

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090143** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.03

(22) Дата подачи заявки
2017.07.05

(51) Int. Cl. *C07K 7/06* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМЫЕ СОЛИ ПОЛИПЕПТИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(86) PCT/CN2017/091792

(87) WO 2019/006690 2019.01.10

(71) Заявитель:
БИОСЕЛЗ (БЕЙДЗИН) БИОТЕК КО.,
ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Хань Хуаминь, Тянь Юйцзя, Цзя
Хунцзюнь (CN)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) В настоящей заявке предложена фармацевтически приемлемая соль полипептида и содержащая ее фармацевтическая композиция, указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность YEKLLDTEI или ее функциональный вариант.

A1

202090143

202090143

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ПРИЕМЛЕМЫЕ СОЛИ ПОЛИПЕПТИДОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка в целом относится к биомедицинской области. В частности, в настоящей заявке предложены фармацевтически приемлемые соли полипептидов, композиции и способы лечения, облегчения или предупреждения расстройств, связанных с нервной системой.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Заболевания, связанные с нервной системой, проявляются в различных формах и представляют серьезную опасность для здоровья и качества жизни человека.

Инсульт представляет собой распространенное острое цереброваскулярное заболевание у людей среднего и пожилого возраста, которому также подвержены и лица более молодого возраста. Сегодня во всем мире он является одним из трех самых опасных заболеваний человека наряду со злокачественными новообразованиями, сердечнососудистыми заболеваниями и сахарным диабетом. Установлено, что в КНР около трех миллионов человек ежегодно умирает от цереброваскулярных заболеваний. Эта цифра в 4–5 раз выше, чем в США и странах Европы, в 3,5 раз выше, чем в Японии, и даже выше, чем в развивающихся странах, таких как Таиланд и Индия. Частота новых случаев растет со скоростью 8,7% в год. Частота рецидивов превышает 30%, а частота рецидивов в течение 5 лет достигает 54%. 75% перенесших инсульт в большей или меньшей степени утрачивают трудоспособность, а 40% получают тяжелую инвалидность.

Инсульт можно приблизительно разделить на две категории, а именно ишемический инсульт и геморрагический инсульт, из которых ишемический инсульт насчитывает 85% от общего числа заболевших инсультом. В настоящее время терапевтические лекарственные средства для лечения ишемического инсульта включают главным образом следующие типы: вазодилататоры (такие как персантин), лекарственные средства, улучшающие микроциркуляцию и увеличивающие объем крови (такие как низкомолекулярный декстран), тромболитические лекарственные средства (такие как урокиназа), антикоагулянты, лекарственные средства, предотвращающие агрегацию тромбоцитов (такие как аспирин), средства китайской медицины, нейропротективные средства и т. д. Тем не менее, в связи с тем, что большинство этих лекарственных средств вызывает проблемы, такие как существенные побочные эффекты, потенциальные риски или недостаточная терапевтическая эффективность, изучение патогенеза инсульта и

разработка лекарственных средств, направленно действующих на патогенез, имеет важное общественное значение для предупреждения и лечения возникновения и развития цереброваскулярных заболеваний.

Инсульт характеризуется гибелью нейронов в участках локальной ишемии, церебрального кровоизлияния и/или травмы. Гибель или повреждения нейронов, вызываемые церебральной ишемией, претерпевает каскадный процесс повреждения, т. е. после возникновения церебральной ишемии уменьшается кровоснабжение ткани, нарастает количество возбуждающих нейротрансмиттеров, которые, в свою очередь, активируют рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA) и альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовой кислоты (AMPA), вызывают открытие ионных каналов и приток ионов кальция и дополнительно активируют широкий ряд ферментов, которые запускают сигнальный каскад, приводящий к повреждению нервных клеток различными путями. Следующий по каскаду белок постсинаптического уплотнения 95 (PSD-95) запускает серии ишемических повреждений посредством взаимодействия с различными белками и, таким образом, является критическим фактором повреждений, вызванных церебральной ишемией, а также возможной мишенью фармакотерапии. Следовательно, разработка ингибиторов PSD-95 имеет огромное медицинское значение для повреждений нервной системы, вызванных различными видами возбуждающей нейротоксичности, включая инсульт.

Кроме того, исследования показали, что возбуждающий нейротрансмиттер NMDA играет важную роль в развитии тревоги, эпилепсии и различных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона или болезнь Хантингтона. Например, исследования показали, что избыточное возбуждение центральной глутаминергической системы может вызывать тревогу, тогда как рецептор NMDA (NMDAR) является основным элементом, ответственным за возбуждающую нейротоксичность глутаминовой кислоты. Начало эпилепсии включает три различных, но непрерывных патофизиологических процесса, включая инициацию, поддержание и распространение судорожного разряда и ингибирование судорожного разряда. В ходе этого процесса важную роль играют возбуждающие нейротрансмиттеры, такие как глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота. При болезни Альцгеймера PSD-95 вовлечен в нейротоксический механизм заболевания через биохимический путь GluR6-PSD-95-MLK3. Кроме того, при болезни Хантингтона PSD-95 является медиатором нейротоксичности, вызванной рецепторами NMDA и мутациями в гене гентингина. Таким образом, разработка ингибиторов PSD-95

также важна для лечения, облегчения и предупреждения описанных выше заболеваний.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте в настоящей заявке предложена фармацевтически приемлемая соль полипептида, содержащего аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант.

В некоторых воплощениях изобретения функциональный вариант представляет собой вариант, образованный в результате одной или более консервативных замен в участке LDTEI последовательности SEQ ID NO: 1.

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

В некоторых воплощениях изобретения функциональный вариант представляет собой вариант, образованный в результате замены участка LDTEI (SEQ ID NO: 6) последовательности SEQ ID NO: 1 последовательностью, выбранной из группы, состоящей из LDTEL (SEQ ID NO: 7), LDTEV (SEQ ID NO: 8), LDTDИ (SEQ ID NO: 9), LDTDЛ (SEQ ID NO: 10), LDTDV (SEQ ID NO: 11), LDSEI (SEQ ID NO: 12), LDSEL (SEQ ID NO: 13), LDSEV (SEQ ID NO: 14), LDSDI (SEQ ID NO: 15), LDSDL (SEQ ID NO: 16), LDSDV (SEQ ID NO: 17), LETEI (SEQ ID NO: 18), LETEL (SEQ ID NO: 19), LETEV (SEQ ID NO: 20), LETDI (SEQ ID NO: 21), LETDL (SEQ ID NO: 22), LETDV (SEQ ID NO: 23), VDTEI (SEQ ID NO: 24), VDTEL (SEQ ID NO: 25), VDTEV (SEQ ID NO: 26), VDTDИ (SEQ ID NO: 27), VDTDЛ (SEQ ID NO: 28), VDTDV (SEQ ID NO: 29), IDTEI (SEQ ID NO: 30), IDTEL (SEQ ID NO: 31), IDTEV (SEQ ID NO: 32), IDTDИ (SEQ ID NO: 33), IDTDЛ (SEQ ID NO: 34), IDTDV (SEQ ID NO: 35), IETEI (SEQ ID NO: 36), IETEL (SEQ ID NO: 37), IETEV (SEQ ID NO: 38), IETDI (SEQ ID NO: 39), IETDL (SEQ ID NO: 40) и IETDV (SEQ ID NO: 41).

В некоторых воплощениях изобретения полипептид представляет собой химерный пептид, содержащий группировку интернализации пептида и активную пептидную группировку, где активная пептидная группировка представляет собой аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант, и группировка интернализации пептида способна облегчать захват химерного пептида клеткой.

В некоторых воплощениях изобретения группировка интернализации пептида содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2).

В некоторых воплощениях изобретения химерный пептид содержит

аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRRYEKLLDTEI (SEQ ID NO: 3).

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтически приемлемая соль выбрана из группы, состоящей из трифторацетата, ацетата, гидрохлорида и фосфата.

Во втором аспекте в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемую соль полипептида в соответствии с первым аспектом и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент и/или разбавитель.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция представляет собой прелиофилизированный препарат, предпочтительно содержащий гистидин и трегалозу.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированный препарат, предпочтительно полученный лиофилизацией прелиофилизированного препарата, как описано выше.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция представляет собой восстановленный препарат, предпочтительно полученный объединением лиофилизированного препарата, как описано выше, с водным раствором.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция предназначена для применения в лечении, облегчении или предупреждении повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция предназначена для применения в качестве нейропротективного агента.

В третьем аспекте в настоящей заявке предложен способ лечения, облегчения или предупреждения повреждения нервной системы, заболевания или боли ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта, включающий введение этому субъекту фармацевтически приемлемой соли полипептида в соответствии с первым аспектом или фармацевтической композиции в соответствии со вторым аспектом.

В четвертом аспекте в настоящей заявке предложено применение фармацевтически приемлемой соли полипептида в соответствии с первым аспектом или фармацевтической композиции в соответствии со вторым аспектом в изготовлении лекарственного средства для лечения, облегчения или предупреждения повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта или в изготовлении нейропротективного агента.

В некоторых воплощениях второго, третьего или четвертого аспекта повреждение нервной системы представляет собой повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью.

В некоторых воплощениях изобретения повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного или спинного мозга, повреждение нейронов в центральной нервной системе (ЦНС), включая острое повреждение ЦНС, ишемический инсульт или повреждение спинного мозга, гипоксию, ишемию или механическое повреждение и повреждение, вызванное нейродегенеративным заболеванием, тревогой, эпилепсией или инсультом.

