

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392089 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.19(22) Дата подачи заявки
2022.01.24(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61K 31/047 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ PEDF КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ (PDSP), И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/140,851

(32) 2021.01.23

(33) US

(86) PCT/US2022/013547

(87) WO 2022/159829 2022.07.28

(71) Заявитель:
БРИМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(CN)

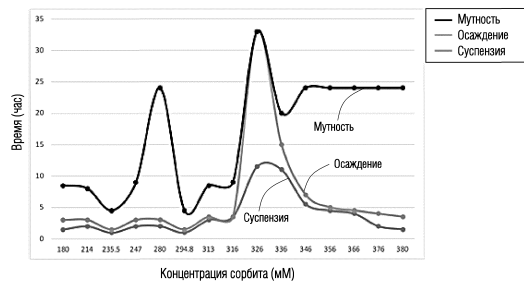
(72) Изобретатель:

Лиав Уэйн Вэй-Чэн, Хуан Джейсон
Пин-Ень, Ван Эмили Хсяо-Хань, Ли
Фрэнк Вэнь-Чи (TW)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описывается водный состав, который включает полученный из PEDF короткий пептид (PDSP), имеющий последовательность одну из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8 или 9, борную кислоту в концентрации 0,01-923 мМ и неионный тонический агент. Величина pH составляет примерно 5,5-8,4. Неионным тоническим агентом является глицерин, сахароза, манит или сорбит. Концентрация PDSP составляет 0,01-1% мас./об.



202392089

A1

A1

202392089

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579010EA/032

КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ PEDF КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ (PDSP), И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

[0001] Настоящее изобретение относится к композициям коротких пептидов, полученных из PEDF, в частности, к составам таких пептидов, и их применениям.

Уровень техники

[0002] Фактор пигментного эпителия (PEDF) человека представляет собой секретлируемый белок из 418 аминокислот с молекулярной массой примерно 50 кДа. PEDF представляет собой многофункциональный белок со многими биологическими функциями (см. публикацию заявки на патент США № 2010/0047212). Обнаружено, что различные пептидные участки PEDF человека ответственны за различные функции. Например, 34-мерный фрагмент (остатки 44-77 PEDF) идентифицирован как обладающий антиангиогенной активностью, в то время как 44-мерный фрагмент (остатки 78-121 PEDF) идентифицирован как обладающий нейротрофическими свойствами.

[0003] Обнаружено, что короткие пептиды, полученные из PEDF человека (PDSP), являются многообещающими терапевтическими средствами для лечения или предупреждения различных заболеваний или расстройств. Например, обнаружено, что PDSP эффективны при стимулировании регенерации мышц или ангиогенеза (патент США № 9884012), лечении алопеции и/или депигментации волос (патент США № 9938328), лечении остеоартрита (патент США № 9777048), для предупреждения или улучшения при старении кожи (патент США № 9815878), при лечении цирроза печени (патент США № 8507446) или лечении различных глазных заболеваний или состояний (например, дегенерации сетчатки, болезни мейбомиевой железы, сухого глаза). Также обнаружено, что соответствующие короткие пептиды, полученные из PEDF мышцы (моPDSP), обладают такими же терапевтическими действиями. Однако обнаружено, что препараты этих пептидов не обладают долговременной стабильностью. Следовательно, существует потребность в более совершенных составах для этого многообещающего биофармацевтического продукта.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Варианты осуществления изобретения относятся к составам для короткого полученного из PEDF пептида (PDSP), включая SEQ ID NO: 1 (39-мер), SEQ ID NO: 2 (34-мер), SEQ ID NO: 3 (29-мер), SEQ ID NO: 5 (24-мер), SEQ ID №: 6 (20-мер), SEQ ID №: 8 (мо29-мер) и SEQ ID №: 9 (мо20-мер), причем мо29-мер и мо20-мер представляют собой PDSP мышцы, соответствующие 29-меру и 20-меру человека, соответственно.

[0005] Один аспект изобретения относится к водному составу, который включает PDSP, имеющий последовательность одного из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8 или 9, борнокислотный буфер и тонический агент. Тонический агент предпочтительно

представляет собой неионный тонический агент. Неионным тоническим агентом может являться глицерин, сахароза, манит или сорбит.

[0006] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения величина pH водных составов может составлять около 5-9, предпочтительно около 5,5-8,4, предпочтительнее около 6,5-7,5. Неионным тоническим агентом предпочтительно является глицерин, концентрация которого составляет 10 мМ - 500 мМ, предпочтительно 200-400 мМ, предпочтительнее 300-350 мМ. Концентрация PDSP может составлять 0,01% - 1%, масс/об, предпочтительно 0,01% - 0,1%, масс/об, предпочтительнее около 0,03%.

[0007] Другие аспекты изобретения будут очевидны из последующего описания и прилагаемых чертежей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0008] Фиг.1 показывает схему, иллюстрирующую протокол испытания для оценки стабильности растворов PDSP различных составов. Получают различные растворы PDSP в соответствии с планом исследования. Величины pH растворов PDSP регулируют с помощью 1N HCl или 2N NaOH, растворы фильтруют через шприцевой фильтр 0,2 мкм и помещают в 50-мл стеклянные пузырьки. Отфильтрованные растворы PDSP перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре. Собирают 400-мкл аликвоты растворов PDSP в различные моменты времени (каждые полчаса в течение первых 7 часов) и центрифугируют при 13000 об/мин, для того, чтобы наблюдать, не появляется ли какой-либо осадок. Перемешивание растворов PDSP продолжают, и также исследуют осаждение в 10- и 24-часовые моменты времени от начала перемешивания. Регистрируют время появления взвешенного вещества, осадка и мутности.

[0009] Фиг.2 показывает результаты испытаний на стабильность составов PDSP, полученных в 10 мМ лимоннокислом буфере с различными эксципиентами и величинами pH, в условиях непрерывного перемешивания. (A) PDSP (BRM421) получают в 10 мМ цитрате с 0,85% NaCl или 334 мМ глицерина, pH 6,0, (B) PDSP (BRM421) получают в 10 мМ цитрате с 334 мМ глицерина, pH 7,0. Такие растворы после фильтрации перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре и исследуют каждые полчаса в течение первых 7 часов, и также в 10 и 24 часа. Время, когда появляются осадок и мутность, фиксируют в таблице 2.

[0010] Фиг.3 показывает результаты испытаний на стабильность составов PDSP (BRM421), полученных с различными концентрациями борной кислоты (BA) и 303 мМ глицерина в условиях непрерывного перемешивания. Растворы PDSP, полученные в 15 различных составах, после фильтрации помещают в 50-мл стаканы, и затем растворы перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре. Такие растворы исследуют каждые полчаса в течение первых 7 часов, а также через 10, 12,5 и 24 часа. Фиксируют время выпадения осадка и появления мутности.

[0011] Фиг.4 показывает время появления взвешенного вещества, осаждения и помутнения в условиях непрерывного перемешивания в составах PDSP, полученных с различными концентрациями BA и 303 мМ глицерина. Кривая 1: время появления

взвешенного вещества. Кривая 2: время появления видимых осадков. Кривая 3: время помутнения раствора. Звездочка: не наблюдают суспензии, осадка или мутности в BRM421, полученном в 40 мМ ВА с 303 мМ глицерина на протяжении указанного исследования (24 часа). Наблюдение проводилось каждые полчаса в течение 7-часового перемешивания. И через 7 часов наблюдение проводят в 10, 12,5 и 24 часа. Через 7 часов фиксируют время для каждого явления, когда его замечают впервые.

[0012] Фиг. 5 показывает результаты испытаний на стабильность растворов DPSP, полученных в различных комбинациях ВА/глицерин, в условиях непрерывного перемешивания. Растворы DPSP, полученные в растворах ВА/глицерина 8 различных концентраций и только в 2 растворах ВА, после фильтрации помещают в 50-мл стаканы и затем перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре. Такие растворы исследуют каждые полчаса в течение первых 10 часов, а также через 24 часа.

[0013] Фиг. 6 показывает моменты времени, когда суспензия, осадок и мутность появляются в условиях непрерывного перемешивания для растворов PDSP, полученных в различных комбинациях растворов ВА/глицерин. Кривая 1: время появления взвешенного вещества. Кривая 2: время появления видимых осадков. Кривая 3: время помутнения раствора. Наблюдение проводят каждые полчаса в течение первых 10 часов. Через 10 часов наблюдение снова проводят через 24 часа.

[0014] Фиг. 7 показывает результаты испытаний на стабильность растворов PDSP, полученных с различными концентрациями ВА с 9,46% сахарозы, в условиях непрерывного перемешивания. **(А)** PDSP (BRM421) в 4 различных составах после фильтрации помещают в 50-мл стаканы и затем перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре. Такие растворы исследуют каждые полчаса в течение первых 7 часов, а также после 10- и 24-часового перемешивания. **(В)** Линеичатый график времени появления взвешенного вещества, осадка и мутности в условиях непрерывного перемешивания.

[0015] На фиг. 8 показаны результаты испытаний на стабильность растворов PDSP (BRM421), полученных с различными концентрациями борной кислоты (ВА) с 4,29% маннита, в условиях непрерывного перемешивания. **(А)** PDSP в 4 различных составах после фильтрации помещают в 50-мл стаканы и затем перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре. Такие растворы исследуют каждые полчаса в течение первых 7 часов и также после 10- и 24-часового перемешивания. **(В)** График времени появления взвешенного вещества, осадка и мутности под действием усилия сдвига.

[0016] Фиг. 9А показывает результаты испытаний на стабильность PDSP (BRM421) в 40 мМ растворе борной кислоты (ВА) с различными концентрациями сорбита при воздействии усилия сдвига. Такие растворы перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре и исследуют каждые полчаса в течение 9 часов. Через 9 часов BRM421 непрерывно перемешивают и исследуют мутность через 24 и 33 часа. Дополнительно исследуют стабильность BRM421 в 40 мМ растворе борной кислоты с 326 и 336 мМ сорбита в течение 11-20 часов после перемешивания. Фиксируют время

появления взвешенного вещества, осадка и мутности. В качестве контрольного образца используют BRM421 в растворе 20 мМ гистидина/350 мМ никотинамида.

[0017] На фиг. 9В приводится график, иллюстрирующий время появления взвешенного вещества, осадка и мутности в результате испытаний, показанных на фиг. 9А.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0018] Варианты осуществления изобретения относятся к составам полученных из PEDF коротких пептидов (PDSP) с повышенной стабильностью. Обнаружено, что различные PDSP человека являются перспективными терапевтическими средствами для лечения или предупреждения различных заболеваний или расстройств, включая регенерацию мышц или ангиогенез, алопецию и/или депигментацию волос, остеоартрит, старение кожи, цирроз печени или глазные заболевания или состояния. Примеры таких PDSP могут включать PDSP, приведенные в ТАБЛИЦЕ 1.

