

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202291083 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.07.14

(51) Int. Cl. A61K 9/00 (2006.01)  
A61Q 9/00 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)  
C07K 16/00 (2006.01)  
A61K 31/047 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.12.04

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

(31) 62/911,367

(72) Изобретатель:

(32) 2019.10.06

Ли Фрэнк Вэнь-Чи, Лиав Уэйн В.К.  
(US), Хуан Пин-Ень, Ван Хсяо-Хань  
(TW)

(33) US

(86) PCT/US2020/063182

(87) WO 2021/077125 2021.04.22

(88) 2021.06.03

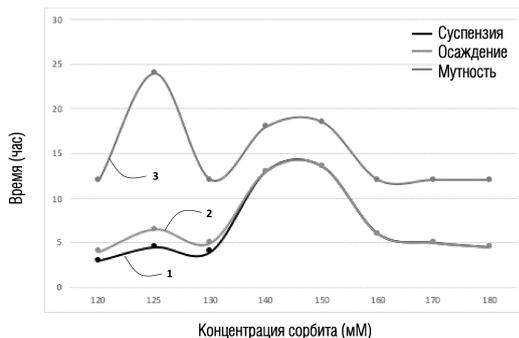
(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

БРИМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.  
(TW)

(57) Описывается водная композиция, которая включает полученный из PEDF короткий пептид (PDSP), имеющий последовательность одну из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8 или 9, гистидин в концентрации 1-100 мМ, антиоксидант и, необязательно, неионный тонизирующий агент. Величина pH составляет примерно 5-9. Антиоксидантом является никотинамид, который находится в концентрации 50-1000 мМ. Неионным тонизирующим агентом является сорбит, который находится в концентрации 0-500 мМ. Концентрация PDSP составляет 0,01-1% мас./об.



A1

202291083

202291083

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573960EA/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 старения 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 улучшенных 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, гистидин, имеющий концентрацию 1 мМ - 100 мМ, и антиоксидант и, необязательно, неионный

тонирующий агент. Антиоксидантом является аскорбиновая кислота или никотинамид. Неионным тонирующим агентом является сорбит, декстроза, глицерин, маннит, хлорид калия, хлорид натрия, этиленгликоль или пропиленгликоль.

**[0006]** Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения величина pH водных составов может составлять около 5-9, предпочтительно около 6,5-7,5. Неионным тонирующим агентом является сорбит, концентрация которого составляет 0 мМ - 500 мМ. Антиоксидантом является никотинамид, который находится в концентрации 50 мМ - 1000 мМ. Концентрация PDSP может составлять 0,01% - 1%, масс/об.

**[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, фильтруют через шприцевой фильтр 0,2 мкм и помещают в 50-мл стеклянный пузырек. Отфильтрованные растворы PDSP перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре. Собирают 400-мкл аликвоты растворов PDSP в различные моменты времени (каждые полчаса до 7 или 9 часов) и центрифугируют при 13000 об/мин, для того, чтобы наблюдать, не появляется ли какой-либо осадок. Перемешивание растворов PDSP продолжают, и исследуют осаждение в моменты времени 10, 12, 18 и 24-часа. Фиксируют время появления взвешенного вещества, осадка и мутности.

**[0009]** Фиг.2 показывает результаты испытаний на стабильность составов PDSP, полученных в 10 мМ цитратном буфере с 0,85% NaCl, pH 6,0, и в 20 мМ гистидиновом буфере с различными концентрациями никотинамида, pH 7,0, в условиях непрерывного перемешивания. PDSP, полученные в этих различных составах, после фильтрации помещают, каждый, в 50-мл стакан, и затем растворы перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре. Эти растворы исследуют каждые полчаса в течение первых 7 часов, и непрерывное наблюдение продолжают через 12 часов после начала перемешивания.

**[0010]** Фиг.3 показывает результаты испытаний на стабильность составов PDSP, полученных с различными концентрациями сорбита в растворах 20 мМ гистидина/150 мМ никотинамида. Испытания на стабильность выполняют при непрерывном перемешивании. Растворы PDSP, полученные в 8 различных составах, после фильтрации помещают в 50-мл стаканы, и затем растворы перемешивают при 1150 об/мин при комнатной температуре. Эти растворы исследуют каждые полчаса в течение первых 9 часов, а также через 12, 18 и 24 часа после начала перемешивания. Фиксируют время выпадения осадков и появления мутности.

