



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109106941 A

(43)申请公布日 2019.01.01

(21)申请号 201810971184.4

A61K 9/19(2006.01)

(22)申请日 2013.11.25

A61K 47/18(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 47/26(2006.01)

61/730,952 2012.11.28 US

A61P 9/10(2006.01)

(62)分案原申请数据

201380071653.2 2013.11.25

(71)申请人 诺诺公司

地址 加拿大安大略省多伦多市

(72)发明人 乔纳森·戴维·加曼

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 郝传鑫

(51)Int.Cl.

A61K 38/10(2006.01)

A61K 38/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书35页

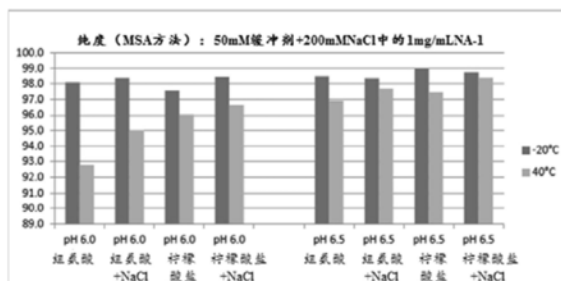
序列表21页 附图6页

(54)发明名称

TAT-NR2B9C的冻干制剂

(57)摘要

本发明提供了活性试剂的冻干制剂,尤其是TAT-NR2B9c的冻干制剂。TAT-NR2B9c对于治疗中风、动脉瘤、蛛网膜下腔出血和其它神经或神经创伤状况具有良好的前景。这种制剂在室温下是稳定的,因此便于维持该制剂在救护车上的供给,以在疾病或事故现场施用或运往医院途中施用。



图II 稳定性结果图, MSA方法 (以pH排序)

1. 一种预冻干制剂,所述预冻干制剂包含TAT-NR2B9c (SEQ ID NO:6)、组氨酸和海藻糖,所述预冻干制剂的pH为6-7。
2. 根据权利要求1所述的预冻干制剂,其中所述TAT-NR2B9c的浓度为70-120mg/ml,所述组氨酸的浓度为15-100mM,以及所述海藻糖的浓度为80-160mM。
3. 根据权利要求1所述的预冻干制剂,其中所述TAT-NR2B9c的浓度为70-120mg/ml,所述组氨酸的浓度为20-100mM,以及所述海藻糖的浓度为100-140mM。
4. 根据权利要求1所述的预冻干制剂,其中所述TAT-NR2B9c的浓度为70-120mg/ml,所述组氨酸的浓度为20-50mM,以及所述海藻糖的浓度为100-140mM。
5. 根据权利要求1所述的预冻干制剂,其中所述组氨酸的浓度为20mM,所述海藻糖的浓度为100-200mM,优选为120mM,以及所述TAT-NR2B9c的浓度为90mg/ml。
6. 一种冻干制剂,通过将权利要求1-5中任一项所述的预冻干制剂冻干而制备。
7. 一种复原制剂,通过将权利要求6所述的冻干制剂和水溶液结合而制备。
8. 根据权利要求7所述的复原制剂,其中所述的水溶液是水或生理盐水。
9. 根据权利要求7所述的复原制剂,其中所述复原制剂的体积是所述预冻干制剂体积的3-6倍。
10. 一种复原制剂,所述复原制剂包括浓度为15-25mg/ml的TAT-NR2B9c,浓度为4-20mM的组氨酸,和浓度为20-30mM的海藻糖,所述复原制剂的pH为6-7。
11. 一种制备制剂的方法,所述方法包括将权利要求4所述的冻干制剂样品在室温下储存至少一周;以及复原所述冻干制剂。

## TAT-NR2B9C的冻干制剂

### [0001] 分案申请说明

[0002] 本申请是申请日为2013年11月25日、申请号为201380071653.2、发明名称为“TAT-NR2B9C的冻干制剂”的发明专利申请的分案申请。

### [0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 相关申请为2012年11月28日递交的申请号为61/730,952的非临时申请,出于所有目的,该申请的全部内容通过引用并入本申请中。

### [0005] 序列表的引用

[0006] 序列表命名为427409SEQLIST.txt,共有16千字节,创建于2013年11月20日,该序列表通过引用并入本申请中。

## 背景技术

[0007] Tat-NR2B9c (NA-1) 是一种抑制PSD-95的试剂,从而破坏PSD-95与 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDARs) 和神经元型一氧化氮合酶(nNOS) 的结合,以及降低由脑缺血诱发的兴奋毒性。治疗可减少梗塞体积和功能缺失。TAT-NR2B9c (NA-1) 已通过了成功的II期试验(参见WO 2010144721 和Aarts等,Science 298,846-850(2002);Hill等,The Lancet Neurology, 11:942-950(2012))。

[0008] 由于TAT-NR2B9c无严重的副作用,在疑似中风或其他缺血性或出血性状况但还尚未根据领域已认可的标准作出确认不存在出血的诊断时可以施用TAT-NR2B9c。例如,TAT-NR2B9c可在发生中风或神经创伤发生地点被施用(比如患者家中)或在运送受试者去往医院的救护车上被施用。

## 背景技术

### [0009]

[0010] 本发明提供了一种预冻干制剂(prelyophilized formulation),所述预冻干制剂包含TAT-NR2B9c (SEQ ID NO:6)、组氨酸和海藻糖,其pH为6-7。所述TAT-NR2B9c的浓度为70-120mg/ml,所述组氨酸的浓度为15-100mM,以及所述海藻糖的浓度为80-160mM。可选地,所述TAT-NR2B9c的浓度为70-120mg/ml,所述组氨酸的浓度为20-100mM,以及所述海藻糖的浓度为100-140mM。

[0011] 可选地,所述TAT-NR2B9c的浓度为70-120mg/ml,所述组氨酸的浓度为20-50mM,以及所述海藻糖的浓度为100-140mM,所述pH为6-7。可选地,所述组氨酸的浓度为20mM,所述海藻糖的浓度为100-200mM,优选为120mM,以及所述TAT-NR2B9c的浓度为90mg/ml。

[0012] 本发明进一步提供了一种通过将任一上述预冻干制剂冻干而制备的冻干制剂。

[0013] 本发明进一步提供了一种复原制剂(reconstituted formulation),所述复原制剂通过将上述冻干制剂和水溶液结合而制得。可选地,所述水溶液为水或生理盐水。可选地,所述复原制剂的体积是所述预冻干制剂的体积的3-6倍。

[0014] 本发明进一步提供了一种复原制剂,所述复原制剂包含浓度为15-25 mg/ml的

TAT-NR2B9c,浓度为4-20mM的组氨酸以及浓度为20-30mM的海藻糖,其pH为6-7。

[0015] 本发明进一步提供了一种制备制剂的方法,该方法包括室温下将此处所述的冻干制剂样品储存至少一周;以及复原所述冻干制剂。所述方法可进一步包括对患者施用所述复原制剂,可选地,所述复原制剂在生理盐水中进一步稀释后施用。可选地,所述患者患有中风或CNS创伤。可选地,所述冻干样品被储存在救护车上。可选地,所述患者患有蛛网膜下腔出血。可选地,所述患者正在接受动脉瘤腔内修复术。

## 附图说明

[0016] 图1:该图显示了经不同的NA-1制剂治疗后,3PVO中风后的大鼠的脑梗塞面积。

[0017] 图2A,图2B:A)柱状图显示了不同的NA-1制剂在-20°C和40°C下的稳定性。Y轴表示在储存温度下储存一周后的NA-1的纯度,该纯度使用RP-HPLC测定,以总面积%表示。B)与A)相同的数据,但按缓冲液和pH归类。

[0018] 图3:该柱状图显示了在不同的填充剂和盐的存在下,在pH6.5的组氨酸缓冲液中的20mg/ml NA-1在-20°C和40°C下的稳定性(通过HPLC测定)。

[0019] 图4A,图4B:在甘露醇(A)或甘露醇和NaCl(B)的存在下,在pH6.5的组氨酸缓冲液中的20mg/ml NA-1的差示扫描量热法(Differential scanning calorimetry)分析图。

[0020] 图5A,图5B:在海藻糖(A)或海藻糖和NaCl(B)的存在下,在pH6.5的组氨酸缓冲液中的20mg/ml NA-1的差示扫描量热法分析图。

[0021] 图6A,图6B:在右旋糖酐-40(A)或右旋糖酐-40和NaCl(B)的存在下,在pH6.5的组氨酸缓冲液中的20mg/ml NA-1的差示扫描量热法分析图。

[0022] 图7A,图7B:A)3mL在pH为6.5的100mM组氨酸和120mM海藻糖中的90mg/ml NA-1冻干后的蛋糕状外观。B)具有不同含量的组氨酸和海藻糖的选择性的NA-1制剂的蛋糕状外观。

## [0023] 定义

[0024] 除了活性试剂,冻干制剂还包括一种或多种下列种类的成分。所述种类不是相互排斥的,换句话说,相同的试剂成分可能属于多个种类。

[0025] “填充剂”为冻干肽提供了结构。所述填充剂包括:甘露醇、海藻糖、右旋糖酐-40、甘氨酸、乳糖、山梨醇和蔗糖等。除了提供药物上美观的蛋糕状,填充剂也会在改善(蛋糕状)塌陷温度,提供冻干保护、玻璃化转变温度以及增强蛋白长期储存稳定性方面提供有益的效果。这些试剂也可用作渗透压调节剂(tonicity modifiers)。

[0026] 缓冲液是一种在冻干前将溶液pH维持在可接受的范围内的试剂。优选的缓冲液为组氨酸。其它的缓冲液包括琥珀酸盐(钠或钾),组氨酸,柠檬酸盐(钠),葡糖酸盐,醋酸盐,磷酸盐,Tris等。优选的缓冲液在约5.5至7或约6至7.7的pH范围内有效,优选pH为约6.5。将pH控制在该范围内的缓冲液实例包括琥珀酸盐(比如琥珀酸钠)、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐和其它的有机酸缓冲液。

[0027] “冷冻保护剂(cryoprotectant)”为肽提供稳定性以抵挡冷冻诱导的应力,推测应力是从蛋白表面优先排除的。该试剂也可在初级和次级干燥期间及产品长期储存期间内提供保护。冷冻保护剂的实例为:聚合物,例如右旋糖酐和聚乙二醇;糖类,例如蔗糖、海藻糖和乳糖;表面活性剂,例如聚山梨醇酯;以及氨基酸,例如甘氨酸、精氨酸和丝氨酸。

[0028] 在干燥或脱水过程(初级和次级干燥周期)中,冻干保护剂(lyoprotectant)为肽提供了稳定性,推测是通过提供无定形的玻璃状基质,以及通过氢键与蛋白结合,取代干燥过程中被除去的水分子而提供稳定性的。这有助于维持肽的构象,使肽在冻干周期的降解最小化,提高产品的长期稳定性。实例包括多元醇或糖,例如蔗糖和海藻糖。

[0029] 上文中尚未提到的是,其它的稳定剂或降解抑制剂也可包括脱酰胺作用抑制剂、表面活性剂,一些常见的为聚乙氧基失水山梨醇(sorbitan polyethoxylates)脂肪酸酯(例如:聚山梨酯20或聚山梨酯80)/泊咯沙姆 188和洗涤剂。

[0030] 术语“冻干(lyophilization)”、“冻干的(lyophilized)”和“冷冻干(freeze-dried)”涉及一种工艺,通过该工艺,待干燥的原料先被冷冻,然后在真空环境下升华而去除冰或冻结的溶剂。

[0031] “药物制剂(pharmaceutical formulation)”或组合物为一种制剂,该制剂使得活性试剂有效,而且对将要被施用该制剂的受试者没有有毒的附加组分。

[0032] “复原时间(Reconstitution time)”是用溶液将冻干制剂再水化为肉眼看不到微粒的溶液所需的时间。

[0033] “稳定的”冻干肽制剂是在20℃下观察至少1个星期、1个月,或者更优选为至少3个月、至少6个月或一年而无显著变化的制剂。如果通过 SEC-HPLC测定,不超过10%、优选为不超过5%的肽被分解,则认为变化不显著。通过视觉分析,上述再水化的溶液是无色的或清澈的至呈淡淡的乳白色。所述制剂的浓度、pH以及渗透压在储存后的变化不超过+/-10%。(制剂的)效力为新近制备的对照样品的70-130%,优选为80-120%,或有时为80-100%的范围之内。可观察到不超过10%,优选为不超过5%的碎屑。形成了不超过10%,优选为不超过5%的聚集物(aggregation)。可通过多种在Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)以及Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90(1993)中讨论的方法来测定稳定性。

[0034] 术语“等渗(isotonic)”是指目标制剂与人体血液具有基本相同的渗透压。等渗制剂通常具有约270-328mOsm的渗透压。稍低渗透压为250-269 mOsm,稍高渗透压为328-350mOsm。渗透压可以测量,例如,使用蒸汽压渗透计或冰冻型渗透计(ice-freezing type osmometer)。

[0035] 渗透压调节剂:盐(NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>)可用作渗透压调节剂从而调控渗透压。此外,冷冻保护剂/冻干保护剂和/或填充剂也可用作渗透压调节剂,例如,蔗糖、甘露醇或甘氨酸。

[0036] 例如浓度或pH的数值在反应测量该值时的精确度的误差范围内给出。除非文中另有要求,部分数值舍入至最接近的整数。除非文中另有要求,数值范围的详述意味着可使用该范围内的任何整数或子范围。

## 具体实施方式

### [0037] I. 概述

[0038] 本发明提供了活性试剂的冻干制剂,尤其是TAT-NR2B9c的冻干制剂。这样的制剂在室温下是稳定的,从而方便维持该种制剂在救护车等场所的供给,或者方便应急人员在

疾病或事故现场或介于此类现场与医疗设施之间的场所施用该制剂。

[0039] 冻干制剂由预冻干制剂制备而来,所述预冻干制剂包含活性试剂、缓冲液、填充剂和水。其他的组分,例如,低温保护剂或冻干保护剂,张度剂(tonicity agent)药学上可接受的载体等可能存在也可能不存在。优选的活性试剂为TAT-NR2B9c。优选的缓冲液为组氨酸。优选的填充剂为海藻糖。海藻糖还可以作为低温或冻干保护剂。预冻干制剂的示范例包含活性试剂(例如,TAT-NR2B9c)、组氨酸(10-100mM、15-100mM、15-80mM、40-60 mM或15-60mM,如20mM,或可选为50mM或20-50mM)和海藻糖(50-200 mM,优选为80-160mM、100-140mM,更优选为120mM)。pH为5.5-7.5,较优选为6-7,更优选为6.5。所述活性试剂(例如,TAT-NR2B9c)的浓度为20-200mg/ml,优选为50-150mg/ml,更优选为70-120mg/ml或90mg/ml。由此,预冻干制剂的示范例为20mM组氨酸、120mM海藻糖和90mg/ml TAT-NR2B9c。

[0040] 冻干后,冻干制剂含水量低,按重量计,优选含有大约0%-5%的水,更优选为含有低于2.5%的水。冻干制剂可在冷冻箱中(例如,-20或-70℃)、冰箱中(0-4℃)或室温下储存(20-25℃)。

