



등록특허 10-2166374



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월15일

(11) 등록번호 10-2166374

(24) 등록일자 2020년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/19 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)

A61K 47/26 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/19 (2013.01)

A61K 38/10 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7017140

(22) 출원일자(국제) 2013년11월25일

심사청구일자 2018년10월23일

(85) 번역문제출일자 2015년06월26일

(65) 공개번호 10-2015-0094656

(43) 공개일자 2015년08월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/071755

(87) 국제공개번호 WO 2014/085349

국제공개일자 2014년06월05일

(30) 우선권주장

61/730,952 2012년11월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2010144721 A3*

(뒷면에 계속)

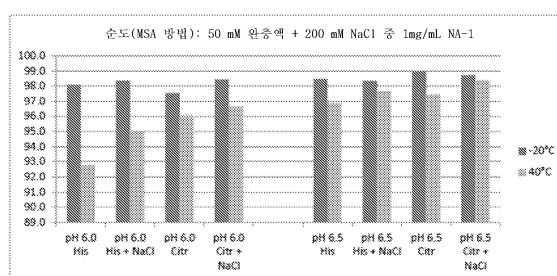
전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 윤재욱

(54) 발명의 명칭 TAT-NR2B9C의 동결건조된 제형

(57) 요약

본 발명은 활성제, 특히 TAT-NR2B9C의 동결건조된 제형을 제공한다. TAT-NR2B9C는 뇌졸중, 동맥류, 거미막밑출혈 및 다른 신경계 또는 신경외상 질환을 치료하는데 가망이 나타내었다. 상기 제형은 실온에서 안정적이고, 따라서 병 또는 사고 현장에서의 투여를 위해 구급차에서 또는 병원으로의 이송에서 상기 제형의 공급의 유지를 촉진한다.

대표도 - 도2a

순도 결과의 플롯, MSA 방법 (pH에 의해 정리됨)

(52) CPC특허분류

A61K 38/177 (2013.01)

A61K 47/183 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US07060268 B2*

US20090281036 A1

W02012021854 A3

W02010144721 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

pH 6-7에서 TAT-NR2B9c(SEQ ID NO:6), 히스티딘 및 트레할로스를 포함하는 동결건조전 제형으로서, TAT-NR2B9c가 70-120 mg/ml의 농도로 존재하고, 히스티딘이 15-100 mM의 농도로 존재하고, 트레할로스가 80-160 mM의 농도로 존재하는 동결건조전 제형.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, TAT-NR2B9c가 70-120 mg/ml의 농도로 존재하고, 히스티딘이 20-100 mM의 농도로 존재하고, 트레할로스가 100-140 mM의 농도로 존재하는 동결건조전 제형.

청구항 4

제 1항에 있어서, TAT-NR2B9c가 70-120 mg/ml의 농도로 존재하고, 히스티딘의 농도가 20-50 mM이고, 트레할로스의 농도가 100-140 mM인 동결건조전 제형.

청구항 5

제 1항에 있어서, 히스티딘의 농도가 20 mM이고, 트레할로스의 농도가 100-160 mM이고, TAT-NR2B9c의 농도가 90 mg/ml인 동결건조전 제형.

청구항 6

제 1항 및 제3항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 동결건조전 제형을 동결건조시킴으로써 제조된 동결건조된 제형.

청구항 7

제 6항의 동결건조된 제형과 수용액을 조합시킴으로써 제조된 재구성된 제형.

청구항 8

제 7항에 있어서, 수용액이 물 또는 일반 염수인 재구성된 제형.

청구항 9

제 7항에 있어서, 재구성된 제형의 부피가 동결건조전 제형의 부피의 3-6배인 재구성된 제형.

청구항 10

pH 6-7에서 15-25 mg/ml 농도의 TAT-NR2B9c, 4-20 mM 농도의 히스티딘 및 20-30 mM 농도의 트레할로스를 포함하는 재구성된 제형.

청구항 11

실온에서 적어도 1주 동안 제 6항에 따른 동결건조된 제형 샘플을 저장하고;

동결건조된 제형을 재구성시키는 것을 포함하는, 제형을 제조하는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 환자에게 투여하기 전에 재구성된 제형을 일반 염수 중에서 희석하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제 5항에 있어서, 트레할로스의 농도가 120 mM인 동결건조전 제형.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원의 상호 참조
- [0002] 본 출원은 모든 목적에 있어서 그 전체가 참조로 통합된 2012년 11월 28일 출원된 61/730,952의 정식 출원이다.
- [0003] 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 2013년 11월 20일자로 생성된 16kbyte의 427409SEQLIST.txt로 설계된 서열 목록은 참조로서 통합된다.

배경 기술

- [0005] Tat-NR2B9c (NA-1)는 PSD-95를 억제하여, N-메틸-D-아스파르테이트 수용체 (NMDAR) 및 뉴런 산화질소 합성효소 (nNOS)로의 결합을 방해하고 대뇌 허혈에 의해 유발된 흥분독성을 감소시키는 제제이다. 처치는 경색 크기 및 기능 결핍을 감소시킨다. TAT-NR2B9c (NA-1)는 II상 임상 시험을 성공적으로 마쳤다 (WO 2010144721 및 문헌 [Aarts et al., Science 298, 846-850 (2002), Hill et al., The Lancet Neurology, 11:942 - 950 (2012)] 참조).
- [0006] TAT-NR2B9c는 심각한 부작용이 없기 때문에, 이는 출혈이 없음을 확인하기 위해 제작된 본 기술분야에서 인정된 기준에 따른 진단 없이 뇌졸중 또는 기타 허혈성 상태 또는 출혈 상태가 예상되는 경우 투여될 수 있다. 예를 들어, TAT-NR2B9c는 뇌졸중 또는 신경외상이 발생한 장소 (예를 들어, 환자의 집)에서 또는 대상을 병원으로 수송하는 구급차에서 투여될 수 있다.

발명의 내용

- [0007] 청구 발명의 개요
- [0008] 본 발명은 pH 6-7에서 TAT-NR2B9c (SEQ ID NO:6), 히스티딘 및 트레할로스를 포함하는 사전동결건조된 제형을 제공한다. 선택적으로, TAT-NR2B9c의 농도는 70-120 mg/ml이며, 히스티딘의 농도는 15-100 mM이며, 트레할로스의 농도는 80-160 mM이다. 선택적으로, TAT-NR2B9c의 농도는 70-120 mg/ml이며, 히스티딘의 농도는 20-100 mM이며, 트레할로스의 농도는 100-140 mM이다.
- [0009] 선택적으로, Tat-NR2B9c의 농도는 70-120 mg/ml이며, 히스티딘의 농도는 20-50 mM이며, 트레할로스의 농도는 100-140 mM이며, pH는 6-7이다. 선택적으로, 히스티딘의 농도는 20 mM이며, 트레할로스의 농도는 100-200 mM, 바람직하게는, 120 mM이며, TAT-NR2B9c의 농도는 90 mg/ml이다.
- [0010] 본 발명은 임의의 상기 기술된 사전동결건조된 제형을 동결건조함으로써 제조된 동결건조된 제형을 추가로 제공한다.
- [0011] 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 동결건조된 제형을 수용액과 조합시킴으로써 제조된 재구성된 제형을 추가로 제공한다. 선택적으로, 수용액은 물 또는 생리식염수이다. 선택적으로, 재구성된 제형의 용적은 사전동결건조된 제형의 용적의 3-6배이다.

- [0012] 본 발명은 pH 6-7에서 15-25 mg/ml 농도의 TAT-NR2B9c, 4-20 mM 농도의 히스티딘 및 20-30 mM 농도의 트레할로스를 포함하는 재구성된 제형을 추가로 제공한다.
- [0013] 본 발명은 실온에서 적어도 1주 동안 본원에 기술된 바와 같은 동결건조된 제형 샘플을 저장하고, 동결건조된 제형을 재구성시키는 것을 포함하여, 제형을 제조하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0014] 본 방법은 재구성된 제형을 선택적으로 생리식염수에서 추가로 희석시킨 후 환자에 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 선택적으로, 환자는 뇌졸중 또는 CNS에 외상성 손상을 갖는다.
- [0015] 선택적으로, 동결건조된 샘플은 구급차에 보관된다. 선택적으로, 환자는 거미막밑 출혈을 갖는다. 선택적으로, 환자는 동맥류에 대해서 혈관내 치유중에 있다.
- [0016] 도면의 간단한 설명
- [0017] 도 1: 그래프는 NA-1의 다양한 제형으로의 처리에 따른 3PVO 뇌졸중 후 랫트 뇌의 경색부를 보여준다.
- [0018] 도 2a, b: a) -20℃ 및 40℃에서 다양한 NA-1 제형의 안정도를 입증하는 막대 그래프. Y 축은 RP-HPLC를 사용하여 전체 영역%로 측정된, 저장 온도에서 1주 후의 NA-1의 순도를 나타낸다. b) a와 동일한 데이터나, 완충제 및 pH에 의해 구분된다.
- [0019] 도 3: -20℃ 및 40℃에서 다양한 증량제 및 염의 존재하에 히스티딘 완충제 (pH 6.5)중의 20 mg/ml NA-1의 안정도 (HPLC에 의해 측정)를 입증하는 막대 그래프.
- [0020] 도 4a, b: 만니톨 (a) 또는 만니톨과 NaCl (b)의 존재하에 히스티딘 완충제 (pH 6.5)중의 20 mg/ml NA-1의 시차주사열량측정 그래프.
- [0021] 도 5a, b: 트레할로스 (a) 또는 트레할로스와 NaCl (b)의 존재하에 히스티딘 완충제 (pH 6.5)중의 20 mg/ml NA-1의 시차주사열량측정 그래프.
- [0022] 도 6a, b: 텍스트란-40 (a) 또는 텍스트란-40과 NaCl (b)의 존재하에 히스티딘 완충제 (pH 6.5)중의 20 mg/ml NA-1의 시차주사열량측정 그래프.
- [0023] 도 7a, b: a) 100 mM 히스티딘 (pH 6.5)중 90 mg/ml NA-1 3 mL와 트레할로스 120 mM의 동결건조후의 케이크 형상. b) 다양한 양의 히스티딘 및 트레할로스를 갖는 대안적인 Na-1 제형의 케이크 형상.
- 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**
- [0024] 정의
- [0025] 활성 성분은 물론, 동결건조된 제형은 하기 부류의 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 이러한 부류들은 상호 배타적이지 않으며; 즉 동일한 제제가 복수의 부류에 속할 수 있는 성분일 수 있다.
- [0026] "증량제"는 냉동-건조된 펩티드에 구조를 부여한다. 증량제는 특히 만니톨, 트레할로스, 텍스트란-40, 글리신, 락토스, 소르비톨 및 수크로스를 포함한다. 약제학적으로 우수한 케이크를 제공한다는 점 이외에, 증량제는 또한 붕괴 온도 변경, 냉동-해동 보호 제공, 유리 전이 온도 및 장기간 저장에 걸친 단백질 안정성에 있어서 유용한 특질을 부여할 수 있다. 이들 제제는 또한 장성 변형제 (tonicity modifier)로서 제공될 수 있다.
- [0027] 완충제는 동결건조 전에 허용가능한 범위로 용액 pH를 유지시키는 제제이다. 바람직한 완충제는 히스티딘이다. 그 밖의 완충제로는 숙시네이트 (소듐 또는 포타슘), 히스티딘, 시트레이트 (소듐), 글루코네이트, 아세테이트, 포스페이트, Tris 및 기타 등등을 포함한다. 바람직한 완충제는 약 5.5 내지 약 7 또는 약 6 내지 약 7.7 범위의 pH; 바람직하게는 약 6.5의 pH에서 유효하다. 이러한 범위의 pH를 조정하는 완충제의 예로는 숙시네이트 (예컨대, 소듐 숙시네이트), 글루코네이트, 히스티딘, 시트레이트 및 그 밖의 유기산 완충제를 포함한다.
- [0028] "동결방지제"는 아마도 단백질 표면으로부터 우선적으로 차단됨으로써 펩티드에 냉동-유발 스트레스에 대한 안정성을 제공한다. 이는 또한 일차 및 이차 건조, 및 장기간 생물물 저장 동안 보호를 제공할 수 있다. 예로는 폴리머 예컨대, 텍스트란 및 폴리에틸렌 글리콜; 당 예컨대, 수크로스, 글루코스, 트레할로스 및 락토스; 및 계면활성제 예컨대, 폴리소르베이트; 및 아미노산 예컨대, 글리신, 아르기닌 및 세린이 있다.
- [0029] 동결건조보호제는 아마도 무수성 유리질 매트릭스를 제공함으로써 그리고, 수소 결합을 통해 단백질과 결합하고 건조 과정 동안 제거되는 물 분자를 대체함으로써 건조 또는 '탈수' 과정 (일차 및 이차 건조 사이클) 동안 펩티드에 안정성을 부여한다. 이는 펩티드 형태를 유지시키고, 동결건조 사이클 동안 펩티드 분해를 최소화시키

고, 장기간 생성물 안정성을 향상시키는 것을 돕는다. 예로는 폴리올 또는 당 예컨대, 수크로스 및 트레할로스를 포함한다.

- [0030] 이미 언급되지 않은 범위에 있어서, 그 밖의 안정화제 또는 분해 억제제로는 탈아미드화 억제제, 계면활성제를 포함할 수 있으며, 몇 가지 일반적인 것으로는 소르비탄 폴리에톡실레이트의 지방산 에스테르 (예를 들어, 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80), 폴록사머 188 및 세정제가 있다.
- [0031] 용어 "동결건조", "동결건조된" 및 "냉동-건조된"은 건조될 물질이 먼저 냉동되고 이어서 아이스 또는 냉동 용매가 진공 환경에서 승화에 의해 제거되는 과정을 나타낸다.
- [0032] "약제 제형" 또는 조성물은 활성제가 유효하게 되고, 제형이 투여될 대상체에 독성인 추가적인 성분을 함유하지 않는 제조물이다.
- [0033] "재구성 시간"은 동결건조된 제형과 용액을 육안으로 입자가 보이지 않는 용액으로 재수화시키는데 필요한 시간이다.
- [0034] "안정한" 동결건조된 펩티드 제형은 적어도 1 주, 1 개월 또는 더욱 바람직하게는, 적어도 3 개월, 적어도 6 개월 또는 1 년 동안 20℃에서 현저한 변화가 관찰되지 않는 제형이다. 변화는 SEC-HPLC로 측정시 펩티드의 10% 이하, 바람직하게는 5%가 분해되는 경우 유의하지 않은 것으로 간주된다. 재수화된 용액은 육안 분석시 무색이거나 투명 내지 약간 유백색이다. 제형의 농도, pH 및 삼투압은 저장 후 +/- 10% 이하로 변화된다. 효능은 바로 제조된 대조군 샘플의 70-130%, 바람직하게는, 80-120% 또는 때때로 80-100%이다. 10% 이하, 바람직하게는 5%의 클리핑 (clipping)이 관찰된다. 10% 이하, 바람직하게는 5%의 응집이 형성된다. 안전성은 문헌 [Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993)]에서 검토된 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0035] 용어 "등장성"은 관심의 대상이 되는 제형이 본질적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 지님을 의미한다. 등장성 제형은 일반적으로 약 270-328 mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 약간 저장성 압력은 250-269이고, 약간 고장성 압력은 328-350 mOsm이다. 삼투압은 예를 들어, 증기압 또는 아이스-동결형 삼투압계를 사용하여 측정될 수 있다.
- [0036] 장성 변형제: 염 (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂)이 삼투압을 조절하는 장성 변형제로서 사용될 수 있다. 또한, 크라이오프로텍턴트(cryoprotectant)/라이오프로텍턴트(lyoprotectant) 및/또는 벌킹제(bulking agent), 예컨대, 수크로오스, 만니톨, 또는 글리신이 장성 변형제로서 작용할 수 있다.
- [0037] 농도 또는 pH와 같은 수치는 값이 측정될 수 있는 정확도를 반영하여 허용치 내에서 주어진다. 문맥에서 달리 요구되지 않는 한, 분수 값은 가장 가까운 정수로 어림잡아진다. 문맥에서 달리 요구되지 않는 한, 값의 범위에 대한 설명은 그러한 범위 내에서 어떠한 정수 또는 하위범위가 이용될 수 있음을 의미한다.
- [0038] 상세한 설명
- [0039] I. 총론
- [0040] 본 발명은 활성제, 특히, TAT-NR2B9c의 동결건조된 제형을 제공한다. 그러한 제형은 실온에서 안정해서 구급차 등에서, 또는 병 또는 사고 현장에서 또는 그러한 현장과 의료 시설 사이에서 투여를 위해 응급 의료 종사자에 의해서 그러한 제형의 공급의 관리를 용이하게 한다.
- [0041] 동결건조된 제형은 활성제, 완충제, 벌킹제 및 물을 포함한 동결건조전 제형으로부터 제조된다. 그 밖의 성분, 예컨대, 극저온 또는 동결 보존제, 긴장성 제제, 및 약학적으로 허용되는 담체 등이 존재할 수 있다. 바람직한 활성제는 TAT-NR2B9c이다. 바람직한 완충제는 히스티딘이다. 바람직한 벌킹제는 트레할로오스이다. 트레할로오스는 또한 극저온 및 동결-보존제로서 작용한다. 예시적인 동결건조전 제형은 활성제 (예, TAT-NR2B9c), 히스티딘 (10-100 mM, 15-100 mM, 15-80 mM, 40-60 mM 또는 15-60 mM, 예를 들어, 20 mM 또는 임의로 50 mM, 또는 20-50mM) 및 트레할로오스 (50-200 mM, 바람직하게는 80-160 mM, 100-140 mM, 더욱 바람직하게는 120 mM)을 포함한다. pH는 5.5 내지 7.5, 더욱 바람직하게는 6-7, 더욱 바람직하게는 6.5이다. 활성제 (예, TAT-NR2B9c)의 농도는 20-200 mg/ml, 바람직하게는 50-150 mg/ml, 더욱 바람직하게는 70-120 mg/ml 또는 90 mg/ml이다. 따라서, 예시적인 동결건조전 제형은 20 mM의 히스티딘, 120 mM의 트레할로오스, 및 90 mg/ml의 TAT-NR2B9c이다.
- [0042] 동결 건조 후, 동결건조된 제형은 낮은 함수량, 바람직하게는, 약 0중량%-5중량%의 물, 더욱 바람직하게는 2.5

중량% 미만의 물을 갖는다. 동결건조된 제형은 냉동고에서(예, -20 또는 -70℃), 냉장고에서(0-4℃) 또는 실온에서(20-25℃) 저장될 수 있다.

