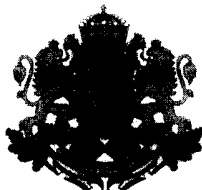


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 100371A

(51) A61K 9/08

A61K 9/19

A61K 38/18

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 100371				(71) Заявител(и):	
(22) Заявено на 19.02.1996				SYNTEX (U.S.A.) INC. , . , 94303 PALO	
(24) Начало на действие				ALTO , 3401 HILLVIEW AVENUE, P.O.BOX	
на патента от:				10850 CALIFORNIA (US) ;	
Приоритетни данни				(72) Изобретател(и):	
				KNEPP , VICTORIA M . ,	
				SUNNYVALE,CA (US) ; LIDGATE ,	
				DEBORAH M . , LOS ALTOS,CA (US) ;	
(31) 109798 (32) 20.08.1993 (33)				MASKIEWICZ , RICHARD . , SUNNYVALE,CA	
				(US) ; GU , LEO . , SARATOGA,CA (US) ;	
				(74) Представител по индустриална	
(41) Публикувана заявка в				собственост:	
бюлетин № 12 31.12.1996				Фани Владимирова Божинова , 1000	
(45) Отпечатано на				София , п.к.728	
(46) Публикувано в бюлетин №				(86) № на PCT заявка:	
на				PCT/ US94/0 / 9245 , 16.08.1994	
(56) Информационни източници:				(87) № и дата на PCT публикация:	
(62) Разделена заявка от рег. №				95/058 / 45 , 02.03.1995	

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНИ ФОРМИ НА НЕВРОКЛЕТЪЧЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР

(57) Формите на (ngf) са приложими за лечение на болестта на алцхаймер и други неврологични заболявания. Те са стабилни във воден изотоничен разтвор с рН 4,5-6,0 и, по желание, включват носител като човешк и серумен албумин. Изобретението се отнася също до водни ngf форми, подходящи за лиофилизация и последващо възстановяване, в които gngf е в смес от захари, незадължително nsa и буфер.

14 претенции , 0

BG 100371A

ФАРМАЦЕВТИЧНИ ФОРМИ НА НЕВРОКЛЕТЪЧЕН РАСТЕЖЕН ФАКТОР

ОБЛАСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Изобретението се отнася до фармацевтични форми на невроклетъчния растежен фактор. Изобретението се отнася също до форми на невроклетъчния растежен фактор, подходящи за лиофилизация.

НИВО НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Множество полипептиди и протеини регулират растежа и оцеляването на клетките; такива молекули са наречени "растежни фактори". Примерите за растежни фактори включват епидермалния растежен фактор (EGF), основни и кисели фибробластни растежни фактори (aFGF and bFGF), получени от тромбоцитите растежни фактори (PDGF), ресничест (цилиарен) невротрофичен фактор (CNTF), и невроклетъчен растежен фактор (NGF). От всички тези фактори, NGF е първият

идентифициран и охарактеризиран (*Levi-Montalcini, R., et al., J. Exp. Zool., 116: 321, 1951*).

NGF подпомага оцеляването и активността на определени типове нервни клетки. В допълнение, NGF подпомага диференциацията на незрелите нервни клетки в пост-митотични зрели неврони.

Пречистването на NGF от миша субмаксиларна жлеза води до идентифициране на комплекс, включващ три субединици, α , β и γ . Предполага се, че цялата невротрофична активност е съсредоточена в β субединицата, протеин състоящ се от 118 аминокиселини с молекулно тегло от около 13 000 Da (*Varon, S., et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 57: 1782- 1789, 1967; Greene, L. A., et al., Neurobiol., 1: 37- 48, 1971*). В разтвор, β субединицата формира димери с молекулно тегло около 26, 500 Da.

Предполага се, че NGF е ефективен при лечение на определени дегенеративни заболявания както на периферната, така и на централната нервна системи. Предполагало се е, че въвеждането на NGF може бъде полезно при лечение на заболявания при които недостатъка на NGF, абнормалността на неговия рецептор или измененията при транспортирането му или интрацелуларното му преработване, води до намаляване на функцията на невроните, атрофия или дори до клетъчна смърт. Подобни заболявания включват наследствена чувствителност и моторна невропатия, наследствена или спорадично срещана системна дегенерация, амиотрофна латерална склероза, заболяване на Паркинсон и болестта на Аल्цхаймер (*Goedert, M., et al., Mol. Brain Res., 1: 85- 92, 1986; Mobley, W. C., et al., Soc. Neurosci. Abstr., 4: 302, 1988; Hefti, F., et al., Ann. Neurol., 20: 275- 281, 1986*). Счита се също, че NGF намалява смъртта на нервните клетки след излагането им на определени токсини, като напр. 6- хидрокси-

гопамин, (Aloe, L., *Arch Ital. Biol.*, 113: 326- 353, 1975), винбластин и колхицин (Menesini- Chen, M. G., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5559- 5563, 1977; Johnson, E. M., *Brain Res.*, 141: 105- 118, 1978) и кансацин (Otten, U., *Nature*, 301: 515- 577, 1983).

Високата експресия на NGF mPHK в хипокампуса, една област, която се свързва с паметта и ученето, предполага че клиничното приложение на NGF може да бъде ефективно за лечение на деменция (Kaisho, Y., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 174: 379- 385, 1991). Докладвано е, че интравентрикуларното приложение на NGF предотвратява смъртта на базалните холинергични неврони на предния дял на мозъка след аксотомия, което предполага, че NGF може да бъде ефективна за подпомагане оцеляването на клетките при увреждане. (Hefti, F., *J. Neurosci.*, 6: 2155- 2162, 1986; Williams, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 9231- 9235, 1986; Kromer, L., *Science*, 235: 214- 216, 1987).

Приложението на NGF за лечение е свързано със значителни проблеми като: 1) съхраняване биоактивността на NGF, която може да бъде повишена по време на производството, пречистването или съхраняването; и 2) въвеждане на NGF, относително голяма, хидрофилна молекула, която да достигне активното място в задоволително количество така, че да бъде ефективно нейното въздействие. Биоактивността на NGF, както и на други протеини, е в зависимост от вторичната и третичната му структура. β - субединицата на NGF притежава три вътрешни дисулфидни моста, които се считат за особено важни за биоактивността (Kanaya, E., et al., *Gene*, 83: 65- 74, 1989; Iwane, M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 171: 116- 122, 1990; Hu, G. -L. and Neet, K. E., *Gene*, 70:57- 65, 1988). В допълнение, към степента до която се денатурира който и да е един от протеините, ефективното количество от биологично активният NGF намалява. Поради това,

интегритета на протеина трябва да бъде запазен по време на производството и съхранението, както и по време на въвеждането. Протеините са особено склонни на деградация при повишени температури.