[0041] 将活性试剂在水溶液中复原,所述水溶液优选为注射用水或可选为生理盐水(0.8-1.0%生理盐水,优选为0.9%生理盐水)。复原液可与预冻干制剂的体积相同,或者小于或大于预冻干制剂的体积。优选地,复原之后的体积大于之前的体积(例如,大3-6倍)。举例来说,3-5ml的预冻干制剂可复原为13.5ml。复原之后,组氨酸的浓度优选为2-20mM,例如2-7mM或4.5mM;海藻糖的浓度优选为15-45mM或20-30mM或25-27mM。所述活性试剂的浓度优选为10-30mg/ml,例如,活性试剂(如TAT-NR2B9c)的浓度为15-25mg/ml、18-20mg/ml或20mg/ml。复原之后的示范例制剂含有4-5mM组氨酸、26-27mM海藻糖和20mg/ml TAT-NR2B9c(浓度舍入至最接近的整数)。所述复原制剂在施用前可作进一步稀释,例如将其加入到含有静脉输液用的生理盐水的液体袋中。

[0042] 例如,在Methods in Enzymology,Vol.22,Pages 33-39,Academic Press, New York (1971)以及Freeze-Drying,E.W.Flosdorf,Rheinhold,New York (1949)中阐述了冷冻干燥的方法。TAT-NR2B9c优选地在与其复原时使用的同一个小瓶中被冻干。将TAT-NR2B9c的水溶液加入小瓶中,水溶液可选为经消毒的过滤系统(如标准用于肽的0.22微米过滤器)过滤之后加入小瓶中。制剂可在控制周期内进行冻干,例如实施例中所描述的。预冻干制剂可放置在小瓶中,然后在降低的温度和压强下进行冻干。冻干后,将小瓶密封。用注射用水、生理盐水或其它药学上可接受的载体或稀释剂将冻干产物复原,以供使用。

[0043] 多种容器可适用于冻干。当所述容器被密封且储存在半真空下时,该容器需能够承受外部压强。所述容器应由可使热量由外向内合理转换的材料制成。根据当下普遍的容器容积USP推荐规范,所述容器的大小应该使得即将被冻干的溶液占据不超过20%的有效容积,或被过量的溶液装满。例如,0.5ml的溶液可装在3ml的小瓶中。所述小瓶可由玻璃(如:硼硅玻璃)或塑料(如:聚丙烯)制成。

[0044] 可以使用通常用于冻干生物材料的玻璃瓶。其他适用的容器为具有两个腔室的注射器,其中一个腔室包含冻干的蛋糕状TAT-NR2B9c肽,另一个腔室包含水性稀释剂。完成冻干后,通过带有惰性气体的填充系统将小瓶或安瓿瓶抽成真空,使用标准设备原位加塞,之后压紧密封(crimp sealed)。该方法保证了最终产品无菌。也可采用其它“两部分(two-part)”的解决方案,比如一种在冻干药物腔室和稀释剂之间具有易破开的封口的袋

子。

[0045] I. 活性试剂

[0046] 活性试剂通过与PSD-95结合而抑制PSD-95与一种或多种NMDARs (例如,2A、2B、2C或2D) 或与nNOS (例如,Swiss-Prot P29475) 之间的相互作用。此类试剂可以用于减轻至少部分由NMDAR兴奋性神经毒性介导的中风和其它神经病学状况的损伤效应。这样的试剂包括肽,所述肽具有包含或基于NMDA受体的PL基序或PSD95的PDZ结构域的氨基酸序列。这样的肽也可以抑制PSD-95和nNOS以及其它谷氨酸受体 (例如,钾盐镁矾 (kainite) 受体或AMPA受体), 例如KV1-4和GluR6, 之间的相互作用。优选的肽抑制突触后密度蛋白95 (PSD-95) 的PDZ结构域1和 2 (人氨基酸序列由Stathakism提供,Genomics 44 (1) :71-82 (1997)) 与一或多种NMDA受体2亚基的C末端PL序列之间的相互作用,所述 NMDA受体2亚基包括神经元N-甲基-D-天冬氨酸受体的NR2B亚基 (Mandich等,Genomics 22,216-8 (1994))。NMDAR2B的GenBank识别号为4099612,其具有C末端20个氨基酸FNGSSNGHVYEKLSIESDV (SEQ ID NO: 11) 和PL基序ESDV (SEQ ID NO:12)。优选的肽抑制人PSD-95和人NMDAR受体。然而,对于这些蛋白质的物种变体,也能够显示出抑制作用。可以使用的NMDA和谷氨酸受体的列表显示如下:

[0047] 具有PL序列的NMDA受体

[0048]

名称	GI 或 Acc#	C-端 20 个氨基酸的序列	C-端 4 个氨基酸 的序列	PL?	内部 PL ID
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLS DPSVSTV V (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLS DPSVSTV V (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLS DPSVSTV V (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLS DPSVSTV V (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLS DPSVSTV V (SEQ ID NO:13)	STVV (SEQ ID NO:27)	X	AA216
NMDAR1-2	1103863 4	RRAIEREEGQLQLCSRHR ES (SEQ ID NO:14)	HRES (SEQ ID NO:28)		
NMDAR1-3	1103863 6	RRAIEREEGQLQLCSRHR ES (SEQ ID NO:14)	HRES (SEQ ID NO:28)		
NMDAR2C	6006004	TQGFPGPCTWRRISSE V (SEQ ID NO:15)	ESEV (SEQ ID NO:29)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIESD V (SEQ ID NO:11)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	AA34.1
NMDAR3A	1753017 6	AVSRKTELEEYQRTSRTCE S (SEQ ID NO:16)	TCES (SEQ ID NO:30)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIESD V (SEQ ID NO:11)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	

[0049]

名称	GI 或 Acc#	C-端 20 个氨基酸的序列	C-端 4 个氨基酸 的序列	PL?	内部 PL ID
NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKKMPSIES DV (SEQ ID NO:17)	ESDV (SEQ ID NO:12)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGS AHFSSLES EV (SEQ ID NO:18)	ESEV (SEQ ID NO:29)	X	
谷氨酸受体 δ2	AF00901 4	QPTPTLGLNLGNDPDRGT SI (SEQ ID NO:19)	GTSI (SEQ ID NO:31)	X	
谷氨酸受体 1	I28953	MQSIPCMSHSSGMPLGAT GL (SEQ ID NO:20)	ATGL (SEQ ID NO:32)	X	
谷氨酸受体 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIESV KI (SEQ ID NO:21)	SVKI (SEQ ID NO:33)	X	
谷氨酸受体 3	AF16733 2	QNYATYREGYNVYGTESV KI (SEQ ID NO:22)	SVKI (SEQ ID NO:33)	X	
谷氨酸受体 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASDL P (SEQ ID NO:23)	SDLP (SEQ ID NO:34)		
谷氨酸受体 5	U16125	SFTSILTCHQRRRTQRKETV A (SEQ ID NO:24)	ETVA (SEQ ID NO:35)	X	
谷氨酸受体 6	U16126	EVINMHTFNDRLPGKET MA (SEQ ID NO:25)	ETMA (SEQ ID NO:36)	X	

[0050] 肽可以包括或基于来自任何以上亚基的C末端的PL基序,并具有包含[S/T]-X-[V/L]的氨基酸序列。该序列优选存在于本发明的肽的C末端。优选的肽具有在其C末端包含[E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID NO: 38)的氨基酸序列。示例性肽包括作为C末端氨基酸的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)和DTEV (SEQ ID NO:42)。两个特别优选的肽是KLSSIESDV (SEQ ID NO:5)和KLSSIETDV (SEQ ID NO:43)。这样的肽通常具有3-25个氨基酸(在没有内化肽的情况下),优选的肽长度为5-10个氨基酸,特别是9个氨基酸(也在没有内化肽的情况下)。在一些这样的肽中,所有的氨基酸都来自NMDA受体的C末端(不包括来自内化肽的氨基酸)。

[0051] 本发明中的肽和拟肽可包括修饰的氨基酸残基,例如,N-烷基化的残基。N-端烷基

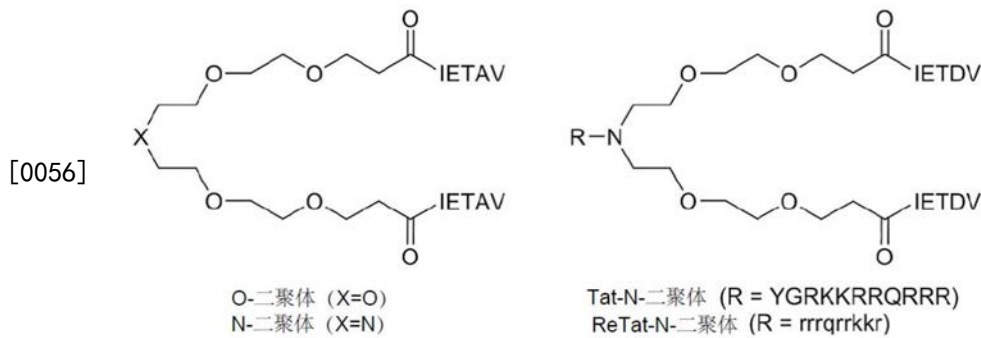
化修饰可包括,例如,N-甲基、N-乙基、N-丙基、N-丁基、N-环己基甲基、N-环己基乙基、N-苄基、N-苄乙基、N-苄丙基、N-(3,4-二氯苯基)丙基、N-(3,4-二氟苯基)丙基和N-(萘-2-基)乙基。

[0052] Bach, J. Med. Chem. 51, 6450-6459 (2008) 和 WO 2010/004003 中描述了一系列 NR2B9c (SEQ ID NO:6) 的类似物。具有仅3个C末端氨基酸 (SDV) 的肽显示出 PDZ 结合活性。Bach 同时报道了具有包含 X<sub>1</sub>tSX<sub>2</sub>V (SEQ ID NO:68) 或由 X<sub>1</sub>tSX<sub>2</sub>V (SEQ ID NO:68) 组成的氨基酸序列的类似物,其中 t 和 S 为可替代的氨基酸, X<sub>1</sub> 选自 E、Q 和 A 或它们的类似物, X<sub>2</sub> 选自 A、Q、D、N、N-Me-A、N-Me-Q、N-Me-D 和 N-Me-N 或它们的类似物。可选地,所述肽在 P3 位置 (从 C-末端数起的第三个氨基酸,即由 tS 占据的位置) 被 N-烷基化。所述肽可以被环己烷或芳香族取代基 N-烷基化,并进一步地在取代基和肽或肽类似物的末端氨基之间包含间隔基团,其中间隔基团为烷基,优选地选自亚甲基、亚乙基、亚丙基和亚丁基。所述芳香族取代基可以是萘-2-基基团,或者被一个或两个卤素原子和/或烷基取代的芳环。

[0053] 还可能包括对活性无不利影响的其它修饰,这些修饰包括以 D 异构体形式的氨基酸替代一个或多个天然 L 异构体形式的氨基酸。因此,任何天然以 L 异构体形式存在的氨基酸 (根据该化学实体的结构,其也可以被称为 R 或 S) 均可以被手性相反但化学结构类型相同的氨基酸或肽模拟物 (通常被称为 D 型氨基酸,但可以另外被称为 R 或 S 型) 替代。因此,拟肽可能包括 1、2、3、4、5 个或至少 50% 的 D-氨基酸残基,或全部为 D-氨基酸残基。包括一部分 D 残基或全部为 D 残基的拟肽有时被称作“反向 (inverso)”肽。

[0054] 拟肽也包括逆向 (retro) 肽。逆向肽具有逆向的氨基酸序列。拟肽还包括逆向反向 (retro inverso) 肽,其氨基酸顺序是反向的,因此原始的 C-端氨基酸出现在 N 末端,且用 D-氨基酸取代 L-氨基酸。WO 2008/014917 描述了 Tat-NR2B9c 的逆向反向类似物,所述逆向反向类似物具有氨基酸序列 vdseisslk-rrrqrkkrgyin (SEQ ID NO:69) (小写字母表示 D 氨基酸),并报道了其可有效地抑制脑缺血。本文中所描述的另一种有效的肽为 Rv-Tat-NR2B9c (RRRQRRKRGYKLSSIESDV; SEQ ID NO:70)。

[0055] 连接体 (linker), 例如,聚乙二醇连接体,可用来二聚化所述肽或所述拟肽的活性部分,从而增强它对包含串联 PDZ 结构域的蛋白的亲合力以及选择性。参见:例如, Bach et al., (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48:9685-9689 和 WO 2010/004003。包含 PL 基序的肽优先通过连接两个这样的分子 N-端而被二聚化,而使 C 末端处于游离状态。Bach 进一步报道了五聚体肽 IESDV (SEQ ID NO:71) 可有效抑制 NMDAR 2B 与 PSD-95 的结合,所述五聚体肽来自 NMDAR 2B 的 C-末端。IETDV (SEQ ID NO:73) 可用来代替 IESDV。可选地,可串联加入大约 2-10 个拷贝的 PEG (聚乙二醇) 作为连接体。可选地,所述连接体也可以附着于内化肽上或被脂化以增强细胞摄取。说明性的二聚体抑制剂实例如下所示 (参见: Bach 等, PNAS 109 (2012) 3317-3322)。本文公开的任何 PSD-95 抑制剂都可以代替 IETDV,且任何内化肽或脂化部分都可用来代替 tat。也可以使用所示出的其它连接体。



[0057] IETAV为SEQ ID NO:26,YGRKKRRQRRR为SEQ ID NO:2, rrrqrrkkr,为SEQ ID NO:10,小写字母表示D-氨基酸。

[0058] 如果需要的话,在以本申请描述的灵长类动物和临床试验进行测试之前,可以使用以前描述的大鼠中风模型来确认肽、肽模拟物或其它试剂的适当的药理学活性。也可以使用描述于例如US 20050059597(通过引入而并入本文)中的分析方法,对肽或肽模拟物抑制PSD-95和NMDAR2B之间相互作用的能力进行筛选。在这样的分析中,可用的肽通常具有不超过50 $\mu$ M,25 $\mu$ M,10 $\mu$ M,0.1 $\mu$ M或0.01 $\mu$ M的IC<sub>50</sub>值。优选的肽通常具有介于0.001至1 $\mu$ M之间的IC<sub>50</sub>值,更优选地为0.05至0.5或0.05至0.1 $\mu$ M。当肽或其它试剂被表征为抑制一种相互作用(例如,PSD-95与NMDAR2B之间的相互作用)的结合时,这样的描述不排除该肽或试剂也抑制另外的相互作用,例如抑制PSD-95与nNOS的结合。

[0059] 可以任选地对肽,例如,刚才所描述的肽进行衍生化(例如,乙酰化、磷酸化、豆蔻酰化、香叶基化(geranylated)、聚乙二醇化和/或糖基化),以提高该抑制剂的结合亲和力、提高抑制剂跨细胞膜运输的能力或提高稳定性。作为具体的实例,对于其中自C末端起第3个残基为S或T的抑制剂,在使用该肽之前,该残基可以被磷酸化。

[0060] 药剂可被连接到内化肽上,从而促进细胞摄取和/或穿越血脑屏障。众所周知,内化肽是一类相对较短的肽,其可以使许多细胞的或病毒的蛋白质穿过膜。内化肽(也被称为细胞膜转导肽或细胞穿透肽)可以具有,例如,5-30个氨基酸。这样的肽通常具有阳离子电荷,所述阳离子电荷来自高于正常值(相对于普通蛋白质)的精氨酸和/或赖氨酸残基,这被认为可以促进穿膜。一些这样的肽具有至少5,6,7或8个精氨酸和/或赖氨酸残基。其实例包括触角足蛋白(Bonfanti,Cancer Res.57,1442-6(1997))(及其变体)、人类免疫缺陷病毒的tat蛋白、VP22蛋白(单纯疱疹病毒1型的UL49基因的产物)、穿透素(Penetratin)、SynB1和3、转运素(Transportan)、两性分子(Amphipathic)、gp41NLS、聚精氨酸以及几种植物和细菌蛋白质毒素,例如蓖麻毒素、相思豆毒素、蒴莲根毒蛋白、白喉毒素、霍乱毒素、炭疽毒素、热不稳定毒素和绿脓假单胞菌外毒素A(ETA)。下列参考文献以及附录中(皆通过引用并入本文)描述了其它例子,参见: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。

