

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393218 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.28

(22) Дата подачи заявки
2022.05.13

(51) Int. Cl. *A61K 38/18* (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ ФАКТОРА РОСТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ ГЛАЗ

(31) 63/188,816

(32) 2021.05.14

(33) US

(86) PCT/US2022/072302

(87) WO 2022/241465 2022.11.17

(71) Заявитель:
КЛАРИС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Брила Петр, Орт Сьюзан К.,
Этвелл Э. Кларк (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим фактор роста, и к способам лечения или профилактики болезней глаз, используя фактор роста и его композиции.

A1

202393218

202393218

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579602EA/061

КОМПОЗИЦИИ ФАКТОРА РОСТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ ГЛАЗ

ПРИТЯЗАНИЕ НА ПРИОРИТЕТ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/188816, поданной 14 мая 2021 г. Полное содержание упомянутых выше заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, поданных в электронном виде, предоставленных в виде текстового файла ASCII с именем «Sequence_Listing.txt». Размер текстового файла ASCII, созданного 10 мая 2022 г., составляет 171 килобайт. Материал текстового файла ASCII в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим фактор роста, и к способам лечения или профилактики болезней глаз, используя фактор роста и его композиции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Фактор роста гепатоцитов (Hepatocyte Growth Factor - HGF) был исследован для лечения помутнения или рубцевания роговицы глаза. См. патент США № 10449234. Были определены и другие травмы и болезни глаз, при которых могут помочь новые виды лечения. Например, нейротрофический кератит (также известный как нейротрофическая кератопатия (НТК) или нейропаралитический кератит) представляет собой болезнь роговицы, возникающую в результате повреждения тройничного нерва или его пути к роговице либо в результате нарушения поверхности глаза, что приводит к последующему снижению или потере чувствительности роговицы. НТК впервые был признан как заболевание роговицы Magendie в 1824 г. (Okada et al., 2010, *Histol Histopathol*, 25:771-780), и его молекулярную основу впоследствии установили на животной модели Sigelman и Friedenwald в 1954 г. (Sigelman and Friedenwald, 1954, *Arch Ophthalmol*, 53:46-57). Роговица представляет собой прозрачное «окно» глаза и вместе со склерой образует внешнюю оболочку глазного яблока. Поскольку в роговице нет сосудов, питательные вещества и кислород поступают в эти ткани преимущественно со слезной жидкостью, а также спереди через лимбальные сосуды и сзади через внутриглазную жидкость. Ткань роговицы состоит из пяти слоев: эпителия, боуменовой мембраны, стромы, десцеметовой мембраны и эндотелия, причем эпителий служит в качестве основного барьера, который защищает расположенную под ним строму роговицы. Роговица является наиболее чувствительной тканью организма, иннервируемой обширной сеткой нервных волокон в различных слоях и плотными нервными окончаниями. Сенсорная иннервация роговицы происходит из глазной ветви тройничного нерва, где вырабатываются факторы роста, необходимые для выживания эпителия. Тройничный нерв поддерживает стабильность

слезной пленки и вместе с различными физиологически активными веществами, выделяемыми эпителием (например, цитокинами, протеазами и нейропептидами), дополнительно обеспечивает жизнеспособность эпителия и стромы роговицы. Нарушение тройничного нерва или эпителия наиболее часто происходит вследствие инфекций (например, инфекций простого герпеса или опоясывающего герпеса), операций на глазах (например, операции по удалению катаракты, трансплантации роговицы, рефракционной хирургии), других системных заболеваний, таких как диабет, проказа, опухоли или воспаления глазницы, или физических травм, включая химические и термические ожоги, а также ношения контактных линз.

Соответственно, существует постоянная потребность в новых способах лечения болезней глаз, таких как НТК, а также в новых фармацевтических составах, которые можно вводить в глаз. Способы, описанные в настоящем документе, были разработаны с этой целью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены способы лечения или профилактики нейротрофического кератита у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту фактора роста, такого как фактор роста гепатоцитов (HGF) или фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor - FGF).

В настоящем изобретении дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие HGF или FGF, для лечения болезней глаз.

В настоящем изобретении предложены способы лечения или профилактики нейротрофического кератита у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фактора роста гепатоцитов (HGF) или фактора роста фибробластов (FGF), например, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF является очищенным.

В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF вводят в комбинации со вспомогательным веществом, проникающим в строму роговицы.

В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF изготовлены в виде жидкой фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF вводят в глаз. В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF местно вводят в глаз. В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF вводят в глаз путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF вводят субконъюнктивально. В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF вводят интракамерально.

В некоторых вариантах осуществления жидкая фармацевтическая композиция содержит HGF или FGF в концентрации от около 0,01% (масс./об.) до около 1,0% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления жидкая фармацевтическая композиция содержит HGF или FGF в концентрации от около 0,08% (масс./об.) до около 0,25% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления жидкая фармацевтическая композиция

содержит HGF или FGF в концентрации около 0,1% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления жидкая фармацевтическая композиция содержит HGF или FGF в концентрации около 0,2% (масс./об.).

В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF вводят в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой дополнительный фактор роста.

В некоторых вариантах осуществления HGF содержит полипептидную последовательность, имеющую любой из SEQ ID NOS: 1-27. В некоторых вариантах осуществления HGF содержит полипептидную последовательность, которая на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления HGF содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1.

Также в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие: от около 0,01% до около 1,0% (масс./об.) HGF; буфер, который может поддерживать pH композиции от около 5,8 до около 6,2; от около 100 до около 300 мМ стабилизатора, выбранного из трегалозы, пролина, сорбита и их смеси; необязательно модификатор тоничности, который может обеспечить осмоляльность композиции от около 250 мОсм/кг H₂O до около 500 мОсм/кг H₂O; и необязательно поверхностно-активное вещество.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от около 0,05% до около 0,5% (масс./об.) HGF. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от около 0,08% до около 0,25% (масс./об.) HGF. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит около 0,1% (масс./об.) HGF. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит около 0,2% (масс./об.) HGF.

В некоторых вариантах осуществления композиция имеет pH около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от около 150 до около 250 мМ стабилизатора. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит около 200 мМ стабилизатора. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой трегалозу или пролин. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой трегалозу. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой пролин. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой сорбит.

В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой цитратный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой цитрат натрия. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от около 10 до около 50 мМ буфера.

В некоторых вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит

модификатор тоничности. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит модификатор тоничности, который представляет собой соль щелочного металла. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит модификатор тоничности, который представляет собой хлорид натрия.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из полисорбата 80 (PS80), полаксомера 188 и полаксомера 407. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 (PS80). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в количестве от около 0,01% до около 0,1% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в количестве от около 0,02% до около 0,8% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в количестве около 0,05% (масс./об.).

Также в настоящем документе предложены водные фармацевтические композиции, содержащие: около 0,1% (масс./об.) HGF; около 20 мМ цитрата натрия; около 200 мМ трегалозы, пролина или сорбита; около 0,05% (масс./об.) поверхностно-активного вещества; причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит: около 0,1% (масс./об.) HGF; около 20 мМ цитрата натрия; около 200 мМ трегалозы; около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80); причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит: около 0,1% (масс./об.) HGF; около 20 мМ цитрата натрия; около 200 мМ пролина; около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80); причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит: около 0,1% (масс./об.) HGF; около 20 мМ цитрата натрия; около 200 мМ сорбита; около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80); причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит: около 0,2% (масс./об.) HGF; около 20 мМ цитрата натрия; около 200 мМ трегалозы, пролина или сорбита;

около 0,05% (масс./об.) поверхностно-активного вещества; причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит: около 0,2% (масс./об.) HGF; около 20 мМ цитрата натрия; около 200 мМ трегалозы; около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80); причем pH композиции

составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит: около 0,2% (масс./об.) HGF; около 20 мМ цитрата натрия; около 200 мМ пролина; около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80); причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит: около 0,2% (масс./об.) HGF; около 20 мМ цитрата натрия; около 200 мМ сорбита; около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80); причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления HGF содержит полипептидную последовательность любой из SEQ ID NOS: 1-27. В некоторых вариантах осуществления HGF содержит полипептидную последовательность, которая на 95% идентична последовательности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления HGF содержит полипептидную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 1.

Также в настоящем изобретении предложены способы лечения или предотвращения болезни глаз у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления болезнь глаз представляет собой заболевание роговицы, выбранное из нейротрофического кератита, персистирующего дефекта роговицы, язвы роговицы, синдрома сухого глаза, микробного кератита, бактериального кератита, вирусного кератита, грибкового кератита, химического ожога, термического ожога, механической травмы, эрозии роговицы, нарушения эндотелия, буллезной кератопатии, дистрофии роговицы Фукса, рубца роговицы, синдрома Сьогрена или послеоперационных осложнений. В некоторых вариантах осуществления болезнь глаз представляет собой помутнение или рубцевание роговицы. В некоторых вариантах осуществления болезнь глаз представляет собой нейротрофический кератит. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в комбинации со вспомогательным веществом, проникающим в строму роговицы.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в глаз. В некоторых вариантах осуществления композицию местно вводят в глаз. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в глаз путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субконъюнктивально. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят интракамерально.

В некоторых вариантах осуществления способов или композиций, описанных в настоящем документе, HGF представляет собой активированный HGF. В некоторых вариантах осуществления активированный HGF представляет собой активированный dHGF.

В некоторых вариантах осуществления способов или композиций, описанных в настоящем документе, HGF содержит:

(v) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 26; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 26, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 26; или

(w) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 27; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 27, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления способов или композиций, описанных в настоящем документе, HGF содержит:

(a) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 2; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 2, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 2; или

(b) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 7; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 7, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 7; или

(c) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 8; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 8, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 8; или

(d) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 9; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 9, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 9; или

(e) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 10; и второй

первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 23; или

(t) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 24; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 24, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 24; или

(u) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 25; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 25, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 25; или

(v) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 26; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 26, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 26; или

(w) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 27; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 27, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления способов или композиций, описанных в настоящем документе, первый полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, а второй полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления способов или композиций, описанных в настоящем документе, N-концевая аминокислота первого полипептида представляет собой пирролидонкарбоновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления способов или композиций, описанных в настоящем документе, первый полипептид и второй полипептид соединены посредством одной или большего количества дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления способов или композиций, описанных в настоящем документе, HGF способен связываться с с-MET и/или активировать путь МАРК в эпителиальных клетках.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Изображения флуоресцентной микроскопии предметных стекол, содержащих серийные срезы зрительного нерва мыши, для оценки иннервации роговицы на день 3 после операции. Образцы ткани окрашивали на TUJ-1 (также известный как бета-III тубулин, обведенные кружками области) для оценки иннервации роговицы. Животные, которым вводили контроль (PBS), демонстрировали потенциально более низкую степень окрашивания на TUJ-1 (обведенные кружками области) на день 3 по сравнению с глазами, обработанными 0,1% dHGF (SEQ ID. NO. 1); DAPI использовали в качестве контрастного красителя, чтобы выделить все ядра.

Фиг. 2. Анализ времени до закрытия на окрашенной флуоресцеином поверхности роговицы у животных после операции и ежедневного лечения с помощью PBS (контрольный носитель), 0,1% или 0,2% dHGF, 0,1% mNGF или 0,1% mHGF в исследовании фазы 1 на мышинной модели механического повреждения роговицы.

Фиг. 3А. Анализ изображений светлого поля средней площади рубцевания (в пикселях), измеренной на поверхности роговицы животных, получавших лечение с помощью PBS (контроль), 0,1% dHGF или 0,2% dHGF, на день 7 после операции в мышинной модели механического повреждения роговицы.

Фиг. 3В. Анализ изображений светлого поля среднего уменьшения площади рубцевания (в пикселях), измеренной на поверхности роговицы животных, получавших лечение с помощью PBS (контроль), 0,1% mNGF или 0,1% mHGF, на день 7 после операции в мышинной модели механического повреждения роговицы.

Фиг. 4. Средний процент, стандартная погрешность измерения (standard error of measurement - SEM) и статистическое сравнение уменьшения рубца за период с дня 8 по день 21 у животных, получавших лечение с помощью PBS (контроль), dHGF (0,1% и 0,2%), mHGF и mNGF, в мышинной модели механического повреждения роговицы.

Фиг. 5. Процент изменения размера рубца на 9 день у животных, обработанных PBS (контроль), dHGF (0,1% и 0,2%) или mNGF, в мышинной модели кератита роговицы, вызванного LPS *E. coli*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен, *среди прочего*, способ лечения или профилактики нейротрофического кератита (НТК) у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту фактора роста гепатоцитов (HGF) или фактора роста фибробластов (FGF).

Нейротрофический кератит или, альтернативно, нейротрофическая кератопатия (НТК) представляет собой дегенеративное состояние роговицы, возникающее в результате повреждения тройничного нерва или его ветвей либо в результате нарушения поверхности глаза, что приводит к последующему снижению или полной потере чувствительности роговицы. В контексте настоящего документа термины «болезнь», «состояние» или «нарушение», используемые взаимозаменяемо, относятся к любому из многочисленных патологических состояний пораженной ткани или органа. Нарушение тройничного нерва или его ветвей наиболее часто происходит вследствие инфекций (например, вирусных

инфекций, включая инфекции простого герпеса или опоясывающего герпеса, бактериальных язв, поздних язв, вызванных акантамебами), операций на глазах (например, операции по удалению катаракты, трансплантации роговицы, рефракционной хирургии и операции на сетчатке), других системных заболеваний, таких как диабет, проказа, опухоли и воспаления глазницы, паралич тройничного нерва вследствие повреждения тройничного нерва в задней черепной ямке, аневризма, акустическая неврома, менингиома, или других физических травм слоев роговицы вследствие химических и термических ожогов. Другие причины НТК включают в себя генетические заболевания (например, семейная гипестезия роговицы, синдром Гольденхара, наследственная сенсорная и вегетативная нейропатия типа III, IV или V, дистрофии роговицы и множественная эндокринная неоплазия IIb), использование определенных лекарственных препаратов (например, местные бета-блокаторы, местные нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), местные анестетики) и ношение контактных линз (обзор см. в Okada et al. *выше*).

Лечение или профилактику НТК можно осуществлять способами, описанными в настоящем документе, путем введения фактора роста гепатоцитов (HGF) и/или фактора роста фибробластов (FGF).

HGF (например, UniProt ID No. P14210) представляет собой агонист cMet киназы, который, *среди прочего*, стимулирует пролиферацию, подвижность, морфогенез и ангиогенез эпителиальных клеток в различных органах посредством сигнального пути тирозинкиназы и играет важную роль в развитии эмбриональных органов и регенерации органов у взрослых, а также в заживлении ран. HGF представляет собой белок массой приблизительно 84 кДа, содержащий две субъединицы: α -субъединицу с кажущейся молекулярной массой 69 кДа и β -субъединицу с кажущейся молекулярной массой 34 кДа, связанные посредством одной дисульфидной связи.

HGF вырабатывается как молекула про-HGF из 728 аминокислот мезенхимальными стромальными клетками (например, фибробластами и макрофагами), причем первые аминокислотные остатки 1-31 соответствуют сигнальной последовательности секреции (Matsumoto and Nakamura, *in Encyclopedia of Endocrine Diseases*, Elsevier, 2004, 436-442). Первичная аминокислотная последовательность про-HGF организована в доменную структуру из четырех доменов Kringle (K) (Sigurdardottir, et al., 2015, *Chem. Sci.*, 6:6147-6157). В контексте настоящего документа домен «Kringle» относится к полипептидной линейной последовательности, свернутой в дисульфидно-сшитые домены с тройной петлей (Simonneau, et al., 2015, *Chem. Sci.*, 6:2110-2121). Домены Kringle присутствуют в различных полипептидах, включая апополипротеин А, фактор свертывания крови XII, плазминоген и HGF. Термин «Kringle» походит от названия скандинавского кондитерского изделия, форму которого напоминают эти структуры. Считают, что домены Kringle опосредуют взаимодействия связывания между белками, мембранами и фосфолипидами. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению содержат по меньшей мере один домен Kringle.

При расщеплении сигнальной последовательности секреции протеолитическое расщепление в трипсиноподобном сайте (R494-V495) между четвертым доменом Kringle и С-концевым доменом гомологии сериновой протеиназы (serine-proteinase homology - SPH) про-HGF дает зрелый активированный HGF. Трипсиноподобный сайт расщепления представляет собой пептидную связь после положительно заряженной аминокислоты (например, лизина или аргинина). После активации HGF связывается со своим рецептором сMet (также известный как тирозинкиназа MET) и активирует его, что приводит к фосфорилированию тирозина, дополнительно влияя на рекрутирование различных расположенных ниже адапторных молекул и на модуляцию различных внутриклеточных путей и биологических активностей, совместно известных как программа инвазивного роста (Nakamura, T., 1991, *Prog. Growth Factor Res.*, 3:67-85; Bottaro, et al., 1991, *Science* 251:802-804). HGF и его рецептор сMet экспрессируются в эпителии, стромальных клетках, эндотелии и слезной железе роговицы, хоть и на чрезвычайно низких уровнях, причем количество HGF в слезах человека составляет, по оценкам, около 500 пг/мл (Wilson et al., 1993, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34:2544-2561; Li et al., 1996, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37:727-739).