По-ниски температури обикновено понижават разграждането на протеините. Обаче, по-икономично е съхраняването им на стайна температура, т. е. , около 25°C, отколкото при температура на хладилник около 4°C. Поради това стабилността на произведената фармацевтична форма следва да бъде подходяща за съхранение както при стайна, така и при хладилна температура около 4°C.

В допълнение към проблема за стабилността, NGF като много други протеини се свързва неспецифично към повърхности. Подобно неспецифично свързване може да се осъществи към различни материали, включително стъкло и пластмаси, например полиетилен или полипропилен. Тези материали могат да бъдат под форма на епруветки, тръби, шприцове, имплантивни инфузионни приспособления или каквито и да са други повърхности, които могат да влязат в контакт с NGF по време на производството, съхранението и приложението му.

Други затруднения при прилагането на протеини като NGF в качеството им на терапевтици е лошото им абсорбиране от тялото и разграждането им от стомашните киселини. Поради това оралното приложение най-обща е неподходящо. За преодоляване на тези абсорбционни бариери е необходимо използването на инжекционни и инфузионни форми.

Инжектирането е приложимо когато мястото на лечение е достижимо. Обаче, ако това място е относително невъзможно да бъде достигнато, като напр. централната нервна система (CNS), продължителната инфузия може да бъде по-удобна за продължително

въвеждане. Такова въвеждане е било непрактично поради различни усложнения. Например, продължителна инфузия може да бъде постигната чрез имплантиране на NGF помпи в мозъка, но продължителното подлагане на протеина на действието на телесната температура е причина за деградацията му. Също така, може да има допълнителни загуби благодарение на протеиновата адсорбция към помпата през цялото време.

В допълнение към проблемите, свързани с приложението на NGF, налице са проблеми и с неговото продължително съхранение от времето на произвеждането му до приложението. Лиофилизацията е един метод за продължително съхраняване на биологични протеини, предотвратяващ разграждането, агрегирането и/или неспецифичната адсорбция. Но сам по себе си, процеса на лиофилизиране предоставя редица трудности. Тъй като обема на течността се намалява при замразяване, ефективната концентрация на солите се повишава драматично, което може да доведе до разграждане на протеина, редуцирайки ефективната терапевтична активност при възстановяване. В допълнение, формирането на ледени кристали по време на процеса на замразяване може да причини денатуриране и също намалява ефективното количество на достъпния NGF. Формата следва да бъде такава, че да предотврати флукуацията във варирането на концентрацията на солите и да доведе до минимум формирането на ледени кристали.

Един от обектите на настоящето изобретение е да се предложат водни форми на NGF, които съхраняват биологичната си активност в продължение на поне един месец в температурен интервал от около 4 до 40°C.

Друг обект на настоящето изобретение е да се предложат форми на NGF, в които биологичната активност е запазена след лиофилизиране и възстановяване.

Още един обект на настоящето изобретение е да се предложат методи за съхраняване на биологично активен NGF в разтвор.

ОБЩО ЗА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение предлага стабилни форми на невроклетъчния растежен фактор, които могат да бъдат съхранявани при температура пониска, еднаква и по-висока от тази на околната среда без значими загуби в количеството или активността на протеина. Формите включват водни разтвори на :

- (a) невроклетъчен растежен фактор;
 - (b) незагължителен, подходящ в биологично отношение, водно разтворим носител;
 - (c) достатъчно количество подходяща в биологично отношение сол за поддържане на изотоничността;
 - (d) буфер за поддържане на рН на формата от около 4.5 до около 6.0 ;
- и
- (e) вода.

В друго отношение, настоящето изобретение предлага фармацевтични форми на NGF, подходящи за лиофилизация.

Фармацевтичните форми на това изобретение, подходящи за лиофилизация включват водни разтвори на :

- (a) невроклетъчен растежен фактор;
- (b) подходящ в биологично отношение пълнител;

- (с) буфер за поддържане на рН на формата от около 5. 5 до около 6. 5;
- (d) незагължително, подходящ в биологично отношение, водно разтворим носител; и
- (е) вода.

Други варианти на това изобретение са лиофилизирани форми , от които водата е по същество отстранена. При възстановяване с възстановяваща среда, незагължително съдържаща подходящ в биологично отношение носител, лиофилизираните форми на това изобретение са подходящи за въвеждане на пациенти, нуждаещи се от лечение.

Това изобретение също предлага метод за съхранение на NGF във водните форми на това изобретение при температури от около 4 до около 40°C.

Друг вариант на настоящето изобретение е метод за лечение на нервни увреждания у хора, включващ въвеждане на терапевтично количество от NGF форма на това изобретение.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Създаването на стабилни парентерални форми за дозиране на NGF изисква оценка на множество фактори, включително пътя на въвеждане, адсорбтивни взаимодействия и конкурентност с изградените съоръжения и евентуалните приспособления за доставяне. Друго съображение е стабилността на NGF във водна среда при температури по- ниски, еднакви и по- високи от околната. Един вариант на това изобретение е включването на NGF във воден разтвор, който проявява стабилност в определен температурен интервал и по- специално при повишена (поне около 40°C) температура. Тази форма включва воден разтвор на NGF, сол и буфер с рН от около 4. 5 до около 6. 0 . Формата освен това може да съдържа носител.

Тази комбинация от инградиенти изненадващо придава много услужливи характеристики на разтвора, по-специално свързани със стабилността при повишени температури. Освен това предложена е форма на NGF, подходяща за лиофилизация. Това изобретение предлага също и метод за съхранение на NGF.

Както тук се използва, терминът “подходящ в биологично отношение” се прилага за материали, характеризирани с отсъствие на неблагоприятни биологични ефекти *in vivo*. “Стайна температура” е около 22°C до около 25°C. “Телесна температура” е около 36°C до около 40 °C. “Льофилизационни форми” се отнася до фодна форма на NGF, която може да бъде изсушена при замразяване до съдържание на влагата по-малко от около 2% и която съхранява поне около 70% от изходната NGF биологична активност при възстановяване. “Изотоничен” се отнася до разтвор с приблизително същото осмотично налягане както кръвния серум, около 300 милиона за литър. “Носител” е който и да е подходящ в биологично отношение емулгиращ, диспергиращ агент, повърхностно активно вещество или протеин, който повишава адсорбирането на NGF към дадена повърхност.

