

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7670704号
(P7670704)

(45)発行日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(24)登録日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 P	27/04 (2006.01)	A 6 1 P	27/04	Z N A
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26	
請求項の数 21 (全72頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-527200(P2022-527200)	(73)特許権者	519046579	
(86)(22)出願日	令和2年11月16日(2020.11.16)		シルク テクノロジーズ、リミテッド	
(65)公表番号	特表2023-502591(P2023-502591 A)		アメリカ合衆国 5 5 4 4 7 ミネソタ、	
			プリマス、アナポリス レイン ノース	
(43)公表日	令和5年1月25日(2023.1.25)		3 7 0 0、スウィート 1 0 5	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/060781	(74)代理人	110000855	
(87)国際公開番号	WO2021/141672		弁理士法人浅村特許事務所	
(87)国際公開日	令和3年7月15日(2021.7.15)	(72)発明者	ローレンス、ブライアン ディー、	
審査請求日	令和5年11月15日(2023.11.15)		アメリカ合衆国 5 5 4 4 7 ミネソタ、	
(31)優先権主張番号	62/936,294		プリマス、アナポリス レイン ノース	
(32)優先日	令和1年11月15日(2019.11.15)		3 7 0 0、スウィート 1 0 5	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	インファンガー、デイヴィッド ダブリ	
			ュー、	
(31)優先権主張番号	63/094,709		アメリカ合衆国 5 5 4 4 7 ミネソタ、	
(32)優先日	令和2年10月21日(2020.10.21)		プリマス、アナポリス レイン ノース	
	最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 絹由来タンパク質の安定した配合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、およびアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、天然フィブロインと少なくとも4%異なる、フィブロイン由来タンパク質組成物であって；

フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖とフィブロイン軽タンパク質鎖との間のシステインジスルフィド結合が減少または排除され；当該タンパク質組成物のセリン含有量は、ネイティブフィブロインと比較して25%以上減少しており、

しかも、セリン含有量は少なくとも約5%であり；フィブロイン由来タンパク質組成物の平均分子量は15 k D aから36 k D aの間である、前記のフィブロイン由来タンパク質組成物；

(b) 約0.02重量%から約0.5重量%の量のポリソルベートー80；

(c) 1つ以上の緩衝剤；

(d) 1つ以上の浸透圧剤；

を含む配合物であって、

ここで、10マイクロメートル以上の直径を有する粒子に関して、4℃から40℃で12週間を超える貯蔵期間後、4.5から6.0のp H、約160 m O s m / k gから約200 m O s m / k gの浸透圧、および50 / m L以下の粒子数を有する、前記の配合物。

【請求項2】

タンパク質組成物が46.5%を超えるグリシンアミノ酸を含み、タンパク質組成物が

30.5%を超えるアラニンアミノ酸、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1に記載の配合物。

【請求項3】

タンパク質組成物が、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%を超えて減少し、その結果、タンパク質組成物が8%未満のセリンアミノ酸を含む、請求項1に記載の配合物。

【請求項4】

タンパク質組成物のタンパク質鎖の50%超が10kDaから40kDaの範囲内の分子量を有する、請求項1に記載の配合物。

【請求項5】

フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、およびアラニン含有量の合計の差に関して少なくとも6%だけ天然フィブロインと異なり；フィブロイン由来タンパク質の平均分子量は約15kDaから約30kDaであり；配合物のpHは約5.2から約5.8の間である、請求項1に記載の配合物。

【請求項6】

フィブロイン由来タンパク質組成物が約15kDaから約25kDaの平均分子量を有し、配合物のpHが5.3から5.7である、請求項1に記載の配合物。

【請求項7】

フィブロイン由来タンパク質組成物が約18kDaから約25kDaの平均分子量を有する、請求項1に記載の配合物。

【請求項8】

フィブロイン由来タンパク質の重量%が約0.05%から約10%である、請求項1に記載の配合物。

【請求項9】

緩衝剤が、ヒスチジン、酢酸塩、クエン酸塩、グルタミン酸塩、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1に記載の配合物。

【請求項10】

緩衝剤によって形成される緩衝剤濃度が約10ミリモルから約50ミリモルであるか、または配合物中の1つ以上の浸透圧剤のそれぞれの濃度が約30ミリモルから約40ミリモルである、請求項9に記載の配合物。

【請求項11】

緩衝剤が、約0.1重量%～約1重量%の酢酸ナトリウムおよび約0.01重量%～約0.1重量%の酢酸を含む、請求項10に記載の配合物。

【請求項12】

浸透圧試薬が単糖、無機塩、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1に記載の配合物。

【請求項13】

浸透圧試薬が、マンニトール、デキストロース、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、またはそれらの組み合わせを含む、請求項12に記載の配合物。

【請求項14】

浸透圧試薬が、約0.10重量%～約2重量%のデキストロースおよび約0.10重量%～約2重量%の塩化マグネシウムを含む、請求項13に記載の配合物。

【請求項15】

配合物がガラスまたはポリエチレンを含む容器中に保存され、場合により、容器がタイプIボロシリケートガラスまたはLDPEである、請求項1に記載の配合物。

【請求項16】

(a) フィブロイン由来タンパク質の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、およびアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、天然フィブロインと少なくとも6%異なる、約0.1重量%から約3重量%のフィブロイン由来タンパク質であって；

フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖とフィブロイン軽タンパク

10

20

30

40

50

質鎖との間のシステインジスルフィド結合が減少または排除され；フィブロイン由来タンパク質は、46%を超えるグリシンアミノ酸と30%を超えるアラニンアミノ酸を含み；当該フィブロイン由来タンパク質のセリン含有量は、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%を超えて減少しており、その結果、フィブロイン由来タンパク質は、8%未満のセリンアミノ酸を含み；フィブロイン由来タンパク質の平均分子量は約15 kDaから約35 kDaである、前記のフィブロイン由来タンパク質；

(b) 約0.02重量%～約0.5重量%の量のポリソルベート-80；

(c) 約10ミリモルから約50ミリモルの酢酸塩緩衝液；及び

(d) 1つ以上の浸透圧剤；

含む水性配合物であって、

直径10マイクロメートル以上の微粒子に関して、4℃～40℃で12週間以上の保管期間後の微粒子数が50/mL以下であり；5.2から5.8のpH；及び175 mOsm/kgから185 mOsm/kgの浸透圧を有する、前記の配合物。

【請求項17】

酢酸塩緩衝液が、約0.2重量%～約0.3重量%の酢酸ナトリウムおよび約0.01重量%～約0.03重量%の酢酸を含む、請求項16に記載の配合物。

【請求項18】

浸透圧剤が、約0.6重量%から約0.9重量%のデキストロースおよび約0.6重量%から約0.9重量%の塩化マグネシウム六水和物を含む、請求項17に記載の配合物。

【請求項19】

ポリソルベート-80の重量%が約0.01%から約0.1%である、請求項18に記載の配合物。

【請求項20】

眼疾患を有する対象に、請求項1～19のいずれか一項に記載の配合物の有効量を投与し、それにより眼疾患を治療することを含む、眼疾患を治療するための方法に使用するための請求項1～19のいずれか一項に記載の配合物。

【請求項21】

眼疾患がドライアイ症候群である、請求項20に記載の配合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2020年10月21日に出願された米国仮特許出願第63/094,748号、2020年10月21日に出願された第63/094,709号、および2019年11月15日に出願された62/936,294号の35 U.S.C. § 119(e)に基づく優先権を主張しており、これらの出願は参照により本願に組み込まれるものとする。

【0002】

政府支援

この発明は、米国陸軍から授与されたGrant No. W81XWH-17-C-0147による政府の支援を受けて行われたものである。政府は、この発明について一定の権利を有している。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ペプチドやタンパク質の治療薬は、様々な疾患の治療薬としてますます普及している。これらの分子を単離するための歴史的なアプローチには、動物の臓器や組織からの採取が含まれていた。しかし、近年の組換えDNA技術の成功により、過去20年間に新しいタンパク質バイオ治療薬の開発に拍車がかかっている。ペプチド、タンパク質、タンパク質ベースのバイオシミラーは、化学的に合成された治療薬と比較して、疾病の治療において多くの利点がある。例えば、精製された抗体は、その構造の基礎となる二次および三次折り畳みパターンが極めて特異的であり、患者に投与された後も機能性が維持される。同様

10

20

30

40

50

に、細胞内シグナル伝達（ホルモン、血液凝固因子など）を刺激または阻害するために用いられる治療用ペプチドは、強力に即効性があり、宿主の一般的なタンパク質分解経路を利用して代謝される。

【0004】

ペプチドやタンパク質の有効性は、細胞表面受容体、脂質ラフト、または細胞内／細胞外分子などの標的とユニークかつ効果的にインターフェースする能力に依存している。この特異性のために、治療用ペプチドやタンパク質は、高次の二次構造（例えば、 α ヘリカル、 β シート）、三次構造（三次元形状）、四次構造（複数のタンパク質サブユニットの相互作用）を形成するアミノ酸とアミノ酸コンフォメーションの機能組織を維持することが必要である。これらの配置は、共有結合（ジスルフィド結合など）および非共有結合（水素結合、疎水性結合、イオン結合など）を含むアミノ酸残基間の静電相互作用によって方向付けられるが、これらはすべて、生理的恒常性に支配される周囲の環境パラメータに依存して、これらの結合を促進させるものである。

【0005】

組織や溶液のpHがわずかに変化すると、水素イオンの濃度が変化し、アミノ酸残基のプロトン化が促進または阻害され、それによってそれぞれ反対電荷または同種電荷を持つ隣接するアミノ酸が引き寄せられたり、反発したりして、水素イオンが変化する。同様に、タンパク質を含む組織や溶液の温度が上昇すると、内部エネルギーが上昇し、ペプチドの加水分解やタンパク質構造の再配列により、タンパク質が不安定になる可能性がある。従って、ペプチドやタンパク質の配合物の有効性を維持するために、環境を制御・維持することが切実に求められている。

【0006】

ヒトの体内には、細胞レベルのイオンチャネルやプロトンポンプから、体内の各器官の集団機能、これらの器官や組織における体液廃棄物勾配を解消するための全身血管系やリンパ系まで、恒常性を維持するための多数のプロセスや機構が存在するが、これらのフィードバック駆動型保護装置からタンパク質が外れると、機能性が損なわれたり失われたりしやすくなってしまう。このことは、特に治療用ペプチドやタンパク質において顕著であり、周囲温度や非生理的な溶液条件によって、その機能的な構造が急速に劣化する可能性がある。タンパク質の構造変化は、共有結合の形成や切断によるもの（化学的不安定性）、隣接するタンパク質との相互作用、溶解性を損なう溶液添加物によるものなどがある。

【0007】

タンパク質の化学的不安定性は、一般に、酸化（例えば、紫外線照射、および／または過酸化物質もしくは金属イオンの存在による）またはpHの変化もしくは昇温によって誘発されるアミノ酸脱アミド化によって引き起こされる。溶液条件におけるこれらの後者の変化は、水溶液中の溶解したタンパク質に課される機械的（例えば、せん断）および界面ストレスから生じ得るタンパク質の凝集およびタンパク質の溶解度の減少につながる可能性がある。そのため、タンパク質を含む配合物の設計では、保存性の高い治療法を促進し、有効性を維持するために、これらのストレス要因にできる限り対処する必要がある。

【0008】

現在、治療用ペプチドおよびタンパク質の安定性のための主要な戦略は、組織の生理学的環境を模倣する溶液を調合することである。塩ベースの緩衝系は、経時的（例えば、溶液を酸性化する二酸化炭素の吸収に伴って）またはペプチドの加水分解に伴って生じる溶液pHの大きな変動を防止するために一般的に使用されている。賦形剤は、溶液の浸透圧を高め、タンパク質とタンパク質の相互作用や凝集の機会を減少させるために使用される。同様に、界面活性剤の添加は、界面ストレスおよび物理的不安定性の可能性を低減するために使用される。あるいは、多くのタンパク質溶液は、保存期間を延ばすために冷蔵温度で保管されるが、治療薬が日常的に投与される場合や1日に何度も投与される場合には、理想的ではない。最後に、タンパク質治療薬の中には、タンパク質の劣化を最小限に抑えるために、凍結乾燥粉末として保存されるものがある。これらの溶液は投与直前に可溶化されるが、可溶化に使用する溶媒の容量にばらつきがあるため、薬剤の投与量に誤差が

10

20

30

40

50

生じやすくなる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従って、溶液中で高度に可溶性であり、長期安定性及び低微粒子数を有し、他の容易に入手可能な成分と適合する、安定した治療用タンパク質配合物が必要とされている。また、溶液中のタンパク質の安定性を長期間維持することができ、したがって、配合物の貯蔵寿命および効力を増加させることができる、眼に関連する症状の治療のためのタンパク質配合物に対する必要性が存在する。また、タンパク質添加剤を使用せずに眼関連症状を治療するために使用され得る配合物に対するニーズも存在する。本開示は、これらのニーズを満たす。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の概要

本発明は、修飾絹フィブロイン（変性シルクフィブロイン）などのタンパク質の物理的・化学的安定性を向上させるための配合物（製剤）を提供するものである。本明細書に記載の絹由来タンパク質（SDP）は、βシート活性を低下させたタンパク質組成物であり、その結果、高可溶性材料となる。SDPは、高濃度で溶液ベースの製品配合物に容易に組み込むことができる。別の利点は、SDPが、治療用配合物に典型的に含まれるような他の溶解成分と高い混和性を有することである。

20

【0011】

水性タンパク質の安定性を追求するために使用される従来の薬剤は、溶液中のSDPの物理的安定性に影響を与えないか、悪影響を及ぼすものであったが、本明細書に記載された配合物の特定の成分の選択はユニークなものである。特定の緩衝塩、浸透圧剤、および界面活性剤は、タンパク質の分解またはタンパク質の効能の低下なしに、室温でのSDPの安定性を拡張する。

【0012】

本開示は、フィブロイン由来タンパク質組成物を含む配合物であって、該フィブロイン由来タンパク質組成物の平均分子量が15～35kDaである、配合物を提供する。配合物はまた、緩衝剤、ポリソルベート-80、及び1つ以上の浸透圧剤を含み；配合物は、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して、4℃～40℃で12週間以上、又は24週間以上の保存期間の後に、4.5～6.0のpH及び50mL以下の微粒子数を有している。

30

【0013】

さらに、本開示は、約0.1重量%～約3重量%のシルク由来タンパク質-4（SDP-4）；ポリソルベート-80、約10ミリモル～約50ミリモルの酢酸塩緩衝液、及び浸透圧剤を含む配合物であって；配合物が、pHが5.2～5.8、175mOsm/kg～185mOsm/kgの浸透圧、および40℃で12週間以上、または24週間以上の保存期間の後、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して、50/mL以下の微粒子カウントを有することを特徴とする。

40

【0014】

特定の実施形態は、約0.1重量%～約3重量%の絹由来タンパク質を含む配合物を含み、ここで、以下の通りである。絹由来タンパク質は、フィブロイン由来タンパク質の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、及びアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも6%異なり、フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖とフィブロイン軽タンパク質鎖間のシステインジスルフィド結合は減少又は消滅し、フィブロイン由来タンパク質は46%を超えるグリシンアミノ酸と30%を超えるアラニンアミノ酸を含むことを有し得る。フィブロイン由来タンパク質は、フィブロイン由来タンパク質が8%未満のセリンアミノ酸を含むように、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%以上減少したセリン含量を有し；そしてフ

50

イブロイン由来タンパク質の平均分子量は約15kDa～約35kDaであり；そしてポリソルベート-80、約10ミリモル～約50ミリモルの酢酸塩緩衝剤、および浸透剤；ここで配合物はpHが5.2～5.8、175mOsm/kg～185mOsm/kgの浸透圧、および10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して4℃～40℃での12週間を超える貯蔵期間の後に50mL以下の微粒子カウントを有することを特徴とする。

【0015】

一実施形態において、緩衝塩は5.5の溶液pHを生成し；使用される緩衝塩は3.7と5.6の間の機能範囲を有し；使用される浸透圧剤は160～200mOsm/kgの浸透圧を有する溶液を生成し；使用される浸透圧剤は0.5%wt./wt.の濃度を有し；そして使用される界面活性剤は0.05～0.5%wt./wt.の濃度を有する。

10

【0016】

他の態様において、特定の実施形態は、特定の眼関連症状の治療、特に、ドライアイ疾患の治療又はその他の症状の軽減に使用され得る眼科用配合物を提供する。

【0017】

したがって、好ましい実施形態は、約0.04重量%～約0.1重量%のポリソルベート-80、約0.2重量%～約0.3重量%の酢酸ナトリウムおよび約0.01重量%～約0.03重量%を含む酢酸塩緩衝液を含んでよい眼科用配合物を含んでいる。酢酸、および約0.6重量%～約0.9重量%のブドウ糖と約0.4重量%～約0.9重量%の塩化マグネシウムを含む浸透圧剤を含み、配合物は5.2～5.8のpHおよび175mOsm/kg～185mOsm/kgの浸透圧を持ち、場合により絹由来タンパク質を含むことができる。

20

【0018】

眼科用配合物の一実施形態は、約0.04重量%～約0.1重量%のポリソルベート-80、約0.2重量%～約0.3重量%の酢酸ナトリウムおよび約0.01重量%～約0.03重量%の酢酸を含む酢酸塩緩衝液、ならびに約0.6重量%から約0.9重量%のデキストロースおよび約0.6重量%から約0.9重量%の塩化マグネシウムを含む浸透圧剤から本質的になるものである。ここで、配合物は、5.2～5.8のpH及び175mOsm/kg～185mOsm/kgの浸透圧を有し、場合により絹由来タンパク質を含んでもよい。

30

【0019】

一部の実施形態では、本明細書に記載の眼科用配合物は、治療用タンパク質又はペプチド組成物をさらに含む。特定の実施形態では、配合物中のタンパク質又はペプチドの重量%は、約0.01%～約15%である。特定の実施形態では、タンパク質又はペプチドのwt%は、約0.1%～約5%、又は約1%～約3%である。好ましい実施形態では、タンパク質は疎水性タンパク質である。1つの具体的な実施形態では、タンパク質はSDP-4である。様々な実施形態において、配合物中のSDP-4の重量%は、約0.01%～約15%である。追加の実施形態では、SDP-4のwt%は、約0.1%～約5%、または約1%～約3%、または約0.1%、1%、または3%である。

【0020】

従って、眼科用配合物の特定の実施形態は、1つ以上の緩衝剤、界面活性剤、及び1つ以上の浸透圧剤を含み；ここで、配合物は4.5～6.0のpHを有し、配合物は4週間超の期間ゲル化せずに溶液中のタンパク質を維持し、4℃～40℃での12週間超の貯蔵期間の後に、直径10マイクロメートル以上を有する微粒子数に関して50mL以下維持できるものである。

40

【0021】

追加の実施形態では、眼科用配合物は、1つ以上の界面活性剤；1つ以上の浸透圧剤；及び約0.1重量%～約1.0重量%の酢酸ナトリウム及び約0.01重量%～約0.1重量%の酢酸を含む酢酸緩衝系を含んでよく、緩衝系は配合物をpH4.5～6に維持し、配合物は、ゲル化することなく4週間を超える期間、溶液中のタンパク質を維持するこ

50

とができ、配合物は、眼科用配合物にタンパク質を添加した場合、直径10 μm 以上を有する微粒子に関して4℃～40℃での12週間を超える保存期間後に50 mL以下の微粒子カウントを維持することができるものである。

【図面の簡単な説明】

【0022】

図面の簡単な記述

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本発明の特定の実施形態または様々な態様をさらに示すために含まれている。場合によっては、本発明の実施形態は、本明細書に提示された詳細な説明と組み合わせて添付の図面を参照することによって最もよく理解され得る。説明及び添付の図面は、特定の具体例、又は本発明の特定の態様を強調することがある。しかし、当業者であれば、その例または態様の一部を本発明の他の例または態様と組み合わせて使用することができることを理解するであろう。

【0023】

【図1】図1：SDP-4の物理的安定性の温度による影響。1.0% wt./wt.における溶液微粒子カウントの概要のグラフ。SDP-4溶液を定義された温度とpHに維持した（30分間）。緩衝剤、賦形剤は使用していない。図は、表示された溶液条件下で4週間後のコールター法による可視光以下の微粒子数を示している。40℃に保った溶液では、pHの上昇に伴い微粒子形成が増加した。

【0024】

【図2】図2：SDP-4の物理的安定性に対する温度の影響。1.0% wt./wt.における溶液微粒子カウントの概要のグラフ。SDP-4溶液を定義された温度とpHに維持した（200分間）。緩衝剤、賦形剤は使用していない。図に示した溶液条件下で4週間経過したコールター法による可視光線下微粒子計数値を示す。いずれの条件においても、SDP-4の反応時間の延長に伴い、微粒子数は著しく減少した。40℃では、pHの上昇に伴い微粒子の発生が増加した。

【0025】

【図3】図3：SDP-4の反応時間は物理的安定性に影響する。1%重量/重量での微粒子数（Coulter法による）のまとめグラフ。SDP-4溶液を30分（濃い灰色）または200分（薄い灰色）で反応させ、クエン酸（CA）で緩衝化して溶液のpHを示した。溶液は測定前に40℃/75%相対湿度で2週間保存した。すべてのpH条件において、30分反応させたSDP-4は、200分反応させたSDP-4と比較して微粒子数が増加した。

【0026】

【図4】図4：緩衝化SDP-4溶液の熱安定性の評価。1%重量/重量における微粒子数（コールター法による）のまとめグラフ。SDP-4溶液を200分で反応させ、クエン酸で緩衝化してpHを5.5にした。溶液は定められた温度条件下で2週間保存された。保存温度の上昇に伴い、微粒子形成が促進された。

【0027】

【図5】図5：容器の密閉性は、SDP-4の物理的安定性に劇的に影響する。1.0% wt./wt.での微粒子数（コールター法による）のまとめ。SDP-4（200分反応）溶液をガラス、低密度ポリエチレンまたはポリプロピレンで保存した場合の微粒子数（コールター法による）のまとめ。緩衝剤、賦形剤は使用しなかった。溶液は測定前に40℃/75%相対湿度で2週間保管した。微粒子数は、ガラス製容器で最も少なく、ポリプロピレン製容器で最も多く、低密度ポリエチレンは中程度の微粒子数を示した。

【0028】

【図6】図6：SDP-4の物理的安定性に対する緩衝剤の影響。1%重量/重量における微粒子数（Coulter法による）を描写した概要のグラフ。SDP-4溶液（240分反応）を、10または50 mMの濃度のグルタミン、酢酸またはヒスチジンで緩衝化し、pHを5.5とした。溶液は血清用ガラスバイアルに入れ、40℃/75%相対湿度で8週間保存した。グルタミン酸および酢酸塩緩衝液は、ヒスチジン緩衝液よりも微粒子

10

20

30

40

50

形成をより大きく阻害した。

【0029】

【図7】図7：緩衝液と緩衝液強度がpHドリフトに与える影響。1%重量／重量を含む配合物における溶液pHの概要グラフ。SDP-4（240分反応）溶液を、10又は50mMの濃度のグルタミン、酢酸、又はヒスチジン緩衝液で緩衝化し、pHを5.5とした。40℃／相対湿度75%の環境下で、最初のpH測定（暗、左サイドバー）、8週間後の再測定（明、右サイドバー）を行った。グルタミン酸緩衝液ではSDP-4溶液のpHを維持できなかったが、50mM酢酸塩緩衝液とヒスチジン緩衝液は安定したpHを維持するのに有効であった。

【0030】

【図8】図8：SDP-4の安定性に対する浸透圧の影響。サイズ10～25μmの50個以上の微粒子数によって定義される、破損までの溶液安定性の持続時間を描写した概要のグラフである。1.0% wt.／wt.を含む2種類の配合物。SDP-4溶液（240分反応）、25mM酢酸塩緩衝液（pH5.5）および浸透圧剤としてのマンニトールを含む2つの配合物をガラスバイアルに入れて、40℃／75%の相対湿度で保存した。浸透圧の高い溶液（290mOsm／kg）は1日で不合格となったが、マンニトールの少ない溶液（180mOsm／kg）は14日まで合格であった。

【0031】

【図9】図9：SDP-4の安定性に対する浸透圧剤の影響。1%wt.／wt.の物理的安定性（微粒子数、コールター法により測定）を示す概要図。SDP-4（240分反応）配合物をpH5.5の酢酸（25mM）で緩衝化し、塩または糖浸透圧剤（180mOsm／kgを達成するため）を定義した物理的安定性（コールター法による微粒子数の測定）を示す概要図。溶液はガラスバイアルに入れ、40℃／75%相対湿度で2週間保存した。マンニトールと塩化ナトリウム（NaCl）は溶液の微粒子を増加させたが、MgCl₂、ブドウ糖は微粒子形成を減少させた。組成に関係なく、すべての溶液は、測定されたより大きな微粒子に対して、より多くの10～25μmの微粒子を生成した。

【0032】

【図10】図10：ポリソルベート80は、SDP-4の長期安定性を向上させる。サイズ10～25μmの範囲の50を超える微粒子数によって定義される、不合格までの溶液安定性の持続時間を示す概要のグラフである。1%重量／重量を含む配合物。SDP-4溶液（240分反応）、25mM酢酸塩緩衝液（pH5.5）およびマンニトール（180mOsm／kgまで）を含む配合物を、40℃／75%相対湿度のガラスバイアルに保存した。ポリソルベート80の添加により、不合格までの期間が1日（コントロール、ポリソルベート80無添加の場合）から90日に延長された。

【0033】

【図11】図11：界面活性剤の選択がSDP-4の物理的安定性に与える影響。1%wt.／wt.における微粒子カウントを描写する概要のグラフ。0.1wt.／wt.のポリソルベート20またはポリソルベート80のいずれかを有する25mM酢酸塩緩衝液（pH5.5）、38mM塩化マグネシウムおよび39mMデキストロースを含むSDP-4（240分反応）調合物を作成した。配合物はガラスバイアルに入れ、40℃／75%相対湿度の環境条件下で4週間保存し、コールター法で微粒子を評価した。ポリソルベート80を含む配合物は、ポリソルベート20を含む配合物よりも微粒子数が著しく少なかった。

【0034】

【図12】図12：本明細書に開示される配合物の特定の実施形態を使用する臨床試験において患者に与えられるアンケートである。

【0035】

【図13】図13：ドライアイ治療のためのALPHAおよびBETA第2相臨床試験の臨床試験デザインフローチャート。

【0036】

10

20

30

40

50

【図14A】図14：ドライアイ研究の主要な臨床的徴候のエンドポイントは涙液分解時間(TBUT)と呼ばれる。(A)標準化された試験手順を模式的に示す。

【図14B】(B)SDP-4(アムリシモド)は、試験の56日目まで、ビヒクルと比較してTBUTを増加させた(* $p < 0.001$ for SDP-4 ($n=75$) vs. Vehicle ($n=76$), Error bars = SE)。