[0043] 활성제는 수용액, 바람직하게는, 주사용수, 또는 임의로 생리 식염수(0.8-1.0%의 염류, 바람직하게는 0.9%의 염류)에서 재구성된다. 재구성은 동결건조된 제형과 동일하거나, 그보다 적거나 그보다 큰 부피로 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 부피는 재구성전보다 재구성후에 더 크다(예, 3-6배 더 큼). 예를 들어, 3-5 ml의 동결건조된 부피는 13.5 ml의 부피로 재구성될 수 있다. 재구성 후, 히스티딘의 농도는 바람직하게는 2-20 mM, 예를 들어, 2-7 mM 또는 4.5 mM이고; 트레할로오스의 농도는 바람직하게는 15-45 mM 또는 20-30 mM 또는 25-27 mM이다. 활성제는 바람직하게는 10-30 mg/ml, 예를 들어, 15-25, 18-20 또는 20 mg/ml의 농도의 활성제(예, TAT-NR2B9c)이다. 재구성 후 예시적인 제형은 4-5 mM의 히스티딘, 26-27 mM의 트레할로오스 및 20 mg/ml의 TAT-NR2B9c(가장 가까운 정수로 어림잡아진 농도)를 지닌다. 재구성된 제형은 정맥내 주사를 위한 생리식염수를 함유하는 유체 백(fluid bag)에 첨가하는 것과 같이 투여 전에 추가로 희석될 수 있다.

[0044] 냉동 건조 방법은 예를 들어, 문헌[Methods in Enzymology, Vol. 22, Pages 33-39, Academic Press, New York (1971)]; 및 문헌[Freeze-Drying, E. W. Flosdorf, Rheinhold, New York (1949)]에 기술되어 있다. TAT-NR2B9c는 바람직하게는 사용을 위해 재구성될 바이알과 동일한 바이알에서 동결건조된다. TAT-NR2B9c의 수용액은 임의로 펩티드에 일반적으로 사용되는 0.22 마이크론 필터와 같은 멸균 여과 시스템을 통해 여과한 후에 바이알에 첨가된다. 제형은 실시예에 기재된 바와 같이, 제어된 사이클에서 동결건조될 수 있다. 동결건조된 제형은 바이알에 넣어지고, 환산 온도 및 압력에서 동결건조된다. 동결건조 후, 바이알은 밀봉된다. 사용을 위해, 동결건조물은 주사용수, 생리식염수 또는 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제로 재구성된다.

[0045] 다양한 용기가 동결건조에 적합하다. 용기는, 용기가 밀봉되고 부분 진공 하에 보관되는 경우에 외부 압력을 견딜 수 있어야 한다. 용기는 외부로부터 내부로 열의 적당한 이동을 허용하는 물질로 제조되어야 한다. 용기는, 동결건조될 용액이 유용한 공간의 20% 이하를 차지하거나 용기에서 부피에 대한 보편적인 USP에 따라 과량으로 과충전될 수 있게 하는 크기여야 한다. 예를 들어, 0.5 ml의 용액이 3 ml 바이알에 충전될 수 있다. 바이알은 유리, 예를 들어, 보로실리케이트, 또는 플라스틱, 예를 들어, 폴리프로필렌으로 제조될 수 있다.

[0046] 생물학적 물질을 동결건조하는데 흔히 사용되는 유리병이 사용될 수 있다. 또 다른 적합한 용기는 하나의 구획이 동결건조된 TAT-NR2B9c 펩티드 케이크를 함유하고 다른 구획이 수성 희석제를 함유하는 2-구획 주사기이다. 동결건조가 완료된 후, 바이알 또는 앰플 내 진공은 시스템을 불활성 가스로 충전시킴으로써 방출되고, 표준 장비를 사용하여 그 자리에서 마개로 막아지고, 그 후에 크립트 밀봉될 수 있다. 그러한 방법은 무균적인 최종 제품을 보장할 것이다. 동결건조된 약물 구획과 희석제 사이에 파괴가능한 밀봉이 있는 백과 같은 다른 2-분획 용액이 마찬가지로 사용될 수 있다.

[0047] II. 활성제

[0048] 활성제는 PSD-95에 결합함으로써 PSD-95와 하나 이상의 NMDAR (예, 2A, 2B, 2C 또는 2D) 또는 nNOS (예, Swiss-Prot P29475) 사이의 상호작용을 억제한다. 이러한 작용제는 뇌졸중의 하나 이상의 손상 효과 및 NMDAR 흥분독성에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 다른 신경학적 질환을 감소시키는데 유용하다. 상기 작용제는 NMDA 수용체의 PL 모티프 또는 PSD-95의 PDZ 도메인을 포함하거나 이들을 기초로 한 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 포함한다. 상기 펩티드는 또한 PSD-95 및 nNOS 및 다른 글루타메이트 수용체(예, kainite 수용체 또는 AMPA 수용체), 예컨대, KV1-4 및 GluR6 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 이러한 펩티드는 또한 PSD-95 및 nNOS과 다른 글루타메이트 수용체 (예, 카이나이트 수용체 또는 AMPA 수용체), 예컨대, KV1-4 및 GluR6 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 바람직한 펩티드는 시냅스후 치밀질(postsynaptic density)-95 단백질(PSD-95)의 PDZ 도메인 1 및 2(문헌[Stathakism, Genomics 44(1):71-82 (1997)]에 의해 제공된 인간 아미노산 서열)와 신경 N-메틸-D-아스파테이트 수용체의 NR2B 서브유닛을 포함하는 하나 이상의 NMDA 수용체 2 서브유닛의 C-말단 PL 서열[Mandich et al., Genomics 22, 216-8 (1994)] 사이의 상호작용을 억제한다. NMDAR2B는 GenBank ID 4099612, C-말단의 20개의 아미노산 FNGSSNGHVYEKLSIESDV(SEQ ID NO:11) 및 PL 모티프 ESDV(SEQ ID NO:12)를 갖는다. 바람직한 펩티드는 PSD-95의 인간 형태 및 인간 NMDAR 수용체를 억제한다. 그러나, 억제는 또한 단백질의 중 변이체로부터 나타날 수 있다. 사용될 수 있는 NMDA 및 글루타메이트 수용체의 목록이 하기에 제시된다:

[0049] PL 서열을 갖는 NMDA 수용체

명칭	GI 또는 Acc#	C-말단 20 머 서열	C-말단 4 머 서열	PL?	내부 PL ID
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:14)	HRES (SEQ ID NO:28)		
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:14)	HRES (SEQ ID NO:28)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISLES EV (SEQ ID NO:15)	ESEV (SEQ ID NO:29)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:11)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEEYQRTSRT CES (SEQ ID NO:16)	TCES (SEQ ID NO:30)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:11)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	
NMDAR2A	558748	LNCSNRRVYKKMPSIE SDV (SEQ ID NO:17)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGSAHFSSLE SEV (SEQ ID NO:18)	ESEV (SEQ ID NO:29)	X	
글루타메이 트 수용체	AF009014	QPTPTLGLNLGNDPDRG TSI (SEQ ID NO:19)	GTSI (SEQ ID NO:31)	X	

[0050]

명칭	GI 또는 Acc#	C-말단 20 머 서열	C-말단 4 머 서열	PL?	내부 PL ID
델타 2					
글루타메이 트 수용체 1	I28953	MQSIPCMSSHSSGMPLGA TGL (SEQ ID NO:20)	ATGL (SEQ ID NO:32)	X	
글루타메이 트 수용체 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIES VKI (SEQ ID NO:21)	SVKI (SEQ ID NO:33)	X	
글루타메이 트 수용체 3	AF167332	QNYATYREGYNVYGTE SVKI (SEQ ID NO:22)	SVKI (SEQ ID NO:33)	X	
글루타메이 트 수용체 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASD LP (SEQ ID NO:23)	SDLP (SEQ ID NO:34)		
글루타메이 트 수용체 5	U16125	SFTSILTCHQRRTQRKET VA (SEQ ID NO:24)	ETVA (SEQ ID NO:35)	X	
글루타메이 트 수용체 6	U16126	EVINMHTFNDRLPGKE TMA (SEQ ID NO:25)	ETMA (SEQ ID NO:36)	X	

[0051]

[0052] 펩티드는 상기 서브유닛 중 임의의 서브유닛의 C-말단으로부터의 PL 모티프를 포함하거나 이를 기초로 할 수 있

고, 이는 [S/T]-X-[V/L]을 포함하는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 서열은 바람직하게는 본 발명의 펩티드의 C-말단에서 발생한다. 바람직한 펩티드는 이들의 C-말단에 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L](SEQ ID NO:38)을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다. 예시적 펩티드는 C-말단 아미노산으로서 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), 및 DTEV(SEQ ID NO:42)를 포함한다. 2개의 특히 바람직한 펩티드는 KLSSIESDV(SEQ ID NO:5), 및 KLSSIETDV(SEQ ID NO:43)이다. 상기 펩티드는 일반적으로 3-25개의 아미노산(내재화 펩티드가 없음)을 가지며, 5-10개 아미노산, 특히 9개 아미노산(또한 내재화 펩티드가 없음)의 펩티드 길이가 바람직하다. 일부 상기 펩티드에서, 모든 아미노산은 NMDA 수용체의 C-말단으로부터 유래된다(내재화 펩티드로부터의 아미노산을 포함하지 않음).

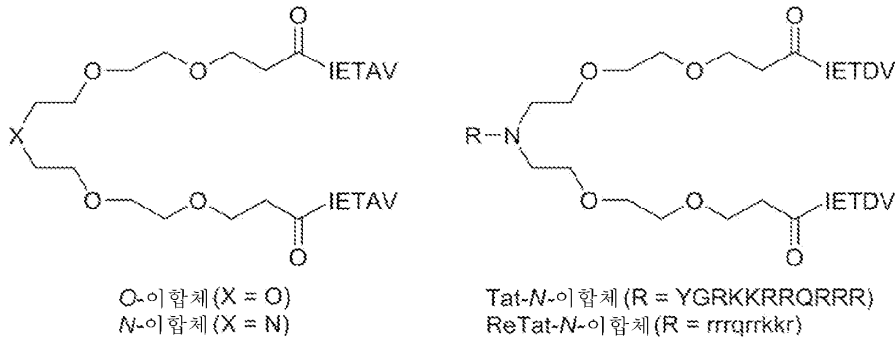
[0053] 본 발명의 펩티드 및 펩티도미메틱은 변형된 아미노산 잔기, 예를 들어, N-알킬화된 잔기를 함유할 수 있다. N-말단 알킬 변형은, 예를 들어, N-메틸, N-에틸, N-프로필, N-부틸, N-사이클로헥실메틸, N-사이클리헥실에틸, N-벤질, N-페닐에틸, N-페닐프로필, N-(3,4-디클로로페닐)프로필, N-(3,4-디플루오로페닐)프로필, 및 N-(나프탈렌-2-일)에틸)을 포함할 수 있다.

[0054] 문헌[Bach, J. Med. Chem. 51, 6450-6459 (2008)] 및 WO 2010/004003호에는 NR2B9c(SEQ ID NO:6)의 일련의 유사체가 기재되어 있다. PDZ-결합 활성은 단지 3개의 C-말단 아미노산(SDV)을 갖는 펩티드에 의해 나타난다. 상기 Bach의 문헌에는 또한 X_1tSX_2V (SEQ ID NO:68)를 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖는 유사체가 보고되어 있고, 여기서 t 및 S는 대안적 아미노산이고, X_1 은 E, Q, 및 A, 또는 이들의 유사체로부터 선택되고, X_2 는 A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D, 및 N-Me-N 또는 이들의 유사체로부터 선택된다. 임의로, 펩티드는 P3 위치(C-말단으로부터 세번째 아미노산, 즉, tS에 의해 점유되는 위치)에서 N-알킬화된다. 펩티드는 사이클로헥산 또는 방향족 치환기와 함께 N-알킬화될 수 있고, 이는 치환기와 펩티드 또는 펩티드 유사체의 말단 아미노기 사이에 스페이서 기를 추가로 포함하며, 상기 스페이서는, 바람직하게는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌 및 부틸렌으로부터 선택되는 알킬기이다. 방향족 치환기는 1개 또는 2개의 할로겐 및/또는 알킬기로 치환된 나프탈렌-2-일 모이어티 또는 방향족 고리일 수 있다.

[0055] 다른 변형이 또한 활성에 불리하게 영향을 미치지 않고 포함될 수 있으며, 이들은 자연 L-아이소머 형태의 아미노산 중 하나 이상의 D-아이소머 형태의 아미노산으로의 치환을 포함한다. 따라서, L-형태(화합물의 구조에 따라 R 또는 S로도 언급될 수 있음)에서 자연 존재하는 임의의 아미노산이 일반적으로 D-아미노산으로 언급되나, R-형태 또는 S-형태로 추가로 언급될 수 있는, 동일한 화학 구조 유형 또는 펩티도미메틱이나 반대 키랄성인 화학 구조 유형 또는 펩티도미메틱의 아미노산으로 대체될 수 있다. 따라서, 펩티도미메틱은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 적어도 50%, 또는 모든 D-아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일부 또는 모든 D 잔기를 함유하는 펩티도미메틱은 때때로 "인버소(inverso)" 펩티드로 언급된다.

[0056] 펩티도미메틱은 또한 레트로 펩티드를 포함한다. 레트로 펩티드는 역 아미노산 서열을 갖는다. 펩티도미메틱은 또한 원래 C-말단 아미노산이 N-말단에서 보이고, D-아미노산이 L-아미노산 대신 사용되도록 아미노산의 순서가 역전된 레트로 인버소 펩티드를 포함한다. WO 2008/014917호에는 아미노산 서열 $vdseisslk-rrrqrkrkrgyin$ (SEQ ID NO:69)(소문자 글자는 D 아미노산을 나타냄)을 갖는 Tat-NR2B9c의 레트로-인버소 유사체가 기재되어 있으며, 상기 유사체는 대뇌 허혈을 억제하는데 효과적인 것으로 보고되어 있다. 여기에 기재된 또 다른 효과적인 펩티드는 Rv-Tat-NR2B9c(RRRQRRKKRGYKLSSIESDV; SEQ ID NO:70)이다.

[0057] 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 링커는 탠덤(tandem) PDZ 도메인을 함유하는 단백질에 대한 친화성 및 선택성을 향상시키기 위해 펩티드 또는 펩티도미메틱의 활성 모이어티를 이합체화시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Bach et al., (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48:9685-9689] 및 WO 2010/004003호를 참조하라. PL 모티프-함유 펩티드는 바람직하게는 2개의 상기 분자의 N-말단을 연결시킴으로써 이합체화되어, C-말단이 자유롭게 된다. 상기 Bach의 문헌에는 NMDAR 2B의 C-말단으로부터의 펜타머 펩티드 IESDV(SEQ ID NO:71)가 PSD-95에 대한 NMDAR 2B의 결합을 억제하는데 있어서 효과적인 것이 추가로 보고되어 있다. IETDV(SEQ ID NO:73)가 또한 IESDV 대신 사용될 수 있다. 임의로, 약 2-10 카피의 PEG가 링커로서 세로로 1열로 연결될 수 있다. 임의로, 링커는 또한 세포 흡수를 향상시키기 위해 내재화 펩티드에 부착되거나 지질화될 수 있다. 예시적 이합체 억제제의 예가 하기에 제시된다(Bach et al., PNAS 109 (2012) 3317-3322 참조). 본원에 개시된 PSD-95 억제제 중 임의의 PSD-95 억제제가 IETDV 대신 사용될 수 있고, 임의의 내재화 펩티드 또는 지질화 모이어티가 tat 대신 사용될 수 있다. 제시된 것과 다른 링커가 또한 사용될 수 있다.



