, показанную на фиг. 3, строили на основании статистического анализа данных объема церебрального инфаркта на фиг. 2, и конкретные статистические данные объема церебрального инфаркта приведены ниже в табл. 2. Эти результаты показали, что терапевтическое введение и профилактическое введение пептида P5 в самой высокой дозе (10 мг/кг) может значительно уменьшать объем церебрального инфаркта у крыс, перенесших церебральную ишемию, примерно на 50% ($p < 0,01$), в то время как в группе, получающей положительное лекарственное средство Enbipu, наблюдали уменьшение только примерно на 16% ($p < 0,01$), в группе NA-1 наблюдали уменьшение примерно на 16% ($p < 0,01$) и в группе YE-NA-1 наблюдали уменьшение примерно на 26% ($p < 0,01$). Терапевтическое введение и профилактическое введение пептида P5 во второй высокой дозе (3 мг/кг) также необходимым образом снижало объем церебрального инфаркта. Помимо этого, данные показали, что величина объема инфаркта снижалась при увеличении дозы пептида P5, что указывает на то, что терапевтический эффект положительно коррелировал с дозой лекарственного средства. Терапевтический эффект полипептида YE-NA-1 был значительно сильнее эффекта, наблюдаемого для NA-1. Основываясь на этом, авторы изобретения предполагают, что добавление двух аминокислот YE может приводить к более сильному терапевтическому эффекту по сравнению с эффектом NA-1 за счет улучшения взаимодействия полипептида с доменом PDZ1/2.

Таблица 2

Терапевтический эффект полипептида P5 на крысах в модели MCAO

| Группы | Среднее значение объема инфаркта в процентном отношении (%) | Стандартное отклонение | Уменьшение объема инфаркта в процентном отношении по сравнению с группой модельных животных | t-критерий по сравнению с группой модельных животных | t-критерий по сравн. с P5 в дозе 10 мг/кг |
|----------------------------|---|------------------------|---|--|---|
| Группа нормальных животных | 0 | 0 | | | |
| Группа имитации | 0 | 0 | | | |

| | | | | | |
|---|-------|------|-------|--------|--------|
| Группа модельных животных | 45,96 | 3,35 | | | |
| Группа, получающая положительное лекарственное средство Епвіри | 38,61 | 3,21 | 15,99 | p<0,01 | |
| NA-I в дозе 10 мг/кг | 38,56 | 2,25 | 16,10 | p<0,01 | p<0,01 |
| УЕ-NA-1 в дозе 10 мг/кг | 33,96 | 2,40 | 26,11 | p<0,01 | p<0,01 |
| P5 в дозе 10 мг/кг | 24,84 | 2,90 | 45,95 | p<0,01 | |
| P5 в дозе 3 мг/кг | 36,54 | 2,35 | 20,50 | p<0,01 | |
| P5 в дозе 1 мг/кг | 43,22 | 3,12 | 5,96 | 0,061 | |
| Профилактич. введение P5 в дозе 10 мг/кг | 19,54 | 2,30 | 57,48 | p<0,01 | |
| Профилактич. введение P5 в дозе 3 мг/кг | 35,66 | 1,50 | 22,41 | p<0,01 | |
| Профилактич. введение P5 в дозе 1 мг/кг | 44,23 | 2,20 | 3,76 | 0,082 | |

Пример 4. Распределение P5 в головном мозге крыс.

Нормальным контрольным крысам и крысам в модели МСАО, соответственно, вводили инъекцией в хвостовую вену физиологический раствор, содержащий флуоресцентно меченый полипептид, FITC-P5, (10 мг/кг) через 1 час после создания модели. Крыс умерщвляли через 12 часов после введения. Быстро извлекали ткани головного мозга и помещали в систему визуализации для мелких живых животных для детектирования флуоресценции. По завершении детектирования флуоресценции ткани головного мозга помещали в раствор с красителем TTC для окрашивания с целью определения корреляции между площадью ишемии и распределением лекарственного средства. Как показано на фиг. 4 и 5, головной мозг нормальных крыс полностью окрашивался TTC, и никакого распределения флуоресцентно меченого полипептида обнаружено не было, в то время как поврежденный ишемией участок головного мозга крыс с ишемией не окрашивался TTC, и по затронутому ишемией участку был распределен флуоресцентно меченый полипептид, при этом основным поврежденным ишемией участком оказывался участок средней артерии, что являлось подтверждением того, что полипептид P5 может направленно воздействовать на затронутый ишемией участок и оказывать терапевтический эффект, и его количественное распределение положительно коррелировало со степенью ишемии.

Пример 5. Окрашивание с использованием HE для обнаружения гистологических изменений.

Крыс в каждой группе подвергали декапитации через 24 ч после ишемии и в полученном образце головного мозга вблизи хиазмы зрительного нерва делали фронтальные срезы, получая срезы толщиной примерно 4 мм. Срезы фиксировали, используя 10%-ный раствор формалина, и обезвоживали спиртом с градиентом концентрации от 70 до 100%. Секции дважды подвергали пермеабиллизации в ксилоле и погружали в парафин. Парафиновый блок осторожно подрезали, закрепляли в станке для получения па-

рафиновых срезов и готовили срезы толщиной 4 мкм. Парафиновые срезы полностью разворачивали, прикрепляли к чистой и сухой стеклянной пластинке и хранили в холодильнике при 4°C. Выполняли традиционное окрашивание с использованием HE и результаты окрашивания наблюдали с применением световой микроскопии.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 6. Нервные клетки ткани головного мозга нормального животного демонстрировали четкое ядро, сферическую ядерную и неповрежденную ядерную мембрану. Ткани с поврежденной ишемией стороны головного мозга крыс с ишемией из группы модельных животных демонстрировали тяжелый некроз нервных клеток, набухание клеток, конденсацию ядер, рыхлую и слегка окрашенную цитоплазму и вакуолизацию. В случае группы с терапевтическим введением и группы с профилактическим введением пептида P5 в дозе 10 мг/кг наблюдали значительное улучшение вышеупомянутых патологических изменений, и результаты были значительно лучше, чем у групп с введением положительного лекарственного средства - раствора Enbipi для инъекций, NA-1 и YE-NA-1 (10 мг/кг).

Пример 6. Оценка острой токсичности.

Тестирования острой токсичности проводили на крысах. Полученные результаты показали, что P5 не оказывал никакого летального эффекта и других явных токсических побочных эффектов на крыс в дозе 200 мг/кг массы тела.

Пример 7. Приготовление лиофилизированных композиций на основе P5.

Ниже описан способ приготовления лиофилизированных композиций с использованием трегалозы в качестве типичного наполнителя и раствора аргинина в качестве типичного регулирующего pH агента. Другие лиофилизированные композиции готовили аналогичным образом.

