

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к препаратам лиофилизированного фактора роста кератиноцитов и способам приготовления лиофилизированной композиции, содержащей фактор роста кератиноцитов.

Предпосылки создания изобретения

Фактор роста кератиноцитов (KGF) представляет собой фактор роста, специфический для эпителиальных клеток, которые первоначально были идентифицированы в кондиционированной среде клеточной линии эмбриональных лёгочных фибробластов человека [Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 802-806 (1989)]. Экспрессия матричной РНК для KGF обнаружена в некоторых клеточных линиях стромальных фибробластов, образованных из эпителиальных тканей на разных стадиях развития. Транскрипт для KGF также был очевиден в РНК, извлечённой из нормальной почки взрослого и органов желудочно-кишечного тракта [Finch et al., Science, 245: 752-755 (1989)]. Доказательства того, что KGF секретируется фибробластами в культуре и экспрессируется *in vivo* в дермисе, но не в эпидермисе, указывает на то, что KGF может быть важным нормальным паракринным эффектором пролиферации кератиноцитов. Исследования показали, что KGF так же эффективно стимулирует пролиферацию первичных или вторичных человеческих кератиноцитов в культуре ткани, как и эпидермальный фактор роста (EGF) (Marchese et al., J. Cell Phys. 144: 326-332 (1990)). KGF продуцируется мезенхимными клетками близ эпителия многих органов, включая эпидермис, оральный эпителий и эпителий нижних отделов желудочно-кишечного тракта, поджелудочную железу, печень, лёгкое, уротелий, эпителий простаты и т.д. [Finch et al., supra Housley et al., J. Clin. Invest. 94: 1764-77 (1994); Yi et al., Am. J. Path. 145: 80-85 (1994); Pierce et al., J. Exp. Med. 179: 831-40 (1994); Yi et al., J. Urol. 154: 1566-70 (1995); и Ulich et al., J. Clin. Invest. 93: 1298-1306 (1994)].

Очистка KGF от кондиционированной среды клеточной линии эмбриональных фибробластов человека, а также частичное секвенирование аминокислот очищенного KGF, клонирование гена KGF и экспрессия гена в бактериальных клетках с получением биологически активного рекомбинантного KGF описаны в Международной патентной заявке WO 90/08771. В этой публикации также раскрывается, что KGF или KGF-подобные полипептиды применимы в качестве агентов для заживления ожоговых ран или для стимуляции трансплантированной роговицы.

Ex vivo и *in vivo* исследования на нормальных взрослых животных показали, что KGF-1 (далее в данном описании "KGF") вызывает изменения в морфогенезе волосяного фолликула, пролиферации гепатоцитов и пролиферации эпителиальных клеток в лёгком, молочной железе, поджелудочной железе, желудке, тонком кишечнике и толстом кишечнике (Panes et al., J. Clin. Invest. 92: 969-977 (1993); Ulich et al., Am. J. Path. 144: 862-868 (1994); Yi et al., Am. J. Path. 145: 80-85 (1994) и Ulich et al., J. Clin. Invest. 93: 1298-1306 (1994)]. Роль KGF в развитии эмбриона и новорождённого в настоящее время изучается; однако документально установлено, что KGF является важным медиатором развития семенных пузырьков у новорождённой мыши [Alarid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 1074-1078 (1994)]. Кроме того, у мышей со сверхэкспрессией KGF в гепатоцитах наблюдается болезнь почек [Nguyen et al., Oncogene 12: 2109-19 (1996)], тогда как сверхэкспрессия KGF в лёгком с использованием поверхностно-активного промотора приводит в результате к появлению мышей с цистаденомами лёгкого [Simonet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 12461-65 (1995)], что демонстрирует важность KGF для нормального развития почек и лёгких.

Показано, что KGF повышает реэпителизацию и увеличивает толщину эпителия, когда рекомбинантный KGF местно наносят на раны, образующиеся в результате хирургического вмешательства в ухе кролика или на коже свиньи [Pierce et al., J. Exp. Med. 179: 831-840 (1994) и Staiano-Coico et al., J. Exp. Med. 178: 865-878 (1993)]; Bosch, et al. [J. Clin. Invest. 98: 2683-2687 (1996)] сообщали, что введение фактора роста кератиноцитов вызывает пролиферацию печёночных клеток.

Как правило, очищенные полипептиды лишь малоустойчивы в водной среде и претерпевают химическое и физическое расщепление, приводящее к утрате биологической активности при процессировании и хранении. Кроме того, композиции полипептидов в водном растворе подвергаются гидролизу, такому как деамидирование и расщепление пептидной связи. Эти эффекты являются серьёзной проблемой для терапевтически активных полипептидов, которые предполагаются для введения людям в определённом интервале доз с учётом биологической активности.

Введение очищенного фактора роста кератиноцитов остаётся перспективной возможностью лечения множества заболеваний, влияющих на человеческую популяцию. Однако способность KGF оставаться устойчивой фармацевтической композицией во времени в различных условиях хранения, а затем эффективно действовать на пациентов *in vivo* не рассматривалась. Таким образом, остаётся потребность в уровне техники обеспечить фактор роста кератиноцитов в виде устойчивых рецептов, пригодных в качестве терапевтических агентов для лечения множества заболеваний, при которых помогает опосредованная KGF стимуляция роста эпителиальных клеток.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает в себя новый состав, пригодный для лиофилизации фактора роста кератиноцитов (KGF), которая даёт высокоустойчивый KGF продукт. Устойчивый KGF продукт применим в качестве терапевтического агента при лечении людей, страдающих нарушениями или состояниями, при которых введение KGF является целебным.

В одном аспекте изобретение включает лиофилизированную композицию фактора роста кератиноцитов, содержащую гистидин, наполнитель, поверхностно-активное вещество и сахар, такой как стабилизирующий сахар.

В одном варианте изобретения композиция KGF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или её вариант. Вариант KGF белков включает аллельные варианты, или делецию (делеции), замену (замены) или инсерцию (инсерции) аминокислот, включая фрагменты, химерные или гибридные молекулы нативного KGF. Например, в изобретении рассматривается, что KGF представляет собой Δ N23 KGF (SEQ ID NO: 3), в котором первые 23 аминокислоты нативного KGF делетированы. Варианты включают такие молекулы по данному описанию, как полипептиды с изменением заряда, в которых один или более аминокислотных остатков 41-154 нативного KGF (SEQ ID NO: 2) делетируются или заменяются на нейтральный остаток или отрицательно заряженный остаток, выбранный с целью подействовать на белок с пониженным положительным зарядом. Ещё один пример KGF включает, но без ограничения, белки, образующиеся с помощью замены по меньшей мере одной аминокислоты, имеющей более высокий потенциал петлеобразования по меньшей мере на одну аминокислоту внутри петлеобразующей области Asn¹¹⁵-His¹¹⁶-Tyr¹¹⁷-Asn¹¹⁸-Thr¹¹⁹ нативного KGF. Ещё один пример включает белки, имеющие одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений в области аминокислот 123-133 (аминокислоты 154-164 SEQ ID NO: 2) нативного KGF.

В одном аспекте изобретение рассматривает применение наполнителя/регулятора осмолярности. Наполнители могут быть либо кристаллическими (например, глицин, маннит), либо аморфными (например, L-гистидин, сахароза, полимеры, такие как декстран, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлоза и лактоза). В одном варианте изобретения наполнителем является маннит. В другом варианте изобретения маннит вводят в концентрации около 2-5% (вес./об.). Ещё в одном варианте изобретения концентрация составляет около 3-4,5% (вес./об.). В другом варианте изобретения концентрация маннита составляет 4% (вес./об.).

В другом аспекте изобретение включает композицию, содержащую стабилизирующий сахар. Сахара, рассматриваемые для применения, включают, но без ограничения, сахарозу, трегалозу или глицин. В одном варианте изобретения сахар представляет собой сахарозу. В зависимом (родственном) варианте изобретения концентрация сахарозы составляет около 1-3% (вес./об.). В другом варианте изобретения концентрация сахарозы составляет 2%.

Рассматривается, что pH композиции по изобретению корректируется в интервале около 5,0-8,0. В одном варианте изобретения композиция KGF имеет pH в интервале около 6,0-8,0. В другом варианте изобретения композиция имеет pH в интервале около 6,0-7,0. В другом варианте изобретения композиция имеет pH около 6,5.

В другом аспекте предусматривается применение поверхностно-активного вещества в композиции. Предполагается, что применяемое поверхностно-активное вещество включает, но без ограничения, полисорбат 20 или полисорбат 80. В одном варианте изобретения поверхностно-активным веществом является полисорбат 20. В зависимом (родственном) варианте изобретения концентрация полисорбата 20 находится в примерном интервале 0,1-0,004% (вес./об.). В другом варианте изобретения концентрация полисорбата 20 составляет около 0,01% (вес./об.).

В одном аспекте изобретение предусматривает лиофилизированную композицию фактора роста кератиноцитов, содержащую 10 mM гистидина, 4% маннита, 2% сахарозы и 0,01% полисорбата 20, причём pH композиции 6,5.

Кроме того, изобретение включает способ приготовления лиофилизованного фактора роста кератиноцитов, содержащий стадии:

а) приготовления раствора гистидина, наполнителя, стабилизирующего сахара и поверхностно-активного вещества; и

б) лиофилизации указанного KGF.

В родственном аспекте изобретение предусматривает способ приготовления лиофилизованного фактора роста кератиноцитов, дополнительно включающий, до стадии лиофилизации:

б) доведение pH раствора до pH в примерном интервале 6,0-8,0;

в) приготовление раствора, содержащего фактор роста кератиноцитов;

г) буферный обмен раствора стадии в) на раствор стадии б);

д) добавление соответствующего количества поверхностно-активного вещества и

е) лиофилизацию смеси стадии (д).

Кроме того, предусматривается, что KGF может представлять собой набор белков KGF, представленный SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или их вариантами.

В одном аспекте способ по изобретению предусматривает применение наполнителя/регулятора осмолярности, причём наполнители могут быть либо кристаллическими (например, глицин, маннит), либо аморфными (например, L-гистидин, сахароза, полимеры, такие как декстран, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлоза и лактоза). В одном варианте изобретения наполнителем является маннит. В другом варианте изобретения концентрации маннита составляет около 2-5% (вес./об.). В родственном (зависимом) варианте изобретения концентрация составляет около 3-4,5% (вес./об.). В другом варианте изобретения концентрация маннита составляет 4% (вес./об.).

В другом аспекте способ по изобретению включает композицию, содержащую сахар, причём сахар представляет собой стабилизирующий сахар. Сахара, рассматриваемые для применения по способу, включают, но без ограничения, сахарозу, трегалозу или глицин. В одном варианте изобретения сахар представляет собой сахарозу. В зависимом (родственном) варианте изобретения концентрация сахарозы составляет около 1-3% (вес./об.). В другом варианте изобретения концентрация сахарозы составляет 2%.