**[0011]** Фиг.4 показывает время появления суспензии, осаждения и помутнения в условиях непрерывного перемешивания в составах PDSP, полученных с различными

концентрациями сорбита в растворах с 20 мМ гистидина/150 мМ никотинамида. Кривая 1: время появления взвешенного вещества. Кривая 2: время появления видимых осадков. Кривая 3: время помутнения раствора.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

**[0012]** 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 LGAEQRTESEIHRALYYDLISSPD IHGT	1	82-121
34-мер	ALSALS LGAEQRTESEIHRALYYDLISSPD IHGT	2	88-121
29-мер	SLGAEQRTESEIHRALYYDLISSPD IHGT	3	93-121
25-мер	EQRTSEIHRALYYDLISSPD IHGT	4	97-121
24-мер	SLGAEQRTESEIHRALYYDLISSP	5	93-116
20-мер	SLGAEQRTESEIHRALYYDL	6	93-112
18-мер	EQRTSEIHRALYYDLIS	7	97-114
мо29-мер	SLGAEHRTESEIHRALYYDLITNPDIHST	8	мышь
мо20-мер	SLGAEHRTESEIHRALYYDL	9	мышь

**[0013]** 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 этих пептидов можно необязательно защитить ацилированием (например, защита ацетилом или пропионоилом), и C-концы могут быть необязательно защищены в виде амидов.

**[0014]** Такие PDSP получают в цитратных буферах и находят, что они эффективны для терапевтических целей в различных доклинических исследованиях. Однако обнаружено, что препараты таких коротких пептидов (например, 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).

**[0015]** 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 композиций различные составы испытывают в условиях стресса, особенно при напряжении сдвига. После широких испытаний неожиданно обнаруживают, что

некоторые составы обладают долговременной стабильностью, превосходящей стабильность первоначальных составов с цитратным буфером.

**[0016]** Далее описываются конкретные примеры, иллюстрирующие варианты осуществления 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 варианты без отхода от объема изобретения. Например, несмотря на то, что в следующих примерах для иллюстраций используется 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)

**[0017]** Цитратные буферы получают из лимонной кислоты и тринатрийцитрата для достижения желательной буферной емкости и pH. Например, используют моногидрат лимонной кислоты (MW 210,14 кДа) (Merck) и дигидрат тринатрийцитрата (MW 294,12 кДа) (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 А и В указаны далее.

**[0018]** Раствор А (0,1 М моногидрата лимонной кислоты) (10 мл):  $210,14 \text{ кДа} \times 10/1000 \times 0,1 = 0,21$  г моногидрата лимонной кислоты. Взвешивают 0,21 г моногидрата лимонной кислоты и растворяют его в 10 мл ddH<sub>2</sub>O, и получают 10 мл исходного раствора А.

**[0019]** Раствор В (0,1 М дигидрата тринатрийцитрата) (10 мл):  $294,12 \text{ кДа} \times 10/1000 \times 0,1 = 0,294$  г дигидрата тринатрийцитрата. Взвешивают 0,294 г дигидрата тринатрийцитрата и растворяют его в 10 мл ddH<sub>2</sub>O, и получают 10 мл исходного раствора В.

**[0020]** 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 ddH<sub>2</sub>O, и получают 10 мМ рабочий цитратный буфер, 100 мл (1X раствор).

**[0021]** 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. Гистидиновый буфер (20 мМ гистидиновый буфер с 0-260 мМ сорбита и/или 15-300 мМ никотинамида, pH 7,0)

**[0022]** Для того, чтобы получить 20 мл 20 мМ гистидинового буфера с pH 7,0 для испытания, 0,062 г гистидина и различные массы сорбита и/или никотинамида растворяют в 15 мл ddH<sub>2</sub>O. Получают примеры различных композиций с различными концентрациями сорбита и никотинамида следующих составов, показанных в ТАБЛИЦЕ 2.

**ТАБЛИЦА 2.** Различные композиции гистидинового буфера

20 мМ гистидина/150 мМ никотинамида: 0,37 г/20 мл
---

20 мМ гистидина/300 мМ никотинамида: 0,73 г/20 мл
20 мМ гистидина/350 мМ никотинамида: 0,86 г/20 мл
20 мМ гистидина/120 мМ сорбита: 0,44 г/20 мл
20 мМ гистидина/140 мМ сорбита: 0,51 г/20 мл
20 мМ гистидина/160 мМ сорбита: 0,58 г/20 мл
20 мМ гистидина/180 мМ сорбита: 0,66 г/20 мл

[0023] Величины рН буферов доводят до рН 7,0 с использованием 2N NaOH или 1N HCl. Регистрируют объемы 2N NaOH или 1N HCl для регулирования величины рН, и затем добавляют ddH<sub>2</sub>O для получения общего объема 20 мл.