[0061] 优选的内化肽为来自HIV病毒的tat。在以前的工作中报道的tat肽包含在HIVtat蛋白中发现的标准氨基酸序列YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO: 2)或由其组成。如果在这样的tat

基序的侧翼存在额外的残基(除了该药剂以外),这些残基可以为例如来自tat蛋白的位于该片段侧翼的天然氨基酸;或为典型地用来连接两个肽结构域的间隔区或连接体氨基酸,例如gly (ser) 4(SEQ ID NO:44),TGEKP(SEQ ID NO:45),GGRRGGGS(SEQ ID NO:46)或LRQRDGERP(SEQ ID NO:47)(参见:例如,Tang等(1996),J.Biol. Chem.271,15682-15686; Hennecke等(1998),Protein Eng.11,405-410);或可以为不显著降低在无侧翼残基的情况下赋予变体的摄取能力的任何其它氨基酸。优选地,在YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:2)的任一侧,除了活性肽以外的侧翼氨基酸的数量不超过10个。一个包含位于 YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:2)C末端侧翼的额外氨基酸残基的合适tat 肽为YGRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:48)。然而,优选地,不存在侧翼氨基酸。其它可以利用的tat肽包括GRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:4)和GRKKRRQRRRP(SEQ ID NO:72)。

[0062] WO/2008/109010中描述了与N型钙通道结合能力减弱的以上tat肽的变体。这样的变体可以包含氨基酸序列XGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:49) 或由其组成,其中X为除了Y以外的氨基酸、或为空缺(在此情况下,G 为游离的N末端残基)。优选的tat肽的N末端Y残基被F替换。因此,优选包含FGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:3) 或由其组成的tat肽。另一个优选的变体tat肽由GRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)组成。另一个优选的 tat肽包含RRRQRRKKRG或RRRQRRKKRGY(SEQ ID NO:70的第1-11 或1-10位氨基酸)或由其组成。促进药剂的吸收而不抑制N型钙通道的其它tat衍生肽包括列于以下表中的那些肽。

[0063]

X- <u>FGRKKRRQRRR</u> (F-Tat) (SEQ ID NO:8)
X-GKKKKKKQKKK (SEQ ID NO:50)
X- <u>RKKRRQRRR</u> (SEQ ID NO:51)
X- <u>GAKKRRQRRR</u> (SEQ ID NO:52)
X- <u>AKKRRQRRR</u> (SEQ ID NO:53)

[0064]

X- <u>GRKARRQRRR</u> (SEQ ID NO:54)
X- <u>RKARRQRRR</u> (SEQ ID NO:55)
X- <u>GRKKARQRRR</u> (SEQ ID NO:56)
X- <u>RKKARQRRR</u> (SEQ ID NO:57)
X- <u>GRKKRRQARR</u> (SEQ ID NO:58)
X- <u>RKKRRQARR</u> (SEQ ID NO:59)
X-GRKKRRQRAR (SEQ ID NO:60)
X-RKKRRQRAR (SEQ ID NO:61)
X- <u>RRPRRPRRPRR</u> (SEQ ID NO:62)
X- <u>RRARRARRARR</u> (SEQ ID NO:63)
X- <u>RRRARRRARR</u> (SEQ ID NO:64)
X- <u>RRRPRRRPRR</u> (SEQ ID NO:65)
X- <u>RRPRRPRR</u> (SEQ ID NO:66)
X- <u>RRARRARR</u> (SEQ ID NO:67)

[0065] X可以表示游离的氨基末端、一个或多个氨基酸或缀合的部分。可以以反向或逆向或逆向向的形式使用内化肽，其中连接的肽或肽模拟物是或不是这样的形式。例如，优选的嵌合肽具有包括YGRKKRRQRRR-KLSSIE SDV (SEQ ID NO:6, 又名NA-1或Tat-NR2B9c) 或YGRKKRRQRRR-KLSSIE TDV (SEQ ID NO:7) 或由该序列组成的氨基酸序列。其它优选肽包括RRRQRKRGY-KLSSIESDV (SEQ ID NO:70, 又名RvTat-NR2B9c, 或者具有包括RRRQRKRGY-KLSSIETDV (SEQ ID NO:37) 或由该序列组成的氨基酸序列)。

[0066] 可以通过常规方法将内化肽连接到药剂上。例如，可以通过化学连接（例如通过偶联或缀合剂）将药剂连接到内化肽上。许多这样的化学试剂在市场上有售，S.S.Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991) 中论述了这些试剂。交联试剂的一些实例包括J-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶二硫基)-丙酸酯 (SPDP) 或N, N'-(1,3-亚苯基) 双马来酰亚胺; N, N'-亚乙基-双-(碘代乙酰胺) 或其它具有6至11个碳亚甲基桥的试剂 (其对巯基基团相对特异); 和1,5-二氟-2,4-二硝基苯 (其与氨基和酪氨酸基团形成不可逆的连接)。其它交联试剂包括p, p'-二氟-m, m'-二硝基二苯基砒 (其与氨基和酚基形成不可逆连接); 己二酰亚氨酸二甲基酯 (其对氨基基团特异); 苯酚-1,4-二磺酰氯 (其主要与氨基基团起反应); 六亚甲基二异氰酸酯或二异硫氰酸酯, 或偶氮苯基-p-二异硫氰酸酯 (其主要与氨基基团起反应); 戊二醛 (其与几种不同的侧链起反应) 和重氮对二氨基联苯 (disdiazobenzidine) (其主要与酪氨酸和组氨酸起反应)。

[0067] 当药剂为肽时，可以通过产生融合蛋白来实现与内化肽的连接，所述融合蛋白包

含融合到,优选地在其N末端融合到,内化肽的肽序列。

[0068] 除了将抑制PSD-95的肽(或其它试剂)与内化肽连接,抑制PSD-95的肽还可以与脂类连接(脂化(lipidation)),从而仅增加与该肽相关的缀合物的疏水性,从而促进连接肽跨越细胞膜和/或血脑屏障。脂化优选在N末端氨基酸上进行,但也可以在内部氨基酸上进行,只要肽抑制PSD-95和 NMDAR 2B相互作用的能力没有降低到50%以上。优选地,脂化是在除了C末端最后四个氨基酸的氨基酸上进行的。脂类是溶于乙醚而不溶于水的有机分子,包括脂肪酸,甘油酯和甾醇类。合适的脂化形式包括豆蔻酰化,棕榈酰化,或添加其它脂肪酸(优选具有10-20个碳原子的链长度,例如,月桂酸和硬脂酸)以及香叶基化(geranylation)、牻牛儿基化(geranylgeranylation)和异戊二烯化。发生在天然蛋白翻译后修饰中的脂化类型为优选。将脂肪酸通过氨基连接到肽N末端氨基酸的 $\alpha$ -氨基基团而实现的脂化同样是优选的。脂化也可能是通过含有预脂化(pre-lipidated)氨基酸的肽合成进行的(在体外酶促进行),或通过重组表达、化学交联或肽化学衍生进行。被豆蔻酰化和其他脂质修饰的氨基酸可以商业获取。

[0069] 脂化优选促进联合肽(例如,KLSSIESDV (SEQ ID NO:5) 或 KLSSIETDV (SEQ ID NO:43)) 穿过细胞膜和/或血脑屏障,而不引起血压的瞬间下降,如与标准tat肽被高剂量给药时(例如,等于或大于3mg/kg) 出现的血压瞬间下降情况一样,或至少比连接到标准tat肽的相同肽引起更轻微的血压下降。

[0070] 药理学肽(可选地,与tat肽融合)可以通过固相合成或重组方法来合成。可以使用多种描述于科学和专利文献中的程序和方法合成拟肽,这些文献,例如,Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman等(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。

[0071] III. 疾病

[0072] 所述冻干制剂用于治疗多种疾病,尤其是神经疾病,特别是部分由兴奋毒性引起的疾病。该类疾病包括中风、癫痫、低氧、蛛网膜下腔出血、CNS创伤(与中风不关联,例如,创伤性脑损伤和脊髓损伤)、其它的脑缺血、阿尔茨海默病和帕金森氏病。可采用本发明药剂治疗的其它神经性疾病包括焦虑和疼痛,其与兴奋毒性是否相关尚未知。

[0073] 无论何种原因,中风是由CNS区域血流量受损引起的症状。潜在的原因包括栓塞、脑出血和血栓形成。由于血流量受损,一些神经细胞立即死亡。这些细胞释放包括谷氨酸在内的组分分子,谷氨酸进而激活NMDA受体,导致细胞内钙水平和胞内酶水平增加,从而导致进一步的神经细胞死亡(兴奋毒性级联反应, excitotoxicity cascade)。CNS组织的死亡被称为梗塞(infarction)。梗塞体积(即,大脑中由中风所导致的死亡神经细胞的体积) 可作为由中风所引起的病理损伤程度的一项指标。症状结果取决于梗塞体积和梗塞在大脑中的位置。残疾指数可用于衡量症状损伤,例如,Rankin 中风结果量表(Rankin Stroke Outcome Scale) (Rankin, Scott Med J; 2:200-15 (1957)) 和Barthel指数(Barthel Index)。Rankin量表是基于直接评估受试者的整体状况,如下:

[0074] 0: 毫无症状。

[0075] 1: 尽管有症状,但无明显残疾;能够进行所有平常的活动。

[0076] 2: 轻微的残疾;无法进行所有之前的活动,但是生活能够自理。

- [0077] 3: 中度残疾; 需要一些帮助, 但走路不需要帮助。
- [0078] 4: 中度到重度残疾; 没有帮助时无法行走, 没有帮助时生活无法自理。
- [0079] 5: 重度残疾; 卧床不起, 大小便失禁, 需要持续的护理和照看。
- [0080] Barthel指数基于一系列关于患者执行10项基本日常生活活动的能力的问题, 产生0到100的得分, 较低的分值表示更大程度的残障 (Mahoney 等, Maryland State Medical Journal 14:56-61 (1965))。
- [0081] 可选地, 中风严重程度/结果也可以利用NIH中风量表进行评估, 该量表可以在万维网[www.ninds.nih.gov/doctors/NIH Stroke ScaleJBooklet.pdf](http://www.ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_ScaleJBooklet.pdf) 获取。
- [0082] 该量表是基于受试者进行11项功能的能力, 包括评估受试者的意识、运动、感官和语言能力水平。
- [0083] 更确切地说, 缺血性中风是指一类由于流向大脑的血液堵塞引起的中风。这种类型的堵塞的根本情况是最常见的在血管壁形成脂肪沉积。这种情况被称为动脉粥样硬化。这些脂肪沉积会导致两种类型的梗阻。脑血栓症是指血栓(血块)在血管阻塞部分的形成。“脑栓塞”通常是指在循环系统另一个位置形成的血凝块, 通常是心脏、上胸部大动脉和颈部。一部分血凝块随后脱落, 进入血液中, 穿过大脑的血管, 直到到达太小而无法让其过的血管。栓塞的第二个重要原因是心律不齐, 被称为房颤。房颤创造了条件, 凝块可以在心脏形成, 排出, 移动到脑部。缺血性中风的其他潜在原因是脑出血、血栓形成、动脉或静脉解剖、心脏骤停、任何原因(包括脑出血)的休克以及医源性原因, 例如, 脑部血管或流向脑部的血管的直接手术损伤或心脏手术)。缺血性中风约占所有中风病例的83%。
- [0084] 短暂性缺血发作(TIAs)是较轻微或警示性中风。在TIA中, 存在指示缺血性中风的情况, 并出现典型的中风警示信号。然而, 梗死(血块)短时间存在, 并趋于通过正常机制而自身溶解。经历心脏手术的患者尤其具有短暂性脑缺血发作的风险。
- [0085] 出血性中风约占约17%的中风病例。其由破裂并导致血液流进周围脑部的脆弱血管引起。血液积累并压迫周围的脑组织。两类典型的出血性中风为脑内出血和蛛网膜下腔出血。出血性中风由脆弱血管的破裂引起。导致脆弱血管破裂的潜在原因包括高血压性出血, 其中高的血压导致血管破裂; 或其他导致脆弱血管的原因, 例如破裂的脑血管的畸形, 包括脑动脉瘤、动静脉畸形(AVM)或海绵状血管畸形。出血性中风也可以由缺血性中风的出血性转化而引起, 所述缺血性中风弱化了梗死中的血管; 或由包含异常弱的血管的CNS中的原发性或转移性肿瘤的出血引起。出血性中风也可以由医源性原因引起, 例如对脑部血管的直接手术损伤。动脉瘤是弱化的血管区域的膨胀。如果不进行治疗, 动脉瘤将继续弱化直至其破裂并流血入脑部。动静脉畸形(AVM)是一串异常形成的血管。海绵状血管畸形是静脉畸形, 能够导致从弱化的静脉结构的出血。这些血管的任何一个都可能破裂, 也导致血液流进脑部。出血性中风也可以由物理创伤引起。在脑的一个部分中的出血性中风可以通过血液的缺乏(在出血性中风中流失)而引起另一个部位的缺血性中风。
- [0086] 一类适合接受治疗的患者为经历手术的患者, 所述手术涉及或可能涉及供应脑部、或位于脑部或CNS中的血管。一些例子为经历心肺转流术、颈动脉支架置入术、脑部或主动脉弓冠状动脉的诊断性血管造影术、血管手术或神经手术的患者。这样的患者的更多例子已在以上第IV部分讨论过。特别适合的是患有脑动脉瘤的患者。可以通过多种手术对这样的患者进行治疗, 所述手术包括剪掉动脉瘤以阻断血液, 或进行血管内手术以小线圈来

封闭动脉瘤、或向出现动脉瘤的血管中植入支架、或置入微导管。血管内手术比剪掉动脉瘤具有较小的侵入性,与较好的患者结果相关,但该结果仍然包括高发生率的小梗死。可以用 PSD95 与 NMDAR2B 相互作用的抑制剂、特别是以上所描述的化学剂,包括肽 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO:6,也被称为 Tat-NR2B9c),对这样的患者进行治疗。相对于实施手术的用药时间可以按以上在临床试验中所描述的进行。

[0087] 另一类适合接受治疗的患者是患有带有动脉瘤或不带有动脉瘤的蛛网膜下腔出血的患者(参见US61/570264)。

[0088] IV. 有效的用药方案

[0089] 复原后,施用冻干制剂,从而使得所述活性试剂(例如, NR2B9c)以能够使正在接受治疗的患病患者的至少一种病兆或病症被有效地治疗、降低或抑制进一步恶化的剂量、频率和用药途径被施用。

[0090] 有效治疗的剂量是指,相对于未使用本发明药剂进行治疗的对照患病患者(动物模型)群体的损伤,所述活性试剂的剂量足以使患有疾病并以本发明化学剂治疗的患者(或动物模型)群体的至少一种病兆或病症被有效地治疗、降低或抑制进一步恶化。相较于未使用本发明所述方法进行治疗的对比患者的对照群体中的平均结果,如果接受治疗的患者个体达到的效果更好,那么所述剂量也被认为是治疗有效的。治疗有效的方案(regime)包括按达到预期目的所需要的用药频率和途径来施用治疗有效的剂量。

