

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-8623

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN UN MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF-BETA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 38/18; A61P 29/00

71. SOLICITANTE RENDVO LIMITED

DOMICILIO MANCHESTER, INGLATERRA, REINO UNIDO

74. APODERADO GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D. C.,

(FORMA P-10)

SS

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-008623- -00000-0000

Fecha: 2008-01-30 10:41:55 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **RENOVO LIMITED**

Dirección: Incubator Building, 48 Grafton Street

Nacionalidad o domicilio: Manchester, Inglaterra, Reino Unido

Lugar de Constitución: Reino Unido

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **GERMAN CASTILLO GRAU**

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 74 60 Fax: 285 92 67

E-mail info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

Número 17.017.671 de TP 2.978 del
Bogotá C.S.J.

4

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre: Mark Ferguson; Sharon O'Kane; Hugh Lavery; Nick Occleston; Jane Kelly; Wayne Burrill

Dirección Renovo ltd, Incubator Building, 48 Grafton Street

Nacionalidad o Domicilio: Manchester, Inglaterra, Reino Unido

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2006/002574 Fecha: Julio 12, 2006

Publicación Internacional No. WO 2007/007095 A3 Fecha: Enero 18, 2007

6

Título (54) COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN UN MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF-BETA

7

Clasificación Internacional (51) A61K 38/18; A61P 29/00

8

Prioridad

Si

☒

No

☐

(33) País de origen

Gran Bretaña Gran
Gran Bretaña Gran

(32) Fecha

Julio 12, 2005
Julio 12, 2005

(31) Número de Solicitud

0514259.1
0514260.9

9

Comprobante de pago N°:

7311

Fecha:

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

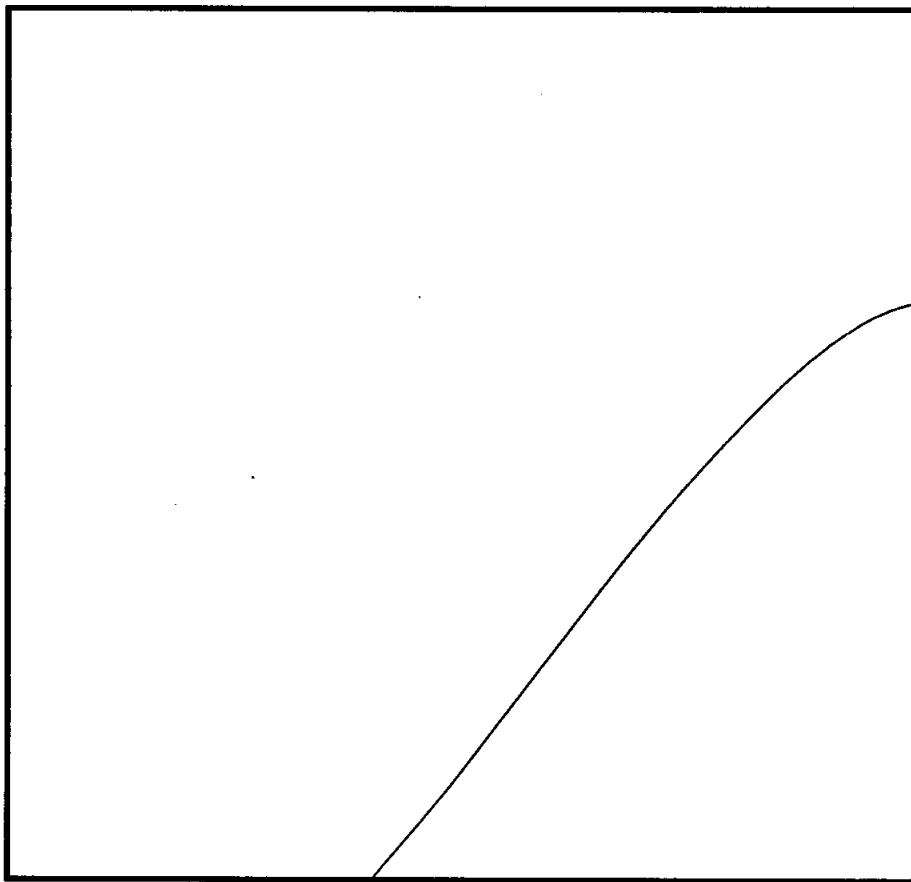
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA:

C.C. 17'017.671
de BogotáI.P.No. 2978
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

1 CIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 7,311
FECHA : ENERO 28 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-008623- -00000-0000

Fecha: 2008-01-30 10:41:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2546094	28/01/2008	6,567,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

EXTRACTO PARA LA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

.(21) No. SOLICITUD	.(51) INT.CL: A61K 38/18; A61P 29/00
.(22) FECHA DE PRESENTACION	.(71) SOLICITANTE: RENOVO LIMITED
.(30) PRIORIDAD	
.(31) No. DE SOLICITUD 0514259.1 0514260.9	.(72) INVENTOR(ES): Mark Ferguson Sharon O'Kane Hugh Lavery Nick Occleston Jane Kelly Wayne Burrill
.(32) FECHA DE PRESENTACION Julio 12, 2005 Julio 12, 2005	.(74) APODERADO: GERMAN CASTILLO GRAU
.(33) PAIS Gran Bretaña Gran Bretaña	

.(54) TITULO: COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN UN
MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF-BETA

.(57) RESUMEN

La presente invención tiene relación con las composiciones farmacéuticas que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β . En especial, la invención proporciona las composiciones farmacéuticas mejoradas que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β , en donde las composiciones proporcionan una mejora de la recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β y/o mejora de la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporado en las composiciones. La invención también proporciona métodos que usan dichas las composiciones farmacéuticas. Además, la invención también proporciona medicamentos para la prevención o reducción del dolor de la inyección.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención tiene relación con las composiciones farmacéuticas que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β . En especial, la invención proporciona las composiciones farmacéuticas mejoradas que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β , en donde las composiciones proporcionan una mejora de la recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β y/o mejora de la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en las composiciones. La invención también proporciona métodos que usan dichas las composiciones farmacéuticas. Además, la invención también proporciona medicamentos para la prevención o reducción del dolor de la inyección.

Los factores beta transformadores del crecimiento (TGF- β s) representan una familia de citocinas que tienen diversas actividades biológicas. Los TGF- β s pertenecen a un grupo más amplio de citocinas emparentadas que se conocen como la superfamilia del TGF- β . Los miembros de la superfamilia del TGF- β incluyen activinas, proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), hormona anti-Mulleriana (AMH), la subfamilia del factor neurotrófico derivado de la línea de las células gliales (GDNF) y la subfamilia del factor de crecimiento/diferenciación (GDF). Los miembros de la superfamilia del TGF- β comparten similitudes estructurales, como un motivo común de nudo de cisteína, así como vías comunes de transducción de señales. Algunos ejemplos ilustrativos de miembros de la superfamilia del TGF se muestran en La Figura 1.

Las actividades biológicas de los miembros de la superfamilia del TGF- β encuentran utilidad en muchos contextos terapéuticos diferente, y por ello hay gran interés en la aplicación farmacéutica de los miembros de la superfamilia del TGF- β .

Es sabido que el TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 desempeñan papeles importantes en la regulación de la respuesta de la cicatrización de heridas, mientras que la osteoinducción modulada por BMPs es útil en la aplicación terapéutica de la formación, curación y remodelación del hueso.

El TGF- β_1 encuentra uso en la la prevención o el tratamiento de la escleroderma, los trastornos de la angiogénesis, la enfermedad renal, la osteoporosis, enfermedades óseas y la glomerulonefritis.

El TGF- β_2 se puede usar en el tratamiento de gliomas, cáncer de células no pequeñas del pulmón, tumores pancreáticos, tumores sólidos, tumores del colon, tumores ováricos, degeneración macular relacionada con la edad, lesiones oculares, osteoporosis, retinopatía, úlceras, carcinoma, inflamación de la boca y escleroderma.

6

El TGF- β_3 se pueden usar en el tratamiento de trastornos fibróticos, escleroderma, trastornos de la angiogénesis, reestenosis, adherencias, endometriosis, enfermedad isquémica, inducción de hueso y cartilago fertilización *in vitro*, mucositis oral, enfermedad renal, prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices, reforzamiento de la reconexión neuronal en el sistema nervioso central y periférico, prevención, reducción o inhibición de las complicaciones de cirugía ocular (como cirugía LASIK o PRK).

Se sabe que muchos otros miembros de la superfamilia del TGF- β también tienen aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, se ha sugerido que el factor neurotrófico derivado de la línea de las células gliales (GDNF) es útil en el tratamiento de muchas enfermedades neurodegenerativas y neurológicas (como enfermedad de Parkinson, enfermedad de neurona motora, enfermedad de Alzheimer, y corea de Huntington), así como en la cicatrización de las heridas, el tratamiento de tejido de la cicatrización y aplicaciones oculares en el tratamiento del tejido corneal y las enfermedades de la córnea.

El Artemin (que también se conoce como neublastina o enovin) es adecuado para usar en la la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, dolor neuropático y neuropatía.

El Neurturin tiene aplicaciones terapéuticas en la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurológicas.

Se cree que el Persephin reviste utilidad terapéutica en el tratamiento de afecciones como inflamación, esclerosis múltiple, neoplasias, cierre de heridas y otras lesiones, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), infecciones bacterianas, virales y otras, inmunodeficiencia, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, isquemia cerebrovascular, y enfermedades degenerativas.

El BMP 15 (también conocido como Factor de Diferenciación del Crecimiento 9B) es útil en el tratamiento de la infertilidad femenina, en anticoncepción, así como en casos de lesión ósea y cicatrización de heridas.

Otro miembro de la superfamilia, el GDF9, tiene utilidad terapéutica en el tratamiento de la infertilidad femenina.

El Nodal se puede usar en el tratamiento de enfermedades musculares, osteoporosis, osteoartritis, cicatrización de heridas, enfermedad periodontal y enfermedades del tejido conectivo.

El BMP3 tiene usos médicos en los campos de las lesiones óseas, osteoporosis, cicatrización de heridas, lesiones del sistema nervioso, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Parkinson, enfermedad cerebrovascular y enfermedad renal. El BMP3b se puede usar en el tratamiento de las complicaciones del parto.

X

El BMP-5 se puede usar para tratar muchas de las mismas indicaciones del BMP-3, así como osteoporosis, enfermedades del tejido conectivo, lesión e incluso cicatrización de heridas, enfermedades óseas, enfermedades dentales, osteoartritis, enfermedad periodontal, isquemia cerebrovascular, insuficiencia renal y lesión cerebral.

El GDF-5 (también conocido como factor morfogenético derivado del cartílago) se puede usar en el tratamiento de artritis, artropatías y neoplasias.

El BMP10 se puede usar para tratar osteoporosis, cicatrización de heridas, úlceras, enfermedad periodontal, enfermedades óseas, quemaduras, enfermedades del tejido conectivo, tumores óseos, lesiones ósea y neoplasias.

El BMP-8 (también conocido como proteína osteogénica 2) se puede usar en el tratamiento de enfermedades óseas.

El BMP-6 tiene aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la isquemia cerebrovascular y el cáncer.

El BMP-7 se puede usar en el tratamiento de enfermedad renal, calcificación, enfermedades dentales, enfermedad de neurona motora, enfermedad de Parkinson, enfermedad periodontal, enfermedades óseas, isquemia cerebrovascular, insuficiencia renal, lesión cerebral, tejido de la cicatrización, enfermedad musculoesquelética y osteoporosis.

El BMP-2 se puede usar para tratar osteoporosis, enfermedades óseas incluidas las enfermedades musculoesqueléticas y la enfermedad periodontal.

El BMP-4 se puede usar en el tratamiento de enfermedades del riñón.

El GDF-3 tiene usos terapéuticos en el tratamiento de trastornos de la inmunidad, en tanto que el GDF-I se puede usar en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso, esclerosis múltiple y enfermedades neurológicas.

El GDF-8 (también conocido como miostatina) se puede usar en la la prevención o el tratamiento de enfermedades consuntivas de los músculos y la diabetes no insulino dependiente.

La familia de proteínas llamadas inhibinas se puede usar para tratar la infertilidad, enfermedades hematológicas, anemia, carcinoma, leucemia y hiperfosfatemia y cánceres, así como en anticoncepción.

La activina tiene usos terapéuticos en los campos de la escleroderma, los trastornos de la angiogénesis, cicatrización y fibrosis, reestenosis, adherencias, endometriosis, enfermedad isquémica, inducción de hueso y cartílago, fertilización in vitro, mucositis oral y cicatrización de heridas.

El GDF- 15 se pueden usar para tratar la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, isquemia cerebrovascular, demencia, trastornos de la inmunidad y neoplasias.

El factor inhibidor mulleriano (MIF), que también se conoce como hormona anti-Mulleriana o MIS, se puede usar en el campo del cáncer incluídas metástasis, leucemia linfóide, tumor de próstata, cáncer del cuello uterino, tumores de la mama, tumores oculares, tumores ováricos, enfermedad endocrina, hemangioma, endometriosis, inflamación, melanoma, neoplasias, carcinoma, tumores de piel, tumores del tracto genital femenino, enfermedades del sistema genital masculino, disfunción eréctil y síndrome de dificultad respiratoria.

El Eba^f (también conocido como Lefty) se puede usar en el tratamiento de enfermedades del cuero cabelludo incluyendo la alopecia, escleroderma, fibrosis, distrofia muscular, neoplasias, enfermedades autoinmunes, tratamiento del tejido de la cicatrización, cirrosis, fibrosis pulmonar, melanoma y carcinoma.

A pesar de los bien conocidos requisitos para las composiciones farmacéuticas que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β , existen muchos problemas reconocidos asociados con las composiciones que existen hoy en día. Entre estos problemas se encuentran la incapacidad común para recuperar una proporción de miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en una composición dada (un problema que puede surgir como resultado de la adsorción del miembro de la superfamilia del TGF- β al material de un recipiente en el cual se guarda la composición), y una disminución generalmente observada en el tiempo de la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados y almacenados en composiciones. Esto también tiene importantes implicaciones en la manufactura de cualquier miembro de la superfamilia del TGF- β terapéutico.

Constituye un objeto de la presente invención obviar o mitigar por lo menos algunos de los problemas que se asocian con las composiciones farmacéuticas del estado de la técnica que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β .

Conforme a la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar provisto en concentración suficiente para permitir una mejora de la recuperación y/o un aumento de la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β .

La presente invención también proporciona el uso de un azúcar para mejorar la recuperación y/o aumentar la actividad biológica de un miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en una composición farmacéutica. Se apreciará que es posible valorar el incremento de la actividad biológica después de la recuperación del TGF- β de la

composición. De preferencia la cantidad de un miembro de la superfamilia del TGF- β recuperado de la composición farmacéutica puede ser aumentada, y este miembro recuperado de la superfamilia del TGF- β puede tener un aumento de su actividad biológica. Los azúcares y miembros adecuados de la superfamilia del TGF- β (y las concentraciones tanto de los azúcares y como miembros de la superfamilia) para usar de conformidad con este aspecto de la invención se pueden seleccionar con base en cualquiera de las consideraciones establecidas en otra parte en donde en esta especificación hace referencia a cualquiera de los aspectos o versiones de la invención. En particular el TGF- β_3 puede ser un miembro adecuado de la superfamilia, y la maltosa puede ser un azúcar preferido. La combinación de maltosa y TGF- β_3 puede ser especialmente preferida.

De preferencia un miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en una composición farmacéutica de conformidad con la invención exhibirá un aumento de su actividad biológica (es decir, la actividad biológica exhibida por un miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en una composición farmacéutica de la invención será mayor que por la misma cantidad del mismo miembro de la superfamilia incorporado en una composición del estado de la técnica).

Más de preferencia, una composición farmacéutica de la invención debe permitir una mejor recuperación de un miembro de la superfamilia del TGF- β que ha sido incorporado, y el miembro de la superfamilia además exhibirá un aumento de su actividad biológica.

Los inventores han encontrado que los efectos beneficiosos conferidos por las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden obtener usando cualquier azúcar de los que hasta ahora se han examinado. Sin embargo, se puede preferir que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención comprendan un azúcar seleccionado de entre el grupo compuesto por maltosa, sacarosa, glucosa y manosa. Más de preferencia, el azúcar utilizado en las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se puede seleccionar de entre el grupo compuesto por maltosa y sacarosa, y la máxima preferencia es que el azúcar sea maltosa.

Para aliviar cualquier duda, términos como "las composiciones farmacéuticas de la invención" (o similares) tienen por objeto abarcar no sólo a las composiciones como definidas en el primer, tercer y cuarto aspectos de la invención, sino también a las composiciones farmacéuticas manufacturadas de conformidad con los usos de la invención.

La presente invención se basa en el hallazgo de los inventores de que las composiciones farmacéuticas que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β en presencia de azúcares adecuados, o concentraciones adecuadas de azúcares, brindan numerosas ventajas sorprendentes comparadas con las composiciones farmacéuticas conocidas del estado de la técnica. Estas ventajas incluyen un aumento de hasta cinco veces en la recuperación de los

19

miembros de la superfamilia del TGF- β de las composiciones farmacéuticas de la invención, así como un aumento de cuatro veces en la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en dichas composiciones.

En una versión preferida de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar, el cual azúcar está presente a una concentración de más de 50 mg/mL, para usar como medicamento. Una composición de conformidad con la invención puede comprender un azúcar provisto a una concentración de entre 51 y 200 mg/mL, de preferencia a una concentración de entre 60 y 150 mg/mL, más de preferencia a una concentración de entre 70 y 100 mg/mL, todavía más de preferencia a una concentración de entre 80 y 95 mg/mL, y la máxima preferencia a una concentración de entre 85 y 90 mg/mL.

En otra versión preferida de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar seleccionado de entre el grupo compuesto por glucosa y manosa, para usar como un medicamento.

Antes, el estado de la técnica había sugerido que el azúcar alcohol manitol representaba una excipiente preferido para usar en las composiciones farmacéuticas que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β . Los inventores han encontrado que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención proporcionan ventajas y efectos beneficiosos aun cuando se comparan con estas composiciones preferidas del estado de la técnica. En efecto, las sorprendentemente eficaces composiciones de la invención permiten un aumento de dos a cinco veces en la recuperación de un miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado comparado con esas formulaciones a base de manitol, así como hasta un aumento de cuatro veces en la actividad biológica.

Las composiciones de conformidad con la invención proporcionan beneficios sobre el estado de la técnica tanto en términos de la mejor recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β como del incremento inherente de la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados a tales composiciones. El estado de la técnica no contiene indicación de que los azúcares se puedan con tan gran provecho, y ciertamente no contiene ninguna sugerencia de que el uso de composiciones que comprenden azúcares a una concentración mayor de 50 mg/mL proporcionan cualquiera de las ventajas identificadas por los inventores.

El incremento de la recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en composiciones de conformidad con la invención confiere numerosas importantes ventajas sobre las composiciones conocidas previamente reveladas en el estado de la técnica. Nada en el estado de la técnica sugiere que los azúcares seleccionados de

entre el grupo compuesto por glucosa y manosa puedan proporcionar estas ventajas identificadas por los presentes inventores.

La persona versada en la técnica apreciará que existen ciertos contextos en los cuales derivados, variantes y sales de azúcares adecuados farmacéuticamente aceptables también se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los derivados, variantes o sales adecuados pueden ser los de un azúcar seleccionado de entre el grupo compuesto por maltosa, sacarosa glucosa y manosa, y en particular aquellos basados en azúcares seleccionados de entre el grupo compuesto por maltosa y sacarosa (más de preferencia en el azúcar maltosa). Con todo, los inventores creen que las ventajas identificadas son conferidas con más facilidad por el uso de los azúcares mismos. Esto obra en contraposición, y se debe distinguir del uso sugerido por el estado de la técnica de agentes como azúcares alcoholes. En relación con estas ventajas se apreciará que los azúcares alcoholes no se deben usar de conformidad con la presente invención.

Los inventores han encontrado que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención son adecuadas para usar con cualquier miembro de la superfamilia del TGF- β . Según esto, excepto allí en donde el contexto exija otra cosa, se puede asumir que las referencias que se hagan a TGF- β o TGF- β s comprenden la referencia a cualquier miembro de la superfamilia del TGF- β . Se apreciará se ha de asumir que tales referencias abarcan a todos los miembros conocidos de la superfamilia, y por lo menos a todos los miembros de la superfamilia del TGF- β mencionados en la Figura 1. De preferencia el miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención se puede seleccionar de entre el grupo compuesto por TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 (correspondiente a las Secuencia ID Nos. 1, 2 y 3 respectivamente como se muestra en la Figura 2). La máxima preferencia es que el miembro de la superfamilia del TGF- β sea TGF- β_3 .

La persona versada en la técnica además apreciará que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incorporar más de un miembro de la superfamilia del TGF- β . Tales composiciones que incorporan múltiples miembros de la superfamilia del TGF- β pueden ser preferidas en contextos en donde se desea aprovechar la ventaja de las combinaciones de los miembros de la superfamilia del TGF- β que tienen una interacción aditivo o sinérgica en sus efectos terapéuticos o biológicos combinados. Según esto, excepto en donde el contexto exija otra cosa, se asumirá que las referencias que se hagan a un miembro de la superfamilia del TGF- β , y en especial a un miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en una composición farmacéutica de la invención, también comprenden las composiciones que incorporan dos o más miembros de la superfamilia del TGF- β .

Es bien conocido para las personas versadas en el estado de la técnica que las proteínas como los miembros de la superfamilia del TGF- β tienen la tendencia a interactuar, en especial con componentes hidrófobos de una composición o recipiente de almacenamiento, de manera que no se encuentran disponibles para ejercer sus actividades biológicas o terapéuticas luego de la administración de una composición en la cual están incorporadas. Este problema resulta exacerbado con el almacenamiento de composiciones que contienen miembros de la superfamilia del TGF- β . El almacenamiento de tales composiciones aumenta la inaccesibilidad del miembro de la superfamilia del TGF- β así incorporado. Se cree que la incidencia de la unión de las moléculas del miembro de la superfamilia del TGF- β dentro de la composición, así como a los componentes de un recipiente en el cual la composición está almacenada, aumenta con el tiempo de almacenamiento. La unión de las moléculas del miembro de la superfamilia del TGF- β , ya sea dentro de la composición misma o a otros sustratos (como recipientes de almacenamiento), da lugar a la falta de disponibilidad de las moléculas enlazadas para lograr su actividad biológica y/o terapéutica. Después de almacenamiento prolongado la reducción de la actividad biológica y/o terapéutica disponible del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado puede tornarse tan pronunciada que la composición se torna biológica y/o terapéuticamente ineficaz.

En comparación con las composiciones farmacéuticas conocidas, como las que usan manitol como excipiente, las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención permiten la recuperación de una proporción significativamente más alta de la cantidad total del miembro de la superfamilia del TGF- β originalmente incorporado en una composición farmacéutica. Para estos propósitos se puede suponer que la "recuperación" de un miembro de la superfamilia del TGF- β de una composición se refiere a la proporción del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en la composición que está disponible para ejercer una actividad terapéutica y/o biológica cuando la composición se administra. Un modelo con el cual se puede investigar la recuperación de un miembro de la superfamilia del TGF- β de una composición farmacéutica de interés (ya sea una composición del estado de la técnica o una composición de la invención) está descrito en la sección de Resultados Experimentales más adelante. Se apreciará que, aunque el principal provecho del aumento de la recuperación reside en el incremento de la actividad biológica que puede ser ejercido, cuando se valora la recuperación el método empleado no tiene que medir la actividad biológica. En vez de esto, los métodos adecuados pueden basarse en indicios físicos o químicos como la cantidad de un miembro de la superfamilia del TGF- β recuperada (p.ej., el peso recuperable).

Como se anotó antes, los inventores han encontrado que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención permiten un aumento de dos a cinco veces en la recuperación de miembros incorporados de la superfamilia del TGF- β comparados con las composiciones a base de manitol. Se pueden obtener dichos resultados usando composiciones que emplean azúcares a una concentración mayor de 50 mg/mL. Típicamente, las composiciones farmacéuticas que usan sacarosa o manosa permiten un aumento de dos a tres o más veces en los miembros recuperables de la superfamilia del TGF- β en comparación con las del estado de la técnica. El aumento de la recuperación que se alcanza usando manosa comparada con manitol destaca la ventaja de usar azúcares en vez de azúcares alcoholes.

Como resultado de su capacidad de permitir una mejor recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en las composiciones, las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención confieren marcadas ventajas comparadas con las composiciones del estado de la técnica. Se apreciará que, con el fin de poder recuperar una cantidad terapéuticamente efectiva de un miembro de la superfamilia del TGF- β con la administración de una composición del estado de la técnica, es necesario incorporar en la composición una mayor cantidad del miembro de la superfamilia del TGF- β que la cantidad terapéuticamente efectiva que se desea recuperar (dado que una cierta proporción de la cantidad total del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en la composición del estado de la técnica no podrá ser recuperable, por ejemplo por la unión dentro de la composición o al recipiente de almacenamiento). De acuerdo con esto, la composición del estado de la técnica tiene que ser manufacturada de manera que incorpore una cantidad total equivalente la suma de:

- i) la cantidad terapéuticamente efectiva del miembro de la superfamilia del TGF- β ; y
- ii) la cantidad del miembro de la superfamilia del TGF- β que no será recuperable.

Dado que las composiciones farmacéuticas de la invención permiten una mayor recuperación de los miembros incorporados de la superfamilia del TGF- β , la cantidad total del miembro de la superfamilia del TGF- β que se tiene que incorporar en tales composiciones de manufactura (con el fin de permitir la recuperación de la cantidad deseada terapéuticamente efectiva del miembro de la superfamilia del TGF- β) puede ser relativamente reducida. Se apreciará que la capacidad de alcanzar el efecto terapéutico deseado con el uso de una composición farmacéutica que incorporan una cantidad relativamente pequeña de un miembro de la superfamilia del TGF- β proporciona considerables ventajas comerciales sobre el estado de la técnica.

A pesar de los avances hacia una mayor eficiencia y eficacia según costos en la manufactura de proteínas terapéuticamente útiles como los miembros de la superfamilia del

14

TGF- β , estas proteínas biológica y terapéuticamente activas siguen siendo relativamente costosas de producir y suelen ser los componentes más costosos de las composiciones farmacéuticas en las cuales se incorporan. En contraposición, los azúcares representan compuestos relativamente económicos en las composiciones farmacéuticas. Se apreciará que las composiciones de la invención, en las cuales la cantidad de un miembro de la superfamilia del TGF- β recuperable de la composición se aumenta por medio de la incorporación en la composición de azúcares relativamente baratos, proporcionan considerables ventajas económicas sobre composiciones conocidas del estado de la técnica.

El aumento de la recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención también significa que tales composiciones tienen un aumento de la "vida útil" comparados con composiciones conocidas. Se apreciará que la capacidad de recuperar una mayor proporción de un miembro de la superfamilia del TGF- β de una composición de la invención que ha sido almacenada significa que las composiciones de conformidad con la presente invención se pueden usar durante periodos más largos después de su manufactura que las composiciones del estado de la técnica. Por ejemplo, la tendencia de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en composiciones del estado de la técnica a tornarse no recuperables de las composiciones después de un periodo de almacenamiento prolongado se reduce drásticamente cuando se usan composiciones de la presente invención. Esta prolongación de la vida útil se mejora todavía más por el nola tabla aumento de la actividad biológica inherente de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en composiciones de la invención que se examinan más adelante.

Además de la mejora de la recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención, los inventores han encontrado para su sorpresa que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención también son capaces de aumentar provechosamente la actividad biológica inherente de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados a ellas.

La actividad biológica inherente de un miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en las composiciones farmacéuticas de la invención se puede medir, por ejemplo, con referencia a la capacidad del miembro de la superfamilia del TGF- β a inhibir la proliferación de células epiteliales de pulmón de visón (CEPV). Un modelo con el cual se puede determinar la actividad biológica inherente de un miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en una composición de interés se presenta en la Sección de Resultados Experimentales más adelante.

15

Como alternativa, la actividad biológica inherente que se va a valorar puede ser una actividad que es específica del Miembro de la superfamilia del TGF- β en cuestión. Por ejemplo, en el caso de las composiciones farmacéuticas de la invención que incorporan al miembro preferido de la superfamilia del TGF- β TGF- β_3 , la actividad biológica inherente puede ser la capacidad de reducir o inhibir la cicatrización o la fibrosis.

Los inventores han descubierto que algunos miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención exhiben una actividad biológica hasta cinco veces mayor que la demostrada por miembros de la superfamilia del TGF- β incorporado en composiciones del estado de la técnica. Este marcado incremento de la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en las composiciones farmacéuticas de la invención representa una ventaja sorprendente e importante de estas composiciones. En efecto, nada en el estado de la técnica sugiere que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención sean capaces de aumentar la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en ellas.

Se apreciará fácilmente que la mejora de la actividad biológica exhibida por miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención supondrá una ventaja especial en contextos en los cuales se desea usar la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β de forma terapéutica. Dado que casi todas las aplicaciones terapéuticas de los miembros de la superfamilia del TGF- β se basan en la actividad biológica del miembro de la superfamilia, el incremento de la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en composiciones conforme a la invención corresponde directamente a un aumento de la actividad terapéutica.

Existen muchos contextos terapéuticos en los cuales es sabido que se emplean las composiciones farmacéuticas que incorporan miembros de la superfamilia del TGF- β . Ejemplos de dichos contextos incluyen el tratamiento de la cicatrización de las heridas; la prevención o el tratamiento de la cicatrización; la prevención o el tratamiento de la fibrosis; la aceleración de la cicatrización de heridas; la promoción de la regeneración epitelial; la inhibición de la cicatrización y/o la fibrosis; y aplicaciones terapéuticas de osteoinducción (p.ej., osteoinducción en construcción; curación y/o remodelación de tejido óseo) y en los demás contextos terapéuticos descritos en la introducción.

Los inventores han encontrado que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención son particularmente adecuadas para usar en el contexto de la cicatrización de heridas y/o la fibrosis. Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención son adecuadas para usar en la promoción de la cicatrización de heridas con

14

menor cicatrización; la la prevención o el tratamiento de la fibrosis; la inhibición de la cicatrización y/o la fibrosis; la aceleración de la cicatrización de heridas; y la promoción de la regeneración epitelial. Según esto, se reconocerá que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención se pueden usar en la preparación de medicamentos para:

- i) la promoción de la cicatrización de heridas con menor cicatrización; y/o
- ii) la prevención o el tratamiento de la fibrosis; y/o
- iii) la inhibición de la cicatrización y/o la fibrosis; y/o
- iv) la aceleración de la cicatrización de heridas; y/o v) la promoción de la regeneración epitelial.