### 3. Получение PDSP в различных составах

[0024] PDSP, используемый в этих примерах, представляет собой короткий синтетический пептид (29-мер) с ацелированием по концу NH<sub>2</sub> и амидом на конце COOH. Молекулярная масса PDSP составляет 3243,6 кДа. PDSP растворяют в каждом из растворов, описанных выше, в определенных концентрациях.

[0025] Например, для получения 20 мл раствора PDSP в гистидин/никотинамидном или цитратном буфере к 20 мл гистидин/никотинамидного буфера или цитратного буфера добавляют 6,772 мг пептидного продукта.

[0026] Измеряют величины рН растворов PDSP после полного растворения PDSP в растворах, и затем величины рН регулируют до 7,0 или 6,0 в соответствии с планами исследования. Перед использованием каждый раствор PDSP фильтруют через шприцевой фильтр 0,2 мкм.

### 4. Оценка стабильности PDSP в различных составах

[0027] 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).

[0028] Для таких испытаний двадцать (20) миллилитров каждого из растворов PDSP, полученных в различных буферах и эксципиентах (показанных в **таблице 3**), после фильтрации помещают в 50-мл стакан. Затем растворы подвергают перемешиванию при 1150 об/мин при комнатной температуре. Каждые полчаса до 7 или 9 часов в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл 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. Внешний вид раствора и возможное осаждение исследуют после 10-, 12-, 18- и 24-часового перемешивания. Фиксируют время появления взвешенного вещества, осадка и мутности. Экспериментальные процедуры проиллюстрированы на **фигуре 1**.

### Таблица 3. Перечень составов, тестируемых в этом исследовании

Экципиенты	Основной буфер	Величина pH
0,85% NaCl	10 мМ цитратный буфер	6,0
150 мМ никотинамида	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
300 мМ никотинамида	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
350 мМ никотинамида	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
260 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
150 мМ никотинамида, 120 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
150 мМ никотинамида, 125 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
150 мМ Nicotinamide, 130 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
150 мМ никотинамида, 140 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
150 мМ никотинамида, 150 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
150 мМ никотинамида, 160 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
150 мМ никотинамида, 170 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0
150 мМ никотинамида, 180 мМ сорбита	20 мМ гистидиновый буфер	7,0

#### Результаты

**1.** Способность сопротивляться усилию сдвига полученного из PEDF короткого пептида (PDSP), полученного в 10 мМ цитратном буфере с 0,85%, мас./об., NaCl, pH 6,0

**[0029]** Исходный состав препарата PDSP представляет собой 10 мМ цитратный буфер с 0,85%, мас./об., NaCl, pH 6,0. Этот состав превосходит для различных доклинических исследований. Однако при длительном хранении (много месяцев) этот

состав становился мутной. Поэтому его стабильность исследуют с использованием метода принудительной агрегации, чтобы выяснить его способность сопротивляться усилию сдвига. Как видно на **фигуре 2**, до перемешивания раствор чистый и прозрачный (**фигура 2**, верхняя панель). Взвешенное вещество видно в этом составе примерно через 1 час после начала перемешивания (**фигура 2**, левая панель, и **таблица 4**). Осаждение и мутный раствор наблюдают через 1,5 и 2,5 часа после начала перемешивания, соответственно. Эти наблюдения будут использоваться в качестве исходных данных для сравнения с другими составами.

**Таблица 4. Стабильность PDSР, полученного в различных составах в условиях перемешивания**

Раствор		Суспензия (час)	Осаждение (час)	Мутность (час)
Экципиенты/рН	Основной буфер			
0,85% NaCl, рН 6,0	10 мМ цитратный буфер	1	1,5	2
Раствор		Суспензия (час)	Осаждение (час)	Мутность (час)
Экципиенты/рН	Основной буфер			
150 мМ никотинамида, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	5	5,5	13,5
300 мМ никотинамида, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	4,5	4,5	В промежутке 7-24
350 мМ никотинамида, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	14	14,5	16,5
260 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	3	3	12
150 мМ никотинамида, 120 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	3	4	В промежутке 9-12
150 мМ никотинамида, 125 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	4,5	6,5	В промежутке 9-24
150 мМ никотинамида, 130 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	4	5	В промежутке 9-12

150 мМ никотинамида, 140 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	13	13	18
150 мМ никотинамида, 150 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	13,5	14	18
150 мМ никотинамида, 160 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	6	6	В промежутке 9-12
150 мМ никотинамида, 170 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	5	5	В промежутке 9-12
150 мМ никотинамида, 180 мМ сорбита, рН 7,0	20 мМ гистидиновый буфер	4,5	4,5	В промежутке 9-12

**2.** Способность сопротивляться усилию сдвига полученных из PEDF коротких пептидов (PDSP), полученных в гистидиновых буферах с никотинамидом

