



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115397454 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202180026116.0

(22) 申请日 2021.03.30

(30) 优先权数据

63/002,882 2020.03.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/024954 2021.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/202577 EN 2021.10.07

(71) 申请人 立美基股份有限公司

地址 日本东京

(72) 发明人 马里卡·G·里乌特 吉恩锡

埃尔顿·阿列克西 山本直树

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

专利代理师 董世豪 张淑珍

(51) Int.Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书23页

序列表6页 附图24页

(54) 发明名称

通过辐照对自组装肽进行灭菌

(57) 摘要

伽马射线和电子束辐照提供了对某些自组装肽(包括溶液中的RADA16)的有效灭菌,而不会实质性降解主要肽,而例如另一种自组装肽QLEL12在辐照后显著降解。辐照灭菌增强了例如RADA16水凝胶一经施用至处于生理pH的组织的流变特性。流变特性的增强可以在各种生物医学应用中产生更高的功效。

1. 一种对自组装肽 (SAP) 溶液进行灭菌的方法, 所述方法包括:
 - a) 将装有自组装肽溶液的一个或多个容器放入辐照机中, 所述自组装肽在被施用至处于约中性pH的生物组织时能够形成水凝胶; 以及
 - b) 将所述容器暴露于预定剂量的伽马射线、X射线和/或电子束辐照, 以使所述肽溶液在所述肽没有实质性降解的情况下被灭菌至预定的无菌保证水平 (SAL), 同时其期望的生物学或物理学特性保持在实质上相同的水平或得到改善。
2. 如权利要求1所述的方法, 其中, 所述肽选自于由RADA16、KLD12和IEIK13所组成的组。
3. 如权利要求2所述的方法, 其中, 所述剂量为15kGy-50kGy。
4. 如权利要求1-3所述的方法, 其中, 通过X射线或电子束对所述溶液进行辐照。
5. 如权利要求2-4所述的方法, 其中, 所述肽溶液含有约2.5%的RADA16, 并且所述剂量为15kGy-24kGy。
6. 如权利要求1-5所述的方法, 其中, 在辐照后降解的总 (“总体”) 的肽的量不超过辐照前所述肽的量的20%。
7. 如权利要求1-6所述的方法, 其中, 所述期望的生物学和物理学特性选自于由如下所组成的组: 止血、抗粘连、防止再出血、抗狭窄、组织封塞、黏膜提升、伤口愈合、储能模量、粘度和组织空隙填充特性。
8. 如权利要求7所述的方法, 其中, 所述自组装肽溶液的辐照前生物负载为每产品单位9CFU或更少。
9. 如权利要求1-8所述的方法, 其中, 辐照剂量达到至少 10^{-6} 的无菌保证水平 (SAL)。
10. 如权利要求1-9所述的方法, 其中, 辐照后溶液中的全长肽 (“主要肽”) 的降解产物的浓度范围为0.1%至5%。
11. 如权利要求1-10所述的方法, 其中, 所述溶液在辐照前和辐照后的pH范围为约1.8至3.5。
12. 如权利要求1-11所述的方法, 其中, 所述溶液容器是塑料注射器。
13. 如权利要求1-12所述的方法, 其中, 在辐照后, 凝胶化溶液的储能模量增加至少10%。
14. 如权利要求1-13所述的方法, 所述方法进一步包括剪切所述溶液以降低或恢复其储能模量。
15. 通过权利要求1-14中任一项所述的方法制备的自组装肽的经灭菌溶液。
16. 一种使用权利要求15所述的经灭菌溶液的方法, 所述方法包括将所述溶液施用至生物组织。
17. 如权利要求16所述的方法, 其中, 在涉及出血的创伤之后或手术期间施用所述经灭菌溶液。
18. 如权利要求17所述的方法, 其中, 将所述经灭菌溶液施用于人类受试者的内部部位。
19. 如权利要求1所述的方法, 其中, 所述自组装肽溶液表现出实质上如图2-图6的相应的辐照后图谱中所示的和/或如实施例 (例如在PuraStat[®]的情况下, 在836/1670、1100和1513m/z处观察到额外的主要的 M_z 峰) 所述的辐照后质谱 (MS) 图谱。

20. 自组装肽的经灭菌溶液用于治疗或预防疾病或病症的用途,其中,所述经灭菌溶液通过权利要求1-19中任一项所述的方法获得。

通过辐照对自组装肽进行灭菌

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求于2020年3月31日提交的美国临时申请号63/002,882的优先权。

技术领域

[0003] 本发明涉及某些医用凝胶的灭菌,更具体而言,涉及含有所谓的自组装肽的凝胶的灭菌。

背景技术

[0004] 自组装肽(有时缩写为“SAP”)是当被置于水性环境中以及发生周围条件的化学或物理变化时自发组装成高度组织化的纳米结构的一种肽。另一种众所周知的结构是由天然胶原蛋白形成的纳米纤维生物聚合物结构。与本发明相关的一类SAP由能够形成 β -折叠的交替的亲水和疏水氨基酸残基组成。它们在中性水中自主地组装成有序的纳米结构,而当对它们施加高剪切力时,它们可以暂时拆解成单个分子。SAP可根据其环境(例如pH和/或渗透压)形成水凝胶(也称为SAP凝胶);例如当它们被置于处于接近中性的体内时,它们能够形成水凝胶。SAP凝胶先前已被描述为用于多种医疗应用,例如改善伤口愈合、诱导体内稳态;减少内部组织的粘连,特别是在手术的情况下;作为临时的组织空隙基质填充物,促进天然组织向内生长到这种空隙中。具体的SAP描述于美国专利号5,670,483;5,955,343;9,724,448;10,596,225和国际专利申请公开W02014/136081;及其外国同族。

[0005] 灭菌是大多数生物材料(包括自组装肽溶液)制造过程中非常重要的步骤。

PuraStat[®] (RADA16=Ac-RADARADARADARADA-NH₂=SEQ ID NO:1;约2.5%)通常进行过滤用于灭菌(参见例如国际专利申请公开号W0 2014/008400);然而,在较高浓度下**PuraStat[®]**的粘度是其过滤的主要障碍,除了管中的损失外,还会引起实质性的肽损失。在该灭菌方法中,迫使SAP溶液通过多孔过滤器,其中,灭菌过滤器具有0.22 μ m的平均孔径(美国专利申请号2015/019735)。作为另一种方法,一些热稳定的自组装肽溶液可以通过在约121 $^{\circ}$ C下高压灭菌处理约25分钟来灭菌(美国专利申请号10/369,237)。

[0006] 此外,**PuraStat[®]**产品的外部还需要额外的环氧乙烷灭菌步骤。并且,发现高压灭菌不能用于某些SAP,例如溶液中的RADA16,因为其完全热降解(美国专利申请公开号2017/0202986)。因此,需要另一种新的灭菌方法来减少损失,特别是对于RADA16和其它SAP。

[0007] 在先前的出版物(美国专利申请公开号2016/0317607;第[0052]段)中附带地描述了包括RADA16在内的自组装肽的伽马辐照灭菌;但到目前为止,辐照对包括RADA16在内的自组装肽的结构和性质的实际影响和具体条件还未有描述。事实上,肽的结构可以被通过辐照(例如伽马射线、X射线和电子束)产生的活性自由基所改变。这种结构变化可由多种因素控制,包括氨基酸组成、反应性残基位置以及可能的由各个大分子获得的构象(Vieira R等,Biol.Pharm.Bull.2013,36(4)664-675)。例如,无论该文章中肽的不同序列如何,所有被测试的九种肽在高达15kGy的伽马射线辐照下都显示出进行性降解。考虑到灭菌过程可

能需要比15kGy甚至更高的辐照剂量,许多肽不能用伽马射线辐照灭菌而不实质性降解。众所周知,芳香族氨基酸(即苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)、组氨酸(H)和脯氨酸(P))和含硫氨基酸(即,半胱氨酸(C))的侧链特别易受到活性自由基的攻击(Annul.Rev.Biochem., 62,797-821(1993)和Vieira R等,Biol.Pharm.Bull.2013,36(4)664-675)。作为背景,以下SAP不包含芳香族氨基酸或含硫氨基酸:RADA16(Ac-RADARADARADARADA-NH₂(SEQ ID NO:1))、KLD12(Ac-KLDLKLKLDL-NH₂(SEQ ID NO:2))和IEIK13(Ac-IEIKIEIKIEIKI-NH₂(SEQ ID NO:3))。

[0008] 另一方面,辐照灭菌也可影响自组装肽的二级结构及其纤维结构。如所述的,RADA16、KLD12和IEIK13具有 β -折叠构象,并且这些分子自组装形成有序的纳米纤维结构。辐照灭菌过程可潜在地改变肽的二级结构和纳米纤维结构,这可随后引起其流变特性的不期望的变化。

[0009] 因此,存在对有利地对自组装肽发挥作用的新灭菌方法的需求。由于上文引述原因,迄今为止一直避免通过辐照灭菌。

附图说明

[0010] 图1.以28kGy进行伽马辐照之前(图1A)和之后(图1B)的PuraStat[®](RADA16 2.5%)和IEIK13 1.3%的外观。

[0011] 图2.PuraStat[®](RADA16 2.5%)的质谱:(A)伽马辐照前,(B)以40kGy进行伽马辐照后,以及(C)以121°C高压灭菌20min后。

[0012] 图3.PuraStat[®](RADA16 2.5%)的质谱:(A)以25kGy进行X射线辐照后,以及(B)以40kGy进行X射线辐照后。

[0013] 图4.PuraStat[®](RADA16 2.5%)的质谱:(A)以25kGy进行电子束辐照后,以及(B)以40kGy进行电子束辐照后。

[0014] 图5.IEIK13 1.3%的质谱:(A)辐照前;(B)以40kGy进行伽马辐照后;(C)以25kGy进行X射线辐照后;(D)以40kGy进行X射线辐照后;(E)以25kGy进行电子束辐照后;以及(E)以40kGy进行电子束辐照后。

[0015] 图6.QLEL12 0.15%的质谱:(A)辐照前;(B)以23kGy进行伽马辐照后;(C)以25kGy进行X射线辐照后,(D)以40kGy进行X射线辐照后,(E)以25kGy进行电子束辐照后,以及(F)以40kGy进行电子束辐照后。

[0016] 图7.用40mm锥-板以0.1%应变进行的经伽马辐照的PuraStat[®](RADA16 2.5%)的频率测试(N=3,棒代表SD)。

[0017] 图8.用40mm锥-板以0.1%应变进行的凝胶化后的经伽马辐照的PuraStat[®](RADA16 2.5%)的频率测试。用DMEM处理样品20min(N=3,棒代表SD)。

[0018] 图9.以1Hz频率和0.1%应变用40mm锥-板进行的经伽马辐照的PuraStat[®](RADA16 2.5%)的触变测试。在以1000s⁻¹进行第一次剪切前,测量初始储能模量(G')1分钟。第一次剪切1分钟后,记录G'的恢复1小时以显示PuraStat[®]的触变行为。重复该测试。

[0019] 图10.高分辨率MS(当前PuraStat[®]产品(未辐照),建议的PuraStat[®]产品(经辐

照))。

发明内容

[0020] 在本公开中,评价了通过辐照灭菌对自组装肽溶液的影响,具体而言,用以下肽进行评价: **PuraStat**[®] (Ac-RADARADARADARADA-NH₂, RADA16 (SEQ ID NO:1))、IEIK13 (Ac-IEIKIEIKIEIKI-NH₂ (SEQ ID NO:3)) 和 QLEL12 (Ac-QLELQLELQLEL-NH₂ (SEQ ID NO:4))。意外地发现,伽马辐照灭菌增强了某些自组装肽溶液和水凝胶的流变特性而没有预期的值得注意的降解,而某些其它肽在伽马辐照后表现出预期的显著降解和粘度下降(即与RADA16和IEIK13不同),而例如另一自组装肽QLEL12 (Ac-QLELQLELQLEL-NH₂ (SEQ ID NO:4))在辐照后显著降解。本发明进一步基于如下的预见性发现:至少对于相应的肽而言,用其它类似的辐照灭菌方法(具体而言包括X射线和电子束)可以预期相同的结果。因此,在一些实施方式中,对自组装肽溶液进行灭菌的方法包括:

[0021] a) 将装有自组装肽溶液的一个或多个容器放入辐照机中,所述自组装肽在被施用至处于约中性pH的生物组织时能够形成水凝胶;以及

[0022] b) 将容器暴露于预定剂量的伽马射线、X射线和/或电子束辐照下,使得肽溶液在没有肽的实质性降解的情况下被灭菌,同时其期望的生物学和/或流变学特性保持在相同水平或得到改善。

[0023] 在一些实施方式中,肽选自于由RADA16、KLD12和IEIK13组成的组。在相关实施方式中,将此类肽暴露于15-50kGy、优选15-40kGy的剂量、更优选地暴露于产生期望的无菌保证水平(SAL)的最小剂量,而没有这些肽的生物学特性的实质性负面变化和/或实质性降解。在一些实施方式中,通过伽马射线、X射线或电子束对肽溶液进行辐照。在一些实施方式中,辐照后溶液中总肽的整体降解不超过辐照前肽量的20%,更优选10%,最优选5%。在一些实施方式中,期望的生物学或物理学特性选自于由如下所组成的组:止血、抗粘连、防止再出血、抗狭窄、组织封塞、储能模量(例如在一些实施方式中,在辐照后,凝胶化溶液的储能模量增加至少10%、至少15%或至少20%)和粘度以及组织空隙填充特性,这些特性在辐照后保持在可接受的或改进的参数内。在一些实施方式中,辐照剂量达到至少10⁻⁵、优选10⁻⁶或更低的无菌保证水平(SAL)。在其它实施方式中,使用下文实施例中描述的生物负载测试,辐照前肽溶液的污染的可接受水平为1000CFU、500CFU、100CFU、15CFU、10CFU、9CFU、5CFU、2CFU、1.5CFU、1CFU或更少。在一些实施方式中,辐照后溶液中完整(“主要”或“全长”)肽的降解产物的浓度范围为0.1%到5%。在一些实施方式中,辐照后肽溶液的pH范围为约1.8至3.5。在一些实施方式中,溶液容器是带有或不带有适配喷嘴的塑料注射器。在此类实施方式中,注意确保包装的塑料和橡胶部分也保持其期望的物理特性。虽然可预期塑料注射器的些许变黄并且这是正常的,但任何橡胶化材料都必须将其塑料性能保持在可接受的水平。

[0024] 在一些实施方式中,使胶凝化溶液进一步经受剪切以降低或恢复其储能模量。

[0025] 因此,本发明提供了用于自组装肽的灭菌方法。根据本发明的方法,在一些实施方式中,例如在涉及出血的创伤之后或在手术期间,将溶液进一步施用于生物组织。

具体实施方式

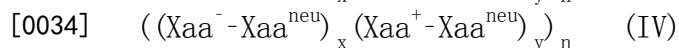
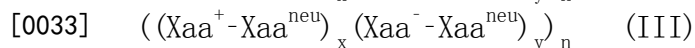
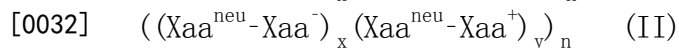
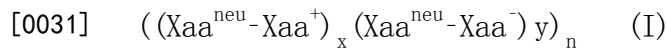
[0026] 如上所述,在本公开中,评价了辐照灭菌对自组装肽溶液的影响,具体而言,用以下肽进行评价: PuraStat[®] (Ac-RADARADARADARADA-NH₂, RADA16 (SEQ ID NO:1))、IEIK13 (Ac-IEIKIEIKIEIKI-NH₂ (SEQ ID NO:3))、以及QLEL12 (Ac-QLELQLELQLEL-NH₂ (SEQ ID NO:4))。在一些实施方式中,对自组装肽溶液进行灭菌的方法包括:

[0027] a) 将装有自组装肽溶液的一个或多个容器放入辐照机中,所述自组装肽在被施用至处于约中性pH的生物组织(例如原位)时能够形成水凝胶;以及

[0028] b) 将容器暴露于预定剂量的伽马射线、X射线和/或电子束辐照,使得肽溶液在肽没有实质性降解的情况下被灭菌到预定的无菌保证水平(SAL),同时其期望的生物学和/或物理学特性则保持在实质上相同水平或得到改善。

[0029] 出人意料地发现,伽马辐照灭菌增强了某些自组装肽溶液和水凝胶的流变特性而没有引起任何值得注意的降解,而某些其它肽在伽马辐照后表现出显著的降解和粘度下降,即与RADA16和IEIK13不同,另一自组装肽QLEL12 (Ac-QLELQLELQLEL-NH₂ (SEQ ID NO:4)) 在辐照后显著降解。本发明进一步基于如下的预见性发现:至少对于相应的肽而言,用其它类似的辐照灭菌方法(具体而言包括X射线和电子束)可以预期相同的结果。在优选的实施方式中,本发明的组合物和方法保持或改善期望的生物学特性,例如止血、抗粘连、防止再出血、抗狭窄、组织封塞、储能模量、粘度和组织空隙填充性能等。例如在一些实施方式中,储能模量增加了至少5%、10%、15%、20%或更多。如果这种增加对于某些应用来说是不期望的,则可以通过本领域已知的方法稀释或剪切来进一步使凝胶变稀,将其变成溶液或以其它方式降低其储能模量。在某些实施方式中,SAP的经辐照溶液保持清澈而粘稠。

