



Industria y Comercio

Organización CSA Ltda

QF

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

08-7818

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TÍTULO**

PROMOCIÓN DE LA REGENERACIÓN EPITELIAL

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

A61K 38/18; A61L 27/60;
A61L 27/54; A61L 26/00

71. **SOLICITANTE**

RENOVO LIMITED

DOMICILIO

Manchester, Inglaterra, Reino Unido

74. **APODERADO**

GERMAN CASTILLO GRAU

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

(FORMA P-10)

5-5

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-007818- -00000-0000

Fecha: 2008-01-28 15:53:02 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒

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;

Dirección Renovo Ltd, Incubator Building, 48 Grafton Street

Nacionalidad o Domicilio: Manchester, Inglaterra, Reino Unido

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2006/002577 Fecha: Julio 12, 2006

Publicación Internacional No. WO 2007/007098 A3 Fecha: Enero 18, 2007

6

Título (54) PROMOCIÓN DE LA REGENERACIÓN EPITELIAL

7

Clasificación Internacional (51) A61K 38/18; A61L 27/60; A61L 27/54; A61L 26/00

8

Prioridad

Si

☒

No

☐

(33) País de origen
Gran Bretaña

(32) Fecha

Julio 12, 2005

(31) Número de Solicitud

0514262.5

9

Comprobante de pago N°:

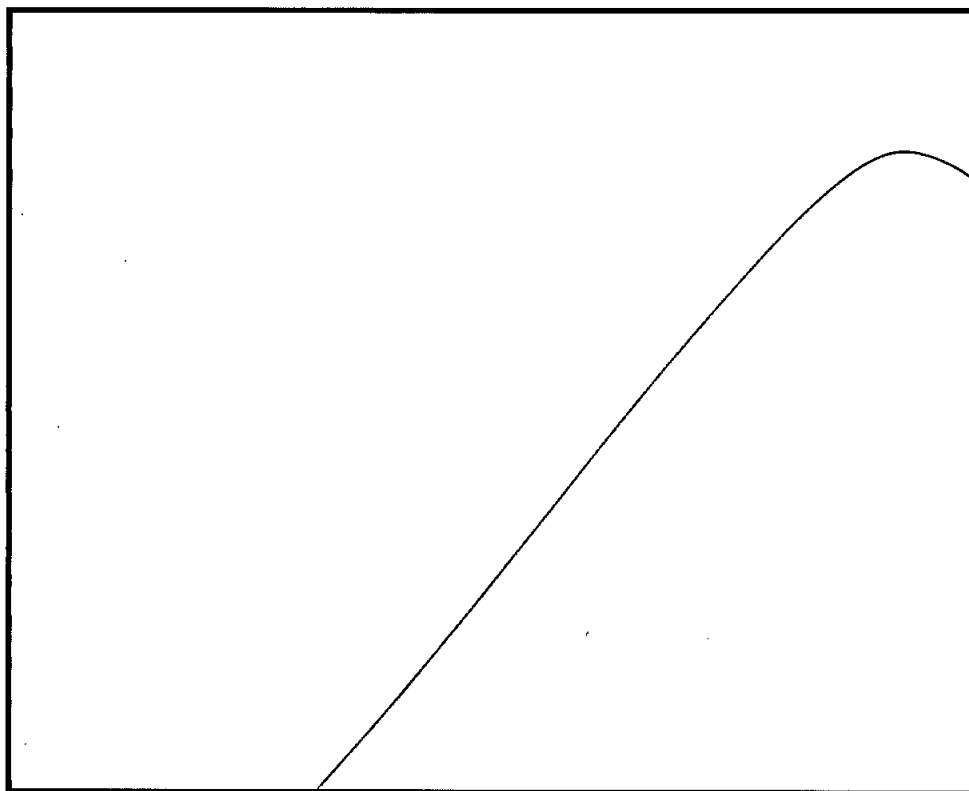
7309

Fecha:

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

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite 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

FIGURA CARACTERISTICA



Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA: _____

C.C. 17.017.671
de BogotáT.P. 2.978
del C.S.J.

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-007818- -00000-0000

Fecha: 2008-01-28 15:53:02

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 113

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 7,309
FECHA : ENERO 28 DE 2008

***** 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. _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

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

.(21)	No. SOLICITUD		.(51)	INT.CL:	A61K 38/18; A61L 27/60; A61L 27/54; A61L 26/00
.(22)	FECHA DE PRESENTACION		.(71)	SOLICITANTE:	RENOVO LIMITED
.(30)	PRIORIDAD				
.(31)	No. DE SOLICITUD	0514262.5	.(72)	INVENTOR(ES):	
.(32)	FECHA DE PRESENTACION	Julio 12, 2005			Mark Ferguson Sharon O'Kane Hugh Lavery Nick Occleston
.(33)	PAIS	Gran Bretaña	.(74)	APODERADO:	GERMAN CASTILLO GRAU

.(54) TITULO: PROMOCIÓN DE LA REGENERACIÓN EPITELIAL

.(57) RESUMEN

Conforme a un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un agente que tiene actividad TGF- β_3 en la manufactura de un medicamento para la promoción de la regeneración epitelial.

El agente que tiene actividad TGF- β_3 de preferencia se puede seleccionar de entre el grupo compuesto por TGF- β_3 , fragmentos biológicamente activos, variantes y derivados del TGF- β_3 , y sustancias capaces de promover o imitar la actividad biológica del TGF- β_3 .

Se puede entender que la promoción de la regeneración epitelial dentro del contexto de la presente invención abarca cualquier incremento en la velocidad de regeneración epitelial comparada con la regeneración que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar.

6

PROMOCIÓN DE LA REGENERACIÓN EPITELIAL

La presente invención tiene relación con la manufactura de medicamentos para la promoción de la regeneración epitelial. También proporciona un método de promoción de la regeneración epitelial en un individuo que tiene la necesidad de dicha promoción.

El organismo comprende muchos tipos diferentes de epitelios, cuyas estructuras y complejidad varían dependiendo de su localización, rol y función.

La forma más básica de epitelio es el epitelio simple, que comprende una sola capa de células epiteliales. Un ejemplo de una forma de epitelio simple es el epitelio escamoso simple, el cual comprende una sola capa de células planas semejantes a escamas. Algunos ejemplos de epitelios escamosos simples en el organismo incluyen mesotelio, endotelio, y el revestimiento de los alvéolos pulmonares.

Otra forma común de epitelio es el epitelio estratificado. Éste comprende una serie de capas, y las células de diferentes capas pueden variar en tamaño, forma y función. Los epitelios estratificados se pueden caracterizar además haciendo referencia al tipo de células situadas en su superficie.