**[0030]** Для исследования влияния никотинамида, который является антиоксидантом, на стабильность PDSP в буфере на основе гистидина, для сравнения выбирают препараты PDSP в 20 мМ гистидиновом буфере с 150 мМ, 300 мМ или 350 мМ никотинамида, рН 7,0. Как видно на **фигуре 2** и в **таблице 4**, взвешенные вещества наблюдают через 5, 4,5 и 14 часов после начала перемешивания для препаратов PDSP в 20 мМ гистидиновом буфере с 150, 300 и 350 мМ никотинамида соответственно (**таблица 4**). Взвешенные вещества в составах с гистидиновым/никотинамидным буфером образуются значительно позже по сравнению с составами в цитратном буфере.

**[0031]** При исследовании обнаруживают, что взвешенное вещество в препарате PDSP в 10 мМ цитратном буфере с 0,85% NaCl является грубым, и мелкие частицы или волокна можно наблюдать при анализе под микроскопом. Однако взвешенное вещество в составах PDSP, полученных в гистидин/никотинамидном буфере, очень мелкое, так что только уменьшается прозрачность раствора без видимых частиц при анализе под микроскопом.

**[0032]** Для того, чтобы оценить, может ли также происходить осаждение при наличии взвешенного вещества, аликвоты по 400 мкл каждого из растворов PDSP собирают в 1,5-мл пробирки Эппендорфа для центрифугирования (13000 об/мин в течение 5 мин). Как видно на **фигуре 2** (средняя панель) и в **таблице 4**, видимое осаждение наблюдается через 5,5, 4,5 и 14,5 часов после начала перемешивания для препаратов PDSP в 20 мМ гистидиновом буфере со 150, 300 и 350 мМ никотинамида, соответственно.

**[0033]** После того, как наблюдается взвешенное вещество или осаждение, перемешивание растворов PDSP продолжают до тех пор, пока они не становятся мутными. **Фигура 2** (нижняя панель) и **таблица 4** показывают, что составы PDSP,

полученные в 20 мМ гистидиновом буфере со 150, 300 и 350 мМ никотинамида, становятся мутными через 13,5, 7-24 и 16,5 часов после начала перемешивания, соответственно.

**[0034]** По сравнению с составами PDSP, полученными в цитратных буферах, составы PDSP, полученные в гистидин/никотинамидных буферах, могут лучше выдерживать напряжение сдвига. Кроме того, среди таких гистидин/никотинамидных составов раствор с 350 мМ никотинамида показывает более длительное время для осаждения, чем раствор со 150 мМ и 300 мМ никотинамида, что предполагает, что более высокая концентрация никотинамида может повысить стабильность PDSP в составах, полученных в буферах на основе гистидина.

**3.** Способность сопротивляться усилию сдвига препаратов полученного из PEDF короткого пептида (PDSP) с гистидин/никотинамидным буфером с различными концентрациями сорбита

**[0035]** Сообщается, что применение никотинамида для глаз может вызвать раздражение глаз (Keri G., 2005. Reassessment of the one experiment from the requirement of the tolerance for nicotinamide. United State Environmental Protection Agency Washington, D.C. 20460. 1-12). В соответствии с этим, используют сорбит для замены всего или части никотинамида в буфере на основе гистидина. Как видно в **таблице 4**, взвешенное вещество наблюдают после перемешивания в течение только 3 часов в составе 20 мМ гистидина/только 260 мМ сорбита. И взвешенное вещество находят через 3, 4,5, 4, 13, 13,5, 6,5 and 4,5 часов, соответственно, после начала перемешивания в препарате PDSP в буферах 20 мМ гистидина/150 мМ никотинамида с 120, 125, 130, 140, 150, 160, 170 и 180 мМ сорбита (**фигуры 3, 4** и **таблица 4**).

**[0036]** Среди таких гистидин/никотинамидных составов взвешенные вещества, осаждение и мутность наблюдаются после 13-часового непрерывного перемешивания в PDSP, полученном в 20 мМ гистидине/150 мМ никотинамиде с 140 и 150 мМ сорбита, что предполагает, что диапазон от примерно 140 мМ до 150 мМ может являться оптимальной концентрацией сорбита в составе гистидин/никотинамид (**фигуры 3, 4** и **таблица 4**). Кроме того, стабильности препарата PDSP с буфером 20 мМ гистидина/150 мМ никотинамида/140 или 150 мМ сорбита и с буфером 20 мМ гистидина/350 мМ никотинамида буфера сопоставимы, что предполагает, что сорбит можно использовать для замены части никотинамида.