[0091] 对于患有中风或其它缺血症状的患者,所述活性试剂的施用方案包括对降低中风或其它缺血性病症的损伤效应有效的施用量、频率和途径。当需治疗的疾病是中风时,可以通过梗死的体积或残障指数,对结果进行确定,如果治疗的患者个体的残障在 Rankin 量表上表现为2或以下以及在 Barthel 量表上表现为75或以上,或如果治疗患者群体比相当的未经治疗的群体在残障量表上显示出显著改善的分值分布(即,较少的残障),则剂量被视为治疗上有效的,参见 Lees et al, N Engl J Med 2006;354:588-600。单剂量的药剂通常足以治疗中风。

[0092] 本发明也提供用于在具有失调危险的受试者中预防该失调的方法和组合物。通常,与对照群体相比较,这样的受试者出现失调(例如,病态、不适、失调或疾病)的可能性增加。对照群体例如可以包括随机选自一般群体(例如,按年龄、性别、人种和/或种族进行匹配)、没有被诊断的或具有该失调的家族史的一个或多个个体。如果发现受试者和失调相关“危险因素”间具有联系,则受试者可以被认为具有失调的危险。危险因素可以包括,例如通过对受试者群体进行统计学或流行病学研究而得到的、与给定的失调相关的任何活动、性状、事件或特性。即使鉴别潜在危险因素的研究没有特别地包括该受试者,受试者也可以因此被分类为具有失调风险。例如,经历心脏手术的受试者具有短暂性脑缺血发作的风险,因为与没有经历心脏手术的受试者群体相比较,经历了心脏手术的受试者群体中短暂性脑缺血发作的频率增加。

[0093] 其它常见的中风危险因素包括年龄,家族史,性别,先前发生过中风,短暂性缺血发作或心脏病发作,高血压,吸烟,糖尿病,颈动脉或其它动脉疾病,心房颤动,其它心脏病(例如心脏病、心力衰竭、扩张型心肌病、心脏瓣膜疾病和/或先天性心脏病),高血胆固醇,以及高饱和脂肪、反式脂肪或胆固醇的饮食。

[0094] 在预防过程中,将复原后的冻干制剂以足以阻止、延迟或抑制所述疾病的至少一

种病兆或病症的发展的剂量、频率和途径给药给具有患病风险但尚未患病的患者。有效预防的剂量是指,相较于具有患病风险但未使用本发明的嵌合剂进行治疗的对照患者(或动物模型)群体,足以有效地预防、抑制或延迟具有患病的风险且使用所述试剂进行治疗的患者(或动物模型)群体的至少一种病兆或病症的试剂量。相较于未使用本发明所述方法进行治疗的可比患者的对照群体中的平均结果,如果接受治疗的个体患者达到的效果更好,那么所述剂量也被认为预防有效的。预防有效的方案包括在达到预期目的所需要的频率和用药途径下以预防活性剂量给药。对于处在紧迫的中风风险(比如,正在接受心脏手术的患者)中的患者的中风预防,单剂量药剂通常是足够的。

[0095] 根据所述试剂而定,给药(方式)可以是肠胃外的、静脉内的、经鼻的、口服的、皮下的、动脉内的、颅内的、鞘内的、腹膜内的、局部的、鼻内的或肌内的。对于肽试剂,优选为静脉给药。

[0096] 对于给人类用药,优选的活性试剂(例如,TAT-NR2B9c)剂量为2-3mg/kg,更优选为2.6mg/kg。所示剂量应被理解为包括在典型的医院条件下可测定的剂量在精度上所固有的误差幅度。这样的量为用于单剂施用,即,每疾病发作期一剂。

[0097] 活性试剂,例如TAT-NR2B9c,优选为通过输注进入血管进行输送,更优选为通过静脉输注输送。输液的时间可以影响副作用(例如由于肥大细胞脱粒和组胺的释放)和功效。通常,对于给定的剂量水平,较短的输液时间更有可能导致组胺的释放。然而,较短的输液时间也可能导致改良的功效。尽管本发明的实施不依赖于对机制的理解,但后一种结果可以解释为:相对于患者病状的发展,延迟将是显著的,以及相对于嵌合剂的血浆半衰期,延迟将是显著的,由此嵌合剂达不到最佳的治疗水平。对于嵌合剂 Tat-NR2B9c,在这些因素之间提供平衡的优选输液时间为5-15分钟,更优选为10分钟。所示时间应被理解为包括 $\pm 10\%$ 的误差。输液时间不包括任何用于洗脱输注(洗脱已经完成的最初输液的任何残留液滴)的额外时间。用于Tat-NR2B9c的输液时间也可以充当其它药剂的指导。

[0098] 尽管为了便于清楚理解,本发明已被详细描述,某些修改仍可在所附权利要求的范围内实施。出于所有目的,本申请中引用的所有发表刊物、序列号和专利文献的全部内容均以引用的方式并入本申请中,如同其单独被引用的程度。某种程度上,在不同时间段,某个序列号不止与一条序列相关联,与序列号相关联的序列是指本申请有效递交日时的序列。有效申请日是公开争议序列号的最早优先权申请的日期。除非上下文中另有明确说明,否则本发明的任何要素、具体实施例、步骤、特征或形式可以任意组合实施。

[0099] 具体实施例

[0100] 实施例1:验证标准缓冲液和赋形剂不会干扰NA-1在体内的效力

[0101] 制备5种NA-1浓度均为20mg/mL的液体毒理制剂。表1包括赋形剂组分、编号以及制备时的效力、纯度和pH。将大约5mL每种制剂装入小瓶用以测试。 $-20^{\circ}\text{C}$ 冷冻小瓶,以模拟运输或液体储存条件。

[0102] 表1:NA-1制剂组合物在体内的效力试验

[0103]

制剂#	赋形剂组分	PTek 编号#	效力 <sup>1</sup> (mg/mL)	纯度 <sup>2</sup> (NA-1 峰面积%)	pH <sup>3</sup>
1	50 mM 磷酸钠、 76.9mM NaCl, pH 7.0	1205-1-17-1	20.5	97.87	6.7
2	50 mM 磷酸钠、154 mM 甘露醇, PH 7.0	1205-1-17-2	20.0	96.34 <sup>2</sup>	6.5
3	50 mM 组氨酸、154 mM 甘露醇, PH 6.5	1205-1-17-3	19.9	98.38	6.4
4	50 mM 组氨酸、154 mM 海藻糖, PH 6.5	1205-1-17-4	20.8	99.16	6.4
5	50 mM 组氨酸、 5%右旋糖酐-40, PH 6.5	1205-1-18-1	19.4	98.81	6.4

[0104] <sup>1</sup>效力和纯度采用TFA方法通过RP-HPLC分析进行评估。

[0105] <sup>2</sup>制剂#2的纯度明显低于其它制剂。

[0106] <sup>3</sup>磷酸盐缓冲的制剂的pH明显偏离其初始缓冲液的pH(7.0)。

[0107] 需要注意的是,磷酸盐缓冲的制剂不能像组氨酸缓冲液一样维持制剂和试验之间的pH,这表明组氨酸可能是更佳的制剂缓冲液。

[0108] 制剂1-5在大鼠3-软脑膜血管阻塞(3PVO)中风模型中进行试验。患有中风的大鼠通过静脉给药被施用所述制剂中的一种,所述制剂进入股静脉,然后,所述动物在中风24小时后被处死。收集大脑,固定,并使用氯化三苯基四氮唑(TTC)进行染色,以显现出大脑的缺血部分。相对于仅仅注射生理盐水的对照样品,所有的试验制剂都可以为动物提供显著的神经保护作用(图1)。

[0109] 方法

[0110] 缺血性3-软脑膜血管闭塞模型

[0111] 试验在大鼠身上进行。如前所述实施永久性的3-软脑膜血管闭塞(3PVO)(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)。简而言之,以0.5ml/kg肌内注射氯胺酮(100mg/kg)、乙酰丙嗪(2mg/kg)和甲苯噻嗪(5mg/kg),对250g至350g的大鼠进行麻醉,需要时,辅以初始剂量的三分之一。插入肛门温度探针,并且将动物置于温度保持在约37°C的加热垫上。颅骨经正中切口被暴露出来,并被刮擦去掉组织。使用解剖显微镜和气动牙钻,通过穿过颅骨钻一个矩形,保持硬脑膜完整的同时剥离颅骨块,从而在右侧体感皮质区上产生6-8mm的

颅骨窗口(尾侧2mm和外侧至前囟5mm)。围绕选定的桶状皮层,烧灼3- 软脑膜小动脉大脑中动脉分支(3pial arteriolar middle cerebral artery branches),并穿过硬脑膜进行电灼烧。灼烧后,缝合头皮。将每只大鼠放回各自的位于加热灯下的笼子里,以维持体温直到所述的大鼠完全恢复。提供食物和水。3PVO局部缺血一小时后,根据大鼠的体重,用溶在约0.45ml 生理盐水中的3nmol/g的NA-1制剂注射大鼠。给药过程超过5分钟。

[0112] 手术后24小时,快速收集上述大脑。通过大脑获得冠状切片(2mm),并在37°C下,在2%氯化三苯基四氮唑(TTC)(Sigma-AldrichSt.Louis MO)中温育15分钟。扫描图像(CanoScan4200F Canon)且测定数量。

[0113] 实施例2:测定NA-1在不同的缓冲液中和不同pH下的稳定性

[0114] 缓冲液的筛选

[0115] 制备10种1mg/mL NA-1的缓冲液,以筛选赋形剂。样品被贮存在25°C /60%RH(相对湿度)和40°C/75%RH下。测试样品在t=0和t=1周的稳定性(纯度),通过RP-HPLC(TFA和MSA方法)测试样品的纯度,结果如表2和表3所示。

[0116] 结果表明,在pH6.0和pH6.5之间的液体介质缓冲液中的NA-1的稳定性提高。该范围以外(低于或高于这个范围),降解增加。由MSA方法得到的数据显示出明显的降解模式,所述降解模式与pH和缓冲液种类均相关,该数据为未来的制剂制备提供了有价值的借鉴。表2提供了使用MSA方法测定的主峰纯度结果,所述主峰纯度以HPLC面积%表示,而表3提供了使用TFA方法测定的主峰纯度结果,所述主峰纯度以HPLC面积%表示。

[0117] 表2:通过MSA方法测定的NA-1主峰面积%

[0118]

样品	t=0	t=1周25°C	t=1周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
磷酸盐,6.0	98.5	98.2	97.0
磷酸盐,6.5	98.5	97.9	97.3
磷酸盐,7.0	98.5	97.9	96.0
磷酸盐,7.5	98.5	97.6	95.2
柠檬酸盐,5.5	98.5	98.3	94.4
柠檬酸盐,6.0	98.5	98.4	97.4
柠檬酸盐,6.5	98.5	98.7	97.7

[0119] 表3:通过TFA方法测定的NA-1主峰面积%

[0120]

样品	t=0	t=1周25°C	t=1周40°C
His,6.0	98.5	98.8	99.2
His,6.5	98.5	98.4	99.4
His,7.0	98.5	98.3	96.7
磷酸盐,6.0	98.5	99.8	97.9
磷酸盐,6.5	98.5	99.5	98.6

磷酸盐,7.0	98.5	98.6	98.3
磷酸盐,7.5	98.5	98.0	93.2
柠檬酸盐,5.5	98.5	98.0	95.1
柠檬酸盐,6.0	98.5	99.0	98.2
柠檬酸盐,6.5	98.5	99.5	99.1

[0121] 结果表明,在pH6.0-6.5的缓冲介质中能够最佳地维持NA-1的溶液稳定性,且所述介质仍然能够良好地耐受静脉注射给药。通常,即使被保持在加速稳定性试验的条件下(在25℃或40℃下保持一周),组氨酸和柠檬酸盐缓冲体系也能够维持NA-1的完整形态。

[0122] 选择缓冲液种类时需考虑的几种因素是:在各种介质中出现的特定降解模式,以及在判断特定的相关物质是否需要避免时,任何已确认的相关物质或毒理的数据可使判断过程简单化。在试验期,pH6至pH6.5之间的组氨酸和柠檬酸盐缓冲液出现很少的降解物。用于本试验的组氨酸缓冲液本身含有杂质,所述杂质存在于没有添加NA-1的组氨酸缓冲液中。因此,对不含此种杂质的组氨酸供应商的鉴别将会使分析更为简单。表4从NA-1 稳定性方面给出了缓冲液种类的总结。

[0123] 表4:缓冲液种类的筛选

[0124]

种类	pH	优点	缺点
组氨酸	6.0	优良的稳定性,曾用于冻干应用,较好地处于缓冲范围内	色谱干扰,但色谱有可能通过新的组氨酸供应商得到改善
柠檬酸盐	6.0	提高的稳定性,曾用于冻干应用,较好地处于缓冲范围内	

[0125]

组氨酸	6.5	提高的稳定性,曾用于冻干应用,较好地处于缓冲范围内	色谱干扰,但色谱有可能通过新的组氨酸供应商得到改善
柠檬酸盐	6.5	优良的稳定性,曾用于冻干应用,较好地处于缓冲范围内	对于柠檬酸盐种类,目标 pH6.5 可能处在理想的缓冲范围边缘
磷酸盐	6.5	提高的稳定性,磷酸盐种类曾用于 NA-1 制剂	磷酸盐种类曾被避免用于冻干制剂

[0126] 实施例3:测定NA-1制剂在含有不同含量的氯化钠的组氨酸和柠檬酸盐缓冲液中以及在不同pH值下的稳定性

[0127] 该研究的目的是论证氯化钠(NaCl)对pH和液体制剂中的NA-1稳定性的影响。具有1mg/mL NA-1的缓冲液制剂列于表5,pH的结果如表6 所示。在整个研究期间,数据显示出非常一致的结果。但加入NaCl的柠檬酸盐中出现了明显的变化,其缓冲能力受到影响,且pH降低约0.2个单位。选定的pH 6.0和pH6.5处于柠檬酸盐的理想缓冲范围(pH 2.5-5.6)的外边

界,因此在制备过程中,各种添加剂可能会导致干扰,在评估制剂的稳健性时应考虑到这些干扰。

[0128] 表5:用于检测盐对pH的影响的缓冲液制剂

[0129]

介质#	缓冲液	目标pH	NaCl
1	50mM柠檬酸盐	6.0	NA
2	50mM柠檬酸盐	6.0	200mM
3	50mM柠檬酸盐	6.5	NA
4	50mM柠檬酸盐	6.5	200mM
5	50mM组氨酸	6.0	NA
6	50mM组氨酸	6.0	200mM
7	50mM组氨酸	6.5	NA
8	50mM组氨酸	6.5	200mM

[0130] 表6:在冷冻和加速温度条件下的NA-1制剂的pH稳定性

[0131]

介质#	缓冲液	目标 pH	测定的 pH t=0	测定的 pH t=0	测定的 pH t=1 周

[0132]

			介质	介质+NA-1	介质+NA-1
				-20 °C	40 °C/75%RH
1	柠檬酸盐	6.0	6.1	6.0	6.0
2		6.5	6.6	6.5	6.7
3	组氨酸	6.0	6.0	5.9	6.0
4		6.5	6.5	6.5	6.6
5	柠檬酸盐	6.0	5.8	5.8	5.8
6	+NaCl	6.5	6.3	6.2	6.3
7	组氨酸	6.0	6.1	6.0	6.0
8	+NaCl	6.5	6.6	6.6	6.7

