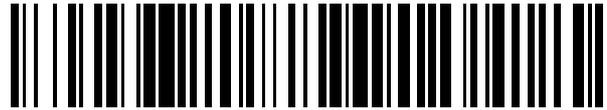


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 504 441**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 47/18** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2005 E 05853972 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 1827483**

54 Título: **Formulaciones terapéuticas del factor de crecimiento de queratinocitos**

30 Prioridad:

**15.12.2004 US 636210 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.10.2014**

73 Titular/es:

**SWEDISH ORPHAN BIOVITRUM AB (PUBL)**  
**(100.0%)**  
**112 76 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**TREUHEIT, MICHAEL J.;**  
**DHARMAVARAM, VASUMATHI;**  
**PURTELL, JUDITH y**  
**ROY, SUZANNE E.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 504 441 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones terapéuticas del factor de crecimiento de queratinocitos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a formulaciones del factor de crecimiento de queratinocitos liofilizado y a métodos para hacer una composición liofilizada compuesta por el factor de crecimiento de queratinocitos.

10 **Antecedentes de la invención**

El factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) es un factor de crecimiento específico de las células epiteliales que fue identificado primero en medio acondicionado de una línea celular de fibroblastos embrionarios pulmonares humanos [Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:802-806 (1989)]. La expresión del ARN mensajero para KGF se detectó en varias líneas celulares de fibroblastos estromales derivados de tejidos epiteliales en diversas etapas de desarrollo. La transcripción para KGF también fue evidente en el ARN extraído de riñón de adulto normal y órganos del tubo gastrointestinal [Finch et al., Science 245:752-755 (1989)]. La evidencia de que KGF es segregado por los fibroblastos en cultivo y se expresa *in vivo* en la dermis, pero no en la epidermis, indica que KGF puede ser un efector paracrino normal importante de la proliferación de queratinocitos. Los estudios han demostrado que KGF es tan potente como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) para estimular la proliferación de los queratinocitos humanos primarios o secundarios en cultivo tisular [Marchese et al., J. Cell Phys. 144:326-332 (1990)]. KGF es producido por las células mesenquimatosas cerca del epitelio de muchos órganos que incluyen la epidermis, el epitelio gastrointestinal oral e inferior, el páncreas, el hígado, el pulmón, el urotelio, el epitelio prostático y otros [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. 179:831-840, (1994); Yi et al, J Urol. 154:1566-70, (1995); y Ulich et al., J Clin Invest. 93:1298-1306, (1994)].

La purificación de KGF del medio acondicionado de una línea celular de fibroblastos de embrionarios humanos, así como la secuenciación parcial de aminoácidos del KGF purificado, la clonación del gen de KGF y la expresión del gen en células bacterianas para producir KGF biológicamente activo recombinante se describen en la publicación de patente internacional WO 90/08771. Esta publicación también da a conocer que KGF o polipéptidos tipo KGF son útiles como agentes curativos de heridas por quemaduras o para estimular el tejido córneo trasplantado.

Estudios *ex vivo* e *in vivo* en animales adultos normales han demostrado que KGF-1 (en lo sucesivo "KGF") produce cambios en la morfogénesis del folículo piloso, la proliferación de hepatocitos y la proliferación de células epiteliales en pulmón, mama, páncreas, estómago, intestino delgado e intestino grueso [Panos 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); y Ulich et al., J. Clin. Invest. 93:1298-1306 (1994)]. El papel de KGF en el desarrollo embrionario o neonatal está actualmente en investigación; sin embargo, se ha documentado que KGF es un mediador importante del desarrollo de la vesícula seminal en el ratón recién nacido [Alarid et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1074-1078 (1994)]. Además, los ratones que sobreexpresan KGF en los hepatocitos tienen riñones poliquisticos [Nguyen et al., Oncogene 12:2109-19, (1996)], mientras que la sobreexpresión de KGF en el pulmón utilizando un promotor surfactante da lugar a ratones con cistadenomas pulmonares [Simonet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:12461-65, (1995)], lo que demuestra la importancia de KGF en el desarrollo renal y pulmonar normal.

Se ha demostrado que KGF aumenta la reepitelización y que aumentó el espesor del epitelio cuando se aplicó tópicamente KGF recombinante a heridas inducidas quirúrgicamente en oreja de conejo o en piel porcina [Pierce et al., J. Exp. Med. 179:831-840 (1994)]; y Staiano-Coico et al., J. Exp. Med. 178:865-878 (1993)]. Bosch, et al., [J. Clin. Invest. 98:2683-2687 (1996)] informaron que la administración del factor de crecimiento de queratinocitos inducirá la proliferación de células hepáticas.

Habitualmente, los polipéptidos purificados son sólo marginalmente estables en estado acuoso y sufren degradación química y física lo que resulta en una pérdida de actividad biológica durante el procesamiento y el almacenamiento. Además, las composiciones de polipéptidos en solución acuosa sufren hidrólisis, como desamidación y escisión del enlace peptídico. Estos efectos representan un problema serio para los polipéptidos terapéuticamente activos destinados a ser administrados a humanos en un rango de dosis definido basado en la actividad biológica.

La administración del factor de crecimiento de queratinocitos sigue siendo una estrategia promisoría para tratar muchas enfermedades que afectan a la población humana. No obstante, no se ha abordado la capacidad de KGF para permanecer como una composición farmacéutica estable en el tiempo en diversas condiciones de almacenamiento y ser por lo tanto eficaz para los pacientes *in vivo*. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en el área de proporcionar el factor de crecimiento de queratinocitos en formulaciones estables que sean útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades que se benefician de la estimulación mediada por KGF de la multiplicación de células epiteliales.

65

## Resumen de la invención

La presente invención proporciona una novedosa formulación útil para la liofilización del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), que resulta en un producto de KGF sumamente estable. El producto de KGF estable es útil como agente terapéutico en el tratamiento de individuos que sufren de trastornos o afecciones que se pueden beneficiar de la administración de KGF.

En un aspecto, la invención proporciona una composición liofilizada del factor de crecimiento de queratinocitos que contiene histidina, un incrementador del volumen, un surfactante y un azúcar, por ej. un azúcar estabilizante, como el que se reivindica en la reivindicación 1.

En una realización, la composición de KGF comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 2 o una variante de ésta. Una variante de proteínas KGF incluye variaciones alélicas o una o más deleciones, sustituciones o inserciones de aminoácidos, incluidos fragmentos y moléculas quiméricas o híbridas del KGF nativo. Por ejemplo, la invención propone que el KGF sea  $\Delta$ N23 KGF (SEC. ID N°: 3), en el cual se eliminaron los primeros 23 aminoácidos del KGF nativo. Las variantes incluyen las moléculas descritas en este documento como los polipéptidos que cambian de carga, donde uno o más residuos de los aminoácidos 41-154 del KGF nativo (SEC. ID N°: 2) son eliminados o sustituidos con un residuo neutro o un residuo cargado negativamente elegido para efectuar una proteína con una carga positiva menor. Aún otro ejemplo de KGF incluye, pero no exclusivamente, las proteínas generadas mediante la sustitución de al menos un aminoácido que tenga un mayor potencial de formación de bucle para al menos un aminoácido dentro de una región de formación de bucle de Asn<sup>115</sup>-His<sup>116</sup>-Tyr<sup>117</sup>-Asn<sup>118</sup>-Thr<sup>119</sup> del KGF nativo. Aún otro ejemplo incluye proteínas que tienen una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos dentro de la región de los aminoácidos 123-133 (aminoácidos 154-164 de SEC. ID N°: 2) del KGF nativo.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que contiene un incrementador del volumen/regulador de la osmolaridad. Específicamente el incrementador del volumen es manitol, incorporado en una concentración entre aproximadamente 2% y aproximadamente 5% p/v. Aún en otra realización, la concentración es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 4.5% p/v. En otra realización, el manitol está en una concentración de 4% p/v.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que contiene un azúcar estabilizante. Específicamente, el azúcar es sacarosa en una concentración entre aproximadamente 1% y 3% p/v. En otra realización, la sacarosa está en una concentración de 2%.

La composición de la invención se ajusta a un pH en el rango de 6.0 a 8.0. En otra realización, la composición tiene un pH en el rango entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 7.0. En otra realización, la composición tiene un pH de aproximadamente 6.5.

En otra realización más, la invención proporciona una composición que contiene el surfactante polisorbato 20 en un rango entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 0.004% p/v. En otra realización, el polisorbato 20 está en una concentración de aproximadamente 0.01% p/v.

En un aspecto, la invención propone una composición liofilizada del factor de crecimiento de queratinocitos que contiene histidina 10 mM, 4% de manitol, 2% de sacarosa y 0.01% de polisorbato 20, donde la composición tiene un pH de 6.5.

La invención proporciona además un método para preparar el factor de crecimiento de queratinocitos liofilizado que comprende los pasos de: a) preparar una solución de histidina, un incrementador del volumen, un azúcar estabilizante y un surfactante; y b) liofilizar dicho KGF. En un aspecto relacionado, la invención propone un método para preparar un factor de crecimiento de queratinocitos liofilizado que comprende además, antes del paso de liofilización: b) ajustar el pH de la solución a un pH entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 8.0; c) preparar una solución que contenga un factor de crecimiento de queratinocitos; d) intercambiar la solución del paso (c) con la solución tampón del paso (b); e) agregar una cantidad apropiada de un surfactante, y f) liofilizar la mezcla del paso (e). Además se propone que el KGF puede ser una proteína KGF indicada en la SEC. ID N°: 2, SEC. ID N°: 3 o sus variantes.

En el método de la invención el incrementador del volumen es manitol en una concentración entre aproximadamente 2% y aproximadamente 5% p/v. En una realización relacionada, el manitol está en una concentración entre aproximadamente 3% y aproximadamente 4.5% p/v. En otra realización, el manitol está en una concentración de 4% p/v.

De acuerdo con el método de la invención el azúcar estabilizante es sacarosa en una concentración entre aproximadamente 1% y aproximadamente 3% p/v. En otra realización, la sacarosa está en una concentración de 2%.