В способе по изобретению рассматривается, что pH композиции по изобретению доводится до физиологического значения. В одном варианте изобретения pH доводится до значения в интервале около 5,0-8,0. В другом варианте изобретения pH доводится до значения в интервале около 6,0-8,0. В другом варианте изобретения pH доводится до значения в интервале около 6,0-7,0. Ещё в одном варианте изобретения pH доводится до значения, примерно, 6,5.

В другом аспекте способы по изобретению предусматривают применение поверхностно-активного вещества. Предполагается, что применяемое поверхностно-активное вещество включает, но без ограничения, полисорбат 20 или полисорбат 80. В одном варианте изобретения поверхностно-активным веществом является полисорбат 20. В зависимом (родственном) варианте изобретения концентрация полисорбата 20 находится в примерном интервале 0,1-0,004% (вес./об.). В другом варианте изобретения концентрация полисорбата 20 составляет около 0,01% (вес./об.).

В одном аспекте изобретение предусматривает способ приготовления лиофилизированной композиции фактора роста кератиноцитов, содержащей 10 мМ гистидина, 4% маннита, 2% сахарозы и 0,01% полисорбата 20, причём pH композиции 6,5.

Изобретение дополнительно предусматривает способ лечения заболевания за счёт повышения опосредованной KGF стимуляции роста эпителиальных клеток, заключающийся во введении субъекту эффективного количества лиофилизированной композиции фактора роста кератиноцитов по изобретению.

Предусматривается, что подлежащее лечению заболевание представляет собой кишечную интоксикацию; воспаление слизистой оболочки; ожог или другое частичное или полное нарушение слоя; регенерацию волосяных фолликулов, потовых и сальных желёз; пролиферацию придаточных структур; врождённый буллёзный эпидермолиз; вызванную химиотерапией алопецию; облысение по мужскому типу; язвы желудка; язвы двенадцатиперстной кишки; эрозивный гастрит, эзофагит или эзофагеальный рефлюкс; воспалительное заболевание кишечника; асфиктическую пневмонию (гиалиново-мембранную болезнь новорождённых); поражения в результате вдыхания дыма; эмфизему; цирроз печени, печёночную недостаточность, острый вирусный гепатит, другие токсические поражения печени или гомологичную болезнь (болезнь трансплантат-против-хозяина (GVHD)).

Также изобретение включает набор для приготовления водной фармацевтической композиции, содержащий первый контейнер с лиофилизированной композицией фактора роста кератиноцитов, и второй контейнер с физиологически приемлемым раствором для реконституции лиофилизированного раствора. Предусматривается, что белок KGF представлен в виде SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или их вариантов. Физиологически приемлемый раствор для реконституции может представлять собой любой фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, включая, но без ограничения, любые и все клинически приемлемые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т.п., включая такие агенты по данному описанию. Кроме того, композицию KGF можно вводить субъекту любым способом, подходящим по мнению лечащего врача, включая пероральный, топический, трансдермальный, парентеральный, в виде спрея для ингаляций, вагинальный, ректальный или с помощью внутривенной инъекции. Термин "парентеральный" по данному описанию включает подкожные инъекции, внутривенную, внутримышечную, интракостеральную инъекцию или инфузию. Также предусматривается введение внутривенной, интрадермальной, внутримышечной, интрамаммарной, интраперитонеальной (внутрибрюшинной), подболовочной, ретробульбарной, внутривенной инъекцией или хирургической имплантацией в конкретную область (сайт).

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны результаты анализа методами эксклюзионной (с исключением по размеру) SE-ВЭЖХ (фиг. 1А) и катионообменной SE-ВЭЖХ (фиг. 1В) растворимого белка в жидких препаратах KGF при различных значениях pH.

На фиг. 2 изображены обращённо-фазовые (RP)-ВЭЖХ хроматограммы, сравнивающие KGF препараты, лиофилизированные в 10 mM гистидина, 0,01% полисорбата 20 и либо с 4% маннита/2% сахарозы, либо с 3% маннита/2% сахарозы. На фиг. 2А показано время 0 после лиофилизации, тогда как на фиг. 2В показан продукт после хранения в течение 1 года при 4°C. На вставке изображена область около основного пика.

На фиг. 3 показано процентное содержание основного пика как функция концентрации белка, полученное SE-ВЭЖХ анализом лиофилизированного препарата KGF после хранения в течение 24 недель при 45°C.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к составам для лиофилизации очищенного фактора роста кератиноцитов, которые обеспечивают устойчивый белковый продукт и увеличивают время хранения очищенного белка. Кроме того, изобретение включает способ приготовления лиофилизированной композиции, содержащей фактор роста кератиноцитов.

Применяемый в данном описании термин "фактор роста кератиноцитов", или "KGF", относится к полинуклеотиду фактора роста кератиноцитов (SEQ ID NO: 1, регистрационный № в Genbank NM_002009), или к полипептиду, представленному SEQ ID NO: 2 (регистрационный № в Genbank NP_002000), или к их аналогу, или же к активному фрагменту фактора роста кератиноцитов или его аналогу, такому как ΔN23 KGF (SEQ ID NO: 3), или к фактору, который связывает и активирует рецептор фактора роста кератиноцитов. В предпочтительном варианте изобретения KGF обозначает ΔN23 KGF, полученную методами рекомбинации форму KGF, в котором делетированы первые 23 аминокислоты на аминоконце зрелого KGF (отсутствует сигнальная последовательность). См., например, патенты США № 5677278; 6677301; 6074848; 5843883; 5863767 и 5773586, все переданы CHIRON Corp.; патент США № 5731170 и Международную патентную заявку PCT WO 90/08771, опубликованную 9 августа 1990 г. (относящиеся к полноразмерным формам KGF и вариантам); Международную патентную заявку PCT WO 96/11949, опубликованную 25 апреля 1996 г.; Международную патентную заявку PCT WO 96/11951, опубликованную 25 апреля 1996 г. и Международную патентную заявку PCT WO 98/24813, опубликованную 11 июня 1998 г. (относящиеся к устойчивым аналогам KGF).

Аналоги KGF, имеющие повышенную стабильность по сравнению с природным KGF, описаны в Международной патентной заявке PCT WO 96/11951 и патенте США 6677301, и такие аналоги KGF рассматриваются в изобретении. Или же рассматривается любой фрагмент целого KGF полипептида или его аналога, который сохраняет полную или даже частичную активность KGF.

Следует понимать, что предполагается, что термины "фактор роста кератиноцитов" и "KGF" по данному описанию включают и означают равнозначно, если не указано иначе, нативный белок KGF и белки KGF аналогов (или "мутеины"), характеризующиеся пептидной последовательностью, практически такой же, как вся пептидная последовательность или часть пептидной последовательности нативного KGF, и сохраняющие некоторую или всю биологическую активность нативного KGF, в частности пролиферацию нефибробластных эпителиальных клеток, например, проявляющих по меньшей мере в 500 раз большую стимуляцию кератиноцитов BALB/MK, чем NIH/3T3 фибробластных клеток, и по меньшей мере примерно в 50 раз большую стимуляцию кератиноцитов BALB/MK, чем BS/589 эпителиальных клеток или CC1208 эпителиальных клеток, как определено с помощью включения Н-тимидина. Также в изобретении рассматриваются пептиды, "характеризующиеся пептидной последовательностью, практически такой же, как пептидная последовательность нативного KGF", что относится к пептидной последовательности, кодированной последовательностью ДНК, способной гибридизоваться кодирующей областью SEQ ID NO: 1 в условиях гибридизации от умеренно жёстких до очень жёстких, как поясняется примерами в данном описании.

Жёсткие условия применительно к гибридизации означают жёсткие совокупные условия, включая: соль, температуру, органические растворители и другие параметры, обычно контролируемые в реакциях гибридизации. Примером жёстких условий гибридизации является гибридизация в 4× SSC при 62-67°C с последующим отмыванием в 0,1× SSC при 62-67°C, примерно, в течение 1 ч. Или же примером жёстких условий гибридизации является гибридизация в 45-55% формамиде, 4× SSC при 40-45°C [см. T. Maniatis et al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual); Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p. 387-389].

KGF белки включают аллельные варианты или делецию (делеции), замену (замены) или инсерцию (инсерции) аминокислот, включая фрагменты, химерные или гибридные молекулы нативного KGF. Предпочтительная молекула KGF по изобретению представляет собой ΔN23 KGF. Другие примеры KGF включают, без ограничения, белки, в которых остатки, соответствующие Cys¹ и Cys¹⁵ SEQ ID NO: 2, заменены или делегированы, в результате получают молекулу с повышенной стабильностью по сравнению с исходной молекулой (как заявляется в находящемся в совместном обладании патенте США

№ 6008328). Другой пример KGF включает, но без ограничения, полипептиды с изменением заряда, в которых один или более аминокислотных остатков 41-154 нативного KGF (предпочтительно, остатки Arg⁴¹, Gln⁴³, Lys⁵⁵, Lys⁹⁵, Lys¹²⁸, Asn¹³⁷, Gln¹³⁸, Lys¹³⁹, Arg¹⁴⁴, Lys¹⁴⁷, Gln¹⁵², Lys¹⁵³ или Thr¹⁵⁴) делетированы или заменены на нейтральный остаток или отрицательно заряженный остаток, выбранный для того, чтобы подействовать на белок с пониженным положительным зарядом. Ещё один пример KGF включает, но без ограничения, белки, образующиеся путём замены по меньшей мере одной аминокислоты с более высоким потенциалом образования петли по меньшей мере на одну аминокислоту внутри петлеобразующей области Asn¹¹⁵-His¹¹⁶-Tyr¹¹⁷-Asn¹¹⁸-Thr¹¹⁹ нативного KGF (как заявляется в патенте США № 6008328). Ещё один пример включает белки, имеющие одну или более аминокислотных замен, делеций или добавлений в области аминокислот 123-133 (аминокислоты 154-164 SEQ ID NO: 2) нативного KGF.

Конкретно рассматриваемые KGF белки включают следующие KGF молекулы, названные по остатку, находящемуся в этом положении в зрелом белке (минус сигнальная последовательность), представленном в SEQ ID NO:2, далее следует это положение в скобках, а затем либо заменивший остаток, либо "-" для обозначения делеций): ΔN15, ΔN16, ΔN18, ΔN23, ΔN24, ΔN25, ΔN26 или ΔN27 KGF, C(1,15)S, ΔN15-ΔN24, ΔN3/C(15)S, ΔN3/C(15)-, ΔN8/C(15)S, ΔN8/C(15)-, C(1,15)S/R(144)E, C(1,15)S/R(144)Q, ΔN23/R(144)Q, C(1,15,40)S, C(1,15,102)S, C(1,15,102,106)S, ΔN23/N(137)E, ΔN23/K(139)E, ΔN23/K(139)Q, ΔN23/R(144)A, ΔN23/R(144)E, ΔN23/R(144)L, ΔN23/K(147)E, ΔN23/K(147)Q, ΔN23/K(153)E, ΔN23/K(153)Q, ΔN23/Q(152)E/K(153)E; R(144)Q и H(116)G.