Se apreciará que es posible separar (por lo menos hasta cierto punto) los beneficios en términos de una mejor recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β de las composiciones de la invención y el incremento de la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en tales composiciones unos de otros de acuerdo con la forma como se formulan las composiciones farmacéuticas. En otras palabras, se pueden producir composiciones de conformidad con la presente invención en las cuales:

- i) la composición confiere los beneficios tanto de una mejor recuperación del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en ella, como de un aumento de la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β ; o
- ii) la composición confiere los beneficios de una mejor recuperación del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en ella, pero no los de un aumento de su actividad biológica; o
- iii) la composición no confiere una mejor recuperación del miembro de la superfamilia del TGF- β , pero si proporcionan un aumento de la actividad biológica del mismo.

A continuación se dan algunos ejemplos que ilustran estas diversas opciones.

Por ejemplo, las composiciones de conformidad con el primer aspecto de la invención pueden de preferencia comprender a un miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar a una concentración efectiva (p.ej., mayor de 50 mg/mL) tanto durante el almacenamiento de la composición, que para los presentes efectos se asume que abarca el tiempo que transcurre entre la manufactura de la composición y su eventual uso, y también en el time en el cual composición se administra. Tales composiciones de conformidad con este aspecto de la invención aprovechan las ventajas de una mejor recuperación del miembro de la superfamilia del TGF- β durante y después del almacenamiento, y también de un aumento de la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β cuando se administra.

X

Se apreciará que las composiciones de conformidad con la presente invención también abarcan a aquellas composiciones en las cuales el azúcar está presente a una concentración efectiva (p.ej., mayor de 50 mg/mL) durante el almacenamiento, pero en donde el azúcar está presente a una concentración menor en el momento de la administración. Un ejemplo típico de esta situación es aquel en el cual la composición se diluye antes de su administración. Aunque las composiciones de conformidad con esta versión de la invención no comprenden un azúcar a una concentración efectiva (p.ej., mayor de 50 mg/mL) en el momento de la administración de la composición, las composiciones siguen beneficiándose de la mejora de la recuperación del miembro de la superfamilia del TGF- β después del almacenamiento, y también de un aumento de la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β en el momento de su recuperación.

En otra versión de composiciones de conformidad con la presente invención, la concentración efectiva (p.ej., mayor de 50 mg/mL) del azúcar sólo se puede establecer relativamente poco antes de la administración de la composición. Un ejemplo típico de una composición conforme a esta versión puede ser aquel en el cual se adiciona un solvente a una composición por lo demás "seca" antes de su administración para producir una composición en la cual el azúcar tiene la concentración efectiva requerida (p.ej., mayor de 50 mg/mL). Las composiciones de conformidad con esta versión de la invención proporcionan miembros de la superfamilia del TGF- β que tiene una actividad biológica sorprendentemente alta (comparadas con las composiciones del estado de la técnica) en el sitio en el cual se administran. Los problemas asociados con la recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF- β después del almacenamiento en comparación con las composiciones del estado de la técnica se pueden obviar mediante el almacenamiento de la composición en un estado seco relativamente inerte.

En efecto, es tan ventajosa esta versión de la invención que, de conformidad con un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica soluble que comprende al miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar, en donde el azúcar se proporciona en una proporción tal que, al ser disuelta la composición para alcanzar una solución fisiológica, el azúcar se proporciona a una concentración suficiente para permitir una mejor recuperación y/o un aumento de la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β . De preferencia el azúcar se proporciona en una proporción tal que al ser disuelta la composición para alcanzar una solución fisiológica la concentración del azúcar es mayor de 50 mg/mL. El azúcar de preferencia puede ser maltosa.

De preferencia una composición farmacéutica de conformidad con este tercer aspecto de la invención puede ser una composición farmacéutica hidrosoluble. Una solución fisiológica de conformidad con este aspecto de la invención puede ser una solución que

14

tiene concentración u osmolalidad fisiológicas. Por ejemplo, una composición farmacéutica soluble de conformidad con este aspecto de la invención adecuada para inyección en mamíferos podrá, al ser disuelta la composición, alcanzar una osmolalidad de aproximadamente 290 miliosmoles (osmoles por litro). Se apreciará que las composiciones de conformidad con este tercer aspecto de la invención confieren todas las ventajas relacionadas con un aumento de la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en ellas que se encuentran en las composiciones de conformidad con el primero y el segundo aspectos de la invención. Según esto, las composiciones de conformidad con este tercer aspecto de la invención son adecuadas para todos los usos médicos o terapéuticos arriba descritos en relación con las composiciones de conformidad con el primero y el segundo aspectos de la invención.

Uno de los factores que determinan si una composición se considera o no adecuada para ser inyectada en mamíferos como los seres humanos es la concentración de iones de sodio presente en la composición en el momento de la administración. Según esto, en un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica soluble que comprende un miembro de la superfamilia del TGF- β , una fuente de iones de sodio, y un azúcar, las cantidades de la fuente de iones de sodio y del azúcar son tales que al ser disuelta la composición para producir una concentración de sodio de entre 130 y 160 mEq/L, la concentración del azúcar es suficiente para permitir una mejor recuperación y/o un aumento de la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β . De preferencia, las cantidades de la fuente de iones de sodio y del azúcar son tales que al ser disuelta la composición para producir una concentración de sodio de entre 130 y 160 mEq/L la concentración del azúcar es mayor de 50 mg/mL. El azúcar de preferencia es maltosa. Las fuentes de iones de sodio adecuados para usar en las composiciones farmacéuticas inyectables son bien conocidas para la persona versada en la técnica. De preferencia, las composiciones de conformidad con este cuarto aspecto de la invención pueden ser composiciones hidrosolubles. Se apreciará además que estas composiciones del cuarto aspecto de la invención también se pueden emplear de conformidad con los usos médicos o terapéuticos arriba descritos.

Además del uso de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención en aplicaciones terapéuticas, la persona versada en la técnica también apreciará que el incremento de la actividad biológica exhibido por las composiciones conforme a la invención también pueden ser de provecho en contextos en los cuales la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β se va a utilizar para propósitos no terapéuticos. Lo usual es que dichos usos no terapéuticos de los miembros de la superfamilia del TGF- β pueden estar relacionados con su uso para propósitos investigativos

19

o experimentales. Según esto, la invención también proporciona composiciones como las mencionadas en los primero, segundo o tercer aspectos de la invención no para usar como medicamentos, y en especial para usos investigativos o experimentales.

Los inventores han encontrado que aunque las ventajas conferidas por las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención se tornan disponibles a través de todas las formulaciones examinadas, las composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente provechosas cuando se formulan para administración por inyección. Más de preferencia, las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden formular para inyección intradérmica, o se pueden formular para inyección subcutánea. Las formulaciones más adecuadas para inyección intradérmica y/o inyección subcutánea serán bien conocidas de la persona versada en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención adecuadas para administración parenteral localizada (p.ej., intradérmica, intramuscular y subcutánea) y administración parenteral sistémica (p.ej., intravenosa e intraarterial) se pueden preparar mezclando un miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar (ambos con el grado deseado de pureza) con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables en la forma de formulaciones en polvos liofilizados y no liofilizados para reconstitución previa al uso, soluciones no acuosas y acuosas, y formulaciones semisólidas. Los vehículos aceptables, incluidos los excipientes, son atóxicos para quienes las reciben en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitaciones, amortiguadores como fosfatos, citratos, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluidos ácido ascórbico y metionina; modificadores de la tonicidad como cloruro de sodio, glicerol, y similares; preservativos como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos como metilo y/o propilo y/o butilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); bajo peso molecular polipéptidos (comprende menos de cerca de diez residuos de aminoácido); proteínas, como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; carbohidratos incluidas las dextrinas; agentes quelantes como EDTA; contraiones formadores de sales como sodio; complejos metálicos (p.ej., complejos Zn-proteína); surfactantes aniónicos como jabones de ácidos grasos, sulfatos de acilo, o sulfosuccinatos de acilo; surfactantes catiónicos, como alquilaminas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias; surfactantes no iónicos, por ejemplo, ésteres de sorbitán o ésteres poliethoxilados de ácidos acílicos, copolímeros de óxido de polietileno y óxido de polipropileno.

20

A manera de ejemplo, una composición farmacéutica de la invención en la forma de una solución estéril adecuada para administración parenteral, pueden incluir los siguientes constituyentes además del miembro de la superfamilia del TGF- β y azúcar:

Amortiguador de fosfato 0,01 M a 0,1 M, y

Cloruro de sodio hasta 0,9% p/v (para alcanzar la isotonicidad con la sangre para alcanzar la isotonicidad con la sangre, 290-300 mOsm/L), y

0,1 mg/mL de mono-oleato de polioxietileno de sorbitán (TweenTM 80).

Se puede preparar una "torta" de polvo liofilizado de la anterior solución.

Dicha composición farmacéutica de conformidad con la invención se podría presentar en la forma de un vial, una ampolleta, o una jeringa prellenada de bien sea; una solución estéril, una suspensión estéril o cualquier otra forma de presentación farmacéuticamente aceptable idónea para administración parenteral localizada del fármaco.

La mejor recuperación y el aumento de la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención generalmente significan que se pueden usar como una alternativa de los abordajes existentes, como la liofilización, que se usa para mejorar las vidas útiles de las composiciones que contienen miembros de la superfamilia del TGF- β . Según esto, se puede en general preferir que una composición farmacéutica de la invención sea no liofilizada. No obstante, se puede desear usar técnicas conocidas, como la liofilización, de conformidad con las composiciones de la invención. Estas técnicas pueden prolongar todavía más vida útil de las composiciones farmacéuticas de la invención, y se pueden usar para producir, por ejemplo, un polvo liofilizado estéril adecuado para reconstitución.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden formular para usar en el ojo (por ejemplo, como colirios), o como instilados intraperitoneales.

Como alternativa, o además, las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden formular para administración tópica. La administración tópica de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención puede ser especialmente preferida en el contexto del seguimiento de un sitio en el cual el miembro de la superfamilia del TGF- β está ejerciendo un efecto terapéutico.

Las composiciones farmacéuticas de la invención adecuadas para administración tópica (p.ej., transdérmica/cutánea, ocular, ótica, nasal, faríngea, bucal, rectal, vaginal, uretral) se pueden preparar mezclando un miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar (ambos con el grado deseado de pureza) con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables en la forma de formulaciones en polvo liofilizadas o no liofilizadas, soluciones no acuosas o acuosas, no dispersiones/suspensiones acuosas o acuosas, incluidas emulsiones y formulaciones semisólidas. Los vehículos aceptables,

incluidos los excipientes, son atóxicos para quienes las reciben a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitaciones, agua purificada, solución salina, solución salina con amortiguador de fosfato (PBS) solución de Ringer, solución de lactato de Ringer, soluciones hidro-alcohólicas, polietilenglicol (PEG), propilenglicol (PG), fosfatos, acetatos, gelatina, colágenos, Carbopol 934™ (BF Goodrich Corp.), aceites y ceras vegetales y sintéticos, surfactantes aniónicos como jabones de ácidos grasos, sulfatos de acilo, o sulfosuccinatos de acilo; surfactantes catiónicos, como alquilaminas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias; surfactantes no iónicos, por ejemplo, ésteres de sorbitán o ésteres poliethoxilados de ácidos acílicos, copolímeros de óxido de polietileno y óxido de polipropileno, y similares. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden además incluir agentes preservativos, estabilizadores, antioxidantes, antimicrobianos y amortiguadores adecuados como, por ejemplo, metilo y/o propilo y/o butiloparabenos, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), ácido cítrico, ácido ascórbico, y similares. Las bases de emulsión, crema o pomada útiles en la formulación pueden incluir cremas y emulsiones de base acuosa (aceite en agua), cremas y emulsiones de base oleosa (agua en aceite), pomadas (hidrocarburos emulsionantes y no emulsionantes), geles, hidrogeles, y similares. Otras formulaciones para administración tópica pueden incluir aerosoles, vendajes, y otros apósitos para herida. Como alternativa la composición farmacéutica de la invención puede incorporarse o encapsularse en una matriz o membrana adecuada de polímero, proporcionando de esta suerte un dispositivo de liberación prolongada adecuado para poner, o implantar en el sitio que se va a tratar.

Una composición farmacéutica de la presente invención en la forma de un hidrogel semisólido adecuado para administración tópica puede además comprender los siguientes constituyentes (además del miembro de la superfamilia del TGF- β y el azúcar):

hidroxicelulosa 0,1% p/v a 2,0% p/v, y

Carbopol 934™ 0,1% p/v a 1,0% p/v (BF Goodrich Corp.), y

Propilenglicol 10 a 20% p/v, y

Metilparaben 0,005% p/v a 0,020% p/v, y

Propilparaben 0,005% p/v a 0,020% p/v, y

Hidróxido de sodio o ácido clorhídrico c.s. para pH 4 - 10

Agua purificada, c.s. para 100% p/v

Las composiciones farmacéuticas adecuadas de la invención se pueden presentar en forma de a frasco, pote, tubo, aerosol, ya sea de una solución estéril; polvo estéril liofilizado o no liofilizado polvo estéril liofilizado o no liofilizado para reconstitución, dispersión/suspensión estéril, semisólido estéril, o cualquier otra forma de presentación farmacéuticamente aceptable para la administración tópica de un fármaco.

2
2

Las composiciones farmacéuticas de la invención adecuadas para administración oral se pueden preparar mezclando el miembro de la superfamilia del TGF- β y el azúcar (ambos con el grado deseado de pureza) con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables en forma de polvo o formulaciones en gránulos, soluciones no acuosas o acuosas, formulaciones en dispersión/suspensión no acuosas o acuosas incluidas emulsiones, formulaciones semisólidas, tabletas (no recubiertas o recubiertas) o cápsulas (duras o blandas) que tienen características ya sea de liberación inmediata y/o liberación modificada (entérica/retardada/sostenida). Los vehículos aceptables, incluidos los excipientes, son atóxicos para quienes los reciben a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitaciones, agua purificada, solución salina, solución salina con amortiguador de fosfato (PBS) solución de Ringer, solución de lactato de Ringer, soluciones hidro-alcohólicas, celulosa y derivados de la celulosa, almidón y almidones modificados, polietilenglicol (PEG), propilenglicol (PG), fosfatos, acetatos, gelatina, colágenos, Carbopol 934™ (BF Goodrich Corp.), aceites y ceras vegetales y sintéticos, surfactantes aniónicos como jabones de ácidos grasos, sulfatos de acilo, o sulfosuccinatos de acilo; surfactantes catiónicos, como alquilaminas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias; surfactantes no iónicos, por ejemplo, ésteres de sorbitán o ésteres poliethoxilados de ácidos acílicos, copolímeros de óxido de polietileno y óxido de polipropileno, y similares.

El miembro de la superfamilia del TGF- β se puede dispersar dentro de una formulación líquida ya sea como una suspensión dentro del líquido (por ejemplo como una suspensión coloidal), o disuelto dentro del líquido como una solución. Para los presentes propósitos, se puede considerar que una solución comprende un solvente líquido a través del cual se dispersa una distribución homogénea de un miembro de la superfamilia del TGF- β que no se asentará más adelante en la solución.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención pueden de preferencia comprender soluciones acuosas. Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden ser composiciones líquidas, o como alternativa, pueden además comprender agentes espesantes de manera que se forma un gel o una composición semisólida. Los agentes espesantes adecuados son bien conocidos de la persona versada en la técnica, e incluyen metilcelulosa. El uso de agentes espesantes en las composiciones farmacéuticas de conformidad con el primero, segundo o tercer aspectos de la invención pueden ser provechosos en varios contextos. En especial, el uso de agentes espesantes en composiciones de la invención puede ser provechoso para asegurar que la composición se retiene en el sitio en el cual se administra y en el cual se desea que la composición tenga su efecto biológico o terapéutico. Esta ventaja es de provecho en relación medicamentos

M
V

tópicos, y puede ser aplicable tanto a medicamentos para aplicación externa (como cremas o geles espesados) y medicamentos para aplicación interna (por ejemplo, geles espesados para inyección local). Se apreciará que las formulaciones tixotrópicas de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención pueden ser provechosas en varias aplicaciones como, por ejemplo, en el uso de aerosoles nasales o inhaladores empleados para administrar composiciones a los pulmones (que de otra forma pueden ser relativamente inaccesibles) para la prevención o el tratamiento de la fibrosis o cicatrización pulmonar.

Las composiciones farmacéuticas de la invención de preferencia se pueden proporcionar en recipientes prellenados que contienen la composición. Dichos recipientes prellenados proporcionan ventajas en términos de su capacidad de administrar rápidamente las composiciones, y en especial las composiciones previamente esterilizadas, en la localización en la cual se va a emplear la composición. Los recipientes adecuados se pueden seleccionar con referencia a la formulación elegida y el método o vía por la cual se va a administrar la composición, y típicamente incluirán recipientes como viales o jeringas. La provisión de las composiciones farmacéuticas que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β en tales recipientes prellenados ya se ha puesto en tela de juicio por la tendencia de la proteína miembro de la superfamilia del TGF- β a adherirse a las paredes del recipiente con el tiempo. Además, la tendencia de los miembros de la superfamilia del TGF- β almacenados en recipientes a degenerar y perder actividad con el tiempo también ha limitado la utilidad de las composiciones que comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β prellenadas y almacenadas de esta forma. Así pues, las composiciones farmacéuticas de la presente invención proporcionan una solución a falencias del estado de la técnica que previamente han impedido o desalentado la provisión de recipientes prellenados por lo demás deseables, y en especial de los recipientes que contienen composiciones estériles.

Como ya se indicó, las composiciones farmacéuticas de la invención son idóneas para uso terapéutico. Según esto, en un quinto aspecto de la invención se proporciona un método de tratamiento que comprende administrar a un individuo que necesita de la actividad terapéutica de un miembro de la superfamilia del TGF- β una cantidad terapéutica de una composición de conformidad con el primero, segundo, tercero o cuarto aspectos de la invención. Se entenderá que la actividad terapéutica abarca la terapia profiláctica, incluida la prevención de enfermedades o afecciones que se pueden tratar usando la actividad terapéutica del miembro de la superfamilia del TGF- β .

Un uso preferido de las composiciones farmacéuticas conforme a la invención se da en el contexto de la cicatrización de heridas o la prevención/reducción de la formación de

24

cicatrices. Los inventores han encontrado que las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar en la prevención y/o inhibición de la formación de cicatrices. Como alternativa o adicionalmente las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar en la prevención o el tratamiento de la fibrosis. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden usar para promover la cicatrización de las heridas. En la promoción de la cicatrización de las heridas o la prevención o inhibición de la formación de cicatrices puede ser preferible o necesario administrar la composición farmacéutica antes o después de la formación de la herida. Según esto, la composición farmacéutica estará presente en el área afectada, bien sea merced a su introducción en la herida, o por la formación de la herida en un sitio en el cual la composición farmacéutica ya se encuentra presente (en virtud de una administración previa). En consecuencia se apreciará que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención de preferencia se pueden formular de manera que sean bien toleradas por el sitio afectado. Las formulaciones para aplicación una heridas pueden de preferencia hacer uso de un vehículo farmacéutico que es relativamente "suave". Los vehículos adecuados pueden ser biocompatibles, biodegradables y bioreabsorbibles y biorresolubles. Las formulaciones preferidas pueden excluir sustancias que estimulan la inflamación, y de preferencia pueden incluir agentes antiinflamatorios.

Un método adecuado por el cual se puede valorar la prevención o inhibición de la cicatrización se describe en la solicitud copendiente de los inventores publicada como WO2006/064207.

Tan beneficioso es el uso de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención en la curación de las heridas y la inhibición de la formación de cicatrices que, en un sexto aspecto de la invención, se proporciona un método para promover la curación de las heridas o la inhibición de la formación de cicatrices, el cual método comprende administrar a un paciente que tiene la necesidad de dicha promoción o inhibición una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de conformidad con el primero, segundo, tercero o cuarto aspectos de la invención. En el contexto de la presente invención, se puede considerar que la promoción de la curación abarca un aumento de la velocidad de curación o un aumento de la calidad de la curación. Se puede considerar que la inhibición de la formación de cicatrices abarca cualquier grado de inhibición (que puede variar desde inhibición parcial hasta inhibición total) de la formación de cicatriz asociada con la curación de las heridas o otros procesos fibróticos que se caracterizan por el depósito anormal o excesivo de tejido fibroso. Las composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento de la invención pueden revestir especial utilidad en la prevención, reducción, inhibición o tratamiento de la cicatrización (fibrosis) asociada con trastornos fibróticos

6

seleccionados de entre el grupo compuesto por: fibrosis cutánea; escleroderma; fibrosis sistémica progresiva; fibrosis pulmonar; fibrosis muscular; fibrosis renal; glomeruloesclerosis; glomerulonefritis; fibrosis uterina; renal fibrosis; cirrosis del hígado, fibrosis hepática; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; fibrosis posterior al infarto de miocardio; fibrosis del sistema nervioso central, como la fibrosis que sigue al ACV; fibrosis asociada con trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple; fibrosis asociada con vitreorretinopatía proliferativa (PVR); reestenosis; endometriosis; enfermedad isquémica y fibrosis por radiación. Los medicamentos y métodos de tratamiento de la invención también pueden ser útiles en la prevención, reducción o manejo de la fibrosis asociada con la artritis reumatoide.

La prevención o el tratamiento de conformidad con la presente invención pueden ser particularmente útiles en el caso de heridas que corren el riesgo de sufrir un proceso de la cicatrización o una respuesta de la cicatrización aberrantes. Por ejemplo, la prevención o el tratamiento de conformidad con el sexto aspecto de la invención puede ser especialmente preferida en el tratamiento de lesiones crónicas (como úlceras) o de heridas predispuestas a convertirse en lesiones crónicas (por ejemplo, las heridas de los diabéticos, los ancianos o los pacientes con polifarmacia).

La prevención o el tratamiento de conformidad con el sexto aspecto de la invención también pueden ser de especial provecho en el tratamiento de cicatrices patológicas (como los queloides o cicatrices hipertróficas) o de heridas predispuestas a convertirse en cicatrices patológicas (como las quemaduras, las heridas en los niños, las heridas de individuos de ascendencia afrocaribeña o mongoloide, o las heridas situadas en lugares de tensión de la piel).

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención son especialmente apropiadas para administrarlas a la piel como, por ejemplo, en el tratamiento de heridas dérmicas. No obstante, las composiciones se pueden usar efectivamente en el tratamiento de otros tipos de heridas incluidas, pero sin limitaciones, heridas en el ojo; heridas del sistema digestivo; heridas del sistema nervioso; heridas del sistema urogenital; heridas el sistema respiratorio; heridas de los riñones; heridas de los tendones y ligamentos y heridas del corazón o el sistema circulatorio, adherencias formadas después de lesiones y reestenosis. Los inventores piensan que las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento de la invención son adecuados para usar en la piel; en el ojo (incluida la prevención, reducción o inhibición de la cicatrización que resulta de la cirugía ocular como cirugía LASIK o PRK); en receptores de sangre; uso en el sistema nervioso central o periférico (en donde la prevención, reducción o inhibición de la cicatrización pueden acrecentar la reconexión neuronal); en tendones, ligamentos o músculos; en la cavidad oral,

incluidos los labios y el paladar (como en la prevención, reducción o inhibición de la cicatrización que resulta del tratamiento del labio leporino o el paladar hendido); en los órganos internos como el hígado, corazón, cerebro, tejidos digestivos y tejidos reproductivos; y en cavidades del organismo como las cavidades abdominal, pélvica y torácica (en donde la prevención, reducción o inhibición de la cicatrización puede reducir e número de incidencias de formación de adherencias o el tamaño de las adherencias formadas). Los medicamentos y métodos de la invención se pueden usar para prevenir, reducir o inhibir adherencias, como las que se presentan en el abdomen, la pelvis o la columna vertebral. Se prefiere especialmente que los medicamentos y métodos de la invención se usen para prevenir, reducir o inhibir la cicatrización de la piel (cicatrización dérmica).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención de preferencia se pueden administrar antes de la herida o de comienzo del proceso de la cicatrización (el cual para el presente propósito debe asumirse que incluye la fibrosis asociada con trastornos fibróticos). La composición farmacéutica puede ser administrada hasta 24 horas antes de la herida, de preferencia hasta diez horas antes de la herida, más de preferencia hasta cinco horas antes de la herida, y la máxima preferencia hasta una hora antes de la herida. Se apreciará que la administración de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención antes de la herida o el comienzo de la cicatrización reviste particular utilidad en el caso de heridas electivas (como las que se asocian con procedimientos quirúrgicos) o situaciones en las cuales existe el riesgo reconocido de la iniciación de la cicatrización (es decir, la predisposición a la fibrosis o la exposición a estímulos que pueden inducir la fibrosis).

Como alternativa, la composición farmacéutica puede ser administrada después de la herida o el comienzo de la cicatrización. En el caso de la administración de la composición farmacéutica después de la herida, se puede preferir que la composición farmacéutica sea administrada inmediatamente después de la herida, o por lo menos lo más pronto posible después de la herida (por ejemplo, después de la admisión al hospital de un paciente herido puesto a cargo de un médico). En el caso de la administración de la composición farmacéutica después del comienzo de la cicatrización, como en el proceso de la cicatrización que surge como resultado de un trastorno fibrótico, la composición de preferencia se puede administrar inmediatamente después de que se ha reconocido la iniciación de la cicatrización. En cualquier caso, la composición farmacéutica de preferencia se puede administrar hasta una semana después de la herida o el comienzo de la cicatrización, más de preferencia hasta 24 horas después de la herida o el comienzo de la cicatrización, todavía más de preferencia hasta cinco horas, todavía más de preferencia

hasta cinco horas, y la máxima preferencia hasta una hora después de la herida o el comienzo de la cicatrización.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden formular para aplicación tópica. Las formulaciones adecuadas de conformidad con esta versión de la invención pueden incluir formulaciones en líquido, crema, pomada o gel, o formulaciones en aerosol.

Los métodos o medicamentos de la invención se pueden usar de forma profiláctica, en sitios en donde no existe herida pero en donde se va a formar una herida que de otra forma conduciría a la formación de una cicatriz o herida crónica. Por ejemplo, los medicamentos de conformidad con la invención se pueden administrar a sitios que van a sufrir una herida como resultado de procedimientos electivos (como cirugía), o a sitios de los que se cree que tienen un riesgo elevado de sufrir una herida. Se puede preferir que los medicamentos de la invención sean administrado al sitio inmediatamente antes de la formación de una herida (por ejemplo en el periodo de hasta seis horas antes de la herida) o los medicamentos se pueden administrar en un tiempo más precoz antes de la herida (por ejemplo, hasta 48 horas antes de que se forme la herida). La persona versada en la técnica apreciará que los tiempos más preferidos de administración antes de la formación de una herida estarán determinados de acuerdo con varios factores, incluidos la formulación y la vía de administración del medicamento seleccionado, la dosificación del medicamento que se va a administrar, el tamaño y la naturaleza de la herida que se va a formar, y la situación biológica del paciente (que se puede determinar con respecto a factores como la edad, el estado de salud y la predisposición a sufrir complicaciones de la curación o cicatrización adversa). El uso profiláctico de los métodos y medicamentos de conformidad con la invención es una versión preferida de la invención, y es especialmente preferido en la promoción de la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida en el contexto de las heridas quirúrgicas.

Los métodos y medicamentos de la invención también son capaces de promover la cicatrización acelerada de las heridas que tienen cicatrización reducida si se administran después de que la herida ha sido formada. Se prefiere que dicha administración tenga lugar lo más pronto posible después de la formación de la herida, pero los agentes de la invención son capaces de promover la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida en cualquier momento hasta la terminación del proceso curativo (es decir, incluso en el evento de que una herida haya sanado parcialmente, los métodos y medicamentos de la invención se pueden usar para promover la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida con respecto a la porción remanente que falta por sanar). Se apreciará que la "ventana" en la los métodos y medicamentos de la invención se pueden

usar para promover la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida depende de la naturaleza de la herida en cuestión (incluido el grado del daño que se ha presentado, y el tamaño del área lesionada). Así las cosas, en el caso de una herida grande, los métodos y medicamentos de la invención se pueden administrar relativamente tarde en la respuesta curativa y seguir siendo capaces de promover la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida. Los métodos y medicamentos de la invención pueden, por ejemplo, de preferencia ser administrados dentro de las primeras 24 horas después de formada la herida, pero todavía pueden promover la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida si se administran hasta diez, o más, días después de la formación de la herida.

Los métodos y medicamentos de la invención se pueden administrar en una o más ocasiones según sea el caso con el fin de promover la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida. Por ejemplo, se pueden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los medicamentos a una herida con tanta frecuencia como se requiera hasta cuando se termine el proceso curativo. Por ejemplo, los medicamentos de la invención se pueden administrar una o dos veces al día a una herida durante por lo menos los primeros tres días siguientes a la formación de la herida.

La máxima preferencia es que los métodos o medicamentos de la invención se administren tanto antes como después de la formación de la herida. Los inventores han encontrado que la administración de los medicamentos de la invención inmediatamente antes de la formación de una herida, seguida de la administración diaria de dichos agentes en los días siguientes reviste particular eficacia en la promoción de la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida.

Se apreciará que la cantidad de una composición farmacéutica de conformidad con la invención que se debe aplicar a una herida depende de varios factores como la actividad biológica y la biodisponibilidad del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en el medicamento. Esto, a su vez, puede depender de factores como la identidad del miembro de la superfamilia del TGF- β y el modo de administración de la composición. Otros factores que determinan una cantidad terapéutica adecuada de una composición de conformidad con la invención pueden incluir:

- i) La vida media del miembro de la superfamilia del TGF- β en el sujeto que está siendo tratado,
- ii) El padecimiento específico que se va a tratar (p.ej., heridas agudas, lesiones crónicas o trastornos fibróticos),
- iii) La edad del sujeto que está siendo tratado.

29

La frecuencia de administración de composiciones de conformidad con la invención estará bajo la influencia de los factores arriba mencionados y, en especial, de la vida media del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en la composición en el sujeto que está siendo tratado.

Generalmente cuando las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se van a usar en el tratamiento de heridas ya existentes, la composición se debe administrar tan pronto como la herida se ha presentado (o, en el caso de heridas que no son aparentes de inmediato, como las que se presentan en el interior del cuerpo, tan pronto como la herida ha sido diagnosticada). La terapia con composiciones o métodos de conformidad con la invención debe continuar hasta cuando se haya promovido el proceso curativo (o se haya inhibido la cicatrización patológica) a satisfacción del médico.