В литературе известно шесть встречающихся в природе изоформ HGF, возникающих в результате альтернативного сплайсинга транскриптов гена мРНК HGF, среди которых основными изоформами являются изоформы 1 (например, SEQ ID NO: 2) и 2 (например, SEQ ID NO: 3) (Bottaro, et al., 1991, *Science*, 251:802-804; Chan et al., 1991, *Science*, 254:1382-1385; Lokker and Godowski, 1992, *EMBO J.*, 11:2503-2510; Cioce, et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271:13110-13115). В контексте настоящего документа термин «изоформа» относится к белкам, которые возникают в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК, кодирующей HGF. Транскрипт мРНК изоформы 1 кодирует самую длинную последовательность гена HGF, которая содержит 728 аминокислотных остатков. Другую основную изоформу HGF кодирует транскрипт мРНК изоформы 2, в которой отсутствует множество 3' экзонов, но присутствует альтернативный 3' экзон относительно транскрипта изоформы 1. Белок HGF, кодируемый транскриптом мРНК изоформы 2, содержит 290 аминокислотных остатков и является усеченным после второго домена Kringle по сравнению с белком HGF изоформы 1 (Miyazawa, et al., 1991, *Eur. J. Biochem.*, 197:15-22). Транскрипт мРНК изоформы 3 не содержит кодирующий сегмент внутри рамки, присутствующий в изоформе 1, и кодирует белок HGF, содержащий 723 аминокислотных остатков (например, SEQ ID NO: 1), не содержащих последовательность «SFLPS» в положениях 161-165 в первом домене Kringle изоформы 1 (Rubin et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:415-419). Белок HGF изоформы 4 (например, SEQ ID NO: 4) представляет собой меньшую молекулу, содержащую остатки 1-296, причем аминокислотная последовательность проходит только через второй домен Kringle (Chan et al., 1991, *Science*, 254:1382-1385). Белок HGF изоформы 5 (например, SEQ ID NO: 5) аналогичен белку HGF изоформы 2 с дополнительной делецией остатков 161-165 (SFLPS), как в HGF изоформы 3 (Rubin et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 415-419). Белок HGF

изоформы 6 (также известный как NK1) (например, SEQ ID NO: 6) является наименьшей из всех изоформ HGF и содержит только 210 аминокислот (Cioce, et al., 1996, *J. Bio. Chem.*, 271:13110-13115).

Было продемонстрировано, что как полноразмерные, так и усеченные изоформы HGF связываются с cMet, хотя и с разной активностью и взаимодействиями с протеогликаном сульфата гепарина внеклеточного матрикса, который помогает увеличить период полувыведения HGF из кровотока *in vivo* (Masumoto and Yamamoto, 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174:90-95; Montesano, et al., 1998, *Cell Growth Differ.*, 9:355-365; Sakata et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:9457-9463; Stahl et al., 1997, *Biochem. J.*, 326:763-772). Тогда как для изоформ 1 и 3 требуется протеолитическое расщепление в R494-V495, чтобы стать биологически активными, усеченные изоформы 2, 4, 5 и 6 не имеют сайта расщепления R494-V495, таким образом этот этап активации не требуется для их биологической активности. Однако усеченные изоформы 2, 4, 5 и 6, как известно, являются обычно менее активными, чем полноразмерные изоформы 1 и 3 (Stahl et al., 1997; Montesano, et al., 1998; *выше*).

Факторы роста фибробластов (FGF) представляют собой семейство клеточных сигнальных белков, которые участвуют в широком диапазоне биологических процессов, включая развитие. Семейство FGF человека включает в себя 22 члена: FGF1, FGF2, FGF3 (INT2), FGF4, FGF5, FGF6, FGF7 (KGF), FGF8 (AIGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22 и FGF23.

FGF оказывают свой биологический эффект посредством связывания и активации рецепторов фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor receptors - FGFR). Активированные FGFR опосредуют передачу сигналов посредством рекрутирования специфических молекул, которые связываются с фосфорилированным тирозином в цитозольной части рецептора, запуская ряд сигнальных путей, что приводит к специфическим клеточным ответам. Семейство FGFR человека включает в себя 4 члена: FGFR1, FGFR2, FGFR3 и FGFR4.

В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NOS: 1-27 с сигнальной последовательностью или без нее (т. е. аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 с сигнальной последовательностью или без нее (т. е. аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 с сигнальной последовательностью или без нее (т. е. аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 с сигнальной последовательностью или без нее (т. е. аминокислоты, соответствующие

аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий активированную форму аминокислотной последовательности SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2. Термин «активированная форма» относится, *среди прочего*, к полипептиду HGF, из которого была расщеплена сигнальная последовательность (например, аминокислоты 1-31 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2) и который был расщеплен между R489 и V490 SEQ ID NO:1 или между R494 и V495 SEQ ID NO:2 с образованием связанных дисульфидными связями альфа- и бета-цепей HGF. В некоторых вариантах осуществления N-концевая аминокислота (например, аминокислота 32 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2) представляет собой пирролидонкарбоновую кислоту, например, полученную в результате расщепления сигнальной последовательности. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению существуют в форме-предшественнике HGF (про-HGF), где пептидная связь между R489 и V490 SEQ ID NO:1 или R494 и V495 SEQ ID NO:2 является интактной. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению могут быть превращены в активную форму посредством протеолитического расщепления трипсиноподобного сайта расщепления между аминокислотными остатками R489 и V490 SEQ ID NO:1 или между аминокислотными остатками R494 и V495 SEQ ID NO:2 белка про-HGF *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению могут быть превращены в активную форму посредством протеолитического расщепления трипсиноподобного сайта расщепления между аминокислотными остатками R489 и V490 SEQ ID NO:1 или между аминокислотными остатками R494 и V495 SEQ ID NO:2 белка про-HGF *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 32-723 SEQ ID NO:1 белка про-HGF. В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 32-723 SEQ ID NO: 1 активированного белка. В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 32-728 SEQ ID NO: 2 белка про-HGF. В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из аминокислот 32-728 SEQ ID NO: 2 активированного белка.

В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6 с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 6).

В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой вариант полипептида SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6 с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6). В контексте настоящего документа термин «вариант» предназначен для обозначения полипептида, отличающегося

от другого полипептида одной или большим количеством аминокислотных замен, делеций или вставок, возникающих в результате мутаций в нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид. В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6, с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления вариант HGF может (1) связываться с с-MET и/или (2) активировать путь MAPK в эпителиальных клетках (например, эпителиальных клетках роговицы человека).

В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий мутацию в аминокислотной последовательности изоформы 1 HGF дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 2), с сигнальной последовательностью или без нее (*например*, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 2) в одном или большем количестве положений 62, 64, 77, 95, 125, 127, 130, 132, 137, 142, 148, 154, 170, 173 и 193. В некоторых вариантах осуществления аналогичные положения в изоформе 3 HGF дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 1) являются мутированными. В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий мутацию в аминокислотной последовательности, как показано ниже в таблице 1 и таблице 2. Любую комбинацию мутаций, представленных в таблице 1 и таблице 2, можно включить в полипептиды HGF, описанные в настоящем документе.

Таблица 1. Мутации последовательностей в вариантах HGF.

SEQ ID NO: 2 относится к дикому типу. Для SEQ ID NO: 7-16 показаны только отличия от последовательности дикого типа, пробелы означают, что остаток HGF дикого типа

сохранен.

SEQ ID NO	Изоформ а	bp	AA	28	30	33	37	38	42	44	48	58	62	64	65	75	77	82	95
2	1			Y	E	R	N	T	F	K	T	K	K	V	N	T	N	F	Q
7	1	15	12									R	E	A			S		R
8	1	21	15										E	A		I			R
9	1	16	14										E	A			S		R
10	1	18	15		K	G							E	A	D		S		
11	1	19	15							A	R		E	A			S		R
12	1	20	15										E	A			S		R
13	1	16	13										E	A		I			
14	1	28	20				D	A	C	R			E	A				S	R
15	1	14	12			G							E				S		R
16	1	17	15	H									E	A			S		R

SEQ ID NO	96	98	101	123	125	127	130	132	135	137	142	148	154	168	170	173	181	190	193
2	C	W	F	D	I	N	I	K	S	K	I	K	S	R	K	Q	R	F	N
7					D					R			A		E	R		Y	D
8			V		T		V	N		R	T		A		E	R		Y	D
9					D	V	N		R		E	A		E	R		Y	D	
10					D	V	N		R	V				E	R		Y	D	
11					D	V	N		R		E			E		W	Y	D	
12					T		V	N		R		E	A	Q	E	R		Y	D
13				A		D		R	N	R		E			E	R		Y	D
14	R	R			T		V	N		R	T		A		E	R	W		D
15					D		R		R				A		E	R		Y	D
16					T		V	N		R	T		A		E	R		Y	D

п. о.: количество мутаций пар оснований

AA: количество аминокислотных мутаций

Таблица 2. Мутации последовательностей в вариантах HGF.

SEQ ID NO: 2 относится к дикому типу. Для SEQ ID NO: 17-27 показаны только отличия от последовательности дикого типа, пробелы означают, что остаток HGF дикого типа

сохранен.

SEQ																
ID	Изоформа	bp	AA	30	33	46	58	62	64	65	75	77	78	79	95	101
NO																
2	1			E	R	A	K	K	V	N	T	N	K	G	Q	F
17	1	17	13					E	A			S	R			
18	1	16	11					E	A							R
19	1	20	17			V		E	A			S			R	V
20	1	18	13					E	A			S				R
21	1	17	13				R	E	A			S	R			R
22	1	21	16					E	A			S	R	R		R
23	1	16	14					E	A			S				R
24	1	14	9							D						R
25	1	24	16		G		R	E	A			S				R
26	1	21	15	K			R	E			I					R
27	1	14	12		G			E				S				R

SEQ																
ID	112	123	127	130	132	135	137	142	148	154	166	170	173	181	190	193
NO																
2	F	D	N	I	K	S	K	I	K	S	S	K	Q	R	F	N
17			D		N		R	V		A		E	R		Y	D
18			D	V	N		R					E	R		Y	D
19	S		D	V	N		R	T		A		E	R		Y	D
20			D	V	N		R					E	R	W	Y	D
21			D		N		R					E	R		Y	D
22			D				R	V	E	A	N	E	R		Y	D
23			D	V	N		R		E	A		E	R		Y	D
24			D		N		R					E	R		Y	D
25		A	D		R	N	R			A		E	R		Y	D
26		A	D		R	N	R			A		E	R		Y	D
27			D		N		R			A		E	R		Y	D

п. о.: количество мутаций пар оснований

AA: количество аминокислотных мутаций

В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

любой из SEQ ID NO: 7-27, с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 7-27). В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-27, с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 7-27).

В некоторых вариантах осуществления FGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления FGF представляет собой вариант полипептида SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления FGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления вариант FGF демонстрирует повышенную протеолитическую стабильность по сравнению с FGF1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления FGF представляет собой полипептид, содержащий мутацию в аминокислотной последовательности изоформы 1 FGF дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 28) в одном или большем количестве положений 28, 40, 47, 93 или 131. Любую комбинацию мутаций в положениях 28, 40, 47, 93 и 131 можно включить в полипептиды FGF, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления вариант FGF1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из D28N, Q40P, S47I, H93G, L131R и L131K. В некоторых вариантах осуществления вариант FGF1 содержит аминокислотную замену L131R. В некоторых вариантах осуществления вариант FGF1 содержит аминокислотную замену L131K. В некоторых вариантах осуществления вариант содержит аминокислотные замены D28N и L131R (*например*, SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления вариант содержит аминокислотные замены D28N и L131K. В некоторых вариантах осуществления вариант содержит аминокислотные замены Q40P, S47I и H93G (*например*, SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления вариант содержит аминокислотные замены Q40P, S47I, H93G и L131R. В некоторых вариантах осуществления вариант содержит аминокислотные замены Q40P, S47I, H93G и L131K. В некоторых вариантах осуществления вариант содержит аминокислотные замены D28N, Q40P, S47I, H93G и L131R (*например*, SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления вариант содержит аминокислотные замены D28N, Q40P, S47I, H93G и L131K. В некоторых вариантах осуществления вариант FGF1 не содержит аминокислотную замену L131A.

В некоторых вариантах осуществления FGF представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-33. В некоторых вариантах осуществления FGF представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-33.

Полипептиды, описанные в настоящем документе (например, полипептиды HGF, полипептиды FGF) могут быть мономерами или димерами. В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой ковалентный димер полипептида или его вариант полипептида любой из SEQ ID NO: 1-27 (с сигнальной последовательностью или без нее (например, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 1-31 из SEQ ID NO: 1-27)). В некоторых вариантах осуществления FGF представляет собой ковалентный димер полипептида или его вариант полипептида любой из SEQ ID NO: 29-33. Ковалентные димеры полипептидов HGF или FGF могут быть получены путем экспрессии в подходящей экспрессионной системе (например, дрожжи или *E. Coli*) любой из полипептидных последовательностей HGF из SEQ ID NO: 1-27, или их варианта, тогда как один аминокислотный остаток, в частности N-концевой аминокислотный остаток, заменен цистеиновым остатком. Экспрессируемый и, например, расщепленный сигнальной последовательностью мономер полипептида HGF или экспрессируемый мономер полипептида FGF можно индуцировать для димеризации путем образования дисульфидной связи между введенным цистеиновым остатком (см., например, Liu, *et al.*, 2014, *FEBS Letters*, 588:4831-4837; Jones II, *et al.*, 2011, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108:13035-13040; и USSN 15/365,514).

В некоторых случаях полипептиды HGF, описанные в настоящем документе, содержат одну или большее количество посттрансляционных модификаций, включая, например, одну или большее количество из следующих:

Основная характеристика	Положение(-я)	Описание
Модифицированный остаток	32	Пирролидонкарбоновая кислота
Дисульфидная связь	70 ↔ 96	
Дисульфидная связь	74 ↔ 84	
Дисульфидная связь	128 ↔ 206	
Дисульфидная связь	149 ↔ 189	
Дисульфидная связь	177 ↔ 201	
Дисульфидная связь	211 ↔ 288	
Дисульфидная связь	232 ↔ 271	
Дисульфидная связь	260 ↔ 283	
Гликозилирование	294	N-связанный (GlcNAc...) (сложный) аспарагин
Дисульфидная связь	305 ↔ 383	
Дисульфидная связь	326 ↔ 365	
Дисульфидная связь	354 ↔ 377	
Дисульфидная связь	391 ↔ 469	

Основная характеристика	Положение(-я)	Описание
Гликозилирование	402	N-связанный (GlcNAc...) (сложный) аспарагин
Дисульфидная связь	412 ↔ 452	
Дисульфидная связь	440 ↔ 464	
Гликозилирование	476	O-связанный (GalNAc...) треонин
Дисульфидная связь	487 ↔ 604	Между цепями (между альфа- и бета-цепями)
Дисульфидная связь	519 ↔ 535	
Гликозилирование	566	N-связанный (GlcNAc...) (сложный) аспарагин
Дисульфидная связь	612 ↔ 679	
Дисульфидная связь	642 ↔ 658	
Гликозилирование	653	N-связанный (GlcNAc...) (сложный) аспарагин
Дисульфидная связь	669 ↔ 697	

Полипептиды, описанные в настоящем документе (*например*, полипептиды HGF, полипептиды FGF) могут содержать замену на встречающуюся в природе аминокислоту или на не встречающуюся в природе аминокислоту, включая, помимо прочего, гидроксипролин (Hyp), бета-аланин, цитруллин (Cit), орнитин (Orn), норлейцин (Nle), 3-нитротирозин, нитроаргинин и пироглутаминовую кислоту (Pyr). В некоторых случаях полипептиды HGF являются посттрансляционно модифицированными, например, как показано в таблице выше.

В контексте настоящего документа термин «идентичность последовательности» относится к проценту идентичных остатков между двумя полипептидами последовательностей нуклеиновых кислот. Специалист в данной области техники сможет легко определить идентичность последовательности с аминокислотой HGF или FGF, например, используя основной инструмент поиска локальных выравниваний (Basic Local Alignment Search Tool - BLAST), доступный на веб-сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, и вводя аминокислотные последовательности (или последовательности нуклеиновых кислот) HGF или FGF и рассматриваемый полипептид (или нуклеиновую кислоту). Программу BLAST, например, можно использовать для выравнивания двух последовательностей (с параметрами по умолчанию), как описано у Tatiana A. Tatusova and Thomas L. Madden (1999), «Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences», *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250. Различные другие алгоритмы и программное обеспечение, которые можно использовать для получения выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей, хорошо известны в данной области техники. Они включают в себя, помимо прочего, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package и их варианты. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению имеют по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по

меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% гомологии с HGF, как определено, например, с помощью программы BLAST для выравнивания двух последовательностей (параметры по умолчанию). В некоторых случаях последовательности являются по существу идентичными по всей длине сравниваемых последовательностей, например, (i) кодирующая область нуклеотидной последовательности или (ii) аминокислотная последовательность.

В некоторых вариантах осуществления HGF и/или FGF выделен из биологического источника, такого как амниотическая мембрана или жидкость, клетки или ткани, которые вырабатывают HGF и/или FGF (например, мезенхимальные стромальные клетки или гепатоциты), или слезная жидкость. В некоторых вариантах осуществления HGF представляет собой рекомбинантный белок, экспрессируемый в подходящей системе экспрессии белка-хозяина, такой как, например, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, клетки яичника китайского хомяка (CHO), эмбриональные клетки почки человека (HEK293) или клеточные линии насекомых (например, Sf9, Sf21 или S2). В некоторых вариантах осуществления HGF является очищенным. В контексте настоящего документа «очищенный» HGF относится к полипептиду, который был обработан для удаления других нежелательных компонентов или загрязнений. В некоторых вариантах осуществления FGF представляет собой рекомбинантный белок, экспрессируемый в подходящей системе экспрессии белка-хозяина, такой как, например, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, клетки яичника китайского хомяка (CHO), эмбриональные клетки почки человека (HEK293) или клеточные линии насекомых (например, Sf9, Sf21 или S2). В некоторых вариантах осуществления FGF является очищенным. В контексте настоящего документа «очищенный» FGF относится к полипептиду, который был обработан для удаления других нежелательных компонентов или загрязнений.