ТАБЛИЦА 1. Примеры полученных из PEDF коротких пептидов (PDSP)

Название	Последовательность	SEQ ID NO	Остатки PEDF человека
39-мер	LSVATALSALS SLGAEQRTESI HRALYYDLISSP DIHGT	1	82-121
34-мер	ALSALS SLGAEQRTESI HRALYYDLISSPDIHGT	2	88-121
29-мер	SLGAEQRTESI HRALYYDLISSPDIHGT	3	93-121
25-мер	EQRTESI HRALYYDLISSPDIHGT	4	97-121
24-мер	SLGAEQRTESI HRALYYDLISSP	5	93-116
20-мер	SLGAEQRTESI HRALYYDL	6	93-112
18-мер	EQRTESI HRALYYDLIS	7	97-114
мо29-мер	SLGAEHRTESVI HRALYYDLITNPDIHST	8	мышь
мо20-мер	SLGAEHRTESVI HRALYYDL	9	мышь

[0019] В соответствии с вариантами осуществления изобретения PDSP могут представлять собой SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8 или 9. Кроме того, N-концы таких пептидов можно необязательно защитить ацилированием (например, защита ацетилом или пропионоилем), и С-концы могут быть необязательно защищены в виде амидов.

[0020] Такие PDSP получают в цитратных буферах и в различных доклинических исследованиях находят, что они эффективны для терапевтических целей. Однако обнаружено, что препараты таких коротких пептидов (например, BRM421, 29-мер PDSP (SEQ ID NO:3) в 10 мМ цитратном буфере с 0,85%, мас./об., NaCl, pH 6,0) не обладают долговременной стабильностью (в течение нескольких месяцев).

[0021] Многие факторы, включая химический стресс (например, окисление, гидролиз и т.д.) и физический стресс (например, температура, свет и перемешивание),

могут влиять на качество и стабильность биофармацевтических продуктов, особенно при длительном хранении. Для того, чтобы исследовать стабильность PDSP в различных составах, выполняют ускоренное испытание на стабильность. Конкретно, для определения оптимальных составов различные составы испытывают в условиях стресса, особенно при напряжении сдвига. После широких испытаний неожиданно обнаруживают, что составы в борнокислотных буферах обладают долговременной стабильностью, заметно превосходящей стабильность первоначальных составов с цитратным буфером.

[0022] Борная кислота обладает мягкими антибиотическими свойствами, которые можно использовать для лечения грибковых или бактериальных инфекций. Борная кислота используется в офтальмологических растворах для промывания глаз для очищения или орошения глаз. Борная кислота также может оказывать успокаивающее действие при раздражении глаз. Кроме того, борная кислота также действует как буферирующий агент и/или средство, регулирующее тоничность, в офтальмологических растворах. В вариантах осуществления изобретения используются преимущества таких полезных эффектов борной кислоты, а также ее неожиданная способность способствовать долговременной стабильности составов PDSP.

[0023] Ниже описаны конкретные примеры для иллюстрации воплощений изобретения. Однако специалист в данной области техники должен иметь в виду, что эти конкретные примеры приводятся только для иллюстрации и что возможны другие модификации и вариации без отхода от объема изобретения. Например, несмотря на то, что в следующих примерах для иллюстрации используется BRM421 DP (29-мер PDSP; SEQ ID NO:3), вместо него могут использоваться другие PDSP.

1. Цитратный буфер (10 мМ рабочий цитратный буфер с 0,85%, мас./об., NaCl, pH 6,0)

[0024] Цитратные буферы получают из лимонной кислоты и тринатрийцитрата для достижения желательной буферной емкости и величин pH. Например, используют моногидрат лимонной кислоты (MW 210,14 Да) (Merck) и дигидрат тринатрийцитрата (MW 294,12 Да) (BioShop) для получения раствора А и раствора В соответственно. Затем эти два раствора используют для получения цитратных буферов с требуемыми концентрациями и величинами pH. Формулы растворов, например, А и В указаны далее.

Раствор А (0,1 М моногидрата лимонной кислоты) (10 мл): $210,14 \text{ Да} \times 10/1000 \times 0,1 = 0,21$ г моногидрата лимонной кислоты. Взвешивают 0,21 г моногидрата лимонной кислоты и растворяют в 10 мл ddH₂O, и получают 10 мл исходного раствора А.

Раствор В (0,1 М дигидрата тринатрийцитрата) (10 мл): $294,12 \text{ Да} \times 10/1000 \times 0,1 = 0,294$ г дигидрата тринатрийцитрата. Взвешивают 0,294 г дигидрата тринатрийцитрата и растворяют в 10 мл ddH₂O, и получают 10 мл исходного раствора В.

[0025] Как пример, для получения 10X исходного цитратного буферного раствора, pH 6,0, смешивают 1,15 мл раствора А и 8,85 мл раствора В, и получают 0,1 М цитратный буфер, 10 мл. Затем 10 мл 0,1 М исходного цитратного буферного раствора разбавляют 90 мл ddH₂O, и получают 10 мМ рабочий цитратный буфер, 100 мл (1X раствор). Для

получения 10 мМ цитратного буфера с 0,85%, мас./об., NaCl добавляют 0,85 г NaCl в 10 мМ рабочий цитратный буфер, 100 мл. Перед использованием следует измерить и отрегулировать pH в соответствии с планом исследования.

2. Борнокислотный буфер (1-923 мМ борнокислотные буферы с 0,77%, масс./об., NaCl или 303 мМ глицерина или 9,46%, масс./об., сахарозы или 4,29%, масс./об., маннита pH 7,0).

[0026] Составы по изобретению получают в различных борнокислотных буферах. Для получения 20 мл борнокислотных буферов различной концентрации при pH 7,0 для испытания можно использовать следующую формулу для расчета необходимого количества борной кислоты: $61,83 \text{ (Дж)} \times 0,000001 \times X \text{ (мМ)} \times Y \text{ (мл конечного раствора)} = \text{ВА (г)}$. В частности, при исследованиях получают следующие борнокислотные буферы: 0,01 мМ, 0,1 мМ, 1 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 80 мМ, 100 мМ, 280 мМ, 290 мМ, 500 мМ, 800 мМ и 923 мМ (923 мМ - насыщенная концентрация раствора ВА в воде при 25 °С).

[0027] Различные агенты, регулирующие тоничность, такие как NaCl, сахароза, глицерин, маннит и сорбит, используются в офтальмологических составах. Например, для получения 20 мл растворов борной кислоты (ВА), pH 7,0, с такими тонизирующими агентами растворяют различные количества ВА в 15 мл ddH₂O, и затем в растворы ВА добавляют 512,6 мкл 87%-ного глицерина, или 0,154 г NaCl, или 1,892 г сахарозы, или 0,858 г маннита для получения борнокислотных буферов с 303 мМ глицерина, 0,77% NaCl, 9,46% сахарозы, 4,29% маннита, соответственно. Величины pH буферов доводят до pH 7,0 с использованием 2N NaOH. Фиксируют объемы 2N NaOH для корректировки величины pH, и затем добавляют ddH₂O до общих 20 мл.

3. Получение ВА/глицериновых буферов с различными концентрациями борной кислоты (0,01~280 мМ) и глицерина при pH 7,0

[0028] Глицерин в офтальмологических препаратах является тоническим агентом и также используется в качестве лубриканта. Поэтому получают борнокислотные буферы с глицерином в различных концентрациях и исследуют на стабильность составов BR421 DP. В таких борнокислотных буферах количество глицерина для поддержания по существу одинаковой тоничности регулируют следующим образом. Концентрацию (%) глицерина, необходимую для X мМ борнокислотного буфера, можно вычислить с использованием следующей формулы:

$$\{100 - [(X \text{ (мМ)} \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = \text{глицерин \%}$$

Например: (глицерин, используемый в настоящем исследовании, представляет собой 87%-ный раствор)

0,01 мМ ВА/353 мМ глицерина: $\{100 - [(0,01 \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = 2,5999077\%$
глицерина = 597,68 мкл/20 мл (т.е. для получения 2,5999077% глицерина в общем объеме 20 мл требуется 597,68 мкл 87% раствора глицерина);

10 mM BA/341 mM глицерина: $\{100 - [(10 \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = 2,5077\%$
 глицерина=576,48 мкл/20 мл (т.е. для получения 2,5077% глицерина в общем объеме 20 мл требуется 576,48 мкл 87% раствора глицерина);

20 mM BA/328 mM глицерина: $\{100 - [(20 \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = 2,4154\%$
 глицерина=555,26 мкл/20 мл (т.е. для получения 2,4154% глицерина в общем объеме 20 мл требуется 555,26 мкл 87% раствора глицерина);

30 mM BA/316 mM глицерина: $\{100 - [(30 \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = 2,3231\%$
 глицерина=534,05 мкл/20 мл (т.е. для получения 2,3231% глицерина в общем объеме 20 мл требуется 534,05 мкл 87% раствора глицерина);

50 mM BA/291 mM глицерина: $\{100 - [(50 \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = 2,1385\%$
 глицерина=491,61 мкл/20 мл (т.е. для получения 2,1385% глицерина в общем объеме 20 мл требуется 491,61 мкл 87% раствора глицерина);

80 mM BA/253 mM глицерина: $\{100 - [(80 \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = 1,8616\%$
 глицерина=427,95 мкл/20 мл (т.е. для получения 1,8616% глицерина в общем объеме 20 мл требуется 427,95 мкл 87% раствора глицерина);

100 mM BA/228 mM глицерина: $\{100 - [(100 \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = 1,677\%$
 глицерина=385,52 мкл/20 мл (т.е. для получения 1,677% глицерина в общем объеме 20 мл требуется 385,52 мкл 87% раствора глицерина);

280 mM BA/2 mM глицерина: $\{100 - [(280 \div 40) \times 14,2]\} \div 100 \times 2,6 = 0,0156\%$
 глицерина=3,59 мкл/20 мл (т.е. для получения 0,0156% глицерина в общем объеме 20 мл требуется 3,59 мкл 87% раствора глицерина).

[0029] Для получения 20 мл BA буферных растворов с pH 7,0 различные количества BA (как описано выше) и различные количества глицерина растворяют в 15 мл ddH₂O, как описано выше. Величины pH таких буферов доводят до pH 7,0 с использованием 2N NaOH. Фиксируют объемы 2N NaOH для корректировки значения pH, и затем добавляют ddH₂O до общих 20 мл.