В некоторых воплощениях второго, третьего и четвертого аспектов нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Паркинсона и болезни Хантингтона.

В некоторых воплощениях второго, третьего или четвертого аспекта повреждение нервной системы или боль локализованы в периферической нервной системе или в центральной нервной системе.

В некоторых воплощениях второго, третьего или четвертого аспекта заболевание, ассоциированное с повреждением нервной системы, представляет собой инсульт. В некоторых воплощениях инсульт включает в себя ишемический инсульт, геморрагический инсульт и геморрагический инсульт, преобразованный из ишемического инсульта. В некоторых воплощениях изобретения инсульт представляет собой ишемический инсульт.

В некоторых воплощениях второго, третьего или четвертого аспекта субъект представляет собой млекопитающее, такое как млекопитающее, не относящееся или относящееся к приматам, например человека.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показан результат анализа с соосаждением для обнаружения взаимодействия между P5 и доменом PDZ1/2. M представляет собой маркер молекулярной массы; на дорожке 1 показаны His+PDZ1/2+P5; на дорожке 2 показан только P5; на дорожке 3 показаны His+P5; и на дорожке 4 показаны His+PDZ1/2. Полоса элюции, показанная на дорожке 1, содержит как P5, так и PDZ1/2, что подтверждает, что P5 способен к связыванию с доменом PDZ1/2.

На Фиг. 2 показано сравнение экспериментальных данных фармакодинамики

различных солей полипептида у крыс.

На Фиг. 3 показаны результаты анализов цитотоксичности для различных солей полипептида.

На Фиг. 4 показана стабильность различных солей полипептида, где на панелях А и В соответственно показано содержание и количество молекул примесей различных солей полипептида в форме твердого вещества после воздействия обработки, включающей освещение и УФ свет, высокую температуру и высокую влажность; и на панелях С и D соответственно показано содержание и количество молекул примесей различных солей полипептида в форме водного раствора после воздействия на них обработки освещением и высокой температурой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящей заявки на изобретение провели обширные исследования пептидов, уменьшающих повреждающее влияние неврологических расстройств, по меньшей мере частично опосредованных возбуждающей нейротоксичностью NMDAR. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, считают, что такие пептиды по меньшей мере частично функционируют посредством ингибирования взаимодействия между NMDAR и белком постсинаптического уплотнения 95 (PSD-95), т. е. в качестве ингибиторов PSD-95. На основании вышеописанного авторы настоящей заявки на изобретение тщательно рассмотрели различные мишени для лечения заболеваний нервной системы, сконструировали и провели скрининг полипептидных нейропротективных агентов посредством фармакологических и фармакодинамических экспериментов *in vivo* и *in vitro* и дополнительно усовершенствовали полученные пептиды с получением фармацевтически приемлемых солей полипептидов с желаемыми свойствами.

Если не указано иное, термины, используемые в настоящей заявке, имеют значение, обычно понятное для специалистов среднего уровня в данной области техники.

Однобуквенные или трехбуквенные сокращения для аминокислот, используемые в настоящей заявке, соответствуют международным конвенциям.

В описании и формуле изобретения слова «включающий», «включающий в себя» и «содержащий» означают «включающий без ограничений» и не предусматривают исключения других частей, дополнений, компонентов или стадий.

В первом аспекте в настоящей заявке предложена фармацевтически приемлемая соль полипептида, содержащего аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант.

Термин «функциональный вариант» относится к варианту, обладающему такой же

или подобной биологической функцией или свойством, что и родительский вариант. В качестве неограничивающего примера «функциональный вариант» может быть получен выполнением одной или более консервативных замен в родительском варианте. Аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант в настоящем документе также относят к «активной пептидной группировке», которая действует в качестве активной группировки в лечении повреждения центральной нервной системы или при применении в качестве нейропротективного агента в настоящей заявке.

В некоторых исследованиях сообщалось, что некоторые активные пептиды, ингибирующие взаимодействие между NMDAR и PSD-95, основаны на структуре NMDAR. Например, NMDAR2B (идентификатор 4099612 в базе данных GenBank) имеет 20 аминокислот FNGSSNGHVYEKLLSSLESDV (SEQ ID NO: 42) на его С-конце, включая PL мотив ESDV (SEQ ID NO: 43). Некоторые известные активные пептиды содержат часть этой аминокислотной последовательности С-конца NMDAR2B, таким образом полностью ингибируя PSD-95 посредством NMDAR2B. В исследованиях выдвинуто предположение, что участок ESDV или LESDV (SEQ ID NO: 44) в вышеописанных пептидах играет важную роль в ингибировании взаимодействия между NMDAR и PSD-95. Авторы настоящей заявки на изобретение получили пептидную последовательность YEKLLDTEI посредством анализа и валидации. По сравнению с составом аминокислот на С-конце описанного выше NMDAR2B, в этом пептиде отсутствуют два остатка SS после KL, при этом он имеет аминокислотную последовательность YEKL (SEQ ID NO: 45), продолжающуюся от N-конца PL-мотива. Авторы настоящей заявки на изобретение доказали, что эта последовательность может усиливать взаимодействие активного пептида с доменом PDZ1/2. Участок LDTEI на С-конце пептида относительно мотива YEKL может быть модифицирован, и ожидают, что такая модификация не повлияет на активность активного пептида или может даже повысить его активность. Соответственно, в некоторых воплощениях изобретения предложенный в настоящем документе функциональный вариант представляет собой вариант, образованный в результате одной или более консервативных замен в участке LDTEI последовательности SEQ ID NO: 1.

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

В некоторых более конкретных воплощениях изобретения функциональный вариант представляет собой вариант, образованный замещением участка LDTEI

последовательности SEQ ID NO: 1 последовательностью, выбранной из группы, состоящей из LDTEL, LDTEV, LDTDI, LDTDL, LDTDV, LDSEI, LDSEL, LDSEV, LDSDI, LDSDL, LDSDV, LETEI, LETEL, LETEV, LETDI, LETDL, LETDV, VDTEI, VDTEL, VDTEV, VDTDI, VDTDL, VDTDV, IDTEI, IDTEL, IDTEV, IDTDI, IDTDL, IDTDV, IETEI, IETEL, IETEV, IETDI, IETDL и IETDV.

В некоторых воплощениях изобретения функциональные варианты, раскрытые в настоящем документе, также включают аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже более высокой идентичностью упомянутым выше пептидам. В данной области техники известно, что «идентичность» между двумя белками может быть определена путем выравнивания аминокислотной последовательности первого белка с последовательностью второго белка, которая содержит консервативную замену аминокислоты относительно первого белка. Степень идентичности между двумя белками можно определить с помощью компьютерных алгоритмов и способов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями предпочтительно определяют с использованием алгоритма BLASTP.

В некоторых воплощениях изобретения функциональные варианты, раскрытые в настоящем документе, включают варианты, имеющие замены, делеции, добавления и/или вставки аминокислотных остатков в 1, 2, 3, 4, 5 или более положениях по сравнению с упомянутыми выше пептидами, и тем самым отличающиеся от конкретных пептидов, раскрытых выше.

Как описано выше, функциональный вариант может отличаться от конкретного пептида, раскрытого выше, одной или более заменами, делециями, добавлениями и/или вставками. Таким варианты могут иметь природное происхождение или могут быть получены синтетическим путем. Например, одна или более из описанных выше пептидных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, могут быть модифицированы, и оценку их биологических активностей можно проводить, следуя любой из разнообразных методик, хорошо известных в данной области техники или описанных в настоящем документе.

В некоторых воплощениях изобретения полипептид представляет собой химерный пептид, содержащий группировку интернализации пептида и активную пептидную группировку, представляющую собой аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант, и группировка интернализации пептида

способна облегчать захват химерного пептида клеткой.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что главная цель объединения активного пептида и пептида интернализации в химерном пептиде состоит в улучшении доставки активного пептида к мишени его действия. Таким образом, пептиды интернализации, подходящие для настоящей заявки, не ограничены определенными типами, если может быть достигнута цель проникновения в клетку. Специалистам в данной области техники также должно быть понятно, что, поскольку мишень действия активного пептида главным образом локализована внутри нейронов, предпочтительно, чтобы пептид интернализации специфично подходил к нейронам. В некоторых воплощениях изобретения пептид интернализации может представлять собой пептид Tat. В некоторых воплощениях изобретения аминокислотная последовательность пептида Tat представляет собой YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2). В некоторых воплощениях изобретения химерный пептид содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRRYEKLLDTEI (SEQ ID NO: 3).