Примеры нежелательных компонентов или загрязнений, удаленных в процессе очистки, включают в себя клетки, ткани, нуклеиновые кислоты, полипептиды, которые не относятся к HGF и/или FGF (например, белки клетки-хозяина из используемой системы экспрессии или распространенные белки из биологического источника, из которого его выделяют, например, альбумин и иммуноглобулины), небольшие фрагменты HGF и/или FGF, имеющие менее 50% гомологии последовательности, металлы и другие неорганические соли. Примеры процессов очистки, используемых специалистами в данной области техники, включают в себя: осаждение, флокуляцию, тангенциальную поточную фильтрацию (tangential-flow filtration - TFF), ультрафильтрацию (ultra-filtration - UF), диафильтрацию (diafiltration - DF), диализ, хроматографию гель-фильтрацией (gel filtration chromatography - GFC), жидкостную хроматографию (ЖХ), ионообменную хроматографию (ion-exchange chromatography - IEX), хроматографию гидрофобного взаимодействия (hydrophobic-interaction chromatography - HIC) и электрофорез. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного HGF составляет по меньшей мере около 50%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного HGF

составляет по меньшей мере около 60%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного HGF составляет около 75%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного HGF составляет около 80%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного HGF составляет около 85%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного HGF составляет около 90%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного HGF составляет около 95%. В предпочтительном варианте осуществления чистота очищенного HGF составляет около 97%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного FGF составляет по меньшей мере около 50%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного FGF составляет по меньшей мере около 60%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного FGF составляет около 75%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного FGF составляет около 80%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного FGF составляет около 85%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного FGF составляет около 90%. В некоторых вариантах осуществления чистота очищенного FGF составляет около 95%. В предпочтительном варианте осуществления чистота очищенного FGF составляет около 97%.

Определение чистоты и содержания HGF и/или FGF может быть легко выполнено специалистом в данной области техники с помощью обычных аналитических анализов и методов, например, с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), эксклюзионной хроматографии (size-exclusion chromatography - SEC), ионообменной хроматографии (ИEX), электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), капиллярного гель-электрофореза (КГЭ) и вестерн-блоттинга.

В контексте настоящего документа «полипептиды» или «белки» представляют собой полимеры аминокислот, имеющие, например, от 2 до около 1000 или более аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления «полипептиды» имеют от 10 до около 130 аминокислот, от 10 до около 220 аминокислот, от 10 до около 500 аминокислот или от 10 до около 730 аминокислот. Любая встречающаяся в природе или синтетическая аминокислота может образовать полипептид. Полипептиды могут также содержать модификации, такие как гликозилирование, и другие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по изобретению имеют способность селективно связываться с полипептидами-мишенями на основе, например, аминокислотной последовательности мишени, такой как аминокислотные последовательности N- или С-конца.

В контексте настоящего документа термин «около» применяется для обозначения приблизительно, в области, примерно или близко. Если термин «около» используется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В общем, термин «около» применяется в настоящем документе для изменения числового значения выше и ниже указанного значения с отклонением в 10%.

Терапевтические и профилактические способы

В настоящем раскрытии представлены способы лечения или профилактики болезней или нарушений глаз у субъекта. В некоторых вариантах осуществления болезнь или нарушение глаз представляет собой заболевание роговицы. Неограничивающие примеры заболеваний роговицы включают в себя нейротрофический кератит, персистирующий дефект роговицы, язву роговицы, синдром сухого глаза, микробный кератит, бактериальный кератит, вирусный кератит, грибковый кератит, химический ожог, термический ожог, механическую травму, эрозию роговицы, нарушение эндотелия, буллезную кератопатию, дистрофию роговицы Фукса, рубец роговицы, синдром Сьогрена или послеоперационные осложнения. В некоторых вариантах осуществления болезнь или нарушение глаз представляет собой повреждение роговицы, включая помутнение или рубцевание роговицы. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой нейропатический кератит. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества полипептида HGF и/или FGF, как описано в настоящем документе. В контексте настоящего документа термины «субъект» или «пациент», используемые взаимозаменяемо, включают в себя млекопитающих, таких как человек, крупный рогатый скот, лошадь, собака, кошка, свинья и овца. Субъект представляет собой предпочтительно человека.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется НТК, при котором наблюдается нарушение тройничного нерва или его ветвей. В определенных случаях нарушение тройничного нерва или его ветвей вызвано инфекциями (например, бактериальными или вирусными инфекциями, такими как инфекции простого герпеса или опоясывающего герпеса). В определенных случаях нарушение тройничного нерва или его ветвей вызвано операциями на глазах (например, операцией по удалению катаракты, трансплантацией роговицы, рефракционной хирургией). В определенных случаях нарушение тройничного нерва или его ветвей вызвано системными заболеваниями, такими как диабет, проказа, опухоли и воспаления глазницы. В некоторых случаях нарушение тройничного нерва или его ветвей вызвано физическими травмами, включая химические и термические ожоги. В других случаях нарушение тройничного нерва или его ветвей вызвано ношением контактных линз. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется НТК, при котором наблюдается повреждение эпителия, не связанное с какими-либо нарушениями путей тройничного нерва.

В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF вводят в глаз субъекта. Введение HGF и/или FGF может осуществляться в соответствии с известными способами, например, местно в виде глазных капель или бандажных контактных линз, путем местных внутриглазных инъекций (например, субконъюнктивальной, интравитреальной, ретробульбарной и интракамеральной) или посредством систем с замедленным высвобождением, как отмечено ниже. В некоторых вариантах осуществления HGF или FGF вводят местно в глаз. Термин «местно» относится к нанесению HGF и/или FGF непосредственно на поверхность (т. е. роговицу) глаза. В некоторых вариантах

осуществления HGF и/или FGF вводят в глаз путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления HGF и/или FGF вводят субконъюнктивально. Термин «субконъюнктивально» относится к инъекции, осуществляемой под конъюнктиву глазного яблока (эпibuльбарно) или под конъюнктиву, покрывающую веко (субпальпебрально) (Stanley, R., 2008 «Ocular Clinical Pharmacology» in *Small Animal Clinical Pharmacology* (2nd Ed.)). В некоторых вариантах осуществления HGF и/или FGF вводят интравитреально. Термин «интравитреально» относится к инъекции, выполняемой непосредственно в стекловидную полость глаза. В некоторых вариантах осуществления HGF и/или FGF вводят интракамерально. Термин «интракамерально» относится к инъекции, выполняемой непосредственно в переднюю камеру глаза. Терапевтические полипептидные композиции, предназначенные для инъекции, обычно помещают в стерильный контейнер, имеющий подходящий порт доступа, например, флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций. Для местного введения фармацевтическую композицию, содержащую HGF и/или FGF, можно поместить в гибкий флакон для глазных капель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую HGF и/или FGF, вводят местно, используя офтальмологический дозатор нажимного типа, такой как, например, дозатор от Aptar Pharma.

Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают в себя полупроницаемые полимерные матрицы в виде изделий определенной формы, например, пленки, имплантаты или микрокапсулы. Матрицы с замедленным высвобождением включают в себя полиэферы, гидрогели, полилактиды (патент США № 3773919 и EP 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers*, 22:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:267-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.*, 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., *выше*) или поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988). Композиции с замедленным высвобождением также включают в себя заключенный в липосому HGF, FGF, или как HGF, так и FGF. Липосомы, содержащие HGF, FGF, или как HGF, так и FGF, могут быть получены хорошо известными способами: DE 3,218,121; Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:3688-3692; Hwang et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:4030-4034; EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949; EP 142641; патенты США №№ 4485045 и 4544545; и EP 102324. Обычно липосомы представляют собой небольшие (около 200-800 ангстрем) однослойные структуры, в которых липидный компонент составляет более чем около 30 мольных процентов холестерина, причем выбранная пропорция корректируется для наиболее эффективной терапии.

«Эффективное количество» HGF или композиции, содержащей HGF, и/или FGF или композиции, содержащей FGF, используемое терапевтически, будет зависеть, например, от терапевтических целей, пути введения и состояния субъекта. Соответственно, терапевту может понадобиться при необходимости титровать дозировку

и изменить путь введения, чтобы получить оптимальный терапевтический эффект. Как правило, врач будет вводить HGF и/или FGF, пока не будет достигнута доза, при которой достигается желаемый эффект. Эффективность такой терапии легко контролировать при помощи традиционных анализов и способов.

При лечении и профилактике болезней и нарушений глаз, таких как помутнение или рубцевание роговицы, а также НТК, фармацевтическую композицию, содержащую HGF и/или FGF, могут составлять, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают в себя конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного субъекта, причину расстройства, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. «Терапевтически эффективное количество» HGF и/или FGF для введения может определяться такими соображениями и представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения, облегчения или лечения симптомов болезни глаз. Такое количество предпочтительно будет ниже, чем количество, которое является токсичным для хозяина или вызывает у него значительные побочные эффекты.

В качестве общей нормы, фармацевтическая композиция, вводимая местно в глаз субъекта, содержит HGF и/или FGF в первоначальной концентрации в диапазоне от около 0,01% до около 1,0%, от около 0,05% до около 0,5%, от около 0,05% до около 0,4%, от около 0,05% до около 0,3% или от около 0,08% до около 0,25% на основании соотношения массы к объему (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, вводимая местно в глаз субъекта, содержит HGF в концентрации около 0,1% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, вводимая местно в глаз субъекта, содержит HGF в концентрации около 0,2% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, вводимая местно в глаз субъекта, содержит FGF в концентрации около 0,1% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, вводимая местно в глаз субъекта, содержит FGF в концентрации около 0,2% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, вводимая местно в глаз субъекта, содержит HGF и FGF, каждый из которых в концентрации около 0,1% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, вводимая местно в глаз субъекта, содержит HGF и FGF, каждый из которых в концентрации около 0,2% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит HGF и по существу не содержит FGF. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит FGF и по существу не содержит HGF.

В настоящем раскрытии также представлена комбинированная терапия. Например, субъекту (например, человеку) вводят HGF, описанный в настоящем документе, в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят полипептид HGF одновременно со вторым терапевтическим агентом. В контексте настоящего документа термин «одновременный» означает «происходящий в

течение одного и того же периода времени». В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент изготовлены в виде одного и того же состава. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент изготовлены в виде отдельных составов. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент вводят в одно и то же время. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF вводят перед введением второго терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF вводят после введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент вводят с интервалом от 1 до 60 минут, с интервалом от 5 до 30 минут или с интервалом от 10 до 20 минут. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент вводят с интервалом 5 минут. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент вводят с интервалом 10 минут. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент вводят с интервалом 15 минут. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент вводят с интервалом 30 минут. В некоторых вариантах осуществления полипептид HGF и второй терапевтический агент вводят с интервалом 1 час. В некоторых вариантах осуществления полипептид FGF представляет собой второй терапевтический агент.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент может вызывать такой же биологический и физиологический эффект, что и HGF, например, активацию аналогичных внутриклеточных путей. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент может вызывать другой биологический и физиологический эффект, чем HGF. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент усиливает биологический и физиологический эффекты, вызванные HGF. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент относится к тому же классу молекул, что и HGF (т. е. оба являются полипептидами). В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент относится к другому классу молекул (например, малая молекула или нуклеиновая кислота). Неограничивающие примеры вторых терапевтических агентов включают в себя малые молекулы, пептиды, протеины, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, нуклеиновые кислоты, клетки и экстракты тканей, а также амниотическую и другие физиологические жидкости. Вторые терапевтические агенты могут быть получены путем выделения из природных источников, получены синтетическим путем или из клеточной культуры. В контексте настоящего документа термин «малая молекула» относится к органическому соединению с низкой молекулярной массой менее чем 900 дальтон. В контексте настоящего документа термин «пептид» относится к соединению, содержащему от 2 до около 50 аминокислот-субъединиц, аналогов аминокислот или пептидомиметиков. Субъединицы могут быть соединены посредством пептидных связей. В контексте настоящего документа термин

«аминокислота» относится к природным и/или неприродным или синтетическим аминокислотам, включая глицин и оптические изомеры как D, так и L, аналоги аминокислот и пептидомиметики. В контексте настоящего документа термин «антитело» включает в себя поликлональные антитела и моноклональные антитела, а также их фрагменты. Антитела включают в себя, помимо прочего, мышьиные, крысиные, кроличьи, человеческие или химерные антитела и т. п. Термин «антитело» также включает в себя антитела всех изотипов. В контексте настоящего документа «нуклеиновые кислоты» или «полинуклеотиды» относятся к полимерным формам нуклеотидов или их аналогов любой длины. Полинуклеотиды могут содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды и/или их аналоги. Нуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Молекулы нуклеиновой кислоты дополнительно содержат олигонуклеотиды, такие как антисмысловые молекулы, зонды, праймеры и т. п. Олигонуклеотиды обычно имеют от около 2 до около 100, от 8 до около 30 или от 10 до около 28 нуклеотидов или их аналогов.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой антибиотик. Неограничивающие примеры антибиотиков включают в себя триметоприм, полимиксин В, азитромицин, гентамицин, безифлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин, левофлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин и тобрамицин. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП). Неограничивающие примеры НПВП включают в себя аспирин, сальсалат, цецекоксиб, диклофенак, этодолак, ибупрофен, индометацин, кетопрофен, кеторолак, набуметон, напроксен, оксaproзин, пироксикам, сулиндак и толметин. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой офтальмологический стероид. Неограничивающие примеры офтальмологического стероида включают в себя дексаметазон офтальмологический (Maxidex®), дифлупреднат офтальмологический (Durezol®), фторметолон офтальмологический (Flarex®, FML®, FML Liquifilm®, FML Forte®), лотепреднола этабонат офтальмологический (Alrex®, Lotemax®), преднизолон ацетат офтальмологический (Omnipred®, Pred Forte®, Pred Mild®), преднизолон натрия фосфат офтальмологический и римексолон офтальмологический (Vexol®). В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой местный анестетик. Неограничивающие примеры местных анестетиков включают в себя прилокаин, эпинефрин, лидокаин, бупивакаин, лонтокаин, новокаин, ропивакаин, прокаин, аметокаин, цинхокаин, мепивакаин и этидокаин. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой дополнительный фактор роста. Неограничивающие примеры факторов роста включают в себя фактор эпителиального роста (epithelial growth factor - EGF), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor - PDGF), фактор роста кератиноцитов (keratinocyte growth factor - KGF), трансформирующий фактор роста (transforming growth factor - TGF), факторы роста

эндотелия сосудов и колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - GM-CSF), нейротрофины и фактор роста нервов (nerve growth factor - NGF), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α) и интерлейкины.

Фармацевтические композиции и составы

Поддержание стабильности полипептида при термическом стрессе и минимизация образования видимых частиц и растворимых агрегатов являются важными приоритетами при разработке фармацевтической композиции, содержащей полипептид, в частности фармацевтической композиции, содержащей по существу водный раствор, который требует длительного хранения. См. следующие ссылки, где HGF и связанные белки составлены с различными стабилизирующими агентами: WO 90/10651WO00/72873 (патент EP № 1180368), JP-A 9-25241 (патент США № 7173008), WO 2008/102849 (патент США № 8461112) и US 10213485. Несмотря на то что проблема агрегации белков и термической стабильности может быть в некоторой степени решена при использовании таких лиофилизированных составов HGF, как описано в предшествующем уровне техники, это требует задействования установки для сублимационной сушки при производстве фармацевтической композиции, содержащей HGF, что влечет за собой дополнительные производственные затраты и усложняет процесс. Более того, лиофилизированный состав HGF требует восстановления перед дозированием и введением. Таким образом, стабильные растворы имеют преимущество.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения HGF (и/или FGF) составлен в виде жидкой фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой водную фармацевтическую композицию. В контексте настоящего документа «водная фармацевтическая композиция» относится к жидкости на водной основе. В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит дистиллированную воду. В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит деионизированную воду. В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит стерильную воду. В некоторых вариантах осуществления водная фармацевтическая композиция содержит воду для инъекций (ВДИ). В некоторых вариантах осуществления жидкая фармацевтическая композиция составлена в виде глазных капель. В некоторых вариантах осуществления жидкая фармацевтическая композиция составлена в виде раствора. В некоторых вариантах осуществления жидкая фармацевтическая композиция составлена в виде суспензии. В некоторых вариантах осуществления HGF составлен вместе с дополнительным терапевтическим агентом в виде жидкой фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления HGF составлен вместе с дополнительным терапевтическим агентом в виде глазных капель. В некоторых вариантах осуществления HGF составлен вместе с дополнительным терапевтическим агентом в виде раствора.

Фармацевтические составы полипептидов по изобретению или их производные

могут быть подготовлены для хранения путем смешивания полипептида или его производного, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами, модификаторами тоничности или стабилизаторами (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Chapter 43, 14th Ed., Mack Publishing Co, Easton Pa. 18042, USA) в форме лиофилизированной массы или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества, модификаторы тоничности или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат, сукцинат и другие органические кислоты, причем термин «буфер» относится к смеси слабой кислоты и сопряженного с ней основания, или наоборот, которая используется для поддержания pH раствора практически на постоянном уровне; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; полипептиды с низкой молекулярной массой (менее чем около 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон (PVP) и полиэтиленгликоль (ПЭГ); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин, гистидин, пролин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий или калий; и/или неионные поверхностно-активные вещества или соразтворители, такие как полисорбаты и поллоксамеры; модификаторы тоничности, такие как хлорид натрия, хлорид калия, маннит, декстроза, глицерин и хлорид магния.

В некоторых вариантах осуществления составы по изобретению по существу не содержат модификатора тоничности. В некоторых вариантах осуществления составы по изобретению по существу не содержат хлористых солей, таких как хлорид натрия, хлорид калия и хлорид магния.