**[0037]** Такие результаты вместе с данными, описанными выше, предполагают, что составы, содержащие гистидин/никотинамид, более хороши для стабильности PDSP, чем составы цитрат/NaCl. Осадки появляются через 1 час после начала перемешивания в случае препарата PDSP в 10 мМ цитрате с 0,85% NaCl, в то время как для PDSP, полученного в 20 мМ гистидине с 150 мМ - 350 мМ никотинамида, осаждение наблюдается после 5-часового перемешивания. В 5 раз более длительное время образования осадков в составах с гистидином/никотинамидом указывает на то, что PDSP значительно более стабильны в составах с гистидином/никотинамидом по сравнению с

составами с цитратом/NaCl. Кроме того, среди составов с различными концентрациями никотинамида осаждение не наблюдается до 14,5 часов после непрерывного перемешивания, что указывает на то, что для поддержания стабильности PDSP в качестве эксципиента более подходящими являются более высокие концентрации никотинамида.

**[0038]** При сравнении с составами PDSP, полученными в цитратных буферах, составы PDSP, полученные в буфере, содержащем только гистидин/сорбит, демонстрируют лучшую способность поддерживать стабильность PDSP. Однако, при сравнении с составами, содержащими только гистидин/никотинамид, способность поддерживать стабильность PDSP все еще недостаточно хороша для составов, содержащих только гистидин/сорбит, что указывает на то, что никотинамид может являться важным компонентом для поддержания стабильности PDSP в буфере на основе гистидина.

**[0039]** Когда тонизирующий агент, такой как сорбит, используют для замены части никотинамида, время появления осадка схоже для препарата PDSP в 20 мМ гистидина/350 мМ никотинамида (14,5 часов), и препарата PDSP в 20 мМ гистидина/150 мМ никотинамида/140 или 150 мМ сорбита (13 и 14 часов соответственно). Такие данные дополнительно подтверждают, что концентрация около 140-150 мМ является лучшим выбором концентраций сорбита для составов PDSP, получаемых в буферах с 20 мМ гистидина/150 мМ никотинамида.

**[0040]** В целом, из испытаний составов, проведенных авторами изобретения, показано, что гистидин/никотинамид является значительно лучшим базовым буфером для составов, содержащих PDSP (такой как PDSP SEQ ID NO:3), чем цитратные буферы. Согласно вариантам осуществления изобретения PDSP может находиться в любых подходящих концентрациях (таких как 0,01%-5%, мас./об., предпочтительно 0,01%-1%, мас./об.), и гистидиновые буферы можно использовать в любых подходящих концентрациях, таких как 1 мМ -100 мМ, предпочтительно 5 мМ - 60 мМ, предпочтительнее 10 мМ - 40 мМ, наиболее предпочтительно 15 мМ - 30 мМ. Величины pH для составов могут находиться в диапазоне от 5 до 9, предпочтительно величины pH находятся вблизи нейтральной величины, такой как 6,5-7,5, наиболее предпочтительно около 7,0. Составы включают антиоксидант, предпочтительно никотинамид, в подходящей концентрации, такой как 50 мМ - 1000 мМ, предпочтительно 100 мМ - 700 мМ, предпочтительнее 200 мМ - 500 мМ и наиболее предпочтительно 300 мМ - 400 мМ. Например, предпочтительный состав для раствора PDSP может включать 20 мМ гистидина с 350 мМ никотинамида, pH 7,0. Составы также могут включать неионный тонизирующий агент, предпочтительно сорбит, в подходящей концентрации, такой как 0 мМ - 500 мМ, предпочтительно 10 мМ - 400 мМ, предпочтительнее 50 мМ - 300 мМ и наиболее предпочтительно 100 мМ - 200 мМ. Например, предпочтительный состав раствора PDSP может включать 20 мМ гистидина со 150 мМ никотинамида и 150 мМ сорбита, pH 7,0.