4. Получение составов PDSP (BM421 DP) различных составов

[0030] PDSP, используемый в этих примерах, представляет собой короткий синтетический пептид (29-мер, SEQ ID NO:3) с ацетилированием по N-концу и амидом на C-конце. Другие PDSP можно приготовить аналогичным образом. Пептид BM421 синтезируют и характеризуют в Bachem (лот 7003945, содержание пептида 88,6%; Toppance, CA). Молекулярная масса BRM421 составляет 3243,6 Да. В качестве примера, концентрация BRM421 в растворах BRM421 DP для последующих исследований составляет 0,03%, мас./об., в буферах/растворах, описанных выше. Формула расчета для 20 мл раствора является следующей:

$$0,03\% \text{ BRM421} = 0,03 \text{ г} / 100 \text{ мл} = 0,0003 \text{ г} / \text{мл},$$

$$\text{содержание пептида } 0,0003 \text{ г} \div 88,6\% = 0,0003386 \text{ г},$$

$$0,0003386 \times 20 = 0,006772 \text{ г},$$

например, 20 мл BA буфера или цитратного буфера + 0,006772 г Bachem BRM421 = 20 мл, 0,03% BRM421 DP

[0031] Величину pH BRM421 DP измеряют после того, как BRM421 полностью растворится в растворе и затем доводят до 7,0 или 6,0 в соответствии с планами исследования. Перед использованием в исследовании BRM421 DP следует отфильтровать с помощью шприцевого фильтра 0,2 мкм. Аналогичным образом можно получить PDSP в различных концентрациях.

5. Оценка стабильности BRM421 DP в различных составах на сопротивление усилию сдвига

[0032] Авторы изобретения отмечают, что более ранние составы PDSP в цитратных буферах не являются стабильными при длительном хранении (в течение нескольких месяцев). Для того, чтобы проверить влияние различных составов на стабильность, различные составы PDSP для ускорения изменений подвергают воздействию в условиях напряжения (например, напряжения сдвига).

[0033] Для таких испытаний двадцать (20) миллилитров каждого из растворов PDSP (BRM421), полученных в различных буферах и с эксципиентами (показанных в **таблице 2**), после фильтрации помещают в 50-мл стаканы. Затем растворы подвергают перемешиванию при 1150 об/мин при комнатной температуре. Каждые полчаса до 7 часов в 1,5-мл пробирки Эппендорфа собирают аликвоты растворов PDSP по 400 мкл каждая. Собранные образцы центрифугируют при 13000 об/мин в течение 5 мин для того, чтобы оценить, происходит ли какое-либо осаждение. После непрерывного наблюдения перемешивание раствора PDSP продолжают до 24 часов для исследования осаждения. Внешний вид раствора и возможное осаждение исследуют после 10- и 24-часового перемешивания. Фиксируют время появления взвешенного вещества, осадка и мутности. Экспериментальные процедуры проиллюстрированы на **фиг. 1**.

Таблица 2. Перечень составов, проверяемых в этом исследовании

Эксципиенты	Базовый буфер	Величина pH
334 мМ глицерина	10 мМ цитратный буфер	6,0
334 мМ глицерина	10 мМ цитратный буфер	7,0
0,85% NaCl	10 мМ цитратный буфер	6,0
303 мМ глицерина	0,01 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	0,1 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	1 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	10 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	20 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	30 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	40 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	45 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	50 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	80 мМ ВА буфер	7,0

303 мМ глицерина	100 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	290 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	500 мМ ВА буфер	7,0
303 мМ глицерина	800 мМ ВАбуферг	7,0
303 мМ глицерина	923мМ ВА буфер	7,0
353 мМ глицерина	0.01 мМ ВА буфер	7,0
341 мМ глицерина	10 мМ ВА буфер	7,0
328 мМ глицерина	20 мМ ВА буфер	7,0
316 мМ глицерина	30 мМ ВА буфер	7,0
291 мМ глицерина	50 мМ ВА буфер	7,0
253 мМ глицерина	80 мМ ВА буфер	7,0
228 мМ глицерина	100 мМ ВА буфер	7,0
2 мМ глицерина	280 мМ ВА буфер	7,0
0 мМ глицерина	290 мМ ВА буфер	7,0
0 мМ глицерина	500 мМ ВА буфер	7,0
0,77% NaCl	40 мМ ВА буфер	7,0
9,46% сахарозы	10 мМ ВА буфер	7,0
9,46% сахарозы	40 мМ ВА буфер	7,0
9,46% сахарозы	50 мМ ВА буфер	7,0
9,46% сахарозы	100 мМ ВА буфер	7,0
4,29% маннита	10 мМ ВА буфер	7,0
4,29% маннита	40 мМ ВА буфер	7,0
4.29% маннита	50 мМ ВА буфер	7,0
4.29% маннита	100 мМ ВА буфер	7,0

Результаты

1. Способность сопротивляться усилию сдвига BRM421 PD, полученного с 10 мМ цитратным буфером с 0,85%, мас./об., NaCl, pH 6,0

[0034] Исходный состав BRM421 PD представляет собой 10 мМ цитратный буфер с 0,85%, мас./об., NaCl, pH 6,0. Такой состав превосходен для различных доклинических исследований. Однако при длительном хранении (несколько месяцев) этот состав становился мутным. Поэтому его стабильность исследуют с использованием метода принудительной агрегации, чтобы выяснить его способность сопротивляться усилию сдвига. Как видно на **фиг. 2**, до перемешивания раствор чистый и прозрачный (**фиг. 2**, верхняя панель). Взвешенное вещество видно в этом составе примерно через 1 час после начала перемешивания (**фиг. 2**, левая панель, и **таблица 3**). Осаждение и мутный раствор наблюдают через 1,5 и 2,5 часа после начала перемешивания, соответственно. Такие

наблюдения будут использоваться в качестве исходных данных для сравнения с другими составами.

Таблица 3. Стабильность BRM421 PD, полученного в различных составах, в условиях перемешивания

Раствор		Суспензия (час)	Осаждение (час)	Мутность (час)
Экципиенты/pH	Базовый буфер			
0,85% NaCl, pH 6,0	10 mM цитратный буфер	1	1	2
334 mM глицерина, pH 6,0	10 mM цитратный буфер	4,5	4,5	4,5
334 mM глицерина, pH 7,0	10 mM цитратный буфер ^{1ый}	5	5	7
	10 mM цитратный буфер ^{2ой}	4,5	5	7
303 mM глицерина, pH 7,0	0.01 mM ВА буфер	3	3	5,5
	0.1 mM ВА буфер	3,5	3,5	5,5
	1 mM ВА буфер	5,5	6	От 7 до 10
	10 mM ВА буфер	5	5	От 7 до 10
	20 mM ВА буфер	6,5	6,5	От 7 до 10
	30 mM ВА буфер	От 7 до 10	От 7 до 10	От 7 до 10
	40 mM ВА буфер [@]	Нет взвеш. в-ва	Нет осадка	Нет мутности
	45 mM ВА буфер ^{1ый}	От 12 до 24	От 12 до 24	От 12 до 24
	45 mM ВА буфер ^{2ой}	От 10 до 24	От 10 до 24	От 10 до 24
	50 mM ВА буфер	От 7 до 10	От 7 до 10	От 10 до 12,5
	80 mM ВА буфер	6,5	6,5	От 10 до 12,5
	100 mM ВА буфер [@]	6	6	От 10 до 24
	290 mM ВА буфер	5,5	5,5	8.5
	500 mM ВА буфер ^{1ый}	5.5	5.5	8,5
	500 mM ВА буфер ^{2ой}	5	5	8
	500 mM ВА буфер ^{3ий}	4,5	5	От 7 до 10
800 mM ВА буфер	6	6	От 10 до 24	
923 mM ВА буфер	6	6	От 7 до 10	

353 мМ глицерина, рН 7,0	0.01 мМ ВА буфер	2,5	2,5	7
341 мМ глицерина, рН 7,0	10 мМ ВА буфер	5	5	8,5
328 мМ глицерина, рН 7,0	20 мМ ВА буфер	6,5	6,5	10
316 мМ глицерина, рН 7,0	30 мМ ВА буфер	7,5	7,5	От 10 до 24
291 мМ глицерина, рН 7,0	50 мМ ВА буфер	6,5	6,5	10
253 мМ глицерина, рН 7,0	80 мМ ВА буфер	4,5	4,5	10
228 мМ глицерина, рН 7,0	100 мМ ВА буфер	4,5	4,5	10
2 мМ глицерина, рН 7,0	280 мМ ВА буфер	4	4	10
0 мМ глицерина, рН 7,0	290 мМ ВА буфер	5	5	8,5
0 мМ глицерина, рН 7,0	500 мМ ВА буфер	4	4	8
9,46% сахарозы, рН 7,0	10 мМ ВА буфер	7	От 7 до 10	От 7 до 10
	40 мМ ВА буфер	От 7 до 10	От 7 до 10	От 10 до 24
	50 мМ ВА буфер	7	От 7 до 10	От 7 до 10
	100 мМ ВА буфер	7	От 7 до 10	От 7 до 10
4,29% маннита, рН 7,0	10 мМ ВА буфер ^{1ый}	5	5	7-10
	10 мМ ВА буфер ^{2ой}	4,5	4,5	7-10
	40 мМ ВА буфер ^{1ый}	4,5	4,5	7-10
	40 мМ ВА буфер ^{2ой}	4,5	4,5	7-10
	50 мМ ВА буфер ^{1ый}	3,5	3,5	7-10
	50 мМ ВА буфер ^{2ой}	3,5	4	7
	100 мМ ВА буфер ^{1ый}	2	2,5	6,5
	100 мМ ВА буфер ^{2ой}	2,5	3	6
0,77% NaCl, рН 7,0	40 мМ ВА буфер	5	5	5,5
316 мМ сорбита, рН 7,0	40 мМ ВА буфер	4	4	9

326 мМ сорбита, рН 7,0	40 мМ ВА буфер	12	33	33
336 мМ сорбита, рН 7,0	40 мМ ВА буфер	11	15	20

[@] Исследование указанных 2 составов провели дважды для подтверждения результатов и получили одинаковые результаты в обоих исследованиях

2. Способность сопротивляться усилиям сдвига BRM421 DP, полученного с буферами на основе ВА

[0035] Для оценки стабильности BRM421 DP, полученного в ВА буфере и цитратном буфере, в условиях перемешивания для сравнения выбирают 10 мМ цитратный буфер с 334 мМ глицерина, рН 6,0 или рН 7,0, и 40 мМ ВА буфер с 303 мМ глицерина, рН 7,0. Различие в концентрациях глицерина между этими двумя препаратами обусловлена разной осмолярностью ВА буфера и цитратного буфера - т.е. для поддержания одинаковой тоничности требуется разное количество глицерина. Взвешенное вещество и осадок наблюдают в BRM421 DP, полученном в буфере на основе цитрата, в течение 4,5-5 часов после перемешивания независимо от величины рН (**фиг. 2В** и **таблица 3**). Однако ни взвешенных веществ, ни осадения не наблюдают даже после 24-часового перемешивания BRM421 DP, полученного в буфере на основе ВА (**фиг. 3** и **таблица 3**). Такие данные указывают на то, что ВА является более подходящим базовым буфером для BRM421 DP.