Por ejemplo, los epitelios escamosos estratificados tienen células similares a escamas (escamoso) situadas en su superficie. La forma de las células que componen los epitelios escamosos estratificados puede variar en las diferentes localizaciones dentro del epitelio. Aunque las células situadas en la capa superficial del epitelio generalmente tienen una conformación aplanada parecida a escamas, las que se sitúan en la base del epitelio pueden tender a tener una forma poliédrica. Las células epiteliales pueden estar fortificadas estructuralmente por la presencia de queratina, y la cantidad presente de esta molécula tiende a aumentar al aumentar la altura de los epitelios. Los epitelios escamosos estratificados suelen estar compuestos por varias capas de células que contienen queratina. Los tipos de molécula de queratina presente pueden variar tanto de acuerdo a la capa celular como al lugar del cuerpo.

El más prominente de los epitelios del organismo es la epidermis, la capa de epitelio escamoso estratificado que cubre la piel. La epidermis, en virtud de su localización, es el tejido que con mayor frecuencia entra en contacto con el ambiente externo, y como resultado es el tejido que con más frecuencia se expone a daños ambientales y de otro tipo.

Otros ejemplos de epitelios estratificados incluyen epitelios cilíndricos estratificados, y epitelios cilíndricos estratificados ciliados, en los cuales las células de la capa más superficial tienen forma de columna y están provistas de cilios móviles.

Los epitelios de todo el organismo están sujetos a muchas formas diferentes del daño. Dicho daño puede deteriorar o destruir por completo la función de los epitelios lesionados, y el desenlace de dicho daño depende de la naturaleza y el papel que desempeña el epitelio afectado. Según esto, la promoción de la regeneración epitelial resulta provechosa en muchos contextos diferentes. Sin embargo, a pesar de lo deseable que resulta la promoción de la regeneración epitelial, sigue habiendo la necesidad de más medicamentos y métodos más efectivos con los cuales se puede lograr la promoción de la regeneración.

El grado de variación en la gama de terapias que se usan en la actualidad para promover la regeneración epitelial es significativo. por ejemplo, el manejo de sitios donantes de injertos de piel de espesor parcial (revisado por Rakel et al. 1998) puede sencillamente implicar dejar el sitio donante de injerto expuesto y sin tratar, o puede como alternativa hacer uso de tratamientos como la aplicación de vendajes (típicamente vendajes de gasa, los cuales se pueden usar solos o impregnados con diversos agentes antiinfecciosos, alginatos, hidrocoloides, membranas de compuestos sintéticos, películas transparentes o miel), aplicación de piel artificial (la cual se puede generar a partir de la propia epidermis del individuo), aplicación de aloinjertos (típicamente aloinjertos bovinos o porcinos) o aplicación de pomadas (típicamente pomadas que contienen compuestos a base de plata como agentes antiinfecciosos).

Esta falta de una sola terapia universalmente aceptada indica la necesidad de métodos novedosos para promover la regeneración epitelial. Además, es bien sabido que existen muchos defectos y desventajas asociados con las terapias actuales.

Los efectos adversos que se asocian con los tratamientos actuales incluyen tiempos de cicatrización prolongados en los sitios donantes y receptores de injertos, el desarrollo de epitelio de reemplazo que puede ser más grueso o más delgado que el que originalmente estaba presente, aumento de las tasas de infección, edema y eritema, cicatrices hipertróficas alrededor del sitio tratado, riesgo de infección con priones o virus por el material del aloinjerto, el tiempo que toma generar el tratamiento (en el caso de la piel artificial que se genera a partir de las propias células del paciente) y dolor asociado con los sitios donante y receptor.

Uno de los objetos de la presente invención es proporcionar nuevos medicamentos para la promoción de la regeneración epitelial que superen por lo menos algunas de las desventajas asociadas con el estado de la técnica.

N

Conforme a un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un agente que tiene actividad TGF- β ₃ en la manufactura de un medicamento para la promoción de la regeneración epitelial.

El agente que tiene actividad TGF- β ₃ de preferencia se puede seleccionar de entre el grupo compuesto por TGF- β ₃, fragmentos biológicamente activos, variantes y derivados del TGF- β ₃, y sustancias capaces de promover o imitar la actividad biológica del TGF- β ₃.

Se puede entender que la promoción de la regeneración epitelial dentro del contexto de la presente invención abarca cualquier incremento en la velocidad de regeneración epitelial comparada con la regeneración que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar.

La velocidad de regeneración epitelial que se alcanza con métodos de conformidad con la invención se puede comparar fácilmente con la que tiene lugar en epitelios de control tratados o sin tratar usando cualquier modelo idóneo de regeneración epitelial conocido del estado de la técnica. Por ejemplo, la velocidad a la cual se regeneran los sitios del daño epitelial experimental que tienen áreas conocidas se puede comparar usando modelos *in vivo* bien conocidos en ratones, ratas, conejos o cerdos como los que se describen en Tomlinson y Ferguson (2003), Davidson et al. (1991) y Padock et al (2003).

De conformidad con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método de promoción de la regeneración epitelial, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que tiene actividad TGF- β ₃ a un sujeto que tiene la necesidad de dicha promoción.

En relación con este aspecto de la invención una "cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que tiene actividad TGF- β ₃" es una cantidad de un agente que tiene actividad TGF- β ₃, que es suficiente para promover la regeneración epitelial en el sujeto al cual se le administra la cantidad.

Como se anotó arriba, los epitelios, y en especial la epidermis, sufren encuentros más directos, frecuentes y nocivos con el ambiente externo que cualquier otro tejido en el organismo. Por tanto, es altamente deseable que la reparación y la renovación de tejidos epiteliales, como la epidermis, puedan ser influenciadas con el fin de asegurar su máxima eficacia funcional. En efecto, aunque los métodos y medicamentos de la invención son adecuados para la promoción de la regeneración epitelial en todos los tipos de epitelios, y han sido probados con buen efecto en todos los epitelios examinados, la promoción de la regeneración epidérmica constituye una aplicación en especial preferida de la invención. Otras versiones preferidas de la invención incluyen la promoción de la regeneración del epitelio escamoso, o la promoción de la regeneración del epitelio queratinizado. Se

8

apreciará que los métodos y medicamentos de la invención pueden ser de provecho para la epidermis que cubre el cuero cabelludo.