**[0041]** Составы по изобретению можно использовать для лечения различных

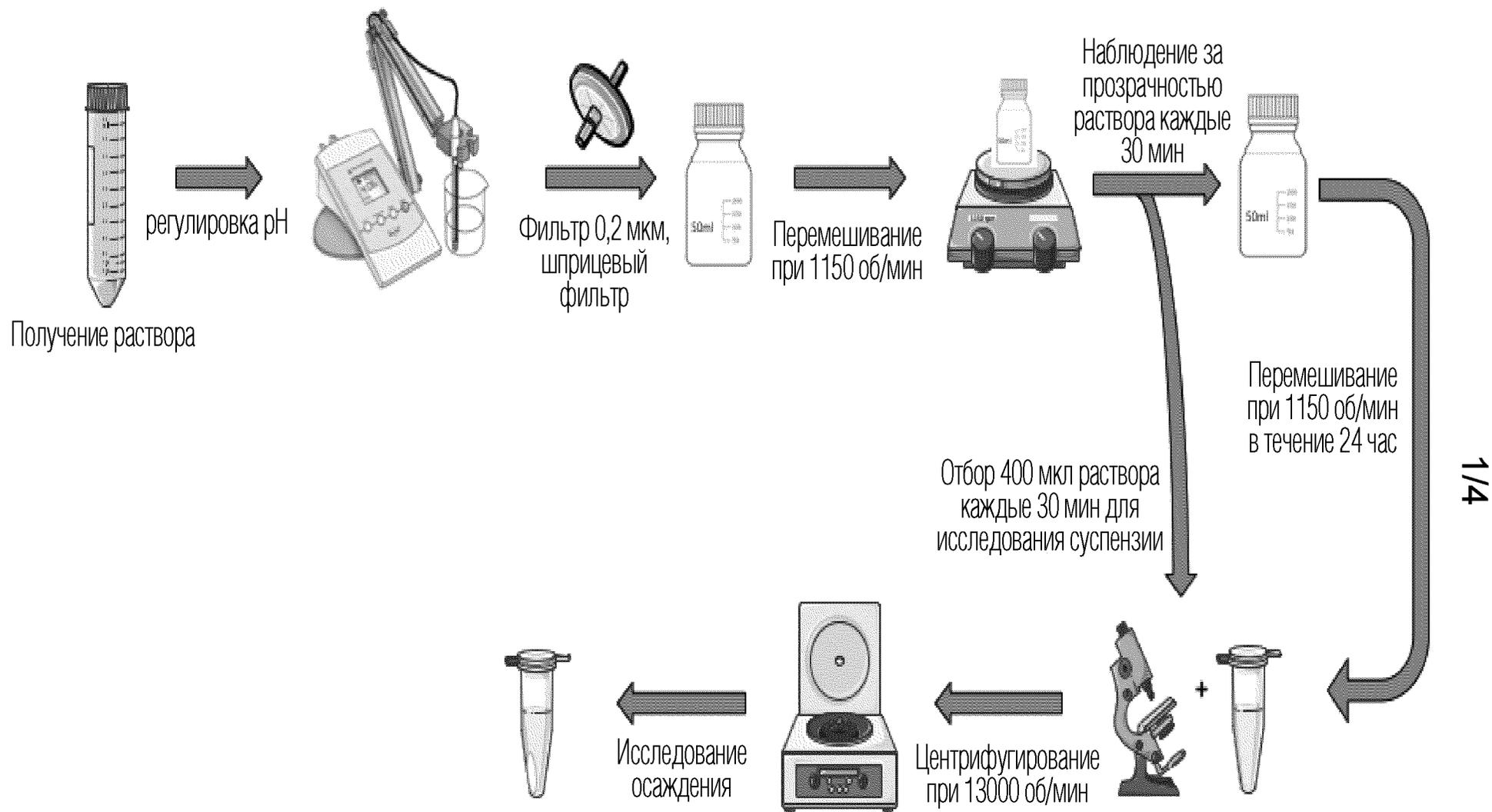
заболеваний и состояний, таких как дегенерация сетчатки, болезнь мейбомиевой железы, сухость глаз и т.д. Для глазных применений составы могут представлять собой офтальмологические растворы.

**[0042]** Варианты осуществления изобретения проиллюстрированы ограниченным числом примеров. Специалист в данной области техники должен понимать, что эти примеры приведены только для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения, поскольку возможны другие модификации и варианты без отхода от объема изобретения. Соответственно, объем изобретения должен ограничиваться прилагаемой формулой изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