Следует принимать во внимание, что пептид интернализации может быть связан с активным пептидом амидной связью с образованием слитого пептида, при этом они также могут быть связаны другими подходящими средствами, такими как химическая связь. Сочетание двух компонентов может быть достигнуто с помощью агента сочетания или агента конъюгации. В продаже имеется большое количество таких реактивов, и их можно обнаружить в работе S. S. Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*, CRC Press (1991). Примеры реактивов поперечной сшивки включают J-сукцинимид-3-(2-пиридиндитио)пропионат (SPOP) или N,N'-(1,3-фенилен)бисмалеимид; N,N'-этилиден-бис-(йодацетамид) или другие такие реактивы, имеющие от 6 до 11 углеродных метиленовых мостиков (которые являются относительно специфичными к тиольным группам); и 1,5-дифтор-2,4-динитробензол (образующий необратимую связь с аминогруппой и группой тирозина). Другие реактивы поперечной сшивки включают P,P'-дифтор-м,м'-динитрофенилсульфон (образующий необратимую поперечную сшивку с аминогруппой и фенольной группой); диметилдиэтиламингексаноат (специфичный к аминогруппе); фенол-1,4-дисульфонила хлорид (главным образом взаимодействующий с аминогруппой); 1,6-гексаметилендиизоцианат, или диизотиоцианат, или диизотиоцианат, либо фенилазо-п-диизоцианат (главным образом взаимодействующий с аминогруппой); глутаральдегид, (взаимодействующий с несколькими различными боковыми цепями), и бис-диазотированный бензидин (главным образом взаимодействующий с тирозином и гистидином).

Активный пептид и слитый пептид с активным пептидом, слитым с пептидом интернализации по настоящему изобретению можно синтезировать способами твердофазного синтеза или рекомбинантными способами. Пептидомиметики можно синтезировать с использованием разнообразных протоколов и способов, описанных в научных трудах и патентных документах, таких как *Organic Syntheses Collective Volumes*, Gilman *et al.* (ed.) 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.

Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, ожидают, что молекула или ион с зарядом, противоположным заряду лекарственного вещества, при объединении с лекарственным веществом с образованием соли может улучшить некоторые нежелательные физико-химические или биофармацевтические свойства лекарственного вещества, например, изменить растворимость или растворение, уменьшить гигроскопичность, улучшить стабильность или изменить температуру плавления лекарственного вещества. Для окончательного определения идеальной солевой формы требуется надлежащее равновесие между физико-химическими свойствами и биофармацевтическими свойствами. При выборе фармацевтически приемлемой солевой формы лекарственного вещества приоритет должен быть отдан таким требованиям, как растворимость, гигроскопичность и устойчивость к факторам окружающей среды в различных состояниях. Фармацевтически приемлемые соли полипептидов согласно настоящей заявке могут быть в любой подходящей фармацевтически приемлемой форме. В некоторых воплощениях изобретения фармацевтически приемлемая соль полипептида представляет собой трифторацетат. В некоторых воплощениях изобретения фармацевтически приемлемая соль полипептида представляет собой ацетат. В некоторых воплощениях изобретения фармацевтически приемлемая соль полипептида представляет собой гидрохлорид. В некоторых воплощениях изобретения фармацевтически приемлемая соль полипептида представляет собой фосфат. В некоторых конкретных воплощениях изобретения фармацевтически приемлемая соль полипептида представляет собой ацетат или гидрохлорид.

Во втором аспекте в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемую соль полипептида, как описано в соответствии с первым аспектом, и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент и/или разбавитель.

Описанные в настоящем документе соединения могут быть получены в форме

лиофилизированной композиции. В некоторых воплощениях изобретения в настоящей заявке предложена лиофилизированная композиция. Лиофилизированная композиция может быть получена путем лиофилизации прелиофилизированной композиции, содержащей по меньшей мере один активный ингредиент, буфер, наполнитель и воду, где активный ингредиент представляет собой соединение согласно настоящей заявке или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых воплощениях изобретения предпочтительным буфером является гистидин. Другие буферы могут быть выбраны из сукцината, цитрата, глюконата, ацетата, фосфата, Трис и т.д. Наполнитель придает структуру лиофилизированному соединению. В некоторых воплощениях изобретения наполнитель выбран из маннита, трегалозы, декстрана-40, глицина, лактозы, сорбита, сахарозы и тому подобного, при этом предпочтительна трегалоза. В некоторых воплощениях изобретения лиофилизированная композиция согласно настоящей заявке содержит описанное выше соединение или его фармацевтически приемлемую соль, и гистидин и трегалозу.

Лиофилизированная композиция может быть восстановлена. Таким образом, лиофилизированную композицию регидратируют раствором с образованием раствора частиц, невидимых невооруженным глазом. В некоторых воплощениях в настоящей заявке предложена восстановленная композиция, полученная путем объединения лиофилизированной композиции с водным раствором. В некоторых воплощениях изобретения водный раствор представляет собой воду для инъекций. В некоторых воплощениях изобретения водный раствор представляет собой физиологический соляной раствор.

Термин «лиофилизация» относится к процессу, при котором исходное сырье, подлежащее высушиванию, сначала замораживают, а потом сублимируют в условиях вакуума, чтобы удалить лед или замороженные растворители.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтически приемлемую соль раскрытого в настоящем документе полипептида можно вводить в форме фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может быть приготовлена традиционными способами, например, смешиванием, растворением, гранулированием, таблетированием, размалыванием, эмульгированием, инкапсуляцией, иммобилизацией или лиофилизацией.

Фармацевтическая композиция может быть приготовлена традиционным способом, с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или ингредиентов, подходящих для приготовления

фармацевтически приемлемой композиции фармацевтически приемлемой соли полипептида. Подходящее приготовление зависит от выбранных путей введения.

В некоторых воплощениях изобретения введение может быть парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, внутричерепным, подоболочечным, внутрибрюшинным, местным, интраназальным или внутримышечным. Предпочтительно внутривенное введение.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическая композиция для внутривенного введения является предпочтительно стерильной и по существу изотоничной. Для инъекций фармацевтически приемлемая соль полипептида может быть приготовлена в водном растворе, предпочтительно в физиологически совместимом буфере, таком как раствор Хэнка, раствор Рингера, либо в физиологическом солевом растворе или ацетатном буфере (чтобы уменьшить дискомфорт в месте инъекции). Раствор может содержать агенты, образующие препарат, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Альтернативно фармацевтически приемлемая соль полипептида может быть в форме порошка для восстановления непосредственно перед применением с помощью подходящего носителя, такого как стерильная апиrogenная вода.

В случае трансмукозального введения в составе применяют пенетранты, подходящие для проникновения через интересующий барьер. Этот путь введения можно использовать для доставки соединения в носовую полость или для сублингвального введения.

В некоторых воплощениях изобретения для перорального введения фармацевтически приемлемую соль полипептида можно объединять с фармацевтически приемлемым носителем в таблетки, пилюли, пастилки, капсулы, жидкости, гели, сиропы, взвеси, суспензии и тому подобное, для приема внутрь пациентом, подлежащим лечению. Для твердых пероральных композиций, таких как порошки, капсулы и таблетки, подходящие эксципиенты включают наполнители, такие как сахара, такие как лактоза, сахароза, маннит и сорбит; препараты целлюлозы, такие как кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, карбоксипропилметилцеллюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, и/или повидон (ПВП); гранулирующие агенты и связующие агенты. Если требуется, можно добавлять разрыхлитель, такой как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль (такая как альгинат натрия). Если требуется, твердые композиции можно покрывать сахаром или

энтеросолюбильным покрытием, используя стандартные методики. Для жидких пероральных композиций, таких как эликсиры и растворы, подходящие носители, эксципиенты или растворители включают воду, глицерин, масло и спирт. Кроме того, можно добавлять корригент, консервант, красящее вещество или тому подобное.

В дополнение к описанным выше композициям фармацевтически приемлемую соль полипептида можно включать в резервуарную лекарственную форму. Такие композиции пролонгированного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Таким образом, например, соединение можно объединять с подходящим полимерным или гидрофобным материалом (например, приготовленном в виде эмульсии в приемлемом масле), либо с ионообменной смолой, либо приготовить в виде умеренно растворимого производного, например в виде умеренно растворимой соли.

Альтернативно можно использовать другие системы доставки лекарственного препарата. Химерный пептид может быть доставлен с помощью липосом и эмульсий. Можно также использовать некоторые органические растворители, такие как диметилсульфоксид. Дополнительно соединение может быть доставлено с помощью системы с замедленным высвобождением, такой как полупроницаемый субстрат из твердых полимеров, содержащий терапевтический агент.

Капсулы пролонгированного высвобождения могут высвобождать химерный пептид в течение нескольких недель или даже более чем до 100 дней в зависимости от их химических свойств. В зависимости от химических свойств и биологической стабильности терапевтического агента могут быть использованы другие стратегии стабилизации белка.

Фармацевтически приемлемую соль полипептида применяют в количестве, эффективном для достижения предусмотренной цели (например, уменьшение повреждающего воздействия, вызванного инсультом и родственными состояниями). Терапевтически эффективное количество означает количество фармацевтически приемлемой соли полипептида, достаточное для значимого уменьшения вызванных инсультом повреждений у пациентов (или в модельной популяции животных), получивших лечение раскрытой в настоящем документе фармацевтически приемлемой солью полипептида, по сравнению с повреждением центральной нервной системы в контрольной популяции пациентов (или животных моделей), не получивших лечение раскрытой в настоящем документе фармацевтически приемлемой солью полипептида. Количество также считают терапевтически эффективным, если у получившего лечение

пациента достигается лучший результат по сравнению со средним результатом (определяемым объемом очага омертвения или индексом инвалидизации) в сопоставимой контрольной популяции пациентов, не получивших лечение раскрытым в настоящем документе способом. Это количество также считают терапевтически эффективным количеством. Это количество также считают терапевтически эффективным, если получивший лечение пациент характеризуется балльной оценкой инвалидизации 2 или менее по шкале Рэнкина и 75 или более по шкале Бартела. Дозу также считают терапевтически эффективной, если популяция получивших лечение пациентов демонстрирует значимо улучшенное распределение балльных оценок (т. е. меньшую инвалидизацию) по шкале инвалидизации по сравнению с сопоставимыми популяциями не получивших лечение пациентов, см. Lees *et al.* N Engl J Med 2006; 354: 588–600. Терапевтически эффективная схема лечения представляет собой сочетание терапевтически эффективной дозы и периодичности введения, необходимой для достижения описанной выше предусмотренной цели.