Como ya se dijo, la frecuencia de administración de composiciones de conformidad con la invención dependerá de la vida media biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en ella. Típicamente, una composición de conformidad con la invención formulada en forma de crema o pomada se debe administrar un tejido diana de manera que la concentración del miembro de la superfamilia del TGF- β en el tejido diana se mantenga a un nivel adecuado para que tenga efecto terapéutico. Esto puede requerir la administración diaria o incluso varias veces al día.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden administrar por cualquier vía adecuada vía capaz alcanzar un efecto biológico o terapéutico deseado (como la promoción de la cicatrización de heridas o la inhibición de la cicatrización), pero se prefiere que las composiciones se administren localmente en el sitio en el cual se requiere la actividad p.ej., por inyección.

Los inventores han encontrado que la promoción de la cicatrización acelerada de heridas o la inhibición de la cicatrización con el uso de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención mejora especialmente con la aplicación tópica de la composición a la herida (o, en el caso de la aplicación profiláctica, a un tejido o sitio en el cual se va a producir una herida).

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención pueden adoptar variadas formas dependiendo, sobre todo, de la forma en que se van a usar. Así, por ejemplo, pueden estar en forma de líquido, pomada, crema, gel, hidrogel o aerosol. Todas estas composiciones son adecuadas para aplicación tópica a una herida, que es el medio preferido de administrar agentes de la invención a un sujeto (persona o animal) que necesita el tratamiento.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden proporcionar en un vendaje o parche estéril, el cual se puede usar para cubrir un sitio en el

9
7

cual se desea que el miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en la composición tenga un efecto biológico o terapéutico. Se apreciará que las ventajas proporcionadas por las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención, en términos de mejora de la vida útil, aumento de la recuperación o aumento de la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado, significan que tales composiciones son particularmente adecuadas para incorporarlas en parches o vendas previamente preparados.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención son especialmente adecuadas para incorporarlas a dispositivos de liberación lenta o retardada, dado que las composiciones son capaces de obviar muchas de las desventajas normalmente asociadas con el almacenamiento de las composiciones que incorporan a miembros de la superfamilia del TGF- β . Los dispositivos adecuados, por ejemplo, se pueden colocar sobre la piel o insertar debajo de ella y la composición que incorpora al miembro de la superfamilia del TGF- β se liberará en el curso de días, semanas o incluso meses. Tal dispositivo puede ser especialmente útil para pacientes que requieren la administración a largo plazo del miembro de la superfamilia del TGF- β . Algunos ejemplos de padecimientos que pueden obtener más beneficios de dicha administración a largo plazo de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención incluyen el tratamiento de lesiones crónicas o de heridas agudas extensas (como quemaduras) y el tratamiento de problemas fibróticos establecidos.

Las dosis diarias de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención pueden ser dadas en una sola administración (p.ej., una inyección diaria o una aplicación diaria de una formulación tópica). Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención pueden tener que ser administradas dos o más veces en el día. En otra alternativa, se puede usar un dispositivo de liberación lenta para dar al paciente una dosis adecuada de una composición farmacéutica de conformidad con la invención sin tener que administrar dosis repetidas.

Se pueden usar vehículos líquidos en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El agente de la invención se puede disolver o suspender en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable como agua, un solvente orgánico, una mezcla de los dos, o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. Se prefiere que las composiciones farmacéuticas líquidas de conformidad con la invención se proporcionen como soluciones acuosas.

El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados como solubilizadores, emulsionantes, amortiguadores, preservativos, endulzantes, agentes saborizantes, agentes suspensores, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizadores u osmorreguladores. Algunos ejemplos adecuados de vehículos líquidos para administración oral y parenteral incluyen agua (que contiene parcialmente

5
m

aditivos como los anteriores, p.ej., derivados de la celulosa, de preferencia la solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluidos alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, p.ej., glicoles) y sus derivados, y aceites (p.ej., aceite de coco fraccionado y aceite de maní). Para la administración parenteral el vehículo también puede ser un éster oleoso como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones estériles en forma líquida para administración parenteral. El vehículo líquido para composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención formuladas como soluciones o suspensiones estériles se pueden administrar por inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. Las soluciones estériles también se pueden administrar por vía intravenosa. Se apreciará que las composiciones inyectables de conformidad con la invención también pueden incluir ligantes, agentes suspensores y preservativos según sea el caso. Algunos ejemplos adecuados de dichos agentes son bien conocidos de la persona versada en la técnica.

Los inventores también han encontrado que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención son adecuadas para administración oral. Las formulaciones adecuadas para usar de conformidad con esta versión de la invención incluyen enjuagues bucales y similares. Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención administradas por vía oral se pueden usar en la prevención o el tratamiento de mucositis, úlceras (incluidas las úlceras gastrointestinales y gástricas) enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención son adecuadas para administrar en el ojo. Según esto, una formulación preferida de composiciones de la invención para tal uso puede estar en forma de colirio. Se sabe que miembros de la superfamilia del TGF- β como TGF- β_3 se pueden usar en la promoción de la cicatrización acelerada de heridas que tienen una cicatrización reducida en la córnea. Las heridas de la córnea pueden provenir de un traumatismo del ojo que surge como resultado de una lesión accidental (como las arriba consideradas) o como resultado de intervenciones quirúrgicas (p.ej., cirugía con láser en la córnea).

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar en varios sitios "internos" (es decir, situados dentro del organismo, en vez de sobre una superficie externa). Así, por ejemplo, los medicamentos de conformidad con la invención se pueden formular para inhalación para usar en la nariz, los pulmones u otro epitelio respiratorio. Algunos ejemplos en lugares en los cuales puede ser deseable este uso de las composiciones

2
7

farmacéuticas de la invención incluyen el tratamiento de heridas internas, y la prevención o el tratamiento de la cicatrización o la fibrosis en el sistema respiratorio.

El uso en localizaciones internas de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención también puede suponer ventajas en el tratamiento de heridas que tienen riesgo elevado de formación de adherencias. Dichas adherencias resultan a menudo de lesiones o heridas en los sistemas digestivo o genitourinario, y pueden conllevar una pérdida nociva de la función de los tejidos afectados.

Se pueden usar procedimientos conocidos como los que se emplean convencionalmente en la industria farmacéutica (p.ej., experimentación *in vivo*, estudios clínicos etc.), para establecer formulaciones específicas o preferidas de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención, así como regímenes terapéuticos precisos para la administración de tales composiciones (como dosis diarias del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en la composición y la frecuencia y vía de administración de la composición).

La dosis diaria adecuada de una composición farmacéutica de conformidad con la invención para usar en cicatrización de heridas depende de varios factores incluidos (pero sin limitaciones) la actividad terapéutica que se desea que tenga la composición (por ejemplo, la aceleración del proceso de curación o la prevención o inhibición de la cicatrización); la identidad del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en la composición; la naturaleza del tejido lesionado; el área o la profundidad de la herida que se va a tratar; la gravedad de la herida; y la presencia o ausencia de factores que predisponen a la formación de una cicatriz patológica o una herida crónica. Típicamente, una dosis adecuada de un miembro de la superfamilia del TGF- β (como TGF- β_3) que se va a administrar por medio de una composición farmacéutica de conformidad con la invención estará dentro del intervalo de 0,00 mg a 100 mg del miembro de la superfamilia durante 24 horas, aunque esta cifra se puede modificar hacia arriba o hacia abajo en respuesta a los factores que se delinearon arriba. La cantidad del miembro de la superfamilia del TGF- β administrado por medio de la composición farmacéutica de la invención de preferencia puede ser de 50 a 500 mg por centímetro lineal de daño tisular.

En general, las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se deben formular de tal manera que cuando se administra a una herida, se alcanza una concentración del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado (p.ej., TGF- β_3) de entre 10 ng/100 μ L y 500 ng/100 μ L por centímetro lineal. De preferencia, el miembro de la superfamilia del TGF- β puede ser proporcionado a concentraciones de entre 50 ng/100 μ L y 250 ng/100 μ L por centímetro lineal.

La persona versada en la técnica apreciará que la concentración de un miembro de la superfamilia del TGF- β que se puede desear que se presente en un tejido que va a ser tratado mediante la administración de una composición farmacéutica de conformidad con la invención dependerá de la potencia del miembro de la familia, y de las células y tejidos específicos que se quieren tratar.

En caso de un miembro típico de la superfamilia (como TGF- β 3) de 110-170 aminoácidos de longitud se puede preferir que las composiciones farmacéuticas de la invención se administren para alcanzar una concentración local de aproximadamente 19nM a 100nM, y más de preferencia entre 19.664 nM y 98.321 nM, en el tejido que se va a tratar.

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden usar terapéuticamente en monoterapia, es decir que la actividad terapéutica deseada es causada solamente por el uso de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención. Como alternativa, los métodos o las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar en combinación con otros compuestos o tratamientos para alcanzar el efecto terapéutico deseado. Los tratamientos adecuados que se pueden usar como parte de tales terapias combinadas dependerán del efecto terapéutico que se desea alcanzar, pero serán bien conocidas de la persona versada en la técnica.

Una ventaja muy sorprendente de las composiciones farmacéuticas de la invención (y de los métodos de tratamiento que usan tales composiciones) es que los inventores han encontrado que la administración de estas composiciones en inyección se asocia con una importante reducción del dolor y el eritema de la inyección comparado con lo que se observa tras la administración de composiciones del estado de la técnica. Este beneficio supone una gran ventaja puesto que las composiciones farmacéuticas de la invención son altamente adecuadas para ser administradas en inyección.

Sin embargo, los inventores creen que la ventaja de un menor dolor de la inyección también se puede alcanzar usando las composiciones farmacéuticas que no comprenden miembros de la superfamilia del TGF- β .

Según esto, en un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un azúcar en la manufactura de un medicamento para la prevención o la reducción del dolor de la inyección.

Este séptimo aspecto de la invención se basa en el sorprendente hallazgo hecho por los inventores de que las composiciones farmacéuticas que comprenden azúcares se acompañan de menos dolor cuando se le administran a un sujeto. En especial, los inventores han encontrado que las composiciones farmacéuticas inyectables que comprenden azúcares dan lugar a un menor dolor de la inyección cuando se inyectan a un

24

sujeto, y en una versión preferida de la invención se proporciona el uso de un azúcar en la preparación de un medicamento inyectable para la prevención o la reducción del dolor de la inyección.

En un octavo aspecto de la invención se proporciona un método de prevención o reducción del dolor de la inyección que comprende administrar a un paciente que necesita dicha prevención o reducción del dolor una cantidad efectiva de un medicamento que comprende un azúcar. Se prefiere que los medicamentos que se administran de conformidad con este aspecto de la invención sean medicamentos inyectables.

Los medicamentos de conformidad con en estos aspectos de la invención o adecuados para usarlos ellos, se pueden ser manufacturar y formular de conformidad con técnicas y formulaciones descritas en referencia a aspectos precedentes de la invención.

El dolor de la inyección es un problema médico generalmente reconocido, y constituye uno de los efectos adversos más importante que militan contra el uso de especialidades o composiciones farmacéuticas inyectables, y el dolor de la inyección (o el miedo al dolor de la inyección) puede ser causa de considerable ansiedad en pacientes que requieren inyecciones. Para estos propósitos, se puede suponer que el dolor de la inyección se refiere al dolor que se asocia con la introducción de agujas hipodérmicas, catéteres, cánulas y otros dispositivos similares en el organismo de un sujeto.

A menudo es necesario administrar inyecciones a pacientes en sitios que son ya están sujetos a sensaciones del dolor y ello puede exacerbar el nivel del dolor que percibe quien recibe la inyección. Algunos ejemplos de dichas situaciones incluyen las inyecciones en el lugar de la herida, las inyecciones asociadas con el tratamiento de infecciones, y las inyecciones asociadas con el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En muchos de estos casos la inflamación existente en el sitio en donde se va a aplicar la inyección puede aumentar la percepción del dolor asociado con la inyección del paciente.

Incluso en ausencia de inflamación u otros factores que predisponen a una intensificación del dolor de la inyección la aversión natural de los pacientes al dolor de las inyecciones tiene varios efectos nocivos. Es bien sabido que dolor de la inyección es una de las principales razones subyacentes por las cuales los pacientes pueden no iniciar o terminar regímenes terapéuticos en los cuales los medicamentos se administran en inyección. En el caso de los bebés y niños pequeños, la reacción aversiva del sujeto también puede ser traumática para los padres o tutores responsables del sujeto que recibe la inyección.

Estos problemas asociados con el dolor de la inyección se pueden aliviar parcialmente (o incluso totalmente) con los medicamentos manufacturados de conformidad con el séptimo aspecto de la invención, o con métodos de tratamiento de conformidad con el octavo aspecto de la invención.

6
3

Los inventores creen que las ventajas que brindan los medicamentos manufacturados de conformidad con el séptimo aspecto de la presente invención también son proporcionadas por todos los medicamentos de la invención (es decir, los medicamentos de conformidad con los otros aspectos de la invención). Así pues, excepto en los casos en los cuales el contexto exija otra cosa, se ha de considerar que las ventajas que se describen a continuación en relación con los medicamentos del séptimo aspecto de la invención (y los métodos del octavo aspecto de la invención) son proporcionadas por las composiciones farmacéuticas de la invención (dado que todas ellas comprenden los azúcares de los que se piensa que son responsable de la prevención o reducción del dolor de la inyección).

Una de las notables ventajas de los medicamentos de la invención es su acción muy rápida de prevención o reducción del dolor de la inyección. Los medicamentos de la invención son capaces de ejercer su actividad contra el dolor de la inyección de forma casi instantánea al ser inyectados al paciente. Según esto, los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención son capaces de prevenir o reducir el dolor de la inyección más efectivamente de lo que sucedería como resultado de la inyección a través de la cual se le administran los medicamentos a un paciente.

Se reconocerá que la acción inmediata de los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención proporciona muchas ventajas en el contexto clínico. Al usar los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención no se necesita dar tratamiento previo a un paciente o sitio de inyección con el fin de aliviar o prevenir el dolor de la inyección. Esto reviste considerable importancia dado que muchos médicos actúan bajo una considerable presión de tiempo, y el gasto adicional de tiempo asociado con los regímenes existentes de pre-tratamiento orientados a reducir el dolor de la inyección es uno de los principales factores que influyen de manera adversa el uso de dichos regímenes en la práctica. En efecto, incluso la percepción de que el uso de regímenes existentes de pre-tratamiento requiere un gasto considerable de tiempo impide que su aplicación sea más extendida. Dado que los medicamentos de la invención se pueden administrar por medio de la misma inyección cuyo dolor se desea reducir, se apreciará que su uso no suma tiempo adicional al proceso de administrar la inyección.

La persona versada en la técnica apreciará de inmediato que los medicamentos manufacturados de conformidad con los métodos de la invención (y en especial aquellos manufacturados de conformidad con el séptimo aspecto de la invención) se pueden usar como "vehículos" que incorporan otros agentes activos. Al incorporar estos otros agentes activos a los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención es posible administrar los agentes activos a un paciente por medio de inyección con la ventaja de que el paciente a quien se le va a administrar el medicamento experimenta un menor dolor de la

inyección. Según esto, supone una versión preferida de la invención que los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención además comprendan un agente activo que se va a administrar con menor dolor de la inyección.

Se deberá suponer que un “agente activo” como el que se considera en el contexto de esta versión de la invención incluye:

- i) todos los agentes activos terapéuticos adecuados;
- ii) todos los agentes activos anestésicos adecuados;
- iii) todos los agentes activos diagnósticos adecuados; y
- iv) todos los agentes activos cosméticos adecuados.

Se apreciará que los miembros de la superfamilia del TGF- β constituyen agentes activos preferidos que pueden ser incorporados en los medicamentos y las composiciones farmacéuticas de la invención. Otros ejemplos específicos e ilustrativos ejemplos de agentes activos adecuados que pueden ser incorporados con provecho en los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención se consideran más adelante.

Dado que los azúcares que se usan en la manufactura de los medicamentos de conformidad con la invención son generalmente sustancias inertes, se pueden combinar en medicamentos con muchos agentes activos adecuados sin temer una reacción adversa. Los azúcares que se usan en los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención no tienden a comprometer la actividad de otros agentes activos que se pueden incorporar en los medicamentos, y tampoco tienden a reducir la vida útil de las composiciones que comprenden dichos agentes activos.

Los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención proporcionan muchas ventajas sobre los anestésicos locales que se usan por lo común en muchas estrategias existentes para la prevención o reducción del dolor de la inyección. Una de las principales ventajas que confieren los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención es que los medicamentos (que se basan alrededor del uso de azúcares) comportan un riesgo mucho menor de reacciones adversas que las preparaciones anestésicas existentes. Las pautas de la Organización Mundial de la Salud sugieren que en numerosos contextos en los cuales se emplean anestésicos locales se recomienda que el personal médico presente esté entrenado en el uso de los anestésicos, y también que el sitio cuente con equipos de emergencia, incluidos oxígeno y equipo de reanimación. Como se apreciará, el cumplimiento de estos requisitos supone un costo considerable, tanto en términos de entrenamiento como de los equipos necesarios.

En contraposición, los medicamentos preparados de conformidad con la presente invención son a la vez seguros y fáciles de usar. Las personas que administran los

λ
m

medicamentos manufacturados de conformidad con la invención no requieren un entrenamiento específico en anestesia, solo la capacidad de aplicar inyecciones. Las destrezas necesarias para aplicar inyecciones se le pueden enseñar fácilmente a los pacientes, y dado que no se necesitan equipos de emergencia los pacientes se pueden administrar ellos mismos los medicamentos, y así obtener los beneficios de la reducción del dolor de la inyección, en el seno de su propio hogar.

Los azúcares que se usan en los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención en general no se asocian con reacciones de sensibilidad peligrosas que pueden presentarse con los anestésicos que se usan comúnmente en las estrategias existentes contra el dolor de la inyección. Por ejemplo, hipersensibilidad a la xilocaína (un anestésico local de uso común) suele ser reconocida como uno de los principales efectos secundarios adversos del uso de este anestésico local.

La inyección intravascular incluso de pequeñas cantidades de anestésico local puede alcanzar niveles sanguíneos potencialmente tóxicos. Según esto, un objetivo reconocido de la investigación es producir medicamentos capaces de reducir el dolor de la inyección sin la necesidad de administrar anestésicos locales. Los medicamentos de este tipo pueden especialmente útiles en tejidos, como la boca, que contienen muchos vasos sanguíneos y por tanto se asocia con un aumento del riesgo de inyección intravascular accidental.

En contraposición, el efecto de los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención está dado por azúcares que se metabolizan fácilmente, y que en general se asocian con un riesgo muy bajo de reacciones adversas. Según esto, constituye una versión preferida de la invención que los medicamentos se usen en la prevención o reducción del dolor de la inyección en pacientes predispuestos a una mayor sensibilidad a los anestésicos locales, y más de preferencia en personas predispuestas a hipersensibilidad a la xilocaína.

Otra ventaja de los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención, cuando se comparan con el uso de anestésicos locales descritos en el estado de la técnica, es que los medicamentos de la invención no ocasionan constricción de los vasos sanguíneos, lo cual sucede a menudo como resultado de la administración de anestésicos locales conocidos. Tal constricción de vasos sanguíneos (que puede ser causada especialmente por la administración previa de los anestésicos locales) puede dificultar la administración de inyecciones en los vasos sanguíneos. Esta desventaja es obviada por los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención. En efecto, el uso de los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención en la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con inyecciones dentro de los vasos sanguíneos constituye una versión preferida de la invención.

B
h

Los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención también constituyen una forma notablemente efectiva por costos de reducir el dolor de la inyección. En contraposición con los costosos anestésicos locales, agentes refrigerantes y similares que se usan las estrategias existentes diseñadas para reducir el dolor de la inyección, los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención emplean azúcares relativamente poco costosos. Según esto, los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención ofrecen una notable ventaja sobre el estado de la técnica en virtud de su bajo costo de manufactura.

Los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención pueden ser especialmente beneficiosos para individuos que requieren la administración repetida de inyecciones. Por ejemplo, los medicamentos de la invención pueden ser especialmente adecuados para que los usen los diabéticos. Cuando los usan por individuos aquejados de diabetes los medicamentos manufacturados de conformidad con el séptimo aspecto de la invención se pueden usar para reducir el dolor de la inyección asociado con inyecciones requeridas para el control o la regulación de la diabetes, como inyecciones de insulina o glucagón. Se apreciará que los medicamentos de la invención que incorporan miembros de la superfamilia del TGF- β , como TGF- β_3 , puede ser especialmente preferidos para que los usen pacientes que requieren inyecciones repetidas en sitios de cicatrización de heridas. En particular esto puede ser útil para pacientes aquejados por condiciones de cicatrización aberrante de heridas, como los que sufren de lesiones crónicas o de cicatrices patológicas.

Como ya se dijo, los inventores han encontrado que los efectos beneficiosos conferidos por las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se pueden obtener usando cualquier azúcar de los hasta ahora examinados. En efecto, los inventores han encontrado que las sales o derivados de azúcares se pueden usar efectivamente en la manufactura de medicamentos de conformidad con la invención. Sin embargo, puede ser preferible que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención comprendan un azúcar seleccionado de entre el grupo compuesto por maltosa, sacarosa, glucosa y manosa. Más de preferencia el azúcar utilizado en las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se puede seleccionar de entre el grupo compuesto por maltosa y sacarosa, y la máxima preferencia es que el azúcar sea maltosa. El uso de maltosa proporciona particulares ventajas ya que muestra la máxima eficacia no solo en la prevención del dolor de la inyección, sino que también aminora los efectos de eritema que por lo demás se pueden asociar con las inyecciones.

Excepto en donde el contexto exija otra cosa, las referencias a azúcares en el contexto de medicamentos para la reducción del dolor de la inyección también se debe asumir que abarcan sales, derivados y variantes de azúcares farmacéuticamente aceptables. Dichas

a
3

sales, derivados y variantes de preferencia pueden ser sales, derivados o variantes de azúcares seleccionados de entre el grupo compuesto por maltosa, manosa, sacarosa y glucosa, más de preferencia maltosa.

Se puede preferir que un medicamento manufacturado de conformidad con la invención comprenda un azúcar proporcionado en una concentración mayor de 50 mg/mL. Tales medicamentos pueden comprender un azúcar a una concentración de entre 51 y 200 mg/mL, de preferencia a una concentración de entre 60 y 150 mg/mL, más de preferencia a una concentración de entre 70 y 100 mg/mL, todavía más de preferencia a una concentración de entre 80 y 95 mg/mL, y la máxima preferencia a una concentración de entre 85 y 90 mg/mL.

Como alternativa o además, un medicamento manufacturado de conformidad con la invención puede comprender un azúcar proporcionado a una concentración de entre 0,001 y 5M, o de entre 0,005 y 2M. De preferencia el azúcar se proporciona a una concentración de entre 0,01 y 1M, más de preferencia a una concentración de entre 0,1 y 0,5, todavía más de preferencia a una concentración de entre 0,2 y 0,4, y la máxima preferencia a una concentración de cerca de 0,25M.

Los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención son particularmente apropiados para administrarlos a la piel, por ejemplo por inyección intradérmica o subcutánea. Sin embargo, los medicamentos también se pueden usar efectivamente en la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con inyecciones en otros lugares del cuerpo como, por ejemplo, las inyecciones que se administran en el ojo; las inyecciones que se administran a la boca y el sistema digestivo; las inyecciones que se administran en el sistema nervioso; las inyecciones en el sistema urogenital; o las inyecciones en el sistema respiratorio; los riñones; tendones; ligamentos; el corazón o el sistema circulatorio.

Los medicamentos de la invención son especialmente adecuados para usar en inyecciones en sitios en donde la inflamación existente puede por lo demás aumentar el grado del dolor de la inyección que es percibido por un paciente que recibe una inyección. Según esto, los medicamentos de la invención de preferencia se pueden usar para la prevención o reducción del dolor de la inyección cuando se inyectan en un sitio inflamado. Dichos sitios inflamados pueden incluir sitios de heridas o abrasiones, sitios de artritis (incluidos sitios de inyección afectados por osteoartritis, artritis reumatoide, y espondiloartropatías); sitios inflamados asociados con esclerosis múltiple; sitios sujetos a una reacción alérgica (incluidas rinitis/sinusitis alérgica; alergias de piel incluídas urticaria/habones; angioedema; dermatitis ectópica; inflamación asociada con alergias alimenticias; inflamación asociada con alergias a los medicamentos o a los insectos; o

29

inflamación asociada con otros trastornos alérgicos específicos como la mastocitosis), trastornos autoinmunes (incluidos lupus eritematoso sistémico; dermatomiositis y polimiositis); neuropatías inflamatorias como la enfermedad de Guillain Barré y polineuropatías inflamatorias; vasculitis como la granulomatosis de Wegener o la poliarteritis nodosa; y otros trastornos autoinmunes como polimialgia reumática; arteritis temporal, síndrome de Sjogren; enfermedad de Bechet; síndrome de Churg-Strauss y arteritis de Takayasu.

Los medicamentos de la invención también pueden ser de provecho en casos de inyección en sitios de inflamación cardiovascular, inflamación gastrointestinal, infección u otros sitios que involucran una reacción inmunitaria, trastornos neuroinflamatorios y sitios de trasplante.

Un riesgo reconocido del uso de anestésicos locales convencionales es que, cuando se usan sobre la piel afectada como la que se encuentra en áreas inflamadas, heridas o infectadas, existe la tendencia a un aumento de la captación del anestésico a través de la piel dañada piel que puede conducir al desarrollo de una reacción sistémica, antes que local. Esto es especialmente notorio en el caso de anestésicos locales de aplicación tópica.

En contraposición, los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención confieren una marcada ventaja en términos de su mejor seguridad ya que, aun en el evento de una captación sistémica, los azúcares que se usan en su preparación no se asocian con efectos deletéreos. Según esto, supone una versión preferida de la invención que los medicamentos se usen en la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con inyecciones en sitios donde la piel está afectada. Se prefiere especialmente, como se anotó en otra parte, que los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención se usen en la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con inyecciones en sitios de inflamación; sitios de heridas (incluidos sitios de trasplante); o áreas infectadas.

Los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención pueden incorporar agentes activos que son beneficiosos en el tratamiento o el manejo de áreas heridas. Algunos ejemplos de agentes activos que se pueden incorporar con provecho en medicamentos que se van a administrar por inyección en el sitio de las heridas incluyen:

- i) Agentes activos terapéuticos, en especial aquellos que tienen un efecto beneficioso sobre la cicatrización de heridas o la formación de cicatrices. Algunos agentes activos terapéuticos adecuados pueden ser capaces de promover o acelerar la respuesta de la cicatrización de heridas o de prevenir o inhibir la formación de cicatrices. Algunos ejemplos de dichos agentes activos terapéuticos adecuados incluyen miembros de la superfamilia del

41

TGF- β (como se describe en más detalle abajo) y agentes capaces de neutralizar la función de factores de crecimiento fibrogénicos.

- ii) Agentes activos anestésicos. Existen varios contextos en los cuales puede ser provechoso administrar agentes activos anestésicos en áreas heridas, por ejemplo para facilitar la limpieza, el cierre o el vendaje de la herida.

Se debe suponer que los agentes activos terapéuticos que tienen un efecto beneficioso sobre la cicatrización de las heridas adecuados para incorporarlos en los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención abarcan cualquier sustancia que tiene un efecto beneficioso sobre la cicatrización de las heridas. Las sustancias que tienen un efecto beneficioso sobre la cicatrización de heridas pueden, por ejemplo, incluir sustancias capaces de iniciar o estimular la respuesta natural de la cicatrización de las heridas, así como aquellas sustancias capaces de acelerar la respuesta de cicatrización de las heridas.

En un noveno aspecto de la invención se proporciona un método de prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la administración de una inyección en el sitio de la herida, el cual método comprende administrar, mediante inyección en un sitio de la herida, una cantidad terapéuticamente efectiva de un medicamento que comprende un azúcar a un paciente que necesita de dicha prevención o reducción del dolor de la inyección. Una cantidad terapéuticamente efectiva en el contexto de este aspecto de la invención será una cantidad de un medicamento suficiente para prevenir o reducir el dolor de la inyección percibido por el paciente a quien se le administra el medicamento. Los medicamentos que se van a administrar de conformidad con este aspecto de la invención pueden de preferencia además comprender un agente activo adecuado para la promoción de la cicatrización de heridas o para la prevención de la formación de cicatrices. Algunos ejemplos preferidos de tales agentes activos pueden incluir miembros de la superfamilia del TGF- β , y más de preferencia pueden incluir al TGF- β 3.

La persona versada en la técnica apreciará que los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención y que comprenden un agente activo de provecho para el proceso de cicatrización de las heridas también se le pueden administrar a un paciente antes de que sufra la herida. Los agentes activos adecuados pueden incluir aquellos capaces de promover a curación o de prevenir o inhibir la formación de cicatrices, como los miembros de la superfamilia del TGF- β . Como alternativa, o además, los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención pueden contener un anestésico útil en la prevención del dolor que por lo demás puede ser causado por una herida que se va a formar.

2
x

Es bien sabido que uno de los procedimientos médicos que con más frecuencia da lugar al dolor de la inyección es la administración de agentes anestésicos inyectados. Aunque tales agentes pueden ser capaces de reducir efectivamente el dolor una vez que se han administrado y ha pasado tiempo suficiente para que ellos alcancen su actividad anestésica, la inyección con la cual se administran es a menudo causa de considerable dolor para quien la recibe.

Aunque supone un objetivo de ciertas versiones de la invención proporcionar un medio por el cual se evite o reduzca el uso de anestésicos conocidos, en especial en contextos en los cuales su uso puede dar lugar a efectos secundarios indeseados o peligrosos, la persona versada en la técnica apreciará que los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención se pueden usar como "vehículos" adecuados para agentes activos anestésicos (como anestésicos inyectables). Cuando se usan de esta forma los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención sirven para prevenir o reducir el dolor de la inyección que por lo demás se asociaría con la administración del agente activo anestésico. Así las cosas, en una versión alternativa preferida, un medicamento manufacturado de conformidad con la invención además puede comprender un agente activo anestésico. Para efectos de la presente invención se puede suponer que un agente activo anestésico adecuado para ser incorporado en los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención es cualquier sustancia que tiene propiedades anestésicas. Un agente activo anestésico adecuado para ser incorporado en los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención puede ser un anestésico local inyectable. En una versión especialmente preferida de la invención el agente activo anestésico es el anestésico local xilocaína.