【0037】

【図15A】図15：ドライアイ亜集団の被験者において、治療群の症状が有意に改善された。(A)SAND E症状スコアは、56日目の平均でSDP-4(Amlisimod)点眼薬で最も改善した($p < 0.1$)。

【図15B】(B)SAND Eスコアが70以上の患者を含まない特定患者集団は、全集団より有意な改善を示し、この患者集団においてSDP-4(Amlisimod)が車両に対して高い効果を示すことが示された(* $p=0.02$, Vehicle $n=32/76$, 1% SDP-4 (Amlisimod) $n=38/76$; Error bars=SE)。Y軸＝ベースラインからのSAND Eの変化(p t s.)、X軸＝治療日数。

【発明を実施するための形態】

【0038】

発明の詳細な記述

本発明は、SDPに由来するタンパク質組成物を含む眼科用配合物を提供する。本明細書に記載のタンパク質組成物は、米国特許第9,394,355号(Lawrence et al.)に記載のタンパク質組成物を含むか、またはそこから調製することができ、これは参照によりここに組み込まれる。低平均分子量画分も単離して、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第2019/0169243号(Lawrence et al.)に記載のタンパク質組成物など、抗炎症活性が増強された組成物を提供することが可能である。

【0039】

定義

以下の定義は、本明細書および特許請求の範囲の明確かつ一貫した理解を提供するために含まれる。本明細書で使用される場合、引用された用語は、以下の意味を有する。本明細書で使用される他のすべての用語および語句は、当業者であれば理解できるような通常の意味を有する。そのような通常の意味は、Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14th Edition, by R.J. Lewis, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2001などの技術辞書を参照することにより得ることができる。

【0040】

本明細書における「一実施形態」、「一実施形態」等への言及は、記載された実施形態が特定の局面、特徴、構造、部位、又は特性を含み得るが、全ての実施形態が必ずしもその局面、特徴、構造、部位、又は特性を含むとは限らないことを示す。さらに、そのような語句は、本明細書の他の部分で言及される同じ実施形態を参照することができるが、必ずしもそうではない。さらに、特定の態様、特徴、構造、部位、または特性が実施形態に関連して記載される場合、明示的に記載されているかどうかにかかわらず、そのような態様、特徴、構造、部位、または特性を他の実施形態に影響を与えるかまたは接続することは当業者の知識の範囲内である。

【0041】

単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、複数の参照を含む。したがって、例えば、「成分」への言及は、そのような成分の複数を含むので、成分Xは、複数の成分Xを含む。さらに、特許請求の範囲は、任意の要素を除外するように起草される場合があることに留意されたい。このように、本明細書は、本明細書に記載される任意の要素に関連して、「単独で」、「のみ」、「以外」などの排他的用語の使用、および／または請求項の要素の記載または「否定」制限の使用に対する先行基礎として機能することを意図している。

【0042】

用語「及び／又は」は、この用語が関連する項目のいずれか1つ、項目の任意の組み合

10

20

30

40

50

わせ、又は項目の全てを意味する。フレーズ「1つ以上」および「少なくとも1つ」は、特にその用法の文脈で読まれる場合、当業者には容易に理解される。例えば、この句は、1、2、3、4、5、6、10、100、または言及された下限値よりもおよそ10倍、100倍、または1000倍高い任意の上限値を意味することができる。

【0043】

「約」という用語は、指定された値の±5%、±10%、±20%、または±25%の変動を指すことができる。例えば、「約50」パーセントは、いくつかの実施形態において、45から55パーセントまでの変動を担わせることができる。整数の範囲について、用語「約」は、範囲の両端において、言及された整数より大きい及び／又は小さい1又は2の整数を含むことができる。本明細書で他に示されない限り、用語「約」は、個々の成分、要素、組成物、または実施形態の機能性の観点から同等である、言及された範囲に近接した値、例えば、重量パーセントを含むことを意図している。約」という用語は、この段落で上述したように、言及された範囲の終点を修正することもできる。

【0044】

当業者に理解されるように、成分の量、分子量のような特性、反応条件などを表すものを含む全ての数値は近似値であり、全ての例において「約」という用語によって場合により修正されると理解される。これらの値は、本明細書の記述の教示を利用して当業者が得ようとする所望の特性に応じて変化し得る。また、このような値は、本質的に、それぞれの試験測定で見られる標準偏差に起因する変動性を必然的に含むことが理解される。

【0045】

当業者には理解されるであろうが、あらゆる目的、特に書面の説明を提供する観点から、本明細書で言及される全ての範囲は、その範囲を構成する個々の値、特に整数値と同様に、あらゆる可能なサブ範囲及びサブ範囲の組み合わせも包含する。記載された範囲（例えば、重量パーセントまたは炭素基）は、その範囲内の各特定値、整数値、小数値、または同一性を含む。任意の記載された範囲は、同じ範囲を少なくとも等しい半分、3分の1、4分の1、5分の1、または10分の1に分解することが十分に記述され、可能になると容易に認識されることが可能である。非限定的な例として、本明細書で議論される各範囲は、下3分の1、中3分の1、上3分の1などに容易に分解することが可能である。また、当業者には理解されるように、「まで」、「少なくとも」、「より大きい」、「より小さい」、「より多い」、「またはそれ以上」等の全ての言語は、言及された数を含み、そのような用語は、上述したように、その後サブ範囲に分解できる範囲を意味する。同様に、本明細書で言及される全ての比率は、より広い比率の中に入る全ての副比率も含む。したがって、ラジカル、置換基、および範囲について言及された特定の値は、例示のためだけのものであり、ラジカルおよび置換基について定義された範囲内の他の定義された値または他の値を除外するものではない。

【0046】

また、当業者であれば、Markushグループのようにメンバーが共通の方法でグループ化されている場合、本発明は、全体として記載されたグループだけでなく、グループの各メンバーを個別に、および主グループのすべての可能なサブグループを包含することを容易に認識することができる。さらに、すべての目的のために、本発明は、主グループだけでなく、グループメンバーの1つ以上を除いた主グループも包含する。したがって、本発明は、引用されたグループのメンバーのうちの任意の1つ以上を明示的に除外することを想定している。従って、開示されたカテゴリまたは実施形態のいずれかに但し書きを適用することができ、それによって、例えば、明示的な否定的制限に使用するために、引用された要素、種、または実施形態のいずれか1つ以上を、かかるカテゴリまたは実施形態から除外することができる。

【0047】

「接触」という用語は、例えば、溶液中、反応混合物中、in vitro、またはin vivoで、生理反応、化学反応、または物理的变化をもたらすために、細胞または分子レベルを含む、触れる、接触する、または即時または近接させる行為を意味する。

【0048】

治療用途の場合、「有効量」とは、疾患、障害、および／または状態を治療するために有効な量、または言及された効果をもたらすために有効な量を意味する。例えば、有効量は、治療される状態又は症状の進行又は重症度を低減するのに有効な量とすることができる。治療上有効な量の決定は、当業者の能力の範囲内である。有効量」という用語は、例えば、宿主において疾患もしくは障害を治療もしくは予防するために、または疾患もしくは障害の症状を治療するために有効な、本明細書に記載の組成物の量、または本明細書に記載のペプチドの組み合わせの量を含むことを意図している。したがって、「有効量」は、一般に、所望の効果を提供する量を意味する。

【0049】

フィブロインは、カイコの繭（例えば、*Bombyx mori*）に由来するタンパク質である。フィブロインは、分子量約350～400 kDaの重鎖と分子量約24～27 kDaの軽鎖を含み、重鎖と軽鎖はジスルフィド結合によって連結されている。重鎖および軽鎖の一次配列は当技術分野で既知である。フィブロインタンパク質鎖は、親水性のNおよびC末端ドメインと、疎水性／親水性アミノ酸配列の交互ブロックを有し、溶液中で周囲の分子と立体的および静電的相互作用の混合が可能である。低濃度希釈時（1%以下）には、フィブロインタンパク質分子は拡張したタンパク質鎖の形態をとることが知られており、溶液中で直ちに凝集することはない。フィブロインタンパク質は、ヒアルロン酸（HA）、ポリエチレングリコール（PEG）、グリセリン、カルボキシメチルセルロース（CMC）などの水和分子との混和性が高く、高い生体適合性が認められ、酵素作用により体内で自然に統合・分解される。ネイティブフィブロイン（本明細書では先行技術絹フィブロイン（PASF）とも呼ばれる）は、当該技術分野で知られており、例えば、Daithankaret al. (Indian J. Biotechnol. 2005, 4, 115-121)及び国際公開番号WO 2014/145002 (Kluge et.al.)によって記載されてきた。

【0050】

「絹由来タンパク質」（SDP）及び「フィブロイン由来タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に使用される。これらの材料は、熱、圧力、及び高濃度の重塩溶液を含む本明細書に記載されるプロセスによって調製される。したがって、「絹由来」および「フィブロイン由来」は、絹フィブロインタンパク質を構造的に修飾して、本明細書に記載の構造的、化学的および物理的特性を有するタンパク質組成物（SDP）に到達するプロセスの出発物質を指す。SDP組成物は、水溶液中で強化された溶解性および安定性を有する。SDPは、カイコ絹（例えば、*Bombyx mori*）、クモ絹、または遺伝子操作された絹に由来してもよい。

【0051】

本明細書で使用する場合、用語「分子量」及び「平均分子量」は、NuPAGE™ 4%～12%ビストリスタンパク質ゲル(ThermoFisher Scientific, Inc.)とImageJソフトウェア(National Institutes of Health)との組み合わせ分析で行われる標準のドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）電気泳法で決定した重量平均分子量を意味する。ImageJは、サンプル中のある分子量のタンパク質の相対量を決定するために使用される。このソフトウェアは、ゲル上の染色（すなわち、タンパク質の量）を定量的な信号強度に変換することでこれを実現する。次に、このシグナルを分子量既知の生物種を含む標準物質（またはラダー）と比較する。ラダー上の各マーカー間のシグナル量は、シグナル全体で割られる。各タンパク質サブポピュレーション（本明細書ではフラクション（分画）とも呼ばれ、互換的にフラグメントとも呼ばれる）の累積和により、ユーザーは中央値分子量を決定することができ、本明細書では平均分子量と呼ばれる。実際には、電気泳動ゲルを染色した後、グレースケール画像にスキャンし、ImageJを使用してヒストグラムに変換する。各ゲルのレーン内の総ピクセル強度をImageJで定量化し（すなわち、ヒストグラム下の総面積）、その後、ゲル上で染色したタンパク質分子量標準によって区分された集団に分画する。2つの分子量標準の間のヒストグラムピクセル面積をタンパク質の総ヒストグラム面積で割ることにより、これらの分子量に含ま

れる全タンパク質の割合が算出される。他の方法による分析では、SDS-PAGE法では考慮されない特定のペプチドを考慮した異なる値が得られる場合がある。例えば、HPLCを使用して平均分子量を分析することができ、この方法では、SDS-PAGEで決定した値よりも通常約10～30%低い値が得られる（分子量が低下するにつれて差が大きくなる）。

【0052】

発明の実施の形態

本開示は、(a) フィブロイン由来タンパク質組成物であって、フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、及びアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも4%異なり；フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖及びフィブロイン軽鎖間のシステインジスルフィド結合が低減又は排除されたフィブロイン由来タンパク質組成物を含む配合物を提供する。該タンパク質組成物は、ネイティブフィブロインと比較して25%以上低減されたセリン含有量を有し、ここで、セリン含有量は少なくとも約5%であり；そしてフィブロイン由来タンパク質組成物の平均分子量は15～35 kDaであり；そして(b) 緩衝剤、(c) ポリソルベート-80、及び(d) mOsmが170 mOsm/kg～約300 mOsm/kgとなるように1以上の浸透圧剤を含み；ここで配合物はpHが4.5～6.0であり、4℃～40℃での12週間以上の保存期間後、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して、50/mL以下の微粒子数を有する。

【0053】

一部の実施形態では、タンパク質組成物は、46.5%を超えるグリシンアミノ酸を含むか、又はタンパク質組成物は、30.5%を超えるアラニンアミノ酸若しくは31.5%を超えるアラニンアミノ酸を含む。他の実施形態では、タンパク質組成物は、タンパク質組成物が8%未満のセリンアミノ酸を含むように、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%より多く減少したセリン含有量を有する。追加の実施形態において、タンパク質組成物のタンパク質鎖の50%超は、10 kDa～40 kDaの範囲内の分子量を有する。

【0054】

さらなる実施形態では、フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列は、セリン、グリシン、及びアラニン含有量の合計差に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも6%異なり；そしてフィブロイン由来タンパク質の平均分子量は12 kDa～30 kDaである。様々な他の実施形態において、フィブロイン由来タンパク質組成物は、約15 kDa～約35 kDaの平均分子量を有する絹由来タンパク質-4 (SDP-4) であり、配合物のpHは、約5.0～約6.0である。他の実施形態では、pHは5.2～5.8である。

【0055】

様々な実施形態において、配合物の浸透圧は、約170 mOsm/kg～約300 mOsm/kgである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約160 mOsm/kg～約200 mOsm/kg、約175 mOsm/kg～約180 mOsm/kg、約180 mOsm/kg～約200 mOsm/kg、約200 mOsm/kg～約250 mOsm/kg、または約250 mOsm/kg～約300 mOsm/kgである。

【0056】

重量パーセントの表現は、本開示では、%wt./wtとして解釈されるものとする。様々な実施形態、実施形態では、配合物中のSDP-4の重量%は、約0.01%～約15%である。追加の実施形態では、SDP-4のwt%は、約0.1%～約5%、または約0.1%、約1%、もしくは約3%である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、ヒスチジン、酢酸、グルタミン酸、またはそれらの組合せを含む。さらに他の実施形態では、配合物は、約10ミリモル～約50ミリモル、又は約20ミリモル～約40ミリモルの緩衝液濃度を有する。他の実施形態では、配合物中の1つ又は複数の浸透圧剤の各々の濃度は、約30ミリモル～約40ミリモル、又は約35ミリモルである。他の実施形態では、

緩衝剤は、約 0.1 重量%～約 1.0 重量%の酢酸ナトリウム及び約 0.01 重量%～約 0.1 重量%の酢酸を含んでなる。他の実施形態では、緩衝液は、約 0.5 重量%～約 2.0 重量%の酢酸ナトリウムと約 0.05 重量%～約 1.0 重量%の酢酸から構成される。
【0057】

他の実施形態では、浸透圧試薬は、単糖類、無機塩、またはそれらの組合せを含む。追加の実施形態では、浸透圧試薬は、マンニトール、デキストロース、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、またはこれらの組み合わせを含む。他の実施形態では、浸透圧試薬は、約 0.1 重量%～約 2 重量%のブドウ糖および約 0.1 重量%～約 2 重量%の塩化マグネシウムを含んでなる。さらに他の実施形態では、浸透圧試薬は、約 0.01 重量%～約 2 重量%のデキストロースおよび約 0.01 重量%～約 2 重量%の塩化マグネシウムを含む。さらなる実施形態において、ポリソルベート-80 の重量%は、約 0.02 %～約 2 %である。他の実施形態では、ポリソルベート-80 の重量%は約 0.01 %～約 2 %である。追加の実施形態では、配合物は、ガラスまたはポリエチレンを含む容器に保存される。様々な実施形態において、容器は、タイプ I のホウケイ酸ガラスである。追加の実施形態では、容器は、低密度ポリエチレン容器であり得る。配合物は、低密度ポリエチレン容器内で 6 ヶ月以上安定であることが示されている。

【0058】

他の実施形態では、貯蔵期間又は貯蔵寿命は、製造日から約 4 ヶ月～約 8 ヶ月、約 8 ヶ月～約 12 ヶ月、約 1 年～約 2 年、又は 2 年以上である。様々な実施形態において、保存後の微粒子数は、約 200 /mL、約 150 /mL、約 100 /mL、約 75 /mL、約 45 /mL、約 35 /mL、約 25 /mL、約 20 /mL、約 15 /mL、約 10 /mL、約 5 /mL、又は約 1 /mL である。さらに他の実施形態では、保存温度は、約 10 °C～約 30 °C、又は約 15 °C～約 25 °C である。

【0059】

本開示はまた、約 0.1 重量%～約 3 重量%を含む水性配合物を提供する。ここで、SDP-4 の一次アミノ酸配列は、セリン、グリシン、およびアラニンのアミノ酸含量の合計差の絶対値に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも 6 %異なり；SDP-4 のフィブロイン重タンパク質鎖およびフィブロイン軽タンパク質鎖間のシステインジスルフィド結合は減少または消失し；SDP-4 は 46 %を超えるグリシンアミノ酸および 30 %を超えるアラニンアミノ酸から構成され；この SDP-4 はネイティブフィブロインのアミノ酸の 46 %を超える含有量を有する。SDP-4 は、8 %未満のセリンアミノ酸を含むように、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して 40 %以上減少したセリン含量を有し；そして SDP-4 の平均分子量は約 15 kDa～約 35 kDa であり；そしてポリソルベート-80、約 10 ミリモル～約 50 ミリモルの酢酸塩緩衝液、浸透剤を含み；ここで配合物は pH 5.2～5.8 の値を有する；そして浸透剤を有する；この配合物では、SFP-4 が 5.2～5.8 であり、175 mOsm/kg～185 mOsm/kg の浸透圧、および 10 マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して 4 °C～40 °C での 12 週間を超える貯蔵期間の後に 50 mL 以下の微粒子カウントを有することを特徴とする。

【0060】

好ましい一実施形態では、配合物は、フィブロイン由来タンパク質組成物から本質的になってもよく、フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列は、セリン、グリシン、及びアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも 4 %異なり、フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖及びフィブロイン軽鎖間のシステイン二硫化結合は低減又は除去され、該タンパク質組成物は、ネイティブフィブロインと比較して 25 %以上低減されたセリン含有量を有し、該セリン含有量は少なくとも約 5 %であり、フィブロイン由来タンパク質組成物の平均分子量は 35 kDa 未満かつ 15 kDa より大きく、緩衝剤、ポリソルベート-80、および 1 つ以上の浸透圧剤を含み、ここで該配合物の pH は 4.5～6.0 であり、10 µm 以上の直径を有する微粒子に関して、4 °C～40 °C で 12 週間を超える保存期間の後、50

／mL以下の微粒子数を有することを特徴とする。

【0061】

別の好ましい実施形態では、配合物は、約0.1重量%～約3重量%のSDP-4から本質的になることができる。ここで、フィブロイン由来タンパク質の一次アミノ酸配列は、セリン、グリシン、及びアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも6%異なり、フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖及びフィブロイン軽タンパク質鎖間のシステインジスルフィド結合は減少又は消失し、フィブロイン由来タンパク質は46%を超えるグリシンアミノ酸及び30%を超えるアラニンアミノ酸を含み、フィブロイン由来タンパク質は、フィブロイン由来タンパク質が8%未満のセリンアミノ酸を含むように、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%以上減少したセリン含有量を有し、SDP-4の平均分子量は約15kDa～約35kDaであり、ポリソルベート-80、約10ミリモル～約50ミリモルの酢酸塩緩衝剤、浸透圧剤を含み、配合物はpHが5.2～5.8、175mOsm/kg～185mOsm/kgの浸透圧、および10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して4℃～40℃での12週間を超える貯蔵期間の後に50mL以下の微粒子カウントを有することを特徴とする。

10

【0062】

様々な実施形態において、酢酸塩緩衝液は、約0.2重量%～約0.3重量%の酢酸ナトリウム及び約0.01重量%～約0.03重量%の酢酸から構成される。いくつかの実施形態では、浸透圧剤は、約0.6重量%～約0.9重量%のブドウ糖と約0.6重量%～約0.9重量%の塩化マグネシウムとを含む。追加の実施形態では、ポリソルベート-80の重量%は、約0.05%～約0.1%である。

20

【0063】

様々な実施形態において、配合物は、フィブロイン由来タンパク質（例えば、SDP-4）を、約0.1%w/wの最終濃度で存在し、約0.25%w/wの最終濃度で存在する酢酸ナトリウム、約0.01%w/wの最終濃度での氷酢酸、約0.8%w/wの最終濃度で存在する塩化マグネシウム、約0.8%w/wの最終濃度でのデキストロース及び約0.05%w/wの最終濃度でのポリソルベート-80で存在するような本明細書に調製したようなものである。

【0064】

種々の実施形態において、配合物は、フィブロイン由来タンパク質（例えば、約1%w/wの最終濃度で存在する本明細書で調製されるようなSDP-4）、約0.25%w/wの最終濃度で存在する酢酸ナトリウム、約0.01%w/wの最終濃度の氷酢酸、約0.75%w/wの最終濃度で存在する塩化マグネシウム、約0.75%w/wの最終濃度で存在するデキストロース及び約0.05%w/wの最終濃度で存在するポリソルベート-80であってよい。

30

【0065】

一部の実施形態では、配合物は、フィブロイン由来タンパク質（例えば、約3%w/wの最終濃度で存在する本明細書で調製されるSDP-4）、約0.25%w/wの最終濃度で存在する酢酸ナトリウム、約0.01%w/wの最終濃度の氷酢酸、約0.65%w/wの最終濃度で存在する塩化マグネシウム、約0.65%w/wの最終濃度で存在するデキストロース、および約0.05%w/wの最終濃度で存在するポリソルベート-80を含み得る。

40

【0066】

さらに、本開示は、眼科疾患を有する対象に、上記に開示される配合物の有効量を投与し、それによって眼科疾患を治療することを含む、眼科疾患を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、眼科疾患はドライアイ症候群である。

【0067】

本明細書に記載される配合物は、目に関連する状態の効果的な治療及び／又は症状の軽減を提供する。これらの結果は、少なくとも部分的には、一般的な技術が、当業者が本発

50

明者らの配合物において使用される成分の特定の組合せを選択することを思いとどまらせるため、驚くべきものである。例えば、Wang et al., Dual Effects of Tween 80 on Protein Stability., Int J Pharm. 2008 Jan 22;347(1-2):31-8 は、モデルタンパク質 IL-2 の安定性および凝集に対する Tween-80 の効果の研究に向けられたものであり、「0.1%の Tween 80 の添加は、貯蔵中の IL-2 ムテイン凝集の速度を有意に増加させた」(Wang、要旨、ページ 31) ことを開示している。しかし、本発明者らは、界面活性剤としてのポリソルベート(例えば、ポリソルベート 80)を配合物に使用することにより、溶液中のタンパク質の凝集を有意に抑制することを見出した。

【0068】

さらに、本発明者らの配合物は、予想外に、一般的な技術と矛盾する特性を示す。Katakam et al., Effects of Surfactants on the Physical Stability of Recombinant Human Growth Hormone. J Pharm Sci. 1995 Jun;84(6):713-6 (組換えヒト成長ホルモンの物理的安定性に関する界面活性剤の効果)は、空気/水界面および非等温ストレスへの曝露に伴うヒト成長ホルモンの物理的安定性に対する特定の界面活性剤(例えば、BR IJ 35、TWEEN-80、Pluronic F68)の効果に関するものである。Katakam は、TWEEN-80 (すなわち、ポリソルベート 80) が熱ストレスから hGH を保護しなかったことを開示している:「(攪拌による)界面変性に関して hGH を安定化させる濃度の界面活性剤は、熱ストレスに対していかなる保護も与えなかった」。(Katakam, page 716, 2nd full para.)。これに対し、本発明者らは、TWEEN-80 (ポリソルベート 80) を使用すると、溶液中のタンパク質が熱ストレスから保護されることを見いだした。

【0069】

Kreilgaard et al., Effect of Tween 20 on Freeze-Thawing- and Agitation-induced Aggregation of Recombinant Human Factor XIII., J Pharm Sci. 1998 Dec;87(12):1597-603 は、ポリソルベート 20 (すなわち Tween 20) の組換えヒト因子 XIII (rFXIII) の冷凍融解誘導凝集に対する効果を検討することに向けられたものである。Kreilgaard は、「これらの観察は、Tween 20 が、主にストレス誘導性の可溶性凝集体と界面について競合し、その後の不溶性凝集体への移行を阻害することによって rFXIII [タンパク質] を安定化することを示唆している」(Kreilgaard, page 1602, last full para.) と開示している。さらに、Bam et al., Tween Protects Recombinant Human Growth Hormone against Agitation-Induced Damage via Hydrophobic Interactions., J Pharm Sci. 1998 Dec;87(12):1554-9 は、「界面活性剤がない場合、組換えヒト成長ホルモンは、攪拌中に急速に不溶性の凝集体を形成する」と開示している。非イオン性界面活性剤 TWEEN-20 は、界面活性剤:タンパク質モル比 > 4 で存在するとき、この凝集を効果的に阻害する (Bam, Abstract) とある。これらの研究は、本発明者らが見出した結果—ポリソルベート 20 (TWEEN-20) の使用は、実際に溶液中のタンパク質を不安定にし、凝集の増加および不溶性微粒子の形成につながる—とは真逆の結果を提示している。

【0070】

さらに、一般的な技術では、グリセロールなどのオスモライト/ポリオールを使用して、溶液中のタンパク質の凝集を防止することが教示されている。例えば、Vagenende et al., Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol., Biocemistry 2009 Nov 24;48(46):11084-96 は、「グリセロールがタンパク質の非折りたたみを阻害し、グリセロールの両親媒性界面の方向性を好む疎水性表面領域との優先相互作用により凝集しやすい部分非折りたたみ中間体を安定化することによってタンパク質凝集を防ぐ」(Vagenende, page 11094, 4th full para) ことを開示している。同様に、Feng et al., Effects of glycerol on the compaction and stability of the wild type and mutated rabbit muscle creatine kinase., Proteins 2008 May 1;71(2):844-54 は、リフォルディング緩衝液中のグリセロールの存在下で、「両タンパク質の凝集は同様に挙動した:グリセロール濃度の増加とともに減少し、30%グリセロールで完全に阻害された」ことを開示している (Feng, page 850, first

paragraph)。 (Prieve et al., Glycerol decreases the Volume and Compressibility of Protein Interior., Biochemistry 1996, 35, 2061-2066によれば、「我々は、グリセロールがいわゆる『潤滑』水の放出を誘発し、それがポリペプチド鎖の隣接セグメントを離すことによってコンフォメーションの柔軟性を維持する（したがって、タンパク質の安定性を高める）」 (Prieve, Abstract)) ; Gekko et al., Mechanism of Protein Stabilization: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures., Biochemistry 1981, 20, 4667-4676によると、「水-グリセロール溶媒系におけるタンパク質と溶媒成分との優先的相互作用の現在の測定では、調べた6つのタンパク質のうち、すべてがこの溶媒系で優先的に水和されることが示された・・・したがって、この状況を他のタンパク質について一般化することは妥当であると思われる」と教えている。さらに、タンパク質のコンフォメーションがグリセロールの存在によって安定化されることは、長い間経験的に知られていた(Gekko, page 4674, 2nd full para.); Sedgwick et al., Protein Phase Behavior and Crystallization: Effect of Glycerol., J. Chem. Phys. 2007 Sep 28;127(12):125102によると、「一定のタンパク質濃度では、タンパク質の結晶化に必要な塩の量が増加し、グリセロール濃度が増加すると結晶化にかかる時間が徐々に長くなることがわかった」そうである。(Sedgwick, page 6, 3rd full para))。驚くべきことに、本発明者らは、配合物にグリセロールを使用すると、タンパク質の凝集と不溶性微粒子の形成が大きく促進されることを見出した。