La promoción de la regeneración epitelial de conformidad con la invención es capaz de suscitar la formación de una barrera epitelial funcional sobre áreas previamente dañadas o denudadas. La barrera epitelial formada es capaz de prevenir el ingreso y la colonización del tejido subyacente por patógenos como bacterias, hongos y virus. Así, la promoción de la regeneración epitelial puede proporcionar beneficios en contextos en los cuales resulta deseable prevenir o reducir la infección en sitios donde la capa epitelial ha sido vulnerada.

La presencia de una capa epitelial intacta también obra como una barrera contra el paso de fluidos, y por tanto es capaz de prevenir desecación de los tejidos subyacentes. Así, la promoción de la regeneración epitelial es capaz de prevenir o reducir la desecación de los tejidos que surge como resultado de la pérdida de fluido a través de una capa epitelial dañada o de otra forma vulnerada.

La presente invención se basa en el muy sorprendente hallazgo de que la regeneración epitelial puede ser estimulada por la provisión de la citocina TGF- β_3 o un agente que comparta la actividad biológica característica del TGF- β_3 . Ya antes se había pensado que el TGF- β s (que existe en tres isoformas en los mamíferos, TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3) inhibe la regeneración epitelial.

Se han informado los efectos inhibitorios del TGF- β sobre la regeneración epitelial con base en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios de los efectos de las isoformas del TGF-en queratinocitos en cultivo (células epiteliales cutáneas) han sugerido que, aunque el tratamiento con TGF- β aumenta la expresión de integrinas de los queratinocitos asociadas con la migración, la velocidad de proliferación de los queratinocitos, que es necesaria para la regeneración epidérmica, está considerablemente reducida. También se ha informado de la inhibición de la proliferación de las células epiteliales mediada por TGF- β requerida para la regeneración epitelial en estudios *in vivo*.

Aunque los efectos inhibitorios informados del TGF- β se observan en todas las isoformas, existen diferencias en las potencias relativas de las diferentes isoformas. Los estudios han demostrado que el TGF- β_3 es la más potente de las isoformas en su capacidad de inhibir la síntesis del ADN y la proliferación en cultivos primarios de queratinocitos humanos, lo cual trae consigo una inhibición más fuerte que TGF- β_1 o TGF- β_2 .

Además de los estudios en que se usaron células cultivadas, recientemente se han emprendido numerosos estudios *in vivo* que utilizan compuestos o tecnologías genéticas específicas para interrumpir la vía de señales del TGF- β . Estos estudios además han sugerido que los TGF- β s, y en especial el TGF- β_3 , inhiben la regeneración epitelial.

9

En contraposición con los informes publicados previamente, los inventores de la presente solicitud han descubierto ahora que la aplicación de un agente que tiene actividad TGF- β 3 a un tejido epitelial antes o después del daño sufrido por dicho tejido es capaz de promover la regeneración de la capa epitelial, en lugar de inhibir dicha regeneración. Sin desear quedar limitados por cualquier hipótesis los inventores creen que la promoción de la regeneración epitelial es lograda por la promoción de migración de células epiteliales mediada por el TGF- β 3. Las células epiteliales (cuya migración ha sido promovida) son por tanto capaces de repoblar y regenerar el epitelio dañado más rápidamente de lo que sucede en ausencia de agentes que tienen actividad TGF- β 3.

Se apreciará que la promoción de la regeneración epitelial de conformidad con la invención puede ser útil para inducir reepitelización efectiva en contextos en los cuales la invención puede ser de provecho en casos en los cuales la respuesta de reepitelización está deteriorada, inhibida, retardada o de otra manera es defectuosa. Sin embargo, se prefiere en especial que los métodos y medicamentos de la invención que se usan en la promoción de la regeneración epitelial también puedan tener el efecto de acelerar la velocidad de las respuestas normales de regeneración epitelial en pacientes que han sufrido daño epitelial.

Existen muchos contextos en los cuales la respuesta de reepitelización del organismo puede ser defectuosa. Por ejemplo, la reepitelización defectuosa de la piel se asocia con padecimientos como pénfigo, enfermedad de Hailey-Hailey (pénfigo benigno familiar), necrosis epidérmica tóxica (TEN)/síndrome de Lyell, epidermolisis bullosa, leishmaniasis cutánea y queratosis actínica. La reepitelización defectuosa de los pulmones se puede asociar con fibrosis pulmonar idiopática (IPF) o enfermedad intersticial del pulmón. La reepitelización defectuosa del ojo se puede asociar con afecciones como deficiencia parcial de células madre del limbo o erosiones de la córnea. La reepitelización defectuosa del tracto gastrointestinal o el colon se puede asociar con afecciones como fisuras anales crónicas (fisuras en el ano), colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn, y otros trastornos inflamatorios del intestino.

El proceso de reepitelización en respuesta a lesiones dérmicas también puede verse perturbado en muchos individuos. Por ejemplo, es bien sabido que las lesiones dérmicas en ancianos exhiben una regeneración epitelial menos vigorosa que en los individuos más jóvenes. También existen otras muchas afecciones o trastornos que se asocian con retardo u otro deterioro de la regeneración epitelial en respuesta a la lesión. Por ejemplo, los pacientes aquejados de diabetes, los pacientes con polifarmacia (por ejemplo, como resultado de la edad avanzada), las mujeres posmenopáusicas, los pacientes susceptibles a lesiones por compresión (por ejemplo, los parapléjicos), los pacientes con enfermedad

10

venosa, los pacientes clínicamente obesos, los pacientes que reciben quimioterapia, los pacientes que reciben radioterapia, pacientes que reciben tratamiento con esteroides o los pacientes inmunocomprometidos pueden sufrir de un deterioro de la regeneración epitelial. En muchos de estos casos la falta de una respuesta apropiada de regeneración epitelial contribuye a la aparición de infecciones en el sitio de la herida, y un retardo de la respuesta normal de cicatrización de la herida que puede conducir a la formación de lesiones crónicas como úlceras. Según esto, se apreciará que la promoción de la regeneración epitelial con los métodos o medicamentos de la invención será de provecho para estos pacientes.

Sin apartarse de lo anterior, generalmente se preferirá que la promoción de la regeneración epitelial de conformidad con la invención se pueda efectuar con el fin de acrecentar una respuesta de reepitelización en curso (es decir, para producir una mayor respuesta máxima de regeneración epitelial de la que normalmente sería alcanzada sin promoción). Se apreciará que de esta forma se puede inducir una regeneración más rápida en los sitios del daño epitelial que se presentan en sujetos por lo demás sanos.

