

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 123820****(13) C2****(51) МПК****C07K 7/08** (2006.01)**A61K 38/10** (2006.01)**A61K 9/19** (2006.01)**A61P 9/10** (2006.01)

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"**

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2016 13470</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Гарман Джонатан Девід (CA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>28.05.2015</b>	<b>(73)</b> Володілець (володільці):	<b>НОНО ІНК.,</b> 88 Strath Avenue, Toronto, Ontario M8X 1R5, Canada (CA)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	<b>10.06.2021</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Федорова Ірина Олександрівна, реєстр. №11</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	<b>62/004,142</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2007124090 A2, 01.11.2007 WO 2015181757 A1, 03.12.2015 Roux S. et al. Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: a critical avaluation of different approaches. Journal of peptide science, 2008, vol. 14, p. 354-359 WO 2012156308 A1, 22.11.2012 WO 2010144721 A2, 16.12.2010 US 7060268 B2, 13.06.2006 WO 2014085349 A1, 05.06.2014
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	<b>28.05.2014</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>25.04.2017, Бюл.№ 8</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про державну реєстрацію:	<b>09.06.2021, Бюл.№ 23</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/IB2015/053995, 28.05.2015</b>		

**(54) ХЛОРИДНА СІЛЬ ПЕПТИДУ TAT-NR2B9C****(57) Реферат:**

Винахід стосується хлоридної солі пептиду, який являє собою TAT-NR2B9c, де хлорид становить більше, ніж 95 % молів усіх аніонів, що містяться в солі. Винахід також стосується попередньо ліофілізованого складу для лікування інсульту, церебральної ішемії, черепно-мозкової травми або субарахноїдального крововиливу, що містить таку хлоридну сіль, буфер та цукор, де ацетат та трифторацетат окремо і разом складають менше ніж 5 % молів аніонів складу, способу отримання складу, що включає зберігання зразка ліофілізованого складу протягом щонайменше тижня при температурі щонайменше 20 °C; та відновлення ліофілізованого складу, а також до застосування хлоридної солі пептиду у виготовленні лікарського засобу для зниження руйнівних наслідків інсульту або іншого ішемічного стану.

**UA 123820 C2**



Посилання на споріднену заявку

Дана заявка являє собою звичайну заявку на видання патенту США № 62/004142, подану 28 травня 2014 року, включену за допомогою посилання в усій своїй повноті для усіх цілей.

Посилання на перелік послідовностей

5 Перелік послідовностей, позначений як 446849SEQLIST.txt, 16618 біт, створений 28 травня 2014 року, включений за допомогою посилання.

Попередній рівень техніки даного винаходу

10 TAT-NR2B9c (також відомий як NA-1) є засобом, який інгібує PSD-95, порушуючи таким чином зв'язування з рецепторами N-метил-D-аспартату (NMDAR) та з нейрональними синтазами оксиду азоту (nNOS), а також знижуючи ексайтотоксичність, індуковану ішемією головного мозку. Лікування знижує розмір інфаркту та функціональні дефіцити. TAT-NR2B9c успішно проходить II фазу випробовування (див. WO 2010144721 та Aarts et al., Science 298, 846-850 (2002), Hill et al., Lancet Neurol. 11:942 – 950 (2012)).

15 Оскільки TAT-NR2B9c не викликає тяжких побічних ефектів, його можна вводити при підозрі на інсульт або інші ішемічні стани або геморагічні стани без діагнозу згідно з прийнятими у даній галузі критеріями для підтвердження відсутності крововиливу. Наприклад, TAT-NR2B9c може бути введений на місці, де відбулися інсульт або травма нервової системи (наприклад, дома у хворого) або в машині швидкої допомоги, що транспортує суб'єкта у лікарню.

20 TAT-NR2B9c раніше був описаний як рідка композиція нормального сольового розчину або фосфатно-буферного сольового розчину або композиція, ліофілізована з нормального сольового розчину (WO 2010144721).

Коротке розкриття даного винаходу

25 Даний винахід відноситься до хлоридної солі пептиду, який являє собою TAT-NR2B9c (SEQ ID NO: 6) або відрізняється від TAT-NR2B9c не більш ніж 5 амінокислотними замінами, вставками або делеціями, або будь-якого іншого пептиду, що розкривається у даному документі як активний засіб. Хлоридна сіль може бути отримана шляхом обміну трифторацетату на хлорид у трифторацетатній солі TAT-NR2B9c. Хлоридна сіль також може бути отримана шляхом обміну трифторацетату на ацетат, а потім ацетату на хлорид, виходячи з трифторацетатної солі TAT-NR2B9c. Необов'язково, більш ніж 99 % аніонів в солі складає хлорид.

30 Даний винахід, крім того, відноситься до попередньо ліофілізованого складу, що містить хлоридну сіль, що описується вище, буфер та цукор. Необов'язково, хлоридною сіллю є хлоридна сіль TAT-NR2B9c. Необов'язково, буфером є гістидин, цукром є трегалоза, а pH становить 6-7. Необов'язково, кожний з ацетату та трифторацетату містить менш ніж 1 % за масою аніонів у складі. Необов'язково, кожний з ацетату та трифторацетату містить менш ніж 0,1 % за масою аніонів у складі. Необов'язково, хлоридна сіль пептиду має концентрацію 70-120 мг/мл, гістидин має концентрацію 15-100 мМ, а трегалоза має концентрацію 80-160 мМ. Необов'язково, хлоридна сіль пептиду має концентрацію 70-120 мг/мл, гістидин має концентрацію 20-100 мМ, а трегалоза має концентрацію 100-140 мМ. Необов'язково, TAT-NR2B9c має концентрацію 70-120 мг/мл, концентрація гістидину становить 20-50 мМ, а концентрація трегалози становить 100-140 мМ. Необов'язково, концентрація гістидину становить 20 мМ, концентрація трегалози становить 100-200 мМ, переважно 120 мМ, а концентрація TAT-NR2B9c становить 90 мг/мл.

45 Даний винахід, крім того, відноситься до ліофілізованого складу, отриманого шляхом ліофілізації будь-якого з попередньо ліофілізованих складів, що описуються вище. Необов'язково, кожний з ацетату та трифторацетату містить менш ніж 1 % за масою аніонів у складі. Необов'язково, кожний з ацетату та трифторацетату містить менш ніж 0,1 % за масою аніонів у складі.

50 Даний винахід, крім того, відноситься до відновленого складу, отриманого шляхом об'єднання будь-якого з ліофілізованих складів, що описуються вище, з водним розчином. Необов'язково, водним розчином є вода або нормальний сольовий розчин. Необов'язково, об'єм відновленого складу становить 3-6-кратний об'єм попередньо ліофілізованого складу.

55 Даний винахід, крім того, відноситься до відновленого складу, що містить TAT-NR2B9c або інший активний засіб, що описується у даному документі, при концентрації 15-25 мг/мл, буфер та цукор. Необов'язково, буфером є гістидин при концентрації 4-20 мМ, цукром є трегалоза при концентрації 20-30 мМ, а pH становить 6-7. Необов'язково, відновлений склад за пунктом 19 являє собою склад, у якому кожний з ацетату та трифторацетату містить менш ніж 1 % за масою аніонів у складі. Необов'язково, кожний з ацетату та трифторацетату містить менш ніж 0,1 % за масою аніонів у складі.

60 Даний винахід, крім того, відноситься до способу отримання складу, що передбачає

зберігання зразка ліофілізованого складу, що описується вище, протягом щонайменше тижня за температурою щонайменше 20 °C; та відновлення ліофілізованого складу. Необов'язково, ліофілізований склад відновлюють у воді або сольовому розчині. Необов'язково, спосіб також передбачає введення хворому відновленого складу, необов'язково, після додаткового розбавлення нормальним сольовим розчином. Необов'язково, склад зберігають протягом щонайменше року. Необов'язково, зберігання здійснюють при навколишній температурі. Необов'язково, зберігання передбачає періоди, при яких температура перевищує 37 °C. Згідно з деякими способами хворий страждає на інсульт або травматичне пошкодження CNS (центральної нервової системи). Згідно з деякими способами ліофілізований зразок зберігають в машині швидкої допомоги. Згідно з деякими способами хворий страждає на субарахноїдальний крововилив. Згідно з деякими способами хворого піддають ендоваскулярній репарації аневризми.

Короткий опис графічних матеріалів

На фіг. 1 представлений графік, що демонструє зону інфаркту головного мозку щура після інсульту 3PVO після лікування різними складами TAT-NR2B9c.

На фіг. 2A, B A) представлена стовпчикова діаграма, що демонструє стабільність різних складів TAT-NR2B9c при -20 °C та 40 °C. На вісі Y представлена чистота TAT-NR2B9c після 1 тижня при температурі зберігання, як виміряно за % загальної площі із застосуванням RP-HPLC. B) Ті самі дані, що і для A, але відсортовані за буфером та pH.

На фіг. 3 представлена стовпчикова діаграма, що демонструє стабільність (за допомогою HPLC) 20 мг/мл TAT-NR2B9c у гістидиновому буфері, pH 6,5, у присутності різних об'ємоутворювальних засобів та солі при -20 °C та 40 °C.

На фіг. 4A, B представлені графіки диференційної сканувальної калориметрії для 20 мг/мл TAT-NR2B9c у гістидиновому буфері, pH 6,5, у присутності маніту (A) або маніту та NaCl (B).

На фіг. 5A, B представлені графіки диференційної сканувальної калориметрії для 20 мг/мл TAT-NR2B9c у гістидиновому буфері, pH 6,5, у присутності трегалози (A) або трегалози та NaCl (B).

На фіг. 6A, B представлений графік диференційної сканувальної калориметрії для 20 мг/мл TAT-NR2B9c у гістидиновому буфері, pH 6,5, у присутності декстрану-40 (A) або декстрану-40 та NaCl (B).

На фіг. 7A, B A) показаний зовнішній вигляд осаду після ліофілізації 3 мл 90 мг/мл TAT-NR2B9c в 100 мМ гістидині, pH 6,5, з 120 мМ трегалозою. B) Показаний зовнішній вигляд осаду альтернативних складів TAT-NR2B9c з різними кількостями гістидину та трегалози.

Визначення

Разом з активними інгредієнтами ліофілізовані склади можуть містити один або декілька наступних класів компонентів. Класи не є взаємовиключальними; іншими словами, один і той самий засіб може відноситися до кількох класів.

"Об'ємоутворювальний засіб" забезпечує структуру висушеного заморожуванням пептиду. Об'ємоутворювальні засоби передбачають маніт, трегалозу, декстран-40, гліцин, лактозу, сорбіт та цукрозу, серед інших. Крім забезпечення фармацевтично прийняттого осаду об'ємоутворювальні засоби також можуть забезпечувати корисні властивості у відношенні модифікації температури колапсу, забезпечення захисту при заморожуванні та відтаванні, температури склування та посилення стабільності білка протягом тривалого зберігання. Ці засоби також можуть служити як модифікатори тоничності.

Буфер являє собою засіб, який підтримує pH розчину в прийнятному діапазоні до ліофілізації. Переважним буфером є гістидин. Інші буфери передбачають сукцинат (натрію або калію), гістидин, цитрат (натрію), глюконат, ацетат, фосфат, Tris та подібне. Переважні буфери є ефективними у діапазоні pH від приблизно 5,5 до приблизно 7 або від приблизно 6 до приблизно 7; переважно pH становить приблизно 6,5. Приклади буферів, що контролюють pH у даному діапазоні, передбачають сукцинат (такий як натрію сукцинат), глюконат, гістидин, цитрат та інші буфери на основі органічних кислот.

"Кріопротектор" забезпечує стабільність пептиду при індукованих заморожуванням впливах, вірогідно, у результаті переважного витиснення з поверхні білка. Він також може забезпечувати захист в ході первинного та вторинного сушіння і тривалого зберігання продукту. Прикладами є полімери, такі як декстран та поліетиленгліколь; цукри (у тому числі цукрові спирти), такі як цукроза, глюкоза, трегалоза і лактоза; поверхнево-активні речовини, такі як полісорбати; та амінокислоти, такі як гліцин, аргінін і серин.

"Ліопротектор" забезпечує стабільність пептиду у ході процесу сушіння або дегідратації (циклів первинного та вторинного сушіння), вірогідно, шляхом забезпечення аморфної матриці у склуватому стані та шляхом зв'язування з білком за допомогою водневого зв'язку із заміною

молекул води, які видаляються в ході процесу сушіння. Це допомагає зберігати пептидну конформацію, мінімізувати розщеплення пептиду в ході циклу ліофілізації та поліпшувати довгочасну стабільність продукту. Приклади передбачають багатоатомні спирти або цукри, такі як цукроза та трегалоза.

5 Крім тих, що вже згадувалися, інші стабілізатори або інгібітори розщеплення можуть передбачати інгібітори деамідування, поверхнево-активні речовини, деякі з яких являють собою складні ефіри жирних кислот і сорбітанполіетоксилатів (наприклад, полісорбат 20 або полісорбат 80), полуксамер 188 та детергенти.

10 Терміни "ліофілізація", "ліофілізований" та "висушений заморожуванням" відносяться до процесу, за допомогою якого матеріал, що підлягає сушінню, спочатку заморожують, а потім лід або заморожений розчинник видаляють шляхом сублімації у вакуумному середовищі.

Термін "фармацевтичний склад" або "композиція" означає препарат, який забезпечує ефективність активного засобу та не містить додаткові компоненти, що є токсичними для суб'єктів, яким будуть вводити склад.

15 Термін "час відновлення" означає час, необхідний для регідратування ліофілізованого складу розчином до розчину, який не містить частинки, помітні неозброєним оком.

Термін "стабільний" ліофілізований пептидний склад означає склад без суттєвих змін, що спостерігаються при 20 °C протягом щонайменше одного тижня, місяця або переважно більш ніж щонайменше трьох місяців, щонайменше шести місяців або року. Зміни вважають незначними, якщо руйнується не більш ніж 10 %, переважно 5 % пептиду, як виміряно за допомогою SEC-HPLC. Регідратований розчин при візуальному аналізі виглядає безбарвним або прозорим - злегка опалесцентним. Концентрація, pH та осмоляльність складу характеризуються не більш ніж +/-10 % зміною після зберігання. Ефективність знаходиться у межах 70-130 %, переважно 80-120 % або іноді 80-100 % свіжовиготовленого контрольного зразка. Спостерігається не більш ніж 10 %, переважно 5 % фрагментація. Утворюється не більш ніж 10 %, переважно 5 % агрегація. Стабільність може бути виміряна різними способами, що розглядаються в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991), та Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993).

20 Термін "ізотонічний" означає, що склад, який становить інтерес, має, по суті, той самий осмотичний тиск, що і кров людини. Ізотонічні склади, як правило, будуть мати осмотичний тиск від приблизно 270 до 328 мОсм. Злегка гіпотонічний тиск становить 250-269, а злегка гіпертонічний тиск становить 328-350 мОсм. Осмотичний тиск може бути виміряний, наприклад, із застосуванням парового осмометра або осмометра заморожувального типу.

25 Модифікатори тонічності: Солі (NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>) можуть бути використані як модифікатори тонічності для контролю осмотичного тиску. Крім того, кріопротектори/ліопротектори та/або об'ємоутворювальні засоби, такі як цукроза, маніт або гліцин, можуть служити модифікаторами тонічності.

30 Числові значення, такі як концентрації або pH, приводяться у межах допуску, що відображають точність, з якою значення може бути виміряне. Якщо контекст не вимагає іншого, дробові величини округляються до найближчого цілого числа. Якщо контекст не вимагає іншого, наведення діапазону значень передбачає, що можуть бути використані будь-які ціле число або піддіапазон у межах діапазону.

Терміни "захворювання" та "стан" використовуються синонімічно із зазначенням будь-якого порушення або переривання нормальної структури або функції у суб'єкта.

45 Докладне розкриття даного винаходу

#### I. Загальні відомості

Пептиди, що синтезуються твердофазними способами, як правило, отримують у вигляді трифторацетатних солей, оскільки трифтороцтову кислоту (TFA) використовують для зняття захисту з пептидів та/або для видалення пептидів зі смол. Для фармацевтичного застосування трифторацетат, як правило, замінюють ацетатом як протиіоном, оскільки ацетат є нетоксичним, та заміна трифторацетату ацетатом є ефективною. Так було у випадку з пептидом TAT-NR2B9c, що синтезується на даний час, як описано в WO 2010144721 або в WO-A-2014/085349, а також в інших документах.

50 Ацетат часто є переважним протиіоном для фармацевтичних пептидів, оскільки трифторацетат може бути замінений ацетатом з незначною зміною у типовому процесі очищення пептиду, що отримують твердофазним синтезом, при якому кінцеве промивання виконують з оцтовою кислотою замість трифтороцтової кислоти з наступним елюванням ацетонітрилом. Іноді замість цього застосовують інші протиіони. Наприклад, іноді застосовують хлорид для погано розчинних пептидів, оскільки він поліпшує їх розчинність. Однак заміна трифторацетату або ацетату на хлорид призводить до втрати деякої кількості пептиду. Більш

того, наявність HCl, що утворюється при хлоридному обміні, як повідомляли, модифікує структуру та знижує термічну стабільність деяких пептидів (Biochemistry, 5th edition, Berg et al. eds, Freeman; 2002); J Pept Sci. 2007 Jan; 13(1):37-43). TAT-NR2B9c вже є високорозчинним пептидом у вигляді ацетатної соли. Отже, заміна трифторацетатної або ацетатної соли хлоридом, як, здавалося б, має недоліки, що полягають у зниженні виходу та у можливому зменшенні стабільності без будь-якої компенсуючої переваги.

Неочікувано було виявлено, що хлоридна сіль TAT-NR2B9c забезпечує значно більшу стабільність у ліофілізованій формі, ніж ацетатна сіль TAT-NR2B9c у тому самому складі або ацетатна сіль TAT-NR2B9c, ліофілізована з сольового розчину. Хлоридна сіль може залишатися достатньо стабільною для клінічного застосування, навіть при зберіганні при навколишніх температурах літнього періоду, що досягають або навіть перевищують 37°C, протягом кількох років. Більш ніж висока стабільність хлоридної соли у порівнянні з ацетатом більш ніж компенсує будь-які більші витрати або зниження виходу, що потребуються при заміні трифторацетату як соли. Даний винахід відноситься до ліофілізованих складів активних засобів, зокрема, TAT-NR2B9c, у вигляді хлоридної соли. Такі склади є стабільними при навколишній температурі (наприклад, щонайменше 20°C), що, таким чином, полегшує забезпечення постачання такого складу в машинах швидкої допомоги або подібному, або персоналом служби негайної допомоги для введення на місці захворювання або нещасного випадку, або між таким місцем та медичним закладом.

Ліофілізовані склади отримують з попередньо ліофілізованого складу, що містить активний засіб, буфер, об'ємоутворювальний засіб та воду. Можуть бути присутніми, а можуть не бути присутніми, інші компоненти, такі як кріо- або ліоконсерванти, засіб регулювання тоничності, фармацевтично прийнятні носії та подібне. Переважним активним засобом є хлоридна сіль TAT-NR2B9c. Переважним буфером є гістидин. Переважним об'ємоутворювальним засобом є трегалоза. Трегалоза також служить кріо- та ліоконсервантом. Типовий попередньо ліофілізований склад містить активний засіб (наприклад, хлоридну сіль TAT-NR2B9c), гістидин (10-100 мМ, 15-100 мМ, 15-80 мМ, 40-60 мМ або 15-60 мМ, наприклад, 20 мМ або необов'язково 50 мМ або 20-50 мМ) та трегалозу (50-200 мМ, переважно 80-160 мМ, 100-140 мМ, більш переважно 120 мМ). рН становить 5,5-7,5, більш переважно 6-7, більш переважно 6,5. Концентрація активного засобу (наприклад, хлоридної соли TAT-NR2B9c) складає 20-200 мг/мл, переважно 50-150 мг/мл, більш переважно 70-120 мг/мл або 90 мг/мл. Таким чином, типовий попередньо ліофілізований склад містить 20 мМ гістидину, 120 мМ трегалози та 90 мг/мл хлоридної соли TAT-NR2B9c. Необов'язково може бути включений скавенджер ацетилювання, такий як лізин, як описується у заявці № 057769-446850, що знаходиться на одночасному розгляданні, для додаткового зниження будь-якого остаточного ацетату або трифторацетату у складі.

Після ліофілізації ліофілізовані склади характеризуються низьким вмістом води, переважно приблизно 0 % - 5 % води, більш переважно менш ніж 2,5 % води за масою. Ліофілізовані склади можна зберігати у морозильній камері (наприклад, при -20 або -70 °C), у холодильнику (при 0-4 °C) або при кімнатній температурі (при 20-25 °C).

Активні засоби відновлюють у водному розчині, переважно у воді для ін'єкції або необов'язково в нормальному сольовому розчині (в 0,8-1,0 % сольовому розчині та переважно в 0,9 % сольовому розчині). Відновлення може бути до того самого або до меншого або більшого об'єму, ніж об'єм попередньо ліофілізованого складу. Переважно, об'єм після відновлення більше, ніж до відновлення (наприклад, більше у 3-6 разів). Наприклад, об'єм при попередній ліофілізації, що складає 3-5 мл, може бути відновлений до об'єму 10 мл, 12 мл, 13,5 мл, 15 мл, або 20 мл, або 10-20 мл, серед інших. Після відновлення концентрація гістидину становить переважно 2-20 мМ, наприклад, 2-7 мМ, 4,0-6,5 мМ, 4,5 мМ або 6 мМ; концентрація трегалози становить переважно 15-45 мМ або 20-40 мМ або 25-27 мМ або 35-37 мМ. Концентрація лізину складає переважно 100-300 мМ, наприклад, 150-250 мМ, 150-170 мМ або 210-220 мМ. Активний засіб переважно має концентрацію 10-30 мг/мл, наприклад 15-30, 18-20, 20 мг/мл активного засобу (наприклад, TAT-NR2B9c) або 25-30, 26-28 або 27 мг/мл активного засобу. Типовий склад після відновлення містить 4-5 мМ гістидину, 26-27 мМ трегалози, 150-170 мМ лізину та 20 мг/мл TAT-NR2B9c (при цьому концентрації заокруглюють до найближчого цілого числа). Другий типовий склад після відновлення містить 5-7 мМ гістидину, 35-37 мМ трегалози, 210-220 мМ лізину та 26-28 мг/мл TAT-NR2B9c (при цьому концентрації заокруглюють до найближчого цілого числа). Відновлений склад може бути додатково розбавлений перед введенням, наприклад, шляхом додавання у мішок для рідини, що містить нормальний сольовий розчин для внутрішньовенної інфузії.