Пролиферативное действие KGF на многие различные типы эпителиальных и эндотелиальных клеток делает его полезным лекарственным средством при лечении многих состояний или заболеваний индивида. Ниже даётся описание заболеваний и медицинских состояний, которые можно лечить с помощью KGF по изобретению.

Кишечная интоксикация является основным лимитирующим фактором при схемах лечения с облучением и химиотерапией. Премедикация с помощью KGF может оказывать цитопротективное действие на слизистую тонкого кишечника, что позволяет применять повышенные дозы такой терапии при уменьшении возможных тяжёлых побочных эффектов интоксикации кишечника. Недавно проводившаяся фаза I клинических испытаний с введением пациентам рекомбинантного KGF перед лечением химиотерапевтическим агентом 5-фторурацилом наводит на мысль, что лечение KGF вызывает пониженную частоту воспаления слизистой оболочки [Meeropol et al., J. Clin. Oncol. 21: 1452-8 (2003)]. Стандартные in vivo модели вызванной облучением кишечной интоксикации, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны [Withers and Elkind, "Microcolony Survival Assay for Cells of Mouse Intestinal Mucosa Exposed to Radiation", Int. J. Radiat., 17: 261-267 (1970)]. Стандартные in vivo модели вызванной химиотерапией кишечной интоксикации, которые позволяют предсказывать терапевтическую эффективность в отношении людей, хорошо известны. [Sonis, et al., "An Animal Model for Mucositis Induced by Cancer Chemotherapy, Oral Surg.", Oral. Med. Oral Pathol., 69: 437-431 (1990) и Moore, "Clonogenic Response of Cells of Murine Intestinal Crypts to 12 Cytotoxic Drugs", Cancer Chemotherapy Pharmacol., 15: 11-15 (1985)].

Лечение с помощью KGF оказывает поразительное действие на выделение слизи вдоль всего желудочно-кишечного тракта. Это свойство может быть полезным для защиты слизистой кишечника от опасных проглатываемых веществ или для ограничения распространения поражения в таких состояниях как воспалительные заболевания кишечника.

Стимуляция пролиферации и дифференцировки придаточных структур, таких как волосные фолликулы, потовые и сальные железы, играет решающую роль в регенерации эпидермиса и дермиса у пациентов с ожогами и другими поражениями части или целого слоя. В настоящее время нарушения поверхности заживляются с образованием рубцов и восстановлением слоя кератиноцитов; полная регенерация кожи ещё невозможна. В настоящее время регенерация волосных фолликулов, потовых и сальных желёз не происходит по всей толщине кожных поражений, включая ожоги. Применение KGF может способствовать такой регенерации. Стандартные in vivo модели пролиферации и стимуляции придаточных структур, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтическим действием на ожоги и другие поражения части слоя или всего слоя у человека, хорошо известны. [Mustoe, et al., "Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model". J. Clin. Invest., 87: 694-703 (1991); Pierce, et al., "Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair". Am. J. Path. 140: 1375-88 (1992) и Davis, et al., "Second-degree burn healing: the effect of occlusive dressings and a cream". J. of Surgical Res. 48: 245-248 (1990)].

Врождённый буллёзный эпидермолиз представляет собой нарушение плотности соединения эпидермиса с расположенным под ним дермисом, что часто приводит к открытым болезненным волдырям, которые могут вызывать тяжёлое заболевание. Ускоренная реэпителизация этих поражений, например при лечении с помощью KGF, обеспечивает меньший риск инфекции, уменьшение боли и меньше проблем с раной.

Вызванная химиотерапией алопеция возникает, когда больные проходят курсы химиотерапии при злокачественной опухоли. В настоящее время отсутствуют терапевтические средства, эффективно предупреждающие гибель клеток волосных фолликулов, служащую причиной временной потери волос. KGF обеспечивает такое средство. Стандартные *in vivo* модели алопеции, вызванной химиотерапией, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны. [Sawada, et al., "Cyclosporin A Stimulates Hair Growth in Nude Mice", *Laboratory Investigation*, 56 (6): 684 (1987); Holland, "Animal Models of Alopecia", *Clin. Dermatol.*, 6: 159: 162 (1988); Hussein, "Protection from Chemotherapy-induced Alopecia in a Rat Model", *Science*, 249: 1564-1566 (1990) и Hussein, et al., "Interleukin 1 Protects against 1-B-D-Arabinofuranosylcytosine-induced Alopecia in the Newborn Rat Animal Model", *Cancer Research*, 51: 3329-3330 (1991)].

Облысение по мужскому типу является широко распространённым и практически не лечится. Прогрессирующее выпадение волос у мужчин и женщин является серьёзной косметической проблемой. У мышей, дефицитных по KGF, наружный покров сморщенный и неряшливый, тогда как у мышей, нокаутированных по KGF рецептору, кожа тонкая, число волосных фолликулов низкое, и раны заживают медленно [Werner et al., *Science*, 266: 819-22 (1994)]. В экспериментальных моделях алопеции премедикация с помощью рекомбинантного KGF примерно в 50% случаев предупреждала алопецию, вызываемую введением химиотерапевтического агента цитозин-арабинозида (ARA-c) [Danilenko et al., *Am. J. Pathol.* 147: 145-54 (1995)]. Эти состояния можно было бы лечить, применяя KGF либо системно, либо топически, если лекарство может наноситься и всасываться через кожу головы, или инъекцией спрея в кожу головы с помощью воздушного пульверизатора или подобными методами. Стандартная *in vivo* модель облысения по мужскому типу, которая позволяет проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известна [Uno, "The Stumptailed Macaque as a Model for Baldness: effects of Minoxidil", *International Journal of Cosmetic Science*, 8: 63-71 (1986); Porter R., "Mouse models for human hair loss disorders". *J. Anat.* 202: 125-31 (2003)].

Исследования показали, что введение KGF может вызвать рост клеток в желудочно-кишечном тракте [Playford et al., *J. Pathol.* 184: 316-22 (1998)]. Язвы желудка, хотя и лечатся с помощью H2 антагонистов, имеют высокий коэффициент заболеваемости и высокую частоту рецидивов и заживают с образованием рубцов в выстилке слизистой оболочки. Способность быстрее регенерировать слизистую оболочку жёлёз у больных язвой желудка, например при лечении KGF, обеспечивает значительный прогресс при лечении язвы желудка. Стандартные *in vivo* модели язвы желудка, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны, например Tamawski, et al. "Indomethacin Impairs Quality of Experimental Gastric Ulcer Healing: A Quantitative Histological and Ultrastructural Analysis", In: *Mechanisms of Injury, Protection and Repair of the Upper Gastrointestinal Tract*, (eds) Garner and O'Brien, Wiley & Sons (1991) и Astudillo et al. "Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice". *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 583-8 (2002).

Язвы двенадцатиперстной кишки, как и язвы желудка, поддаются лечению, но создание терапевтического агента для более полной и более быстрой регенерации выстилки слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки было бы серьёзным достижением. Кроме того, был бы выгоден терапевтический агент для регенеративного заживления этих язв и уменьшения рецидивов. Стандартные *in vivo* модели язвы двенадцатиперстной кишки, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны [Berg, et al., "Duodenal ulcers produced on a diet deficient in pantothenic acid", *Proc. Sac., Exp., Biol. Med.*, 7: 314-376 (1949); Szabo and Pihan, "Development and Significance of Cysteamine and Propionitrile Models of Duodenal Ulcer", *Chronobiol. Int.*, 6: 31-42 (1987); Robert, et al., "Production of Secretagogues of Duodenal Ulcers in the Rat", *Gastroenterology*, 59: 95-102 (1970) и Keshavarzian et al., "Gastroduodenal ulcers in rats induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP): requirement for gastric acid secretion and the role of prostaglandins". *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 70: 21-48 (1990)].

Эрозии желудка и пищевода, подобные эрозивному гастриту, эзофагиту или эзофагеальному рефлюксу, поддаются лечению, но создание терапевтического агента для более полной и более быстрой регенерации выстилки слизистой оболочки желудка и пищевода было бы серьёзным достижением. Кроме того, был бы выгоден терапевтический агент для регенеративного заживления этих изъязвлений (эрозии) и уменьшения рецидивов. KGF предлагает такую возможность. Стандартные *in vivo* модели эрозии (изъязвления) желудка и пищевода, подобные эрозивному гастриту, эзофагиту или эзофагеальному рефлюксу, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны [Geisinger et al., "The histologic development of acid-induced esophagitis in the cat", *Mod-Pathol.*, 3: 619-624 (1990); Carlborg et al., "Tetracycline induced esophageal ulcers. A clinical and experimental study", *Laryngoscope*, 93: 184-187 (1983); Carlborg et al., "Esophageal lesions caused by orally administered drugs. An experimental study in the cat", *Eur-Surg-Ethanol on esophageal motility in cats, Alcohol-Clin-Exp-Res.*, 15: 116-121 (1991) и Katz et al., "Acid-induced esophagitis in cats is prevented by sucralfate but not synthetic prostaglandin E.", *Dig-Dis-Sci*, 33: 217-224

(1988)].

Воспалительные заболевания кишечника (IBD), такие как болезнь Крона (поражающая прежде всего тонкий кишечник) и язвенный колит (поражающий прежде всего толстый кишечник), являются хроническими заболеваниями неизвестной этиологии, которые вызывают разрушение поверхности слизистой оболочки, воспаление, образование в процессе заживления рубцов и спаек и являются очень болезненными для поражённых ими индивидуумов. В настоящее время лечение направлено на контроль за воспалением, однако было показано, что лечение с помощью KGF индуцирует пролиферацию эпителия в желудочно-кишечном тракте у поражённых IBD животных [Housley et al., *J. Clin. Invest.* 94: 1764-77 (1994)]. Такое терапевтическое средство, как KGF, стимулирующее восстановление поверхности слизистой оболочки, что приводит к более быстрому заживлению, может быть полезным при контроле прогрессирования заболевания. Стандартные *in vivo* модели воспалительного заболевания кишечника, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны [Morris, et al., "Hapten-induced Models of Chronic Inflammation and Ulceration in the Rat Colon", *Gastroenterology*, 96: 795-803 (1989); Rachmilewitz, et al., "Inflammatory Mediators of Experimental Colitis in Rats", *Gastroenterology*, 97: 326-327 (1989); Allgayer, et al., "Treatment with 16,16'-dimethyl-prostaglandin E2 before and after induction of colitis with trinitrobenzenesulfonic acid in Rats", *Gastroenterology*, 96: 1290-1300 (1989); "Review: Experimental Colitis in Animal Models", *Scand. J. Gastroenterol.* 27: 529-537 (1992)].