[0030] 在一些实施方式中,SAP包含符合式I-式IV中的一个或多个的氨基酸残基序列:



[0035] Xaa^{neu}表示电荷中性的氨基酸残基;Xaa⁺表示带正电荷的氨基酸残基;Xaa⁻表示带负电荷的氨基酸残基;x和y独立地是值为1、2、3或4的整数;并且n是值为1-5的整数。

[0036] 在一些实施方式中,SAP进一步包含与细胞外基质相互作用的氨基酸序列,其中,该氨基酸序列将SAP锚定至细胞外基质。

[0037] 在一些实施方式中,SAP中的氨基酸残基可以是天然存在的或非天然存在的氨基酸残基。天然存在的氨基酸可以包括由标准遗传密码编码的氨基酸残基以及非标准氨基酸(例如具有D构型而不是L构型的氨基酸),以及那些可以通过标准氨基酸的修饰形成的氨基酸(例如吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸)。合适的非天然存在的氨基酸包括但不限于D-别异亮氨酸(2R,3S)-2-氨基-3-甲基戊酸、L-环戊基甘氨酸(S)-2-氨基-2-环戊基乙酸。

[0038] 在其它实施方式中,可自组装的另一类材料是肽模拟物(petidomimetics)。如本文所使用的,肽模拟物是指模拟肽结构的分子。肽模拟物具有与其母体结构(多肽)类似的一般特征,例如两亲性。此类肽模拟材料的实例描述于Moore等,Chem.Rev.101(12),3893-4012(2001)。肽模拟材料可分为四类:α-肽、β-肽、γ-肽和δ-肽。也可以使用这些肽的共聚物。α-肽肽模拟物的实例包括但不限于N,N'-连接的寡脲、寡聚吡咯啉酮

(oligopyrrolinones)、噁唑烷-2-酮、azatides和氮杂肽。 β -肽的实例包括但不限于 β -肽折叠体、 α -氨基酸、含硫 β -肽类似物和胍基肽。 γ -肽的实例包括但不限于 γ -肽折叠体、寡脲、寡氨基甲酸酯和磷酸二酯。 δ -肽的实例包括但不限于基于烯炔的 δ -氨基酸和carbopeptoids,例如基于吡喃糖的carbopeptoids和基于呋喃糖的carbopeptoids。

[0039] 在某些实施方式中,SAP是由Arch Therapeutics, Inc. (参见www.archtherapeutics.com)制造的AC5®、AC5-V®、AC5-G™或TK45(也被称为AC1)。

[0040] 在一些实施方式中,SAP溶液被包含在“储存和/或药物递送系统”中,例如适用于本文所述肽组合物的储存和/或递送系统,例如小瓶、瓶、烧杯、袋、注射器、安瓿、药筒、储液器或LYO-JECTS®。储存和/或递送系统不必是同一的,而可以是分开的。在具体实施方式中,SAP以含有约10mL、约7.5mL、约5mL、约2.5mL、约1mL、或约0.5mL的SAP溶液的塑料注射器的形式提供。在某些实施方式中,塑料(例如塑料注射器)在辐照后可能出现淡黄色调,这是正常的,并且不影响其中包含的SAP溶液的生物医学特性。

[0041] 在一些实施方式中,此类储存和递送系统可以进一步包含“喷嘴”,“喷嘴”指通常细窄的圆柱形物体,通常具有窄端和宽端,适于固定在本文所述的递送装置上。在一些实施方式中,术语“喷嘴”和“套管”可互换使用。喷嘴由两个连接点或末端组成:用于连接到递送系统(例如注射器)的第一连接点或末端,以及可充当给予药物组合物递送的位点或充当用于连接至辅助装置(例如导管)的位点的第二连接点。

[0042] 因此,本发明提供了制备自组装肽的灭菌溶液的方法。本发明还提供了可将此类经灭菌溶液例如在涉及出血的创伤之后或在手术期间施用于生物组织(例如原位)的用途,或经如此地灭菌的溶液在治疗或预防其它疾病或病症中的用途;例如,如国际专利申请W02014/133027中所述,或如美国专利申请公开号2011/02101541中所述并用于堵塞组织损伤部位;或如美国专利申请公开号2016/0287744中所述用于血管栓塞;或如美国专利申请号16/085,803中所述用于脑脊液渗漏堵塞;或如国际专利公开申请号W02013/133414中所述作为黏膜提升剂;或如国际专利公开申请号W02014/141160中所述用于胆漏堵塞;或如美国专利申请号16/885,753中所述用于组织的抗粘连;或如美国专利申请号16/085,804中所述用于胰瘘堵塞;或如美国专利申请号15/124,639中所述用于支气管阻塞;或如国际专利申请公开号W02015/138,478中所述用于治疗肺大泡塌陷;或如国际专利申请公开号W02015/019,738中所述用于治疗肺漏;或如国际专利申请公开号W02015/196020中所述用于填充牙骨空隙;或如美国专利申请公开号2017/0128622中所述用于填充骨空隙;或如美国专利申请号16/312,878中所述用于内窥镜解剖后的食管结构的预防,以及任何上述出版物的国外同族,以及本领域已知的其它方法。因此,在一些实施方式中,本发明提供了自组装肽的经灭菌溶液用于治疗或预防上述疾病或病症的用途,其中,所述经灭菌溶液通过本发明的方法获得。在某些此类实施方式中,自组装肽溶液表现出实质上如图2-图6的相应的辐照后图谱所示的和/或如实施例中所描述的辐照后质谱(MS)图谱。例如在PuraStat®的情况下,在836/1670、1100和1513m/z处观察到额外的主要的 M_z 峰。

[0043] 平均生物负载 $<1,000$ CFU是PuraStat®在灭菌前的典型无菌状态。在这种情况下,要达到 10^{-6} 的无菌保证水平(SAL),辐照剂量范围应在25kGy和40kGy之间。使用伽马射线和X射线方法,总体肽的约高达20%可能在灭菌过程中降解。使用电子束方法,总体肽的约高达

10%可能在灭菌过程中降解。在通过伽马射线、X射线灭菌后，PuraStat[®]流变性增强，这可以正面或负面地改变其止血功效。但是，在电子束灭菌后PuraStat[®]流变性不改变。

[0044] 在某些实施方式中，使用下文在实施例中描述的生物负载测试，肽溶液辐照前的可接受污染水平可为每个产品单位<1000CFU、<500CFU、<100CFU、<15CFU、<10CFU、<9CFU、<5CFU、<2CFU、<1.5CFU、<1CFU、或更少。优选的生物负载在灭菌前是<9CFU。因此，在9CFU条件下，辐照剂量范围可以在15kGy和24kGy之间选择。虽然辐照剂量范围的下限可由辐照前产品的生物负载决定，但该范围的上限是根据辐照机的配置和选择来选择的，并设置为达到期望的无菌保证水平(SAL)所需的最小值。

[0045] 使用伽马射线和X射线方法，高达10%的肽可能在灭菌过程中降解。使用电子束方法，肽在灭菌过程中可能不显著降解。即使在这种情况下，PuraStat[®]流变性在伽马射线和X射线灭菌后也会增强，这可能会在一定程度上正面或负面地改变其止血功效。由此，如果期望流变学特性无变化或最小地变化并且期望其止血性能，PuraStat[®]流变性在电子束灭菌后不变化并因此可能是优选的。因此，对于PuraStat[®]，可能特别优选电子束辐照。

[0046] 在一些实施方式中，辐照后溶液中降解的全长肽(“主要肽”)的浓度范围为0.1%至5%、0.1%至4%、0.1%至3%、0.1%至2.5%、0.1%至2%、或0.1%或1.5%或更低。在一些实施方式中，以总剂量辐照RADA16、KLD12或IEIK13溶液，该总剂量可能取决于其辐照前的生物负载，包括例如15-50kGy、25kGy+/-15kGy、40kGy-10kGy、35kGy-10kGy、30kGy-10kGy、15kGy-24kGy、25kGy-10kGy、20kGy-10kGy、10kGy-15kGy和12kGy-14kGy。12kGy-14kGy左右的剂量似乎对伽马射线辐照而言最优，然而，肽溶液也可以用X射线或电子束以类似剂量辐照。

[0047] 在一些实施方式中，“储存和/或药物递送系统”(例如包含在泡罩包装中的塑料注射器)以每次至少100单位、200单位、300单位、400单位、500单位、600单位、700单位、800单位、900单位、1000单位、2,000单位、3,000单位、4,000单位、5,000单位、6,000单位、7,000单位、8,000单位、9,000单位、10,000单位或更多单位分批进行辐照。通常，优选辐照批次中任何样品的总暴露量不超过100kGy、更优选60kGy、最优选50kGy或如本文所述的更少。

[0048] 在一些实施方式中，辐照后主要肽的降解(也称为“全长肽的降解”)不超过辐照前肽量的20%，并且优选不超过18%、16%、14%、12%、10%、8%、5%、3%或1%。在一些实施方式中，总剂量在足以实现溶液的必要无菌性的一段时间内实现。例如40kGy的剂量可以通过6.3kGy/hr的辐射强度而被递送约6小时21分钟。其它组合可见于实施例1。在一些实施方式中，在数小时内递送恒定剂量，例如约10小时、约9小时、约8小时、约7小时、约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、或约2小时。

[0049] 在一些实施方式中，使用仪器用例如约23kGy、约25kGy、约28kGy或约40kGy的伽马射线剂量或上文指示的其它剂量对样品进行辐照，所述仪器例如VPTrad(www.vptrad.com; MDS Nordion,渥太华,加拿大)的Gammacell 220[®]高剂量率Co-60辐照器。

[0050] 在其它实施方式中，用Mevex加速器(具有以下设置:10MeV,20kW)以约25kGy至约40kGy的剂量或如上文指示的剂量用X射线辐照样品。

[0051] 一般而言，X射线的频率范围是 3×10^{16} - 3×10^{19} Hz，而伽马射线的频率范围是 3×10^{19} 以上。

[0052] 在其它实施方式中,用Mevex加速器(具有以下设置:10MeV,20kW)(参见mevex.com/linacs/10mev-system-e-beam-sterilization-for-medical-devices/)以约25kGy至约40kGy用电子束辐照样品。

[0053] 在一些实施方式中,期望的生物学和物理特性选自于由如下所组成的组:止血、抗粘连、防止再出血、抗狭窄、组织封塞、储能模量、粘度、组织空隙填充特性、黏膜提升(mucosa elevation)和伤口愈合。

[0054] 在优选实施方式中,辐照剂量实现至少 10^{-5} 、 10^{-6} 或更低的无菌保证水平(SAL)。

[0055] 本发明还提供了通过本文所述的方法制备的自组装肽的经灭菌溶液。这包括将溶液施用于生物组织,例如在涉及出血的创伤后或在手术期间,施用于具有实质上中性pH的位点,从而引起凝胶化。在一些实施方式中,这样的位点是内部的,而在其它实施方式中,该位点可以是外部的,例如表面缝合、切口或擦伤。

[0056] 基于本描述,包括实施例和所附权利要求,本发明的其它方面对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0057] 实施例1:辐照条件

[0058] 用VPTrad Gammacell 220[®]高剂量率Co-60辐照器以23kGy、25kGy、28kGy和40kGy用伽马射线辐照样品。在一些实施方式中,40kGy辐照的运行剂量率和持续时间分别为6.30kGy/hr和6小时20分58秒。在其它实施方式中,28kGy辐照的运行剂量率和持续时间分别为4.40kGy/hr和6小时22分31秒。在其它实施方式中,25kGy辐照的运行剂量率和持续时间分别为6.58kGy/hr和3小时47分42秒。在其它实施方式中,23kGy辐照的运行剂量率和持续时间分别为6.58kGy/hr和3小时29分29秒。

[0059] 在其它实施方式中,使用Mevex加速器(10MeV,20kW)以25kGy和40kGy用X射线辐照样品。

[0060] 在其它实施方式中,使用Mevex加速器(10MeV,20kW)以25kGy和40kGy用电子束辐照样品。

[0061] 实施例2:HPLC条件

[0062] 进行HPLC测试以评价辐照测试后的主要肽含量。本研究使用Agilent HPLC 1100(Agilent Technologies)。柱温保持在25℃。

[0063] 对于RADA16样品,溶剂A是含有0.1%TFA的水,并且溶剂B是含有0.1%TFA的80%乙腈。在25℃下,溶剂B的梯度控制为在20min内从10%到40%,并在40%再持续5min。将Agilent Zorbax 300SB-C18柱(4.6mm×250mm,5μm,300 Å)用于该测试。将PuraStat[®](RADA16 2.5%)(40mg)与10μL DH₂O混合并将混合物涡旋。将该混合物进一步与500μL甲酸混合并涡旋。然后将该混合物与DH₂O(4,450μL)混合并涡旋。使用Agilent自动进样器进样20μL样品。

[0064] 对于IEIK13样品,溶剂A是含有0.1%TFA的水,并且溶剂B是含有0.1%TFA的90%乙腈。在25℃下,溶剂B的梯度控制为在8min内从20%到43%,在8min到9.5min之间从43%到70%,在9.5min到30min之间从70%到95%,并在95%再持续5min。将Agilent PLRP-S柱(4.6mm×250mm,8μm,300 Å)用于该测试。用含有0.1%TFA的水将IEIK13的1.3%溶液稀释至0.075%,然后将混合物涡旋。使用Agilent自动进样器进样35μL样品。

[0065] 对于QLEL12样品,溶剂A为水,并且溶剂B为80%乙腈。在25℃下,溶剂B的梯度控制为在15min内从20%到80%,并在80%再持续7min。将Agilent PLRP-S柱(4.6mm×250mm,8μm,300 Å)用于该测试。用DH₂O将0.15%w/v的QLEL12溶液稀释至0.01%并涡旋。使用Agilent自动进样器进样50μL样品。

[0066] 实施例3:质谱条件

[0067] 进行质谱测试以研究辐照灭菌后肽的降解。将Agilent LC/MSD离子阱质谱仪用于本研究。对于HPLC样品,如上所述制备样品溶液。用注射泵以9μL/min注射各个样品。记录质谱1分钟。

[0068] 实施例4:经辐照的自组装肽的流变特性

[0069] 使用具有40mm锥和板的流变仪(DHR1,TA Instruments)评价样品的流变特性。将肽溶液(700μL)置于流变仪板上,并用金属刮刀轻轻去除多余的溶液。在37℃松弛2分钟后进行测量。

[0070] 以0.1%的应变从0.1Hz到10Hz进行频率测试。在将3mL DMEM轻轻添加到锥和板周围后,在相同条件下进行凝胶化后的频率测试持续20分钟。

[0071] 触变测试以下方法进行。施加1000s⁻¹的剪切速率1分钟以重置所有流变特性,然后施加0.1%应变的1Hz频率60分钟以记录触变行为。重复该次序,然后分析触变特性。

[0072] 实施例5:外观和pH

[0073] PuraStat[®]在伽马辐照后的外观和pH在图1和表1中示出(N=3)。

[0074] 表1.伽马辐照后PuraStat[®](RADA16 2.5%)的外观和pH。

| 测试条件 | 外观 | pH |
|---|-------|-----|
| PuraStat [®] 对照 | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| [0075] 以 23 kGy 辐照 (伽马) 的 PuraStat [®] | 清澈而粘稠 | 2.3 |
| 以 25 kGy 辐照 (伽马) 的 PuraStat [®] | 清澈而粘稠 | 2.3 |
| 以 28 kGy 辐照 (伽马) 的 PuraStat [®] | 清澈而粘稠 | 2.3 |
| 以 40 kGy 辐照 (伽马) 的 PuraStat [®] | 清澈而粘稠 | 2.3 |

[0076] 伽马射线辐照后PuraStat[®]的外观和pH仅略有改变。PuraStat[®]对照的pH为2.2。以23kGy、25kGy、28kGy和40kGy进行伽马辐照后的PuraStat[®]的pH为2.3。

[0077] 伽马辐照后IEIK13 1.3%的外观和pH在图1和表2中示出。

[0078] 表2.伽马辐照后IEIK13 1.3%、KLD12 1.3%和QLEL12 0.15%的外观和pH(N=3)。

| 测试条件 | 外观 | pH |
|----------------------------------|-------|-----|
| IEIK13 对照 | 清澈而粘稠 | 3.0 |
| 以 28 kGy 辐照 (伽马) 的 IEIK13 | 清澈而粘稠 | 3.0 |
| 以 40 kGy 辐照 (伽马) 的 IEIK13 | 清澈而粘稠 | 3.0 |
| [0079] KLD12 对照 | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| 以 40 kGy 辐照 (伽马) 的 KLD12 | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| QLEL12 对照 | 清澈而粘稠 | 7.0 |
| 以 23 kGy 辐照 (伽马) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 6.7 |
| 以 25 kGy 辐照 (伽马) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 6.5 |
| 以 40 kGy 辐照 (伽马) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 5.9 |