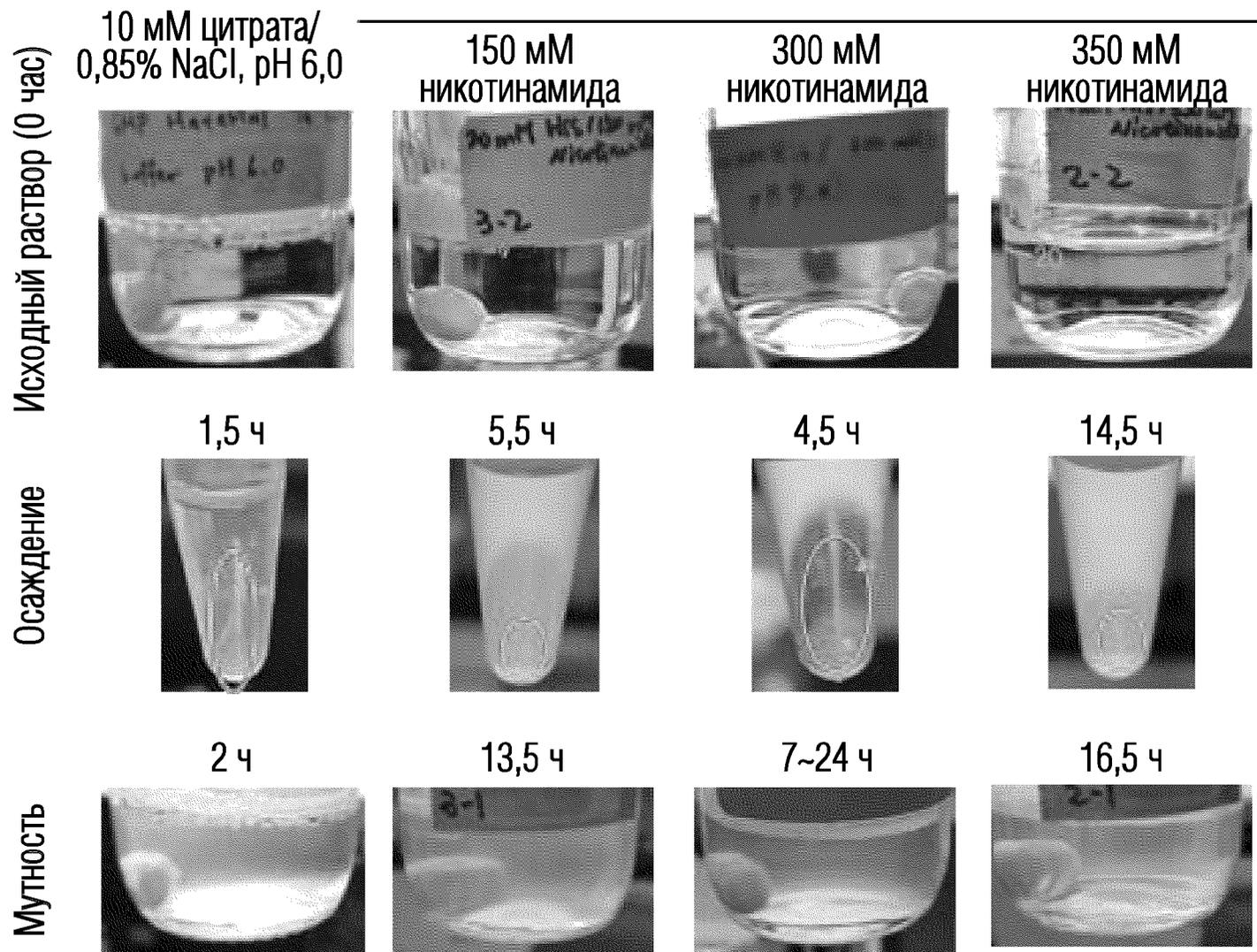
1. Водный состав, содержащий:  
полученный из PEDF короткий пептид (PDSP), имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5, 6, 8 или 9,  
антиоксидант и  
гистидин, имеющий концентрацию 1 мМ - 100 мМ.
2. Водный состав по п.1, в котором величина рН составляет примерно 5-9.
3. Водный состав по п.1, в котором антиоксидантом является никотинамид.
4. Водный состав по п.3, в котором концентрация никотинамида составляет 50 мМ - 1000 мМ.
5. Водный состав по п.1, дополнительно содержащий неионный тонизирующий агент.
6. Водный состав по п.5, в котором неионным тонизирующим агентом является сорбит.
7. Водный состав по п.6 в котором концентрация сорбита составляет 0 мМ - 500 мМ.
8. Водный состав по п.1, в котором концентрация гистидина составляет 5 мМ - 60 мМ.
9. Водный состав по п.1, в котором концентрация гистидина составляет 10 мМ - 40 мМ.
10. Водный состав по любому из пп. 1-9, в котором PDSP имеет последовательность SEQ ID NO: 3.
11. Водный состав по п.10, в котором концентрация PDSP составляет 0,01%-1%, мас./об.