【0071】

さらに、Chen et al., Influence of Histidine on the Stability and Physical Properties of a Fully Human Antibody in Aqueous and Solid Forms., Pharm Res. 2003 Dec;20(12): 1952-60は、タンパク質凝集を防止するためのヒシジン使用の有用性を開示している：「バルク溶液中のヒスチジン濃度を増加させると、凍結乾燥および保存時に高分子量（HMW）種および凝集体の増加が抑制されることがわかった。さらに、ヒスチジンのバルクは、凝集体のレベルの低さによって証明されるように、凍結および熱ストレス条件下での抗体の溶液安定性を向上させた」（と述べている(Chen, Abstract))。さらに、Shiraki et al., Amino Acid Esters Prevent Thermal Inactivation and Aggregation of Lysozyme, Biotechnol Prog. 2005 21: 640-643は、タンパク質の熱による不活性化の防止におけるアミノ酸エステルの有利な使用を教示している：「アミノ酸エステル（AAEs）は、鶏卵リゾチームの熱による凝集および不活性化を防止する」。リゾチームは、50mM Na-phosphate緩衝剤（pH 6.5）中の0.2mg/mLリゾチームを含む溶液で98℃、30分の熱処理で完全に失活した（元の活性が1%未満）」。（白木、要旨）。これらの研究とは対照的に、本発明者らは、低濃度のアミノ酸エステル（アルギニン）はタンパク質の凝集を防止せず、高濃度のアミノ酸エステルの使用は配合物のゲル化につながることを見出した。また、ヒスチジンは溶液中のタンパク質の安定性を高めるが、ヒスチジンによる眼への刺激性があるため、眼科用配合物には適さないことがわかった。

【0072】

配合物と緩衝剤及びイオンの使用に関して、一般的な技術は、溶液中のタンパク質を安定化するためにカルシウムイオンを使用することの利点を教えている。例えば、Saboory et al., Effects of calcium binding on the structure and stability of human growth hormone., Int J Biol Macromol. 2005 Sep 28;36(5):305-9は、「カルシウムイオン結合は、 α ヘリックス含有量の増加、ならびに β およびランダムコイル構造の両方の減少によって、タンパク質の熱安定性を増加させる」ことを開示している (Saboory, Abstract)。さらに、Pikal-Cleland et al., Effect of glycine on pH changes and protein stability during freeze-thawing in phosphate buffer systems., J Pharm Sci. 2002 Sep;91(9):1969-79は、グリシンを使用して、タンパク質不安定性の基礎となる溶液凍結中の離散pHミクロ環境形成を最小限にする利点について教示している：「リン酸ナトリウム緩衝液中に高濃度（>100mM）のグリシンが存在すると、平衡値（pH 3.6）に近い凍結pH値によって示されるように、二ナトリウム塩のより完全

な結晶化がもたらされた」(Pikal-Cleland, Abstract)。しかし、本発明者らは、カルシウムイオンの使用が溶液中のタンパク質の溶解度にマイナスの影響を与える一方、グリシンの使用はタンパク質の安定性に明確な影響を与えないことを見いだした。

【0073】

一般的な技術の教示を考慮すると、当業者であれば、出願人が選択した成分の組合せを含む配合物を追求する動機はないだろうし、当業者であれば、配合物が眼関連症状、特にドライアイ病の治療に有効であるという成功を合理的に期待して配合物及び関連機能を製造することはできないだろう。

【0074】

S D P 組成物の調製

眼科用配合物に用いられるタンパク質組成物は、米国特許第9,394,355号(Lawrence et al.)及び米国特許公開第2019/0169243号(Lawrence et al.)に記載されているように調製することができる。S D Pは、Bombyx moriカイコフィブロインまたはBombyx属の他のフィブロインまたは他の絹タンパク質に由来し得る。

【0075】

S D P材料は、以下の工程で調製することができる。

1. 絹繭は、蛹の材料を取り除き、温水で予洗いして準備する。
2. 繭をアルカリ性pHで、通常95℃以上の高水温で水洗することにより、ガム状のセリシントタンパク質からフィブロインタンパク質の原繊維を抽出することができる。
3. 抽出したフィブロイン繊維を乾燥させた後、βシート間の水素結合を中和する溶媒系を用いて溶解する。この中和ステップには、20%w/v絹フィブロインタンパク質の54%LiBr水溶液が有効である。
4. LiBr溶液に溶解したフィブロインタンパク質を、オートクレーブ環境(〜121℃[〜250°F]、圧力〜15〜17PSI、温度約30分)で処理する。
5. 加熱処理されたフィブロインタンパク質とLiBr溶液を透析し、溶液中のリチウムイオンと臭化物イオンを除去する。この時点で、材料は化学的にS D Pに変化している。
6. 透析されたS D Pは、非溶解性の凝集体や汚染されたバイオバーデンを除去するために濾過される。

【0076】

S D P溶液は、現在の絹フィブロイン溶液の製造に用いられるプロセスとは明らかに異なるプロセスを用いて製造される。注目すべきは、絹フィブロインタンパク質をLiBr溶液中でオートクレーブ処理すると(LiBrを除去した後ではない)、安定化S D P材料を生成する化学遷移が開始される点である。フィブロインタンパク質はLiBr溶液に溶解し、可溶化したネイティブフィブロインタンパク質の水素結合と静電相互作用が中和される。このような条件下では、タンパク質は溶液中で特定の二次構造を確認することができない。その結果、フィブロインタンパク質鎖内の共有結合を加水分解するのに必要な熱力学的エネルギーが最も低くなり、デヒドロアラニン構造形成後の加水分解切断と確認変化が容易になる。

【0077】

S D P調製条件は、オートクレーブで15〜17PSIで30分間、121℃に設定された温度を含む。しかしながら、様々な実施形態において、処理条件は、様々な程度にS D P材料を安定化させるために変更され得る。塩化カルシウム及びチオシアン酸ナトリウムなどの他の又は追加のハロゲン化物塩、尿素、塩酸グアニジン及び1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノールなどの有機薬剤、硝酸カルシウム及び塩化1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムなどの追加の強イオン液体溶液添加剤又はそれらの組み合わせを含む追加のタンパク質可溶化剤がプロセスにおいて使用され得る。

【0078】

S D P 組成物

本明細書に記載のS D P組成物は、絹フィブロインに由来し、水溶液における強化された溶解度及び安定性を有することができる。本組成物は、炎症を治療及び軽減するために

10

20

30

40

50

使用することができる。一実施形態では、SDP及び／又はその画分は、セリン、グリシン、及びアラニンの複合アミノ酸含有量に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも4%（差の絶対値の総和を介して）異なる一次アミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、SDPの複数のタンパク質断片は、アミド（ $-C(=O)NH_2$ ）基で終端することができる。SDPは、ネイティブフィブロインと比較して40%以上低減されたセリン含有量を有し得、ここで、セリン含有量は少なくとも約質鎖とフィブロイン軽タンパク質鎖との間のシステインジスルフィド結合は、低減または除去され得る。特定の実施形態において、タンパク質断片の少なくとも75%は、約60kDa未満の分子量を有する。組成物は、8.5%未満のセリンアミノ酸残基を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、SDPの平均分子量は55kDa未満である。SDP組成物は、水溶液中で強化された安定性を有する。

10

【0079】

いくつかの態様において、SDPタンパク質組成物は、水性フィブロイン溶液を昇圧で加熱することを含むプロセスによって調製される。水性フィブロイン溶5%である。フィブロインのフィブロイン重タンパク

液は、少なくとも8Mの濃度で臭化リチウムを含む。水性フィブロイン溶液は、少なくとも約10PSIの圧力下で少なくとも約105℃（221°F）まで少なくとも約20分間加熱され、タンパク質組成物を提供する。これらの処理条件の結果、タンパク質組成物のポリペプチドは、8.5%未満のセリンアミノ酸残基を含み、複数のタンパク質断片はアミド（ $C(=O)NH_2$ ）基で終端している。

20

【0080】

いくつかの態様において、SDP組成物は、水性フィブロイン溶液を高圧で加熱することを含むプロセスによって調製され、水性フィブロイン溶液は9~10Mの濃度で臭化リチウムを含み、水性フィブロイン溶液は約15PSI~約20PSIの圧力下で少なくとも約20分間、約115℃（239°F）~約125℃（257°F）の範囲の温度まで加熱し；タンパク質組成物を提供する。タンパク質組成物は、6.5%未満のセリンアミノ酸残基を含むことができる。

【0081】

いくつかの態様において、調製方法は、約8.0M~約11Mの間の濃度を有する臭化リチウムを使用することができる。いくつかの実施形態において、臭化リチウムの濃度は、約9M~約10M、又は約9.5M~約10Mである。

30

【0082】

一部の実施形態では、臭化リチウムを含むフィブロイン水溶液は、少なくとも約107℃（225°F）、少なくとも約110℃（230°F）、少なくとも約113℃（235°F）、少なくとも約115℃（239°F）、又は少なくとも約120℃（248°F）に加熱される。

【0083】

いくつかの実施形態では、臭化リチウムを含む水性フィブロイン溶液は、少なくとも約12PSI、少なくとも約14PSI、少なくとも約15PSI、又は少なくとも約16PSI、最大約18PSI、又は最大約20PSIの圧力下で加熱される。

40

【0084】

いくつかの実施形態では、臭化リチウムを含む水性フィブロイン溶液は、少なくとも約20分、少なくとも約30分、少なくとも約45分、又は少なくとも約1時間、最大で数時間（例えば、12~24時間）加熱される。

【0085】

SDP組成物は、調製プロセスの結果として、アミノ酸含量の変化及び末端アミド基の形成をもたらし、ネイティブの絹フィブロインタンパク質と化学的に区別される。得られたSDPは、水溶液中での溶解性及び安定性が向上している。SDPは、本明細書に記載のタンパク質組成物を用いて、例えば、眼科用配合物を形成するための方法、例えば、タンパク質組成物の水溶液において使用することができる。この溶液は、約0.01%~約

50

35%w/vのSDPを含むことができる。溶液は、約65%～約99.9%w/vの水とすることができる。

【0086】

いくつかの実施形態では、SDPは、タンパク質の平均分子量が、先行技術の方法を使用して製造された絹フィブロインの約100～200kDaから、本明細書に記載のSDP材料の約35～90kDa、又は約40～50kDaに減少するように、フィブロインタンパク質の加水分解、アミノ酸分解又はそれらの組み合わせを誘発する工程を用いて調製される。得られるポリペプチドは、本明細書に記載される範囲に平均化された様々な分子量のペプチドのランダムな詰め合わせであり得る。

【0087】

さらに、システイン含有量を標準的なアッセイ手順で検出できないレベルまで減少させることによって、アミノ酸化学を変化させることができる。例えば、セリン含有量は、ネイティブフィブロインに見られるレベルから50%以上減少させることができ、これは、標準的なアッセイ手順によって決定されるように、全体のアラニン及びグリシン含有量を5%（相対的アミノ酸含有量）増加させる結果となり得る。SDP材料は、約8%未満の相対アミノ酸含有量のセリン含有量、又は約6%未満の相対アミノ酸含有量のセリンアミノ酸含有量を有することができる。SDP材料は、約46.5%を超えるグリシン含有量、及び／又は約30%を超えるアラニン含有量、又は約30.5%を超えるアラニン含有量を有することができる。SDP材料は、例えば、タンパク質組成物の加水分解ポリペプチドのHPLC分析によって決定されるような、検出可能なシステイン含有量を有しないことができる。SDP材料は、例えば、FTIR分析によって決定されるように、ネイティブの絹フィブロインタンパク質と比較して、90%少ない、95%少ない、又は98%少ないβシート二次タンパク質構造を形成することができる。

【0088】

SDP組成物は、水溶液中で強化された安定性を有し、ここで：SDP組成物の一次アミノ酸配列は、セリン、グリシン、及びアラニン含有量の合計（絶対値）の差（SDP対PASF）に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも4%異なり；フィブロイン重タンパク質鎖とフィブロイン軽鎖の間のシステインジスルフィド結合は低減又は排除され、組成物はネイティブフィブロインタンパク質と比較して25%を超えて減少したセリン含有量を有している。SDP組成物の平均分子量は、透析膜のMWCOおよびSDS-PAGE分析によって決定されるように、60kDa未満、約35kDaより大きい、または約40kDaより大きいものとすることができる。

【0089】

いくつかの態様において、SDP組成物は、セリン、グリシン及びアラニン含有量の合計差に関して少なくとも6%ネイティブフィブロインと異なる一次アミノ酸配列を有し；フィブロイン重タンパク質鎖及びフィブロイン軽タンパク質鎖間のシステインジスルフィド結合は減少又は消失し；組成物はネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%以上減少したセリン含有量を有する。SDP組成物の平均分子量は、透析膜のMWCOおよびSDS-PAGE分析によって決定されるように、約55kDa未満および約35kDaより大きくすることができる。

【0090】

いくつかの態様において、SDP組成物は、ネイティブな絹フィブロインから改変された一次アミノ酸配列を有し；フィブロイン重タンパク質鎖とフィブロイン軽鎖との間のシステインジスルフィド結合は低減又は除去され；SDP組成物の平均分子量は約60kDa未満で約35kDaより大きく；及びSDP組成物の5%w/w水溶液は5秒間超音波処理後少なくとも2時間550nmにおける光学吸光度が0.25未満に維持されている。

【0091】

いくつかの態様において、SDP組成物は、水溶液中で高められた安定性を有し、ここで：SDP組成物の一次アミノ酸配列は、セリン、グリシン及びアラニン含有量の合計（絶対値）の差に関して少なくとも5%ネイティブフィブロインと異なるようにネイティブ

10

20

30

40

50

シルクフィブロインから改変されている。いくつかの実施形態では、その差は、ネイティブフィブロインと比較して少なくとも6%、8%、10%、12%、または14%である。フィブロイン重タンパク質鎖とフィブロイン軽タンパク質鎖との間のシステインジスルフィド結合が低減または除去され；SDP組成物の平均分子量が約60 kDa未満、約35 kDaより大きく；SDP組成物が5秒間の超音波処理後少なくとも2時間、550 nmにおける吸光度が0.2未満に維持されている。

【0092】

SDP組成物は、例えば、透析及び／又は濾過により、乾燥粉末又はフィルムとして単離及び／又は精製することができる。あるいは、SDP組成物は、安定な水溶液として単離及び／又は精製することができ、これは、本明細書に記載の眼科用配合物などの治療用配合物として使用するために改変することができる。

10

【0093】

様々な実施形態において、SDPのアミノ酸組成は、セリン、グリシン、およびアラニンを合わせた含有量に関して、ネイティブフィブロインのアミノ酸組成と少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも5%、または少なくとも5.5%、または少なくとも6%異なることができる。

【0094】

いくつかの態様において、本明細書に記載のSDP組成物は、ネイティブフィブロインタンパク質のセリン含有量と比較して、25%より多く、30%より多く、35%より多く、40%より多く、又は45%より多く減少したセリン含有量を有している。

20

【0095】

SDP組成物の平均分子量は、約80 kDa未満、約70 kDa未満、約60 kDa未満、又は約55 kDa未満とすることができ、又は組成物は、約50～60 kDa、又は約51～55 kDaの平均分子量を有する。様々な実施形態において、SDP組成物の平均分子量は、35 kDaより大きく、約40 kDaより大きく、または約50 kDaより大きくすることができる。したがって、SDP組成物の（重量平均）平均分子量は、約36 kDa～約80 kDa、約36 kDa～約65 kDa、約36 kDa～約60 kDa、または約40 kDa～約55 kDaであり得る。様々な実施形態において、SDP組成物の平均分子量は、約45 kDa～約65 kDa、約45 kDa～約60 kDa、約50 kDa～約65 kDa、又は約50 kDa～約60 kDaである。

30

【0096】

SDP組成物は、眼球検査で観察可能な沈殿を生じることなく、40% w/wで水に可溶であることができる。

【0097】

いくつかの実施形態では、SDP組成物は、8%未満のセリンアミノ酸残基を含んでなる。いくつかの実施態様では、タンパク質組成物は、7.5%未満のセリンアミノ酸残基、7%未満のセリンアミノ酸残基、6.5%未満のセリンアミノ酸残基、又は6%未満のセリンアミノ酸残基を含む。ペプチド組成物のセリン含量は、一般に、少なくとも約4%、または少なくとも約5%、または約4～5%である。

【0098】

いくつかの実施形態では、SDP組成物は、タンパク質組成物の全アミノ酸含量に対して、46.5%より大きいグリシンアミノ酸を含んでなる。いくつかの態様において、タンパク質組成物は、47%より大きいグリシンアミノ酸、47.5%より大きいグリシンアミノ酸、又は48%より大きいグリシンアミノ酸を含む。

40

【0099】

いくつかの実施形態では、SDP組成物は、タンパク質組成物の全アミノ酸含量に対して、30%より大きいアラニンアミノ酸を含んでなる。いくつかの態様において、タンパク質組成物は、30.5%より大きいアラニン、31%より大きいアラニン、又は31.5%より大きいアラニンを含む。

【0100】

50

いくつかの実施形態では、SDP組成物は、薄膜に乾燥させた後、完全に再溶解することができる。様々な実施形態において、タンパク質組成物は、水溶液中でベータシートタンパク質構造を欠くことができる。タンパク質組成物は、少なくとも5秒間の超音波処理後、550nmで0.25未満の水溶液中の光学吸光度を維持することができる。

【0101】

いくつかの実施形態では、SDPタンパク質組成物は、水と併用することができる。いくつかの実施形態では、タンパク質組成物は、10%w/wの濃度、又は15%w/w、20%w/w、25%w/w、30%w/w、35%w/w、若しくは40%w/wなどの更に高い濃度で水に完全に溶解することができる。いくつかの実施形態では、タンパク質組成物は、例えば、透析、濾過、またはそれらの組み合わせによって、単離および精製することができる。

10

【0102】

様々な実施形態において、SDP組成物は、例えば、タンパク質組成物及び眼科用配合物成分を含む水溶液の拡がりを、タンパク質組成物を含まない対応する組成物の拡がりと比較して向上させることができる。この強化された拡がりは、水溶液の表面積の2倍以上、又は3倍以上の増加をもたらすことができる。

【0103】

様々な実施形態において、SDP組成物は、水中で20%w/vまで、30%w/vまで、又は40%w/vまでの濃度でゲルを形成しない。いくつかの実施形態では、SDP組成物は、SDP組成物のアミノ酸の少なくとも約47.5%を構成するアミノ酸のグリシン-アラニン-グリシン-アラニン(GAGA)(SEQ ID NO:1)セグメントを有することができる。場合によっては、SDP組成物は、タンパク質組成物のアミノ酸の少なくとも約48%、少なくとも約48.5%、少なくとも約49%、少なくとも約49.5%、または少なくとも約50%を構成するアミノ酸のGAGA(SEQ ID NO:1)セグメントも有し得る。

20

【0104】

様々な実施形態において、SDP組成物は、SDP組成物のアミノ酸の少なくとも約59%を構成するアミノ酸のグリシン-アラニン(GA)セグメントを有することができる。場合によっては、SDP組成物は、タンパク質組成物のアミノ酸の少なくとも約59.5%、少なくとも約60%、少なくとも約60.5%、少なくとも約61%、または少なくとも約61.5%を構成するアミノ酸のGAセグメントも有し得る。典型的な実施形態では、フィブロインは、セリシンから分離されている。様々な実施形態において、SDP組成物は、乾燥後に薄膜として再溶解し、これはネイティブフィブロインには見られない特性である。

30

【0105】

具体的な一実施形態において、本発明は、水性フィブロイン溶液を高圧で加熱することを含むプロセスによって調製されるSDP組成物を提供し、水性フィブロイン溶液は9~10Mの濃度の臭化リチウムを含み、水性フィブロイン溶液は約15PSI~約20PSIの圧力下で少なくとも約30分間、約115°C(239°F)~約125°C(257°F)の範囲の温度へ加熱される、。を提供することであり、ここで、該タンパク質組成物は、6.5%未満のセリンアミノ酸残基を含んでいる。5%のセリンアミノ酸残基を含む。タンパク質組成物は、水中の15%w/w溶液として、10cP未満の水性粘度を有する。

40

【0106】

安定性の評価タンパク質溶液の安定性は、多くの異なる方法で評価することができる。一つの好適な評価は、Lawrence Stability Test(米国特許第9,394,355号(Lawrence et al.))である。別の好適な評価は、タンパク質溶液に超音波処理を施し、その後、光学的透明性の継続(および凝集、βシート形成、および/またはゲル化の欠如)を確認するための吸光分析を行うことである。SDP溶液の安定性を試験するために、標準的な超音波処理、またはその代わりに超音波処理(音の周波数は20kHz超)を使用す

50

ることができる。SDPの溶液は、超音波処理に供した後、安定である。SDP組成物は、5秒間の超音波処理後、少なくとも2時間、0.25未満の550nmにおける光学吸光度を維持する。例えば、タンパク質組成物の5%w/w溶液は、本明細書に記載の超音波処理に用いられる標準条件である〜20kHzでの5秒間の超音波処理の後、550nmで0.1未満の光学吸光度を維持する。様々な実施形態において、SDP組成物水溶液は、最大10%w/wの濃度で超音波処理時にゲル化しない。さらなる実施形態において、SDP組成物水溶液は、最大15%w/w、最大20%w/w、最大25%w/w、最大30%w/w、最大35%w/w、または最大40%w/wの濃度での超音波処理時にゲル化しない。

【0107】

低粘性SDPは、その調製プロセスおよびその結果生じるペプチド鎖の化学構造の変化の結果として、ネイティブシルクフィブロイン(PASF)よりも低い粘度を有する。水中の5%w/w溶液(25.6℃)として、ネイティブシルクフィブロインの粘度は約5.8cPであるが、同じ条件下で、SDPは約1.8cP、SDP-4は約2.7cP(例えば、2.6-2.8cP)の粘度である。SDPは、高濃度でもPASFと比較して低い粘度を維持する。SDP組成物は、水中の10%w/w溶液として、5cP未満、又は4cP未満の水性粘度を有することができる。様々な実施形態において、SDPは、少なくとも9.8cPの粘度まで溶液のままである。SDPはまた、水中での15%w/w溶液として10cP未満の水性粘度を有する。SDPはまた、水中の24%w/w溶液として10cP未満の水性粘度を有し得る。

【0108】

本明細書に記載のプロセスは、サンプルが、NuPAGE™ 4%~12%Bis-Trisタンパク質ゲル(ThermoFisher Scientific, Inc.)で行われる標準的なドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)電気泳動方法を用いて実行する場合にも、フィブロイン軽鎖タンパク質が処理後に識別可能ではないタンパク質組成物を提供する。さらに、先行技術の方法を用いて製造された絹フィブロイン溶液は、かなりの量のβシート二次構造を形成するが、得られたSDP材料は、βシートタンパク質二次構造を最小から全く形成しない後処理を行うことが可能である。一実施形態では、SDP材料は、40~60%w/v臭化リチウム(LiBr)溶液の存在下で、オートクレーブまたはオートクレーブ様条件(すなわち、約120℃および14~18PSI)下で絹フィブロイン繊維を処理することによって調製することができる。

【0109】

SNP組成分

Silk Technologies, Ltd.は、炎症を抑え、創傷治癒プロセスを強化するために、眼科製品の配合物に容易に組み込むことができる絹由来タンパク質(SDP)製品を開発した。このSDPは、抗炎症作用と創傷治癒作用を高めるために、分子量に基づいてより小さなタンパク質画分または亜集団に分離することができる。画分または断片とも呼ばれるSDPタンパク質亜集団は、任意の適切かつ有効な方法、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーまたは膜透析によって分離することができる。例えば、画分は、減少する平均分子量に基づいて、2~4つの異なるグループに分離することができる。例6は、全体的なアミノ酸含有量及び末端アミド含有量は同じであるが、平均分子量が異なる4つの異なる画分を調製するための1つの方法を説明する。異なるフラクションの細胞への取り込みが異なる結果、異なる生物学的特性、例えば、体内および様々な組織における炎症を抑えるための特性も有することが、意外にも発見された。

【0110】

SDPの低平均分子量画分は、炎症を抑え、ドライアイを治療する。また、ドライアイ疾患、及び/又は角膜の傷を含む傷害などの眼の状態を治療するための組成物も記載されるが、これらに限定されない。治療法は、SDP、又は低分子量SDP亜集団(SDP-4)を含む配合物の投与を含むことができる。特定の実施形態では、本発明は、低分子量SDP(例えば、SDP-4)を含む組成物を、それを必要とする対象に投与することを

10

20

30

40

50

含む、疾患状態及び／又は創傷を治療するための方法を提供する。

【0111】

SDP-4は、セリン、グリシン、およびアラニンの複合アミノ酸含量に関して、ネイティブフィブリンと少なくとも4%異なる一次アミノ酸配列（絶対値差の総和を介して）を有する、SDPタンパク質の亜集団である。複数のタンパク質断片は、アミド（-C（=O）NH₂）基で終端することができる。SDP-4組成物は、ネイティブフィブリンと比較して40%以上低減されたセリン含有量を有し、ここで、セリン含有量は少なくとも約5%である。フィブリンのフィブリン重タンパク質鎖とフィブリン軽タンパク質鎖との間のシステインジスルフィド結合は、低減または除去されてもよい。いくつかの実施形態では、タンパク質断片の少なくとも75%が、約100kDa未満の分子量を有する。このような組成物は、炎症を抑え、組織における細胞の移動及び／又は増殖を促進し、疾患状態を治療し、及び／又は創傷の閉鎖を促進する。SDP組成物は、水溶液中で強化された溶解度および安定性を有する。