[0058]

[0059]

IETAV는 SEQ ID NO:26으로 지정되고, YGRKKRRQRRR은 SEQ ID NO:2로 지정되고, rrrqrrkkr은 SEQ ID NO:10으로 지정되며, 소문자 글자는 D-아미노산을 나타낸다.

[0060]

펩티드, 펩티도미메틱 또는 다른 작용제의 적절한 약리학적 활성은 요망시 영장류에서의 시험 전에 뇌졸중의 이전에 기재된 래트 모델 및 본 출원에 기재된 임상 시험을 이용하여 입증될 수 있다. 펩티드 또는 펩티도미메틱은 또한, 예를 들어, 참조로서 포함되는 US 20050059597호에 기재된 검정을 이용하여 PSD-95와 NMDAR 2B 사이의 상호작용을 억제하는 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 유용한 펩티드는 통상적으로 상기 검정에서 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 0.1 μ M 또는 0.01 μ M 미만의 IC₅₀ 값을 갖는다. 바람직한 펩티드는 통상적으로 0.001 내지 1 μ M, 및 더욱 바람직하게는 0.001 내지 0.05, 0.05 내지 0.5 또는 0.05 내지 0.1 μ M의 IC₅₀ 값을 갖는다. 펩티드 또는 다른 작용제가 하나의 상호작용, 예를 들어, NMDAR2B에 대한 PSD-95 상호작용의 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 경우, 상기 기재는 펩티드 또는 작용제가 또한, 예를 들어, nNOS에 대한 PSD-95 결합의 억제와 같은 또 다른 상호작용을 억제하는 것을 배제하지 않는다.

[0061]

상기 기재된 것과 같은 펩티드는 임의로 억제제의 결합 친화성을 개선시키거나, 세포막을 가로질러 운반되는 억제제의 능력을 개선시키거나, 안정성을 개선시키기 위해 유도체화(예를 들어, 아세틸화, 인산화, 미리스토일화, 제라닐화(geranylation) 및/또는 당화)될 수 있다. 특정 예로서, C-말단으로부터의 세번째 잔기가 S 또는 T인 억제제에 대해, 상기 잔기는 펩티드의 사용 전에 인산화될 수 있다.

[0062]

약리학적 작용제는 세포로의 흡수 및/또는 혈액뇌장벽을 가로지르는 흡수를 촉진하기 위해 내재화 펩티드에 연결될 수 있다. 내재화 펩티드는 많은 세포 또는 바이러스 단백질이 막을 통과하는 것을 가능케 하는 널리 공지된 부류의 비교적 짧은 펩티드이다. 세포막 형질도입 펩티드 또는 세포 투과 펩티드로도 공지된 내재화 펩티드는, 예를 들어, 5-30개의 아미노산을 가질 수 있다. 상기 펩티드는 통상적으로 이러한 펩티드의 막을 통한 통과를 촉진시키는 것으로 생각되는 아르기닌 및/또는 리신 잔기의 상기 일반 표시(일반적으로, 단백질에 대한 표시)로부터 양이온 전하를 갖는다. 일부 상기 펩티드는 적어도 5, 6, 7 또는 8개의 아르기닌 및/또는 리신 잔기를 갖는다. 예는 안테나페디아(antennapedia) 단백질(Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997))(및 이의 변이체), 인간 면역결핍 바이러스의 tat 단백질, 단백질 VP22, 단순 헤르페스 바이러스 타입 1의 UL49 유전자의 생성물, 페네트라틴(Penetratin), SynB1 및 3, 트랜스포르탄(Transportan), 암피파틱(Amphipathic), gp41NLS, polyArg, 및 여러 식물 및 박테리아 단백질 독소, 예를 들어, 리신(ricin), 아브린(abrin), 모데신(modeccin), 디프테리아 독소, 콜레라 독소, 탄저병 독소, 열 민감 독소, 및 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 외독소 A(ETA)를 포함한다. 다른 예는 다음과 같은 참고문헌에 기재되어 있다(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 및 부록(모두 참조로서 포함됨).

[0063]

바람직한 내재화 펩티드는 HIV 바이러스로부터의 tat이다. 이전의 연구에서 보고된 tat 펩티드는 HIV Tat 단백질에서 발견되는 표준 아미노산 서열 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:2)을 포함하거나 이로 구성된다. 상기 tat 모티프 측면에 추가의 잔기가 존재(약리학적 작용제에 더함)하는 경우, 잔기는, 예를 들어, tat 단백질로부터의 상기 세그먼트의 측면에 존재하는 자연 아미노산, 2개의 펩티드 도메인을 연결시키는데 통상적으로 사용되는 부류의 스페이서 또는 링커 아미노산, 예를 들어, gly (ser)₄(SEQ ID NO:44), TGEKP(SEQ ID NO:45), GGRRGGGS(SEQ ID NO:46), 또는 LRQDGERP(SEQ ID NO:47)(예를 들어, Tang et al. (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682-15686; Hennecke et al. (1998), Protein Eng. 11, 405-410) 참조)일 수 있거나, 측면에 존재하는 잔기 없이 변이체의

흡수를 부여하는 능력을 유의하게 감소시키지 않는 임의의 다른 아미노산일 수 있다. 바람직하게는, 활성 펩티드가 아닌 측면에 존재하는 아미노산의 수는 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:2)의 어느 한 면 상에서 10개를 초과하지 않는다. YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:2)의 C-말단의 측면에 존재하는 추가의 아미노산 잔기를 포함하는 한 적합한 tat 펩티드는 YGRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:48)이다. 그러나, 바람직하게는, 측면에 존재하는 아미노산은 존재하지 않는다. 사용될 수 있는 다른 tat 펩티드는 GRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:4) 및 GRKKRRQRRRP(SEQ ID NO:72)를 포함한다.

[0064] 감소된 N-타입 칼슘 채널에 결합하는 능력을 갖는 상기 tat 펩티드의 변이체는 WO/2008/109010호에 기재되어 있다. 상기 변이체는 아미노산 서열 XGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:49)을 포함하거나 이로 구성될 수 있으며, 여기서 X는 Y가 아닌 아미노산이거나, 존재하지 않는다(여기서, 문자 G는 자유 N-말단 잔기이다). 바람직한 tat 펩티드는 F로 치환된 N-말단 Y 잔기를 갖는다. 따라서, FGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:3)을 포함하거나 이로 구성된 tat 펩티드가 바람직하다. 또 다른 바람직한 변이체 tat 펩티드는 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)로 구성된다. 또 다른 바람직한 tat 펩티드는 RRRQRRKKRG 또는 RRRQRRKKRGY(SEQ ID NO:70)의 아미노산 1-10 또는 1-11)를 포함하거나 이로 구성된다. N-타입 칼슘 채널을 억제함이 없이 약리학적 작용제의 흡수를 촉진하는 다른 tat 유래 펩티드는 하기에 제시되는 것들을 포함한다.

X-FGRKKRRQRRR (F-Tat) (SEQ ID NO:3)
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-RRPRRRPRRR (SEQ ID NO:62)
X-RRARRARRR (SEQ ID NO:63)
X-RRARRARRR (SEQ ID NO:64)
X-RRPRRRPRRR (SEQ ID NO:65)
X-RRPRRRPRR (SEQ ID NO:66)
X-RRARRARR (SEQ ID NO:67)

[0065]

[0066] X는 자유 아미노 말단, 하나 이상의 아미노산, 또는 컨주게이션된 모이어티를 나타낼 수 있다. 내재화 펩티드는 인버소 또는 레트로 또는 인버소 레트로 형태에 존재하는 연결된 펩티드 또는 펩티도미메틱이 존재하거나 존재하지 않는 인버소 또는 레트로 또는 인버소 레트로 형태로 사용될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 키메라 펩티드는 YGRKKRRQRRR-KLSSIESDV(SEQ ID NO:6, NA-1 또는 Tat-NR2B9c로도 공지됨), 또는 YGRKKRRQRRR-KLSSIEDTV(SEQ ID NO:7)를 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖는다. 다른 바람직한 펩티드는 RRRQRRKKRGY-KLSSIESDV(SEQ ID NO:70, RvTat-NR2B9c로도 공지됨)를 포함하거나, RRRQRRKKRGY-KLSSIEDTV(SEQ ID NO:37)를 포함하거나 이로 구성된 아미노산 서열을 갖는다.

[0067] 내재화 펩티드는 통상적인 방법에 의해 약리학적 작용제에 부착될 수 있다. 예를 들어, 작용제는 화학적 결합, 예를 들어, 커플링 또는 컨주게이션 작용제에 의해 내재화 펩티드에 연결될 수 있다. 다수의 상기 작용제는 시판되며, 문헌[S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991)]에 의해 개관되어 있다. 가교 시약의 일부 예는 J-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(SPDP) 또는 N,N'-(1,3-페닐렌) 비스말레이미드; N,N'-에틸렌-비스-(아이오도아세트아미드) 또는 6 내지 11개의 탄소 메틸렌 브릿지(비교적 선택적일 수 있음)를 갖는 다른 상기 시약; 및 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠(아미노 및 티로신기와 비가역적 결합을 형성함)을 포함한다. 다른 가교 시약은 p,p'-디플루오로-m,m'-디니트로디페닐설펜(아미노 및 페놀기와 비가역적 가교를 형성함); 디메틸 아디프이미데이트(아미노기에 특이적임); 페놀-1,4-디설포닐클로라이드(주로 아미노기와 반응함); 헥사메틸렌다이소시아네이트 또는 디이소티오시아네이트, 또는 아조페닐-p-디이소시아네이트(주로 아미노기와 반응함); 글루타르알데하이드(여러 상이한 측쇄와 반응함) 및 디스디아조벤지딘(주로 티로신 및 히스티딘과 반응함)을 포함한다.

[0068] 펩티드인 약리학적 작용제에 대해, 내재화 펩티드에 대한 부착은 바람직하게는 N-말단에서 내재화 펩티드에 용

합된 펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질을 생성시킴으로써 달성될 수 있다.

[0069] 내재화 펩티드에 PSD-95를 억제하는 펩티드(또는 다른 작용제)를 연결시키는 것 대신 또는 연결시키는 것에 더하여, 상기 펩티드는 펩티드 단독에 비해 컨주게이트의 소수성을 증가시킴으로써, 세포막 및/또는 뇌장벽을 가로지르는 연결된 펩티드의 통과를 촉진시키기 위해 지질에 연결(지질화)될 수 있다. 지질화는 바람직하게는 N-말단 아미노산에서 수행되나, PSD-95와 NMDAR 2B 사이의 상호작용을 억제하는 펩티드의 능력이 50% 초과까지 감소되지 않는 한 내부 아미노산에서 또한 수행될 수 있다. 바람직하게는, 지질화는 4개의 가장 C-말단의 아미노산 중 하나가 아닌 아미노산에 대해 수행된다. 지질은 물에서보다 에테르에서 더욱 가용성인 유기 분자이며, 이는 지방산, 글리세라이드 및 스테롤을 포함한다. 지질화의 적합한 형태는 미리스토일화, 팔미토일화 또는 바람직하게는 10-20개의 탄소의 사슬 길이를 갖는 다른 지방산, 예를 들어, 라우르산 및 스테아르산의 부착, 뿐만 아니라 제라닐화, 제라닐제라닐화(geranylgeranylation), 및 이소프레닐화를 포함한다. 자연 단백질의 번역후 변형을 발생시키는 타입의 지질화가 바람직하다. 펩티드의 N-말단 아미노산의 알파-아미노기에 대한 아미드 결합의 형성을 통해 지방산을 갖는 지질화가 또한 바람직하다. 지질화는 미리 지질화된 아미노산을 포함하는 펩티드 합성에 의해 수행될 수 있거나, 시험관내에서 효소적으로 수행될 수 있거나, 재조합 발현에 의해 수행될 수 있거나, 펩티드의 화학적 가공 또는 화학적 유도체화에 의해 수행될 수 있다. 미리스토일화 및 다른 지질 변형에 의해 변형된 아미노산이 시판된다.

[0070] 지질화는 바람직하게는 표준 tat 펩티드가 높은 투여량(예를 들어, 3 mg/kg 또는 그 초과)으로 투여되는 경우에 발견되는 바와 같은 혈압의 일시적 감소를 야기시키지 않거나, 적어도 표준 tat 펩티드에 연결된 동일한 펩티드보다 적은 감소를 야기시키면서, 세포막 및/또는 혈액뇌장벽을 가로지르는 연결된 펩티드(예를 들어, KLSSIESDV(SEQ ID NO:5) 또는 KLSSIEDV(SEQ ID NO:43))의 통과를 촉진시킨다.

[0071] 임의로 tat 펩티드에 융합된 약리학적 펩티드는 고상 합성 또는 재조합 방법에 의해 합성될 수 있다. 과학 및 특허 문헌, 예를 들어, 문헌[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]에 기재된 다양한 절차 및 방법을 이용하여 펩티도미메틱이 합성될 수 있다.

[0072] III. 질병

[0073] 동결건조된 제형은 다양한 질병, 특히 신경계 질병, 및 특히 부분적으로 흥분독성(excitotoxicity)에 의해 매개되는 질병을 치료하는데 유용하다. 상기 질병 및 질환은 뇌졸중, 간질, 저산소증, 거미막밑 출혈, 뇌졸중과 관련되지 않은 CNS에 대한 외상성 손상, 예를 들어, 외상성 뇌손상 및 척수 손상, 다른 대뇌 허혈, 알츠하이머병 및 파킨슨병을 포함한다. 흥분독성과 관련된 것으로 공지되지 않은 본 발명의 작용제에 의해 치료가능한 다른 신경계 질병은 불안 및 동통을 포함한다.

[0074] 뇌졸중은 원인에 상관 없이 CNS 내의 손상된 혈류로부터 발생하는 질환이다. 잠재적 원인은 색전증, 출혈 및 혈전증을 포함한다. 일부 신경 세포는 손상된 혈류의 결과로서 즉시 사멸한다. 이들 세포는 글루타메이트를 포함하는 이들의 성분 분자를 방출하고, 이는 차례로 NMDA 수용체를 활성화시키고, 세포내 칼슘 수준, 및 세포내 효소 수준을 상승시켜, 추가의 신경 세포 사멸을 발생시킨다(흥분독성 캐스케이드). CNS 조직의 사멸은 경색증으로 언급된다. 경색 부피(즉, 뇌 내의 뇌졸중으로부터 발생하는 사멸한 신경 세포의 부피)는 뇌졸중으로부터 발생하는 병리학적 손상의 정도의 지표로 사용될 수 있다. 대증 결과는 경색의 부피 및 뇌 내에서의 경색의 위치 둘 모두에 좌우된다. 장애 지수, 예를 들어, 랭킨 뇌졸중 결과 척도(Rankin Stroke Outcome Scale)(Rankin, Scott Med J;2:200-15(1957)) 및 바텔 지수(Barthel Index)가 대증 손상의 척도로 사용될 수 있다. 랭킨 척도는 하기와 같이 피검체의 전체적인 상태를 직접 평가하는 것을 기초로 한다.

[0075] 0: 증상이 전혀 없음.

[0076] 1: 증상에도 불구하고 유의한 장애가 없음; 모든 일상적인 직무 및 활동을 수행할 수 있음.

[0077] 2: 약간의 장애; 모든 이전의 활동을 수행할 수 없으나, 도움 없이 자신의 업무를 감독할 수 있음.

[0078] 3: 약간의 도움을 필요로 하는 중간 장애, 그러나 도움 없이 보행할 수 있음.

[0079] 4: 중간 내지 중증의 장애; 도움 없이 보행할 수 없고, 도움 없이 자신의 신체적 용무를 수행할 수 없음.

[0080] 5: 중증 장애; 누워 있음, 실금, 및 항시적인 간호 및 주의를 필요로 함.