В некоторых воплощениях изобретения предпочтительный диапазон дозы фармацевтически приемлемой соли полипептида в соответствии с настоящей заявкой включает в себя от 0,001 до 20 мкмоль соли на кг массы тела пациента, возможно, от 0,03 до 3 мкмоль соли на кг массы тела пациента, включая любую величину или любой диапазон в этих пределах. В некоторых способах вводят 0,1–20 мкмоль соли в соответствии с настоящей заявкой на кг массы тела пациента в течение 6 часов. В некоторых способах вводят 0,1–10 мкмоль соли в соответствии с настоящей заявкой на кг массы тела пациента в течение 6 часов, более предпочтительно около 0,3 мкмоль соли в соответствии с настоящей заявкой на кг массы тела пациента в течение 6 часов. В других случаях диапазон дозы составляет от 0,005 до 0,5 мкмоль соли в соответствии с настоящей заявкой на кг массы тела пациента. Дозу на кг массы тела для крысы можно преобразовать в дозу для человека путем деления на 6,2, чтобы компенсировать различия отношения площади поверхности к массе тела. Приемлемая доза соли в соответствии с настоящей заявкой для применения у человека в граммах может включать от 0,01 до 100 мг/кг массы тела пациента, или более предпочтительно от 0,01 до 30 мг/кг массы тела пациента, или от 0,01 до 10 мг/кг, или от 0,01 до 1 мг/кг, включая любую величину или любой диапазон в этих пределах.

В некоторых воплощениях изобретения вводимое количество фармацевтически приемлемой соли полипептида зависит от подлежащего лечению субъекта, массы тела субъекта, выраженности боли, способа введения и корректировки врачом, назначающим

препарат. Терапию можно повторять при определяемых или даже не определяемых симптомах. Терапию можно проводить отдельно или в комбинации с другими лекарственными препаратами.

В некоторых воплощениях изобретения терапевтически эффективная доза раскрытой в настоящем документе фармацевтически приемлемой соли полипептида способна обеспечивать благоприятный терапевтический эффект, не вызывая значимой токсичности. Токсичность химерного пептида можно определять на культурах клеток или у экспериментальных животных с помощью стандартных фармацевтических процедур, например, путем определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции), или LD₁₀₀ (дозы, летальной для 100% популяции). Отношение дозы, вызывающей токсический эффект, к дозе, вызывающей терапевтический эффект, представляет собой терапевтический индекс. Предпочтительна фармацевтически приемлемая соль полипептида, демонстрирующая высокий терапевтический индекс (см., например, Fingl *et al*, 1975, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Chapter 1, page 1).

Во втором аспекте в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемую соль полипептида, как описано в первом аспекте, и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент и/или разбавитель.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическую композицию применяют для лечения, облегчения или профилактики повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическую композицию применяют в качестве нейропротективного агента.

В некоторых воплощениях изобретения повреждение нервной системы представляет собой повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью.

В некоторых воплощениях изобретения повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного или спинного мозга, повреждения нейронов в центральной нервной системе (ЦНС), включая острое повреждение ЦНС, инсульт или повреждение спинного мозга, гипоксию, ишемию или механическое повреждение и повреждение, вызванное нейродегенеративным заболеванием, тревогой, эпилепсией или инсультом.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическую композицию

применяют для лечения, облегчения или профилактики ишемического инсульта или повреждения нервной системы, вызванного ишемическим инсультом. В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическую композицию применяют для лечения, облегчения или профилактики геморрагического инсульта или повреждения нервной системы, вызванного геморрагическим инсультом. В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическую композицию применяют для лечения, облегчения или профилактики геморрагического инсульта, преобразованного из ишемического инсульта, или повреждения нервной системы, вызванного геморрагическим инсультом, преобразованным из ишемического инсульта.

Инсульт представляет собой состояние, вызванное нарушением кровотока в ЦНС. Возможные причины включают эмболию, кровотечение и тромбоз. Из-за нарушения кровотока некоторые нейроны погибают мгновенно. Эти клетки высвобождают свои молекулы-компоненты (включая глутаминовую кислоту), которые, в свою очередь, активируют рецепторы NMDA, в результате чего повышаются внутриклеточные уровни кальция и внутриклеточные уровни ферментов, приводя к гибели все большего количества нейронов (каскадной амплификации возбуждающей нейротоксичности). Гибель тканей ЦНС называют омертвением (инфарктом). Объем очага омертвения (т.е. объем погибших вследствие инсульта нейронов в головном мозге) можно использовать в качестве показателя степени вызванных инсультом патологических повреждений. Симптоматические эффекты зависят как от объема очага омертвения, так и от локализации очага омертвения в головном мозге. Индекс инвалидизации можно использовать как меру симптоматических повреждений, такую как шкала исходов инсульта Рэнкина (Rankin, Scott MedJ; 2: 200-15 (1957) и индекс Бартела. Шкала Рэнкина основана на прямой оценке пациентом системного состояния, как описано ниже.

0: симптомы полностью отсутствуют.

1: симптомы есть, но без значимого снижения трудоспособности; пациент способен выполнять все виды повседневной работы и занятий.

2: незначительное снижение трудоспособности; пациент не может выполнять все виды деятельности, как прежде, но способен ухаживать за собой без посторонней помощи.

3: умеренная инвалидизация, требующая некоторой помощи, но пациент может самостоятельно ходить.

4: инвалидизация от умеренной до тяжелой степени, пациент неспособен ходить без посторонней помощи и не может удовлетворять естественные потребности своего организма без посторонней помощи.

5: тяжелая инвалидизация; пациент прикован к постели, недержание мочи и кала, и нуждается в постоянном уходе и внимании.

Индекс Бартела основан на группах вопросов о способности пациента выполнять 10 основных видов повседневной деятельности, которые оценивают в баллах по шкале от 0 до 100, где более низкие баллы указывают на более высокую степень инвалидизации (Mahoney *et al.*, Maryland State Medical Journal) 14:56-61 (1965).

Альтернативно степень тяжести/исход инсульта можно измерять с помощью шкалы инсульта Национальных институтов здравоохранения (НИИ), которая доступна на международном портале ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_Scale_Booklet.pdf. Эта шкала основана на способности пациента к выполнению 11 комплектов действий, включая оценку уровня сознания, двигательных, сенсорных и речевых функций пациента.

Ишемический инсульт более четко определяют как тип инсульта, вызванный блокадой кровотока в головном мозге. Потенциальный патогенез таких блокад чаще всего связан с появлением жировых отложений вдоль стенок кровеносных сосудов. Это состояние называют атеросклерозом. Эти жировые отложения вызывают два типа закупорки. Тромбоз сосудов головного мозга относится к тромбу (сгустку крови), образуемому в заблокированном участке кровеносного сосуда. «Эмболия головного мозга» обычно означает, что различные эмболы (такие как пристеночный тромб в сердце, атеросклеротическая бляшка, жир, опухолевые клетки, соединительно-тканый хрящ или воздух), находящиеся в крови, проникают в мозговую артерию вместе с кровотоком и блокируют кровеносные сосуды. Если коллатерального кровообращения недостаточно для компенсации, это вызывает ишемический некроз ткани головного мозга, которую эта артерия снабжает кровью, и очаговый неврологический дефицит. Второй важной причиной эмболии являются нерегулярные сердечные сокращения, называемые фибрилляцией предсердий. Это вызывает состояние, при котором сгусток крови может образоваться в сердце, а затем сместиться и переместиться в головной мозг. Другими возможными причинами ишемического инсульта являются кровоизлияние, тромбоз, разрыв артерии или вены, остановка сердца, шок по любым причинам (включая кровотечение) и ятрогенные причины, такие как прямые хирургические повреждения кровеносных сосудов головного мозга или кровеносных сосудов, идущих к головному мозгу, или операция на сердце. Ишемические инсульты насчитывают приблизительно 83% всех случаев инсульта.

Несколько других неврологических расстройств также могут вызывать гибель нейронов в результате опосредованной NDMAR возбуждающей нейротоксичности. Эти

расстройства включают нейродегенеративные заболевания, тревогу, эпилепсию, гипоксию, повреждение ЦНС, не связанное с инсультом, такое как травматическое повреждение головного мозга и повреждение спинного мозга. Соответственно, в некоторых воплощениях изобретения фармацевтическую композицию применяют для лечения, облегчения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, тревоги или эпилепсии, где нейродегенеративные заболевания могут включать болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона или болезнь Хантингтона.

В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическую композицию применяют в качестве нейропротективного агента.

В третьем аспекте в настоящей заявке предложен способ лечения, облегчения или профилактики повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта, включающий введение этому субъекту фармацевтически приемлемой соли полипептида, как описано в первом аспекте, или фармацевтической композиции, как описано во втором аспекте.