De acuerdo con los métodos de la invención el pH se ajusta a un rango entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 8.0. En otra realización, el pH se ajusta a un rango entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 7.0. Todavía en otra realización más, el pH se ajusta a un valor de pH 6.5.

- 5 El surfactante utilizado es polisorbato 20 en un rango entre aproximadamente 0.1% y aproximadamente 0.004% p/v. En otra realización, la concentración de polisorbato 20 es de aproximadamente 0.01% p/v.

10 En un aspecto, la invención propone un método para preparar una composición liofilizada del factor de crecimiento de queratinocitos que contenga histidina 10 mM, 4% de manitol, 2% de sacarosa y 0.01% (p/v) de polisorbato 20 y que tenga un pH de aproximadamente 6.5.

15 La invención propone además un método para tratar una enfermedad mediante aumento de la estimulación mediada por KGF de la multiplicación de las células epiteliales, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición liofilizada del factor de crecimiento de queratinocitos de la invención.

20 Se propone que la enfermedad a tratar sea toxicidad intestinal; mucositis; una quemadura u otras lesiones de espesor parcial y total; repoblación de los folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas; proliferación de estructura anexas; epidermolisis ampollosa; alopecia inducida por quimioterapia; calvicie hipocrática; úlceras gástricas; úlceras duodenales, gastritis erosiva, esofagitis o reflujo esofágico; enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedad de la membrana hialina; lesiones por inhalación de humo; enfisema; cirrosis hepática, insuficiencia hepática, hepatitis viral aguda, otras agresiones tóxicas para el hígado; o enfermedad injerto contra huésped (EICH).

25 La invención también propone un kit para preparar una composición farmacéutica acuosa compuesta por un primer recipiente que tiene la composición liofilizada del factor de crecimiento de queratinocitos y un segundo recipiente con una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición liofilizada. Se propone que la proteína KGF está indicada en SEC. ID N°: 2, SEC. ID N°: 3 o sus variantes. La solución de reconstitución fisiológicamente aceptable puede ser cualquier portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, incluidos, pero no exclusivamente, cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, antibióticos y antimicóticos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y análogos, clínicamente útiles, que incluyen los agentes dados a conocer en este documento. Además, la composición de KGF se puede administrar a un sujeto por cualquier vía considerada adecuada por el médico tratante, incluidas la vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, por inhalación de aerosol, vaginal, rectal o inyección intracraneal. El término parenteral según se usa en este documento incluye las inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, la inyección intracisternal, o técnicas de infusión. También se propone la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o la implantación quirúrgica en un sitio particular.

### Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 ilustra el análisis por (SE) - HPLC de exclusión por tamaño (Figura 1A) y (CE) - HPLC de intercambio catiónico (Figura 1B) de la proteína soluble en formulaciones líquidas de KGF a diferentes pH.

45 La figura 2 ilustra los cromatograma de (RP) - HPLC de fase reversa que comparan las formulaciones liofilizadas de KGF en histidina 10 mM, 0.01% de polisorbato 20 y 4% de manitol/2% de sacarosa o 3% de manitol/2% de sacarosa. La figura 2A ilustra el tiempo cero después de la liofilización mientras que la figura 2B muestra el producto después del almacenamiento durante 1 año a 4 °C. El recuadro muestra el área alrededor del pico principal.

50 La figura 3 representa el porcentaje del pico principal como una función de la concentración de proteína de un análisis SE-HPLC de formulaciones liofilizadas de KGF después del almacenamiento durante 24 semanas a 45 °C.

### Descripción detallada de la invención

55 La presente invención se refiere a formulaciones para la liofilización del factor de crecimiento de queratinocitos purificado que proporcionan un producto proteico estable y aumentan la vida útil de la proteína purificada. La invención proporciona además un método para preparar una composición liofilizada compuesta por el factor de crecimiento de queratinocitos.

60 Según se usa en este documento, "factor de crecimiento de queratinocitos" o "KGF" se refiere al polinucleótido factor de crecimiento de queratinocitos (SEC. ID N°: 1, N° de referencia de Genbank NM\_002009) o al polipéptido planteado en SEC. ID N°: 2 (N° de referencia de Genbank NP\_002000) o a un análogo de éstos, o alternativamente a un fragmento activo del factor de crecimiento de queratinocitos o a un análogo de éste, como ΔN23 KGF (SEC. ID N°: 3), o a un factor que se una y active al receptor del factor de crecimiento de queratinocitos. En una realización preferida, KGF es ΔN23 KGF, una forma de KGF producida por vía recombinante en la cual se eliminaron los primeros 23 aminoácidos del extremo amino terminal del KGF maduro (sin secuencia señal unida). Véanse, por

ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5,677,278; 6,677,301, 6,074,848, 5,843,883, 5,863,767 y 5,773,586, todas asignadas a CHIRON Corp., la patente de Estados Unidos. N° 5,731,170 y la solicitud PCT N° WO 90/08771, publicada el 9 de agosto de 1990 (dirigida a las formas completas de KGF y variantes); y la solicitud PCT N° WO 96/11949, publicada el 25 de abril de 1996; la solicitud PCT N° WO 96/11951, publicada el 25 de abril de 1996; y la solicitud PCT N° WO 98/24813, publicada el 11 de junio de 1998 (dirigida a análogos estables de KGF).

Se describen análogos de KGF que tienen mayor estabilidad con respecto al KGF natural en la publicación PCT internacional WO 96/11951 y la patente de Estados Unidos N° 6,677,301, y dichos análogos de KGF son propuestos por la invención. Alternativamente, se propone cualquier fragmento del polipéptido KGF entero, o un análogo de éste que retenga la actividad total o incluso parcial de KGF.

Se debe entender que las expresiones "factor de crecimiento de queratinocitos" y "KGF" según se emplean en esta descripción están destinadas a incluir y a significar indistintamente, a menos que se indique lo contrario, el KGF nativo y las proteínas análogas a KGF (o "muteínas") caracterizadas por una secuencia peptídica sustancialmente igual a parte o toda la secuencia peptídica del KGF nativo y por retener parte o toda la actividad biológica del KGF nativo, particularmente la proliferación de células epiteliales que no son fibroblastos, por ejemplo, exhibiendo al menos unas 500 veces más estimulación de los queratinocitos BALB/MK que para los fibroblastos NIH/3T3, y al menos unas 50 veces más estimulación de los queratinocitos BALB/MK células que para las células epiteliales BS/589 o para las células epiteliales CC1208, según lo determinado por la incorporación de H-timidina. También son propuestos por la invención los péptidos "caracterizados por una secuencia peptídica sustancialmente igual a la secuencia peptídica del KGF nativo" que se refiere a una secuencia peptídica que es codificada por una secuencia de ADN capaz de hibridarse con la región codificante de SEC. ID N°: 1, en condiciones de hibridación de moderadamente a muy rigurosas como se ejemplifica en este documento.

Las condiciones rigurosas en el contexto de la hibridación, serán condiciones rigurosas combinadas de sal, temperatura, solventes orgánicos y otros parámetros habitualmente controlados en las reacciones de hibridación. Los ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas son la hibridación en 4 x SSC a 62-67 °C, seguido de lavado en 0.1 x SSC a 62-67 °C durante aproximadamente una hora. Alternativamente, los ejemplos de condiciones de hibridación rigurosas son la hibridación en formamida al 45-55%, 4 x SSC a 40-45 °C. [Véase, T. Maniatis et. al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual); Cold Spring Harbor Laboratory (1982), páginas 387 a 389.]

Las proteínas KGF incluyen variaciones alélicas o uno más deleciones, sustituciones o inserciones de aminoácidos, que incluyen fragmentos y moléculas quiméricas o híbridas del KGF nativo. Una molécula de KGF preferida de esta invención es ΔN23 KGF. Otros ejemplos de KGF incluyen, sin limitación, las proteínas que tienen los residuos correspondientes a Cys<sup>1</sup> y Cys<sup>15</sup> de SEC. ID N°: 2 reemplazados o eliminados, donde la molécula resultante tiene mayor estabilidad en comparación con la molécula parental (como se instruye en la patente de Estados Unidos 6,008,328 de propiedad común). Otro ejemplo de KGF incluye, pero no exclusivamente, polipéptidos que cambian de carga, en los que uno o más residuos de los aminoácidos 41-154 del KGF nativo (preferentemente los residuos Arg<sup>41</sup>, Gln<sup>43</sup>, Lys<sup>55</sup>, Lys<sup>95</sup>, Lys<sup>128</sup>, Asn<sup>137</sup>, Gln<sup>138</sup>, Lys<sup>139</sup>, Arg<sup>144</sup>, Lys<sup>147</sup>, Gln<sup>152</sup>, Lys<sup>153</sup> o Thr<sup>154</sup>) son eliminados o sustituidos con un residuo neutro o cargado negativamente elegido para efectuar una proteína con una carga positiva menor. Aún otro ejemplo de KGF incluye, pero no exclusivamente, las proteínas generadas mediante sustitución de al menos un aminoácido con un potencial de formación de bucle por al menos un aminoácido dentro de una región de formación de bucle de Asn<sup>115</sup>-His<sup>116</sup>-Tyr<sup>117</sup>-Asn<sup>118</sup>-Thr<sup>119</sup> del KGF nativo (como se instruye en la patente de Estados Unidos 6,008,328). Aún otro ejemplo incluye proteínas que tienen una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos dentro de la región de los aminoácidos 123-133 (aminoácidos 154-164 de SEC. ID N°: 2) del KGF nativo.

Las proteínas KGF específicamente propuestas incluyen las moléculas de KGF siguientes (a las que se hace referencia por el residuo encontrado en esa posición en la proteína madura (menos la secuencia señal) indicada en SEC. ID N°:2, seguido de esa posición del aminoácido entre paréntesis y después del residuo sustituido o "-" para designar una deleción): ΔN15, ΔN16, ΔN18, ΔN23, ΔN24, ΔN25, ΔN26, or ΔN27 KGF, C(1,15)S, ΔN15-AN24, 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 y H(116)G.