Приготовление лиофилизированной композиции на основе P5 включало следующие стадии:

- приготовление 5%-ного раствора аргинина для использования;
- взвешивание требуемых количеств трегалозы и пептида P5, соответственно, и добавление 80% общего количества воды для инъекций с перемешиванием до полного растворения;
- добавление раствора аргинина и подведение pH до $6,5 \pm 0,5$;
- добавление воды до полного объема при равномерном перемешивании;
- проведение фильтрации с использованием фильтров с диаметром пор 0,45 мкм и 0,22 мкм, соответственно;
- внесение фильтрата во флакон с частичной укупоркой;
- проведение вакуумной лиофилизации, включающей в себя предварительное замораживание при -30°C в течение 3 ч; сублимацию при -20°C в течение 3 ч, -10°C в течение 5 ч и 5°C в течение 10 ч; и вторную сушку при 30°C в течение 5 ч;
- проведение вакуумной герметизации; и
- наложение комбинированной алюминиевой-пластиковой крышки.

Пример 8. Влияние разных наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе P5.

Метод тестирования.

Для оценки влияния наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе P5 были выбраны разные наполнители. Образцы помещали в камеру для испытаний на стабильность при 60°C на 2 недели и в конце первой и второй недель, соответственно, отбирали пробу для детектирования. В качестве наполнителей использовали трегалозу, циклодекстрин, маннит, лактозу и глюкозу, соответственно, и оценивали свойства, прозрачность и цвет раствора, pH, примеси и содержание P5 в различных образцах.

Таблица 3

Наполнители и используемые количества

| Номер теста | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------|--------|--------------------|------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| P5 | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г |
| Наполнитель | / | Трегалоза 1,0 г | Циклодекстрин 1,0 г | Маннит 1,0 г | Лактоза 1,0 г | Глюкоза 1,0 г |
| Вода | 20 мл | 20 мл | 20 мл | 20 мл | 20 мл | 20 мл |
| Объем/флакон | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл |

Таблица 4

Информация относительно реагентов, использованных в примере 8

| Серия | Название | Степень чистоты | Производитель | № партии |
|-------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|-------------|
| 1 | P5 | Степень чистоты «для инъекций» | Синтезировали и получали в Hangzhou Zhongtai | CQ-04-00317 |
| 2 | Трегалоза | Фармацевтическая степень чистоты | Pfanstiehl | 38540A |
| 3 | Гидроксипропил-бета-циклодекстрин | Фармацевтическая степень чистоты | Binzhou City Zhiyuan, Shandong Province | 20160309-1 |
| 4 | Маннит | Фармацевтическая степень чистоты | Nanning Chemical Pharmaceutical | F431C |
| 5 | Лактоза | Фармацевтическая степень чистоты | Zhenjiang fukang Biology | 20160510 |
| 6 | Глюкоза | Фармацевтическая степень чистоты | Xiwang Pharmaceutical Industry | 201605133 |
| 7 | Ацетонитрил | Степень чистоты «для хроматографии» | Mereda | |
| 8 | Трифторуксусная кислота | Степень чистоты «для хроматографии» | Mereda | |

Метод оценки.

Внешний вид - проводили визуальное обследование образцов, и ожидается, что они будут представлять собой белые рыхлые лиофилизированные массы или порошки.

Прозрачность и цвет раствора - образец растворяют, используя 1 мл воды.

Ожидается, что раствор будет прозрачным и бесцветным. Если раствор мутный, то его сравнивают с раствором стандарта мутности № 1 (метод 1 Общего правила 0902), и он не должен быть более мутным, чем раствор стандарта. Если раствор имеет окраску, то его сравнивают с раствором стандарта желтого цвета № 1 (Китайская фармакопея IV, первый метод), и он не должен быть окрашен в большей степени, чем раствор стандарта.

pH - измерение для раствора, удовлетворяющего требованиям по прозрачности и окраске, выполняют со ссылкой на метод 0631 "Определение концентрации раствора" Китайской фармакопеи IV.

Примеси - измерение выполняют с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в следующих условиях хроматографирования:

колонка: Agilent C18 (4,6 мм x 150 мм, 5 мкм);

подвижная фаза: А: 0,065% TFA - вода; В: 0,05% TFA - ацетонитрил;

элюирование: градиентное элюирование, от 0 до 30 мин 5-65% В;

скорость потока: 1,0 мл/мин;

температура колонки: 36°C;

длина волны для детектирования: 220 нм;

вводимый объем: 10 мкл.

Навеску пептида P5 растворяют в воде, получая раствор, содержащий примерно 2 мг пептида P5 в 1 мл, в качестве контрольного раствора.

Образец растворяют в воде и разбавляют, получая раствор, содержащий примерно 2 мг в 1 мл, в качестве тестируемого образца. 10 мкл этого раствора вводят в жидкостной хроматограф и регистрируют хроматограмму. Содержание рассчитывают исходя из площади пика внешнего стандарта для прибора, а количество примесей рассчитывают методом нормализации площадей.

Наконец, прозрачность тестируемого образца определяют путем сравнения с результатом измерения прозрачности раствора стандарта мутности.

Результаты эксперимента.

Таблица 5

Влияние разных наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе Р5 (в 0-е сутки)

| Скрининг наполнителей (в 0-е сутки) | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------|--|------------------------------|------|-------------------|---------------|
| Номер теста | Наполнитель | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | рН | Содержание Р5 (%) | Примеси |
| 0 | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,88 | 109,27% | Не определены |
| 1 | Трегалоза | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,83 | 105,34% | Не определены |
| 2 | Цикло-декстрин | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,98 | 103,97% | Не определены |
| 3 | Маннит | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,90 | 111,40% | Не определены |
| 4 | Лактоза | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,70 | 107,60% | Не определены |
| 5 | Глюкоза | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 5,73 | 100,88% | Не определены |

Таблица 6

Влияние разных наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе Р5 (через 1 неделю)

| Скрининг наполнителей (при 60°C в течение 1 недели) | | | | | | | |
|---|-------------|---|------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| Номер теста | Наполнитель | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение рН | Содержание Р5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| 0 | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слегка слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,07 | 107,91 | 0,53 | 1,04 |
| 1 | Трегалоза | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,76 | 105,35 | 0,21 | 0,30 |

| | | | | | | | |
|---|----------------|--|--|------|--------|-------|-------|
| 2 | Цикло-декстрин | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,89 | 102,42 | 0,89 | 1,36 |
| 3 | Маннит | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 6,09 | 103,05 | 1,34 | 3,91 |
| 4 | Лактоза | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,57 | 64,89 | 10,47 | 38,82 |
| 5 | Глюкоза | Желтая масса (значительно слежавшаяся) | Прозрачный, а окраска темнее желтого №10 | 4,62 | 57,58 | 75,28 | 75,51 |

Таблица 7

Влияние разных наполнителей на форму и стабильность лиофилизированных композиций на основе Р5 (через 2 недели)

| Скрининг наполнителей (при 60°C в течение 2 недель) | | | | | | | |
|---|----------------|---|------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| Номер теста | Наполнитель | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание Р5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| 0 | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слегка слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 5,77 | 106,97 | 0,72 | 1,34 |
| 1 | Трегалоза | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,97 | 105,63 | 0,19 | 0,25 |
| 2 | Цикло-декстрин | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 6,30 | 101,04 | 1,01 | 1,72 |
| 3 | Маннит | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 6,29 | 102,05 | 1,61 | 4,66 |

В 0-е сутки в каждом из образцов (образцов от № 0 до № 5) примеси обнаружены не были. Через 1 неделю максимальное содержание отдельной примеси в образце № 1 (с трегалозой) составляло 0,21%, а содержание всех примесей составляло 0,3%, что было значительно меньше, чем в контрольном образце (№ 0), указывая на то, что трегалоза проявляла значительное защитное действие.