Гиалиново-мембранная болезнь новорождённых (асфиктическая пневмония) вызывает недостаточную продукцию пневмоцитами типа II сурфактанта в лёгких, что приводит к коллапсу альвеол. Гиалиново-мембранная болезнь может иметь как острую, так и хроническую фазы. Острая фаза гиалиново-мембранной болезни (респираторный дистресс-синдром новорождённых - IRDS) лечится с помощью механической вентиляции и дополнительной подачи кислорода с концентрациями 80-100% и введением экзогенного сурфактанта. У пациентов, проходящих продолжительный курс лечения, может развиться хроническая фаза гиалиново-мембранной болезни (бронхо-лёгочная дисплазия-BPD). Хотя сурфактанты значительно снизили смертность, обусловленную IRDS, смертность, обусловленная BPD, остаётся высокой. Таким образом, необходимо создание эффективных лекарственных средств для ускорения созревания лёгкого и секреции сурфактанта у новорождённых с целью снижения случаев заболевания BRD. Хотя кортикостероиды могут в значительной степени ускорить созревание и секрецию у 28-недельного плода и старше, в настоящее время отсутствует лекарство для плода более раннего возраста, что вызывает значительную заболеваемость и смертность в этой популяции. Общие сведения о BRD говорят о том, что улучшение при лечении IRDS согласуется с механической вентиляцией новорождённых более раннего возраста, и о последующем увеличении заболеваемости BRD у этих новорождённых. Терапевтический агент, такой как KGF, который индуцирует пролиферацию и дифференцировку типа II пневмоцитов [Yi et al., *Inflammation*, 22: 315-25 (1998)], принёс бы значительную пользу при лечении этого заболевания. Стандартные *in vivo* модели IRDS, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны [Seider, et al., "Effects of antenatal thyrotropin-releasing hormone, antenatal corticosteroids, and postnatal ventilation on surfactant mobilization in premature rabbits", *Am. J. Obstet. Gynec.* 166: 1551-1559 (1992); Ikegami, et al., "Corticosteroid and thyrotropin-releasing hormone effects on preterm sheep lung function", *J. Appl. Physiol.* 70: 2268-2278 (1991)]. Стандартные *in vivo* модели BPD, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны [Yuh-Chin, et al., "Natural surfactant and hyperoxide lung injury in primates I. Physiology and biochemistry", *J. Appl. Physiol.* 76: 991-1001 (1994); и Galan, et al., "Surfactant replacement therapy in utero for prevention of hyaline membrane disease in the preterm baboon". *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169: 817-824(1993)].

Ингаляция дыма является важной причиной заболеваемости и смертности в течение недели после ожогового поражения вследствие некроза бронхиального эпителия и альвеол. Фактор роста, такой как KGF, который может стимулировать пролиферацию и дифференцировку этих структур и индуцировать их репарацию и регенерацию, был бы очень полезен для лечения поражений, вызванных ингаляцией дыма. Стандартная *in vivo* модель BPD, которая позволяет проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известна [Hubbard, et al., "Smoke inhalation injury in sheep", *Am. J. Pathol.*, 133: 660-663 (1988)].

Эмфизема является результатом прогрессирующей потери альвеол. Фактор роста, такой как KGF, который может стимулировать возобновление роста или который является цитопротективным для остающихся альвеол [Kaza et al., *Circulation*. 106 (12 Suppl 1): I120-4 (2002)], был бы важным для терапии. В настоящее время отсутствует эффективное лекарственное средство. Стандартная *in vivo* модель эмфиземы, которая позволяет проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известна [Stolk et al., "Induction of emphysema and bronchial mucus cell hyperplasia by intratracheal instillation of lipopolysaccharide in the hamster." *J. Pathol.*, 167: 349-56 (1992)].

Цирроз печени, вторичный, возникающий как результат вирусного гепатита и хронического потребления алкоголя, является достоверной причиной распространённости заболевания и смертности. Цитопротекция, пролиферация и дифференцировка гепатоцитов, например, с помощью KGF [Danilenki, D., *Toxicol Pathol.* 27: 64-71 (1999)] для усиления функции печени, были бы важны для замедления или предупреждения развития цирроза. Стандартная *in vivo* модель цирроза печени, которая позволяет проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известна [Tomaszewski, et al., "The production of hepatic cirrhosis in rats", *J. Appl. Toxicol.*, 11:229-231 (1991)].

Молниеносная (фульминантная) печёночная недостаточность представляет собой опасное для жизни состояние, которое возникает на последней стадии цирроза. Такой агент, как KGF, который мог бы индуцировать пролиферацию остающихся гепатоцитов, принёс бы непосредственную пользу для лечения этого заболевания, которое в настоящее время можно лечить только путём трансплантации печени. Стандартные *in vivo* модели фульминантной печёночной недостаточности, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны [Mitchell, et al., "Acetaminophen-induced hepatic necrosis I. Role of drug metabolism", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187: 185-194 (1973) и Thakore and Mehendale, "Role of hepatocellular regeneration in CC14 autoprotection", *Toxicologic Pathol.* 19: 47-58 (1991)].

Острый вирусный гепатит часто является бессимптомным и самоограничивающимся. Однако у меньшего числа пациентов тяжёлое поражение печени может наступить через несколько недель. Циклопротективный агент, такой как KGF, был бы полезен для предупреждения дегенерации клеток печени.

Можно ослабить интенсивность токсических поражений печени, вызванных ацетаминофеном, галотаном, четырёххлористым углеродом и другими токсинами, с помощью фактора роста, который является цитопротективным в отношении гепатоцитов. Стандартные *in vivo* модели интоксикации печени, которые позволяют проводить прогнозные испытания соединений, обладающих терапевтической эффективностью в отношении человека, хорошо известны [Mitchell, et al. (1973), см. выше и Thakore and Mehendale (1991), см. выше].

Болезнь трансплантат-против-хозяина (GVHD, гомологичная болезнь) (хроническая или острая) является основной причиной безуспешной пересадки костного мозга или трансплантации гематопозитических клеток у пациентов. GVHD приводит к поражению некоторых систем органов вследствие позитивной регуляции (активации) иммуномодулирующих и цитотоксических факторов, а также GVHD приводит к поражению многих областей, включая желудочно-кишечный тракт, лёгкие, печень, кожу и слюнные железы в глазах, слюнные железы во рту и железы, которые увлажняют выстилку желудка и кишечника. Последние исследования на животных, у которых вызывали GVHD, показывают, что у реципиентов, получавших rHuKGF, не развивалась кишечная GVHD, не развивалась эндотоксемия и они не умирали [Panoskaltsis-Mortari et al., "Keratinocyte growth factor facilitates alloengraftment and ameliorates graft-versus-host disease in mice by a mechanism independent of repair of conditioning-induced tissue injury". *Blood.* 96: 4350-6 (2000)]. Эти данные наводят на мысль, что KGF предупреждает развитие острой летальной GVHD, предохраняя эпителиальные клетки от поражения, опосредованного TNF-альфа, NO и другими потенциальными цитотоксическими факторами. Агент, такой как KGF, который может индуцировать пролиферацию эпителия во многих из этих клеточных типах, был бы очень полезен для лечения GVHD у людей-реципиентов трансплантатов.

Препараты и применение

Белки или пептиды KGF применимы в фармацевтических препаратах для лечения описанных выше заболеваний человека. KGF можно приготовить в виде жидкого или лиофилизированного препарата. В предпочтительном варианте изобретения композиции KGF являются лиофилизированными. Лيوфилизацию можно проводить обычными в уровне техники методами и метод можно оптимизировать в соответствии с создаваемой композицией [Tang et al., *Pharm Res.* 21: 191-200 (2004) и Chang et al., *Pharm Res.* 13: 243-9 (1996)].

Цикл лиофилизационной сушки состоит из трёх стадий: замораживание, первичная сушка и вторичная сушка [A.P. Mackenzie, *Phil. Trans. R. Soc. London, Ser. B, Biol.* 278: 167 (1977)]. На стадии замораживания раствор охлаждают, чтобы вызвать образование льда, и до завершения замораживания. Кроме того, на этой стадии индуцируется кристаллизация наполнителя. Лёд сублимируется на первичной стадии сушки, которую проводят, уменьшая давление в камере ниже давления паров льда, вакуумируя и нагревая с целью промотировать сублимацию. Наконец, адсорбированную или связанную воду удаляют на вторичной стадии сушки в камере при пониженном давлении и при повышенной температуре. В результате получают материал, известный как лиофилизат (лиофилизированный материал). Далее лиофилизат может быть восстановлен (реконституция) либо стерильной водой для инъекций, либо соответствующим раствором для восстановления (реконституции) многократного пользования перед употреблением.

Цикл лиофилизационной сушки не только определяет конечное физическое состояние эксципиентов, но также влияет на другие параметры, такие как время восстановления, внешний вид, стабильность и конечное содержание влаги. Структура композиции в замороженном состоянии проходит через несколько фазовых переходов (например, стеклование и кристаллизации), которые происходят при конкретных температурах, и их можно использовать для понимания и оптимизации процесса лиофилизации. Температура стеклования (T_g) может дать информацию о физическом состоянии раствора и может определяться методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Это важный параметр, который нужно принимать во внимание при разработке цикла лиофилизационной сушки. Кроме того, температура стеклования даёт информацию о температуре хранения конечного продукта в высушенном состоянии.

В конкретном варианте композиций по настоящему изобретению к составу для лиофилизации добавляют стабилизатор для предупреждения или уменьшения агрегации или химического разложения в процессе лиофилизации или хранения. Непрозрачный или мутный раствор при восстановлении указывает на то, что белок осаждён. Термин "стабилизатор" означает эксципиент, способный предупреждать агрегацию или другой физический процесс разложения, а также химическое расщепление (например, автолиз, деамидирование, окисление и т.д.) в водном растворе и в твёрдом состоянии. Можно использовать стабилизаторы, которые традиционно применяются в фармацевтических композициях, включая, но без ограничения, сахарозу, трегалозу или глицин [Carpenter et al., *Develop. Biol. Standard*, 74: 225 (1991)]. Можно также добавлять соответствующие количества поверхностно-активных стабилизаторов, таких как полисорбат 20 (Tween 20) или полисорбат 80 (Tween 80), для предотвращения агрегации на поверхности в процессе замораживания и сушки [Chang, B., *J. Pharm. Sci.* 85: 1325 (1996)]. При желании, лиофилизированные композиции также включают соответствующие количества наполнителей и агентов, регулирующих осмолярность, подходящих для образования лиофилизированного материала ("cake"), лиофилизата. Наполнители могут быть либо кристаллическими (например, маннит, глицин), либо аморфными (например, сахароза, полимеры, такие как декстран, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлоза). В другом варианте изобретения маннит вводят в концентрации около 2-5% (вес./об.), а ещё в одном варианте изобретения концентрация маннита составляет около 3-4,5% (вес./об.), при этом получают механически и фармацевтически устойчивый и красивый лиофилизированный материал (cake). В другом варианте изобретения концентрация маннита составляет 2% (вес./об.).