В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава, содержащего HGF (и/или FGF) составляет от около 5,5 до около 7,5. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава составляет от около 5,5 до около 6,0. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава составляет от около 5,8 до около 6,2. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава составляет от около 6,0 до около 6,5. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава составляет от около 6,5 до около 7,0. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава составляет от около 7,0 до около 7,5. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава составляет около 6,0. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава составляет около 6,5. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтического состава составляет около 7,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы по изобретению дополнительно содержат буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер выбран из

ацетата, цитрата, глутамата, гистидина, сукцината, тартрата и трис(гидроксиметил)аминометана (Трис). В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой цитратный буфер, такой как цитрат натрия (например, дигидрат цитрата натрия). В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой ацетатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой сукцинатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой тартратный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой глутаматный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой Трис. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации от около 10 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации от около 20 мМ до около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер присутствует в концентрации около 20 мМ.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы по изобретению дополнительно необязательно содержат модификатор тоничности. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав по существу не содержит модификатора тоничности. В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности представляет собой соль щелочного металла, такую как хлорид натрия (NaCl) или хлорид калия (KCl). В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности представляет собой хлорид кальция (CaCl₂). В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности представляет собой маннит. В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности представляет собой трегалозу (например, дигидрат трегалозы). В некоторых вариантах осуществления модификатор тоничности присутствует в концентрации от около 0,1 до около 1,0 М, от около 0,2 до около 0,8 М, около 0,3 М, около 0,4 М, около 0,5 М, около 0,6 М, около 0,7 М или около 0,75 М. В некоторых вариантах осуществления осмоляльность состава составляет от около 200 до около 500 мОсм/кг H₂O, от около 200 до около 300 мОсм/кг H₂O, от около 250 до около 350 мОсм/кг H₂O, от около 350 до около 400 мОсм/кг H₂O, от около 400 до около 450 мОсм/кг H₂O или от около 450 мОсм/кг H₂O до около 500 мОсм/кг H₂O. В некоторых вариантах осуществления осмоляльность состава составляет около 300 мОсм/кг H₂O. В некоторых вариантах осуществления осмоляльность состава составляет около 350 мОсм/кг H₂O. В некоторых вариантах осуществления осмоляльность состава составляет около 400 мОсм/кг H₂O. В некоторых вариантах осуществления осмоляльность состава составляет около 425 мОсм/кг H₂O. В некоторых вариантах осуществления осмоляльность состава составляет около 450 мОсм/кг H₂O. В некоторых вариантах осуществления осмоляльность состава составляет около 475 мОсм/кг H₂O. В некоторых вариантах осуществления осмоляльность состава составляет около 500 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы по изобретению дополнительно содержат один или большее количество стабилизаторов. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов выбраны из сорбита, трегалозы, сахарозы, аланина, глицина, пролина, глутаминовой кислоты и

аргинина. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов выбраны из сорбитала, пролина и трегалозы. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов выбраны из пролина, аргинина и трегалозы. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов выбраны из глутаминовой кислоты, пролина и трегалозы. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов выбраны из аргинина, глутаминовой кислоты и трегалозы. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов выбраны из аргинина, пролина и сорбита. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов выбраны из глутаминовой кислоты, пролина и сорбита. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов выбраны из аргинина, глутаминовой кислоты и сорбита. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов представляют собой аргинин и трегалозу. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов представляют собой сорбитал и трегалозу. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов представляют собой пролин и трегалозу. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов представляют собой аргинин и сорбит. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество представляют собой глутаминовую кислоту и сорбит. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество стабилизаторов представляют собой пролин и сорбит. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой трегалозу. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой пролин. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой аргинин. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой сорбит.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы по изобретению по существу не содержат сахарозу, аланин и глицин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав по существу не содержит сахарозу. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав по существу не содержит аланин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав по существу не содержит глицин.

В некоторых вариантах осуществления стабилизатор присутствует в составе в концентрации от около 100 мМ до около 500 мМ. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор присутствует в концентрации от около 150 мМ до около 250 мМ. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор присутствует в концентрации около 200 мМ.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы по изобретению дополнительно необязательно содержат поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20), полоксамера 188 (P188) и полоксамера 407 (P407). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет

собой полисорбат 80. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в количестве от около 0,02% до около 0,07% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в количестве от около 0,04% до около 0,06% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество присутствует в количестве около 0,05% (масс./об.).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

- (i) от около 0,1% (масс./об.) до около 1,0% (масс./об.) HGF;
- (ii) буфер, который может поддерживать pH композиции от около 5,8 до около 6,2;
- (iii) от около 100 до около 300 мМ трегалозы, пролина, сорбита или их смеси;
- (iv) необязательно модификатор тоничности, который может обеспечить осмоляльность композиции от около 250 мОсм/кг H₂O до около 500 мОсм/кг H₂O; и
- (v) необязательно поверхностно-активное вещество.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

- (i) от около 0,1% до около 0,5% (масс./об.) HGF;
- (ii) буфер, который может поддерживать pH композиции от около 5,8 до около 6,2;
- (iii) от около 100 до около 300 мМ трегалозы, пролина, сорбита или их смеси;
- (iv) необязательно модификатор тоничности, который может обеспечить осмоляльность композиции от около 250 мОсм/кг H₂O до около 500 мОсм/кг H₂O; и
- (v) необязательно поверхностно-активное вещество.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

- (i) около 0,1% (масс./об.) HGF;
- (ii) буфер, который может поддерживать pH композиции от около 5,8 до около 6,2;
- (iii) от около 100 до около 300 мМ трегалозы, пролина, сорбита или их смеси;
- (iv) необязательно модификатор тоничности, который может обеспечить осмоляльность композиции от около 250 мОсм/кг H₂O до около 500 мОсм/кг H₂O; и
- (v) необязательно поверхностно-активное вещество.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

- (i) около 0,2% (масс./об.) HGF;
- (ii) буфер, который может поддерживать pH композиции от около 5,8 до около 6,2;
- (iii) от около 100 до около 300 мМ трегалозы, пролина, сорбита или их смеси;
- (iv) необязательно модификатор тоничности, который может обеспечить осмоляльность композиции от около 250 мОсм/кг H₂O до около 500 мОсм/кг H₂O; и
- (v) необязательно поверхностно-активное вещество.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы, пролина или сорбита;
около 0,05% (масс./об.) поверхностно-активного вещества;
причем рН композиции составляет около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем рН композиции составляет около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ пролина;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем рН композиции составляет около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ сорбита;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем рН композиции составляет около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы, пролина или сорбита;
около 0,05% (масс./об.) поверхностно-активного вещества;
причем рН композиции составляет около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем рН композиции составляет около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ пролина;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем pH композиции составляет около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ сорбита;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем pH композиции составляет около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы, пролина или сорбита;
около 0,05% (масс./об.) поверхностно-активного вещества;
причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ пролина;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ сорбита;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы, пролина или сорбита;
около 0,05% (масс./об.) поверхностно-активного вещества;
причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ пролина;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит:

около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ сорбита;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем pH композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

В некоторых вариантах осуществления HGF вводят в комбинации со вспомогательным веществом, проникающим в строму роговицы. Вспомогательные

вещества, проникающие в строму роговицы, представляют собой соединения, которые могут улучшать доставку терапевтических агентов в слои роговицы, в первую очередь в эпителий (Moiseev et al., 2019, *Pharmaceutics*, 11:321-354). Эти соединения, когда они включены в фармацевтическую композицию и вводятся местно в глаз, способны изменять слезную пленку, слизистую оболочку или мембраны глаз, тем самым повышая проницаемость терапевтического агента в роговицу. Неограничивающие примеры вспомогательных веществ, проникающих в строму роговицы, включают в себя циклодекстрины (CD), включая α -, β - и γ -CD; хелатирующие агенты, такие как этилендиамин-N, N,N',N'-тетрауксусная кислота (ЭДТК), этиленгликоль-бис(бета-аминоэтил)-N, N,N',N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА), 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N, N,N',N'-тетрауксусная кислота (ВАРТА) и этилендиамин-N, N,N',N'-дисукциновая кислота (ЭДС); краун-эфиры, поверхностно-активные вещества, желчные кислоты и желчные соли, а также проникающие в клетки пептиды. HGF для введения *in vivo* предпочтительно являются стерильными. Данное условие легко достижимо путем фильтрации водного раствора HGF через мембраны для стерильной фильтрации. HGF или его варианты обычно будут хранить в лиофилизированном виде или в виде раствора.

Следует понимать, что определенные признаки данного изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть обеспечены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки данного изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей субкомбинации.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Аминокислотные последовательности изоформ HGF человека, доступные на UniProtKB (uniprot.org/uniprot/P14210)

SEQ ID NO:1. Аминокислотная последовательность изоформы 3 HGF *Homo sapiens*; (идентификатор: P14210-3, номер доступа NP_001010932.1) (dHGF)

MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTINEFKKSAKTTLIKIDPALKIKT
 KKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YENKDYIRNCPIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSYRGKDLQENYCRNPRGE
 EGGPWCFTSNPEVRYEVCIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQT
 PH RHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDV
 PLETTECIQGGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRN
 PDGSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSM
 WDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEG
 DTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLT
 ARQCFPSRDLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPA
 VLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTSVYGGWYTGILNYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHR
 GKVTLNESEICAGAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIF
 VRVAYYAKWIHKIILTYKVPQS

SEQ ID NO:2. Аминокислотная последовательность изоформы 1 HGF Homo sapiens; (идентификатор: P14210-1, номер доступа: NP_000592.3)

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIKT
 KKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRN
 PRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDDIPQCSEVECMTTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDH
 QTPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMN
 DTDVPLETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLREN
 YCRNPDGSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNNGKNYMGNSQTRSGL
 TCSMWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDHDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPIS
 RCEGDTTPTIVNLDHPVISCATKQLRVVNGIPTRTNGWVMVSLRYRNKHICGGSLIKES
 WVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGIHVDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKL
 ARPAVLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTSVYGVWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCS
 QHHRGKVTLNESICAGAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVGLVIVPGRGCAIPNR
 PGIFVRVAYYAKWIHKIILTYKVPQS

SEQ ID NO:3. Аминокислотная последовательность изоформы 2 HGF Homo sapiens (идентификатор: P14210-2, номер доступа: NP_001010931.1):

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIKT
 KKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRN
 PRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDDIPQCSEVECMTTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDH
 QTPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCET

SEQ ID NO:4. Аминокислотная последовательность изоформы 4 HGF Homo sapiens (идентификатор: P14210-4):

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIKT
 KKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRN
 PRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDDIPQCSEVECMTTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDH
 QTPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKNMRDITWAL
 N

SEQ ID NO:5. Аминокислотная последовательность изоформы 5 HGF Homo sapiens (идентификатор: P14210-5, NP_001010933.1):

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
 TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSYRGKDLQENYCRNPRGE
 EGGPWCFTSNPEVRYEVCDDIPQCSEVECMTTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQT
 PHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCET

SEQ ID NO:6. Аминокислотная последовательность изоформы 6 HGF Homo sapiens (идентификатор: P14210-6, NP_001010934.1):

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK

TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRN
PRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVC DIPQCSE GK

SEQ ID NO: 7. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALEIK
TKKANTADQCANRCTRSKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE
NKDYIRD CIIGKGRSYRGTVSITKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSE VECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP
HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL
ETTECIQGQEGYRGTVNTIWNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS
ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NME
DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
L
DHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
D
LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLP
NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESICA
G
AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI
I
LTYKVPQS

SEQ ID NO: 8. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TEKANTADQCANRCIRNKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPVNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE
NKDYTRNCIVGNRSYRGTVSTTKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRN
P
RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSE VECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP
HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL
ETTECIQGQEGYRGTVNTIWNGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS
ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK

NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN

L

DHPVISCATKQLRVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR

D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI

DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGGWYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESICA

G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI

I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 9. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK

TEKANTADQCANRCTRSKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL

YE

NKDYIRD CIVGNRSYRGTVSITKSGIECQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP

RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ

TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD

VPL

ETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD

GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK

NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN

L

DHPVISCATKQLRVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR

D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI

DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGGWYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESICA

G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI

I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 10. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAKGQKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK

TEKADTADQCANRCTRSKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL

YE

NKDYIRDCIVGNRSYRGTVSVTKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
 RGEEGGPWCYTS DPEVRYE VCDIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
 TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
 VPL

ETTECIQGQGEgyrgtvntiwnGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
 GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
 NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
 L

DHPVISAkTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
 D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
 DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNeseICA
 G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHkMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPgIFVRVAYYAKWIHKI
 I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 11. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHvLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRNAIHEFKKSAKATLIKIDPALKIK
 TEKANTADQCANRCTRskGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YE

NKDYIRDCIVGNRSYRGTVSITKSGIECQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGEDLQENYCRNP
 WGEEGGPWCYTS DPEVRYE VCDIPQCSEVECMTCNGESYRGLMDHTESGKICQRWDH
 QTP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
 VPL

ETTECIQGQGEgyrgtvntiwnGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
 GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
 NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
 L

DHPVISAkTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
 D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
 DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNeseICA

G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIKI

I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 12. Вариант HGF:MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TEKANTADQCANRCTRSKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YENKDYTRNCIVGNRSYRGTVSITKSGIECQPWSAMIPHEHSFLPSSYQGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVCDIPQCSEVECMTCN GESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTM
NDTDVPLETTECIQGQEGGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
LDHPVISCATKQLRVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
DLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLPNYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLN ESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIKI

I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 13. Вариант HGF:MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNP
RGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVECMTCN GESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPLETTECIQGQEGGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK

NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN

L

DHPVISCATKQLRVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR

D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI

DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGGWYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNSEICA

G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI

I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 14. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRDAIHECKRSAKTTLIKIDPALKIK

TEKANTADQCANRCTRNGLPSTCKAFVFDKARKRRLRFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL

YE

NKDYTRNCIVGKGRSYRGTVSTTKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRN

P

RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMTNCGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ

TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD

VPL

ETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD

GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK

NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN

L

DHPVISCATKQLRVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR

D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI

DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGGWYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNSEICA

G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI

I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 15. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQGKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK

TEKVNTADQCANRCTRNSKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL

YE

NKDYIRDCCIIGRGRSYRGTVSITKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL

ETTECIQGQEGGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
L

DHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 16. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPHAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TEKANTADQCANRCTRSKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE

NKDYTRNCIVGNRSYRGTVSTTKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRN
P

RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL

ETTECIQGQEGGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
L

DHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI

DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIHKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 17. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TEKANTADQCANRCTR SRGLPFTCKAFVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE

NKDYIRDCCIIGNRSYRGTVSVTKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYE VCDIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL

ETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
L

DHPVISCATKQQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIHKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 18. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TEKANTADQCANRCTR NKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE

NKDYIRD CIVGNRSYRGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYE VCDIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL

ETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD

GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
LDHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
DLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLPNYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
GAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 19. Вариант HGF:MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSVKTTLIKIDPALKIK
TEKANTADQCANRCTRSKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPVNSMSSGVKKESGHEFDL
YENKDYIRD CIVGNRSYRGTVSTTKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPLETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
LDHPVISCAKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
DLKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLPNYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
GAEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 20. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK

TEKANTADQCANRCTRSKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YE
 NKDYIRD CIVGNRSYRGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
 WGEEGGPWCYTS DPEVRYE VCDIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDH
 QTP
 HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
 VPL
 ETTECIQGQGEgyrgtvntiwnGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
 GS
 ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
 NME
 DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHG PWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
 L
 DHPVISA KTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
 D
 LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
 DLP
 NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESICA
 G
 AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQH KMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI
 I
 LTYKVPQS

SEQ ID NO: 21. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQH VLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALRIK
 TEKANTADQCANRCTR SRGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YE
 NKDYIRD CIIGNRSYRGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
 RGEEGGPWCYTS DPEVRYE VCDIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
 TP
 HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
 VPL
 ETTECIQGQGEgyrgtvntiwnGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
 GS
 ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
 NME
 DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHG PWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
 L
 DHPVISA KTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
 D
 LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTI

DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 22. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TEKANTADQCANRCTR SRRLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE

NKDYIRDCCIIGKGRSYRGTVSVTKSGIECQPWSAMIPHEHSFLPSNYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYE VCDIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL

ETTECIQGQEGGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
L

DHPVISCATKQQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 23. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TEKANTADQCANRCTR SKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE

NKDYIRDCIVGNRSYRGTVSITKSGIECQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYE VCDIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL

ETTECIQGQEGGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD

GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
L

DHPVISCATKQLRVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 24. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TKKVDTADQCANRCTRNKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE

NKDYIRDCCIIGNRSYRGTVSITKSGIKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL

ETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
L

DHPVISCATKQLRVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIIKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 25. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQGRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALRIK

TEKANTADQCANRCTRKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YE
 NKAYIRDCIIGRGRNYRGTVSITKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
 RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
 TP
 HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
 VPL
 ETTECIQGQGEgyrgtvntiwnGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
 GS
 ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
 NME
 DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
 L
 DHPVISC AKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
 D
 LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGS DLVLMKLARPAVLDDFVSTI
 DLP
 NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESICA
 G
 AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQH KMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI
 I
 LTYKVPQS

SEQ ID NO: 26. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLHLLLLPIAIPYAKGQRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALEIK
 TEKVNTADQCANRCIRNKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
 YE
 NKAYIRDCIIGRGRNYRGTVSITKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
 RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
 TP
 HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
 VPL
 ETTECIQGQGEgyrgtvntiwnGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
 GS
 ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
 NME
 DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
 L
 DHPVISC AKTKQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
 D
 LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGS DLVLMKLARPAVLDDFVSTI

DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 27. Вариант HGF:

MWVTKLLPALLLQHVLLHLLLPIAIPYAEGQGKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIK
TEKVNTADQCANRCTRSKGLPFTCKAFVFDKARKRCLWPFNSMSSGVKKEFGHEFDL
YE

NKDYIRDCHIIGNRSYRGTVSITKSGIKCQPWSAMIPHEHSFLPSSYRGEDLRENYCRNP
RGEEGGPWCYTSDPEVRYEVC DIPQCSEVECMT CNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQ
TP

HRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPDGQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTD
VPL

ETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPD
GS

ESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHGQDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDK
NME

DLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVN
L

DHPVISCATKQQLRVVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGSLIKESWVLTARQCFPSR
D

LKDYEAWLGIHDVHGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTI
DLP

NYGCTIPEKTSCSVYGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICA
G

AEKIGSGPCEGDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRP GIFVRVAYYAKWIHKI
I

LTYKVPQS

SEQ ID NO: 28. FGF1 дикого типа:

FNLPPGNYKKPKLLYCSNGGHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHIQLQLSAESVGEVYIKSTE
TGQYLAMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKNWVGLKKNNGSCK
RG

PRTHYGQKAILFLPLPVSSD

SEQ ID NO: 29. Вариант FGF1:

FNLPPGNYKKPKLLYCSNGGHFLRILPNGTVDGTRDRSDQHIQLQLSAESVGEVYIKSTE
TGQYLAMDTDGLLYGSQTPNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEKNWVGLKKNNGSCK
RG

PRTHYGQKAIRFLPLPVSSD

YTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPLETTECIQGQEGYRGTVNTIWNIGIPCQRW
 DSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIPNCDMSHG
 QDCYRGNGKNYMGNLSQTRSGLTCSMWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNENYCRNPD
 DDAHGPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLR

SEQ ID NO:37 Пептид бета-цепи SEQ ID NO:1

VVNGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHCSSGLIKESWVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGIHNDV
 HGRGDEKCKQVLNVSQLVYGPESDLVLMKLARPAVLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTSC
 SVYGGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESICAGAEKIGSGPCE
 GDYGGPLVCEQHKMRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGIFVRVAYYAKWINKIILTYKVPQS

Пример 2: Составы

Исследование схемы эксперимента (design-of-experiments - DoE) было проведено с целью определить оптимальный pH, буфер и стабилизаторы, которые могут предотвратить агрегацию и поддерживать наилучшую физико-химическую стабильность HGF в составе раствора. Белок HGF (активированный dHGF из SEQ. ID NO. 1) был составлен в концентрации 34,67 мг/мл в 10 mM цитрате, 1M NaCl, 0,075% PS80, pH 6,0, и для него была проведена замена буфера на составы, перечисленные в таблице 3, используя концентраторы Amicon-15 (MWCO 10 кДа) до достижения концентрации 1 мг/мл. Раствор в концентрации 34,67 мг/мл объемом 340 мкл добавляли в предварительно промытые концентраторы (с соответствующим буфером) и разводили до 15 мл в соответствующем буферном растворе для состава (без поверхностно-активного вещества). Образцы центрифугировали со скоростью 3200 gcf до достижения объема ~5 мл, затем снова разводили до общего объема ~15 мл с помощью соответствующего буфера для состава. Этот процесс замены буфера повторяли в течение пяти циклов с общим разведением в ~3610 раз. Объем образца уменьшали до ~7 мл в конечном цикле центрифугирования. Предполагая наихудшее восстановление ~60%, конечная концентрация белка каждого образца составила ~1 мг/мл, причем расчетная остаточная концентрация PS80 составила ~0,004%.