Se han hecho grandes esfuerzos experimentales e investigativos en la identificación y desarrollo de agentes y técnicas terapéuticas que se puedan usar para promover la regeneración epitelial en personas en las cuales la respuesta de reepitelización está comprometida. Sin embargo, el grupo de pacientes que no tiene un deterioro de la reepitelización constituye un número mayor de la población total cubierta por los servicios de atención médica, y una proporción mucho mayor de la población trabajadora. Por tanto, la persona versada en la técnica apreciará de inmediato que la sociedad puede obtener un gran beneficio del desarrollo de agentes y técnicas terapéuticas que puedan solventar las necesidades de estos pacientes por lo demás sanos. Según esto, la promoción de la regeneración epitelial en pacientes sanos es una versión preferida de todos los aspectos de la presente invención. La promoción de la reepitelización de heridas agudas (en oposición a lesiones crónicas) también es una versión preferida de todos los aspectos de la invención.

Para efectos de la presente invención, una herida crónica se puede definir como cualquier herida que no muestra ninguna tendencia hacia la curación tendencia pasadas ocho semanas de su formación estando sujeta a medidas terapéuticas adecuadas (convencionales). Las heridas agudas pueden ser aquellas heridas diferentes de las heridas crónicas. De preferencia, las heridas agudas pueden ser heridas incisionales, de las cuales las incisiones quirúrgicas pueden ser un grupo en especial preferido.

Los epitelios, como la epidermis o el epitelio corneal, pueden ser objeto de daños como a resultado de muchos tipos diferentes de agresión. Por ejemplo, los epitelios pueden resultar lesionados como resultado de agresiones o lesiones físicas, que incluyen rasguños,

abrasiones, heridas (tanto las penetrantes como las no penetrantes), incisiones quirúrgicas, y otros procedimientos quirúrgicos (en especial injertos de espesor parcial de tejidos como la piel), “quemaduras” (las cuales, excepto cuando el contexto implique otra cosa, se considera que incluyen daños tisulares como resultado de la exposición a temperaturas altas o bajas, agentes químicos o radiación), y otras formas de trauma.

Los inventores han encontrado que los medicamentos y métodos de la invención son especialmente efectivos para la promoción de la regeneración epitelial en respuesta a lesiones. Éstas se ejemplifican, de forma especialmente beneficiosa, por lesiones de la piel, en las cuales la epidermis resulta vulnerada. Sin embargo, se apreciará que los métodos de la invención también se pueden aplicar a otros tipos de lesiones y heridas incluidas lesiones, daños o traumas de los epitelios como los epitelios respiratorios, o de los que rodean a los tejidos u órganos internos. La regeneración de los epitelios que se va a promover puede ser de un epitelio diferente del epitelio digestivo. Por ejemplo, el epitelio puede ser diferente del epitelio intestinal o gastrointestinal.

Se reconoce que el daño epitelial, y en especial daño epidérmico, que resulta de quemaduras se puede extender a grandes áreas de un individuo afectado. Como resultado las quemaduras son especialmente susceptibles a sufrir complicaciones como infección y desecación que surgen a causa de la falta de una capa epitelial funcional. Según esto, la promoción de la regeneración epitelial en respuesta a las quemaduras representa una aplicación preferida de la invención.

La promoción de la regeneración epitelial, por ejemplo en el sitio de lesiones dérmicas, acarrea una rápida mejora en la apariencia cosmética del área lesionada. Las consideraciones cosméticas son importantes en numerosos contextos clínicos, en especial cuando el daño epitelial se presenta en lugares prominentes del cuerpo como la cara, el cuello y las manos. En consecuencia, la promoción de la regeneración epitelial en lugares en los cuales se desea mejorar la apariencia cosmética del área dañada representa una versión preferida de la invención.

El daño de los epitelios también puede surgir como resultado de la acción de patógenos (como bacterias, hongos, o virus), agresiones químicas (como quemaduras químicas causadas por agentes cáusticos, o a través del efecto de fármacos citotóxicos como los que se usan en la quimioterapia) o como resultado de los daños por radiación (ya sea por radiación en partículas o radiación electromagnética como rayos gamma, rayos ultravioleta, o similares) como los que se presentan en las quemaduras solares. La promoción de la regeneración epitelial usando métodos y medicamentos de conformidad

con la invención se puede usar eficazmente en todos los contextos que se acaban de mencionar.

Se apreciará que muchas de las mismas consideraciones que surgen en relación con el daño epitelial en los seres humanos también pueden suponer un problema en otros animales, en especial los animales veterinarios o domésticos (p.ej., caballos, ganado, perros, gatos etc.). Así, los métodos de la invención también se pueden aplicar a animales diferentes del hombre.

El uso de agentes que tienen actividad TGF- P_3 para promover la regeneración epitelial en respuesta al daño asociado con procedimientos de aplicación de injertos epiteliales representa una versión preferida de la invención. El daño epitelial que sobreviene como resultado de injertos de piel puede suponer un problema clínico, además de las consideraciones cosméticas.

La regeneración epitelial es de provecho tanto en el sitio donante del injerto epitelial, en donde ayuda al restablecimiento de una capa epitelial funcional, y también al el sitio receptor en donde la regeneración es capaz de mejorar y acelerar la integración del tejido injertado. La regeneración epitelial en sitios receptores de injerto también es de provecho en el caso de injertos en que se usa piel, piel artificial, o sustitutos de la piel.

La promoción de la regeneración epitelial en el sitio donante del injerto epitelial disminuye el tiempo que se necesita para restablecer la capa epitelial funcional, y por consiguiente reduce el potencial de infección en el sitio donante. La promoción de la regeneración epitelial también disminuye la incidencia de aparición de ampollas y daño tisular que de otra forma se podrían presentar en el sitio donante.

Se prefiere que los injertos epiteliales sean injertos epidérmicos (de piel). Los métodos y medicamentos de la invención tienen utilidad en la promoción de la regeneración epitelial en los contextos tanto de los injertos de piel de espesor total como en los de espesor parcial. Dichos injertos de piel (es decir, los injertos de espesor total o parcial) pueden tener o no una malla.

Los inventores han encontrado que la presencia o ausencia de una capa epitelial intacta también es un factor que contribuye a determinar el grado de dolor asociado con lugares en los cuales el epitelio ha sufrido daños o ha sido extirpado, como sitios donantes de piel. Así, con la promoción de la regeneración epitelial en dichos sitios es posible reducir el dolor asociado con, por ejemplo, la obtención de injertos de piel.