- [0081] 바텔 지수는 환자의 일상의 10개의 기본적인 활동을 수행하는 능력에 관한 일련의 질문을 기초로 하고, 0 내지 100의 스코어를 발생시키며, 낮은 스코어는 더욱 심한 장애를 나타낸다(Mahoney et al., Maryland State Medical Journal 14:56-61 (1965)).
- [0082] 대안적으로, 뇌졸중 중증도/결과는 월드 와이드 웹 [ninds.nih.gov/doctors/NIH Stroke ScaleJBooklet.pdf](http://ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_ScaleJBooklet.pdf)에서 이용가능한 NIH 뇌졸중 척도를 이용하여 측정될 수 있다.
- [0083] 상기 척도는 환자의 의식, 운동, 감각 및 언어 기능의 수준의 평가를 포함하는 11개 그룹의 기능을 수행하는 환자의 능력을 기초로 한다.
- [0084] 허혈성 뇌졸중은 더욱 특히 뇌로의 혈류의 봉쇄에 의해 야기되는 뇌졸중의 한 유형을 나타낸다. 상기 유형의 봉쇄에 대한 기초적 질환은 가장 일반적으로는 혈관벽 내층의 지방 침착의 발생이다. 이러한 질환은 죽상경화증으로 언급된다. 이들 지방 침착은 2개 유형의 폐색을 야기시킬 수 있다. 뇌혈전증은 혈관의 막힌 부분에서 발생하는 혈전(혈병)을 나타낸다. "뇌색전증"은 일반적으로 순환계, 일반적으로 심장 및 상부 흉부 및 목의 대동맥 내의 또 다른 위치에서 형성되는 혈병을 나타낸다. 이후, 혈병의 일부가 방출되고, 혈류로 진입하고, 통과하기에 너무 작은 혈관에 도달할 때까지 뇌의 혈관을 통해 이동한다. 색전증의 두번째의 중요한 원인은 동맥 세동으로 공지된 불규칙한 심박이다. 이는 혈병이 심장에서 형성되고, 이동하고, 뇌로 전해질 수 있는 질환을 발생시킨다. 허혈성 뇌졸중의 추가의 잠재적 원인은 출혈, 혈전증, 동맥 또는 정맥의 박리, 심장 정지, 출혈을 포함하는 임의의 원인의 쇼크, 및 의인성 원인, 예를 들어, 뇌 또는 심장 수술을 초래하는 뇌혈관 또는 혈관들에 대한 직접적인 외과적 손상이다. 허혈성 뇌졸중은 모든 뇌졸중 환자의 약 83 퍼센트에 해당한다.
- [0085] 일과성 허혈 발작(TIA)은 작은 또는 경계 뇌졸중이다. TIA에서, 허혈성 뇌졸중을 나타내는 질환이 존재하고, 통상적인 뇌졸중 경계 징후가 발생한다. 그러나, 폐색(혈병)이 단기간 동안 발생하고, 일반적인 메커니즘을 통해 자연히 해소되는 경향이 있다. 심장 수술을 겪는 환자는 일과성 뇌 허혈 발작의 위험이 특히 존재한다.
- [0086] 출혈성 뇌졸중은 뇌졸중 환자의 약 17 퍼센트에 해당한다. 이는 파열되고, 주위 뇌 조직을 압박한다. 출혈성 뇌졸중의 2개의 일반적 유형은 뇌내 출혈 및 거미막밑 출혈이다. 출혈성 뇌졸중은 약해진 혈관의 파열로부터 발생한다. 약해진 혈관으로부터의 파열의 잠재적 원인은 높은 혈압이 혈관의 파열을 야기시키는 고혈압성 출혈, 또는 뇌 동맥류, 동정맥 기형(AVM) 또는 해면 기형을 포함하는 파열된 뇌 혈관 기형과 같은 약해진 혈관의 또 다른 기초적 원인을 포함한다. 출혈성 뇌졸중은 또한 경색 내의 혈관을 약화시키는 허혈성 뇌졸중의 출혈성 전환, 또는 비정상적으로 약한 혈관을 함유하는 CNS에서의 원발성 또는 전이성 종양으로부터의 출혈로부터 발생할 수 있다. 출혈성 뇌졸중은 또한 의인성 원인, 예를 들어, 뇌혈관에 대한 직접적인 외과적 손상으로부터 발생할 수 있다. 동맥류는 혈관의 약해진 영역의 풍선확장이다. 치료되지 않고 방치되는 경우, 동맥류는 파열되고, 뇌로 출혈될 때까지 지속적으로 약해질 수 있다. 동정맥 기형(AVM)은 비정상적으로 형성된 혈관의 집단이다. 해면 기형은 약해진 정맥 구조로부터 출혈을 야기시킬 수 있는 정맥 이상이다. 상기 혈관 중 어느 하나가 파열되고, 또한 뇌로의 출혈을 야기시킬 수 있다. 출혈성 뇌졸중은 또한 신체적 외상으로부터 발생할 수 있다. 뇌의 한 부분에서의 출혈성 뇌졸중은 출혈성 뇌졸중에서 손실된 혈액의 부족을 통해 또 다른 부분에서 허혈성 뇌졸중을 초래할 수 있다.
- [0087] 치료에 여지가 있는 한 환자는 뇌로 혈액을 공급하는 혈관을 포함하거나 포함할 수 있는 외과적 시술, 또는 달리 뇌 또는 CNS에 대한 외과적 시술을 받는 환자이다. 일부 예는 심폐우회술, 경동맥 스텐트, 뇌 또는 대동맥 활의 관상동맥의 진단 혈관조영술, 혈관 외과적 시술 및 신경외과 시술을 받는 환자이다. 상기 환자의 추가 예는 상기 섹션 IV에 논의되어 있다. 뇌동맥류를 갖는 환자가 특히 적합하다. 상기 환자는 혈액을 차단하기 위해 동맥류를 잘라내거나, 작은 코일로 동맥류를 차단하거나, 동맥류가 나타나는 혈관으로 스텐트를 도입시키거나, 미세도관을 삽입하는 혈관내 수술을 포함하는 다양한 외과적 시술에 의해 치료될 수 있다. 혈관내 시술은 동맥류를 잘라내는 것보다 덜 침습적이고, 더 나은 환자 결과와 관련되나, 결과는 또한 작은 경색증의 높은 발병률을 포함한다. 상기 환자는 NMDAR 2B와의 PSD95 상호작용의 억제제, 특히 펩티드 YGRKKRRQRRKLSSIESDV(SEQ ID NO:6, Tat-NR2B9c로도 공지됨)를 포함하는 상기 기재된 작용제로 치료될 수 있다. 수술을 수행하는 것에 대한 투여 시기는 임상 시험에 대해 상기 기재된 바와 같을 수 있다.
- [0088] 치료에 여지가 있는 환자의 또 다른 부류는 동맥류와 함께 또는 동맥류 없이 거미막밑 출혈을 갖는 환자이다(US 61/570,264 참조).
- [0089] IV. 효과적인 투여 요법
- [0090] 제구성 후, 동결건조된 제형은 활성제(예를 들어, NR2B9c)가 치료되는 질병을 갖는 환자에서 질병의 적어도 하

나의 징후 또는 증상의 추가 악화를 치료하거나, 감소시키거나, 억제하기에 효과적인 투여량, 투여 빈도 및 투여 경로로 투여되도록 투여된다. 치료적 유효량은 본 발명의 작용제로 처리되지 않은 질병 또는 질환으로 고통받는 환자(또는 동물 모델)의 대조군 집단에서의 손상에 비해 본 발명의 작용제로 처리된 질병으로 고통받는 환자(또는 동물 모델)의 집단에서 치료되는 질병 또는 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 추가 악화를 유의하게 치료하거나, 감소시키거나, 억제하기에 충분한 활성제의 양을 의미한다. 상기 양은 또한 개별 치료된 환자가 본 발명의 방법에 의해 치료되지 않은 동등한 환자의 대조군 집단에서의 평균 결과보다 더 유리한 결과를 달성하는 경우에 치료적으로 효과적인 것으로 간주된다. 치료적으로 효과적인 요법은 의도된 목적을 달성하는데 필요한 투여 빈도 및 경로의 치료적으로 효과적인 용량의 투여를 포함한다.

[0091] 뇌졸중 또는 다른 허혈 질환으로 고통받는 환자에 대해, 활성제는 뇌졸중 또는 다른 허혈 질환의 손상 효과를 감소시키는데 효과적인 투여량, 투여 빈도 및 투여 경로를 포함하는 요법으로 투여된다. 치료를 필요로 하는 질환이 뇌졸중인 경우, 결과는 경색 부피 또는 장애 지수에 의해 결정될 수 있고, 개별 치료된 환자가 랜킨 척도에서 2 또는 그 미만 및 바텔 척도에서 75 또는 그 초과를 나타내거나, 치료된 환자의 집단이 동등한 미처리된 집단보다 장애 척도에서 유의하게 개선된(즉, 보다 덜한 장애) 분포의 스코어를 나타내거나 경우 투여량은 치료적으로 효과적인 것으로 간주된다. 문헌[Lees et al, N Engl J Med 2006;354:588-600]을 참조하라. 뇌졸중의 치료를 위해 단일 용량의 작용제가 일반적으로 충분하다.

[0092] 본 발명은 또한 상기 장애의 위험이 있는 피검체에서 장애의 예방을 위한 방법 및 제형을 제공한다. 일반적으로, 상기 피검체는 대조군 집단에 비해 장애(예를 들어, 질환, 병, 장애 또는 질병)이 발생할 증가된 가능성을 갖는다. 대조 집단은 장애가 진단된 적이 없거나, 장애의 가족력을 갖지 않는 일반 집단(예를 들어, 연령, 성별, 인종 및/또는 민족에 의해 매치됨)으로부터 무작위로 선택된 하나 이상의 개체를 포함할 수 있다. 피검체는 상기 장애와 관련된 "위험 인자"가 상기 피검체와 관련된 것으로 밝혀지는 경우 장애에 대해 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 위험 인자는, 예를 들어, 피검체 집단에 대한 통계적 또는 역학적 연구를 통해 제공된 장애와 관련된 임의의 활성, 소질, 사건 또는 특성을 포함할 수 있다. 따라서, 피검체는 기초적 위험 인자를 확인하는 연구가 특별히 상기 피검체를 포함하지 않은 경우에도 장애의 위험이 있는 것으로 분류될 수 있다. 예를 들어, 심장 수술을 받은 피검체는 일과성 뇌 허혈 발작의 위험이 있는데, 이는 심장 수술을 받지 않은 피검체의 집단에 비해 심장 수술을 받은 피검체의 집단에서 일과성 뇌 허혈 발작의 빈도가 증가되기 때문이다.

[0093] 뇌졸중에 대한 다른 일반적인 위험 인자는 연령, 가족력, 성별, 뇌졸중의 이전 발생, 일과성 허혈 발작 또는 심장 마비, 고혈압, 흡연, 당뇨병, 경동맥 또는 다른 혈관 질환, 심방세동, 다른 심장 질환, 예를 들어, 심장병, 심장기능상실, 확장심장근육병, 심장 판막 질환 및/또는 선천성 심장 결함; 높은 혈중 콜레스테롤, 및 포화 지방, 트랜스 지방 또는 콜레스테롤이 높은 식이를 포함한다.

[0094] 예방에서, 재구성 후의 동결건조된 제형은 질병의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 발생을 예방하거나, 지연시키거나, 억제하기에 충분한 양, 빈도 및 경로로 질병의 위험이 있으나 아직 질병을 갖지 않는 환자에 투여된다. 예방적 유효량은 본 발명의 키메라 작용제로 처리되지 않은 질병의 위험이 있는 환자(또는 동물 모델)의 대조군 집단에 비해 작용제로 처리된 질병의 위험이 있는 환자(또는 동물 모델)의 집단에서의 질병의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 유의하게 예방하거나, 억제하거나, 지연시키기에 충분한 작용제의 양을 의미한다. 상기 양은 또한 개별적으로 치료된 환자가 본 발명의 방법에 의해 치료되지 않은 동등한 환자의 대조군 집단에서의 평균 결과보다 더 유리한 결과를 달성하는 경우에 예방적으로 효과적인 것으로 간주된다. 예방적으로 효과적인 요법은 의도된 목적을 달성하는데 필요한 투여 빈도 및 경로에서의 예방적 유효량의 투여를 포함한다. 긴급한 뇌졸중의 위험이 있는 환자(예를 들어, 심장 수술을 받는 환자)에서의 뇌졸중의 예방을 위해, 단일 용량의 작용제가 일반적으로 충분하다.

[0095] 작용제에 따라, 투여는 비경구, 정맥내, 비, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 수막강내, 복막내, 국소, 비내 또는 근내 투여일 수 있다. 펩티드 작용제에 대해 정맥내 투여가 바람직하다.

[0096] 인간으로의 투여를 위해, 활성제(예를 들어, Tat-NR2B9c)의 바람직한 용량은 2-3mg/kg, 더욱 바람직하게는 2.6 mg/kg이다. 표시된 투여량은 상기 투여량이 통상적인 병원 환경에서 측정될 수 있는 정확도에서 고유한 오차 한계(margin of error)를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 양은 단일 용량 투여를 위한 양, 즉, 질병 에피소드 당 하나의 용량이다.

[0097] 활성제, 예를 들어, Tat-NR2B9c는 바람직하게는 혈관으로의 주입, 더욱 바람직하게는 정맥내 주입에 의해 전달된다. 주입 시간은 부작용(예를 들어, 비만 세포 탈과립 및 히스타민 방출로 인한) 및 효능 둘 모두에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로, 제공된 투여량 수준에 대해, 더 짧은 주입 시간은 히스타민 방출을 발생시킬 가능

성이 더 높다. 그러나, 더 짧은 주입 시간은 또한 개선된 효능을 발생시킬 수 있다. 본 발명의 실시는 메커니즘의 이해에 좌우되지 않지만, 환자에서의 병리의 발생에 비해 지연이 유의하고, 키메라 작용제의 혈장 반감기에 비해 지연이 유의하여, 그 결과로 키메라 작용제가 최적의 치료 수준에 도달하지 않으므로 이후의 결과가 설명될 수 있다. 키메라 작용제 Tat-NR2B9c에 대해, 상기 고려사항 사이의 균형을 제공하는 바람직한 주입 시간은 5-15분, 더욱 바람직하게는 10분이다. 표시된 시간은 $\pm 10\%$ 의 오차점(marking of error)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 주입 시간은 다른 방식으로 진행되어 완료되는 최초 확산으로부터의 임의의 잔여 비밀을 세척하기 위한 세척 확산을 위한 임의의 여분의 시간을 포함하지 않는다. Tat-NR2B9c에 대한 주입 시간은 또한 다른 활성제에 대한 지침으로 작용할 수 있다.

[0098] 본 발명은 이해의 명료함의 목적으로 상세하게 기재되었으나, 첨부된 청구항의 범위 내에서 특정 변형이 실시될 수 있다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 등록 번호, 및 특허 문헌은, 이들 각각이 개별적으로 표시되는 것과 동일한 정도로 모든 목적상 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 상기 범위에서, 하나 초과의 서열이 다양한 시점에서 등록 번호와 관련되는 경우, 이는 본 출원의 유효 출원일로부터의 등록 번호와 관련된 서열을 의미한다. 유효 출원일은 당해 등록 번호를 개시하는 가장 이른 우선권 출원일의 날짜이다. 문맥으로부터 달리 명백하지 않은 한, 본 발명의 임의의 구성요소, 구체예, 단계, 특징 또는 양태는 임의의 다른 구성요소, 구체예, 단계, 특징 또는 양태와 조합하여 수행될 수 있다.

[0099] 실시예

[0100] **실시예 1: 표준 완충제 및 부형제가 생체 내 NA-1의 효능을 저해하지 않음을 입증**

[0101] 5개의 액체 독성학 제형을 20 mg/mL 농도의 NA-1에서 표적으로 하여 컴파운드하였다. 표 1은 비히클 조성, 로트 번호, 및 역가, 순도 및 컴파운드 시점에서의 pH를 포함한다. 약 5 mL의 각각의 제형을 시험을 위해 바이알에 넣었다. 바이알을 이동 또는 액체 저장 조건을 시뮬레이션하기 위해 -20에서 동결시켰다.

[0102] 표 1: 생체 내 효능 시험을 위한 NA-1 제형의 조성물

제형 #	비히클 조성	PTek Lot #	역가 ¹ {mg/mL}	순도 ² { NA-1 피크의 % 면적 }	pH ³
1	50 mM 소듐 포스페이트 76.9 mM NaCl, pH 7.0	1205-1-17-1	20.5	97.87	6.7
2	50 mM 소듐 포스페이트 154 mM Mannitol, pH 7.0	1205-1-17-2	20.0	96.34 ²	6.5
3	50 mM 히스티딘 154 mM 만니톨, pH 6.5	1205-1-17-3	19.9	98.38	6.4
4	50 mM 히스티딘 154 mM 트레할로스, pH 6.5	1205-1-17-4	20.8	99.16	6.4
5	50 mM 히스티딘 5% 덱스트란 40, pH 6.5	1205-1-18-1	19.4	98.81	6.4

[0103]

[0104] ¹역가 및 순도를 TFA 방법을 사용하는 RP-HPLC 분석에 의해 평가하였다.