Будь-який опис складу у вигляді зазначених компонентів, що містяться або включені (або

зазначених подібною термінологією), слід розуміти як альтернативний або додатковий опис складу, що складається з цих указаних компонентів, або що складається, по суті, з таких.

Способи сушіння заморожуванням викладені, наприклад, в *Methods in Enzymology*, Vol. 22, Pages 33-39, Academic Press, New York (1971), а також в *Freeze-Drying*, E. W. Flosdorf, Rheinhold, New York (1949). TAT-NR2B9c переважно ліофілізують у тому самому флаконі, у якому його будуть відновлювати для застосування. Водний розчин TAT-NR2B9c додають у флакон необов'язково після фільтрування через стерильну систему фільтрації, таку як 0,22-мікронний фільтр, що зазвичай застосовують для пептидів. Склади можуть бути ліофілізовані в контрольованому циклі, такому як цикл, що описується у прикладах. Попередньо ліофілізований склад може бути поміщений до флакону та ліофілізований при понижених температурі та тиску. Після ліофілізації флакони можуть бути заткнуті. Для застосування ліофілізат відновлюють водою для ін'єкції, нормальним сольовим розчином або іншим фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем.

Ряд контейнерів є прийнятним для ліофілізації. Контейнер повинен витримувати зовнішній тиск при його затиканні та зберіганні в умовах часткового вакууму. Контейнер повинен бути зробленим з матеріалу, який забезпечує прийнятний теплообмін між зовнішнім та внутрішнім середовищем. Розмір контейнера повинен бути таким, щоб розчин, що підлягає ліофілізації, займав не більш ніж 20 % корисного об'єму або міг перевищувати його з надлишком згідно з рекомендаціями USP по об'єму в контейнері, що мають переважну силу. Наприклад, 3-мл флакон може бути наповнений 0,5 мл розчину. Флакони можуть бути зроблені зі скла, наприклад, боросілікату, або пластику, наприклад, поліпропілену.

Можуть бути використані скляні пляшки, що зазвичай застосовують для ліофілізації біологічних матеріалів. Іншим прийнятним контейнером є двохкамерний шприц, у якому одна камера містить ліофілізований осад пептиду TAT-NR2B9c, а інша камера містить водний розріджувач. Після завершення ліофілізації вакуум у флаконах або ампулах може бути послаблений шляхом заповнення системи інертним газом, з затиканням на місці із застосуванням стандартного обладнання, а потім з обтискним запечатуванням. Такий спосіб забезпечить стерильний кінцевий продукт. Також можуть бути застосовані інші рішення з двох частин, такі як мішок з руйнівною перегородкою між камерою з ліофілізованим лікарським засобом та розріджувачем.

## II. Активні засоби

Хоча велика частина опису відноситься до активного засобу TAT-NR2B9c, з метою ілюстрації, інші активні засоби, що описуються нижче, можуть бути отримані у вигляді хлоридних солей або складені згідно з принципами, що описуються для TAT-NR2B9c. Конкретні концентрації, що наводяться для TAT-NR2B9c, можуть бути використані як є для інших засобів або перетворені з отриманням еквімолярних концентрацій для іншого засобу та TAT-NR2B9c.

Активні засоби інгібують взаємодію між PSD-95 та одним або декількома NMDAR (наприклад, 2A, 2B, 2C або 2D) або nNOS (наприклад, Swiss-Prot P29475) шляхом зв'язування з PSD-95. Такі засоби застосовні для зменшення одного або декількох пошкоджувальних ефектів інсульту та інших неврологічних станів, опосередкованих, щонайменше частково, ексайтотоксичністю NMDAR. Такі засоби включають пептиди з амінокислотною послідовністю, що містить мотив PL NMDA-рецептора або домен PDZ в PSD-95 або ґрунтується на ньому. Такі пептиди також можуть інгібувати взаємодії між PSD-95 і nNOS та іншими глутаматними рецепторами (наприклад, каїнітиновими рецепторами або AMPA-рецепторами), такими як KV1.4 та GluR6. Переважні пептиди інгібують взаємодію між доменами PDZ-1 та -2 у білку постсинаптичної щільності-95 (PSD-95) (амінокислотної послідовності людини, що надана Stathakism, *Genomics* 44(1):71-82 (1997)) та C-кінцевою PL послідовністю однієї або декількох субодиниць NMDA-рецептора 2, у тому числі субодиниці NR2B нейронального рецептора N-метил-D-аспартату (Mandich et al., *Genomics* 22, 216-8 (1994)). NMDAR2B має ID GenBank 4099612, 20 C-кінцевих амінокислот FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID NO: 11) та PL мотив ESDV (SEQ ID NO: 12). Переважні пептиди інгібують людські форми PSD-95 та людські рецептори NMDAR. Однак інгібування також може бути показано видовими варіантами білків. Нижче представлений перелік NMDA- та глутаматних рецепторів, які можуть бути використані.

## NMDA-рецептори з PL послідовностями

Назва	GI або № доступу	С-кінцева послідовність з 20 мономерів	С-кінцева послідовність з 40 мономерів	PL?	Внутрішній ID PL
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPSVSTVV (SEQ ID NO: 13)	STVV (SEQ ID NO: 27)	X	AA216
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID NO: 14)	HRES (SEQ ID NO: 28)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRHRES (SEQ ID NO: 14)	HRES (SEQ ID NO: 28)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISSESEV (SEQ ID NO: 15)	ESEV (SEQ ID NO: 29)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID NO: 11)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	AA34,1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEYQRTSRTCES (SEQ ID NO: 16)	TCES (SEQ ID NO: 30)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIESDV (SEQ ID NO: 11)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	
NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV (SEQ ID NO: 17)	ESDV (SEQ ID NO: 12)	X	AA34,2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGS AHFSSLESEV (SEQ ID NO: 18)	ESEV (SEQ ID NO: 29)	X	
Глутаматний рецептор дельта 2	AF009014	QPTPTLGLNLGNDPDRGTSI (SEQ ID NO: 19)	GTSI (SEQ ID NO: 31)	X	
Глутаматний рецептор 1	I28953	MQSIPCMSSHSSGMPLGATGL (SEQ ID NO: 20)	ATGL (SEQ ID NO: 32)	X	
Глутаматний рецептор 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIESVKI (SEQ ID NO: 21)	SVKI (SEQ ID NO: 33)	X	
Глутаматний рецептор 3	AF167332	QNYATYREGYNVYGTESVKI (SEQ ID NO: 22)	SVKI (SEQ ID NO: 33)	X	
Глутаматний рецептор 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASDLP (SEQ ID NO: 23)	SDLP (SEQ ID NO: 34)		
Глутаматний рецептор 5	U16125	SFTSILTCHQRRRTQRKETVA (SEQ ID NO: 24)	ETVA (SEQ ID NO: 35)	X	
Глутаматний рецептор 6	U16126	EVINMHTFNDRLPGKETMA (SEQ ID NO: 25)	ETMA (SEQ ID NO: 36)	X	

Пептиди можуть містити або можуть ґрунтуватися на PL мотиві з С-кінця будь-якої з вищезгаданих субодиниць та мають амінокислотну послідовність, що містить [S/T]-X-[V/L]. Ця послідовність переважно зустрічається на С-кінці пептидів згідно з даним винаходом. Переважні пептиди мають амінокислотну послідовність, що містить [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID NO: 38) на своєму С-кінці. Типові пептиди містять ESDV (SEQ ID NO: 12), ESEV (SEQ ID NO: 29), ETDV (SEQ ID NO: 39), ETEV (SEQ ID NO: 40), DTDV (SEQ ID NO: 41) та DTEV (SEQ ID NO: 42) у вигляді С-кінцевих амінокислот. Двома особливо переважними пептидами є KLSSIESDV (SEQ ID NO: 5) та KLSSIETDV (SEQ ID NO: 43). Такі пептиди, як правило, містять 3-25 амінокислот (без пептиду інтерналізації), пептиди довжиною 5-10 амінокислот та особливо 9 амінокислот (також без пептиду інтерналізації) є переважними. В деяких таких пептидах усі амінокислоти отримані з С-кінця NMDA-рецептора (не включаючи амінокислоти з пептиду інтерналізації).



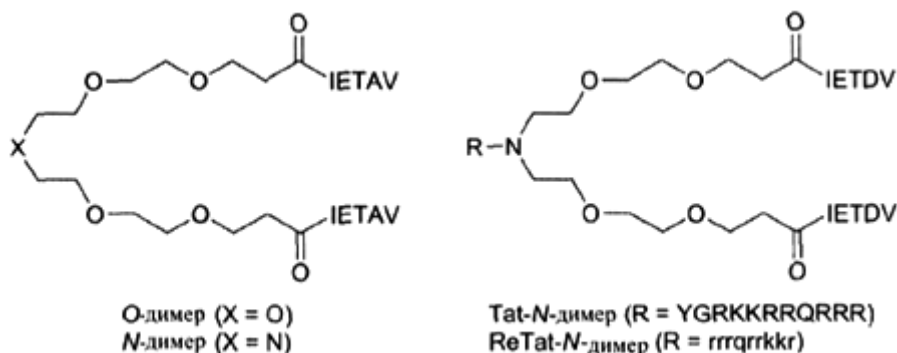
Пептиди та пептидоміметики згідно з даним винаходом можуть містити модифіковані амінокислотні залишки, наприклад, залишки, які є N-алкільованими. N-кінцеві модифікації алкілом можуть містити, наприклад, N-метил, N-етил, N-пропіл, N-бутил, N-циклогексилметил, N-циклогексилетил, N-бензил, N-фенілетил, N-фенілпропіл, N-(3,4-дихлорфеніл)-пропіл, N-(3,4-дифторфеніл)-пропіл та N-(нафтален-2-іл)-етил).

В Bach, J. Med. Chem. 51, 6450-6459 (2008), та WO 2010/004003 описуються серії аналогів NR2B9c (SEQ ID NO: 6). Активність зв'язування PDZ демонструється пептидами, що мають тільки три C-кінцевих амінокислоти (SDV). У Bach також повідомляється про аналоги з амінокислотною послідовністю, що містить  $X_1tSX_2V$  або складається з такої (SEQ ID NO: 68), при цьому  $t$  та  $S$  являють собою альтернативні амінокислоти,  $X_1$  вибраний з E, Q та A або їх аналога,  $X_2$  вибраний з A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D і N-Me-N або їх аналога. Необов'язково пептид є N-алкільованим у положенні P3 (третя амінокислота з C-кінця, тобто у положенні, яке займає tS). Пептид може бути N-алкільованим з циклогексаном або ароматичним замісником та додатково містить спейсерну групу між замісником та кінцевою аміногрупою пептиду або пептидного аналога, в якому спейсером є алкільна група, переважно вибрана з метилену, етилену, пропілену та бутилену. Ароматичним замісником може бути нафтален-2-ільний фрагмент або ароматичне кільце, заміщене однією або двома галогеновими та/або алкільними групами.

Також можуть бути включені інші модифікації без несприятливого впливу на активність, та вони передбачають заміну однієї або декількох амінокислот у природній L-ізомерній формі амінокислотами в D-ізомерній формі. Таким чином, будь-яка амінокислота, що зустрічається у природі в L-конфігурації (яку також можна назвати R або S в залежності від структури хімічного об'єкта) може бути замінена амінокислотою того самого типу хімічної структури або пептидоміметика, але протилежної хіральності, що зазвичай називають D-амінокислотою, але яку, крім того, можна називати R- або S-формою. Таким чином, пептидоміметик може містити 1, 2, 3, 4, 5, щонайменше 50 % або усі D-амінокислотні залишки. Пептидоміметик, що містить декілька або усі D залишки, іноді називають "інвертованим" пептидом.

Пептидоміметики також передбачають ретропептиди. Ретропептид має зворотну амінокислотну послідовність. Пептидоміметики також передбачають ретроінвертовані пептиди, у яких порядок амінокислот є протилежним таким чином, що первісно C-кінцева амінокислота знаходиться на N-кінці, а D-амінокислоти застосовуються замість L-амінокислот. В WO 2008/014917 описується ретроінвертований аналог Tat-NR2B9c з амінокислотною послідовністю vdseisslk-rrrqrkkrgyin (SEQ ID NO: 69) (строчні літери вказують на D-амінокислоти), та повідомляється, що він є ефективним у інгібуванні ішемії головного мозку. Іншим ефективним пептидом, що описується у даному документі, є Rv-Tat-NR2B9c (RRRQRRKKRGYKLSSIESDV; SEQ ID NO: 70).

Лінкер, наприклад, поліетиленгліколевий лінкер, може бути використаний для димеризації активного фрагмента пептиду або пептидоміметика з метою посилення його афінності та селективності у відношенні білків, що містять тандемні домени PDZ. Див., наприклад, Bach et al., (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48:9685-9689, та WO 2010/004003. Пептид, що містить PL мотив, переважно є димеризованим шляхом з'єднання N-кінців двох таких молекул, при цьому C-кінці залишаються вільними. В Bach, крім того, повідомляється, що пентамерний пептид IESDV (SEQ ID NO: 71) з C-кінця NMDAR 2B був ефективним в інгібуванні зв'язування NMDAR 2B з PSD-95. IETDV (SEQ ID NO: 73) також можна використовувати замість IESDV. Необов'язково, приблизно 2-10 копій PEG може бути з'єднано у тандемі як лінкер. Необов'язково, лінкер також може бути приєднаний до пептиду інтерналізації або ліпидований для посилення клітинного поглинання. Приклади типових димерних інгібіторів приведені нижче (див. Bach et al., PNAS 109 (2012), 3317-3322). Будь-який з інгібіторів PSD-95, що розкриваються у даному документі, може бути застосований замість IETDV, та будь-який пептид інтерналізації або ліпідувальний фрагмент може бути застосований замість tat. Також можуть бути використані інші лінкери, окрім тих, що показані.



IETAV визначається в SEQ ID NO: 26, YGRKKRRQRRR в SEQ ID NO: 2, а rrrqrrkkr в SEQ ID NO: 10, при цьому строчні літери вказують на D-амінокислоти.

Відповідна фармакологічна активність пептидів, пептидоміметиків або інших засобів при необхідності може бути підтверджена із застосуванням щурячих моделей інсульту, що описувалися раніше, перед тестуванням на приматі та клінічних іспитах, що описуються у даній заявці. Пептиди або пептидоміметики також можуть бути скриновані за здатністю інгібувати взаємодії між PSD-95 та NMDAR 2B із застосуванням аналізів, що описуються, наприклад, у заявці на видання патенту США № 20050059597, яка включена за допомогою посилання. Застосовні пептиди, як правило, характеризуються значеннями IC<sub>50</sub> менш ніж 50 мкМ, 25 мкМ, 10 мкМ, 0,1 мкМ або 0,01 мкМ у такому аналізі. Переважні пептиди, як правило, характеризуються значеннями IC<sub>50</sub> 0,001-1 мкМ та більш переважно 0,001-0,05, 0,05-0,5 або 0,05-0,1 мкМ. Якщо пептид або інший засіб характеризують як такий, що інгібує зв'язування однієї взаємодії, наприклад, взаємодії PSD-95 з NMDAR2B, то такий опис не виключає того, що пептид або засіб також інгібує іншу взаємодію, наприклад, інгібування зв'язування PSD-95 з nNOS.

Пептиди, подібні тільки що описаним, необов'язково можуть бути дериватизовані (наприклад, ацетильовані, фосфорильовані, міристоїльовані, геранільовані, пегільовані та/або глікозилізовані) для поліпшення афінності зв'язування інгібітору, для поліпшення здатності інгібітору транспортуватися через клітинну мембрану або для підвищення стабільності. Як конкретний приклад, для інгібіторів, у яких третій залишок з С-кінця являє собою S або T, даний залишок може бути фосфорильований перед застосуванням пептиду.

Фармакологічний засіб може бути зв'язаний з пептидом інтерналізації для полегшення поглинання клітинами та/або проходження крізь гематоенцефалічний бар'єр. Пептиди інтерналізації складають добре відомий клас відносно коротких пептидів, які дозволяють багатьом клітинним або вірусним білкам перетинати мембрани. Пептиди інтерналізації, також відомі як пептиди трансдукції крізь клітинну мембрану або пептиди проникнення у клітину, можуть містити, наприклад, 5-30 амінокислот. Такі пептиди, як правило, мають катіонний заряд від вищезгаданої нормальної представленості (відносно білків у цілому) залишків аргініну та/або лізину, який, як вважають, полегшує їх проходження крізь мембрани. Деякі з таких пептидів містять щонайменше 5, 6, 7 або 8 залишків аргініну та/або лізину. Приклади включають білок Antennapedia (Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997)) (та його варіанти), білок tat вірусу імунodefіциту людини, білок VP22, продукт гена UL49 вірусу простого герпесу 1 типу, пенетратин, SynB1 та 3, транспортан, амфіпатичний, gr41NLS, polyArg та деякі білкові токсини рослин та бактерій, такі як рицин, абрин, модесин, дифтерійний токсин, холерний токсин, сибіревирозковий токсин, термолабільні токсини та екзотоксин A Pseudomonas aeruginosa (ETA). Інші приклади описуються у наступних посиланнях: Temsamani, Drug Discovery Today, 9(23):1012-1019, 2004; De Coupade, Biochem J., 390:407-418, 2005; Saalik Bioconjugate Chem. 15: 1246-1253, 2004; Zhao, Medicinal Research Reviews 24(1):1-12, 2004; Deshayes, Cellular and Molecular Life Sciences 62:1839-49, 2005; Gao, ACS Chem. Biol. 2011, 6, 484-491, SG3 (RLSGMNEVLSFRWL (SEQ ID NO:9)), Stalmans PLoS ONE 2013, 8(8) e71752, 1-11 and supplement; Figueiredo et al., IUBMB Life 66, 182-194 (2014); Copolovici et al., ACS Nano, 8, 1972-94 (2014); Lukanowski Biotech J. 8, 918-930 (2013); Stockwell, Chem. Biol. Drug Des. 83, 507-520 (2014); Stanzl et al. Accounts. Chem. Res/ 46, 2944-2954 (2013); (усі включені за допомогою посилання).

Переважаючим пептидом інтерналізації є tat з вірусу HIV. Пептид tat, описаний у попередній роботі, містить стандартну амінокислотну послідовність YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), знайдено в білкові Tat HIV, або складається з такої. Якщо присутні додаткові залишки, що

фланкують такий мотив tat (рядом з фармакологічним засобом), то такими залишками можуть бути, наприклад, натуральні амінокислоти, що фланкують цей сегмент від білка tat, спейсерні або лінкерні амінокислоти, як правило, застосовувані для зв'язування двох пептидних доменів виду, наприклад, gly (ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 44), TGEKP (SEQ ID NO: 45), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 46) або LRQRDGERP (SEQ ID NO: 47) (див., наприклад, Tang et al. (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682-15686; Hennecke et al. (1998), Protein Eng. 11, 405-410)), або можуть бути будь-які інші амінокислоти, що суттєво не знижують здатність забезпечувати поглинання варіанта без залишків, що фланкують. Переважно, число амінокислот, що фланкують, відмінних від таких активного пептиду, не перевищує десяти на будь-якій стороні YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2). Одним прийнятним пептидом tat, що містить додаткові амінокислотні залишки, що фланкують C-кінець YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), є YGRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 48). Однак, переважно, амінокислоти, що фланкують, відсутні. Інші пептиди tat, які можуть бути використані, передбачають GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO: 4) та GRKKRRQRRRP (SEQ ID NO: 72).

Варіанти вищезгаданого пептиду tat, що мають знижену здатність зв'язуватися з кальцієвими каналами N-типа, описуються в WO 2008/109010. Такі варіанти можуть містити амінокислотну послідовність XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 49) або складатися з такої, в якій X являє собою амінокислоту, відмінну від Y, або відсутній (у цьому випадку G являє собою вільний N-кінцевий залишок). Переважний пептид tat має N-кінцевий залишок Y, заміщений F. Таким чином, переважним є пептид tat, що містить FGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 3) або що складається з такої. Інший переважний варіантний пептид tat складається з GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 1). Інший переважний пептид tat містить RRRQRRKKRG або RRRQRRKKRGY (амінокислоти 1-10 або 1-11 з SEQ ID NO: 70) або складається з таких. Інші отриманні з tat пептиди, які полегшують поглинання фармакологічного засобу без інгібування кальцієвих каналів N-типа, передбачають такі, що представлені нижче.

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat) (SEQ ID NO: 8)

X-GKKKKKQKKK (SEQ ID NO: 50)

X-RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 51)

X-GAKRRQRRR (SEQ ID NO: 52)

X-AKKRRQRRR (SEQ ID NO: 53)

X-GRKARRQRRR (SEQ ID NO: 54)

X-RKARRQRRR (SEQ ID NO: 55)

X-GRKKARQRRR (SEQ ID NO: 56)

X-RKKARQRRR (SEQ ID NO: 57)

X-GRKKRRQARR (SEQ ID NO: 58)

X-RKKRRQARR (SEQ ID NO: 59)

X-GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 60)

X-RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 61)

X-RRPRRRRRPRR (SEQ ID NO: 62)

X-RRARRARRARR (SEQ ID NO: 63)

X-RRRARRRRARR (SEQ ID NO: 64)

X-RRRPRRRRRPRR (SEQ ID NO: 65)

X-RRPRRRRR (SEQ ID NO: 66)

X-RRARRARR (SEQ ID NO: 67)

X може представляти собою вільний амінокінець, одну або декілька амінокислот або кон'югований фрагмент. Пептиди інтерналізації можуть бути використані у інвертованій, або ретро-, або інвертованій ретроформі зі зв'язаним пептидом або пептидоміметиком, що знаходиться у такій формі, або без такого. Наприклад, переважний химерний пептид має амінокислотну послідовність, що містить YGRKKRRQRRR-KLSSIESDV (SEQ ID NO: 6, також відому як TAT-NR2B9c або Tat-NR2B9c) або YGRKKRRQRRR-KLSSIETDV (SEQ ID NO: 7), або складається з такої. Інші переважні химерні пептиди відрізняються від SEQ ID NO: 6 або NO: 7 не більш ніж 1, 2, 3, 4 або 5 амінокислотними замінами, делеціями або додаваннями (внутрішніми або на кінцях). Інші переважні пептиди передбачають RRRQRRKKRGY-KLSSIESDV (SEQ ID NO: 70), також відому як RvTat-NR2B9c, або мають амінокислотну послідовність, що містить RRRQRRKKRGY-KLSSIETDV (SEQ ID NO: 37) або складається з такої.