Otra ventaja de la promoción de la regeneración epitelial en sitios donantes de epitelio es que esto disminuye el tiempo que tiene que pasar hasta una nueva cosecha de tejido del sitio donante. La nueva cosecha quiere decir la extirpación subsiguiente de más

tejido epitelial de un sitio donante usado previamente. Esto reviste especial importancia en situaciones en las cuales la piel disponible para cosechar la piel es limitada o el área de que se tiene que recoger es grande. Algunos ejemplos de tales situaciones incluyen las ocasiones en las cuales resulta necesario tomar injertos en niños o pacientes que sufren quemaduras que abarcan un alto porcentaje de la superficie corporal.

Según esto, en un tercer aspecto de la invención se proporciona un método para preparar un sitio donante del injerto epitelial para repetición de la cosecha, el cual método comprende administrar en un sitio donante de epitelio que necesita dicha preparación una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que tiene actividad TGF- β 3. En el contexto de este aspecto de la invención una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad de un agente que tiene actividad TGF- β 3 suficiente para promover la regeneración epitelial en grado tal que se puedan tomar otros injertos epiteliales del sitio donante. Se apreciará que la decisión de si un sitio donante se ha regenerado lo suficiente para permitir una nueva cosecha normalmente será tomada por un médico competente, y que dicha persona tendrá acceso a un fondo de orientación, tanto por medio de textos pertinentes como de su propia experiencia, que le indiquen qué tan pronto se puede emprender la nueva cosecha sin el beneficio de la preparación de conformidad con la invención.

Los inventores han encontrado que la promoción de la regeneración epitelial estimulada por agentes que tienen actividad TGF- β 3 se puede efectuar usando el mismo TGF- β 3, fragmentos biológicamente activos, variantes y derivados del TGF- β 3, y sustancias con capacidad de promover o simular la actividad biológica del TGF- β 3. Resulta relativamente fácil identificar fragmentos biológicamente activos, variantes y derivados del TGF- β 3 en virtud de su capacidad de reproducir los efectos del TGF- β 3 *in vivo* o *in vitro*. La actividad TGF- β 3 se puede valorar *in vivo* usando modelos animales adecuados en los cuales la velocidad de regeneración epitelial que tiene lugar en áreas del daño epitelial tratado con compuestos de prueba se puede comparar con la velocidad de regeneración epitelial que tiene lugar en áreas del daño epitelial de control. Los modelos animales adecuados pueden incluir heridas espesor parcial o espesor total de tejidos que contienen una capa epitelial (como la epidermis de la piel).

La persona versada en la técnica apreciará que cuando se valora la velocidad de regeneración epitelial (por ejemplo, con el fin de identificar si se ha promovido o no la regeneración) el parámetro relevante que hay que considerar es el grado de cobertura epitelial alcanzado. Se debe tener cuidado para diferenciar dicha cobertura epitelial de otros factores, como la cantidad de tejido de granulación (u otros materiales como la matriz asociada con la formación del coágulo) presente en una herida. El tejido de granulación de

14

este tipo puede contribuir al cierre de la herida porque llena la solución de continuidad o el lecho de la herida, pero no contribuye a la regeneración epitelial, ya que en esencia está compuesto por tipos epiteliales no celulares. En el caso del análisis de heridas (como heridas de la piel) es posible identificar las células epiteliales en virtud de su morfología aplanada (diferente de los fibroblastos en forma de huso, o las células redondeadas de la respuesta inflamatoria).

La secuencia de aminoácidos del TGF- β_3 humano nativo se proporciona como la Secuencia ID No. 1 a continuación:

ALDTNYCFRN LEENCCVRPL YIDFRQDLGW
KVVHEPKGYY ANFCSGPCPY LRSADTTTHST
VLGLYNTLNP EASASPCCVP QDLEPLTILY
YVGRTPKVEQ LSMVVKSK CS (Secuencia ID No. 1)

El estado de la técnica contiene numerosas variantes del TGF- β_3 que son adecuadas para usarlas en los métodos y medicamentos de la invención. Por ejemplo, EP-A-O 684 260 describe un polipéptido que comprende una forma modificada del TGF- β_3 que tiene actividad biológica adecuada para usarlo de conformidad con la presente invención, así como ácidos nucleicos que los codifican. Las revelaciones de EP-A-O 684 260 representan polipéptidos y ácidos nucleicos preferidos para usar de conformidad con la presente invención.

Las variantes del TGF- β_3 que se pueden usar de conformidad con la invención incluyen proteínas que contienen sustituciones conservadas de aminoácidos que retienen la actividad biológica del TGF- β_3 que se caracteriza por su capacidad para promover la regeneración epitelial. Se prefiere que las sustituciones conservadas sean sustituciones diseñadas para eliminar sitios de división de la proteasa, u otras estructuras peptídicas que pueden estar involucradas en la degradación o depuración del TGF- β_3 . A continuación se dan más detalles de las variantes y derivados del TGF- β_3 que se pueden emplear en los medicamentos y métodos de la invención.

Las variantes apropiadas del TGF- β_3 pueden aquellas en las cuales ciertos de los aminoácidos nativos son reemplazados por aminoácidos que tienen una cadena lateral de propiedades biofísicas similares a las del aminoácido al cual sustituyen, para producir un cambio conservador. Por ejemplo pequeños aminoácidos hidrófobos no polares incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, y metionina. Los aminoácidos grandes hidrófobos no polares incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los

15

aminoácidos básicos de carga positiva (básicos) incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos de carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Otras modificaciones en las secuencias proteicas como las que tienen lugar durante o después de la translación, p.ej., por acetilación, amidación, carboxilación, fosforilación, división proteolítica o unión a un ligando puede proporcionar otras variantes del TGF- β_3 adecuadas para usarlas en los medicamentos y métodos de la invención.

Los derivados del TGF- β_3 adecuados para usar en los métodos y medicamentos de la invención pueden incluir derivados que aumentan o disminuyen la vida media del TGF- β_3 's *in vivo*. Algunos ejemplos de derivados capaces de aumentar la vida media del TGF- β_3 incluyen derivados peptoides del TGF- β_3 , D-aminoácidos derivados del TGF- β_3 , e híbridos péptido-peptóide.

Se apreciará que, dado que el TGF- β_3 y sus fragmentos (así como muchas de las posibles variantes y derivados del mismo) son proteínas o pueden contener componentes peptídico, pueden estar sujetos a degradación por varios medios (como la actividad de proteasa en sistemas biológicos). Tal degradación puede limitar la biodisponibilidad de los polipéptidos y por ende la capacidad de los polipéptidos de cumplir su función biológica. Es amplia la gama de técnicas bien establecidas por las cuales se pueden diseñar y producir derivados peptídicos que tienen mayor estabilidad en contextos biológicos. Dichos derivados peptídicos puede tener una biodisponibilidad mejorada como resultado de un aumento de la resistencia a la degradación mediada por proteasas. De preferencia, un derivado o análogo peptídico idóneo para usar conforme a la invención es más resistente a las proteasas que el péptido del cual se deriva.