[0105] ²제형 #2의 순도가 다른 제형들보다 현저히 더 낮다.

[0106] ³인산염 완충 제형의 pH는 초기 완충액 pH인 7.0으로부터 현격히 벗어났다.

[0107] 인산염 완충 제형은 제형과 시험 간에 히스티딘 완충액 못지 않게 pH를 유지하지 못하였으며, 이는 히스티딘이 제형에 대해 더 우수한 완충액일 수 있음을 시사한다.

[0108] 제형 1-5를 래트 뇌졸중의 3-연질막 혈관 폐색(PIAL Vessel Occlusion)(3PVO) 모델로 시험하였다. 뇌졸중 처리된 래트에 제형 중 하나를 대뇌 정맥에 정맥 내 투여하여 주여지게 한 후, 동물을 뇌졸중 후 24시간 후에 희생시켰다. 뇌를 수거하고, 고정시키고, 트리페닐테트라졸륨 클로라이드(TTC)로 염색시켜서 뇌의 허혈 부분을 시각화시켰다. 시험된 모든 제형이 염수 대조군에 비해 동물에게서 상당한 신경보호를 제공할 수 있었다(도 1)

[0109] 방법

[0110] *허혈의 3개의 연질막 혈관 폐색 모델*

[0111] 래트에 대해 실험을 수행하였다. 영구성을 위해, 3개의 연질막 혈관 폐색((3PVO)를 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다[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]. 요컨대, 250 g 내지 350 g의 래트를 필요에 따라 최초 용량의 1/3이 보충된 케타민(100 mg/kg), 아세프로마진(2 mg/kg), 및 크실

라진(5 mg/kg)의 0.5 ml/kg 근내 주사로 마취시켰다. 항문 온도 프로브를 삽입하고, 동물을 37℃로 유지되는 가열 패드에 배치하였다. 두개골을 중간선 절개를 통해 노출시키고, 조직을 벗겨내었다. 절개 현미경 및 공압 치과 드릴을 이용하여, 두개골 전체에 걸쳐 직사각형으로 천공시키고, 경질막을 온전하게 유지시키면서 두개골 조각을 들어올림으로써 우측 몸감각피질(브레그마(bregma)에 대해 2 mm 미부 및 5 mm 측면) 전체에 걸쳐 6-mm 내지 8-mm의 두개 윈도우를 만들었다. 3개의 연결막 세동맥 중뇌 동맥 분지가 경질막을 통해 선택되고 전기적으로 조각된 배럴 피질(barrel cortex) 주위로 조각되었다. 조각 후, 두피를 봉합하였다. 각각의 래트를 가열 램프 하의 그것의 개별 케이지로 돌려 보내어 래트가 완전히 회복될 때까지 체온을 유지시켰다. 음식과 물을 제공하였다. 3PVO 허혈 1시간 후, 래트 체중에 기초하여 ~0.45 mL 염수 중 3 nmol/g로 NA1 제형을 래트에 주입하였다. 투여량을 5분에 걸쳐 투여하였다.

[0112] 수술 24시간 후, 뇌를 신속하게 수거하였다. 관상 절편(2 mm)을 뇌를 통해 취하고, 2% 트리페닐테트라졸륨 클로라이드(TTC) (Sigma-Aldrich St. Louis MO) 중에서 15분 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이미지를 스캔하고(CanoScan 4200F Canon), 정량화하였다.

[0113] 실시예 2: 상이한 완충액 및 상이한 pH 값에서의 NA-1 안정성의 측정

[0114] 완충액 스크리닝

[0115] 10개의 완충액을 부형제 스크리닝을 위해 1 mg/mL NA-1로 컴파운딩하였다. 샘플을 25℃/60% 상대 습도 (RH) 및 40℃/75% RH에서 저장하였다. 샘플을, RP-HPLC (TFA 및 MSA 방법)에 의해 순도에 대해 t=0 및 t=1 주체에 안정성(순도)에 대한 시험을 하였으며, 결과가 표 2 및 3에 기재된다.

[0116] 결과는, pH 6.0 내지 pH 6.5로 완충된 액체 매질 중에서 NA-1에 대해 개선된 안정성을 나타낸다. 이 범위 밖에서 어느 방향으로든 분해가 증가하는 것으로 나타낸다. MSA 방법으로 생성된 데이터는 pH 및 완충 중 둘 모두에 의존적인, 분명한 분해 패턴을 나타냈고, 미래 제형 개발로의 소중한 통찰력을 제시하였다. MSA 방법을 사용하는 % HPLC 면적에 의한 주피크 순도에 대한 결과는 표 2에 제시되는 반면, TFA 방법을 사용하는 % HPLC 면적에 의한 주피크 순도에 대한 결과는 표 3에 제시된다.

[0117] 표 2. MSA 방법에 의한 주피크의 % 면적, NA-1

샘플	t=0	t=1 주 25℃	t=1 주 40℃
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

[0119] 표 3. TFA 방법에 의한 주피크의 % 면적, NA-1

샘플	t=0	t=1 주 25℃	t=1 주 40℃
His, pH 6.0	99.5	98.8	99.2
His, 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	98.5	99.1

[0121] 결과는, NA-1 용액 안정성이 pH 6.0 내지 6.5 완충 매질에서 최상으로 유지되며, 비히클은 IV에 의한 투여에 대해 여전히 충분히 내성이 있음을 나타낸다. 일반적으로, 히스티딘 및 시트레이트 완충 시스템은 1주일 동안 25℃ 또는 40℃의 가속화된 안정성 조건에서 유지되는 경우에도 NA-1을 무손상 형태로 유지할 수 있었다.

[0122] 완충 종을 선택할 때 고려하는 인자는 여러 가지 존재하는데, 각각의 매질 중에 발생하는 특이적 분해 패턴, 및

확인된 관련 물질 또는 독성 문제에 대한 어떠한 데이터는 특정된 관련 물질이 회피되어야 하는 경우 결정 과정을 간소화시킬 수 있다. 시험되는 기간에 대해, pH 6 내지 6.5의 히스티딘 및 시트레이트 완충액은 적은 분해 생성물을 나타냈다. 본 연구에 사용된 히스티딘 완충액은 그 자체로 첨가되는 NA-1의 부재 시에 히스티딘 완충액 중에 존재하는 오염물을 함유하였다. 그러므로, 이러한 오염물이 없는 히스티딘 공급처의 확인은 분석을 보다 단순화할 것이다. 표 4는 NA-1 안정성의 관점에서 완충액 중을 요약한 것이다.

표 4. 완충 중 선택

중	pH	Pro	Con
히스티딘	6.0	탁월한 안정성, 동결건조시 주목할만한 용도, 충분히 완충 범위 내에 있음.	크로마토그래피 간섭이 있으나, 크로마토그래피는 가능하게는 새로운 히스티딘 판매자에 의해 개선될 수 있음
시트레이트	6.0	개선된 안정성, 동결건조시 주목할만한 용도, 충분히 완충 범위 내에 있음.	
히스티딘	6.5	개선된 안정성, 동결건조시 주목할만한 용도, 충분히 완충 범위 내에 있음.	크로마토그래피 간섭이 있으나, 크로마토그래피는 가능하게는 새로운 히스티딘 판매자에 의해 개선될 수 있음
시트레이트	6.5	탁월한 안정성, 동결건조시 주목할만한 용도, 충분히 완충 범위 내에 있음.	6.5의 목표 pH가 시트레이트 중에 대한 이상적인 완충 범위의 경계에 대한 것일 수 있음
인산염	6.5	개선된 안정성, NA-1 제형에서의 인산염 중의 주목할만한 용도	인산염 중은 동결건조 제형에 대해 통상적으로 회피되었음

실시예 3: 히스티딘 및 시트레이트 완충액 중에서의, 그리고 달라지는 염화나트륨의 양에 의한 상이한 pH 값에서의 NA-1 안정성 측정

본 연구의 목표는 액체 제형에서의 NA-1 안정성 및 pH에 대한 염화나트륨(NaCl)의 효과를 입증하기 위한 것이다. 1 mg/mL NA-1를 지닌 완충액 제형이 표 5에 열거되어 있으며, pH에 대한 결과가 표 6에 제시된다. 데이터는 연구 기간 동안 상당히 일관된 결과를 보여준다. 그러나, NaCl의 첨가로 시트레이트 중에서 현저한 변화가 발생하였는데, 이때 완충 능력이 영향을 받았고, pH가 ~0.2 단위 만큼 저하되었다. 6.0 및 6.5의 선택된 pH는 시트레이트의 이상적 완충 범위(pH 2.5-5.6) 밖 경계에 대한 것이므로, 이는 컴파운딩 과정 동안 여러 첨가제 문제를 야기할 수 있고, 제형 견고성(formulation robustness)을 평가하는 경우에 고려되어야 한다.

표 5: pH에 대한 염의 효과를 조사하기 위한 완충액 제형

비행클 #	완충액	목표 pH	NaCl
1	50 mM 시트레이트	6.0	NA
2	50 mM 시트레이트	6.0	200 mM
3	50 mM 시트레이트	6.5	NA
4	50 mM 시트레이트	6.5	200 mM
5	50 mM 히스티딘	6.0	NA
6	50 mM 히스티딘	6.0	200 mM
7	50 mM 히스티딘	6.5	NA
8	50 mM 히스티딘	6.5	200 mM

[0129] 표 6: 동결 및 가속화 온도 조건 하에서의 NA-1 제형의 pH 안정성

비히클 #	완충액	목표 pH	측정된 pH	측정된 pH	측정된 pH	
			t=0 비히클	t=8 비히클 + NA-1	t ≈ 1 주 비히클 + NA-1	t ≈ 1 주 비히클 + 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

[0130]

[0131] 결과는 히스티딘 및 시트레이트 완충된 NA-1 용액에의 200mM NaCl의 첨가가 1 주일 동결 저장하든지 또는 40°C의 상승된 온도에서 저장하든지 간에 용액의 pH에 유의하게 영향을 주지 않음을 나타내고 있다.

[0132] 다음으로, 본 발명자들은 1 주일 동안 동결 저장하는 때와 상승된 온도에서 저장하는 때의 이들 제형 내의 NA-1의 안정성을 시험하였다. 표 7은 MSA 구매와 함께 RP-HPLC 방법을 이용한 시험의 결과를 나타내고 있다. 데이터는 또한 도 2a 및 도 2b에 제시되어 있다. 도 2a는 좌측으로부터 우측으로(낮은 안정성으로부터 높은 안정성으로) 분류된 제형의 가속된 안정성을 나타내고 있다. 도 2b는 완충제에 의한 상대적인 가속된 안정성을 나타내고 있다.

[0133] 표 7. 순도(MSA 방법), NA-1

비히클	pH 6.0		pH 6.5	
	-20°C	40°C	-20°C	40°C
His (히스티딘)	98.1	92.8	98.5	96.9
His + NaCl	98.4	95.0	98.4	97.7
Citr (시트레이트)	97.5	96.0	99.0	97.5
Citr + NaCl	98.4	96.7	98.7	98.4

[0134]

[0135] 이들 결과는 NA-1 용액 안정성이 pH 6.5에서 최상으로 유지되며, NaCl의 첨가가 안정성에서의 약간의 개선을 제공할 수 있음을 나타내고 있다(도 2a 및 도 2b). 히스티딘 완충액의 개선된 완충 용량 및 비견되는 안정성으로 인해서, 특히 0.28의 상대적 체류 시간(relative retention time: RRT)의 오염물질 이동이 배제되는 때에(NA-1 피크 면적에 대한 더 낮은 안정성 값을 생성시키는 상기 표에서 포함된 오염물질 면적), pH 6.5에서의 히스티딘 완충 종이 동결 건조 연구에 적용하기에 최상의 제형이다.

[0136] pH 6.5의 비히클이 IV에 의한 투여에 좋게 관용된다.

[0137] 실시예 4: 안정한 동결 건조 케이크를 형성시키기 위한 NA-1에 대한 증량제(bulking agent)의 선택

[0138] 동결 건조시에 좋은 케이크를 생성시키며 안정성을 개선시킬 수 있는 증량제를 확인하기 위해서, 본 발명자들은, 표 8에 개괄된 바와 같이, 50 mM 히스티딘 완충제 중의 20 mg/mL NA-1 용액, 증량제 및 NaCl을 여러 가지로 컴파운딩(compounding)하였다. 동결 건조 과정 동안에 NA-1 제형이 노출될 수 있는 시간 및 취급 온도를 시뮬레이션(simulation)하기 위해서, 이들 샘플을 -20°C(대조군) 및 40°C/75%RH(시험군)에서 저장하고, 1 주일 저장 후에 HPLC(MSA 방법)에 의한 순도 및 pH에 대해 분석하였다. pH 안정성에 대한 결과가 표 9에 개괄되어 있으며, 상이한 액체 제형 중의 NA-1의 안정성에 대한 결과가 표 10 및 도 3에 제시되어 있다.

표 8. 증량제 샘플 매트릭스

비히클 #	완충제	증량제	NaCl
1	50 mM 히스티딘, pH 6.5	120 mM 만니톨	
2	50 mM 히스티딘, pH 6.5	120 mM 만니톨	75 mM
3	50 mM 히스티딘, pH 6.5	120 mM 트레할로스	
4	50 mM 히스티딘, pH 6.5	120 mM 트레할로스	75 mM
5	50 mM 히스티딘, pH 6.5	5% 덱스트란 -40	
6	50 mM 히스티딘, pH 6.5	5% 덱스트란 -40	75 mM

표 9. pH, 증량제 샘플

비히클	목표 pH	pH, -20°C	pH, 40°C
만니톨	6.5	6.5	6.5
만니톨 + NaCl	6.5	6.5	6.5
트레할로스	6.5	6.5	6.4
트레할로스 + NaCl	6.5	6.5	6.4
덱스트란 -40	6.5	6.5	6.3
덱스트란 -40 + NaCl	6.5	6.5	6.4

표 10. NA-1 피크의 면적 %에 의한 순도, MSA 방법

비히클 #	비히클	NA-1 피크의 면적 %	
		-20°C	40°C
1	만니톨	99.2	98.5
2	만니톨 + NaCl	99.4	98.6
3	트레할로스	99.1	98.5
4	트레할로스 + NaCl	99.3	98.3
5	덱스트란 -40	99.2	97.6
6	덱스트란 -40 + NaCl	99.0	97.7

NA-1 안정성에 대한 증량제 액체 제형의 결과

만니톨, 트레할로스 및 덱스트란-40은 6.5의 pH를 잘 유지하며(표 9) 고온에서 저장되는 때에 액체 제형으로서 1 주일에 걸쳐서 대략 1%의 순도의 증가((표 10)가 있다. NA-1 동결 건조 충전 용액의 화학적 안정성 면에서, 만니톨 및 트레할로스가 바람직한 증량제인데, 그 이유는 이들이 덱스트란-40 용액보다 NA-1에 더 우수한 안정성을 부여하기 때문이다(도 3).

실시예 5: 동결 건조 사이클의 설계를 용이하게 하기 위한 증량제의 열적 분석

NA-1 동결 건조된 약물 제품을 위한 동결 건조 사이클 개발의 일부로서, 증량제 샘플 매트릭스로부터 제안된 충전 용액(표 8)을 제형 중의 유리 전이 온도(Tg)를 포함한 열적 특성에 대해서 시차주사열량계(Differential Scanning Calorimetry: DSC)에 의해서 평가하였다. 결과가 표 11에 기록되어 있고, DSC 트레이스(DSC trace)가 도 4a 내지 도 6b에 포함되어 있다.

표 11. NA-1 동결 건조 충전 용액의 유리 전이 온도

비히클	T _g
50 mM 히스티딘, pH 6.5, 120 mM 만니톨	-37.25°C
50 mM 히스티딘, pH 6.5, 120 mM 만니톨, 75 mM NaCl	-42.51°C
50 mM 히스티딘, pH 6.5, 120 mM 트레할로스	-28.25°C
50 mM 히스티딘, pH 6.5, 120 mM 트레할로스, 75 mM NaCl	-35.74°C
50 mM 히스티딘, pH 6.5, 5% 덱스트란 -40	-17.09°C
50 mM 히스티딘, pH 6.5, 5% 덱스트란 -40, 75 mM NaCl	-22.49°C

20 mg/mL의 NA-1 농도에서, 시험된 NA-1 제형은 저온에서 개시되면서 넓은 용융 범위가 특징인 열적 특성을 나

타냈다. 이러한 넓은 용융 범위는 만니톨 제형에서 전형적으로 나타나는 결정화 발생을 억제하였고, 생성물이 유리 전이 온도를 결코 초과하지 않는 강력한 동결 건조 사이클이 수행되어야 함을 나타낼 수 있다. 이러한 경우에, NA-1 약물 제품 충전 용액의 관찰된 유리 전이 온도를 기초로 하여, 증량제로서 만니톨의 사용은 확장 가능한 사이클에 대한 가능성의 전형적인 한계 온도인 -40°C 미만의 주요 건조 온도를 필요로 할 수 있다. 열적 특성 면에서, 트레할로스 및 텍스트란-40이 증량제로서의 사용에 우수하다. 그러나, 트레할로스를 함유하는 액체 제형 중의 NA-1의 안정성이 텍스트란을 함유하는 것들에 비해서 우수하였음을 고려하면, 트레할로스가 시험된 것들 중 바람직한 증량제일 수 있다.