В некоторых воплощениях изобретения повреждение нервной системы представляет собой повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, где повреждение или боль могут быть локализованы в периферической нервной системе или в центральной нервной системе. В некоторых воплощениях изобретения повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного или спинного мозга, повреждения нейронов в центральной нервной системе (ЦНС), включая острое повреждение ЦНС, инсульта или повреждения спинного мозга, гипоксии, ишемии или механического повреждения и повреждения, вызванного нейродегенеративным заболеванием, тревогой, эпилепсией или инсультом.

В некоторых воплощениях изобретения нейродегенеративное заболевание включает болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона или болезнь Хантингтона.

В некоторых воплощениях изобретения заболевание представляет собой ишемический инсульт или повреждение нервной системы, вызванное ишемическим инсультом. В некоторых воплощениях изобретения заболевание представляет собой геморрагический инсульт или повреждение нервной системы, вызванное геморрагическим инсультом. В некоторых воплощениях изобретения заболевание представляет собой

геморрагический инсульт, преобразованный из ишемического инсульта, или повреждение нервной системы, вызванное геморрагическим инсультом, преобразованным из ишемического инсульта.

В четвертом аспекте в настоящей заявке предложено применение фармацевтически приемлемой соли полипептида, как описано в первом аспекте, или фармацевтической композиции, как описано во втором аспекте, в изготовлении лекарственного средства для лечения, облегчения или профилактики повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта или в изготовлении нейропротективного агента.

В некоторых воплощениях изобретения повреждение нервной системы представляет собой повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, где повреждение или боль могут быть локализованы в периферической нервной системе или в центральной нервной системе. В некоторых воплощениях изобретения повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга, ишемического или травматического повреждения головного или спинного мозга, повреждения нейронов в центральной нервной системе (ЦНС), включая острое повреждение ЦНС, инсульт или повреждение спинного мозга, гипоксии, ишемии или механического повреждения и повреждения, вызванного нейродегенеративным заболеванием, тревогой, эпилепсией или инсультом.

В некоторых воплощениях изобретения нейродегенеративное заболевание включает болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (БАС), болезнь Паркинсона или болезнь Хантингтона.

В некоторых воплощениях изобретения заболевание представляет собой ишемический инсульт или повреждение нервной системы, вызванное ишемическим инсультом. В некоторых воплощениях изобретения заболевание представляет собой геморрагический инсульт или повреждение нервной системы, вызванное геморрагическим инсультом. В некоторых воплощениях изобретения заболевание представляет собой геморрагический инсульт, преобразованный из ишемического инсульта, или повреждение нервной системы, вызванное геморрагическим инсультом, преобразованным из ишемического инсульта.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» относится к животным, включая птиц, рептилий и млекопитающих. В некоторых воплощениях изобретения

субъект представляет собой млекопитающее, включающее приматов и не являющихся приматами, например человека, шимпанзе, крупный рогатый скот, лошадей, свиней, овец, коз, собак, кошек и животных отряда грызунов, таких как крысы и мыши.

Следует понимать, что цель приведенного выше подробного описания состоит лишь в том, чтобы помочь специалистам в данной области техники более четко понять настоящую заявку, но оно никоим образом не предусматривает ограничения настоящей заявки. Специалисты в данной области техники могут выполнять различные модификации и изменения описанных воплощений.

ПРИМЕРЫ

Приведенные ниже примеры представлены только для иллюстрации некоторых воплощений настоящей заявки и не имеют какой-либо ограничительной цели или характера.

Пример 1. Скрининг активных пептидных молекул

На основании описанных результатов исследования был выбран трансмембранный пептид Tat YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2), который лигировали с различными количествами аминокислот с образованием пептидной библиотеки. Молекулы химерного пептида в библиотеке пептидов исследовали на взаимодействие с доменом PDZ1/2, полученным в результате экспрессии и очистки *in vitro*, и подвергали полипептиды предварительному скринингу для определения прочности силы взаимодействия.

Молекулой иммобилизованной фазы (лигандом) был белок PDZ1/2 с молекулярной массой приблизительно 20 кД в концентрации 2 мг/мл. Молекулой подвижной фазы (определяемым веществом) был подлежащий скринингу полипептид с молекулярной массой приблизительно 2 кД в концентрации 10 мг/мл. Для фиксации с помощью прибора Вiascore 3000 использовали микрочип CM5. Электрофоретический буфер представлял собой фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавлением 0,005% Твин 20. Фиксацию проводили, используя метод аминного сочетания. Концентрация лиганда составляла 10 мкг/мл. Буфер для фиксации представлял собой 10 ммоль/л ацетата натрия, pH 4,0. Фиксируемое количество для проточной кюветы 2 составляло 1400 единиц ответа (ЕО). Используемая скорость потока составляла 10 мкл/мин, и лиганд наносили в течение 1 минуты. В качестве регенерирующего раствора использовали 10 ммоль/л глицина при pH 2,0 + 2,5. Регенерацию проводили со скоростью потока 30 мкл/мин. Время нанесения составляло 30 с.

Анализ кинетики выполняли, используя описанные ниже условия.

Контрольный канал: проточная кювета 1

Электрофоретический буфер: ФСБ

Режим: Мастер анализа кинетики (Kinetic Analysis Wizard)

Градиенты концентрации: 6,25 нмоль, 12,5 нмоль, 25 нмоль, 50 нмоль, 100 нмоль, 200 нмоль, 400 нмоль

Время нанесения: 1 минута

Время диссоциации: 2 мин

Скорость потока: 30 мкл/мин

Аппроксимацию данных выполняли с помощью программного обеспечения аппроксимации Viaevaluation 4.1. Модель аппроксимации представляла собой модель связывания 1:1. Значение константы диссоциации KD было обратно пропорционально силе взаимодействия.

В результате скрининга был получен химерный пептид, обладающий сильной способностью к взаимодействию с доменом PDZ1/2, и обозначен P5. Последовательность этого химерного пептида приведена ниже.

P5: YGRKKRRQRRRYEKLLDTEI

Чтобы провести прямое сравнение с аналогичным химерным пептидом в опубликованных исследованиях, был введен контрольный химерный пептид NA-1 с приведенной ниже последовательностью.

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

Кроме того, с учетом структурного различия между P5 и NA-1 был дополнительно введен химерный пептид YE-NA-1, в котором два остатка YE были присоединены к N-концу активного пептида химерного пептида NA-1, и его последовательность приведена ниже.

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

Химерные пептиды NA-1, YE-NA-1 и P5 одновременно подвергали исследованиям на взаимодействие с доменом PDZ1/2, как указано выше, и результаты представлены в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Определение силы взаимодействия между тремя химерными пептидами и доменом PDZ1/2

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

Как показано в таблице 1, химерные пептиды YE-NA-1 и P5 более интенсивно взаимодействовали с доменом PDZ1/2 по сравнению с контрольным химерным пептидом

NA-1, и характеристики P5 были даже лучше. Таким образом, на основании предположений авторов изобретения два дополнительных аминокислотных остатка YE на N-конце активного пептида оказали некоторое благоприятное влияние на взаимодействие полипептида с доменом PDZ1/2. Кроме того, в P5 отсутствуют два слабо гидрофобных остатка серина (SS) относительно карбокси-конца YE-NA-1. Как предполагают авторы изобретения, это может дополнительно усиливать взаимодействие полипептида с доменом PDZ1/2.

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

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

Колонку уравнивали 100 мкл гранул с гистидином и 1 мл буфера MCAC-0 в течение 5 мин, и затем перемешивали встряхиванием при 4°C. Смесь центрифугировали при 5000 g в течение 1 минуты при 4°C и отбрасывали супернатант. К смеси добавляли 1 мг белка PDZ1/2 и добавляли буфер до достижения объема 1 мл. Смесь вращали для связывания в течение 1 часа при 4°C. Смесь центрифугировали при 5000 g в течение 1 минуты при 4°C, и супернатант отбрасывали. Смесь промывали три раза 1 мл буфера MCAC-0, каждый раз по 5 мин (промывка при 4°C со встряхиванием). К смеси добавляли 1 мг белка P5 и добавляли буфер до достижения объема 1 мл. Смесь вращали для связывания в течение 2 часов при 4°C. Смесь центрифугировали при 5000 g в течение 1 минуты при 4°C, и супернатант отбрасывали. Смесь промывали три раза 1 мл буфера для лизиса, каждый раз по 5 мин (промывка при 4°C со встряхиванием). После промывки добавляли 20 мкл MCAC-300. После центрифугирования элюат отбирали на анализ с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГЭ). Результаты эксперимента представлены на Фиг. 1.

Как показано на Фиг. 1, в полосе элюата химерного пептида P5 присутствовали как пептид P5, так и домен PDZ1/2, что подтверждает способность химерного пептида P5 к связыванию с доменом PDZ1/2.

Пример 3. Терапевтические эффекты солей P5 в модели MCAO (модель окклюзии срединной церебральной артерии) на крысах

На основе химерного пептида P5, полученного в примерах 1 и 2, авторы настоящего изобретения сконструировали P5-трифторацетат (P5-ТФА), P5-ацетат (P5-Ас) и P5-гидрохлорид (P5-Cl) и передали для синтеза в компанию Hangzhou Chinese Peptide Co., Ltd. Исследование терапевтических эффектов этих трех полученных

солей P5 проводили в модели МСАО на крысах.

Экспериментальные животные и материалы

Животные представляли собой взрослых самцов крыс линии Спрег-Доули (СД) (Vittalia), маркированных как свободные от специфической патогенной микрофлоры (СПФ), с массой тела 220–250 г.