Los medicamentos manufacturados de conformidad con esta versión de la invención son adecuados para usar en todos los contextos en los cuales los anestésicos se pueden administrar por inyección. Ejemplos de tales contextos serán bien conocidos de la persona versada en la técnica y se consideran en otra parte en la especificación.

No obstante, existen numerosos contextos en los cuales los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención se usan con especial provecho en la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección de anestésicos locales.

Así pues, en un ejemplo preferido, los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención se pueden usar para prevenir o reducir el dolor de la inyección asociado con la inyección de anestésicos locales en la boca. Se ha demostrado que el dolor que se asocia con la inyección de anestésicos locales en la boca es especialmente traumático para los pacientes y se cree este aumento del traumatismo surge como resultado

3
4

del hecho de que el dolor es percibido como asociado con la cabeza del paciente. Esta localización aumenta tanto el grado del dolor de la inyección que percibe el paciente como la sensación desagradable de dicho dolor. Además, la percepción acrecentada del dolor por parte del paciente también exacerba el trauma experimentado por un médico u odontólogo que administra estas inyecciones.

Los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención también se pueden usar para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con inyecciones de anestésico en otros sitios en la cabeza del paciente, en especial con la inyección de anestésicos en sitios en la cara del paciente.

Como se describió antes, los medicamentos de la invención también se pueden usar como “vehículos” para agentes activos diagnósticos, con lo cual la reducción o prevención del dolor de la inyección que por lo demás podría asociarse con la administración del agente activo diagnóstico. Algunos ejemplos de agentes activos diagnósticos que se pueden administrar por inyección, y que pueden en consecuencia incorporarse con ventaja a los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención incluyen agentes radioopacos. Tales agentes activos diagnósticos se le administran a un paciente en inyección (por ejemplo en los vasos sanguíneos o el líquido cefalorraquídeo) y su capacidad de absorber rayos x que se usan como ayuda del diagnóstico. Algunos ejemplos de agentes activos diagnósticos adecuados que pueden ser incorporados en los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención incluyen diatrizoatos, iohexol, iopamidol, iotalamato, ioversol, ioxagato, y metrizamida. Estos agentes diagnósticos activos radioopacos se pueden usar en el diagnóstico de enfermedades o padecimientos como problemas del tracto biliar, enfermedades de los vasos sanguíneos, enfermedades de los vasos sanguíneos del cerebro, enfermedades de los vasos sanguíneos del corazón, cerebro enfermedades y tumores, lesiones de la mama, enfermedad cardíaca, alteración del flujo del líquido cefalorraquídeo en el cerebro, enfermedades del riñón, enfermedades de las articulaciones, enfermedades hepáticas, enfermedades pancreáticas, enfermedades vertebrales como enfermedades de los discos, enfermedades del bazo, problemas gástricos e intestinales, o problemas del tracto urinario.

Los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención pueden incorporar con ventaja agentes activos cosméticos. Existen numerosos agentes activos cosméticos que típicamente se administran a los pacientes por medio de inyecciones. Por ejemplo, las inyecciones de la toxina botulínica (más conocidas como las inyecciones de “botox”) usualmente se administran en inyección intradérmica de la toxina en el sitio requerido de un paciente. Las inyecciones de la toxina botulínica a menudo se administran en sitios de la cara o el cuello del paciente que está siendo tratado, y esta administración suele asociarse

44

con dolor que puede ser aliviado por la incorporación de toxina botulínica en los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención.

Otro procedimiento cosmético que involucra la administración de agentes activos cosméticos en inyección, y por ende que se asocia con dolor de la inyección, es la inyección de rellenos cosméticos. Estos agentes activos (que típicamente incluyen colágeno, ácido hialurónico, grasa y otras sustancias relacionadas) se pueden administrar por inyección en sitios en donde se desea "rellenar" la piel, por ejemplo rellenar arrugas asociadas con el proceso de envejecimiento, aumento del perfil de los labios o relleno de cicatrices como las causadas por el acné. El dolor de la inyección asociado con la administración de rellenos cosméticos se puede prevenir o reducir por la incorporación de rellenos cosméticos adecuados en los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención.

Los inventores han encontrado que la prevención o reducción del dolor de la inyección es proporcionada por los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención con respecto de todas las vías de inyección investigadas.

A manera de ejemplo, los inventores han encontrado que los medicamentos de conformidad con la invención se pueden usar para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección intradérmica. Según esto, en una versión preferida de la invención un medicamento adecuado puede ser un medicamento inyección por vía intradérmica para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección intradérmica.

Los inventores también han encontrado que los medicamentos de conformidad con la invención se pueden usar para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección subcutánea. Según esto, en otra versión preferida de la invención un medicamento adecuado puede ser un medicamento inyección por vía subcutánea para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección subcutánea.

Los inventores además han encontrado que los medicamentos de conformidad con la invención se pueden usar para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección intravenosa. Como ya se anotó, los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención se pueden usar con ventaja en inyecciones dentro de los vasos sanguíneos dado que estos pueden prevenir o reducir el dolor de la inyección sin contribuir a la constricción de los vasos sanguíneos. Según esto, en otra versión preferida de la invención, un medicamento adecuado puede ser un medicamento inyección por vía intravenosa para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección intravenosa.

Los inventores también encontraron que los medicamentos de conformidad con la invención se pueden usar para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado

✓ 5

con la inyección intramuscular. Según esto, en otra versión preferida de la invención un medicamento adecuado puede ser un medicamento inyectable por vía intramuscular para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección intramuscular.

Los inventores además también encontraron que los medicamentos de conformidad con la invención se pueden usar para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección intraperitoneal. Según esto, en otra versión preferida de la invención un medicamento adecuado puede ser un medicamento inyectable por vía intramuscular para la prevención o reducción del dolor de la inyección asociado con la inyección intraperitoneal.

Se prefiere especialmente que los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención se puedan formular para inyección intradérmica, o se puedan formular para inyección subcutánea. Las formulaciones típicas adecuadas para inyección intradérmica o inyección subcutánea serán bien conocidas de la persona versada en la técnica.

Aunque las composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento de la presente invención son especialmente adecuadas para usar en los seres humanos, y se han descrito en gran medida en referencia a dicho uso, se apreciará que también son susceptible de ser empleadas en otras especies animales; y en especial en animales domésticos y agropecuarios como perros, gatos, ganado y caballos.

La invención se describirá en más detalle, por ejemplo, haciendo referencia a los Resultados Experimentales y Las Figuras que se acompañan, en los cuales:

La Figura 1 ilustra miembros de la superfamilia del TGF- β , y las relaciones entre miembros de la superfamilia;

La Figura 2 ilustra la secuencia de aminoácidos de los miembros de la superfamilia del TGF- β TGF- β_1 (Secuencia ID No. 1), TGF- β_2 (Secuencia ID No. 2) y TGF- β_3 (Secuencia ID No. 3); y

La Figura 3 ilustra, en los paneles 3A a 3J, los resultados de experimentos que comparan la actividad biológica inherente al miembro de la superfamilia del TGF- β TGF- β_3 cuando se incorpora en las composiciones farmacéuticas conforme a la invención, o en las composiciones farmacéuticas del estado de la técnica. La Figura 3 A muestra una primera curva estándar generada usando la formulación del estado de la técnica DS11, en la cual el TGF- β_3 tiene un IC₅₀ de 34,793 pg/mL. La Figura 3B muestra una segunda curva estándar generada usando la formulación del estado de la técnica DS11, en la cual el TGF- β_3 tiene un IC₅₀ de 24,136 pg/mL. La Figura 3C muestra una tercera curva estándar generada usando la formulación del estado de la técnica DS11, en la cual el TGF- β_3 tiene un IC₅₀ de 22,055 pg/mL. La Figura 3D muestra una cuarta curva estándar generada usando

46

la formulación del estado de la técnica DS11, en la cual el TGF- β 3 tiene un IC₅₀ de 30,562 pg/mL. La Figura 3E muestra una quinta curva estándar generada usando la formulación del estado de la técnica DS11, en la cual el TGF- β 3 tiene un IC₅₀ de 39,973 pg/mL. La Figura 3F muestra una primera curva estándar generada usando una formulación de maltosa de conformidad con la invención, en la cual el TGF- β 3 tiene un IC₅₀ de 8,758 pg/mL. La Figura 3G muestra una segunda curva estándar generada usando una formulación de maltosa de conformidad con la invención, en la cual el TGF- β 3 tiene un IC₅₀ de 5,957 pg/mL. La Figura 3H muestra una tercera curva estándar generada usando una formulación de maltosa de conformidad con la invención, en la cual el TGF- β 3 tiene un IC₅₀ de 7,72 pg/mL. La Figura 3I muestra una cuarta curva estándar generada usando una formulación de maltosa de conformidad con la invención, en la cual el TGF- β 3 tiene un IC₅₀ de 7,31 pg/mL. La Figura 3J muestra una quinta curva estándar generada usando una formulación de maltosa de conformidad con la invención, en la cual el TGF- β 3 tiene un IC₅₀ de 6,798 pg/mL.

La tabla 1 compara la cantidad de un miembro de la superfamilia del TGF- β recuperable de las composiciones farmacéuticas de la invención con la cantidad recuperable de composiciones conocidas del estado de la técnica;

La tabla 2 compara la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β recuperada de las composiciones de conformidad con la invención con la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF- β recuperada de composiciones conocidas del estado de la técnica;

La tabla 3 muestra los resultados de una valoración del dolor de la inyección comparando los resultados alcanzados usando los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención con los resultados obtenidos usando composiciones del estado de la técnica; y

La tabla 4 resume los resultados que se muestran en la tabla 4.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Material a granel de TGF- β 3

El miembro de la superfamilia del TGF- β TGF- β 3 fue suministrado en una solución estándar a una concentración de 9,1 mg/mL en ácido acético 20 mM y alcohol isopropílico al 20% (v/v). Esta solución estándar se sometió a dilución en serie para producir composiciones que incorporan al miembro de la superfamilia TGF- β 3. Las concentraciones del TGF- β 3 incorporado en las composiciones empleadas en los siguientes experimentos se describen a continuación.

A. Recuperación del TGF- β 3 de jeringas prellenadas que contienen las composiciones farmacéuticas.

2
4

El siguiente experimento investigó la recuperación del miembro de la superfamilia del TGF- β TGF- β_3 de jeringas prellenadas que contienen composiciones ya sea de conformidad con la invención, o de conformidad con el estado de la técnica.

A1. Producción de las jeringas prellenadas.

Las composiciones que incorporan al miembro de la superfamilia del TGF- β TGF- β_3 a una concentración de 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ fueron producidas por dilución seriada aséptica del material a granel arriba descrito. Los siguientes fueron los diluyentes empleados para producir las composiciones de prueba de conformidad con la presente invención:

- i) maltosa 0,25M (equivalente a 90 mg/mL);
- ii) glucosa 0,25M (equivalente a 45 mg/mL);
- iii) sacarosa 0,25M (equivalente a 86 mg/mL); y
- iv) manosa 0,25M (equivalente a 45 mg/mL).

Para efectos de la comparación, una composición que representa composiciones preferidas del estado de la técnica se produjo por dilución de la solución estándar para producir una solución de 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ del TGF- β_3 en DS11 (un diluyente comprende amortiguador de fosfato en solución salina PBS y manitol 5% (p/v)).

Las jeringas estériles de 1 mL se llenaron con muestras de 750 μL de cada una de las composiciones formadas. De esta manera cada jeringa contenía una cantidad definida de una composición experimental o de comparación en la cual se incorporó una cantidad conocida del miembro de la superfamilia del TGF- β TGF- β_3 . Las jeringas que contenían las composiciones de la invención y las que contenían la composición del estado de la técnica se almacenaron a 4°C durante una semana. Estas condiciones experimentales de almacenamiento sirvieron de modelo para la forma típica en la cual las composiciones farmacéuticas se guardan refrigeradas antes de su uso terapéutico.

Con el fin de evaluar la cantidad del TGF- β_3 recuperable de las composiciones de la invención y la composición del estado de la técnica, el contenido de las jeringas se recuperó (expulsándolo de la jeringa) y la cantidad de proteína TGF- β_3 recuperable se evaluó mediante técnica de ELISA como se describe a continuación.

A2. Valoración de la recuperación del TGF- β por ELISA

Se hizo el siguiente examen para comparar la recuperación del miembro de la superfamilia del TGF- β TGF- β_3 de las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención con la cantidad del TGF- β_3 recuperable de composiciones del estado de la técnica. La prueba puede ser fácilmente adaptada, mediante sustitución de la captación y detección de los anticuerpos adecuados y el uso de una curva estándar adecuada, que permita la valoración de la recuperación de otros miembros de la superfamilia del TGF- β de las composiciones farmacéuticas de interés (por ejemplo, otras composiciones de

cf
u

conformidad con la invención, u otras composiciones de control conocidas del estado de la técnica).

A2.1. Preparación de las placas para ELISA.

Se recubrieron 96 placas de pozo (Falcon 353912) con 100 μ L/pozo de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- β_3 de captación (R&D Systems MAB643) diluido en PBS a una concentración de 2 μ g/mL. Entonces se sellaron las placas y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente para permitir que el anticuerpo se adhiriera a los pozos. Después de la incubación cada pozo se succionó y se lavó tres veces con 300 μ L/pozo (cada lavado) de amortiguador de lavado (comprende Tween 20 0,05% (v/v) en PBS, pH 7,4). Los sitios no específicos de unión a las proteínas fueron bloqueados mediante la adición de 150 μ L/pozo de PBS que contenía BSA 1% (p/v), sacarosa 5% (p/v) y azida de sodio 0,05% (p/v). Los pozos que contenían esta solución se incubaron a temperatura ambiente durante una hora.

A2.2. Preparación de la curva estándar del TGF- β_3

Todas las diluciones estándar y de muestra se hicieron ya sea en una solución 0,25M de azúcar (es decir, maltosa, glucosa, manosa o sacarosa) o en diluyente para ELISA (0,1% (p/v) BSA, Tween 20 0,05% (v/v) en solución salina Tris-amortiguadora pH 7.3).

Se preparó una serie estándar de TGF- β_3 usando TGF- β_3 humana recombinante (R&D Systems 243- β_3) o TGF- β_3 (de la solución estándar a una concentración de 9,1 mg/mL en ácido acético 20mM y alcohol isopropílico al 20% (v/v)), que osciló entre 31,25 pg/mL y 2000 pg/mL.

A2.3. Prueba de recuperación

A cada pozo se le añadió un volumen de 100 μ L bien sea de las soluciones de la muestra o estándar. Entonces la placa se selló e incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después se succionaron los pozos y se lavaron en total tres veces con 300 μ L/pozo de amortiguador de lavado (como se indicó arriba) para cada lavado.

Una vez que los pozos se succionaron y lavaron, a cada pozo se le añadió un volumen de 100 μ L de anticuerpo de detección biotinilado anti-TGF- β_3 (R&D Systems BAF243) diluido hasta 100 ng/mL en diluyente para ELISA (como se indicó arriba). La placa se selló e incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Entonces los pozos se succionaron y lavaron en total tres veces con 300 μ L/pozo de amortiguador de lavado (como se indicó arriba) para cada lavado. Entonces a cada pozo se le añadió un volumen de 100 μ L/pozo de Streptavidin HRP (Dako P0397) diluido 1:5000 en diluyente para ELISA, y la placa se selló e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces los pozos se succionaron y lavaron en total tres veces, usando 300 μ L/pozo de amortiguador de lavado para cada lavado. Entonces a cada pozo se le añadió un volumen de 100 μ L de Solución Sustrato (R&D Systems DY999), la placa se cubrió e incubó durante 20 minutos a

49

temperatura ambiente. A cada pozo se le añadió un volumen de 50 µL de Solución de Detención (H₂SO₄ 0,5M). Entonces se determinó la densidad óptica del contenido de cada pozo, en un tiempo de 30 minutos, usando un lector de microplaca a una longitud de onda de 450 nm (la corrección de la longitud de onda se fijó a 570 nm). Entonces se determinó la cantidad del TGF-β₃ presente en las muestras, que representa al TGF-β₃ recuperable de las composiciones, haciendo referencia a la curva estándar. Los resultados se expresan en la tabla 1, como las veces de aumento del material recuperado de la jeringa comparado con la formulación DS11 (manitol) representativa de las composiciones preferidas conocidas del estado de la técnica.

A3. Resultados de la prueba de recuperación

El TGF-β₃ recuperable detectado en una formulación de PBS/Manitol (DS11) fue de 284,8 (±0,03) ng/100 µL.

Los incrementos de la recuperación del TGF-β₃ de las jeringas que contienen composiciones de conformidad con la invención luego de una semana almacenamiento a 4°C (comparada con la recuperación de TGF-β₃ de las jeringas que contienen la formulación DS11 sometida a las mismas condiciones de almacenamiento) se muestra en La tabla 1.

Los resultados claramente indican que las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención permiten un gran aumento de la recuperación del miembro de la superfamilia del TGF-β incorporado en ellas en comparación con el nivel de recuperación que es posible usando composiciones preferidas conocidas del estado de la técnica.

Tabla 1

Formulación	Veces en que se incrementa el material recuperable comparado con la formulación DS11
Sacarosa	3,18
Maltosa	4,91
Glucosa	2,18
Manosa	2

B. Actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF-β incorporados en las composiciones farmacéuticas de conformidad con el primer aspecto de la invención.

La actividad biológica inherente del miembro de la superfamilia del TGF-β TGF-β₃ incorporado en composiciones de la invención se determinó de conformidad con la

siguiente prueba, que se basa en la capacidad de los miembros de la superfamilia del TGF- β de inhibir la proliferación de las células del epitelio pulmonar del visón. La actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado se puede valorar entonces determinando su valor IC₅₀ (la concentración a la cual se observa una inhibición de 50% de la respuesta de proliferación celular).

Esta prueba representa un medio adecuado para determinar la actividad biológica de otros miembros de la superfamilia del TGF- β incorporados en composiciones de la invención, o en composiciones conocidas que se usan para propósitos de comparación.

B1. Detalles experimentales de la prueba de actividad biológica.

En pocas palabras, la actividad biológica del TGF- β_3 incorporado en una composición de conformidad con el primer aspecto de la invención se determinó midiendo la inhibición de la proliferación de las células epiteliales del pulmón del visón (Mv-I-Lu) (No Cat. ATCC CCL-64) producida por el miembro de la superfamilia del TGF- β . La inhibición de la proliferación se valoró usando un reactivo MTT (No Cat. Sigma M2279). El MTT es el bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio, una sal soluble de tetrazolio que se convierte en su producto formazán por la actividad metabólica (deshidrogenasas mitocondriales) de las células. Los cristales insolubles de formazán se solubilizan con isopropanol acidificado y la intensidad de la solución resultante se mide colorimétricamente a una longitud de onda de 570 nm.

En pocas palabras, 1×10^5 /mL de células epiteliales de pulmón de visón se inocularon en placas de 96 pozos en 100 μ L de medio de cultivo (DMEM + 10% (v/v) Suero fetal bovino, Glutamina 20mM, Hepes 0,1M) por pozo. Las células se incubaron a 37°C en CO₂ 5% (v/v), y se dejaron conglomerar durante 24 horas. El TGF- β_3 se diluyó justo antes de usarlo (es decir, sin almacenamiento previo) en DS11, que comprende solución salina con amortiguador de fosfato (PBS) que contiene manitol 5% (p/v), o maltosa 0,25M para generar curvas estándar a diez veces la concentración final de la prueba de 1,9-500 pg/mL. Las muestras se diluyeron más al 1:5 en medio de cultivo celular antes de la adición de 100 μ L de estas muestras a cada pozo que contenía 100 μ L de medio de cultivo celular (que da lugar a una dilución adicional 1:2 en el pozo y en consecuencia concentraciones finales de la prueba de 1,9-500 pg/mL). Entonces las células de cada pozo se expusieron a las muestras durante cinco días a 37°C en CO₂ 5%(v/v). Al final de la exposición a cada pozo se le añadieron 50 μ L de reactivo (2 mg/mL estándar disuelto en PBS). Las placas se incubaron durante otras cuatro horas a 37°C en CO₂ 5%(v/v). Después de este periodo se extrajo el sobrenadante de cada pozo y los cristales precipitados de formazán se disolvieron mediante la adición de 100 μ L/pozo de isopropanol ácido. El MTT solubilizado en cada pozo se cuantificó usando un lector de placa de 96 pozos a una longitud de onda de 570 nm.

5

Los datos se llevaron a gráfica usando XLFit 3 y se calcularon los valores de IC₅₀ para cinco curvas individuales para cada formulación. El valor de IC₅₀ para cada formulación se expresó como la media (± desviación estándar) de estas curvas estándar individuales.

B2. Resultados de la prueba de actividad biológica.

Los resultados de cinco repeticiones de la prueba de actividad biológica usando tanto una composición conocida del estado de la técnica (Figuras 3A a 3E) y una composición de la invención (Figuras 3F a 3J) se muestran en la Figura 3. Las medias (± desviación estándar) de las curvas individuales que se muestran en la Figura 3 se dan en la tabla 2:

Los resultados ilustran claramente que el valor de IC₅₀ (para la inhibición de proliferación de las células del epitelio pulmonar del visón) del TGF-β₃ incorporado en las composiciones farmacéuticas de conformidad con la invención se reduce en gran medida en comparación con el valor que se obtiene con el TGF-β₃ incorporado en composiciones preferidas del estado de la técnica. Esta disminución del valor de IC₅₀ indica que la cantidad del miembro de la superfamilia del TGF-β TGF-β₃ que se requiere para alcanzar 50% de la actividad biológica ejercida por la citocina se reduce cuando se incorpora en las composiciones farmacéuticas de la invención. Según esto, se puede ver que la actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF-β incorporado en composiciones de la invención presenta un gran incremento sobre la que se puede alcanzar con el uso de composiciones del estado de la técnica.

Tabla 2

Formulación	Media de IC ₅₀ (pg/mL; ± desviación estándar)
DS11	30,104 (± 7,093)
Maltosa	7,309 (± 1,044)

D. Resumen de los estudios A y B

Las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención permiten niveles sorprendentemente altos de recuperación de los miembros de la superfamilia del TGF-β incorporados en las composiciones comparados con las composiciones preferidas descritas en el estado de la técnica.

Además, la actividad biológica de los miembros de la superfamilia del TGF-β incorporados en las composiciones está sorprendentemente elevada comparada con la de los miembros de la superfamilia del TGF-β incorporados en composiciones del estado de la técnica.

25

E. Evaluación de dolor y eritema localizados asociado con la inyección intradérmica de las formulaciones

Se llevó a cabo un estudio para valorar el dolor y eritema localizados asociados con la inyección intradérmica de los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención y el dolor y el eritema asociados con inyecciones de control de composiciones del estado de la técnica.

Las soluciones inyectables experimentales se prepararon como se describió arriba.

En pocas palabras, se inyectó por vía intradérmica un volumen de 100 μ L de cada una de las formulaciones descritas arriba en la cara interna del brazo de un voluntario. Además del control de arriba descrito, también se usó una solución del conocido anestésico local xilocaína como control adicional. El dolor y el eritema causados por la inyección fueron clasificados por el voluntario y un médico.

Se hicieron evaluaciones separadas de dolor y eritema locales asociados con cada una de las soluciones que se muestran en la tabla 3. Tanto el voluntario como el médico realizaron estas evaluaciones. El grado de dolor o eritema asociados con las diferentes formulaciones empleadas se calificó con base en las siguientes categorías (enumeradas por gravedad ascendente): i) ninguna ii) mínima iii) leve iv) marcada.

Los resultados de la evaluación se muestran en la tabla 3 y se resumen en la tabla 4.

Los resultados indican que los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención dieron lugar de forma constante a una reducción del dolor de la inyección en comparación con composiciones inyectables conocidas del estado de la técnica.

Los resultados ilustran claramente la idoneidad de los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención para usarlos como vehículos capaces de reducir el dolor de la inyección que por lo demás se asociaría con la inyección de otras sustancias. Esto se ve especialmente ilustrado por el hallazgo de que el medicamento de conformidad con la invención que incorpora manitol dio lugar a menos dolor por la inyección que las inyecciones de composiciones a base de manitol solas.

F. Resumen del estudio E

Los medicamentos manufacturados de conformidad con la presente invención poseen una sorprendente capacidad de prevenir o reducir el dolor de la inyección. Esta capacidad la muestran tanto en comparación con agentes anestésicos conocidos (como la xilocaína) como en comparación con medicamentos inyectables existentes preferidos (como la formulación a base de manitol DS11). Las propiedades beneficiosas de los medicamentos manufacturados de conformidad con la invención las muestran todos los azúcares examinados hasta el momento, pero son no una formulación compuesta por el azúcar alcohol manitol.

55

Tabla 3

Muestra	Voluntario	Eritema	Dolor
Xilocaína		Marcado	Marcado
Agua con 5% manitol y equivalente a 100 µg/100 mL de proteína		Leve	Leve
Glucosa		Leve	Ninguno
Manosa		Mínimo	Ninguno
Maltosa		Mínimo	Ninguno
Sacarosa		Mínimo/Ninguno	Ninguno
Manosa + manitol 5%		Mínimo	Mínimo
Glucosa + manitol 5%		Mínimo	Mínimo
Sacarosa + manitol 5%		Mínimo	Mínimo
Maltosa + manitol 5%		Ninguno	Mínimo
Xilocaína		Marcado	Marcado
Maltosa + manitol 5%		Ninguno	Mínimo
Maltosa + manitol 5%		Ninguno	Mínimo

Tabla 4

Formulación	Eritema	Dolor
Xilocaína	Marcado	Marcado
DS11	Leve	Leve
Sacarosa	Mínimo	Ninguno
Maltosa	Mínimo	Ninguno
Glucosa	Mínimo	Ninguno
Manosa	Mínimo	Ninguno

54

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar proporcionado a concentración suficiente para permitir una mejor recuperación y/o un aumento de su actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β .
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el azúcar se selecciona de entre el grupo compuesto por maltosa, sacarosa, glucosa y manosa.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde el azúcar es maltosa.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde el azúcar se selecciona de entre el grupo compuesto por glucosa y manosa.
5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el azúcar está presente a una concentración mayor de 50 mg/mL.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el azúcar está presente a una concentración de entre 51 y 200 mg/mL.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el azúcar está presente a una concentración de entre 60 y 150 mg/mL.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el azúcar está presente a una concentración de entre 70 y 100 mg/mL.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el azúcar está presente a una concentración de entre 80 y 95 mg/mL.
10. 10, La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el azúcar está presente a una concentración de entre 85 y 90 mg/mL.
11. Una composición farmacéutica soluble que comprende un miembro de la superfamilia del TGF- β y un azúcar, en donde el azúcar se proporciona en una proporción tal que, al ser disuelta la composición hasta alcanzar una solución fisiológica, el azúcar se proporciona a concentración suficiente para permitir una mejor recuperación y/o un aumento de su actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β .
12. Una composición soluble conforme a la reivindicación 11, en donde el azúcar se proporciona en una proporción tal que al ser disuelta la composición hasta alcanzar una solución fisiológica, la concentración del azúcar es mayor de 50 mg/mL.
13. Una composición farmacéutica soluble que comprende un miembro de la superfamilia del TGF- β , una fuente de iones de sodio, y un azúcar, las cantidades de la fuente de iones de sodio y del azúcar son tales que al ser disuelta la composición para producir una concentración de sodio de entre 130 y 160 mEq/L, la concentración del azúcar es suficiente para permitir una mejor recuperación y/o un aumento de su actividad biológica del miembro de la superfamilia del TGF- β .

5

14. Una composición soluble conforme a la reivindicación 13, en donde las cantidades de la fuente de iones de sodio y del azúcar son tales que al ser disuelta la composición para producir una concentración de sodio de entre 130 y 160 mEq/L la concentración del azúcar es mayor de 50 mg/mL.
15. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el miembro de la superfamilia del TGF- β se selecciona de entre el grupo compuesto por TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 .
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde el miembro de la superfamilia del TGF- β es TGF- β_3 .
17. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la composición es para usar en la cicatrización de heridas.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en donde la composición es para usar para promover cicatrización de heridas y/o prevenir o inhibir la formación de cicatrices.
19. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la composición está formulada para administración por inyección.
20. 20, La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en donde la composición está formulada para administración por inyección intradérmica.
21. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en donde la composición está formulada para administración por inyección subcutánea.
22. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en donde la composición está formulada para administración por inyección intravenosa.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en donde la composición está formulada para administración por inyección intramuscular.
24. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición está formulada para administración como un instilado intraperitoneal.
25. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición está formulada para administración como un colirio.
26. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición está formulada para administración a través de una endoprótesis.
27. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición está formulada para administración por un vehículo de liberación lenta.
28. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende un agente espesante.

29. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende un agente tixotrópico.
30. Un recipiente prellenado que comprende una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.
31. El recipiente prellenado de la reivindicación 30, en donde el recipiente es una jeringa.
32. El recipiente prellenado de la reivindicación 30, en donde el recipiente es un vial.
33. Un método de tratamiento que comprende administrar a un individuo que necesita de la actividad terapéutica de un miembro de la superfamilia del TGF- β una cantidad terapéutica de una composición conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.
34. Un método para promover la cicatrización de las heridas y/o la inhibición de la formación de cicatrices, el cual método comprende administrar a un paciente que tiene la necesidad de dicha promoción y/o inhibición una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.
35. El uso de un azúcar para mejorar la recuperación y/o aumentar la actividad biológica de un miembro de la superfamilia del TGF- β incorporado en una composición farmacéutica
36. El uso conforme a la reivindicación 35, en donde el azúcar se selecciona de entre el grupo compuesto por de maltosa, sacarosa, glucosa y manosa.
37. El uso conforme a la reivindicación 36, en donde el azúcar es maltosa.
38. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en donde el azúcar está presente a una concentración mayor de 50 mg/mL.
39. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, en donde el miembro de la superfamilia del TGF- β se selecciona de entre el grupo compuesto por del TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 .
40. El uso conforme a la reivindicación 39, en donde el miembro de la superfamilia del TGF- β es TGF- β_3 .
41. El uso de un azúcar en la manufactura de un medicamento para la prevención o reducción del dolor de la inyección.
42. El uso conforme a la reivindicación 41, en donde el azúcar se selecciona de entre el grupo compuesto por maltosa, sacarosa, glucosa y manosa.
43. El uso conforme a la reivindicación 42, en donde el azúcar es maltosa.
44. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, en donde el azúcar se proporciona a una concentración mayor de 50 mg/mL.
45. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 41 a 44 para la manufactura de un medicamento inyectable.