10

【0112】

SDP組成物画分は、約15kDa～60kDaの間の平均分子量を有することができる。一実施形態では、約15～35kDaの平均分子量を有する低分子量画分が単離され、この画分はSDP-4と称される。

【0113】

一部の実施形態では、タンパク質断片の少なくとも60パーセントは、約60kDa未満、または約55kDa未満の分子量を有し、創傷を閉鎖するために組織における細胞移動および増殖を促進する。別の実施形態では、タンパク質断片の少なくとも90%は、約100kDa未満の分子量を有し、創傷を閉鎖するために組織における細胞の移動および増殖を促進する。

20

【0114】

一部の実施形態では、タンパク質断片の少なくとも80パーセントは、約10kDaと85kDaの間の分子量を有する。いくつかの実施形態では、タンパク質断片の少なくとも50パーセントは、約18kDaと60kDaの間の分子量を有する。いくつかの実施形態では、タンパク質断片の少なくとも85パーセントは、約12kDaを超える分子量を有する。いくつかの実施形態では、タンパク質断片の少なくとも90パーセントは、約10kDaより大きい分子量を有する。

30

【0115】

特定の実施形態において、本発明は、低分子量SDPと薬学的に許容される担体とを含むSDP組成物を提供する。低分子量SDPは、60kDa未満の平均分子量を有することができる。

【0116】

好ましい一実施形態では、SDP-4画分は、前述のようにSDS-PAGE/ImageJ分析によって決定される15～35kDaの平均分子量、及びpH8.1～8.3、約23mOsmの浸透圧、及び25℃での約1.5～3cPの粘度を、それぞれ水中の50mg/mL溶液として有している。

【0117】

好ましい一実施形態では、SDP-4画分は、前述のようにSDS-PAGE/ImageJ分析によって決定される15～30kDaの平均分子量と、水中の50mg/mL溶液として、それぞれ25℃でpH8.1～8.3、約23mOsmの浸透圧、約1.5～3cPの粘度とを有している。

40

【0118】

好ましい一実施形態では、SDP-4画分は、前述のようにSDS-PAGE/ImageJ分析によって決定される15～25kDaの平均分子量と、水中の50mg/mL溶液として、それぞれ25℃でpH8.1～8.3、約23mOsmの浸透圧及び約1.5～3cPの粘度とを有している。

【0119】

50

別の好ましい実施形態では、SDP-4画分は、前述のようにSDS-PAGE/ImageJ分析によって決定される約18~22 kDaの平均分子量、及び約8.1~8.3のpH、約23 mOsmの浸透圧、及び25℃での約1.5~3 cPの粘度を、それぞれ水中50 mg/mL溶液として有している。

【0120】

一部のSDP-4画分の実施形態では、SDP-4のタンパク質断片の約39%は25 kDa~50 kDaの範囲にあり、タンパク質断片の約57.7%は20 kDa~60 kDaの範囲にあり、約72.1%が15 kDaから85 kDaの範囲、約83.6%が10 kDaから85 kDaの範囲、約85.3%が10 kDaから100 kDaの範囲である。

【0121】

低分子量タンパク質断片、高分子量タンパク質断片、またはそれらの組み合わせを含むように、様々なSDP組成物を調製することができる。低分子量タンパク質断片は、疾患組織表面及び／又は創傷上の炎症を軽減し、及び／又は細胞の移動及び／又は増殖を促進する。低分子量タンパク質断片は、活発な疾患状態及び／又は創傷又は傷の存在に起因する炎症組織表面の治療にも有用である。場合によっては、創傷治癒プロセスを強化するために低分子量タンパク質断片の組成物を適用することが有用であり得る。これらの場合、戦争中の戦場で獲得した傷、例えば感染症の、または痛みの緩和のための、より速い治癒を望む人の外科的傷などが含まれ得る。創傷治癒プロセスは、細胞数の増加、MMP-9などの炎症性分子の減少、および／または上皮細胞増殖の増加によって強化される。

【0122】

高分子量タンパク質断片は、基底膜への細胞接着を増加させるか、または基底膜の形成を補助することができる。場合によっては、糖尿病性潰瘍や皮膚熱傷などの慢性創傷や化膿する創傷、治癒が困難な創傷に対して、高分子量タンパク質断片の組成物を適用することが有用である場合がある。低分子量タンパク質断片が創傷閉鎖速度に関与するのに対し、高分子量タンパク質断片は創傷閉鎖の質に関与することがある。場合によっては、最適な創傷治癒速度および質のために、注意深く選択された量の低分子量タンパク質断片および高分子量タンパク質断片の組成物を適用することが使用されるかもしれない。創傷治癒プロセスは、フォーカルアドヒージョンキナーゼ（FAK）などの構造タンパク質、および／またはゾヌラオクルーデン（ZO-1）構造などの細胞間のタイトジャンクションを増加させることによって向上させることができる。

【0123】

SDP-4のような低平均分子量画分は、SDPや高分子量画分とは異なるある種の特徴を有している。例えば、SDPの細胞への取り込みは、ペプチド鎖の分子量に依存する。約60 kDaより小さいSDPペプチド分子は、培養細胞、より具体的にはヒト角膜辺縁上皮（hCLE）細胞に容易に吸収される。60 kDaより大きいSDP分子は、培養細胞からの吸収をほとんど排除される。また、SDP分子は、リソソームエンドサイトーシス分解経路のマーカーであるリソソーム関連膜タンパク質1（LAMP-1）とは共局在化しないことも重要なポイントである。その結果、SDP分子は非特定の細胞膜受容体に結合し、約60 kDa以下の分子はhCLE細胞に吸収されるようだ。さらに重要なことは、SDP分子はリソソーム分解経路で吸収されないため、生物学的に利用可能であり、生物活性を引き出すことができることである。

【0124】

水性SDP配合物

本明細書に記載されるSDP組成物及びサブフラクションは、水及び／又は医薬担体と共に配合物化することができる。具体的な実施形態では、担体は、例えば、眼科用配合物では、酢酸塩緩衝生理食塩水である。

【0125】

一部の実施形態では、ヒト又は哺乳動物におけるドライアイ症候群の治療のための眼科用組成物が提供される。本明細書で提供される組成物は、ドライアイ症候群を治療するた

めに有効な量のSDPを含む水溶液であり得る。例えば、水溶液中のSDPの有効量は、約0.01重量%～約80重量%のSDPであり得る。他の実施形態では、水溶液は、約0.1重量%～約10重量%のSDP、又は約0.5重量%～約2重量%のSDPを含むことができる。特定の特定の実施形態では、眼科用組成物は、約0.05%w/v SDP、約0.1%w/v SDP、約0.2%w/v SDP、約0.25%w/v SDP、約0.5%w/v SDP、約0.75%w/v SDP、約1%w/v SDP、約1.5%w/v SDP、約2%w/v SDP、約2.5%w/v SDP、約5%w/v SDP、約8%w/v SDP、または約10%w/v SDPを含む。

【0126】

様々な実施形態において、眼科用配合物は、水溶液中に、消炎剤、緩衝剤、及び／又は安定化剤などの追加の成分を含むことができる。消炎剤は、例えば、ヒアルロン酸(HA)、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、デキストラン、ゼラチン、ポリオール、カルボキシメチルセルロース(CMC)、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール(PG)、ヒプロメロース、グリセリン、ポリソルベート80、ポリビニルアルコール又はポビドンとすることができる。消炎剤は、例えば、約0.01重量%～約10重量%、または約0.2重量%～約2重量%で存在することができる。1つの具体的な実施形態において、消炎剤はHAである。様々な実施形態において、HAは、配合物の約0.2重量%で存在することができる。これらの成分の1つ以上を配合物から除外することも可能である。

【0127】

眼科用配合物の緩衝剤または安定化剤は、リン酸塩緩衝生理食塩水、ホウ酸塩緩衝生理食塩水、クエン酸塩緩衝生理食塩水、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、重炭酸ナトリウム、塩化亜鉛、塩酸、水酸化ナトリウム、エデト酸二ナトリウム、またはこれらの組合せとすることができる。これらの成分の1つ以上は、配合物から除外することもできる。

【0128】

眼科用配合物は、有効量の抗菌性防腐剤をさらに含むことができる。抗菌防腐剤は、例えば、過ホウ酸ナトリウム、ポリクオタリウム-1(例えば、Polyquad(登録商標)防腐剤)、塩化ベンザルコニウム(BAK)、亜塩素酸ナトリウム、ブリモニジン、ブリモニジンピューライト、ポレキシトニウム、またはこれらの組合せとすることができる。これらの成分の1つ以上を配合物から除外することも可能である。

【0129】

眼科用配合物は、有効量の血管収縮剤、抗ヒスタミン剤、またはそれらの組合せを含むことも可能である。血管収縮剤又は抗ヒスタミンは、塩酸ナファゾリン、塩酸エフェドリン、塩酸フェニレフリン、塩酸テトラヒドロゾリン、マレイン酸フェニラミン、又はこれらの組み合わせとすることができる。これらの成分の1つ以上を配合物から除外することもできる。

【0130】

一実施形態では、眼科用配合物は、本明細書に記載の有効量のSDPを、水及び1つ又は複数の眼科用成分と組み合わせて含むことができる。眼科用成分は、例えば、a)ポリビニルアルコール；b)PEG及びヒアルロン酸；c)PEG及びプロピレングリコール、d)CMC及びグリセリン；e)プロピレングリコール及びグリセリン；f)グリセリン、ヒプロメロース及びPEG；又は前記成分のいずれか1以上の組合せとすることができる。眼科用配合物は、HP-グアー、ホウ酸塩、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化亜鉛などの1つ以上の不活性成分を含むことができる。また、眼科用配合物は、亜塩素酸ナトリウム(Purite(登録商標)防腐剤(NaClO_2))、ポリクアッド、BAK、EDTA、ソルビン酸、ベンジルアルコール等の眼科用防腐剤を1種又は2種以上含有することができる。

【0131】

眼科成分、不活性成分、および防腐剤は、約0.1%～約5%w/v、例えば約0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.4%、0.5%、0.75%、1%、1.

5 %、2 %、2.5 %、または5 %で含めることができ、また前述の値の任意の二つの間の領域で含めることができる。

【0132】

SDPは水中で非常に安定であり、保存期間溶液安定性は溶液中のネイティブシルクフィブロインと比較して2倍以上である。例えば、SDPは水中で非常に安定であり、貯蔵寿命溶液安定性は、溶液中のネイティブシルクフィブロインと比較して10倍以上である。SDP材料は、水溶液中にある場合、5 % (50 mg/mL) 濃度の溶液を超音波処理しても、ゲル化しない。他の実施形態では、SDP材料は、水溶液中にあるとき、10 % (100 mg/mL) 濃度の溶液の超音波処理によってゲル化しない。

【0133】

眼科用水性配合物

本開示はまた、一般に、例えば、目に関する状態を治療するために使用され得る、特定の眼科用及び／又は水性配合物を提供する。出願人は、酢酸緩衝系及び低いpHレベル（中性pHレベル以下）などの眼科用配合物における特定の成分の使用が、ドライアイ疾患の治療に驚くほど有効であることを見出した。さらに、出願人は、本明細書に開示される配合物が、同時に低レベルの微粒子を示しながら、予想外に長い時間溶液中のタンパク質を安定化させるのに有効であることも見出した。特定の緩衝剤、浸透圧剤、及び界面活性剤の組み合わせの使用は、ドライアイ疾患の治療に驚くほど有効であるだけでなく、タンパク質の分解又はタンパク質の効力の低下なしに室温での特定のタンパク質の使用を延長することができることが確認された。

【0134】

したがって、例示的な配合物は、1つ又は複数の緩衝剤、界面活性剤、及び1つ又は複数の浸透圧剤を含む。いくつかの実施形態では、配合物はまた、約4.5～約6.0のpHレベルを含んでもよい。配合物は、場合により、溶液中で長時間安定化され得るタンパク質を含んでもよい。これらの実施形態において、配合物は、例えば、ゲル化せずに4週間を超える期間、溶液中のタンパク質を維持することができ、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して、4℃～40℃での12週間を超える保存期間後に50粒子/mL以下の微粒子数を維持することができる。

【0135】

一部の実施形態では、緩衝剤は、ヒスチジン、酢酸塩、グルタミン酸塩、又はそれらの組合せを含んでもよい。さらに他の実施形態では、配合物は、約10ミリモル～約50ミリモル、又は約20ミリモル～約40ミリモルの最終濃度を有する1つ又は複数の緩衝剤を含む。他の実施形態では、配合物中の1つ以上の浸透圧剤の各々の濃度は、約30ミリモル～約40ミリモル、又は約35ミリモルである。

【0136】

好ましい実施形態では、緩衝剤は、約0.1重量%～約1.0重量%の酢酸ナトリウムと約0.01重量%～約0.1重量%の酢酸とを含むことができる。他の実施形態では、緩衝剤は、約0.5重量%～約2.0重量%の酢酸ナトリウム及び約0.05重量%～約1.0重量%の酢酸から構成される。

【0137】

好ましくは、緩衝剤（例えば、酢酸ナトリウム及び氷酢酸）は、配合物のpHを約4.5～約6.0、約5.0～約6.0、約5.2～約5.8、約5.3～約5.7、または約5.4、または約5.5に維持する。

【0138】

一部の実施形態では、配合物中の浸透圧剤は、単糖類、無機塩、またはそれらの組み合わせから構成されてもよい。追加の実施形態では、浸透圧剤は、マンニトール、デキストロース、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、又はそれらの組み合わせから構成されてもよい。他の実施形態では、浸透圧剤は、約0.1重量%～約2重量%のブドウ糖および約0.1重量%～約2重量%の塩化マグネシウムから構成されてもよい。さらに他の実施形態では、浸透圧剤は、約0.01重量%～約2重量%のデキストロース、および約0.0

10

20

30

40

50

1重量%～約2重量%の塩化マグネシウムを含んでもよい。さらなる実施形態では、浸透圧剤は、約0.6重量%～約0.9重量%のデキストロース、および約0.6重量%～約0.9重量%の塩化マグネシウムから構成されてもよい。

【0139】

配合物の特定の実施形態はまた、1つ又は複数の界面活性剤を含んでもよい。界面活性剤には、非イオン性洗剤、すなわち、帯電していない頭部基を有する分子を含む洗剤が含まれるが、これらに限定されることはない。非イオン性洗剤には、ポリオキシエチレン（および関連する洗剤）、およびグリコシド化合物（例えば、アルキルグリコシド）が含まれる。アルキルグリコシドとしては、オクチルβ-グルコシド、n-ドデシルβ-D-マルトシド、β-デシルマルトシド、デジトニンなどが挙げられる。ポリオキシエチレン系洗剤の例としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80（それぞれ、TWEEN-40、TWEEN-60、TWEEN-80ともいう）、TRITON-Xシリーズ（例えば、TRITON X-100）、TERGITOLシリーズの洗剤（例えば、NP-40）、BRJシリーズの洗剤（例えば、BRJ-35、BRJ-58、BRJ-L23、BRJ-L4、BRJ-O10）、PLURONIC F68などである。好ましくは、界面活性剤は、ポリソルベート40、ポリソルベート60、またはポリソルベート80である。特定の好ましい実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート80である。好ましくは、界面活性剤は、約0.02%～約1%w/wの最終濃度、より好ましくは、約0.02%～約0.5%w/wの最終濃度を有する配合物に存在する。ある特定の好ましい実施形態では、ポリソルベート80は、約0.01%～約2.0%または約0.02%～約0.5%の最終濃度で存在する。別の実施形態では、配合物中に存在する唯一の界面活性剤はポリソルベート80である。

【0140】

様々な実施形態において、配合物のオスモラリティは、約170mOsm/kg～約300mOsm/kgである。他の実施形態では、浸透圧は、約160mOsm/kg～約200mOsm/kg、約175mOsm/kg～約180mOsm/kg、約180mOsm/kg～約200mOsm/kg、約200mOsm/kg～約250mOsm/kg、又は約250mOsm/kg～約300mOsm/kgである。好ましい一実施形態では、浸透圧は、約160mOsm/kg～約280mOsm/kg、又は約175mOsm/kg～約185mOsm/kgである。

【0141】

追加的な実施形態では、配合物は、ガラス又はポリエチレンを含む容器に保存される。様々な実施形態において、容器は、タイプIのホウケイ酸ガラスである。追加の実施形態において、容器は、低密度ポリエチレン容器であり得る。配合物は、低密度ポリエチレン容器内で6ヶ月以上安定であることが示されている。

【0142】

他の実施形態では、配合物の保存期間又は貯蔵寿命は、製造日から約4ヶ月～約8ヶ月、約8ヶ月～約12ヶ月、約1年～約2年、又は2年超である。様々な実施形態において、保存後の微粒子数は、約200/mL、約150/mL、約100/mL、約75/mL、約45/mL、約35/mL、約25/mL、約20/mL、約15/mL、約10/mL、約5/mL、または約1/mLである。さらに他の実施形態では、保存温度は、約10℃～約30℃、又は約15℃～約25℃である。

【0143】

眼科用配合物または水性配合物の好ましい一実施形態は、約0.04重量%～約0.1重量%のポリソルベート-80、約0.2重量%～約0.3重量%の酢酸ナトリウムおよび約0.01重量%～約0.03重量%の酢酸を含む酢酸塩緩衝液を含んでなること、および約0.6wt%～約0.9wt%のブドウ糖と約0.6wt%～約0.9wt%の塩化マグネシウムを含む浸透圧剤を含んでなることであり、pH5.2～5.8、浸透圧175mOsm/kg～185mOsm/kgの配合物になるようにする。

【0144】

眼科用配合物又は水性配合物のある特定の好ましい実施形態は、1つ以上の界面活性剤、1つ以上の浸透圧剤、及び約0.1重量%～約1.0重量%の酢酸ナトリウムと約0.01重量%～約0.1重量%の酢酸とを含む酢酸塩緩衝系を含み、緩衝系は配合物をpH 4.5から6.0に維持するものである。

【0145】

眼科用又は水性配合物の好ましい一実施形態は、0.1%～1.0%の酢酸ナトリウム、0.01%～0.1%の酢酸、0.1%～2%の塩化マグネシウム、0.1%～2%のブドウ糖、0.02%～2%のポリソルベート80、約160～200mOsm/kgの浸透圧及び約4.5～6のpHから構成されている。

10

【0146】

眼科用または水性配合物の好ましい一実施形態は、約0.25%酢酸ナトリウム、約0.01%酢酸、約0.75%塩化マグネシウム、約0.75%ブドウ糖、約0.05%ポリソルベート80、約160～200mOsm/kgの浸透圧、および約4.5～6のpHを含む。

【0147】

別の好ましい実施形態の眼科用又は水性配合物は、0.1%～1.0%の酢酸ナトリウム、0.01%～0.1%の酢酸、0.1%～2%の塩化マグネシウム、0.1%～2%のブドウ糖、0.02%～2%のポリソルベート80、約160～200mOsm/kgの浸透圧及び約4.5～6のpHから構成される。

20

【0148】

別の好ましい眼科用又は水性配合物は、約0.25%酢酸ナトリウム、約0.01%酢酸、約0.75%塩化マグネシウム、約0.75%ブドウ糖、約0.05%ポリソルベート80を含み、約180～190mOsm/kgの浸透圧及び5.2～5.7のpHである。

【0149】

眼科用または水性配合物の別の好ましい実施形態は、0.1%～1.0%の酢酸ナトリウム、0.01%～0.1%の酢酸、0.1%～2%の塩化マグネシウム、0.1%～2%のデキストロース、0.02%～2%のポリソルベート80、約160～200mOsm/kgの浸透圧および約4.5～6のpHから必須である構成である。

30

【0150】

さらに好ましい実施形態では、眼科用又は水性配合物は、約0.25%酢酸ナトリウム、約0.01%酢酸、約0.75%塩化マグネシウム、約0.75%ブドウ糖、約0.05%ポリソルベート80、浸透圧約180～190mOsm/kg及びpH 5.2～5.7から本質的に構成される。

【0151】

特定の実施形態では、眼科用配合物又は水性配合物は、長期間にわたって溶液中のタンパク質を安定化させることができる。例えば、配合物は、存在する場合、溶液中のタンパク質をゲル化することなく4週間を超える期間維持することができ、配合物は、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して4℃～40℃での12週間を超える保存期間後に50mL以下の微粒子カウントを維持することが可能である。

40

【0152】

様々な実施形態において、配合物中のタンパク質の重量%は、約0.01%～約15%である。追加の実施形態では、タンパク質のwt%は、約0.1%～約5%、又は約1%～約3%である。

【0153】

特定の実施形態では、眼科用配合物又は水性配合物に含まれるタンパク質は、疎水性タンパク質である。疎水性タンパク質に言及する場合、タンパク質は「正味の」疎水性を有していてもよく、これは、全体として、タンパク質が親水性よりも疎水性であることが理解される。正味の疎水性は、アミノ酸の疎水性指数を用いて決定される。例えば、各アミ

50

ノ酸は、その疎水性と電荷特性に基づいて、疎水性指数を割り当てられており、これらは、イソロイシン (+4.5)、バリン (+4.2)、ロイシン (+3.8)、フェニルアラニン (+2.8)、システイン／シスチン (+2.5)、メチオニン (+1.9)、アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5)である。この例では、正の値ほど疎水性が高い（例えば、Kyte et al., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein., J. Mol. Biol. (1982) 157(1):105-32、参照により本明細書に組み込まれる）。

10

【0154】

疎水性タンパク質は、次の操作の後、正の総疎水性指数を有するものである：ポリペプチド鎖の各アミノ酸をそれぞれの指数値に変換し、その値を合計して総疎水性指数を得る。ポリペプチドおよびペプチドの疎水性／非疎水性の性質も同様に決定することができる。特定のタンパク質及びポリペプチドが疎水性である領域を有し、これらの領域が、例えばMALDI MSのような分子の分析又は有用性を妨害することが理解される。これらの場合、領域に対する疎水性指数は、関心事であり、決定される。ある場合には、領域は連続したアミノ酸を含み、他の場合には、領域はポリペプチド鎖の高次折り畳み（例えば、3次構造）によってもたらされた疎水性表面を含む。

【0155】

20

一部の実施形態では、タンパク質は、約10kDa～約50kDa、約10kDa～約35kDa、15kDa～約35kDa、約15kDa～約30kDa、約15kDa～約25kDa、約16kDa～約23kDa又は約18kDa～約22kDaの平均分子量を含む小さい繊維状タンパク質（すなわち、3次構造をほとんど有さない）である。いくつかの実施形態では、タンパク質は、8%未満のセリンアミノ酸残基を含んでなる。他の実施形態では、タンパク質は、7.5%未満のセリンアミノ酸残基、7%未満のセリンアミノ酸残基、6.5%未満のセリンアミノ酸残基、または6%未満のセリンアミノ酸残基から構成される。

【0156】

一部の実施形態では、タンパク質は、タンパク質の全アミノ酸含量に対して、46%より大きいグリシンアミノ酸を含んでいる。他の実施形態では、タンパク質は、46.5%より大きいグリシンアミノ酸、47%より大きいグリシンアミノ酸、47.5%より大きいグリシンアミノ酸、又は48%より大きいグリシンアミノ酸を含む。

30

【0157】

いくつかの実施形態では、タンパク質は、タンパク質の総アミノ酸含量に対して、30%より大きいアラニンアミノ酸を含んでいる。他の実施形態では、タンパク質は、30.5%より大きいアラニンアミノ酸、31%より大きいアラニンアミノ酸、31.5%より大きいアラニンアミノ酸、32%より大きいアラニンアミノ酸、33%より大きいアラニンアミノ酸、または33.5%より大きいアラニンアミノ酸から構成される。

【0158】

40

特定の実施形態では、タンパク質は、タンパク質の全アミノ酸含量に対して、46.5%～48%のグリシンアミノ酸および30%～33.5%のアラニンアミノ酸から構成される。

【0159】

他の実施形態では、タンパク質は、タンパク質の全アミノ酸含量に対して46%より大きいグリシンアミノ酸及び30%より大きいアラニンアミノ酸を含む。

【0160】

配合物に使用するための例示的なタンパク質は、溶液中のその特徴に基づいて特徴付けることができる。例えば、例示的なタンパク質が存在する場合、結果として得られる配合物は、水中の10%w/w溶液として4cP未満の水性粘度を有していてもよい。様々な

50

実施形態において、配合物は、水中での15%w/w溶液として10cP未満の水性粘度、又は水中での24%w/w溶液として10cP未満の水性粘度を有する。

【0161】

好ましい実施形態では、タンパク質は、フィブロイン由来タンパク質（例えば、SDP-4）である。様々な実施形態において、配合物中のフィブロイン由来タンパク質の重量%は、約0.01%～約15%である。追加の実施形態では、フィブロイン由来タンパク質のwt%は、約0.1%～約5%、または約1%～約3%である。したがって、タンパク質を含む好ましい実施形態において、本開示は、フィブロイン由来タンパク質を含む配合物であって、フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、及びアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して少なくとも4%、ネイティブフィブロインと異なり；フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖及びフィブロイン軽鎖間のシステインジスルフィド結合は減少又は除去され；フィブロイン由来タンパク質組成物のシステインが減少又は除去される、配合物を提供する。該タンパク質組成物は、ネイティブフィブロインと比較して25%以上低減されたセリン含有量を有し、ここでセリン含有量は少なくとも約5%であり；そしてフィブロイン由来タンパク質組成物の平均分子量は35kDa未満かつ15kDaより大きい；および緩衝剤、ポリソルベート-80および1以上の浸透圧剤；ここで配合物はpHが4.5～6.0であり、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して、4℃～40℃での12週間を超える保存期間後の微粒子数が50/mL以下である、配合物を提供する。

【0162】

様々な他の実施形態において、フィブロイン由来タンパク質組成物は、約15kDa～約35kDa、又は約18kDa～約22kDaの平均分子量を有するSilk Derived Protein-4（SDP-4）であり、配合物のpHは、5.2～5.8である。他の実施形態では、pHは約5.0～約6.0である。