Пептиди інтерналізації можуть бути приєднані до фармакологічних засобів традиційними способами. Наприклад, засоби можуть бути з'єднані з пептидами інтерналізації хімічним зв'язком, наприклад, через з'єднувальний або кон'югувальний засіб. Багато таких засобів

комерційно доступні та розглядаються в S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991). Деякі приклади зшивальних реагентів передбачають J-сукцинїмідил-3-(2-піридилїтіо)-пропіонат (SPDP) або N, N'-(1,3-фенїлен)-біс-малеїмід; N, N'-етилєн-біс-(їодоацетамід) або їншїй такий реагент з метїленовими мїсточками з 6-11 атомами вуглецю (які відносно специфічні для сульфїдрїльних груп) та 1,5-дїфтор-2,4-дїнітробензол (який утворює необоротні зв'язки з аміногрупами та тїрозиновими групами). Їнші зшивальні реагенти передбачають п, п'-дїфтор-м, м'-дїнітродїфенїлсульфон (який утворює необоротні поперечні зв'язки з аміногрупами та фенольними групами); дїметїладїпїмїдат (який є специфічним для аміногруп); фенол-1,4-дисульфонїлхлорид (який реагує переважно з аміногрупами); гексаметїлендїїзоціанат або дїїзотїоціанат або азофенїл-п-дїїзоціанат (який реагує переважно з аміногрупами); глутаральдегід (який реагує з кількома різними боковими ланцюгами) та дїсдїазобензїдїн (який реагує, головним чином, з тїрозином та гїстїдином).

Для фармакологічних засобів, які є пептидами, приєднання до пептиду їнтерналізацїї, може бути досягнуто шляхом створення білка злиття, що мїстить пептидну послїдовність, зливу, переважно на своєму N-кінці, з пептидом їнтерналізацїї.

Замість або на додаток до зв'язку пептиду (або їншого засобу), що їнгїбує PSD-95, з пептидом їнтерналізацїї, такий пептид може бути зв'язаний з лїпїдом (лїпїдїзацїя) для пїдвищення гїдрофобності кон'югату у порівнянні з окремим пептидом та полегшення тим самим проходження зв'язаного пептиду крізь клітинні мембрани та/або крізь бар'єр головного мозку. Лїпїдїзацїю переважно виконують на N-кінцевїй амінокислотї, але вона також може бути виконана на внутрішніх амінокислотах, за умови, що здатність пептиду їнгїбувати взаємодїю мїж PSD-95 та NMDAR 2B не знижується бїльш нїж на 50 %. Переважно, лїпїдїзацїю виконують на амінокислотї, відмінній від однієї з чотирьох крайніх C-кінцевих амінокислот. Лїпїди є органічними молекулами, бїльш розчинними в ефірі, нїж у водї, та включають жирні кислоти, гліцериди та стерини. Приїнятні форми лїпїдїзацїї передбачають мїристоїлювання, пальмітоїлювання або приєднання їнших жирних кислот, переважно з довжиною ланцюга 10-20 атомів вуглецю, таких як лауїнова кислота та стеарїнова кислота, а також геранїлювання, геранїлгеранїлювання та їзопренїлювання. Переважними є лїпїдїзацїї типа, що зустрїчається при посттрансляцїйній модифїкацїї природних білків. Лїпїдїзацїя жирною кислотою за допомогою утворення амїдного зв'язку з альфа-амїногрупою N-кінцевої амінокислоти пептиду також є переважною. Лїпїдїзацїя може бути здїйснена пептидним синтезом, що передбачає попередньо лїпїдовану амінокислоту, може бути здїйснена ферментативно *in vitro* або шляхом рекомбїнантної експресїї, за допомогою хїмічного зшивання або хїмічної дериватїзацїї пептиду. Амінокислоти, модифїкованї шляхом мїристоїлювання та їншими лїпїдними модифїкацїями, є комерційно доступними.

Лїпїдїзацїя переважно полегшує проходження зв'язаного пептиду (наприклад, KLSSIESDV (SEQ ID NO: 5) або KLSSIETDV (SEQ ID NO: 43)) крізь клітинну мембрану та/або гематоенцефалїчний бар'єр, не викликаючи тимчасового зниження кров'яного тиску, як це спостерїгається при введенні стандартного пептиду tat за високого дозування (наприклад, при 3 мг/кг або бїльше), або щонаїменше з менш значним зниженням, нїж з тим самим пептидом, зв'язаним зі стандартним пептидом tat.

Фармакологічні пептиди, необов'язково злитї з пептидами tat, можуть бути синтезованї твердофазним синтезом або рекомбїнантними способами. Пептидомїметики можуть бути синтезованї із застосуванням ряду процедур та методів, описаних в науковїй та патентнїй лїтературї, наприклад, в Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9:205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234.

### III. Солї

Пептиди типа, що описується вище, як правило, отримують твердофазним синтезом. Оскїльки при твердофазному синтезї використовується трифторацетат (TFA) для видалення захисних груп або видалення пептидів зі смоли, пептиди, як правило, спочатку отримують у вигляді трифторацетатних солей. Трифторацетат може бути замїщений їншим аніоном, наприклад, шляхом зв'язування пептиду з твердою підкладкою, такою як колонка, промивання колонки для видалення наявного протїїону, урівноваження колонки розчином, що мїстить новий протїїон, а потїм елююванням пептиду, наприклад, за допомогою введення гїдрофобного розчинника, такого як ацетонїтрил, у колонку. Замїщення трифторацетату ацетатом може бути виконано ацетатним промиванням, як останньою стадїєю перед елююванням пептиду в їншому традиційному твердофазному синтезї. Замїщення трифторацетату або ацетату хлоридом може бути виконано промиванням амонїю хлоридом з наступним елююванням. Застосування гїдрофобної підкладки є переважним, та препаративна обернено-фазна HPLC є особливо

переважною для іонного обміну. Трифторацетат може бути заміщений хлоридом безпосередньо або спочатку може бути заміщений ацетатом, а потім ацетат заміщений хлоридом.

Протиіони, будь то трифторацетат, ацетат або хлорид, зв'язуються з позитивно зарядженими атомами в TAT-NR2B9c, зокрема, в N-кінцевій аміногрупі, а також в аргінінових та лізинових залишках бокових ланцюгів амінокислоти. Хоча здійснення даного винаходу не залежить від розуміння точної стехіометрії взаємодії пептиду з аніоном у солі TAT-NR2B9c, вважають, що в молекулах приходить до приблизно 9 протиіонів на молекулу солі.

Хоча заміщення одного протиіона іншим відбувається ефективно, чистота кінцевого протиіона може складати менш ніж 100 %. Таким чином, згадування хлоридної солі TAT-NR2B9c або іншого активного засоби означає, що у препараті солі хлорид є аніоном, переважним за масою (або молями) над усіма іншими аніонами, що присутні в усій солі. Іншими словами, хлорид складає більш ніж 50 % та переважно більш ніж 75 %, 95 %, 99 %, 99,5 % або 99,9 % за масою або молями усіх аніонів, що присутні в солі. В таких соли або складі, отриманому з солі, ацетат та трифторацетат у комбінації та окремо складають менш ніж 50 %, 25 %, 5 %, 0,5 % або 0,1 % аніонів в солі або складі.

#### IV. Захворювання

Ліофілізовані склади застосовні у лікуванні ряду захворювань, зокрема, неврологічних захворювань, та особливо захворювань, опосередкованих частково ексайтотоксичністю. Такі захворювання та стани передбачають інсульт, епілепсію, гіпоксію, субарахноїдальний крововилив, травматичне пошкодження CNS, не асоційоване з інсультом, таке як травматичне пошкодження головного мозку та пошкодження спинного мозку, інша ішемія головного мозку, хвороба Альцгеймера та хвороба Паркінсона. Інші неврологічні виліковні засобами згідно з даним винаходом захворювання, як відомо, не асоційовані з ексайтотоксичністю, передбачають тривожність та біль.

Інсульт є станом, що викликається порушенням кровотоку в CNS незалежно від причини. Можливі причини передбачають емболію, крововилив та тромбоз. Деякі нейрональні клітини гинуть відразу у результаті порушення кровотоку. Ці клітини вивільняють свої складові молекули, у тому числі глутамат, який, у свою чергу, активує NMDA-рецептори, що підвищують рівні внутрішньоклітинного кальцію та внутрішньоклітинні рівні ферментів, що призводить до подальшої загибелі нейрональних клітин (каскад ексайтотоксичності). Загибель тканини CNS називають інфарктом. Об'єм інфаркту (тобто об'єм нейрональних клітин, що загинули у результаті інсульту у головному мозку) може бути застосований як показник ступеню патологічного пошкодження в результаті інсульту. Симптоматичний ефект залежить як від об'єму інфаркту, так і від того, в якій частині головного мозку він спостерігається. Індекс інвалідності може бути використаний як міра симптоматичного пошкодження, наприклад, шкала Ренкіна оцінки наслідків хворих, що перенесли інсульт (Rankin, Scott Med J;2:200-15 (1957)), та індекс Бартела. Шкала Ренкіна ґрунтується на оцінюванні безпосередньо загальних станів хворого наступним чином:

0: відсутність симптомів;

1: відсутність суттєвого порушення життєдіяльності, незважаючи на наявність деяких симптомів; здатен виконувати усі повсякденні обов'язки;

2: легке порушення життєдіяльності; не здатен виконувати усі дотеперішні обов'язки, але здатен обслуговувати себе без сторонньої допомоги;

3: помірне порушення життєдіяльності, що потребує деякої допомоги, однак здатен ходити без сторонньої допомоги;

4: порушення життєдіяльності від помірного до тяжкого; не здатен ходити без сторонньої допомоги та не здатен справлятися зі своїми фізичними потребами без сторонньої допомоги;

5: тяжке порушення життєдіяльності; прикутий до ліжка, нетримання сечі та кала, потребує постійної допомоги та догляду персоналу.

Індекс Бартела ґрунтується на серіях запитані про здатності хворого виконувати 10 основних повсякденних дій з надавання балу від 0 до 100, при цьому більш низький бал вказує на більше порушення життєдіяльності (Mahoney et al, Maryland State Medical Journal 14:56-61 (1965)).

Як альтернатива, тяжкість/наслідки інсульту можуть бути виміряні із застосуванням шкали інсульту NIH, доступної у всесвітній сітці Інтернет на [ninds.nih.gov/doctors/NIH\\_Stroke\\_ScaleJBooklet.pdf](http://ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_ScaleJBooklet.pdf).

Шкала ґрунтується на здатності хворого виконувати 11 груп функцій, що передбачає оцінювання у хворого рівня свідомості, рухових, сенсорних та мовних функцій.

Ішемічний інсульт, більш конкретно, відноситься до типу інсульту, який викликається

затиканням кровотоку до головного мозку. Основною умовою для цього типу затикання найчастіше є розвиток жирових відкладень, що вистеляють стінки судин. Цей стан називають атеросклерозом. Такі жирові відкладення можуть викликати два типи обструкції. Церебральний тромбоз відноситься до тромбу (кров'яного згустку), який розвивається у заткнутій частині судини. "Церебральна емболія" відноситься в цілому до кров'яного згустку, який формується в іншому місці серцево-судинної системи, як правило, у серці та великих артеріях верхньої частини грудної клітини і ший. Потім частина кров'яного згустку відривається, потрапляє у кров та проходить по кровоносним судинам головного мозку, доки не досягає судин, занадто дрібних, щоб його пропустити. Другою важливою причиною емболії є нерегулярне серцевбиття, відоме як артеріальна фібриляція. Це створює умови, при яких згустки можуть утворюватися у серці, переміщуватися та доходити до головного мозку. Додатковими потенційними причинами ішемічного інсульту є крововилив, тромбоз, розсікання артерії або вени, зупинка серця, шок будь-якої етіології, у тому числі крововилив, та ятрогенні причини, такі як безпосереднє хірургічне пошкодження кровоносних судин головного мозку або судин, що ведуть до головного мозку, або хірургічне втручання на серці. На ішемічний інсульт приходить приблизно 83 відсотка усіх випадків інсульту.

Транзиторні ішемічні приступи (TIA) є незначними або провісними інсультами. При TIA присутні стани, що вказують на ішемічний інсульт, та розвиваються типові ознаки, що передвіщають інсульт. Однак затикання (кров'яний згусток) виникає протягом короткого періоду часу та має тенденцію розчинятися за допомогою нормальних механізмів. Хворі, піддані хірургічному втручанню на серці, особливо схильні до ризику транзиторного церебрального ішемічного приступу.

Геморагічний інсульт становить приблизно 17 відсотків випадків інсульту. Він виникає в результаті ослабленої судини, яка розривається та кровоточить у навколишній головний мозок. Кров накопичується та стискає навколишні тканини головного мозку. Двома основними типами геморагічних інсультів є внутрішньомозковий крововилив та субарахноїдальний крововилив. Геморагічний інсульт виникає через руйнування послабленої кровоносної судини. Потенційні причини розривання послабленої кровоносної судини передбачають гіпертонічний крововилив, при якому високий кров'яний тиск викликає розривання кровоносної судини, або іншу основну причину послабленої кровоносної судини, таку як мальформація головного мозку, що руйнує судини, у тому числі аневризму головного мозку, артеріовенозна мальформація (AVM) або кавернозна мальформація. Геморагічні інсульти також можуть бути результатом геморагічної трансформації ішемічного інсульту, що послабляє кровоносні судини при інфаркті, або крововиливу з первинних або метастатичних пухлин в CNS, які містять патологічно слабкі кровоносні судини. Геморагічний інсульт також може виникати з ятрогенних причин, таких як пряме хірургічне втручання на кровоносних судинах головного мозку. Аневризма є балонуванням послабленої ділянки кровоносної судини. Якщо її не лікувати, аневризма буде продовжувати слабнути до розриву та крововиливу у головний мозок. Артеріовенозна мальформація (AVM) являє собою скупчення аномально сформованих кровоносних судин. Кавернозна мальформація являє собою венозну патологію, яка може викликати крововилив з послаблених венозних структур. Будь-яка з таких судин може розірватися, що також викликає кровотечу у головний мозок. Геморагічний інсульт також може виникати у результаті фізичної травми. Геморагічний інсульт в одній частині головного мозку може призвести до ішемічного інсульту в іншій через нестачу крові, втраченої при геморагічному інсульті.

Один клас хворих, що підлягають лікуванню, складають хворі, піддані хірургічній процедурі, яка порушує або може порушувати кровоносну судину, що живить головний мозок, або іншу у головному мозку або CNS. Деякі приклади передбачають хворих, підданих серцево-легеневому шунтуванню, стентуванню сонної артерії, діагностичній ангіографії головного мозку або коронарних артерій аортальної дуги, процедурам судинної хірургії та нейрохірургічним процедурам. Додаткові приклади таких хворих обговорюються у приведеному вище розділі IV. Особливо підходять хворі з аневризмою головного мозку. Таких хворих можна лікувати за допомогою ряду хірургічних процедур, що передбачають кліпірування аневризми для припинення крові або виконання ендovasкулярного хірургічного втручання для блокування аневризми невеликими спіралями або введенням стента у кровоносну судину, у якій виникає аневризма, або введенням мікрокатетера. Ендovasкулярні процедури є менш інвазивними, ніж кліпірування аневризми, та асоціюються з кращим наслідком для хворого, але наслідок все ще передбачає виникання невеликих інфарктів. Таких хворих можна лікувати інгібітором взаємодії PSD-95 з NMDAR 2B та, зокрема, засобами, що описуються вище, у тому числі пептидом YGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID NO: 6, також відомим як Tat-NR2B9c). Часові рамки введення відносно здійснюваного хірургічного втручання можуть бути такими, як описуються

вище для клінічного випробування.

Інший клас хворих, що підлягають лікуванню, складають хворі, що страждають на субарахноїдальний крововилив з анеризмою або без такої (див. WO2013088382).

#### IV. Ефективні режими введення

Після відновлення ліофілізований склад вводять так, що активний засіб (наприклад, NR2B9c) вводиться у кількості, при частоті та шляху введення, ефективних для виліковування, зниження або інгібування подальшого погіршення щонайменше однієї ознаки або симптому захворювання у хворого, що страждає на захворювання, що підлягає лікуванню. Терапевтично ефективна кількість означає кількість активного засобу, достатню в значній мірі для виліковування, зниження або інгібування подальшого погіршення щонайменше однієї ознаки або симптому захворювання або стану, що підлягає лікуванню, у групи хворих (або тваринних моделей), що страждають на захворювання, яке лікують засобом згідно з даним винаходом, у порівнянні з ураженням у контрольній групі хворих (або тваринних моделей), що страждають на це захворювання або стан, які не отримують лікування даним засобом. Кількість також вважається терапевтично ефективною, якщо хворий, що отримує індивідуальне лікування, досягає більш ніж сприятливий наслідок, ніж середній наслідок у контрольній групі порівнюваних хворих, які не отримують лікування способами згідно з даним винаходом. Терапевтично ефективний режим передбачає введення терапевтично ефективною дози при частоті та шляху введення, необхідних для досягнення поставленої мети.

Для хворих, що страждають на інсульт або інший ішемічний стан, активний засіб вводять при режимі, що передбачає кількість, частоту та шлях введення, ефективні для зниження пошкоджувальних впливів інсульту або іншого ішемічного стану. Якщо станом, що потребує лікування, є інсульт, то наслідок може бути визначений за об'ємом інфаркту або індексом інвалідності, а дозування вважають терапевтично ефективним, якщо хворий, що отримує індивідуальне лікування, показує непрацездатність у два бали або менше за шкалою Рэнкина та 75 або більше за шкалою Бартела, або якщо група хворих, що отримують лікування, показують суттєво поліпшене (тобто менше порушення життєдіяльності) розподілення балів за шкалою порушення життєдіяльності, ніж порівнювальна група, що не отримує лікування, див. Lees et al, N Engl J Med 2006; 354:588-600. Однієї дози засобу, як правило, достатньо для лікування інсульту.

Даний винахід також відноситься до способів та складів для профілактики розладу у суб'єкта з ризиком даного розладу. Як правило, такий суб'єкт характеризується підвищеною вірогідністю розвитку розладу (наприклад, стану, хвороби, розладу або захворювання) у порівнянні з контрольною групою. Контрольна група, наприклад, може містити одного або декількох індивідуумів, довільно вибраних з загальної групи (наприклад, підбраної за віком, статтю, расовою та/або етнічною приналежністю), у яких даний розлад не був діагностований або не спостерігався у сімейному анамнезі. Суб'єкта можна вважати схильним до ризику розладу, якщо виявляють, що "фактор ризику", асоційований з даним розладом, асоціюється з даним суб'єктом. Фактор ризику може передбачати будь-яку активність, ознаку, подію або властивість, асоційовані з даним розладом, наприклад, за допомогою статистичних або епідеміологічних досліджень на групі суб'єктів. Суб'єкт, таким чином, може бути класифікований як схильний до ризику розладу, навіть якщо дослідження, що ідентифікує основні фактори ризику, не передбачають суб'єкта конкретно. Наприклад, суб'єкт, підданий хірургічному втручанню на серці, схильний до ризику транзиторного церебрального ішемічного приступу, оскільки частота транзиторного церебрального ішемічного приступу підвищується у групі суб'єктів, підданих хірургічному втручанню на серці, у порівнянні з групою суб'єктів, що не піддавалися такому.

Інші широко поширені фактори ризику інсульту передбачають вік, сімейний анамнез, стать, число попередніх випадків інсульту, транзиторний ішемічний приступ або серцевий приступ, високий тиск крові, паління, діабет, захворювання сонної або інших артерій, фібриляцію передсердя, інші захворювання серця, такі як хвороба серця, серцева недостатність, дилатаційна кардіоміопатія, захворювання серцевого клапана та/або уроджена вада серця; високий вміст холестерину у крові та харчування з високим вмістом насиченого жиру, трансжиру або холестерину.

При профілактиці ліофілізований склад після відновлення вводять хворому, який схильний до ризику захворювання, але ще не страждає на захворювання, при кількості, частоті та шляху, достатніх для попередження, затримання або інігування розвитку щонайменше однієї ознаки або симптому захворювання. Профілактично ефективна кількість означає кількість засобу, достатню в значній мірі для попередження, інігування або затримання щонайменше однієї ознаки або симптому захворювання у групі хворих (або тваринних моделей), схильних до ризику на захворювання, яке лікують даним засобом, у порівнянні з контрольною групою схильних до

ризик на захворювання хворих (або тваринних моделей), які отримували лікування химерним засобом згідно з даним винаходом. Кількість також вважають профілактично ефективною, якщо хворий, що отримує індивідуальне лікування, досягає наслідку, більш ніж сприйнятливо, ніж середній наслідок в контрольній групі порівнювальних хворих, що не отримували лікування способами згідно з даним винаходом. Профілактично ефективний режим передбачає введення профілактично ефективної дози при частоті та шляху введення, необхідних для досягнення поставленої мети. Для профілактики інсульту у хворого, схильного до ризику інсульту, що насувається (наприклад, у хворого, підданого хірургічному втручанню на серці), однієї дози засобу, як правило, достатньо.

В залежності від засобу введення може бути парентеральним, внутрішньовенним, назальним, пероральним, підшкірним, внутрішньоартеріальним, внутрішньочерепним, інтратекальним, внутрішньочеревним, місцевим, інтраназальним або внутрішньом'язовим. Внутрішньовенне введення є переважним для пептидних засобів.

Для введення людям переважна доза активного засобу (наприклад, Tat-NR2B9c) складає 2-3 мг/кг та більш переважно 2,6 мг/кг. Зазначені дозування слід розуміти як такі, що включають межу погрішності, характерну для точності, з якою дозування можуть бути виміряні у типових умовах стаціонару. Такі кількості відносяться до введення однією дозою, тобто однією дозою на приступ хвороби.