Найдено, что выбор фармацевтически приемлемо буфера и pH также влияет на стабильность композиций по настоящему изобретению. Буферная система, присутствующая в композициях, выбирается таким образом, чтобы она была физиологически совместимой и поддерживала заданное значение pH в воссозданном растворе, а также в растворе перед лиофилизацией. Предпочтительно буферы обладают способностью буферизации pH в интервале примерно, 6,0-8,0. Обычно проводят серию исследований с помощью скрининга с применением вышеуказанных параметров с целью выбрать условия получения наиболее стабильного состава.

Ожидается, что композиции будут устойчивы по меньшей мере в течение двух лет при 2-8°C в лиофилизированном состоянии. Продолжительная стабильность выгодна для продления срока хранения фармацевтического продукта.

Далее, в настоящем изобретении предусматриваются способы приготовления настоящих препаратов KGF. В одном аспекте способы приготовления лиофилизированного препарата KGF включают следующие стадии:

(а) смешение указанной композиции KGF в буфере, содержащем гистидин, наполнитель, сахар и сурфактант;

(б) лиофилизацию указанного KGF.

Кроме того, способы по настоящему изобретению включают одну или более следующих стадий: добавление стабилизирующего агента к указанной смеси перед лиофилизацией, добавление по меньшей мере одного агента, выбранного из наполнителя и агента, регулирующего осмолярность, и поверхностно-активного вещества к указанной смеси перед лиофилизацией. Наполнителем может являться любой наполнитель, представленный выше. Предпочтительно наполнитель представляет собой маннит. Сахаром может являться любой стабилизирующий сахар, представленный выше. В одном варианте изобретения стабилизирующий агент представляет собой сахарозу. Поверхностно-активное вещество может являться любым ПАВ, представленным выше. В одном варианте изобретения ПАВ представляет собой полисорбат 20.

На практике стандартная процедура восстановления (реконституции) лиофилизированного материала представляет собой прибавление некоторого объёма чистой воды или стерильной воды для инъекций (WFI, воды д/ин.) (обычно эквивалентного объёму, удалённому в процессе лиофилизации), хотя для получения фармацевтических препаратов для парентерального введения иногда используют разбавленные растворы антибактериальных агентов [Chen, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18: 1311-1354 (1992)].

Лиофилизированную композицию KGF можно восстанавливать в виде водного раствора. Различные водные носители, например стерильная вода для инъекций, вода с консервантами для многократного применения или вода с соответствующими количествами ПАВ (например, полисорбата 20), 0,4% физиологического солевого раствора, 0,3% глицина, или водные суспензии могут содержать активное соединение в смеси с эксципиентами, пригодными для получения (производства) водных суспензий. Такие эксципиенты представляют собой суспендирующие агенты, например натрий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксиметилпропилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, камедь трагаканта и аравийская камедь; диспергирующие агенты или увлажнители могут представлять собой природный фосфатид, например лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например полиоксиэтилен стеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепными алифатическими спиртами, например гептадекаэтиленоксицетанол, или продукты конденсации этиленоксида с частичными эфирами жирных кислот и гексита, такие как полиоксиэтилен сорбитол моноолеат, или продукты этиленоксида с частичными эфирами жирных кислот и ангидросорбита (ангидрогексита?), например полиэтилен сорбитан моноолеат. Водные суспензии могут также содержать один или более консервантов, например этиловый или n-пропиловый эфир p-гидроксibenзойной кислоты.

Для введения композиций по изобретению человеку или испытываемым животным предпочтительно готовить композиции в виде состава, содержащего один или более фармацевтически приемлемых носителей. Выражения "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным частицам и композициям, которые являются устойчивыми, ингибируют снижение эффективности белка, например агрегацию и образование продуктов расщепления, и, кроме того, не вызывают аллергических или других вредных побочных реакций при введении общеизвестными в уровне техники способами, описанными ниже. "Фармацевтически приемлемые носители" включают любые и все применяемые в клинике растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т.п., включая эти агенты, описанные выше.

Композиции фактора роста кератиноцитов можно вводить перорально, топически, трансдермально, парентерально, с помощью спрея для ингаляций, вагинально, ректально или с помощью внутривенной инъекции. Термин "парентеральный" по данному описанию включает подкожные инъекции, внутривенную, внутримышечную, интракостальную инъекцию или инфузию. Также предусматривается введение внутривенной, интрадермальной, внутримышечной, интрамаммарной, интраперитонеальной (внутрибрюшинной), подбололочечной, ретробульбарной, внутривенной инъекцией или хирургической имплантацией в конкретную область (сайт). Обычно композиции практически не содержат пирогенов, а также других примесей, вредных для реципиента.

Наборы.

В качестве дополнительного аспекта изобретение включает наборы, которые содержат одно или более соединений, упакованные таким способом, который облегчает их применение для введения субъектам. В одном варианте изобретения такой набор включает соединение или композицию по данному описанию (например, композицию, содержащую фактор роста кератиноцитов), упакованную в контейнер, такой как плотно закрытый (запаянный) флакон или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или вложенной в упаковку, на которой описано применение соединения или композиции при практическом осуществлении способа. В одном варианте изобретения набор содержит первый контейнер с лиофилизированным фактором роста кератиноцитов и второй контейнер с физиологически приемлемым раствором для восстановления (реконституции) лиофилизированной композиции. Предпочтительно соединение или композиция упакованы в виде стандартной лекарственной формы. Кроме того, набор может включать устройство, пригодное для введения композиции конкретным способом. Предпочтительно набор содержит этикетку, в которой описано применение композиции фактора роста кератиноцитов.

Дополнительные аспекты и детали изобретения будут очевидны из нижеприведенных примеров.

Пример 1. Жидкий препарат KGF.

Стабильность, срок хранения и биоактивность продукта являются важными аспектами любой терапевтически эффективной композиции. Разработка и приготовление композиций, устойчивых при хранении при температурах, рекомендованных для хранения в течение продолжительного периода времени, но сохраняющих биологическую активность, являются важными элементами фармацевтических композиций.

В предыдущих экспериментах в жидких препаратах KGF наблюдалась заметная агрегация и последующая потеря белка при повышенных температурах (37°C). Для определения значения pH, обеспечивающего наиболее высокую стабильность KGF композиций, испытывают жидкий препарат фактора роста кератиноцитов в интервале pH 3,0-9,0.

KGF, применяемый в нижеприведенных экспериментах, в частности в примерах 1-3, представляет собой молекулу $\Delta N23$ KGF. pH раствора корректируют либо с помощью HCl, либо с помощью гидроксида натрия. Образцы препарата KGF (0,5 мг/мл, 10 mM буфера, 0,1 M NaCl) с различным pH проверяют через 0, 6 и 28 ч инкубации при 37°C (фиг. 1). Процентное содержание регенерированного белка определяют с помощью SE (эксклюзионной)-ВЭЖХ (фиг. 1A) или CE (катионообменной)-ВЭЖХ (фиг. 1B). При

экслюзионной (по размеру) ВЭЖХ (SE-ВЭЖХ) образцы (40 мкг) наносят на колонку G2000SW×1 (7,8 мм×30 см), соединённую с прибором HP 1090/1050. Белок элюируют с помощью 20 mM фосфата натрия (NaP), 1 M NaCl при pH 7,0. Белок контролируют по оптической плотности при 215 нм. Пик номера показывает, что в препарате KGF мало агрегатов.

Катионообменную (CE)-ВЭЖХ проводят на приборе HP 1090/1050, снабжённом колонкой Mono-S, при комнатной температуре. 40 мкг белка KGF наносят на колонку и элюируют в градиенте 20 mM натрий-фосфатного буфера, pH 8,0 и соли (1 M NaCl). Мониторинг элюированного белка проводят по оптической плотности при 215 нм.

Обращённо-фазовую ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) проводят на приборе HP 1090/1050, используя колонку C4 от Vydac, (4,6×250 мм), размер пор 300 Å. Белок (30 мкг) вводят в колонку и элюируют, используя градиент ацетонитрила (ACN) с 0,1% трифторуксусной кислотой (ТФК) (в/в) и 90% ACN, 0,1% ТФК в воде (в/в). Мониторинг пиков белка осуществляют по оптической плотности при 215 нм.

Полную регенерацию белка наблюдают во время 0 в интервале pH 5,0-9,0. Однако при pH 3,0 наблюдается полная потеря белка, а при pH 4,0 происходит потеря примерно 80% вследствие мгновенного осаждения. Через 6 ч при 37°C в образцах pH 4,0 совсем не получают растворимого белка. Процентное содержание регенерированного белка через 28 ч при 37°C, когда растворимый препарат KGF готовят при pH 5-9, составляет менее 20%. Однако при pH 7,0 теряется только 20% всего белка. Потеря растворимого белка через 28 ч при 37°C происходит, главным образом, за счёт агрегации.

Эти результаты показывают, что белок KGF в жидких препаратах наиболее устойчив при нейтральном pH, однако даже в этом оптимальном интервале pH сохранение KGF в виде жидкости приводит к значительной потере белка вследствие агрегации.

Пример 2. Приготовление композиции KGF для лиофилизации.

Для получения более стабильной композиции KGF было решено приготовить KGF в виде лиофилизированного продукта. Предыдущие попытки приготовления лиофилизированной композиции KGF включали операцию по восстановлению раствора, в результате получают композицию, дающую меньше агрегатов белка, в зависимости от состава восстанавливаемого раствора [Zhang et al., Pharm. Res. 12: 1447-52 (1995)]. Однако в этом предварительном исследовании любую агрегацию, наблюдаемую при восстановлении (реконституции), было очень трудно или невозможно реверсировать.

В данном примере описана такая лиофилизация белка в растворе, которая предупреждает агрегацию при реконституции вне зависимости от раствора для реконституции, это исключает потребность в обычном растворе для восстановления (реконституции).

Для определения композиции стабильного лиофилизированного препарата KGF, например ΔN23 KGF, лиофилизируют в различных условиях, изменяя параметры, такие как pH, наполнитель, концентрацию сахара и концентрацию ПАВ. Затем определяют устойчивость KGF при длительном хранении при рекомендуемой температуре.

Цикл лиофилизационной сушки.