Los efectos proliferativos de KGF en muchos tipos diferentes de células epiteliales y endoteliales implican que es un producto terapéutico útil en el tratamiento de muchas afecciones o enfermedades que afectan a un individuo. La siguiente es una descripción de las enfermedades y afecciones médicas que pueden ser tratadas con el KGF de la invención.

La toxicidad intestinal es un factor limitante importante en los regímenes de tratamiento por radiación y quimioterapia. El pretratamiento con KGF puede tener un efecto citoprotector sobre la mucosa del intestino delgado, lo que permite aumentar la dosis de dichas terapias reduciendo los posibles efectos secundarios mortales de la toxicidad intestinal. Ensayos clínicos recientes de fase I de pacientes a los que se les administró KGF humano recombinante antes de tratamiento con el antineoplásico 5-fluorouracilo sugieren que el tratamiento con KGF

- promoverá una menor incidencia de mucositis [Meropol et al., J Clin Oncol. 21:1452-8 (2003)]. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de toxicidad intestinal inducida por radiación que permiten pruebas predictivas de compuestos con eficacia terapéutica en humanos [Withers y Elkind, "Microcolony Survival Assay for Cells of Mouse Intestinal Mucosa Exposed to Radiation", Int. J. Radiat., 17:261-267 (1970). Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de toxicidad intestinal inducida por quimioterapia que son predictivos de la eficacia terapéutica en humanos. Sonis, et al., "An Animal Model for Mucositis Induced by Cancer Chemotherapy, Oral Surg.", Oral Med. Oral Pathol., 69:437-431 (1990); y Moore, "Clonogenic Response of Cells of Murine Intestinal Crypts to 12 Cytotoxic Drugs", Cancer Chemotherapy Pharmacol., 15:11-15 (1985)].
- El tratamiento con KGF tiene un efecto sorprendente sobre la producción de mucosidad a lo largo del tubo gastrointestinal. Esta propiedad puede ser útil para proteger la mucosa intestinal de sustancias nocivas que son ingeridas, o para limitar la propagación de la lesión en afecciones como enfermedades inflamatorias intestinales.
- La estimulación de la proliferación y diferenciación de las estructuras anexas como folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas es de vital importancia en la regeneración de la epidermis y la dermis en pacientes con quemaduras y otras lesiones de espesor parcial y total. En la actualidad, los defectos superficiales curan por formación de cicatriz y la reaparición de queratinocitos en la superficie; la regeneración total de la piel todavía no es posible. La repoblación de los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y las glándulas sebáceas no se produce en la actualidad en defectos cutáneos de espesor total, por ejemplo las quemaduras. El uso de KGF puede permitir dicha repoblación. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de proliferación y estimulación de estructuras anexas que permiten pruebas predictivas de compuestos con eficacia terapéutica en humanos para quemaduras y otras lesiones de espesor parcial y total [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); y Davis, et al., "Second-degree burn healing: the effect of occlusive dressings and a cream." J. of Surgical Res. 48:245-248 (1990)].
- La epidermólisis ampollosa es un defecto en la adhesión de la epidermis a la dermis subyacente, que da lugar a frecuentes ampollas abiertas y dolorosas que pueden causar morbilidad grave. La reepitelización acelerada de estas lesiones, como por ejemplo mediante tratamiento con KGF, resultaría en menos riesgo de infección, menos dolor, y menos cuidado de las heridas.
- Se produce alopecia inducida por quimioterapia cuando los pacientes son tratados con tandas de quimioterapia para el cáncer. En la actualidad no hay productos terapéuticos eficaces para prevenir la muerte de los folículos pilosos que causa la pérdida transitoria de cabello. El KGF proporciona dichos medios. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de alopecia inducida por quimioterapia que permiten pruebas predictivas de compuestos con eficacia terapéutica en humanos. [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); y 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)].
- La calvicie hipocrática es prevalente y esencialmente intratable. La pérdida progresiva de cabello en hombres y mujeres es un problema cosmético serio. Los ratones con deficiencia de KGF tienen un pelaje despeinado descuidado mientras que los que tienen el receptor de KGF inactivado tienen una piel fina, bajo número de folículos pilosos y retraso en la cicatrización de heridas [Werner et al., Science 266:819-22 (1994)]. En modelos experimentales de alopecia, el pretratamiento con KGF recombinante protegió de aproximadamente el 50% de la alopecia inducida por la administración del antineoplásico citosina arabinósido (ARA-c) [Danilenko et al., Am J Path. 147:145-54, (1995)]. Estas afecciones se podrían tratar utilizando KGF ya sea sistémica o tópicamente si el fármaco se pudiera aplicar y absorber a través del cuero cabelludo o mediante inyección de aerosol en el cuero cabelludo utilizando una pistola de aire o tecnologías similares. Es bien conocido un modelo estándar *in vivo* de alopecia hipocrática que permite pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos. [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)].
- Los estudios han demostrado que la administración de KGF podría inducir la multiplicación celular en el tubo gastrointestinal [Playford et al., J Pathol. 184:316-22, (1998)]. Las úlceras gástricas, aunque son tratables por los antagonistas de H2, causan una morbilidad y una tasa de reaparición importantes y se curan por formación de una cicatriz del revestimiento mucoso. La capacidad de regenerar la mucosa glandular más rápidamente en los pacientes con úlceras gástricas, por ejemplo, mediante tratamiento con KGF, ofrecería una mejora terapéutica significativa en el tratamiento de las úlceras gástricas. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de úlceras gástricas que permiten pruebas predictivas de compuestos con eficacia terapéutica en humanos, por ejemplo, Tarnawski, et al., ["Indomethacin Impairs Quality of Experimental Gastric Ulcer Healing: A Quantitative Histological and Ultrastructural Analysis", en: Mechanisms of Injury, Protection and Repair of the Upper Gastrointestinal Tract,

(eds) Garner and O'Brien, Wiley & Sons (1991); y 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)].

Las úlceras duodenales, como las úlceras gástricas, son tratables, pero el desarrollo de un agente terapéutico para regenerar el revestimiento mucoso del duodeno de forma más rápida y total sería un avance importante. Además, sería beneficioso contar con un agente terapéutico para curar regenerativamente esas úlceras y disminuir su reaparición. El KGF ofrece dicho potencial. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de úlceras duodenales que permiten pruebas predictivas de compuestos con eficacia terapéutica en humanos [Berg, et al., "Duodenal ulcers produced on a diet deficient in pantothenic acid", Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 7:374-376 (1949); Szabo y 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); y Keshavarzian et al., "Gastrointestinal 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)].

Las erosiones del estómago y del esófago, como la gastritis erosiva, la esofagitis o el reflujo esofágico, son tratables, pero el desarrollo de un agente terapéutico para regenerar el revestimiento mucoso del estómago y del esófago de manera más rápida y total sería un avance importante. Además, sería beneficioso contar con un agente terapéutico para curar regenerativamente esas erosiones y disminuir su reaparición. El KGF ofrece dicho potencial. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de erosión del estómago y el esófago, como la gastritis erosiva, la esofagitis, o el reflujo esofágico, que permiten pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos [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), y Katz et al., "Acid-induced esophagitis in cats is prevented by sucralfate but not synthetic prostaglandin E.", Dig-Dis-Sci., 33:217-224 (1988)].

Las enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn (que afecta principalmente al intestino delgado) y la colitis ulcerosa (que afecta principalmente al intestino grueso), son enfermedades crónicas de etiología desconocida que producen la destrucción de la superficie de la mucosa, inflamación, formación de cicatriz y adherencias durante la reparación, y una morbilidad significativa para los individuos afectados. En la actualidad, el tratamiento está diseñado para controlar la inflamación, sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento con KGF induce la proliferación del epitelio del tubo gastrointestinal en animales afectados por enfermedades inflamatorias intestinales [Housley et al., J Clin Invest. 94:1764-77, (1994)]. Un producto terapéutico como el KGF para estimular la recuperación de la superficie de la mucosa, que dé lugar a una curación más rápida, puede ser beneficioso para controlar el avance de la enfermedad. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal que permiten pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos. [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)].

La enfermedad de la membrana hialina de los recién nacidos prematuros resulta en la ausencia de producción de surfactante por los neumocitos tipo II en el pulmón, lo que produce el colapso de los alvéolos. La enfermedad de la membrana hialina puede tener tanto una fase crónica como aguda. La fase aguda de la enfermedad de la membrana hialina (síndrome de dificultad respiratoria infantil - SDRI) se trata con ventilación mecánica y tratamiento con concentraciones de 80 a 100% de oxígeno complementario y por administración de un surfactante exógeno. Los pacientes sometidos a un curso prolongado de tratamiento pueden presentar la fase crónica de la enfermedad de la membrana hialina (displasia broncopulmonar - DBP). Si bien los surfactantes han disminuido en gran medida la mortalidad asociada al SDRI, la morbilidad asociada a la DBP continúa siendo elevada. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar tratamientos eficaces para acelerar la maduración del pulmón y la secreción de surfactante en los recién nacidos para reducir la incidencia de DBP. Aunque los corticoesteroides pueden acelerar en gran medida la maduración y la secreción en fetos de veintiocho semanas de edad y más, actualmente no existe ningún tratamiento para los fetos de menos tiempo, lo que resulta en una importante morbimortalidad en esta población. La historia de la DBP sugiere que las mejoras en el tratamiento del SDRI serán igualadas mediante ventilación mecánica de los bebés nacidos prematuramente incluso más pequeños y un consiguiente aumento en la incidencia de DBP en estos niños más pequeños. Un agente terapéutico como KGF que induciría la proliferación y la diferenciación de los neumocitos tipo II [Yi et al., Inflammation 22:315-25 (1998)] sería muy beneficioso en el tratamiento de esta enfermedad. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de SDRI que permiten pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos. 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). Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de DBP que permiten pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia

terapéutica en humanos [Yuh-Chin, et al., "Natural surfactant and hyperoxide lung injury in primates I. Physiology and biochemistry", J. Appl. Physiol. 76:991-1001 (1994); y 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)].