Образцы с заменой буфера анализировали в отношении содержания белка с помощью УФ-видимой спектроскопии, используя коэффициент экстинкции 1,890 мл мг⁻¹ см⁻¹. Образцы нормализовали до целевой концентрации 1 мг/мл, используя при необходимости соответствующий буфер для состава, и добавляли 10% PS80 (масс./об., полученный из PS80 класса USP, № по кат. 4117-04 J.T.Baker или эквивалентный) до достижения целевой концентрации 0,05% PS80 в составах HGF. Теоретический остаточный уровень PS80 в конце процесса замены буфера (~0,004%) не учитывали, поскольку остаточный уровень PS80 был минимальным относительно добавленного количества PS80.

После нормализации содержания белка и концентраций поверхностно-активных веществ составы подвергали стерилизующей фильтрации с помощью стерильных концентраторов 0,22 мкм (Millipore Ultrafree-CL GV, P/N UFC40GV0S). Каждый состав подвергали стерилизующей фильтрации в шесть стерилизованных флаконов из

боросиликатного стекла типа 1 (2 мл, 13 мм, № по кат. RTF8418, Afton) в объеме 1,0 мл на флакон. Оставшийся объем образца переносили в пробирки из ПЭНП объемом 1 мл (№ по кат. 03-439-61W Fisher) и использовали в качестве контроля в начальный момент времени (T₀) для аналитического тестирования. В случае составов центральной точки 200 мкл из флакона для тестирования T₀ переносили в пробирки из ПЭНП объемом 1 мл (№ по кат. 03-439-61W Fisher) и использовали для исследования адсорбции, как описано ниже. Процедуры переноса образцов и стерилизующей фильтрации выполняли в стерильном боксе биологической безопасности в асептических условиях. Флаконы закупоривали стерилизованными пробками Fluorotec и закрывали алюминиевыми колпачками 13FO с кнопками. Два флакона каждого типа состава хранили в следующих условиях хранения: при 2-8°C в течение 4 недель и при 40°C в течение 4 недель. Внешний вид образцов оценивали на предмет цвета, прозрачности и наличия частиц с помощью визуального осмотра. Термическую стабильность белка оценивали с помощью DSF/SLS. Кроме того, выполняли измерения мутности с помощью УФ-видимой спектроскопии, измеряя абсорбцию при длине волны 340 нм. Конформационную стабильность и агрегационную стабильность белка определяли с помощью ДРС и ЭХ-ВЭЖХ, соответственно. Образцы дополнительно подвергали анализу с помощью восстанавливающего и невосстанавливающего капиллярного гель-электрофореза (CE-SDS) и гель-электрофореза с изоэлектрическим фокусированием (iCIEF). Присутствие твердых частиц оценивали с помощью счетчика частиц HIAC, который регистрировал среднее число частиц > 2 мкм, ≥ 5 мкм, ≥ 10 мкм и ≥ 25 мкм в образце. Все анализы DoE выполняли в рандомизированном порядке. Данные для момента времени T₀ и моментов времени стабильности для всех составов DoE оценивали с помощью программного обеспечения Design Expert Stat Ease®, чтобы определить статистически значимые тенденции.

Исследование адсорбции для оценки неспецифической адсорбции белка HGF поверхностями контейнеров из ПЭНП

Образцы в пробирках из ПЭНП хранили при 2-8°C в течение по меньшей мере пяти дней. Содержание белка, определенное с помощью УФ-поглощения при 280 нм (A₂₈₀), измеряли в этих образцах через пять дней хранения и значения сравнивали с соответствующими результатами в T₀, чтобы определить, имела ли место какая-либо адсорбция белка материалом контейнера из ПЭНП. Минимальную адсорбцию белка наблюдали при хранении в контейнере из ПЭНП, причем % разницы концентраций HGF, измеренных через 5 дней, составлял менее 4% для большинства протестированных составов, при этом исключение представлял собой состав, который содержал сахарозу и аланин и для которого наблюдали снижение концентрации белка HGF на 8% (таблица 3). Результаты этого исследования подтверждают использование пробирок из ПЭНП в качестве пригодных контейнеров для составов HGF.

Таблица 3. Исследование адсорбции ПЭНП

Состав	pH	Концентрация (мг/мл)	Концентрация (мг/мл)	% разницы
--------	----	-------------------------	-------------------------	-----------

		T=начальный момент времени	T=через 5 дней	
20 мМ цитрат, 200 мМ сорбит, 0,05% PS80	6,0	1,0	1,0	1
	6,0	1,0	1,0	2
20 мМ цитрат, 200 мМ пролин, 0,05% PS80	6,0	1,0	1,0	3
	6,0	1,0	1,0	2
20 мМ цитрат, 200 мМ трегалоза, 0,05% PS80	6,0	1,0	1,0	3
	6,0	1,0	1,0	1
30 мМ ацетат, 200 мМ сорбит, 0,05% PS80	5,0	1,0	1,0	4
	5,0	1,0	1,0	3
30 мМ ацетат, 200 мМ пролин, 0,05% PS80	5,0	1,0	1,0	1
	5,0	1,0	1,0	1
30 мМ ацетат, 200 мМ трегалоза, 0,05% PS80**	5,0	1,0	1,0	2
	5,0	1,0	1,0	1
10 мМ цитрат, 0,3М NaCl, 1% сахараза, 0,5% аланин, 0,05% PS80**	6,0	1,1	1,0	8
10 мМ цитрат, 0,75М NaCl, 0,08% глицин, 0,01% PS80**	6,0	1,0	1,0	2

Результаты

В целом, более низкий уровень мутности наблюдали в составах при более высоком диапазоне значений pH 6,0-6,5 при хранении при 40°C или 5°C в течение 1 месяца (таблица 4). Составы, содержащие 200 мМ трегалозу, продемонстрировали низкий уровень мутности (менее 0,01) для диапазона значений pH 5,0-6,5, причем состав, содержащий 200 мМ трегалозу, при pH 6,0 демонстрировал наиболее низкий уровень мутности при хранении при 40°C в течение 1 месяца.

Таблица 4. Мутность различных составов раствора HGF, хранимых при 40°C или 5°C в течение 1 месяца

Состав	pH	A340* 1M при 40°C	A340* 1M при 5°C
20 мМ цитрат, 200 мМ сорбит, 0,05% PS80	5,5	0,011	0,005
	6,0	0,016	0,008
	6,5	0,024	0,013
20 мМ цитрат, 200 мМ пролин, 0,05%	5,5	0,028	0,023

PS80	6,0	0,009	0,006
	6,5	0,030	0,014
20 мМ цитрат, 200 мМ трегалоза, 0,05% PS80	5,5	0,009	0,007
	6,0	0,007	0,005
	6,5	0,014	0,009
30 мМ ацетат, 200 мМ сорбит, 0,05% PS80	4,5	0,027	0,009
	5,0	0,015	0,013
	5,5	0,019	0,021
30 мМ ацетат, 200 мМ пролин, 0,05% PS80	4,5	0,023	0,021
	5,0	0,019	0,008
	5,5	0,011	0,018
30 мМ ацетат, 200 мМ трегалоза, 0,05% PS80	4,5	0,032	0,014
	5,0	0,022	0,010
	5,5	0,010	0,009
10 мМ цитрат, 0,3М NaCl, 1% сахароза, 0,5% аланин, 0,05% PS80**	6,0	0,017	0,014
10 мМ цитрат, 0,75М NaCl, 0,08% глицин, 0,01% PS80**	6,0	0,006	0,000

* Все значения А340 указаны как среднее измерений для двух отдельных препаратов, за исключением составов, отмеченных «**», что означает один препарат.

Присутствие твердых частиц при хранении при 5°C или 40°C в течение 1 месяца, что определено с помощью НІАС, наблюдали в нескольких составах (таблица 5). Составы, содержащие 200 мМ сорбит, 200 мМ пролин или 200 мМ трегалозу при рН 5,0 либо 200 мМ трегалозу или 0,08% глицин при рН 6,0, демонстрировали наиболее низкое число частиц. Однако другие аналитические данные, включая данные по мутности, приведенные в таблице 4, указывают на лучшую общую стабильность белка HGF при рН 6,0, причем только составы, содержащие 200 мМ трегалозу и 0,08% глицин, продемонстрировали низкое число частиц при хранении.

Таблица 5. Число частиц, измеренное с помощью НІАС, для составов HGF, хранимых при 40°C или 5°C в течение 1 месяца.

Состав	рН	Число частиц с помощью НІАС* Т1М при 40°C				Число частиц с помощью НІАС* Т1М при 5°C			
		≥ 2 мкм	≥ 5 мкм	≥ 10 мкм	≥ 25 мкм	≥ 2 мкм	≥ 5 мкм	≥ 10 мкм	≥ 25 мкм
20 мМ цитрат, 200 мМ сорбит, 0,05% PS80	6,0	326	121	46	4	386	146	48	3
20 мМ цитрат, 200 мМ пролин, 0,05% PS80	6,0	753	238	94	4	417	125	20	0

20 мМ цитрат, 200 мМ трегалоза, 0,05% PS80	6,0	142	47	16	2	200	73	19	0
20 мМ цитрат, 200 мМ сорбит, 0,05% PS80	5,0	125	34	3	0	327	81	13	0
20 мМ цитрат, 200 мМ пролин, 0,05% PS80	5,0	74	24	7	2	433	140	26	1
20 мМ цитрат, 200 мМ трегалоза, 0,05% PS80	5,0	132	33	6	2	314	113	50	8
10 мМ цитрат, 0,3М NaCl, 1% сахароза, 0,5% аланин, 0,05% PS80**	6,0	955	100	43	2	172	57	23	3
10 мМ цитрат, 0,75М NaCl, 0,08% глицин, 0,01% PS80**	6,0	57	5	0	0	47	13	8	0

* Все значения НІАС указаны как среднее измерений для двух отдельных препаратов, за исключением составов, отмеченных «**», что означает один препарат

Восстанавливающий капиллярный гель-электрофорез (R-CE-SDS) использовали для дополнительной оценки химической стабильности белка HGF в различных составах. HGF представляет собой гетеродимер, содержащий α - и β -цепи, соединенные посредством дисульфидной связи. В восстанавливающих условиях два пика присутствуют на электроферограмме (% основного пика 1 и % основного пика 2 в таблице 6); в колонке под названием «% других» представлены потенциальные продукты разложения белка HGF. Как показано в таблице 6, составы HGF при pH 6,0 обычно демонстрировали лучшую химическую стабильность при долгосрочном хранении, как при 40°C, так и при 5°C, причем самый высокий общий % основного пика наблюдали для составов, содержащих 200 мМ трегалозу или 200 мМ пролин при pH 6,0. Оказалось, что состав HGF, содержащий 0,08% глицин, который продемонстрировал хорошую стабильность в отношении числа частиц и мутности, имеет плохую химическую стабильность, что показал R-CE-SDS.

Таблица 6. Восстанавливающий капиллярный гель-электрофорез (R-CE-SDS) для составов HGF, хранимых при 40°C или 5°C в течение 1 месяца.

		T1M при 40°C	T1M при 5°C
--	--	--------------	-------------

Состав	pH	% основного пика 1	% основного пика 2	% других	Общий % основного пика*	% основного пика 1	% основного пика 2	% других	Общий % основного пика*
20 мМ цитрат, 200 мМ сорбит, 0,05% PS80	6,0	31,5	45,9	22,5	77,5	31,4	46,5	22,1	77,9
20 мМ цитрат, 200 мМ пролин, 0,05% PS80	6,0	31,9	47,1	21,0	79,0	31,8	46,9	21,3	78,7
20 мМ цитрат, 200 мМ трегалоза, 0,05% PS80	6,0	32,0	47,0	20,9	79,1	31,3	46,8	21,9	78,1
20 мМ цитрат, 200 мМ сорбит, 0,05% PS80	5,0	34,2	41,0	24,8	75,2	32,0	47,5	20,5	79,5
20 мМ цитрат, 200 мМ пролин, 0,05% PS80	5,0	34,3	41,2	24,6	75,4	31,4	47,7	20,9	79,1
20 мМ цитрат, 200 мМ трегалоза, 0,05% PS80	5,0	34,6	41,9	23,5	76,5	31,9	47,7	20,3	79,7
10 мМ цитрат, 0,3М NaCl, 1% сахараза, 0,5% аланин, 0,05% PS80**	6,0	30,8	44,5	24,6	75,4	30,1	43,0	27,0	73,0
10 мМ цитрат, 0,75М NaCl, 0,08% глицин, 0,01% PS80**	6,0	29,8	37,9	32,3	67,7	26,9	39,1	34,0	66,0

* Все значения % пика представляют собой среднее измерений для двух отдельных препаратов, за исключением составов, отмеченных «**», что означает один препарат.

Пример 3. Биоанализ для определения относительной активности

Составы, которые продемонстрировали наилучшие общие свойства, определенные в ходе экспериментов по разработке составов, описанных в примере 2, дополнительно оценивали на предмет относительной активности с помощью анализа активности в отношении стимуляции пролиферации клеток, используя клетки Mv.1.Lu (линия клеток легкого американской норки), в присутствии трансформирующего фактора роста бета (TGF- β). TGF- β ингибирует рост клеток Mv.1.Lu, а составы HGF, описанные в настоящем документе, могут обратить данное ингибирование роста. Клетки Mv.1.Lu размораживали и жизнеспособность банка клеток оценивали путем окрашивания трипановым синим. После определения плотности жизнеспособных клеток соответствующее количество

клеток переносили в колбу для первичного культивирования. Клетки непрерывно выращивали и размножали в колбах с тканевыми культурами, прежде чем высевать на планшет для проведения анализа образцов.

Каждый эталонный стандарт и каждый исследуемый образец разбавляли средой для количественного определения для получения 8-точечной кривой разбавления. Активность каждого исследуемого образца определяли путем сравнения кривой разбавления, полученной для исследуемого образца, относительно эталонного стандарта.

Культивируемые клетки в колбах с тканевыми культурами обрабатывали трипсином и ресуспендировали в среде для количественного определения (содержащей 250 пг/мл TGF-β) до приблизительно $0,1 \times 10^6$ клеток/мл. Пятьдесят микролитров клеточной суспензии помещали в каждую лунку 96-луночного планшета. 96-луночные планшеты, содержащие культивируемые клетки, инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 1-4 часов перед добавлением эталонного стандарта и исследуемых образцов. Исследуемые образцы и эталонные стандарты добавляли в отдельные лунки в трех экземплярах и клетки инкубировали в течение 72 часов.

После инкубации в каждую лунку добавляли реагент для пролиферации клеток MTS (Promega, Cat. No G3582) или эквивалентный и 96-луночный планшет инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 4 часов. После данной инкубации планшет помещали в планшетный ридер UV-Vis и измеряли абсорбцию при 490 нм. Каждый эталонный стандарт и исследуемый образец анализировали в трех экземплярах и определяли активность с помощью анализа параллельных линий. Каждый образец сравнивали с эталонным стандартом, используя четырехпараметрическую ограниченную кривую, чтобы определить относительную активность.

Критерии приемлемости исследуемого образца (ИО):

1. Независимая четырехпараметрическая кривая ИО должна демонстрировать дозозависимую связь при нанесении среднего ответа относительно логарифмической концентрации белка.

2. Значение R^2 для независимой 4-параметрической кривой ИО должно составлять $\geq 0,97$.

3. Все значения КВ% для ИО должны составлять $\leq 20\%$.