De preferencia, se puede hacer que el TGF- β_3 , sus variantes o fragmentos sean más resistentes a las proteasas mediante la protección del N o del C terminal. Por ejemplo, el N terminal puede ser protegido por un grupo acetilo. El C terminal puede ser protegido un grupo amida.

La resistencia a las proteasas de un derivado del TGF- β_3 se puede comparar con la resistencia a las proteasas del TGF- β_3 mismo por medio de exámenes bien conocidos de degradación de las proteínas descritos en el estado de la técnica.

Los derivados peptoides del TGF- β_3 pueden ser diseñados fácilmente a partir del conocimiento de la estructura del TGF- β_3 . Se puede usar un software comercialmente disponible para desarrollar derivados peptoides conforme protocolos bien establecidos.

Los retropeptoides, (en los cuales todos los aminoácidos son reemplazados por residuos peptoides en orden inverso) también son capaces de imitar las propiedades promotoras de la regeneración epitelial del TGF- β_3 . Se espera que un retropeptóide se una

en dirección opuesta en el surco de enlace de ligandos, comparado con un péptido o híbrido peptoide-péptido que contiene un residuo peptoide. Como resultado, las cadenas laterales de los residuos peptoides son capaces de apuntar en la misma dirección que las cadenas laterales del péptido original.

Las formas del TGF- β_3 con D-aminoácidos constituyen otra versión de un derivado del TGF- β_3 adecuado para usar conformidad con los métodos y medicamentos de la invención. En este caso, el orden de los residuos de aminoácidos del derivado se invierte en comparación con el TGF- β_3 original. La preparación de derivados usando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos disminuye en gran medida cualquier ruptura indeseada de dicho agente por los procesos metabólicos normales, disminuyendo así las cantidades de agente que es preciso administrar, así como la frecuencia de su administración.

Se apreciará que, con el fin de constituir un fragmento, variante o derivado biológicamente activo del TGF- β_3 adecuado para usar de conformidad con los métodos y medicamentos de la invención un fragmento, variante o derivado tiene que retener la actividad promotora de la regeneración epitelial del TGF- β_3 .

El TGF- β_3 (o los fragmentos, variantes, o derivados biológicamente activos del mismo) se pueden proporcionar para usarlos en los métodos o medicamentos de la invención en forma activa o inactiva. Es posible inactivar al TGF- β_3 por cualquiera de varios mecanismos como, por ejemplo, encapsulación. Las cápsulas se pueden degradar por acción de un estímulo externo liberando el agente activo cuando así se requiera. Los estímulos externos adecuados para usar de esta forma incluyen luz UV, ultrasonido, enzimas *in vivo* o calor.

También se puede proporcionar el TGF- β_3 como un precursor inactivo, que se puede activar al entrar en contacto con tejidos que contienen las enzimas divisoras naturales necesarias para convertir al precursor en su forma activa. La secuencia de aminoácidos de un precursor natural del TGF β_3 humano se proporciona como Secuencia ID No. 2 a continuación:

MKMHQLRALV VLALLNFATV SLSLSTCTTL
DFGHIKKRV EAIRGQILSK LRLTSPPEPT
VMTHVPYQVL ALYNSTRELL EEMHGEREEG
CTQENTESEY YAKEIHKFDM IQGLAEHNEL
AVCPKGITSK VFRFNVSSVE KNRTNLFRAE
FRVLRVPNPS SKRNEQRIEL FQILRPDEHI
AKQRYIGGKN LPTRGTAEWL SFDVTDTVRE
WLLRRESNLG LEISIHCPCH TFQPNGDILE

NIHEVMEIKF KGVDNEDDHG RGDLGRLKKQ
KDHHPHLIL MMIPPHRLDN PGQGGQRKKR
ALDTNYCFRN LEENCCVRPL YIDFRQDLGW
KQVHEPKGYY ANFCSGPCPY LRSADTTTST
VLGLYNTLNP EASASPCCVP QDLEPLTILY
YVGRTPKVEQ LSNMWKSCK CS

(Secuencia ID No. 2)

Como alternativa, se puede lograr la inactivación mediante la adición molecular de una molécula de unión. La molécula de unión se puede desprender cuando se requiera por acción de un estímulo externo como luz UV, ultrasonido, enzimas *in vivo* o calor.

Los péptidos idóneos para usar en la producción de TGF- β_3 inactivo son bien conocidos del estado de la técnica, ya que a menudo los TGF- β s son segregados por las células en forma inactiva conocida como TGF- β latente. El TGF- β latente consta de un Péptido Asociado con la Latencia (LAP) N terminal y el TGF- β también recibe el nombre de Complejo Latente Pequeño. Adicionalmente, el Complejo Latente Pequeño se puede unir a otro péptido (derivado de un gen diferente) de tamaño variable denominado Proteína de unión al TGF- β Latente (LTBP) en cuyo caso todo el complejo se llama complejo latente grande de TGF- β .

El TGF- β latente se activa cuando se hace que el TGF- β se disocie del LAP. Esta disociación puede ser coordinada en un receptor de manosa-6-fosfato / Factor II de crecimiento similar a la insulina (M6P-R) e involucra proteasas como plasmina, estando los sustratos asociados a la superficie celular por la transglutaminasa tisular. Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno también pueden activar al TGF- β al causar la disociación del LAP.

La invención también abarca el uso de sustancias capaces de promover o imitar la actividad biológica del TGF- β_3 para la manufactura de un medicamento para la promoción de la regeneración epitelial.

Las sustancias capaces de promover o imitar la actividad biológica del TGF- β_3 pueden lograr su efecto por varios medios. Por ejemplo, dichas sustancias pueden aumentar la expresión del TGF- β_3 o prolongar la vida media del TGF- β_3 , por ejemplo, disminuyendo el recambio del TGF- β_3 . Algunos ejemplos de sustancias capaces de promover o imitar la actividad biológica del TGF- β_3 incluyen sustancias tanto proteináceas como no proteináceas. Por ejemplo, tales sustancias capaces de promover o imitar la actividad biológica del TGF- β_3 incluyen factores de transcripción que regulan la actividad del TGF- β_3 , al activar anticuerpos capaces de imitar la actividad biológica del TGF- β_3 , pequeñas

48

moléculas inorgánicas que reproducen los efectos de unión al receptor del TGF- β_3 , así como sustancias capaces de inducir cascadas de señales intracelulares que conservan las características de las generadas cuando se produce la unión al receptor del TGF- β_3 .