5 La inhalación de humo es una causa importante de morbimortalidad en la semana siguiente a una lesión por quemadura debido a la necrosis del epitelio bronquiolar y los alvéolos. Un factor de crecimiento como KGF que podría estimular la proliferación y diferenciación de esas estructuras, e inducir su reparación y regeneración, sería beneficioso para tratar lesiones por inhalación. Es bien conocido un modelo estándar *in vivo* de inhalación de humo que permite pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos. Hubbard, et al.,  
10 "Smoke inhalation injury in sheep", Am. J. Pathol., 133:660-663 (1988).

El enfisema resulta de la pérdida progresiva de los alveolos. Un factor de crecimiento como KGF que podría estimular la multiplicación o que sea citoprotector de los alvéolos restantes [Kaza et al., Circulation. 106(12 Suppl 1):1120-4 (2002)], proporcionaría un beneficio terapéutico. En la actualidad, no se dispone de un tratamiento eficaz.  
15 Es bien conocido un modelo estándar *in vivo* de enfisema que permite pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos [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)].

La cirrosis hepática, secundaria a una hepatitis viral y a la ingesta crónica de alcohol es una causa importante de morbimortalidad. La citoprotección, la proliferación y la diferenciación de los hepatocitos mediante el uso de KGF [Danilenki, D., Toxicol Pathol. 27:64-71 (1999)] para aumentar la función hepática sería beneficioso para retardar o prevenir la aparición de cirrosis. Es bien conocido un modelo estándar *in vivo* de cirrosis hepática que permite pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos [Tomaszewski, et al., "The production of hepatic cirrhosis in rats", J Appl. Toxicol., 11:229-231 (1991)].  
20

La insuficiencia hepática fulminante es una afección potencialmente mortal que se produce en la etapa final de la cirrosis. Un agente como KGF que podría inducir la proliferación de los hepatocitos restantes proporcionaría un beneficio directo para esta enfermedad, que en la actualidad es tratable sólo mediante el trasplante de hígado. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de insuficiencia hepática fulminante que permiten pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos [Mitchell, et al., "Acetaminophen-induced hepatic necrosis I. Role of drug metabolism", J. Pharmacol. Exp. Ther., 187:185-194 (1973); y Thakore y Mehendale, "Role of hepatocellular regeneration in CC14 autoprotection", Toxicologic Pathol. 19:47-58 (1991)].  
25

La hepatitis viral aguda es frecuentemente subclínica y autolimitante. Sin embargo, en una minoría de los pacientes, puede provocar daño hepático severo durante varias semanas. Se podría utilizar un agente citoprotector como KGF para prevenir la degeneración hepatocelular.  
30

Las agresiones tóxicas para el hígado causadas por acetaminofén, halotano, tetracloruro de carbono y otras toxinas se podrían mejorar con un factor de crecimiento (KGF) que sea citoprotector de los hepatocitos. Son bien conocidos modelos estándar *in vivo* de toxicidad hepática que permiten pruebas predictivas de compuestos que tienen eficacia terapéutica en humanos [Mitchell, et al. (1973), *supra*, y Thakore y Mehendale (1991), *supra*].  
35

La enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (crónica o aguda) es la principal causa de fracaso del trasplante de células de médula ósea o hematopoyéticas en los pacientes. La EICH produce el daño de varios sistemas de órganos debido al aumento de inmunomoduladores y factores citotóxicos. La EICH produce daño en múltiples áreas, que incluyen el tubo gastrointestinal, el pulmón, el hígado, la piel, y las glándulas mucosas de los ojos, las glándulas salivales de la boca y las glándulas que lubrican el revestimiento del estómago y los intestinos. Estudios recientes en animales a los que se les indujo EICH indican que los receptores tratados con rHuKGF no presentaron EICH intestinal, no presentaron endotoxemia ni murieron [Panoskaltis-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)]. Estos datos sugieren que KGF impide el desarrollo de la EICH aguda mortal al proteger la lesión de la célula epitelial mediada por TNF-alfa, NO y otros posibles factores citotóxicos. Un agente como KGF que podría inducir la proliferación de los epitelios en muchos de estos tipos de células proporcionaría un beneficio directo para tratar la EICH en receptores de trasplante humanos.  
40  
45  
50

### 55 **Formulaciones y administración**

Las proteínas o los péptidos KGF son útiles para utilizar en formulaciones farmacéuticas destinadas a tratar enfermedades humanas como las descritas antes. KGF se puede preparar como una formulación líquida o liofilizada. En una realización preferida las composiciones de KGF se liofilizan. La liofilización se puede llevar a cabo mediante técnicas comunes en el área y se deben optimizar para que se desarrolle la composición [Tang et al., Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang et al., Pharm Res. 13:243-9 (1996)].  
60

Un ciclo de liofilización está habitualmente compuesto por tres pasos: congelación, secado primario y secado secundario [A.P. Mackenzie, Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol 278:167 (1977)]. En el paso de congelación, la solución se enfría hasta que iniciar y completar la formación de hielo. Después, este paso induce la cristalización del  
65

incrementador del volumen. El hielo sublima en la etapa de secado primario que se realiza reduciendo la presión de la cámara por debajo de la presión de vapor del hielo, utilizando vacío e introduciendo calor para promover la sublimación. Finalmente, se extrae el agua adsorbida o unida en la etapa de secado secundario a presión de cámara reducida y a una temperatura de almacenamiento elevada. El proceso produce un material conocido como una torta liofilizada. Posteriormente la torta se puede reconstituir con agua estéril para inyección o una solución de reconstitución multidosis adecuada antes de utilizarla.

El ciclo de liofilización no sólo determina el estado físico final de los excipientes sino que también afecta otros parámetros como tiempo de reconstitución, aspecto, estabilidad y contenido final de humedad. La estructura de la composición en el estado congelado procede a través de varias transiciones (por ejemplo transiciones vítreas y cristalizaciones) que se producen a temperaturas específicas y se pueden usar para entender y optimizar el proceso de liofilización. La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) puede proporcionar información acerca del estado físico de un soluto y se puede determinar por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Este es un parámetro importante que se debe tener en cuenta cuando se diseña el ciclo de liofilización. Además, en el estado seco, la temperatura de transición vítrea proporciona información sobre la temperatura de almacenamiento del producto final.

En las composiciones de la presente, se agrega un estabilizante a la formulación de liofilización para prevenir o reducir la liofilización o la agregación y la degradación química inducidas por el almacenamiento. Una solución brumosa o turbia luego de la reconstitución indica que ha precipitado la proteína. El término "estabilizante" significa un excipiente capaz de prevenir la agregación u otra degradación física, así como la degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.) en un estado acuoso y sólido. Se pueden utilizar los estabilizantes que se emplean convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, incluidas, pero no exclusivamente, sacarosa, trehalosa o glicina [Carpenter et al., *Develop. Biol. Standard* 74:225, (1991)]. Los estabilizantes surfactantes como polisorbato 20 (Tween 20) o polisorbato 80 (Tween 80) también se pueden agregar en cantidades adecuadas para prevenir el fenómeno de agregación relacionado con la superficie durante el congelamiento y el secado [Chang, B, J. *Pharm. Sci.* 85:1325, (1996)]. Si se desea, las composiciones liofilizadas también incluyen cantidades adecuadas de incrementadores del volumen y reguladores de la osmolaridad adecuados para formar una "torta" liofilizada. Los incrementadores del volumen pueden ser cristalinos (por ejemplo, manitol o glicina) o amorfos (por ejemplo, sacarosa, polímeros como dextrano, polivinilpirrolidona o carboximetilcelulosa). En una realización, el incrementador del volumen es manitol. En otra realización, el manitol se incorpora en una concentración entre aproximadamente 2% y aproximadamente 5% p/v, y aún en otra realización en una concentración entre aproximadamente 3% y 4.5% p/v, para producir una torta mecánica y farmacéuticamente estable y elegante. En otra realización, la concentración de manitol es 2% p/v.

Se encontró que la elección de un tampón y un pH farmacéuticamente aceptables también afecta la estabilidad de las composiciones de la presente. El sistema tampón presente en las composiciones se elige para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH deseado en la solución reconstituida así como en la solución antes de liofilizar. Preferentemente, los tampones tienen una capacidad de amortiguación del pH en el rango entre aproximadamente pH 6.0 y aproximadamente pH 8.0. Se llevan a cabo una serie de estudios de cribado que incorporan los parámetros mencionados antes para elegir las condiciones de formulación más estables.

Se espera que las composiciones sean estables durante al menos 2 años a una temperatura entre 2 °C y 8 °C en el estado liofilizado. Esta estabilidad a largo plazo es beneficiosa para extender la vida útil del producto farmacéutico.

La presente invención propone además métodos para la preparación de las formulaciones de KGF de la invención. En un aspecto, los métodos para preparar una formulación liofilizada de KGF comprenden los pasos de:

- (a) mezclar dicha composición de KGF en un tampón de histidina, un incrementador del volumen, un azúcar y un surfactante;
- (b) liofilizar dicho KGF.

Los métodos de la presente comprenden además uno o más de los pasos siguientes: agregar un estabilizante a dicha mezcla antes de la liofilización, agregar a dicha mezcla un agente elegido entre un incrementador del volumen y un regulador de la osmolaridad, y un surfactante, antes de la liofilización. El incrementador del volumen puede ser cualquier incrementador del volumen de los mencionados antes. Preferentemente, el incrementador del volumen es manitol. El azúcar puede ser cualquier azúcar estabilizante de los mencionados antes. En una realización, el estabilizante es sacarosa. El surfactante puede ser cualquier surfactante de los mencionados antes. En una realización, el surfactante es polisorbato 20.

La práctica de reconstitución estándar para material liofilizado es volver a agregar un volumen de agua pura o agua estéril para inyección (WFI) (habitualmente equivalente al volumen eliminado durante la liofilización), aunque a veces se usan soluciones diluidas de antibióticos en la producción de medicamentos para administración parenteral [Chen, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18:1311-1354 (1992)].