Инструменты включали односторонние ножницы, две пары глазных хирургических ножниц, четыре пинцета с изогнутыми концами, хирургический шовный материал №4, №5, треугольные иглы 6×17, окклюзионную систему (0,26 мм в диаметре) и один иглодержатель. Препараты включали раствор хлорида натрия для инъекций Enbipu (Shijiazhuang Group NBP Pharmaceutical Co., Ltd.), хлоралгидрат, фуросемид (20 мг/флакон), гентамицина сульфат (80 мг/флакон), ватные тампоны и медицинские лотки.

Моделирование МСАО

Модель очаговой церебральной ишемии-реперфузии была подготовлена в соответствии с методикой наложения швов для создания обратимой окклюзии средней мозговой артерии (МСАО; middle cerebral artery occlusion), предложенной Лонга (Longa), с модификациями с учетом анатомической структуры головного мозга крысы. Крыс анестезировали с помощью интраперитонеального введения 10% хлоралгидрата в дозе 0,3 мл/кг. После анестезии делали разрез по срединной линии шеи и обнажали общую сонную артерию (ОСА), наружную сонную артерию (НСА) и крылонебную артерию. Рабочую часть (0,5 см) монофиламентной нейлоновой хирургической лески (0,26 мм) покрывали парафином и делали отметку на 20 мм. Ее вводили всем крысам через надрез ОСА справа, и для предотвращения ошибочного введения на крылонебную артерию накладывали временный зажим. Длина окклюзионной системы составляла около 18–20 мм от разветвления ОСА в зависимости от массы тела животного, в результате чего создавалась окклюзия средней мозговой артерии с правой стороны. Затем кожу зашивали, и хвостовой конец окклюзионной системы частично закрепляли на коже. После периода ишемии в течение 2 часов окклюзионную линию осторожно извлекали, чтобы создать реперфузию. В течение периода ишемии и 2 ч после реперфузии температуру тела поддерживали при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Успешным маркером для модели является то, что после пробуждения крыс от анестезии у них наблюдали паралич левой конечности, неустойчивую стойку и переворот на одну сторону при поднятии за хвост.

Разделение на экспериментальные группы

Экспериментальных животных распределяли в контрольную группу (нормальная группа), модельную группу (группу, получавшую физиологический раствор),

положительную контрольную группу, получавшую препарат Enbipru (NBP), и группы, получавшие соль P5. Физиологический раствор, положительный контрольный препарат Enbipru (2,5 мг/кг) и каждую из солей P5 (10 мг/кг) соответственно вводили соответствующим группам крыс путем инъекции в хвостовую вену через 1 час после ишемии.

Расчет объема очага омертвения

Через 24 ч после введения препаратов крыс умерщвляли путем декапитации. Ткани головного мозга быстро извлекали и помещали в холодильник на -20°C . Через 10 минут ткани помещали в окружающую среду комнатной температуры. Головные мозги помещали в секционную форму для головного мозга крысы. После удаления обонятельной луковицы, мозжечка и нижнего ствола головного мозга проводили пять коронарных разрезов головного мозга толщиной 2 мм, как показано в профиле, с получением шести непрерывных необработанных коронарных срезов. Затем срезы головного мозга быстро помещали в 5 мл раствора, содержащего 2% тетразолия хлорида (ТТС), и инкубировали при 37°C в течение 30 минут в темноте, в течение которых срезы переворачивали один раз каждые 5 минут. При окрашивании ТТС нормальная ткань будет иметь розово-красный цвет, а омертвевшая ткань не окрасится и останется белой. Аккуратно располагали каждую группу срезов и фотографировали. Фотографии обрабатывали с помощью программного обеспечения системы анализа изображений и проводили статистический анализ. На каждом срезе головного мозга рассчитывали площадь очага омертвения и умножали на толщину каждого среза головного мозга (2 мм). Произведения площади очага омертвения в рассматриваемом срезе головного мозга и толщины среза суммировали с получением общего объема очага омертвения головного мозга у каждого животного. Чтобы устранить влияние отека головного мозга, эти значения выражали в процентах от объема полушария головного мозга.

Результаты эксперимента представлены на Фиг. 2. Эти результаты показали, что введение P5-ТФА, P5-As и P5-Cl приводило к статистически значимому уменьшению объема очага омертвения в головном мозге крыс по сравнению с модельной группой (p менее 0,01); при этом при сравнении с положительным контрольным препаратом NBP эффекты введения P5-ТФА, P5-As и P5-Cl по уменьшению объема очага омертвения у крыс статистически значимо превосходили эффекты положительного контрольного препарата NBP (p менее 0,05).

Пример 4. Определение цитотоксичности солей P5

В этом примере проводили исследование цитотоксичности двух солей полипептида

P5-As и P5-Cl из примера 3.

Материалы эксперимента

Использовали линию клеток PC12. Другие материалы эксперимента включали чистый лабораторный стол с вертикальным ламинарным потоком воздуха, паровой стерилизатор, центрифугу, микроскоп, ридер микропланшетов, покровные стекла, чашку для подсчета клеток крови, ручной счетчик, спиртовую горелку, микродозаторы, пипетки, наконечники для автоматических пипеток, центрифужные пробирки, 96-луночные планшеты, фосфатно-солевой буфер (ФСБ)/физиологический раствор, модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (содержащую 10% фетальную телячью сыворотку (ФТС) и 1%-ый раствор двух антибиотиков). ССК8 приобретали у компании Solvay.

Протоколы экспериментов

Клетки в логарифмической фазе роста собирали и высевали в 96-луночный планшет при плотности 4×10^4 клеток/лунка в трех повторностях и культивировали в течение ночи. Готовили препарат соли P5 (например, 5 мкмоль) в культуральной среде. Супернатант в 96-луночном планшете отбрасывали, планшет промывали 2–3 раза ФСБ/физиологическим раствором, а затем в каждую лунку добавляли 100 мкл препарата соли P5. Тот же препарат соли P5 также добавляли в контрольные лунки с холостой средой (не содержащие клеток). Клетки культивировали в течение 24 часов. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 10 мкл ССК8 и инкубировали планшет в течение 1 ч. Оптическую плотность в каждой лунке 96-луночного планшета измеряли при 450 нм с помощью ридера для микропланшетов. Жизнеспособность клеток рассчитывали на основании показаний по следующему уравнению.

$$\text{Жизнеспособность клеток (\%)} = (\text{экспериментальная группа} - \text{соответствующая контрольная группа с холостой пробой}) / (\text{экспериментальная группа } 0 \text{ мкмоль} - \text{контрольная группа с холостой пробой}, 0 \text{ мкмоль}) \times 100\%$$

Результаты эксперимента представлены на Фиг. 3. Результаты показали, что две фармацевтически приемлемые соли полипептида P5, т. е. P5-As и P5-Cl, не обладают значимой цитотоксичностью в концентрации 5 мкмоль.

Пример 5. Стабильность солей P5

В данном примере проводили исследование стабильности трех солей P5 из примера 3 в различных условиях, включая освещение, высокую температуру и высокую влажность.

Анализ стабильности порошков солей P5

Три соли P5 примера 3 в форме порошка подвергали воздействиям освещения

(3000 Люкс) и ультрафиолетового света (УФ), высокой температуры (60°C) и высокой влажности (ОВ 75%) в течение 10 дней. После обработки порошки растворяли в воде с получением раствора концентрации 2 мг/мл. Точно отмеряли 10 мкл каждого раствора, вводили в жидкостный хроматограф, и записывали хроматограммы. Для анализа содержания и количества видов примесей рассчитывали содержание соответствующих веществ методом нормализации площади пика.

Приборы и реактивы

Высокоэффективный жидкостный хроматограф (Agilent, 1260 EZChrom); хроматографическая колонка (Agilent, ZORBAX 300SB-C18 (4,6 * 250 мм, 5 мкм) SN: USHH008416); аналитические весы (Sartoris, BT25S); фильтрационная мембрана (Millipore, 0,45 мкм ПТФЭ (политетрафторэтилен)); ацетонитрил (MREDA); вода (Aqua); трифторуксусная кислота (ТФУ) (MREDA); и испытательная камера для полного исследования стабильности лекарственных препаратов (трехкамерного типа) (Shanghai Zuocheng Experimental Instrument Co. Ltd, № изделия SHH-3SDT).

Параметры хроматографирования

Подвижная фаза: А 0,065% ТФУ в воде; В 0,05% ТФУ в ацетонитриле (ACN)

Длина волны детектора $\lambda = 220$ нм; скорость потока $V = 1,0$ мл/мин; температура $T = 36^\circ\text{C}$

Объем вводимой пробы (I_{nj}) = 10 мкл

Условия градиента: 0–30 мин, $B\% = 5–65\%$

Результаты анализа

Результаты анализа стабильности порошков трех солей P5 представлены ниже в таблице 2 и на панелях А и В на Фиг. 4.

Таблица 2

		Гидрохлорид	Ацетат	Трифторацетат
Освещение + ультрафиолетовый свет	Процент площади основного пика	90,59%	96,47%	98,34%
	Количество видов примесей	18	14	6
Высокая температура	Процент площади основного пика	99,50%	99,79%	99,56%
	Количество видов примесей	3	1	3

Высокая влажность	Процент площади основного пика	99,44%	95,75%	99,73%
	Количество видов примесей	3	2	1

Результаты

После воздействия освещения и ультрафиолетового света проценты площади основного пика и количества видов примесей трех солей статистически значимо различались. Относительный порядок стабильности был таким: трифторацетат > ацетат > гидрохлорид.