57

46. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 41 a 45 en donde el medicamento además comprende un agente terapéutico activo.
47. El uso conforme a la reivindicación 46, en donde el medicamento comprende un agente terapéutico activo capaz de promover la cicatrización de las heridas.
48. El uso conforme a la reivindicación 46 o la reivindicación 47, en donde el medicamento comprende un agente terapéutico activo capaz de reducir la cicatrización.
49. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 46 a 48, en donde el agente terapéutico activo comprende un miembro de la superfamilia del TGF- β .
50. El uso conforme a la reivindicación 49, en donde el miembro de la superfamilia del TGF- β se selecciona de entre el grupo compuesto por TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3 .
51. El uso conforme a la reivindicación 50, en donde el miembro de la superfamilia del TGF- β es TGF- β_3 .
52. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 41 a 51, en donde el medicamento además comprende un agente activo anestésico.
53. El uso conforme a la reivindicación 52, en donde el agente activo anestésico es un anestésico local inyectable.
54. El uso conforme a la reivindicación 53, en donde el medicamento además comprende xilocaína.
55. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 41 a 54, en donde el medicamento además comprende un agente cosmético activo.
56. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 41 a 55, en donde el medicamento además comprende un agente diagnóstico activo.

FIGURA 1

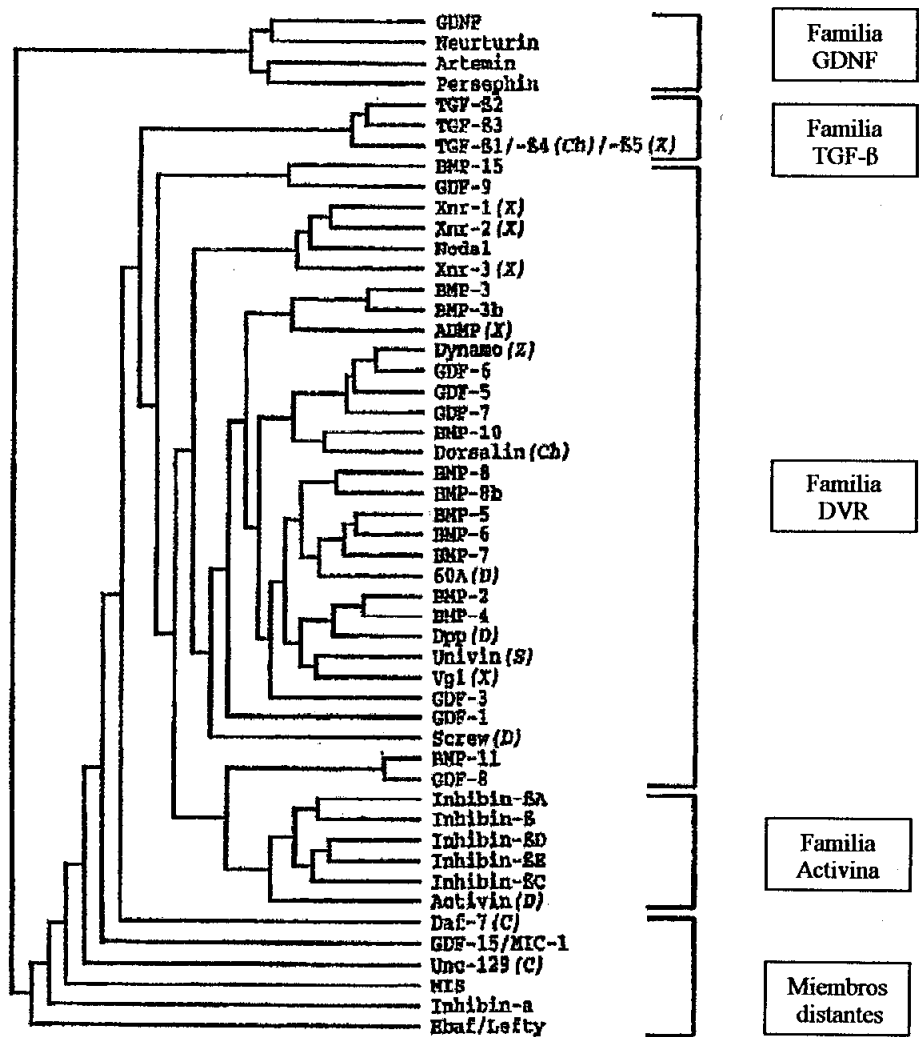


FIGURA 2

TGF-BETA 1 (Secuencia ID No. 1)

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT
QYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

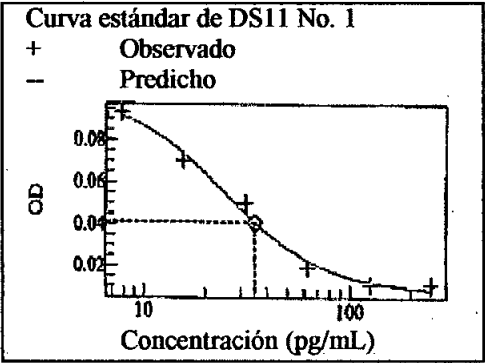
TGF-BETA 2 (Secuencia ID No. 2)

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDT
QHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS

TGF-BETA 3 (Secuencia ID No. 3)

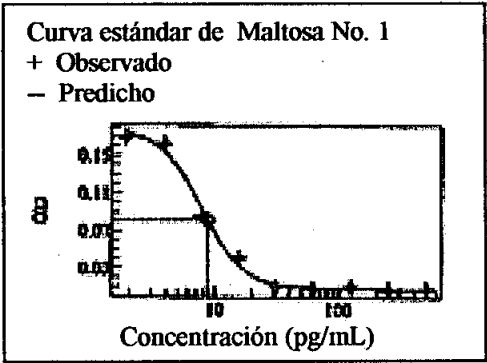
ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSKCS

FIGURA 3



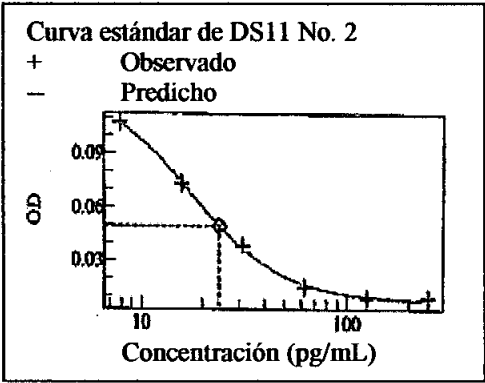
3A

IC₅₀ = 34.793 pg/mL



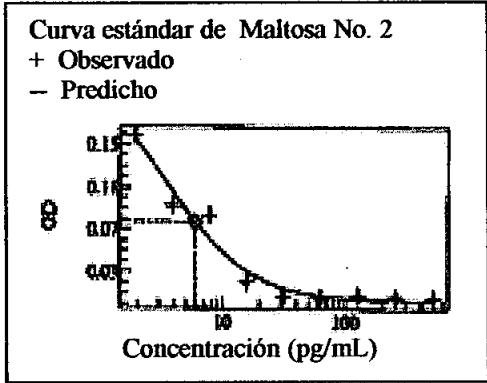
3F

IC₅₀ = 8.758 pg/mL



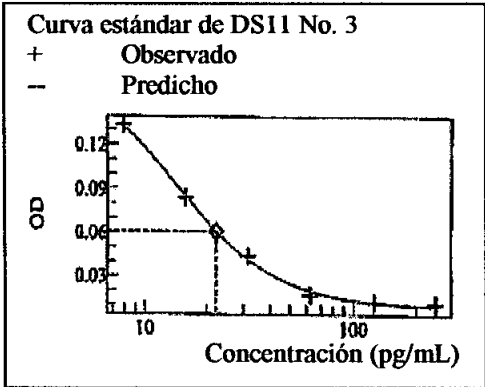
3B

IC₅₀ = 24.136 pg/mL



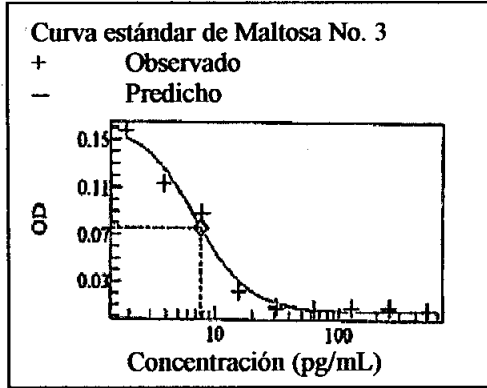
3G

IC₅₀ = 5.957 pg/mL



3C

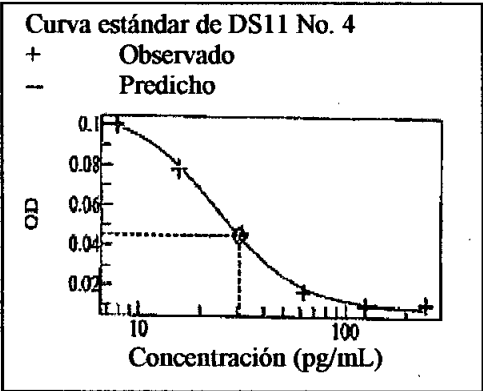
IC₅₀ = 22.055 pg/mL



3H

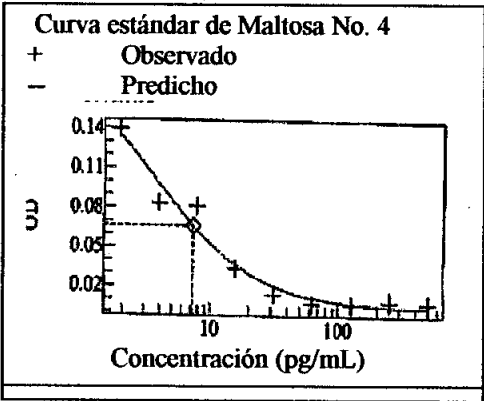
IC₅₀ = 7,72 pg/mL

FIGURA 3 CONTINUA



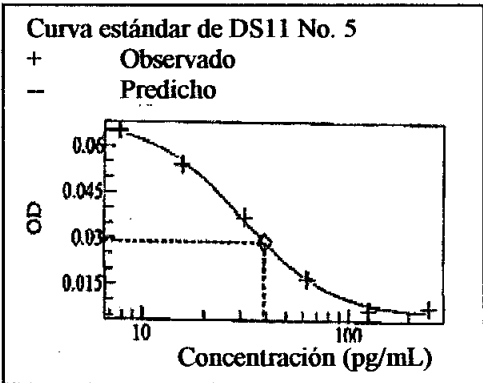
3D

IC₅₀ = 30.562 pg/mL



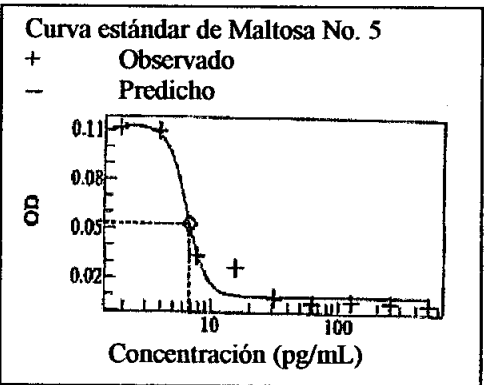
3I

IC₅₀ = 7.31 pg/mL



3E

IC₅₀ = 38.973 pg/mL



3J

IC₅₀ = 6,798 pg/mL

62

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention relates to pharmaceutical compositions comprising TGF- β superfamily members. Particularly, the invention provides improved pharmaceutical compositions comprising TGF- β superfamily members, wherein the compositions provide improved recovery of the TGF- β superfamily members and/or improved biological activity of the TGF- β superfamily members incorporated in the compositions. The invention also provides methods utilising such pharmaceutical compositions. Furthermore, the invention also provides medicaments for the prevention or reduction of injection pain.

The Transforming Growth Factor-Betas (TGF- β s) represent a family of cytokines having diverse biological activities. The TGF- β s belong to a wider group of related cytokines known as the TGF- β superfamily. Members of the TGF- β superfamily include activins, bone morphogenetic proteins (BMPs), anti-Müllerian hormone (AMH), the glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) subfamily and the growth/differentiation factor (GDF) subfamily. TGF- β superfamily members share structural similarities, such as a common cysteine knot motif, as well as common signal transduction pathways. Illustrative examples of members of the TGF-superfamily are shown in Figure 1.

The biological activities of members of the TGF- β superfamily have utility in many different therapeutic contexts, and accordingly there is much interest in the pharmaceutical application of TGF- β superfamily members.

TGF- β_1 , TGF- β_2 and TGF- β_3 are known to play crucial roles in the regulation of the wound healing response, while osteoinduction modulated by BMPs is useful in the therapeutic application of bone formation, healing and remodelling.

TGF- β_1 has uses in the prevention and/or treatment of scleroderma, angiogenesis disorders, renal disease, osteoporosis, bone disease, glomerulonephritis and renal disease.

TGF- β 2 may be used in the treatment of glioma, non-small-cell lung cancer, pancreas tumour, solid tumours, colon tumour, ovary tumour, age-related macular degeneration, ocular injury, osteoporosis, retinopathy, ulcers, carcinoma, mouth inflammation and scleroderma.

TGF- β 3 may be used in the treatment of fibrotic disorders, scleroderma, angiogenesis disorders, restenosis, adhesions, endometriosis, ischemic disease, bone and cartilage induction in vitro fertilisation, oral mucositis, renal disease, prevention, reduction or inhibition of scarring, enhancement of neuronal reconnection in the peripheral and central nervous system, preventing, reducing or inhibiting complications of eye surgery (such as LASIK or PRK surgery).

Many other members of the TGF- β superfamily are also known to have therapeutic applications. For example, glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) has been suggested to be useful in the treatment of many neurodegenerative and neurological diseases (such as Parkinson's disease, motor neurone disease, Alzheimer's disease, and Huntington's chorea) as well as in wound healing, treatment of scar tissue and ocular applications in treatment of corneal tissue and corneal disease.

Artemin (which is also known as neublastin or enovin) is suitable for use in the prevention and/or treatment of neurodegenerative disease, neuropathic pain and neuropathy.

Neurturin has therapeutic applications in Parkinson's disease and other neurological diseases.

Persephin is believed to have therapeutic utility in the treatment of such conditions as inflammation, multiple sclerosis, neoplasm, healing of wounds and other injuries, Acquired immune deficiency syndrome (AIDS), bacterial, viral and other infections,

624

immune deficiency, Alzheimer's disease, Huntington's chorea, Parkinson's disease, cerebrovascular ischemia, and degenerative diseases.

BMP 15 (also known as Growth Differentiation Factor 9B) is useful in the treatment of female infertility, in contraception, as well as in cases of bone injury and wound healing.

The superfamily member GDF9 has therapeutic utility in the treatment of female infertility.

Nodal may be used in the treatment of muscle disease, osteoporosis, osteoarthritis, wound healing, periodontal disease and connective tissue disease.

BMP3 has medical uses in the fields of bone injury, osteoporosis, wound healing, nervous system injury, neurodegenerative disease, Parkinson's disease, cerebrovascular disease and renal disease. BMP3b may be used in the treatment of birth complications.

BMP-5 may be used to treat many of the same indications as BMP-3, as well as osteoporosis, connective tissue disease, injury including wound healing, bone disease, tooth disease, osteoarthritis, periodontal disease, cerebrovascular ischemia, renal failure and brain injury.

GDF-5 (also known as cartilage derived morphogenetic factor) may be used in the treatment of arthritis, arthropathy, and neoplasm.

BMP10 may be used to treat osteoporosis, wound healing, ulcer, periodontal disease, bone disease, burns, connective tissue disease, bone tumour, bone injury and neoplasm.

BMP-8 (also known as osteogenic protein 2) may be used in the treatment of bone disease.

65

BMP-6 has therapeutic applications in the treatment of cerebrovascular ischemia and cancer.

BMP-7 may be used in the treatment of renal disease, calcification, tooth disease, motor neurone disease, Parkinson's disease, periodontal disease, bone diseases, cerebrovascular ischemia, renal failure, brain injury, scar tissue, musculoskeletal disease, and osteoporosis.

BMP-2 may be used for treating osteoporosis, bone diseases including musculoskeletal diseases and periodontal disease.

BMP-4 may be used in the treatment of kidney diseases.

GDF-3 has therapeutic uses in the treatment of immune disorders, whereas GDF-1 may be used in the treatment of nervous system injuries, multiple sclerosis and neurological diseases.

GDF-8 (also known as myostatin) may be used in the prevention and/or treatment of muscle wasting disease and non-insulin dependent diabetes.

The inhibin family of proteins may be used to treat infertility, haematological disease, anaemia, carcinoma, leukaemia and hyperphosphatemia and cancers, as well as in contraception.

Activin has therapeutic uses in the fields of scleroderma, angiogenesis disorders, scarring and fibrosis, restenosis, adhesions, endometriosis, ischemic disease, bone and cartilage induction, in vitro fertilisation, oral mucositis and wound healing.

GDF-15 may be used to treat Parkinson's disease, Alzheimer's disease, schizophrenia, cerebrovascular ischemia, dementia, immune disorders and neoplasm.

66

Mullerian inhibitory factor (MIF), which is also known as anti-Mullerian hormone or MIS, may be used in the fields of cancer including metastasis, lymphoid leukaemia, prostate tumour, uterine cervix tumour, breast tumour, ocular tumour, ovary tumour endocrine disease, haemangioma, endometriosis, inflammation, melanoma, neoplasm, carcinoma, skin tumour, female genital tract tumour, male genital system disease, erectile dysfunction and respiratory distress syndrome.

Ebaf (also known as Lefty) may be used in the treatment of hair disease including alopecia, scleroderma, fibrosis, muscular dystrophy, neoplasm, autoimmune disease, treatment of scar tissue, cirrhosis, pulmonary fibrosis, melanoma and carcinoma.

Despite the well-recognised requirement for pharmaceutical compositions comprising TGF- β superfamily members there are many acknowledged problems associated with presently existing compositions. Among these problems are the common inability to recover a proportion of a TGF- β superfamily member incorporated in a given composition (a problem which may arise as a result of adsorption of the TGF- β superfamily member to the material of a container in which the composition is stored), and a generally observed decrease over time of the biological activity of TGF- β superfamily members incorporated and stored in compositions. This also has important implications in the manufacture of any TGF- β superfamily member therapeutic.

It is an object of the present invention to obviate or mitigate at least some of the problems associated with prior art pharmaceutical compositions comprising TGF- β superfamily members.

According to the present invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a TGF- β superfamily member and a sugar provided at sufficient concentration to allow improved recovery and/or increased biological activity of the TGF- β superfamily member.

The present invention also provides use of a sugar for improving the recovery and/or increasing the biological activity of a TGF- β superfamily member incorporated in a pharmaceutical composition. It will be appreciated that the increase in biological activity may be assessed after recovery of the TGF- β from the composition. Preferably the amount of a TGF- β superfamily member recovered from the pharmaceutical composition may be increased, and this recovered TGF- β superfamily member may have increased biological activity. Suitable sugars and TGF- β superfamily members (and concentrations of both sugars and superfamily members) for use in accordance with this aspect of the invention may be selected based on any of the considerations set out elsewhere in this specification with reference to any of the aspects or embodiments of the invention. In particular TGF- β_3 may be a suitable superfamily member, and maltose may be a preferred sugar. The combination of maltose and TGF- β_3 may be particularly preferred.

Preferably a TGF- β superfamily member incorporated in a pharmaceutical composition in accordance with the invention will exhibit increased biological activity (i.e. the biological activity exhibited by a TGF- β superfamily member incorporated in a pharmaceutical composition of the invention will be greater than for the same quantity of the same superfamily member incorporated in a prior art composition).

Most preferably a pharmaceutical composition of the invention should allow improved recovery of a TGF- β superfamily member that has been incorporated, and the superfamily member will additionally exhibit increased biological activity.

The inventors have found that the beneficial effects conferred by pharmaceutical compositions in accordance with the invention can be obtained using any sugar thus far tested. However, it may be preferred that pharmaceutical compositions in accordance with the invention comprise a sugar selected from the group comprising maltose, sucrose, glucose and mannose. More preferably the sugar utilised in pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be selected from the group comprising maltose and sucrose, and most preferably the sugar is maltose.

For the avoidance of doubt, terms as "pharmaceutical compositions of the invention" (or the like) are intended to encompass not only compositions as defined in the first, third and fourth aspects of the invention, but also pharmaceutical compositions manufactured in accordance with the uses of the invention.

The present invention is based on the inventors' finding that pharmaceutical compositions comprising TGF- β superfamily members in the presence of suitable sugars, or suitable concentrations of sugars, provide a number of surprising advantages when compared to pharmaceutical compositions known in the prior art. These advantages include a two- to five-fold increase in the recovery of TGF- β superfamily members from pharmaceutical compositions of the invention, as well as a four-fold increase in the biological activity of TGF- β superfamily members incorporated in such compositions.

In a preferred embodiment of the invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a TGF- β superfamily member and a sugar, the sugar being present at a concentration of greater than 50mg/ml, for use as a medicament. A composition in accordance with the invention may comprise a sugar provided at a concentration of between 51 and 200mg/ml, preferably at a concentration of between 60 and 150mg/ml, more preferably at a concentration of between 70 and 100mg/ml, even more preferably at a concentration of between 80 and 95mg/ml, and most preferably at a concentration of between 85 and 90mg/ml.

In a further preferred embodiment of the invention there is provided a pharmaceutical composition comprising a TGF- β superfamily member and a sugar selected from the group comprising glucose and mannose, for use as a medicament.

Previously, the prior art has suggested that the sugar alcohol mannitol represents a preferred excipient for use in pharmaceutical compositions comprising TGF- β superfamily members. The inventors have found that pharmaceutical compositions in accordance with the present invention provide advantages and beneficial effects even when compared to these preferred prior art compositions. Indeed, the surprisingly

efficacious compositions of the invention allow two- to five-fold increased recovery of an incorporated TGF- β superfamily member compared to such mannitol-based formulations, as well as up to a four-fold increase in biological activity.

Compositions in accordance with the invention provide benefits over the prior art both in terms of the improved recovery of TGF- β superfamily members and the increased inherent biological activity of TGF- β superfamily members incorporated in such compositions. The prior art contains no indication that sugars may be used to such great effect, and certainly contains no suggestion that the use of compositions comprising sugars at a concentration of greater than 50mg/ml provide any of the advantages identified by the inventors.

The increased recovery of TGF- β superfamily members incorporated in compositions in accordance with the invention confers many important advantages over known compositions previously disclosed in the prior art. There is nothing in the prior art to suggest that sugars selected from the group comprising glucose and mannose may provide these advantages identified by the present inventors.

The skilled person will appreciate that, there are certain contexts in which, suitable pharmaceutically acceptable derivatives, variants and salts of sugars may also be used in the pharmaceutical compositions of the invention. Suitable derivatives, variants or salts may be those of a sugar selected from the group comprising maltose, sucrose, glucose and mannose, and in particular those based on sugars selected from the group comprising maltose and sucrose (more preferably on the sugar maltose). However, the inventors believe that the benefits identified are most readily conferred by use of the sugars themselves. This is in contrast to, and should be distinguished from, the prior art's suggested use of agents such as sugar alcohols. In keeping with these advantages it will be appreciated that sugar alcohols should not be used in accordance with the present invention.

The inventors have found that the pharmaceutical compositions in accordance with the invention are suitable for use with any TGF- β superfamily member. Accordingly,

except for where the context requires otherwise, references to TGF- β or TGF- β s may be taken to encompass reference to any member of the TGF- β superfamily. It will be appreciated that such references should be taken to encompass all known superfamily members, and at least all members of the TGF- β superfamily set out in Figure 1. Preferably the TGF- β superfamily member incorporated in pharmaceutical compositions in accordance with the present invention may be selected from the group comprising TGF- β_1 , TGF- β_2 and TGF- β_3 (corresponding to Sequence IDs No.s 1, 2 and 3 respectively as shown in Figure 2). Most preferably the TGF- β superfamily member is TGF- β_3 .

The skilled person will further appreciate that the pharmaceutical compositions of the invention may incorporate more than one TGF- β superfamily member. Such compositions incorporating multiple TGF- β superfamily members may be preferred in contexts where it is wished to take advantage of combinations of TGF- β superfamily members having an additive or synergistic interaction in their combined therapeutic or biological effects. Accordingly, except for where the context requires otherwise, references to a TGF- β superfamily member, and particularly a TGF- β superfamily member incorporated in a pharmaceutical composition of the invention, should be taken also to encompass compositions incorporating two or more TGF- β superfamily members.

It is well known to those skilled in the art that proteins such as TGF- β superfamily members have a tendency to interact, particularly with hydrophobic components of a composition or storage vessel, such that they are not available to exert their biological or therapeutic activities on administration of a composition in which they are incorporated. This problem is exacerbated on storage of compositions containing TGF- β superfamily members. Storage of such compositions increases the inaccessibility of the TGF- β superfamily member so incorporated. It is believed that the incidence of binding of the TGF- β superfamily member molecules within the composition, as well as to components of a vessel in which the composition is stored, increases over time of storage. The binding of the TGF- β superfamily member molecules, either within the composition itself or to other substrates (such as storage

vessels), results in a lack of availability of the bound molecules to achieve their biological and/or therapeutic activity. After prolonged storage the reduction in available biological and/or therapeutic activity of the incorporated TGF- β superfamily member may become so pronounced that the composition is rendered biologically and/or therapeutically ineffective.

In comparison with known pharmaceutical compositions, such as those using mannitol as an excipient, pharmaceutical compositions in accordance with the present invention allow recovery of a significantly higher proportion of the total amount of the TGF- β superfamily member originally incorporated in a pharmaceutical composition. For the present purposes "recovery" of a TGF- β superfamily member from a composition may be taken to refer to the proportion of the TGF- β superfamily member incorporated in the composition that is available to exert a therapeutic and/or biological activity on administration of the composition. A model by which recovery of a TGF- β superfamily member from a pharmaceutical composition of interest (either a prior art composition or a composition of the invention) may be investigated is described in the Experimental Results section below. It will be appreciated that, although the major benefit of increased recovery lies in the increased biological activity that may be exerted, when assessing recovery the method used need not measure biological activity. Suitable methods may, instead, be based on chemical or physical indications as to the amount of a TGF- β superfamily member recovered (e.g. the weight recoverable).

As noted above, the inventors have found that pharmaceutical compositions in accordance with the present invention allow a two- to five-fold increase in recovery of incorporated TGF- β superfamily members when compared to mannitol-based compositions. Such results may be obtained using compositions utilising sugars at a concentration of greater than 50mg/ml. Typically pharmaceutical compositions using sucrose or mannose allow a two- to three-or-more-fold increase in recoverable TGF- β superfamily members as compared to the prior art. The increased recovery achieved using mannose as compared to mannitol highlights to benefits of using sugars as opposed to sugar alcohols.

As a result of their capacity to allow improved recovery of TGF- β superfamily members incorporated in the compositions, pharmaceutical compositions in accordance with the present invention confer marked advantages as compared to prior art compositions. It will be appreciated that, in order to be able to recover a therapeutically effective amount of a TGF- β superfamily member on administration of a prior art composition, it is necessary to incorporate in the composition a greater quantity of the TGF- β superfamily member than the therapeutically effective amount that it is wished to recover (since a certain proportion of the total amount of the TGF- β superfamily member incorporated in the prior art composition will be rendered unrecoverable, for example through binding within the composition or to the storage vessel). Accordingly the prior art composition must be manufactured such that it incorporates a total amount equivalent to the sum of:

- i) the therapeutically effective amount of the TGF- β superfamily member; and
- ii) the amount of the TGF- β superfamily member that will be rendered unrecoverable.

Since the pharmaceutical compositions of the invention allow greater recovery of incorporated TGF- β superfamily members the total amount of the TGF- β superfamily member that must be incorporated in such compositions at manufacture (in order to enable recovery of the desired therapeutically effective amount of the TGF- β superfamily member) may be relatively reduced. It will be appreciated that the ability to achieve a desired therapeutic effect by use of a pharmaceutical composition incorporating a relatively smaller amount of a TGF- β superfamily member provides considerable commercial advantages over the prior art.

Despite progress allowing increased efficiency and cost-effectiveness in the manufacture of therapeutically useful proteins such as TGF- β superfamily members, these biologically and therapeutically active proteins remain relatively expensive to produce and are typically the most expensive components of pharmaceutical

23

compositions in which they are incorporated. In contrast, sugars represent relatively inexpensive compounds to be used in pharmaceutical compositions. It will be appreciated that compositions of the invention, in which the amount of a TGF- β superfamily member recoverable from the composition is increased by means of the incorporation in the composition of relatively cheap sugars, provide considerable economic benefits over compositions known in the prior art.

The increased recovery of TGF- β superfamily members incorporated in pharmaceutical compositions in accordance with the invention also means that such compositions have increased "shelf life" as compared to known compositions. It will be appreciated that the ability to recover a higher proportion of a TGF- β superfamily member from a composition of the invention that has been stored means that compositions in accordance with the present invention may be used for a longer period after their manufacture than is the case with prior art compositions. For example, the tendency of TGF- β superfamily members incorporated in prior art compositions to become unrecoverable from the compositions after a prolonged period of storage is dramatically reduced when using compositions of the present invention. This increased shelf life is further improved by the notable increase in the inherent biological activity of TGF- β superfamily members incorporated in compositions of the invention discussed below.

In addition to improved recovery of TGF- β superfamily members from pharmaceutical compositions in accordance with the present invention, the inventors have surprisingly found that pharmaceutical compositions in accordance with the invention are also able to beneficially increase the inherent biological activity of TGF- β superfamily members incorporated therein.

The inherent biological activity of a TGF- β superfamily member incorporated in a pharmaceutical compositions of the invention may, for example, be measured with reference to the ability of the TGF- β superfamily member to inhibit the proliferation of mink lung epithelial cells (MLECs). A model by which the inherent biological

24

activity of a TGF- β superfamily member incorporated in a composition of interest may be determined is presented in the Experimental Results section below.

Alternatively, the inherent biological activity to be assessed may be an activity that is specific to the TGF- β superfamily member in question. For example, in the case of pharmaceutical compositions of the invention incorporating the preferred TGF- β superfamily member TGF- β_3 , the inherent biological activity may be the ability to reduce and/or inhibit scarring or fibrosis.

The inventors have discovered that TGF- β superfamily members incorporated in pharmaceutical compositions in accordance with the present invention exhibit up to five times the biological activity demonstrated by TGF- β superfamily members incorporated in prior art compositions. This marked increase in biological activity of TGF- β superfamily members incorporated in pharmaceutical compositions of the invention represents a surprising and important advantage of these compositions. Indeed, there is nothing in the prior art that suggests that pharmaceutical compositions in accordance with the present invention should be able to increase the biological activity of TGF- β superfamily members incorporated therein.