[0080] 伽马辐照后IEIK13 (1.3%) 的外观和pH没有改变。IEIK13对照的pH为3.0。以28kGy和40kGy进行伽马辐照后IEIK13 (1.3%) 的pH值为3.0。

[0081] 伽马辐照后KLD12 (1.3%) 和QLEL12 (0.15%) 的外观和pH也在表2中示出。伽马辐照后KLD12 (1.3%) 的外观和pH没有变化。KLD12对照的pH为2.2。以40kGy进行伽马辐照后KLD12 (1.3%) 的pH为2.2。

[0082] 然而,伽马辐照后QLEL12的外观和pH显著改变。QLEL12对照的pH为7.0。在以23kGy、25kGy和40kGy进行伽马辐照后QLEL12的pH分别为6.7、6.5和5.9,并且样品在伽马辐照后变成水状。

[0083] **PuraStat®**在X射线和电子束辐照后的外观和pH也在表3中示出 (N=3)。

[0084] 表3.X射线和电子束辐照测试后**PuraStat®** (RADA16 2.5%) 的外观和pH (N=3)。

| 测试条件 | 外观 | pH |
|--|-------|-----|
| PuraStat®对照 | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| [0085] 以 25 kGy 辐照 (X 射线) 的 PuraStat® | 清澈而粘稠 | 2.3 |
| 以 40 kGy 辐照 (X 射线) 的 PuraStat® | 清澈而粘稠 | 2.3 |
| 以 25 kGy 辐照 (电子束) 的 PuraStat® | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| 以 40 kGy 辐照 (电子束) 的 PuraStat® | 清澈而粘稠 | 2.2 |

[0086] X射线或电子束辐照后**PuraStat®**的外观和pH仅略有变化或保持不变。**PuraStat®**对照的pH为2.2。以25kGy和40kGy进行X射线辐照后**PuraStat®**的pH为2.3。以25kGy和40kGy进行电子束辐照后**PuraStat®**的pH为2.2。

[0087] X射线或电子束辐照后IEIK13 1.3%的外观和pH也在表4中示出。

[0088] 表4.X射线或电子束辐照后IEIK13 1.3%的外观和pH (N=3)。

| 测试条件 | 外观 | pH |
|---|-------|-----|
| IEIK13 对照 | 清澈而粘稠 | 3.0 |
| [0089] 以 25 kGy 辐照 (X 射线) 的 IEIK13 | 清澈而粘稠 | 3.0 |
| 以 40 kGy 辐照 (X 射线) 的 IEIK13 | 清澈而粘稠 | 3.0 |
| 以 25 kGy 辐照 (电子束) 的 IEIK13 | 清澈而粘稠 | 3.0 |
| 以 40 kGy 辐照 (电子束) 的 IEIK13 | 清澈而粘稠 | 3.0 |

[0090] X射线或电子束辐照后IEIK13 1.3%的外观和pH没有变化。IEIK13 1.3%对照的pH为3.0。以28kGy和40kGy进行X射线或电子束辐照后IEIK13 1.3%的pH为3.0。

[0091] X射线或电子束辐照后KLD12 1.3%的外观和pH也在表5中示出。

[0092] 表5.X射线或电子束辐照后KLD12 1.3%的外观和pH(N=3)。

| 测试条件 | 外观 | pH |
|--|-------|-----|
| KLD12 对照 | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| [0093] 以 25 kGy 辐照 (X 射线) 的 KLD12 | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| 以 40 kGy 辐照 (X 射线) 的 KLD12 | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| 以 25 kGy 辐照 (电子束) 的 KLD12 | 清澈而粘稠 | 2.2 |
| 以 40 kGy 辐照 (电子束) 的 KLD12 | 清澈而粘稠 | 2.2 |

[0094] X射线或电子束辐照后KLD12 1.3%的外观和pH没有变化。KLD12 1.3%对照的pH为2.2。以25kGy和40kGy进行X射线或电子束辐照后KLD12 1.3%的pH为2.2。

[0095] X射线或电子束辐照后QLEL12 0.15%的外观和pH也在表6中示出。

[0096] 表6.X射线和电子束辐照后QLEL12 0.15%的外观和pH(N=3)。

| 测试条件 | 外观 | pH |
|---|-------|-----|
| QLEL12 对照 | 清澈而粘稠 | 7.0 |
| 以 25 kGy 辐照 (伽马) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 6.5 |
| [0097] 以 40 kGy 辐照 (伽马) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 5.9 |
| 以 25 kGy 辐照 (X 射线) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 6.3 |
| 以 40 kGy 辐照 (X 射线) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 5.9 |
| 以 25 kGy 辐照 (电子束) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 6.6 |
| 以 40 kGy 辐照 (电子束) 的 QLEL12 | 清澈而水状 | 6.5 |

[0098] 伽马辐照、X射线辐照或电子束辐照后QLEL12的外观显著改变。QLEL12对照的pH为7.0。以25kGy和40kGy进行伽马辐照后QLEL12的pH分别为6.5和5.9,以25kGy和40kGy进行X射线辐照后QLEL12的pH分别为6.3和6.5,并且以25kGy和40kGy进行电子束辐照后QLEL12的

pH分别为6.6和6.5。QLEL12溶液在伽马辐照、X射线辐照或电子束辐照后变成水状。

[0099] 综上所述,RADA16、IEIK13和KLD12在约25~40kGy的伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照后保持不变,而QLEL12则不然。因此,与QLEL12不同,RADA16、IEIK13和KLD12可以使用伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照技术进行灭菌。

[0100] 实施例7:通过HPLC和质谱进行表征

[0101] 在伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照之前和之后进行RADA16、IEIK13和QLEL12的HPLC测试,并且其主要肽含量的结果在表7-表10中列出。

[0102] 表7.伽马辐照之前和之后 PuraStat® (RADA16 2.5%) 的主要肽的含量的HPLC测试 (N=3,平均值±SD)。

| 测试条件 | 主要肽含量 (%) |
|-------------------------------------|-------------|
| PuraStat®对照 | 78.3 ± 1.7 |
| [0103] 以 23 kGy 辐照 (伽马) 的 PuraStat® | 75.5 ± 1.4* |
| 以 25 kGy 辐照 (伽马) 的 PuraStat® | 74.6 ± 0.7* |
| 以 28 kGy 辐照 (伽马) 的 PuraStat® | 68.5 ± 0.5* |
| 以 40 kGy 辐照 (伽马) 的 PuraStat® | 69.7 ± 0.5* |

[0104] *:表示显著低于PuraStat®对照的数据 (p<0.05,双尾学生t检验)。

[0105] 表8.X射线和电子束辐照之前和之后PuraStat® (RADA16 2.5%) 的主要肽的含量的HPLC测试 (N=3,平均值±SD)。

| 测试条件 | 主要肽含量 (%) |
|---------------------------------------|-------------|
| PuraStat®对照 | 78.3 ± 1.7 |
| [0106] 以 25 kGy 辐照 (X 射线) 的 PuraStat® | 73.8 ± 1.7* |
| 以 40 kGy 辐照 (X 射线) 的 PuraStat® | 71.9 ± 0.8* |
| 以 25 kGy 辐照 (电子束) 的 PuraStat® | 76.0 ± 0.9* |
| 以 40 kGy 辐照 (电子束) 的 PuraStat® | 70.0 ± 2.4* |

[0107] *:表示显著低于PuraStat®对照的数据 (p<0.05,双尾学生t检验)。

[0108] 表9.伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照之前和之后IEIK13 1.3%的主要肽的含量的HPLC测试 (N=3,t平均值±SD)。

| 测试条件 | 主要肽含量 (%) |
|---|------------|
| IEIK13 对照 | 99.6 ± 0.0 |
| 以 40 kGy 辐照 (伽马) 的 IEIK13 | 99.8 ± 0.2 |
| [0109] 以 25 kGy 辐照 (X 射线) 的 IEIK13 | 99.8 ± 0.1 |
| 以 40 kGy 辐照 (X 射线) 的 IEIK13 | 99.9 ± 0.1 |
| 以 25 kGy 辐照 (电子束) 的 IEIK13 | 99.6 ± 0.2 |
| 以 40 kGy 辐照 (电子束) 的 IEIK13 | 99.8 ± 0.1 |

[0110] 表10. 伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照之前和之后QLEL12 0.15%的主要肽的含量的HPLC测试 (N=3, 平均值±SD)。

| 测试条件 | 主要肽含量 (%) |
|---|-------------|
| QLEL12 对照 | 90.5 ± 1.3 |
| [0111] 以 40 kGy 辐照 (伽马) 的 QLEL12 | 40.7 ± 3.1* |
| 以 25 kGy 辐照 (X 射线) 的 QLEL12 | 57.0 ± 4.9* |
| 以 40 kGy 辐照 (X 射线) 的 QLEL12 | 47.3 ± 1.3* |
| 以 25 kGy 辐照 (电子束) 的 QLEL12 | 51.9 ± 7.3* |
| 以 40 kGy 辐照 (电子束) 的 QLEL12 | 55.6 ± 3.0* |

[0112] *: 表示显著低于QLEL12对照的数据 ($p < 0.05$, 双尾学生t检验)。

[0113] RADA16对照的主要肽含量为78.3%。以23kGy、25kGy、28kGy和40kGy进行伽马辐照后,RADA16的主要肽含量分别为75.5%、74.6%、68.5%和69.7%。以25kGy和40kGy进行X射线辐照后RADA16的主要肽含量分别为73.8%和71.9%。以25kGy和40kGy进行电子束辐照后,RADA16的主要肽含量分别为76.0%和70.0%。

[0114] IEIK13对照的主要肽含量为99.6%。以40kGy进行伽马辐照后IEIK13的主要肽含量为99.8%。以25kGy和40kGy进行X射线辐照后,IEIK13的主要肽含量分别为99.8%和99.9%。以25kGy和40kGy进行电子束辐照后IEIK13的主要肽含量分别为99.6%和99.8%。

[0115] QLEL12对照的主要肽含量为90.5%。然而,QLEL12在辐照灭菌后其主要肽含量显示出显著降低。以40kGy进行伽马辐照后,QLEL12的主要肽含量为40.7%。以25kGy和40kGy进行X射线辐照后,QLEL12的主要肽含量分别为57.0%和47.3%。以25kGy和40kGy进行电子束辐照后,QLEL12的主要肽含量分别为51.9%和55.6%。这些结果表明,与QLEL12相比,RADA16和IEIK13在伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照后保持相对不变。

[0116] RADA16的实测分子量为1712,与其计算分子量相符(图2)。质谱分析表明,在伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照后,RADA16没有降解(图2-图4)。然而,RADA16在高压灭菌器处理过程中完全降解。

[0117] 与高压灭菌不同,辐照是低温灭菌技术。尽管这两种灭菌技术在灭菌过程中都为自组装肽(如RADA16)提供了高能量(即辐射和热),但辐照灭菌并未诱导RADA16分子的实质

性降解。

[0118] 然而,所有经伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照的PuraStat[®]质谱都显示出辐照前未观察到的一些峰,而它们之间没有观察到显著差异。质谱的总结列于表11中。

[0119] 表11. 辐照灭菌过程后PuraStat[®]的质谱数据。

| Mz | n=1 的 Mw | n=2 的 Mw | n=3 的 Mw | 估计的成分 | 对照 PuraStat [®] * | 经辐照的 PuraStat [®] # |
|------|----------|----------|----------|--|----------------------------|------------------------------|
| 502 | 501 | | | ARADA-NH ₂ (SEQ ID NO:5) | 是 | 是 |
| 572 | | | 1712 | Ac-(RADA) ₄ -NH ₂ (SEQ ID NO:1) | 是 | 是 |
| 665 | | 1328 | | ARADARADARADA-NH ₂ (SEQ ID NO:6) | 是 | 是 |
| 836 | | 1670 | | (RADA) ₄ -NH ₂ (SEQ ID NO:7) | 否 | 是 |
| 857 | | | 1712 | Ac-(RADA) ₄ -NH ₂ (SEQ ID NO:1) | 是 | 是 |
| 916 | 915 | | | ARADARADA-NH ₂ (SEQ ID NO:8) | 是 | 是 |
| 1100 | 1100 | | | ADARADARADA-NH ₂ (SEQ ID NO:9) | 否 | 是 |
| 1143 | 1142 | | | ARADARADARA (SEQ ID NO:10) | 是 | 是 |
| 1229 | 1228 | | | Ac-RADARADARAD (SEQ ID NO:11) | 是 | 是 |
| 1329 | 1328 | | | ARADARADARADA-NH ₂ (SEQ ID NO:6) | 是 | 是 |
| 1513 | 1513 | | | ADARADARADARADA-NH ₂ (SEQ ID NO:12) | 否 | 是 |
| 1643 | 1642 | | | Ac-RADARADARADARAD (SEQ ID NO:13) | 是 | 是 |
| 1670 | 1670 | | | (RADA) ₄ -NH ₂ (SEQ ID NO:7) | 否 | 是 |
| 1713 | 1712 | | | Ac-(RADA) ₄ -NH ₂ (SEQ ID NO:1) | 是 | 是 |

[0122] *:在2°C-8°C下储存约4年。

[0123] #:所有PuraStat[®]样品均以40kGy辐照(用伽马射线、X射线和电子束)

[0124] 对照PuraStat[®]在572、857和1713处显示M_z峰,这些峰归属于主要肽Ac-(RADA)₄-

NH₂ (SEQ ID NO:1)。对照 PuraStat[®] 还在502、665/1329、916、1143和1229处显示出其它M_z峰,估计分别为ARADA-NH₂ (SEQ ID NO:5)、ARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:6)、ARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:8)、ARADARADARA (SEQ ID NO:10)、Ac-RADARADARAD (SEQ ID NO:11)。

[0125] 表12示出了当 PuraStat[®] 在2°C-8°C下储存约4年时Ac-(RADA)₄-NH₂ (SEQ ID NO:1)的降解样式。从该样式中,我们发现降解主要发生在~RAD和A~之间的位点。

[0126] 另一方面,经辐照的 PuraStat[®] 在836/1670、1100和1513处显示额外的M_z峰,估计分别为(RADA)₄-NH₂ (SEQ ID NO:7)、ADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:9)、和ADARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:12)。

[0127] 表13示出了当 PuraStat[®] 用辐照灭菌时Ac-(RADA)₄-NH₂ (SEQ ID NO:1)的额外降解样式。尤其是,836和1670处的峰在主要的附加峰之列,代表RADARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:7)。这意味着辐照可在乙酰基基团(Ac)和RAD~之间的位点处引起 PuraStat[®] 的额外的降解。1100和1513处的峰也在主要的附加峰之列,它们代表ADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:9)和ADARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:12)这意味着辐照可在~R和AD~之间的位点处引起 PuraStat[®] 的额外的降解。

[0128] 表12.Ac-(RADA)₄-NH₂ (SEQ ID NO:1)的降解样式 (PuraStat[®]在2°C-8°C下储存约4年)

Ac-RADARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:1) (降解前)

Ac-RAD / ARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:6)

Ac-RADARAD (SEQ ID NO:14) / ARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:8)

[0129] Ac-RADARADARAD (SEQ ID NO:11) / ARADA-NH₂ (SEQ ID NO:5)

Ac-RAD / ARADARADARA (SEQ ID NO:10) / DA-NH₂

Ac-RADARADARADARAD (SEQ ID NO:13) / A-NH₂

[0130] 表13. PuraStat[®]经辐照灭菌时Ac-(RADA)₄-NH₂降解的额外样式

Ac-RADARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:1) (降解前)

Ac / RADARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:7)

[0131] Ac-R / ADARADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:12)

Ac-RADAR (SEQ ID NO:14) / ADARADARADA-NH₂ (SEQ ID NO:9)

[0132] 另外,测得IEIK13的分子量为1622,与其计算分子量相符(图5)。质谱分析表明,IEIK13在伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照后仅有非实质性降解。

[0133] 此外,测得QLEL12的摩尔质量为1506,与其计算摩尔质量相符(图6)。然而,质谱分析表明QLEL12在伽马辐照、X射线辐照和电子束辐照后显著降解。

[0134] 实施例7:流变特性

[0135] 根据ISO 11137(保健产品的灭菌-辐射),可以用25kGy或15kGy辐照作为灭菌剂量使用辐射灭菌方法以达到10⁻⁶的无菌保证水平(SAL)。

[0136] 图7和图8分别示出了凝胶化之前和之后,进行伽马辐照灭菌的PuraStat®的流变学结果。测定的流变结果列于表14-表15中。

[0137] 表14. 来自以0.1%的应变用40mm锥-板进行的经伽马辐照的PuraStat®(RADA16 2.5%)的频率测试的结果

| 样品# | 1 Hz 时的储能模量 G' (Pa) | | | |
|----------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | PuraStat® 对照 | 以 23 kGy 经 伽马辐照的 PuraStat® | 以 25 kGy 经 伽马辐照的 PuraStat® | 以 40 kGy 经 伽马辐照的 PuraStat® |
| [0138] 1 | 343.7 | 514.1 | 546.0 | 551.0 |
| 2 | 323.3 | 449.7 | 490.2 | 607.7 |
| 3 | 301.7 | 449.5 | 467.0 | 618.4 |
| 平均值 | 322.9 | 471.1* | 501.0* | 592.4*,\$ |
| SD | 21.0 | 37.2 | 40.6 | 36.2 |