“NGF” отбелязва каквато и да е форма на невроклетъчен растежен фактор, за предпочитане β -субединицата на невроклетъчния растежен фактор, който проявява биологична активност и се свързва към NGF рецептор. Терминът NGF също включва хибридувани и льофилизирани форми на NGF, които се свързват към NGF рецептора и съхраняват NGF биологичната активност. Модифицирани форми на NGF включват фузионни протеини като тези, описани в *Iwai, S. et al., Chem. Pharm. Bull., 34: 4724-4730, 1986 and Kanaya, E., et al., Gene, 83: 65-74, 1989*, и NGF фрагменти и хибриди, в които определени аминокиселини са делетирани или заместени по

време на съхраняването на необходимата NGF биологична активност и свързването на рецептора за придобиване на терапевтична активност.

Предпочитана форма на NGF е човешката форма NGF (hNGF). Най-предпочитана форма на hNGF е екомбинантна hNGF (rhNGF). Методи за получаване на NGF, подходяща за приложение за формите съгласно настоящето изобретение, са известни на специалистите в областта. Например, подходяща rhNGF може да бъде получена с използването на бакуловирерна експресионна система (*Barnett, J., et al., Exp. Neurol., 110: 11-24, 1990; EPO 370, 171*), дрождева експресионна система (*Kanaya, E., et al., Gene 83: 65-74, 1989*), експресионна система от клетки на бозайници (CHO) (*Iwane, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 171: 116-122, 1990*), или COS експресионна система (*Bruce, G., et al., Neurobiol. Aging. 10: 89-94, 1989*). NGF следва да бъде поне 65% чист; по-специално поне 95%; и най-добре - поне 98% чист. Чистотата на изолирания NGF за използване във фармацевтичните форми съгласно изобретението може да бъде определена чрез SDS-PAGE сребърно оцветяване или други средства, известни на специалистите в областта.

Във водните NGF форми, NGF присъства в терапевтично ефективни количества. За предпочитане NGF включва от около 0.0001 до 0.125% тегл. от водния състав, което съответства на от около 1 до около 1250 µg/ml. За предпочитане е NGF да е в количество от около 0.001 до около 0.10% тегл. (10 до 1000 µg/ml) от водната форма. Дори още по-добре е NGF да се съдържа в количество от около 0.01 до около 0.10% (100 до 1000 µg/ml) тегловни от водната форма. Най-добре е количеството на NGF да бъде от около 0.01 до около 0.05% (100 до 500 µg/ml) тегловни от водната форма.

Водните NGF форми като незагъжителност, включват и носители. Присъствието на носителя във формата редуцира или предотвратява NGF адсорбирането към различни повърхности. Необходимостта от носител зависи от концентрацията на NGF във водния състав. При достатъчно високи (повече от около 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) концентрации на NGF, достатъчно NGF остава в разтвора за да компенсира тези, които се е загубил при адсорбцията към повърхности. Подходящите носители включват, но не се ограничават до, полисорбати като Tween® 80, полуксамери като Pluronic® F68, и протеини като серумен албумин. Предпочитаният носител е протеин. Човешки серумен албумин (HSA) е особено предпочитан. Тегловното съотношение на NGF за носителя е от около 0.0001: 1 до около 1: 1. Още по-предпочитано тегловно съотношение е от около 0.01: 1 до около 1: 1. И най-много се предпочита е тегловно съотношение от около 0.01:1 до около 0.5: 1. Съответно, когато HSA се използва като носител, предпочитаната концентрация на HSA е от около 0.1 до около 1.25% тегловни (т.е., 1 до 12.5 mg/ml) от водната форма. Предпочитаната форма е около 0.3 до 0.7% тегл. HSA от водната форма, и по-добре около 0.4 до 0.6% тегл. HSA от водната форма. Най-много предпочитана форма е около 0.5% тегл. (т.е., 5 mg/ml) HSA от водната форма.

NGF формата също съдържа значително количество подходяща в биологично отношение сол за запазване на тонизиращото свойство на флуида. Солта освен това действа за запазване на NGF в разтвора. За предпочитане, NGF формата съдържа достатъчно количество сол за да бъде изотонична, в рамките на физиологично приемливите ограничения, с човешка кръв или цереброспинална течност. Предпочитаната сол е натриев хлорид (NaCl), но могат да бъдат използвани и други подходящи в биологично

отношение соли като калиев хлорид (KCl), калциев хлорид ($CaCl_2$) и магнезиев хлорид ($MgCl_2$). Солта може да бъде една или комбинация от соли. Предпочитаната форма съдържа около 0.5 до 1.0% тегл. (т. е., 5 до 10 mg/ml) сол. Повече се предпочита съдържанието на солта във водната форма да бъде от 0.6 до 0.9% сол на тегло от формата. И най-добре, формата да съдържа около 0.7 до 0.9% сол от теглото на водната форма. Най-предпочитаната форма съдържа около 0.87% (т. е., 8.7 mg/ml) сол от теглото на водната форма.

По-нататък NGF формата съдържа подходящ в биологично отношение буфер за запазване стойностите на pH по време на съхранението. Ние установихме, че NGF е по-стабилен при ниски стойности на pH. Предпочитаната стабилна NGF форма е буферирана с подходящ в биологично отношение буфер до pH около 4.5 до около 6.0 и най-добре от около 5.0 до около 5.4. Най-предпочитаната форма е около 5.2. Предпочитан буфер е лимонената киселина, но е възможно използването и на други буфери, които са в състояние да поддържат pH в рамките на желания интервал. Други подходящи буфери са напр. оцетно кисел/ацетат и малешново кисел/малеат. Предпочитаното количество от буфера ще варира в зависимост от типа му и от неговия буферен капацитет. В състава на формата буфера следва да бъде представен в количество, достатъчно да запази крайното pH на формата в предпочитания pH интервал. Предпочитаната концентрация на буфера за стабилни NGF форми е около 0.01 до около 0.3% от теглото на водната форма (0.1 до 3.0 mg/ml), по-предпочитана концентрация е около 0.1 до около 0.25% буфер от теглото на водната форма (1.0 до 2.5 mg/ml) и най-предпочитаната буферна

концентрация е около 0. 2% буфер от теглото на водната форма (2. 0 mg/ml).