4. Активность образца пригодности системы будет определяться с помощью глобальной модели аппроксимации, а F-вероятность каждого ИО должна составлять $\geq 0,01$.

5. Исследуемые образцы, которые не подходят по всем вышеперечисленным критериям, будут повторно протестированы в аналогичных условиях.

6. Планшеты для анализа, которые не подходят по всем вышеперечисленным критериям, должны быть повторно протестированы в аналогичных условиях один раз.

7. % относительной активности стандартного образца (СО) должен находиться в пределах 50%-200%.

Результаты биоанализа относительной активности *in vitro* для выбранных составов

обобщены в таблице 7. Было подтверждено, что составы раствора HGF, содержащие 200 мМ трегалозу при рН 6,0, также сохраняют превосходную активность для белка HGF (99%).

Таблица 7. Относительная активность HGF в различных составах

Состав	Результаты (% относительной активности)**
20 мМ цитрат, 200 мМ пролин, рН 6,0	106%
20 мМ цитрат, 200 мМ трегалоза, рН 6,0	99%
20 мМ цитрат, 200 мМ сорбит, рН 6,0	93%
30 мМ ацетат, 200 мМ пролин, рН 4,5	34%
30 мМ ацетат, 200 мМ трегалоза, рН 4,5	35%
30 мМ ацетат, 200 мМ сорбит, рН 4,5	29%
30 мМ ацетат, 200 мМ пролин, рН 5,5	68%
30 мМ ацетат, 200 мМ трегалоза, рН 5,5	63%
30 мМ ацетат, 200 мМ сорбит, рН 5,5	70%
10 мМ цитрат, 0,75М NaCl, 0,08% глицин, 0,01% PS80, рН 6,0	91%
10 мМ цитрат, 0,3М NaCl, 1% сахароза, 0,5% аланин, 0,05% PS80, рН 6,0	98%

** Относительная активность в сравнении с эталонным стандартом.

Пример 4. Эффективность местных составов в мышинной модели механического повреждения роговицы

Эффективность местных составов HGF при применении для лечения НТК была протестирована на мышинной модели повреждения роговицы. Тестирование на эффективность проводили в две фазы, используя самцов мышей C57BL/6. Во время фазы I в один глаз каждого из 75 животных вводили 4 раза в сутки (4 р./сут.) с интервалом 2 часа между дозами в день 0 (повреждение) и с интервалом 3 часа между дозами в течение остального периода исследования (день 8) исследуемый препарат объемом 3,5 мкл с помощью пипетки. Животных (~10-20%), которые не реагировали на повреждение (т. е. помутнение роговицы отсутствовало на день 3), исключали из исследования. Экспериментальный дизайн исследования фазы I обобщен в таблице 8 ниже.

Таблица 8. Экспериментальный дизайн тестирования фазы 1 на эффективность HGF при лечении НТК в мышинной модели механического повреждения роговицы

№ группы	Кол-во животных*	Лечение (4 р./сут. в день 0)	Конечные точки/процедуры	Эвтаназия
1	12 +3	PBS	Осмотр глаз на исходном уровне (щелевая лампа)	День 8 (животных из
2	12 +3	0,1%		

		(масс./об.) dHGF (T1)**	Цифровая фотография светлого поля после операции, а затем ежедневно в течение до 7 дней. Окрашивание флюоресцеином и визуализация после операции, а затем ежедневно в течение до 7 дней. ОКТ (до и после операции на исходном уровне, дни 3 и 7) Животных в количестве N=3/группа умерщвляли через 3 дня лечения для проведения гистопатологии (окрашивание Н&Е поперечного среза всего глазного яблока)	группы с PBS использовали для пробного исследования, как описано в таблице 9 ниже)
3	12 +3	0,2% (масс./об.) dHGF (T2)**		
4	12 +3	0,1% (масс./об.) mNGF (N)		
5	12 +3	0,1% (масс./об.) mHGF (HGF)		

Сокращения:

mNGF - мышинный фактор роста нервов

mHGF - мышинный фактор роста гепатоцитов

*Следующие животные были исключены в день 3:

1. Животных (n=1-2/группа), которые не реагировали на повреждение (т. е. помутнение роговицы отсутствовало на день 3), исключал на день 3 спонсор, и спонсор был замаскирован.

2. Животных (n=3/группа) как представителей каждой группы собирали для проведения гистологии (окрашивание Н&Е).

** T1: 0,1% (масс./об.) dHGF человека (SEQ ID NO: 1) в PBS.

T2: 0,2% (масс./об.) dHGF человека (SEQ ID NO: 1) в PBS.

Таблица 9. Пробное исследование для определения частоты эпителиального соскабливания (для данного пилотного исследования использовали животных (n=9-10) из группы с PBS из фазы 1), и дозу 0,1% против 0,2% dHGF выбрали на основе результата фазы 1.

№ группы	Кол-во животных*	Лечение (4 р./сут.), начиная в день 10	Конечные точки/процедуры	Эвтаназия
1	3	HGF (0,1%) (+ один раз эпителий. соскабливание)	Один раз в день 10 перед началом лечения, соскоб эпителия роговицы с помощью Algerbrush в области помутнения (1 мм трепан). Изображения светлого поля и ОКТ на исходном уровне (день 10), в день 14, день 17, день 20	День 20

2	4	HGF (0,1%) (+ три раза эпители. соскабливание)	Один раз в день 10, день 14 и день 17 перед началом лечения, соскоб эпителия с помощью Algerbrush в области помутнения (1 мм трепан). Изображения светлого поля и ОКТ на исходном уровне (день 10), в день 14, день 17, день 20	День 20
---	---	---	--	---------

Во время фазы 2 исследования эффективности 85 животным вводили в поврежденную роговицу 4 раза в сутки (4 р./сут.) с интервалом 2 часа между дозами в день 11 (повреждение) и с интервалом 3 часа между дозами в течение остального периода исследования (день 20) исследуемый препарат объемом 3,5 мкл. На момент первого применения лечения (день 11) эпителий роговицы удаляли, осторожно помещая кончик Algerbrush на область помутнения (маркированную 1 мм трепаном) роговицы. Эпителий роговицы удаляли во второй раз в день 16. Дизайн исследования для фазы 2 обобщен в таблице 10 ниже.

Таблица 10. Экспериментальный дизайн тестирования фазы 2 на эффективность HGF при лечении НТК в мышинной модели механического повреждения роговицы

№ группы	Кол-во животных*	Лечение (4 р./сут.), начиная в день 10	Конечные точки/процедуры	Эвтаназия
1	17	Носитель**	Осмотр глаз на исходном уровне (щелевая лампа) Цифровая фотография светлого поля на исходном уровне (день 8), день 16 и 21. Окрашивание флюоресцеином и визуализация на исходном уровне (день 8) день 21. ОКТ на исходном уровне (день 8), дни 16 и 21.	День 21
2	17	0,1% (масс./об.) dHGF		
3	17	0,2% (масс./об.) dHGF		
4	17	0,1% (масс./об.) mNGF		
5	17	0,1% (масс./об.) mHGF		

*Животных с правильным фенотипом включали для лечения.

Сокращения:

mNGF - мышинный фактор роста нервов

mHGF - мышинный фактор роста гепатоцитов

dHGF - человеческий фактор роста гепатоцитов (SEQ. ID NO. 1)

**носитель - PBS; mNGF, mHGF и dHGF были составлены в носителе в указанной концентрации.

Повреждение роговицы (фаза 1 и фаза 2).

Перед индукцией модели исследуемым субъектам подкожно вводили бупренорфин в дозе 0,01-0,05 мг/кг. Животным также местно вводили коктейль тропикамида (1,0%) и

фенилэфрина (2,5%) для расширения глаз и смещения их вперед. Животных затем успокаивали для проведения хирургической процедуры с помощью коктейля кетамин/ксилазин и одной капли 0,5% пропаракaina HCl. Щипцы (например, Dumont #4) использовали для смещения глаза животного вперед и, применяя легкое давление, 2 мм трепан помещали над центральной частью роговицы. Трепан поворачивали на 3 часа, осторожно надавливая на него, чтобы определить дефектную область. Algerbrush II (Alger Company Inc., Lago Vista, TX) с 0,5 мм буром использовали для удаления эпителия и передней стромы роговицы в пределах трепанированной области. Поврежденная строма была отмечена появлением стромального дебриса. Стромальный дебрис удаляли путем промывания сбалансированным солевым раствором (BSS). Животных сканировали с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) и окрашивали флуоресцеином перед введением первой дозы лечения в поврежденный глаз. Местные антибиотики (офлоксацин) наносили через 15 минут и животным давали нормально восстановиться после операции. Животные подкожно получали вторую дозу бупренорфина 0,01-0,05 мг/кг приблизительно через 6-8 часов после операции и два раза в сутки каждые 6-8 часов в течение двух дней после операции.

Повреждение роговицы (удаление эпителия, только фаза 2).

Перед запуском фазы 2 проводили пилотное исследование с целью определить оптимальное количество эпителиальных соскобов после первоначального повреждения, как было описано выше для фазы 1. Двух соскобов было достаточно для индукции желаемой модели. После запуска фазы 2 животным подкожно вводили бупренорфин в дозе 0,01-0,05 мг/кг. Животным также местно вводили коктейль тропикамида (1,0%) и фенилэфрина (2,5%) для расширения глаз и смещения их вперед. Животных затем успокаивали для проведения хирургической процедуры с помощью коктейля кетамин/ксилазин, и вводили одну каплю 0,5% пропаракaina HCl. В день 0 животных подвергали хирургической процедуре, как описано выше для фазы 1. В дни 11 и 16 после первоначального повреждения и образования рубца использовали щипцы (например, Dumont #4) для смещения глаза животного вперед и, применяя легкое давление, над областью рубца на роговице помещали 1 мм трепан. Трепан поворачивали на 3 часа, осторожно надавливая на него, чтобы определить дефектную область. Algerbrush II (Alger Company Inc., Lago Vista, TX) с 0,5 мм буром использовали для удаления эпителия роговицы в пределах трепанированной области. Поверхность глаза затем промывали BSS. Животных сканировали с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ), окрашивали флуоресцеином и фотографировали перед введением первой дозы лечения в поврежденный глаз. Местные антибиотики (офлоксацин) наносили через 15 минут и животным давали нормально восстановиться после операции. Животные подкожно получали вторую дозу бупренорфина 0,01-0,05 мг/кг приблизительно через 6-8 часов после операции и два раза в сутки (2 р./сут.) каждые 6-8 часов в течение двух дней после операции.

Контролируемые параметры.

(i) Осмотр и масса тела.

Уровень смертности и заболеваемости отслеживали два раза в сутки вместе с наблюдениями у клетки, при этом особенное внимание уделялось обоим глазам. Из-за значительного количества манипуляций в ходе фазы 1 данного исследования в отношении дозирования и визуализации $n=18$ животных умерло (группа 1: 4 мыши; группа 2: 3 мыши; группа 3: 3 мыши; группа 4: 3 мыши; группа 5: 5 мышей) или было подвергнуто эвтаназии до окончания исследования. В ходе пилотного исследования для фазы 2 летальных исходов не было. В ходе фазы 2 количество сеансов визуализации уменьшили, и только $n=3$ мыши умерло (группа 1: 1 мышшь; группа 2: 1 мышшь; группа 4: 1 мышшь). Массу тела измеряли перед индукцией модели и на момент проведения вскрытия.

(ii) Осмотры глаз и изображения светлого поля.

Морфологию поверхности глаза на исходном уровне оценивал ветеринар-офтальмолог при помощи щелевой лампы до включения в исследование. Изображения светлого поля получали для анализа помутнения роговицы, используя программное обеспечение Image J, на исходном уровне и в дни, указанные в дизайне исследования.

(iii) Окрашивание флуоресцеином.

В моменты времени, указанные в таблице экспериментального дизайна, животных подвергали окрашиванию поверхности глаза флуоресцеином. Приблизительно 1,5 мкл 2,5% флуоресцеина натрия наносили на поверхность роговицы на 30 секунд с последующим промыванием 1X PBS с помощью шприца объемом 1 мл. Окрашивание роговицы фотографировали под кобальтово-синим светом с помощью фотоаппарата Nikon Digital SLR, закрепленного на треноге. Линзу фотоаппарата перевели в ручной режим, настроив расстояние фокусировки линзы на 1 фут. Глаз животного помещали в центр видоискателя и получали изображения, сохраняя при этом соответствующее расстояние между линзой фотоаппарата и глазом животного. Площадь (в пикселях) окрашивания флуоресцеином для каждого глаза в каждый момент времени определяли с помощью программного обеспечения Image J (NIH).

(iv) Оптическая когерентная томография (ОКТ).

В дни, указанные в таблице экспериментального дизайна, всех животных подвергали процедуре визуализации ОКТ переднего участка глаза. Животных анестезировали и роговицы промывали PBS до проведения исследования ОКТ.

(v) Гистология (только фаза 1).

В день 3 после финальных измерений в течение жизни подгруппу животных подвергали гуманной эвтаназии путем удушения углекислым газом с последующей торакотомией. Глаза животных, подвергавшиеся хирургическому вмешательству, собирали в 10% нейтральный забуференный формалин. На следующий день глаза помещали в 70% этанол, заливали парафином и выполняли саггитальные срезы. Три предметных стекла, содержащих серийные срезы зрительного нерва, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для морфологии. Кроме того, блоки, оставшиеся после окрашивания H&E, дополнительно секционировали на срезы и проводили

иммуногистохимию для окрашивания на TUJ-1 (также известный как бета-III тубулин) для оценки иннервации роговицы. DAPI (синий) использовали в качестве контрастного красителя, чтобы выделить все ядра. Анализ предметных стекол выполнял ветеринар-офтальмолог.

(vii) Результаты.

1) Ускоренное заживление (окрашивание флуоресцеином)

Более интенсивное окрашивание на TUJ01 наблюдали в образцах ткани на 3 день после операции, полученных от животных, которым вводили 0,1% dHGF, по сравнению с животными, получавшими носитель PBS (Фиг. 1), что свидетельствует о иннервации роговицы у животных, которым вводили 0,1% dHGF. Время заживления эпителия было меньшим при введении 0,1% dHGF ($p=0,041$) и 0,2% dHGF при сравнении с контролем PBS и 0,1% mNGF (Фиг. 2). Время до полного заживления 50% глаз составило три дня в группе с 0,1% dHGF, что составило половину времени, которое потребовалось группе с PBS (шесть дней; $p=0,41$). Как в группе с 0,2% dHGF, так и в группе с 0,1% mHGF скорость заживления была в две трети раза выше, чем скорость заживления в группе с PBS (четыре дня по сравнению с шестью днями). Кроме того, группа с 0,1% mHGF была значительно быстрее, чем группы с mNGF ($p=0,053$) и PBS ($p=0,0018$). У животных, получавших 0,1% dHGF, закрытие начиналось раньше, и > 75% достигали закрытия к дню 4 после лечения; аналогичный эффект наблюдали для 0,1% mHGF (Фиг. 2). Для сравнения, только 50% животных, получавших лечение PBS, достигали полного закрытия раны и не ранее дня 6.

2) Предотвращение образования рубцов (анализ изображений светлого поля)

После операции и ежедневного лечения с помощью PBS (носитель), 0,1% или 0,2% dHGF, 0,1% mNGF или 0,1% mHGF все исследуемые препараты, за исключением контроля PBS, эффективно уменьшали средний размер рубца ко дню 7 (Фиг. 3). Количественная оценка эффекта исследуемых препаратов на образование рубцов показала, что 0,1% mHGF оказывал наиболее сильный эффект, на втором месте оказался 0,1% dHGF. В группах с dHGF рубцы были значительно меньше ($p=0,0439$ и $p=0,0126$ для групп с 0,1% и 0,2%, соответственно), чем в группах с контролем PBS, однако они значительно не отличались друг от друга ($p=0,7406$). Средняя площадь рубцов в группе с 0,1% mHGF была значительно меньше в день 7, чем в группах с контролем ($p=0,0001$) и 0,1% mNGF ($p=0,0029$). Средний размер рубцов в группах с контролем и 0,1% mNGF значительно не отличался ($p=0,2481$) друг от друга.

Эффект на размер, оказываемый HGF, отражен в анализе времени до закрытия (см. раздел vii.1). Уменьшение образования рубцов с помощью 0,1% mHGF было приблизительно в 9 раз выше, чем уменьшение образования рубцов, наблюдаемое в контрольной группе, тогда как процент уменьшения с помощью 0,1% и 0,2% dHGF был более чем в 5 раз больше, чем у контроля. Процент уменьшения с помощью 0,1% mNGF составлял приблизительно половину от этого процента в группах с dHGF, причем численно, но не статистически значимо большее уменьшение размера рубца, чем в

контрольной группе с PBS.

3) Устранение рубцов (анализ изображений светлого поля)

После хирургии для удаления эпителия роговицы и передней стромы и после двух повторных соскобов для удаления исключительно эпителия животные, которым вводили PBS, демонстрировали лишь незначительное изменение размера рубца, тогда как животные, получавшие 0,1% dHGF, 0,2% dHGF или 0,1% mHGF, демонстрировали уменьшение размера рубца роговицы. В контрольной группе с PBS средний размер рубца продолжал увеличиваться более чем на 20% от исходного уровня (день 8) до дня 21. Напротив, рубцы в трех группах с HGF уменьшились в размере более чем на 35% от исходного уровня до дня 21, причем общая разница среднего размера составила 55% по сравнению с группой с PBS. Разница между 0,1% dHGF и 0,2% dHGF по сравнению с контролем PBS была статистически значимой ($p=0,0054$ и $p=0,0015$, соответственно), как показано на Фиг. 4. Средний размер рубца в группе с 0,1% mHGF уменьшился с дня 8 до дня 21, однако статистически не отличался от контроля PBS ($p=0,0859$). Результаты лечения с помощью 0,1% или 0,2% dHGF статистически не отличались ($p=0,7558$).