[0139] *:表示与对照相比p<0.05(双尾学生t检验)。

[0140] \$:表示与其它相比p<0.05(双尾学生t检验)。

[0141] 以23kGy、25kGy和40kGy经伽马辐照的PuraStat®显示出比PuraStat®对照更高的储能模量(图7和表14)。以40kGy经伽马辐照的PuraStat®显示出比以23kGy和25kGy经伽马

辐照的 PuraStat[®] 显著更高的储能模量。此外,以25kGy经伽马辐照的 PuraStat[®] 显示出比以23kGy经伽马辐照的 PuraStat[®] 略高的储能模量。这指示伽马辐照对 PuraStat[®] 的流变特性产生了积极影响。以23kGy (471.1 ± 37.2 Pa)、25kGy (501.0 ± 40.6 Pa) 和40kGy (592.4 ± 36.2 Pa) 经伽马辐照的 PuraStat[®] 与 PuraStat[®] 对照 (322.9 ± 21.0 Pa) 相比分别显示出其储能模量的46%、55%和83%的增加。

[0142] 表15. 来自凝胶化后进行伽马辐照的 PuraStat[®] (RADA16 2.5%) 的频率测试结果。用40mm锥-板以0.1%的应变用DMEM处理样品20min。

| 样品# | 1 Hz 时的储能模量 G' (Pa) | | | |
|----------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | PuraStat [®] 对照 | 以 23 kGy 经伽马辐照的 PuraStat [®] | 以 25 kGy 经伽马辐照的 PuraStat [®] | 以 40 kGy 经伽马辐照的 PuraStat [®] |
| [0143] 1 | 4454 | 8866 | 6885 | 14568 |
| 2 | 5280 | 8845 | 10395 | 10286 |
| 3 | 5183 | 8622 | 10148 | 12134 |
| 平均值 | 4972 | 8711* | 9143* | 12330* |
| SD | 451 | 135 | 1959 | 2148 |

[0144] *:表示与对照相比 $p < 0.05$ (双尾学生t检验)。

[0145] §:表示与其它相比 $p < 0.05$ (双尾学生t检验)。

[0146] 此外,在通过模拟体液(即DMEM缓冲液)触发凝胶化20min后,以23kGy (8711 ± 135 Pa)、25kGy (9143 ± 1959 Pa) 和40kGy (12330 ± 2148 Pa) 经伽马辐照的 PuraStat[®] 与 PuraStat[®] 对照 (4972 ± 451 Pa) 相比分别显示出其储能模量的75%、84%和148%的增加(图8和表11)。

[0147] 对于在凝胶化之前和之后的用X射线辐照灭菌的 PuraStat[®],流变学结果分别在表16和表17中示出。

[0148] 表16. 来自用40mm锥-板以0.1%的应变进行的用X射线辐照的 PuraStat[®] (RADA16 2.5%) 的频率测试结果

| 样品# | 1 Hz 时的储能模量 G' (Pa) | | |
|--------|---------------------|------------------------------|------------------------------|
| | PuraStat®对照 | 以 25 kGy 经 X 射线辐照的 PuraStat® | 以 40 kGy 经 X 射线辐照的 PuraStat® |
| [0149] | | | |
| 1 | 343.7 | 448.3 | 610.2 |
| 2 | 323.3 | 429.3 | 632.5 |
| 3 | 301.7 | 471.7 | 578.9 |
| [0150] | 平均值 | 322.9 | 449.8* |
| | SD | 21.0 | 21.2 |
| | | | 607.2*,\$ |
| | | | 27.0 |

[0151] *:表示与对照相比 $p < 0.05$ (双尾学生t检验)。

[0152] \$:表示与其它相比 $p < 0.05$ (双尾学生t检验)。

[0153] 以25kGy和40kGy经X射线辐照的PuraStat®也显示出比PuraStat®对照更高的储能模量。以40kGy经X射线辐照的PuraStat®显示出比以25kGy经X射线辐照的PuraStat®显著更高的储能模量。这指示X射线辐照对PuraStat®的流变特性产生了积极影响。与PuraStat®对照 (322.9 ± 21.0 Pa) 相比,以25kGy (449.8 ± 21.2) 和40kGy (607.2 ± 27.0 Pa) 辐照的PuraStat®分别显示出其储能模量的39%和88%的增加(表17)。

[0154] 表17.凝胶化后,用X射线辐照的PuraStat® (RADA16 2.5%) 的频率测试结果。用40mm锥-板以0.1%的应变用DMEM处理样品20min。

| 样品# | 1 Hz 时的储能模量 G' (Pa) | | |
|--------|---------------------|------------------------------|------------------------------|
| | PuraStat®对照 | 以 25 kGy 经 X 射线辐照的 PuraStat® | 以 40 kGy 经 X 射线辐照的 PuraStat® |
| [0155] | | | |
| 1 | 4454 | 9563 | 12832 |
| 2 | 5280 | 6404 | 10611 |
| 3 | 5183 | 9522 | 10294 |
| | 平均值 | 4972 | 8497* |
| | SD | 451 | 1812 |
| | | | 11246* |
| | | | 1383 |

[0156] *:表示与对照相比 $p < 0.05$ (双尾学生t检验)。

[0157] 此外,在通过模拟体液(即DMEM缓冲液)触发凝胶化20min后,与PuraStat®对照 (4972 ± 451 Pa) 相比,以25kGy (8497 ± 1812 Pa) 和40kGy (11246 ± 1383 Pa) 经X射线辐照的

PuraStat®分别表现出其储能模量71%和126%的增加(表17)。

[0158] 对于凝胶化之前和之后的用电子束辐照灭菌的**PuraStat®**，流变学结果分别在表18和表19中示出。

[0159] 表18. 来自用40mm锥-板以0.1%的应变用电子束辐照的**PuraStat®** (RADA16 2.5%)的频率测试结果

| 样品# | 1 Hz 时的储能模量 G' (Pa) | | |
|-----|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| | PuraStat®对照 | 以 25 kGy 经电子束辐照的 PuraStat® | 以 40 kGy 经电子束辐照的 PuraStat® |
| 1 | 343.7 | 348.1 | 349.6 |
| 2 | 323.3 | 356.1 | 371.5 |
| 3 | 301.7 | 324.0 | 338.4 |
| 平均数 | 322.9 | 342.7 | 353.2 |
| SD | 21.0 | 16.7 | 16.8 |

[0161] 然而,以25kGy和40kGy经电子束辐照的**PuraStat®**在储能模量方面与**PuraStat®**对照相比没有显示出显著变化。这指示电子束辐照灭菌对**PuraStat®**的流变特性没有重大影响。然而,虽然p值没有显示出统计学显著性(即 $p > 0.05$),但与**PuraStat®**对照(322.9 ± 21.0Pa)相比,以25kGy(342.7 ± 16.7Pa)和40kGy(353.2 ± 16.8Pa)经X射线辐照的**PuraStat®**分别表现出其储能模量的6%和9%的增加(表18)。

[0162] 表19. 来自凝胶化后的用电子束辐照的**PuraStat®** (RADA16 2.5%)的频率测试结果。用40mm锥-板以0.1%的应变用DMEM处理样品20min。

| 样品# | 1 Hz 时的储能模量 G' (Pa) | | |
|-----|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| | PuraStat®对照 | 以 25 kGy 经电子束辐照的 PuraStat® | 以 40 kGy 经电子束辐照的 PuraStat® |
| 1 | 4454 | 3623 | 4918 |
| 2 | 5280 | 4830 | 9327 |
| 3 | 5183 | 3542 | 7875 |
| 平均数 | 4972 | 4007 | 7373 |
| SD | 451 | 715 | 2247 |

[0164] 在通过模拟体液(即DMEM缓冲液)触发凝胶化20min后,与**PuraStat®**对照相比,以

25kGy和40kGy经电子束辐照的PuraStat[®]在其储能模量方面没有显示出显著差异(即p值高于0.05)(表19)。

[0165] PuraStat[®]表现出高剪切速率下的剪切稀化特性和触变行为,表明高剪切停止时的缓慢的流变特性恢复(图9)。根据PuraStat[®]的这些特性,可以降低PuraStat[®]的刚度,使得在施用于患者过程中更容易处理,并且刚度可以随后在施用后缓慢恢复到初始值。即使在以23kGy和25kGy进行伽马辐照后,PuraStat[®]的这些固有的触变特性也没有改变,而经辐照的PuraStat[®]显示出比PuraStat[®]对照更高的储能模量。

[0166] 由于鉴于HPLC和质谱的结果,肽的分子结构没有发生实质性变化,肽的经组装的纳米纤维结构可能是增加其流变特性的因素。当自组装肽结构更为组织化时,自组装肽溶液的流变特性可能增加。作为非约束性理论,来自辐照的高能量可以使肽分子轻微移动以具有更为组织化的纳米纤维结构,从而产生改善的流变特性。

[0167] 增加的流变特性至少部分被重复的高剪切逆转,并恢复到接近原始水平。在以 1000s^{-1} 持续1分钟将其彻底剪切两次后,以23kGy和25kGy辐照的PuraStat[®]样品显示出其储能模量的逐渐降低,分别从484.5Pa到410.9Pa以及514.3Pa到426.5Pa,而PuraStat[®]对照在其储能模量方面没有显示出显著变化(图9)。可以预期,在进行更多的剪切后,经辐照的PuraStat[®]的流变特性会变得更接近PuraStat[®]对照的流变特性。因此,伽马辐照增强了自组装纳米纤维的结构,以增加其流变特性,而在肽分子结构降解或交联方面没有可检测的变化。

[0168] 实施例8:生物负载测试

[0169] A. 样品的采集。辐照后,按如下采集了50个样品:用于包装内的生物负载测试的10个样品(在包装操作开始时采集4个,在包装操作的中间和结束时采集各3个);用于注射器内填充液的生物负载测试的10个样品(在包装操作开始时采集4个,在包装操作的中间和结束时采集各3个);可收集备用样品(例如30个样本)以防可能需要进行额外测试。

[0170] B. 用于灭菌验证的活细菌计数测试。样品在洁净工作台中无菌制备,并且待使用的仪器和溶剂均经灭菌。

[0171] 对于泡罩包装产品,用一个密封包装重复以下程序两次,以制备共100mL的样品溶液。使用注射器将用于灭菌测试的50mL冲洗液(USP液体D)注入包装内部。彻底摇动样品并允许其静置以减少气泡。然后,在不加热内容物的情况下,通过将开口轻轻地通过火焰来对包装的外部开口进行灭菌。然后,使用注射器或其它合适的方法从包装中提取所有注入的溶液,然后将所述溶液收集在耐热瓶中。使用装有从标准菌株(如枯草芽孢杆菌(NBRC3134))中纯化出约 10^8 CFU的孢子的密封的泡罩包装,根据来自用与上文相同的方式制备的样品的活细菌数和添加细菌数来预先计算回收率和基于回收率的校正系数。校正系数计算为 $1/\text{回收率}(\%) \times 100$ 。当样品制备程序改变时,重新计算该校正系数。

[0172] 为了测试内容液,将1mL内容物溶液与9mL的大豆-酪蛋白消化培养基琼脂培养基(SCD琼脂培养基)混合,并将凝胶均匀分散以制成10mL的样品溶液。

[0173] 对于泡罩包装产品,每个培养基使用100mL样品溶液,并使用日本药典微生物限度测试的膜过滤法进行测试。

[0174] 为了测试内容液,每个培养基加入1mL样品溶液,并使用日本药典微生物限度测试的琼脂平板稀释法进行测试。该测试重复10次,得到10个培养基平板,对应于10mL样品溶液。

[0175] 将培养物在SCD琼脂培养基上于30°C-35°C维持3-5天(或更长时间)。作为一般规则,在最后测量日和培养期间的每个操作日至少观察一次培养物。

[0176] 培养完成后,将SCD琼脂培养基的菌落的实测值通过以下计算进行转换:

[0177] (1) 对于泡罩包装产品

[0178] 泡罩包装中的活细菌数=100mL样品液中的活细菌数×校正系数

[0179] (2) 对于内容液

[0180] 1mL内容液中的活细菌数=与样品溶液相当的10mL(10个培养基平板)中的总活细菌数备注:在内容液的测试方法中,当用等同于1mL内容液的5mL产物通过该方法进行测量时,用于计算的SIP值(等分试样)被确定为 $1/5=0.2$,而不是总量。*SIP(Sample Item Portion,样品份额)相当于等分试样(用于测试的保健产品的限定的部分)。

[0181] 实施例9:通过伽马辐照进行PuraStat®灭菌的实验设计

[0182] 辐照条件——用Gammacell 220®高剂量率Co-60辐照器(MDS Nordion,渥太华,加拿大)以25kGy、28kGy和40kGy用伽马射线辐照PuraStat®样品(批号#17C09A30)。40kGy辐照的运行剂量率和持续时间分别为6.30kGy/hr和6小时20分58秒。28kGy辐照的运行剂量率和持续时间分别为4.40kGy/hr和6小时22分31秒。25kGy辐照的运行剂量率和持续时间分别为6.58kGy/hr和3小时47分42秒。

[0183] 方法和测试结果:每次测试后观察PuraStat®的外观。使用Accumet AB15 pH计(Fisher Scientific)测试PuraStat®的pH。进行HPLC测试以评价辐照测试后的主要肽含量。本研究使用Agilent HPLC 1100(Agilent Technologies)。柱温保持在25°C。

[0184] 溶剂A是含有0.1%TFA的水,并且溶剂B是含有0.1%TFA的80%乙腈。在25°C下,溶剂B的梯度被控制为在20min内从10%到40%,并在40%再持续5min。将Agilent Zorbax 300SB-C18柱(4.6mm×250mm,5μm,300 Å)用于该测试。将PuraStat®(RADA16 2.5%)(40mg)与10μL DH₂O和500μL甲酸混合并涡旋。将混合物与DH₂O(4,450μL)混合并涡旋。使用Agilent自动进样器进样20μL样品。

[0185] 进行质谱测试以研究辐照灭菌后肽的降解。本研究使用Agilent LC/MSD离子阱质谱仪。对于HPLC样品,如上文所述制备样品溶液。使用注射泵以9μL/min注射各样品。质谱记录1分钟。MS迹线在图10中示出。PuraStat®(Ac-(RADA)₄-NH₂)(SEQ ID NO:1)的分子量为1712,与对照和经辐照PuraStat®样品的所有质谱中 $m/3=572$ 、 $m/2=857$ 和 $m=1713$ 处的主要的三个峰的计算分子量相匹配。

[0186] Ac-RADARADARADARADA-NH₂(SEQ ID NO:1)的所分配的峰是,

[0187] $M/z=572=(M_w+3)/3$,因此计算出的 $M_w=1713$

[0188] $M/z=857=(M_w+2)/2$,因此计算出的 $M_w=1712$

[0189] $M/z=1713=M_w+1$,因此计算出的 $M_w=1712$

[0190] 使用流变仪(Discovery HR 1,TA Instruments)在37°C下评价伽马灭菌之前和之

后的 PuraStat® 样品的流变特性。在 37°C 下,以 0.001 1/sec 至 3,000 1/sec 的剪切速率范围,用 20mm 板-板几何结构和 800µm 的间隙距离进行流动测试。将样品溶液 (350µL) 置于流变仪板上,并轻轻去除多余的溶液;在 37°C 下松弛 2 分钟后进行测量。从非常低的剪切速率 (0.001 1/sec) 到高剪切速率 (3000 1/sec) 记录粘度 (h)。

[0191] 进行 L929 中性红摄取试验以研究辐照的 PuraStat® 的细胞毒性。这些测试由位于 Bedford, MA, 美国的 Toxikon 进行。该研究是根据以下进行的: ISO 10993-5, 2009, 医疗器械的生物学评价-第 5 部分: 体外细胞毒性测试和 ISO 10993-12, 2012, 医疗器械的生物学评价-第 12 部分: 样品制备和参考材料。测定了哺乳动物细胞单层 L929 小鼠成纤维细胞响应于测试物质 (test article) 提取物的生物反应性。用补充有血清的最低必需培养基 (MEM) 以每毫升 0.2g 物质的比例获得测试物质提取物。在 37±1°C 下提取 24±2 小时。制备阳性对照 (天然橡胶) 和阴性对照 (阴性对照塑料) 物质和未经处理的对照 (空白) 以验证测试系统恰当地发挥功能。使用测试物质和对照物质提取物代替细胞培养的维持培养基。测试物质提取物以 100% (纯) 浓度进行测试。所有培养物以至少 6 重复孵育 24 至 26 小时; 在 37±1°C 下, 在含有 5±1% 二氧化碳 (CO₂) 的潮湿环境中。暴露于提取物后的细胞活力通过它们摄取重要染料中性红的能力来测定。将这种染料添加到细胞以在活细胞中被主动掺入。活细胞的数量与提取后在 540nm 处通过光度测量确定的颜色强度相关。