Формата съдържа вода в количество, достатъчно да достигне подходящата концентрация на използваните компоненти.

Предпочитани стабилни водни форми на NGF съдържат от около 1 до 1250 µg/ml NGF, 1 до 12. 5 mg/ml HSA, 5 до 10 mg/ml NaCl, 0. 2 до 3. 0 mg/ml лимонена киселина и вода, където рН на формата е доведено до от около 4. 5 до около 6. 0, по- добре от около 5. 0 до около 5. 4. Най- много се предпочита стабилните форми на NGF да съдържат от 10 до 500 µg/ml NGF, 5 mg/ml HSA, 8. 7 mg/ml NaCl, 2. 1 mg/ ml лимонена киселина и вода, където рН на формата е доведено до около 5. 2.

Лиофилизирани форми на това изобретение са специално приложими за осигуряване на продължителното съхранение на NGF, по- специално при повишени температури. Лиофилизирани форми на това изобретение включват NGF, подходящ в биологично отношение пълнител, буфер за поддържане на рН на формата от около 5. 5 до около 6. 5, незагъжително, подходяща сол, незагъжително подходящ в биологично отношение водно разтворим носител и вода.

NGF е представена в лиофилизирана форма в същия интервал на концентрация както във водната форма. Пълнителят най- общо придава механична устойчивост като позволява на матрикса да запази своята конформация по време и след процеса на изсушаване чрез замразяване. Могат да бъдат използвани една или повече захари като пълнител. Захарите, които са използвани тук, включват но не се ограничават до, монозахариди, олигозахариди и полизахариди. Примери за подходящи захари включват, но не се ограничават до фруктоза, глюкоза, маноза, сорбоза, ксилоза, малтоза,

лактоза, захароза и декстран. Захар означава също захарни алкохоли, като манитол, сорбитол, инозитол, гулицитол, ксилитол и арабитол. В съответствие с настоящето изобретение, могат да бъдат използвани и смеси от захари.

Предпочитаният пълнител представлява комбинация от захари. Предпочитаният пълнител е комбинация от захароза и манитол. Без да е установено теоретично, захарозата е тази, която формира аморфно стъкло при замразяване и последващо лиофилизиране, като дава възможност за потенциално повишаване на стабилността на протеина (напр. предотвратяване на агрегацията) чрез формиране на молекулна дисперсия на NGF в твърдо стъкло. Стабилността също може да бъде повишена посредством това, че захарта действа като заместител на водата, загубена при лиофилизиране. Захарните молекули много повече отколкото водните молекули се свързват към протеина посредством водородни връзки. Когато манитола се смеси в съотношение 1: 1 със захарозата (която има изменение на температурата на стъклото - 36°C) температурата на изменение на стъклото нараства от 5°C на -31°C . Това относително съкращава първичното време на изсушаване на формата по време на лиофилизацията, докато е все още в аморфна, стъклена форма и по този начин това е едно преимущество при широкомащабни производства. Други пълнители, които също притежават тези характеристики, могат да бъдат заместени с една или двете от тези захари.

Формите съгласно настоящето изобретение, които могат да бъдат лиофилизирани, за предпочитане съдържат по-високо рН от формите, които не са лиофилизирани или които са възстановени. Пълнителите (захари), които са включени в лиофилизационните форми от изобретението, са най-

общо по-стабилни при по-високи стойности на рН. За предпочитане, рН на формата преди лиофилизиране е между около 5.5 до около 6.5. Повече се предпочита рН на подлаганите на лиофилизация NGF форми да е около 6.0. Когато е включена захароза в качеството на пълнител, предпочитаното рН на лиофилизационните форми е около 6.0 доколкото при кисели рН, захароза, нередуциращ дисахарид, се редуцира до редуциращи захари D-фруктоза и D-глюкоза. Цитратът е най-предпочитан буфер за лиофилизационни NGF форми, но могат да бъдат използвани и други подходящи в биологично отношение буфери, като напр. малеат. Предпочитат се буфери, различни от ацетат, поради склонността на оцетната киселина да се изпарява по време на лиофилизацията. Следва да се знае, че може да е необходимо да се регулира крайната стойност на рН с киселина или основа. Всяка загуба на продължителната стабилност на водния NGF, дължаща се на по-високи стойности на рН от около 6.0 може да бъде преодоляно чрез повишаване стабилността на NGF при лиофилизация.

Изборът на буфера води до придвижване на рН по време на лиофилизацията, причинено от последваща кристализация на буферните компоненти. Например, с фосфатни буфери, основният компонент притежава по-висока евтектична точка в сравнение с киселинния компонент, следователно той кристализира най-напред и рН пада. Цитратният буфер се предпочита, тъй като се счита че двата буферни компонента притежават почти една и съща евтектична точка, което води да има слаби колебания на рН когато температурата пада. Другите подходящи буфери следва да притежават компоненти със същите или сходни евтектични точки.

Леофилизационните форми също незагължително включват подходяща в биологично отношение сол. Солта, която може да бъде подбрана от

същите соли, приложими за водните форми, е представена в лиофилизационната форма със същата или редуцирани концентрации както при водните форми. Поради това, че концентрацията на солта може да се повиши по време на лиофилизация, желателно е да се редуцира концентрацията на присъстващата сол в лиофилизационните форми за предотвратяване разграждането на протеина. Редуцирането на концентрацията на солта в лиофилизационните форми може да бъде компенсирано за времето на възстановяване, така че да се получи крайна форма, която да е достатъчно изотонична, че да е подходяща за прилагане на даден индивид.

Незагължително, лиофилизационните форми включват подходящ в биологично отношение водно разтворим носител. Носителите и техните концентрации, които могат да бъдат използвани в лиофилизационните форми на настоящето изобретение са същите както тези, които са подходящи за използване във водните форми на настоящето изобретение.

Предпочитаните лиофилизационни форми включват около 1 до 1250 $\mu\text{g/ml}$ NGF, 15 до 45 mg/ml захароза, 15 до 45 mg/ml манитол, незагължително 7 до 9 mg/ml NaCl и 0.1 до 0.7 mg/ml лимонена киселина при pH от около 5.5 до около 6.5. Най-много предпочитаните лиофилизационни форми на NGF съдържат 100 до 1250 $\mu\text{g/ml}$ NGF, 30 mg/ml захароза, 30 mg/ml манитол, 5 mg/ml човешки серумен албумин, незагължително 8.7 mg/ml NaCl и 0.3 mg/ml лимонена киселина. Особено се предпочита pH на лиофилизационните форми да бъде около 6.0.