It will be readily appreciated that the improved biological activity exhibited by TGF- β superfamily members incorporated in pharmaceutical compositions in accordance with the invention will be particularly advantageous in contexts in which it is desired to utilise the biological activity of TGF- β superfamily members therapeutically. Since almost all therapeutic applications of the members of the TGF- β superfamily rely upon the biological activity of the superfamily member, the increased biological activity of TGF- β superfamily members incorporated in compositions according to the invention corresponds directly with an increase in therapeutic activity.

There are many therapeutic contexts in which it is known to employ pharmaceutical compositions incorporating TGF- β superfamily members. Examples of such contexts include the treatment of wound healing; the prevention and/or treatment of scarring; the prevention and/or treatment of fibrosis; the acceleration of wound healing; the

25

promotion of epithelial regeneration; the inhibition of scarring and/or fibrosis; and therapeutic applications of osteoinduction (e.g. osteoinduction in bone building; healing; and/or remodelling) and in the other therapeutic contexts described in the introduction.

The inventors have found that pharmaceutical compositions in accordance with the present invention are particularly suitable for use in the context of wound healing and/or fibrosis. Pharmaceutical compositions in accordance with the invention are suitable for use in the promotion of wound healing with reduced scarring; the prevention and/or treatment of fibrosis; the inhibition of scarring and/or fibrosis; the acceleration of wound healing; and the promotion of epithelial regeneration. Accordingly it will be recognised that pharmaceutical compositions in accordance with the present invention may be used in the preparation of medicaments for:

- i) the promotion of wound healing with reduced scarring; and/or
- ii) the prevention and/or treatment of fibrosis; and/or
- iii) the inhibition of scarring and/or fibrosis; and/or
- iv) the acceleration of wound healing; and/or
- v) the promotion of epithelial regeneration.

It will be appreciated that the benefits in terms of improved recovery of TGF- β superfamily members from compositions of the invention and the increased biological activity of TGF- β superfamily members incorporated in such compositions may be (to at least some extent) separated from one another according to the manner in which the pharmaceutical compositions are formulated. In other words, compositions in accordance with the present invention may be produced in which:

- i) the composition provides the benefits of both improved recovery of the TGF- β superfamily member incorporated therein, and increased biological activity of the TGF- β superfamily member; or

26

- ii) the composition provides the benefits of improved recovery of the TGF- β superfamily member incorporated therein, but not of increased biological activity; or
- iii) the composition does not provide improved recovery of the TGF- β superfamily member, but does provide increased biological activity thereof.

Examples illustrating these various options are provided below.

For example, compositions in accordance with the first aspect of the invention may preferably comprise a TGF- β superfamily member and a sugar at an effective concentration (e.g. greater than 50mg/ml) both during storage of the composition, for the present purposes taken to encompass the time occurring between the manufacture of the composition and its eventual use, and also at the time at which the composition is administered. Such compositions in accordance with this aspect of the invention benefit from the advantages of improved recovery of the TGF- β superfamily member during and after storage, and also from increased biological activity of the TGF- β superfamily member when administered.

It will be appreciated that compositions in accordance with the present invention also encompass those compositions in which the sugar is present at an effective concentration (e.g. greater than 50mg/ml) during storage, but wherein the sugar is present at a lower concentration at the time of administration. A typical example of such a situation is one in which the composition is diluted prior to its administration. Although compositions in accordance with this embodiment of the invention do not comprise a sugar at an effective concentration (e.g. greater than 50mg/ml) at the time of administration of the composition the compositions still benefit from the increased recovery of the TGF- β superfamily member after storage, and also from increased biological activity of the TGF- β superfamily member at the time of its recovery.

In a further embodiment of compositions in accordance with the present invention, the effective concentration (e.g. greater than 50mg/ml) of the sugar may only be

27

established relatively shortly before the composition is administered. A typical example of a composition according to this embodiment may be one in which a solvent is added to an otherwise "dry" composition prior to administration to produce a composition in which the sugar has the requisite effective concentration (e.g. greater than 50mg/ml). Compositions in accordance with this embodiment of the invention provide TGF- β superfamily members having surprisingly high biological activity (compared with prior art compositions) to the site at which they are administered. The problems associated with recovery of TGF- β superfamily members after storage associated with prior art compositions may be obviated by the storage of the composition in a relatively inert dry state.

Indeed, so advantageous is this embodiment of the invention that, in accordance with a third aspect of the invention, there is provided a soluble pharmaceutical composition comprising TGF- β superfamily member and a sugar, wherein the sugar is provided in such a proportion that, on dissolution of the composition to achieve a physiological solution, the sugar is provided at sufficient concentration to allow improved recovery and/or increased biological activity of the TGF- β superfamily member. Preferably the sugar is provided in such a proportion that on dissolution of the composition to achieve a physiological solution the concentration of the sugar is greater than 50mg/ml. The sugar may preferably be maltose.

Preferably a pharmaceutical composition in accordance with this third aspect of the invention may be a water-soluble pharmaceutical composition. A physiological solution in accordance with this aspect of the invention may be a solution having physiological concentration or osmolarity. For example, a soluble pharmaceutical composition in accordance with this aspect of the invention suitable for injection in mammals may, on dissolution of the composition, achieve an osmolarity of approximately 290 milliosmolar (osmole per litre). It will be appreciated that compositions in accordance with this third aspect of the invention confer all the advantages relating to increased biological activity of the TGF- β superfamily member incorporated therein that are found in compositions in accordance with the first and second aspects of the invention. Accordingly, compositions in accordance with this

28

third aspect of the invention are suitable for all medical and/or therapeutic uses described above in relation to compositions in accordance with the first and second aspects of the invention.

One of the factors determining whether or not a composition is considered suitable for safe injection into mammals such as humans is the concentration of sodium ions present in the composition at the time of administration. Accordingly, in a fourth aspect of the invention, there is provided a soluble pharmaceutical composition comprising a TGF- β superfamily member, a source of sodium ions, and a sugar, the quantities of the source of sodium ions and of the sugar being such that on dissolution of the composition to produce a sodium concentration of between 130 and 160 mEq/L, the concentration of the sugar is sufficient to allow improved recovery and/or increased biological activity of the TGF- β superfamily member. Preferably, the quantities of the source of sodium ions and of the sugar are such that on dissolution of the composition to produce a sodium concentration of between 130 and 160 mEq/L the concentration of the sugar is greater than 50mg/ml. The sugar may preferably be maltose. Sources of sodium ions suitable for use in injectable pharmaceutical compositions will be well known to those of skill in the art. Preferably compositions in accordance with this fourth aspect of the invention may be water-soluble compositions. It will further be appreciated that these compositions of the fourth aspect of the invention may also be employed in accordance with the medical and/or therapeutic uses described above.

In addition to the use of pharmaceutical compositions in accordance with the invention in therapeutic applications, the skilled person will also appreciate that the increased biological activity exhibited by compositions according to the invention may also be of benefit in contexts in which the biological activity of TGF- β superfamily members is to be utilised for non-therapeutic purposes. Typically, such non-therapeutic uses of TGF- β superfamily members may relate to their use for research or experimental purposes. Accordingly, the invention also provides compositions as recited in the first, second or third aspects of the invention for use other than as a medicament, and particularly for research and/or experimental use.

79

The inventors have found that although the advantages conferred by pharmaceutical compositions in accordance with the present invention are made available through all formulations tested the pharmaceutical compositions of the invention are particularly advantageous when the compositions are formulated for administration by injection. More preferably, pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be formulated for intradermal injection, or may be formulated for subcutaneous injection. Typical formulations suitable for intradermal injection and/or subcutaneous injection will be well known to those skilled in the art.

Pharmaceutical compositions in accordance with the invention suitable for localised parenteral administration (e.g. intradermal, intramuscular and subcutaneous) and systemic parenteral administration (e.g. intravenous and intra-arterial) may be prepared by mixing a TGF- β superfamily member and sugar (both having the desired degree of purity) with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers in the form of; lyophilised and non-lyophilised powder formulations for reconstitution prior to use, non-aqueous and aqueous solutions, and semi-solid formulations. Acceptable carriers, including excipients, are non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include, but are not limited to, buffers such as phosphates, citrates, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; tonicity modifiers such as sodium chloride, glycerol, and the like; preservatives such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benazalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl and/or propyl and/or butyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol; low molecular weight polypeptides (comprising less than about ten amino acid residues); proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; carbohydrates including dextrans; chelating agents such as EDTA; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); anionic surfactants such as fatty acid soaps, acyl sulfates, or acyl sulfosuccinates; cationic surfactants, such as alkyl primary, secondary, tertiary, or

80

quaternary amines; non-ionic surfactants, for example, sorbitan esters or polyethoxylated esters of acyl acids, copolymers of polyethylene oxide and polypropylene oxide.

By way of example, a pharmaceutical composition of the invention in the form of a sterile solution suitable for parenteral administration, may include the following constituents in addition to the TGF- β superfamily member and sugar:

0.01 M to 0.1 M phosphate buffer, and

Sodium chloride up to 0.9% w/v (to achieve iso-tonicity with blood, 290-300 mOsm/L), and

0.1 mg/ml polyoxyethylene sorbitan mono-oleate (TweenTM 80).

A lyophilized (freeze-dried) powder 'cake' of the above solution could be prepared.

Such a pharmaceutical composition in accordance with the invention could be presented in the form of a vial, an ampoule, or a pre-filled syringe of, either; a sterile solution, a sterile suspension or any other pharmaceutically acceptable form of presentation suited to localised parenteral drug delivery.

The improved recovery and increased biological activity of TGF- β superfamily members incorporated in pharmaceutical compositions in accordance with the invention generally means that they may be used as an alternative to existing approaches, such as lyophilisation, used to improve the shelf-lives of compositions containing TGF- β superfamily members. Accordingly, it may generally be preferred that a pharmaceutical composition of the invention is non-lyophilised. However, it may be wished that known techniques, such as lyophilisation, be used in accordance with the compositions of the invention. These techniques may still further extend the shelf life of pharmaceutical compositions of the invention, and may be used to

produce, for example, a sterile lyophilised (freeze-dried) powder suitable for reconstitution.

Pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be formulated for use in the eye (for instance as eye drops), or as intraperitoneal instillates.

Alternatively, or additionally, pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be formulated for topical administration. The topical administration of pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be particularly preferred in the context of follow up care for a site at which the TGF- β superfamily member is exerting a therapeutic effect.

Pharmaceutical compositions of the invention suitable for topical administration (e.g. transdermal/cutaneous, ocular, otic, nasal, pharyngeal, buccal, rectal, vaginal, urethral) may be prepared by mixing a TGF- β superfamily member and a sugar (both having the desired degree of purity) with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilisers in the form of lyophilised or non-lyophilised powder formulations, non-aqueous or aqueous solutions, non-aqueous or aqueous dispersions/suspensions, including emulsions and semi-solid formulations. Acceptable carriers, including excipients, are non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include, but are not limited to, purified water, saline, phosphate-buffered saline (PBS) Ringer's solution, Ringer's-lactate solution, hydro-alcoholic solutions, polyethylene glycol (PEG), propylene glycol (PG), phosphates, acetates, gelatin, collagens, Carbopol 934™ (BF Goodrich Corp.), vegetable and synthetic oils and waxes, anionic surfactants such as fatty acid soaps, acyl sulfates, or acyl sulfosuccinates; cationic surfactants, such as alkyl primary, secondary, tertiary, or quaternary amines; non-ionic surfactants, for example, sorbitan esters or polyethoxylated esters of acyl acids, copolymers of polyethylene oxide and polypropylene oxide, and the like. Pharmaceutical compositions of the invention may additionally include suitable preservatives, stabilisers, antioxidants, anti-microbials and buffering agents, for example, methyl and/or propyl and/or butyl parabens, butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT), citric acid,

2
9

ascorbic acid, and the like. Emulsion, cream or ointment bases useful in formulation may include aqueous-based creams and emulsions (oil-in-water), oil-based creams and emulsions (water-in-oil), ointments (emulsifying and non-emulsifying hydrocarbon), gels, hydrogels, and the like. Other formulations for topical delivery may include aerosols, bandages, and other wound dressings. Alternatively pharmaceutical composition of the invention one may incorporate or encapsulate in a suitable polymer matrix or membrane, thus providing a sustained-release delivery device suitable for placement on, or implantation near, a site to be treated.

A pharmaceutical composition of the present invention in the form of a semi-solid hydrogel formulation suitable for topical administration may further comprise the following constituents (in addition to the TGF- β superfamily member and sugar):

0.1% w/v to 2.0% w/v hydroxy cellulose, and

0.1% w/v to 1.0% w/v Carbopol 934TM (BF Goodrich Corp.), and

10 to 20% w/v propylene glycol, and

0.005% w/v to 0.020% w/v methyl paraben, and

0.005% w/v to 0.020% w/v propyl paraben, and

Sodium hydroxide or hydrochloric acid q.s. ad pH 4 – 10

Purified water, q.s. ad 100% w/v

Suitable pharmaceutical compositions of the invention may be presented in the form of a bottle, a jar, a tube, a spray, of, either; a sterile solution; a sterile lyophilized or non-lyophilized powder for reconstitution, a sterile dispersion/suspension, a sterile semi-solid, or any other pharmaceutically acceptable form of presentation suited to topical drug delivery.

83

Pharmaceutical compositions of the invention suitable for oral administration may be prepared by mixing the TGF- β superfamily member and sugar (both having the desired degree of purity) with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilisers in the form of powder or granule formulations, non-aqueous or aqueous solutions, non-aqueous or aqueous dispersion/suspension formulations including emulsions, semi-solid formulations, tablet (uncoated or coated) or capsule (hard or soft) formulations having either immediate release and/or modified release (enteric/delayed/sustained) characteristics. Acceptable carriers, including excipients, are non-toxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include, but are not limited to, purified water, saline, phosphate-buffered saline (PBS) Ringer's solution, Ringer's-lactate solution, hydro-alcoholic solutions, cellulose and cellulose derivatives, starch and modified starches, polyethylene glycol (PEG), propylene glycol (PG), phosphates, acetates, gelatin, collagens, Carbopol 934™ (BF Goodrich Corp.), vegetable and synthetic oils and waxes, anionic surfactants such as fatty acid soaps, acyl sulfates, or acyl sulfosuccinates; cationic surfactants, such as alkyl primary, secondary, tertiary, or quaternary amines; non-ionic surfactants, for example, sorbitan esters or polyethoxylated esters of acyl acids, copolymers of polyethylene oxide and polypropylene oxide, and the like.

The TGF- β superfamily member may be dispersed within a liquid formulation either as a suspension within the liquid (for example as a colloidal suspension), or dissolved within the liquid as a solution. For present purposes, a solution may be considered to be characterised as comprising a liquid solvent throughout which is dispersed a homogeneous distribution of a TGF- β superfamily member that will not subsequently settle out of the solution.

Pharmaceutical compositions in accordance with the present invention may preferably comprise aqueous solutions. Suitable pharmaceutical compositions may be liquid compositions, or alternatively may further comprise thickening agents such that a gel or semi-solid composition is formed. Suitable thickening agents are well known to those skilled in the art, and include methylcellulose. The use of thickening agents in

54

pharmaceutical compositions in accordance with the first, second, or third aspects of the invention may be advantageous in a number of contexts. Particularly, the use of thickening agents in compositions of the invention may be advantageous in ensuring that the composition is retained in the site at which it is administered and at which it is desired for the composition to have its biological and/or therapeutic effect. This advantage is of benefit in relation to topical medicaments, and may be applicable to both medicaments for external application (such as thickened creams or gels) and medicaments for internal application (for example thickened gels for local injection). It will be appreciated that thixotropic formulations of pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be beneficial in a number of applications, for example in the use of nasal sprays or inhalers used to administer compositions to the lungs (which may otherwise be relatively inaccessible) for the prevention and/or treatment of lung fibrosis or scarring.

The pharmaceutical compositions of the invention may preferably be provided in pre-filled vessels containing the composition. Such pre-filled vessels provide advantages in terms of their ability to readily deliver compositions, and particularly pre-sterilised compositions, to the location at which the composition is to be employed. Suitable vessels may be selected with reference to the chosen formulation and the method or route by which the composition is to be administered, and will typically include vessels such as vials or syringes. The provision of pharmaceutical compositions comprising TGF- β superfamily members in such pre-filled vessels has previously been compromised by the tendency for the TGF- β superfamily member protein to adhere to the walls of the vessel over time. Furthermore, the tendency of TGF- β superfamily members stored in vessels to degenerate and lose activity over time has also limited the suitability of compositions comprising TGF- β superfamily members to be pre-filled and stored in this way. Thus the pharmaceutical compositions of the present invention provide a solution to failings of the prior art that have previously prevented or discouraged the provision of otherwise desirable pre-filled vessels, and particularly vessels containing sterile compositions.

85

As previously indicated, the pharmaceutical compositions of the invention are well suited for therapeutic use. Accordingly, in a fifth aspect of the invention there is provided a method of treatment comprising administering to an individual in need of the therapeutic activity of a TGF- β superfamily member a therapeutic amount of a composition in accordance with the first, second, third or fourth aspects of the invention. The therapeutic activity should be understood to encompass prophylactic therapy, including the prevention of diseases or conditions that may be treated using the therapeutic activity of the TGF- β superfamily member.

A preferred use of pharmaceutical compositions according to the invention is in the context of wound healing and/or scar prevention/reduction. The inventors have found that pharmaceutical compositions of the invention may be used in the preventions and/or inhibition of scarring. Alternatively or additionally the pharmaceutical compositions of the invention may be used in the preventions and/or treatment of fibrosis. The pharmaceutical compositions of the invention may also be used to promote wound healing. In promoting wound healing and/or prevention or inhibition of scar formation it may be preferred or necessary to administer the pharmaceutical composition before or after the formation of a wound. Accordingly, the pharmaceutical composition will be present in the wounded area, either through its introduction into the wound, or through the formation of the wound at a site where the pharmaceutical composition is already present (by virtue of earlier administration). It will therefore be appreciated that pharmaceutical compositions in accordance with the invention may preferably be formulated such that they are well tolerated by the wounded site. Formulations for application to wounds may preferably make use of a pharmaceutical vehicle that is relatively "mild". Suitable vehicles may be biocompatible, biodegradable and bioresorbable and bioresolvable. Preferred formulations may exclude substances that stimulate inflammation, and may preferably include anti-inflammatory agents.

A suitable method by which prevention and/or inhibition of scarring may be assessed is described in the inventors' co-pending application published as WO2006/064207.

86

So beneficial is the use of pharmaceutical compositions in accordance with the invention in the healing of wounds and inhibition of scarring that, in a sixth aspect of the invention, there is provided a method of promoting wound healing and/or inhibiting scar formation, the method comprising administering to a patient in need of such promotion and/or inhibition a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition in accordance with the first, second, third or fourth aspects of the invention. In the context of the present invention, promotion of healing may be considered to encompass an increase in the rate of healing and/or an increase in the quality of healing. The inhibition of scar formation may be considered to encompass any degree of inhibition (which may range from partial inhibition to total inhibition) of scarring associated with wound healing or other fibrotic processes characterised by the abnormal or excessive deposition of fibrous tissue. The pharmaceutical compositions and methods of treatment of the invention may be particularly useful in the prevention, reduction, inhibition or treatment of scarring (fibrosis) associated with fibrotic disorders selected from the group consisting of: skin fibrosis; scleroderma; progressive systemic fibrosis; lung fibrosis; muscle fibrosis; kidney fibrosis; glomerulosclerosis; glomerulonephritis; uterine fibrosis; renal fibrosis; cirrhosis of the liver, liver fibrosis; chronic obstructive pulmonary disease; fibrosis following myocardial infarction; central nervous system fibrosis, such as fibrosis following stroke; fibrosis associated with neuro-degenerative disorders such as Alzheimer's Disease or multiple sclerosis; fibrosis associated with proliferative vitreoretinopathy (PVR); restenosis; endometriosis; ischemic disease and radiation fibrosis. The medicaments and methods of treatment of the invention may also be useful in the prevention, reduction or management of fibrosis associated with rheumatoid arthritis.

Prevention and/or treatment in accordance with the present invention may be particularly useful in the case of wounds at risk of an aberrant wound healing or scarring response. For example, prevention and/or treatment in accordance with the sixth aspect of the invention may be particularly preferred in the treatment of chronic wounds (such as ulcers) or of wounds predisposed to development into chronic wounds (for example wounds of diabetics, the elderly or patients with polypharmacy).

82

Prevention and/or treatment in accordance with the sixth aspect of the invention may also be of particular benefit in the treatment of pathological scars (such as keloid or hypertrophic scars) or of wounds predisposed to the development of pathological scars (such as burns wounds, the wounds of children, the wounds of Afro-Caribbean or Mongoloid individuals, or wounds at positions of heightened skin tension).

Pharmaceutical compositions in accordance with the present invention are particularly suited to administration to the skin, for example in the treatment of dermal wounds. However, the compositions may be used effectively in the treatment of other wound types including, but not limited to, wounds of the eye; wounds of the digestive system; wounds of the nervous system; wounds of the urino-genital system; wounds of the respiratory system; wounds of the kidneys; tendon and ligament wounds; and wounds of the heart or circulatory system, adhesions formed after injury and restenosis. The inventors believe that pharmaceutical compositions and methods of treatment of the invention are suitable for use in the skin; use in the eye (including the prevention, reduction or inhibition of scarring resulting from eye surgery such as LASIK or PRK surgery); use in blood vessels; use in the peripheral or central nervous system (where prevention, reduction or inhibition of scarring may enhance neuronal reconnection); use in tendons, ligaments or muscle; use in the oral cavity, including the lips and palate (such as in preventing, reducing or inhibiting scarring resulting from treatment of cleft lip or palate); use in the internal organs such as the liver, heart, brain, digestive tissues and reproductive tissues; and use in body cavities such as the abdominal cavity, pelvic cavity and thoracic cavity (where prevention, reduction or inhibition of scarring may reduce the number of incidences of adhesion formation and/or the size of adhesions formed). The medicaments and methods of the invention may be used to prevent, reduce or inhibit adhesions, such as those occurring in the abdomen, pelvis or spine. It is particularly preferred that the medicaments and methods of the invention be used to prevent, reduce or inhibit scarring of the skin (dermal scarring).

Pharmaceutical compositions of the present invention may preferably be administered prior to wounding and/or the onset of scarring (which for the present purpose should

ab

be taken to include fibrosis associated with fibrotic disorders). The pharmaceutical composition may be administered up to 24 hours before wounding, preferably up to ten hours before wounding, more preferably up to five hours before wounding, and most preferably up to an hour before wounding. It will be appreciated that the administration of pharmaceutical compositions in accordance with the invention prior to wounding or the onset of scarring is of particular utility in the case of elective wounds (such as those associated with surgical procedures) or situations in which there is a recognised risk of the initiation of scarring (i.e. predisposition to fibrosis or exposure to stimuli likely to induce fibrosis).

As an alternative, the pharmaceutical composition may be administered after wounding or the onset of scarring. In the case of administration of the pharmaceutical composition after wounding, it may be preferred that the pharmaceutical composition be administered immediately after wounding, or at least as soon as practicable after wounding (for example after admission of a wounded patient into the care of a physician). In the case of administration of the pharmaceutical composition after the onset of scarring, such as scarring arising as a result of a fibrotic disorder, the composition may preferably be administered immediately after the initiation of scarring is recognised. In either case the pharmaceutical composition may preferably be administered up to a week after wounding or the onset of scarring, more preferably up to 24 hours after wounding or onset of scarring, yet more preferably up to five hours, even more preferably up to five hours, and most preferably up to an hour after wounding or the onset of scarring.

The pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be formulated for topical application. Suitable formulations in accordance with this embodiment of the invention may include liquid, cream, ointment or gel formulations, or spray or aerosol formulations.

The methods or medicaments of the invention may be used prophylactically, at sites where no wound exists but where a wound that would otherwise give rise to a scar or chronic wound is to be formed. By way of example medicaments in accordance with

89

the invention may be administered to sites that are to undergo wounding as a result of elective procedures (such as surgery), or to sites that are believed to be at elevated risk of wounding. It may be preferred that the medicaments of the invention are administered to the site immediately prior to the forming of a wound (for example in the period up to six hours before wounding) or the medicaments may be administered at an earlier time before wounding (for example up to 48 hours before a wound is formed). The skilled person will appreciate that the most preferred times of administration prior to formation of a wound will be determined with reference to a number of factors, including the formulation and route of administration of the selected medicament, the dosage of the medicament to be administered, the size and nature of the wound to be formed, and the biological status of the patient (which may be determined with reference to factors such as the patient's age, health, and predisposition to healing complications or adverse scarring). The prophylactic use of methods and medicaments in accordance with the invention is a preferred embodiment of the invention, and is particularly preferred in the promotion of accelerated wound healing with reduced scarring in the context of surgical wounds.

The methods and medicaments of the invention are also able to promote accelerated wound healing with reduced scarring if administered after a wound has been formed. It is preferred that such administration should occur as early as possible after formation of the wound, but agents of the invention are able to promote accelerated wound healing with reduced scarring at any time up until the healing process has been completed (i.e. even in the event that a wound has already partially healed the methods and medicaments of the invention may be used to promote accelerated wound healing with reduced scarring in respect of the remaining un-healed portion). It will be appreciated that the "window" in which the methods and medicaments of the invention may be used to promote accelerated wound healing with reduced scarring is dependent on the nature of the wound in question (including the degree of damage that has occurred, and the size of the wounded area). Thus in the case of a large wound the methods and medicaments of the invention may be administered relatively late in the healing response yet still be able to promote accelerated wound healing with reduced scarring. The methods and medicaments of the invention may,

90

for instance, preferably be administered within the first 24 hours after a wound is formed, but may still promote accelerated wound healing with reduced scarring if administered up to ten, or more, days after wounding.

The methods and medicaments of the invention may be administered on one or more occasions as necessary in order to promote accelerated wound healing with reduced scarring. For instance therapeutically effective amounts of the medicaments may be administered to a wound as often as required until the healing process has been completed. By way of example, the medicaments of the invention may be administered daily or twice daily to a wound for at least the first three days following the formation of the wound.

Most preferably the methods or medicaments of the invention may be administered both before and after formation of a wound. The inventors have found that administration of the medicaments of the invention immediately prior to the formation of a wound, followed by daily administration of such agents in the days following wounding, is particularly effective in promoting accelerated wound healing with reduced scarring.

It will be appreciated that the amount of a pharmaceutical composition in accordance with the invention that should be applied to a wound depends on a number of factors such as the biological activity and bioavailability of the TGF- β superfamily member incorporated in the medicament. This in turn may depend on factors such as the identity of the TGF- β superfamily member and the mode of administration of the composition. Other factors in determining a suitable therapeutic amount of a composition in accordance with the invention may include:

- i) The half-life of the TGF- β superfamily member in the subject being treated.
- ii) The specific condition to be treated (e.g. acute wounding, chronic wounds or fibrotic disorders).
- iii) The age of the subject being treated.

a1

The frequency of administration of compositions in accordance with the invention will be influenced by the above-mentioned factors and particularly by the half-life of the TGF- β superfamily member incorporated in the composition within the subject being treated.

Generally when pharmaceutical compositions in accordance with the invention are to be used in the treatment of existing wounds the composition should be administered as soon as the wound has occurred (or in the case of wounds that are not immediately apparent, such as those at internal body sites, as soon as the wound has been diagnosed). Therapy with compositions or methods in accordance with the invention should continue until the healing process has been promoted (and/or scarring inhibited) to a clinician's satisfaction.

As noted above, frequency of administration of compositions in accordance with the invention will depend upon the biological half-life of the TGF- β superfamily member incorporated therein. Typically a composition in accordance with the invention formulated as a cream or ointment should be administered to a target tissue such that the concentration of the TGF- β superfamily member in the target tissue is maintained at a level suitable for having a therapeutic effect. This may require administration daily or even several times daily.

Pharmaceutical compositions in accordance with the invention, may be administered by any suitable route capable of achieving a desired biological or therapeutic effect (such as the promotion of wound healing or inhibition of scarring), but it is preferred that the compositions be administered locally at the site at which the activity is required e.g. by injection.

The inventors find that the promotion of accelerated wound healing and/or the inhibition of scarring using pharmaceutical compositions in accordance with the present invention is particularly improved by topical application of the composition to

N
Q

a wound (or, in the case of prophylactic application, to a tissue or site where a wound is to be formed).

Pharmaceutical compositions in accordance with the invention may take a number of different forms depending, in particular on the manner in which they are to be used. Thus, for example, they may be in the form of a liquid, ointment, cream, gel, hydrogel or aerosol. All of such compositions are suitable for topical application to a wound, which is a preferred means of administering agents of the invention to a subject (person or animal) in need of treatment.

Pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be provided on a sterile dressing or patch, which may be used to cover a site at which it is desired that the TGF- β superfamily member incorporated in the composition should have a biological or therapeutic effect. It will be appreciated that the advantages provided by pharmaceutical compositions in accordance with the invention, in terms of improved shelf-life, increased recovery and/or increased biological activity of the incorporated TGF- β superfamily member, mean that such compositions are particularly suitable for incorporation in pre-prepared patches or dressing.

Pharmaceutical compositions in accordance with the invention are particularly suitable for incorporation within slow or delayed release devices, since the compositions are able to obviate many of the disadvantages normally associated with the storage of compositions incorporating TGF- β superfamily members. Suitable devices may, for example, be placed on or inserted under the skin and the composition incorporating the TGF- β superfamily member released over days, weeks or even months. Such a device may be particularly useful for patients that require long-term administration of the TGF- β superfamily member. Examples of conditions that may particularly benefit from such long-term administration of pharmaceutical compositions in accordance with the invention include the treatment of chronic wounds or of extensive acute wounds (such as burns) and the treatment of established fibrotic conditions.

a3

Daily doses of pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be given as a single administration (e.g. a daily injection or a daily application of a topical formulation). Alternatively, pharmaceutical compositions in accordance with the invention may require administration twice or more times during a day. In a further alternative, a slow release device may be used to provide a patient with a suitable dose of a pharmaceutical composition in accordance with the invention without the need to administer repeated doses.

Liquid vehicles may be used in preparing solutions, suspensions, emulsions, syrups, elixirs and pressurized compositions. The agent of the invention can be dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable liquid vehicle such as water, an organic solvent, a mixture of both or pharmaceutically acceptable oils or fats. It is preferred that liquid pharmaceutical compositions in accordance with the invention are provided as aqueous solutions.