La composición de KGF liofilizada se puede reconstituir como una solución acuosa. Diversos vehículos acuosos, por ejemplo, agua estéril para inyección, agua con conservantes para uso multidosis o agua con cantidades adecuadas

de surfactantes (por ejemplo, polisorbato 20), 0.4% de suero fisiológico, 0.3% de glicina, o las suspensiones acuosas pueden contener el principio activo mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Este tipo de excipientes son suspendentes, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma de acacia; dispersantes o humectantes que pueden ser fosfátidos naturales, por ejemplo, lecitina, o productos de la condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno o productos de la condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de la condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de la condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilensorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo.

Para administrar las composiciones de la invención a seres humanos o animales de prueba, es preferible formular las composiciones de forma que contengan uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las frases "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, que inhiben la degradación de la proteína como productos de agregación y escisión, y además no producen reacciones alérgicas ni otras reacciones adversas cuando se administran utilizando vías bien conocidas en el área, como las que se describen más adelante. Los "portadores farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, antibióticos y antimicóticos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y análogos, clínicamente útiles, incluidos los agentes mencionados antes.

Las composiciones del factor de crecimiento de queratinocitos se pueden administrar por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante inhalación de aerosol, vaginal, rectal o por inyección intracraneal. El término parenteral según se usa en este documento incluye las inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, la inyección intracisternal, o técnicas de infusión. También se propone la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o la implantación quirúrgica en un sitio particular. Generalmente las composiciones son esencialmente apirógenas, así como exentas de otras impurezas que podrían ser nocivas para el receptor.

### 30 Kits

Como un aspecto adicional, la invención incluye kits que contienen uno o más compuestos o composiciones envasados de manera que facilite su uso para la administración a sujetos. En una realización, dicho kit contiene un compuesto o composición como los descritos aquí (por ejemplo, una composición que contiene el factor de crecimiento de queratinocitos), envasado en un recipiente como un frasco o una garrafa sellados, con una etiqueta adherida al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o la composición para practicar el método. En una realización, el kit contiene un primer recipiente que tiene la composición liofilizada del factor de crecimiento de queratinocitos y un segundo recipiente que tiene la solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición liofilizada. Preferentemente, el compuesto o la composición se envasan en una forma farmacéutica unitaria. El kit puede contener además un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con la vía específica de administración. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición del factor de crecimiento de queratinocitos.

Otros aspectos y detalles de la invención resultarán evidentes a partir de los ejemplos siguientes.

### 45 Ejemplo 1

#### Formulación líquida de KGF

50 La estabilidad, la vida útil y la bioactividad del producto son aspectos importantes para cualquier composición terapéuticamente eficaz. El diseño y la formulación de composiciones que sean estables cuando se almacenen a las temperaturas de almacenamiento recomendadas durante períodos prolongados pero que retengan una actividad biológica importante, son elementos clave para las composiciones farmacéuticas.

55 En experimentos anteriores, las formulaciones de KGF líquidas presentaron una agregación significativa y la consiguiente pérdida de proteína a temperaturas elevadas (37 °C). Para determinar el pH que proporciona la mayor estabilidad a las composiciones de KGF, se analizó el pH de la formulación líquida del factor de crecimiento de queratinocitos en un rango de pH de 3.0 a 9.0.

60 El KGF utilizado en los experimentos siguientes, por ejemplo los ejemplos 1 a 3, fue la molécula ΔN23 KGF. El pH de la solución se ajustó usando HCl o hidróxido de sodio concentrados. Se tomaron muestras de la formulación de KGF (0.5 mg/ml, tampón 10 mM, NaCl 0.1 M) a diferentes pH en los tiempos cero 0, 6 y 28 horas después de la incubación a 37 °C (Figura 1). El porcentaje de proteína recuperada se midió por SE-HPLC (Figura 1A) o por CE-HPLC (Figura 1B). Para la HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), se cargaron muestras (40 µg) en una columna G2000SWx1 (7.8 mm x 30 cm) conectada a un aparato HP 1090/1050. La proteína se eluyó utilizando

fosfato de sodio (NaP) 20 mM, cloruro de sodio 1 M, a pH 7.0. La proteína se monitoreó por absorbancia a 215 nm. Un pico monomérico indica que hay unos pocos agregados en la formulación de KGF.

5 La HPLC de intercambio catiónico (CE)-HPLC se realizó en un aparato HP 1090/1050 equipado con una columna Mono-S a temperatura ambiente. Se cargaron 40 µg de proteína KGF en la columna y se eluyeron utilizando tampón de fosfato de sodio 20 mM de pH 8.0, y un gradiente de sal (NaCl 1 M). La proteína eluida se monitoreó por absorbancia a 215 nm.

10 La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) se realizó en un aparato HP 1090/1050 utilizando una columna C4 de Vydac, (4.6 x 250 mm), tamaño de poro 300 Å. La proteína (30 µg) se inyectó en la columna y se eluyó utilizando un gradiente de acetonitrilo (ACN) con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) (v/v) y 90% de ACN, y 0.1% de TFA en agua (v/v). Los picos de la proteína se monitorearon por absorbancia a 215 nm.

15 Se observó la recuperación completa de la proteína en el tiempo 0 en todo el rango de pH de 5.0 a 9.0. Sin embargo, a pH 3.0 se observó pérdida total de la proteína y el pH 4.0 produjo aproximadamente un 80% de pérdida de la proteína debido a precipitación inmediata. Luego de 6 horas a 37 °C no se obtuvo proteína soluble de las muestras a pH 4.0. El porcentaje de proteína recuperada después de 28 horas a 37 °C cuando se formuló el KGF soluble a un pH de 5 a 9 fue menor de 20%. Sin embargo, a pH 7.0 sólo se perdió un 20% de la proteína total. La pérdida en proteína soluble después de 28 horas a 37 °C fue fundamentalmente debido a agregación.

20 Estos resultados indican que la proteína KGF en formulaciones líquidas es más estable a pH neutro, no obstante incluso en este rango de pH óptimo mantener KGF como un líquido da lugar a pérdidas significativas de proteína debido a agregación.

## 25 **Ejemplo 2**

### **Formulación de la composición de KGF para liofilización**

30 Para desarrollar una composición de KGF más estable, se decidió formular KGF como un producto liofilizado. Los intentos previos de formular una composición de KGF liofilizada implicaban una manipulación de la solución de reconstitución que dio lugar a una composición que produjo menos agregados de proteína dependiendo de la composición de la solución de reconstitución [Zhang et al., Pharm. Res. 12:1447-52 (1995)]. Sin embargo, en este estudio previo, cualquier agregación observada durante la reconstitución fue muy difícil o imposible de revertir.

35 Este ejemplo describe la liofilización de la proteína en una solución que evitará la agregación luego de la reconstitución independientemente de la solución de reconstitución, para eliminar la necesidad de una solución de reconstitución hecha a la medida.

40 Para determinar la composición de una formulación de liofilización estable, se liofilizó KGF, por ejemplo ΔN23 KGF, bajo diversas condiciones, alterando parámetros como el pH, el incrementador de volumen, la concentración de azúcar y la concentración de surfactante. Después se determinó la estabilidad en el almacenamiento a largo plazo de KGF a la temperatura de almacenamiento recomendada.

### **Ciclo de liofilización**

45 Para la liofilización, las muestras se cargaron en un liofilizador VirTis Genesis 12 EL a escala piloto (VirTis, Gardiner, N.Y.) que se enfrió previamente hasta una temperatura de cámara de aproximadamente 4 °C. Las muestras se congelaron rápidamente (aproximadamente 1 °C/minuto hasta -50 °C) y se mantuvieron a esa temperatura durante al menos 2 horas. Una vez que las muestras fueron colocadas en el liofilizado no, la temperatura de almacenamiento se redujo hasta -50 °C a una velocidad de aproximadamente 27 °C/hora. Las muestras se mantuvieron a -50 °C durante 2 horas para asegurar el congelamiento total. En un paso opcional para cristalizar manitol, la temperatura de almacenamiento se elevó hasta -25 °C a una velocidad de 10 °C/hora, se equilibró durante 2 a 3 horas, y después se enfrió hasta -55 °C a una velocidad de 9 °C/hora. Después de mantener durante al menos 2 horas más, se aplicó un vacío de aproximadamente 100 mTorr. La temperatura de almacenamiento se elevó hasta -35 °C para el secado primario, pero puede estar en el rango entre -45 °C y -10 °C. El secado primario se continuó durante 40 horas, pero puede estar en el rango entre 24 y 48 horas. La temperatura de almacenamiento se elevó después hasta un valor entre +20 °C y +25 °C a una velocidad de 5 °C/hora para el secado secundario, y el vacío se redujo hasta aproximadamente 50 mTorr. El secado secundario se llevó a cabo durante 36 horas, pero se puede realizar en un plazo entre 24 y 72 horas. Al culminar el secado secundario, las muestras se taponaron bajo vacío ( $\leq$  25 mTorr) y los viales se retiraron del liofilizador. Los viales se taparon con la cápsula metálica que se plegó sobre el recipiente y se colocaron a varias temperaturas para pruebas de estabilidad.

### **Efecto del pH sobre la estabilidad de KGF liofilizado**

65 Primero se evaluó la estabilidad de KGF en un rango de valores de pH. Se formuló KGF (5 mg/ml) en una solución que contenía histidina 10 mM, 3% de manitol, 2% de sacarosa y 0.01% de polisorbato 20 a pH 6.0, 6.5 pH o pH 7.0.

Una SE-HPLC de la muestra preliofilizada mostró un porcentaje del pico principal de 99%, que corresponde a 99% del principio activo monomérico.

5 Para realizar estudios de estabilidad acelerada, se transfirieron algunas muestras a estufas de incubación para el almacenamiento. Otras muestras se transfirieron a congeladores a -70 °C para que sirvieran como controles. El grueso de los viales se almacenó a 4 °C. En el momento del análisis las muestras se reconstituyeron con 1.2 mL de agua estéril para inyección (WFI).