По доверенности



ФИГ. 1

20 мМ гистидиновый буфер, рН 7,0



ФИГ. 2

20 мМ гистидиновый буфер/150 мМ никотинамида

Исходный раствор (0 час)

120 мМ сорбита 125 мМ сорбита 130 мМ сорбита 140 мМ сорбита 150 мМ сорбита 160 мМ сорбита 170 мМ сорбита 180 мМ сорбита



4 ч

6,5 ч

5 ч

13 ч

14 ч

6 ч

5 ч

4,5 ч

Осаждение



3/4

9~12 ч

9~24 ч

9~12 ч

18 ч

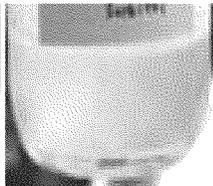
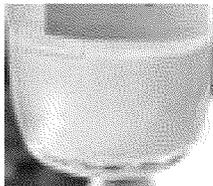
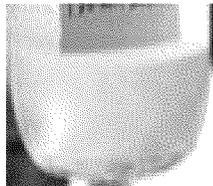
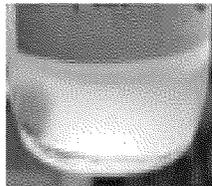
18 ч

9~12 ч

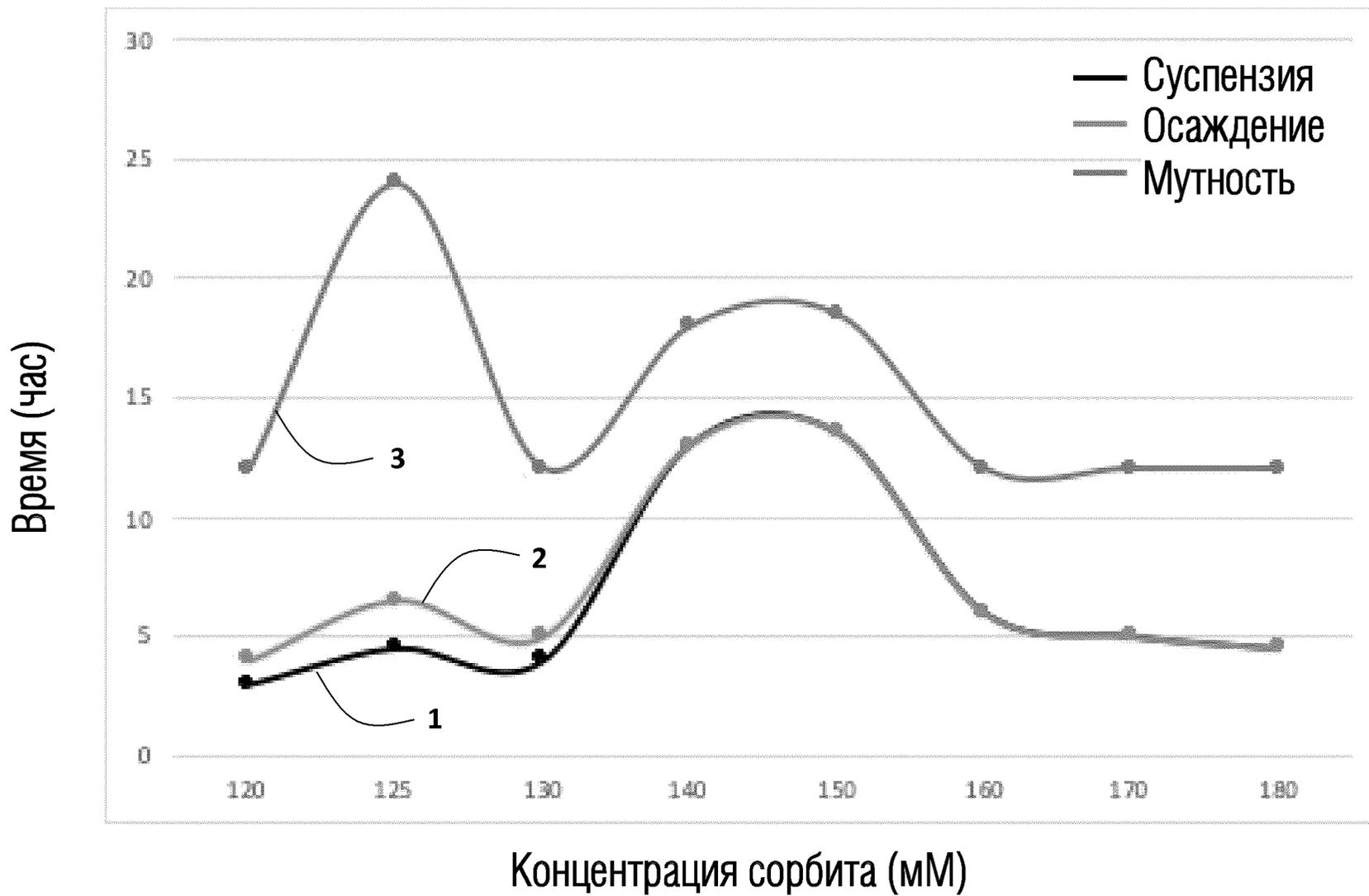
9~12 ч

9~12 ч

Мутность



ФИГ. 3



ФИГ. 4