После воздействия высокой температуры проценты площади основного пика всех трех солей превышали 99,5% без значимого различия. Ацетат был наиболее стабильным при сравнении количества видов примесей.

После воздействия высокой влажности процент площади основного пика ацетата был статистически значимо снижен. Относительный порядок стабильности был таким: трифторацетат > гидрохлорид > ацетат.

В целом для всех трех солей показана надлежащая стабильность в различных условиях.

Анализ стабильности растворов солей P5

Три соли P5 примера 3 растворяли в воде с получением раствора концентрации 2 мг/мл. Растворы подвергали воздействиям освещения (3000 Люкс) и высокой температуры (60°C) в течение 10 дней. После обработки точно отмеряли 10 мкл каждого раствора, вводили в жидкостный хроматограф и записывали хроматограммы. Для анализа содержания и количества видов примесей рассчитывали содержание соответствующих веществ методом нормализации площади пика.

Приборы и реактивы

Высокоэффективный жидкостный хроматограф (Agilent, 1260 EZChrom); хроматографическая колонка (Agilent, ZORBAX 300SB-C18 (4,6 * 250 мм, 5 мкм) SN: USHH008416); аналитические весы (Sartoris, BT25S); фильтрационная мембрана (Millipore, 0,45 мкм ПТФЭ); ацетонитрил (MREDA); вода (Aqua); трифторуксусная кислота (ТФУ) (MREDA); и испытательная камера для полного исследования стабильности лекарственных препаратов (трехкамерного типа) (Shanghai Zuocheng Experimental Instrument Co. Ltd, № изделия SHH-3SDT).

Условия хроматографирования

Подвижная фаза: А 0,065% ТФУ в воде; В 0,05% ТФУ в ацетонитриле (ACN)

Длина волны детектора $\lambda = 220$ нм; скорость потока $V = 1,0$ мл/мин; температура $T = 36^\circ\text{C}$

Объем вводимой пробы (I_{nj}) = 10 мкл

Условия градиента: 0–30 мин, $V\% = 5\text{--}65\%$

Результаты анализа

Результаты анализа стабильности водных растворов трех солей Р5 представлены ниже в таблице 3 и на панелях С и D на Фиг. 4.

Таблица 3

		Гидрохлорид	Ацетат	Трифторацетат
Освещение	Процент площади основного пика	96,73%	98,51%	97,28%
	Количество видов примесей	7	4	10
Высокая температура	Процент площади основного пика	58,63%	90,07%	
	Количество видов примесей	11	7	

Результаты

После воздействия освещения проценты площади основного пика и количества видов примесей трех солей различались. Относительный порядок стабильности был таким: ацетат > трифторацетат > гидрохлорид.

После воздействия высокой температуры проценты площади основного пика и количества видов примесей гидрохлорида и ацетата различались. Относительный порядок стабильности был таким: ацетат > гидрохлорид.

В целом для всех трех растворов солей также показана надлежащая стабильность в различных условиях.

Все публикации и патентные документы, цитируемые в описании, включены в настоящий документ посредством ссылки так, как если бы каждая публикация или патент был бы особо и отдельно указан как включенный посредством ссылки. В различные воплощения изобретения, раскрытые в настоящем документе, могут быть внесены различные изменения и эквивалентные замены без отклонения от истинной сущности и объема защиты изобретения. Любой элемент, стадию или вариант осуществления

воплощения настоящего описания можно использовать в комбинации с любыми другими элементами, стадиями или вариантами осуществления, если в контексте не указано иное.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтически приемлемая соль полипептида, который содержит аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант.

2. Фармацевтически приемлемая соль полипептида по п. 1, где функциональный вариант представляет собой вариант, образованный в результате одной или более консервативных замен в участке LDTEI последовательности SEQ ID NO: 1, и предпочтительно консервативная замена выбрана из группы, состоящей из замены между аминокислотами D и E, замены между L, V и I и замены между T и S.

3. Фармацевтически приемлемая соль полипептида по п. 2, где функциональный вариант представляет собой вариант, образованный в результате замены участка LDTEI последовательности SEQ ID NO: 1 последовательностью, выбранной из группы, состоящей из LDTEL, LDTEV, LDTDI, LDTD L, LDTDV, LDSEI, LDSEL, LDSEV, LDSDI, LDSDL, LDSDV, LETEI, LETEL, LETEV, LETDI, LETDL, LETDV, VDTEI, VDTEL, VDTEV, VDTDI, VDTD L, VDTDV, IDTEI, IDTEL, IDTEV, IDTDI, IDTD L, IDTDV, IETEI, IETEL, IETEV, IETDI, IETDL и IETDV.

4. Фармацевтически приемлемая соль полипептида по любому из п.п. 1–3, где полипептид представляет собой химерный пептид, содержащий активную пептидную группировку и группировку интернализации пептида, и где активная пептидная группировка представляет собой аминокислотную последовательность YEKLLDTEI (SEQ ID NO: 1) или ее функциональный вариант, и группировка интернализации пептида способна облегчать захват химерного пептида клеткой.

5. Фармацевтически приемлемая соль полипептида по п. 4, где группировка интернализации пептида содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2).

6. Фармацевтически приемлемая соль полипептида по п. 5, где химерный пептид содержит аминокислотную последовательность YGRKKRRQRRRYEKLLDTEI (SEQ ID NO: 3).

7. Фармацевтически приемлемая соль полипептида по любому из п.п. 1–6, выбранная из группы, состоящей из трифторацетата, ацетата, гидрохлорида и фосфата.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемую соль полипептида по любому из п.п. 1–7 и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент и/или разбавитель.

9. Фармацевтическая композиция по п. 8, представляющая собой прелиофилизированную композицию, предпочтительно содержащую гистидин и трегалозу.

10. Фармацевтическая композиция по п. 8, представляющая собой лиофилизированную композицию, предпочтительно приготовленную путем лиофилизации прелиофилизированной композиции по п. 9.

11. Фармацевтическая композиция по п. 8, представляющая собой восстановленную композицию, предпочтительно приготовленную путем объединения лиофилизированной композиции по п. 10 с водным раствором.

12. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 8–11 для применения в лечении, облегчении или предупреждении повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта, или для применения в качестве нейропротективного агента.

13. Способ лечения, облегчения или предупреждения повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта, включающий введение этому субъекту фармацевтически приемлемой соли полипептида по любому из п.п. 1–7 или фармацевтической композиции по любому из п.п. 8–12.

14. Применение фармацевтически приемлемой соли полипептида по любому из п.п. 1–7 или фармацевтической композиции по любому из п.п. 8–12 в изготовлении лекарственного средства для лечения, облегчения или предупреждения повреждения нервной системы, заболевания или боли, ассоциированных с повреждением нервной системы, нейродегенеративного заболевания, тревоги или эпилепсии у субъекта или в изготовлении нейропротективного агента.

15. Фармацевтическая композиция по п. 12, способ по п. 13 или применение по п. 14, где повреждение нервной системы представляет собой повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью.

16. Фармацевтическая композиция, способ или применение по п. 15, где повреждение нервной системы, вызванное возбуждающей нейротоксичностью, включает повреждение, выбранное из группы, состоящей из инсульта, повреждения спинного мозга,

ишемического или травматического повреждения головного или спинного мозга, повреждение нейрона в центральной нервной системе (ЦНС), включая острое повреждение ЦНС, ишемический инсульт или повреждение спинного мозга, гипоксию, ишемию, или механическое повреждение и повреждение, вызванное нейродегенеративным заболеванием, тревогой, эпилепсией или инсультом.

17. Фармацевтическая композиция по п. 12, способ по п. 13 или применение по п. 14, где нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Паркинсона и болезни Хантингтона.

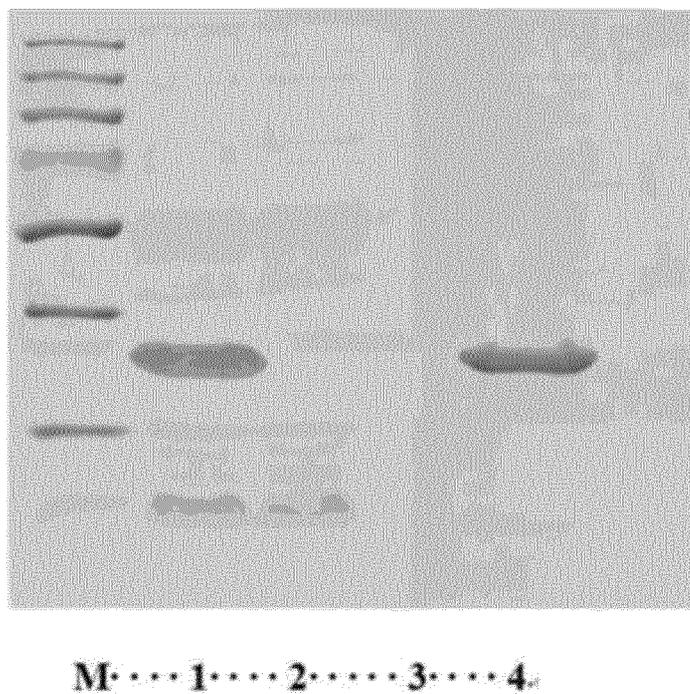
18. Фармацевтическая композиция по п. 12, способ по п. 13 или применение по п. 14, где повреждение нервной системы или боль локализованы в периферической нервной системе или в центральной нервной системе.