Активні засоби, такі як Tat-NR2B9c, переважно доставляють шляхом інфузії у кровоносну судину, більш переважно шляхом внутрішньовенної інфузії. Час інфузії може впливати як на побічні ефекти (наприклад, через дегрануляцію огрядних клітин та вивільнення гістаміну), так і на ефективність. Як правило, для даного рівня дозування більш короткий час інфузії, ймовірно, приведе до вивільнення гістаміну. Однак більш короткий час інфузії також може забезпечити поліпшену ефективність. Хоча здійснення даного винаходу не залежить від розуміння механізму, останній результат можна пояснити як затримкою, що є суттєвою, у відношенні розвитку патології у хворого, так і затримкою, що є суттєвою, у відношенні періоду напіввиведення з плазми химерного засобу, у результаті чого химерний засіб не досягає оптимального терапевтичного рівня. Для химерного засобу Tat-NR2B9c переважний час інфузії, що забезпечує баланс між даними причинами, складає 5-15 хвилин та більш переважно 10 хвилин. Зазначені часові проміжки слід розуміти як такі, що включають погрішність +/- 10 %. Часові проміжки інфузії не передбачають додатковий час для виведення дифузії з метою виведення будь-яких невеликих кількостей, що залишилися, від початкової дифузії, яка іншим чином протікала до кінця. Часові проміжки для інфузії Tat-NR2B9c також можуть служити нормою для інших активних засобів.

Хоча даний винахід описано докладно для ясності розуміння, можуть бути здійснені деякі модифікації у межах об'єму доданої формули винаходу. Усі публікації, номери доступу та патентні документи, що цитуються у даній заявці, тим самим включені шляхом посилання в усій своїй повноті для усіх цілей у тому самому ступені, як якщо б кожний був зазначений індивідуально. В тих випадках, коли більш ніж одна послідовність асоціюється з номером доступу у різні моменти часу, мається на увазі, що послідовності зв'язані з даним номером доступу станом на дійсну дату подання даної заявки. Дійсною датою подання вважають дату самого раннього пріоритету заявки, яка розкриває номер доступу, що становить інтерес. Якщо контекст не вимагає іншого будь-які елемент, варіант здійснення, стадія, ознака або аспект даного винаходу можуть бути здійснені в поєднанні з будь-якими іншими.

#### Приклади

В прикладах 1-7 показано, що ацетатна сіль TAT-NR2B9c може бути складена у ліофілізованій формі з гістидином та трегалозою. У прикладі 9 показано, що хлоридна сіль TAT-NR2B9c забезпечує значно більшу стабільність, ніж ацетатна сіль в іншому аналогічному ліофілізованому складі. У прикладі 8 показано, що хлоридна сіль TAT-NR2B9c, складена у гістидині та трегалозі, також забезпечує поліпшену стабільність у порівнянні з раніше описаним ліофілізованим складом TAT-NR2B9c з нормального сольового розчину.

Приклад 1. Демонстрація того, що стандартні буфери та допоміжні засоби не впливають на ефективність TAT-NR2B9c in vivo

Складали п'ять рідких токсикологічних складів, орієнтованих на концентрацію 20 мг/мл TAT-NR2B9c. Таблиця 1 включає композицію середовища, номер партії, а також ефективність, чистоту та pH на момент складання. Приблизно 5 мл кожного складу розливали по флаконам для тестування. Флакони заморожували при -20 °C для імітації умов транспортування або зберігання у рідкому стані.



Таблиця 1

Композиція складів TAT-NR2B9c для тестування ефективності in vivo

№ складу	Композиція середовища	№ партії РТек	Ефективність <sup>1</sup> (мг/мл)	Чистота <sup>2</sup> (% площі піка NA-1)	pH <sup>3</sup>
1	50 мМ натрію фосфат, 76,9 мМ NaCl, pH 7,0	1205-1-17-1	20,5	97,87	6,7
2	50 мМ натрію фосфат, 154 мМ маніт, pH 7,0	1205-1-17-2	20,0	96,34 <sup>2</sup>	6,5
3	50 мМ гістидин, 154 мМ маніт, pH 6,5	1205-1-17-3	19,9	98,38	6,4
4	50 мМ гістидин, 154 мМ трегалоза, pH 6,5	1205-1-17-4	20,8	99,16	6,4
5	50 мМ гістидин, 5 % декстран-40, pH 6,5	1205-1-18-1	19,4	98,81	6,4

<sup>1</sup>Ефективність та чистоту оцінювали за допомогою RP-HPLC аналізу із застосуванням способу TFA.

<sup>2</sup>Чистота складу № 2 помітно нижче, ніж у інших складів.

<sup>3</sup>pH фосфатно-буферних складів помітно відрізняється від начального pH буфера 7,0.

Було відмічено, що фосфатно-буферний склад не підтримує pH, також як гістидинові буфери, від складання до тестування, що вказує на то, що гістидин може бути чудовим 5 буфером для складу.

Склади №№ 1-5 тестували на моделі інсульту 3-PIAL Vessel Occlusions (3PVO) у щурів. Щурам, підданим інсульту, давали один зі складів шляхом внутрішньовенного введення в стегнову вену, а потім тварин вбивали через 24 години після інсульту. Збирали головний мозок, фіксували та фарбували трифенілтетразолію хлоридом (TTC) для візуалізації ішемічних частин 10 головного мозку. Усі тестовані склади могли забезпечувати значну нейропротекцію у тварин у порівнянні з контролем у вигляді тільки сольового розчину (фіг. 1).

Способи

Модель ішемії з оклюзією трьох піальних судин

Експерименти виконували на щурах. Тривалу оклюзію трьох піальних судин (3PVO) 15 здійснювали, як описувалося раніше (Angiogenic protection from focal ischemia with angiotensin II type 1 receptor blockade in the rat. Forder et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Apr; 288(4):H1989-96). Коротко, щурів масою від 250 г до 350 г анестезували внутрішньом'язовою ін'єкцією 0,5 мл/кг кетаміну (100 мг/кг), ацепромазину (2 мг/кг) та ксилазину (5 мг/кг), доповненою однією третьою від початкової дози за потреби. Тваринам встановлювали анальний термометр 20 та поміщали їх на грілку, яку підтримували при приблизно 37 °C. Череп розкривали шляхом середнього розрізу та очищали від тканини. Із застосуванням препарувальної лупи та пневматичної бормащини проробляли у черепі 6-8-мм віконце над правою соматосенсорною корою (2 мм каудально та 5 мм латерально по відношенню до брегми) шляхом висвердлювання прямокутника у черепі та витягання шматочка черепа, залишаючи тверду мозкову оболонку 25 непошкодженою. Відгалуження 3 піальних середніх мозкових артерій артеріальної системи каутеризували навколо колончастого кору, вибирали та електрично каутеризували крізь тверду мозкову оболонку. Після каутеризацій скальп зашивали. Кожного щура повертали до його індивідуальної клітки під нагрівальною лампою для підтримування температури тіла до повного відновлення щура. Подавали корм та воду. Через одну годину після ішемії 3PVO щурам 30 вводили ін'єкцію зі складами NA-1 при 3 нмоль/г в ~0,45 мл сольового розчину з розрахунку на масу щура. Дози вводили протягом 5 хвилин.

Через двадцять чотири години після хірургічного втручання головний мозок швидко збирали. Брали коронарні зрізи (2 мм) через головний мозок та інкубували в 2 % трифенілтетразолію хлориді (TTC) (Sigma-Aldrich St. Louis MO) протягом 15 хвилин при 37 °C. Зображення 35 сканували (CanoScan 4200F Canon) та оцінювали кількісно.

Приклад 2. Визначення стабільності TAT-NR2B9c в різних буферах та при різних значеннях pH

Скринінг буферів

Десять буферів складали при 1 мг/мл TAT-NR2B9c для скринінгу допоміжних засобів. Зразки зберігали при 25 °C/60 % відносної вологості (RH) та 40 °C/75 % RH. Зразки тестували на предмет стабільності (чистоти) при t=0, а при t=1 тиждень на предмет чистоти за допомогою RP-HPLC (способів TFA та MSA), результати показані в таблицях 2 та 3.

- 5 Результати вказують на поліпшену стабільність для TAT-NR2B9c в рідкому середовищі, буферизованому від pH 6,0 до pH 6,5. Розщеплення, очевидно, посилюється за межами цього діапазону у будь-якому напрямку. Дані, отримані способом MSA, що демонструють чіткі патерни розщеплення, залежали як від pH, так і від буферних компонентів, та забезпечили цінну інформацію для розробки майбутнього складу. Результати для основного піка чистоти за % площі HPLC із застосуванням способу MSA представлені в таблиці 2, тоді як результати для основного піка чистоти за % площі HPLC із застосуванням способу TFA представлені в таблиці 3.

Таблиця 2

% площі основного піка чистоти за способом MSA, TAT-NR2B9c

Зразок	t=0	t=1 тиждень, 25 °C	t=1 тиждень, 40 °C
His, 6,0	98,5	98,5	98,0
His, 6,5	98,5	98,6	97,3
His, 7,0	98,5	98,4	97,0
Phos, 6,0	98,5	98,2	97,0
Phos, 6,5	98,5	97,9	97,3
Phos, 7,0	98,5	97,9	96,0
Phos, 7,5	98,5	97,6	95,2
Citr, 5,5	98,5	98,3	94,4
Citr, 6,0	98,5	98,4	97,4
Citr, 6,5	98,5	98,7	97,7

Таблиця 3

% площі основного піка чистоти за способом TFA, TAT-NR2B9c

Зразок	t=0	t=1 тиждень, 25 °C	t=1 тиждень, 40 °C
His, pH 6,0	99,5	98,8	99,2
Hts, pH 6,5	99,5	98,4	99,4
His, pH 7,0	99,5	98,3	96,7
Phos, 6,0	99,5	99,8	97,9
Phos, 6,5	99,5	99,5	98,6
Phos, 7,0	99,5	98,6	98,3
Phos, 7,5	99,5	98,0	93,2
Citr, 5,5	99,5	98,0	95,1
Citr, 6,0	99,5	99,0	98,2
Citr, 6,5	99,5	99,5	99,1

- 15 Результати вказують на те, що стабільність розчину TAT-NR2B9c найкраще підтримується у буферному середовищі з pH 6,0-6,5, та при цьому середовище добре стерпне при IV введенні. Як правило, буферні системи гістидину та цитрату могли підтримувати TAT-NR2B9c в інтактній формі, навіть при зберіганні в умовах прискорених іспитів стабільності при 25 °C або 40 °C протягом 1 тижня.

- 20 Існує декілька факторів, які слід враховувати при виборі буферних компонентів: специфічні патерни розщеплення, які спостерігаються у кожному середовищі, та будь-які дані про ідентифіковані супутні домішки або токсикологічну настороженість можуть спростити процес прийняття рішень, якщо уникати зазначених супутніх домішок. За період тестування буфери з гістидином та цитратом з pH від 6 до 6,5 демонстрували незначну кількість продуктів розщеплення. Буфер з гістидином окремо, застосований у даному дослідженні, містив домішку, яка була присутня у гістидиновому буфері при відсутності доданого TAT-NR2B9c. Таким чином, пошук постачальника гістидину без такої домішки спростив би аналіз. В таблиці 4 представлений короткий опис буферних компонентів з точки зору стабільності TAT-NR2B9c.

Таблиця 4

## Вибір буферних компонентів

Сполука	pH	Pro	Con
Гістидин	6,0	Відмінна стабільність, традиційне використання у застосуваннях ліофілізації, добре себе проявляє в буферному діапазоні	Хроматографічна інтерференція, але хроматографія, можливо, була би краще з новим постачальником гістидину
Цитрат	6,0	Поліпшена стабільність, традиційне використання у застосуваннях ліофілізації, добре себе проявляє в буферному діапазоні	
Гістидин	6,5	Поліпшена стабільність, традиційне використання у застосуваннях ліофілізації, добре себе проявляє в буферному діапазоні	Хроматографічна інтерференція, але хроматографія, можливо, була би краще з новим постачальником гістидину
Цитрат	6,5	Відмінна стабільність, традиційне використання у застосуваннях ліофілізації, добре себе проявляє в буферному діапазоні	Цільове pH 6,5 може знаходитися на межі ідеального буферного діапазону для цитратних компонентів
Фосфат	6,5	Поліпшена стабільність, традиційне використання фосфатних компонентів в складах NA-1	Історично уникали фосфатних компонентів для ліофілізованих складів

Приклад 3. Визначення стабільності TAT-NR2B9c в гістидинових та цитратних буферах, а також при різних значеннях pH з кількостями натрію хлориду, що варіюють

- 5 Мета даного дослідження полягала у демонстрації ефектів натрію хлориду (NaCl) на pH та стабільність TAT-NR2B9c у рідких складах. Буферні склади з 1 мг/мл TAT-NR2B9c приведені в таблиці 5, а результати по pH представлені в таблиці 6. Дані показують достатньо стабільні результати протягом дослідження. Однак помітні зміни спостерігалися у цитраті з додаванням NaCl, у якому була порушена буферна здатність, та pH падало на ~ 0,2 одиниці. Вибрані pH 6,0 та 6,5 потрапляють у верхню межу ідеального буферного діапазону для цитрату (pH 2,5-5,6) так, що можуть спричиняти ускладнення з різними добавками у ході процесу складання та мають враховуватися при оцінюванні стійкості складу.
- 10

Таблиця 5

## Буферні склади для перевірки ефекту солі на pH

№ середовища	Буфер	Цільове pH	NaCl
1	50 mM Цитрат	6,0	немає даних
2	50 mM Цитрат	6,0	200 mM
3	50 mM Цитрат	6,5	немає даних
4	50 mM Цитрат	6,5	200 mM
5	50 mM Гістидин	6,0	немає даних
6	50 mM Гістидин	6,0	200 mM
7	50 mM Гістидин	6,5	немає даних
8	50 mM Гістидин	6,5	200 mM

Таблиця 6

Стабільність pH складів TAT-NR2B9c при заморожуванні та в умовах прискорених іспитів

№ середовища	Буфер	Цільове pH	Виміряне pH, t=0, середовище	Виміряне pH, t=0, середовище + NA-1	Виміряне pH, t=1 тиждень, середовище + NA-1	
					-20 °C	40 °C/75 % RH
1	Citr	6,0	6,1	6,0	6,1	6,0
2		6,5	6,6	6,5	6,6	6,6
3	His	6,0	6,0	5,9	6,2	6,0
4		6,5	6,5	6,5	6,6	6,7
5	Citr+NaCl	6,0	5,8	5,8	5,9	5,8
6		6,5	6,3	6,2	6,3	6,3
7	His+NaCl	6,0	6,1	6,0	6,2	6,0
8		6,5	6,6	6,6	6,7	6,7

Результати вказують на те, що додавання 200 мМ NaCl у забуферені гістидином та цитратом розчини TAT-NR2B9c суттєво не впливає на pH розчинів ні при зберіганні протягом тижня при заморожуванні, ні при температурних умовах прискорених іспитів 40 °C.

Далі перевіряли стабільність TAT-NR2B9c в даних складах при зберіганні протягом 1 тижня при заморожуванні та температурних умовах прискорених іспитів. В таблиці 7 показані результати тестування із застосуванням способу RP-HPLC з градієнтом MSA. Дані також представлені на фіг. 2A та 2B. На фіг. 2A представлена стабільність в умовах прискорених іспитів складів, відсортовані зліва направо (від низької до високої стабільності). На фіг. 2B показана відносна стабільність в умовах прискорених іспитів з буферним засобом.

Таблиця 7

Чистота (спосіб MSA), TAT-NR2B9c

Середовище	pH 6,0		pH 6,5	
	-20 °C	40 °C	-20 °C	40 °C
His	98,1	92,8	98,5	96,9
His+NaCl	98,4	95,0	98,4	97,7
Citr	97,5	96,0	99,0	97,5
Citr+NaCl	98,4	96,7	98,7	98,4

Дані результати вказують на те, що стабільність розчину TAT-NR2B9c найкращим чином підтримується при pH 6,5, та додавання NaCl може забезпечувати невелике поліпшення стабільності (фіг. 2A та 2B). Завдяки поліпшеній буферній здатності та порівнянній стабільності гістидинового буфера, особливо якщо домішка, що переміщується з відносним часом утримування (RRT) 0,28, виключається (ділянка домішки, включена до приведеної вище таблиці, що призводить до більш ніж низького значення стабільності для площі піка TAT-NR2B9c), гістидинові буферні компоненти при pH 6,5 представляють найкращий склад для переходу до досліджень ліофілізації.

Середовища при pH 6,5 є добре стерпними при IV введенні.

Приклад 4. Відбір об'ємоутворювальних засобів для TAT-NR2B9c з метою формування стабільного ліофілізованого осаду

Для ідентифікації об'ємоутворювальних засобів, які забезпечували б гарний осад при ліофілізації та поліпшену стабільність, складали декілька розчинів з 20 мг/мл TAT-NR2B9c в 50 мМ гістидиновому буфері, об'ємоутворювальному засобі та NaCl, як зазначено в таблиці 8. Для

- імітації часу та температур маніпуляцій, яким можуть піддаватися склади TAT-NR2B9c у ході процесу ліофілізації, данні зразки зберігали при -20 °C (контроль) і 40 °C/75 % RH (тест) та аналізували після одного тижня зберігання на предмет чистоти за допомогою HPLC (способу MSA) та pH. Результати, що представляють стабільність pH, показані в таблиці 9, а результати стабільності TAT-NR2B9c в різних рідких складах показані в таблиці 10 та на фіг. 3.

Таблиця 8

Матриця зразка об'ємоутворювального засобу

№ середовища	Буфер	Об'ємоутворювальний засіб	NaCl
1	50 мМ гістидин, pH 6,5	120 мМ маніт	
2	50 мМ гістидин, pH 6,5	120 мМ маніт	75 мМ
3	50 мМ гістидин, pH 6,5	120 мМ трегалоза	
4	50 мМ гістидин, pH 6,5	120 мМ трегалоза	75 мМ
5	50 мМ гістидин, pH 6,5	5 % декстран-40	
6	50 мМ гістидин, pH 6,5	5 % декстран-40	75 мМ

Таблиця 9

pH, зразки об'ємоутворювального засобу

Середовище	Цільове pH	pH, -20 °C	pH, 40 °C
Маніт	6,5	6,5	6,5
Маніт + NaCl	6,5	6,5	6,5
Трегалоза	6,5	6,5	6,4
Трегалоза + NaCl	6,5	6,5	6,4
Декстран-40	6,5	6,5	6,3
Декстран-40+NaCl	6,5	6,5	6,4

Таблиця 10

Чистота за % площі піка TAT-NR2B9c, спосіб MSA

№ середовища	Середовище	% площі піка NA-1	
		-20 °C	40 °C
1	Маніт	99,2	98,5
2	Маніт + NaCl	99,4	98,6
3	Трегалоза	99,1	98,5
4	Трегалоза + NaCl	99,3	98,3
5	Декстран-40	99,2	97,6
6	Декстран-40+NaCl	99,0	97,7

- Результати рідких складів об'ємоутворювального засобу у відношенні стабільності TAT-NR2B9c

- Маніт, трегалоза та декстран-40 добре підтримують pH при 6,5 (таблиця 9), та спостерігається приблизно 1 % зниження чистоти (таблиця 10) за 1 тиждень при зберіганні рідкого складу при високій температурі. З точки зору хімічної стабільності ліофілізованого розчину TAT-NR2B9c для заповнення маніт та трегалоза є переважними об'ємоутворювальними засобами, оскільки вони забезпечують кращу стабільність для TAT-NR2B9c, ніж розчини декстрану-40 (фіг. 3).

- Приклад 5. Термічний аналіз об'ємоутворювальних засобів для полегшення розробки циклів ліофілізації

- В рамках розробки циклів ліофілізації для ліофілізованого лікарського продукту TAT-NR2B9c запропоновані розчини для заповнення з матриці зразків об'ємоутворювального засобу (таблиця 8) оцінювали за допомогою диференціальної сканувальної калориметрії (DSC) за термічними характеристиками, у тому числі за склуванням (Tg) у складі. Результати приведені в таблиці 11, а сліди DSC включені до фіг. 4A-6B.

## Скльвання розчинів для заповнення TAT-NR2B9c, що ліофілізують

Середовище	Tg
50 mM гістидин, pH 6,5, 120 mM маніт	-37,25 °C
50 mM гістидин, pH 6,5, 120 mM маніт, 75 mM NaCl	-42,51 °C
50 mM гістидин, pH 6,5, 120 mM трегалоза	-28,25 °C
50 mM гістидин, pH 6,5, 120 mM трегалоза, 75 mM NaCl	-35,74 °C
50 mM гістидин, pH 6,5, 5 % декстран-40	-17,09 °C
50 mM гістидин, pH 6,5, 5 % декстран-40, 75 mM NaCl	-22,49 °C

При концентрації TAT-NR2B9c 20 мг/мл тестовані склади TAT-NR2B9c демонстрували термічний профіль, що характеризується широким явищем плавлення з початком при низькій температурі. Таке розширене плавлення маскується явищем кристалізації, що, як правило, спостерігається у складах з манітом, та може вказувати на те, що має бути виконаний жорсткий цикл сушіння заморожуванням, якщо продукт ніколи не перевищує температуру скльвання. У цьому випадку, на підставі спостережуваних скльвань розчину для заповнення лікарського продукту TAT-NR2B9c застосування маніту як об'ємоутворювального засобу потребує температури первинного сушіння нижче -40 °C, типової межі можливості для масштабовуваного циклу. З точки зору термічних профілей трегалоза та декстран-40 відмінно підходять для застосування як об'ємоутворювального засобу. Однак, з врахуванням того, що стабільність TAT-NR2B9c в рідких складах, що містять трегалозу, перевищувала таку у складах, що містять декстран, трегалоза була б переважним об'ємоутворювальним засобом із тестованих.

Через відносно низькі температури Tg, які, ймовірно, будуть потрібними для більш ніж тривалого циклу ліофілізації для сушіння, розглядали більш широкий діапазон стандартних об'ємоутворювальних засобів та слідували за зниженням об'єму заповнення у системі контейнер/закупорка так, щоб там був знижений об'єм рідини для ліофілізації. У спробі зменшити об'єм заповнення та підтримати 270 мг/флакон проводили дослідження розчинності TAT-NR2B9c у гістидині, pH 6,5, та у гістидин + трегалоза, pH 6,5. Зразки аналізували візуально при 35, 50, 75 та 100 мг/мл. Усі розчини були прозорими при t=0 та t=24 години. На підставі цих даних могли використовувати об'єм заповнення нижче 3 мл, який із застосуванням складу TAT-NR2B9c 90 мг/мл забезпечував би 270 мг у цільовому флаконі. У флаконі може бути потрібний широкий діапазон кількостей, але 270 мг забезпечить дозу 2,6 мг/кг для хворого масою 100 кг. За умови, що, якщо цільова концентрація відновлення для введення хворому все ще складає 20 мг/мл (але може складати від 1 мг/мл до 100 мг/мл), то 20-мл флакон для ліофілізації, що містить 270 мг TAT-NR2B9c, може бути використаний з об'ємом відновлення 13,5 мл. Таким чином, оптимальні об'єми рідини для ліофілізації TAT-NR2B9c у флаконі будуть складати від 2,5 мл до 10 мл.