Одновременно, что касается содержания всех примесей в образце №№ 2-5, то было обнаружено, что максимальное содержание отдельной примеси и содержание всех примесей было выше, чем в образце № 1 (с трегалозой), указывая на то, что циклодекстрин, маннит, лактоза и глюкоза уступали трегалозе с точки зрения защитного действия.

Что касается свойств, то все хранимые образцы с трегалозой, циклодекстрином, маннитом или лактозой через 1 неделю представляли собой белые рыхлые лиофилизированные массы, в то время как контрольный образец был слегка слежавшимся, а образец № 5 (с глюкозой) был сильно слежавшимся, имея вид желтой массы. Оставленные для дальнейшего хранения образцы с трегалозой, циклодекстрином или

маннитом через 2 недели представляли собой белые рыхлые лиофилизированные массы, в то время как контрольный образец был слегка слежавшимся.

Что касается pH, то не наблюдали никакого существенного изменения в значении pH для образцов с №№ 0 и 1 через 1 и 2 недели, в то время как значения pH для образцов с №№ 4 и 5 снижались через 1 неделю, а значения pH для образцов с №№ 2 и 3 повышались через 2 недели.

Что касается прозрачности и цвета, то через 1 неделю все образцы с №№ 0-4 выглядели прозрачными и бесцветными, в то время образец № 5 выглядел прозрачным, но имел желтый цвет. Через 2 недели все образцы с №№ 0-3 выглядели прозрачными и бесцветными.

Принимая во внимание приведенные выше оценки с точки зрения внешнего вида, прозрачности и цвета раствора, значения pH, содержания примесей и лекарственного средства, в качестве наполнителя для дальнейших тестирований была выбрана трегалоза.

Пример 9. Влияние количества трегалозы на форму и стабильность лиофилизированной композиции на основе P5.

Оценивали форму лиофилизированных композиций на основе P5, используя разные количества трегалозы. В качестве методов детектирования применяли методы, описанные в примере 8.

Таблица 8

Состав образцов из эксперимента I по скринингу количества трегалозы, в котором соотношение P5:трегалоза составляет 1:0, 1:0,25, 1:0,5, 1:0,75 и 1:1

| Номер теста | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| P5 | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г |
| Трегалоза | / | 50 мг | 0,10 г | 0,15 г | 0,20 г |
| Вода | 2 мл | 2 мл | 2 мл | 2 мл | 2 мл |
| Объем/флакон | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл |

Таблица 9

Состав образцов из эксперимента II по скринингу количества трегалозы, в котором соотношение P5:трегалоза составляет 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4 и 1:5

| Номер теста | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| P5 | 0,10 г | 0,10 г | 0,10 г | 0,10 г | 0,10 г |
| Трегалоза | 0,15 г | 0,20 г | 0,30 г | 0,40 г | 0,50 г |
| Вода | 2 мл | 2 мл | 2 мл | 3 мл | 4 мл |
| Объем/флакон | 100 мкл | 100 мкл | 100 мкл | 150 мкл | 200 мкл |

Каждый образец помещали в камеру для испытаний на стабильность при 60°C на 2 недели и в конце первой и второй недель, соответственно, отбирали пробу для детектирования. Свойства, прозрачность и цвет раствора, pH, содержание примесей и лекарственного средства для разных образцов оценивали применительно к разным соотношениям P5:трегалоза.

Таблица 10

Результаты эксперимента I по скринингу количества трегалозы (в 0-е сутки), при этом вносимое количество составляет 10 мг/флакон и используют флаконы емкостью 7 мл

| Эксперимент I по скринингу количества трегалозы (в 0-е сутки) | | | | | | | |
|---|---------------|-------------|------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| Номер теста | P5: трегалоза | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание P5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |

| | | | | | | | |
|---|--------|--------------------------------------|----------------------------|------|-------|------|------|
| 0 | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,92 | 91,19 | 0,10 | 0,10 |
| 1 | 1:0,25 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,89 | 88,15 | 0,10 | 0,10 |
| 2 | 1:0,5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,73 | 89,68 | 0,10 | 0,11 |
| 3 | 1:0,75 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,89 | 87,18 | 0,09 | 0,10 |
| 4 | 1:1 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,93 | 88,84 | 0,08 | 0,10 |

Таблица 11

Результаты эксперимента I по скринингу количества трегалозы (через 1 неделю)

Эксперимент I по скринингу количества трегалозы (при 60°C в течение 1 недели)

| Номер теста | P5: трегалоза | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значе- ние pH | Содержа- ние P5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все при- меси (%) |
|----------------|------------------|---|------------------------------------|---------------------|---------------------------|---|----------------------------|
| 0 | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,10 | 87,68 | 0,65 | 1,78 |
| 1 | 1:0,25 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,53 | 85,34 | 0,51 | 1,27 |
| 2 | 1:0,5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,40 | 89,56 | 0,23 | 0,48 |
| 3 | 1:0,75 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,22 | 89,87 | 0,18 | 0,21 |
| 4 | 1:1 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,16 | 87,61 | 0,17 | 0,17 |

Таблица 12

Результаты эксперимента I по скринингу количества трегалозы (через 2 недели)

| Эксперимент I по скринингу количества трегалозы (при 60°C в течение 2 недель) | | | | | | | |
|---|---------------|--|------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| Номер теста | P5: трегалоза | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание P5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| 0 | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,88 | 87,91 | 0,88 | 2,74 |
| 1 | 1:0,25 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,97 | 87,48 | 0,51 | 1,15 |
| 2 | 1:0,5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,89 | 92,77 | 0,37 | 0,88 |
| 3 | 1:0,75 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,77 | 90,66 | 0,29 | 0,52 |
| 4 | 1:1 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,81 | 91,10 | 0,26 | 0,47 |