The liquid vehicle can contain other suitable pharmaceutical additives such as solubilizers, emulsifiers, buffers, preservatives, sweeteners, flavoring agents, suspending agents, thickening agents, colors, viscosity regulators, stabilizers or osmoregulators. Suitable examples of liquid vehicles for oral and parenteral administration include water (partially containing additives as above, e.g. cellulose derivatives, preferably sodium carboxymethyl cellulose solution), alcohols (including monohydric alcohols and polyhydric alcohols, e.g. glycols) and their derivatives, and oils (e.g. fractionated coconut oil and arachis oil). For parenteral administration, the vehicle can also be an oily ester such as ethyl oleate and isopropyl myristate. Sterile liquid vehicles are useful in sterile liquid form compositions for parenteral administration. The liquid vehicle for pressurized compositions can be halogenated hydrocarbon or other pharmaceutically acceptable propellant.

Liquid pharmaceutical compositions of the invention formulated as sterile solutions or suspensions can be administered by intramuscular, intrathecal, epidural, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous injection. Sterile solutions can also be administered intravenously. It will be appreciated that injectable compositions in

94

accordance with the invention may also include binders, suspending agents and preservatives as necessary. Suitable examples of such agents will be well known to those skilled in the art.

The inventors have also found that pharmaceutical compositions in accordance with the invention are suitable for oral administration. Suitable formulations for use in accordance with this embodiment of the invention include mouth washes and the like. Orally administered pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be used in the prevention and/or treatment of mucositis, ulcers (including gastrointestinal and stomach ulcers) Crohn's Disease and ulcerative colitis.

Pharmaceutical compositions in accordance with the invention are suitable for administration to the eye. Accordingly a preferred formulation of compositions of the invention for such use may be in the form of eye drops. It is known that TGF- β superfamily members such as TGF- β_3 may be used in the promotion of accelerated wound healing with reduced scarring in the cornea. Corneal wounds may result from trauma to the eye arising as a result of accidental injury (as considered above) or as a result of surgical operations (e.g. laser surgery on the cornea).

Pharmaceutical compositions of the invention may be used in a range of "internal" sites (i.e. sites occurring within the body, rather than on an external surface). Thus for example, medicaments in accordance with the invention may be formulated for inhalation for use in the nose, lungs or other respiratory epithelia. Examples where it may be desirable to use the pharmaceutical compositions of the invention in this manner include the treatment of internal wounds, and the prevention and/or treatment of scarring or fibrosis in the respiratory system.

The use at internal body sites of pharmaceutical compositions in accordance with the present invention may also be advantageous in the treatment of wounds at elevated risk of forming adhesions. Such adhesions are a common result of injuries or wounds in the digestive or urino-genital systems, and can lead to deleterious loss of function in afflicted tissues.

Known procedures, such as those conventionally employed by the pharmaceutical industry (e.g. *in vivo* experimentation, clinical trials etc.), may be used to establish specific or preferred formulations of pharmaceutical compositions in accordance with the invention, as well as precise therapeutic regimes for administration of such compositions (such as daily doses of the TGF- β superfamily member incorporated in the composition and the frequency and route of administration of the composition).

A suitable daily dose of a pharmaceutical composition in accordance with the invention for use in wound healing depends upon a range of factors including (but not limited to) the desired therapeutic activity to be achieved by the composition (for instance acceleration of healing and/or the prevention or inhibition of scarring); the identity of the TGF- β superfamily member incorporated in the composition; the nature of the tissue wounded; the area and/or depth of the wound to be treated; the severity of the wound; and the presence or absence of factors predisposing to pathological scar or chronic wound formation. Typically a suitable dose of a TGF- β (such as TGF- β_3) superfamily member to be administered by means of a pharmaceutical composition in accordance with the invention will be within the range of 0.001ng to 100mg of the superfamily member per 24 hours, although this figure may be modified upwards or downwards in response to the factors outlined above. The amount of the TGF- β superfamily member administered by means of the pharmaceutical composition of the invention may preferably be 50 to 500ng per linear centimetre of tissue damage.

Generally, pharmaceutical compositions in accordance with the invention should be formulated such that when administered to a wound a concentration of the incorporated TGF- β superfamily member (e.g. TGF- β_3) of between 10ng/100 μ l and 500ng/100 μ l per linear centimetre is achieved. Preferably the TGF- β superfamily member may be provided at concentrations of between 50ng/100 μ l and 250ng/100 μ l per linear centimetre.

96

The skilled person will appreciate that the concentration of a TGF- β superfamily member that it may be desired to bring about in a tissue to be treated by administration of a pharmaceutical composition in accordance with the invention will be dependent upon the potency of the family member, and on the particular cell and tissue types that it is desired to treat.

In the case of a typically superfamily member (such as TGF- β 3) of 110 – 170 amino acids length it may be preferred that pharmaceutical compositions of the invention be administered to achieve a local concentration of approximately 19nM to 100nM, and more preferably between 19.664nM and 98.321nM, in the tissue to be treated.

Pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be used therapeutically as a monotherapy, which is to say the desired therapeutic activity being brought about solely through the use of pharmaceutical compositions in accordance with the invention. Alternatively the methods or pharmaceutical compositions of the invention may be used in combination with other compounds or treatments to achieve the desired therapeutic effect. Suitable treatments that may be used as parts of such combination therapies will depend on the therapeutic effect that it is desired to achieve, but will be well known to those skilled in the art.

A highly surprising advantage of pharmaceutical compositions of the invention (and methods of treatment using such compositions) is that the inventors have found that the administration of these compositions by injection is associated with greatly reduced injection pain and erythema compared to that observed on administration of prior art compositions. This benefit is highly advantageous since the pharmaceutical compositions of the invention are highly suitable for administration by injection.

However, the inventors believe that the advantage of reduced injection pain may also be achieved using pharmaceutical compositions that do not comprise TGF- β superfamily members.

a7

Accordingly, in a seventh aspect of the present invention there is provided the use of a sugar in the manufacture of a medicament for the prevention or reduction of injection pain.

This seventh aspect of the invention is based on the inventors' surprising finding that pharmaceutical compositions comprising sugars give rise to reduced pain when administered to a subject. Particularly, the inventors have found that injectable pharmaceutical compositions comprising sugars give rise to reduced injection pain when injected into a subject, and in a preferred embodiment of the invention there is provided the use of a sugar in the preparation of an injectable medicament for the prevention or reduction of injection pain.

In an eighth aspect of the invention there is provided a method of preventing or reducing injection pain comprising administering to a patient in need of such pain prevention or reduction an effective amount of a medicament comprising a sugar. It is preferred that medicaments administered in accordance with this aspect of the invention be injectable medicaments.

Medicaments in accordance with, or suitable for use in, these aspects of the invention, may be manufactured and formulated in accordance with techniques and formulations described with reference to preceding aspects of the invention.

Injection pain is a generally recognised medical problem, and is one of the most important adverse effects militating against the use of injectable pharmaceuticals or compositions, and injection pain (or the fear of injection pain) may cause considerable anxiety in patients requiring injections. For the present purposes injection pain may be taken to refer to pain associated with the introduction of hypodermic needles, catheters, cannulae, and other such devices into the body of a subject.

It is frequently necessary to administer injections to patients at sites that are already subject to sensations of pain and this may exacerbate the level of pain perceived by the recipient of the injection. Examples of such situations include injections at wound

98

sites, injections associated with the treatment of infections, and injections associated with treatment of autoimmune diseases. In many of these cases existing inflammation at the site where the injection is to take place may increase a patient's perception of pain associated with the injection.

Even in the absence of inflammation or other factors predisposing to heightened injection pain the natural aversion of patients to the pain of injections has a number of deleterious effects. It is recognised that injection pain is one of the major underlying reasons why patients may not initiate or complete therapeutic regimes in which medicaments are administered by injection. In the case of babies and young children the adverse reaction of the subject can also be traumatic for the parent or guardian responsible for the subject receiving the injection.

These problems associated with injection pain may be partially (or even totally) alleviated by medicaments manufactured in accordance with the seventh aspect of the invention, or methods of treatment in accordance with the eighth aspect of the invention.

The inventors believe that the advantages provided by medicaments manufactured in accordance with the seventh aspect of the present invention are also provided by all medicaments of the invention (i.e. medicaments in accordance with the other aspects of the invention). Thus, except for where the context requires otherwise, the advantages described below in connection with the medicaments of the seventh aspect of the invention (and the methods of the eighth aspect of the invention) should be considered to be provided by all pharmaceutical compositions of the invention (since all comprise the sugars believed to be responsible for the prevention or reduction of injection pain).

One of the notable advantages of the medicaments of the invention is their very rapid action in preventing or reducing injection pain. Medicaments of the invention are able to exert their activity against injection pain almost instantaneously on their injection into a patient. Accordingly, medicaments manufactured in accordance with

99

the invention are able to effectively prevent or reduce injection pain that would otherwise arise as a result of the injection through which the medicaments are administered to a patient.

It will be recognised that the immediate action of medicaments manufactured in accordance with the invention provides many advantages in a clinical context. By using medicaments manufactured in accordance with the invention it is not necessary to pre-treat a patient or injection site in order to alleviate or prevent injection pain. This is of considerable importance since many medical practitioners act under considerable time pressure, and the additional time expenditure associated with existing pre-treatment regimes aimed to reduce injection pain is one of the major factors that adversely influences the employment of such regimes in practice. Indeed, even the perception that the use of existing pre-treatment regimes requires considerable expenditure of time prevents their wider application. Since the medicaments of the invention can be administered by means of the very injection the pain of which it is desired to reduce it will be appreciated that their use adds no additional time to the process of administering the injection.

The skilled person will immediately appreciate that medicaments manufactured in accordance with the methods of the invention (and particularly those manufactured in accordance with the seventh aspect of the invention) may be used as "carriers" incorporating other active agents. By incorporating these further active agents in medicaments manufactured in accordance with the invention it is possible to administer the active agents to a patient by means of injection with the advantage that the patient to whom the medicament is being administered experiences reduced injection pain. Accordingly, it is a preferred embodiment of the invention that medicaments manufactured in accordance with the invention further comprise an active agent to be administered with reduced injection pain.

An "active agent" as considered in the context of this embodiment of the invention should be taken to include:

- i) all suitable therapeutic active agents;

100

- ii) all suitable anaesthetic active agents;
- iii) all suitable diagnostic active agents; and
- iv) all suitable cosmetic active agents.

It will be appreciated that members of the TGF- β superfamily constitute preferred active agents that may be incorporated in medicaments and pharmaceutical compositions of the invention. Further specific and illustrative examples of suitable active agents that may be advantageously incorporated in medicaments manufactured in accordance with the invention are considered below.

Since sugars used in the manufacture of medicaments in accordance with the invention are generally inert substances they can be combined in medicaments with many suitable active agents without adverse reaction. Sugars used in medicaments manufactured in accordance with the invention do not tend to compromise the activity of other active agents that may be incorporated in the medicaments, nor do they tend to reduce the shelf life of compositions comprising such active agents.

Medicaments manufactured in accordance with the invention provide many advantages over the local anaesthetics that are commonly used in many existing strategies for the prevention or reduction of injection pain. One major advantage conferred by medicaments manufactured in accordance with the invention is that the medicaments (being based around the use of sugars) carry a much lower risk of adverse reactions than do existing anaesthetic preparations. World Health Organisation guidelines suggest that in a number of contexts where local anaesthetics are employed it is recommended that medical staff present are trained in the use of anaesthetics, and also that emergency equipment, including oxygen and resuscitation equipment, be provided on site. As will be appreciated, to meet these requirements involves considerable cost, both in terms of training and necessary equipment.

In contrast, medicaments prepared in accordance with the present invention are both safe and easy to use. Persons administering medicaments manufactured in accordance with the invention do not require specific anaesthetic training, merely the ability to

101

perform injections. The skills needed to give injections can be readily taught to patients, and since there is no need for provision of emergency equipment patients are able to self-administer the medicaments, and thus obtain the benefits of injection pain reduction, within their own homes.

The sugars used in medicaments manufactured in accordance with the invention are not generally associated with dangerous sensitivity reactions that may occur with anaesthetics commonly used in existing anti-injection pain strategies. By way of example, hypersensitivity to lignocaine (a commonly used local anaesthetic) is generally recognised as a major adverse side effect of the use of this local anaesthetic.

Intravascular injections of even small amounts of local anaesthetic can produce potentially toxic blood levels. Accordingly it is a recognised aim of research to produce medicaments able to reduce injection pain without the need for administration of local anaesthetics. Medicaments of this type may be of particular use in tissues, such as the mouth, that contain many blood vessels, and hence are associated with a heightened risk of accidental intravascular injection.

In contrast, the effect of medicaments manufactured in accordance with the present invention is provided by sugars which are readily metabolised, and which are generally associated with a very low risk of adverse reactions. Accordingly it is a preferred embodiment of the invention that the medicaments be used in the prevention or reduction of injection pain in patients predisposed to heightened sensitivity to local anaesthetics, and particularly preferably in those predisposed to lignocaine hypersensitivity.

A further advantage of medicaments manufactured in accordance with the present invention, when compared with the use of local anaesthetics described in the prior art, is that the medicaments of the invention do not cause blood vessel constriction, which commonly occurs as a result of the administration of known local anaesthetics. Such constriction of blood vessels (which may particularly be caused by pre-administration of local anaesthetics) can render the administration of intra-blood vessel injections

102

difficult. This disadvantage is obviated by medicaments manufactured in accordance with the present invention. Indeed, the use of medicaments manufactured in accordance with the present invention in the prevention or reduction of injection pain associated with intra-blood vessel injections constitutes a preferred embodiment of the invention.

Medicaments manufactured in accordance with the invention also constitute a remarkably cost-effective way of reducing injection pain. In contrast with expensive local anaesthetics, cooling agents, and the like used in existing strategies designed to reduce injection pain, the medicaments manufactured in accordance with the invention utilise relatively inexpensive sugars. Accordingly medicaments manufactured in accordance with the invention offer a notable advantage over the prior art by virtue of their low cost of manufacture.

Medicaments manufactured in accordance with the invention may be of particular advantage to individuals requiring repetitious administration of injections. For example, the medicaments of the invention may be particularly suitable for use by diabetics. When used by individuals suffering from diabetes medicaments manufactured in accordance with the seventh aspect of the invention may be used to reduce the injection pain associated with injections required for the control or regulation of diabetes, such as injections of insulin or glucagon. It will be appreciated that medicaments of the invention incorporating TGF- β superfamily members, such as TGF- β_3 , may be particularly preferred for use by patients requiring repeated injections to sites of wound healing. In particular these may be useful for patients suffering from conditions of aberrant wound healing, such as suffering from chronic wounds or from pathological scars.

As mentioned above, the inventors have found that the beneficial effects conferred by pharmaceutical compositions in accordance with the invention can be obtained using any sugar thus far tested. Indeed, the inventors have found that sugar salts or derivatives may be used effectively in the manufacture of medicaments in accordance with the invention. However, it may be preferred that pharmaceutical compositions in

103

accordance with the invention comprise a sugar selected from the group comprising maltose, sucrose, glucose and mannose. More preferably the sugar utilised in pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be selected from the group comprising maltose and sucrose, and most preferably the sugar is maltose. The use of maltose provides particular advantages in that it demonstrates the greatest efficacy in not only preventing injection pain, but also lessening the effects of erythema that may otherwise be associated with injections.

Except for where the context requires otherwise, references to sugars in the context of medicaments for the reduction of injection pain should also be taken to encompass pharmaceutically acceptable salts, derivatives and variants of sugars. Such salts, derivatives and variants may preferably be salts, derivatives or variants of sugars selected from the group comprising maltose, mannose, sucrose and glucose, most preferably maltose.

It may be preferred that a medicament manufactured in accordance with the invention may comprise a sugar provided at a concentration of greater than 50mg/ml. Such medicaments may comprise a sugar at a concentration of between 51 and 200mg/ml, preferably at a concentration of between 60 and 150mg/ml, more preferably at a concentration of between 70 and 100mg/ml, even more preferably at a concentration of between 80 and 95mg/ml, and most preferably at a concentration of between 85 and 90mg/ml.

Alternatively or additionally, a medicament manufactured in accordance with the invention may comprise a sugar provided at a concentration of between 0.001 and 5M, or of between 0.005 and 2M. Preferably the sugar is provided at a concentration of between 0.01 and 1M, more preferably at a concentration of between 0.1 and 0.5, even more preferably at a concentration of between 0.2 and 0.4, and most preferably at a concentration of about 0.25M.

Medicaments manufactured in accordance with the present invention are particularly suited to administration to the skin, for example by intradermal or subcutaneous

104

injection. However, the medicaments may also be used effectively in the prevention or reduction of injection pain associated with injections at other body sites, for example injections administered to the eye; injections administered to the mouth and digestive system; injections administered to the nervous system; injections in the urino-genital system; or injections in the respiratory system; kidneys; tendons; ligaments; heart or circulatory system.

The medicaments of the invention are particularly suitable for use in injections at sites where existing inflammation may otherwise increase the degree of injection pain that is perceived by a patient receiving an injection. Accordingly the medicaments of the invention may preferably be used for the prevention or reduction of injection pain on injection into an inflamed site. Such inflamed sites may include sites of wounds or abrasions, arthritic sites (including injection sites subject to osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and spondyloarthropathies); inflamed sites associated with multiple sclerosis; sites subject to an allergic reaction (including allergic rhinitis/sinusitis; skin allergies including urticaria/hives; angioedema; ectopic dermatitis; inflammation associated with food allergies; inflammation associated with drug allergies or insect allergies; or inflammation associated with other specific allergic disorders such as mastocytosis), autoimmune conditions (including systemic lupus erythematosus; dermatomyositis and polymyositis); inflammatory neuropathies such as Guillain Barré and inflammatory polyneuropathies; vasculitis such as Wegener's granulomatosis or polyarteritis nodosa; and other autoimmune conditions such as polymyalgia rheumatica; temporal arteritis, Sjogren's syndrome; Bechet's disease; Churg-Strauss syndrome and Takayasu's arteritis.

The medicaments of the invention may also be of benefit in cases of injection at sites of cardiovascular inflammation, gastrointestinal inflammation, infection or other sites involving an immune reaction, neuroinflammatory disorders and transplant sites.

It is a recognised risk of the use of conventional local anaesthetics that, when used on broken skin such as that found in inflamed, wounded or infected areas, there is a tendency for increased anaesthetic uptake through the broken skin to lead to the

105

development of a systemic, rather than local, reaction. This is particularly notable in the case of topically applied local anaesthetics.

In contrast, medicaments manufactured in accordance with the invention confer a marked advantage in terms of their improved safety since, even in the event of systemic uptake, the sugars used in their preparation are not associated with any ill effects. Accordingly it is a preferred embodiment of the invention that the medicaments be used in the prevention or reduction of injection pain associated with injections at sites of broken skin. It is particularly preferred, as noted elsewhere, that medicaments manufactured in accordance with the invention be used in the prevention or reduction of injection pain associated with injections at sites of inflammation; wound sites (including transplant sites); or infected areas.

Medicaments manufactured in accordance with the invention may incorporate active agents that are beneficial in the treatment and/or management of wounded areas. Examples of active agents that may be advantageously incorporated in medicaments to be administered by injection at wound sites include:

- i) Therapeutic active agents, particularly those having a beneficial effect on wound healing or scar formation. Suitable therapeutic active agents may be able to promote or accelerate the wound healing response and/or able to prevent or inhibit scar formation. Examples of such suitable therapeutic active agents include TGF- β superfamily members (as discussed in more detail below) and agents able to neutralise the function of fibrogenic growth factors.
- ii) Anaesthetic active agents. There are a number of contexts in which it may be advantageous to administer anaesthetic active agents to wounded areas, for example to facilitate cleaning, closure or dressing of the wound.

Therapeutic active agents having a beneficial effect on wound healing suitable for incorporation in medicaments manufactured in accordance with the present invention

106

should be taken to encompass any substance having a beneficial effect on wound healing. Substances having a beneficial effect on wound healing may, for example, include substances capable of initiating or stimulating the naturally occurring wound healing response, as well as those substances capable of accelerating the wound healing response.

In a ninth aspect of the invention there is provided a method of preventing or reducing injection pain associated with administration of an injection at a wound site, the method comprising administering, by injection at a wound site, a therapeutically effective amount of a medicament comprising a sugar to a patient in need of such injection pain prevention or reduction. A therapeutically effective amount in the context of this aspect of the invention will be an amount of a medicament sufficient to prevent or reduce the injection pain perceived by the patient to whom the medicament is administered. Medicaments to be administered in accordance with this aspect of the invention may preferably further comprise an active agent suitable for the promotion of wound healing and/or the prevention of scar formation. Preferred examples of such active agents may include TGF- β superfamily members, and more preferably may include TGF- β 3.

It will be appreciated by those of skill in the art that medicaments manufactured in accordance with the present invention and comprising an active agent of benefit to the wound healing process may also be administered to a patient prior to wounding. Suitable active agents may include those capable of promoting healing and/or of preventing or inhibiting scar formation, such as TGF- β superfamily members. Alternatively, or additionally, medicaments manufactured in accordance with the present invention may contain an anaesthetic useful in preventing pain that may otherwise be caused by a wound to be formed.

It is well recognised that one of the more common medical procedures giving rise to injection pain is the administration by injection of anaesthetic agents. Although such agents may be able to effectively reduce pain once they have been administered and sufficient time has elapsed to allow them to achieve their anaesthetic activity, the

102

injection by which they are administered is frequently a cause of considerable pain to the recipient.

Although it is an aim of certain embodiments of the invention to provide a means by which to avoid or reduce the use of known anaesthetics, particularly in contexts in which their use may give rise to unwanted and/or dangerous side effects, it will be appreciated by the skilled person that medicaments manufactured in accordance with the present invention may be used as suitable "carriers" for anaesthetic active agents (such as injectable anaesthetics). When used in this way medicaments manufactured in accordance with the invention serve to prevent or reduce injection pain that would otherwise be associated with administration of the anaesthetic active agent. Thus in an alternative preferred embodiment a medicament manufactured in accordance with the invention may further comprise an anaesthetic active agent. For the purposes of the present invention an anaesthetic active agent suitable for incorporation in medicaments manufactured in accordance with the present invention may be taken to be any substance having anaesthetic properties. A suitable anaesthetic active agent for incorporation in medicaments manufactured in accordance with the invention may be an injectable local anaesthetic. In a particularly preferred embodiment of the invention the anaesthetic active agent is the local anaesthetic lignocaine.

Medicaments manufactured in accordance with this embodiment of the invention are suitable for use in all contexts in which anaesthetics may be administered by injection. Examples of such contexts will be well known to the skilled person and are considered elsewhere in the specification.

However, there are a number of contexts in which medicaments manufactured in accordance with the invention particularly beneficially used to prevent or reduce injection pain associated with the injection of local anaesthetics.

Thus in one preferred example, medicaments manufactured in accordance with the present invention may be used to prevent or reduce injection pain associated with the injection of local anaesthetics in the mouth. Injection pain associated with injection

108

of local anaesthetics in the mouth has been shown to be particularly traumatic for patients and it is believed that this increase in trauma arises as a result of the fact that the pain is perceived as associated with the head of the patient. This location both increases the degree of injection pain perceived by the patient and also amplifies the unpleasantness of such pain. Furthermore, the increased perception of pain by the patient also exacerbates the trauma experienced by a medical or dental practitioner administering such injections.

Medicaments manufactured in accordance with the invention may also be used for the prevention or reduction of injection pain associated with injections of anaesthetic at other sites on or in the heads of patients, particularly with injection of anaesthetic at sites on the face of patients.

As described previously, the medicaments of the invention may also be used as "carriers" for diagnostic active agents, thereby reducing or preventing injection pain that might otherwise be associated with the administration of the diagnostic active agent. Examples of diagnostic active agents that may be administered by injection, and that may therefore advantageously be incorporated in medicaments manufactured in accordance with the invention include radiopaque agents. Such diagnostic active agents are administered to a patient by way of injection (for example into blood vessels or the cerebrospinal fluid) and their ability to absorb x-rays used as an aid to diagnosis. Examples of suitable diagnostic active agents that may be incorporated in medicaments manufactured in accordance with the invention include diatrizoates, iohexol, iopamidol, iothalamate, ioversol, ioxaglate, and metrizamide. These radiopaque diagnostic active agents may be used in the diagnosis of diseases or conditions such as biliary tract problems, blood vessel diseases, blood vessel diseases of the brain, blood vessel diseases of the heart, brain diseases and tumours, breast lesions, heart disease, impaired flow of cerebrospinal fluid in the brain, kidney diseases, joint diseases, liver diseases, pancreas diseases, spinal diseases such as spinal disc diseases, spleen diseases, stomach and intestinal problems, or urinary tract problems.

109

Medicaments manufactured in accordance with the invention may advantageously incorporate cosmetic active agents. There are many cosmetic active agents that are typically administered to patients by means of injection. For example, botulinum toxin injections (more commonly known as "botox" injections) are usually administered by intradermal injection of the toxin at a requisite site of a patient. Botulinum toxin injections are frequently administered to sites on the face or neck of patients being treated, and this administration is normally associated with injection pain that may be alleviated by the incorporation of botulinum toxin in medicaments manufactured in accordance with the invention.

Another cosmetic procedure involving administration of cosmetic active agents by injection, and hence associated injection pain, is the injection of cosmetic fillers. These active agents (which typically include collagen, hyaluronic acid, fat and other related substances) may be administered by injection at sites where it is desired to "fill out" the skin, for example filling wrinkles associated with aging, augmenting the profile of the lips, or filling scars such as those caused by acne. Injection pain associated with the administration of cosmetic fillers may be prevented or reduced by the incorporation of suitable cosmetic fillers in medicaments manufactured in accordance with the invention.

The inventors have found that the prevention or reduction of injection pain is provided by medicaments manufactured in accordance with the invention in respect of all routes of injection investigated.

By way of example, the inventors have found that medicaments in accordance with the invention may be used for the prevention or reduction of injection pain associated with intradermal injection. Accordingly, in a preferred embodiment of the invention a suitable medicament may be an intradermally injectable medicament for the prevention or reduction of injection pain associated with intradermal injection.

The inventors have also found that medicaments in accordance with the invention may be used for the prevention or reduction of injection pain associated with

110

subcutaneous injection. Accordingly, in another preferred embodiment of the invention a suitable medicament may be a subcutaneously injectable medicament for the prevention or reduction of injection pain associated with subcutaneous injection.

The inventors have further found that medicaments in accordance with the invention may be used for the prevention or reduction of injection pain associated with intravenous injection. As previously noted, medicaments manufactured in accordance with the invention may be advantageously used in intra-blood vessel injections since they are able to prevent or reduce injection pain without contributing to blood vessel constriction. Accordingly, in a further preferred embodiment of the invention, a suitable medicament may be an intravenously injectable medicament for the prevention or reduction of injection pain associated with intravenous injection.

The inventors have still further found that medicaments in accordance with the invention may be used for the prevention or reduction of injection pain associated with intramuscular injection. Accordingly, in a still further preferred embodiment of the invention a suitable medicament may be an intramuscularly injectable medicament for the prevention or reduction of injection pain associated with intramuscular injection.

The inventors have still further found that medicaments in accordance with the invention may be used for the prevention or reduction of injection pain associated with intraperitoneal injection. Accordingly, in a still further preferred embodiment of the invention a suitable medicament may be an intramuscularly injectable medicament for the prevention or reduction of injection pain associated with intraperitoneal injection.

It is particularly preferred that medicaments manufactured in accordance with the invention may be formulated for intradermal injection, or may be formulated for subcutaneous injection. Typical formulations suitable for intradermal injection and/or subcutaneous injection will be well known to those skilled in the art.

Although the pharmaceutical compositions and methods of treatment of the present invention are particularly suitable for use in humans, and have largely been described with reference to such use, it will be appreciated that they are also susceptible to use in non-human animals; and particularly in domestic or agricultural animals such as dogs, cats, cattle and horses.

112

The invention will be further described, by way of example, with reference to the accompanying Experimental Results and Figures, in which:

Figure 1 illustrates members of the TGF- β superfamily, and the relationships between superfamily members;

Figure 2 illustrates the amino acid sequences of the TGF- β superfamily members TGF- β 1 (Sequence ID No. 1), TGF- β 2 (Sequence ID No. 2) and TGF- β 3 (Sequence ID No. 3); and

Figure 3 illustrates, in panels 3A to 3J, the results of experiments to compare the inherent biological activity of the TGF- β superfamily member TGF- β 3 when incorporated in pharmaceutical compositions according to the invention, or in pharmaceutical compositions of the prior art. Figure 3A shows a first standard curve generated using prior art formulation DS11, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 34.793pg/mL. Figure 3B shows a second standard curve generated using prior art formulation DS11, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 24.136pg/mL. Figure 3C shows a third standard curve generated using prior art formulation DS11, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 22.055pg/mL. Figure 3D shows a fourth standard curve generated using prior art formulation DS11, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 30.562pg/mL. Figure 3E shows a fifth standard curve generated using prior art formulation DS11, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 39.973pg/mL. Figure 3F shows a first standard curve generated using a maltose formulation in accordance with the invention, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 8.758pg/mL. Figure 3G shows a second standard curve generated using a maltose formulation in accordance with the invention, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 5.957pg/mL. Figure 3H shows a third standard curve generated using a maltose formulation in accordance with the invention, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 7.72pg/mL. Figure 3I shows a fourth standard curve generated using a maltose formulation in accordance with the invention, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 7.31pg/mL. Figure 3J shows a fifth standard curve generated using a maltose formulation in accordance with the invention, in which TGF- β 3 has an IC_{50} of 6.798pg/mL.

113

Table 1 compares the quantity of a TGF- β superfamily member recoverable from pharmaceutical compositions of the invention with the quantity recoverable from known compositions of the prior art;

Table 2 compares the biological activity of TGF- β superfamily members recovered from pharmaceutical compositions in accordance with the invention with the biological activity of TGF- β superfamily members recovered from known prior art compositions;

Table 3 shows the results of an assessment of injection pain comparing the results achieved using medicaments manufactured in accordance with the invention with results obtained using prior art compositions; and

Table 4 summarises the results shown in Table 4.

114

EXPERIMENTAL RESULTS

TGF- β_3 Bulk Material

The TGF- β superfamily member TGF- β_3 was supplied in a stock solution at a concentration of 9.1mg/mL in 20mM acetic acid and 20% (v/v) isopropyl alcohol. This stock solution was serially diluted to produce compositions incorporating the TGF- β superfamily member TGF- β_3 . The concentrations of TGF- β_3 incorporated in the compositions used in the following experiments were as described below.

A. Recovery of TGF- β_3 from pre-filled syringes containing pharmaceutical compositions.

The following experiment investigated the recovery of the TGF- β superfamily member TGF- β_3 from pre-filled syringes containing compositions either in accordance with the invention, or in accordance with the prior art.