Для лиофилизации образцы загружают в пилотную установку-лиофилизатор VirTis Genesis 12 EL (VirTis, Gardiner, N.Y.), предварительно охлаждённый до температуры в камере около 4°C. Образцы быстро замораживают (примерно со скоростью 1°C/мин до -50°C) и выдерживают при этой температуре по меньшей мере в течение 2 ч. Когда образцы помещают в лиофилизатор, температуру на полках понижают до -50°C со скоростью примерно 27°C/ч. Образцы выдерживают при -50°C в течение 2 ч для гарантии полного замораживания. На необязательной стадии кристаллизации маннита температуру на (охлаждаемых) полках поднимают до -25°C со скоростью 10°C/ч, уравнивают в течение 2-3 ч, а затем охлаждают до -55°C со скоростью 9°C/ч. Дополнительно выдерживают по меньшей мере 2 ч и подают вакуум примерно 100 мТорр. Температуру на полках повышают до -35°C для первичной сушки, но можно держать в интервале от -45 до -10°C. Первичная сушка продолжается в течение 40 ч, но может продолжаться 24-48 ч. Затем температуру на полке повышают до 20-25°C со скоростью 5°C/ч для вторичной сушки, а вакуум снижают примерно до 50 мТорр. Вторичную сушку проводят в течение 36 ч, но могут проводить примерно 24-72 ч. В конце вторичной сушки образцы закупоривают под вакуумом (≤ 25 мТорр) и пузырьки (ампулы) вынимают из лиофилизатора. Крышки пузырьков обжимают и пузырьки помещают при различных температурах для испытания на стабильность.

Влияние pH на стабильность лиофилизированного KGF.

Сначала оценивают стабильность KGF в интервале значений pH. KGF (5 мг/мл) готовят в растворе, содержащем 10 mM гистидина, 3% маннита, 2% сахарозы и 0,01% полисорбата 20 при pH 6,0, 6,5 или 7,0. Хроматограмма SE-ВЭЖХ предварительно лиофилизированного образца показывает процентное содержание основного пика 99%, что соответствует 99% мономерного активного компонента.

Для проведения ускоренного изучения стабильности некоторые образцы переносят в инкубаторы для хранения. Другие образцы переносят в морозильник с температурой -70°C в качестве контрольных. Основную часть пузырьков хранят при 4°C. В момент анализа образцы восстанавливают, добавляя 1,2 мл стерильной воды для инъекций (WFI).

Хроматограмма SE-ВЭЖХ лиофилизированных образцов KGF после стояния в течение 6 месяцев при 45°C показывает процентное содержание основного пика при всех проверенных значениях pH около 97,5%, это показывает, что в интервале значений pH от 6,0 до 7,0 лиофилизированная композиция KGF устойчива после 6 месяцев хранения при повышенной температуре. Эти работы также показывают, что в интервале pH от 5,0 до 8,0 получают устойчивый белок, когда рецептура хранится при 4°C.

Влияние концентрации сахарозы на стабильность KGF.

Для оценки количества сахарозы, которое придаёт наибольшую устойчивость лиофилизированному KGF, рекомбинантный человеческий KGF (1 мг/мл) готовят в виде композиции, содержащей 10 мМ гистидина, 3% маннита, при pH 7,0 в растворе, либо не содержащем сахарозы, либо содержащем 2% (вес./об.) сахарозы. Образцы лиофилизируют и оставляют инкубироваться до 3 месяцев при 45°C.

Измерение по SE-ВЭЖХ хроматограмме процентного содержания основного пика препаратов KGF в присутствии и в отсутствии сахарозы показывает, что добавление 2% сахарозы придаёт заметную стабильность лиофилизированному препарату KGF. KGF, лиофилизированный с 2% сахарозы, демонстрирует примерное содержание основного пика 99,5% сразу после лиофилизации и 98,5% как через 1 месяц, так и через 3 месяца после лиофилизации. В препаратах, не содержащих сахарозы, процентное содержание основного пика составляет около 96% и около 93,5% через 1 месяц и через 3 месяца после лиофилизации соответственно.

Эти результаты показывают, что в препаратах без сахарозы процентное содержание пика активного мономера снижается на 7% после хранения в течение 3 месяцев при 45°C, тогда как в препаратах, содержащих сахарозу, наблюдается только слабое уменьшение пика мономера. Таким образом, будучи добавлена в лиофилизированный препарат, сахароза действует как мощный стабилизатор KGF.

Другой анализ проводят, используя продукт лиофилизации KGF, содержащий 10 мМ гистидина, pH 6,5, в интервале концентрации сахарозы от 1 до 3%, причём раствор всё время сохраняет изотоничность за счёт соответствующего процентного содержания маннита. Продукт лиофилизации, содержащий 1-3% сахарозы, после хранения при 37°C в течение 1 года показывает стабильность белка, сравнимую с препаратами с содержанием сахарозы 2%, причём процентное содержание основного пика остаётся выше 99% во всех испытанных препаратах.

Влияние концентрации полисорбата 20 на стабильность KGF.

Концентрацию полисорбата 20 в лиофилизированном препарате KGF выбирают с учётом его способности исключать образование макрочастиц при восстановлении. Рекомбинантный человеческий KGF готовят в виде композиции, содержащей 10 мМ гистидина, 3% маннита, 2% сахарозы при pH 7,0 и лиофилизируют. Затем KGF восстанавливают в растворе, содержащем различные концентрации полисорбата 20. Лيوфилизированный материал (cake) состоит из 5 мг/мл KGF, приготовленного, как указано выше. В таблице даны зарегистрированные наблюдения за лиофилизированным препаратом при реконституции.

Разбавитель в растворе для восстановления	Визуальные наблюдения после восстановления
0.1% полисорбат 20	Прозрачный, но пенится
0.01% полисорбат 20	Прозрачный
0.004% полисорбат 20	Мало макрочастиц/граница
0.001% полисорбат 20	Макрочастицы
вода	Макрочастицы

Дальнейшее изучение показывает, что препарат с полисорбатом 20, включённым в лиофилизированный материал перед лиофилизацией, одинаково устойчив после хранения в течение 4 месяцев при 45°C по сравнению с материалом, к которому полисорбат 20 добавляют в растворе для восстановления. SE-ВЭЖХ анализ [Biorad Biosil SEC 125 (7,8 мм×30 см), 20 мМ NaP, pH 7,0, 1 М NaCl, вводимая нагрузка 40 мкг] показывает, что потеря мономерного KGF ничтожна при всех проверенных концентрациях полисорбата (как в таблице) через 0, 1 и 4 месяца. Концентрацию 0,01% (вес./об.) выбирают для введения в препарат с учётом её способности устойчиво исключать видимые частицы при восстановлении (реконституции).

Влияние концентрации маннита на стабильность KGF.

Маннит и другие наполнители вводят в препарат с целью получить материал хорошего внешнего вида и качества. Кроме того, он помогает поддерживать изотоничность фармацевтической композиции с физиологической жидкостью. Например, осмолярность физиологической жидкости 290-320 мОсм. Концентрацию маннита в конечном препарате KGF корректируют, чтобы он был изоосмотичным физиологической жидкости.

Для оценки концентрации маннита в процентах, обеспечивающей стабильность белка в лиофилизированном препарате, KGF с концентрацией 3 мг/мл лиофилизируют в составе, содержащем 10 мМ гистидина, 2% сахарозы и 0,01% полисорбата 20 при pH 7,0 и либо 3% маннита, либо 4% маннита. Рецептуры KGF лиофилизируют и хранят в течение 1 года при 4°C. Осмолярность измеряют с помощью осмометра Model 3D3 от Advanced Instruments (Norwood, MA). Величина осмолярности рецептуры, измеренная для 4%-ного раствора маннита, составляет 312 мОсм, тогда как в случае 3%-ного содержания маннита получают раствор рецептуры с величиной осмолярности 250 мОсм.

На фиг. 2 показано наложение обращённо-фазовых (RP-ВЭЖХ) хроматограмм изотонической рецептуры с содержанием 4% маннита/2% сахарозы и слабо гипотонической рецептуры с содержанием 3% маннита/2% сахарозы во время 0 (фиг. 2А) или после 1 года хранения при 4°C (фиг. 2В). Результаты показывают, что изотоническая рецептура стабильна после хранения в течение 1 года при рекомендуемой температуре хранения при температуре 2-8°C. Кроме того, внешне материал изотонического состава имеет также хороший внешний вид, а содержание влаги в нём ниже 2%. На основании этого исследования для применения в лиофилизированном препарате рекомендуется содержание маннита 4%.

Влияние концентрации белка на стабильность rHuKGF.

Концентрация белка в лиофилизированном образце также может влиять на стабильность белка в лиофилизированном состоянии, а также на стабильность восстановленного продукта.

Влияние концентрации KGF на стабильность изучают на примере концентраций 0,5, 1, 2, 3 и 5 мг/мл. Образцы готовят и лиофилизируют в 10 мМ гистидина, 3% маннита, 2% сахарозы и 0,005% полисорбата 20 при pH 6,5. Лيوфилизированные образцы хранят 24 недели при 45°C до восстановления (реконституции). Разрушение белка контролируют с помощью SE-ВЭЖХ, RP(ОФ)-ВЭЖХ, CE-ВЭЖХ и SDS-PAGE. В этом эксперименте SE-ВЭЖХ осуществляют, как описано выше, используя систему HP и колонку G2000SWx1.

На фиг. 3 представлено процентное содержание основного пика как функция концентрации белка на основании SE-ВЭЖХ анализа KGF после стояния в течение 24 недель при 45°C. Пунктирной линией показана линия тренда в соответствии с данными измерения. На основании данных SE-ВЭЖХ анализа стабильность повышается при увеличении концентрации KGF, по меньшей мере, вплоть до концентрации 5 мг/мл. Зависимость процентного содержания основного пика от концентрации белка, по определению методом RP (ОФ)-ВЭЖХ и CE-ВЭЖХ, аналогична зависимости, наблюдаемой в случае SE-ВЭЖХ. Дополнительные исследования показывают, что концентрация белка 15 мг/мл также даёт устойчивые лиофилизированные препараты.

Оптимизированный лиофилизированный препарат KGF, содержащий 10 мМ гистидина, 0,01% полисорбата 20, 2% сахарозы и 3% маннита, с pH 6,5 хранят в течение 4 лет при температуре 2-8°C. Показано, что по восстановлению препарат KGF сохраняет KGF активность, как проверено ниже, это указывает, что конкретная композиция сохраняет характер стабильности и активности, необходимые для терапевтически эффективной фармацевтической композиции.

Пример 3. Биоанализ восстановленной рецептуры KGF.

Одним из условий при приготовлении фармацевтически эффективного продукта является требование высокой биологической активности представляющего интерес белка.