Леофилизационните форми на настоящето изобретение се леофилизират до съдържание на остатъчна влажност по-малко от около

2%; обаче, формите които съхраняват NGF биологична активност при по-високо или по-ниско съдържание на влага също се имат предвид.

Предпочитаните лиофилизационни форми съдържат от 0.001 до 1.25 части невноклетъчен растежен фактор, 30 до 90 части захар и по-малко от около 1 част вода.

Леофилизираната NGF форма се възстановява с разрежител, съдържащ буфер като лимонена киселина и сол, напр. натриев хлорид, така че получената в резултат на възстановяване форма да е аналогична на водната форма, т. е. около 1 до 1250 $\mu\text{g/ml}$ NGFq 1 до 12.5 mg/ml HSA, 5 до 10 mg/ml NaCl, 0.2 до 3.0 mg/ml лимонена киселина, 1.5 до 30 mg/ml захароза и 1.5 до 30 mg/ml манитол, pH 5.2.

Леофилизираната форма от настоящето изобретение е също приложима като компонента на кит като удобен и икономичен начин да се предложи стабилен леофилизиран NGF във форма, която може бързо и лесно да бъде възстановена в подходяща среда за приложение на пациенти, нуждаещи се от лечение. В допълнение към леофилизираната NGF форма, китовете от това изобретение също включват среда за възстановяване.

Средата за възстановяване съдържа стерилна вода и достатъчно количество сол, че крайната възстановена форма да представлява по-същество изотоничен разтвор. Възстановяващата среда по-нататък може да съдържа допълнителен буфер. Общият обем на възстановяващата среда, съдържаща се в кита следва да бъде достатъчна, че да достигне крайна концентрация на NGF, подходяща за приложение на даден индивид, нуждаещ се от лечение. В предпочитан вариант на изпълнение на настоящето изобретение се предлага кит, съдържащ две епруветки. Едната от тях съдържа стерилна леофилизирана NGF форма от настоящето изобретение, а

втората - стерилна среда за възстановяване. За да бъде използван китът, подходящо количество от възстановяваща среда се прехвърля в епруветката, съдържаща лиофилизираната NGF форма. При разреждане на лиофилизираната форма, възстановената форма може да бъде незабавно прилагана на пациента.

Поради продължителната стабилност на възстановената форма на настоящето изобретение, възможно е също да се изготви достатъчно количество възстановена форма, за да се предложат множество дози.

Формите от настоящето изобретение са приложими за лечение на индивиди със състояния, подходящи за лечение с NGF. Обикновено, такива форми са стерилни и са подходящи за интравенозно, интрамускулно, парентерално или интрацеребровентрикуларно приложение. Подобно лечение може да бъде приложимо за лечение на нервно функционални нарушения, включващи нервни увреждания или дегенерация на NGF отговарящите неврони. NGF по-специално може да бъде специално приложен за лечение на заболявания дължащи се на загуба на централни холинергични неврони като болестта на Алцхаймер. NGF като лечение на болестта на Алцхаймер и други форми на деменция е описано в EP 0 370 171.

Формите от настоящето изобретение като лечение на деменция може да бъдат прилагани по който и да е от различните начини в зависимост от спецификата на крайната употреба. Най-подходящия начин ще зависи от употребата и отделния индивид.

За да бъдат избегнати трудностите вследствие на кръвно-мозъчната бариера, NGF може да бъде прилаган на централната нервна система чрез директни интравенозни инжекции или чрез импрегнирани с лекарства импланти или помпи. Друг начин на въвеждане е чрез продължителна инфузия посредством интрацеребровентрикуларна канюла. Обратно, конюгацията на

NGF с молекулите на носителя като трансферин, може да бъде необходимо за преодоляване на кръвно- мозъчната бариера.

Терапевтично ефективното количество от NGF се очаква да бъде от около 0. 001 до около 0. 5 mg на ден, за предпочитане от около 0. 01 до около 0. 10 mg на ден, най- много предпочитано от около 0. 02 до около 0. 06 mg на ден. Точната доза и режим за приложение ще зависи от много фактори, като пътя на въвеждане и степента на поражение на индивида, получаващ лечението.

МЕТОДИКА НА ИЗСЛЕДВАНЕ

Идентификация и количествено определяне на NGF с помощта на обратно фазова HPLC

NGF се идентифицира и определя количествено чрез анализ на 100 µl проби с обратно фазова HPLC (*Hewlett Packard HP 1090 Liquid Chromatograph*) съоръжена с 4 - 6 mm x 25 cm L Dynamaх (*Rainin Instrument Co. , Woburn, Ma, USA*) 300A 5 µm Аналитична обратно фазова колона с Dynamaх 300 A 5 µm 4. 6 mm x 1. 5 cm гард колона и диоден UV детектор, установен на 220 nm. Подвижните фази са (A) 0. 1% трифлуороцетна киселина във вода и (B) 0. 1% трифлуороцетна киселина в ацетонитрил където градиентите се изменят от 25 % (B) до 60% (B) в 45 минути със скорост на потока от 0. 5 ml/min при налягане 1700 - 2000 psi и температура на околната среда.

Идентифицирането на NGF е установено чрез сравняване на неговото време на съхранение в пробата със съответното време на съхранение на пряко приготвени калибрирани стандартни NGF разтвори, направени от същия източник. Количеството на NGF в пробите се изчислява чрез

сравяване на стандартната крива, получена със серийни разреждания от познати концентрации.

Определяне на NGF концентрацията ($\mu\text{g/ml}$) с ELISA

Концентрациите на NGF се изпитват и чрез ELISA. Както стандартните проби, така и пробите за изследване се изпитват трикратно. Всяка плака съдържа пълна стандартна крива на NGF и съответните празни места без NGF.