Результаты эксперимента II по скринингу количества трегалозы, при этом вносимое количество составляет 5 мг/флакон и используют флаконы емкостью 7 мл

| Эксперимент II по скринингу количества трегалозы (в 0-е сутки) | | | | | | | |
|--|---------------|--------------------------------|------------------------------|-------------|-------------------|---|-----------------|
| Номер теста | Трегалоза :Р5 | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание Р5 (%) | Максимальное содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| 5 | 1:1,5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,98 | 106,63 | 0,03 | 0,03 |
| 6 | 1:2 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,89 | 97,19 | 0,05 | 0,05 |
| 7 | 1:3 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,92 | 94,95 | 0,05 | 0,05 |
| 8 | 1:4 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,83 | 99,88 | 0,03 | 0,03 |
| 9 | 1:5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,86 | 101,34 | 0,04 | 0,04 |

| Эксперимент II по скринингу количества трегалозы (при 60°C в течение 1 недели) | | | | | | | |
|--|---------------|--|------------------------------|-------------|-------------------|---|-----------------|
| Номер теста | Трегалоза :Р5 | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание Р5 (%) | Максимальное содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| 5 | 1:1,5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 6,18 | 98,13 | 0,23 | 0,30 |
| 6 | 1:2 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,95 | 90,87 | 0,19 | 0,35 |
| 7 | 1:3 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,64 | 87,27 | 0,17 | 0,30 |
| 8 | 1:4 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,78 | 93,75 | 0,22 | 0,33 |
| 9 | 1:5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 6,33 | 95,45 | 0,23 | 0,31 |
| Эксперимент II по скринингу количества трегалозы (при 60°C в течение 2 недель) | | | | | | | |
| Номер теста | Трегалоза :Р5 | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание Р5 (%) | Максимальное содержание одной примеси (%) | Все примеси (%) |
| 5 | 1:1,5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса(слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,83 | 94,59 | 0,30 | 0,59 |

| | | | | | | | |
|---|-----|--|-------------------------------|------|-------|------|------|
| 6 | 1:2 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,99 | 91,89 | 0,26 | 0,55 |
| 7 | 1:3 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 7,20 | 86,25 | 0,27 | 0,52 |
| 8 | 1:4 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,88 | 92,82 | 0,23 | 0,46 |
| 9 | 1:5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 6,95 | 94,42 | 0,23 | 0,47 |

Каждый образец помещали в камеру для испытаний на стабильность при 40°C на 3 месяца и в конце первого и третьего месяца, соответственно, отбирали пробу для детектирования. Свойства, прозрачность и цвет раствора, pH, содержание примесей и лекарственного средства для разных образцов оценивали применительно к разным соотношениям P5:трегалоза.

Таблица 14

Результаты эксперимента I по скринингу количества трегалозы (40°C), при этом вносимое количество составляет 0,1 мл (10 мг/флакон) и используют флаконы емкостью 7 мл

| Скрининг количества наполнителя (при 40°C в течение 1 месяца) | | | | | | | |
|---|---------------|---|------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| Номер теста | P5: трегалоза | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание P5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| 0 | 1:0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 7,05 | 91,52 | 0,98 | 1,09 |
| 1 | 1:0,25 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 7,08 | 86,94 | 1,07 | 1,16 |
| 2 | 1:0,5 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 7,07 | 91,43 | 0,85 | 0,92 |
| 3 | 1:0,75 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,99 | 90,36 | 0,84 | 0,92 |
| 4 | 1:1 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачный и бесцветный | 6,94 | 90,36 | 0,80 | 0,88 |

Выводы.

Что касается примесей, то содержание примесей (максимальное содержание отдельной примеси и

содержание всех примесей) в образцах с №№ 1-9 после хранения при 60°C в течение 1 или 2 недель было значительно меньше, чем таковое в контрольном образце (№ 0), указывая на то, что трегалоза проявляла значительное защитное действие.

Что касается эксперимента I (P5:трегалоза составляет от 1:0,25 до 1:1), то с увеличением количества трегалозы содержание примесей постепенно уменьшалось, указывая на то, что защитное действие трегалозы постепенно усиливалось.

Что касается эксперимента II (P5:трегалоза составляет от 1:1,5 до 1:5), то было обнаружено, что нет никакой значимой разницы в содержании примесей в образцах с №№ 5-9 и образце № 4 (где P5:трегалоза составляет 1:1) в конце первой или второй недели, указывая на то, что защитное действие трегалозы больше не усиливалось.

Таким образом, подходящим оказалось соотношение P5 и трегалозы, составляющее 1:1.

Что касается pH, то наблюдали изменение в значении pH для каждого образца и контрольного образца, которые хранили при 60°C в течение 2 недель или при 40°C в течение одного месяца, т.е. увеличение от примерно 6,0 до примерно 7,0, что указывало на то, что целесообразно добавить в композицию буфер для поддержания pH с целью стабилизации значения pH.

Пример 10. Влияние разных pH на прозрачность раствора и содержание примесей в лиофилизированных композициях.

Оценивали влияние разных значений pH на прозрачность раствора и содержание примесей в лиофилизированных композициях. В качестве методов детектирования использовали методы, описанные в примере 8.

Эксперимент I. Регулирование pH композиций с использованием лимонной кислоты и двузамещенного фосфата натрия.

Таблица 15

Состав образцов из эксперимента I по скринингу диапазона pH, когда pH композиции подвели до примерно 4, 5, 6, 7 и 8, используя лимонную кислоту и двузамещенный фосфат натрия

| Номер теста | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|--------|----------|---------|----------|----------|----------|
| Значение pH | 5,43 | 4,10 | 5,00 | 6,04 | 6,92 | 7,84 |
| P5 | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г |
| Трегалоза | 1,0 г | 1,0 г | 1,0 г | 1,0 г | 1,0 г | 1,0 г |
| 0,1 М раствор лимонной кислоты | / | 9,71 мл | 11,3 мл | 12,63 мл | 16,47 мл | 23,45 мл |
| 0,2 М раствор двузамещенного фосфата натрия | / | 12,29 мл | 9,7 мл | 7,37 мл | 3,53 мл | 0,55 мл |
| Вода | 20 мл | / | / | / | / | / |
| Вносимый объем/флакон | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл | 1 мл |

Результаты и анализ эксперимента I.