[0133] 结果表明,不论是冷冻储存一周还是在40°C的加速温度下储存一周,向组氨酸和柠檬酸盐缓冲的NA-1溶液中添加200mM NaCl不会显著影响所述溶液的pH。

[0134] 接着,我们检测了在冷冻和加速温度下储存一周后NA-1在这些制剂中的稳定性。表7显示了采用RP-HPLC方法用MSA梯度测定的结果。所述数据同时示于图2A和2B中。图2A由左至右显示了使用pH归类的制剂的加速稳定性(低稳定性至高稳定性)。图2B显示了使用缓冲液归类的相对加速稳定性。

[0135] 表7:纯度(MSA方法),NA-1

[0136]

介质	pH 6.0		pH 6.5	
	-20 °C	40 °C	-20 °C	40 °C
组氨酸	98.1	92.8	98.5	96.9
组氨酸+NaCl	98.4	95.0	98.4	97.7
柠檬酸盐	97.5	96.0	99.0	97.5
柠檬酸盐+NaCl	98.4	96.7	98.7	98.4

[0137] 这些结果表明,在pH6.5时能够最佳地维持NA-1溶液的稳定性,NaCl 的添加对稳定性有轻微的改善(图2A和2B)。由于组氨酸缓冲液更好的缓冲能力和相当的稳定性,尤其是去除了相对保留时间(RRT)0.28迁移的杂质时(上表中包含了杂质面积,导致了对于NA-1峰面积来说较低的稳定值),因此pH6.5的组氨酸缓冲种类是应用于冻干研究的最佳剂型。

[0138] pH6.5下的介质可很好地耐受通过注射给药。

[0139] 实施例4:筛选使NA-1形成稳定的冻干蛋糕状的填充剂

[0140] 为了确定冻干后可产生漂亮的蛋糕状和改善稳定性的填充剂,我们按表8所示在50mM组氨酸缓冲液、填充剂和NaCl中配制了几种20mg/mL 的NA-1溶液。为了模拟NA-1制剂在冻干过程中暴露的时间和处理温度,这些样品被储存在-20 °C(对照)和40 °C/75%RH(测试)下,储存1周后,通过HPLC(MSA方法)分析纯度以及分析pH值。pH稳定性结果如表9所示,NA-1在不同的液体制剂中的稳定性结果如表10和图3所示。

[0141] 表8:填充剂样品模板

[0142]

介质#	缓冲液	填充剂	NaCl
1	50mM组氨酸,pH6.5	120mM甘露醇	
2	50mM组氨酸,pH6.5	120mM甘露醇	75mM
3	50mM组氨酸,pH6.5	120mM海藻糖	
4	50mM组氨酸,pH6.5	120mM海藻糖	75mM
5	50mM组氨酸,pH6.5	5%右旋糖酐-40	
6	50mM组氨酸,pH6.5	5%右旋糖酐-40	75mM

[0143] 表9:pH,填充剂样品

[0144]

介质	目标 pH	pH, -20°C	pH, 40°C
甘露醇	6.5	6.5	6.5
甘露醇+NaCl	6.5	6.5	6.5

[0145]

海藻糖	6.5	6.5	6.4
海藻糖+NaCl	6.5	6.5	6.4
右旋糖酐-40	6.5	6.5	6.3
右旋糖酐-40+NaCl	6.5	6.5	6.4

[0146] 表10:由NA-1峰面积%所表示的纯度,MSA方法

[0147]

介质#	介质	NA-1 峰面积%	
		-20°C	40°C
1	甘露醇	99.2	98.5
2	甘露醇+NaCl	99.4	98.6
3	海藻糖	99.1	98.5
4	海藻糖+NaCl	99.3	98.3
5	右旋糖酐-40	99.2	97.6
6	右旋糖酐-40+NaCl	99.0	97.7

[0148] 填充剂液体制剂对NA-1稳定性的结果

[0149] 甘露醇、海藻糖和右旋糖酐-40很好地将pH维持在6.5(表9),当液体制剂在高温下储存超过一周时,纯度约有1%的下降(表10)。就NA-1冻干填充溶液的化学稳定性而言,与右旋糖酐溶液相比,由于甘露醇和海藻糖为NA-1提供了更好的稳定性,因此甘露醇和海藻糖为优选的填充剂(图3)。

[0150] 实施例5:填充剂的热分析,以便于冻干周期的设计

[0151] 作为NA-1冻干药品的冻干周期改进的一部分,通过差示扫描量热法评估了来自填充剂样品模板(表8)的推荐的填充溶液的热特性(包括制剂的玻璃化转变温度(Tg))。结果列于表11中,DSC迹线如图4A-6B。

[0152] 表11:NA-1冻干填充溶液的玻璃化转变温度

[0153]

介质	Tg
50mM 组氨酸, pH6.5, 120mM 甘露醇	-37.25°C
50mM 组氨酸, pH6.5, 120mM 甘露醇, 75mMNaCl	-42.51°C

[0154]

50mM 组氨酸, pH6.5, 120mM 海藻糖	-28.25°C
50mM 组氨酸, pH6.5, 120mM 海藻糖, 75mMNaCl	-35.74°C
50mM 组氨酸, pH6.5, 5%右旋糖酐-40	-17.09°C
50mM 组氨酸, pH6.5, 5%右旋糖酐-40, 75mMNaCl	-22.49°C

[0155] 在浓度为20mg/mL的NA-1中,测试的NA-1制剂显示出的热曲线具有以下特征:宽的熔融结果,带有低温起点。这种延伸的熔融结果掩盖了常见于甘露醇制剂中的结晶化结果(crystallization event),这可能表明,稳固的冻干周期必须在产品没有超过玻璃化转变温度下进行。在这种情况下,基于观察到的所述NA-1药品填充溶液的玻璃化转变温度,使用甘露糖醇作为填充剂需要低于-40°C的初级干燥温度,是对可伸缩周期(scalable cycle)的可行性的典型限制。依据热曲线,海藻糖和右旋糖酐-40更适合用作填充剂。但是,考虑到NA-1在含有海藻糖的液体制剂中的稳定性比在含有右旋糖酐的液体制剂中的稳定性更高,因此在测试过的这些填充剂中,海藻糖是优选的填充剂。

[0156] 由于相对较低的Tg温度,其需要较长的冻干周期进行干燥,我们考虑了各种不同的标准填充剂,并希望减少装入容器密封系统内的填充体积,从而减少需要冻干的液体体积。为了努力减少填充体积且维持270mg/小瓶,进行了NA-1在组氨酸中(pH6.5)和组氨酸+海藻糖中(pH6.5)的溶解性研究。对35、50、75和100mg/mL的样品进行肉眼分析。所有的溶液在t=0和t=24小时是清澈的。基于该数据,我们可采用低于3mL的填充体积,使用90mg/mL的NA-1制剂在目标小瓶中将有270mg NA-1。可能要求小中具有很大范围的量的NA-1,但270mg将为一个100kg的患者提供2.6 mg/kg的剂量。假设用于患者给药的目标复原液的浓度仍为20mg/mL(但也可以是1mg/mL至100mg/mL),那么含有270mg NA-1的20mL小瓶就可以有13.5mL的复原体积。因此,NA-1在小瓶中冻干的最佳液体体积在2.5mL和10mL之间。

[0157] 在进行冻干前,对各种不同的填充剂进行了测定,所得的Tg示于表12中。同时使用DSC对组氨酸(pH6.5)中的100mg/mL NA-1进行评估,所得数据列于表12中。

[0158] 表12:DSC数据,制剂

[0159]

制剂	填充剂	介质		DP 填充溶液
		Tg	结晶化温度	Tg
1	山梨醇	-41.03 °C		
2	右旋糖	-38.78 °C		
3	蔗糖	-31.09 °C		
4	甘露醇	-37.38 °C	-22.91 °C	-35.49 °C
5	海藻糖	-29.93 °C		-28.25 °C
6	乳糖	-27.93 °C		
7	75:25 海藻糖:右旋糖酐	-25.07 °C		-25.07 °C
8	50:50 海藻糖:右旋糖酐	-22.60 °C		-22.60 °C
9	25:75 海藻糖:右旋糖酐	-18.55 °C		-18.55 °C
10	右旋糖酐-40			-17.09 °C
11	在组氨酸中的 100 mg/mLNA-1, pH6.5			-21.67 °C

[0160] 基于表12中的DSC数据,对于活性药品和无效对照剂均存在几种制剂选择。就Tg而言,通常制剂5和11对于活性产物是最理想的。任何填充剂都可适用于无效对照剂产物,但是如果退火,制剂4(甘露醇)具有最短的周期时间,如果外观与活性制剂相匹配,制剂4可能是最令人满意的。

[0161] 当我们确定最佳的活性制剂时,考虑溶液稳定性、冻干周期稳固性以及化学稳定性是非常重要的。表12中的制剂5(海藻糖)在加速条件下表现出了良好的溶液稳定性和低压冻干(lyophile)化学稳定性(数据随后显示),不过在13.5mL的填充配置(fill configuration)中需要较长的冻干周期。这种较长的周期时间不适合于将来的商业化生产。商业化生产期望更短的周期。表12中的制剂11(无填充剂,100mg/mL NA-1)相比制剂5具有更高的玻璃化转变温度,其允许更暖、更短的(冻干)周期。此外,减少填充体积将明显缩短操作时间,因为每个小瓶中有更少的冰需要升华。

[0162] 实施例6:具有不同的填充剂、规格和冻干条件的NA-1的稳定性

[0163] 加速稳定性(accelerated stability)的填充剂

[0164] 将小批量的NA-1药品冻干,以评估其在25°C、40°C和60°C下存储一周后的固体稳定性。在三种不同的介质中配制活性浓度为20mg/mL的 NA-1。对t=0和t=1周时的样品进行外观、复原、pH、数量以及纯度(纯度用HPLC(MSA方法)测定)方面的评估。只在t=0时评估含水量。

[0165] 所有的NA-1药品在t=0和t=1周时都呈白色、冻干蛋糕状,并在少于 10秒内被复

原。

[0166] 药品介质如表13所示,且列出了介质的各自玻璃化转变温度和含水量结果。pH、NA-1含量和NA-1纯度结果如表14-16所述。

[0167] 表13:填充剂样品模板(matrix),Tg和含水量%

[0168]

介质#	介质	Tg	t=0 含水量%
1	50mM 组氨酸, pH6.5+120mM 海藻糖	-29.93 °C -28.25 °C w/NA-1	0.29%
2	50mM 组氨酸, pH6.5+5%右旋糖酐-40	-22.60 °C	0.05%
3	50mM 组氨酸, pH6.5 +1:1 120mM 海藻糖:5%右旋糖酐-40	-17.09 °C w/NA-1	0.10%

[0169] 表14:pH,填充剂(Lyo)小规模实验#1

[0170]

填充剂	理论 pH	测定的 pH			
		t=0	t=1wk 25 °C	t=1wk 40 °C	t=1wk 60 °C
海藻糖	6.5	6.4	6.4	6.4	6.4
右旋糖酐-40	6.5	6.4	6.3	6.3	6.3
1:1 海藻糖:右旋糖酐	6.5	6.4	6.3	6.4	6.4

[0171] 表15:含量(mg/小瓶),填充剂(Lyo)小规模实验#1

[0172]

填充剂	t=0	t=1周25 °C	t=1周40 °C	t=1周60 °C
海藻糖	20.6	20.3	20.7	20.7
右旋糖酐-40	19.4	19.8	19.5	19.1
1:1海藻糖:右旋糖酐-40	20.3	20.8	20.2	20.2

[0173] 表16:纯度(由HPLC测定面积%),填充剂(Lyo)小规模实验#1

[0174]

填充剂	t=0	t=1周25 °C	t=1周40 °C	t=1周60 °C
海藻糖	98.8	98.8	98.8	98.4
右旋糖酐-40	98.9	98.9	98.6	96.5
1:1海藻糖:右旋糖酐-40	98.9	98.8	98.6	97.5

[0175] 海藻糖、右旋糖酐-40以及海藻糖:右旋糖酐-40,这三种填充剂皆可将pH维持在6.5(表14),在60 °C下一周后,纯度有0.5-2.5%幅度的下降。含有右旋糖酐-40的药物产品和60 °C下储存的药物产品都在保留时间(RT) ~6.0显示出了相关物质的增长。这些相关物质不存在于海藻糖样品中,这表明海藻糖在冻干的药品中具有稳定效应,而右旋糖酐-40可产生特定的降解产物。

[0176] 在填充剂中包含右旋糖酐-40可允许更暖的初级干燥温度,但右旋糖酐-40作为填充剂显示出最差的稳定性。海藻糖和右旋糖酐-40 (1:1) 的组合导致玻璃化转变温度与单独的海藻糖约暖了10°C。但是,在60°C时,组合的稳定性介于单独的海藻糖和单独右旋糖酐样品之间,所以海藻糖为优选的填充剂。

[0177] 冻干NA-1制剂的制备:小型实验#2

[0178] 将小批量的NA-1药品冻干以评估初级干燥期间将搁板温度设置为5°C的情况。以27mg/mL的活性浓度将NA-1混合在pH6.5的50mM组氨酸和 120mM海藻糖中。周期参数如表17所示。4个20mL的玻璃冻干瓶被装入了10mL混合液。使用温度探针对两个小瓶进行探测。

[0179] 表17:小型实验2,NA-1制剂的制备

[0180]

功能	温度 (°C)	无变化/变化速率	变化速率 (°C/分钟)	时间 (分钟)	压力 (mTorr)
装载	5	无变化	-	0	环境压力
平衡	5	无变化	-	120	环境压力
冷冻	-40	变化速率	0.5	90	环境压力
冷冻	-40	无变化	-	240	环境压力

[0181]

初级干燥 <sup>1</sup>	5	变化速率	0.25	180	225
初级干燥 <sup>1</sup>	5	无变化	-	2050	50
次级干燥	25	变化速率	0.1	200	50
次级干燥	25	无变化	-	1440	50
加塞	20	无变化	-	-	氮压/环境压力
卸载	20	无变化	-	-	环境压力

[0182] <sup>1</sup>初级干燥温度是基于大的瓶尺寸和填充体积,与玻璃化转变温度不直接关联。

[0183] 由于大的填充体积,则需要将搁板温度设置得比玻璃化转变温度暖得多,以弥补蒸发冷却。初级干燥期间的溶液温度为-29°C,该温度接近由DSC 热分析得出的玻璃化转变温度-28°C。

[0184] 低压冻干的90mg/mL NA-1的加速稳定性(小型实验3)

[0185] 在配制小型实验3的填充溶液之前,测定在缓冲液(50mM组氨酸, pH 6.5)中的90mg/mL NA-1的pH。所述溶液的pH为6.04。确定的是随着NA-1浓度的增大,缓冲能力也需要增强。在150mM、100mM和75mM 的组氨酸缓冲液中以及水中制备溶液,并测定pH。pH如表18所示。在pH 6.5的100mM组氨酸缓冲液中配制小型实验3溶液,在加入NA-1之后重新调整pH至6.5。

[0186] 表18:pH,90mg/mL NA-1在pH 6.5的组氨酸缓冲液中

[0187]