След покриване със 100 μl се добавя анти тяло (мишо моноклонално 24C1 срещу rhNGF) към всяка от кладенчетата на 96- кладенчова плака за изпитване, плаките се опаковат в опаковка на Saran с влажна хартиена кърпа и се инкубират в продължение на една нощ в хладилник при температура от 2 до 8° C. Кладенчетата се изпразват, промиват се трикратно и с помощта на самонапълващ се шприц на Wheaton за да се разпределят 250 μl / кладенче в буфера за промиване (съдържащ 500 mM Tris, 2 M натриев хлорид, доведен с буфер до pH 7) и се изсушават. Съответно след това се добавят 200 μl от блокиращия буфер (1% разтвор на говежди серумен албумин) към всяко кладенче за блокиране на неспецифичните места, 50 μl от пробата се добавят към всяко кладенче и плаките се инкубират за минимум 1 час на стайна температура докато се смесват в шейкер. Кладенчетата отново се изпразват и изсушават и се добавят 50 μl от стандартните и изпитваните разтвори. Плаките след това се покриват и инкубират за два часа на стайна температура. Кладенчетата на плаките отново се изпразват, промиват се четири пъти с буфер за промиване и се изсушават. Петдесет (50) μl от биотинирано анти тяло (мишо моноклонално 8C1 срещу rh-NGF) се добавят

към всяко кладенче, плаките се покриват и се инкубират в продължение на два часа. Кладенчетата отново се изпразват, промиват се и се изсушават както е показано по-горе и към всяко кладенче се добавят 50 μ l пероксидазно-свързан стрептавидин от хрян. Плаките се покриват и инкубират в продължение на 20 минути на стайна температура докато се бъркат със шейкер. Плаките се промиват пет пъти с буфер за промиване. След това към всяко кладенче се добавят 50 μ l орто-фенилендиамин (OPD) субстратен буфер, плаките се покриват и инкубират на тъмно за 1 час.

Vmax Kinetic Microplate (Molecular Devices, Mountain View) reader се използва за определяне абсорбцията на всяко кладенче. За всяко кладенче, нивото на абсорбцията при 650 nm се отчита от пика на абсорбция при 450 nm до получаване на чистата (нетна) абсорбция. Концентрацията на NGF в пробите се определя чрез сравняване с една NGF стандартна крива.

Определяне на NGF активност

Биологичната активност на NGF се определя с помощта на PC-12 биологична проба. PC-12 биологичната проба се основава на повишената метаболитна активност на PC-12 феохромоцитомни клетки (Greene, Trends Neurosci. 7: 91, 1986) когато са изложени на действието на NGF. Метаболитната активност на PC-12 клетките се измерва с клетъчното усвояване на 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиумбромид ($C_{18}H_{16}N_5Br$) (MTT), който се превръща от клетъчната дехидрогеназа в неразтворими, вътреклетъчни сини кристали.

Всяко кладенче от 96-кладенчовата плака съдържа около 30 000 PC-12 клетки в 50 μ l среда RPMI-1640 (Sigma). Изготвят се серийни разреждания от всяка проба и стандарти за получаване на разтвори от 0.006 до 400 ng

rhNGF за ml в RPMI- 1640 с 0. 2% говежди серумен албумин (BSA). След това към всяко кладенче се добавят петдесет микролитра от всеки разтвор за получаване на концентрация от 0. 003 до 200 ng NGF за ml и всяка концентрация се изпитва трикратно. След като пробите се оставят да престоят в продължение на 2 дни в 5% CO₂ при 37°C, към всяко кладенче се добавят по 10 µg MTT и плаките се инкубират в продължение на още 4 часа. След това се добавя един обем от 20% SDS в 50% диметил формамид (DMF), рН 4. 7 и плаките се опаковат в целофанпоставят се в пластмасови чанти и се инкубират една нощ при 37°C. Плаките се разчитат следващият ден с помощта на Vmax plate reader set при 575 nm. Съотношението на ED₅₀ от кривата на пробата спрямо ED₅₀ от стандартната NGF крива дава стойността на относителните възможности на двата препарата.

ПРИМЕР 1

NGF форми

Изготвят се водни форми, съдържащи 1, 10, 100 и 1000 µg/ ml rhNGF, 5 mg/ml HSA, 8. 7 mg/ ml натриев хлорид и 2. 1 mg/ ml лимонена киселина и достатъчно вода за получаване на 10 ml от формата, и с рН доведено до 5. 2. След разтварянето на лимонената киселина и солта в около 70% от общия обем, рН се регулира с NaOH/HCl и се добавят HSA и NGF при внимателно разбъркване заедно с вода за допълване на обема и формата се филтрува през 0. 2µ Millipore Millex- GV филтър.

Използваният за получаване на формата rhNGF се експресира в инсектицидни клетки с помощта на бакуловирален вектор на експресия и се пречиства с йоно- обменна и обратно- фазова хроматография както е описано в *Barnett, J. , et al. , Exp. Neurol. , 110: 11- 24, 1990.*

ПРИМЕР 2

Стабилност на NGF формите при 5°C и 25°C

250 µl равни части от по 100 µg/ml от NGF формите от Пример 1 се съхраняват на 5° C и 25°C (RT) в полиетиленови епруветки с наконечник за накапване в продължение на до 6 месеца. RP- HPLC, ELISA и биологични анализи (описани по- горе) от тези проби, показват че няма загуба на протеин повече от 6 месеца (Таблица 1).

Таблица 1. Стабилност на NGF при 5°C и при 25°C, измерена с RP- HPLC, ELISA и PC-12 биологична проба

Съхране- ние	RP-HPLC %LS	RP-HPLC %LS	RP-HPLC %LC	RP-HPLC %LS	RP-HPLC %LS	ELISA %LS	Биол. изпитване
Темп(°C)	1 сегм.	2 сегм.	3 месеца	4 месеца	6 месеца	6 месеца	на относ. възм. 6 месеца
5°C	99± 2	99± 6	96± 4	100±3	101± 3	100± 6	106±14
R. T. (22- 25°C)	99 ± 2	99 ± 5	95 ± 5	103 ± 3	99 ± 5	104 ± 13	123 ± 3

$\%LS = \% \text{ гранична сила} = \frac{[NGF]_{\text{тест}}}{[NGF]_{\text{контрола}}}$

[NGF] контрола

$\% \text{ относит. възможн.} = \frac{\text{активност на теста}}{\text{активност на контролата}}$

активност на контролата

RP-HPLC представя стойността $\pm$ стандартното отклонение на 2- 4 репликата. Броят на биологичните изпитвания представя стойността $\pm$ 95% граници на достоверността от 3 определяния

ПРИМЕР 3

Стабилност на различни NGF форми съхранявани в полиетиленови катетри при 37°C

250 μ l равни части от NGF съдържащи от 1 до 1 000 μ g/ml rhNGF получени както е описано в Пример 1, се съхраняват непроницаеми за рентгенови лъчи полиетиленови катетри (вътрешен диаметър 0. 030 инча и външен диаметър 0. 048 инча) при 37°C за време до 4 седмици. Резултатите, както е показано на Таблица 2, показват незначителна загуба на протеиново съдържание (както е измерено от RP- HPLC) или на NGF активност (както е измерена от PC- 12 биологична проба).