【0163】

ある特定の好ましい実施形態は、約0.1重量%～約3重量%を含む溶液中のタンパク質を安定化する、眼関連症状の治療で使用するための水性配合物であり、フィブロイン由来タンパク質の一次アミノ酸配列は、ネイティブフィブロインと組み合わせたアミノ酸の差の絶対値に関して少なくとも6%異なる。ここで、フィブロイン由来タンパク質の一次アミノ酸配列は、セリン、グリシン、およびアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも6%異なり、フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖およびフィブロイン軽タンパク質鎖間のシステインジスルフィド結合は減少または消失し、フィブロイン由来タンパク質は46%を超えるグリシンアミノ酸および30%を超えるアラニンアミノ酸を含む、フィブロイン由来タンパク質である。フィブロイン由来タンパク質は、フィブロイン由来タンパク質が8%未満のセリンアミノ酸を含むように、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%以上減少したセリン含量を有し；そしてフィブロイン由来タンパク質の平均分子量は約15kDa～約35kDaであり；そしてポリソルベート-80、約10ミリモル～約50ミリモルの酢酸塩緩衝液、および浸透剤を含み；ここで配合物はpHが5.2～5.8、175mOsm/kg～185mOsm/kgの浸透圧、および10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して4℃～40℃での12週間を超える貯蔵期間の後に50mL以下の微粒子カウントを有するものである。

【0164】

様々な実施形態において、酢酸塩緩衝液は、約0.2重量%～約0.3重量%の酢酸ナトリウム及び約0.01重量%～約0.03重量%の酢酸から構成される。他の実施形態では、浸透圧剤は、約0.6重量%～約0.9重量%のブドウ糖と約0.6重量%～約0.9重量%の塩化マグネシウムとを含んでいる。追加の実施形態では、ポリソルベート-80の重量%は、約0.05%～約0.1%である。

【0165】

さらに、本開示は、眼科疾患を有する対象に本明細書に開示される配合物の有効量を投

与し、それによって眼科疾患を治療することを含む、眼科疾患を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、眼科疾患は、ドライアイ症候群である。

【0166】

上述に鑑みて、本開示は、以下の実施形態を提供する。

1. 1種以上の緩衝剤、界面活性剤、及び1種以上の浸透圧剤を含む眼科用配合物であって；配合物が4.5～6.0のpHを有し、配合物がゲル化せずに4週間を超える期間溶液中のタンパク質を維持でき、直径10μm以上の微粒子に関して4℃～40℃での12週間を超える貯蔵期間の後に50mL以下の微粒子数を維持できるものであることを特徴とする、眼科用配合物。配合物は、SDP-4のようなタンパク質組成物を含むことも除外することもできる。

10

2. 配合物の浸透圧が約160mOsm/kg～約280mOsm/kgである、条項1記載の配合物。

3. 配合物の浸透圧が約175mOsm/kg～約185mOsm/kgである、条項2記載の配合物。

4. 1つ以上の緩衝剤が、ヒスチジン、酢酸塩、グルタミン酸塩、またはそれらの組み合わせを含む、条項1に記載の配合物。

5. 配合物が約10ミリモル～約50ミリモルの緩衝液濃度を有する、または配合物中の1つ以上の浸透圧剤の各々の濃度が約30ミリモル～約40ミリモルである、第4項記載の配合物。

6. 1種以上の緩衝剤が、約0.1重量%～約1.0重量%の酢酸ナトリウム及び約0.01重量%～約0.1重量%の酢酸を含む、第4項記載の配合物。

20

7. 1種以上の浸透圧剤が、単糖類、無機塩、またはそれらの組み合わせを含む、第1項記載の配合物。

8. 1つ以上の浸透圧剤が、マンニトール、ブドウ糖、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、またはそれらの組み合わせを含む、条項7に記載の配合物。

9. 1つ以上の浸透圧剤が、約0.10重量%～約2.0重量%のブドウ糖および約0.10重量%～約2.0重量%の塩化マグネシウムを含む、条項7に記載の配合物。

10. 界面活性剤がポリソルベート40、ポリソルベート60、またはポリソルベート80である、第1項記載の配合物。

11. 界面活性剤の重量%が約0.02%～約1.0%である、条項1に記載の配合物。

30

12. 界面活性剤が、約0.02%～約0.5%の重量%で存在するポリソルベート80である、条項10に記載の配合物。

13. 配合物が5.2～5.8のpH及び175mOsm/kg～185mOsm/kgの浸透圧を有する、条項1に記載の配合物。

14. 配合物がさらにタンパク質を含み、配合物中のタンパク質の重量%が約0.01%～約3%である、条項1～13のいずれか1項に記載の配合物。

15. タンパク質が疎水性タンパク質である、第14項に記載の配合物。

16. 疎水性タンパク質の一次アミノ酸配列が、約33%のアラニンおよび約48%のグリシンを含む、条項15に記載の配合物。

17. タンパク質が、以下を含むフィブロイン由来タンパク質である、第14項記載の配合物：フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、およびアラニンのアミノ酸含量の合計差の絶対値に関して、ネイティブフィブロインと少なくとも4%異なり、フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重およびフィブロイン軽タンパク質鎖間のシステインジスルフィド結合は減少または除去され；フィブロイン由来タンパク質は、ネイティブフィブロインと比較して25%以上減少したセリン含有量を有し、ここでセリン含有量は少なくとも約5%である；および配合物中のフィブロイン由来タンパク質の平均分子量は35kDa未満かつ15kDaより大きい。

40

18. 約0.04重量%～約0.1重量%のポリソルベート-80；約0.2重量%～約0.3重量%の酢酸ナトリウムおよび約0.01重量%～約0.03重量%の酢酸を含む酢酸緩衝剤；約0.6重量%～約0.9重量%のブドウ糖と約0.6重量%～約0.9

50

重量%の塩化マグネシウムを含む浸透圧剤を含む水性配合物であって、配合物はpH 5.2～5.8および浸透圧175mOsm/kg～185mOsm/kgの値を有している。
19. 約0.01%～約3%の重量%を有するタンパク質をさらに含む、条項18に記載の水性配合物。

20. タンパク質が、35kDa未満かつ15kDaを超える平均分子量を有する疎水性タンパク質である、条項19に記載の水性配合物。

21. 配合物が、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して、4℃～40℃での12週間を超える貯蔵期間の後に、50/mL以下の微粒子数を有する、条項19または20に記載の水性配合物。

22. ポリソルベート80（約0.04wt%～約0.1wt%）、酢酸ナトリウム（約0.2wt%～約0.3wt%）及び酢酸（約0.01wt%～約0.03wt%）を含む酢酸塩緩衝液、および約0.6重量%～約0.9重量%のブドウ糖と約0.6重量%～約0.9重量%の塩化マグネシウムを含む浸透圧剤から本質的に成る水系配合物。配合物はpH 5.2～5.8および浸透圧175mOsm/kg～185mOsm/kgの値を有している。

10

23. 1種以上の界面活性剤；1種以上の浸透圧剤；及び約0.1重量%～約1.0重量%の酢酸ナトリウム及び約0.01重量%～約0.1重量%の酢酸を含む酢酸緩衝系を含む眼科用配合物において、緩衝系が配合物をpH 4.5～6に維持する、眼科用配合物。配合物は、ゲル化することなく4週間を超える期間、溶液中のタンパク質を維持することができ、配合物は、眼科用配合物にタンパク質を添加した場合、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して4℃～40℃での12週間を超える保存期間後に50mL以下の微粒子カウントを維持することができるものである。

20

24. 1種以上の界面活性剤がポリソルベート80である、第23項記載の眼科用配合物。

25. タンパク質をさらに含み、タンパク質が35kDa未満かつ15kDaを超える平均分子量を有する疎水性タンパク質である、条項23の眼科用配合物。

26. 1種以上の界面活性剤；1種以上の浸透圧剤；及び約0.1重量%～約1.0重量%の酢酸ナトリウム及び約0.01重量%～約0.1重量%の酢酸を含む酢酸塩緩衝系から本質的になる眼科用配合物で、緩衝系が配合物をpH 4.5～6.0に維持することを特徴とする眼科用配合物。

30

27. 絹フィブロイン由来タンパク質；1種以上の界面活性剤；1種以上の浸透圧剤；及び約0.1重量%～約1.0重量%の酢酸ナトリウム及び約0.01重量%～約0.1重量%の酢酸を含む酢酸緩衝系から本質的になる眼科用配合物で、緩衝系は配合物をpH 4.5～6に維持し、配合物は、ゲル化することなく4週間を超える期間、溶液中のタンパク質を維持することができ、配合物は、50/mLを超える保存期間後に微粒子数を維持することができる。配合物は、ゲル化することなく4週間を超える期間、溶液中のタンパク質を維持することができ、配合物は、眼科用配合物にタンパク質を添加した場合、10マイクロメートル以上の直径を有する微粒子に関して4℃～40℃での12週間を超える保存期間後に50mL以下の微粒子カウントを維持することが可能である。

28. 絹由来タンパク質が約35kDa～約15kDaの平均分子量を有する、条項27に記載の眼科用配合物。

40

29. 1つ以上の界面活性剤がポリソルベート80である、条項27に記載の眼科用配合物。

30. 眼科疾患を有する対象に、1～29項のいずれか1項に記載の配合物の有効量を投与し、それによって眼科疾患を治療することを含む、眼科疾患を治療するための方法。

31. 眼科疾患がドライアイ症候群である、第30項に記載の方法。

【0167】

治療法

本発明は、炎症、例えば、ヒト角膜上または角膜内の炎症を軽減するための配合物におけるSDPの使用を提供するものである。このような炎症の軽減は、in vitroおよびin vi

50

voの両方の実験モデルで実証されている。具体的には、SDPが、体内の炎症の原動力として知られるNF- κ B関連細胞シグナル伝達経路を阻害することにより、ヒト角膜モデルにおける炎症を抑制することを示す作業が行われ、その具体例の1つがドライアイ病である。これらの経路を阻害することで、ドライアイや眼球の炎症の原因として知られるMMP-9の遺伝子発現や組織内滞留が最終的に減少することが明らかにされた。

【0168】

したがって、本発明は、炎症を軽減するための方法、及びSDPを対象部位に投与することを含む角膜創傷を含む創傷を治療するための方法を提供する。方法は、絹由来タンパク質（SDP）、又はその分子分画の組成物を含む配合物を、炎症組織、例えば、創傷の生きた動物組織に投与することを含むことができる。いくつかの実施形態では、対象は、例えばドライアイ疾患のように、炎症を起こした組織をもたらす眼球の状態を有する。いくつかの実施形態では、創傷は、眼球創傷、外科的創傷、切開、または擦過傷である。眼球の傷は、例えば、角膜の傷であり得る。

【0169】

SDP及びSDP-4は、したがって、創傷、感染症、又は疾患などの状態によって引き起こされる炎症を治療及び／又は軽減するために使用することができる。そのような状態の例には、眼球の傷、外科的傷、切開、または擦り傷が含まれる。場合によっては、炎症は、眼疾患、例えば、ドライアイ疾患又は症候群、角膜潰瘍、角膜浸食、角膜剥離、角膜変性、角膜穿孔、角膜瘢痕、上皮欠損、角結膜炎、特発性ブドウ膜炎、角膜移植によって生じる。加齢黄斑変性症（AMD、ウェットまたはドライ）、糖尿病性眼疾患、眼瞼炎、緑内障、高眼圧症、術後の眼痛および炎症、後眼部新生血管（PSNV）、増殖性硝子体網膜症（PVR）、サイトメガロウイルス網膜炎（CMV）、眼内炎、脈絡膜新生血管（CNVM）。血管閉塞性疾患、アレルギー性眼疾患、腫瘍、網膜色素変性症、眼感染症、強膜炎、眼瞼下垂、眼痛、散瞳、神経痛、瘢痕性眼表面疾患、眼感染症、炎症性眼疾患、眼表面疾患、角膜疾患、網膜疾患、全身性疾患の眼症状。遺伝性眼疾患、眼腫瘍、眼圧上昇、ヘルペス感染症、プチリギウム（強膜腫瘍）、眼表面に受けた傷、光屈折角膜切開術後の眼の痛み及び炎症、角膜の熱傷又は化学熱傷、強膜傷、角膜傷及び結膜傷などが挙げられる。いくつかの実施形態では、炎症及び／又は眼の状態は、老化、自己免疫状態、外傷、感染、変性疾患、内皮性ジストロフィー、及び／又は手術によって引き起こされる。つの具体例において、SDP又はSDP-4は、ドライアイ症候群を治療するための配合物において使用される。

【0170】

以下の例は、上記発明を説明するためのものであり、その範囲を狭めるものとして解釈されるべきではない。当業者であれば、例が本発明を実施し得る他の多くの方法を示唆していることを容易に認識するであろう。本発明の範囲内に留まりながら、多数の変形および修正がなされ得ることが理解されるべきである。

【0171】

例

例1. 一般用・抗炎症性点眼剤配合物の調製

疾患または損傷のために眼球系を治療するために、SDPの治療特性を利用した目薬組成物を調製することができる。SDP分子は、場合により分子量に基づいて単離することができ、または組成物全体として使用することができる。約35kDa未満で約15kDaを超えるような低い平均分子量のタンパク質分子の組成物を調製することができ、SDP-4と称される。SDP組成物の全ての分子量又は約40kDa以上の分子を含むタンパク質分子の第2の組成物も調製することができる。各組成物は、水、少なくとも1つの緩衝液または緩衝系（例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、クエン酸塩、ホウ酸塩、トリス、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンスルホン酸（HEPES））、任意で少なくとも1つの保存料（例えば、過ホウ酸塩、塩化ベンザルコニウム（BAK））、および場合により少なくとも1つの追加の賦形剤、界面活性剤、安定剤または塩（例えば、。スルファニル酸、トレハロース、グリセリン、エチレンジアミン四酢酸（E

10

20

30

40

50

DTA)、ポリエチレングリコール (PEG)、マンニトール、ポリソルベート、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化マグネシウム (MgCl₂)、塩化カルシウム (CaCl₂) または臭化リチウム (LiBr)) である。

【0172】

上記第1の組成物を含む眼科用配合物は、ドライアイ疾患患者、創傷患者、又はそれ以外の健康な患者の手術創（例えば、屈折矯正手術後又は白内障手術後）に治療製品として適用することができる。疾患または創傷は、炎症および創傷閉鎖率、ならびに患者の快適性および疼痛評価について経時的にモニターすることができる。第2の組成物は、市販の製品、例えば人工涙液点眼剤において、配合物の濡れ性、広がり、及び患者の快適性を高めるのに役立つタンパク質賦形剤として使用することができる。

【0173】

目薬の配合物例としては、0.1wt. / vol. 程度の低濃度のSDP-4またはSDPを含む。SDP-4またはSDPから10wt. / vol. と高いものまで。SDP-4またはSDPを含む。SDP-4またはSDP材料は精製水に溶解され、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、PBS緩衝液、ホウ酸緩衝液などの緩衝系が1mmolから1000mmolの濃度で作成されるであろう。配合物には、さらに賦形剤成分を加えてもよい。ポリソルベートなどの界面活性剤は、0.01%~0.1wt. / vol. の濃度の範囲で添加することができる。安定化糖分子は、トレハロース、デキストロース、またはスクロースのように、10mmol~500mmolの範囲の濃度で添加することができる。眼潤滑剤として、PEG、カルボキシメチルセルロース、ヒドロメロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはグリセリンのような消光分子を、0.1%~2.0wt. / vol. の範囲の濃度で添加することが可能である。また、分子間相互作用を低減し、配合物を安定化させるために、NaCl、MgCl₂、CaCl₂、またはLiBrなどの塩を、10mmol~500mmolの範囲で添加することもできる。アミノ酸分子は、L-グルタミンまたはL-アルギニンのような安定化剤として、10mmol~500mmolの範囲の濃度で添加することができる。安定化剤としては、EDTAなどのキレート剤を0.01%~0.1wt. / vol. の濃度で添加することが可能である。抗菌剤は、過ホウ酸塩やBAKなど、0.015wt. / vol. までの濃度で添加することが可能である。

【0174】

以下の表1には、SDP-4および／またはSDP分子を含有し、上述の配合物用途を強化するために追加の添加物または賦形剤を加えることができる、製造されたいくつかの例示的なベース配合物が記載されている。

【0175】

【表1】

表1. ベース配合物の例

成分	組成物				
	1	2	3	4	5
SDP-4又はSDP	5g又は10g	5g又は10g	5g又は10g	5g又は10g	5g又は10g
リン酸塩	10 mmol	—	—	—	—
NaCl	137 mmol	—	—	—	—
塩化カルシウム	2.7 mmol	—	—	—	—
クエン酸	—	82 mmol	8 mmol	—	—
クエン酸三ナトリウム	—	18 mmol	92 mmol	—	—
トリス塩酸	—	—	—	7.02 g	0.76 g
トリスベース	—	—	—	0.67 g	5.47 g
水	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L
pH	7.4	3.0	6.2	7.2	9.0

10

20

30

40

50

【0176】

SDP、またはSDP-4などのSDP画分は、濡れ性や患者の快適性を改善するために、市販および配合物箋の目薬や軟膏などの既知の眼科用配合物に添加することも可能である。SDPまたはSDP-4を添加できる点眼剤の例としては、酒石酸ブリモニジン、酒石酸ブリモニジン／マレイン酸チモロール、アルカフタジン、ピマトプロスト、シクロスポリン、ガチフロキサシン、ケトロラク・トロメタミン、またはリフィテグラスト点眼液が挙げられる。SDPまたはSDP-4を添加することができる他の配合物の例は、米国特許No.5,468,743; 5,880,283; 6,333,045; 6,562,873; 6,627,210; 6,641,834; 6,673,337; 7,030,149; 7,320,976; 7,323,463; 7,351,404; 7,388,029; 7,642,258; 7,842,714; 7,851,504; 8,008,338; 8,038,988; 8,101,161; 8,133,890; 8,207,215; 8,263,054; 8,278,353; 8,299,118; 8,309,605; 8,338,479; 8,354,409; 8,377,982; 8,512,717; 8,524,777; 8,541,463; 8,541,466; 8,569,367; 8,569,370; 8,569,730; 8,586,630; 8,629,111; 8,632,760; 8,633,162; 8,642,556; 8,648,048; 8,648,107; 8,664,215; 8,685,930; 8,748,425; 8,772,338; 8,858,961; 8,906,962; 9,248,191、及び米国特許Nos. 7,314,938; 7,745,460; 7,790,743; 7,928,122; 8,084,047; 8,168,655; 8,367,701; 8,592,450; 8,927,574; 9,045,457; 9,085,553; 9,216,174; 9,353,088; and 9,447,077。

10

【0177】

例2. 予備配合物の研究

Bombyx moriカイコの繭は、Shanghai Yu Yuan Companyから購入した。生糸は、0.3%wt./wt.の水溶液を用いて抽出した。Na₂CO₃ (J.T. Baker, USP Grade) 溶液を用いて95℃で75分間抽出し、精製水 (SilkTech Biopharmaceuticals) で20分間十分にすすぎを行った。その後、すすぎサイクルをさらに3回繰り返し、残留するNa₂CO₃と抽出された糊状セリシタンパク質がすべて洗い流されたことを確認した。次に、脱ガムした抽出絹繊維をプレスして余分な水分を取り除き、コンベクションオーブンで70℃、16時間乾燥させた。

20

【0178】

次に、乾燥した抽出絹繊維を、54%重量/重量臭化リチウム (LiBr) 溶液 (FMC Lithium, Inc) に、抽出繊維1グラム当たり4xLiBr量の割合で可溶化し、Reactionと呼ぶ工程を実施した。この工程は、121℃、15psiの温度下で様々な可溶化時間で行われ、SDP/LiBr中間体と呼ばれる中間溶液が得られた。次に、この中間溶液を、タンジェンシャルフローろ過 (TFF) 30kDa Sartorius Hydrosart カットオフフィルターを用いて分画し、30kDa未満のすべての画分を保持した。次に、この画分をTFF 10kDa Sartorius Hydrosart カットオフフィルターを用いてろ過し、10kDa以上の画分をすべて保持した。その結果、Silk Derived Protein-4 (SDP-4) が得られた。Sartorius Hydrosart カットオフフィルターは全て Sartorius Stedim 社から購入した。

30

【0179】

初期配合物開発段階 (表2-6) において、各種緩衝剤、塩、糖、界面活性剤の原液を作成した。次に、これらのストック溶液をSDP-4に直接添加し (30分間反応)、賦形剤とSDP-4の所望の濃度に達するまで精製水で希釈した。この溶液を完全に溶解するまで混合し、0.2µmのポリエーテルスルホンフィルター (VWR) でろ過し、50mLポリプロピレン製コニカル (VWR) に入れた。その後、配合物を入れた容器を40℃、相対湿度75%の条件下で安定性チャンバーに入れ、安定性をモニターした。以下の表2に、初期配合物開発の化学物質と製造業者を示す。予備配合物試験 (表3-6) の各項目は、定性分析により評価された。合格基準は、ゲル化せず、目に見える微粒子が本質的でないことである。予備配合物スタディ内の各項目について、受入基準を満たさないため、予備配合物スタディのスクリーニングプロセスで不合格となった。

40

【0180】

50

【表 2】

表 2. 賦形剤とその製造元

賦形剤	製造元	賦形剤	製造元
塩化マグネシウム	VWR	クエン酸ナトリウム	VWR
塩化カルシウム	ミリポア	Twee n 20	VWR
塩化ナトリウム	カロライナ	Twee n 80	VWR
リン酸緩衝生理食塩水	VWR	TRITON	ミリポア
トリス塩酸	VWR	トレハロース	スワンソン
TRIS NaOH	VWR	グリセリン	スペクトラム
ホウ酸ナトリウム	VWR	EDTA	BDH
ホウ酸	BDH	PEG-400	シグマ
クエン酸	VWR	D-マンニトール	VWR
L-アルギニン	VWR	L-グルタミン	VWR
牛血清アルブミン	VWR		

【0181】

【表 3】

表 3. SDP-4 に対する塩の影響 (30 分反応)

SDP-4 濃度 (% wt./wt.)	添加された 塩	塩濃度 (モル分率)	凝集・ゲル化 までの日数	説明
1%	対照	-	6	小さな凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
1%	MgCl ₂	0.05	6	小さな凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
1%	CaCl ₂	0.05	6	大きな凝集体。非常に高いカウント (>10 微粒子数/1mLあたり)
1%	NaCl	0.05	6	大きな凝集体。中位カウント (>4 微粒子数/1mLあたり)
5%	対照	-	35	ゲル化
5%	MgCl ₂	0.05	35	ゲル化
5%	CaCl ₂	0.05	35	ゲル化
5%	NaCl	0.05	35	ゲル化

【0182】

【表 4】

表 4. SDP-4 に対する緩衝剤の影響 (30 分反応)

SDP-4 濃度 (% wt./wt.)	緩衝剤	緩衝剤濃度	凝集・ゲル化までの 日数	説明
5%	PBS (pH:7.2)	0.01M	7	ゲル化
5%	Tris (pH:7.2)	0.1M	21	ゲル化
1%	ホウ酸ナトリウム (pH:7.2)	0.05 M	9	小さな凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
1%	Tris (pH:7.2)	0.05 M	2	小さな凝集体。中位カウント (>4 微粒子数/1mLあたり)
1%	クエン酸 (pH:5.9)	0.1 M	7	ゲル化

10

【0183】

【表 5】

表 5. SDP-4 に対する界面活性剤の影響 (30 分反応)

SDP-4 濃度 (% wt./wt.)	添加剤/ 緩衝剤	添加剤/緩衝剤の 濃度	凝集・ゲル化 までの日数	凝集体の説明
1%	Tween 20	1% wt./wt.	2	高いカウント。破片状凝集体 (>6 微粒子数/1mLあたり)
1%	Tris	0.05M	2	非常に多い。破片状凝集体 (>10 微粒子数/1mLあたり)
	Tween 20	1% wt./wt.		
1%	Tris	0.05M	5	数が少ない。小さな凝集体 (~2 微粒子数 mL)
	TRITON	1% wt./wt.		
1%	ホウ酸ナトリウム	0.05M	2	非常に多い。破片状凝集体 (>10 微粒子数/1mLあたり)
	Tween 20	1% wt./wt.		
1%	ホウ酸ナトリウム	0.05M	9	数が少ない。小さな凝集体 (~2 微粒子数 mL)
	TRITON	1% wt./wt.		
1%	Tween 20	0.10% wt./wt.	14	数が少ない。破片状凝集体 (~2 微粒子数 mL)
1%	Tween 80	0.10% wt./wt.	14	数が少ない。破片状凝集体 (~2 微粒子数 mL)

20

30

【0184】

40

50

【表 6】

表 6. SDP-4 に対する添加剤の効果 (30 分反応)

SDP-4 濃度 (% wt./wt.)	添加剤 /緩衝剤	添加剤/緩衝剤 の濃度	凝集・ゲル化 までの日数	凝集体の説明
5%	トレハロース	0.05M	48	ゲル
1%	トレハロース	0.05M	6	大きな凝集体。非常に高いカウント (>10 微粒子数/1mLあたり)
5%	グリセリン	1% wt./wt.	41	ゲル
1%	EDTA	0.10% wt./wt.	5	大きな凝集体。中位カウント (>4 微粒子数/1mLあたり)
1%	PEG-400	1% wt./wt.	5	大きな凝集体。低いカウント (~2 微粒子数 mL)
1%	D-マンニトール	1%	9	小粒子と大粒子の凝集体。 高いカウント (>10 微粒子数/1mLあたり)
1%	Tris	0.05M	5	中程度の凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
	PEG-400	1% wt./wt.		
1%	Tris	0.05M	9	小さな凝集体。低いカウント (~2 微粒子数 mL)
	PEG-8000	1% wt./wt.		
1%	Tris	0.05M	9	中程度の凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
	グリセリン	1% wt./wt.		
1%	Tris	0.05M	9	大きな凝集体。低いカウント (~2 微粒子数 mL)
	EDTA	0.10% wt./wt.		
1%	Tris	0.05M	5	中程度の凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
	D-マンニトール	1% wt./wt.		
1%	ホウ酸ナトリウム	0.05M	9	中程度の凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
	PEG-400	1% wt./wt.		
1%	ホウ酸ナトリウム	0.05M	9	小さな凝集体。低いカウント (~2 微粒子数 mL)
	PEG-8000	1% wt./wt.		
1%	ホウ酸ナトリウム	0.05M	5	小さな凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
	グリセリン	1% wt./wt.		
1%	ホウ酸ナトリウム	0.05M	5	大きな凝集体。低いカウント (~2 微粒子数 mL)
	EDTA	0.01% wt./wt.		
1%	ホウ酸ナトリウム	0.05M	9	中程度の凝集体。高いカウント (>6 微粒子数/1mLあたり)
	D-マンニトール	1% wt./wt.		