De preferencia, la promoción de la regeneración epitelial puede dar lugar a una velocidad de regeneración epitelial que es por lo menos 5%, 10%, 20% o 30% mayor que la regeneración que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar. Más preferible, la regeneración epitelial promovida puede dar lugar a una velocidad de regeneración epitelial que es por lo menos 40%, 50% o 60% mayor que la regeneración que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar. Todavía más preferido es que la regeneración epitelial promovida puede dar lugar a una velocidad de regeneración epitelial que es por lo menos 70%, 80%, o 90% mayor que la regeneración que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar, y la máxima preferencia es que la regeneración epitelial promovida pueda dar lugar a una velocidad de regeneración epitelial que es por lo menos 100% mayor que la regeneración que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar.

De preferencia, la promoción de la regeneración epitelial pueda dar lugar a un tiempo hasta la reepitelización 1 día, 2 días, o 3 días más rápido que el que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar. Más de preferencia, la regeneración epitelial promovida pueda dar lugar a un tiempo hasta la reepitelización que es por lo menos 4 días, 5 días o 6 días más rápido que el que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar. Todavía más preferido es que la regeneración epitelial promovida pueda dar lugar a un tiempo hasta la reepitelización que es por lo menos 7 días, 8 días o 9 días más rápido que el que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar, y la máxima preferencia es que la regeneración epitelial promovida pueda dar lugar a un tiempo hasta la reepitelización que es por lo menos 10 días más rápido que el que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar.

Con respecto al tiempo hasta la nueva cosecha de epitelio, por ejemplo, de los sitios donantes para injertos de piel de espesor parcial, de preferencia la promoción de la regeneración epitelial pueda dar lugar a un tiempo hasta la nueva cosecha que es 1 día, 2 días, o 3 días más rápido que el que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar. Más de preferencia, la regeneración epitelial promovida pueda dar lugar a un tiempo hasta la nueva cosecha que es por lo menos 4 días, 5 días o 6 días más rápido que el que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar. Todavía más preferido es que la regeneración epitelial promovida pueda dar lugar a un tiempo hasta la nueva cosecha que es por lo menos 7 días, 8 días o 9 días más rápido que el que tiene lugar en un epitelio de

control tratado o sin tratar, y la máxima preferencia es que la regeneración epitelial promovida pueda dar lugar a un tiempo hasta la nueva cosecha que es por lo menos 10 días o más del que tiene lugar en un epitelio de control tratado o sin tratar.

Los medicamentos de conformidad con la invención pueden proporcionar cantidades terapéuticamente efectivas de agentes de conformidad con la invención adecuados para la promoción de la regeneración epitelial. Los inventores han encontrado que tales medicamentos son capaces de promover la regeneración epitelial cuando se administran bien sea antes del daño epitelial, o una vez que dicho daño ya ha tenido lugar.

El uso profiláctico de agentes de conformidad con la invención para promover la regeneración epitelial es un modo preferido de uso de conformidad con la invención. Se apreciará que tal uso es el más adecuado en los casos en los cuales se conocen el momento y la localización del daño epitelial prospectivo como, por ejemplo, el daño que se presenta como resultado de procedimientos electivos, pero el tratamiento previo con agentes de conformidad con la invención también se considera en situaciones en las cuales existe la probabilidad de que sobrevenga un daño epitelial. Los inventores han encontrado que la administración de agentes de conformidad con la invención inmediatamente antes del daño epitelial (es decir, en la hora, o de preferencia media hora que preceden a la aparición del daño) es altamente efectiva, aunque la administración en momentos más tempranos (p.ej., hasta 24 o 48 horas antes del daño epitelial) también es efectiva. El uso profiláctico de usos, métodos y medicamentos de conformidad con la invención es una versión preferida de la invención, y supone una especial preferencia en la preparación de sitios donantes o receptores de injertos de piel.

Los agentes de conformidad con la invención también son efectivos para la promoción de la regeneración epitelial cuando se administran después de que ha sobrevenido el daño epitelial. Se prefiere que tal administración tenga lugar lo más pronto posible después de la iniciación del daño, pero los agentes de conformidad con la invención son capaces de promover la regeneración epitelial en cualquier momento hasta cuando ha tenido lugar el restablecimiento completo del epitelio dañado. Se apreciará que la "ventana" en la cual los agentes de conformidad con la invención pueden ser administrados eficazmente para que puedan promover la regeneración epitelial depende de varios factores, incluidos la naturaleza del epitelio en cuestión (incluida la velocidad natural de reparación del epitelio), el grado del daño que se ha presentado y la extensión del área dañada. Así pues, en el caso un área extensa de daño epitelial, o en el caso del daño de un epitelio que se regenera con lentitud, todavía es posible administrar los agentes de conformidad con la invención con buen efecto relativamente tarde en la respuesta regeneradora. Los agentes de

10

conformidad con la invención, por ejemplo, de preferencia se pueden administrar dentro la primera hora hasta las primeras 24 horas después del daño epitelial, pero todavía pueden alcanzar una promoción beneficiosa de la regeneración epitelial si se administran hasta diez o más días después de la iniciación del daño.

Es posible lograr la promoción de la regeneración epitelial mediante la administración repetida de agentes de conformidad con la invención en sitios de daño epitelial. Por ejemplo, se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de agentes de conformidad con la invención a epitelios dañados el tiempo requerido hasta la regeneración epitelial completa. Por ejemplo, es posible administrar los agentes de conformidad con la invención una o dos veces al día en el sitio del daño epitelial durante por lo menos los primeros tres días que siguen a la iniciación del daño.

La máxima preferencia es que los agentes de conformidad con la invención sean administrados tanto antes como después de la iniciación del daño epitelial. Los inventores han encontrado que la administración de agentes de conformidad con la invención inmediatamente antes del daño epitelial, seguido de la administración diaria de dichos agentes durante los tres días siguientes al daño epitelial, es especialmente eficaz para la promoción de la regeneración epitelial.

Se apreciará que la cantidad de un agente de la invención que se debe aplicar al sitio del daño epitelial depende de varios factores como la actividad biológica y la biodisponibilidad del agente, lo cual a su vez depende del modo de administración y las propiedades fisicoquímicas del agente. Otros factores pueden incluir:

- A) La vida media del agente en el sujeto que se está tratando.
- B) El padecimiento específico que se va a tratar.
- C) La edad del sujeto.