3. Способность противостоять усилию сдвига для BRM421 DP, полученного с 303 мМ глицерином с растворами ВА различной концентрации

[0036] Для того, чтобы исследовать, какая концентрация ВА лучше для стабильности, испытывают составы BRM421 DP, полученные с 15 различными концентрациями ВА (0,01~923 мМ) с 303 мМ глицерина (**таблица 3**). Взвешенные вещества наблюдают через 3, 3,5, 5,5, 5, 6,5, 7-10, >24, 12-24, 7-10, 6,5, 6, 5,5, 5,6 и 6 часов после перемешивания для составов BRM421 DP, полученных в 0,01-, 0,1-, 1-, 10-, 20-, 30-, 40, 45, 50-, 80-, 100-, 290-, 500-, 800- и 923-мМ ВА/303 мМ глицерина соответственно (**фиг. 3, 4** и **таблица 3**).

[0037] В предыдущем исследовании авторы изобретения обнаружили, что взвешенное вещество в составах BRM421 DP, полученных с 10 мМ цитратным буфером/0,85% NaCl, было крупнозернистым и могло быть видно под препаровальной лупой в виде мелких частиц или волокон. Однако взвешенное вещество в составах BRM421 DP, полученных с ВА буферами, является мелкодисперсным, что только снижает прозрачность раствора, без частиц, видимых даже под препаровальной лупой.

[0038] Для того, чтобы оценить, можно ли также наблюдать осадение, когда появляется взвешенное вещество, 400-мкл аликвоты каждого из составов BRM421 DP собирают в 1,5-мл пробирки Эппендорфа для центрифугирования (13000 об/мин в течение 5 мин). Как видно на **фиг. 3**, видимое осадение наблюдают через 3, 3,5, 6, 5, 6,5, 7-10, >24, 12-24, 7-10, 6,5, 6, 5,5, 5, 6 и после 6 часов после перемешивания для составов

BRM421 DP, полученных с 0,01-, 0,1-, 1-, 10-, 20-, 30-, 40-, 45-, 50-, 80-, 100-, 290-, 500-, 800-, и 923-мМ ВА/303 мМ глицерина соответственно. (фиг. 3, средняя панель, фиг. 4 и таблица 3).

[0039] Растворы BRM421 DP непрерывно перемешивают до тех пор, пока раствор не становился мутным после того, как наблюдали взвешенные вещества или осадки. Фиг. 3 показывает, что составы BRM421 DP, полученные с 0,01-, 0,1-, 1-, 10-, 20-, 30-, 40-, 45-, 50-, 80-, 100-, 290-, 500-, 800- и 923-мМ ВА/303 мМ глицерина, становятся мутными за 5,5, 5,5, 7-10, 7-10, 7-10, 7-10, >24, 12-24, 10-12,5, 10-12,5, 10-24, 8,5, 8,5, 10-24 и через 7-10 часов после перемешивания, соответственно (фиг. 3, нижняя панель, фиг. 4 и таблица 3).

[0040] Среди указанных составов состав BRM421 DP, полученный с 40 мМ ВА/303 мМ глицерина, был единственный, который оставался прозрачным после 24-часового перемешивания. (фиг. 3, 4 и таблица 3).

[0041] Все полученные результаты в совокупности предполагают, что существует оптимальный диапазон концентраций ВА около 30-100 мМ в присутствии примерно 303 мМ глицерина, которые могут обеспечить наибольшую стабильность составов BRM421 DP.

4. Способность противостоять усилию сдвига для BRM421 DP, полученного с использованием различных комбинаций раствора глицерин/ВА

[0042] Для того, чтобы оценить, влияет ли осмоляльность на способность противостоять усилию сдвига, исследуют составы BRM421 DP, полученные с использованием 8 различных комбинаций ВА/глицерин и 2 только ВА буферов (таблица 2). Как видно на фигуре 5, все растворы до перемешивания были чистыми и прозрачными (фиг. 5, верхняя панель). Взвешенные вещества и осадки наблюдают на 2,5, 5, 6,5, 7,5, 6,5, 4,5, 4,5 и через 4 часа после перемешивания для растворов BRM421 DP, полученных в буферах 0,01/353-, 10/341-, 20/328-, 30/316-, 50/291-, 80/253-, 100/228- и 280/2-мМ ВА/глицерин, соответственно. Для BRM421 DP, полученного только в 290- и 500-мМ ВА буферах, взвешенные вещества и осадки наблюдают через 5 и 4 часа после перемешивания соответственно (фиг. 5, 6 и таблица 3).

[0043] Растворы становятся мутными на 7, 8,5, 10, 24, 10, 10, 10 часу и через 10 часов после перемешивания для составов BRM421 DP, полученных с буферами 0,01/353-, 10/341-, 20-/328, 30/316-, 50/291-, 80/253-, 100/228- и 280/2-мМ ВА/глицерин, соответственно. Для составов BRM421 DP, полученных только с 290 и 500 мМ ВА буферами, раствор становится мутным через 8,5 и 8 часов после перемешивания соответственно (фиг. 5, нижняя панель, фиг. 6 и таблица 3). Такие результаты показывают, что буферные композиции примерно с 30 мМ ВА и 316 мМ глицерина обеспечивают наилучшую стабильность.

5. Способность противостоять усилию сдвига для BRM421 DP, полученного с ВА буферами с различными эксципиентами

[0044] Для того, чтобы оценить, могут ли другие эксципиенты (кроме глицерина) также работать с ВА буфером для улучшения стабильности составов, получают составы

BRM421 DP с буферами на основе 40 мМ ВА с NaCl, сахарозой, маннитом или сорбитом в качестве эксципиентов.

[0045] Как видно на **фиг. 7** и из **таблицы 3**, взвешенные вещества обнаруживаются в составах BRM421 DP, полученных с 10-, 40-, 50- и 100-мМ ВА буферами с 9,46% сахарозы через 7, 10,7 и 7 часов после перемешивания, соответственно. А для составов BRM421 DP, полученных с 10-, 40-, 50- и 100-мМ ВА буферах с 4,29% маннита, взвешенные вещества обнаруживаются через 5, 4,5, 3,5 и 2 часа после перемешивания соответственно (**фиг. 8** и **таблица 3**). Время появления взвешенного вещества как в ВА/сахароза, так и в ВА/маннит короче, чем в 40 мМ ВА/303 мМ глицерина, что предполагает, что эти эксципиенты не так хороши для стабилизации составов BRM421 DP.

[0046] Как видно на **фиг. 9А** и **9В** и в **таблице 3**, для составов BRM421 DP, полученных в 40 мМ ВА с сорбитом (180 мМ - 380 мМ), наиболее стабильные составы обнаруживаются при концентрациях сорбита около 316-346 мМ, в частности, при концентрации сорбита около 326 мМ. Например, при использовании 326 мМ сорбита и 40 мМ ВА взвешенные вещества видны в растворах примерно через 12 часов после перемешивания, осадение наблюдают примерно через 33 часа после перемешивания, и мутность наблюдают примерно через 33 часа после перемешивания.

[0047] Такие результаты в совокупности предполагают, что неионные тонические агенты лучше подходят для BRM421 в борнокислотных буферах, чем ионные тонические агенты, и что сорбит и глицерин являются более подходящими эксципиентами для BRM421 DP, чем сахароза или маннит.

[0048] Приведенные выше примеры ясно показывают, что составы PDSF в буферах на основе борной кислоты с сорбитом, глицерином или другими тоническими агентами могут обеспечивать значительно улучшенную стабильность по сравнению с первоначальными составами в буферах на основе цитрата. Например, осадки появляются в течение 1 часа после перемешивания составов BRM421 DP, полученных в 10 мМ цитрате/0,85% NaCl, в то время как для составов BRM421 DP, полученных в 40 мМ ВА с 0,77% NaCl, осадение наблюдают после 5-часового перемешивания

[0049] Когда NaCl (тонический агент) заменяют неионными тоническими агентами (например, сорбитом или глицерином), стабильность составов значительно улучшается. Например, время появления осадка является одинаковым для составов BRM421 DP, полученных с 10 мМ цитратом/334 мМ глицерина (4,5 часа), и составов BRM421 DP, полученных с 0,01 мМ ВА/303 мМ глицерина (3 часа), где 0,01 мМ ВА обладают чрезвычайно низкой буферной емкостью. Для составов BRM421 DP, полученных в 40 мМ ВА/303 мМ глицерина, не наблюдают ни взвешенных веществ, ни выпадения осадка даже после 24-часового перемешивания при комнатной температуре. Такие данные указывают на то, что в качестве базового буфера ВА является значительно лучшим выбором для составов BRM421 DP, чем цитрат.

[0050] Для дальнейшей оценки того, могут ли различные концентрации тонических агентов (например, глицерина) влиять на стабильность составов BRM421 DP, выбирают различные комбинации ВА и глицерина для достижения одинаковой осмоляльности, и путем перемешивания проверяют стабильность составов BRM421 DP в таких буферах. Среди всех комбинаций ВА и глицерина составы с 20-100 мМ ВА и 228-328 мМ глицерина дают более стабильные комбинации. В частности, составы ВА с 303 мМ глицерина показывают наилучшую стабильность на основании времени появления осадков, в то время как в других комбинациях осадки появляются раньше или примерно в такое же время. Такое наблюдение дополнительно подтверждает, что примерно 303 мМ глицерина является лучшим выбором для составов BRM421 DP, полученных в ВА буферах. Аналогичным образом обнаружено, что при использовании 40 мМ ВА и 316-336 мМ сорбита получают более стабильные составы. В частности, очень стабильный состав получается с примерно 326 мМ сорбита и 40 мМ ВА.