10 La SE-HPLC de las muestras de KGF liofilizadas después del almacenamiento durante 6 meses a 45 °C mostró que el porcentaje del pico principal de las muestras a todos los pH probados era de aproximadamente 97.5%, lo que indica que en el rango de pH de 6.0 a 7.0 la composición de KGF liofilizada es estable después de 6 meses de almacenamiento a alta temperatura. Estos estudios también indicaron que el rango de pH de 5.0 a 8.0 proporcionó una proteína estable cuando la formulación se mantuvo a 4 °C.

15 **Efecto de la concentración de sacarosa sobre la estabilidad de KGF**

Para evaluar la cantidad de sacarosa que proporcionó la mayor estabilidad al KGF liofilizado, se formuló KGF humano recombinante (1 mg/mL) en una composición que contenía histidina 10 mM, 3% de manitol, a pH 7.0 en una solución sin sacarosa o con 2% de sacarosa (p/v). Las muestras se liofilizaron como se indicó antes y se dejaron en incubación hasta 3 meses a 45 °C.

20 La medición de SE-HPLC del porcentaje del pico principal de las formulaciones de KGF con y sin sacarosa indica que la adición de 2% de sacarosa proporciona una estabilidad considerable a la formulación KGF liofilizada. KGF liofilizado con 2% de sacarosa mostró aproximadamente 99.5% del pico principal inmediatamente después de la liofilización, y 98.5% tanto 1 mes como 3 meses después de la liofilización. Las formulaciones sin sacarosa presentaron aproximadamente 96% del pico principal, y aproximadamente 93.5% del pico principal 1 mes y 3 meses después de la liofilización, respectivamente.

30 Estos resultados indican que en las formulaciones sin sacarosa, el porcentaje del pico del monómero activo disminuye 7% después del almacenamiento durante 3 meses a 45 °C, en tanto que sólo hubo una pequeña disminución en el pico del monómero en la formulación que tenía sacarosa. Por lo tanto la sacarosa actúa como un potente estabilizante de KGF cuando se agrega a la formulación liofilizada.

35 Se realizaron otros análisis utilizando producto de la liofilización de KGF que contenía histidina 10 mM, pH 6.5, en un rango de concentraciones de sacarosa entre 1% y 3% de sacarosa, donde la solución siempre mantuvo la isotonicidad con el porcentaje de manitol adecuado. El producto de la liofilización que tenía de 1% a 3% de sacarosa y almacenado a 37 °C durante 1 año mostró una estabilidad de la proteína semejante a la de las formulaciones con 2% de sacarosa, manteniéndose el porcentaje del pico principal por encima de 99% en todas las formulaciones analizadas.

40 **Efectos de la concentración de polisorbato 20 sobre la estabilidad de KGF**

45 La concentración de polisorbato 20 en la formulación liofilizada de KGF se eligió basándose en su capacidad para eliminar la formación de partículas luego de la reconstitución. Se formuló KGF humano recombinante en una composición que contenía histidina 10 mM, 3% de manitol, 2% de sacarosa, a pH 7.0, y se liofilizó. Después el KGF se reconstituyó en una solución que contenía concentraciones variables de polisorbato 20. La torta liofilizada consistió en 5 mg/mL de KGF formulado como se indicó antes. La tabla 1 describe las observaciones registradas de la formulación liofilizada luego de la reconstitución.

50 Tabla 1

Diluyente en solución de reconstitución	Observaciones visuales luego de la reconstitución
0.1% de polisorbato 20	Transparente pero forma espuma
0.01% de polisorbato 20	Transparente
0.004% de polisorbato 20	Pocas partículas/en el límite
0.001% de polisorbato 20	Forma partículas
agua	Forma partículas

55 Otros estudios mostraron que la formulación con polisorbato 20 incluida en la torta antes de la liofilización era igualmente estable después de 4 meses a 45 °C cuando se la comparaba con la adición de polisorbato 20 en la solución de reconstitución. El análisis SE-HPLC [Biorad Biosil SEC 125 (7.8 mm x 30 cm), NaP 20 mM, pH 7.0, NaCl 1 M, 40 µg de carga de inyección] mostró que la pérdida de KGF monomérico fue despreciable para todas las concentraciones de polisorbato analizadas (como en la Tabla 1) en los meses 0, 1 y 4. Se eligió una concentración

de 0.01% (p/v) para la inclusión en la formulación basándose en su capacidad para eliminar invariablemente partículas visibles luego de la reconstitución.

### **Efecto de la concentración de manitol sobre la estabilidad de KGF**

El manitol y otros incrementadores del volumen se incluyen en las formulaciones para obtener un buen aspecto y una buena calidad de la torta. Además, ayudan a mantener la isotonicidad de la composición farmacéutica con el líquido fisiológico. Por ejemplo el líquido fisiológico tiene una osmolaridad de 290 a 320 mOsm. La concentración de manitol en la formulación de KGF final se ajustó para que fuera isoosmótica con el líquido fisiológico.

Para evaluar el porcentaje de concentración de manitol que proporciona estabilidad de la proteína en la formulación de liofilización, se liofilizó KGF a una concentración de 3 mg/mL en una formulación que contenía histidina 10 mM, 2% de sacarosa y 0.01% de polisorbato 20 a pH 7.0 y 3% de manitol o 4% de manitol. Las formulaciones de KGF se liofilizaron y se almacenaron durante 1 año a 4 °C. Se midió la osmolaridad utilizando un osmómetro Modelo 3D 3 de Advanced Instruments (Norwood, MA). La osmolaridad medida para la solución con 4% de manitol fue de 312 mOsm mientras que la formulación con 3% de manitol resultó en una solución de 250 mOsm.

La figura 2 muestra una superposición de los cromatogramas (RP-HPLC) de fase reversa de la formulación isotónica con 4% de manitol/2% de sacarosa en comparación con la formulación ligeramente hipotónica con 3% de manitol/2% de sacarosa tomados en el tiempo cero (Figura 2A) o después de 1 año de almacenamiento a 4 °C (Figura 2B). Los resultados demuestran que la formulación isoosmótica es estable después de un año a la temperatura de almacenamiento recomendada de 2 °C a 8 °C. Además, el aspecto de la torta para la formulación isoosmótica también fue bueno y su contenido de humedad fue menor de 2%. Basándose en este estudio, se recomendó el uso de 4% de manitol en la formulación liofilizada.

### **Efecto de la concentración de proteína sobre la estabilidad de rHuKGF**

La concentración de proteína en la muestra liofilizada también puede tener un efecto sobre la estabilidad de la calidad de liofilización de la proteína así como sobre la estabilidad del producto reconstituido.

El efecto de la concentración de KGF sobre la estabilidad se exploró a 0.5, 1, 2, 3 y 5 mg/mL. Las muestras se formularon y liofilizaron en histidina 10 mM, 3% de manitol, 2% de sacarosa y 0.005% de polisorbato 20, a pH 6.5. Las muestras liofilizadas se almacenaron durante 24 semanas a 45 °C antes de su reconstitución. Se controló la degradación de proteínas por SE-HPLC, RP-HPLC, CE-HPLC y SDS-PAGE. Para este experimento, se realizó una SE-HPLC como se indicó antes utilizando el sistema HP y una columna G2000SWx1.

La figura 3 representa el porcentaje del pico principal como una función de la concentración de proteína de un análisis SE-HPLC de KGF después del almacenamiento durante 24 semanas a 45 °C. La línea discontinua representa una línea de tendencia para los datos medidos. Basándose en los datos de SE-HPLC, la estabilidad aumentó a medida que aumentó la concentración de KGF, al menos hasta una concentración de 5 mg/mL. La dependencia del porcentaje del pico principal de las concentraciones de proteína según lo determinado por RP-HPLC y CE-HPLC es similar a la que se observa con SE-HPLC. Otros estudios indicaron que una concentración de proteína de 15 mg/mL también produjo formulaciones liofilizadas estables.

Una formulación de liofilización de KGF optimizada que contenía histidina 10 mM, 0.01% de polisorbato 20, 2% de sacarosa y 3% de manitol a pH 6.5 se almacenó durante 4 años entre 2 °C y 8 °C. Luego de la reconstitución, se demostró que la formulación de KGF mantenía la actividad según se analiza a continuación, lo que indica que la composición particular mantuvo el tipo de estabilidad y la actividad necesarias para una composición farmacéutica terapéuticamente eficaz.

### **Ejemplo 3**

#### **Bioensayo de la formulación de KGF reconstituida**

Uno de los factores en la formulación de un producto farmacéuticamente eficaz es el requisito de una elevada actividad biológica de la proteína de interés.

La bioactividad de las formulaciones de KGF, por ejemplo,  $\Delta$ N23 KGF, se analizó utilizando células del clon 16 de 32D KECA, que son linfoblastos murinos dependientes de IL-3 que proliferan en presencia de KGF, similares a las células del clon 3 de 32D (ATCC # CRL-11346) y son un sistema de ensayo de proliferación útil, como se describe en Hsu et al., 1999 Biochemistry, 38, 2523-2534.

Las células del clon 16 de 32D se mantienen en medio de crecimiento [RPMI, suero fetal bovino (10%) (Hyclone, Logan, UT), glutamina (1%) (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), geneticina (2%) (Gibco) y IL-3 murina (12 ng/mL) (Bisource International, Camarillo, CA)] a 37 °C y 5.5% de CO<sub>2</sub>. Las formulaciones de KGF de muestra o estándar de referencia ( $\Delta$ N23 KGF almacenado liofilizado a -70 °C) se reconstituyeron en medio de ensayo [RPMI, FBS (6%),

glutamina (1%), heparina (0.6 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO)] hasta aproximadamente 25 ng/mL. Luego se realizaron diluciones seriadas para obtener un rango de concentraciones desde aproximadamente 25 ng/mL hasta 1.6 ng/mL.