A1. Production of pre-filled syringes.

Compositions incorporating the TGF- β superfamily member TGF- β_3 at a concentration of 1 μ g/100 μ L were produced by serial aseptic dilution from the bulk material described above. The diluents used to produce the test compositions in accordance with the present invention were as follows:

- i) 0.25M maltose (equivalent to 90mg/ml);
- ii) 0.25M glucose (equivalent to 45mg/ml);
- iii) 0.25M sucrose (equivalent to 86mg/ml); and
- iv) 0.25M mannose (equivalent to 45mg/ml).

For comparison purposes, a composition representing preferred prior art compositions was produced by dilution of the stock solution to produce a 1 μ g/100 μ L solution of TGF- β_3 in DS11 (a diluent comprising phosphate buffered saline PBS and 5%(w/v) mannitol).

750 μ L samples of each of the compositions formed were drawn up into individual sterile 1mL syringes. Thus each syringe contained a defined amount of an experimental or comparison composition in which was incorporated a known quantity of the TGF- β superfamily member TGF- β_3 . The syringes containing the compositions of the invention and those containing the prior art composition were then stored at 4°C for one week. These experimental storage conditions provided a model of the typical manner in which pharmaceutical compositions are stored refrigerated prior to their therapeutic use.

In order to evaluate the quantity of TGF- β_3 recoverable from the compositions of the invention and prior art composition, the contents of the syringes were recovered (through expulsion from the syringe) and the amount of recoverable TGF- β_3 protein evaluated by ELISA as described below.

A2. Assessment of TGF- β recovery by ELISA

The following assay was used to compare recovery of the TGF- β superfamily member TGF- β_3 from pharmaceutical compositions in accordance with the invention with the amount of TGF- β_3 recoverable from prior art compositions. The assay may be readily adapted, by substitution of suitable capture and detection antibodies and use of a suitable standard curve, to allow assessment of recovery of other TGF- β superfamily members from pharmaceutical compositions of interest (for example other compositions in accordance with the invention, or other control compositions known from the prior art).

A2.1. Preparation of plates for ELISA.

Ninety-six well plates (Falcon 353912) were coated with 100 μ L/well of a monoclonal anti-TGF- β_3 capture antibody (R&D Systems MAB643) diluted in PBS to a concentration of 2 μ g/mL. The plates were then sealed and incubated overnight at room temperature to allow the antibody to adhere to the wells. After incubation each well was aspirated and washed three times with 300 μ L/well (each wash) of wash buffer (comprising 0.05% (v/v) Tween 20 in PBS, pH 7.4). Non-specific protein

116

binding sites were blocked by the addition of 150µL/well of PBS containing 1% (w/v) BSA, 5% (w/v) sucrose and 0.05% (w/v) sodium azide. Wells containing this solution were incubated at room temperature for one hour.

A2.2. Preparation of TGF-β₃ Standard Curve

All standard and sample dilutions were made in either 0.25M sugar solution (i.e. maltose, glucose, mannose or sucrose) or ELISA diluent (0.1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween 20 in Tris-buffered saline pH 7.3).

A TGF-β₃ standard series using human recombinant TGF-β₃ (R&D Systems 243-B3) or TGF-β₃ (from the stock solution at a concentration of 9.1mg/mL in 20mM acetic acid and 20% (v/v) isopropyl alcohol), ranging from 31.25pg/mL to 2000pg/mL, was prepared.

A2.3. Recovery Assay

A volume of 100µL of either the sample or standard solutions was added to each well. The plate was then sealed and incubated for 1.5 hours at room temperature. The wells were then aspirated and washed a total of three times with 300µL/well of wash buffer (as above) for each wash.

Once the wells had been aspirated and washed, a volume of 100µL of biotinylated anti-TGF-β₃ detection antibody (R&D Systems BAF243) diluted to 100ng/mL in ELISA diluent (as before) was added to each well. The plate was then sealed and incubated for 1.5 hours at room temperature. The wells were then aspirated and washed a total of three times with 300µL/well of wash buffer (as before) for each wash. A volume of 100µL/well of Streptavidin HRP (Dako P0397) diluted 1:5000 in ELISA diluent was then added to each well, and the plate sealed and incubated for 30 minutes at room temperature. The wells were then aspirated and washed a total of three times, using 300µL/well of wash buffer for each wash. A volume of 100µL of Substrate Solution (R&D Systems DY999) was then added to each well, the plate

1/17

covered and incubated for 20 minutes at room temperature. A volume of 50 μ L of Stop Solution (0.5M H₂SO₄) was then added to each well. The optical density of the contents of each well was then determined, within 30 minutes, using a microplate reader at a wavelength of 450nm (wavelength correction set to 570nm). The quantity of TGF- β_3 present in the samples, representing TGF- β_3 recoverable from the compositions, was then determined by reference to the standard curve. The results are expressed in Table 1 below, as the fold increase of material recovered from the syringe compared to the DS11 (mannitol) formulation representative of preferred compositions known in the prior art.

A3. Results of Recovery Assay

The recoverable TGF- β_3 detected in a PBS/Mannitol (DS11) formulation was 284.8 (± 0.03) ng/100 μ L.

The fold-increase in recovery of TGF- β_3 from syringes containing compositions in accordance with the invention following one week storage at 4°C (compared to TGF- β_3 recovery from syringes containing the DS11 formulation subjected to the same storage conditions) is shown below in Table 1.

The results clearly indicate that pharmaceutical compositions in accordance with the present invention allow greatly increased recovery of the TGF- β superfamily member incorporated therein as compared to the level of recovery possible using preferred compositions known from the prior art.

118

Table 1

Formulation	Fold Increase in Recoverable Material Compared to DS11 Formulation
Sucrose	3.18
Maltose	4.91
Glucose	2.18
Mannose	2

B. Biological Activity of TGF- β superfamily members incorporated in pharmaceutical compositions in accordance with the first aspect of the invention.

The inherent biological activity of the TGF- β superfamily member TGF- β_3 incorporated in compositions of the invention was determined in accordance with the following assay, which utilises the ability of TGF- β superfamily members to inhibit mink lung epithelial cell proliferation. The biological activity of the incorporated TGF- β superfamily member may then be assessed by determining its IC₅₀ value (the concentration at which 50% inhibition of the cells' proliferation response is observed).

This assay represents a suitable means by which the biological activity of other TGF- β superfamily members incorporated in compositions of the invention, or in known compositions used for comparison purposes, may be determined.

B1. Experimental details of Biological Activity Assay.

Briefly, the biological activity of TGF- β_3 incorporated in a composition in accordance with the first aspect of the invention was determined by measurement of the inhibition of proliferation of Mink lung epithelial cells (Mv-1-Lu) (ATCC Cat no CCL-64) brought about by the TGF- β superfamily member. Inhibition of proliferation was

assessed using a MTT reagent (Sigma Cat No M2279). MTT is 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, a soluble tetrazolium salt that is converted to its insoluble formazan product by the metabolic activity (mitochondrial dehydrogenases) of cells. The insoluble formazan crystals are solubilized with acidified isopropanol and the intensity of the resultant solution is measured colorimetrically at a wavelength of 570 nm.

Briefly, 1×10^4 /ml of Mink lung epithelial cells were inoculated into 96-well plates in 100 μ l of culture medium (DMEM + 10% (v/v) Foetal Bovine Serum, 20mM Glutamine, 0.1M Hepes) per well. The cells were incubated at 37°C in 5% (v/v) CO₂, and allowed to attach for 24 hours. TGF- β_3 was diluted just prior to use (i.e. without storage) in DS11, comprising phosphate buffered saline (PBS) containing 5%(w/v) mannitol, or 0.25M maltose to generate standard curves at ten times the final assay concentration of 1.9-500pg/mL. The samples were then further diluted 1:5 in cell culture medium prior to the addition of 100 μ L of these samples to each well containing 100 μ L of cell culture medium (resulting in a further 1:2 dilution in the well and therefore final assay concentrations of 1.9-500pg/mL). The cells of each well were then exposed to samples for five days at 37°C in 5%(v/v) CO₂. At the end of the exposure, 50 μ l of MTT reagent (2mg/mL stock diluted in PBS) was then added to each well. The plates were then incubated for a further four hours at 37°C in 5%(v/v) CO₂. After this period the supernatant from each well was removed and the precipitated formazan crystals were dissolved by the addition of 100 μ l/well of acid isopropanol. The solubilised MTT in each well was then quantified using a 96-well plate reader at a wavelength of 570 nm. The data were plotted using XLFit 3 and the IC₅₀ values calculated for five individual curves for each formulation. The IC₅₀ value for each formulation was then expressed as the mean ($\pm$ standard deviation) of these individual standard curves.

B2. Results of Biological Activity Assay.

The results of five repetitions of the biological activity assay using both a known composition of the prior art (Figures 3A to 3E) and a composition of the invention

(Figures 3F to 3J) are shown in Figure 3. The means ($\pm$ the standard deviation) of the individual curves shown in Figure 3 are provided in Table 2.

The results clearly illustrate that the IC50 value (for the inhibition of mink lung epithelial cell proliferation) of TGF- β_3 incorporated in pharmaceutical compositions in accordance with the invention is greatly reduced in as compared to the value obtained for TGF- β_3 incorporated in preferred prior art compositions. This decrease in the IC50 value indicates that the amount of the TGF- β superfamily member TGF- β_3 required to achieve 50% of the biological activity exerted by the cytokine is reduced when incorporated in the pharmaceutical compositions of the invention. Accordingly, the biological activity of the TGF- β superfamily member incorporated in compositions of the invention can be seen to be much increased over that which can be achieved using compositions of the prior art.

Table 2

Formulation	Mean IC ₅₀ (pg/mL; $\pm$ standard deviation)
DS11	30.104 ($\pm$ 7.093)
Maltose	7.309 ($\pm$ 1.044)

D. Summary of Studies A and B

Pharmaceutical compositions in accordance with the present invention allow surprisingly high levels of recovery of TGF- β superfamily members incorporated in the compositions as compared to the preferred compositions described in the prior art.

Furthermore, the biological activity of the TGF- β superfamily members incorporated in the compositions is surprisingly increased as compared to TGF- β superfamily members incorporated in prior art compositions.

E. Evaluation of Localised Pain and Erythema Associated with Intradermal Injection of Formulations

A study was conducted to evaluate localised pain and erythema associated with intradermal injection of medicaments manufactured in accordance with the invention and the pain and erythema associated with control injections of prior art compositions.

Experimental injectable solutions were prepared as described above.

Briefly, a volume of 100 μ L of each formulation described above was injected intradermally into the inner aspect of the upper arms of a volunteer. In addition to the DS11 control described above, a solution of the known local anaesthetic lignocaine was also used as a further control. The pain on injection and erythema were categorised by the volunteer and a clinician.

Separate evaluations of local pain and erythema associated with each of the solutions shown in Table 3 were undertaken. Both the volunteer and the clinician undertook these evaluations. The extent of pain or erythema associated with the different formulations used was rated based upon the following categories (listed in ascending severity):

- i) none
- ii) minimal
- iii) slight
- iv) marked

The results of the evaluation are shown in Table 3 and these are further summarised in Table 4.

The results indicate that medicaments manufactured in accordance with the invention consistently gave rise to reduced injection pain when compared to injectable compositions known from the prior art.

The results clearly illustrate the suitability of medicaments manufactured in accordance with the invention for use as carriers able to reduce the injection pain that would otherwise be associated with injection of other substances. This is particularly illustrated by the finding that medicaments in accordance with the invention that incorporated mannitol gave rise to less injection pain than did injections of mannitol-base compositions alone.

F. Summary of Study E

Medicaments manufactured in accordance with the present invention possess a surprising ability to prevent or reduce injection pain. This ability is exhibited both in comparison to known anaesthetic agents (such as lignocaine) and in comparison to existing preferred injectable medicaments (such as the mannitol-based formulation DS11). The beneficial properties of medicaments manufactured in accordance with the invention are exhibited by all sugars tested thus far, but are not exhibited by a formulation consisting of the sugar alcohol mannitol.

Table 3

Sample	Volunteer	Erythema	Pain
Lignocaine	1	Marked	Marked
Water containing 5% mannitol and equiv 100µg/100µL protein		Slight	Slight
Glucose		Slight	None
Mannose		Minimal	None
Maltose		Minimal	None
Sucrose		Minimal/None	None
Mannose + 5% mannitol		Minimal	Minimal
Glucose + 5% mannitol		Minimal	Minimal
Sucrose + 5% mannitol		Minimal	Minimal
Maltose + 5% mannitol		None	Minimal
Lignocaine	2	Marked	Marked
Maltose + 5% mannitol		None	Minimal
Maltose + 5% mannitol	3	None	Minimal

Table 4

Formulation	Erythema	Pain
Lignocaine (control)	Marked	Marked
DS11	Slight	Slight
Sucrose	Minimal	None
Maltose	Minimal	None
Glucose	Minimal	None
Mannose	Minimal	None

CLAIMS

1. A pharmaceutical composition comprising a TGF- β superfamily member and a sugar provided at sufficient concentration to allow improved recovery and/or increased biological activity of the TGF- β superfamily member.
2. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the sugar is selected from the group comprising maltose, sucrose, glucose and mannose.
3. The pharmaceutical composition of claim 2, wherein the sugar is maltose.
4. The pharmaceutical composition of claim 2, wherein the sugar is selected from the group comprising glucose and mannose.
5. The pharmaceutical composition of any preceding claim, wherein the sugar is present at a concentration of greater than 50mg/ml.
6. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the sugar is present at a concentration of between 51 and 200mg/ml.
7. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the sugar is present at a concentration of between 60 and 150mg/ml.
8. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the sugar is present at a concentration of between 70 and 100mg/ml.
9. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the sugar is present at a concentration of between 80 and 95mg/ml.
10. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the sugar is present at a concentration of between 85 and 90mg/ml.

11. A soluble pharmaceutical composition comprising a TGF- β superfamily member and a sugar, wherein the sugar is provided in such a proportion that, on dissolution of the composition to achieve a physiological solution, the sugar is provided at sufficient concentration to allow improved recovery and/or increased biological activity of the TGF- β superfamily member.
12. A soluble composition according to claim 11, wherein the sugar is provided in such a proportion that on dissolution of the composition to achieve a physiological solution the concentration of the sugar is greater than 50mg/ml.
13. A soluble pharmaceutical composition comprising a TGF- β superfamily member, a source of sodium ions, and a sugar, the quantities of the source of sodium ions and of the sugar being such that on dissolution of the composition to produce a sodium concentration of between 130 and 160 mEq/L, the concentration of the sugar is sufficient to allow improved recovery and/or increased biological activity of the TGF- β superfamily member.
14. A soluble composition according to claim 13, wherein the quantities of the source of sodium ions and of the sugar are such that on dissolution of the composition to produce a sodium concentration of between 130 and 160 mEq/L the concentration of the sugar is greater than 50mg/ml.
15. The pharmaceutical composition of any preceding claim, wherein the TGF- β superfamily member is selected from the group comprising TGF- β_1 , TGF- β_2 and TGF- β_3 .
16. The pharmaceutical composition of claim 15, wherein the TGF- β superfamily member is TGF- β_3 .
17. The pharmaceutical composition of any preceding claim wherein the composition is for use in wound healing.

18. The pharmaceutical composition of claim 17, wherein the composition is for use to promote wound healing and/or to prevent or inhibit scar formation.
19. The pharmaceutical composition of any preceding claim wherein the composition is formulated for administration by injection.
20. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the composition is formulated for administration by intradermal injection.
21. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the composition is formulated for administration by subcutaneous injection.
22. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the composition is formulated for administration by intravenous injection.
23. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the composition is formulated for administration by intramuscular injection.
24. The pharmaceutical composition of any preceding claim, wherein the composition is formulated for administration as an intraperitoneal instillate.
25. The pharmaceutical composition of any preceding claim, wherein the composition is formulated for administration as an eye drop.
26. The pharmaceutical composition of any preceding claim, wherein the composition is formulated for administration via a stent.
27. The pharmaceutical composition of any preceding claim, wherein the composition is formulated for administration by a slow release vehicle.
28. The pharmaceutical composition of any preceding claim, wherein the composition comprises a thickening agent.

29. The pharmaceutical composition of any preceding claim, wherein the composition comprises a thixotropic agent.
30. A pre-filled container comprising a pharmaceutical composition in accordance with any of claims 1 to 29.
31. The pre-filled container of claim 30, wherein the container is a syringe.
32. The pre-filled container of claim 30, wherein the container is a vial.
33. A method of treatment comprising administering to an individual in need of the therapeutic activity of a TGF- β superfamily member a therapeutic amount of a composition according to any of claims 1 to 29.
34. A method of promoting wound healing and/or inhibiting scar formation, the method comprising administering to a patient in need of such promotion and/or inhibition a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition according to any of claims 1 to 29.
35. The use of a sugar for improving the recovery and/or increasing the biological activity of a TGF- β superfamily member incorporated in a pharmaceutical composition
36. The use according to claim 35, wherein the sugar is selected from the group consisting of maltose, sucrose, glucose and mannose.
37. The use according to claim 36, wherein the sugar is maltose.
38. The use according to any one of claims 35 to 37, wherein the sugar is present at a concentration of greater than 50 mg/ml.

39. The use according to any one of claims 35 to 38, wherein the TGF- β superfamily member is selected from the group consisting of TGF- β_1 , TGF- β_2 and TGF- β_3 .
40. The use according to claim 39, wherein the TGF- β superfamily member is TGF- β_3 .
41. The use of a sugar in the manufacture of a medicament for the prevention or reduction of injection pain.
42. The use according to claim 41, wherein the sugar is selected from the group comprising maltose, sucrose, glucose and mannose.
43. The use according to claim 42, wherein the sugar is maltose.
44. The use according to any one of claims 41 to 43, wherein the sugar is provided at a concentration of greater than 50mg/ml.
45. The use according to any one of claims 41 to 44 for the manufacture of an injectable medicament.
46. The use according to any one of claims 41 to 45 wherein the medicament further comprises a therapeutic active agent.
47. The use according to claim 46, wherein the medicament comprises a therapeutic active agent able to promote wound healing.
48. The use according to claim 46 or claim 47, wherein the medicament comprises a therapeutic active agent able to reduce scarring.
49. The use according to any one of claims 46 to 48, wherein the therapeutic active agent comprises a TGF- β superfamily member.

50. The use according to claim 49, wherein the TGF- β superfamily member is selected from the group comprising TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3.

51. The use according to claim 50, wherein the TGF- β superfamily member is TGF- β 3.

52. The use according to any one of claims 41 to 51, wherein the medicament further comprises an anaesthetic active agent.

53. The use according to claim 52, wherein the anaesthetic active agent is an injectable local anaesthetic.

54. The use according to claim 53, wherein the medicament further comprises lignocaine.

55. The use according to any one of claims 41 to 54, wherein the medicament further comprises a cosmetic active agent.

56. The use according to any one of claims 41 to 55, wherein the medicament further comprises a diagnostic active agent.

Figure 1

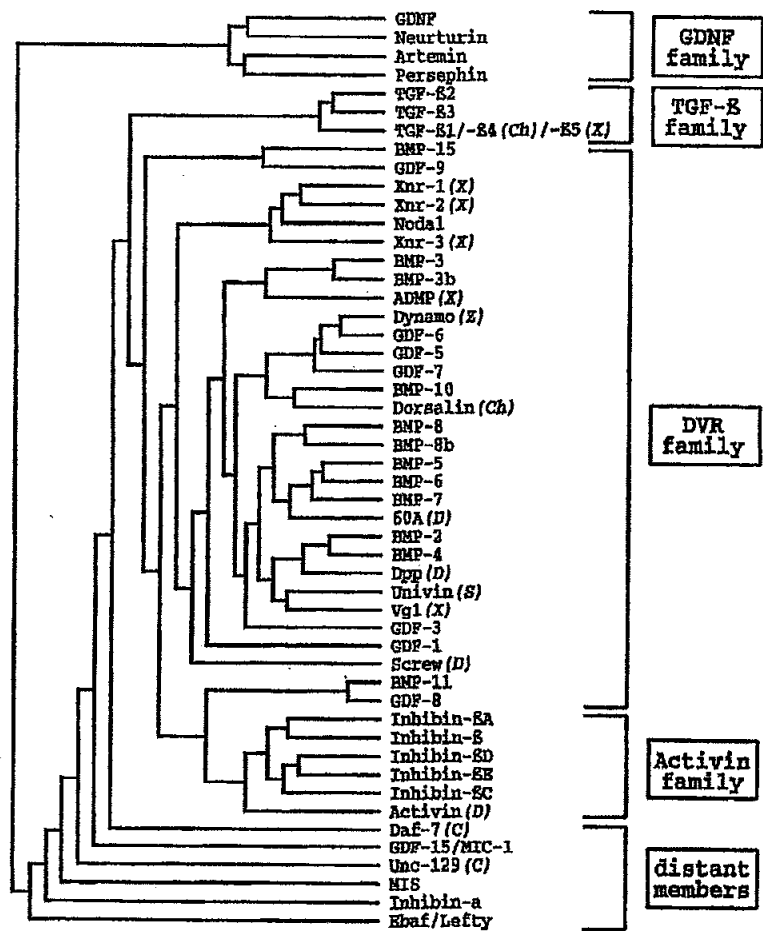


Figure 2.**TGF-Beta 1 (Sequence ID No. 1)**

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT
QYSKVLALYNQHNPASAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

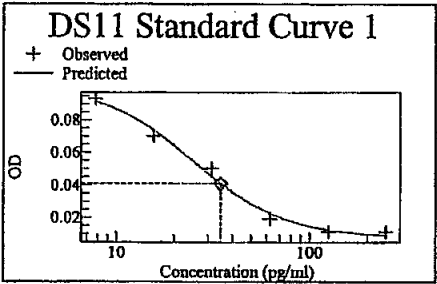
TGF-Beta 2 (Sequence ID No. 2)

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDT
QHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS

TGF-Beta 3 (Sequence ID No. 3)

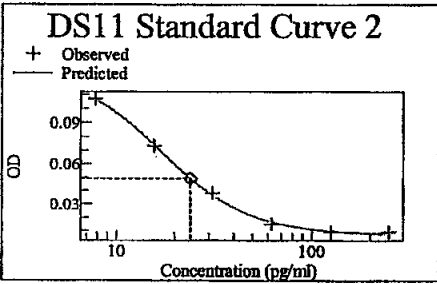
ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSKCS

Figure 3



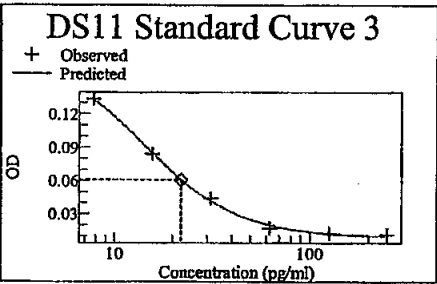
3A

$IC_{50} = 34.793\text{pg/mL}$



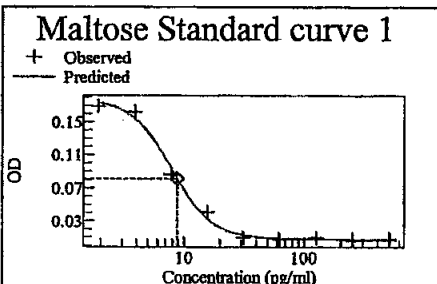
3B

$IC_{50} = 24.136\text{pg/mL}$



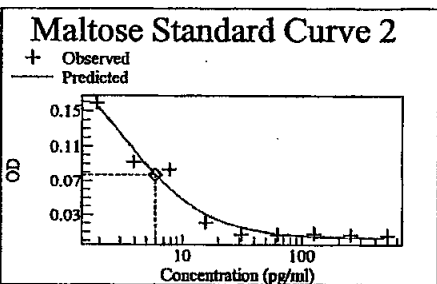
3C

$IC_{50} = 22.055\text{pg/mL}$



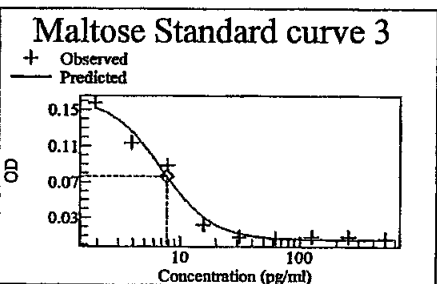
3F

$IC_{50} = 8.758\text{pg/mL}$



3G

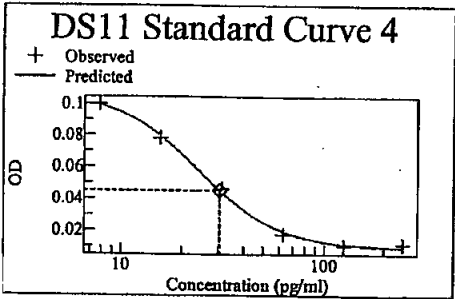
$IC_{50} = 5.957\text{pg/mL}$



3H

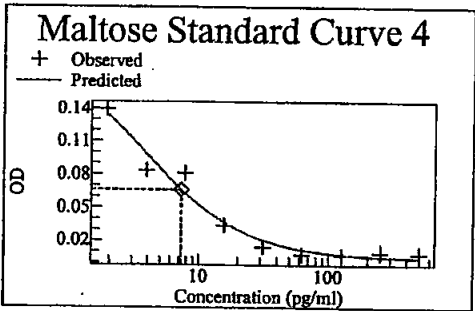
$IC_{50} = 7.72\text{pg/mL}$

Figure 3 continued



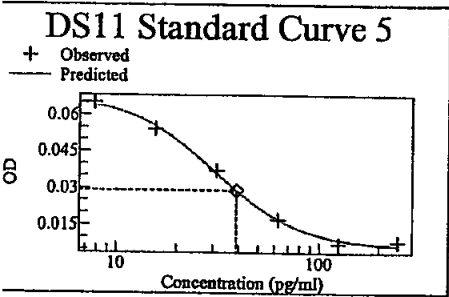
IC₅₀ = 30.562pg/mL

3D



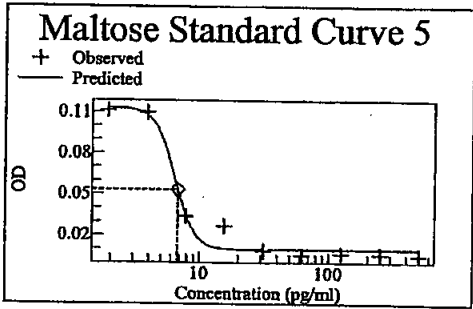
IC₅₀ = 7.31pg/mL

3I



IC₅₀ = 38.973pg/mL

3E



IC₅₀ = 6.798pg/mL

3J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/002574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/18 A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93/10758 A (PITMAN MOORE INC [US]) 10 June 1993 (1993-06-10) *cf. page 4, line 20 bridging with page 5, line 29, page 6, lines 16-34, claims 1,8 and 15*	1-29
X	WO 01/48147 A1 (ISO TIS N V [NL]; BRUIJN JOOST DICK DE [NL]; TIBBE GERHARDUS JOHANNES) 5 July 2001 (2001-07-05) *cf. abstract, page 3, line 21 extending to page 4, line 7, page 5, lines 23-30, claims 1,3, 6 and 7* ----- -/--	1-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 March 2007

Date of mailing of the international search report

19/06/2007

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stoltner, Anton

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/002574

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/04681 A (GENZYME CORP [US]; MCPHERSON JOHN M [US]; YAEGER PETER C [US]; BROWN M) 5 February 1998 (1998-02-05) *cf. abstract, page 3, last para. bridging with page 4, line 7, page 6, 2nd para. including table 2 on pages 7-10, claims 1,3, 15,18 and 19* -----	1-29

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 33 and 34 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

Present claims 1-40 relate to compositions having a given desired property or effect, namely a "TGF-beta superfamily member" and a sugar, allowing for an "improved recovery and/or increased biological activity of the TGF-beta superfamily member". However, the description does not provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for any such compositions having the said property or effect and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of the claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.20).

The search of claims 1-40 was consequently restricted to the specifically disclosed compositions having the desired property or effect, see description pages 53/54.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2006/002574

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: -
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 33 and 34 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: -
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see annex

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-29

A pharmaceutical composition comprising a TGF-beta superfamily member and a sugar.

2. claims: 30-32

A prefilled container comprising a pharmaceutical composition according to the preceding claims.

3. claims: 33,34

A method of treatment comprising administering a composition according to the preceding claims.

4. claims: 35-40

The use of a sugar for improving recovery and/or increasing the biological activity of a TGF-beta superfamily member incorporated in a pharmaceutical composition.

5. claims: 41-56

The use of a sugar in the manufacture of a medicament for the prevention or reduction of injection pain.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2006/002574

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9310758	A	10-06-1993	AT 140620 T	15-08-1996
			AU 3125193 A	28-06-1993
			CA 2125148 A1	10-06-1993
			CN 1072861 A	09-06-1993
			DE 69212497 D1	29-08-1996
			DE 69212497 T2	12-12-1996
			DK 615438 T3	11-11-1996
			EP 0615438 A1	21-09-1994
			ES 2090714 T3	16-10-1996
			US 5356635 A	18-10-1994
WO 0148147	A1	05-07-2001	AT 264385 T	15-04-2004
			AU 780653 B2	07-04-2005
			AU 3246101 A	09-07-2001
			CA 2395271 A1	05-07-2001
			DE 60009956 D1	19-05-2004
			DE 60009956 T2	28-04-2005
			DK 1242578 T3	26-07-2004
			ES 2217031 T3	01-11-2004
			JP 2003518378 T	10-06-2003
			TR 200401091 T4	21-06-2004
			US 2003017588 A1	23-01-2003
WO 9804681	A	05-02-1998	AU 730749 B2	15-03-2001
			AU 3740197 A	20-02-1998
			CA 2261292 A1	05-02-1998
			EP 0920490 A2	09-06-1999
			JP 3638614 B2	13-04-2005
			JP 2000515023 T	14-11-2000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-008623- -00000-0000

Fecha: 2008-01-30 10:41:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 139



Industria y Comercio
PERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL

☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO

☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M Nava Cortes

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN

REFERENCIA	Radicación No.	8 8623
	Solicitud internacional	PCT/GB2006/002574
	Fecha inicio fase nacional	12/02/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2715

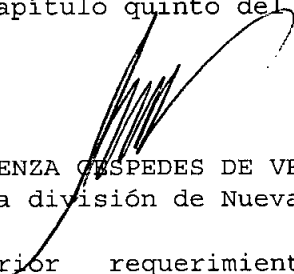
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión de derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuer persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA OSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 22 FEB. 2008
adpall