Таблица 2. Стабилност на NGF формите в полиетиленови катетри при 37°C както е определено с RP- HPLC & PC- 12 биологична проба.

NGF при време Нула (μ g/ml)	%LS 1 седм. RP-HPLC	%LS 2седм. RP-HPLC	% LS 4 седм RP-HPLC	Относ. възм. 4 седм. PC- 12 биол. проба
1. 0	104 $\pm$ 3	87 $\pm$ 6	85 $\pm$ 3	101 $\pm$ 34
10. 0	94 $\pm$ 14	92 $\pm$ 4	100 $\pm$ 1	118 $\pm$ 45
100. 0	102 $\pm$ 4	95 $\pm$ 6	95 $\pm$ 2	129 $\pm$ 34
1 000. 0	107 $\pm$ 2	92 $\pm$ 4	86 $\pm$ 3	108 $\pm$ 33

$\%LS = \% \text{ гранична сила} = \frac{(NGF)_{\text{тест}}}{(NGF)_{\text{контрола}}}$

$\% \text{ Относителна възм.} = \frac{\text{Активност на теста}}{\text{Активност на контролата}}$

(Броят на RP- HPLC представя стойността $\pm$ стандартното отклонение на 2- 4 репликата. Броя на биологичните проби представя стойността $\pm 95\%$ граници на достоверността от 3 определяния).

ПРИМЕР 4

Стабилност на NGF формата в различни спомагателни съоръжения

Равни части от по 100 $\mu\text{g/ml}$ от NGF форма съгласно Пример 1 се зареждат или в инфузионна имплантируема помпа Mogel 600 (Shiley- Infusaid Inc. , Norwood, MA), в Medronics Synchronomed имплантируема инфузионна помпа (Medronics Inc. , Minneapolis, MN) или в 4 мину осмотична инфузионна помпа Alzet Mogel 2ML (Alza Corp. , Palo Alto, CA). Помпите се поставят във водна баня с температура 37°C и потока от формата извън формата се иницира. Пробите се събират през 4 седмичен период и се анализират за протеиново съдържание и активност чрез RP- HPLC, ELISA и PC- 12 биологична проба.

Данните на Таблица 3 показват, че не е наблюдавано значимо понижение на NGF концентрацията или активността.

ТАБЛИЦА 3. Стабилност на NGF формите при различни спомагателни съоръжения при 37°C за един месец

Спомагателна система	%LS 1 седмици RP-HPLC	LS 2 седмици RP-HPLC	LS 4 седмици RP-HPLC	LS 4 седмици ELISA	% Относит. възм. 4 седмици Биол. проба
Инфузионг Модел 600	91 ± 3	101 ± 3	112 ± 4	90 ± 11	100 ± 36
Имплантируе ма помпа					
Медтроникс Синхромед	109 ± 2	92 ± 2	91 ± 3	97 ± 4	90 ± 6
Имплантируе ма помпа					
Алцет 2 ML4 Осмотична мивуипомпа	96 ± 3	95 ± 7	90 ± 5	n. d.	n. d.

%LS = % гранична сила = $\frac{(NGF)_{тест}}{(NGF)_{контрола}}$

% Относит. възм. = $\frac{\text{активност на теста}}{\text{активност на контролата}}$

(Броя на RP- HPLC представя стойността ± стандартното отклонение на 2. 4 репликата. Броя на биологичните проби представя стойността ± 95% граници на достоверността от 3 определяния.)

n. d. = не е определено

ПРИМЕР 5:

Изследване на стабилността на NGF формите при рН 4 до 10

Изготвят се водни форми, съдържащи 100 µg/ml NGF, 1 mg/ml HSA и 9 mg/ml натриев хлорид, с рН доведено от 4 до 10 и се филтруват стерилно през 0.2 µ филтър (Millex-GV; Millipore Corp.), по начина от Пример 1. Формите с рН от 4 до 5 се буферират с ацетат, а формите с рН 6-10 се буферират с Tris. Еднакви части от по 1 ml се прехвърлят в полипропиленови епруветки с наконечници за на капване, които след това се инкубират или на стайна температура (23° до 25°C) или при 37°C. Пробите се изтеглят по различно време и се анализират чрез RP- HPLC. Първите константи на степента на реакцията, представлящи загуба на NGF от разтвора, се установяват като функция на рН. Установено е, че степените на деградация на NGF в разтвор се повишават при рН по-малко от около 4.5 и повече от около 6.0. По-висока стабилност се явява при рН 5.2.

ПРИМЕР 6

Стабилност на NGF формите като функция от концентрацията на носителя

Типа и количеството на носителите се тества с оглед определяне въздействието им върху стабилността на NGF. Изготвят се 100 µg/ml водни форми, както са описани в Пример 1 и водните форми, съдържащи други носители са изброени на Таблица 4. Всяка форма се стерилизира през филтър с размер на порите 0.2 µ - Millipore Millex- GV. Стабилността на NGF в различните форми се определя чрез инкубация на NGF формите при 37°C в полипропиленови епруветки с наконечници за на капване. Пробите се

изтеглят след 2 седмици и се анализират за протеиново съдържимо чрез RP-HPLC.

ТАБЛИЦА 4. Стабилност на различни NGF форми, инкубирани за 2 седмици при 37°C

<u>Експонент</u>	<u>Количество (%w/v)</u>	<u>% LS за 2 седмици</u>
Желатин	1. 0	64 ± 9
Човешки серумен албумин	0. 1	48 ± 7
Човешки серумен албумин	0. 5	99 ± 2
Човешки серумен албумин	1. 0	31 ± 36
Tween 80	0. 2	77 ± 9
Pluronic F- 68	0. 02	65 ± 5

$$\%LS = \frac{\text{Гранична сила} = (\text{NGF})_{\text{мест}}}{(\text{NGF})_{\text{контрола}}}$$

(Броят на RP- HPLC представя стойността ± стандартното отклонение на 2- 4 репликата)

ПРИМЕР 7

NGF форми за лиофилизация

Водна форма на NGF, съдържаща 100 µg/ml NGF, 30 mg/ml захароза, 30 mg/ml манитол, 5 mg/ml HSA и 0. 3 mg/ml лимонена киселинаа, с рН доведено до 6. 0 с NaOH се изготвя при стайна температура. След разтварянето на лимонената киселина и захарите до около 70% от общия обем, рН се регулира

и се добавят HSA и NGF при внимателно разбъркване заедно с достатъчно количество вода до пълен обем.