5 Para analizar la bioactividad de la formulación de KGF, se distribuyeron en placas células del clon 16 de 32D en 150 µL a una concentración de  $2.0 \times 10^5$  células/ml. Se añadieron el estándar de referencia, el control y las muestras de prueba de KGF en la concentración deseada a los pocillos de muestra en un volumen de 50 µL. Las placas de células y de muestra se incubaron aproximadamente 24 horas a 37 °C y 5.5% de CO<sub>2</sub>. El día 2, se agregaron 40 µL de azul de alamar (AccuMed International, Chicago, IL) a los pocillos y se mezcló. Las placas se incubaron durante otras 24 horas a 37 °C y 5.5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas, se midió la fluorescencia en un lector de fluorescencia  
10 (Cytofluor II o Cytofluor serie 4000, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) a una longitud de onda de excitación de 530-560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

15 Las formulaciones de KGF liofilizadas de 3 lotes reconstituidos almacenados entre 2 °C y 8 °C durante 7 días mostraron una bioactividad similar a la de la proteína KGF estándar de referencia (almacenada liofilizada a -70 °C), exhibiendo  $\geq 100\%$  de bioactividad el día 0 y 92%, 100% y 107% de actividad, respectivamente, el día 7. Las formulaciones de KGF almacenadas a 25 °C mostraron una bioactividad  $\geq 100\%$  en el tiempo 0, que disminuyó ligeramente después de 4 horas a 90%, 95% y 100% de bioactividad, respectivamente, en comparación con el KGF nativo. Este nivel de actividad también se mantuvo después del almacenamiento de la formulación de KGF reconstituida a 25 °C durante 24 horas, lo que indica la estabilidad de las formulaciones de KGF.  
20

Estos resultados indican que las formulaciones de KGF reconstituidas descritas en este documento son tan potentes como la proteína KGF estándar de referencia y la formulación no tiene efectos perjudiciales sobre la estabilidad o la potencia de KGF, por ejemplo,  $\Delta N23KGF$ , y por lo tanto son útiles como productos terapéuticos en el tratamiento de individuos para promover la multiplicación de células epiteliales y análogas.  
25

Además, la bioactividad de KGF se puede evaluar mediante la capacidad de las formulaciones reconstituidas para promover la multiplicación de células Balb/C-MK. Se cultivaron y mantuvieron cultivos de reserva de células Balb/MK en medio de Eagle modificado de Dulbecco con bajo contenido de calcio complementado con 10% de suero fetal bovino, 0.25 µg/mL de fungizona y 10 ng/mL de aPGF. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> con 99% de humedad. Para el ensayo de bioactividad las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pocillo en 1 mL de medio como se describe en Gospodarowicz et al. [J. Cell. Physiol. 142:325-333 (1990)]. Se agregó una cantidad predeterminada de formulación de KGF al pocillo de cultivo celular. Se usó FGF como control positivo.  
30

35 Luego de 5 días en cultivo, las células se tripsinizaron y se determinó la densidad celular final utilizando un contador de células. Las células se liberaron de las placas reemplazando el medio de cultivo con una solución que contenía 0.9% de NaCl, fosfato de sodio 0.01 M (pH 7.4), 0.05% de tripsina y 0.02% de EDTA (STV), después se incubaron durante 5 a 10 minutos a 37 °C, y después se agregó a las células el medio de cultivo de reserva.

40 Un aumento en la población de células Balb/C-MK en la muestra tratada con KGF en comparación con la muestra de células sin tratar muestra que la composición de KGF no pierde su bioactividad durante el proceso de formulación e indica que la formulación de KGF proporciona un agente terapéutico eficaz para tratar sujetos que necesitan una mayor actividad de KGF.

45 Se espera que a los expertos en el tema les surjan numerosas modificaciones y variaciones de la invención respecto a lo estipulado en los ejemplos ilustrativos anteriores. En consecuencia sólo se deben considerar las limitaciones a la invención que aparecen en las reivindicaciones adjuntas.

**Listado De Secuencias**

<110> AMGEN INC.

5 <120> Formulaciones terapéuticas del factor de crecimiento de queratinocitos

<130> 01017/40453

<160> 3

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3853

15 <212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

20 <222> (446)..(1030)

<400> 1

```

acgcgctcac acacagagag aaaatccttc tgcctgttga tttatggaaa caattatgat      60
tctgctggag aacttttcag ctgagaaata gttttagct acagtagaaa ggctcaagtt      120
gcaccaggca gacaacagac atggaattct tatatatcca gctgttagca acaaaacaaa      180
agtcaaatag caaacagcgt cacagcaact gaacttacta cgaactgttt ttatgaggat      240
ttatcaacag agttatntaa ggaggaatcc tgtgttgta tcaggaacta aaaggataag      300
gctaacaatt tggaagagc aactactctt tcttaaatca atctacaatt cacagatagg      360
aagaggtcaa tgacctagga gtaacaatca actcaagatt cttttcatt 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

ggg 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

```

25

ES 2 504 441 T3

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	
accagttcc agcagggaga tttctttaag tggactgttt tctttcttct caaaattttc	1110
tttcctttta ttttttagta atcaagaaag gctggaaaaa ctactgaaaa actgatcaag	1170
ctggacttgt gcatttatgt ttgttttaag aactgacatt aaagaaagat ttgaaaagta	1230
tacacaaaaa tcagatttag taactaaagg ttgtaaaaaa ttgtaaaact ggttgtacaa	1290
tcatgatggt agtaacagta attttttct taaattaatt tacccttaag agtatgtag	1350
atttgattat ctgataatga ttatttaaatt attcctatct gcttataaaa tggctgctat	1410
aataataata atacagatgt tgttatataa ggtatatcag acctacaggc ttctggcagg	1470
atttgtcaga taatcaagcc aactaacta tggaaaaatga gcagcatttt aaatgctttc	1530
tagtgaaaaa ttataatcta cttaaactct aatcagaaaa aaaatttctca aaaaaactat	1590
tatgaaagtc aataaaatag ataatttaac aaaagtacag gattagaaca tgcttatacc	1650
tataaataag aacaaaattt ctaatgctgc tcaagtggaa agggatttgc taaaaggatg	1710
ttccaaaaa tcttgatat aagatagcaa cagtgattga tgataaact gtacttcac	1770
ttacttgcca caaataaca tttataaat cctcaaagta aaattgagaa atctttaagt	1830
ttttttcaag taacataatc tatctttgta taattcatat ttgggaatat ggcttttaatt	1890
aatgttcttc ccacaaataa tcatgctttt ttcctatggt tacagcatta aactctattt	1950
taagttgttt ttgaaactta ttgttttggt atttaagttt atgttattta taaaaaaaa	2010
accttaataa gctgtatctg tttcatatgc ttttaatttt aaaggaataa caaaactgtc	2070
tggctcaacg gcaagtttcc ctccctttc tgactgacac taagtctagc acacagcact	2130
tgggccagca aatcctggaa gcagacaaaa ataagagcct gaagcaatgc ttacaataga	2190
tgtctcacac agaacaatac aaatatgtaa aaactctttc accacatatt cttgccaatt	2250
aattggatca tataagtaaa atcattacaa atataagtat ttacaggatt ttaaagttag	2310
aatatatttg aatgcatggg tagaaaatat catattttta aactatgtat atttaaattt	2370
agtaattttc taatctctag aaatctctgc tgttcaaaaag gtggcagcac tgaaagttgt	2430

ES 2 504 441 T3

tttcctgtta gatggcaaga gcacaatgcc caaaatagaa gatgcagtta agaataaggg 2490  
 gccctgaatg tcatgaaggc ttgaggtcag cctacagata acaggattat tacaaggatg 2550  
 aatttcact tcaaaagtct ttcattggca gatcttgga gcactttata tgttcaccaa 2610  
 tgggaggtca atatttatct aatttaaaag gtagtctaac cactgtgggtt ttaattcaa 2670  
 aatatttgtc attcaagtcc ctttacataa atagtatttg gtaatacatt tatagatgag 2730  
 agttatatga aaaggctagg tcaacaaaaa caatagattc atttaatttt cctgtgggtg 2790  
 acctatacga ccaggatgta gaaaactaga aagaactgcc cttcctcaga tatactcttg 2850  
 ggagagagca tgaatggtat tctgaactat cacctgattc aaggactttg cttagctagg 2910  
 tttgaggtca ggcttcagta actgtagtct tgtgagcata ttgagggcag aggaggactt 2970  
 agtttttcat atgtgtttcc ttagtgccta gcagactatc tgttcataat cagttttcag 3030  
 tgtgaattca ctgaatgttt atagacaaaa gaaaatacac actaaaacta atcttcattt 3090  
 taaaagggtg aaacatgact atacagaaat ttaaatagaa atagtgtata tacatataaa 3150  
 atacaagcta tgttaggacc aaatgctctt tgtctatgga gttatacttc catcaaatta 3210  
 catagcaatg ctgaattagg caaaaccaac atttagtggt aaatccattc ctggtagtat 3270  
 aagtcaccta aaaaagactt ctagaaatat gtactttaat tatttgtttt tctcctattt 3330  
 ttaaatttat tatgcaaatt ttagaaaata aaatttgctc tagttacaca cttttagaat 3390  
 tctagaatat taaaactgta aggggcctcc atccctctta ctcatgtgta gtctaggaaa 3450  
 ttgagatttt gatacaccta aggtcacgca gctgggtaga tatacagctg tcacaagagt 3510  
 ctagatcagt tagcacatgc tttctactct tcgattatta gtattattag ctaatggtct 3570  
 ttggcatggt tttgtttttt atttctgttg agatatagcc tttacatttg tacacaaatg 3630  
 tgactatgtc ttggcaatgc acttcataca caatgactaa tctatactgt gatgatttga 3690  
 ctcaaaagga gaaaagaaat tatgtagttt tcaattctga ttcctattca cttttgttt 3750  
 atgaatggaa agctttgtgc aaaatataca tataagcaga gtaagccttt taaaaatggt 3810  
 ctttgaaaga taaaattaaa tacatgagtt tctaacaatt aga 3853

<210> 2  
 <211> 194  
 5 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<220>  
 10 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1)..(31)  
 <223> péptido señal

<400> 2

ES 2 504 441 T3

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

- 5 <210> 3
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

- 10 <400> 3

ES 2 504 441 T3

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

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición liofilizada del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) que consiste en:

- 5
- KGF en una concentración entre 3 mg/mL y 15 mg/mL;
  - el tampón de histidina;
  - el incrementador del volumen manitol en una concentración entre 2% y 5% p/v;
  - sacarosa en una concentración entre 1% y 3% p/v;
  - polisorbato 20 en una concentración en el rango entre 0.004% y 0.1% p/v; y donde el pH se encuentra en el
- 10
- rango entre 6.0 y 8.0.