[0192] 暴露于阴性对照物质和阳性对照物质提取物的细胞的活力需要分别大于或等于未处理对照的 70% 和小于未处理对照的 70%, 以确认测定的有效性。如果存活率 % 大于或等于未处理对照的 70%, 则测试物质满足测试要求。

[0193] 我们只测试了以最高剂量 (即 40kGy) 辐照的 PuraStat® 样品, 认为它们代表了所有经辐照样品, 因为它们对细胞毒性的影响 (如果有的话) 应该比那些以较低剂量辐照的样品更大。

[0194] 表 20. 辐照灭菌测试的汇总表

| 测试条件 | 外观 | pH | HPLC 和 MS | 流变学 | 细胞毒性 |
|------------------------------------|-------|-----|-----------|-----|------|
| PuraStat® (对照) | 清澈而粘稠 | 2.2 | 对照 | 对照 | 无毒性 |
| [0195] 以 25 kGy 经伽马辐照的 PuraStat® | 清澈而粘稠 | 2.3 | ~5%降解 | - | - |
| 以 28 kGy 或 40 kGy 经伽马辐照的 PuraStat® | 清澈而粘稠 | 2.3 | ~15%降解 | 等同的 | 无毒性 |

[0196] 辐照前的肽量。在高达 25kGy 的辐照后, PuraStat® 的降解没有超过辐照前肽量的 5%。

[0197] 根据对照 PuraStat® 的降解样式, 我们发现降解主要发生在 ~RAD 和 A~ 之间的位点。根据用辐照对 PuraStat® 灭菌时 Ac-(RADA)₄-NH₂ (SEQ ID NO:1) 的额外降解样式, 我们发现辐照可在 ~R 和 AD~ 之间的位点引起额外的降解。

[0198] 总体而言,经伽马辐照的 PuraStat® 的流变特性与 PuraStat® 对照相当。所有经辐照的 PuraStat® 和 PuraStat® 对照样品均符合测试要求,且不被认为具有细胞毒性潜力。

[0199] 表21. 两种产品形式的HPLC和LC-MS分析

| 以各个峰给出的 HPLC 和 LCMS 结果 | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|--------|-------|-------------------------|----------------------|------|--------|-------|----------------------------------|
| PuraStat®当前产品 (未辐照) | | | | | PuraStat®建议的产品 (经辐照) | | | | |
| HPLC | | | | LC-MS | HPLC | | | | LC-MS |
| 峰 | tr | 面积 | 面积% | 代表性 m/z | 峰 | tr | 面积 | 面积% | 代表性 m/z |
| 1 | 6.37 | 25.70 | 4.39 | 1329(666) | 1 | 6.35 | 8.20 | 1.90 | 1329(666) |
| 2 | 6.73 | 8.49 | 1.44 | 1229(615) | 2 | 6.73 | 2.90 | 0.67 | 1229(615) |
| 3 | 7.15 | 9.98 | 1.71 | 1300(651) | 3 | 7.27 | 12.00 | 2.78 | 1143(572) |
| 4 | 7.30 | 9.29 | 1.59 | 1143(572) 893 | 4 | 7.56 | 2.29 | 0.53 | 1671(836) |
| 5 | 7.75 | 4.75 | 0.81 | 1671(836), 1713(857) | 5 | 7.71 | 2.34 | 0.54 | 1671(836) |
| 6 | 8.01 | 7.49 | 1.28 | 1713(857), 750 | 6 | 7.90 | 7.62 | 1.77 | 1671(836), 1713(857) |
| 7 | 8.18 | 6.95 | 1.19 | 1643(823), 1713(857) | 7 | 8.16 | 4.06 | 0.94 | 1643(823), 1713(557), 1513 |
| 8 | 8.29 | 2.15 | 0.36 | 1643(823), 1713(857) | 8 | 8.27 | 7.95 | 1.84 | 1643(823), 1713(557), 1513 |
| 9 | 8.45 | 473.23 | 80.80 | 1713(857) | 9 | 8.47 | 348.78 | 80.89 | 1713(857) |
| 10 | 8.80 | 11.89 | 2.03 | 1557, 783, 857 | 10 | 8.77 | 12.95 | 3.00 | 1557, 783 |
| 11 | 8.93 | 4.54 | 0.77 | 783, 857 | 11 | | | | |
| 12 | 9.06 | 4.85 | 0.82 | 839, 1713(857) | 12 | 9.00 | 10.46 | 2.43 | 839, 1713(857) |
| 13 | 10.00 | 16.26 | 2.77 | 482, 839, 891 | 13 | 9.96 | 11.61 | 2.69 | 839, 482 |

[0201] 下面的表21显示了HPLC测试的结果,进行所述HPLC测试以评价伽马辐照之前(对照)和之后的主要肽含量。

[0202] 将Agilent HPLC 1100(Agilent Technologies)用于本研究。柱温保持在25℃。将Agilent Zorbax 300SB-C18柱(4.6mm×250mm,5mm, 300 Å)用于该测试。溶剂A为含有0.1%TFA的水,并且溶剂B为含有0.1%TFA的80%乙腈。在25℃下,溶剂B的梯度控制为在20min内从10%到40%,并在40%再持续5min。PuraStat® (40mg)与10μL DH₂O和500μL甲酸混合并涡旋。将混合物与DH₂O(4,450μL)混合并涡旋。使用Agilent自动进样器进样20mL样品。结果示于下表23中。

[0203] 表23.

| | | |
|--------|----------------|------------------------------|
| | PuraStat®对照 | 以高于 25 kGy 辐照的 PuraStat® |
| [0204] | 主要肽含量 (n=3) | 83,8 +/- 1% 81,3 +/- 0,7% |
| | 制造规范 | 75%以上 |

[0205] 结果——总体而言，PuraStat®的主要肽含量随着伽马辐照方法而降低，并且随着更高的剂量，降低的程度更为显著。在高达40kGy的辐照后，PuraStat®的降解不超过15%。

[0206] 总体而言，PuraStat®的主要肽含量随着伽马辐照方法而降低，并且随着更高的剂量，降低的程度更为显著。在高达40kGy的辐照后，PuraStat®的降解不超过辐照前肽量的15%。在高达25kGy的辐照后，PuraStat®的降解不超过辐照前肽量的5%。

[0207] 根据对照PuraStat®的降解样式，我们发现降解主要发生在~RAD和A~之间的位点。根据用辐照对PuraStat®灭菌时Ac-(RADA)₄-NH₂的额外降解样式，我们发现辐照可在~R和AD~之间的位点处引起额外的降解。

[0208] 总体而言，经伽马辐照的PuraStat®的流变特性与PuraStat®对照相当。所有经辐照的PuraStat®和PuraStat®对照样品均符合测试要求，且不被认为具有细胞毒性潜力。

序列表

<110> 立美基股份有限公司(3-D MATRIX, LTD.)

<120> 通过辐照对组装肽进行灭菌

<130> 3DMUS-2021-02-IRR-PCT

<140> PCT/US21/24954

<141> 2021-04-09

<150> 63/002,882

<151> 2020-03-31

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

肽

<220>

<223> N-末端经乙酰化

<220>

<223> C-末端经酰胺化

<400> 1

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1

5

10

15

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的

肽

<220>

<223> 合成产生

<220>

<223> N-末端经乙酰化

<220>

<223> C-末端经酰胺化

<400> 2

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的
 肽
 <220>
 <223> 合成产生
 <220>
 <223> C-末端经酰胺化
 <400> 8
 Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5
 <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的
 肽
 <220>
 <223> 合成产生
 <220>
 <223> C-末端经酰胺化
 <400> 9
 Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成的
 肽
 <220>
 <223> 合成产生
 <400> 10
 Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala
 1 5 10
 <210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的
肽