ПРИМЕР 8

Лиофилизиране на NGF формата

Изпитва се лиофилизационната стабилност на водния NGF във формата от Пример 7. Едно милилитрови еднакви части от NGF формата, изготвена съгласно Пример 7 се поставят в 5 ml стъклени епруветки Тип I, покрити с лиофилизационни стопери. Съдържащите формата епруветки се поставят в система за изсушаване чрез замразяване (FTS Systems Inc.), която се еквилибрира при 5°C преди началото на замразяването. Температурата на стаята за замразяване се довежда до - 40°C. След 2 часа навлажняване при -40°C, стаята се евакуира и налягането се контролира при 80 до 100 милитора с азотно пречистване. Поддържа се температурен интервал от по 4°C за час до достигане на крайната температура на изсушаване 25°C. Крайното съдържание на влага в продукта между 1 и 2% се достига приблизително 30 часа в цикъла.

Изсушената чрез замразяване пудра се съхранява при 5°C и се възстановява на стайна температура след 3 дни с 1 ml разредител, състоящ се от 8.7 mg/ml натриев хлорид и 1.1 mg/ml лимонена киселина, с pH 5.2. Пробите се анализират за NGF концентрация чрез RP- HPLC. Не са наблюдавани загуби на протеин след лиофилизацията.

ПРИМЕР 9

Изследване на стабилността на NGF формите при съхраняване в стъклени епруветки при 2 - 8°C

Изготвят се водни форми, съдържащи 100 или 1 000 µg/ml rhNGF следвайки процедурата от Пример 1, с изключение на това, че обема е повишен до 1. 5 литра. Еднакви количества от по 4. 2 mLs се поставят в огнеупорни стъклени епруветки Тип I с бутил- каучукови, облицовани с тефлон запушалки, и се съхраняват при 2- 8°C. Резултатите, показани на Таблица 5 по- долу, показват незначителни загуби на протешново съдържание (както е измерено с RP- HPLC и ELISA), или NGF активност (както е измерена чрез PC- 12 биологично изпитване).

ТАБЛИЦА 5: Стабилност на NGF формата при съхраняване при 2 - 8°C, измерено с RP- HPLC, ELISA PC- 12 Биологично изпитване

Номинал	RP-HPLC %LS	RP-HPLC %LS	ELISA %LS	PC- биол. изсл. %LS
	Изходно	12 месеца	12 месеца	12 месеца
100 µg/ml	103 ± 1	101 ± 1	102 ± 3	102 ± 15
1000 µg/ml	102 ± 1	101 ± 1	108 ± 3	102 ± 20

LS = гранична сила = $\frac{\text{NGF към времето на тестване}}{\text{изходно NGF}}$

Идентифициране и количествено определяне на NGF с помощта на Обратно фазова HPLC

В този Пример 9 използваната методика е следната:

NGF се идентифицира и определя количествено чрез анализ на 100 μ л проби с обратна фазова HPLC (Hewlett Packard HP 1090 Liquid Chromatograph), снабден с 4 - 6 mm x 250 mm, Bakerbond Wide- Pore Butyl (C4) с размер на порите 300 Å (J. T. Baker Inc. Phillipsburg NJ, USA) и флуоресцентен детектор, установен на 210 nm. Мобилните фази са (A) 0.2% трифлуороцетна киселина във вода и (B) 60% ацетонитрил в буфер (A), където радиентите се изменят от 29% (B) до 75% (B) за 65 минути със скорост на потока 1.0 ml/min при налягане 110 бара при стайна температура.

По-нататък се използва методиката, описана по-горе за Методика на HPLC изследването.

ПРЕТЕНЦИИ

1. Водна фармацевтична форма съдържаща:

(a) невноклетъчен растежен фактор;

(b) подходяща в биологично отношение сол в количество достатъчно да поддържа изотоничност;

(c) буфер в количество достатъчно да поддържа рН на формата от около 4.5 до около 6.0; и

(d) вода.

2. Форма съгласно претенция 1, съдържаща още подходящ в биологично отношение, водно разтворим носител.

3. Форма съгласно претенция 1 или 2, където :

(a) невноклетъчният растежен фактор представлява около 0.0001 до около 0.125% от теглото на водната форма;

(b) носителят представлява от около 0.5 до 1.25% от теглото на водната форма;

(c) солта представлява около 0.5 до около 1.0% от теглото на водната форма; и

(d) буферът е представен в количество достатъчно да поддържа рН на водната форма от около 4.5 до около 6.0.

4. Форма съгласно която и да е от предходните претенции, където рН е от около 5.0 до около 5.4.

5. Водна форма съгласно която и да е от претенции 2-4, съдържаща 10 до 500 μg NGF, 5 mg/ml HSA, 8.7 mg/ml NaCl, 2.1 mg/ml лимонена киселина и вода, и където рН на формата е доведено до около 5.2.

6. Водна фармацевтична форма на невроклетъчния растежен фактор, подходяща за лиофилизация, съдържаща:

- (a) невроклетъчен растежен фактор;
- (b) подходящ в биологично отношение пълнител;
- (c) буфер в количество, достатъчно да поддържа рН на формата от около 5.5 до около 6.5; и
- (d) вода.

7. Форма съгласно претенция 6, съдържаща 1 до 1250 $\mu\text{g/ml}$ невроклетъчен растежен фактор и 30 до 90 mg/ml пълнител.

8. Форма, съгласно претенция 6 или 7, където пълнителят е захар.

9. Форма съгласно която и да е от претенции 6- 8, където пълнителят съдържа смес от захароза и манитол, буферът е лимонена киселина и рН на формата е около 5.8 до около 6.2.

10. Форма съгласно която и да е от претенции 6- 9, лиофилизирана за намаляване на съдържанието на влага до по- малко от около 2%.

11. Лيوфилизиран фармацевтичен състав съдържащ 0.001 до 1.25 части от невроклетъчния растежен фактор, 30 до 90 части захар, и по- малко от около 1 част вода.

12. Форма или състав съгласно която и да е от претенции 6- 11, съдържаща още и подходящ в биологично отношение водно разтворим носител.

13. Форма или състав съгласно която и да е от предходните претенции за приложение при лечение на нарушения на нервните функции у хора.

14. Форма или състав съгласно претенция 13, в интрацеребровентрикуларна инфузионна форма за приложение при лечение на болестта на Алцхаймер у хора.