Таблица 17

Результаты эксперимента I по скринингу диапазона pH (в 0-е сутки)
Скрининг диапазона pH (в 0-е сутки)

| Номер теста | pH | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание P5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
|-------------|------------|--------------------------------|------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| 0 | Не подвели | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,73 | 102,46 | 0,10 | 0,11 |

| | | | | | | | |
|---|-----|--------------------------------------|---------------------------------------|------|--------|------|------|
| 1 | 4,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 4,32 | 102,31 | 0,13 | 0,13 |
| 2 | 5,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность = № 2 и бесцветный | 5,36 | 102,12 | 0,12 | 0,12 |
| 3 | 6,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 3 и бесцветный | 6,52 | 99,22 | 0,09 | 0,09 |
| 4 | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 3 и бесцветный | 7,37 | 100,05 | 0,03 | 0,03 |
| 5 | 8,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 2 и бесцветный | 8,20 | 98,39 | 0,05 | 0,05 |

Таблица 18

Результаты эксперимента I по скринингу диапазона рН (через 1 неделю)

Скрининг диапазона рН (при 60°C в течение 1 недели)

| Номер теста | рН | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значе- ние рН | Содержа- ние Р5 (%) | Максим. содержание одной примеси (%) | Все при- меси (%) |
|----------------|-----------------|---|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|---|----------------------------|
| 0 | Не подводили | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,87 | 101,28 | 0,18 | 0,23 |
| 1 | 4,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 4,31 | 98,72 | 0,79 | 1,72 |

| | | | | | | | |
|---|-----|---|---------------------------------------|------|--------|------|------|
| 2 | 5,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 5,52 | 100,62 | 0,46 | 0,90 |
| 3 | 6,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность = № 1 и бесцветный | 6,65 | 97,39 | 0,28 | 0,36 |
| 4 | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 7,48 | 98,37 | 0,15 | 0,23 |
| 5 | 8,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 3 и бесцветный | 8,40 | 96,66 | 0,15 | 0,15 |

Таблица 19

Результаты эксперимента I по скринингу диапазона рН (через 2 недели)

| Скрининг диапазона рН (при 60°C в течение 2 недель) | | | | | | | |
|---|-----------------|---|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|---|----------------------------|
| Номер теста | рН | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значе- ние рН | Содержа- ние Р5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все при- меси (%) |
| 0 | Не подводили | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,76 | 102,81 | 0,22 | 0,28 |
| 1 | 4,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 4,36 | 97,13 | 1,16 | 3,40 |

| | | | | | | | |
|---|-----|---|--------------------------------------|------|-------|------|------|
| 2 | 5,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 5,46 | 99,21 | 0,74 | 1,69 |
| 3 | 6,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 6,46 | 97,87 | 0,39 | 0,58 |
| 4 | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 7,27 | 98,99 | 0,17 | 0,32 |
| 5 | 8,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса (слежавшаяся) | Прозрачность <№ 3 и бесцветный | 8,20 | 95,76 | 0,24 | 0,33 |

В случае эксперимента I по скринингу использовали буферную систему на основе лимонной кислоты и двузамещенного фосфата натрия, с помощью которой подвели рН в диапазоне от 4,0 до 8,0. Значения рН контрольного образца (№ 0) и образцов от № 1 до № 5 оставались постоянными в процессе хранения при 60°C в течение 2 недель. Как можно видеть по результатам наблюдений прозрачности, контрольный образец (№ 0) имел хорошую прозрачность, а образцы от № 1 до № 4 демонстрировали незначительную мутность. Через 1 неделю или через 2 недели свойства контрольного образца (№ 0) не изменялись, в то время как образцы с подведенным рН оказывались значительно слежавшимися. Кроме того, также было обнаружено, что при увеличении рН содержание примесей в образцах постепенно уменьшалось. Поэтому авторы изобретения провели эксперимент II в диапазоне более высоких значений рН, используя разные регулирующие рН агенты.

Эксперимент II. Подведение рН композиций с использованием гистидина/аргинина.

Таблица 16

Состав образцов из эксперимента II по скринингу диапазона рН, когда рН композиции подвели до примерно 6, 7, 8, 9 и 10, используя гистидин/аргинин

| Номер теста | Н0 | Н1 | Н2 | Н3 | Н4 | Н5 |
|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Значение рН | 5,5 | 7,1 | 7,0 | 7,9 | 8,9 | 9,5 |
| P5 | 0,10 г | 0,10 г | 0,10 г | 0,10 г | 0,10 г | 0,10 г |
| Трегалоза | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г | 0,20 г |
| 3%-ный раствор гистидина | / | 2,7 мл | / | / | / | / |
| 10%-ный раствор аргинина | / | / | 80 мкл | 100 мкл | 250 мкл | 800 мкл |
| Вода | 2,7 мл | / | 2,7 мл | 2,7 мл | 2,7 мл | 2,4 мл |
| Вносимый объем/флакон | 150 мкл | 150 мкл | 150 мкл | 150 мкл | 150 мкл | 160 мкл |

Результаты и анализ эксперимента II.

Таблица 20

Результаты эксперимента II по скринингу диапазона pH (в 0-е сутки)

| Скрининг диапазона pH (в 0-е сутки) | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------|------|--------------------------------|---------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| Номер теста | Регулирующий pH агент | pH | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание P5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| Н0 | / | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 5,90 | 101,13 | 0,22 | 0,26 |
| Н1 | 3% гисти-дина | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность = № 2 и бесцветный | 7,14 | 102,94 | 0,06 | 0,06 |
| Н2 | 10% аргинина | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность < № 1 и бесцветный | 6,84 | 98,39 | 0,07 | 0,07 |
| Н3 | 10% аргинина | 8,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность < № 1 и бесцветный | 7,26 | 100,94 | 0,05 | 0,05 |
| Н4 | 10% аргинина | 9,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность < № 2 и бесцветный | 8,42 | 92,63 | 0,05 | 0,05 |
| Н5 | 10% аргинина | 10,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность < № 2 и бесцветный | 9,08 | 95,46 | 0,07 | 0,07 |

Результаты эксперимента II по скринингу диапазона рН (через неделю)

| Скрининг диапазона рН (при 60°C в течение 1 недели) | | | | | | | | |
|---|-----------------------|------|--------------------------------|---------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| Номер теста | Регулирующий рН агент | рН | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение рН | Содержание Р5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| Н0 | / | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 6,06 | 100,37 | 0,32 | 0,37 |
| Н1 | 3% гисти-дина | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность = № 2 и бесцветный | 7,19 | 96,95 | 0,07 | 0,07 |
| Н2 | 10% аргинина | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность < № 1 и бесцветный | 6,91 | 98,20 | 0,09 | 0,09 |
| Н3 | 10% аргинина | 8,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность < № 1 и бесцветный | 7,42 | 99,06 | 0,09 | 0,09 |
| Н4 | 10% аргинина | 9,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность < № 3 и бесцветный | 8,63 | 93,39 | 0,07 | 0,07 |
| Н5 | 10% аргинина | 10,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность = № 3 и бесцветный | 9,15 | 94,33 | 0,24 | 0,30 |

Результаты эксперимента II по скринингу диапазона pH (через 2 недели)

| Скрининг диапазона pH (при 60°С в течение 2 недель) | | | | | | | | |
|---|-----------------------|------|--------------------------------|--------------------------------|-------------|-------------------|--|-----------------|
| Номер теста | Регулирующий pH агент | pH | Внешний вид | Прозрачность и цвет раствора | Значение pH | Содержание P5 (%) | Максим. содержание отдельной примеси (%) | Все примеси (%) |
| Н0 | / | / | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачный и бесцветный | 6,47 | 100,89 | 0,31 | 0,38 |
| Н1 | 3% гистидина | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 3 и бесцветный | 7,22 | 103,64 | 0,09 | 0,09 |
| Н2 | 10% аргинина | 7,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 1 и бесцветный | 7,10 | 101,57 | 0,11 | 0,11 |
| Н3 | 10% аргинина | 8,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 2 и бесцветный | 7,61 | 100,86 | 0,10 | 0,10 |
| Н4 | 10% аргинина | 9,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 3 и бесцветный | 8,64 | 91,40 | 0,21 | 0,29 |
| Н5 | 10% аргинина | 10,0 | Белая рыхлая лиофилизир. масса | Прозрачность <№ 4 и бесцветный | 9,18 | 90,51 | 0,36 | 0,44 |