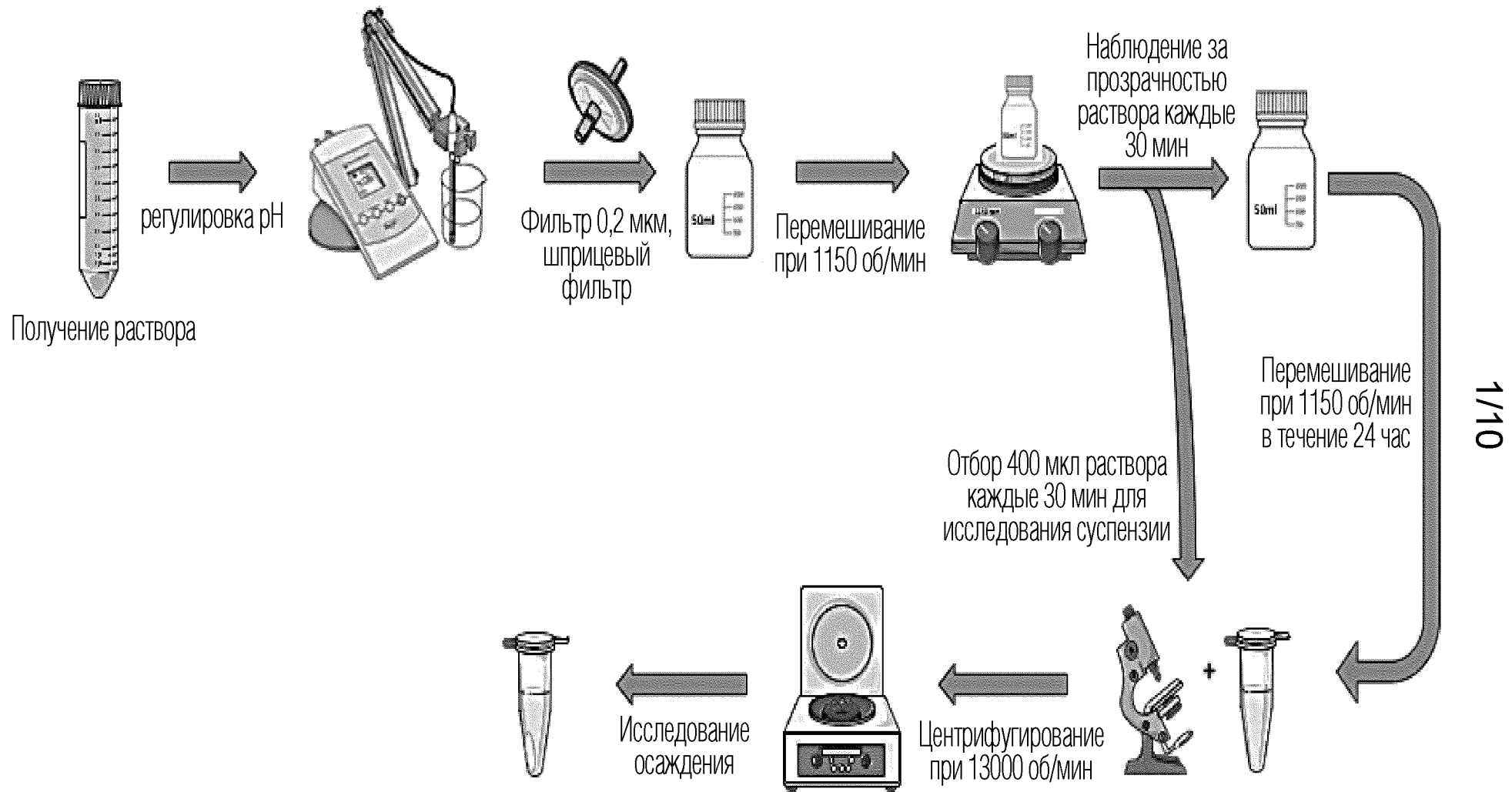
[0051] Кроме базовых буферов также исследованы различные типы и концентрации эксципиентов, отличных от глицерина, на их способность повышать стабильность составов BRM421 DP. Среди 38 исследованных составов среднее время появления взвешенных веществ в буфере с 9,46% сахарозы составов не менее 7 часов, что лучше, чем у маннита и NaCl, но хуже, чем у глицерина. По сравнению с результатами, полученными при использовании 40 мМ ВА/0,77%, масс./об., NaCl, неионные тонические агенты, такие как глицерин, сорбит, сахароза и маннит, показали лучшие результаты, чем ионные тонические агенты. На основании таких результатов, в вариантах осуществления изобретения предпочтительно используются неионные тонические агенты, например, глицерин, сахароза, сорбит и маннит.

[0052] Варианты осуществления изобретения проиллюстрированы ограниченным числом примеров. Специалист в данной области техники должен иметь в виду, что эти примеры приведены только для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения, поскольку возможны другие модификации и вариации, не выходящие за рамки объема изобретения. Соответственно, объем изобретения должен ограничиваться прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный состав, включающий полученный из PEDF короткий пептид (PDSP), имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8 или 9, борную кислоту в концентрации 0,01 мМ - 923 мМ и неионный тонический агент.
2. Водный состав по п.1, в котором концентрация борной кислоты составляет от 10 мМ до 100 мМ.
3. Водный состав по п.1, в котором концентрация борной кислоты составляет от 20 мМ до 50 мМ.
4. Водный состав по п.1, в котором величина рН составляет примерно 5,5-8,4.
5. Водный состав по п.1, в котором величина рН составляет примерно 6,5-7,5.
6. Водный состав по п.1, в котором неионным тоническим агентом является глицерин, сахароза, манит или сорбит.
7. Водный состав по п.1, в котором неионным тоническим агентом является глицерин.
8. Водный состав по п.7, в котором концентрация глицерина составляет от 10 мМ до 500 мМ.
9. Водный состав по п.7, в котором концентрация глицерина составляет от 300 мМ до 350 мМ.
10. Водный состав по п.1, в котором неионным тоническим агентом является сорбит.
11. Водный состав по п.10, в котором концентрация сорбита составляет от 100 мМ до 400 мМ.
12. Водный состав по п.10, в котором концентрация сорбита составляет от 300 мМ до 350 мМ.
13. Водный состав по любому из пп. 1-12, в котором PDSP имеет последовательность SEQ ID NO: 3.
14. Водный состав по п.13, в котором концентрация PDSP составляет 0,01%-1%, мас./об.
15. Водный состав по п.13, в котором концентрация PDSP составляет 0,03%, мас./об..

По доверенности



ФИГ. 1

А.

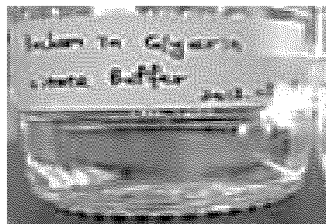
10 мМ цитратный буфер, рН 6,0

Исходный раствор (0 час)

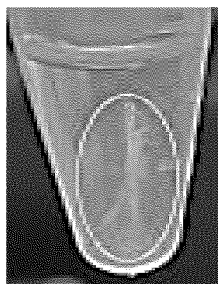
0,85% NaCl



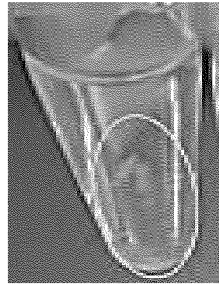
334 мМ глицерин



1,5 ч



4,5 ч

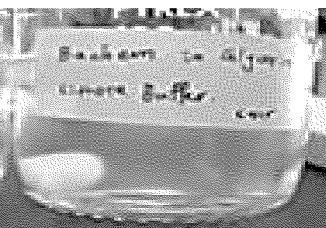


Осаждение

2 ч



4,5 ч

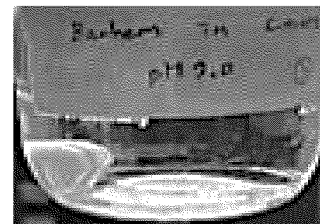


Мутность

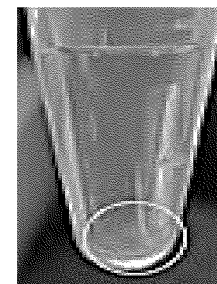
В. 10 мМ цитратный буфер, рН 7,0

Исходный раствор (0 час)