[0152] 건조를 위한 더 긴 동결 건조 사이클을 유사하게 필요로 할 수 있는 비교적 낮은 Tg 온도로 인해서, 본 발명자들은 더 넓은 범위의 표준 증량제를 조사하였고, 용기 폐쇄 시스템(container closure system) 내로의 충전 용적을 감소시켜서 감소된 용적의 동결 건조되는 액체가 존재하게 하는 것을 조사하였다. 충전 용적을 감소시키고 270 mg/바이알을 유지시키기 위한 노력으로, pH 6.5의 히스티딘 중의 NA-1 및 pH 6.5의 히스티딘 + 트레할로스 중의 NA-1의 안정성 연구를 수행하였다. 샘플은 35, 50, 75 및 100 mg/mL에서 시각적으로 분석되었다. 모든 용액이 t=0 및 t=24 시간에서 투명하였다. 이러한 데이터를 기초로 하여, 본 발명자들은 3 mL 미만의 충전 용적을 사용할 수 있으며, 이러한 3 mL는 90 mg/mL NA-1 제형을 사용하면 목표 바이알에 270 mg을 제공할 것이다. 광범위한 범위의 양이 바이알에 요구될 수 있지만, 270 mg은 100 kg 환자에 대해서 2.6 mg/kg 도즈(dose)를 제공할 수 있다. 환자 투여를 위한 목표 재구성 농도는 여전히 20 mg/mL임을 가정하면(그러나, 1 mg/mL 내지 100 mg/mL일 수 있다), 270 mg의 NA-1을 함유하는 20-mL 동결 건조 바이알이 13.5 mL의 재구성 용적으로 사용될 수 있다. 따라서, 바이알 내의 NA-1의 동결 건조를 위한 최적의 액체 용적은 2.5 mL 내지 10 mL일 수 있다.

[0153] 동결 건조 개발로 진행시키기 전에 광범위한 범위의 증량제가 시험되었으며, Tg가 표 12에 제시되어 있다. pH 6.5의 히스티딘 중의 100 mg/mL NA-1가 또한 DSC에 의해서 평가되었고 데이터는 표 12에 포함되어 있다.

[0154] 표 12. DSC 데이터, 제형

제형	증량제	비히클		DP 충전 용액
		T _g	결정화 온도	T _g
1	소르비톨	-41.03°C		
2	덱스트로스	-38.78°C		
3	수크로스	-31.09°C		
4	만니톨	-37.38°C	-22.91°C	-35.49°C
5	트레할로스	-29.93°C		-28.25°C
6	락토스	-27.93°C		
7	75:25 트레할로스:덱스트란-40	-25.07°C		-25.07°C
8	50:50 트레할로스:덱스트란-40	-22.60°C		-22.60°C
9	25:75 트레할로스:덱스트란-40	-18.55°C		-18.55°C
10	덱스트란-40			-17.09°C
11	히스티딘 중의 100 mg/mL NA-1, pH 6.5			-21.67°C

[0155]

[0156] 표 12에서의 DSC 데이터를 기초로 하면, 활성 약물 제품 및 위약 제품 둘 모두를 위한 여러 제형 옵션이 존재한다. 일반적으로, 제형 5 및 제형 11이 Tg와 관련하여 활성 제품에 가장 유망한 제형이다. 어떠한 증량제가 위약 제품에 사용하기에 적합할 수 있지만, 제형 4(만니톨)는, 어닐링된다면, 가장 짧은 사이클 길이를 지닐 것이고, 외관이 활성 제품과 매칭(matching)된다면 가장 바람직한 제형일 수 있다.

[0157] 본 발명자들이 최적의 활성 제형을 밝혀내고 있듯이, 용액 안정성, 동결 건조 사이클 강건성(lyophilization cycle robustness) 및 화학적 안정성을 고려하는 것이 중요하다. 표 12로부터의 제형 5(트레할로스)는 가속된 조건에서의 우수한 용액 안정성 및 동결 건조 화학적 안정성을 입증했지만(후속적으로 나타낸 데이터), 13.5 mL의 충전 상태에서 더 긴 동결 건조 사이클을 필요로 한다. 이러한 더 긴 사이클 길이는 더 짧은 사이클이 바람직한 미래의 상업적 제조에 이상적이지 않을 수 있다. 표 12로부터의 제형 11(증량제 없음, 100 mg/mL NA-1에서)은 제형 5보다 더 높은 유리 전이 온도를 지녀서 더 따뜻하고 더 짧은 사이클을 허용한다. 또한, 감소된 충전 용적은, 각각의 바이알로부터 승화시킬 얼음이 더 적을 것이므로, 실행 시간을 유의하게 단축시킬 것이다.

[0158] 실시예 6: 증량제, 규모 및 동결 건조 조건을 달리함에 따른 NA-1의 안정성

[0159] 증량제 가속된 안정성

[0160] NA-1 약물 제품의 작은 배치(batch)를 동결 건조시켜 25℃, 40℃ 및 60℃에서의 1 주일 후 고체 상태 안정성을 평가하였다. NA-1을 세 가지의 상이한 비히클 중에 20 mg/mL의 활성 농도로 컴파운딩하였다. 샘플을 외관, 재구성, pH, 양, 및 t=0 및 t=1 주일에서의 HPLC(MSA 방법)에 의한 순도를 평가하였다. 물 함량은 t=0에서만 평가되었다.

[0161] 모든 NA-1 약물 제품은 백색의 동결 건조된 케이크로 보였으며, t=0 및 t=1 주일에 10초 이내에 재구성되었다.

[0162] 약물 제품 비히클이 표 13에 기재되어 있으며, 각각의 유리 전이 온도 및 물 함량 결과와 함께 열거되어 있다. pH, NA-1 양 및 MA-1 순도 결과가 표 14 내지 표 16에 기재되어 있다.

[0163] 표 13. 증량제 샘플 매트릭스: Tg, 및 % 물 함량

비히클#	비히클	T _g	t=0 % 물 함량
1	50 mM His, pH 6.5+ 120 mM 트레할로스	-29.93°C -28.25°C w/NA-1	0.29%
2	50 mM His, pH 6.5+ 5% 텍스트란-40	-22.60°C	0.05%
3	50 mM His, pH 6.5 + 1:1 120 mM 트레할로스: 5% 텍스트란-40	-17.09°C w/NA-1	0.10%

[0164]

[0165] 표 14. pH, 증량제 Lyo 소규모 #1

증량제	이론적 pH	측정된 pH			
		t=0	t=1wk 25°C	t=1wk 40°C	t=1wk 60°C
트레할로스	6.5	6.4	6.4	6.4	6.4
텍스트란-40	6.5	6.4	6.3	6.3	6.3
1:1 트레할로스:텍스트란-40	6.5	6.4	6.3	6.4	6.4

[0166]

[0167] 표 15. 양 (mg/바이알), 증량제 Lyo 소규모 #1

증량제	t=0	t=1 주 25°C	t=1 주 40°C	t=1 주 60°C
트레할로스	20.6	20.3	20.7	20.7
텍스트란-40	19.4	19.8	19.5	19.1
1:1 트레할로스:텍스트란-40	20.3	20.8	20.2	20.2

[0168]

[0169] 표 16. 순도 (HPLC에 의한 % 면적), 증량제 Lyo 소규모 #1

증량제	t=0	t=1 주 25°C	t=1 주 40°C	t=1 주 60°C
트레할로스	98.8	98.8	98.8	98.4
텍스트란-40	98.9	98.9	98.6	96.5
1:1 트레할로스:텍스트란-40	98.9	98.8	98.6	97.5

[0170]

[0171] 모두 세 가지 증량제, 즉 트레할로스, 텍스트란-40 및 트레할로스:텍스트란-40은 6.5의 pH를 유지하며 (표 14), 1주 후에 60℃에서 0.5 내지 2.5% 범위의 순도 감소가 나타난다. 텍스트란-40을 함유하고 60℃에서 저장된 두 약물 제품 모두는 머무름 시간 (RT) ~6.0에서 관련된 물질의 성장을 나타내었다. 이러한 관련된 물질은 트레할로스 샘플에 존재하지 않는데, 이는 트레할로스가 동결건조된 약물 제품에서 안정화 효과를 나타내며 텍스트란-40이 특정 분해 산물을 야기시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

[0172] 증량제에 텍스트란-40의 포함은 보다 높은 1차 건조 온도를 고려하지만, 증량제로서의 텍스트란-40은 가장 불량한 안정성을 나타내었다. 트레할로스와 텍스트란-40(1:1)의 조합은 트레할로스 단독 보다 대략 10℃ 높은 유리 전이온도를 야기시킨다. 그러나, 60℃ 안정성이 트레할로스 및 텍스트란 단독 샘플에 대해 중간인 것으로 나타

났으며, 이에 따라, 트레할로스가 바람직한 증량제이다.

[0173] 동결건조된 NA-1 제형 개발: 소규모 실험 #2

[0174] NA-1 약물 제품의 작은 배치를 동결건조하여 1차 건조 동안 5℃에서 선반 온도의 설정을 평가하였다. NA-1을 50 mM 히스티딘, pH 6.5 및 120 mM 트레할로스 중에 27 mg/mL의 활성물 농도로 배합하였다. 사이클 파라미터는 표 17에 개략되어 있다. 네 개의 20-mL 유리 동결건조 바이알에 10 mL 채웠다. 두 개의 바이알을 온도 프로브로 탐침하였다.

[0175] 표 17. 소규모 2, NA-1 제형 개발

기능	온도 (°C)	유지/비율	비율 (°C/분)	시간(분)	압력 (mTorr)
로드	5	유지	~	0	주변
평형	5	유지	~	120	주변
냉동	-40	비율	0.5	90	주변
냉동	-40	유지	~	240	주변
1차 건조 ¹	5	비율	0.25	180	225
1차 건조 ¹	5	유지	~	2050	50
2차 건조	25	비율	0.1	200	50
2차 건조	25	유지	~	1440	50
스토퍼	20	유지	~	~	질소/주변
언로드	20	유지	~	~	주변

1 큰 바이알 크기 및 충전 부피를 기반으로 한 1차 건조 온도, 유리전이온도와 직접적으로 관련되지 않음.

[0177] 큰 충전 부피로 인하여, 증발 냉각을 보정하기 위해 선반 온도를 유리전이온도 보다 상당히 높게 설정하는 것이 필수적이다. 1차 건조 동안의 용액 온도는 -29℃이었는데, 이는 DSC 열 분석으로부터 -28℃의 유리전이온도 부근이다.

[0178] 90 mg/mL NA-1 동결건조물 가속 안정성 (소규모 3)

[0179] 소규모 3 충전 용액을 배합하기 전에, 완충제 (50 mM 히스티딘, pH 6.5) 중의 90 mg/mL NA-1을 pH에 대해 평가하였다. 용액의 pH는 6.04이다. NA-1의 농도가 증가함에 따라, 완충화 농도(buffering strength)가 또한 증가할 필요가 있는 것으로 결정되었다. 용액을 150mM, 100 mM, 75 mM로 제조하고, 물, pH에 대해 평가하였다. pH는 표 18에 나열되어 있다. 소규모 3을 pH 6.5에서 100 mM 히스티딘 완충제에 배합하였으며, NA-1를 첨가한 후에, pH를 6.5로 재조정하였다.

[0180] 표 18. pH, 히스티딘 완충제, pH 6.5 중의 90 mg/mL NA-1

완충제	pH
물	5.39
50mM	6.04
75mM	6.04
100mM	6.29
150mM	6.14

[0182] NA-1 약물 제품의 작은 배치를 동결건조하여 25℃ 및 60℃에서 1주 저장 후에 고체 상태 안정성을 평가하였다. 두 개의 90 mg/mL NA-1 제형을 배합하였다 (완충제 및 트레할로스를 갖는 완충제). 샘플을 t=0 및 t=1 주에 외관, 재구성(reconstitution), 물 함량 및 HPLC (MSA 방법)에 의한 순도에 대해 평가하였다.

[0183] 모든 NA-1 약물 제품은 백색의 동결건조된 케이크로서 나타났다. 일부 케이크는 크랙을 형성하였다. 플라시보 제형은 활성 제형과 시각적으로 유사하였다.

[0184] 재구성 시간(reconstitution time)은 종래 제형에서 10초 미만인 것과 비교하여 대략 1.5분이었다. 재구성 시간의 증가는 NA-1 및 히스티딘의 농도 증가로 인한 가능성이 크다. 추가 시험에서는 단축된 재현탁 시간과 함께, 50 및 75 mM의 히스티딘 완충제 농도를 갖는 NA-1의 양호한 안정성을 나타내었다. 또한, 이러한 연구를 위해 사용되는 2-mL 바이알 크기로 인하여, 단지 1 mL의 물을 동결건조물에 첨가하였다. 실제 재구성 부피는 이러한 소규모 구성에서 4.5 mL이다. 재구성 시간은 보다 큰 부피의 희석제가 사용될 때에 개선시킬 가능성이 클 것이다.

[0185] 바이알을 25℃ 및 60℃에서 안정한 상태로 배치하고, 1주 저장 후에 시험하였다.

[0186] 시각적 외관 데이터를 기초로 하여, 트레할로스 샘플은 보다 엘레강스한 케이크(elegant cake)를 제공하였다. 동결건조 사이클은 -32°C의 1차 건조 온도와 함께, 5일에 걸쳐 보존적으로 진행되었다. 온도 프로브 데이터를 기초로 하여, 사이클은 단축될 수 있는데, 이는 농도가 높아지고 충전 부피가 작아질수록, 최적화된 사이클이 더욱 단축될 것이라는 것을 나타낸다.

[0187] 순도 결과는 표 19에 개략된다.

[0188] 표 19. 순도 (HPLC에 의한 %면적), 소규모 3

제형	조성물	충전 용액	t=0	t=1 주 25°C/60%RH	t=1 주 60°C
1	100 mM His, pH 6.5	99.2	99.3	99.3	97.8
2	100 mM His, pH 6.5 + 120 mM 트레할로스	99.2	99.3	99.2	98.7

[0189]

[0190] 이러한 가속 안정성 데이터를 기초로 하여, 트레할로스는 NA-1 제형에 대한 안정화 효과를 나타내는데, 이는 동결건조물의 화학적 안정성을 개선시킨다. 다른 펩티드를 위해 사용되는 텍스트란 및 만니톨과 같은 다른 표준 증량제는 안정화 효과를 부여하지 않지만, 트레할로스가 이러한 안정화 효과를 부여할 수 있다는 것은 놀라운 것이다.

[0191] 감소된 충전 부피는 주변 바이알의 경쟁 증발 냉각을 최소화하고, 승화하는 물에 대한 내성을 최소화한다.

[0192] 동결건조 사이클 개발 - 소규모 4 (플라시보 및 활성물)

[0193] 동결건조 사이클 개발의 소규모 4를 개시하여 3 mL 충전물에 대한 케이크 외관 및 동결건조 조건을 시험하였다. 시험된 샘플은 120 mM 트레할로스를 갖는 100 mM His, pH 6.5 및 90 mg/kg NA-1, 또는 트레할로스가 제거된 동일한 샘플이다. 보존적, 4일 사이클을 표 20에 기술된 바와 같이 진행시켰다. 플라시보 및 활성물 바이알은 이전 실험을 위해 사용된 작은 바이알 대신에 20-mL 유리 동결건조 바이알에 3 mL 충전 구성으로 포함되었다. 활성 온도 프로브를 사용하여 동결건조 사이클 동안 온도를 확인하였다. 얻어진 활성물 바이알은 도 7a에 도시되어 있다.

[0194] 표 20. 소규모 4에 대한 동결건조 파라미터

기능	온도 {°C}	유지/비율	비율 {°C/분}	시간(분)	압력 {mTorr}
로브	5	유지	~	0	주변
평형	5	유지	~	120	주변
냉동	-40	비율	0.5	90	주변
냉동	-40	유지	~	120	주변
1차 건조	-30	비율	0.25	40	225
1차 건조	-30	유지	~	3400	50
2차 건조	25	비율	0.1	550	50
2차 건조	25	유지	~	1440	50
스토퍼	20	유지	~	~	절소/주변
언로드	20	유지	~	~	주변

[0195]

[0196] 20 mL 바이알에 90 mg/mL의 제형은 4일 사이클에서 엘레강스한 케이크를 형성하였으며, 온도 프로브 데이터는 사이클이 3일까지 단축될 수 있음을 시사하였다.