Для эксперимента по скринингу II была выбрана буферная система на основе гистидина/аргинина, с помощью которой pH подвели в диапазоне от 7 до 10. Через 2 недели значение pH для контрольного образца (Н0) изменилось (т.е. от 5,9 до 6,5), в то время как значения pH для образцов от Н1 до Н5 оставались постоянными. Содержания примесей в контрольном образце (Н0) существенно повышались по сравнению с таковыми в 0-е сутки, в то время как содержания примесей в образцах Н1, Н2 и Н3 не увеличивались. Прозрачность контрольного образца (Н0) была удовлетворительной, в то время как образцы от Н1 до Н5 были мутными, при этом образец Н2 имел наибольшую мутность. Таким образом, желательно поддерживать pH в диапазоне $6,5 \pm 0,5$.

Помимо этого, в отсутствие регулирующего pH агента изменения pH разных образцов также были различными. Например, значение pH образца № 2 в эксперименте по скринингу наполнителей изменялось незначительно в случае хранения при 60°С в течение 2 недель. Значение pH образца № 0 в эксперименте II по скринингу диапазона pH изменялось незначительно в случае хранения при 60°С в течение 2 недель. Значение pH образца Н0 в эксперименте II по скринингу диапазона pH изменялось незначительно в случае хранения при 60°С в течение 2 недель, при этом диапазон изменения составлял 0,5. Зна-

чения рН образцов с №№ 1-5 в эксперименте II по скринингу количества трегалозы изменялись значительно в случае хранения при 60°C в течение 2 недель, при этом диапазон изменения составлял 1,0.

Все публикации и патентные документы, упомянутые в настоящей заявке, включены в данное описание посредством ссылки, как если бы каждая публикация или каждый патент были конкретно и по отдельности указаны внесением посредством ссылки. Различные изменения и эквивалентные замены могут быть внесены в различные воплощения, описанные в настоящей заявке, без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Любые признак, стадию или вариант воплощения настоящего изобретения можно использовать в комбинации с любыми другими признаком, стадией или вариантом, если в контексте не указано иное.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество пептида, регулирующий рН агент и трегалозу в качестве наполнителя, где пептид содержит аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант и где указанный функциональный вариант представляет собой вариант, имеющий одну или более чем одну консервативную замену в YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1), где указанная консервативная замена выбрана из группы, состоящей из замены между D и E, замены среди L, V и I и замены между T и S, и где рН фармацевтической композиции составляет от примерно 6,5 до 7,5, где соотношение масс пептида и трегалозы составляет от примерно 1:0,5 до 1:1.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где функциональный вариант представляет собой вариант, образуемый посредством одной или более чем одной консервативной замены в сегменте LDTEI в SEQ ID NO: 1, и консервативная замена выбрана из группы, состоящей из замены между D и E, замены среди L, V и I и замены между T и S.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, где функциональный вариант представляет собой вариант, образуемый посредством замены сегмента LDTEI (SEQ ID NO: 6) в SEQ ID NO: 1 на последовательность, выбранную из группы, состоящей из LDTEL (SEQ ID NO: 7), LDTEV (SEQ ID NO: 8), LDTD (SEQ ID NO: 9), LDTD (SEQ ID NO: 10), LDTDV (SEQ ID NO: 11), LDSEI (SEQ ID NO: 12), LDSEL (SEQ ID NO: 13), LDSEV (SEQ ID NO: 14), LDSDI (SEQ ID NO: 15), LDSDL (SEQ ID NO: 16), LDSDV (SEQ ID NO: 17), LETEI (SEQ ID NO: 18), LETEL (SEQ ID NO: 19), LETEV (SEQ ID NO: 20), LETDI (SEQ ID NO: 21), LETDL (SEQ ID NO: 22), LETDV (SEQ ID NO: 23), VDTEI (SEQ ID NO: 24), VDTEL (SEQ ID NO: 25), VDTEV (SEQ ID NO: 26), VDTD (SEQ ID NO: 27), VDTD (SEQ ID NO: 28), VDTDV (SEQ ID NO: 29), IDTEI (SEQ ID NO: 30), IDTEL (SEQ ID NO: 31), IDTEV (SEQ ID NO: 32), IDTD (SEQ ID NO: 33), IDTD (SEQ ID NO: 34), IDTDV (SEQ ID NO: 35), IETEI (SEQ ID NO: 36), IETEL (SEQ ID NO: 37), IETEV (SEQ ID NO: 38), IETDI (SEQ ID NO: 39), IETDL (SEQ ID NO: 40) и IETDV (SEQ ID NO: 41).

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где пептид представляет собой химерный пептид, содержащий аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант и участвующий в интернализации пептид, где участвующий в интернализации пептид облегчает захват указанного химерного пептида клеткой.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, где участвующий в интернализации пептид содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), и предпочтительно химерный пептид содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRRYEKLLDTEI (SEQ ID NO: 3).

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5, где регулирующий рН агент выбран из группы, состоящей из гистидинового буфера, аргининового буфера, буфера на основе сукцината натрия, буфера на основе сукцината калия, буфера на основе цитрата натрия, глюконатного буфера, ацетатного буфера, фосфатного буфера, трис-буфера и любой их комбинации, предпочтительно регулирующий рН агент представляет собой буфер на основе лимонной кислоты/двузамещенного фосфата натрия или гистидиновый/аргининовый буфер, и более предпочтительно регулирующий рН агент представляет собой гистидиновый/аргининовый буфер.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-6, где рН композиции составляет примерно 6,5.

8. Фармацевтическая композиция по п.6, где регулирующий рН агент представляет собой гистидиновый/аргининовый буфер и количество гистидина/аргинина в гистидиновом/аргининовом буфере, по массе, составляет от примерно 1 до 10%, предпочтительно от примерно 3 до 10%.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, где соотношение масс пептида и трегалозы составляет примерно 1:0,5.

10. Фармацевтическая композиция по п.9, где соотношение масс пептида и трегалозы составляет примерно 1:1.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, которая находится в форме предварительно лиофилизированной композиции, или в форме лиофилизированной композиции, или в форме восстановленной композиции, полученной путем объединения лиофилизированной композиции с водным раствором.