2. La composición de la reivindicación 1, en la cual el KGF se elige del grupo que consiste en SEC. ID N°: 2 y SEC. ID N°: 3.

15

3. La composición de la reivindicación 1, en la cual el KGF consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 2.

20

4. La composición de la reivindicación 1, en la cual el KGF consiste en  $\Delta$ N23 KGF indicado en SEC. ID N°: 3.

5. La composición de la reivindicación 1, en la cual el manitol está en una concentración de 4% p/v.

6. La composición de la reivindicación 1, en la cual la sacarosa está en una concentración de 2% p/v.

25

7. La composición de la reivindicación 1, en la cual el pH está en el rango de 6.0 a 7.0.

8. La composición de la reivindicación 7, en la cual el pH es 6.5.

30

9. La composición de la reivindicación 1, en la cual la concentración de polisorbato 20 es de 0.01% p/v.

10. La composición de la reivindicación 1, en la cual la concentración de KGF es de 5 mg/mL.

35

11. La composición liofilizada de KGF de la reivindicación 1 que contiene histidina 10 mM, 4% p/v de manitol, 2% p/v de sacarosa y 0.01% p/v de polisorbato 20, donde la composición tiene un pH de 6.5.

12. Un método para preparar una composición liofilizada de KGF de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende los pasos de:

- 40
- a) preparar una solución de KGF a una concentración entre 3 mg/mL y 15 mg/mL; tampón de histidina; manitol a una concentración entre 2% y 5% p/v; sacarosa a una concentración entre 1% y 3% p/v; polisorbato 20 a una concentración en un rango entre 0.004% y 0.1% p/v, en la cual el pH está dentro del rango de 6.0 a 8.0; y
  - b) liofilizar dicha solución de KGF para obtener dicha composición liofilizada de KGF.

45

13. El método de la reivindicación 12, donde el KGF se elige del grupo que consiste en SEC. ID N°: 2 y SEC. ID N°: 3.

14. El método de la reivindicación 12, donde el KGF consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC. ID N°: 2.

50

15. El método de la reivindicación 12, donde el KGF consiste en  $\Delta$ N23 KGF indicado en SEC. ID N°: 3.

55

16. El uso de una composición liofilizada de KGF de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la toxicidad intestinal; la mucositis; una quemadura u otras lesiones de espesor parcial y total; la repoblación de folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas; la proliferación de estructura anexas; la epidermólisis ampollosa; la alopecia inducida por quimioterapia; la calvicie hipocrática; las úlceras gástricas; las úlceras duodenales; la gastritis erosiva, la esofagitis o el reflujo esofágico; la enfermedad inflamatoria intestinal; la enfermedad de la membrana hialina; las lesiones por inhalación de humo; el enfisema; la cirrosis hepática, la insuficiencia hepática, la hepatitis viral aguda, otras agresiones tóxicas para el hígado; o la enfermedad injerto contra huésped (EICH), mediante el aumento de la estimulación mediada por KGF de la multiplicación de células epiteliales.

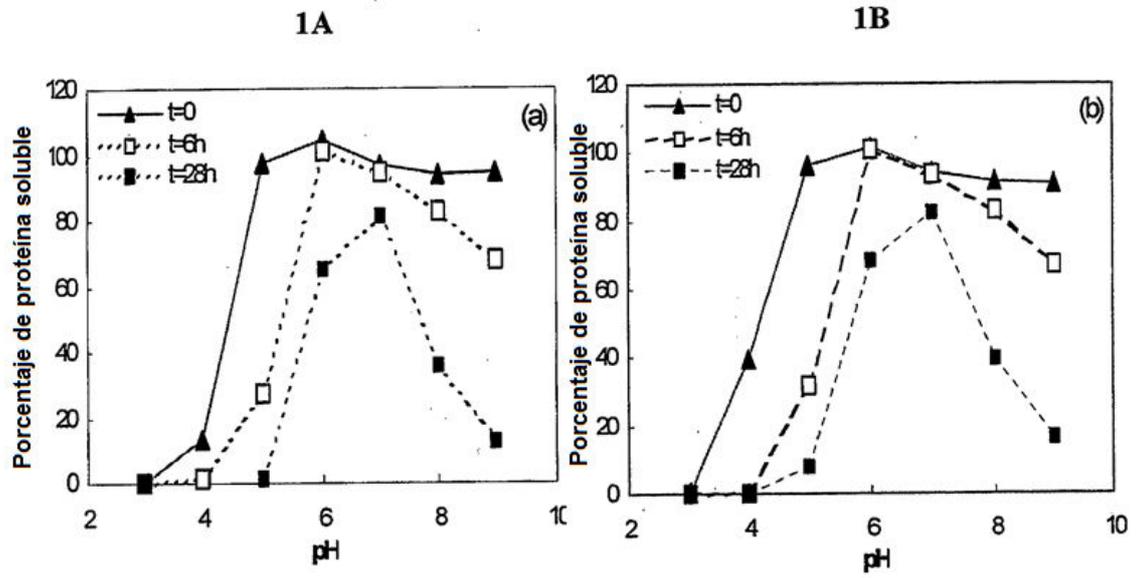
60

17. La composición liofilizada de KGF de la reivindicación 1, para usar en el tratamiento de la toxicidad intestinal; la mucositis; una quemadura u otras lesiones de espesor parcial y total; la repoblación de folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas; la proliferación de estructura anexas; la epidermólisis ampollosa; la alopecia inducida por quimioterapia; la calvicie hipocrática; las úlceras gástricas; las úlceras duodenales; la gastritis erosiva, la esofagitis o el reflujo esofágico; la enfermedad inflamatoria intestinal; la enfermedad de la membrana hialina; las lesiones por inhalación de humo; el enfisema; la cirrosis hepática, la insuficiencia hepática, la hepatitis viral aguda,

65

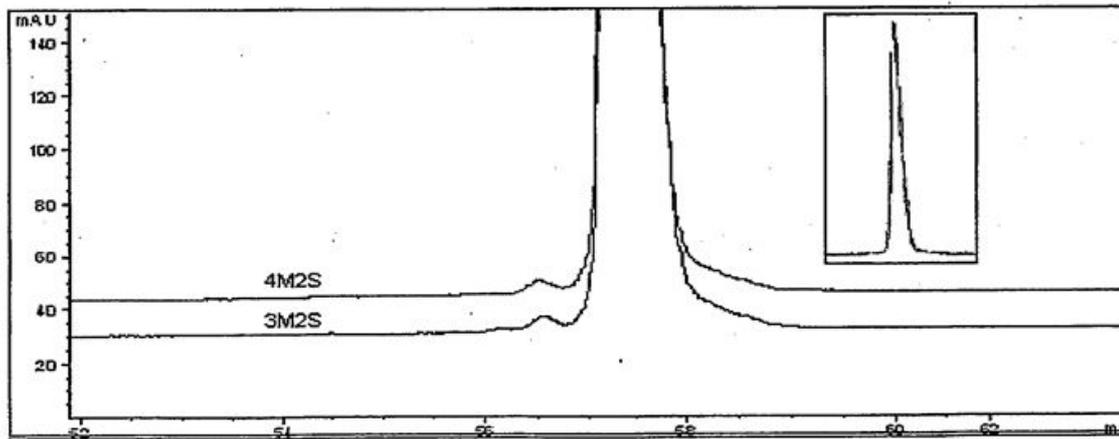
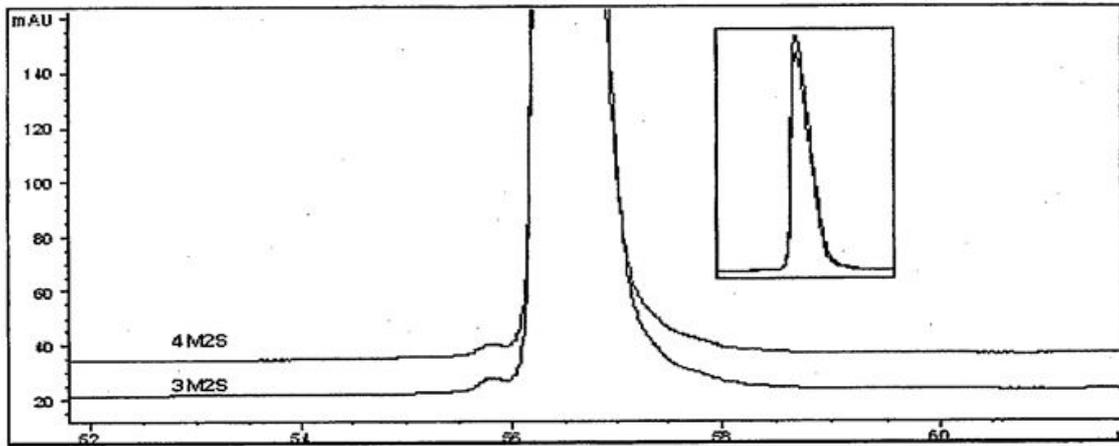
otras agresiones tóxicas para el hígado; o la enfermedad injerto contra huésped (EICH), mediante el aumento de la estimulación mediada por KGF de la proliferación de células epiteliales.

FIGURA 1



**FIGURA 2**

**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

FIGURA 3