Биоактивность препаратов KGF, например ΔN23 KGF, тестируют, используя клетки 32D KECA клон 16, представляющие собой IL-3-зависимые мышечные лимфобластные клетки, которые пролиферируют в присутствии KGF аналогично клеткам 32D клон 3 (ATCC № CRL-11346) и являются подходящей системой для анализа пролиферации, описанной Hsu et al., 1999 Biochemistry, 38, 2523-2534.

Клетки 32D клон 16 хранят в питательной среде [RPMI, фетальная бычья сыворотка (10%) (Hyclone, Logan, UT), глутамин (1%) (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), генетицин (2%) (Gibco) и мышечный IL-3 (12 нг/мл) (Biosource International, Camarillo, CA)] при 37°C и 5,5% CO₂. Образцы препаратов KGF или эталонные образцы (ΔN23 KGF хранят лиофилизированным при -70°C) восстанавливают в среде для анализа [RPMI, FBS (6%), глутамин (1%), гепарин (0,6 мкг/мл) (Sigma, St. Louis, MO)] примерно до 25 нг/мл. Затем делают серийные разведения, получая концентрации в интервале примерно от 25 до 1,6 нг/мл.

Для тестирования биоактивности препарата KGF клетки 32D клон 16 засевают в 150 мкл при плотности $2,0 \times 10^5$ клеток/мл. Эталонные, контрольные и тестируемые KGF образцы в заданных концентрациях добавляют в лунки для образца в объёме 50 мкл. Планшеты с клетками и образцом инкубируют примерно 24 ч при 37°C и 5,5% CO₂. На 2-й день во все лунки добавляют 40 мкл Alomar Blue (AccuMed International, Chicago, IL) и перемешивают. Планшеты инкубируют ещё в течение 24 ч при 37°C и 5,5% CO₂. Через 24 ч измеряют флуоресценцию на флуоресцентном ридере (Cytofluor II или Cytofluor Series 4000, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) при длине волны возбуждения 530-560 нм и длине волны испускания 590 нм.

Лиофилизированные препараты KGF из 3 восстановленных партий, стоявшие при температуре 2-8°C в течение 7 дней, демонстрируют такую же биоактивность, как и эталонный образец KGF белка (хранящийся в лиофилизированном состоянии при -70°C), проявляя биоактивность $\geq 100\%$ в день 0 и активность 92, 100 и 107% соответственно на 7-й день. Препараты KGF, хранившиеся при 25°C, проявляют биоактивность $\geq 100\%$ в момент 0, она немного снижается через 4 ч до биоактивности 90, 95 и 100% соответственно по сравнению с нативным KGF. Этот уровень активности также сохраняется после хранения восстановленного препарата KGF при 25°C в течение 24 ч, что указывает на стабильность препаратов KGF.

Эти результаты показывают, что восстановленные препараты KGF по данному описанию также эффективны, как эталонный образец KGF белка, и препарат не оказывает вредного влияния на стабильность или эффективность KGF, например $\Delta N23$ KGF, и, следовательно, они применимы в качестве лекарственного средства для лечения индивидуумов с целью вызвать рост эпителиальных клеток и т.п.

Кроме того, биоактивность KGF можно оценивать по способности восстановленных препаратов вызывать рост клеток Balb/C-МК. Выращивают чистые культуры клеток Balb/МК и сохраняют в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с низким содержанием кальция, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой, 0,25 мкг/мл фунгицином и 10 нг/мл aPGF. Клетки инкубируют при 37°C в атмосфере 10% CO₂ при влажности 99%. Для анализа биоактивности клетки засевают в 12-луночные планшеты при плотности 5×10^3 клеток/лунка в 1 мл среды, описанной в Gospodarowicz et al. [J. Cell. Physiol. 142: 325-333 (1990)]. В лунку с клеточной культурой добавляют заданное количество препарата KGF. В качестве позитивного контроля используют FGF.

После пребывания в культуре в течение 5 дней клетки трипсинизируют и конечную плотность клеток определяют с помощью счётчика клеток. Клетки высвобождают из планшетов, заменяя культуральную среду раствором, содержащим 0,9% NaCl, 0,01 М фосфата натрия (pH 7,4), 0,05% трипсина и 0,02% EDTA (STV), и инкубируют 5-10 мин при 37°C, а затем к клеткам добавляют исходную культуральную среду.

Увеличение популяции клеток Balb/C-МК в образце, обработанном KGF, по сравнению с необработанными клетками, показывает, что композиция KGF не теряет своей биоактивности в процессе приготовления препарата и что препарат KGF предоставляет эффективный терапевтический агент для лечения субъектов, нуждающихся в повышенной KGF активности.

Следует ожидать, что специалистам в данной области техники придут на ум многочисленные модификации и варианты изобретения, представленного в вышеприведённых иллюстрирующих примерах. Соответственно изобретение включает только такие ограничения, которые очевидны из прилагаемой формулы изобретения.

Перечень последовательностей

<110> АМГЕН, ИНК.
 <120> Терапевтическая композиция фактора роста кератиноцитов
 <130> 01017/40453
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 3853
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (446)..(1030)
 <400> 1
 acgcgctcac acacagagag aaaatccttc tgccgtgtga tttatggaaa caattatgat 60
 tctgctggag aacttttcag ctgagaaaata gttttagct acagtagaaa ggctcaagtt 120
 gcaccaggca gacaacagac atggaattct tatatatcca gctgttagca acaaaacaaa 180
 agtcaaatac caaacagcgt cacagcaact gaacttacta cgaactgttt ttatgaggat 240
 ttatcaacag agttatttaa ggaggaatcc tgtgttgta tcaggaacta aaaggataag 300
 gctaacaatt tggaagagc aactactctt tcttaaatca atctacaatt cacagatagg 360
 aagagggtcaa tgacctagga gtaacaatca actcaagatt cattttcatt atgttattca 420
 tgaacacccg gagcactaca ctata atg cac aaa tgg ata ctg aca tgg atc 472
 Met His Lys Trp Ile Leu Thr Trp Ile
 1 5
 ctg cca act ttg ctc tac aga tca tgc ttt cac att atc tgt cta gtg 520
 Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg Ser Cys Phe His Ile Ile Cys Leu Val
 10 15 20 25
 ggt act ata tct tta gct tgc aat gac atg act cca gag caa atg gct 568
 Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala
 30 35 40
 aca aat gtg aac tgt tcc agc cct gag cga cac aca aga agt tat gat 616
 Thr Asn Val Asn Cys Ser Ser Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp
 45 50 55
 tac atg gaa gga ggg gat ata aga gtg aga aga ctc ttc tgt cga aca 664
 Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr
 60 65 70
 cag tgg tac ctg agg atc gat aaa aga ggc aaa gta aaa ggg acc caa 712
 Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln
 75 80 85
 gag atg aag aat aat tac aat atc atg gaa atc agg aca gtg gca gtt 760
 Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val
 90 95 100 105
 gga att gtg gca atc aaa ggg gtg gaa agt gaa ttc tat ctt gca atg 808
 Gly Ile val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met
 110 115 120

```

aac aag gaa gga aaa ctc tat gca aag aaa gaa tgc aat gaa gat tgt      856
Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys
      125                      130                      135

aac ttc aaa gaa cta att ctg gaa aac cat tac aac aca tat gca tca      904
Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser
      140                      145                      150

gct aaa tgg aca cac aac gga ggg gaa atg ttt gtt gcc tta aat caa      952
Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln
      155                      160                      165

aag ggg att cct gta aga gga aaa aaa acg aag aaa gaa caa aaa aca      1000
Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr
      170                      175                      180                      185

gcc cac ttt ctt cct atg gca ata act taa ttgcatatgg tatataaaga      1050
Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
      190

accaggttcc agcagggaga tttctttaag tggactgttt tctttcttct caaaattttc      1110
tttcttttta ttttttagta atcaagaaag gctggaaaaa ctactgaaaa actgatcaag      1170
ctggacttgt gcatttatgt ttgttttaag acactgcatt aaagaaagat ttgaaaagta      1230
tacacaaaaa tcagatttag taactaaagg ttgtaaaaaa ttgtaaaact ggttgtacaa      1290
tcagtgtgtt agtaacagta atttttttct taaattaatt tacccttaag agtatgttag      1350
atttgattat ctgataatga ttatttaaat attcctatct gcttataaaa tggtgtctat      1410
aataataata atacagatgt tggtatataa ggtatatcag acctacaggc ttctggcagg      1470
atttgtcaga taatcaagcc acactaacta tggaaaatga gcagcatttt aaatgctttc      1530
tagtgaaaaa ttataatcta cttaactctc aatcagaaaa aaaattctca aaaaaactat      1590
tatgaaagtc aataaaatag ataatttaac aaaagtacag gattagaaca tgcttatacc      1650
tataaataag aacaaaattt ctaatgtgtc tcaagtggaa agggatttgc taaaaggatg      1710
tttccaaaaa tcttgtatat aagatagcaa cagtgtattga tgataatact gtacttcac      1770
ttacttgcca caaaataaca ttttataaat cctcaaagta aaattgagaa atctttaagt      1830
ttttttcaag taacataatc tatctttgta taattcatat ttgggaatat ggcttttaat      1890
aatgttcttc ccacaaataa tcagtctttt ttctatgggt tacagcatta aactctattt      1950
taagttgttt ttgaacttta ttgttttgtt atttaagttt atgttattta taaaaaaaaa      2010
accttaataa gctgtatctg ttctatatgc ttttaatttt aaaggaataa caaaactgtc      2070
tggtcacaag gcaagtttcc ctcccttttc tgactgacac taagtctagc acacagcact      2130
tgggccagca aatcctggaa gcagacaaaa ataagagcct gaagcaatgc ttacaataga      2190
tgtctcacac agaacaatac aaatatgtaa aaactcttcc accacatatt ctgccaatt      2250
aattggatca tataagtaaa atcattacaa atataagtat ttacaggatt ttaaagttag      2310
aatatatttg aatgcatggg tagaaaaat catattttta aactatgtat atttaaattt      2370
agtaattttc taatctctag aaatctctgc tgttcaaaag gtggcagcac tgaaagttgt      2430
tttctgttta gatggcaaga gcacaatgcc caaaatagaa gatgcagtta agaataaggg      2490
gccctgaatg tcatgaaggc ttgaggtcag cctacagata acaggattat tacaaggatg      2550
aatttccact tcaaaagtct ttcatgggca gatcttggtg gcactttata tgttcaccaa      2610
tgggagggtca atatttatct aatttaaaag gtatgctaac cactgtgggt ttaatttcaa      2670
aatatttgtc attcaagtcc ctttacataa atagtatttg gtaatacatt tatagatgag      2730