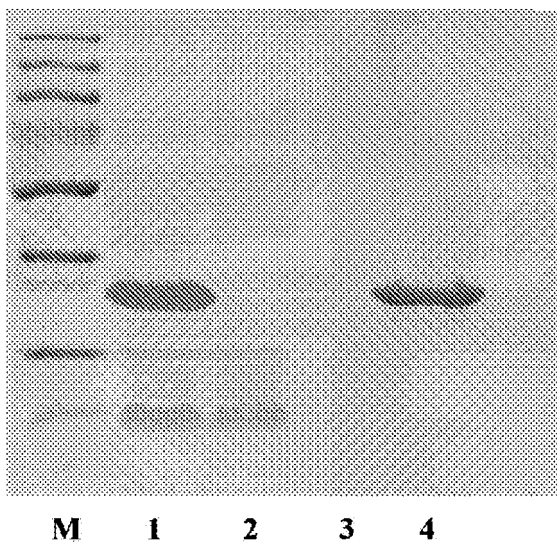
12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-11 для лечения, уменьшения интенсивности

симптомов или предупреждения заболевания, выбранного из группы, состоящей из повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированного(ой) с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревожного расстройства и эпилепсии, у млекопитающего или в качестве нейропротекторного агента, где заболевание опосредовано взаимодействием между NMDAR и PSD-95.

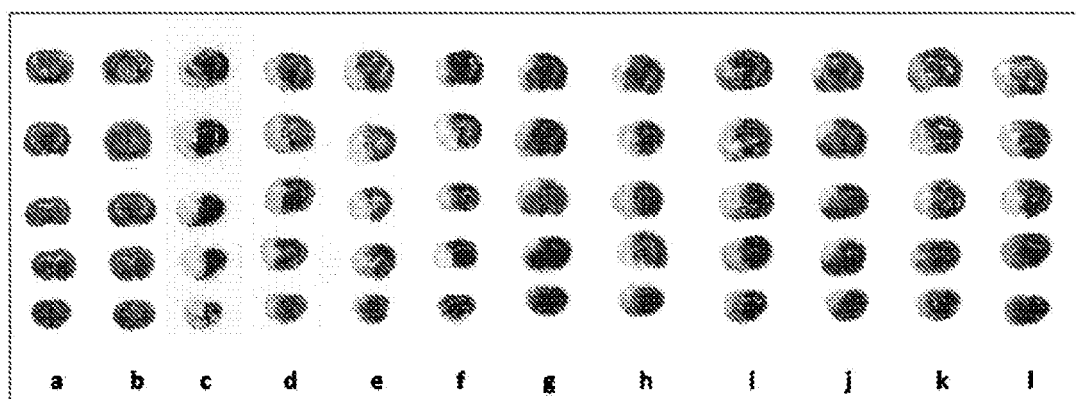
13. Фармацевтическая композиция по п.12, где заболевание представляет собой инсульт или повреждение нервной системы, вызванное инсультом, где инсульт включает ишемический инсульт, геморрагический инсульт и геморрагический инсульт, преобразованный из ишемического инсульта, предпочтительно инсульт представляет собой ишемический инсульт.

14. Фармацевтическая композиция по п.12, где повреждение нервной системы представляет собой повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, где повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного или спинного мозга, повреждения нейрона в центральной нервной системе (ЦНС), в том числе острого повреждения ЦНС, ишемического инсульта или травмы спинного мозга, гипоксии, ишемии или механического повреждения и повреждения, вызванного нейродегенеративным заболеванием, тревожным расстройством, эпилепсией или инсультом.

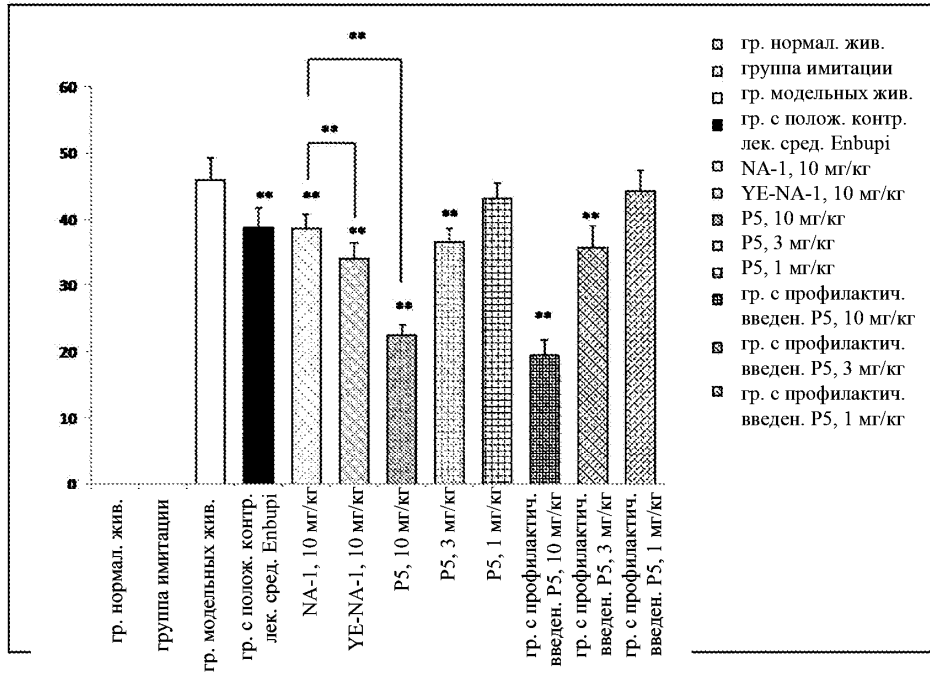
15. Фармацевтическая композиция по п.12, где нейродегенеративное заболевание включает болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь Паркинсона или болезнь Гентингтона.