Перед тем, як приступити до розробки ліофілізації, тестували широкий діапазон об'ємоутворювальних засобів, і Tg показані в таблиці 12. Також оцінювали 100 мг/мл TAT-NR2B9c в гістидині, pH 6,5, за допомогою DSC, дані включені в таблицю 12.

## Дані DSC, склади

Склад	Об'ємоутворювальний засіб	Середовище		Розчин для заповнення DP
		Tg	Температура кристалізації	Tg
1	Сорбіт	-41,03 °C		
2	Декстроза	-38,78 °C		
3	Цукроза	-31,09 °C		
4	Маніт	-37,38 °C	-22,91 °C	-35,49 °C
5	Трегалоза	-29,93 °C		-28,25 °C
6	Лактоза	-27,93 °C		
7	75:25 Трегалоза:Декстран-40	-25,07 °C		-25,07 °C
8	50:50 Трегалоза:Декстран-40	-22,60 °C		-22,60 °C
9	25:75 Трегалоза:Декстран-40	-18,55 °C		-18,55 °C

Склад	Об'ємоутворювальний засіб	Середовище		Розчин для заповнення DP
		Tg	Температура кристалізації	Tg
10	Декстран-40			-17,09 °C
11	100 мг/мл NA-1 в гістидині, pH 6,5			-21,67 °C

На підставі даних DSC в таблиці 12 спостерігається декілька варіантів складів для лікарських продуктів, як з активним засобом, так і з плацебо. Як правило, склади №№ 5 та 11 є найбільш перспективними для активного продукту з точки зору Tg. Будь-який об'ємоутворювальний засіб може бути прийнятним для застосування у плацебо продукті, але склад № 4 (маніт) буде мати найменшу тривалість циклу, якщо виконується відпал, та може бути найбільш придатним для відповідного зовнішнього вигляду активного засобу.

Оскільки визначається оптимальний активний склад, важно розглянути питання про стабільність розчину, стійкість циклу ліофілізації та хімічну стабільність. Склад № 5 з таблиці 12 (трегалоза) демонструє добру стабільність розчину та хімічну стабільність ліофілізату при умовах прискорених іспитів (дані показані нижче), але потребує більш тривалого циклу ліофілізації при конфігурації заповнення 13,5 мл. Такий більш тривалий цикл не може бути ідеальним для комерційного виробництва у майбутньому, при якому бажаний більш короткий цикл. Склад № 11 з таблиці 12 (без об'ємоутворювального засобу, при 100 мг/мл TAT-NR2B9c) характеризується більш високою температурою склування, ніж склад № 5, що створює можливість для більш гарячого, більш короткого циклу. Крім того, понижений об'єм заповнення дозволить суттєво скоротити час виконання, оскільки треба буде сублімувати менше льоду з кожного флакона.

Приклад 6. Стабільність TAT-NR2B9c з об'ємоутворювальними засобами, масштабами та умовами ліофілізації, що варіюють

Стабільність об'ємоутворювального засобу в умовах прискорених іспитів

Невелику партію лікарського продукту TAT-NR2B9c ліофілізували для оцінювання стабільності у твердому стані після 1 тижня при 25 °C, 40 °C та 60 °C. TAT-NR2B9c складали при концентрації активного засобу 20 мг/мл у трьох різних середовищах. Зразки оцінювали за зовнішнім виглядом, відновленням, pH, кількістю та чистотою за допомогою HPLC (способу MSA) при t=0 та t=1 тиждень. Вміст води оцінювали тільки при t=0.

Все лікарські продукти TAT-NR2B9c виглядали як білі ліофілізовані осади та відновлювалися у межах менш ніж 10 секунд при t=0 та t=1 тиждень.

Середовища лікарського продукту описуються в таблиці 13 та наведені з відповідними результатами за температурою склування та вмістом води. Результати pH, кількості TAT-NR2B9c та чистоти TAT-NR2B9c описуються в таблицях 14-16.

Таблиця 13

Матриця зразка об'ємоутворювального засобу: Tg та % вмісту води

№ середовища	Середовище	Tg	t=0 % вмісту води
1	50 mM His, pH 6,5+120 mM трегалоза	-29,93 °C -28,25 °C з NA-1	0,29 %
2	50 mM His, pH 6,5+5 % декстрану-40	-22,60 °C	0,05 %
3	50 mM His, pH 6,5+1:1 120 mM трегалоза:5 % декстрану-40	-17,09 °C з NA-1	0,10 %

Таблиця 14

pH, експеримент малого масштабу ліофілізації № 1 з об'ємоутворювальним засобом

Об'ємоутворювальний засіб	Теоретичне pH	Виміряне pH			
		t=0	t=1 тиждень, 25 °C	t=1 тиждень, 40 °C	t=1 тиждень, 60 °C
Трегалоза	6,5	6,4	6,4	6,4	6,4
Декстран-40	6,5	6,4	6,3	6,3	6,3
1:1 Трегалоза:Декстран	6,5	6,4	6,3	6,4	6,4

Таблиця 15

Кількість (мг/флакон), експеримент малого масштабу № 1 ліофілізації з об'ємоутворювальним засобом

Об'ємоутворювальний засіб	t=0	t=1 тиждень, 25 °C	t=1 тиждень, 40 °C	t=1 тиждень, 60 °C
Трегалоза	20,6	20,3	20,7	20,7
Декстран-40	19,4	19,8	19,5	19,1
1:1 Трегалоза:Декстран-40	20,3	20,8	20,2	20,2

Таблиця 16

Чистота (% площі за допомогою HPLC), експеримент малого масштабу № 1 ліофілізації з об'ємоутворювальним засобом

Об'ємоутворювальний засіб	t=0	t=1 тиждень, 25 °C	t=1 тиждень, 40 °C	t=1 тиждень, 60 °C
Трегалоза	98,8	98,8	98,8	98,4
Декстран-40	98,9	98,9	98,6	96,5
1:1 Трегалоза:Декстран-40	98,9	98,8	98,6	97,5

- 5 Усі три об'ємоутворювальних засоби - трегалоза, декстран-40 та трегалоза:декстран-40 - підтримують pH при 6,5 (таблиця 14), та спостерігається діапазон 0,5-2,5 % зниження чистоти при 60 °C після 1 тижня (таблиця 15). Обидва лікарських продукта, що містили декстран-40 та зберігалися при 60 °C, показали збільшення супутніх домішок при часі утримування (RT) ~ 6,0. Данні супутні домішки не були присутні в зразках трегалози, що підтверджує те, що трегалоза
- 10 забезпечує стабілізуючий ефект у ліофілізованому лікарському продукті, а декстран-40 може викликати специфічне розщеплення продукту.

- Включення декстрану-40 в об'ємоутворювальний засіб забезпечує більш високу температуру первинного сушіння, але декстран-40 як об'ємоутворювальний засіб демонстрував найгіршу стабільність. Комбінація трегалози та декстрану-40 (1:1) призводить до температури
- 15 склування, яка на приблизно 10 °C вище, ніж з трегалозою окремо. Однак виявилось, що стабільність при 60 °C є проміжною для зразків з трегалозою і декстраном окремо, так що трегалоза є переважним об'ємоутворювальним засобом.

Розробка ліофілізованого складу TAT-NR2B9c: експеримент малого масштабу № 2

- 20 Невелику партію лікарського продукту TAT-NR2B9c ліофілізували для оцінювання умов температури зберігання при 5 °C у ході первинного сушіння. TAT-NR2B9c складали при концентрації активного засобу 27 мг/мл в 50 мМ гістидину, pH 6,5, та 120 мМ трегалози. Параметри циклу приведені в таблиці 17. Чотири 20-мл скляних флакона для ліофілізації заповнювали на 10 мл. Два флакона зондували датчиками температури.



Експеримент малого масштабу № 2, розробка складу TAT-NR2B9c

Функція	Температура (°C)	Утримування/швидкість	Швидкість (°C/хвилина)	Час (хвилини)	Тиск (mTorr)
Завантажування	5	Утримування	-	0	Навколишній
Зрівноважування	5	Утримування	-	120	Навколишній
Заморожування	-40	Швидкість	0,5	90	Навколишній
Заморожування	-40	Утримування	-	240	Навколишній
Первинне сушіння <sup>1</sup>	5	Швидкість	0,25	180	225
Первинне сушіння <sup>1</sup>	5	Утримування	-	2050	50
Вторинне сушіння	25	Швидкість	0,1	200	50
Вторинне сушіння	25	Утримування	-	1440	50
Затикання	20	Утримування	-	-	Азот/навколишній
Вивантажування	20	Утримування	-	-	Навколишній

<sup>1</sup>Температура первинного сушіння з урахуванням великого розміру флакона та об'єму заповнення безпосередньо не зв'язана з температурою склування.

Через великий об'єм заповнення необхідно встановити температуру зберігання суттєво вище, ніж температура склування, щоб компенсувати випарне охолодження. Температура розчину у ході первинного сушіння становила -29 °C, що близько до температури склування -28 °C згідно з термічним аналізом DSC.

Стабільність ліофілізату 90 мг/мл TAT-NR2B9c в умовах прискорених іспитів (експеримент малого масштабу № 3)

До складання розчину для заповнення у малому масштабі № 3 90 мг/мл TAT-NR2B9c у буфері (50 мМ гістидин, pH 6,5) оцінювали за pH. pH розчину складало 6,04. Було встановлено, що із збільшенням концентрації TAT-NR2B9c силу буферизації також необхідно підвищувати. Розчини отримували при 150 мМ, 100 мМ, 75 мМ та з водою і оцінювали за pH. Значення pH приведені в таблиці 18. Експеримент малого масштабу № 3 виконували у буфері з 100 мМ гістидином при pH 6,5, та pH доводили до 6,5 після додавання TAT-NR2B9c.

Таблиця 18

pH, 90 мг/мл TAT-NR2B9c в гістидинових буферах, pH 6,5

Буфер	pH
Вода	5,39
50 мМ	6,04
75 мМ	6,04
100 мМ	6,29
150 мМ	6,14

Невелику партію лікарського продукту TAT-NR2B9c ліофілізували для оцінювання стабільності у твердому стані після 1 тижня зберігання при 25 °C та 60 °C. Складали два склади з 90 мг/мл TAT-NR2B9c (буфер та буфер з трегалозою). Зразки оцінювали за зовнішнім виглядом, відновленням, вмістом води та чистотою за допомогою HPLC (способу MSA) при t=0 та t=1 тиждень.

Усі лікарські продукти TAT-NR2B9c виглядали як білі ліофілізовані осади. Деякі осади були розтрісканими. Склади плацебо були візуально схожі на склади активного засобу.

Час відновлення становив приблизно 1,5 хвилини у порівнянні з менш ніж 10 секундами для попередніх складів. Збільшення часу відновлення, швидше за все, пояснюється підвищенням концентрацій TAT-NR2B9c та гістидину. Подальші тести показали гарну стабільність TAT-

NR2B9c з концентраціями гістидинового буфера 50 та 75 мМ при зменшенні часових періодів ресуспендування. Також через розмір 2-мл флакона, застосовуваного для даного дослідження, добавляли тільки 1 мл води у ліофілізат. Фактичний об'єм відновлення складає 4,5 мл у даній конфігурації малого масштабу. Час відновлення, ймовірно, за все, збільшиться при застосуванні більшого об'єму розріджувача.

Флакони поміщали в умови випробування стабільності при 25 °C та 60 °C та тестували після 1 тижня зберігання.

Згідно з даними зовнішнього вигляду зразок трегалози давав більш ніж прийнятний осад. Цикл ліофілізації проводили консервативно протягом 5 днів з температурою первинного сушіння -32 °C. На підставі даних температурних датчиків цикл може бути скорочений, що демонструє той факт, що при більш ніж високій концентрації та більш ніж низькому об'ємі заповнення оптимізований цикл буде коротшим.

Результати чистоти представлені в таблиці 19.

Таблиця 19

Чистота (% площі за допомогою HPLC), експеримент малого масштабу № 3

Склад	Композиція	Розчин для заповнення	t=0	t=1 тиждень, 25 °C/60 % RH	t=1 тиждень, 60 °C
1	100 мМ His, pH 6,5	99,2	99,3	99,3	97,8
2	100 мМ His, pH 6,5+120 мМ трегалоза	99,2	99,3	99,2	98,7

На підставі цих даних стабільності в умовах прискорених іспитів трегалоза демонструє стабілізуючий ефект на склад Tat-NR2B9c, що поліпшує хімічну стабільність ліофілізату. Незвичайним є те, що трегалоза здатна забезпечувати такий стабілізуючий ефект, тоді як інші стандартні об'ємоутворювальні засоби, такі як декстран та маніт, застосовні для інших пептидів, не можуть.

Знижений об'єм заповнення мінімізує конкуруюче випарне охолодження навколишніх флаконів та мінімізує опір потоку води, що сублімується.

Розробка циклу ліофілізації – експеримент малого масштабу № 4 (плацебо та активний засіб)

Експеримент малого масштабу № 4 розробки циклу ліофілізації здійснювали для тестування зовнішнього вигляду осаду та умов ліофілізації для 3-мл заповнення. Тестовими зразками були 100 мМ His, pH 6,5, з 120 мМ трегалози та 90 мг/кг TAT-NR2B9c або аналогічний зразок без трегалози. Консервативний 4-денний цикл виконували, як описано в таблиці 20. Флакони з плацебо та активним засобом включали з конфігурацією заповнення 3 мл в 20-мл скляний флакон для ліофілізації замість маленьких флаконів, що застосовували у попередніх експериментах. Активний датчик температури застосовували для підтвердження температури у ході циклу ліофілізації. Отримані в результаті флакони з активним засобом показані на фіг. 7A.

Таблиця 20

Параметри ліофілізації для малого масштабу № 4

Функція	Температура (°C)	Утримування/швидкість	Швидкість (°C/хвилина)	Час (хвилини)	Тиск (mTorr)
Завантажування	5	Утримування	-	0	Навколишній
Зрівноважування	5	Утримування	-	120	Навколишній
Заморожування	-40	Швидкість	0,5	90	Навколишній
Заморожування	-40	Утримування	-	120	Навколишній
Первинне сушіння	-30	Швидкість	0,25	40	225
Первинне сушіння	-30	Утримування	-	3400	50
Вторинне сушіння	25	Швидкість	0,1	550	50
Вторинне сушіння	25	Утримування	-	1440	50
Затикання	20	Утримування	-	-	Азот/навколишній
Вивантажування	20	Утримування	-	-	Навколишній

Склад при 90 мг/мл у 20-мл флаконі формував прийнятний осад при 4-денному циклі, та дані датчика температури підтверджували, що цикл може бути скорочений до 3 днів.

Вміст води для плацебо та активного засобу становив 0,01 % та 0,00 %.

Розробка циклу ліофілізації – експеримент малого масштабу № 5 (плацебо та активний засіб)

Експеримент малого масштабу № 5 виконували для розглядання розробки відповідного флакона плацебо для клінічних випробовувань, а також для розглядання часових періодів ресуспендування для складів при потенційному промисловому масштабі (270 мг/флакон). Оцінювали 10 складів плацебо та 1 склад активного засобу за зовнішнім виглядом та часом відновлення. Осади активного засоби представляли собою "елегантні", білі осади з незначним осіданням в результаті тріщини біля поверхні стінки флакона. Осади плацебо були білими з більшою кількістю тріщин в осадах, що містять кількості трегалози, що зростають.

Флакони відновлювали за допомогою 13,5 мл води. Час розчинення приведено в таблиці 21. Ліофілізат активного засобу негайно ресуспендували, але він був мутним протягом 17,6 секунди перш, ніж стати прозорим, безбарвним розчином. Усі плацебо представляли собою прозорий, безбарвний розчин.

Таблиця 21

Відновлення плацебо та активного засобу (SS5)

Склади				Час відновлення (хвилини)	
№ складу плацебо	Трегалоза, мМ	Гістидин, мМ	Усього, мг/флакон	Флакон № 1	Флакон № 2
1 (контроль)	120	100	170	< 10 секунд	< 10 секунд
2	200	100	252	< 10 секунд	< 10 секунд
3	300	100	355	< 10 секунд	< 10 секунд
4	400	100	457	< 10 секунд	< 10 секунд
5	500	100	560	< 10 секунд	< 10 секунд
6	120	20	133	< 10 секунд	< 10 секунд
7	200	20	215	< 10 секунд	< 10 секунд
8	300	20	317	< 10 секунд	< 10 секунд
9	400	20	420	< 10 секунд	< 10 секунд
10	500	20	523	< 10 секунд	< 10 секунд
№ складу активного засобу	Трегалоза, мМ	Гістидин, мМ	NA-1, мг	Флакон № 1	Флакон № 2
1 (контроль)	120	100	90	17,6 секунди	немає даних

На підставі стабільності, часових періодів ресуспендування та часових періодів ліофілізації переважним комерційним складом для TAT-NR2B9c з попередньою ліофілізацією буде 20-100 мМ гістидин, 120 мМ трегалоза, рН 6,5. Концентрації трегалози можуть бути збільшені без втрати стабільності або "елегантності" осаду, але не часових періодів ресуспендування.

Перевірка підвищеного вмісту трегалози в утворенні осаду та плацебо, відповідного за зовнішнім виглядом та часом ресуспендування

Для кращої відповідності плацебо тестували концентрації трегалози, що варіюють, з TAT-NR2B9c та без такого, а також при об'ємах заповнення або 3, або 5 мл.

По-перше, будуть коротко описані склади активного засобу та склади плацебо. Потім будуть відмічені основні візуальні відповідності для 3-мл заповнення та 5-мл заповнення. На даний момент аналізуються аналітичні зразки (розчин для заповнення та один ефективний зразок). В таблицях 22 та 23 показана підгрупа тестованих складів.

Таблиця 22

Склади активного засобу

Склад	Об'єм заповнення	Композиція
1	3 мл	270 мг/флакон в 120 мМ трегалоза + 100 мМ гістидин, рН 6,5
2	3 мл	270 мг/флакон в 500 мМ трегалоза + 20 мМ гістидин, рН 6,5
3	5 мл	270 мг/флакон в 120 мМ трегалоза + 50 мМ гістидин, рН 6,5

На фіг. 7В показаний зовнішній вигляд складів активного засобу, приведених вище.

Таблиця 23

## Склади плацебо

Склади плацебо	Склади активного засобу (~ 270 мг/флакон)
500 мМ Трегалоза + 20 мМ Гістидин (n=7)	500 мМ Трегалоза + 20 мМ Гістидин (n=2)
400 мМ Трегалоза + 20 мМ Гістидин (n=3)	400 мМ Трегалоза + 20 мМ Гістидин (n=1)
300 мМ Трегалоза + 20 мМ Гістидин (n=3)	300 мМ Трегалоза + 20 мМ Гістидин (n=1)

5 В таблиці 24 показані умови циклу ліофілізації для приведених вище зразків.

Таблиця 24

## Параметри циклу

Функція	Температура (°C)	Утримування/швидкість	Швидкість (°C/хвилина)	Час (хвилини)	Тиск (mTorr)
Завантажування	5	Утримування	-	0	Навколишній
Зрівноважування	5	Утримування	-	120	Навколишній
Заморожування	-40	Швидкість	0,25	ISO	Навколишній
Заморожування	-40	Утримування	-	120	Навколишній
Відпал	-27	Швидкість	0,25	52	Навколишній
Відпал	-27	Утримування	-	120	Навколишній
Заморожування	-40	Швидкість	0,25	52	Навколишній
Заморожування	-40	Утримування	-	120	Навколишній
Первинне сушіння	-30	Швидкість	0,25	40	225
Первинне сушіння	-30	Утримування	-	4406	50
Вторинне сушіння	25	Швидкість	0,1	550	50
Вторинне сушіння	25	Утримування	-	1440	50
Затикання	20	Утримування	-	-	Азот/ навколишній
Вивантажування	20	Утримування	-	-	Навколишній

Таблиця 25

## Короткий опис основних відповідностей

Назва зразка	Колір та фактура: (блискучий або матовий)	Характер поверхні: наприклад, верхній шар, горбки, тріщини, випинання, вигини	Структура: щільна або пориста	Осідання	Пухкість	Час відновлення
SS6 – заповнення 3 мл						
Активний засіб № 2 500 мМ трегалоза 50 мМ гістидин	брудно-білий, матовий	тонкі тріщини	щільна	мінімальне	див. фото	2 хвилини 30 секунд

Назва зразка	Колір та фактура: (блискучий або матовий)	Характер поверхні: наприклад, верхній шар, горбки, тріщини, випинання, вигини	Структура: щільна або пориста	Осідання	Пухкість	Час відновлення
Плацебо P2 500 мМ трегалоза 20 мМ гістидин	брудно-білий, матовий	розтріскана	щільна	мінімальне		1 хвилина
SS7 - заповнення 5 мл						
Активний засіб 500 мМ трегалоза 20 мМ гістидин	брудно-білий, матовий, блискучими плямами	розтріскана, з горбистим дном	напівщільна, шарувата	є, низ осаду	н.т.	1 хвилина
Плацебо 500 мМ трегалоза 20 мМ гістидин	брудно-білий, матовий, блискучими плямами	розтріскана, з горбистим дном	напівщільна, більш пориста, ніж у активного засобу	мінімальне		20 секунд невідпалений: 38 секунд

н.т. = не тестували.

Приклад 7. Стабільність ліофілізованого TAT-NR2B9c, 270 мг, у буфері з 20 мМ гістидином, рН 6,5, і 120 мМ трегалозою

5 Отримання ліофілізованого лікарського продукту

Складали невелику партію лікарського продукту TAT-NR2B9c при 90 мг/мл в 20 мМ гістидині, рН 6,5, і 120 мМ трегалозі та ліофілізували для оцінювання стабільності у твердому стані після 4 тижнів при -20 °C, 40 °C та 60 °C. В таблиці 25 показані умови ліофілізації.