【0185】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7. S D P - 4 に対するアミノ酸とタンパク質の影響（30分間の反応）

SDP-4 濃度 (% wt./wt.)	追加した添加剤	添加剤濃度	凝集／ゲル化 までの日数	説明
1%	L-アルギニン	500 mM	46	高いカウント 凝集 (>6 微粒子数/1mLあたり)
1%	L-アルギニン	50 mM	46	高いカウント 凝集 (>6 微粒子数/1mLあたり)
1%	L-グルタミン	50 mM	46	ゲル化
1%	L-グルタミン /L-アルギニン	50 mM/50mM	46	高いカウント 凝集 (>6 微粒子数/1mLあたり)
1%	ウシ血清アルブミン	0.1% wt./wt.	46	低いカウント 凝集 (~2 微粒子数/1mLあたり)

【0186】

例 3. S D P - 4 に対する pH と温度の影響

乾燥した抽出繊維をベンチトップリアクターで30分または200分間反応させた。中間体は、30 kDa および 10 kDa の Sartorius Hydrosart フィルターを備えた T F F を使用してさらに処理され、S D P - 4（30分反応）および S D P - 4（200分反応）が得られた。次に、これら2つの試験品を、1 M 塩酸（Lab Chem）を使用して目的の pH に滴定した。次に、サンプルを 1 % w t. / w t. の濃度に希釈した。次に、ポリエーテルスルホンフィルター（VWR）を使用してろ過し、50 mL のポリプロピレンコニカルに分注した。さまざまな反応時間と pH の S D P - 4 を含むこれらの円錐形は、4 °C、25 °C、および 40 °C の条件下で安定チャンバーに入れられた。指定された時点で、サンプルが安定チャンバーから取り出され、Orion Versa Star pH メーターと Coulter Particulate Counter をそれぞれ使用して pH と粒子状物質が分析された。図 1 は、さまざまな pH および温度条件下で 30 分間反応した S D P - 4 の要約グラフを示している。図 2 は、これらの同じ条件下で 200 分間反応した S D P - 4 の要約グラフを示している。30 分と 200 分の反応を比較すると、S D P 反応時間が長くなると凝集体の形成が大幅に減少することがわかる。

【0187】

S D P - 4 タンパク質の凝集は、pH 5.0 未満で発生する。この研究では、遠心分離とろ過の組み合わせを使用して凝集剤を除去した。次に、保持された S D P - 4 上清とろ液を研究に使用した。図 2 に示すように、4.5 ~ 6.0 の pH 範囲内で、形成された粒子の数は最も少なくなった。pH 5.0 以上、40 °C の条件では、目に見えない粒子と目に見える粒子が増加した。まとめると、この研究は、S D P - 4 の物理的安定性が、pH の上昇、保管温度の上昇、および反応時間の短縮とともに低下することを示している。

【0188】

例 4. クエン酸緩衝液配合物における pH と温度の影響

Silk Derived Protein-4（30分または200分のベンチトップ反応）をクエン酸緩衝液に加えた。クエン酸緩衝液は、クエン酸（VWR）とクエン酸ナトリウム（VWR）で構成されている。クエン酸とクエン酸ナトリウムの比率を変えることにより、所望の pH が得られた。S D P - 4 をクエン酸緩衝液に加え、次に精製水で希釈して、50 mM クエン酸緩衝液および 1.0 % w t. / w t. の最終濃度に到達させた。S D P - 4 濃度。次に、ポリエーテルスルホンフィルター（VWR）を使用して配合物をろ過し、50 mL のポリプロピレンコニカル（VWR）に分注した。さまざまな反応時間とクエン酸配合 pH の S D P - 4 を含むこれらの円錐形を、40 °C の条件下で安定チャンバーに入れた。2週間後、C o u l t e r 微粒子カウンターを使用して微粒子のサンプルを測定した。図 3 は、

粒子の形成に対する反応時間とpHの影響を示し、図4は、粒子の形成に対する保管温度の影響を示している。これらの研究は、クエン酸塩緩衝配合物において、pHの上昇、貯蔵温度の上昇、および反応時間の短縮に伴い、SDP-4の物理的安定性が低下することを示している。

【0189】

例5. SDP-4とコンテナ閉鎖システムの互換性

SDP-4の開発バッチは、SilkTech Biopharmaceuticalsで製造され、さまざまなコンテナクロージャーに保管されて、SDP-4とコンテナクロージャーの互換性の影響を調査した。

【0190】

この研究では、低密度ポリエチレン(LDPE)、ガラス、およびポリプロピレン(PP)の3種類の容器クロージャーが選択された。容器のクロージャーを精製水で洗浄して、製造プロセスから粒子を除去した。5.79%wt./wtの濃度のSDP-4の開発バッチは、SDP-4617.0gに精製水2954.6gを加えて精製水で希釈した。ヘッドスペースを分析するために、容器に体積の50%と100%の血清ピペットを充填した。充填後、サンプルは40℃および75%相対湿度(RH)の加速条件下で保管された。2週間後、サンプルの外観と粒子状物質(コールター法を使用)を測定した。表8に、使用した材料と機器の詳細を示す。

【0191】

【表8】

表8. 材料と機器の概要

材料/機器	メーカー	製品コード	ロット番号
SDP-4	Silk Technologies, Ltd.	N/A	1300004-3
ガラス容器クロージャー (22 mL Borosilicate Glass with Phenolic Screw Cap)	VWR	66012-044	083A02
LDPE 容器クロージャー (20 mL Nalgene Laboratory Bottle, Wide Mouth)	Thermo Fischer	2103-0001	1196397
PP 容器クロージャー (50 mL High-Performance Centrifuge Tube with Plug Cap)	VWR	89039-662	10742-734CC
粒子カウンター	Beckman Coulter	Z2	EQPT-00172

【0192】

表9は、40℃および75%RHの条件下で2週間後の結果を示している。表10に、結果の要約を示す。図5は、コンテナ容量の50%での1mLあたりの平均サブミクロン粒子数(>10μm)の粒子数結果を示している。

【0193】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. テストされたクロージャーシステムの結果

パッケージング	外観	粒子数 (カウント)			標準偏差		
		>10 μm	10~25 μm	>25 μm	>10 μm	10~25 μm	>25 μm
Glass 50%	無	19.3	19.0	0.3	3.3	2.8	0.5
Glass 50%	無	10.7	10.0	0.7	1.2	1.4	0.5
Glass 100%	無	19.3	18.7	0.7	1.7	1.9	0.5
Glass 100%	無	33.3	32.3	1.0	4.5	4.6	0.8
LDPE 50%	N/A	59.7	58.3	1.3	7.7	7.0	1.2
LDPE 50%	N/A	54.7	52.0	2.7	8.4	6.7	1.7
LDPE 100%	N/A	55.3	54.7	0.7	22.8	21.9	0.9
LDPE 100%	N/A	36.7	35.7	1.0	4.9	4.9	0.0
PP 50%	有	210.7	207.7	2.7	28.8	28.1	0.9
PP 50%	有	420.0	414.3	5.7	16.1	16.4	1.9
PP100%	無	248.0	245.0	3.0	7.1	5.7	1.4
PP100%	無	276.0	271.7	4.3	11.9	9.0	2.9

【0194】

【表 10】

表 10. テストされたクロージャーシステムの結果の要約

パッケージングタイプ	外観/可視粒子	目に見えない粒子の平均数 (10~25 μm)
Glass 50% Full	無	15
Glass 100% Full	無	26
LDPE 50% Full	N/A	55
LDPE 100% Full	N/A	46
ポリプロピレン 50% Full	有	311
ポリプロピレン 100% Full	無	262

【0195】

ガラスは目に見えない粒子の数が最も少なく、目に見える粒子や凝集体は観察されなかった。低密度のポリエチレン貯蔵は、ガラスに貯蔵された溶液と比較して、目に見えない粒子数が多かった。コンテナの閉鎖が不透明なため、LDPEの目に見える粒子は視覚的に観察されなかった。ポリプロピレンの貯蔵は、あらゆる容器の閉鎖の中で最も多くの目に見えない目に見える粒子を示した。ヘッドスペースは、ガラスおよびLDPEでの粒子の形成の要因ではないようである。

【0196】

1%wt./wt.での発生SDP-4のデータと観察に基づくと、ガラスはLDPEおよびポリプロピレン容器のクロージャーよりも粒子の形成が少なかった。ガラスは、SDP-4のフェーズに適した安定性の研究が行われることを理解した上で、SDP-4の主要なコンテナとして選択された。

【0197】

例 6. 配合物前の評価と安定性のスクリーニング

SDP-4の前配合物の安定性を評価した。溶液の浸透圧は、塩化ナトリウムまたはマンニトールのいずれかを使用して290mOsm/kg(+10mOsm/kg)に調整された。10倍希釈剤および活性配合物(SDP-4は活性医薬成分、API-1と表示されている)の説明を表11に示す。

【0198】

希釈剤をmilli-Q水で1：10に希釈し、0.2 μm 、25mm Acrodisc (Pall p/n 4907)でろ過し、20mLを20ccの透明なガラス製血清バイアルに分注してコントロールとして使用した。20 x 1mLの各活性配合物を0.2 μm 、25mm Acrodisc (Pall p/n 4907)でろ過し、20ccの透明なガラス製血清バイアルに分注してラベルを付けた。1 x 希釈剤と活性配合物を32.5°Cから40°Cに置いた。

【0199】

すべてのサンプルは、1、2、および4週間の時点で外観がチェックされた。「Opalescence」（乳白光）または「Turbidity」を示すサンプルでは、500nmで追加の「%Transmissionance」が実行された。ゲル化していないすべてのサンプルでは、2週目と4週目に%T500nmが実行された。

10

【0200】

合格配合物の合格基準は、ゲル化、透明化、および目に見える粒子が本質的に含まれていないということである。

【0201】

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 1. 40℃条件下で4週間後の外観と%T500nm

配合物	時間点	外観	% 透過率 500 nm
(1x) 0.05% クエン酸緩衝剤, pH 5.5 希釈剤 BCL633-001-01, 対照	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	101.9%
	4 週	透明な無色の溶液. いくつかの小さな粒子	99.6%
(1x) 0.1% ヒスチジン 緩衝剤, pH 6.1 希釈剤 BCL633-001-02, 対照	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	101.6%
	4 週	透明な無色の溶液. いくつかの小さな粒子	100.0%
(1x) 0.2% リン酸ナトリウム 緩衝剤, pH 7.2 希釈剤, BCL633-001-03, 対照	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	101.9%
	4 週	透明な無色の溶液. いくつかの小さな粒子	100.0%
(1x) 0.75% トロメタミン 緩衝剤, pH 8.1 希釈剤 BCL633-001-04, 対照	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	100.0%
	4 週	透明な無色の溶液. いくつかの小さな粒子	100.3%

【0 2 0 2】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

API 及び 緩衝剤			
配合物	時間点	外観	% 透過率. 500 nm
1.0% API-1, 0.05% クエン酸 緩衝剤, pH 5.5 BCL633-001-05	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, いくつかの粒 子, 乳白色無し	97.6%
	4 週	透明な無色の溶液. いくつかの小さな粒子	96.3%
1.0% API-1, 0.1% ヒスチジ ン 緩衝剤, pH 6.1 BCL633-001-06	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, いくつかの粒 子, 乳白色無し	98.9%
	4 週	透明な無色の溶液. 小さな粒子/小球	93.4%
1.0% API-1, 0.2% リン酸ナ トリウム 緩衝剤, pH 7.2, BCL633-001-07	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. いくつかの小さな粒子.	96.6%
	2 週	わずかに黄色の溶液. 乳白色無し, いくつかの粒子, 粘性溶液.	94.6%
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の 稠密な溶液.)	N/A
1.0% API-1, 0.75% トロメタ ミン 緩衝剤, pH 8.1 BCL633-001-08	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. いくつかの小さな粒子.	85.9%
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, いくつかの粒子, 粘性溶液.	95.6%
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. いくつかの小さな 粒子. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の 稠密な溶液.)	N/A

【0 2 0 3】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

API, 緩衝剤 及び界面活性剤			
1.0% API-1, 0.1% PS-80, 0.05% クエン酸緩衝剤, pH 5.5 BCL633-001-11	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, 目に見える粒子無し	100.7%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, 目に見える粒子無し	96.5%
1.0% API-1, 0.1% PS-80, 0.1% ヒスチジン 緩衝剤, pH 6.1, BCL633-001-12	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, 目に見える粒子無し	92.0%
	4 週	わずかに黄色の 中程度の 粘性溶液 . わずかに乳白色, 粒子無し.	41.9%
1.0% API-1, 0.1% PS-80, 0.2% リン酸ナトリウム 緩 衝剤, pH 7.2, BCL633-001-13	1 週	透明な無色の溶液. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し.	94.7%
	2 週	乳白色, 粘性溶液 . 目に見える粒子無し.	35.0%
	4 週	わずかに黄色の 中程度の 粘性溶液 . わずかに乳白色, 粒子無し.	10.1%
1.0% API-1, 0.1% PS-80, 0.75% トロメタミン 緩衝 剤, pH 8.1, BCL633-001-14	1 週	透明な無色の溶液. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し.	81.7%
	2 週	乳白色, 粘性溶液 . 目に見える粒子無し.	38.3%
	4 週	わずかに黄色の 中程度の 粘性溶液 . わずかに乳白色, 粒子無し.	15.2%
1.0% API-1, 1.0% ポビドン, 0.05% クエン酸塩緩衝剤, pH 5.5 BCL633-001-15	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, 大きい及び中程度の 粒子/小球	97.9%
	4 週	わずかに黄色の溶液. いくつかの中 小サイズの粒子. 乳白色無し.	95.0%
1.0% API-1, 1.0% ポビドン, 0.1% ヒスチジン 緩衝剤, pH 6.1 BCL633-001-16	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 大きな球形の粒子.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, 大きい及び中程度の 粒子/小球	98.0%
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料 . い くつかの懸濁粒子. わずかに乳白 色.(振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 粘性溶液.)	N/A

10

20

30

40

50

【表 1 1】

1.0% API-1, 1.0% ポビドン, 0.2% リン酸ナトリウム 緩 衝剤, pH 7.2 BCL633-001-17	1 週	透明な溶液. ゲル化. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; 透 明な, 稠密な溶液. いくつか 乳白色)	102.9%
	2 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. 乳白色 (振とうすると再液化したサンプル; 稠 密な溶液. 外観は決定できない. 多 すぎる懸濁した泡)	N/A
	4 週	わずかに黄色の ゲル化した材料. (振とうすると再液化したサンプル; 稠密な溶液. 多すぎる泡)	N/A
1.0% API-1, 1.0% ポビドン, 0.75% トロメタミン 緩衝 剤, pH 8.1 BCL633-001-18	1 週	透明な溶液. ゲル化. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; 透 明な, 稠密な溶液. いくつか 乳白色)	89.4%
	2 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. 乳白色 (振とうすると再液化したサンプル; 稠 密な溶液. 外観 は決定できない. 多 すぎる懸濁した泡)	N/A
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. いくつか 乳白色. (振とうすると再液化したサンプル; わ ずかに黄色の 稠密な溶液. 多すぎる 懸濁した泡)	N/A

【0 2 0 4】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

API, 緩衝剤, 界面活性剤 及び浸透圧剤			
1.0% API-1, 0.86% 塩化ナトリウム, 0.1% PS-80, 0.05% クエン酸緩衝剤, pH 5.5 BCL633-001-19	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, 目に見える粒子無し	94.1%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色, 目に見える粒子無し	76.0%
1.0% API-1, 0.85% 塩化ナトリウム, 0.1% PS-80, 0.1% ヒスチジン 緩衝剤, pH 6.1 BCL633-001-20	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, わずかに乳白色, 目に見える粒子無し	68.3%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色, いくつかの粒子/小球	40.6%
1.0% API-1, 0.76% 塩化ナトリウム, 0.1% PS-80, 0.2% リン酸ナトリウム 緩衝剤, pH 7.2 BCL633-001-21	1 週	透明な無色の溶液. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し.	94.8%
	2 週	わずかに黄色の溶液, わずかに乳白色, 目に見える粒子無し	52.3%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色, 目に見える粒子無し	22.6%
1.0% API-1, 0.57% 塩化ナトリウム, 0.1% PS-80, 0.75% トロメタミン 緩衝剤, pH 8.1 BCL633-001-22	1 週	透明な無色の溶液. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し.	90.7%
	2 週	わずかに黄色の溶液, わずかに乳白色, 目に見える粒子無し	52.6%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色, 目に見える粒子無し	26.8%
1.0% API-1, 0.86% 塩化ナトリウム, 1.0% ポビドン, 0.05% クエン酸緩衝剤, pH 5.5 BCL633-001-23	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, No 乳白色, いくつかの粒子/小球	101.7%
	4 週	わずかに黄色の溶液, No 乳白色, いくつかの粒子/小球	96.2%
1.0% API-1, 0.84% 塩化ナトリウム, 1.0% ポビドン, 0.1% ヒスチジン 緩衝剤, pH 6.1 BCL633-001-24	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. いくつかの粒子. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液. わずかに乳白色)	N/A
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. 乳白色. 多すぎる泡で粒子を決定できない. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液.)	N/A

10

20

30

40

50

【表 1 1】

1.0% API-1, 0.76% 塩化ナトリウム, 1.0% ポビドン, 0.2% リン酸ナトリウム 緩衝剤, pH 7.2 BCL633-001-25	1 週	透明な溶液, ゲル化, わずかに乳白色. 目に見える粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; 透明な, 稠密な溶液, いくつか 乳白色)	103.4%
	2 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. 粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液, わずかに乳白色. 多すぎる泡で正確に読めない)	N/A
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. 乳白色. 多すぎる泡で粒子を決定できない (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液. 多すぎる泡で正確に読めない)	N/A
1.0% API-1, 0.56% 塩化ナトリウム, 1.0% ポビドン, 0.75% トロメタミン 緩衝剤, pH 8.1 BCL633-001-26	1 週	透明な溶液, ゲル化, わずかに乳白色. 目に見える粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; 透明な, 稠密な溶液, いくつか 乳白色)	99.7%
	2 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. 粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液. 多すぎる泡で正確に読めない)	N/A
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. 多すぎる泡で粒子を決定できない. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液. 多すぎる泡で正確に読めない)	N/A
1.0% API-1, 4.6% マニトール, 0.1% PS-80, 0.05% クエン酸緩衝剤, pH 5.5 BCL633-001-27	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, 目に見える粒子無し	101.6%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, いくつかの小さな粒子.	95.7%
1.0% API-1, 4.5% マニトール, 0.1% PS-80, 0.1% ヒスチジン 緩衝剤, pH 6.1 BCL633-001-28	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, 目に見える粒子無し	91.5%
	4 週	わずかに黄色の溶液, わずかに乳白色, いくつかの小さな粒子.	50.5%
1.0% API-1, 4.1% マニトール, 0.1% PS-80, 0.2% リン酸ナトリウム 緩衝剤, pH 7.2 BCL633-001-29	1 週	透明な無色の溶液, わずかに乳白色. 目に見える粒子無し.	78.9%
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色, 目に見える粒子無し, 粘稠	43.0%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色, 目に見える粒子無し, 粘稠	15.7%

10

20

30

40

50

【表 1 1】

1.0% API-1, 3.1% マニトール, 0.1% PS-80, 0.75% トロメタミン 緩衝剤, pH 8.1 BCL633-001-30	1 週	透明な無色の溶液. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し.	92.1%
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色, 目に見える粒子無し, 粘稠	47.0%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色, 目に見える粒子無し, 粘稠	18.6%
1.0% API-1, 4.6% マニトール, 1.0% ポビドン, 0.05% クエン酸緩衝剤, pH 5.5 BCL633-001-31	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, いくつかの粒子	101.0%
	4 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, いくつかの粒子	97.3%
1.0% API-1, 4.5% マニトール, 1.0% ポビドン, 0.1% ヒスチジン 緩衝剤, pH 6.1 BCL633-001-32	1 週	透明な無色の溶液. 乳白色無し. 目に見える粒子無し.	N/A
	2 週	わずかに黄色の溶液, 乳白色無し, いくつかの粒子	99.1%
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液.)	N/A
1.0% API-1 4.1% マニトール, 1.0% ポビドン, 0.2% リン酸ナトリウム 緩衝剤, pH 7.2 BCL633-001-33	1 週	透明な溶液. ゲル化. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; 透明な, 稠密な溶液. いくつか 乳白色)	79.0%
	2 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. 粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液. 多すぎる泡で正確に読めない)	N/A
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. 多すぎる泡で粒子を決定できない. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液. 多すぎる泡で正確に読めない)	N/A
1.0% API-1, 3.0% マニトール, 1.0% ポビドン, 0.75% トロメタミン 緩衝剤, pH 8.1 BCL633-001-34	1 週	透明な溶液. ゲル化. わずかに乳白色. 目に見える粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; 透明な, 稠密な溶液. いくつか 乳白色)	139.5%
	2 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. 粒子無し. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液. 多すぎる泡で正確に読めない)	N/A
	4 週	わずかに黄色の, ゲル化した材料. わずかに乳白色. 多すぎる泡で粒子を決定できない. (振とうすると再液化したサンプル; わずかに黄色の, 稠密な溶液. 多すぎる泡で正確に読めない)	N/A

【0205】

1週間の観察：ポビドンとリン酸ナトリウムまたはトロメタミンを含む溶液がゲル化した。リン酸ナトリウム、pH 7.2 緩衝液およびトロメタミン、pH 8.1 緩衝液で調製された Silk Derived Protein-4 (API-1、図 11) は、乳白色を示す唯一のサンプルであった。

【0206】

2週間の観察：ポビドンとリン酸ナトリウム、pH 7.2 またはトロメタミン pH 8.1 を含む溶液は、1 週間よりも固いゲルであった。ヒスチジン、ポビドンを含む pH 6.1 緩衝液がゲル化した。全体として、ほとんどのソリューションは 2 週間後に黄変し始めた

。濁度／乳白色を評価するための% T 500 nm法の改善は、外観試験後約4時間サンプルを沈降させ、気泡の形成を防ぐために穏やかに混合し、石英キュベットを使用して% T @ 500 nmを読み取ることによって確立された。これらの手順により、% T @ 500 nmを読み取るためのより堅牢な方法が可能になりた。一部のサンプルは1週目から厚くなり、さらにゲル化するかどうかモニターされた。

【0207】

4週間の観察：ポビドンとヒスチジンpH6.1、リン酸ナトリウム、pH7.2またはトロメタミンpH8.1を含む溶液がゲル化した。一部の溶液は粘稠になったが、ゲル化しなかった。低pHまたはクエン酸塩とポリソルベート-80で配合された溶液は、ポビドンよりも優れた性能を示した。マンニトールも塩化ナトリウムも、他より優れた性能を示さなかった。

【0208】

例7. ジグリシン緩衝液と賦形剤を使用した配合物前評価

配合物前の研究は、タンパク質を安定化するために一般的に使用される眼用賦形剤および一般的に使用される界面活性剤を含むジグリシン緩衝系を使用して実施された。表12は、ポリエチレングリコール-40 (PEG-40)、ジグリシン緩衝液、およびさまざまな糖（マンニトール、トレハロース、ソルビトール）を含むSDP-4の効果を示している。配合物は、0.2 μm PESフィルターを使用してろ過して粒子を除去し、40℃の温度条件下でタイプIボロシリケートガラス血清バイアルに保存し、3週間モニターした。粒子の形成により、すべての配合物がスクリーニングプロセスに不合格になった。

【0209】

【表12】

表12. PEG-40 及びジグリシン配合物システムの影響

成分	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4	Form. 5
PEG-40 (% wt./wt.)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ジグリシン(% wt./wt.)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
SDP-4 (% wt./wt.)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
マンニトール (% wt./wt.)	4.0	2.0	-	4.0	2.0
トレハロース (% wt./wt.)	-	4.0	-	-	4.0
ソルビトール (% wt./wt.)	-	-	4.0	-	-
pH (% wt./wt.)	6.4	6.9	6.9	5.6	5.5
浸透圧 (mOsm/L)	254	248	250	248	240
結果	粒子の形成. 不合格なスクリーニング*	粒子の形成. 不合格なスクリーニング*	粒子の形成. 不合格なスクリーニング*	粒子の形成. 不合格なスクリーニング*	粒子の形成. 不合格なスクリーニング*

【0210】

テトロニック1107とジグリシン緩衝液システムを使用して、追加の配合物研究を実施した。表13は、ジグリシン緩衝液システムを使用したTetronic 1107と、グリセロールとマンニトールを使用したSDP-4の効果を示している。配合物は、0.2 μm PESフィルターを使用してろ過して粒子を除去し、40℃の温度条件下でタイプIボロシリケートガラス血清バイアルに保存し、3週間モニターした。粒子の形成により、すべての配合物がスクリーニングプロセスに不合格になった。

【 0 2 1 1 】

【表 1 3】

表 13. Tetronic 1107 及びジグリシン緩衝剤システムの影響

成分	Form. 6	Form. 7	Form. 8	Form. 9
Tetronic 1107 (% wt./wt.)	1.0	0.5	1.0	0.5
ジグリシン(% wt./wt.)	0.15	0.15	0.15	0.15
SDP-4 (% wt./wt.)	1.0	1.0	1.0	1.0
グリセロール (% wt./wt.)	2.0	2.0	-	-
マニトール (% wt./wt.)	-	-	4.0	4.0
pH	7.2	7.1	7.2	6.9
浸透圧	252	254	256	248
結果	粒子の形成. 不合格なスクリーニング	粒子の形成. 不合格なスクリーニング	粒子の形成. 不合格なスクリーニング	粒子の形成. 不合格なスクリーニング

【 0 2 1 2 】

例 8. 配合物開発緩衝液の選択

例 1 - 4 の結果を踏まえて、SDP-4 の pH 要件を達成するために、pH 5.5 の 3 つの緩衝液の選択を評価した。これらの緩衝液には、10 および 50 mM の濃度のヒスチジン、アセテート、およびグルタミン酸緩衝液が含まれる。酢酸塩緩衝液は、酢酸ナトリウム (VWR) と酢酸 (VWR) を特定の比率で混合して、目的の pH に到達させる。ヒスチジン (VWR) およびグルタミン (VWR) 緩衝液は、1 M 塩酸 (Lab Chem) を使用して調整した。各緩衝液は、5.5 の望ましい pH 値に達するように調整された。Silk Derived Protein-4 を緩衝液に加え、精製水で希釈して、10 mM および 50 mM の望ましい緩衝液濃度にした。配合物中の SDP-4 の最終濃度を 1.0 % wt. / wt に希釈した。次に、配合された SDP-4 をポリエーテルスルホンフィルター (VWR) を使用して濾過し、タイプ I のガラスボロシリケートバイアルに分注した (Prince Sterilization)。バイアルを 40 °C の安定チャンバーに 8 週間入れた。pH と粒子数の初期および最終測定は、Orion VersaStar pH メーターと Coulter Particulate Counter を使用して実行された。図 6 は、40 °C および 75 % の相対湿度の保管条件下での 8 週間後の粒子数を表している。グルタミン酸および酢酸塩緩衝液は、ヒスチジン緩衝液と比較して粒子形成を阻害した。すべてのグルタミン酸および酢酸塩緩衝液は、本質的に目に見える粒子を含んでいなかった。図 7 は、最初と 8 週間後の配合物の pH を示し、これらの配合物で発生した pH ドリフトを示している。グルタミン酸は SDP-4 の pH を維持するには不十分であったが、50 mM の酢酸塩とヒスチジンの緩衝液は経時的に溶液の pH を維持するのに効果的であった。有効な緩衝能力と観察された低い粒子形成を考慮して、酢酸緩衝配合物がその後の研究のために選択された。25 mM の最終緩衝液濃度が、評価された緩衝液強度の中間点として選択された。これは、配合物の pH を維持するための要件を満たすためである。