<220>

<223> 合成产生

<220>

<223> N-末端经乙酰化

<400> 11

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp

1 5 10

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的
肽

<220>

<223> 合成产生

<220>

<223> C-末端经酰胺化

<400> 12

Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的
肽

<220>

<223> 合成产生

<220>

<223> N-末端经乙酰化

<400> 13

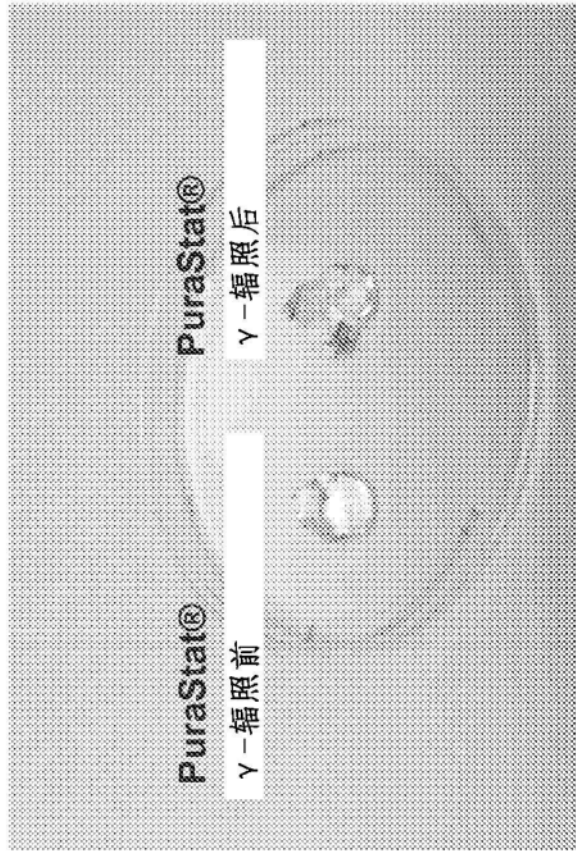


图1A

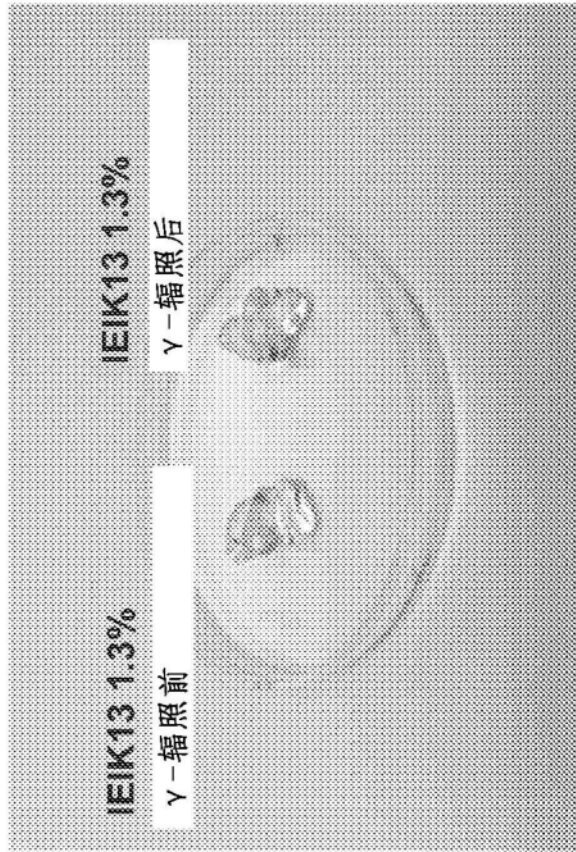


图1B

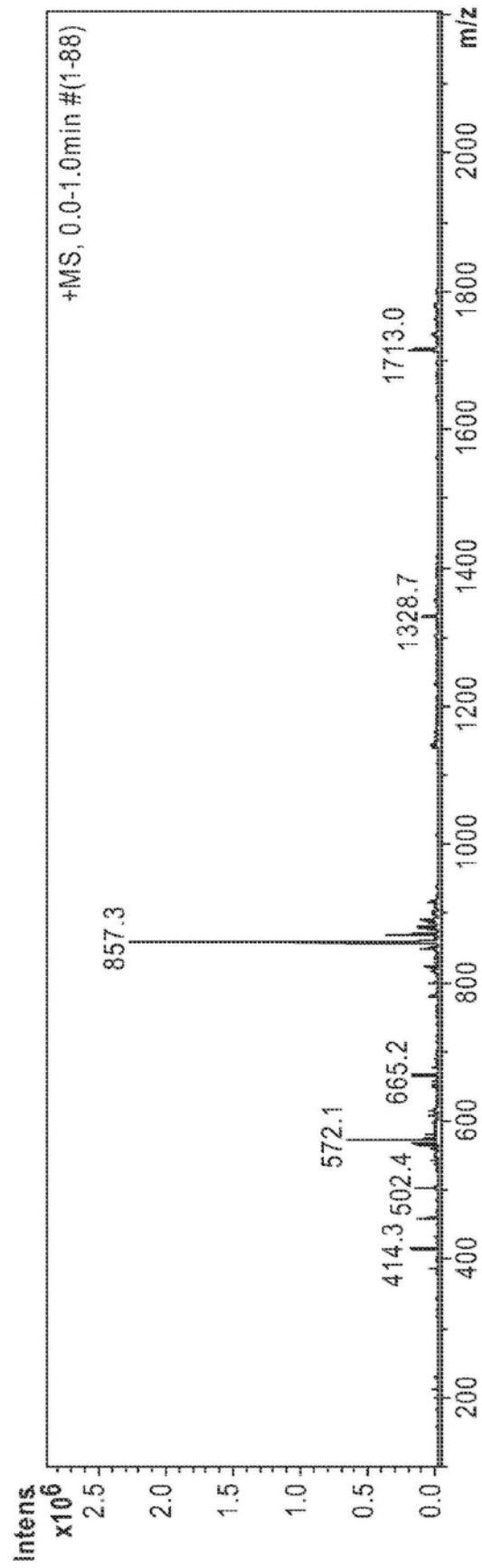


图2A