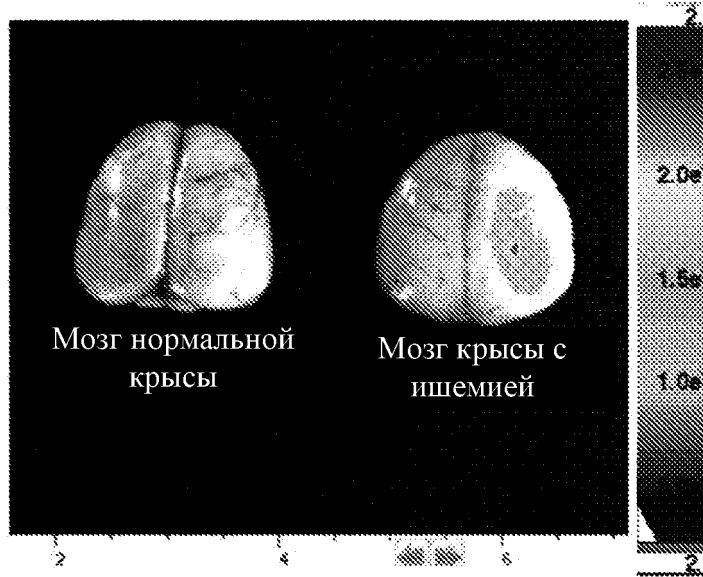
Фиг. 1



Фиг. 2



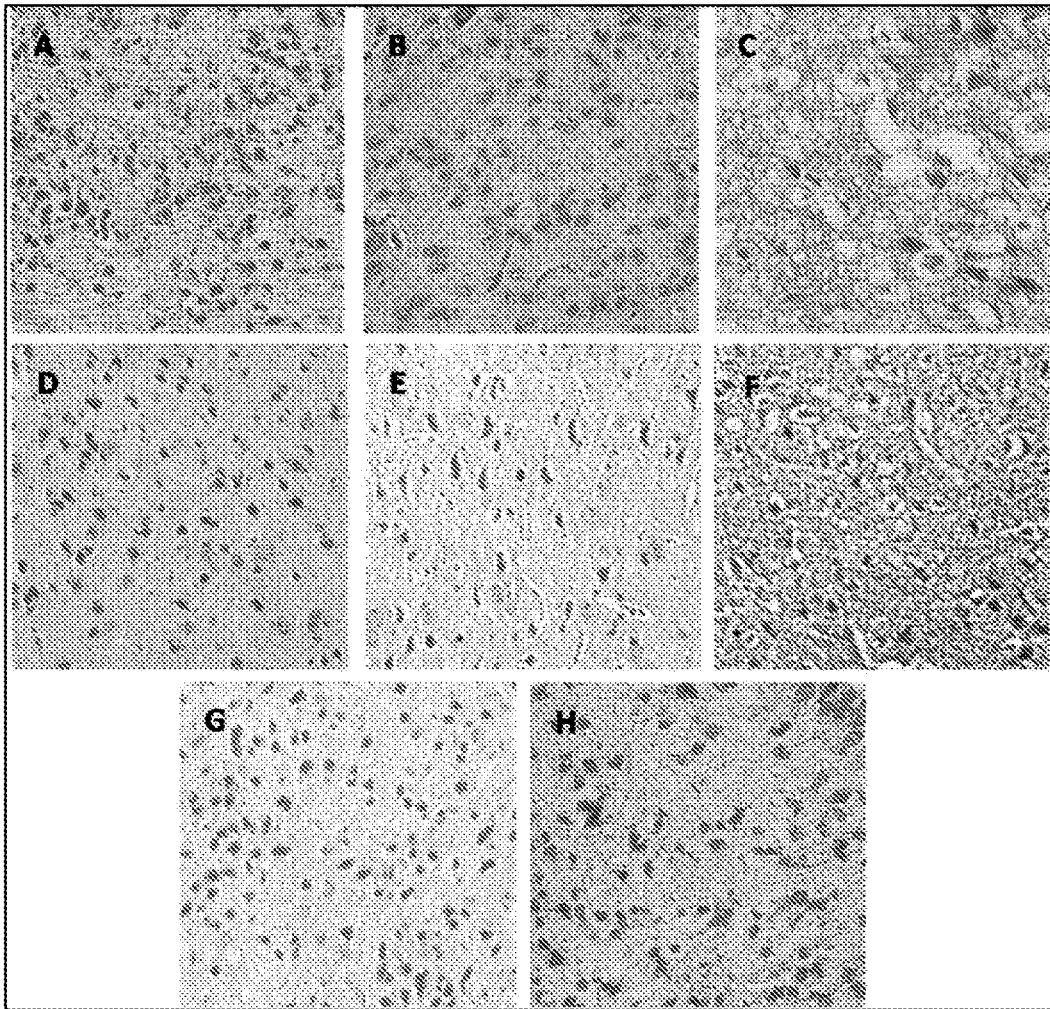
Фиг. 3



Фиг. 4



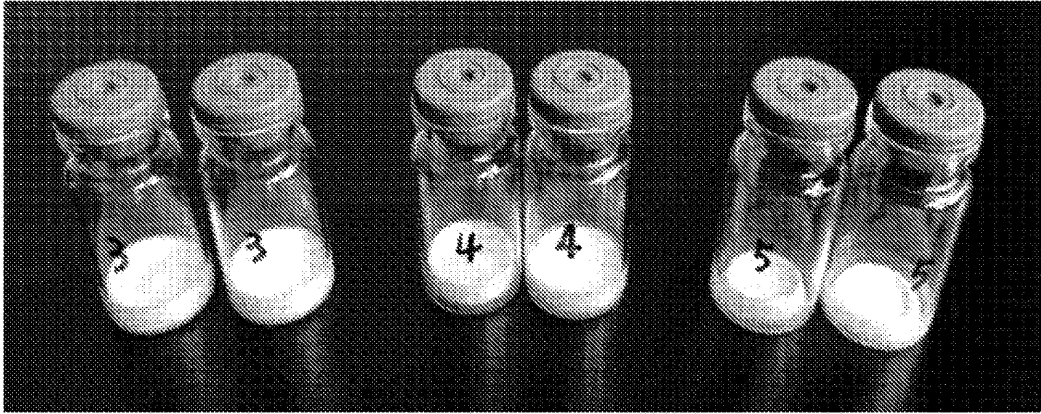
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



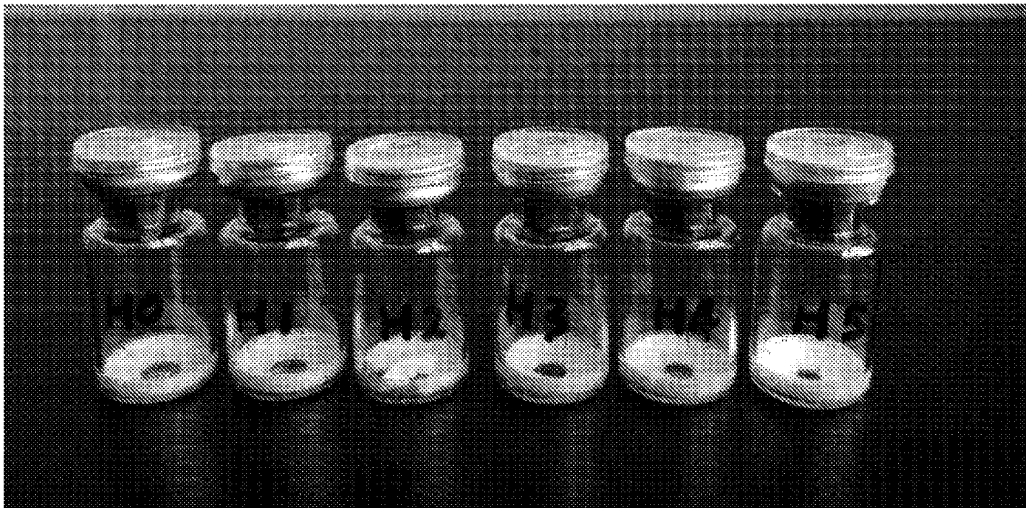
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