Таблиця 25

Умови циклу ліофілізації для прикладу 7

Функція	Температура (°C)	Утримування/ швидкість	Швидкість (°C/хвилина)	Час (хвилини)	Тиск (mTorr)
Завантажування	5	Утримування	-	0	Навколишній
Зрівноважування	5	Утримування		120	Навколишній
Заморожування	-40	Швидкість	0,5	90	Навколишній
Заморожування	-40	Утримування	-	120	Навколишній
Первинне сушіння	-28	Швидкість	0,25	48	225
Первинне сушіння	-28	Утримування		3412	50
Вторинне сушіння	25	Швидкість	0,1	530	50
Вторинне сушіння	25	Утримування	-	1140	50
Затикання	20	Утримування	-	-	Азот/ навколишній
Вивантажування	20	Утримування	-	-	Навколишній

10

Зразки зберігали в термостатах при постійній температурі та оцінювали чистоту, ефективність і час відновлення в 13,2 мл (для кінцевого об'єму 13,5) після 0, 1, 2 та 4 тижнів. Дані для кожної температури зберігання та часу представлені в таблицях 26A-C.

Таблиця 26А

Стабільність при -20 °C

Параметр	t=0		t=4 тижні	
Зовнішній вигляд	Щільний білий осад		Щільний білий осад	
Час відновлення	~ 60 секунд		~ 60 секунд	
pH	6,32		TBD	
Вміст води	0,02 %		н.т.	
% заявленого вмісту, спосіб TFA	99,0 %		101,3 %	
Загальна чистота, спосіб MSA (% площі)	99,2 %		99,2 %	
Окремі домішки	RRT	% площі	RRT	% площі
	0,59	0,02 %	0,59	0,02 %
	немає даних	немає даних	0,95	0,01 %
	0,97	0,26 %	0,98	0,21 %
	1,04	0,26 %	1,05	0,32 %
	1,07	0,09 %	1,09	0,04 %
	1,10	0,13 %	1,11	0,12 %
	немає даних	немає даних	1,14	0,03 %
	1,15	0,02 %	1,16	0,02 %
Деамідований NA-1, спосіб SCX (% площі)	< 0,05 %		TBD	

Таблиця 26В

Стабільність при 40 °C

Параметр	t=0		t=1 тиждень		t=2 тижні		t=4 тижні	
Зовнішній вигляд	Щільний білий осад		Щільний білий осад		Щільний білий осад		Щільний білий осад	
Час відновлення	~ 60 секунд		~ 60 секунд		~ 60 секунд		~ 60 секунд	
pH	6,32		6,55		6,21		TBD	
Вміст води	0,02 %		н.т.		н.т.		н.т.	
% заявленого вмісту, спосіб TFA	99,0 %		97,0 %		100,6 %		100,6 %	
Загальна чистота, спосіб MSA (% площі)	99,2 %		99,1 %		98,9 %		99,0 %	
Окремі домішки	RRT	% площі	RRT	% площі	RRT	% площі	RRT	% площі
	0,59	0,02 %	0,59	0,02 %	0,62	0,02 %	0,59	0,02 %
	0,97	0,26 %	0,97	0,26 %	0,95	0,21 %	0,95	0,01 %
	1,04	0,26 %	1,04	0,25 %	0,98	0,21 %	0,97	0,17 %
	1,07	0,09 %	1,07	0,13 %	1,05	0,33 %	1,05	0,27 %
	немає даних	немає даних	немає даних	немає даних	немає даних	немає даних	1,08	0,19 %
	1,10	0,13 %	1,10	0,15 %	1,10	0,17 %	1,10	0,19 %
	немає даних	немає даних	1,13	0,04 %	1,13	0,16 %	1,13	0,05 %
	1,15	0,02 %	1,15	0,02 %	1,15	0,05 %	1,15	немає даних
	немає даних	немає даних	немає даних	немає даних	1,17	0,05 %	1,16	0,02 %
	1,26	0,01 %	1,26	0,01 %	1,29	0,01 %	1,23	0,01 %
	1,29	0,01 %	1,29	0,02 %	1,31	0,04 %	1,30	0,07 %
Деамідований NA-1, спосіб SCX (% площі)	< 0,05 %		н.т.		н.т.		TBD	

## Стабільність при 60 °С

Параметр	t=0		t=1 тиждень		t=2 тижні		t=4 тижні	
Зовнішній вигляд	Щільний білий осад		Щільний білий осад		Щільний білий осад		Щільний білий осад	
Час відновлення	~ 60 секунд		~ 60 секунд		~ 60 секунд		~ 60 секунд	
pH	6,32		6,43		6,29		6,29	
Вміст води	0,02 %		н.т.		н.т.		н.т.	
% заявленого вмісту, спосіб TFA	99,0 %		97,3 %		101,5 %		101,5 %	
Загальна чистота, спосіб MSA (% площі)	99,2 %		98,8 %		98,3 %		98,0 %	
Окремі домішки	RRT	% площі	RRT	% площі	RRT	% площі	RRT	% площі
	немає даних	немає даних	0,53	0,01 %	0,53	0,01 %	0,51	0,02 %
	0,59	0,02 %	0,59	0,03 %	0,62	0,02 %	0,59	0,02 %
	немає даних	немає даних	0,91	0,01 %	0,91	0,02 %	0,92	0,01 %
	немає даних	немає даних	0,95	0,02 %	0,95	0,02 %	0,95	0,03 %
	0,97	0,26 %	0,97	0,26 %	0,98	0,25 %	0,97	0,20 %
	1,04	0,26 %	1,04	0,23 %	1,05	0,33 %	1,05	0,28 %
	1,07	0,09 %	1,07	0,24 %	1,07	немає даних <sup>1</sup>	1,08	0,59 %
	1,10	0,13 %	1,10	0,23 %	1,09	0,37 %	1,10	0,44 %
	немає даних	немає даних	1,12	0,05 %	1,12	0,30 %	1,13	0,09 %
	1,15	0,02 %	1,15	0,02 %	1,15	0,10 %	1,15	0,05 %
	немає даних	немає даних	немає даних	немає даних	1,17	0,07 %	1,17	немає даних
	1,26	0,01 %	1,26	0,01 %	1,26	<0,01 %	1,27	0,01 %
	1,29	0,01 %	1,29	0,08 %	1,30	0,17 %	1,30	0,29 %
Деамідований NA-1, спосіб SCX (% площі)	< 0,05 %		немає даних		немає даних		TBD	

<sup>1</sup> Втрата розділення біля основного пика.

Даний склад TAT-NR2B9с є стабільним при -20 °С. Для температур зберігання 40 °С та 60 °С вміст потенційних домішок з відносним часом утримування (RRT) 1,07, 1,1 та 1,29 повільно підвищувався із застосуванням аналізу HPLC MSA, при цьому найбільший ріст спостерігали при RRT 1,07. Для температури зберігання 40 °С вміст домішки підвищувався від 0,09 % до 0,27 % за 1 місяць, а для температури зберігання 60 °С вміст домішки підвищувався від 0,09 % до 0,59 %. Домішку не спостерігали при -20 °С. Домішки, інтерпольовані із застосуванням рівняння Арреніуса, складали менш ніж 0,5 % через 16 місяців при 25 °С або через 123 місяці при 5 °С та менш ніж 2 % через > 60 місяців при кімнатній температурі та через багато років при 5 °С. Таким чином, даний склад та споріднені складі придатні для зберігання ліофілізованого лікарського продукту при кімнатній температурі.

Дане дослідження розщеплення проводили ще один місяць для підтвердження того, що продукти розщеплення, що спостерігаються при 60 °С, також спостерігаються і при 40 °С. Вважали, що ці три домішки з'являються при більш низькій температурі, що вказує на те, що, ймовірно, вони є продуктами розщеплення, які не специфічні для сильно підвищених температур. Ідентичності цих компонентів визначали за допомогою LC/MS/MS досліджень та виявили, що усі вони містять продукти ацетилювання сполуки TAT-NR2B9с повної довжини. Такі явища ацетилювання відбувалися як на N-кінці пептиду, так і на лізинових бокових ланцюгах. Таким чином, стабільність TAT-NR2B9с може бути збільшена за рахунок додавання або

скавенджера, або інших допоміжних засобів для зниження ацетилювання TAT-NR2B9c в ліофілізованому стані або за рахунок зниження або видалення ацетату таким чином, щоб знижувалася ймовірність ацетилювання.

#### Загальні висновки

На підставі стабільності, часових періодів ресуспендування та часових періодів ліофілізації переважним комерційним складом для TAT-NR2B9c є 20-100 мМ гістидин, 120 мМ трегалоза, рН 6,5. Концентрації трегалози можуть бути підвищені без втрати стабільності або "елегантності" осаду, але часові періоди ресуспендування збільшуються при підвищенні концентрації трегалози.

Приклад 8. Розробка та стабільність хлоридної солі TAT-NR2B9c (TAT-NR2B9c-Cl)

#### Отримання ліофілізованого лікарського продукту

У зв'язку з нестабільністю раніше розроблених складів сольових розчинів TAT-NR2B9c та спостереженням того, що в ліофілізованих складах може відбуватися ацетилювання ацетатної солі TAT-NR2B9c, ацетатну сіль міняли на хлоридну сіль. Це виконували за допомогою препаративної RP-HPLC із застосуванням амонію хлориду. Мета даного способу полягає у ідентифікації нової композиції об'єкту, що заявляється, та нового складу, які забезпечать поліпшену стабільність для TAT-NR2B9c, переважно поліпшену стабільність, як при кімнатній температурі, так і при 37°C. Оскільки TAT-NR2B9c є ефективним при введенні потенційним жертвам інсульту та інших неврологічних розладів, та особливо важливе значення має раннє лікування цих розладів, склад, що є стабільним позалікарняними умовами, допоміг би мільйонам людей, що страждають на ці розлади щорічно. Наприклад, такий лікарський засіб можна було б зберігати в машинах швидкої допомоги або невеликих клініках, кабінетах лікарів або навіть доступними для окремих осіб, та надавати суб'єктам, що страждають на неврологічні розлади, такі як інсульт, або інші захворювання, що підлягають лікуванню нейропротекторними засобами, набагато раніше, ніж вони могли би бути введені за потреби поїздки до лікарні для лікування.

#### Загальний протокол процесу

Буфер А: вода

Буфер В: ацетонітрил

Колонка: Daisogel ODS C-18 (1 кг), 120 Å, 15 мкм, 10 см (об'єм шару: ~ 1 л)

Швидкість потоку: 250 мл/хвилина

Довжина хвилі: 230 нм

Градiєнт: виключення з 20 % В

1) Колонку промивали 2 об'ємами шару (BV) 80 % CH<sub>3</sub>OH.

2) Пропускали 2 BV 0,025 % HCl у воді або 0,1 % TFA у воді, що було переважним.

3) Завантажений зразок: 30 г ацетату TAT-NR2B9c (PPL-NA11301) розчиняли в 1,5 л води згідно з USP (20 г/л) при умовах зв'язування TAT-NR2B9c з колонкою.

4) Ополіскували 200 мл води згідно з USP (також завантаженої у колонку) з видаленням наявного ацетатного протиіону.

5) Пропускали 3 BV 0,1 М амонію хлориду (NH<sub>4</sub>Cl) для подавання нового хлоридного протиіону.

6) Пропускали 2 BV 2 %.

7) Пропускали 20 % В (ацетонітрилу) для елюювання продукту.

8) Збирали фракції при елююванні піка продукту.

9) Фракції аналізували за допомогою аналітичної HPLC.

10) Колонку знову промивали за допомогою 3 BV 80 % CH<sub>3</sub>OH.

#### Аналітична система HPLC

YMC ODS-A C18 колонка, 5 мкм, 120Å; швидкість потоку: 1,5 мл/хвилина; довжина хвилі: 210 нм; температура: 50 °C; градiєнт: 20 % - 35 % В за 15 хвилин; буфер А=0,1 М NaClO<sub>4</sub>, рН 3,1, буфер В=100 % ACN.

#### Результати синтезу та обговорення

Два основних пула, зібраних при циклах, змішували та ліофілізували (~ 5 л). Збирали 23,4 г кінцевого продукту з чистотою 99,01 %. Залишковий ацетат становив менш ніж 1 %. Стандартні уточнення протоколу повинні збільшувати вихід від 78 % до > 95 %. Дана процедура подібним чином може бути застосована для обміну TFA солі TAT-NR2B9c на хлоридну сіль, оскільки TFA сіль буде зв'язуватися з колонкою на стадії 3 аналогічним чином.

#### Складання ліофілізованої форми TAT-NR2B9c-Cl та тестування стабільності

TAT-NR2B9c-Cl складали в 20 мМ гістидині та 120 мМ трегалозі, рН 6,5, для безпосереднього порівняння з попереднім переважним ліофілізованим складом при тих самих умовах ліофілізації при 270 мг/флакон (маса активного засобу). Також порівнювали стабільність



даного складу зі складом TAT-NR2B9c-Ac, що попередньо розкривається, ресуспендованим у сольовому розчині та ліофілізованим. Для останнього складали невелику партію лікарського продукту TAT-NR2B9c-ацетат при 90 мг/мл в сольовому розчині (без інших допоміжних засобів) та ліофілізували при 270 мг/флакон. Стабільність складів у ліофілізованому стані оцінювали після 4 тижнів при -20°C (контроль), 40°C та 60°C.

5

**Таблиця 27: Стабільність TAT-NR2B9c-Cl (20 мМ гістидин, 120 мМ трегалоза) у порівнянні з TAT-NR2B9c-Ac (сольовий розчин)**

Дані стабільності хлоридної солі NA-I					Дані стабільності сольового розчину NA-I-Ac				
RP-HPLC TFA					RP-HPLC TFA				
	0.899			0.11		0.899			
	0.95					0.95			0.11
	0.97			0.07		0.97			0.09
	0.98					0.98			0.08
	0.99	0.17	0.29	0.43		0.99	0.18	0.23	0.19
	1	98	97.78	96.64		1	97.93	97.42	94.84
	1.02	1.27	1.22	1.36		1.02	1.22	1.39	2.07
	1.03	0.11	0.11	0.16		1.03	0.1	0.1	0.12
	1.05	0.08	0.07	0.09		1.05	0.05	0.16	0.61
	1.06					1.06			0.1
	1.07	0.22	0.24	0.46		1.07	0.2	0.19	0.28
	1.08					1.08			0.1
	1.09			0.06		1.09			0.07
	1.1		0.11	0.09		1.1			0.12
	1.11	0.16		0.09		1.11	0.05	0.06	0.14
	1.12		0.11			1.12	0.17	0.17	0.31
	1.13		0.06			1.13	0.05	0.28	0.72
	1.14			0.09		1.14	0.06		
	1.18					1.18			
	1.19					1.19			
	1.26					1.26			
	1.34					1.34			
	1.36					1.36			
	1.4					1.4			
	1.48					1.48			
RP-HPLC-MSA					RP-HPLC-MSA				
	0.94			0.07		0.94			0.05
	0.98	0.11	0.11	0.15		0.98	0.06	0.07	0.08
	1	99.3	99.14	98.68		1	99.13	98.89	96.38
	1.02					1.02			
	1.03	0.27	0.31	0.3		1.03	0.41	0.32	0.42
	1.04	0.07	0.06	0.09		1.04	0.09	0.09	
	1.06	0.25	0.26	0.55		1.06	0.23	0.21	0.22
	1.07		0.12	0.09		1.07	0.08	0.21	1.17
	1.08					1.08			
	1.1			0.07		1.1		0.1	0.59
	1.12					1.12			0.07
	1.14					1.14			0.1
	1.16					1.16			0.06
	1.2					1.2		0.06	0.31
	1.23					1.23			
	1.24					1.24			
	1.27					1.27			
	1.3					1.3		0.06	0.54

Таблиця 28. Стабільність TAT-NR2B9c-Cl (20 мМ гістидин, 120 мМ трегалоза) у порівнянні з TAT-NR2B9c-As (сольовий розчин) через 11 місяців

Пік (RRT)	Хлоридна сіль NA-I			NA-I-As у сольовому розчині			
	T= 11 місяців			T= 11 місяців			
	-20C	40C	60C	-20C	40C	60C	
RP-HPLC-TFA	0.899		0.1				
	0.93		0.18				
	0.95		0.16			0.27	
	0.97		0.1			0.17	
	0.99		0.38			0.22	
	1	98.57	98.14	95.49	98.57	96.48	81.27
	1.02	1.18	1.09	1.42	1.14	1.8	6.51
	1.03	0.07	0.09	0.34	0.09		
	1.05		0.05	0.17		0.51	3
	1.06			0.15		0.06	0.27
	1.07	0.18	0.36	1.05	0.2	0.27	0.62
	1.08					0.08	0.3
	1.09						0.16
	1.1					0.06	0.28
	1.11						0.29
	1.12			0.12		0.33	
	1.13					0.41	3.49
	1.15						0.42
	1.16						0.16
	1.17						0.26
	1.18						0.1
	1.19						0.23
	1.2						0.26
	1.22						0.19
	1.23						0.3
	1.24						0.25
	1.26						0.34
	1.261						0.34
	1.34						0.14
RP-HPLC-MSA	Хлоридна сіль NA-I			NA-I-As у сольовому розчині			
	0.52					0.13	
	0.87		0.13				
	0.91		0.05	0.2		0.23	
	0.94		0.09	0.34		0.29	
	0.98	0.1	0.12	0.21	0.1	0.12	0.1
	1	99.3	98.71	95.34	99.32	97.08	82.12
	1.02	0.29	0.24	0.61	0.24	0.28	0.82
	1.04	0.07	0.12		0.08	0.11	
	1.06	0.25	0.48	1.48			
	1.07		0.06	0.25	0.25	1.03	6.36
	1.09		0.08	0.26		0.45	3.02
	1.1						0.27
	1.12					0.05	0.23
	1.14			0.17			0.31
	1.15						0.53
	1.16			0.11		0.26	
	1.19						0.33
	1.2						0.1
	1.23		0.05	0.24		0.1	0.59
	1.24					0.06	0.59
	1.25			0.18			0.35
	1.26					0.05	0.44
	1.27					0.41	3.18
	1.33						0.26
	1.35						0.15

В таблиці 27 показана відносна площа кожного піка, що спостерігали у кожному HPLC аналізі при кожній температурі після 1 місяця зберігання та при кожному відносному часі утримання (ідентичність піків) для безпосереднього порівняння. Для обох складів та способів вихідна чистота була дуже схожа (98 % для TAT-NR2B9c-Cl у порівнянні з 97,93 % для TAT-NR2B9c-As за допомогою способу TFA та 99,3 % у порівнянні з 99,13 % для способу із застосуванням метансульфонової кислоти (MSA)). З даних при 60°C видно, що композиція Tat-NR2B9c-Cl, гістидину та трегалози, по суті, більш стабільна, ніж склад сольового розчину Tat-NR2B9c, при обох способах. Для способу TFA після 1 місяця зберігання при 60°C сіль Tat-NR2B9c-Cl зберігає 98,6 % основного піка, тоді як склад сольового розчину Tat-NR2B9c-As зберігає тільки 96,8 % вихідного матеріалу. При способі MSA різниця ще більш чітко виражена,

при цьому сіль Tat-NR2B9c-Cl зберігає 99,4 % свого вихідного матеріалу, тоді як склад сольового розчину Tat-NR2B9c-As зберігає тільки 97,2 % свого вихідного матеріалу.

В таблиці 28 показана відносна площа кожного піка, що спостерігали у кожному HPLC аналізі в однакових зразках після 11 місяців при різних температурах зберігання. Ці дані підтверджують поліпшену стабільність складу солі NA-1-Cl у порівнянні зі складом NA-1-As у хлориді. При порівнянні площі основних піків NA-1 в TFA аналізі при 40°C, який проводили в умовах прискорених іспитів за вказівками ICH для підтвердження зберігання ліофілізованого лікарського засоби при кімнатній температурі, NA-1-Cl зберігає 98,14 % чистоти від вихідної чистоти 98,58 %, тоді як чистота NA-1-As в сольовому розчині падає від 98,57 % чистоти до 96,48 %, що нижче специфікації по чистоті 97 %, та склад не буде вважатися стабільним через приблизно рік. Ту саму тенденцію спостерігали при аналізі MSA від 99,3 % чистоти до 98,71 % чистоти для NA-1-Cl та 97,08 % для NA-1-As у сольовому розчині. При вивченні результатів чистоти при 60°C після 11 місяців (таблиця 28) відмінності були суттєво більш глибокими, при цьому NA-1-Cl є значно стабільнішим, ніж NA-1-As.

З клінічної точки зору, рекомендовані межі чистоти лікарського засобу для людей можуть складати 97 % чистоти без неохарактеризованої домішки, що перевищує 0,5 %, при умовах прискорених іспитів зберігання. За допомогою рівняння Арреніуса можна застосовувати дані стабільності при 40°C та 60°C для прогнозування падіння основного піка чистоти або росту домішок, що спостерігаються при різних температурах зберігання (наприклад, при 25°C або 37°C, у порівнянні з даними, що спостерігаються при 40°C або 60°C). Якщо припустити, що лікарський засіб буде зберігатися при навколишній температурі, було б корисно продемонструвати стабільність при 37°C, оскільки при багатьох навколишніх умовах без холодильника навколишня температура влітку може знаходитися у даному діапазоні. З урахуванням вимоги чистоти 97,0 % при 37°C та з використанням типових даних стабільності з аналізу TFA для основного піка чистота, оскільки він є найбільш чутливим (тобто демонструє найбільше зниження чистоти при 40°C та 60°C), прогнозують термін зберігання складу сольового розчину 29,8 місяця (або трохи більше ніж 2 роки), тоді як для складу Tat-NR2B9c-Cl прогнозують термін зберігання ~ 500 місяців або приблизно 41 рік. Це є суттєве поліпшення стабільності.

З точки зору росту найбільшої домішки (за винятком домішки при відносному часі утримування (RRT) 1,02 за способом TFA, яка є ідентифікованою домішкою), ріст найбільшої домішки через 1 місяць для складу Tat-NR2B9c-Cl становить 0,17-0,43 (RRT 0,99 за способом TFA), тоді як ріст найбільшої домішки для складу сольового розчину Tat-NR2B9c-As становить 0,05-0,72 (1,13 RRT за способом TFA). З урахуванням межі домішок вище 0,5 % при 37°C та за допомогою рівняння Арреніуса разом з даними при 40°C та 60°C по кожній з цих домішок, прогнозують термін зберігання складу сольового розчину ~ 4,8 місяця при 37°C, тоді як для композиції Tat-NR2B9c-Cl прогнозують термін зберігання > 10 років. Таким чином, з точки зору або загального рівня TAT-NR2B9c, або росту найбільшої домішки композиція Tat-NR2B9c-Cl представляє суттєве поліпшення у порівнянні зі складом сольового розчину.