【 0 2 1 3 】

例 9. S D P - 4 配合物に対する浸透圧の影響

酢酸緩衝配合物の安定性に対する浸透圧の影響を監視するための研究が行われた。それぞれ 25 mM 酢酸塩緩衝液と 1.0 % w t . / w t を含む 2 つの配合物。S D P - 4 は、180 および 290 m O s m / k g の浸透圧に到達するために、さまざまなレベルのマニトールで配合された。配合物化された S D P - 4 アセテート緩衝配合物は、P E S フィルターを使用してろ過され、初期の粒子がすべて除去され、タイプ I のガラスボロシリケートバイアルに分注された。バイアルを 40 °C の安定チャンバーに入れ、毎日モニターした。図 8 は、これら 2 つの配合物の結果を示している。図から、浸透圧 290 m O s m / k g の配合物は、浸透圧 180 m O s m / k g の配合物が 14 日間安定している場合、1 日以内に不合格になることがわかる。不合格になる配合物の基準は、10 ~ 25 μ m の粒子サイズで 1 mL あたり 50 粒子カウントを超えるものである。この研究は、S D P - 4 配合物の物理的安定性が配合物の浸透圧に依存することを示した。

【0214】

例 10. 浸透圧を増加させる励起物質の選択

次の賦形剤は、配合物の浸透圧を増加させると考えられた：塩化ナトリウム (N a C l)、塩化マグネシウム (M g C l ₂)、マニトール、およびデキストロース。例 5 に記載の最初のスクリーニングの結果は、グリセロール、ポビドン、塩化カルシウム (C a C l ₂)、トレハロース、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、およびポリエチレングリコール 400 (P E G 400) を含む一般的に使用される賦形剤を除外した。

【0215】

乾燥抽出繊維を、生産規模の反応器で必要な温度と圧力で 240 分間反応させた。S D P / L i B r 中間体は、ベンチトップ T F F ユニットで分画され、S D P - 4 になった。酢酸ナトリウム (V W R) と酢酸 (V W R) を含む酢酸塩緩衝液を、指定された比率で混合して、所望の酢酸塩緩衝液の pH が 5.4 になるようにした。次に、沈殿物を酢酸塩緩衝液に加え、続いて S D P - 4 を加えた。アセテート緩衝液の最終濃度は 25 mM で、S D P - 4 の最終濃度は 1.0 % w t . / w t であった。すべての賦形剤は、180 m O s m / k g の目標浸透圧に達するようにさまざまな量で添加された。次に、配合物をポリエーテルスルホンフィルター (V W R) を使用して濾過し、タイプ I のガラスボロシリケートバイアルに分注した (Prince Sterilization)。バイアルを 25 °C および 40 °C の安定チャンバーに入れ、外観テストと C o u l t e r 微粒子カウンターを使用して微粒子を評価した。表 14 に、使用した原材料とその製造元のリストを示す。

【0216】

【表 14】

表 14. 賦形剤 及びそれらの製造業者

賦形剤	製造業者	賦形剤	製造業者
酢酸ナトリウム三水和物	J.T. Baker	マニトール	J.T. Baker
氷酢酸	J.T. Baker	塩化ナトリウム	J.T. Baker
超精製ポリソルベート 20	Croda	塩化マグネシウム	J.T. Baker
超精製ポリソルベート 80	Croda	デキストロース	J.T. Baker

【0217】

表 15 は、タイプ I ボロシリケートガラスの配合の 2 週間の観察結果をまとめたものである。M g C l ₂ の目に見える粒子スクリーニング中に、粒子は 25 °C では形成されなかったが、40 °C では破片および球形のような粒子を形成し始めたことが確認された。デキストロース配合物は、25 °C でマニトール配合物よりも少ない粒子を形成した。さらに、塩はより少ない凝集体を形成するが、ゲル化を受けやすいことが観察された。逆に、糖

はゲル化を遅らせますが、より多くの凝集体を形成する。したがって、塩と砂糖のブレンドは、粒子の形成とゲル化を未然に防ぐのに最適である。

【0218】

【表15】

表 15. 目に見える粒子のための賦形剤スクリーニング

配合物 (% by 浸透圧寄与)	粒子の記述 at 25 °C	粒子の記述 at 40 °C
100% マニトール	破片状の粒子, <10 per 20 mL の溶液.	破片 及び繊維状の 粒子 >25 粒 子 in 20 mL 溶液.
100% NaCl	破片状の粒子, <10 per 20 mL の溶液.	破片 及び球状の粒子 > 25 粒子 in 20 mL 溶液.
100% MgCl ₂	目に見える粒子無し.	破片 及び球状の粒子 > 25 個の粒子 in 20 mL 溶液.
100% デキストロース	破片状の粒子, <5 個 per 20 mL の溶液.	破片 及び繊維状の 粒子 >25 個の粒子 in 20 mL 溶液.
50% NaCl/50% デキストロース	破片状の粒子, < 10 個 per 20 mL の溶液.	破片 及び球状の粒子, 10~25 個の粒子 in 20 mL 溶液.
50% MgCl ₂ /50% デキストロース	破片状の粒子, <5 個 per 20 mL の溶液.	破片 及び球状の粒子, 10~25 個の粒子 in 20 mL 溶液.
50% NaCl/50% マニトール	破片状の粒子, <5 個 per 20 mL の溶液.	破片 及び球状の粒子 >25 個の粒子 in 20 mL 溶液.
50% MgCl ₂ /50% マニトール	破片状の粒子, <5 個 per 20 mL の溶液.	破片 及び球状の粒子 >25 個の粒子 in 20 mL 溶液.
70% NaCl/30% マニトール	破片状の粒子, <10 個 per 20 mL の溶液	破片 及び球状の粒子 >25 個の粒子 in 20 mL 溶液.
30% NaCl/70% マニトール	破片状の粒子, <10 個 per 20 mL の溶液	破片 及び球状の粒子 >25 個の粒子 in 20 mL 溶液.

【0219】

図 9 は、表 15 に示されている目に見えない粒子測定の定式化を表している。塩化マグネシウムとデキストロースは、塩化ナトリウムとマンニトールに比べて粒子の形成が少なくなっている。50%のMgCl₂と50%のデキストロースの組み合わせは、目に見えない粒子を最も少なく形成する。

【0220】

例 11. 界面活性剤の選択

点眼液に使用できる 2 つの公定性界面活性剤、ポリソルベート 20 およびポリソルベート 80 を C r o d a から入手し、表 16 に示す濃度で評価した。すべての配合物は、21.5 mM 酢酸ナトリウム、3.5 mM 酢酸、および 1.0 % w t. / 重量 S D P - 4 を使用して製造され、タイプ E ポロシリケートガラスに 40 °C / 75 % の相対湿度で 12 週間保管した。外観、pH、UV / V i s による総タンパク質、および C o u l t e r 法によってテストされた粒子状物質の分析が実行された。表 16 は、賦形剤濃度ごとの配合物を示し、表 17 は、12 週間後のスクリーニングの結果を示している。表 17 には、外観試験に合格した（本質的に目に見える粒子がない）配合物のみが示されている。これらの配合物はすべてポリソルベート 80 を含んでいる。ポリソルベート 20 配合物は、界面活性剤を含まない配合物よりもさらに多くの視覚的粒子を形成した。スクリーニングの結果は、ポリソルベート 80 を含む配合物が U S P < 789 > の基準を使用して粒子

状物質を通過し、pHと総タンパク質含有量を維持していることを示した。図10は、ポリソルベート-80を含まない配合物の結果を示し、図11は、ポリソルベート-80とポリソルベート-20を含む配合物間の粒子数の結果を示している。この研究の結果は、SDP-4配合物の長期的な物理的安定性を維持するために界面活性剤が必要であることを示した。ただし、正しい界面活性剤も選択する必要がある。ポリソルベート-20とポリソルベート-80は化学構造が非常に似ているが、ポリソルベート-80は粒子形成を阻害することにより、SDP-4配合物の安定性を高める。ポリソルベート-20は粒子の形成を促進する。

【0221】

【表16】

表 16. SDP-4 配合物のための界面活性剤スクリーニング

配合物 ID	MgCl ₂ (mM)	デキストロース (mM)	ポリソルベート-80 (% wt./wt.)	ポリソルベート-20 (% wt./wt.)
1	N/A	N/A	N/A	N/A
2	38	39	N/A	N/A
3	38	39	0.1%	N/A
4	38	39	N/A	0.1%
5	54	N/A	N/A	N/A
6	N/A	130	N/A	N/A
7	38	39	0.05%	N/A
8	38	39	0.25%	N/A
9	38	39	0.50%	N/A
10	54	N/A	0.10%	N/A
11	N/A	130	0.10%	N/A
12	38	39	N/A	0.05%
13	38	39	N/A	0.50%
14	54	N/A	N/A	0.10%

【0222】

【表17】

表 17. 12 週後の配合物の分析

配合物 ID	粒子			pH	合計タンパク質 (% wt./wt.)
	目に見える粒子	10~25 μm	>25 μm		
3	1	30	3	5.426	1.073
7	1	14	1	5.352	1.058
8	0	13	0	5.365	1.060
9	0	49	1	5.338	1.057
10	0	17	1	5.323	1.053
11	1	9	1	5.493	1.057

【0223】

例 12. 標準的な眼科用緩衝液の配合物スクリーニング

他の一般的に使用される眼科用緩衝液が、既知の粒子抑制性賦形剤（塩化マグネシウム

、デキストロース、ポリソルベート-80)と組み合わせて粒子形成を阻害する同じ結果をもたらすかどうかを調査するために、追加の配合物研究を行った。リン酸ナトリウム、クエン酸リン酸、および塩酸トリスを含む3つの緩衝液の選択が調査された。

【0224】

リン酸ナトリウム一塩基性一水和物(J. T. ベイカー)とリン酸ナトリウム二塩基性12-水和物(J. T. ベイカー)を所望の比率で混合して、pH 7.0を達成した。クエン酸一水和物とリン酸ナトリウム二塩基性物質を所望の比率で混合して、7.0のpHを達成した。トリス塩酸塩(J. T. Baker)は、水酸化ナトリウム(VWR)を使用して滴定し、7.0の望ましいpHを達成した。塩化マグネシウム六水和物と無水デキストロースはJ. T. ベイカーから購入し、ストック溶液中に混合した。Super Refined Polysorbate 80はCrodaから購入した。

10

【0225】

配合の添加順序は次のとおりである。ポリソルベート-80を最初に添加し、次に水量の80%を添加し、次に緩衝液ストック溶液、次に塩化マグネシウムとデキストロースを添加した。次に、Silk Derived Protein-4を添加し、最後に水を添加した。

【0226】

次に、配合物をポリエーテルスルホンフィルター(VWR)を使用してろ過し、タイプIのガラスボロシリケートバイアルに分注した(Prince Sterilization)。バイアルを40℃および75%相対湿度の安定チャンバーに入れ、外観試験を使用して微粒子を評価した。スクリーニングの結果を表18に示す。

20

【0227】

30

40

50

【表 18】

表 18. 標準眼科緩衝剤の配合物スクリーニング

配合物	配合物の pH	浸透圧 (mOsm/kg)	安定チャンバー中の時間 *	結果
20 mM リン酸ナトリウム, 38 mM 塩化マグネシウム, 39 mM デキストロース, 0.05% wt./wt. ポリソルベート-80, 及び 1.0% wt./wt. SDP-4	7.1	167	0 日	水酸化ナトリウムによる滴定中の不溶性粒子の形成. 不合格なスクリーニング.
20 mM Citric Phosphate, 29 Mm 塩化マグネシウム, 29 mM デキストロース, 0.05% wt./wt. ポリソルベート-80, 及び 1.0% wt./wt. SDP-4	7.0	190	0 日	水酸化ナトリウムによる滴定中の不溶性粒子の形成. 不合格なスクリーニング.
20 mM Tris Hydrochloride, 40 mM 塩化マグネシウム, 41 mM デキストロース, 0.05% wt./wt. ポリソルベート-80, 及び 1.0% wt./wt. SDP-4	6.9	190	6 週	1mL あたり 2 個を超える可視粒子. 不合格なスクリーニング.

* 安定チャンバー中の時間 = 40 °C / 75% 相対湿度.

【0228】

研究の結果は、リン酸ナトリウム、リン酸クエン酸、および塩酸トリスを既知の粒子抑制性賦形剤（塩化マグネシウム、デキストロース、ポリソルベート-80）と組み合わせて配合した配合物が粒子形成を抑制しないことを示している。緩衝液のうちの2つ、リン酸ナトリウムとリン酸クエン酸は、所望の pH への滴定中にすぐに不溶性の粒子を形成した。トリス塩酸塩は、40 °Cの保管条件下で6週間後に外観スクリーニングテストに不合格になった。

【0229】

例 13. 標準的な界面活性剤を使用した配合物開発

他の一般的に使用される眼科用界面活性剤が、既知の粒子阻害剤（塩化マグネシウム、デキストロース、酢酸塩）と組み合わせて粒子形成を阻害するのと同じ結果をもたらすかどうかを調査するために、追加の配合物研究を行った。4つの界面活性剤の選択が調査され、ポロキサマー 188、ポロキサマー 407、ポリエチレングリコール 300、ポリエチレングリコール 400、およびポリエチレングリコール 600が含まれている。

【0230】

配合の添加順序は、所望の水分量の80%を添加した後、界面活性剤、塩化マグネシウム、デキストロース、酢酸ナトリウム三水和物、氷酢酸を直接添加した。次に、すべての賦形剤が完全に溶解するまで配合物を混合した。次に、Silk Derived Protein-4を追加し、最後に水を追加した。

【0231】

次に、配合物をポリエーテルスルホンフィルター（VWR）を使用してろ過し、タイプⅠのガラスボロシリケートバイアルに分注した（Prince Sterilization）。バイアルを40℃および75%相対湿度の安定チャンバーに入れ、外観試験を使用して微粒子を評価した。スクリーニングの結果を表19に示す。

【0232】

【表19】

表19. 標準眼科界面活性剤を使用する配合物スクリーニング

界面活性剤	配合物の pH	浸透圧 (mOsm/kg)	安定チャンバー中の時間 *	結果
20 mM 酢酸塩緩衝剤, 37 mM 塩化マグネシウム, 38 mM デキストロース, 1.0% wt./wt. SDP-4, 及び Poloxamer 188 (0.05% wt./wt.)	5.5	180	1 週	1mL あたり 2 個を超える可視粒子 不合格なスクリーニング。
20 mM 酢酸塩緩衝剤, 37 mM 塩化マグネシウム, 38 mM デキストロース, 1.0% wt./wt. SDP-4, 及び Poloxamer 407 (0.05% wt./wt.)	5.5	179	3 週	1mL あたり 2 個を超える可視粒子 不合格なスクリーニング。
20 mM 酢酸塩緩衝剤, 37 mM 塩化マグネシウム, 38 mM デキストロース, 1.0% wt./wt. SDP-4, 及び ポリエチレングリコール (PEG) 300 (0.05% wt./wt.)	5.5	181	1 週	1mL あたり 2 個を超える可視粒子 不合格なスクリーニング。
20 mM 酢酸塩緩衝剤, 37 mM 塩化マグネシウム, 38 mM デキストロース, 1.0% wt./wt. SDP-4, 及び ポリエチレングリコール (PEG) 400 (0.05% wt./wt.)	5.5	180	2 週	1mL あたり 2 個を超える可視粒子 不合格なスクリーニング。
20 mM 酢酸塩緩衝剤, 37 mM 塩化マグネシウム, 38 mM デキストロース, 1.0% wt./wt. SDP-4, 及び ポリエチレングリコール (PEG) 600 (0.05% wt./wt.)	5.5	182	2 週	1mL あたり 2 個を超える可視粒子 不合格なスクリーニング。

* 安定チャンバー中の時間 = 40℃ / 75% 相対湿度。

【0233】

研究の結果は、ポロキサマー188、ポロキサマー407、PEG-300、PEG-400、およびPEG-600を他の粒子抑制性賦形剤（塩化マグネシウム、デキストロース、ポリソルベート-80）と配合した配合物が粒子形成を抑制しないことを示してい

る。表 19 のすべての項目で、界面活性剤は 1 ～ 3 週間のスクリーニングプロセスに不合格になった。

【 0 2 3 4 】

例 14. S D P - 4 点眼液医薬品

投与量フォーム：シルク由来タンパク質 - 4 (S D P - 4) 滅菌局所点眼液医薬品 (D P) には、使い捨てバイアルに S D P - 4 原薬 (D S) が含まれている。浸透圧剤は、180 m O s m / k g (± 1 %) の浸透圧を確立するように調整される (表 21 - 23)。

【 0 2 3 5 】

【表 21】

表 21. S D P - 4 0.1% wt./wt. 医薬品製剤の組成物

成分	単位あたりの量 (wt./wt.)	機能	品質標準
SDP-4 DS	0.1%	原物質	仕様を参照
酢酸ナトリウム 三水和物	0.248%	緩衝剤	USP
氷酢酸	0.011%	緩衝剤	USP
塩化マグネシウム 六水和物	0.813%	浸透圧剤	USP
デキストロース 一水和物	0.813%	浸透圧剤	USP
ポリソルベート-80	0.050%	界面活性剤	USP, 超精製

【 0 2 3 6 】

【表 22】

表 22. S D P - 4 1.0% wt./wt. 医薬品製剤の組成物

成分	単位あたりの量 (wt./wt.)	機能	品質標準
SDP-4 DS	1.0%	原物質	仕様を参照
酢酸ナトリウム 三水和物	0.248%	緩衝剤	USP
氷酢酸	0.011%	緩衝剤	USP
塩化マグネシウム 六水和物	0.752%	浸透圧剤	USP
デキストロース 一水和物	0.753%	浸透圧剤	USP
ポリソルベート-80	0.050%	界面活性剤	USP, 超精製

【 0 2 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 23. SDP-4 3.0 % wt./wt. 医薬品製剤の組成物

成分	単位あたりの量 (wt./wt.)	機能	品質標準
SDP-4 DS	3.0%	原物質	仕様を参照
酢酸ナトリウム 三水和物	0.248%	緩衝剤	USP
氷酢酸	0.011%	緩衝剤	USP
塩化マグネシウム 六水和物	0.651%	浸透圧剤	USP
デキストロース 一水和物	0.654%	浸透圧剤	USP
ポリソルベート- 80	0.050%	界面活性剤	USP, 超精製

10

【 0 2 3 8】

容器の種類と投与フォームの閉鎖：DPは、0.512～0.589 gの充填範囲の単一単位用量（SUD）低密度ポリエチレン（LDPE）バイアルで供給された。DPとバイアルは、BFSバイアルへのDPの滅菌充填プロセスを利用してブローフィルシール（BFS）製造を行い、20 μL～50 μLの液滴体積サイズを可能にした。

20

【 0 2 3 9】

医薬品の容器とクロージャーの種類：ブローフィルシール（BFS）プロセスを使用して、LDPEから総液量1 mLのシールされたSUDを作成した。

【 0 2 4 0】

【表 2 4】

表 24. SDP-4 医薬品製剤の組成物

成分	BFS 単位あたりの量 (wt./wt.)	機能	品質標準
SDP-4 DS	0.1 ～ 15.0% wt./wt.	原物質	仕様を参照
酢酸ナトリウム 三水和物	0.10 ～ 1.0% wt./wt.	緩衝剤	USP
氷酢酸	0.01 ～ 0.1% wt./wt.	緩衝剤	USP
塩化マグネシウム 六水和物	0.10 ～ 2.0% wt./wt.	浸透圧剤	USP
デキストロース 一水和物	0.10 ～ 2.0% wt./wt.	浸透圧剤	USP
ポリソルベート- 80	0.02 ～ 2.0% wt./wt.	界面活性剤	USP, 超精製

30

40

【 0 2 4 1】

安定性試験は、表 2 1～2 3に含まれる配合物で実施された。安定性研究の環境条件は40℃／75%相対湿度であった。初期測定は、製造時および6か月の時点で行われた。各配合物は、外観、pH、浸透圧、および粒子状物質についてテストされた。表 2 5－2 7に、安定性研究の結果を示す。配合物は、粒子形成を阻害し、低密度ポリエチレン容器

50

クロージャー内で 40℃ / 75% 相対湿度の条件下で溶液の pH と浸透圧を維持することが示されている。配合物化作業の開発と要約により、通常は治療用タンパク質に不利な保管条件下での市販の眼科に有利な容器クロージャー内のすべての仕様を満たす配合物が得られた。

【0242】

【表 25】

表 25. SDP-4 0.1% wt./wt. 医薬品製剤の安定性結果

属性	仕様	初期	6 月
外観	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い
pH	5.2 – 5.7	5.5	5.6
浸透圧	160 – 200 mOsm/kg	187	189
粒子物	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ 50 個以下 (NMT) per mL 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ 5 個 NMT per mL 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ 2 個 NMT per mL	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ 2 個 per mL 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ 0 個 per mL 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ 0 個 per mL	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ 4 個 per mL2 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ 1 個 per mL2 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ 1 個 per mL2
仕様を満たす	合格	合格	合格

【0243】

【表 26】

表 26. SDP-4 1.0% wt./wt. 医薬品製剤の安定性結果

属性	仕様	初期	6 月
外観	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い
pH	5.2 – 5.7	5.5	5.6
浸透圧	160 – 200 mOsm/kg	183	187
粒子物	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ NMT 50 個 per mL 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ NMT 5 個 per mL 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ NMT 2 個 per mL	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ 2 個 per mL 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ 0 個 per mL 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ 0 個 per mL	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ 6 個 per mL2 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ 3 個 per mL2 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ 0 個 per mL2
仕様を満たす	合格	合格	合格

【0244】

10

20

30

40

50

【表 27】

表 27. SDP-4 3.0% wt./wt. 医薬品製剤の安定性結果

属性	仕様	初期	6 月
外観	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い	透明な、わずかに黄色の、目に見える粒子が本質的に無い
pH	5.2 – 5.7	5.5	5.6
浸透圧	160 – 200 mOsm/kg	162	182
粒子物	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ NMT 50 個 per mL 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ NMT 5 個 per mL 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ NMT 2 個 per mL	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ 5 個 per mL 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ 0 個 per mL 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ 0 個 per mL	粒子 $\geq 10 \mu\text{m}$ 11 個 per mL ² 粒子 $\geq 25 \mu\text{m}$ 3 個 per mL ² 粒子 $\geq 50 \mu\text{m}$ 2 個 per mL ²
仕様を満たす	合格	合格	合格

10

【0245】

例 15. ドライアイの治療：SDP-4 を使用した場合と使用しない場合の眼科用配合物
この研究の主な目的は、12 週間（84 日）の治療期間にわたってDED を患う被験者におけるSDP-4 点眼液の安全性と有効性を評価することであった。

20

【0246】

研究デザイン：

これは、中等度から重度のDED の被験者におけるSDP-4 点眼液の眼および全身の安全性と有効性を評価するために設計された、フェーズ 2、多施設、ダブルマスク、ランダム化、車両制御、用量反応、並行グループ研究であった。12 週間（84 日）の治療期間にわたる両眼（OU）。

【0247】

被験者は、並行グループで 1 : 1 : 1 : 1 の比率でSDP-4 点眼液またはビヒクルの 3 つの濃度（0.1%、1.0%、および 3.0%）の 1 つにランダム化された。すべての試験薬（IP）（SDP-4 濃度およびビヒクル）は、ホイルポーチに密封された単回使用用量（SUD）容器で提供された。被験者、調査員、および研究評価の実施を担当するすべての現場担当者は、治療の割り当てにマスクされたままであった。

30

【0248】

IP は、局所的な眼への点滴注入により、1 眼あたり 1 滴、1 日 2 回（BID）、12 週間（84 日間）投与された。両方の目が治療された。12 週間のランダム化された治療期間に先立つ BID 車両での 2 週間のスクリーニング／慣らし期間。

【0249】

被験者は、試験に参加するために、訪問 1／スクリーニングおよび訪問 2／日 1 でドライアイの症状評価（SAND E）の合計スコアが 40 以上である必要がある。他のすべての包含／除外基準を満たす適格な SAND E スコアを持つ被験者の場合、訪問 2／日 1 で涙液崩壊時間（TBUT）が短い眼が研究眼として指定された。両方の目が同じ TBUT スコアを持っている場合、Schirmer のテストスコアが低い方の目がスタディアイとして指定された。両方の目が同じ TBUT と Schirmer のテストスコアを持っている場合、右目が研究目として指定された。

40

【0250】

研究は、7 回の診療所訪問、スクリーニング期間中の 2 回の訪問、および治療訪問時の 5 回の訪問で構成された。訪問 1（-14 日目 ± 2 / スクリーニング訪問）、続いて BI

50

D車両での2週間の慣らし期間、訪問2（1日目／確認およびランダム化訪問）、訪問3（7日目±2）、訪問4（14日目±2）、訪問5（28日目±2）、訪問6（56日目±4日目）および訪問7（84日目±4／研究終了時の評価）。

【0251】

被験者が持続的な乾いた目の症状を訴えた場合、その部位は、必要な場合にのみ使用される、保存されていない人工の涙（スポンサーによって提供された）を被験者に提供することを許可された。対象は、サイトが人工涙の使用を評価するための説明責任を果たすことができるように、訪問のたびにすべての使用済みおよび未使用の人工涙を返却することであった。研究訪問前の2時間以内に人工涙液を使用することはできませんであった。

【0252】

有効性の測定

有効性は、DED症状（SAND E合計スコア、視覚的アナログスケール（VAS）で評価された個々の症状：かゆみ、異物感、灼熱感／刺痛、視力変動、目の乾燥、目の不快感、光恐怖症、および目の痛み）の評価によって測定された。および兆候（TBUT、Schirmerのテスト〔麻酔〕、角膜フルオレセイン染色、結膜リサミンググリーン染色、および結膜高血症）（図12）。すべての有効性評価は、訪問および検査のスケジュールに示されている時点で実施された。