Исходя из результатов этого исследования, лечение с помощью 0,1% dHGF с последующим единичным удалением эпителия и передней стромы (фаза 1) или несколькими соскобами эпителия (фаза 2) привело к более быстрому закрытию раны (фаза 1) и большей степени уменьшения размера рубца (фаза 2) при введении дозы четыре раза в сутки, начиная с даты первой хирургической процедуры (фаза 1) или с дня 11 (фаза 2).

В ходе фазы 1 всем животным проводили одну хирургическую процедуру для удаления эпителия и передней стромы роговицы в пределах 2 мм области. Всем животным вводили дозу четыре раза в сутки после процедуры. Тогда как у приблизительно 50% животных, получавших лечение PBS (контрольный носитель), глаза заживали ко дню 7 после операции, у > 75% животных, получавших 0,1% dHGF или 0,1% mHGF, глаза заживали ко дню 7 (Фиг. 2 и Фиг. 3). Кроме того, больший процент роговиц у этих животных полностью заживал ко дню 3 после операции при сравнении с лечением с помощью PBS (> 60% относительно 30%, соответственно). Анализ иннервации роговицы в день 3 путем иммунофлуоресценции выявил повышение степени окрашивания на TUJ-1 у животных, получавших лечение 0,1% dHGF (Фиг. 1).

В ходе фазы 2 животным проводили аналогичную хирургическую процедуру, что и в ходе фазы 1, однако им затем проводили две дополнительные процедуры для удаления исключительно эпителия. В этом эксперименте животные начинали получать лечение после первого соскоба эпителия. В этих условиях животные, которые получали HGF (0,1% dHGF, 0,2% dHGF или 0,1% mHGF), продемонстрировали значительное уменьшение размера рубцов по сравнению с глазами, получавшими лечение PBS, причем размер рубца уменьшался на > 35% для всех глаз, получавших лечение HGF (Фиг. 4).

Результаты этого исследования указывают, что местное введение HGF после повреждения эпителия роговицы приводило к более быстрому заживлению и уменьшению размера рубцов в моделях одного или нескольких повреждений.

Пример 5. Эффективность местных составов в мышинной модели бактериального кератита роговицы, вызванного LPS

Эффективность местных составов HGF при применении для лечения НТК была протестирована на мышинной модели бактериального кератита роговицы, вызванного LPS. Тестирование на эффективность проводили на самцах мышей C57BL/6. В один глаз каждого из 40 животных вводили 4 раза в сутки (4 р./сут.) с интервалом 3 часа между дозами в дни 4-9 после повреждения исследуемый препарат объемом 3,5 мкл с помощью пипетки. В поврежденный глаз вводили исследуемый препарат или контроли, как указано в экспериментальном дизайне (таблица 11). Исходный раствор липополисахарида (LPS) из *E. coli* O111:B4 (Invivogen) разбавляли 1 мл стерильной воды, разделяли на аликвоты и хранили в соответствии с протоколом производителя. В день введения дозы разбавленный раствор LPS дополнительно разбавляли в соотношении 1:1 (об./об.) с помощью PBS для доставки приблизительно 5 мкг материала LPS посредством инъекции объемом 2,0 мкл.

Таблица 11. Экспериментальный дизайн тестирования на эффективность HGF при лечении НТК в мышинной модели бактериального кератита роговицы, вызванного LPS

№ группы	Кол-во животных*	Лечение (4 р./сут.), начиная в день 10	Конечные точки/процедуры	Эвтаназия
1	10	PBS	Осмотр глаз на исходном уровне (щелевая лампа)* Цифровая фотография светлого поля (день 0, n=5 глаз до инъекции), дни 5-9 Окрашивание флуоресцеином в дни по 7. ОКТ (день 0, n=5 глаз до инъекции) и день 8.	День 10
2	10	0,1% (масс./об.) dHGF**		
3	10	0,2% (масс./об.) dHGF**		
4	10	0,1% (масс./об.) mNGF**		

* Осмотры глаз на исходном уровне проводили для n=5 мышей; всех включенных в исследование животных оценивали в последующие дни.

Сокращения:

mNGF - мышинный фактор роста нервов

dHGF - человеческий фактор роста гепатоцитов (SEQ. ID NO. 1)

** составлен в PBS в указанной концентрации.

Повреждение роговицы, используя LPS из *E. coli* O111:B4

Перед индукцией модели исследуемым субъектам подкожно вводили бупренорфин в дозе 0,01-0,05 мг/кг. Животным также местно вводили коктейль тропикамида (1,0%) и фенилэфрина (2,5%) для расширения глаз и смещения их вперед. Животных затем успокаивали для проведения хирургической процедуры с помощью коктейля

кетамин/ксилазин и одной капли 0,5% пропаракаина HCl. Щипцы (например, Dumont #4) использовали для смещения глаза животного вперед и с помощью иглы 34G, присоединенной к шприцу объемом 2,5 мкл, вводили приблизительно 5 мкг LPS (*E. coli* O111:B4) в объеме 2,0 мкл. Инъекции LPS выполняли в дни 0 и 4. Первую дозу лечения вводили в поврежденный глаз после дня 4 инъекции LPS. Местные антибиотики (офлоксацин) наносили через 15 минут и животным давали нормально восстановиться после операции. Животные подкожно получали вторую дозу бупренорфина 0,01-0,05 мг/кг приблизительно через 6-8 часов после операции и два раза в сутки каждые 6-8 часов в течение двух дней после операции.

Контролируемые параметры

(i) Осмотр и масса тела.

Уровень смертности и заболеваемости отслеживали два раза в сутки вместе с наблюдениями у клетки. Массу тела измеряли перед индукцией модели и на момент проведения вскрытия.

(ii) Осмотр глаз и изображения светлого поля.

Морфологию поверхности глаза оценивал ветеринар-офтальмолог при помощи щелевой лампы до включения в исследование. Изображения светлого поля получали для анализа помутнения роговицы, используя программное обеспечение Image J, на исходном уровне и в дни, указанные в дизайне исследования.

(iii) Окрашивание флуоресцеином.

В моменты времени, указанные в таблице экспериментального дизайна, животных подвергали окрашиванию поверхности глаза флуоресцеином. Приблизительно 1,5 мкл 2,5% флуоресцеина натрия наносили на поверхность роговицы на 30 секунд с последующим промыванием 1X PBS с помощью шприца объемом 1 мл. Окрашивание роговицы фотографировали под кобальтово-синим светом с помощью фотоаппарата Nikon Digital SLR, закрепленного на треноге. Линзу фотоаппарата перевели в ручной режим, настроив расстояние фокусировки линзы на 1 фут. Глаз животного помещали в центр видоискателя и получали изображения, сохраняя при этом соответствующее расстояние между линзой фотоаппарата и глазом животного. Площадь (в пикселях) окрашивания флуоресцеином для каждого глаза в каждый момент времени определяли с помощью программного обеспечения Image J (NIH).

(iv) Оптическая когерентная томография (ОКТ).

В дни, указанные в таблице экспериментального дизайна, всех животных подвергали процедуре визуализации ОКТ переднего участка глаза. Животных анестезировали и роговицы промывали PBS до проведения исследования ОКТ.

(v) Результаты.

После индукции модели и введения лечения четыре раза в сутки с помощью PBS (контроль), 0,1% или 0,2% dHGF, или 0,1% mNGF группы 2 и 3 (0,1% и 0,2% dHGF, соответственно) продемонстрировали наибольшую степень уменьшения размера рубца к дню 9. При нормализации к группе 1 в группах 2 и 3 размер рубца уменьшался почти на

60%, тогда как исследуемый препарат в группе 4 уменьшал размер рубца приблизительно на 25% (Фиг. 5). Средняя площадь рубца была значительно меньше для 0,1% dHGF ($p=0,0110$) и 0,2% dHGF ($p=0,0028$) по сравнению с контролями PBS. Рубцы были приблизительно в 5 раз больше при введении контролей PBS по сравнению с группами с 0,1% и 0,2% HGF и приблизительно в 2,5 раза больше при введении PBS, чем в группе с 0,1% mNGF ($p=0,0417$). Полученные средние размеры рубцов в двух группах dHGF значительно не отличались ($p=0,6176$) друг от друга (Фиг. 5).

Таким образом, результаты этого исследования позволяют предположить, что лечение поврежденного глаза с помощью HGF после повреждения эпителия роговицы, вызванного стромальным введением LPS *E. Coli*, привело к улучшению скорости заживления.

Различные модификации изобретения, в дополнение к описанным в настоящем документе, будут очевидны для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания. Такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Каждая ссылка, включая все патенты, заявки на патенты и публикации, цитируемые в настоящей заявке, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики нейротрофического кератита у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фактора роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor - HGF) или фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor - FGF).
2. Способ по п. 1, в котором HGF или FGF является очищенным.
3. Способ по п. 1 или п. 2, в котором HGF или FGF вводят в комбинации со вспомогательным веществом, проникающим в строму роговицы.
4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором HGF или FGF изготовлены в виде жидкой фармацевтической композиции.
5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором HGF или FGF вводят в глаз.
6. Способ по п. 5, в котором HGF или FGF местно вводят в глаз.
7. Способ по п. 5, в котором HGF или FGF вводят в глаз путем инъекции.
8. Способ по п. 7, в котором HGF или FGF вводят субконъюнктивально.
9. Способ по п. 7, в котором HGF или FGF вводят интракамерально.
10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором жидкая фармацевтическая композиция содержит HGF или FGF в концентрации от около 0,01% (масс./об.) до около 1,0% (масс./об.).
11. Способ по п. 10, в котором жидкая фармацевтическая композиция содержит HGF или FGF в концентрации от около 0,08% (масс./об.) до около 0,25% (масс./об.).
12. Способ по п. 10, в котором жидкая фармацевтическая композиция содержит HGF или FGF в концентрации около 0,1% (масс./об.).
13. Способ по п. 10, в котором жидкая фармацевтическая композиция содержит HGF или FGF в концентрации около 0,2% (масс./об.).
14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором HGF или FGF вводят в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом.
15. Способ по п. 14, в котором дополнительный терапевтический агент представляет собой дополнительный фактор роста.
16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором HGF содержит полипептидную последовательность любой из SEQ ID NOS: 1-27.
17. Способ по любому из пп. 1-15, в котором HGF содержит полипептидную последовательность, которая на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.
18. Способ по любому из пп. 1-15, в котором HGF содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1.
19. Фармацевтическая композиция, содержащая:
 - от около 0,01% до около 1,0% (масс./об.) HGF;
 - буфер, который может поддерживать pH композиции от около 5,8 до около 6,2;
 - от около 100 до около 300 мМ стабилизатора, выбранного из трегалозы, пролина, сорбита и их смеси;
 - необязательно модификатор тоничности, который может обеспечить

осмоляльность композиции от около 250 мОсм/кг H₂O до около 500 мОсм/кг H₂O; и
необязательно поверхностно-активное вещество.

20. Композиция по п. 19, содержащая от около 0,05% до около 0,5% (масс./об.)
HGF.

21. Композиция по п. 19, содержащая от около 0,08% до около 0,25% (масс./об.)
HGF.

22. Композиция по п. 19, содержащая около 0,1% (масс./об.) HGF.

23. Композиция по п. 19, содержащая около 0,2% (масс./об.) HGF.

24. Композиция по любому из пп. 19-23, причем композиция имеет рН около 6,0.

25. Композиция по любому из пп. 19-24, содержащая от около 150 до около 250 мМ
стабилизатора.

26. Композиция по п. 25, содержащая около 200 мМ стабилизатора.

27. Композиция по любому из пп. 19-26, в которой стабилизатор представляет
собой трегалозу или пролин.

28. Композиция по любому из пп. 19-26, в которой стабилизатор представляет
собой трегалозу.

29. Композиция по любому из пп. 19-26, в которой стабилизатор представляет
собой пролин.

30. Композиция по любому из пп. 19-26, в которой стабилизатор представляет
собой сорбит.

31. Композиция по любому из пп. 19-30, в которой буфер представляет собой
цитратный буфер.

32. Композиция по любому из пп. 19-30, в которой буфер представляет собой
цитрат натрия.

33. Композиция по любому из пп. 19-30, содержащая от около 10 до около 50 мМ
буфера.

34. Композиция по любому из пп. 19-33, в которой осмоляльность композиции
составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

35. Композиция по любому из пп. 19-33, которая не содержит модификатор
тоничности.

36. Композиция по любому из пп. 19-33, содержащая модификатор тоничности,
который представляет собой соль щелочного металла.

37. Композиция по любому из пп. 19-33, содержащая модификатор тоничности,
который представляет собой хлорид натрия.

38. Композиция по любому из пп. 19-37, которая содержит поверхностно-активное
вещество.

39. Композиция по п. 38, в которой поверхностно-активное вещество выбрано из
полисорбата 80 (PS80), полаксомера 188 и полаксомера 407.

40. Композиция по п. 38, в которой поверхностно-активное вещество представляет
собой полисорбат 80 (PS80).

41. Композиция по любому из пп. 19-40, в которой поверхностно-активное вещество присутствует в количестве от около 0,01% до около 0,1% (масс./об.).

42. Композиция по любому из пп. 19-40, в которой поверхностно-активное вещество присутствует в количестве от около 0,02% до около 0,8% (масс./об.).

43. Композиция по любому из пп. 19-40, в которой поверхностно-активное вещество присутствует в количестве около 0,05% (масс./об.).

44. Водная фармацевтическая композиция, содержащая:
около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы, пролина или сорбита;
около 0,05% (масс./об.) поверхностно-активного вещества;
причем рН композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

45. Водная фармацевтическая композиция по п. 44, содержащая:
около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем рН композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

46. Водная фармацевтическая композиция по п. 44, содержащая:
около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ пролина;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем рН композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

47. Водная фармацевтическая композиция по п. 44, содержащая:
около 0,1% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ сорбита;
около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);
причем рН композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 350 мОсм/кг H₂O.

48. Водная фармацевтическая композиция, содержащая:
около 0,2% (масс./об.) HGF;
около 20 мМ цитрата натрия;
около 200 мМ трегалозы, пролина или сорбита;
около 0,05% (масс./об.) поверхностно-активного вещества;
причем рН композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции

составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

49. Водная фармацевтическая композиция по п. 48, содержащая:

около 0,2% (масс./об.) HGF;

около 20 мМ цитрата натрия;

около 200 мМ трегалозы;

около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);

причем рН композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

50. Водная фармацевтическая композиция по п. 48, содержащая:

около 0,2% (масс./об.) HGF;

около 20 мМ цитрата натрия;

около 200 мМ пролина;

около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);

причем рН композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

51. Водная фармацевтическая композиция по п. 49, содержащая:

около 0,2% (масс./об.) HGF;

около 20 мМ цитрата натрия;

около 200 мМ сорбита;

около 0,05% (масс./об.) полисорбата 80 (PS80);

причем рН композиции составляет около 6,0, а осмоляльность композиции составляет около 450 мОсм/кг H₂O.

52. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-51, в которой HGF содержит полипептидную последовательность любой из SEQ ID NOS: 1-27.

53. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-51, в которой HGF содержит полипептидную последовательность, которая на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

54. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-51, в которой HGF содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1.

55. Способ лечения или профилактики болезни глаз у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 19-55.

56. Способ по п. 55, в котором болезнь глаз представляет собой заболевание роговицы, выбранное из нейротрофического кератита, персистирующего дефекта роговицы, язвы роговицы, синдрома сухого глаза, микробного кератита, бактериального кератита, вирусного кератита, грибкового кератита, химического ожога, термического ожога, механической травмы, эрозии роговицы, нарушения эндотелия, буллезной кератопатии, дистрофии роговицы Фукса, рубца роговицы, синдрома Сьогрена или послеоперационных осложнений.

57. Способ по п. 55, в котором болезнь глаз представляет собой помутнение или

рубцевание роговицы.

58. Способ по п. 55, в котором болезнь глаз представляет собой нейротрофический кератит.

59. Способ по любому из пп. 55-58, в котором композицию вводят в комбинации со вспомогательным веществом, проникающим в строму роговицы.

60. Способ по любому из пп. 55-58, в котором композицию вводят в глаз.

61. Способ по п. 60, в котором композицию местно вводят в глаз.

62. Способ по п. 60, в котором композицию вводят в глаз путем инъекции.

63. Способ по п. 62, в котором композицию вводят субконъюнктивально.

64. Способ по п. 62, в котором композицию вводят интракамерно.

65. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, в которых HGF представляет собой активированный HGF.

66. Композиция или способ по п. 65, в которых активированный HGF представляет собой активированный dHGF.

67. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, в которых HGF содержит:

(а) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 2; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 2; необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 2; или

(б) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 7; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 7, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 7; или

(с) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 8; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 8, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 8; или

(д) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 9; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 9, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 9; или

SEQ ID NO: 23; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 23, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 23; или

(t) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 24; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 24, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 24; или

(u) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 25; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 25, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 25; или

(v) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 26; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 26, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 26; или

(w) первый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 27; и второй полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90% идентичную аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 27, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 27.

68. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, в которых HGF содержит:

(a) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 2; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 2, необязательно при этом первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 2; или

(b) первый полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 32-494 из SEQ ID NO: 7; и второй полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам 495-728 из SEQ ID NO: 7, необязательно при этом

первый полипептид содержит делецию аминокислот, соответствующих аминокислотам 161-165 из SEQ ID NO: 27.

69. Композиция или способ по п. 66, в которых первый полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, а второй полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37.

70. Композиция или способ по п. 66 или п. 67, в которых N-концевая аминокислота первого полипептида представляет собой пирролидонкарбоновую кислоту.

71. Композиция или способ по любому из пп. 65-68, в которых первый полипептид и второй полипептид соединены посредством одной или большего количества дисульфидных связей.

72. Композиция или способ по любому из пп. 65-69, в которых HGF способен связываться с с-MET и/или активировать путь MAPK в эпителиальных клетках.