Приклад 9. TAT-NR2B9c-Cl є більш стабільним, ніж TAT-NR2B9c-As, в складах гістидину, трегалози

Як TAT-NR2B9c-Cl, так і TAT-NR2B9c-As складали при 90 мг/мл в 20 мМ гістидині, 120 мМ трегалозі, pH 6,5. Трьох-мілілітрові аліквоти (270 мг) кожного ліофілізували за тією самою програмою, що представлена вище, та по закінченні поміщали до інкубаторів з постійною температурою та вологістю при -20 °C (контроль), 40 °C та 60 °C. Через 4 тижні тестували стабільність кожного складу із застосуванням двох незалежних один від одного HPLC способів – один з TFA як носієм, а інший з MSA як носієм.

В таблиці 29 показана відносна площа кожного піка, що спостерігали у кожному з двох HPLC аналізів при кожній температурі після 1 місяця зберігання та при кожному відносному часі утримування (RRT; ідентичність піків), для безпосереднього порівняння. На лівій панелі представлений склад Tat-NR2B9c-As, а на правій панелі показані результати складу солі Tat-NR2B9c-Cl. Пік при RRT 1 відповідає інтактному пептиду TAT-NR2B9c в кожному аналізі та в кожній колонці. Для обох складів та способів вихідні показники чистоти дуже схожі (98 % для TAT-NR2B9c-Cl у порівнянні з 98,3 % для TAT-NR2B9c-As за способом TFA, та 99,3 % у порівнянні з 99,2 %, відповідно, за способом MSA). З даних при 60°C видно, що композиція Tat-NR2B9c-Cl суттєво стабільніша, ніж склад Tat-NR2B9c-As, при обох способах. При способі TFA після 1 місяця зберігання при 60°C сіль Tat-NR2B9c-Cl зберігає 98,6 % основного піка (96,64 %, розділеного на 98 % вихідної), тоді як склад сольового розчину Tat-NR2B9c-As зберігає тільки 96 % вихідного матеріалу (94,44 %, розділеного на 98,3 % вихідної чистоти). За способом MSA різниця ще більш помітна, при цьому сіль Tat-NR2B9c-Cl зберігає 99,4 % вихідного матеріалу

(98,68 %/99,3 %), тоді як склад сольового розчину Tat-NR2B9c-As зберігає тільки 95,6 % свого вихідного матеріалу (94,81 %/99,2 %). При розгляданні найбільших домішок для кожної композиції стає зрозумілим, що для умов прискорених іспитів стабільності як при 40 °C, так і при 60 °C сіль Tat-NR2B9c-ацетат має більше домішок і, таким чином, є менш стабільною.

5 Незвичайно, що хлоридна сіль TAT-NR2B9c більш стабільна, ніж ацетатна сіль при аналогічних умовах.

В таблиці 30 показана відносна площа кожного пика, що спостерігали у кожному HPLC аналізі в однакових зразках після 11 місяців при різних температурах зберігання. Ці дані підтверджують поліпшену стабільність складу солі NA-1-Cl у порівнянні зі складом NA-1-As при складанні у тому самому буфері (20 мМ гістидин/120 мМ трегалоза, рН 6,5). При порівнянні площі основних піків NA-1 в TFA аналізі при 40°C, який проводили в умовах прискорених іспитів за вказівками ICH для підтвердження зберігання ліофілізованого лікарського засобу, NA-1-Cl зберігає 98,14 % чистоти від вихідної чистоти 98,58 %, тоді як чистота NA-1-As в сольовому розчині падає від 98,57 % до 95,91 %, що нижче специфікації по чистоті 97 %, та склад не може вважатися стабільним. Ту саму тенденцію спостерігали при аналізі MSA: від 99,3 % чистоти до 98,71 % чистоти для NA-1-Cl та 96,85 % для NA-1-As в сольовому розчині. При вивченні результатів чистоти при 60°C після 11 місяців (таблиця 30) відмінності були суттєво більш глибокими, при цьому NA-1-Cl є значно стабільнішим, ніж NA-1-As (~ 95 % чистота для обох аналізів для хлоридної солі у порівнянні з ~ 83 % чистотою для ацетатної солі). Таким чином, хлоридна сіль NA-1, як передбачали, несподівано та суттєво є більш стабільною, ніж ацетатна сіль у тому самому буфері.

Таблиця 29. Стабільність TAT-NR2B9с-As у порівнянні з ліофілізованим TAT-NR2B9с-CI в 20 мМ гістидині та 120 мМ трегалозі, рН 6,5, після 4 тижнів

	RRT	T=4 тижні				RRT	T=4 тижні		
		-20C	40C	60C			-20C	40C	60C
RP-HPLC-TFA	0.86				RP-HPLC-TFA	0.86			
	0.88					0.88			
	0.9					0.9			0.11
	0.93					0.93			
	0.95					0.95			
	0.97		0.06			0.97			0.07
	0.98					0.98			
	0.99		0.58	0.56		0.99	0.17	0.29	0.43
	1		97.19	94.44		1	98	97.78	96.64
	1.02		1.52	2.18		1.02	1.27	1.22	1.36
	1.03		0.12	0.13		1.03	0.11	0.11	0.16
	1.04		0.15	0.71		1.04			
	1.05					1.05	0.08	0.07	0.09
	1.06		0.07	0.17		1.06			
	1.07		0.23	0.36		1.07	0.22	0.24	0.46
	1.08			0.16		1.08			
	1.09			0.15		1.09			0.06
	1.1			0.18		1.1		0.11	0.09
	1.11			0.21		1.11	0.16		0.09
	1.12					1.12		0.11	
	1.13		0.09	0.75		1.13		0.06	
RP-HPLC-MSA	1.14				RP-HPLC-MSA	1.14			0.09
	1.26					1.26			
	1.34					1.34			
	1.36					1.36			
	1.4					1.4			
	1.48					1.48			
		-20C	40C	60C			-20C	40C	60C
	0.77					0.77			
	0.94			0.09		0.94			0.07
	0.98		0.12	0.19		0.98	0.11	0.11	0.15
	0.99		0.7	0.6		0.99			
	1		98.11	94.81		1	99.3	99.14	98.68
	1.02		0.34	0.38		1.02			
	1.03		0.1	0.17		1.03	0.27	0.31	0.3
	1.04					1.04	0.07	0.06	0.09
	1.06		0.4	1.46		1.06	0.25	0.26	0.55
	1.07					1.07		0.12	0.09
	1.08		0.14	0.64		1.08			
	1.1			0.17		1.1			0.07
	1.12			0.14		1.12			
	1.13			0.06		1.13			
	1.14					1.14			
	1.15			0.19		1.15			
	1.16					1.16			
	1.17			0.09		1.17			
	1.18			0.07		1.18			
	1.2					1.2			
	1.23			0.17		1.23			
	1.24			0.18		1.24			
	1.27		0.08	0.59		1.27			
	1.3					1.3			



**Таблиця 30. Стабільність TAT-NR2B9с-Ас у порівнянні з ліофілізованим TAT-NR2B9с-СІ в 20 мМ гістидині та 120 мМ трегалозі, рН 6,5, після 11 місяців**

		NA-1, 250 мМ His, 120 мМ трегалоза, рН 6,5			Дані стабільності хлоридної солі NA-1		
Пік (RRT)		T= 11 місяців			T=11 місяців		
		-20C	40C	60C	-20C	40C	60C
RP-HPLC TFA	0.86		0.12	0.52			
	0.88			0.17			
	0.899			0.15			0.1
	0.93						0.18
	0.95			0.14			0.16
	0.97			0.19			0.1
	0.99		0.37	0.63		0.29	0.38
	1	98.47	95.91	83.08	98.57	98.14	95.49
	1.02	1.21	1.93	5.77	1.18	1.09	1.42
	1.03	0.08			0.07	0.09	0.34
	1.05	0.05	0.57	3.45		0.05	0.17
	1.06		0.07	0.19			0.15
	1.07	0.19	0.31	0.75	0.18	0.36	1.05
	1.08		0.11	0.39			
	1.09		0.07	0.27			
	1.1		0.07	0.31			
	1.12		0.06	0.29			0.12
	1.13		0.41	2.5			
	1.15			0.19			
	1.17			0.2			
	1.2			0.11			
	1.22			0.12			
	1.23			0.12			
	1.25			0.12			
		NA-1, 250 мМ His, 120 мМ трегалоза, рН 6,5			Хлоридна сіль NA-1		
RP-HPLC-MSA	0.77		0.08	0.48			
	0.8			0.14			
	0.87						0.13
	0.91			0.15		0.05	0.2
	0.94		0.05	0.14		0.09	0.34
	0.945			0.22			
	0.98	0.11	0.23	0.85	0.1	0.12	0.21
	1	99.23	96.85	82.73	99.3	98.71	95.34
	1.02	0.32	0.35	0.77	0.29	0.24	0.61
	1.04	0.08	0.11	0.77	0.07	0.12	
	1.06	0.26	1.07	5.05	0.25	0.48	1.48
	1.07					0.06	0.25
	1.09		0.56	3.42		0.08	0.26
	1.1		0.08	0.41			
	1.12		0.07	0.32			
	1.14			0.28			0.17
	1.15		0.09	0.32			
	1.16						0.11
	1.19			0.27			
	1.23		0.07	0.37		0.05	0.24
	1.24			0.22			
	1.25						0.18
	1.26			0.19			
	1.27		0.38	2.47			
	1.35			0.12			

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> НОНО ІНК.  
ГАРМАН ДЖОНАТАН ДЕВІД

<120> ХЛОРИДНА СІЛЬ TAT-NR2B9c

<130> 057769/446849

<160> 73

<170> FastSEQ для Windows версії 4.0

<210> 1  
<211> 10  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> синтезований

<400> 1  
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 2  
<211> 11  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> синтезований

<400> 2  
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 3  
<211> 11  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> синтезований

<400> 3  
Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 4  
<211> 12  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> синтезований

<400> 4

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln  
1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 5

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val  
1 5

<210> 6

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 6

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile  
1 5 10 15  
Glu Ser Asp Val  
20

<210> 7

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 7

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile  
1 5 10 15  
Glu Thr Asp Val  
20

<210> 8

<211> 12

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> 1

<223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота



<400> 8

Xaa Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 9

Arg Leu Ser Gly Met Asn Glu Val Leu Ser Phe Arg Trp Leu  
1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 10

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg  
1 5

<210> 11

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 11

Phe Asn Gly Ser Ser Asn Gly His Val Tyr Glu Lys Leu Ser Ser Ile  
1 5 10 15  
Glu Ser Asp Val  
20

<210> 12

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 12

Glu Ser Asp Val  
1

<210> 13

<211> 20

<212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 13  
 His Pro Thr Asp Ile Thr Gly Pro Leu Asn Leu Ser Asp Pro Ser Val  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Val Val  
 20  
  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 14  
 Arg Arg Ala Ile Glu Arg Glu Glu Gly Gln Leu Gln Leu Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 His Arg Glu Ser  
 20  
  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 15  
 Thr Gln Gly Phe Pro Gly Pro Cys Thr Trp Arg Arg Ile Ser Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Glu Val  
 20  
  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 16  
 Ala Val Ser Arg Lys Thr Glu Leu Glu Glu Tyr Gln Arg Thr Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Cys Glu Ser  
 20  
  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 17

Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Asn	Arg	Arg	Val	Tyr	Lys	Lys	Met	Pro	Ser	Ile
1				5					10					15	
Glu	Ser	Asp	Val												
			20												

<210> 18

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 18

Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Thr	Arg	Arg	Gly	Ser	Ala	His	Phe	Ser	Ser	Leu
1				5					10					15	
Glu	Ser	Glu	Val												
			20												

<210> 19

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 19

Gln	Pro	Thr	Pro	Thr	Leu	Gly	Leu	Asn	Leu	Gly	Asn	Asp	Pro	Asp	Arg
1				5					10					15	
Gly	Thr	Ser	Ile												
			20												

<210> 20

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 20

Met	Gln	Ser	Ile	Pro	Cys	Met	Ser	His	Ser	Ser	Gly	Met	Pro	Leu	Gly
1				5					10					15	
Ala	Thr	Gly	Leu												
			20												

<210> 21

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 21

Gln Asn Phe Ala Thr Tyr Lys Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Ile Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile  
 20

<210> 22

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 22

Gln Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Thr Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile  
 20

<210> 23

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 23

His Thr Gly Thr Ala Ile Arg Gln Ser Ser Gly Leu Ala Val Ile Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Asp Leu Pro  
 20

<210> 24

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 24

Ser Phe Thr Ser Ile Leu Thr Cys His Gln Arg Arg Thr Gln Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Val Ala  
 20

<210> 25

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 25

Glu Val Ile Asn Met His Thr Phe Asn Asp Arg Arg Leu Pro Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Met Ala  
 20

<210> 26

<211> 5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 26

Ile Glu Thr Ala Val  
 1 5

<210> 27

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 27

Ser Thr Val Val  
 1

<210> 28

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 28

His Arg Glu Ser  
 1

<210> 29

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 29

Glu Ser Glu Val  
 1

<210> 30  
 <211> 4  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<400> 30  
 Thr Cys Glu Ser  
 1

<210> 31  
 <211> 4  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<400> 31  
 Gly Thr Ser Ile  
 1

<210> 32  
 <211> 4  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<400> 32  
 Ala Thr Gly Leu  
 1

<210> 33  
 <211> 4  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<400> 33  
 Ser Val Lys Ile  
 1

<210> 34  
 <211> 4  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<400> 34

Ser Asp Leu Pro

1

<210> 35

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 35

Glu Thr Val Ala

1

<210> 36

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 36

Glu Thr Met Ala

1

<210> 37

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 37

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly Tyr Lys Leu Ser Ser Ile

1

5

10

15

Glu Thr Asp Val

20

<210> 38

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Хаа = E, D, N або Q

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2

<223> Xaa = S або T

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 3

<223> Xaa = D, E, Q або N

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 4

<223> Xaa = V або L

<400> 38

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 39

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 39

Glu Thr Asp Val

1

<210> 40

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 40

Glu Thr Glu Val

1

<210> 41

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<400> 41

Asp Thr Asp Val

1

<210> 42

<211> 4

<212> Білок

<213> Штучна послідовність



<220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 42  
 Asp Thr Glu Val  
 1  
  
 <210> 43  
 <211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 43  
 Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val  
 1 5  
  
 <210> 44  
 <211> 5  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 44  
 Gly Ser Ser Ser Ser  
 1 5  
  
 <210> 45  
 <211> 5  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 45  
 Thr Gly Glu Lys Pro  
 1 5  
  
 <210> 46  
 <211> 8  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 46  
 Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser  
 1 5  
  
 <210> 47

<211> 9  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 47  
 Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro  
 1 5  
  
 <210> 48  
 <211> 13  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <400> 48  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln  
 1 5 10  
  
 <210> 49  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або амінокислота, відмінна від Y  
  
 <400> 49  
 Хаа Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10  
  
 <210> 50  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота  
  
 <400> 50  
 Хаа Gly Lys Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys  
 1 5 10

<210> 51  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота  
  
 <400> 51  
 Хаа Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10  
  
 <210> 52  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота  
  
 <400> 52  
 Хаа Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10  
  
 <210> 53  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований  
  
 <220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота  
  
 <400> 53  
 Хаа Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10  
  
 <210> 54  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> синтезований

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 54  
 Хаа Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 55  
 Хаа Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 56  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 56  
 Хаа Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 57  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 57  
 Хаа Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 58  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 58  
 Хаа Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg  
           1                  5                          10

<210> 59  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 59  
 Хаа Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg  
           1                  5                          10

<210> 60  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<220>  
 <221> ВАРІАНТ  
 <222> 1  
 <223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 60  
 Хаа Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg  
           1                  5                          10

<210> 61  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

```

<220>
<223> синтезований

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 1
<223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 61
Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg
 1             5             10

<210> 62
<211> 12
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтезований

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 1
<223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 62
Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg
 1             5             10

<210> 63
<211> 12
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтезований

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 1
<223> Хаа = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 63
Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg
 1             5             10

<210> 64
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтезований

<220>
<221> ВАРІАНТ
<222> 1

```

<223> Xaa = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 64

Xaa Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg  
1 5 10

<210> 65

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> 1

<223> Xaa = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 65

Xaa Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg  
1 5 10

<210> 66

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> 1

<223> Xaa = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 66

Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg  
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезований

<220>

<221> ВАРІАНТ

<222> 1

<223> Xaa = відсутній або будь-яка амінокислота

<400> 67

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg  
1 5

<210> 68  
 <211> 4  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 1  
 <223> Xaa = E, Q, A або їх аналог

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 2  
 <223> Xaa = T або S

<220>  
 <221> ВАРИАНТ  
 <222> 3  
 <223> Xaa = A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D, N-Me-N  
 або їх аналог

<400> 68  
 Xaa Xaa Xaa Val  
 1

<210> 69  
 <211> 22  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<400> 69  
 Val Asp Ser Glu Ile Ser Ser Leu Lys Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Gly Tyr Ile Asn  
 20

<210> 70  
 <211> 20  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> синтезований

<400> 70  
 Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly Tyr Lys Leu Ser Ser Ile  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Asp Val  
 20