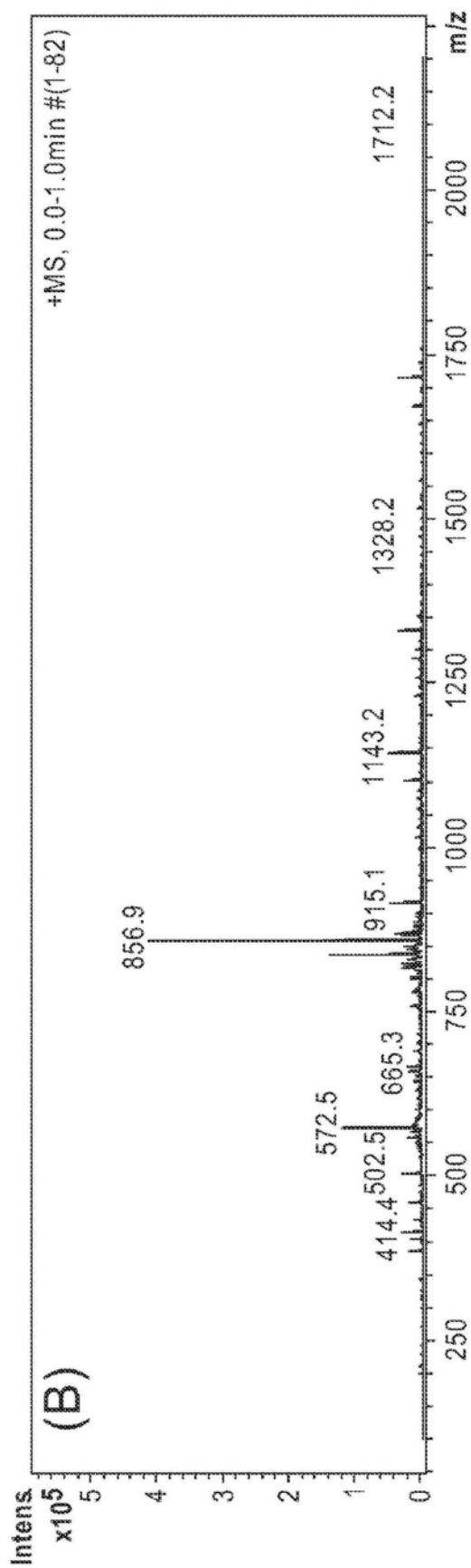


图2B

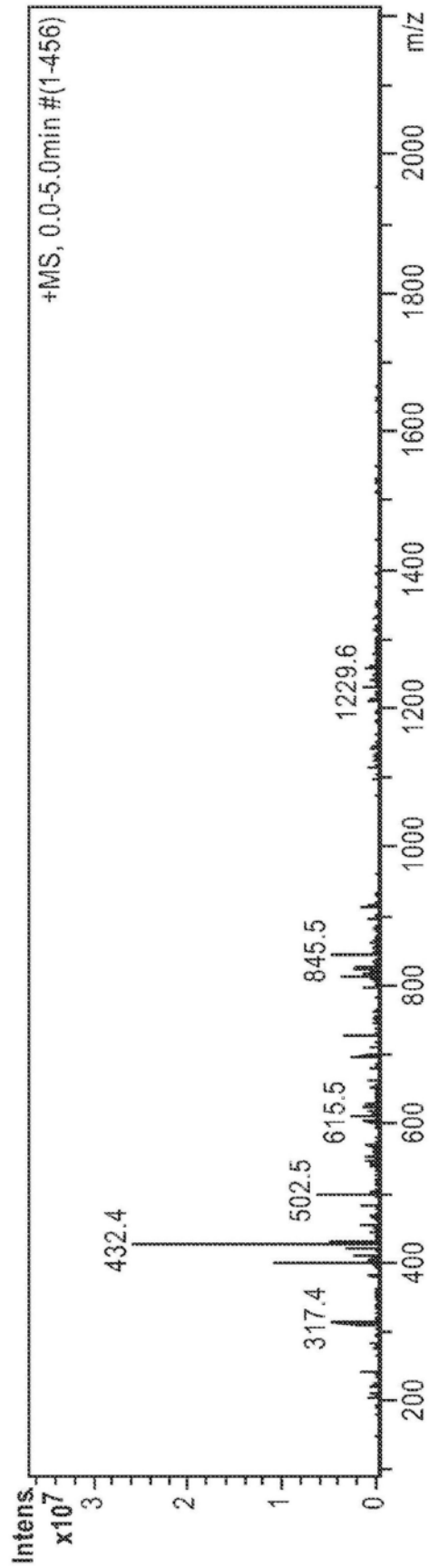


图2C

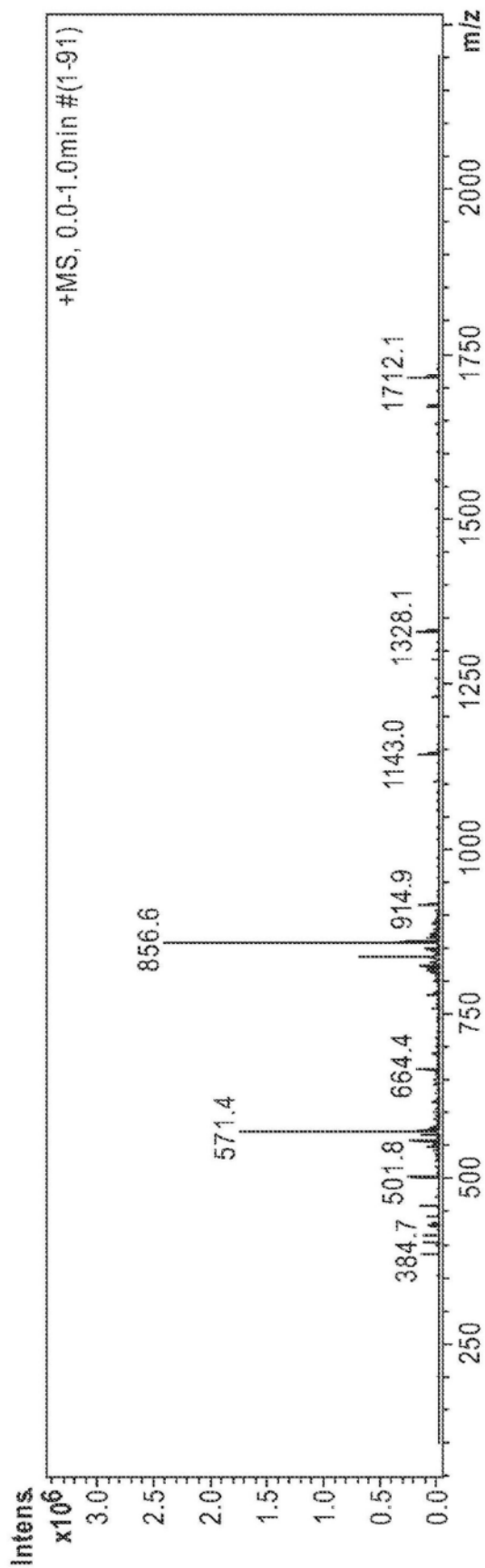


图3A

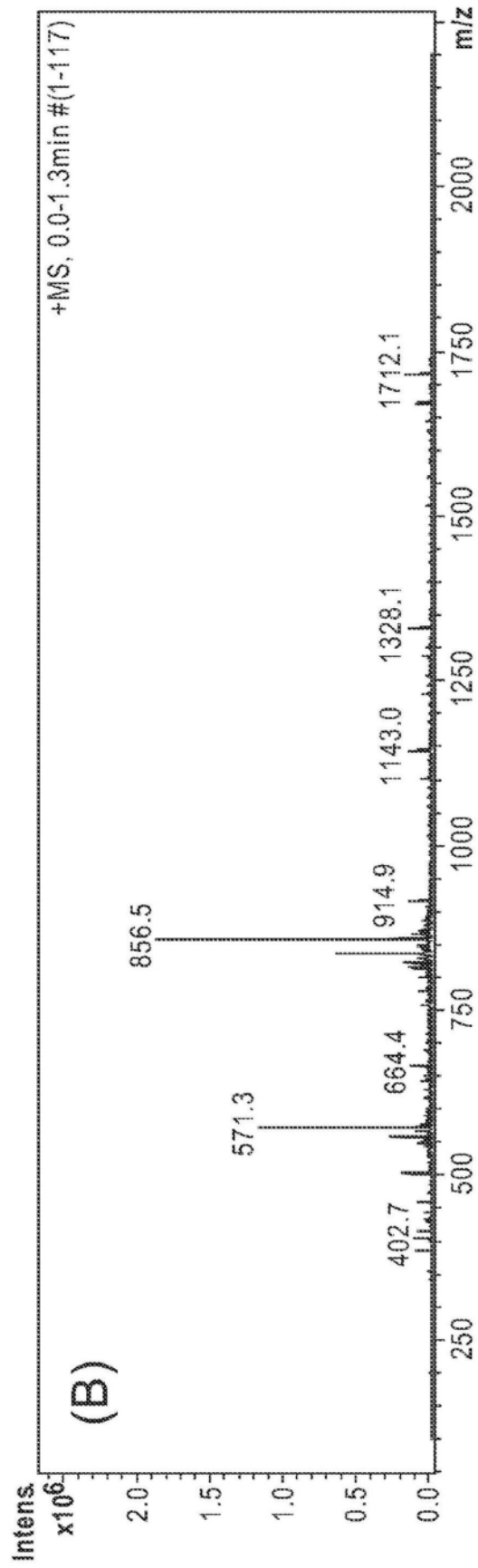


图3B

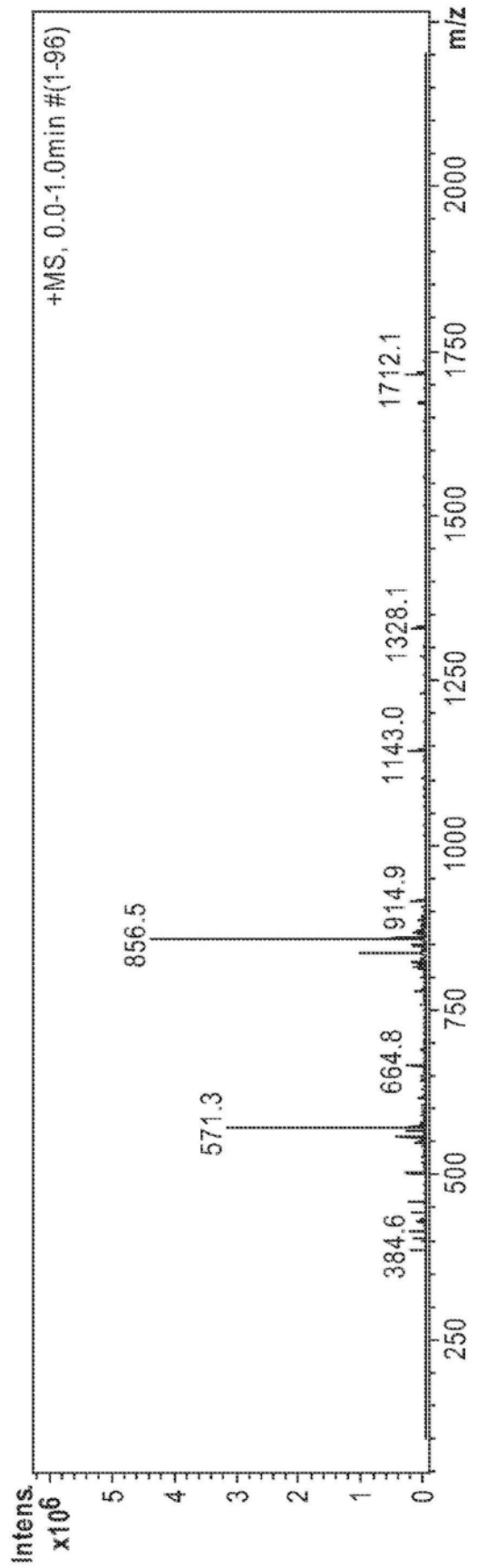


图4A

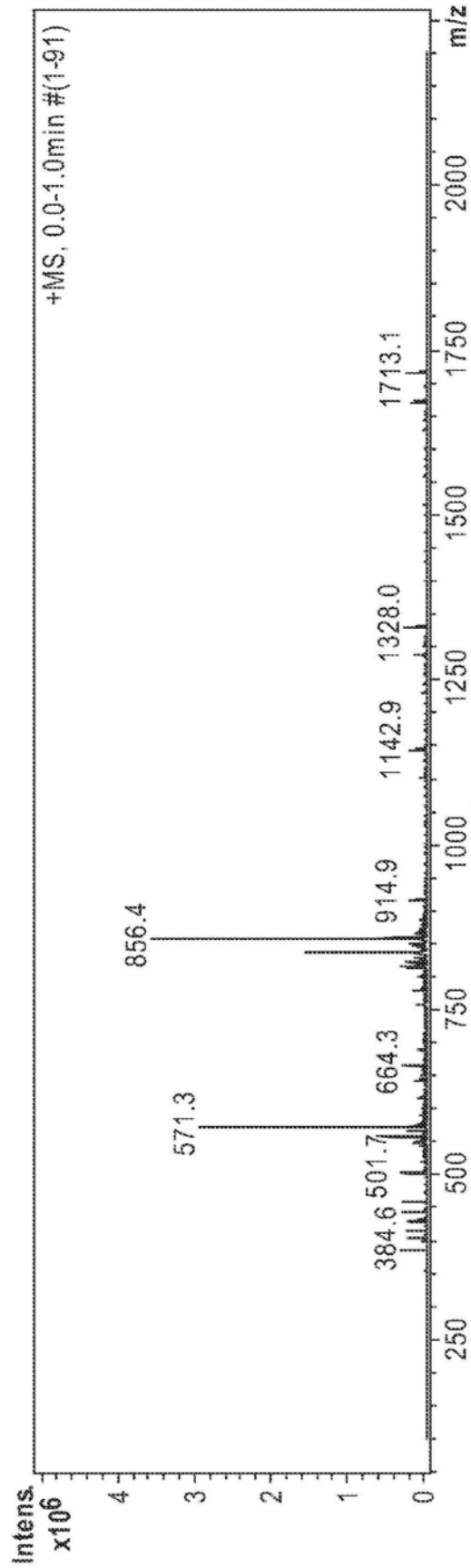


图4B

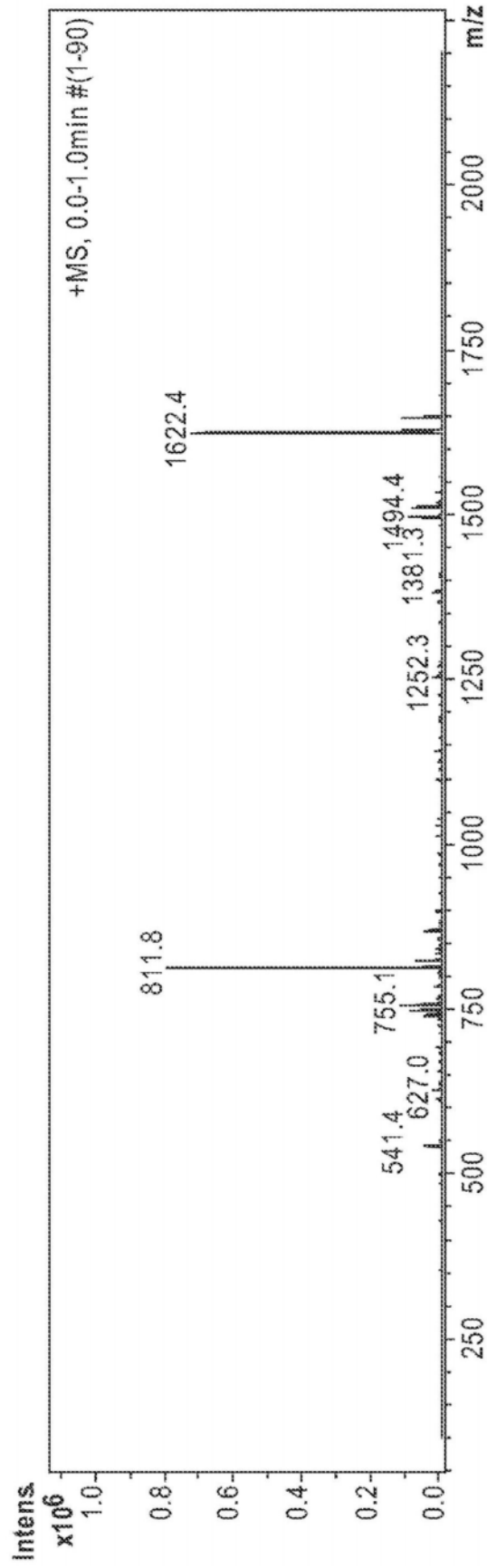


图5A

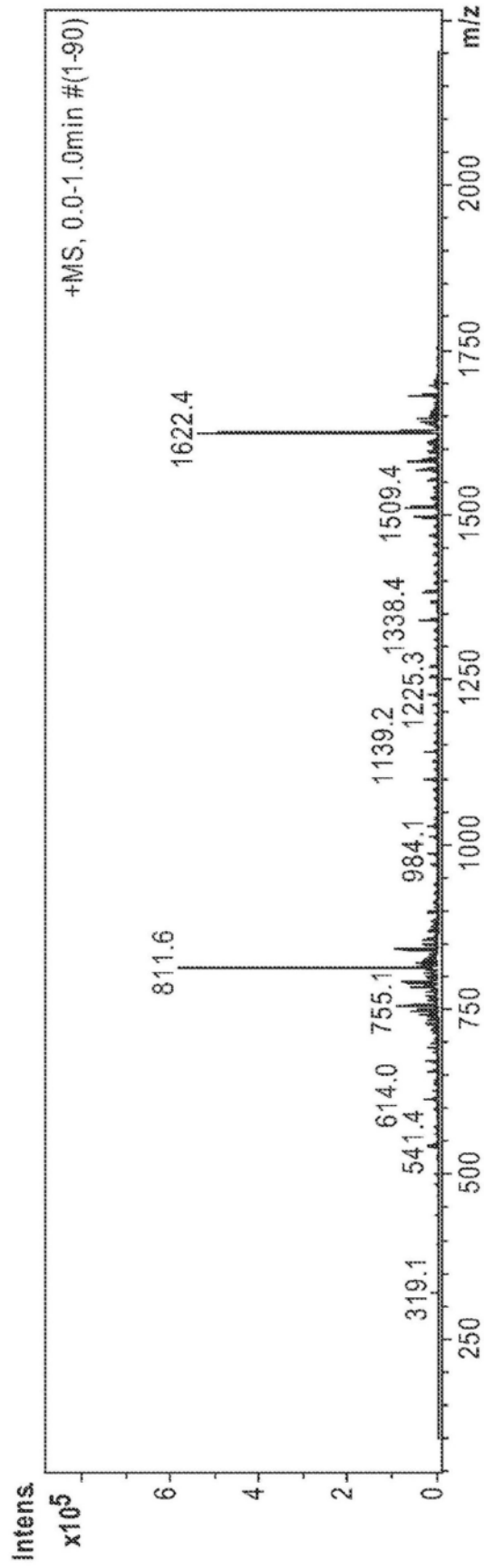


图5B

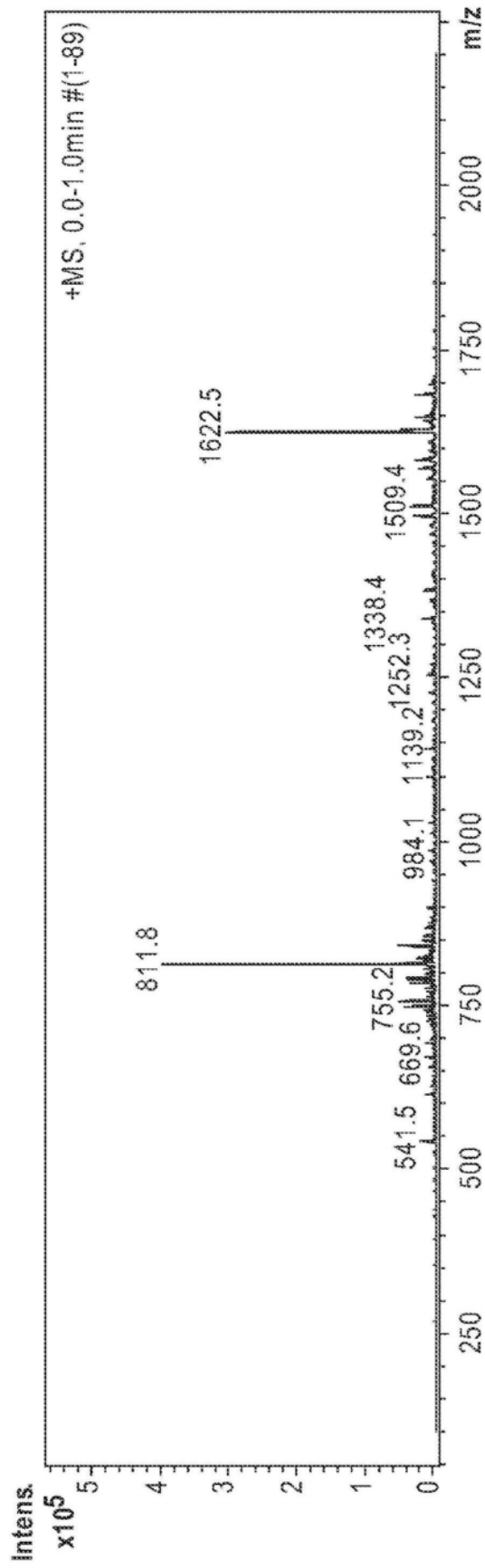


图5C

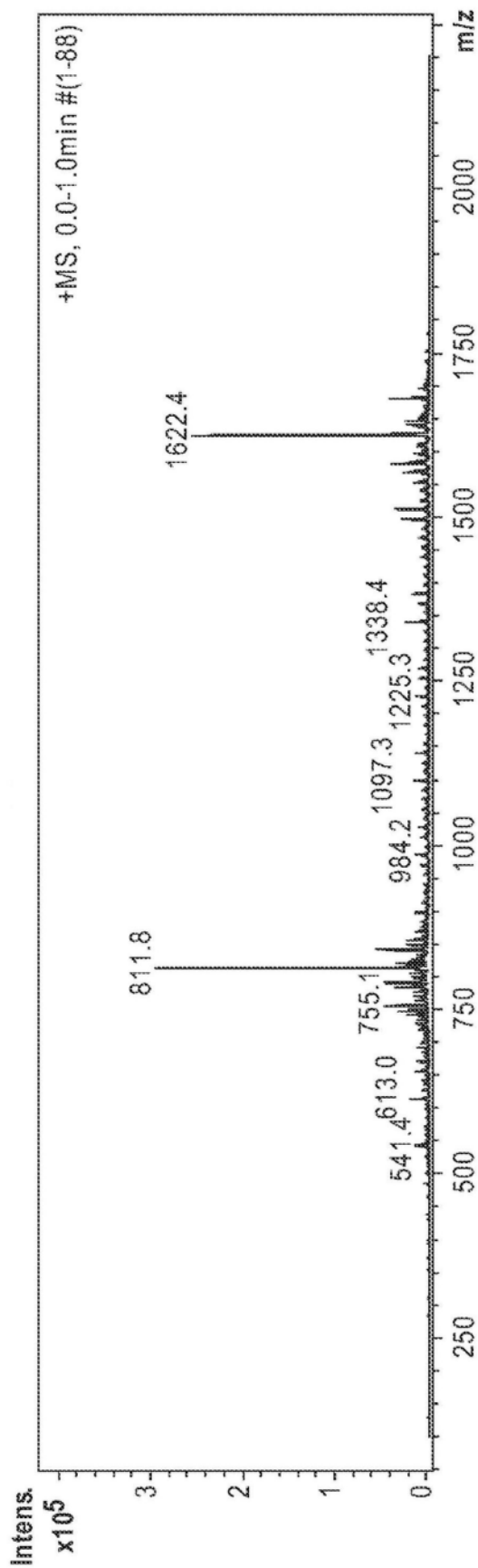


图5D

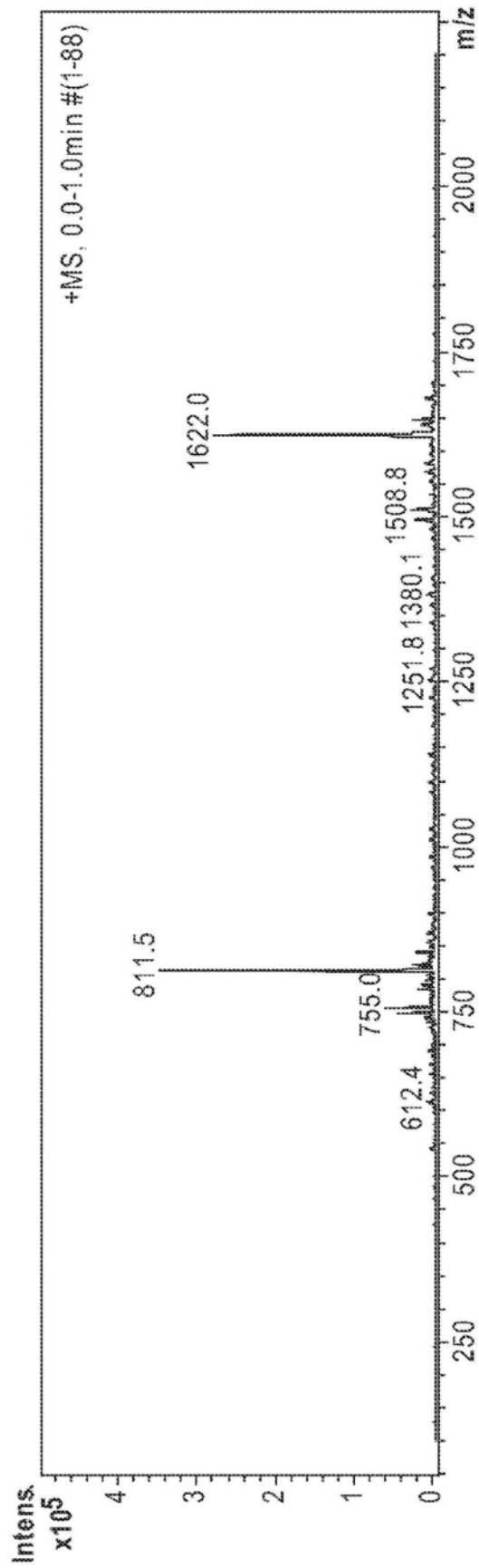