缓冲液	pH
水	5.39
50mM	6.04
75mM	6.04
100mM	6.29
150mM	6.14

[0188] 将小批量的NA-1药品冻干,以评估其在25°C和60°C下储存一周后的固体稳定性。配制两种90mg/mL的NA-1制剂(缓冲液和带有海藻糖的缓冲液)。对t=0和t=1周时的样品进行外观、复原、含水量以及纯度(纯度用HPLC(MSA方法)测定)方面的评估。

[0189] 所有的NA-1药品都呈白色、冻干蛋糕状。某些蛋糕破裂。无效对照剂与活性制剂肉眼看起来很相似。

[0190] 相对于前述制剂少于10秒的复原时间,(此处所述)复原时间约为1.5分钟。复原时间增加最有可能是因为NA-1和组氨酸的浓度增大引起的。进一步的试验表明,在浓度为50mM和75mM的组氨酸缓冲液中的NA-1的稳定性良好,且再悬浮时间缩短。另外,由于本实验采用2mL体积的小瓶,因此低压冻干中仅能加入1mL水。该小型实验配置中的实际复原体积为4.5mL。当采用较大的稀释体积时,复原时间最有可能得到改善。

[0191] 将小瓶置于25°C和60°C下储存一周后,测定其稳定性。

[0192] 根据肉眼所观察的外观数据,海藻糖样品提供了更优良的蛋糕状。冻干周期保守地运行超过5天,初级干燥温度为-32°C。基于温度探针数据,该周期可被缩短,这表明随着浓度增加和填充体积减小,优化周期将会缩短。

[0193] 纯度结果列于表19。

[0194] 表19:纯度(由HPLC测定的面积%),小型实验3

[0195]

制剂	组分	填充溶液	t=0	t=1周 25°C/60%RH	t=1周 60°C
1	100 mM 组氨酸, pH6.5	99.2	99.3	99.3	97.8
2	100 mM 组氨酸, pH 6.5 +120 mM 海藻糖	99.2	99.3	99.2	98.7

[0196] 根据该加速稳定性数据,海藻糖对NA-1制剂显示出稳定效应,所述稳定效应提高了低压冻干的化学稳定性。令人意外的是,海藻糖能够提供这种稳定效应,而其它的标准填充剂(例如用于其它肽的右旋糖酐和甘露醇)不能提供这种稳定效应。

[0197] 减少填充体积可使周围小瓶的蒸发冷却最小化,且最大限度地减少水升华的阻力。

[0198] 冻干周期的进行-小型实验4(无效对照剂和活性剂)

[0199] 开始冻干周期的小型实验4,以测定3mL填充量时的蛋糕状外观和冻干条件。测试的样品为带有120mM海藻糖的100mM组氨酸(pH 6.5)和90mg/kg NA-1或者是去除海藻糖的相同样品。如表20中所述,进行了保守的为期4天的周期。具有3mL填充配制的无效对照剂和

活性剂被加入到20 mL的玻璃冻干瓶中,而不是前述实验使用的较小的小瓶。有效温度探针用于确定冻干周期期间的温度。所得的活性剂小瓶示于图7A。

[0200] 表20:小型实验4的冻干参数

[0201]

功能	温度 (°C)	无变化/变化速率	变化速率 (°C/分钟)	时间 (分钟)	压力 (mTorr)
装载	5	无变化	-	0	环境压力
平衡	5	无变化	-	120	环境压力
冷冻	-40	变化速率	0.5	90	环境压力
冷冻	-40	无变化	-	120	环境压力
初级干燥 <sup>1</sup>	-30	变化速率	0.25	40	225
初级干燥 <sup>1</sup>	-30	无变化	-	3400	50
次级干燥	25	变化速率	0.1	550	50
次级干燥	25	无变化	-	1440	50
加塞	20	无变化	-	-	氮压/环境压力
卸载	20	无变化	-	-	环境压力

[0202] 4天的周期里,浓度为90mg/mL的制剂在20mL的瓶子中形成优良的蛋糕状,温度探针的数据表明周期可缩短至3天。

[0203] 无效对照剂和活性剂的含水量为0.01%和0.00%。

[0204] 冻干周期的进行-小型实验5(无效对照剂和活性剂)

[0205] 为了开发适用于临床试验的匹配无效对照剂小瓶(matching placebo vial)和潜在商业规模下的制剂(270mg/瓶)的再悬浮时间,进行了小型实验5。评估了10种无效对照制剂和1种活性制剂的外观和再悬浮时间。活性剂蛋糕为优良的白色蛋糕状,伴有轻微的收缩,导致瓶壁表面周围有裂纹。无效对照剂蛋糕为白色,含有海藻糖的量越高,裂纹就越多。

[0206] 使用13.5mL的水对小瓶(制剂)进行复原。溶解时间列在表21中。低压冻干的活性剂立刻重新悬浮,但在变为清澈无色的溶液之前活性剂有17.6秒的浑浊。所有的无效对照剂都为清澈无色的溶液。

[0207] 表21:无效对照剂和活性剂的复原(SS5)

[0208]

制剂				复原时间 (min)	
无效对照制剂	海藻糖, mM	组氨酸, mM	总量 mg/瓶	瓶#1	瓶#2
1 (对照)	120	100	170	<10 秒	<10 秒
2	200	100	252	<10 秒	<10 秒
3	300	100	355	<10 秒	<10 秒
4	400	100	457	<10 秒	<10 秒
5	500	100	560	<10 秒	<10 秒
6	120	20	133	<10 秒	<10 秒
7	200	20	215	<10 秒	<10 秒
8	300	20	317	<10 秒	<10 秒
9	400	20	420	<10 秒	<10 秒
10	500	20	523	<10 秒	<10 秒
活性制剂	海藻糖, mM	组氨酸, mM	NA-1, mg	瓶#1	瓶#2
1 (对照)	120	100	90	17.6 秒	NA

[0209] 根据上述稳定性、再悬浮时间和冻干时间,NA-1预冻干的优选商用配方为20-100mM组氨酸、120mM海藻糖,pH为6.5。在不损失稳定性或蛋糕状的美观性但减少再悬浮时间的情况下,可增大海藻糖的浓度。

[0210] 通过肉眼观察和悬浮时间检测增加的海藻糖对蛋糕形成和匹配的无效对照剂的影响

[0211] 为了更好地匹配无效对照剂,在NA-1存在和NA-1不存在,填充体积为3mL或5mL的情况下,对不同浓度的海藻糖进行测试。

[0212] 首先,对活性制剂和无效对照制剂进行概述。然后,对3mL填充和5mL 填充来说,将主要的视觉上匹配性状标记出来。目前,分析样品(填充溶液和一种效力样品)正在被分析。表22和23显示了测试制剂的一部分。

[0213] 表22:活性制剂

[0214]

制剂	填充体积	组分
1	3-mL	270mg/瓶,在120mM海藻糖+100mM组氨酸中,pH 6.5
2	3-mL	270mg/瓶,在500mM海藻糖+20mM组氨酸中,pH 6.5
3	5-mL	270mg/瓶,在120mM海藻糖+50mM组氨酸中,pH 6.5

[0215] 图7B显示了上列活性制剂的外观。

[0216] 表23:无效对照制剂

[0217]

无效对照制剂	活性制剂 (~270mg/瓶)
500mM海藻糖+20mM组氨酸 (n=7)	500mM海藻糖+20mM组氨酸 (n=2)
400mM海藻糖+20mM组氨酸 (n=3)	400mM海藻糖+20mM组氨酸 (n=1)
300mM海藻糖+20mM组氨酸 (n=3)	300mM海藻糖+20mM组氨酸 (n=1)

[0218] 表24给出了上述样品的冻干周期条件。

[0219] 表24:周期参数

[0220]

功能	温度 (°C)	无变化/变化速率	变化速率 (°C/分钟)	时间 (分钟)	压力 (mTorr)
装载	5	无变化	-	0	环境压力
平衡	5	无变化	-	120	环境压力
冷冻	-40	变化速率	0.25	180	环境压力
冷冻	-40	无变化	-	120	环境压力
退火	-27	变化速率	0.25	52	环境压力
退火	-27	无变化	-	120	环境压力
冷冻	-40	变化速率	0.25	52	环境压力
冷冻	-40	无变化	-	120	环境压力
初级干燥	-30	变化速率	0.25	40	225
初级干燥	-30	无变化	-	4406	50
次级干燥	25	变化速率	0.1	550	50
次级干燥	25	无变化	-	1440	50
加塞	20	无变化	-	-	氮压/环境压力
卸载	20	无变化	-	-	环境压力

[0221] 表25:主要的匹配性状概述

[0222]

样品名称	颜色&光洁度 (有光泽或无 光泽)	形态: 如表 层, 凸起, 裂 纹, 峰, 卷曲	结构: 紧密或 多孔	收缩	易碎 性	复原时间
SS6-3mL 填充						
活性剂#2 500mM 海藻糖 20mM 组氨酸	近于纯白 有光泽	细小的裂纹	紧密	极小	参见 图像	2min30sec
无效对照剂 P2 500mM 海藻糖 20mM 组氨酸	近于纯白 有光泽	破裂	紧密	极小		1min
SS7-7mL 填充						
活性剂 500mM 海藻糖 20mM 组氨酸	近于纯白 有光泽 w/光点	破裂 底部凹陷	半紧密 分层	有萎缩, 但基于蛋 糕状	NT	1min
无效对照剂 500mM 海藻糖 20mM 组氨酸	近于纯白 有光泽 w/光点	破裂 底部凹陷	半紧密 比活性 剂更加 多孔	极小		20sec 未退火: 38sec

NT=未测试

[0223] 实施例7:冻干的270mgNA-1在pH6.5的20mM组氨酸缓冲液和120mM 海藻糖中的稳定性

[0224] 冻干药品的制备

[0225] 在pH6.5的20mM组氨酸和120mM海藻糖中制备浓度为90mg/mL的小批量NA-1药品, 然后将其冻干以评估所述药品在-20°C、40°C和60°C下储存4周后的固态稳定性。表25显示了冻干条件。

[0226] 表25:实施例7的冻干周期条件

[0227]

功能	温度 (°C)	无变化/变化速率	变化速率 (°C/分钟)	时间 (分钟)	压力 (mTorr)
装载	5	无变化	-	0	环境压力
平衡	5	无变化	-	120	环境压力
冷冻	-40	变化速率	0.5	90	环境压力
冷冻	-40	无变化	-	120	环境压力
初级干燥	-28	变化速率	0.25	48	225
初级干燥	-28	无变化	-	3412	50
次级干燥	25	变化速率	0.1	530	50
次级干燥	25	无变化	-	1440	50
加塞	20	无变化	-	-	氮压/环境压力
卸载	20	无变化	-	-	环境压力

[0228] 样品被储存在恒温箱中,在0周、1周、2周和4周后,对13.2mL(相对于13.5的最终体积)(样品)的纯度、效力和复原时间进行评估。各个储存时间和时间的数据示于表26A-C中。

[0229] 表26A:-20°C下的稳定性

[0230]

参数	t=0		t=4 周	
外观	紧密白色的蛋糕状		紧密白色的蛋糕状	
复原时间	~60sec		~60sec	
pH	6.32		TBD	
含水量	0.02%		NT	
标示量% (% lable claim) TFA 方法	99.0%		101.3%	
总纯度, MSA 方法 (面积%)	99.2%		99.2%	
单一杂质	RRT	面积%	RRT	面积%
	0.59	0.02%	0.59	0.02%

[0231]

	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%
脱酰胺 NA-1, SCX 方法 (面积%)	<0.05%		TBD	

[0232] 表26B:40°C下的稳定性

[0233]

参数	t=0		t=1 周		t=2 周		t=4 周	
外观	紧密白色的蛋糕状		紧密白色的蛋糕状		紧密白色的蛋糕状		紧密白色的蛋糕状	
复原时间	~60sec		~60sec		~60sec		~60sec	
pH	6.32		6.55		6.21		TBD	
含水量	0.02%		NT		NT		NT	
标示量% TFA 方法	99.0%		97.0%		100.6%		100.6%	
总纯度, MSA 方法(面积%)	99.2%		99.1%		98.9%		99.0%	
单个杂质	RRT	面积%	RRT	面积%	RRT	面积%	RRT	面积%
	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%

[0234]

	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%
脱酰胺 NA-1, SCX 方法(面积%)	<0.05%		NT		NT		TBD	

[0235] 表26C:60℃下的稳定性

[0236]

参数	t=0		t=1 周		t=2 周		t=4 周	
外观	紧密白色的蛋糕状		紧密白色的蛋糕状		紧密白色的蛋糕状		紧密白色的蛋糕状	
复原时间	~60sec		~60sec		~60sec		~60sec	
pH	6.32		6.43		6.29		6.29	
含水量	0.02%		NT		NT		NT	
标示量% TFA 方法	99.0%		97.3%		101.5%		101.5%	
总纯度, MSA 方法(面积%)	99.2%		98.8%		98.3%		98.0%	
单一杂质	RRT	面积%	RRT	面积%	RRT	面积%	RRT	面积%
	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 <sup>1</sup>	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	0.30%	1.13	0.09%

[0237]

	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	0.08%	1.30	0.17%	1.30	0.29%
脱酰胺 NA-1, SCX 方法(面积%)	<0.05%		NT		NT		TBD	

[0238] <sup>1</sup>注:主峰周围分辨率损失

[0239] 该NA-1制剂在-20℃下是稳定的。采用MSAHLPLC分析发现,对于40℃和60℃的储存温度,潜在的杂质在相对保留时间(RRT)1.07、1.1和1.29时缓慢增长,在RRT 1.07时出现了最大程度的增长。对于40℃的储存温度,所述杂质在一个月从0.09%增长至0.27%;对于60℃的储存温度,所述杂质从0.09%增长至0.59%。在-20℃下未观察到杂质。使用Arrhenius方程发现,25℃下16个月或5℃下123个月后掺入的杂质少于0.5%,室温下超过60个月以及5℃下多年后掺入的杂质小于2%。因此,该制剂及相关制剂适合于冻干药品的室温下储存。

[0240] 总结论

[0241] 根据上述稳定性、再悬浮时间以及冻干时间,NA-1的优选商用制剂为20-100mM组氨酸、120mM海藻糖,pH为6.5。在不损失稳定性或蛋糕的美观性的情况下,可增大海藻糖的浓度,但再悬浮时间会随海藻糖浓度增大而增加。







Glu Ser Asp Val  
20

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 12

Glu Ser Asp Val  
1

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成的







<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 26  
Ile Glu Thr Ala Val  
1                    5  
<210> 27  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 27  
Ser Thr Val Val  
1  
<210> 28  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 28  
His Arg Glu Ser  
1  
<210> 29  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 29  
Glu Ser Glu Val  
1  
<210> 30  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>

<223> 合成的  
<400> 30  
Thr Cys Glu Ser  
1  
<210> 31  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 31  
Gly Thr Ser Ile  
1  
<210> 32  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 32  
Ala Thr Gly Leu  
1  
<210> 33  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 33  
Ser Val Lys Ile  
1  
<210> 34  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 34  
Ser Asp Leu Pro

1

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 35

Glu Thr Val Ala

1

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 36

Glu Thr Met Ala

1

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 变体

&lt;222&gt; 1

<223> Xaa = E, D, N, 或Q

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa = S 或T

<220>

<221> 变体

<222> 3

<223> Xaa = D, E, Q, 或N

<220>

<221> 变体

<222> 4

<223> Xaa = V 或L

<400> 38

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 39

Glu Thr Asp Val

1

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 40

Glu Thr Glu Val

1

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的  
<400> 41  
Asp Thr Asp Val  
1  
<210> 42  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 42  
Asp Thr Glu Val  
1  
<210> 43  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 43  
Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val  
1                   5  
<210> 44  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 44  
Gly Ser Ser Ser Ser  
1                   5  
<210> 45  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 45  
Thr Gly Glu Lys Pro









Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg  
 1                   5                   10  
 <210> 59  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa = 空白或任意氨基酸  
 <400> 59

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg  
 1                   5                   10  
 <210> 60  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa = 空白或任意氨基酸  
 <400> 60

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg  
 1                   5                   10  
 <210> 61  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa = 空白或任意氨基酸  
 <400> 61



Xaa Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg  
 1                   5                   10  
 <210> 65  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa = 空白或任意氨基酸  
 <400> 65  
 Xaa Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg  
 1                   5                   10  
 <210> 66  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa = 空白或任意氨基酸  
 <400> 66  
 Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg  
 1                   5  
 <210> 67  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成的  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> 1  
 <223> Xaa = 空白或任意氨基酸  
 <400> 67

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg

1 5

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa = E, Q, A, 或其类似物

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa = T 或 S

<220>

<221> 变体

<222> 3

<223> Xaa = A, Q, D, N, N-Me-A, N-Me-Q, N-Me-D, N-Me-N,  
或其类似物

<400> 68

Xaa Xaa Xaa Val

1

<210> 69

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<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> 人工序列



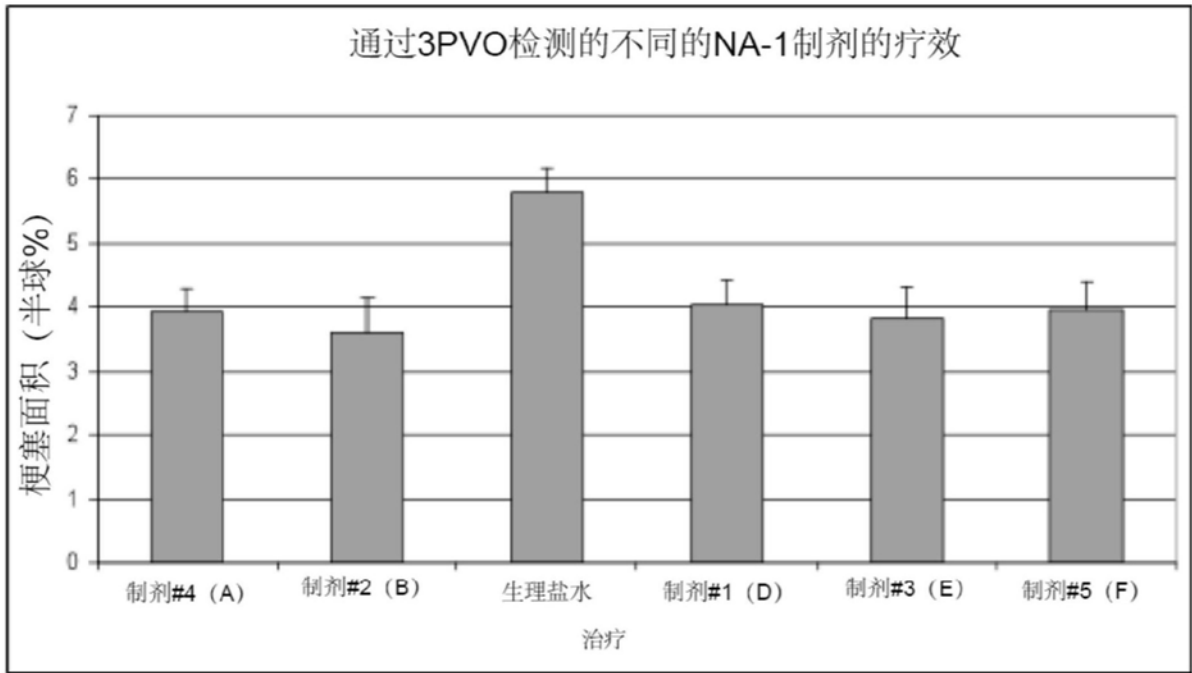
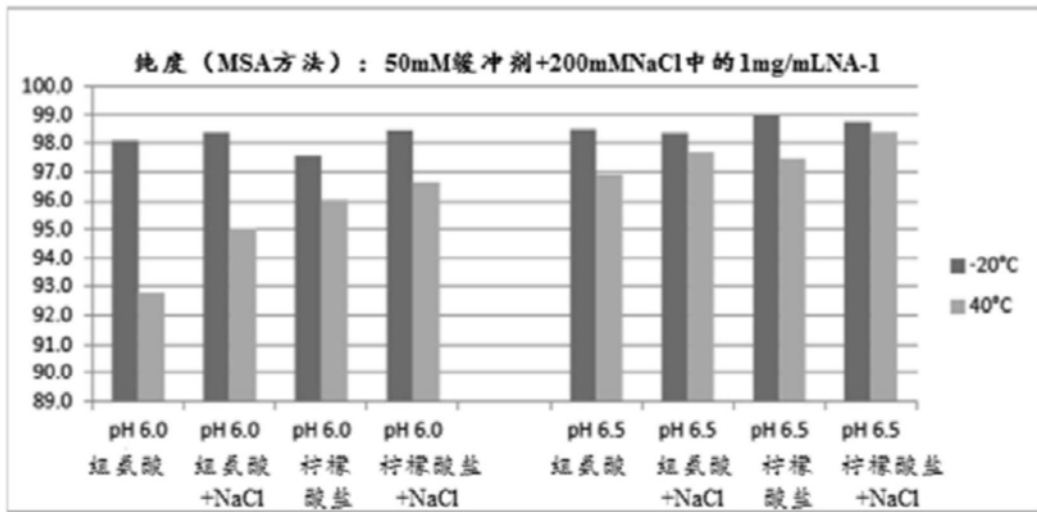


图1



图II. 纯度结果图, MSA方法 (以pH排序)

图2A

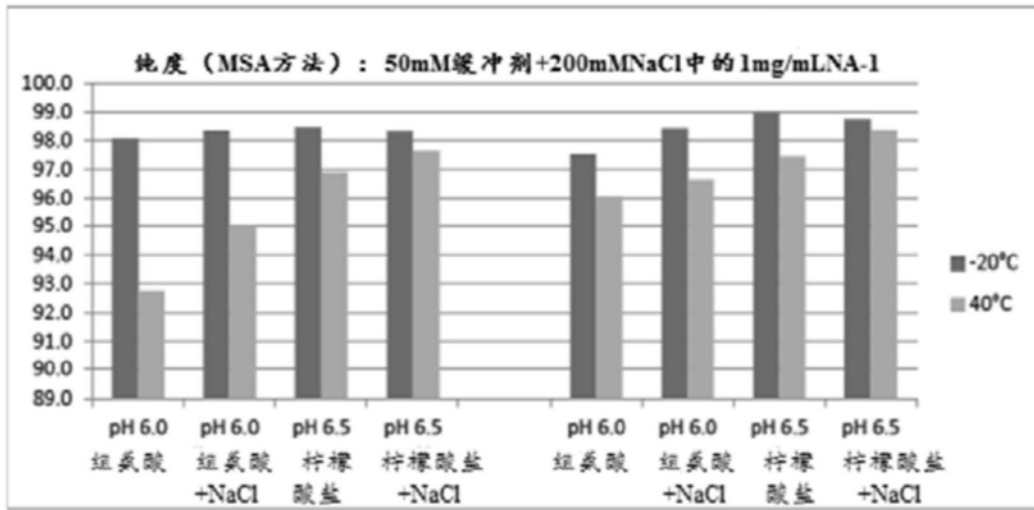


图2B

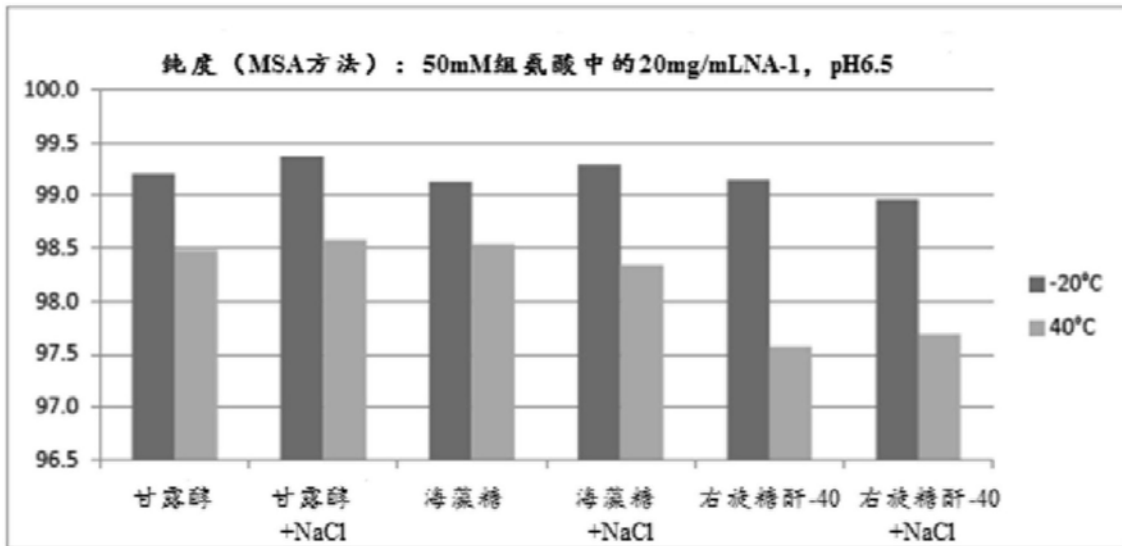
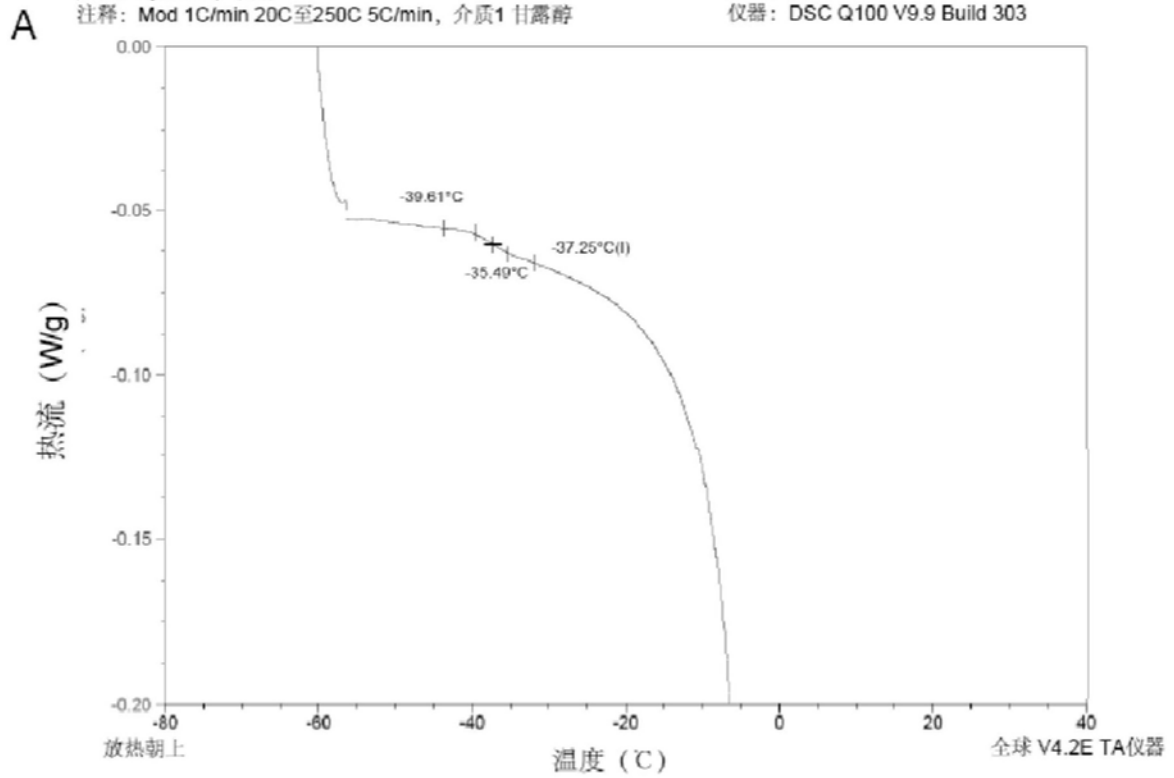


图3

样品: NA-1 DP, 介质1  
大小: 17.0200mg  
方法: Lyo填充, 初始  
注释: Mod 1C/min 20C至250C 5C/min, 介质1 甘露醇

DSC

文件路径: G:\.....\Project\1205\NA-1in Vehicle 1  
操作员: Jenn S.  
操作日期: 2012-5-18 10: 36  
仪器: DSC Q100 V9.9 Build 303



样品: 介质2中的NA-1  
大小: 0.0000mg  
方法: Lyo填充, 初始  
注释: Mod 1C/min 20C至250C 5C/min, 介质2 甘露醇+NaCl

DSC

文件路径: NA-1 IN VEHICLE 2. MANNTTOL AND NACL.00  
操作员: Jenn S.  
操作日期: 2012-5-18 11: 52  
仪器: DSC Q100 V9.9 Build 303