19. Фармацевтическая композиция по п. 12, способ по п. 13 или применение по п. 14, где заболевание, ассоциированное с повреждением нервной системы, представляет собой инсульт.

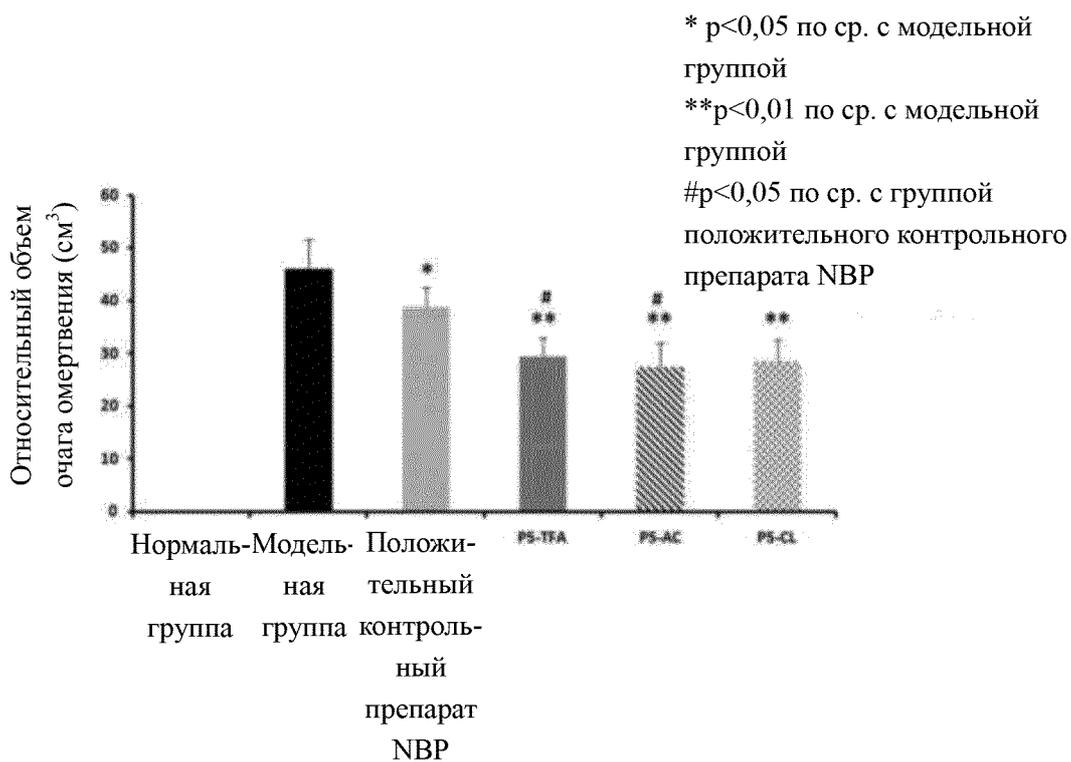
20. Фармацевтическая композиция, способ или применение по п. 19, где инсульт выбран из группы, состоящей из ишемического инсульта, геморрагического инсульта и геморрагического инсульта, преобразованного из ишемического инсульта.

21. Фармацевтическая композиция, способ или применение по п. 20, где инсульт представляет собой ишемический инсульт.

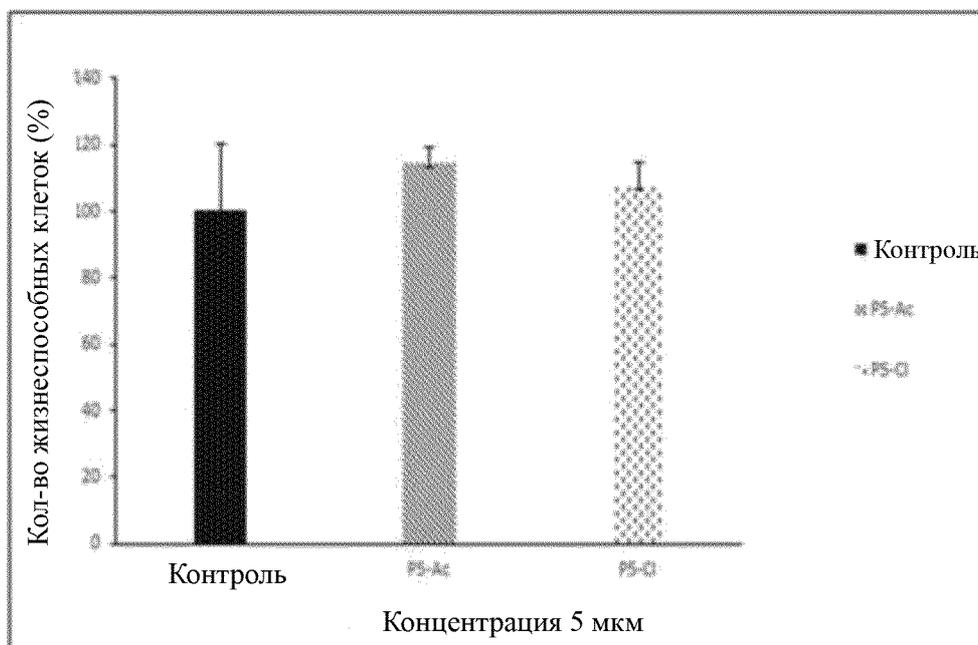
Фиг. 1



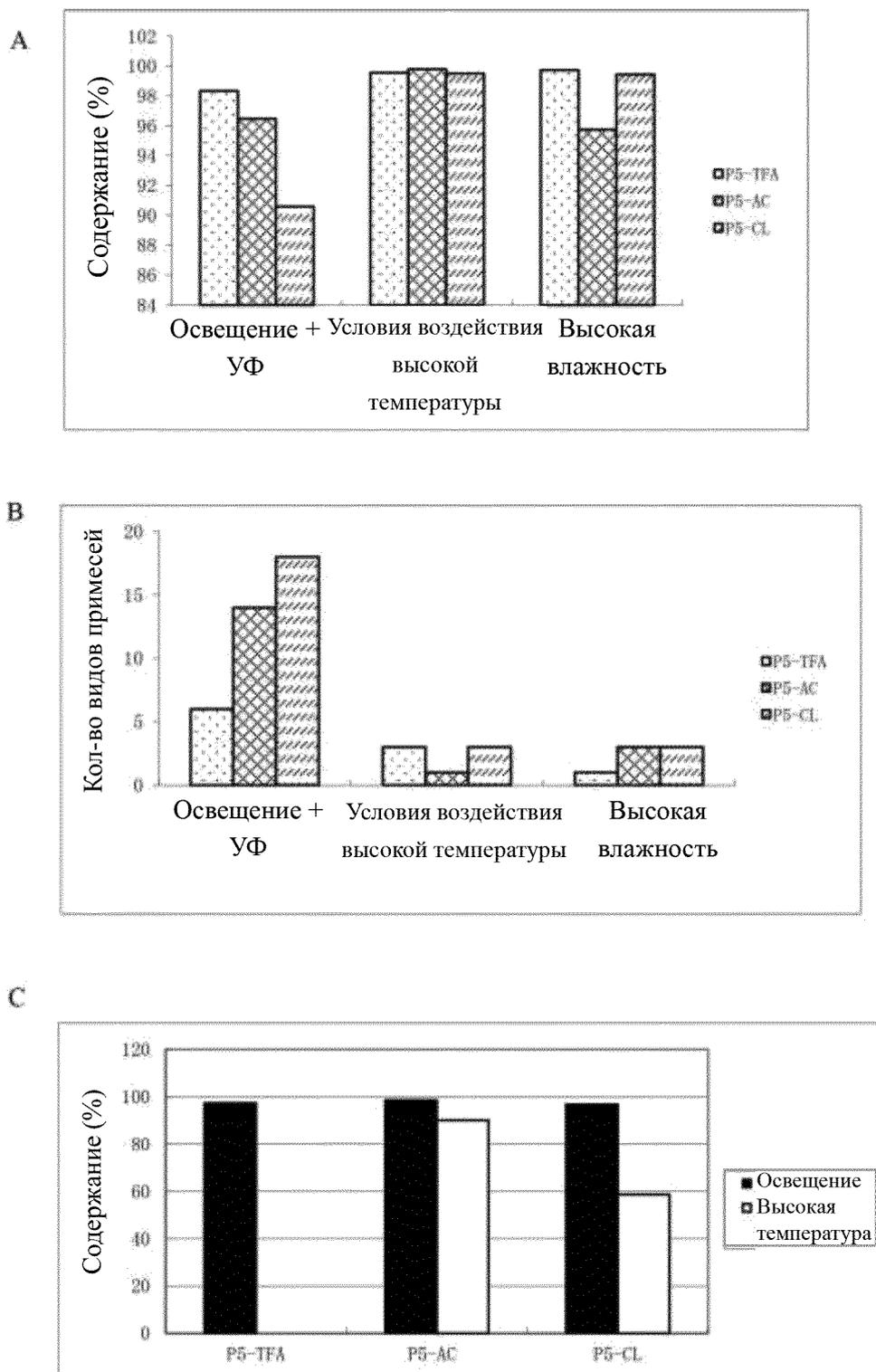
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



D