[0197] 플라시보 및 활성물에 대한 물 함량은 0.01% 및 0.00%이었다.

[0198] 동결건조 사이클 개발 - 소규모 5 (플라시보 및 활성물)

[0199] 소규모 5를 수행하여 임상 시험을 위한 매칭되는 플라시보 바이알의 개발을 검토하고 가능성 있는 상업적 스케일 (270 mg/바이알)에서 제형에 대한 제형력 시간을 검토하였다. 10개의 플라시보 제형 및 1개의 활성물 제형을 외관 및 재구성 시간에 대해 평가하였다. 활성물 케이크는 바이알 벽의 표면 둘레에 크랙을 야기시키는 수축을 최소화하는 엘레강스한 백색 케이크이었다. 플라시보 케이크는 백색으로서, 증가하는 양의 트레할로스를 함유한 케이크에서 보다 많은 크랙을 갖는다.

[0200] 바이알을 13.5 mL의 물로 재구성하였다. 용해되는 시간은 표 21에 나열되었다. 활성 동결건조물은 즉시 재현

탁되었지만, 맑은 무색 용액이 되기 전에 17.6초 동안 탁하였다. 모든 플라시보는 맑은 무색 용액이었다.

표 21. 위약 및 활성 (SS5)의 재구성

제 형				재구성 시간 (분)	
위약 제형 #	트레할로스, mM	히스티딘, mM	총, mg/ 바이알	바이알 #1	바이알 #2
1 (대조군)	120	100	170	< 10 sec	< 10 sec
2	200	100	252	< 10 sec	< 10 sec
3	300	100	355	< 10 sec	< 10 sec
4	400	100	457	< 10 sec	< 10 sec
5	500	100	560	< 10 sec	< 10 sec
6	120	20	133	< 10 sec	< 10 sec
7	200	20	215	< 10 sec	< 10 sec
8	300	20	317	< 10 sec	< 10 sec
9	400	20	420	< 10 sec	< 10 sec
10	500	20	523	< 10 sec	< 10 sec
활성 제형 #	트레할로스, mM	히스티딘, mM	NA-1, mg	바이알 #1	바이알 #2
1 (대조군)	120	100	90	17.6 sec	NA

안정성, 재현탁 시간, 및 동결건조 시간에 기반하여, 동결건조전, NA-1에 대한 바람직한 상업적 제형은 20-100 mM 히스티딘, 120 mM 트레할로스 pH 6.5일 것이다. 트레할로스 농도는 안정성 또는 케익 엘레강스의 손실 없이 증가될 수 있으나 재현탁 시간은 예외이다.

케익 형성에서의 증가된 트레할로스의 조사 및 시각적 외관 및 재현탁 시간에 의한 위약 매칭

위약을 더 잘 매칭시키기 위해, 다양한 농도의 트레할로스를 NA-1와 함께 그리고 NA-1 없이, 3 또는 5 mL의 충전 부피로 시험하였다.

우선, 활성 제형 및 위약 제형이 개요될 것이다. 그 후 3-mL 충전 및 5-mL 충전에 대한 선도 시각적 매칭이 강조될 것이다. 분석 샘플 (충전 용액 및 한 효능 샘플)이 현재 분석되고 있다. 표 22 및 23은 시험된 제형의 서브세트를 나타낸다.

표 22. 활성 제형

제 형	충전 부피	조 성
1	3-mL	120 mM트레할로스+ 100 mM 히스티딘 중 270 mg/바이알 , pH 6.5
2	3-mL	500 mM트레할로스+ 20 mM 히스티딘 중 270 mg/바이알 , pH 6.5
3	5-mL	120 mM트레할로스+ 50 mM 히스티딘 중 270 mg/바이알 , pH 6.5

도 7B는 상기 열거된 활성 제형의 외관을 나타낸다.

표 23. 위약 제형

위약 제형	활성 제형 (~270 mg/ 바이알)
500 mM트레할로스+ 20 mM 히스티딘 (n=7)	500 mM트레할로스+ 20 mM 히스티딘 (n=2)
400 mM트레할로스+ 20 mM 히스티딘 (n=3)	400 mM트레할로스+ 20 mM 히스티딘 (n=1)
300 mM트레할로스+ 20 mM 히스티딘 (n=3)	300 mM트레할로스+ 20 mM 히스티딘 (n=1)

표 24는 상기 샘플에 대한 동결건조 사이클 조건을 나타낸다.

[0213] 표 24. 사이클 파라미터

기능	온도 (°C)	유지/진전	속도 (°C/ 분)	시간 (분)	압력 (mTorr)
로드	5	유지	-	0	주위
평형화	5	유지	-	120	주위
동결	-40	진전	0.25	180	주위
동결	-40	유지	-	120	주위
어닐	-27	진전	0.25	52	주위
어닐	-27	유지	-	120	주위
동결	-40	진전	0.25	52	주위
동결	-40	유지	-	120	주위
일차 건조	-30	진전	0.25	40	225
일차 건조	-30	유지	-	4406	50
이차 건조	25	진전	0.1	550	50
이차 건조	25	유지	-	1440	50
마개	20	유지	-	-	절소/주위
언로드	20	유지	-	-	주위

[0214]

[0215] 표 25. 선도 매칭의 개요

샘플 명칭	색 & 마감: (광택 또는 무광)	지형: 예, 피부, 망, 크랙, 돌출, 컬	구조: 조밀 또는 다공성	수축	마손도	재구성 시간
SS6 - 3 mL 충전						
활성 #2 300 mM 트레할로스 30 mM 히스티딘	회백색 무광	얇은 크랙	조밀	최소	사진 참조	2 min 30 sec
위약 #2 300 mM 트레할로스 20 mM 히스티딘	회백색 무광	크랙	조밀	최소		1 min
SS7 - 5 mL 충전						
활성 300 mM 트레할로스 20 mM 히스티딘	회백색 무광 w/ 빛나는 반점	크랙이 생겨 구멍난 바닥	반-조밀, 흔들 이음	예, 케익의 저부	NT	1 min
위약 300 mM 트레할로스 20 mM 히스티딘	회백색 무광 w/ 빛나는 반점	크랙이 생겨 구멍난 바닥	반-조밀, 활성보다 다공성			최소
NT = 시험되지 않음						

[0216] NT = 시험되지 않음

[0217] 실시예 7: 20 mM 히스티딘 완충제 pH 6.5 및 120 mM 트레할로스에서 동결건조된 270 mg NA-1의 안정성

[0218] 동결건조된 약물 생성물의 제조

[0219] 소 배치의 NA-1 약물 생성물을 20 mM 히스티딘 pH 6.5 및 120 mM 트레할로스에서 90 mg/mL로 제형화하고, 동결 건조시켜, -20°C, 40°C 및 60°C에서 4주 후에 고체 상태 안정성을 평가하였다. 표 25는 동결건조 조건을 나타낸다.

[0220] 표 25: 실시예 7에 대한 동결건조 사이클 조건

기능	온도 (°C)	유지/진전	속도 (°C/분)	시간 (분)	압력 (mTorr)
로딩	5	유지	-	0	주위
평형화	5	유지	-	120	주위
동결	-40	진전	0.5	90	주위
동결	-40	유지	-	120	주위
일차 건조	-28	진전	0.25	48	225
일차 건조	-28	유지	-	3412	50
이차 건조	25	진전	0.1	530	50
이차 건조	25	유지	-	1440	50
마개	20	유지	-	-	절소/주위
언로딩	20	유지	-	-	주위

[0221]

[0222] 샘플을 일정한 온도의 오븐에 저장하고, 13.2 mL (13.5 최종 부피에 대해)의 순도, 효능, 및 재구성 시간을 0, 1, 2 및 4주에 평가하였다. 각 저장 온도 및 시간에 대한 데이터는 표 26A-C에 제시된다.

[0223] 표 26A: -20°C에서의 안정성

파라미터	t = 0	t = 4 주		
외관	조밀한 백색 케익	조밀한 백색 케익		
재구성 시간	~60 sec	~60 sec		
pH	6.32	TBD		
물 함량	0.02%	NT		
% 표시량 (Label Claim), TFA 방법	99.0%	101.3%		
총 순도, MSA 방법 (% 면적)	99.2%	99.2%		
개별 순도	RRT	% 면적	RRT	% 면적
	0.59	0.02%	0.59	0.02%
	ND	ND	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%
	ND	ND	1.14	0.03%
	1.15	0.02%	1.16	0.02%
탈아미드화 NA-1, SCX 방법 (% 면적)	<0.05%	TBD		

[0224]

[0225] 표 26B: 40°C에서의 안정성

파라미터	t = 0	t = 1 주	t = 2 주	t = 4 주				
외관	조밀한 백색 케익	조밀한 백색 케익	조밀한 백색 케익	조밀한 백색 케익				
재구성 시간	~60 sec	~60 sec	~60 sec	~60 sec				
pH	6.32	6.55	6.21	TBD				
물 함량	0.02%	NT	NT	NT				
% 표시량, TFA 방법	99.0%	97.0%	100.6%	100.6%				
총 순도, MSA 방법(%면적)	99.2%	99.1%	98.9%	99.0%				
개별 순도	RRT	%면적	RRT	%면적	RRT	%면적	RRT	%면적
	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	0.02%	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%
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.08	0.19%
	1.10	0.13%	1.10	0.15%	1.10	0.17%	1.10	0.19%
	ND	ND	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	ND
	ND	ND	ND	ND	1.17	0.05%	1.16	0.02%
	1.26	0.01%	1.26	0.01%	1.29	0.01%	1.28	0.01%
	1.29	0.01%	1.29	0.02%	1.31	0.04%	1.30	0.07%
	탈아미드화 NA-1, SCX 방법(%면적)	<0.05%	NT	NT	NT	NT	TBD	

[0226]

[0227] 표 26C: 60°C에서의 안정성

파라미터	t = 0	t = 1 주	t = 2 주	t = 4 주				
외관	조밀한 백색 케익	조밀한 백색 케익	조밀한 백색 케익	조밀한 백색 케익				
재구성 시간	~60 sec	~60 sec	~60 sec	~60 sec				
pH	6.32	6.43	6.29	6.29				
물 함량	0.02%	NT	NT	NT				
% 표시량, TFA 방법	99.0%	97.3%	101.5%	101.5%				
총 순도, MSA 방법(%면적)	99.2%	98.8%	98.3%	98.0%				
개별 순도	RRT	%면적	RRT	%면적	RRT	%면적	RRT	%면적
	ND	ND	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%
	ND	ND	0.91	0.01%	0.91	0.02%	0.92	0.01%
	ND	ND	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	ND ¹	1.08	0.59%
	1.10	0.13%	1.10	0.23%	1.09	0.37%	1.10	0.44%
	ND	ND	1.12	0.05%	1.12	0.38%	1.13	0.09%
	1.15	0.02%	1.15	0.02%	1.15	0.10%	1.15	0.05%
	ND	ND	ND	ND	1.17	0.07%	1.17	ND
	1.26	0.01%	1.26	0.01%	1.26	<0.01%	1.27	0.01%
	1.29	0.01%	1.29	0.06%	1.30	0.17%	1.30	0.29%
	탈아미드화 NA-1, SCX 방법(%면적)	<0.05%	NT	NT	NT	NT	TBD	

¹ 주요 피크 주위에서 한 쌍의 분열

[0228]

[0229] NA-1에 대한 이러한 제형은 -20°C에서 안정하다. 40°C 및 60°C의 저장 온도에서, 1.07, 1.1 및 1.29의 상대 체류 시간(RRT)을 갖는 잠재적인 불순물은 MSA HPLC 검정 이용시 느리게 증가하였고, 가장 큰 성장은 1.07 RRT에

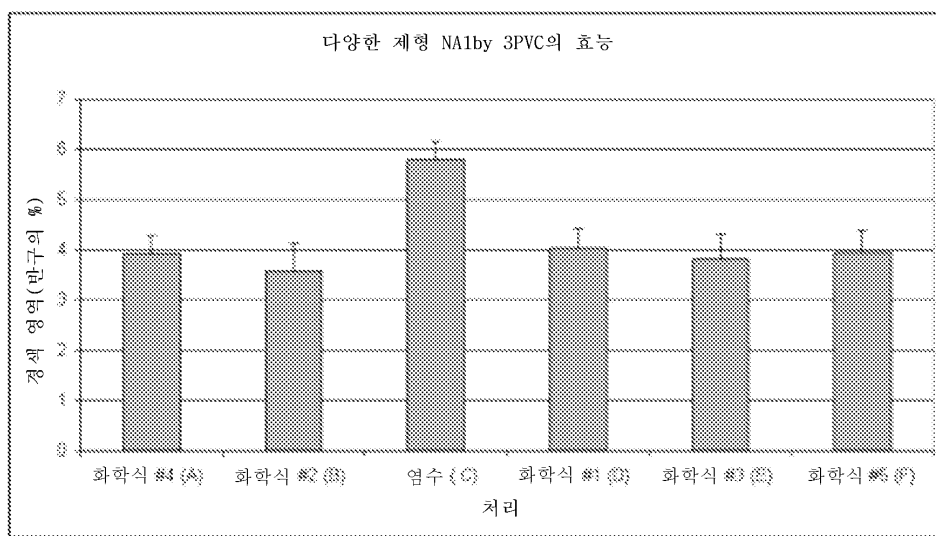
서 나타났다. 40℃ 저장 온도의 경우, 불순물은 1개월 동안 0.09%에서 0.27%로 증가하였고, 60℃ 저장 온도의 경우, 불순물은 0.09%에서 0.59%로 증가하였다. -20℃에서는 불순물이 관찰되지 않았다. Arrnehius 방정식을 이용하여 보관된 불순물은 25℃에서 16개월 또는 5℃에서 123개월 후에 0.5% 미만이었으며, 실온에서 >60개월 및 5℃에서 수 년 동안 2% 미만이었다. 따라서, 상기 및 관련 제형은 동결건조된 약물 생성물의 실온 저장에 적합하다.

[0230] 전반적인 결론

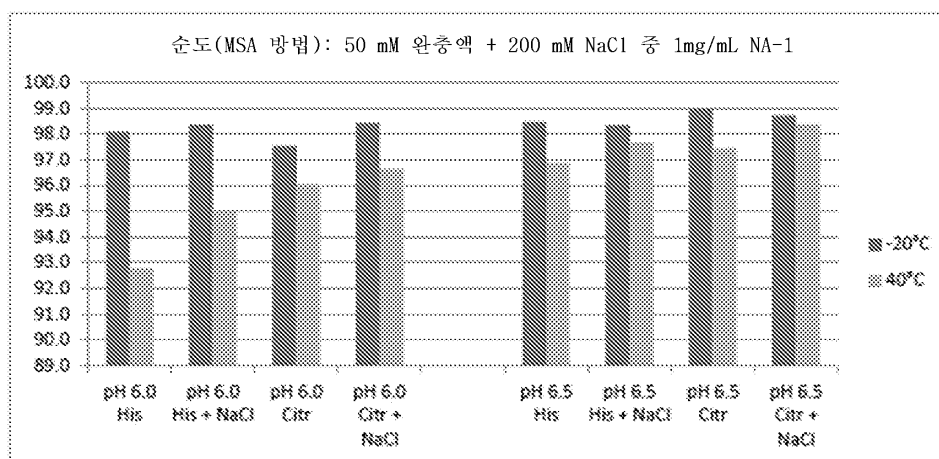
[0231] 안정성, 재현타 시간, 및 동결건조 시간에 기반하여, NA-1에 대한 바람직한 상업적 제형은 20-100 mM 히스티딘, 120 mM 트레할로스 pH 6.5이다. 트레할로스 농도는 안정성 또는 케익 엘레강스의 손실 없이 증가될 수 있으나 재현타 시간은 트레할로스 농도 증가와 함께 증가한다.