<210> 71  
 <211> 5



```

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтезований

<400> 71
Ile Glu Ser Asp Val
1 5

<210> 72
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтезований

<400> 72
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro
1 5 10

<210> 73
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> синтезований

<400> 73
Ile Glu Thr Asp Val
1 5

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Хлоридна сіль пептиду, який являє собою TAT-NR2B9c, де хлорид становить більше ніж 95 % молів усіх аніонів, що містяться в солі.
2. Хлоридна сіль за п. 1, отримана шляхом обміну трифторацетату на хлорид в трифторацетатній солі TAT-NR2B9c.
3. Хлоридна сіль за п. 1, отримана шляхом обміну трифторацетату на ацетат, а потім ацетату
- 10 на хлорид, виходячи з трифторацетатної солі TAT-NR2B9c.
4. Хлоридна сіль за п. 1, в якій більше ніж 99 % молів аніонів в солі являють собою хлорид.
5. Попередньо ліофілізований склад для лікування інсульту, церебральної ішемії, черепно-мозкової травми або субарахноїдального крововиливу, що містить хлоридну сіль за будь-яким з попередніх пунктів, буфер та цукор, при цьому ацетат та трифторацетат окремо і разом
- 15 складають менше ніж 5 % молів аніонів складу.
6. Попередньо ліофілізований склад за п. 5, в якому буфером є гістидин, цукром є трегалоза, а рН становить 6-7.
7. Попередньо ліофілізований склад за п. 5 або 6, в якому кожний з ацетату та трифторацетату містить менше ніж 1 % за масою аніонів у складі.
- 20 8. Попередньо ліофілізований склад за п. 5 або 6, в якому кожний з ацетату та трифторацетату містить менше ніж 0,1 % за масою аніонів у складі.
9. Попередньо ліофілізований склад за будь-яким з пп. 5-8, в якому хлоридна сіль пептиду має концентрацію 70-120 мг/мл, гістидин має концентрацію 15-100 мМ, а трегалоза має концентрацію 80-160 мМ.
- 25 10. Попередньо ліофілізований склад за п. 9, в якому хлоридна сіль пептиду має концентрацію 70-120 мг/мл, гістидин має концентрацію 20-100 мМ, а трегалоза має концентрацію 100-140 мМ.

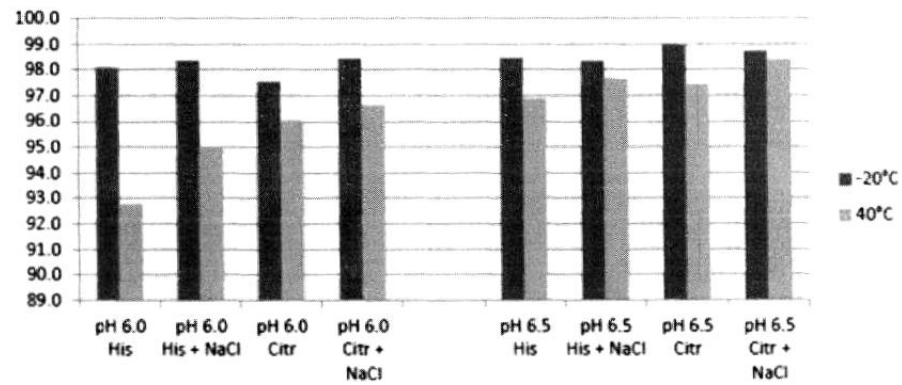
11. Попередньо ліофілізований склад за будь-яким з пп. 5-8, в якому TAT-NR2B9с має концентрацію 70-120 мг/мл, концентрація гістидину становить 20-50 мМ, а концентрація трегалози становить 100-140 мМ.
- 5 12. Попередньо ліофілізований склад за будь-яким з пп. 5-8, в якому концентрація гістидину становить 20 мМ, концентрація трегалози становить 100-200 мМ, переважно 120 мМ, а концентрація TAT-NR2B9с становить 90 мг/мл.
13. Ліофілізований склад для лікування інсульту, церебральної ішемії, черепно-мозкової травми або субарахноїдального крововиливу, отриманий шляхом ліофілізації попередньо ліофілізованого складу за будь-яким з пп. 1-12.
- 10 14. Ліофілізований склад за п. 12, в якому кожний з ацетату та трифторацетату містить менше ніж 1 % за масою аніонів у складі.
- 15 15. Ліофілізований склад за п. 12, у якому кожний з ацетату та трифторацетату містить менше ніж 0,1 % за масою аніонів у складі.
16. Відновлений склад для лікування інсульту, церебральної ішемії, черепно-мозкової травми або субарахноїдального крововиливу, отриманий шляхом об'єднання ліофілізованого складу за будь-яким з пп. 6-15 з водним розчином.
17. Відновлений склад за п. 16, в якому водним розчином є вода або нормальний сольовий розчин.
- 20 18. Відновлений склад за п. 16, в якому об'єм відновленого складу являє собою 3-6-кратний об'єм попередньо ліофілізованого складу.
19. Відновлений склад, що містить хлоридну сіль TAT-NR2B9с при концентрації 15-25 мг/мл, буфер та цукор, де хлорид становить більше ніж 95 % молів усіх аніонів, що містяться в солі.
20. Відновлений склад за п. 19, в якому буфером є гістидин при концентрації 4-20 мМ, цукром є трегалоза при концентрації 20-30 мМ, а рН становить 6-7.
- 25 21. Відновлений склад за п. 20, в якому кожний з ацетату та трифторацетату містить менше ніж 1 % за масою аніонів у складі.
22. Відновлений склад за п. 20, в якому кожний з ацетату та трифторацетату містить менше ніж 0,1 % за масою аніонів у складі.
23. Спосіб отримання складу, що включає:
- 30 зберігання зразка ліофілізованого складу за будь-яким з пп. 6-15 протягом щонайменше тижня при температурі щонайменше 20 °С; та відновлення ліофілізованого складу.
24. Спосіб за п. 23, в якому ліофілізований склад відновлюють у воді.
25. Спосіб за п. 23, в якому ліофілізований склад відновлюють у сольовому розчині.
26. Спосіб за п. 23, в якому склад зберігають протягом щонайменше року.
- 35 27. Спосіб за п. 26, в якому зберігання здійснюють при навколишній температурі.
28. Спосіб за п. 27, в якому зберігання передбачає періоди, при яких температура перевищує 37 °С.
29. Спосіб за п. 23, в якому ліофілізований зразок зберігають в машині швидкої допомоги.
- 40 30. Застосування хлоридної солі пептиду за будь-яким із пп. 1-4 у виготовленні лікарського засобу для зниження руйнівних наслідків інсульту або іншого ішемічного стану.
31. Склад, приготований з хлоридної солі пептиду, за будь-яким із пп. 1-4, в якому ацетат та трифторацетат у поєднанні або окремо складають менше ніж 5 % молів аніонів складу.



**Фіг. 1**

**Чистота (спосіб MSA): 1 мг/мл NA-1 в 50 мМ буферах + 200 мМ NaCl**

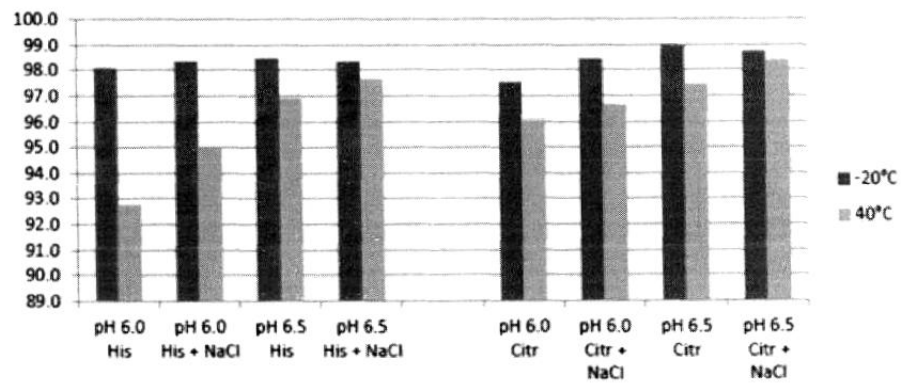
**A**



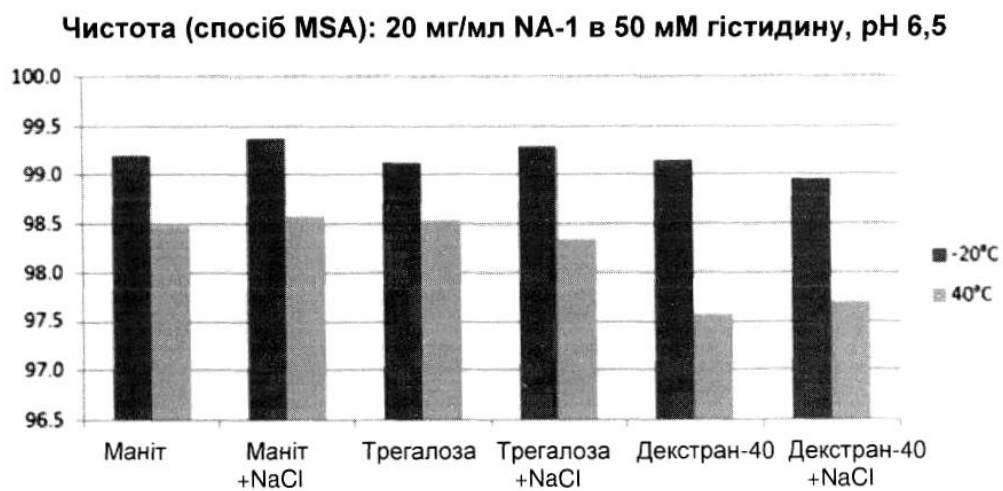
**Фіг. II. Графік результатів чистоти, спосіб MSA (за pH)**

**B**

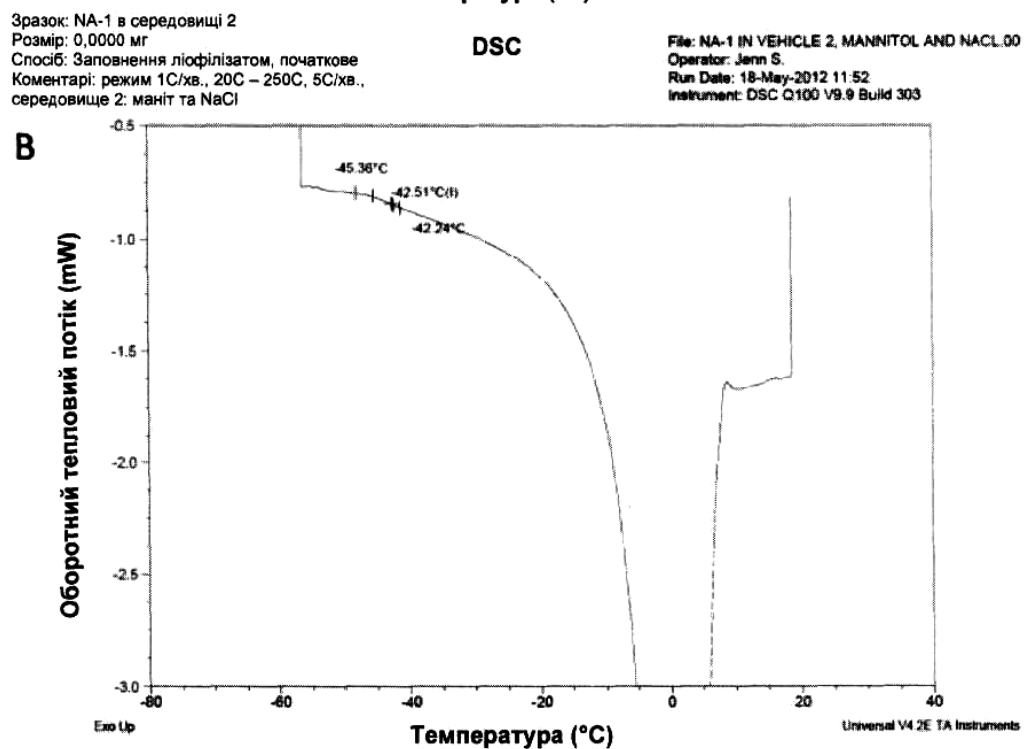
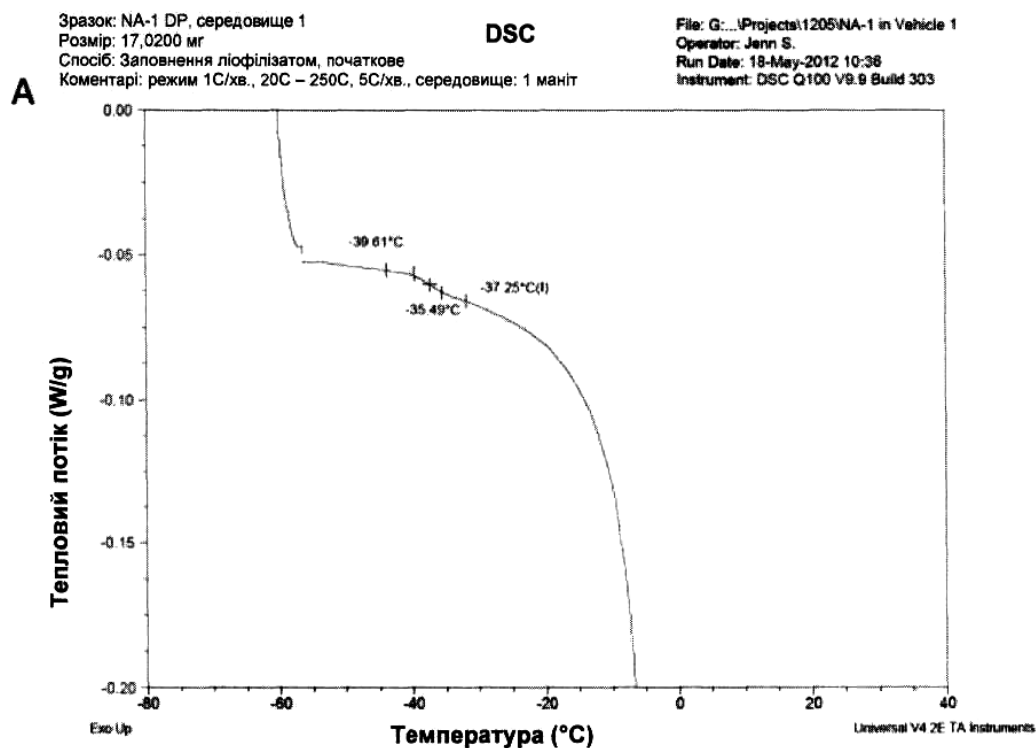
**Чистота (спосіб MSA): 1 мг/мл NA-1 в 50 мМ буферах + 200 мМ NaCl**



**Фіг. 2A, B**



**Фіг. 3**



Фіг. 4А, В

Зразок: NA-1 в середовищі 3

Розмір: 13,9790 мг

Спосіб: Заповнення ліофілізатом, початкове

Коментарі: режим 1C/хв., 20C – 250C, 5C/хв., середовище 3: трегалоза

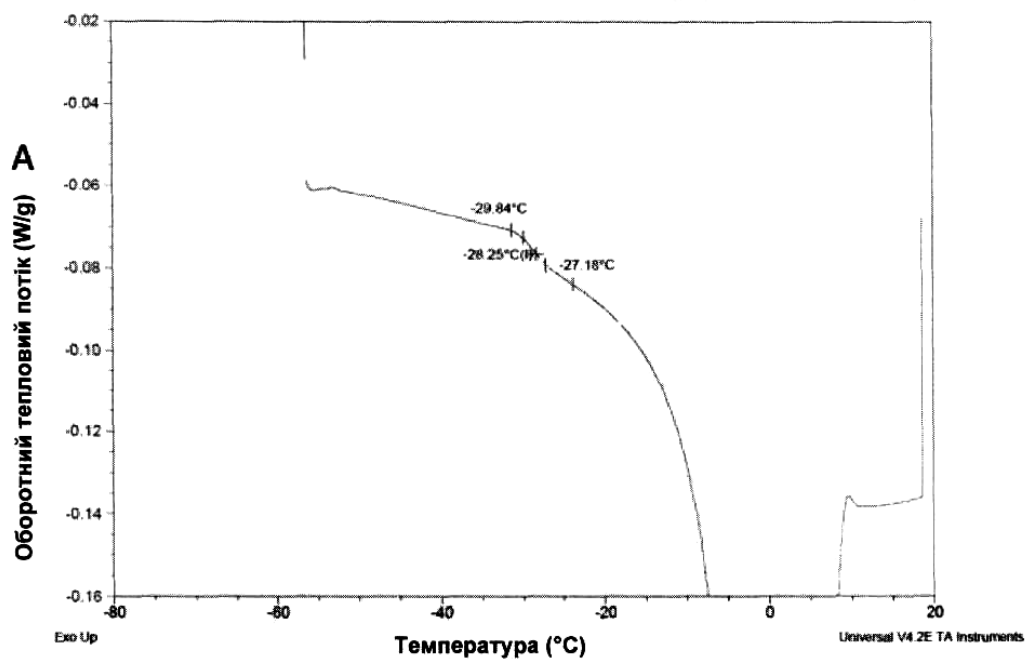
DSC

File: G:\1205\NA-1 in Vehicle 3.002

Operator: Jenn S.

Run Date: 18-May-2012 13:01

Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303



Зразок: NA-1 в середовищі 4

Розмір: 14,4450 мг

Спосіб: Заповнення ліофілізатом, початкове

Коментарі: режим 1C/хв., 20C – 250C, 5C/хв., середовище 4: трегалоза + NaCl

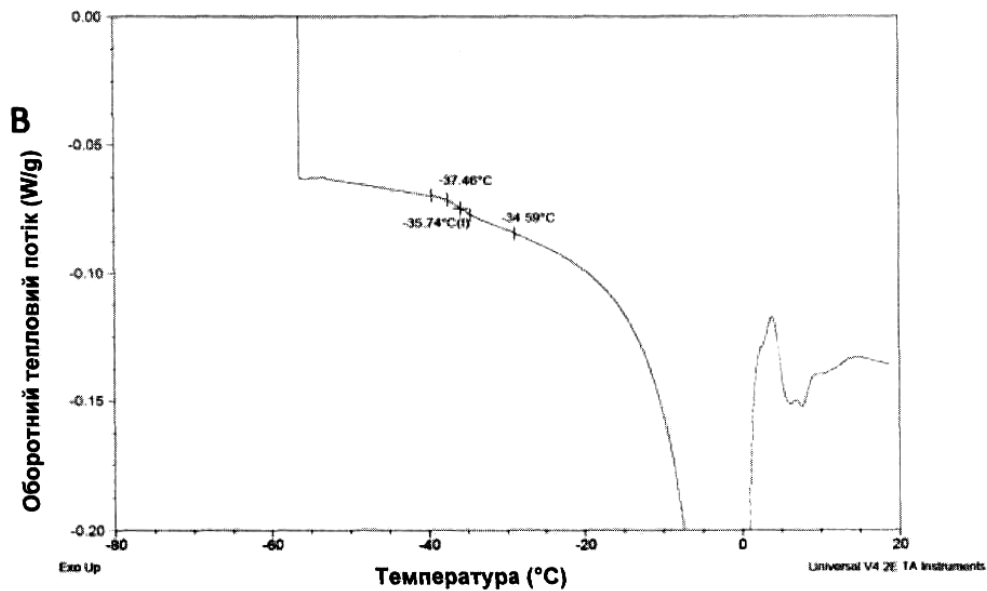
DSC

File: G:\Projects\1205\NA-1 in Vehicle 4

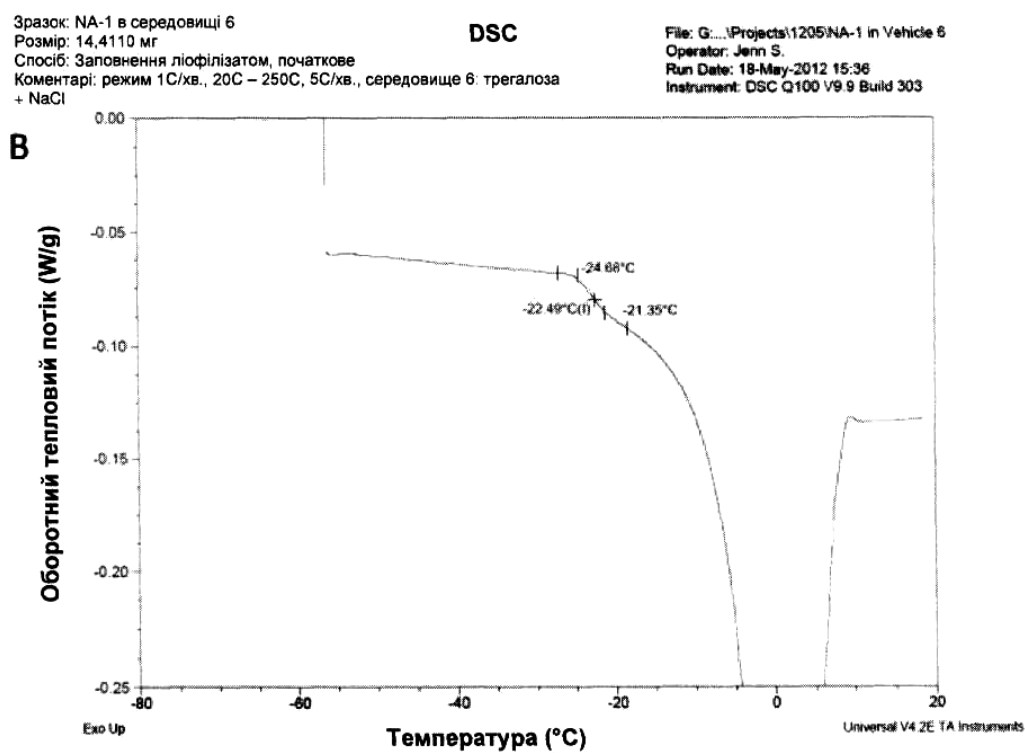
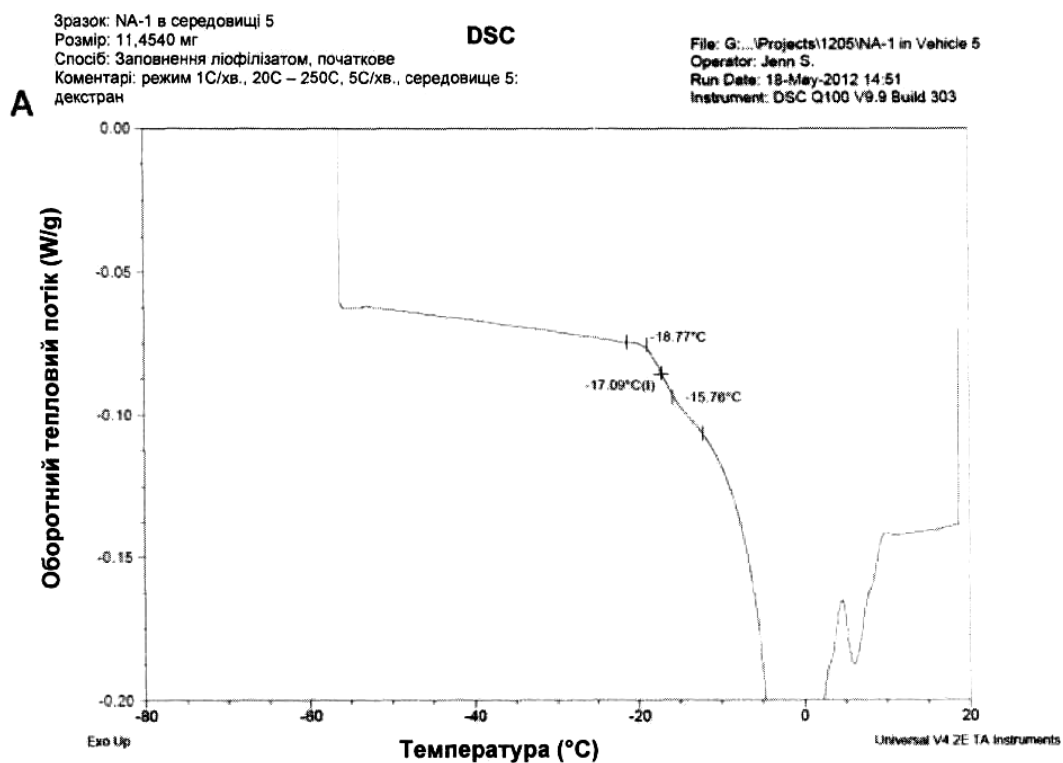
Operator: Jenn S.

Run Date: 18-May-2012 13:52

Instrument: DSC Q100 V9.9 Build 303



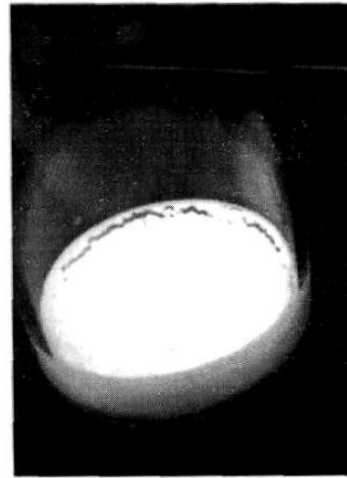
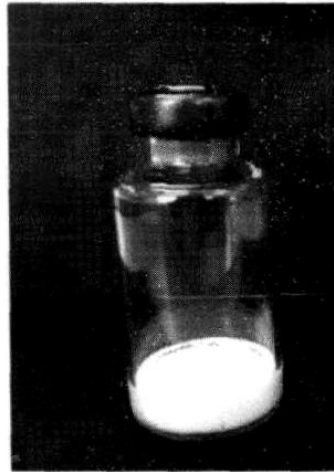
Фіг. 5A, B



Фіг. 6А, В

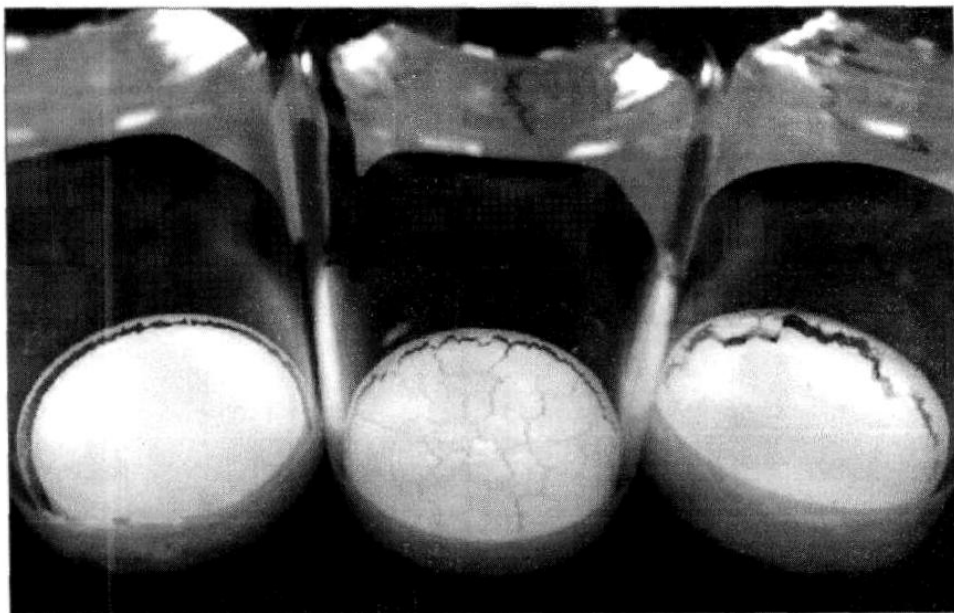


A



NA-1 в експерименті малого масштабу № 4

B



Склади №№ 1-3 з експерименту малого масштабу № 6

Фіг. 7А, В