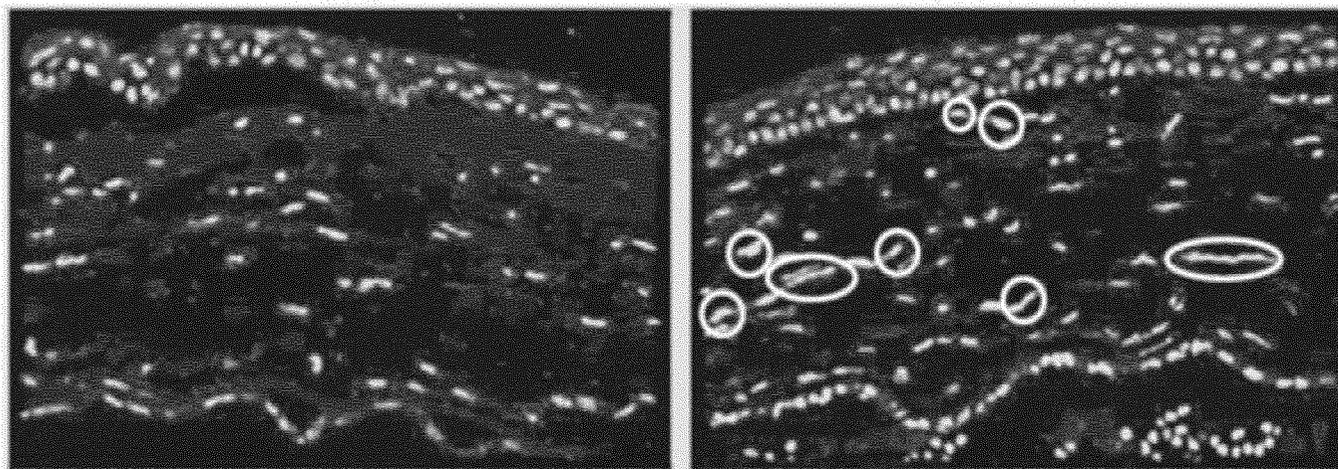
По доверенности

103 OD
Предметное стекло 3

228 OD
Предметное стекло 16

PBS

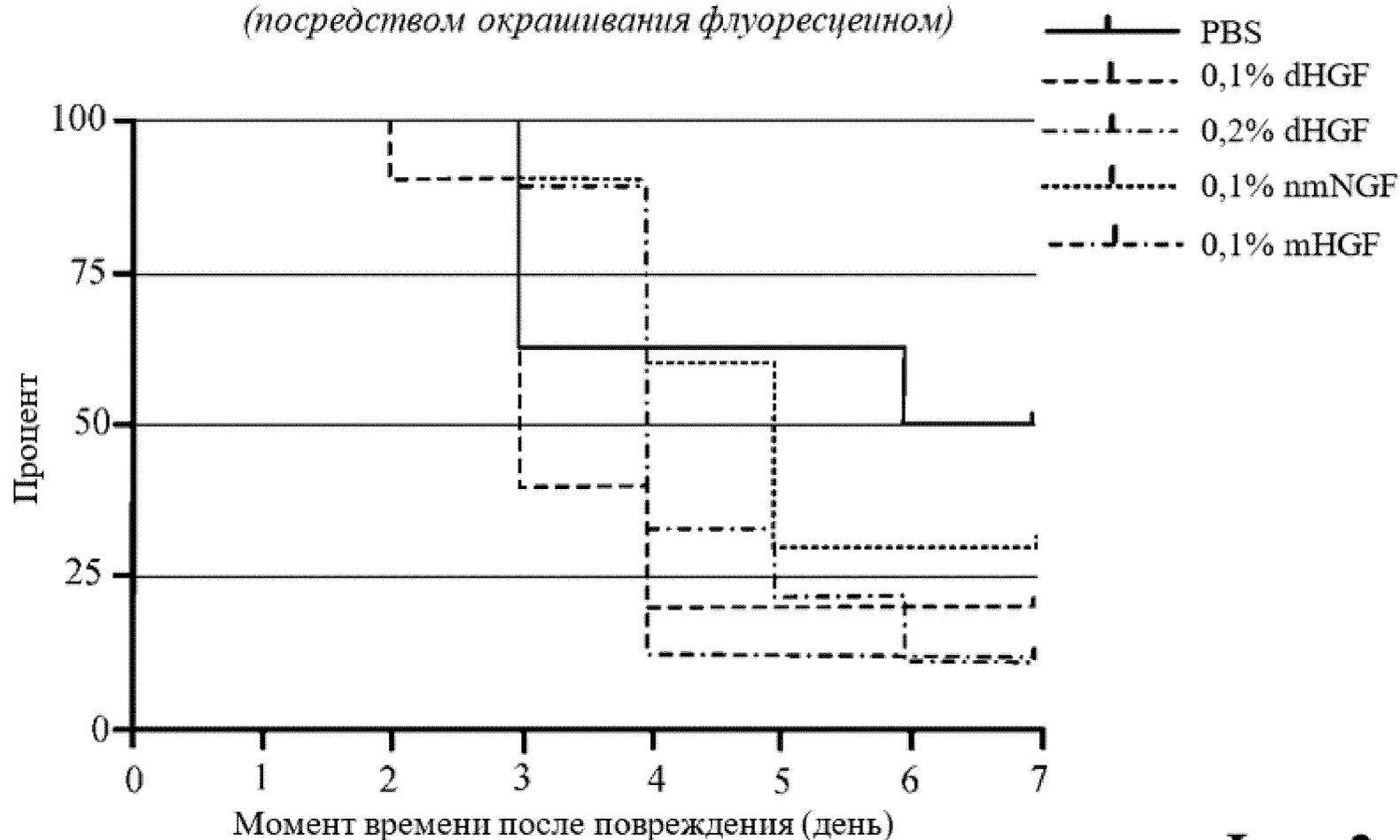
0,1% TAI



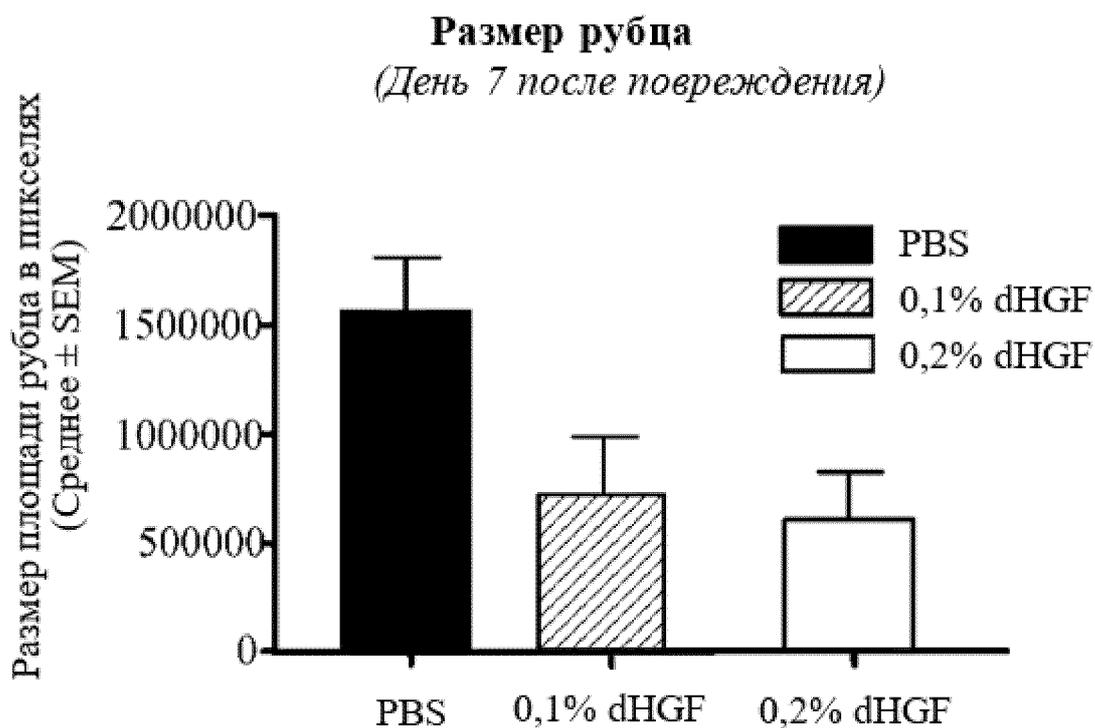
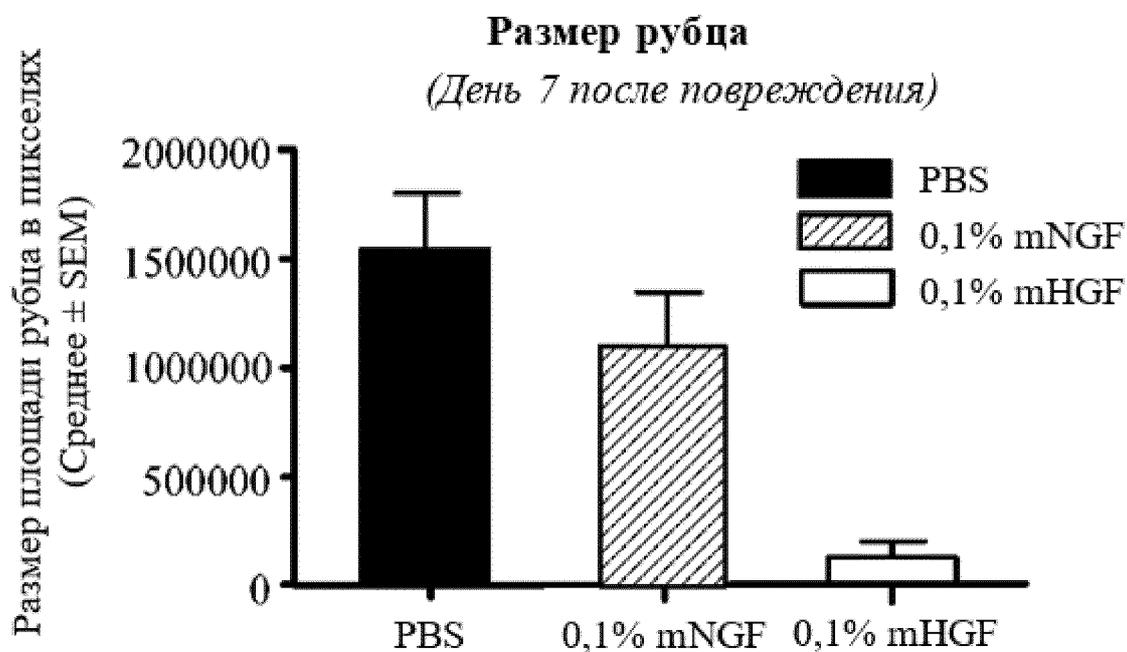
TUJ-1 DAPI

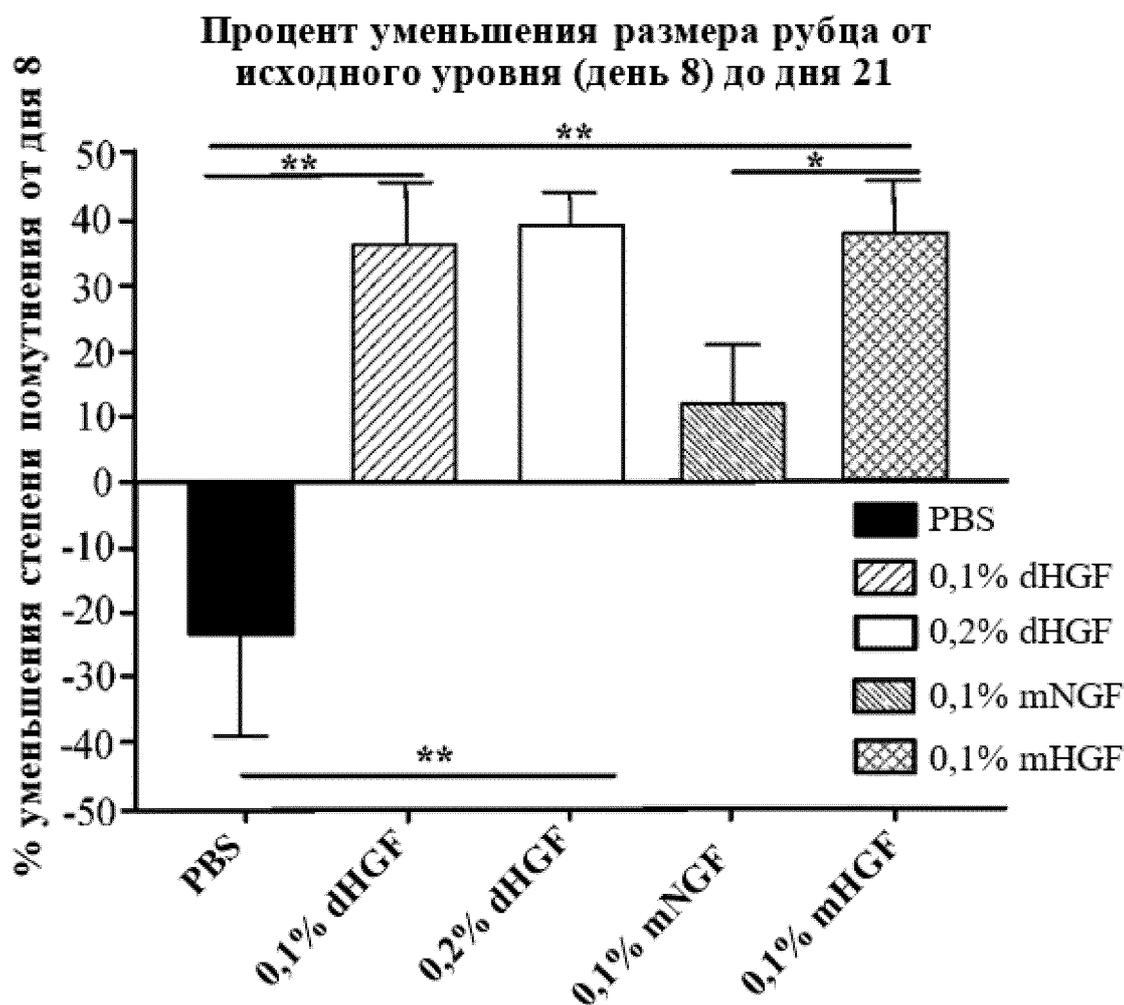
Фиг. 1

Фаза 1: Время до закрытия раны
(*посредством окрашивания флуоресцеином*)



Фиг. 2

**Фиг. 3А****Фиг. 3В**

**Фиг. 4А**

Лечение

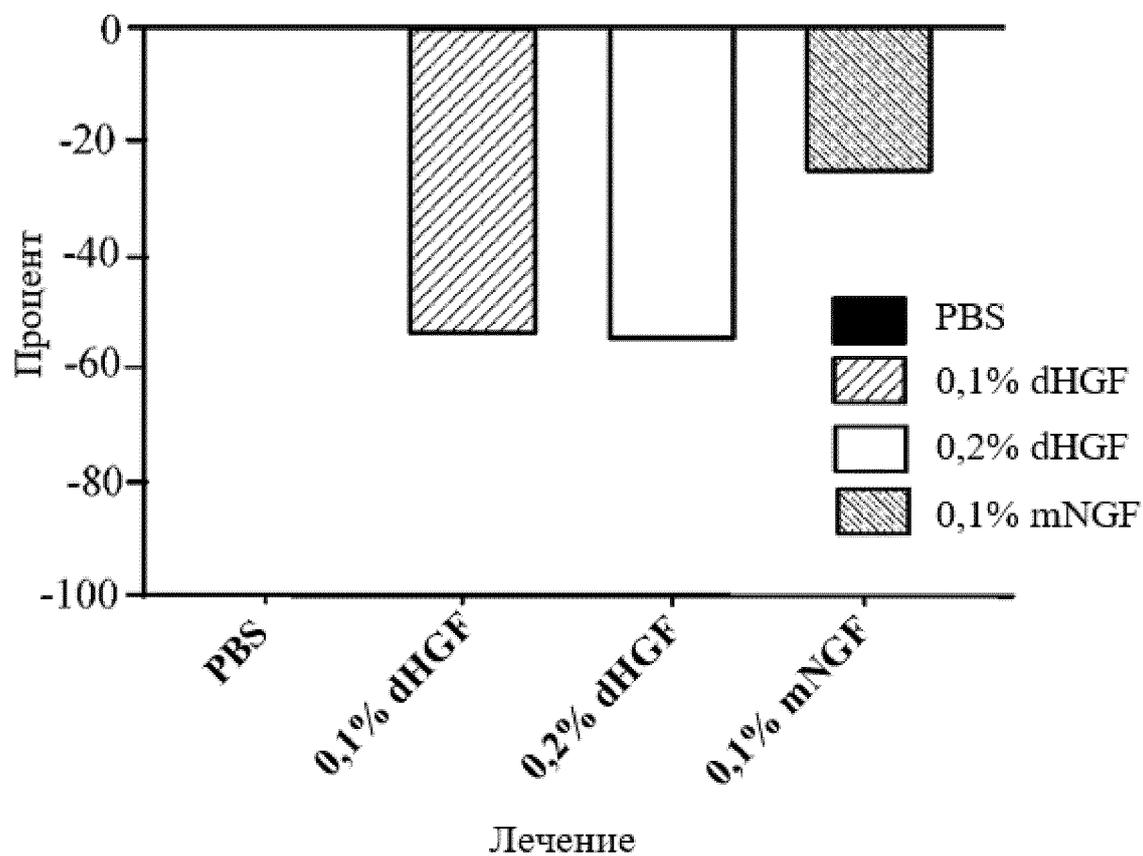
Сравнение	Р-значение	Значимость
PBS по сравн. с 0,1% dHGF	0,0054	**
PBS по сравн. с 0,2% dHGF	0,0015	**
PBS по сравн. с mNGF	0,0859	н/з
PBS по сравн. с mHGF	0,0027	**
0,1% dHGF по сравн. с 0,2% dHGF	0,7588	н/з
mNGF по сравн. с mHGF	0,0228	*

н/з = не значимо

** =

* =

Фиг. 4В

Процент изменения размера рубца*(Нормализованный к PBS в день 9)***Фиг. 5**