334 мМ глицерин



5 ч



Осаждение

7 ч

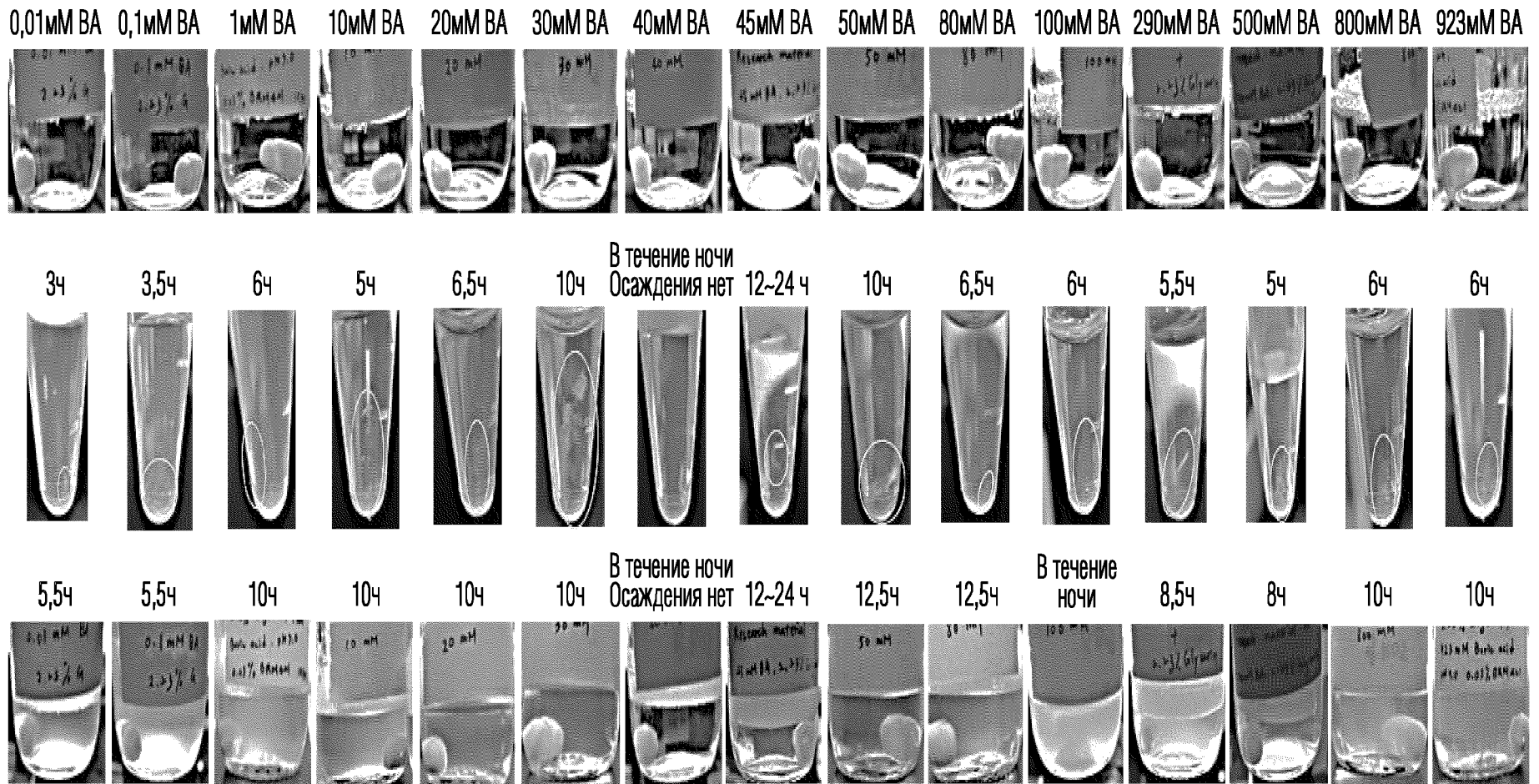


Мутность

ФИГ. 2

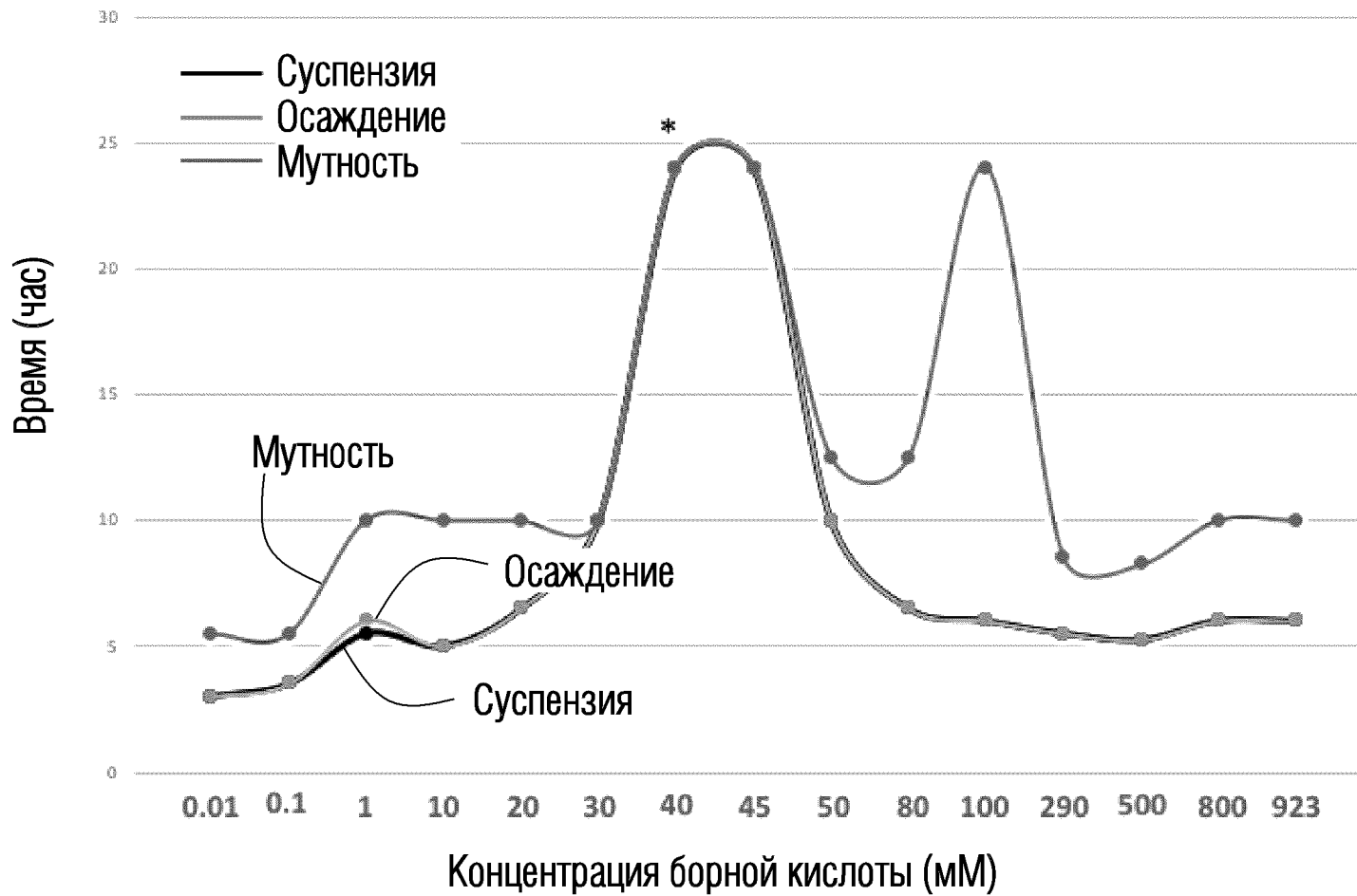
Исходный раствор (0 час)