【0253】

一次有効性変数

主要な有効性エンドポイント（SAND E）は、治療グループおよび訪問ごとの継続的な要約統計を使用して要約された。一次分析では、従属変数がベースラインスコアからの変化、治療グループが固定効果、ベースラインスコアが共変量、訪問が被験者の反復測定である反復測定混合モデルを利用した。データがランダムに欠落しているという仮定の下で、反復測定混合モデルを使用して、欠落しているデータの影響を説明した。最小二乗平均を使用して、車両に対するSDP-4の各濃度をテストした。主要エンドポイントの感度分析は、繰り越された最後の観測（LCF）を使用して実行された。

【0254】

有効性の分析

ベースラインでは、平均合計SAND Eスコアは67～71ユニット（0～100スケール）の範囲であった。この測定値は、すべての治療グループで7日目から改善（値の減少）し、研究全体を通して改善し続けた。主要なアウトカム指標である84日目では、この指標の平均減少は、0.1%、1.0%、3.0%のSDP-4グループと車両グループでそれぞれ25、30、25、26であった。表28、図13-15を参照してください。開始SAND Eスコアが70以上の患者を含む患者集団の平均合計SAND Eスコア差（アクティブグループとビークルグループ）は、28日後まで統計的に有意ではないであった（ $p=0.2839\sim0.7952$ 、図15A）。したがって、ビヒクル配合物は、ドライアイの症状に対する効果的な治療も提供する。ただし、Amlisimod 1%配合物は、開始SAND Eスコアが70以上の患者を含まず、集団全体で有意な改善を示した患者亜集団に対して、ビヒクルよりも統計的に効果的であった（図15B）。これは、SDP-4（Amlisimod）配合物（表22）が乾燥眼の治療に非常に効果的であることを示している。

【0255】

10

20

30

40

50

【表 28】

表 28. 合計 SANDE スコア (ITT 母集団) 中のベースラインからの平均変化

訪問 統計	ビヒクル (N=76)
スクリーニング	
N	76
平均 (SD)	73.00 (13.949)
中央値	74.83
最小, 最大	44.7, 100.0
日 1	
N	76
平均 (SD)	69.22 (15.087)
中央値	66.67
最小, 最大	42.4, 100.0
日 7	
N	76
平均 (SD)	60.30 (20.663)
中央値	64.91
最小, 最大	0.0, 100.0
ベースラインからの変化	
n	76
平均 (SD)	-8.92 (15.906)
中央値	-4.92
最小, 最大	-60.5, 14.8
LS 平均, SE (1)	-8.90, 1.88
LSM 差異, SE (2)	
95% CIs (2)	
p 値 (3)	
日 14	
n	76
平均 (SD)	54.67 (24.179)
中央値	57.28
最小, 最大	5.7, 99.5
ベースラインからの変化	
n	76
平均 (SD)	-14.55 (21.156)
中央値	-8.35
最小, 最大	-76.0, 26.3
LS 平均, SE (1)	-14.53, 2.23
LSM 差異, SE (2)	
95% CIs (2)	
p 値 (3)	
日 28	
n	76
平均 (SD)	49.54 (26.147)
中央値	49.75
最小, 最大	2.7, 99.5
ベースラインからの変化	

10

20

30

40

50

【表 28】

訪問統計	ビヒクル (N=76)
n	76
平均 (SD)	-19.68 (22.805)
中央値	-12.06
最小, 最大	-77.8, 10.2
LS 平均, SE (1)	-19.66, 2.45
LSM 差異, SE (2)	
95% CIs (2)	
p 値 (3)	
日 56	
n	76
平均 (SD)	48.52 (26.605)
中央値	50.00
最小, 最大	2.0, 100.0
ベースラインからの変化	
n	76
平均 (SD)	-20.70 (25.790)
中央値	-13.56
最小, 最大	-90.0, 22.4
LS 平均, SE (1)	-20.67, 2.64
LSM 差異, SE (2)	
95% CIs (2)	
p 値 (3)	
日 84	
n	76
平均 (SD)	43.56 (27.691)
中央値	45.45
最小, 最大	0.0, 100.0
ベースラインからの変化	
n	76
平均 (SD)	-25.66 (26.685)
中央値	-18.75
最小, 最大	-85.9, 26.3
LS 平均, SE (1)	-25.64, 2.89
LSM 差異, SE (2)	
95% CIs (2)	
p 値 (3)	

10

20

30

【0256】

40

スケール：0－100（無しから重大）

テストの統計と推定値は、非構造化共分散構造を使用した反復測定としての治療グループとの相互作用および訪問と共変量としてベースラインをベースライン値から変更した場合の、制限された最大可能性の反復測定混合モデルからのものである。

（１）治療グループごとの最小二乗（LS）平均および標準誤差（SE）。

（２）治療効果：SDP-4と車両間の最小二乗平均（LSM）差、標準誤差（SE）、および95%信頼区間（CI）。

（３）SDP-4と車両を比較したp値。

【0257】

特定の実施形態は、開示された実施形態および例を参照して上で説明されてきたが、そ

50

のような実施形態は、例示にすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。変更および修正は、以下の特許請求の範囲で定義されるように、そのより広い態様において本発明から逸脱することなく、当技術分野における通常の技術に従って行うことができる。

【0258】

すべての出版物、特許、および特許文書は、参照により個別に組み込まれるかのように、参照により本明細書に組み込まれる。本開示と矛盾する制限は、そこから理解されるべきではない。本発明は、様々な特定の好ましい実施形態および技術を参照して説明されてきた。しかしながら、本発明の精神および範囲内にとどまりながら、多くの変形および修正を行うことができることを理解されたい。

本発明に関連して、以下の内容を更に開示する。

【1】

(a) フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、およびアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、天然フィブロインと少なくとも4%異なる、フィブロイン由来タンパク質組成物であって；

フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖とフィブロイン軽タンパク質鎖との間のシステインジスルフィド結合が減少または排除され；当該タンパク質組成物のセリン含有量は、ネイティブフィブロインと比較して25%以上減少しており、

しかも、セリン含有量は少なくとも約5%であり；フィブロイン由来タンパク質組成物の平均分子量は15 kDaから36 kDaの間である、前記のフィブロイン由来タンパク質組成物；

(b) ポリソルベート-80；

(c) 1つ以上の緩衝剤；

(d) 1つ以上の浸透圧剤；

を含む配合物であって、

ここで、10マイクロメートル以上の直径を有する粒子に関して、4℃から40℃で12週間を超える貯蔵期間後、4.5から6.0のpHおよび50/mL以下の粒子数を有する、前記の配合物。

【2】

タンパク質組成物が46.5%を超えるグリシンアミノ酸を含み、タンパク質組成物が30.5%を超えるアラニンアミノ酸、またはそれらの組み合わせを含む、【1】に記載の配合物。

【3】

タンパク質組成物が、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%を超えて減少し、その結果、タンパク質組成物が8%未満のセリンアミノ酸を含む、【1】に記載の配合物。

【4】

タンパク質組成物のタンパク質鎖の50%超が10 kDaから40 kDaの範囲内の分子量を有する、【1】に記載の配合物。

【5】

フィブロイン由来タンパク質組成物の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、およびアラニン含有量の合計の差に関して少なくとも6%だけ天然フィブロインと異なり；フィブロイン由来タンパク質の平均分子量は約15 kDaから約30 kDaであり；配合物のpHは約5.2から約5.8の間である、【1】に記載の配合物。

【6】

フィブロイン由来タンパク質組成物が約15 kDaから約25 kDaの平均分子量を有し、配合物のpHが5.3から5.7である、【1】に記載の配合物。

【7】

フィブロイン由来タンパク質組成物が約18 kDaから約25 kDaの平均分子量を有する、【1】に記載の配合物。

【8】

フィブロイン由来タンパク質の重量%が約0.05%から約10%である、[1]に記載の配合物。

[9]

配合物の浸透圧が約170mOsm/kgから約300mOsm/kgである、[1]に記載の配合物。

[10]

緩衝剤が、ヒスチジン、酢酸塩、クエン酸塩、グルタミン酸塩、またはそれらの組み合わせを含む、[1]に記載の配合物。

[11]

緩衝剤によって形成される緩衝剤濃度が約10ミリモルから約50ミリモルであるか、または配合物中の1つ以上の浸透圧剤のそれぞれの濃度が約30ミリモルから約40ミリモルである、[10]に記載の配合物。

10

[12]

緩衝剤が、約0.1重量%~約1重量%の酢酸ナトリウムおよび約0.01重量%~約0.1重量%の酢酸を含む、[11]に記載の配合物。

[13]

浸透圧試薬が単糖、無機塩、またはそれらの組み合わせを含む、[1]に記載の配合物。

[14]

浸透圧試薬が、マンニトール、デキストロース、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、またはそれらの組み合わせを含む、[13]に記載の配合物。

20

[15]

浸透圧試薬が、約0.10重量%~約2重量%のデキストロースおよび約0.10重量%~約2重量%の塩化マグネシウムを含む、[14]に記載の配合物。

[16]

ポリソルベート-80の重量%が約0.02%から約2%である、[1]に記載の配合物。

[17]

配合物がガラスまたはポリエチレンを含む容器中に保存され、場合により、容器がタイプIボロシリケートガラスまたはLDPEである、[1]に記載の配合物。

[18]

(a) フィブロイン由来タンパク質の一次アミノ酸配列が、セリン、グリシン、およびアラニンのアミノ酸含有量の合計差の絶対値に関して、天然フィブロインと少なくとも6%異なる、約0.1重量%から約3重量%のフィブロイン由来タンパク質であって；

30

フィブロイン由来タンパク質のフィブロイン重タンパク質鎖とフィブロイン軽タンパク質鎖との間のシステインジスルフィド結合が減少または排除され；フィブロイン由来タンパク質は、46%を超えるグリシンアミノ酸と30%を超えるアラニンアミノ酸を含み；当該フィブロイン由来タンパク質のセリン含有量は、ネイティブフィブロインタンパク質と比較して40%を超えて減少しており、その結果、フィブロイン由来タンパク質は、8%未満のセリンアミノ酸を含み；フィブロイン由来タンパク質の平均分子量は約15kDaから約35kDaである、前記のフィブロイン由来タンパク質；

40

(b) ポリソルベート-80；

(c) 約10ミリモルから約50ミリモルの酢酸塩緩衝液；及び

(d) 1つ以上の浸透圧剤；

含む水性配合物であって、

直径10マイクロメートル以上の微粒子に関して、4℃~40℃で12週間以上の保管期間後の微粒子数が50/mL以下であり；5.2から5.8のpH；及び175mOsm/kgから185mOsm/kgの浸透圧を有する、前記の配合物。

[19]

酢酸塩緩衝液が、約0.2重量%~約0.3重量%の酢酸ナトリウムおよび約0.01重量%~約0.03重量%の酢酸を含む、[18]に記載の配合物。

50

〔 2 0 〕

浸透圧剤が、約 0.6 重量% から約 0.9 重量% のデキストロースおよび約 0.6 重量% から約 0.9 重量% の塩化マグネシウム六水和物を含む、〔 1 9 〕 に記載の配合物。

〔 2 1 〕

ポリソルベート 80 の重量% が約 0.01 % から約 0.1 % である、〔 2 0 〕 に記載の配合物。

〔 2 2 〕

眼疾患を有する対象に、〔 1 〕 ～ 〔 2 1 〕 のいずれかに記載の配合物の有効量を投与し、それにより眼疾患を治療することを含む、眼疾患を治療するための方法。

〔 2 3 〕

眼疾患がドライアイ症候群である、〔 2 2 〕 に記載の方法。

【 図面 】

【 図 1 】

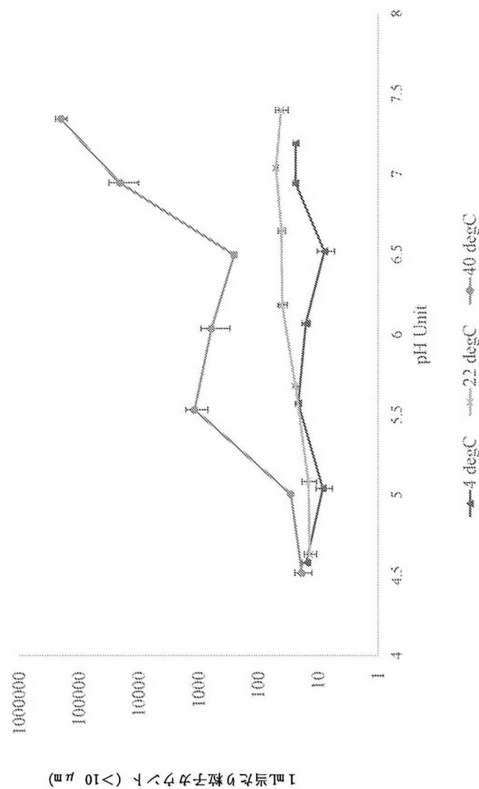


図 1

【 図 2 】

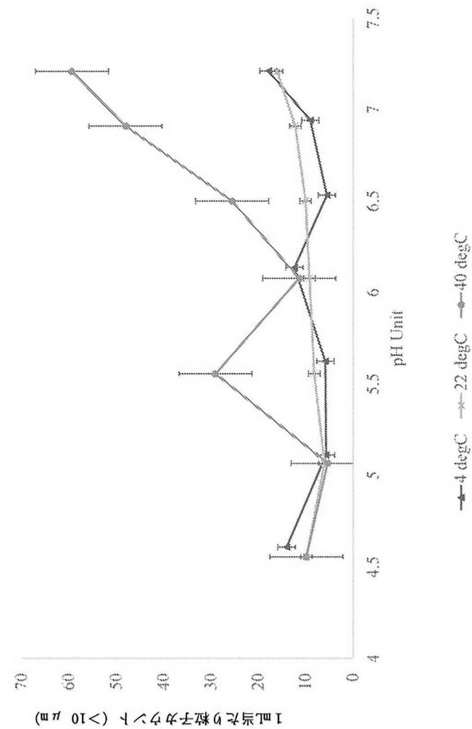


図 2

10

20

30

40

50

【図 3】

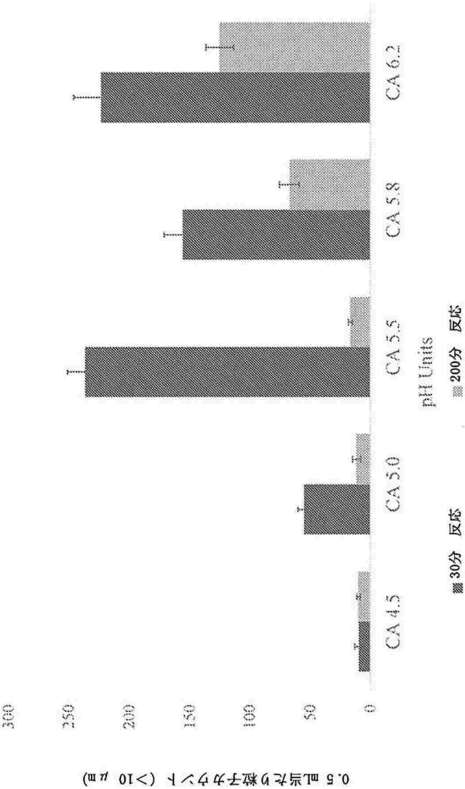


図 3

【図 4】

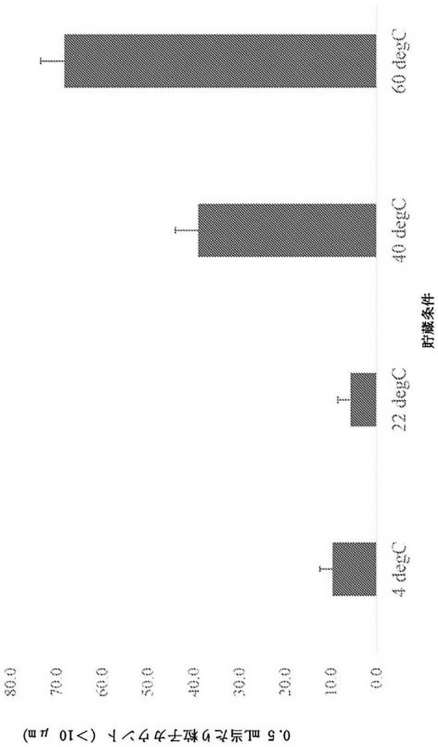


図 4

【図 5】

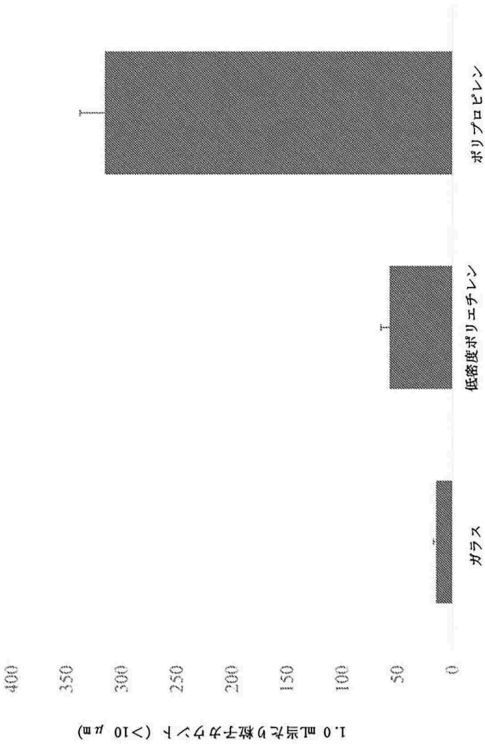


図 5

【図 6】

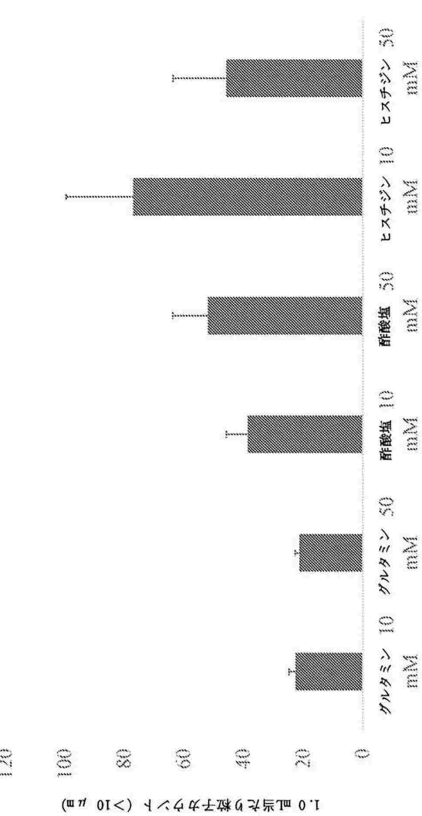


図 6

【図 1 1】

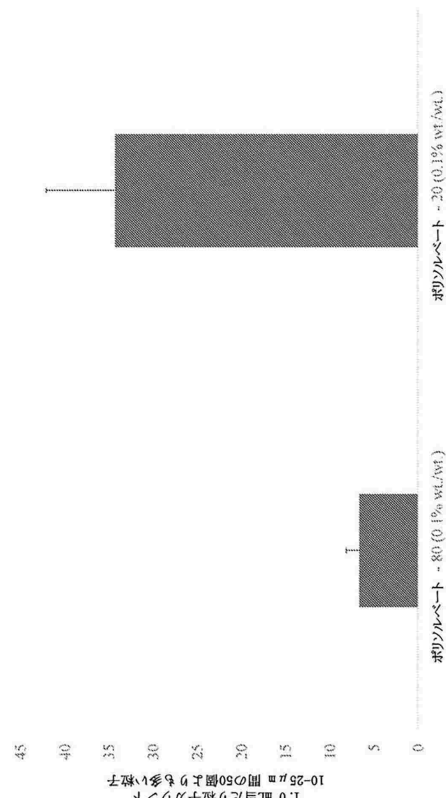


図 11

【図 1 2】



図 12

【図 1 3】

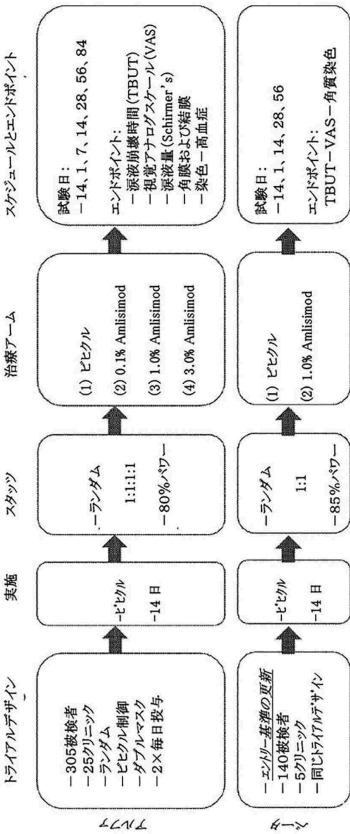


図 13

【図 1 4 A】

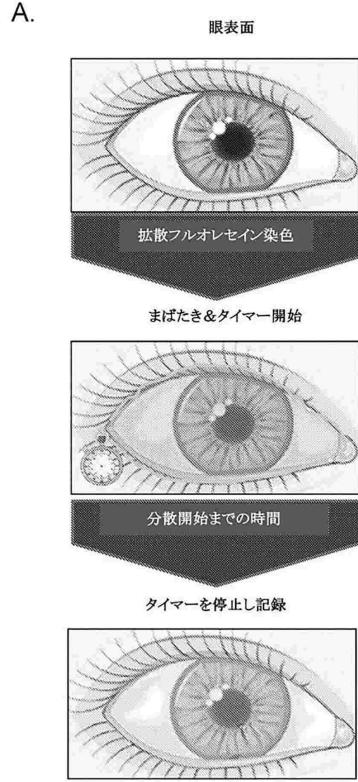
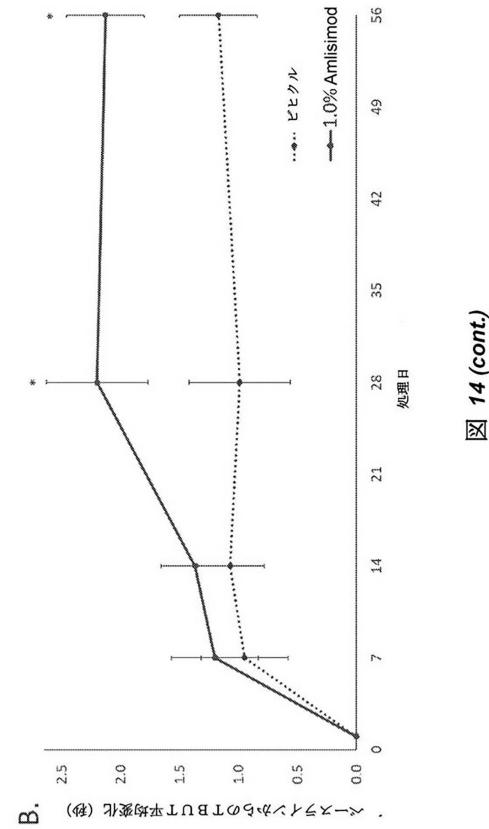


図 14

【図 1 4 B】



【図 1 5 A】

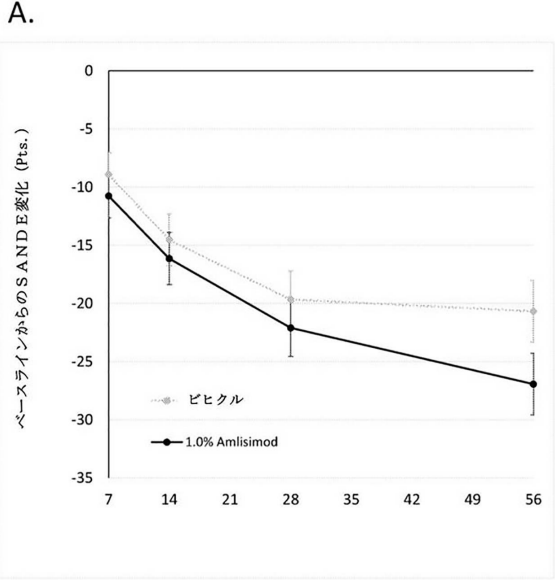


図 14 (cont.)

図 15

【図 1 5 B】

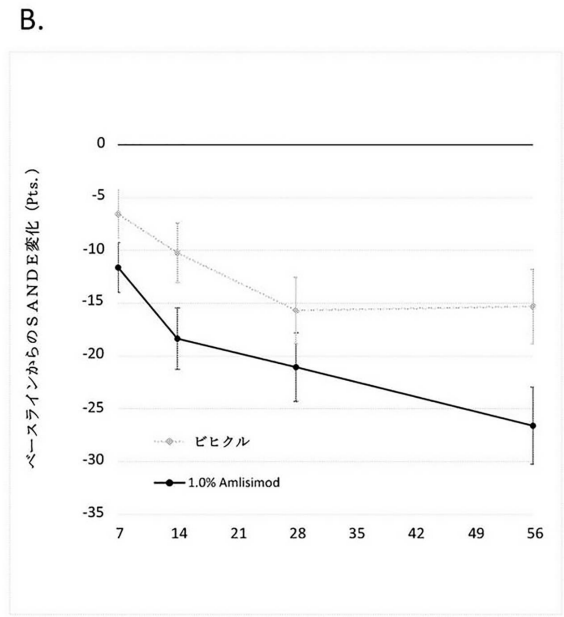


図 15 (cont.)

【配列表】

0007670704000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/18	(2017.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02
C 0 7 K	14/435	(2006.01)	C 0 7 K	14/435

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/094,748

(32)優先日 令和2年10月21日(2020.10.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

3 7 0 0、スウィート 1 0 5

(72)発明者 バイ、ユエ

アメリカ合衆国 5 5 4 4 7 ミネソタ、プリマス、アナポリス レイン ノース 3 7 0 0、スウィート 1 0 5

(72)発明者 ポールソン、ニコラス

アメリカ合衆国 5 5 4 4 7 ミネソタ、プリマス、アナポリス レイン ノース 3 7 0 0、スウィート 1 0 5

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特表 2 0 1 9 - 5 3 1 3 3 4 (J P , A)

特表 2 0 1 5 - 5 0 8 1 0 4 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 5 2 7 6 1 2 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 1 7

A 6 1 P 2 7 / 0 4

A 6 1 P 2 7 / 0 2

A 6 1 K 9 / 0 8

A 6 1 K 4 7 / 2 6

A 6 1 K 4 7 / 1 8

A 6 1 K 4 7 / 1 2

A 6 1 K 4 7 / 0 2

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)