도면

도면1

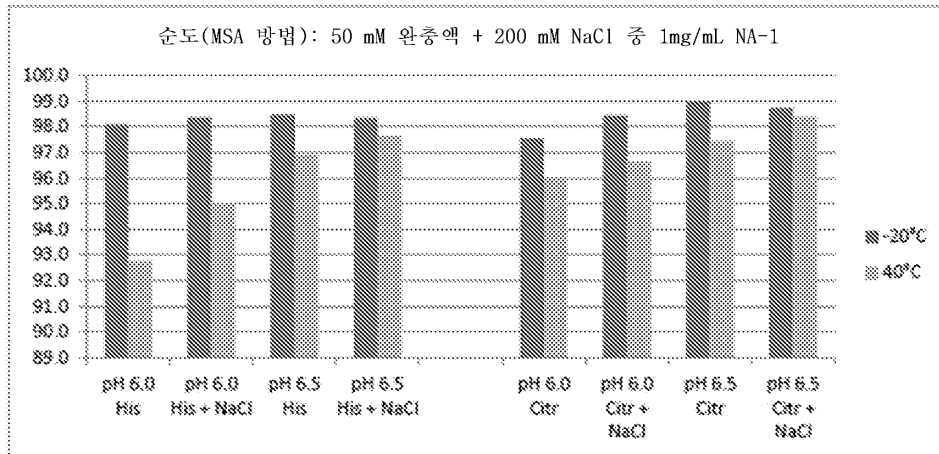


도면2a



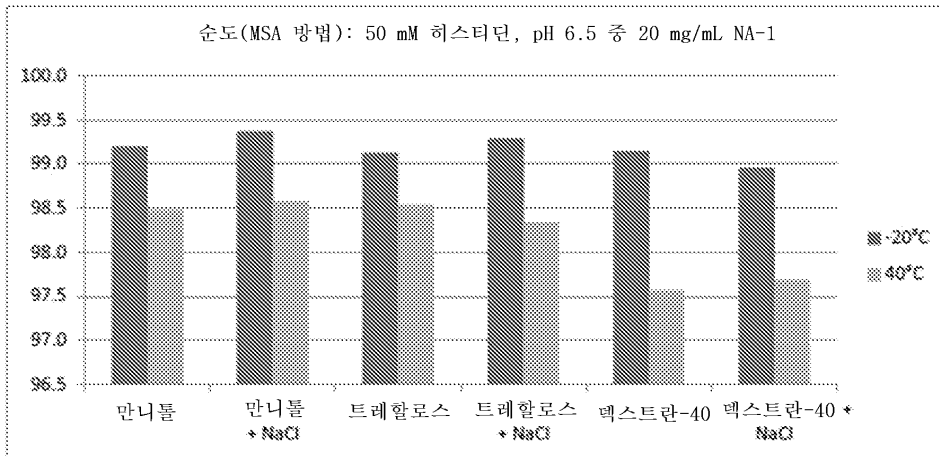
순도 결과의 플롯, MSA 방법(pH에 의해 정리됨)

도면2b

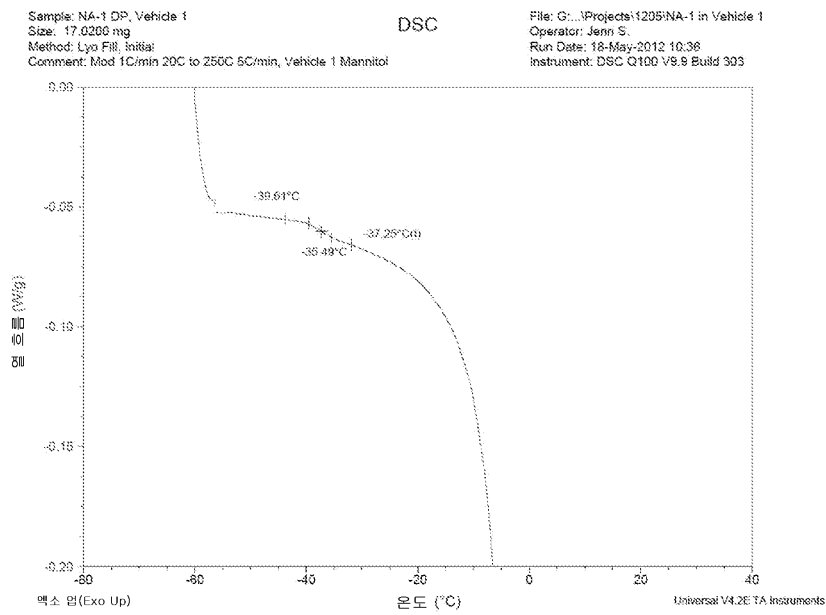


순도 결과의 플롯, MSA 방법(pH에 의해 정리됨)

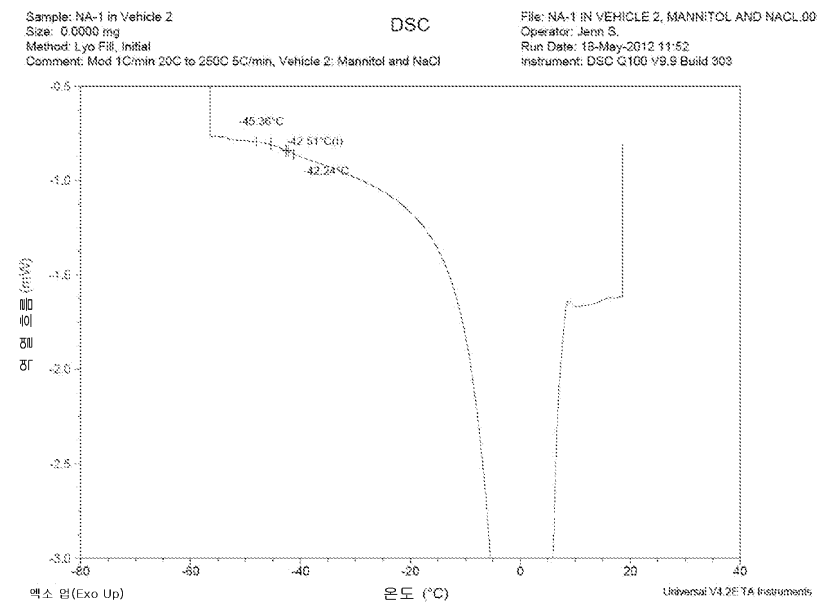
도면3



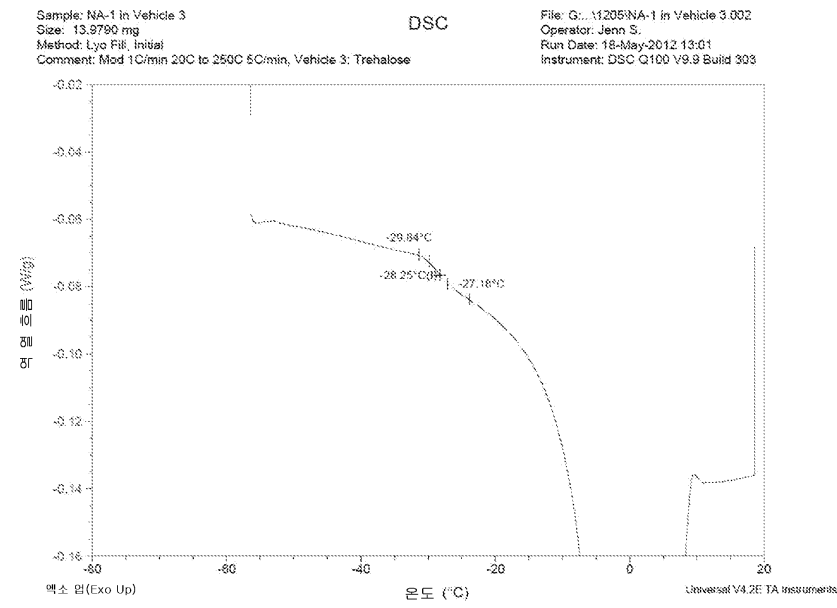
도면4a



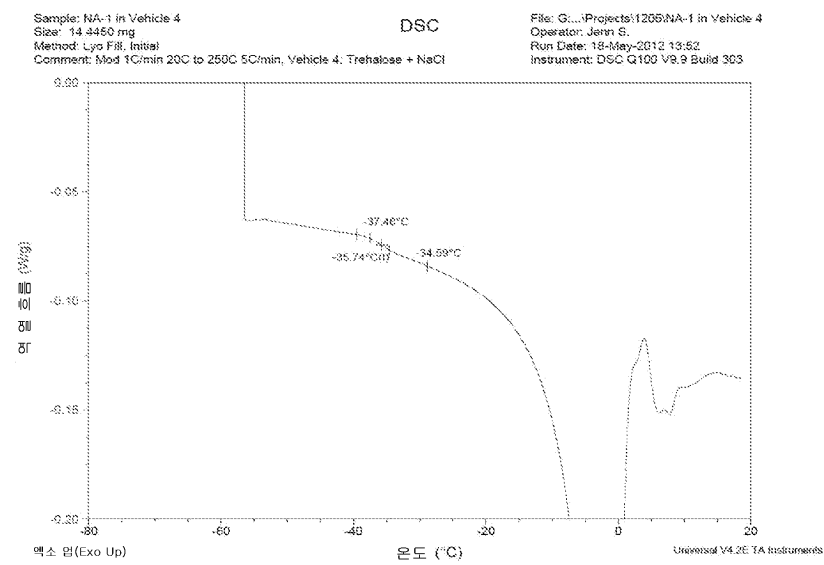
도면4b



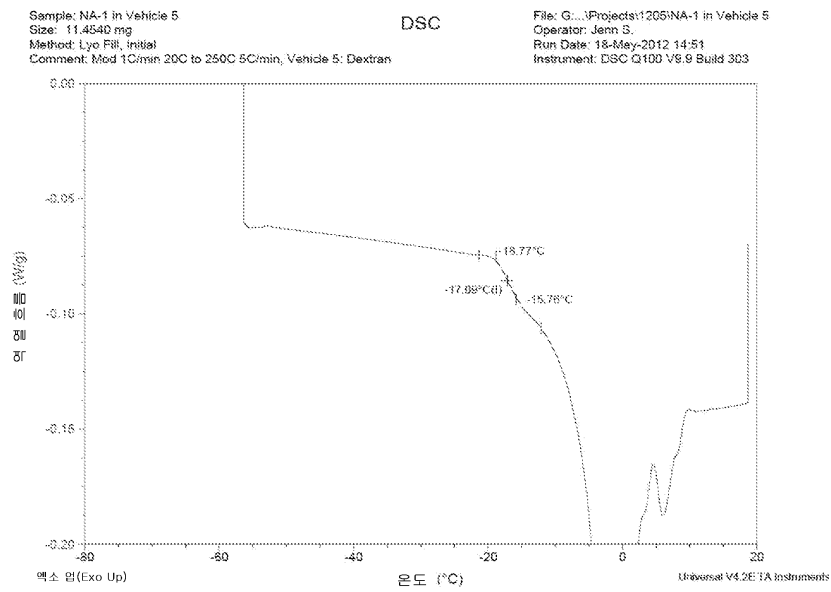
도면5a



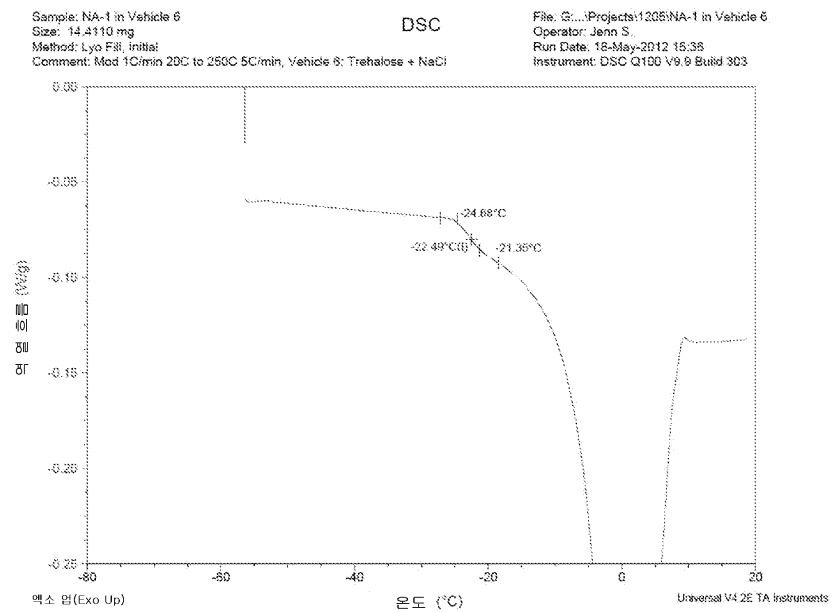
도면5b



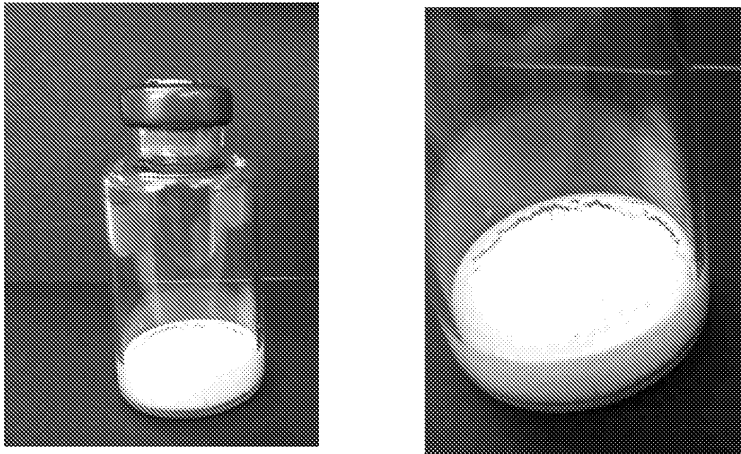
도면6a



도면6b

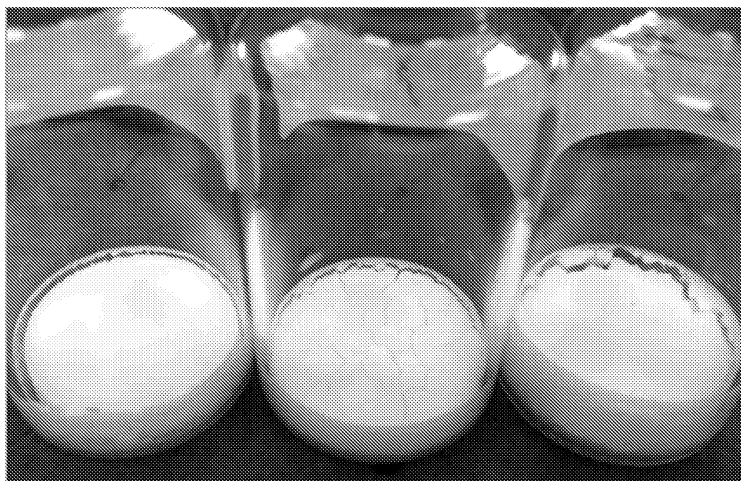


도면7a



소규모 4 NA-1

도면7b



소규모 6으로부터의 제형 1-3

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NONO INC.

GARMAN, JONATHAN DAVID

<120> LYOPHILIZED FORMULATION OF TAT-NR2B9C

<130> 057769/update

<150> 61/730,952

<151> 2012-11-28

<160> 73

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 1

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 3

Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 4

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln

1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 5

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 8

Xaa Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 9

Arg Leu Ser Gly Met Asn Glu Val Leu Ser Phe Arg Trp Leu

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 10

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 12

Glu Ser Asp Val

1

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 26

Ile Glu Thr Ala Val

1 5

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 27

Ser Thr Val Val

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 28

His Arg Glu Ser

1

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 29

Glu Ser Glu Val

1

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 30

Thr Cys Glu Ser

1

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 31

Gly Thr Ser Ile

1

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 32

Ala Thr Gly Leu

1

<210> 33

<211> 4

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 33

Ser Val Lys Ile

1

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 34

Ser Asp Leu Pro

1

<210> 35

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 35

Glu Thr Val Ala

1

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 36

Glu Thr Met Ala

1

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = E, D, N, or Q

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = S or T

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = D, E, Q, or N

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = V or L

<400> 38

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 39

Glu Thr Asp Val

1
 <210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthesized
 <400> 40
 Glu Thr Glu Val

1
 <210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthesized

<400> 41
 Asp Thr Asp Val

1
 <210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthesized
 <400> 42

Asp Thr Glu Val

1
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthesized

<400> 43

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 44

Gly Ser Ser Ser Ser

1 5

<210>

> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 45

Thr Gly Glu Lys Pro

1 5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 46

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 47

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro

1 5

<210> 48

<211> 13

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 48

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln

1 5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or an amino acid that is not Y

<400> 49

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 1
 <223> Xaa = Blank or any amino acid
 <400> 50
 Xaa Gly Lys Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthesized
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 1
 <223> Xaa = Blank or any amino acid
 <400> 51
 Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10
 <210> 52

 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthesized
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 1
 <223> Xaa = Blank or any amino acid
 <400> 52
 Xaa Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10
 <210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 53

Xaa Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 54

Xaa Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 55

Xaa Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 56

Xaa Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 57

Xaa Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 58

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 59

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 60

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg

1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 61

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg

1 5 10

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 62

Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg

1 5 10

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 63

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 64

Xaa Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 65

Xaa Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg

1 5 10

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 66

Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Blank or any amino acid

<400> 67

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg

1 5

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = E, Q, A, or an analog thereof

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = T or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D, N-Me-N,

or an analogue thereof

<400> 68

Xaa Xaa Xaa Val

1

<210> 69

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<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> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 71

Ile Glu Ser Asp Val

1 5

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 72

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro

1 5 10

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 73

Ile Glu Thr Asp Val

1 5