2,23% глицерина, pH7.0

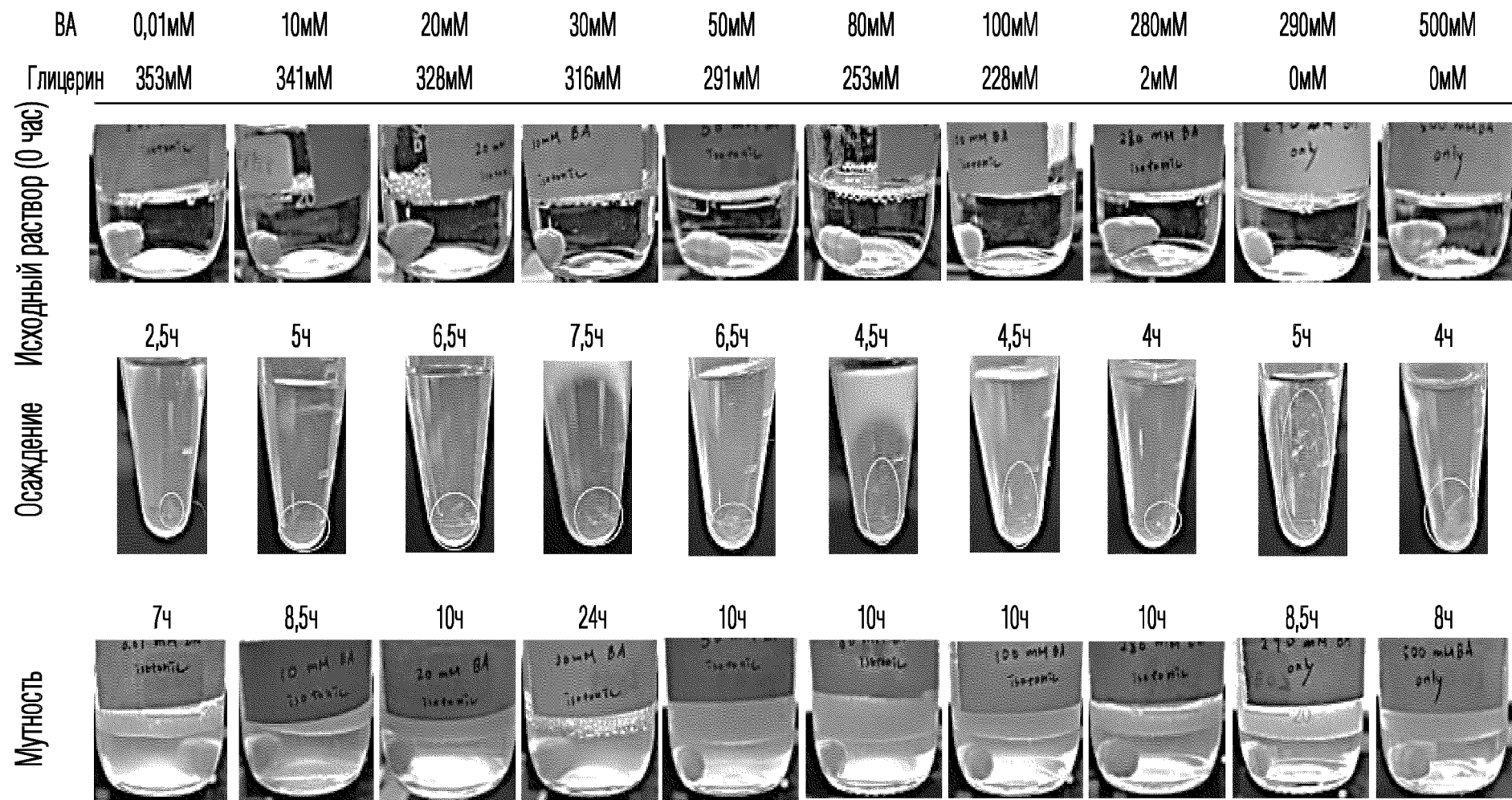


3/10

ФИГ. 3

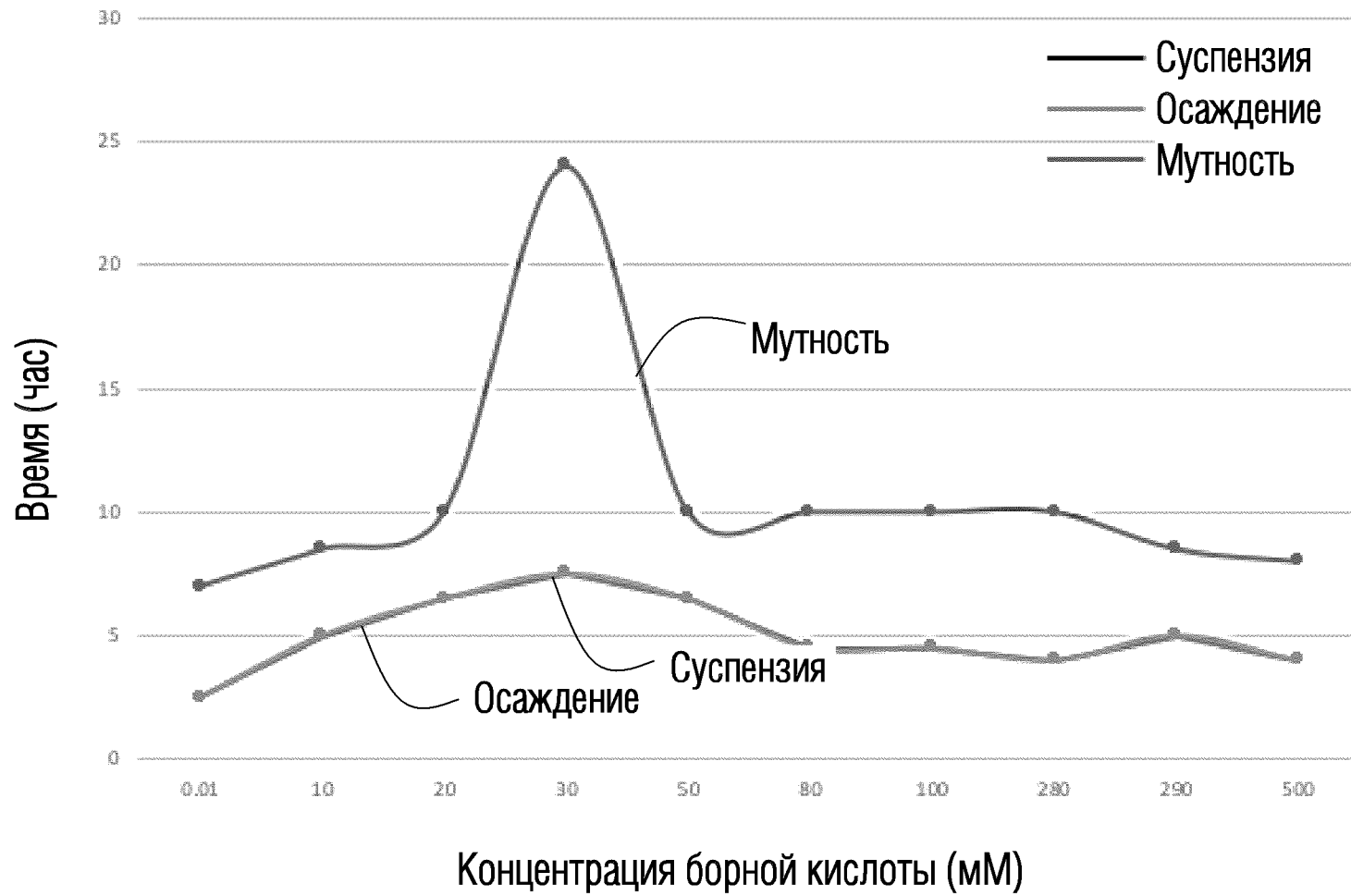


ФИГ. 4

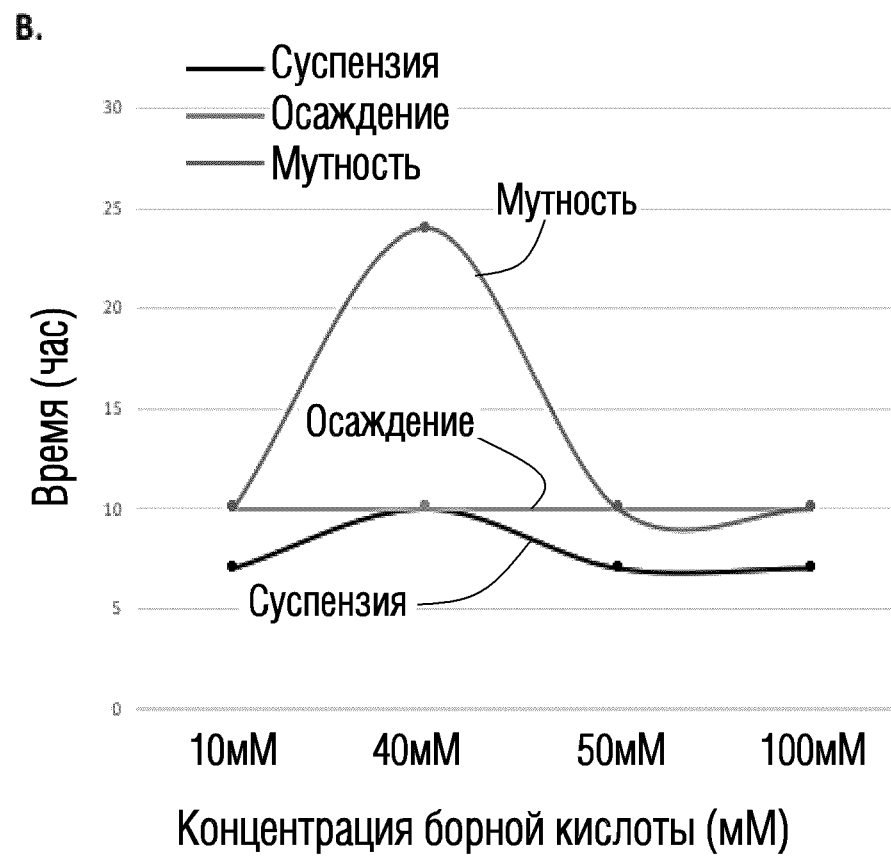
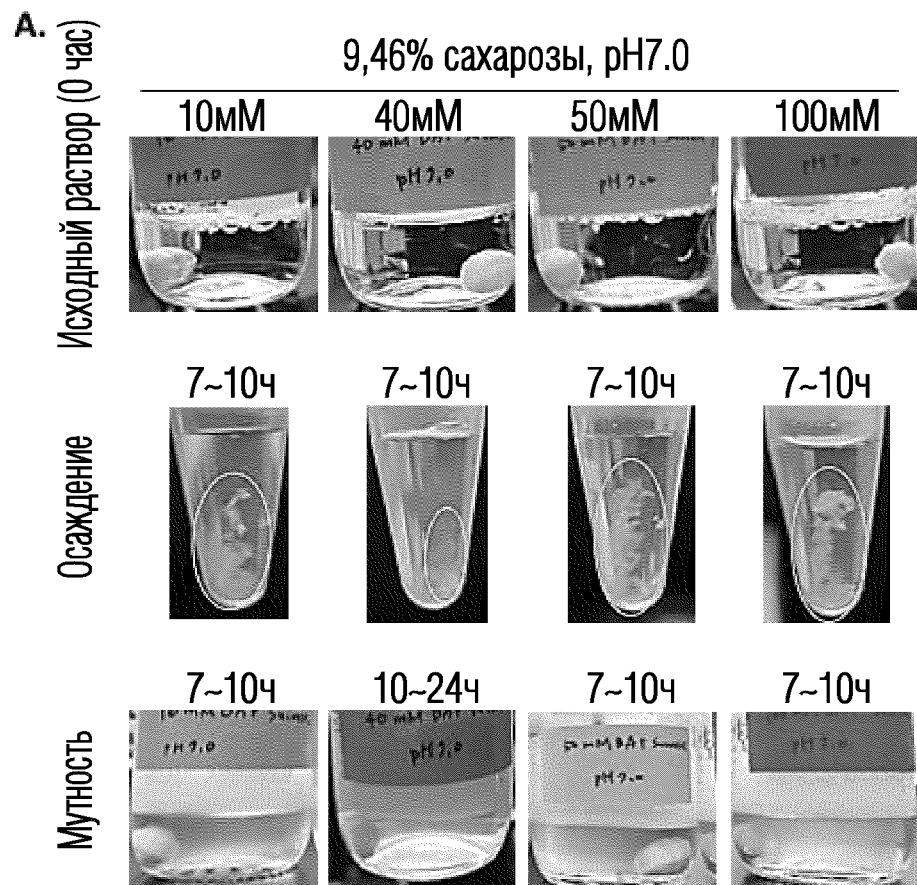