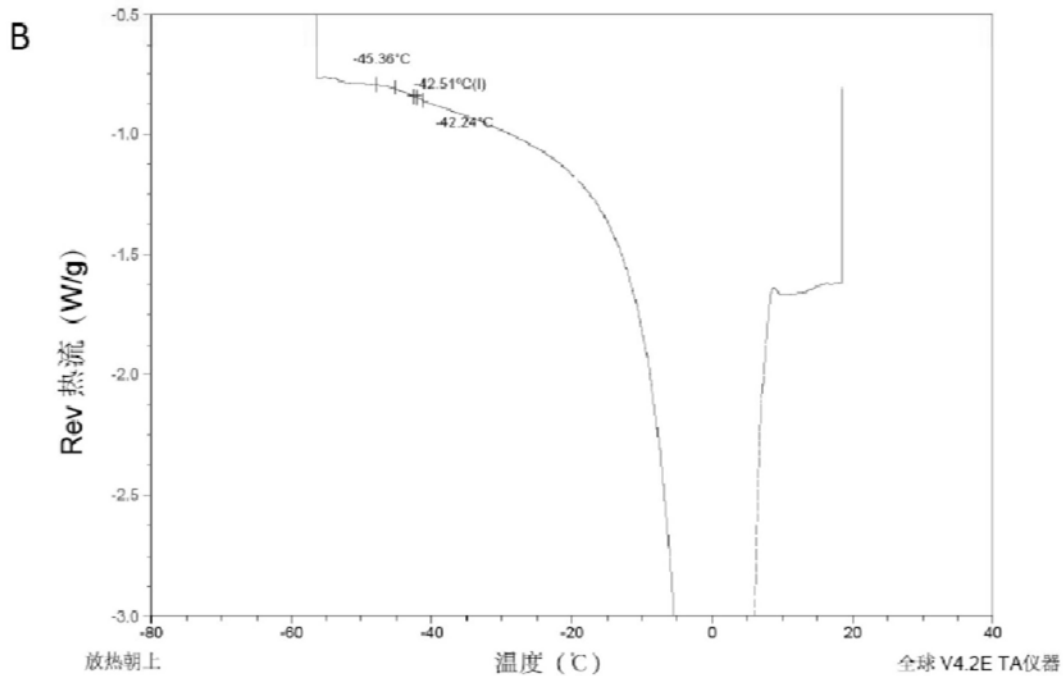
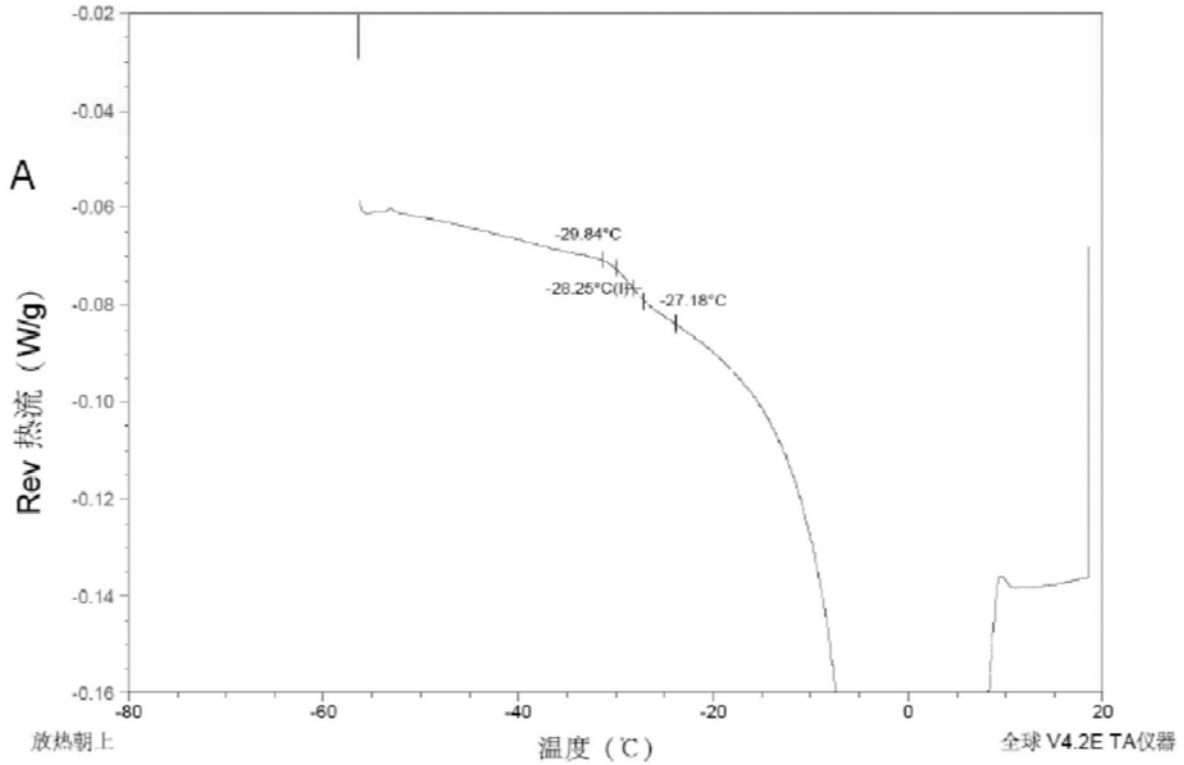


图4A图4B

样品: 介质3中的NA-1  
大小: 13.9790mg  
方法: Lyo填充, 初始  
注释: Mod 1C/min 20C至250C 5C/min, 介质3 海藻糖

DSC

文件路径: G...../1205/NA-1in Vehicle 3  
操作员: Jenn S.  
操作日期: 2012-5-18 13: 01  
仪器: DSC Q100 V9.9 Build 303



样品: 介质4中的NA-1  
大小: 14.4450mg  
方法: Lyo填充, 初始  
注释: Mod 1C/min 20C至250C 5C/min, 介质4 海藻糖+NaCl

DSC

文件路径: G...../1205/NA-1in Vehicle 4  
操作员: Jenn S.  
操作日期: 2012-5-18 13: 52  
仪器: DSC Q100 V9.9 Build 303

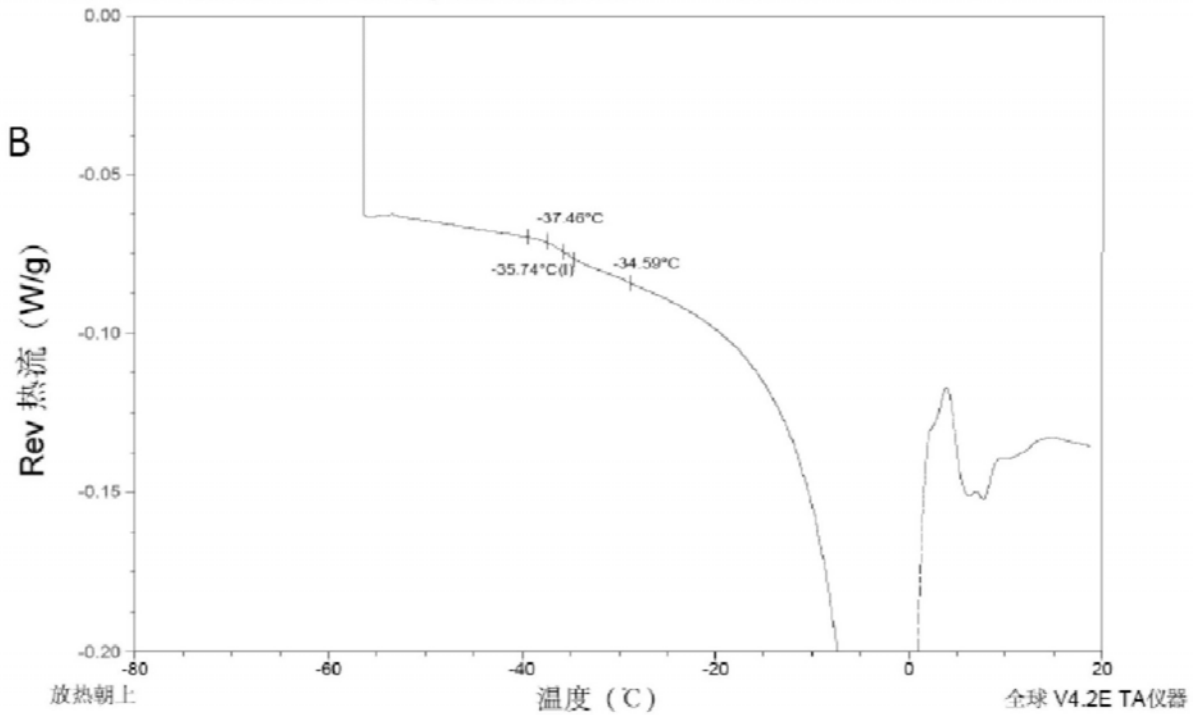


图5A图5B

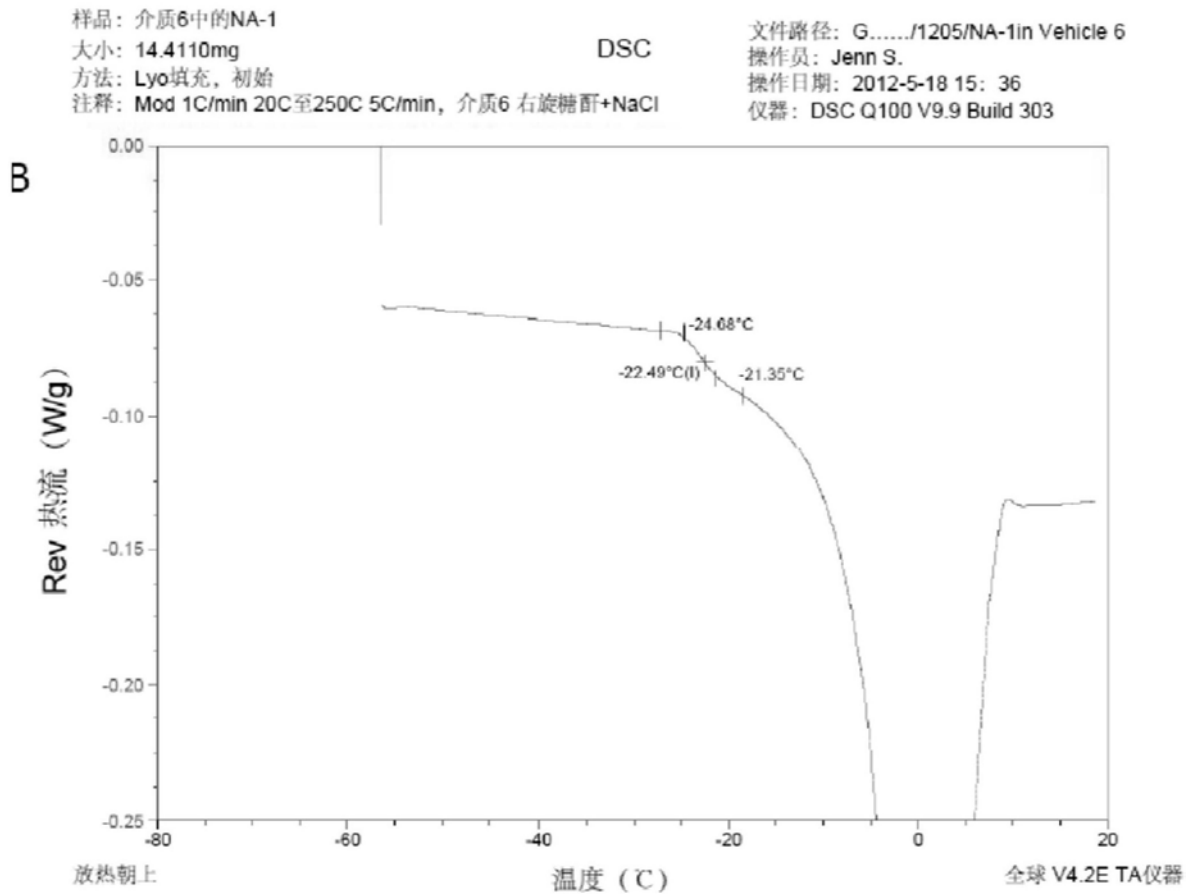
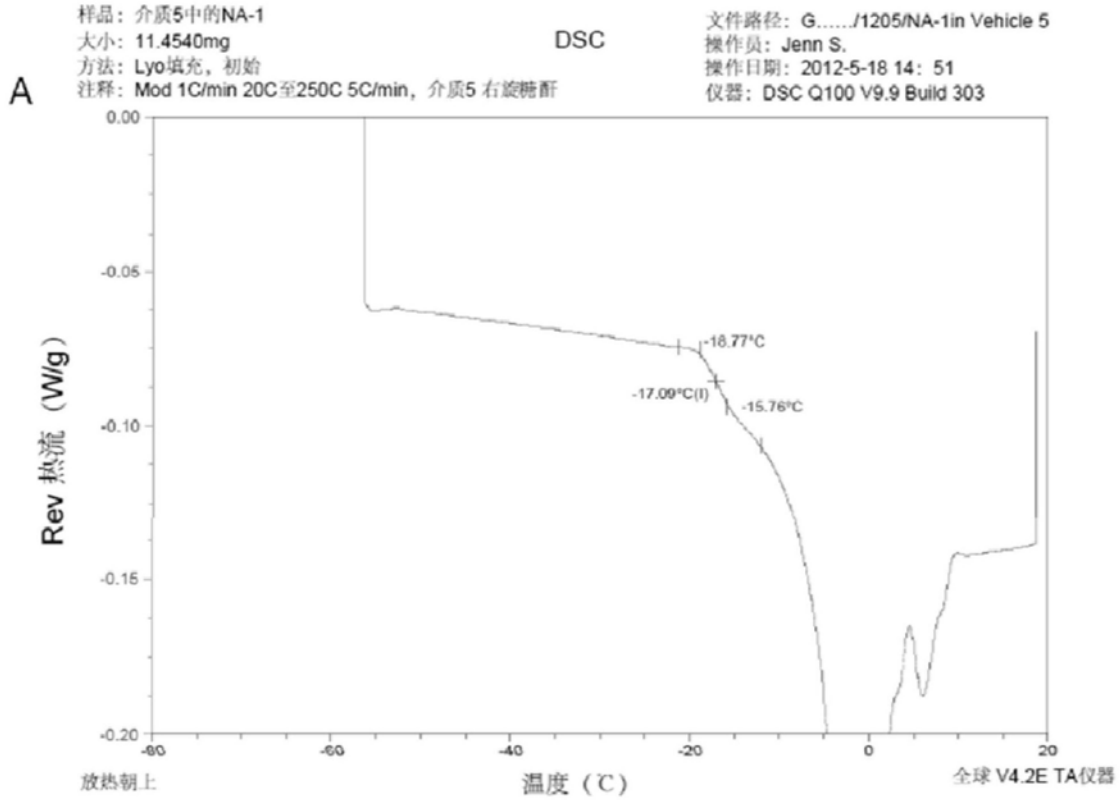
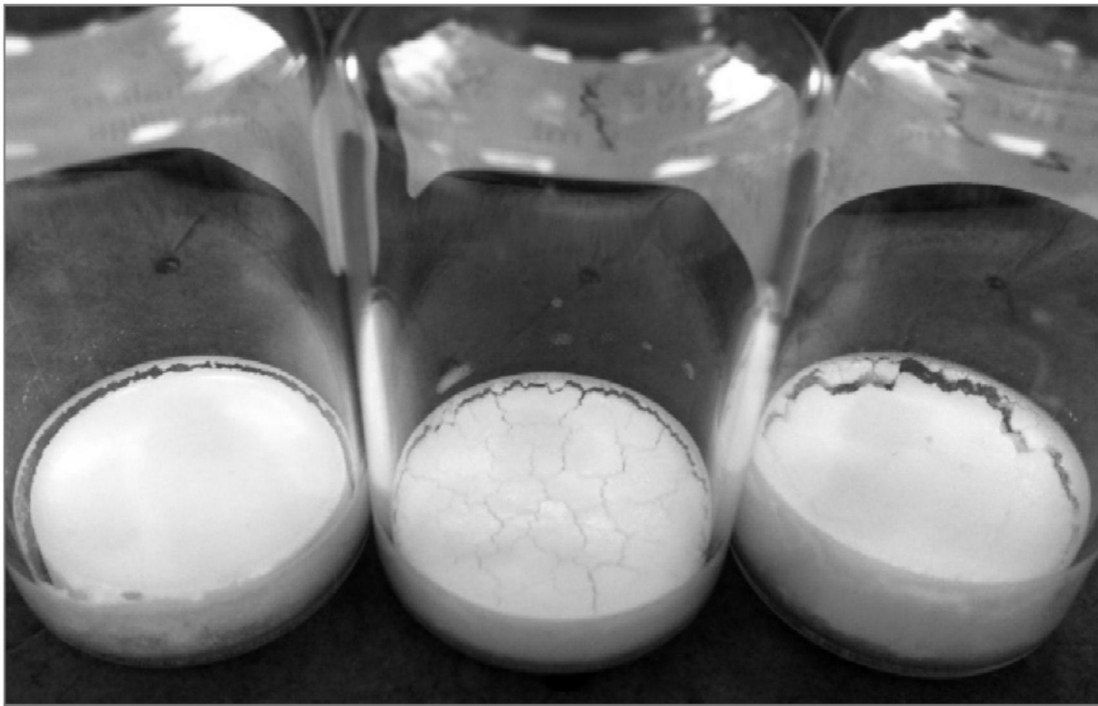


图6A图6B



A: 小型实验 4 NA-1



B: 小型实验 6 中的制剂 1-3

图7A图7B