```



```

agttatatga aaaggctagg tcaacaaaaa caatagattc atttaatttt cctgtggttg 2790
acctatacga ccaggatgta gaaaactaga aagaactgcc cttcctcaga tatactcttg 2850
ggagagagca tgaatggat tctgaactat cacctgattc aaggactttg ctagctaggt 2910
tttgagggtca ggcttcagta actgtagtct tgtgagcata ttgagggcag aggaggactt 2970
agtttttcat atgtgtttcc ttagtgcta gcagactatc tgttcataat cagttttcag 3030
tgtgaattca ctgaatgttt atagacaaaa gaaaatacac actaaaacta atcttcattt 3090
taaaagggtta aaacatgact atacagaaat ttaaatagaa atagtgtata tacatataaa 3150
atacaagcta tgttaggacc aaatgctctt tgtctatgga gttatacttc catcaaatta 3210
catagcaatg ctgaattagg caaaaccaac atttagtggg aaatccattc ctggtagtat 3270
aagtcaccta aaaaagactt ctgaaatat gtactttaat tatttgtttt tctctattt 3330
ttaaatttat tatgcaaatt ttgaaaaata aaatttgctc tagttacaca cctttagaat 3390
tctagaatat taaaactgta aggggcctcc atccctctta ctcatgtgta gtctaggaaa 3450
ttgagatttt gatacaccta aggtcacgca gctgggtaga tatacagctg tcacaagagt 3510
ctagatcagt tagcacatgc tttctactct tcgattatta gtattattag ctaatggctc 3570
ttggcatgtt tttgtttttt atttctgttg agatatagcc ttacatttg tacacaaatg 3630
tgactatgtc ttggcaatgc acttcataca caatgactaa tctatactgt gatgatttga 3690
ctcaaaagga gaaaagaaat tatgtagttt tcaattctga ttctattca ccttttgttt 3750
atgaatggaa agctttgtgc aaaatataca tataagcaga gtaagccttt taaaaatgtt 3810
ctttgaaaga taaaattaaa tacatgagtt tctaacaatt aga 3853

```

<210> 2

<211> 194

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<220>

<221> СМЕШ_ПРИЗНАК

<222> (1)..(31)

<223> Сигнальный пептид

<400> 2

```

Met His Lys Trp Ile Leu Thr Trp Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg
1           5           10          15

Ser Cys Phe His Ile Ile cys Leu Val Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys
          20          25          30

Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser Ser
          35          40          45

Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile
50          55          60

Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
65          70          75          80

Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn
          85          90          95

```

Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly
 100 105 110
 Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr
 115 120 125
 Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu
 130 135 140
 Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly
 145 150 155 160
 Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly
 165 170 175
 Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala
 180 185 190
 Ile Thr

<210> 3
 <211> 140
 <212> BEMOK
 <213> homo sapiens

<400> 3
 Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile Arg Val Arg Arg Leu Phe
 1 5 10 15
 Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp Lys Arg Gly Lys Val Lys
 20 25 30
 Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn Ile Met Glu Ile Arg Thr
 35 40 45
 Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly Val Glu Ser Glu Phe Tyr
 50 55 60
 Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr Ala Lys Lys Glu Cys Asn
 65 70 75 80
 Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu Glu Asn His Tyr Asn Thr
 85 90 95
 Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val Ala
 100 105 110
 Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly Lys Lys Thr Lys Lys Glu
 115 120 125
 Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala Ile Thr
 130 135 140

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лиофилизированная композиция фактора роста кератиноцитов (KGF), содержащая KGF, маннит от 2 до 5% (вес./об.), сахарозу от 1 до 3% (вес./об.), полисорбат 0,1-0,004% (вес./об.) и гистидин в качестве буфера, причем pH композиции составляет от 6,0 до 7,0.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что KGF содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и их вариантов.

3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что KGF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

4. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что KGF представляет собой ΔN23 KGF, содержащий SEQ ID NO: 3.

5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация маннита составляет 4% (вес./об.).

6. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация сахарозы составляет 2% (вес./об.).

7. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что значение pH равно 6,5.

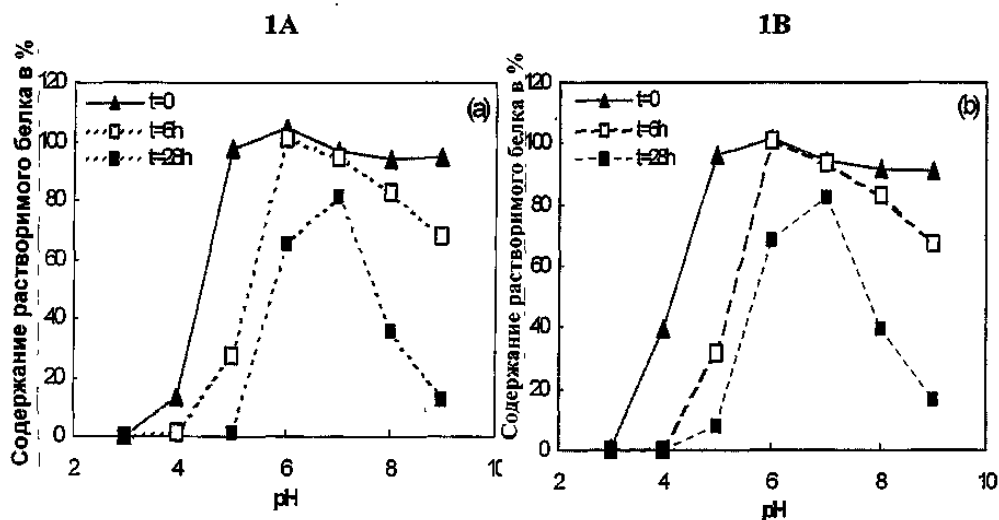
8. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация полисорбата 20 составляет 0,01% (вес./об.).

9. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация KGF составляет 5 мг/мл.

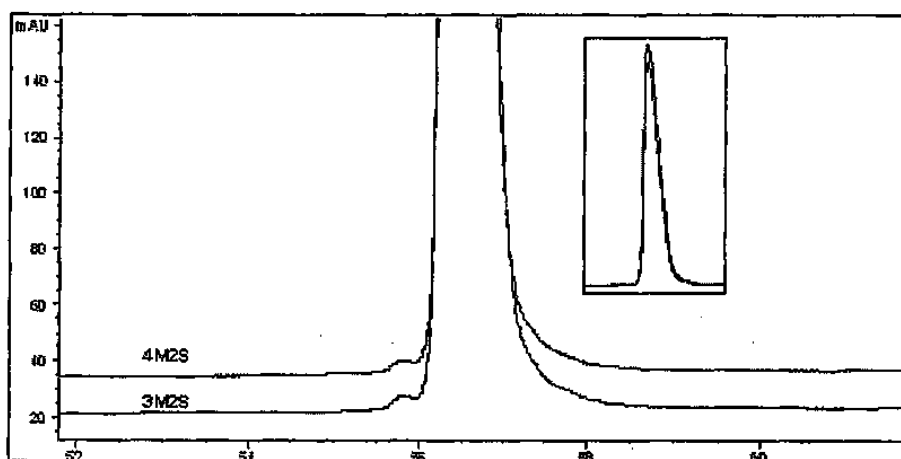
10. Лиофилизированная композиция фактора роста кератиноцитов, содержащая 5 мг/мл KGF, 10 мМ гистидина, 4% (вес./об.) маннита, 2% (вес./об.) сахарозы и 0,01% (вес./об.) полисорбата 20, причем величина pH композиции равна 6,5.

11. Способ лечения заболевания путём повышения опосредованной KGF стимуляции роста эпителиальных клеток, заключающийся во введении субъекту эффективного количества лиофилизированной композиции KGF по п.1.

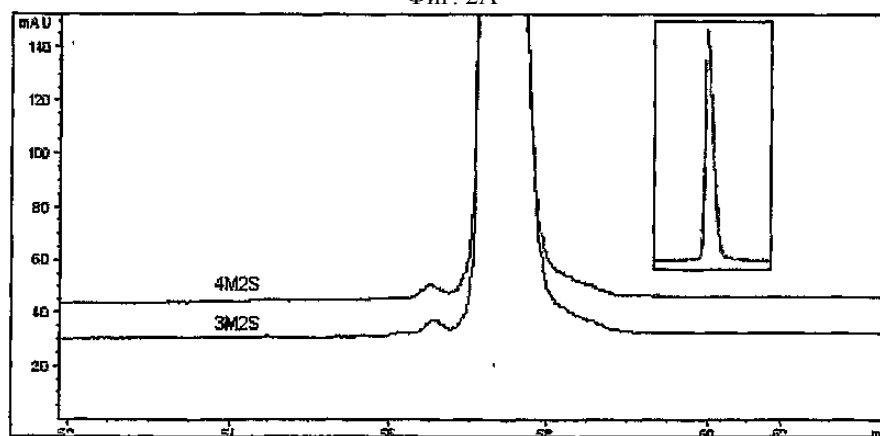
12. Способ по п.11, отличающийся тем, что заболевание представляет собой кишечную интоксикацию; воспаление слизистой оболочки; ожог или другое частичное или полное нарушение слоя; регенерацию волосяных фолликулов, потовых желёз и сальных желёз; пролиферацию придаточных структур; врождённый буллёзный эпидермолиз; вызванную химиотерапией алопецию; облысение по мужскому типу; язвы желудка; язвы двенадцатиперстной кишки; эрозивный гастрит, эзофагит или эзофагеальный рефлюкс; воспалительное заболевание кишечника; асфиктическую пневмонию (гиалиново-мембранную болезнь новорождённых); поражения в результате ингаляции дыма; эмфизему; цирроз печени, печёночную недостаточность, острый вирусный гепатит, другие токсические поражения печени или гомологичную болезнь (болезнь трансплантат против хозяина (GVHD)).



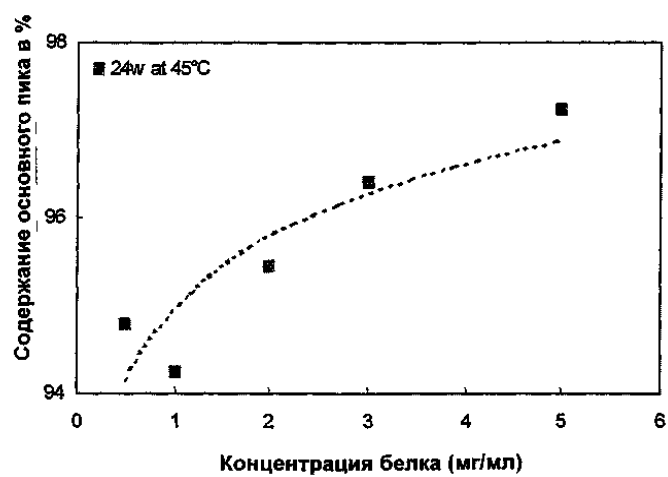
Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 3