5/10

ФИГ. 5

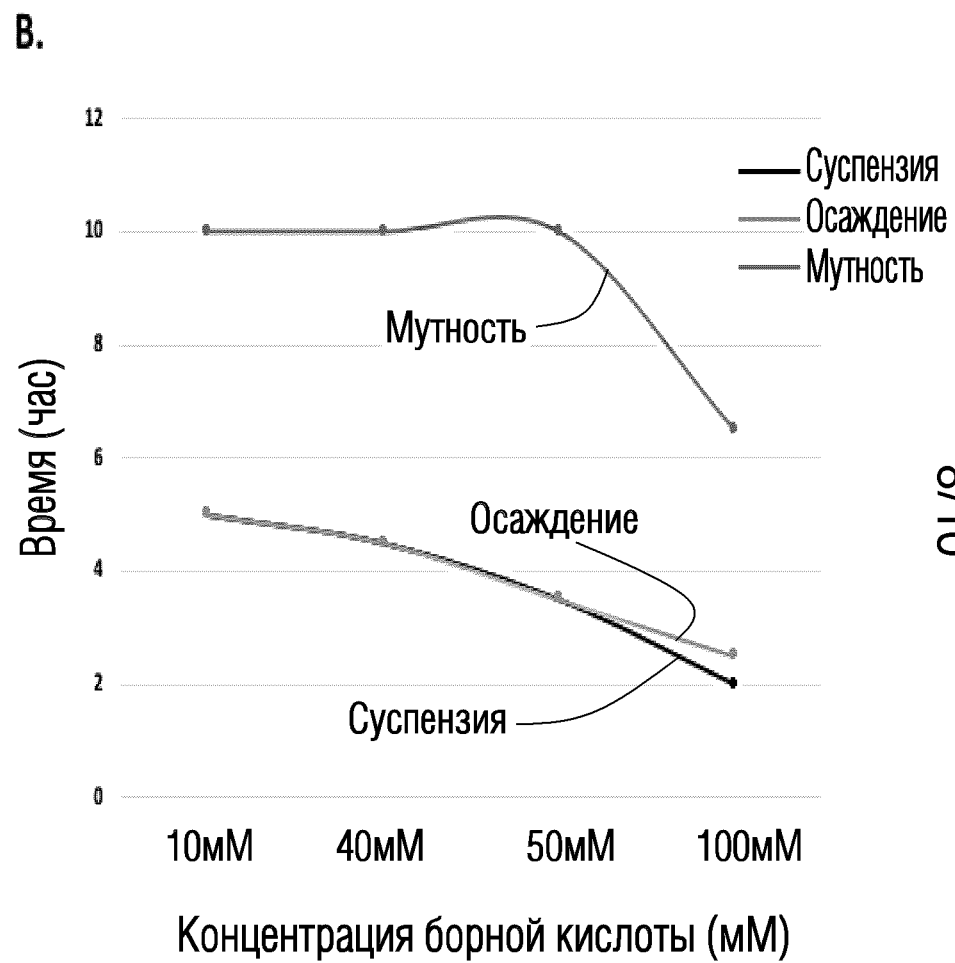
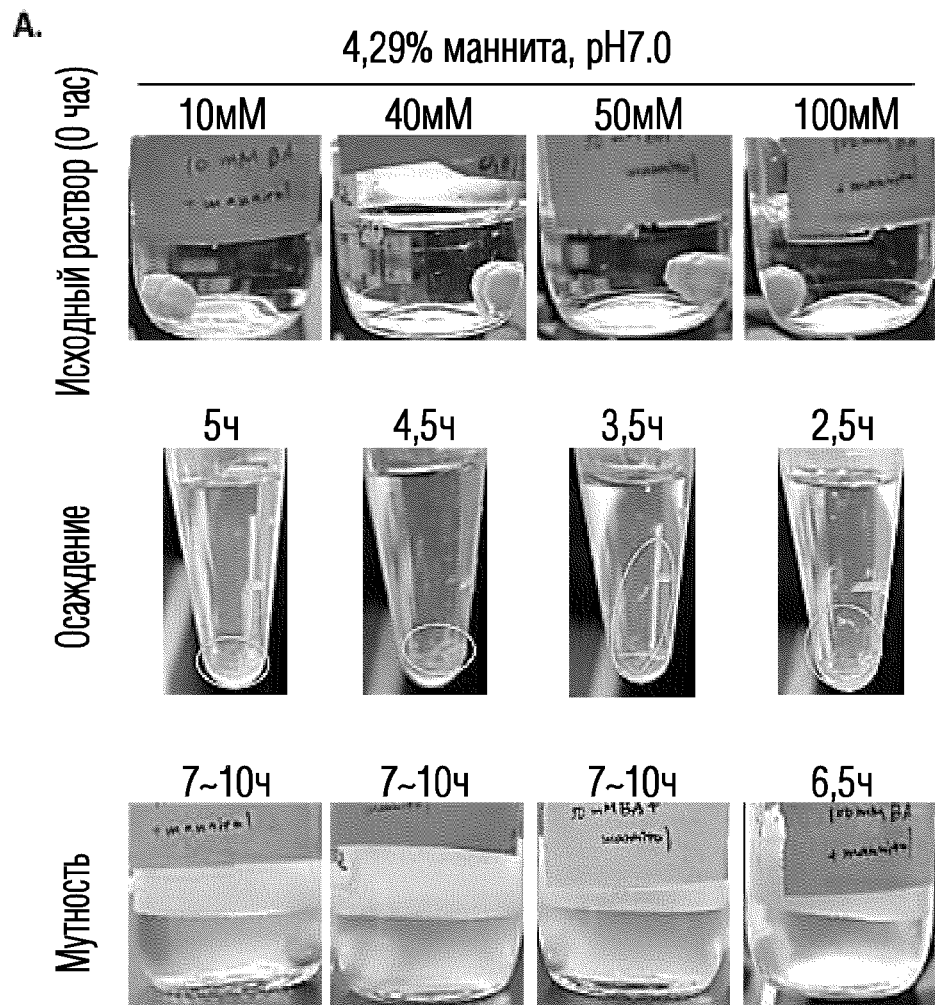


ФИГ. 6



7/10

ФИГ. 7



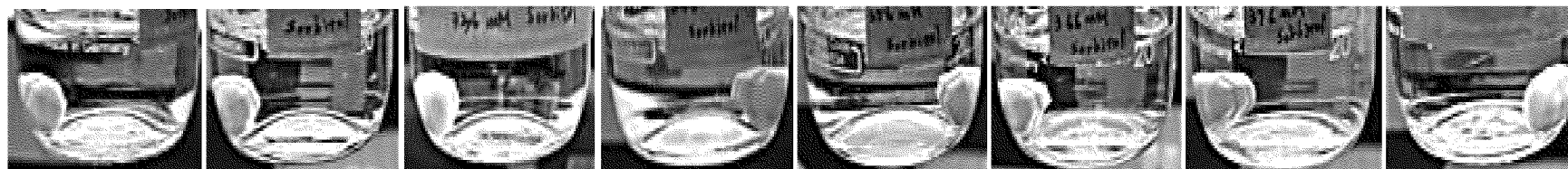
ФИГ. 8

40 мМ борной кислоты

20мМ His/ 350мМ
Никотинамида

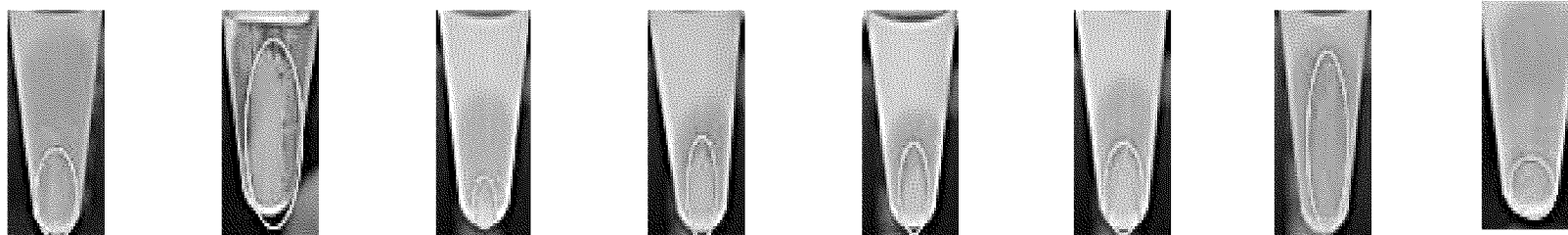
Исходный раствор (0 час)

316мМ сорбита 326мМ сорбита 336мМ сорбита 346мМ сорбита 356мМ сорбита 366мМ сорбита 376мМ сорбита



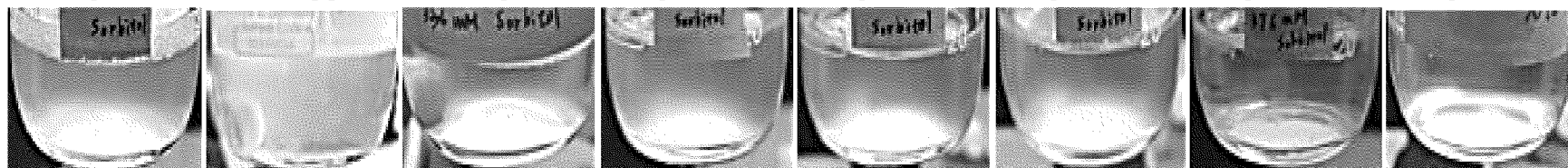
3,5ч 24~33ч 15ч 7ч 5ч 4,5ч 4ч 9~24ч

Осаждение



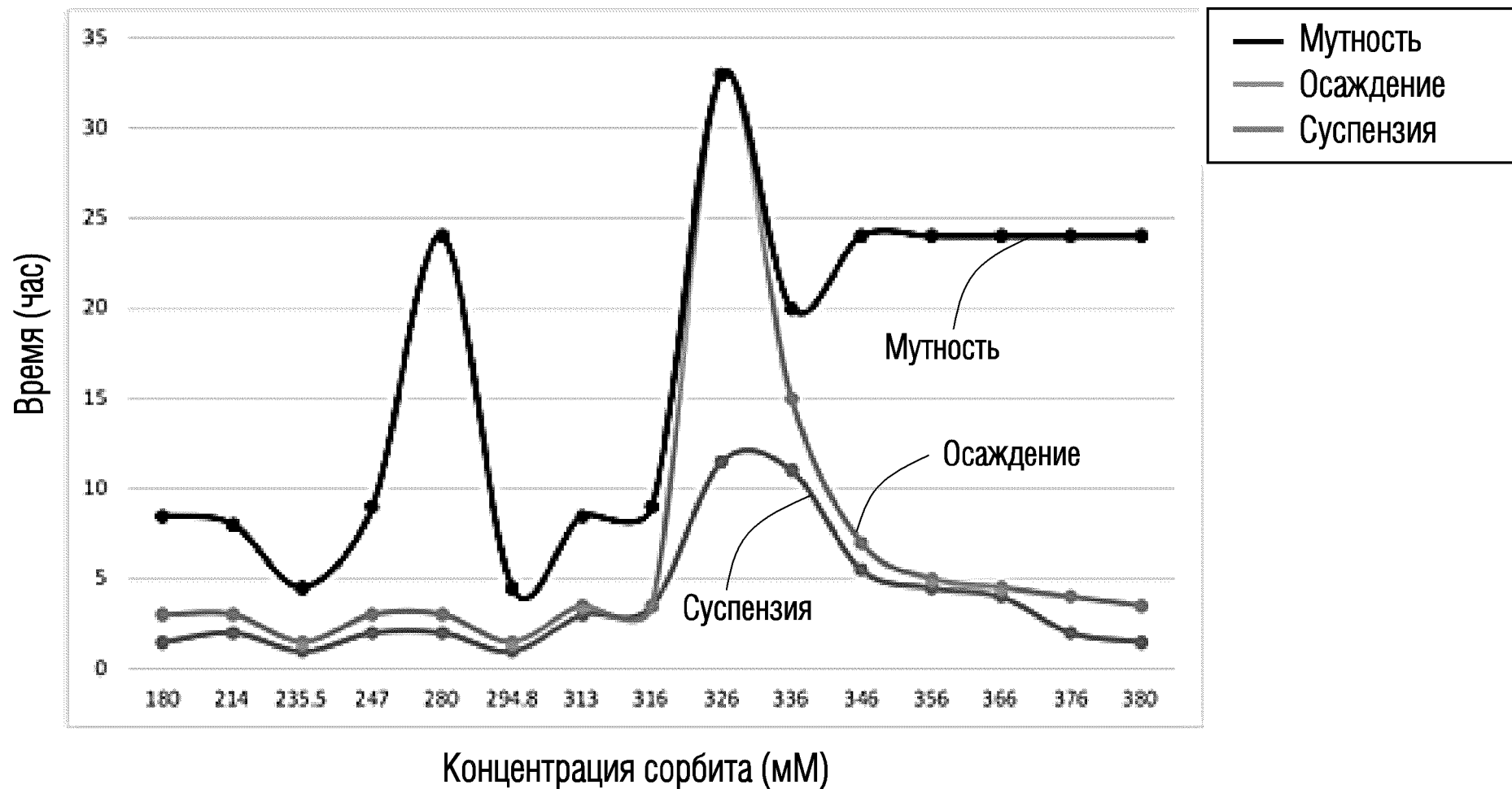
9ч 24~33ч 20ч 9~24ч 9~24ч 9~24ч 9~24ч 9~24ч

Мутность



9/10

ФИГ. 9А



ФИГ. 9В