图5E

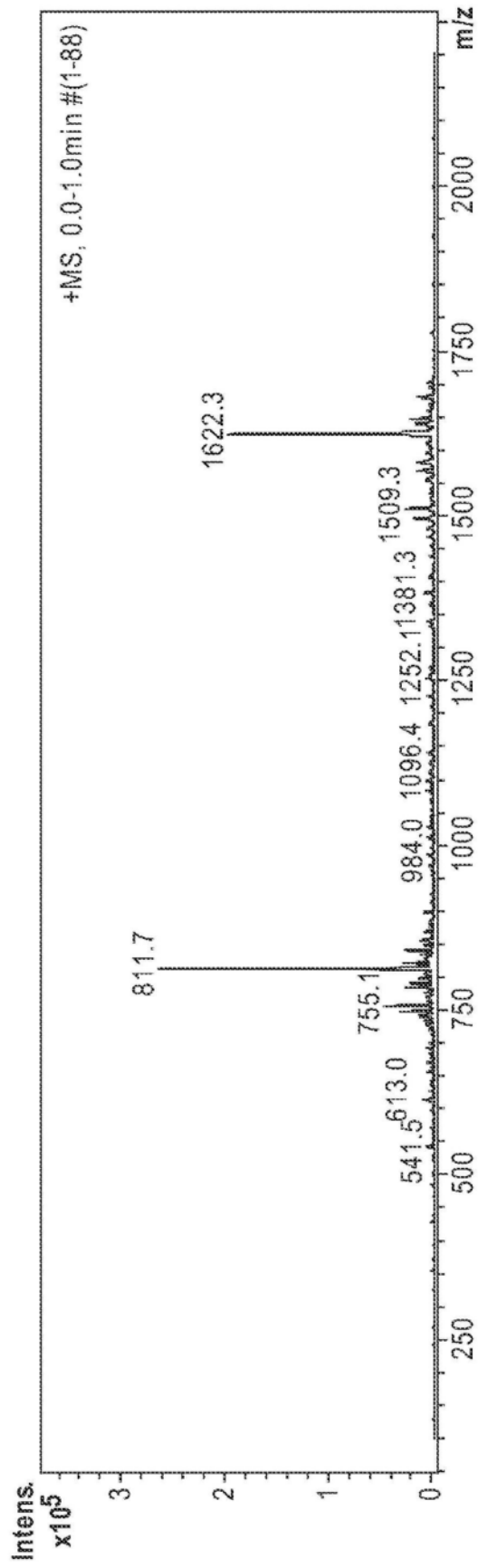


图5F

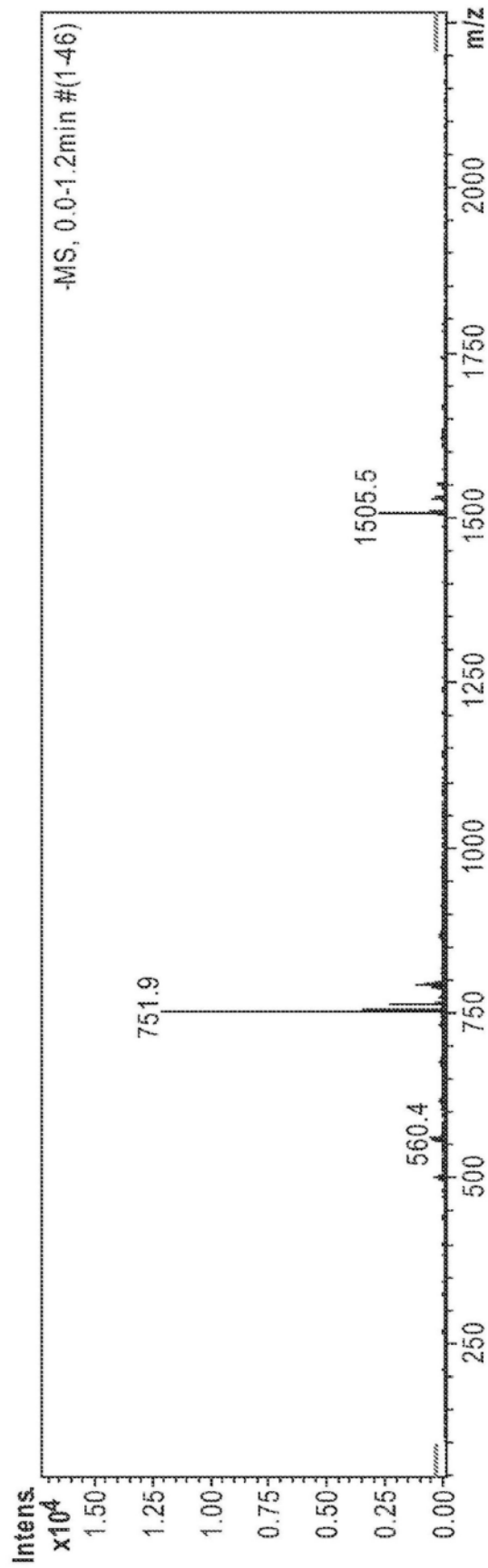


图6A

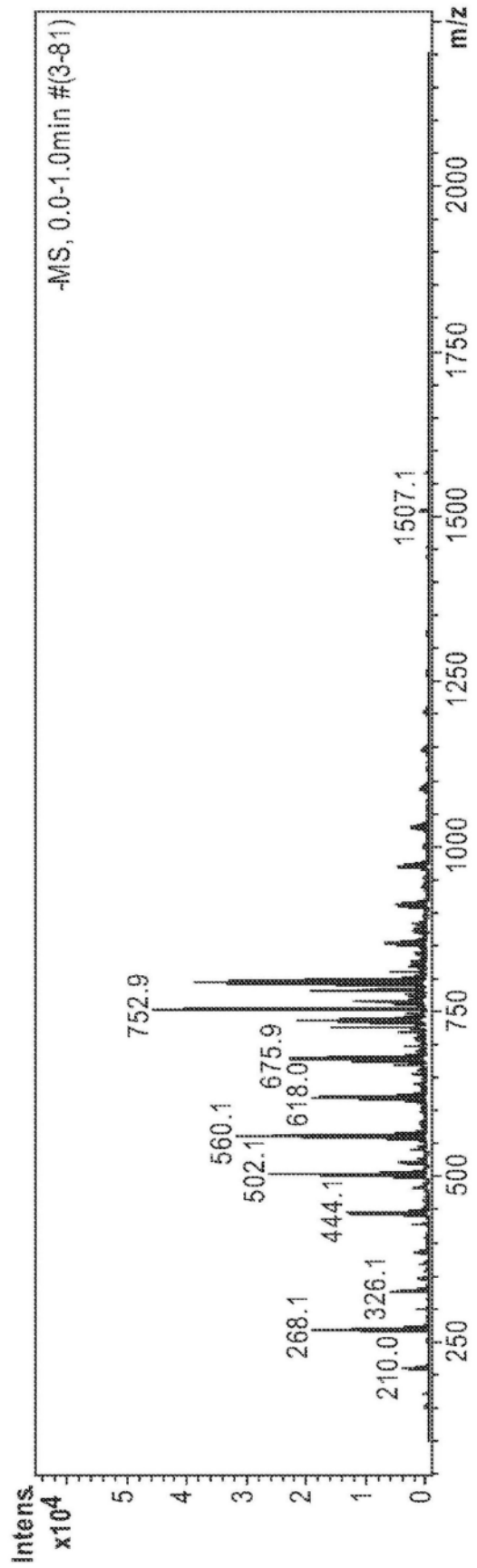


图6B

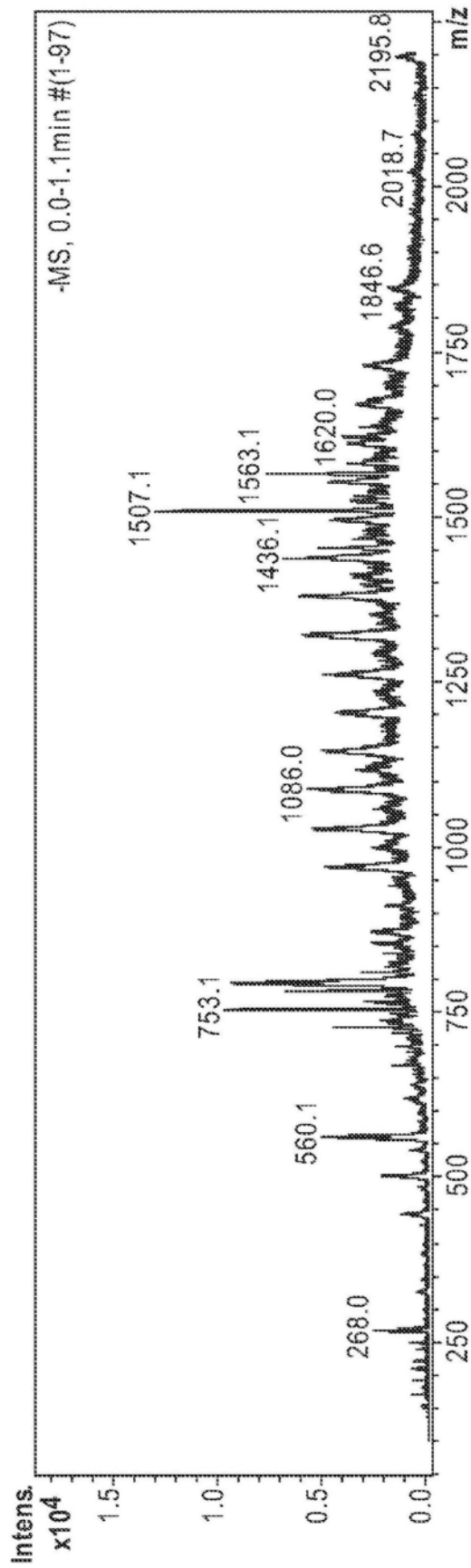


图6C

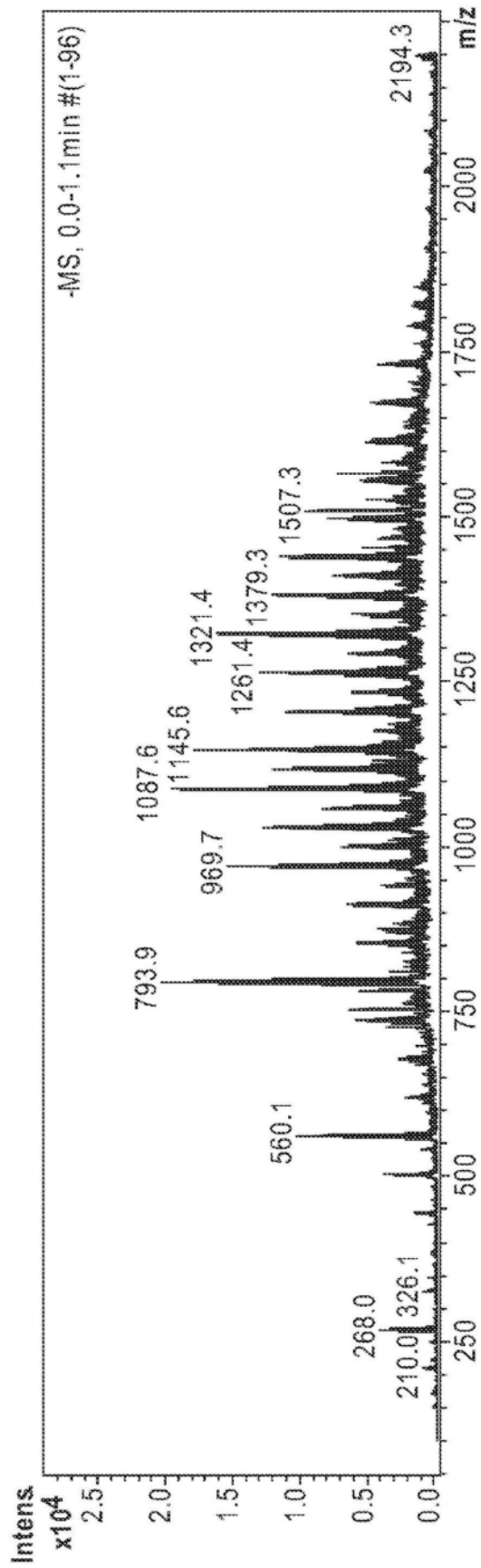


图6D

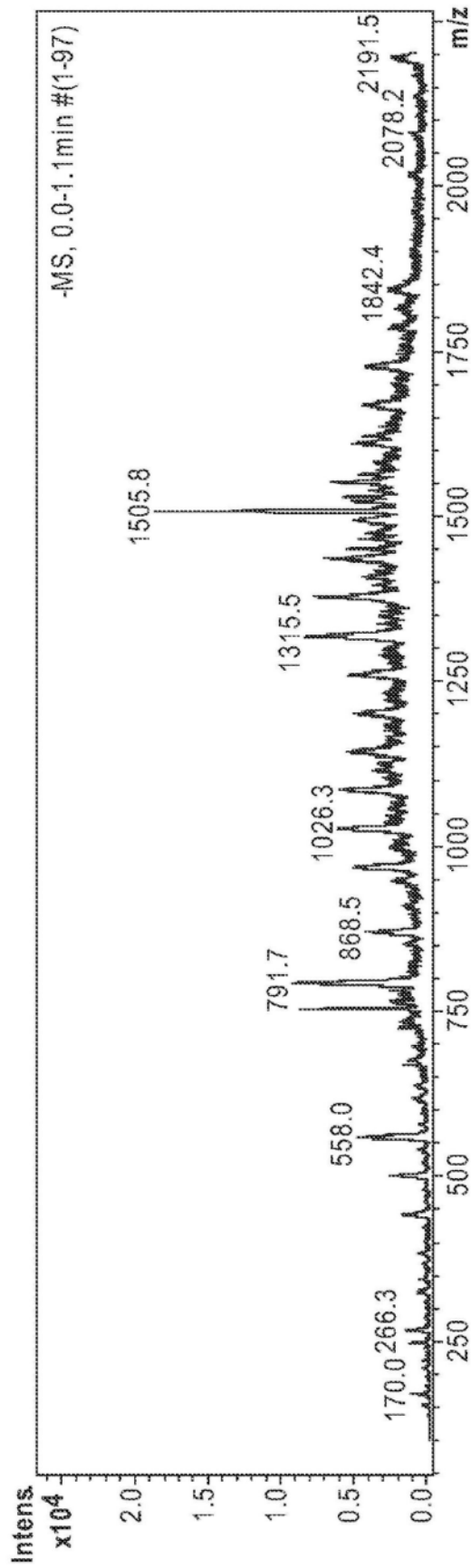


图6E

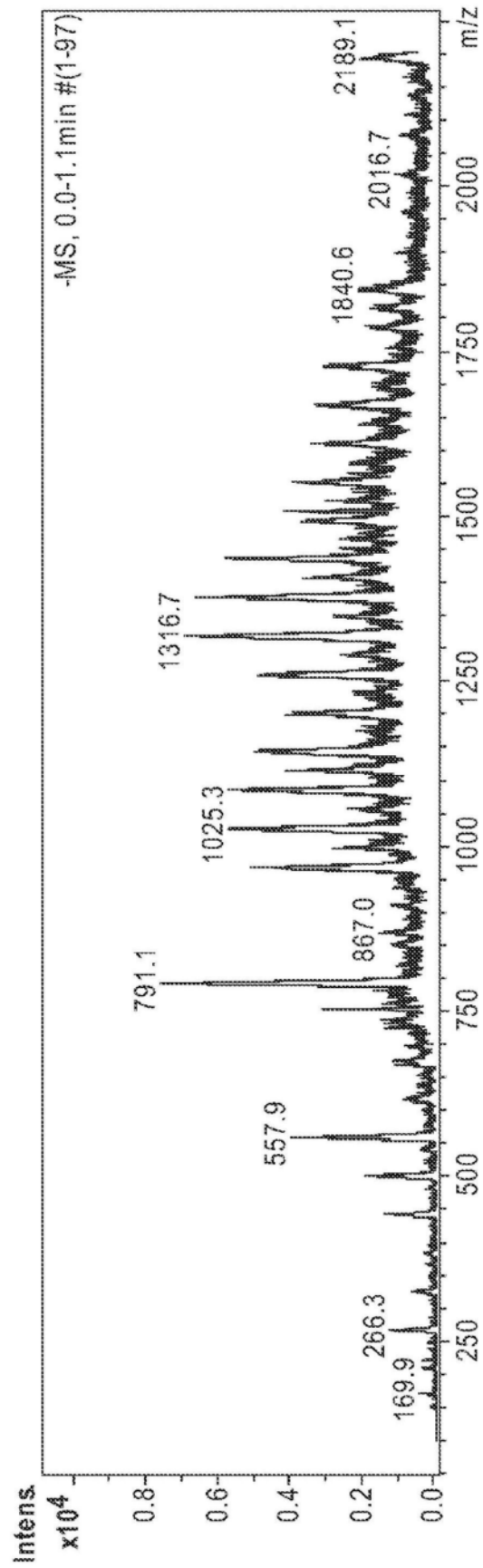


图6F

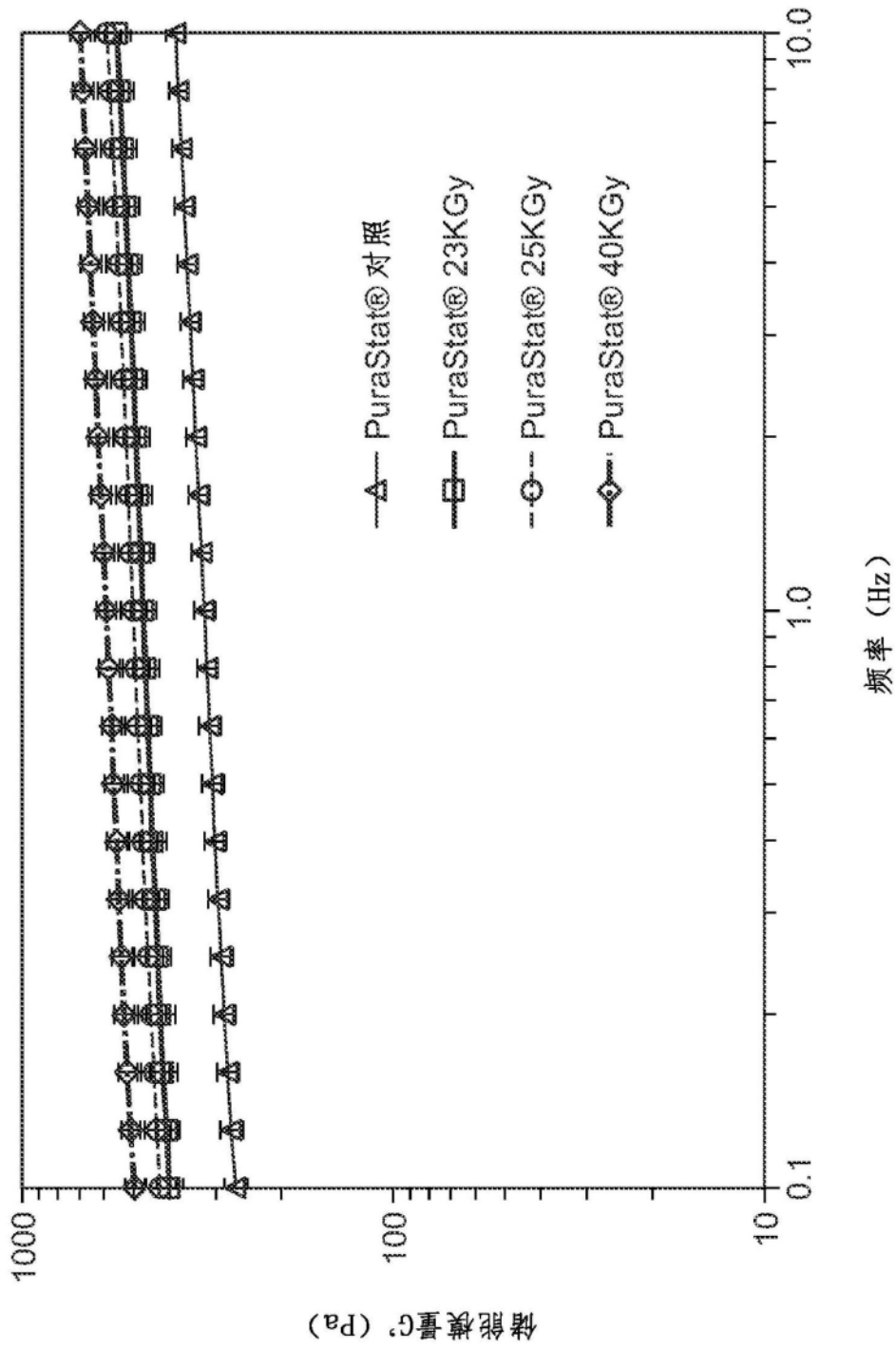


图7

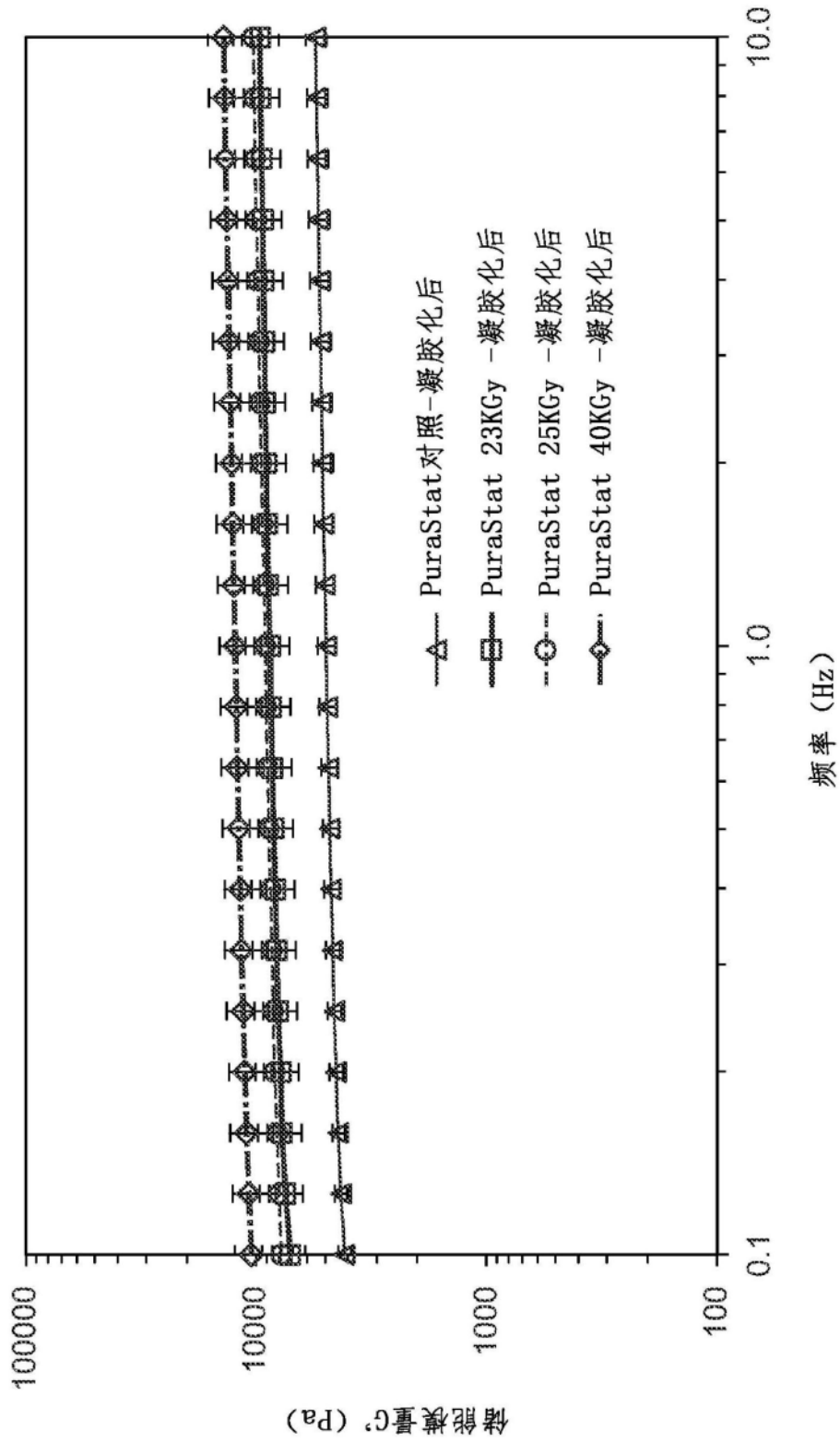


图8

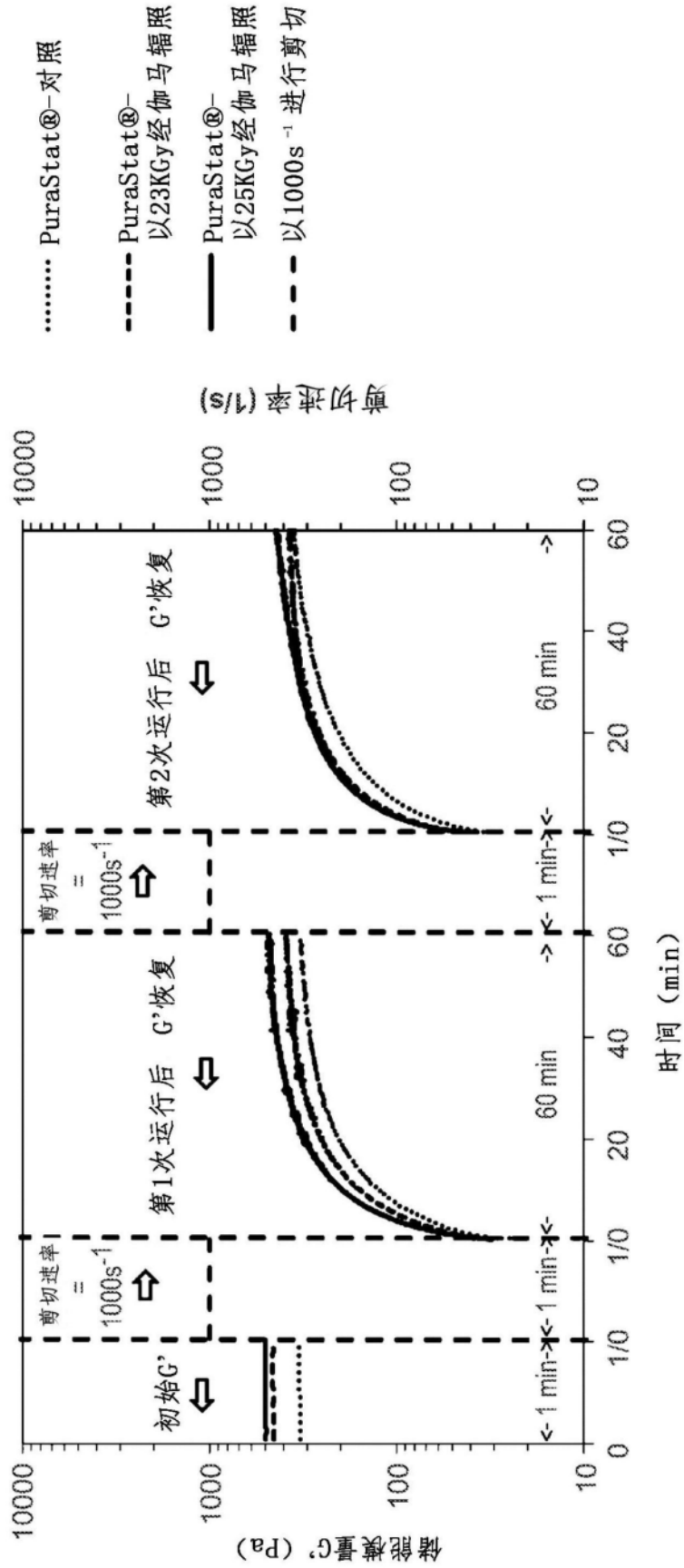


图9