La frecuencia de administración también se verá influenciada por los factores arriba mencionados y en especial por la vida media del agente elegido de la invención en el sujeto que se está tratando.

Generalmente, cuando los agentes de la invención se usan para tratar sitios de daño epitelial existentes se deberá administrar el agente tan pronto como sobrevenga o se diagnostique el daño epitelial. La terapia con agentes de conformidad con la invención debe continuar hasta cuando el epitelio dañado se haya regenerado a satisfacción del médico.

La frecuencia de administración dependerá de la vida media biológica del agente de la invención que se use. Típicamente se deberá administrar una crema o pomada que contienen un agente de la invención a un tejido diana de modo que la concentración del

N

agente en el sitio del daño epitelial se mantenga en un nivel adecuado para que tenga efecto terapéutico. Esto puede requerir la administración una vez o varias veces al día.

Las cantidades terapéuticamente efectivas de agentes de conformidad con la invención como, por ejemplo, en la forma de medicamentos de conformidad con la invención, pueden ser administradas por cualquier vía adecuada capaz de alcanzar el efecto deseado de promoción de la regeneración epitelial, pero de preferencia se puede administrar localmente en los sitios del daño epitelial.

Los inventores han encontrado que la regeneración epitelial puede ser promovida de forma efectiva por la administración de un agente de la invención (en especial TGF- β_3) en forma de inyecciones aplicadas en los sitios del daño epitelial. Por ejemplo, en el caso del daño de la epidermis, el agente de la invención puede ser administrado en inyección intradérmica. Así las cosas, una composición preferida de la invención comprende una solución inyectable de un agente de la invención (p.ej., para inyección alrededor de los bordes de un sitio de daño epitelial o a sitio que probablemente sufra daño). Las formulaciones adecuadas para usar en esta versión de la invención se consideran en el Apéndice que aparece más adelante.

Como alternativa, o además, un agente de la invención también se puede administrar en una forma tópica para promover la regeneración epitelial. Dicha administración puede tener lugar como parte del cuidado inicial o de control del área dañada. Más adelante se dan detalles de formulaciones adecuadas para administración tópica. As formulaciones tópicas se pueden aplicar en inyección sobre la superficie de la herida, en aerosol y también por aplicación sobre la superficie de la herida bajo un vendaje oclusivo o semioclusivo como, p.ej., Opsite, Bioclusive, Tegaderm o similares.

Los inventores encontraron que la promoción de la regeneración epitelial de conformidad con la presente invención mejora de forma especial con la aplicación tópica de un agente de la invención a epitelios dañados (o, en el caso la aplicación profiláctica, a epitelios que van a sufrir daño).

Se prefiere que las composiciones que contienen agentes de conformidad con la invención se formulen de tal manera que adicionalmente contengan un azúcar. El azúcar preferido se puede seleccionar de entre el grupo compuesto por maltosa, manosa, sacarosa y glucosa. En especial se prefiere que el azúcar sea maltosa. El azúcar, como la maltosa, puede estar presente en cantidad suficiente para que la composición sea sustancialmente isotónica en relación con el sitio en el cual se va a administrar la composición.

Los inventores han encontrado que el uso de azúcares como la maltosa en las formulaciones proporciona una mejora marcada y sorprendente tanto en cuanto a la

N
N

cantidad de material activo que se puede recuperar de los vasos que contienen TGF- β_3 (p.ej., jeringas prellenadas) como a la actividad biológica inherente de la molécula de TGF- β_3 . En lo que respecta a la recuperación del material de TGF- β_3 , la formulación con maltosa da lugar a un aumento de 4 veces en el material recuperable (medido por ELISA) comparado con una formulación a base de manitol. En lo que hace a la actividad biológica inherente del TGF- β_3 , la formulación en maltosa da lugar a un incremento de 4 veces en la actividad (IC₅₀ en la prueba de células epiteliales de pulmón de visón de 7,309 [$\pm$ 1,044] pg/mL) comparado con la formulación de manitol (IC₅₀ en el examen de células epiteliales de pulmón de visón de 30,104 [$\pm$ 7,093] pg/mL).

El uso de composiciones en las cuales los agentes de conformidad con la invención están formulados en presencia de azúcares como maltosa es particularmente preferido en contextos en donde las composiciones se van a administrar en inyección. Los inventores para su sorpresa encontraron que el uso de azúcares como la maltosa en dichas formulaciones proporciona notables ventajas en términos de la reducción de los niveles de dolor experimentado por quien recibe las inyecciones de las composiciones, en comparación con las formulaciones en las cuales se usan otros agentes amortiguadores de tonicidad (como el manitol).

En efecto, tan beneficiosas son las composiciones que comprenden agentes activos de conformidad con la invención y azúcares como la maltosa, que este aspecto constituye un aspecto separado de la invención. Según esto, en un cuarto aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende un agente que tiene actividad TGF- β_3 formulado en presencia de un azúcar seleccionado de entre el grupo compuesto por maltosa, manosa, sacarosa y glucosa. Se prefiere que el azúcar comprenda maltosa.

Las composiciones adecuadas para usar de conformidad con cualquiera de los aspectos precedentes de la invención pueden comprender agentes activos formulados en presencia de un azúcar como la maltosa a una concentración de entre 0,1M y 0,4M del azúcar. Más preferible, las formulaciones adecuadas pueden comprender los agentes activos formulados en presencia de azúcar 0,25M.

Las composiciones que comprenden agentes activos de conformidad con la invención pueden adoptar varias formas dependiendo, en particular, de cómo se van a usar. Así, por ejemplo, pueden estar en forma de un líquido, pomada, crema, gel, hidrogel, polvo o aerosol. Todas estas composiciones son adecuadas para aplicación tópica al epitelio dañado, que es un medio preferido de administración de los agentes de conformidad con la invención a un sujeto (persona o animal) que necesita el tratamiento.

23

En una versión preferida las formulaciones terapéuticas de los agentes de la invención adecuados para administración parenteral localizada (p.ej., intradérmica y subcutánea) se pueden preparar mezclando el agente (que tiene el grado de pureza deseado) con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables en forma de formulaciones en polvos liofilizados y no liofilizados para reconstitución, soluciones no acuosas y acuosas, dispersiones/suspensiones no acuosas y acuosas incluidas emulsiones y formulaciones semisólidas. Los vehículos aceptables, incluidos los excipientes, son atóxicos para los receptores a 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, glucosa, glicerol y similares; preservativos como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como parabeno de metilo, propilo o butilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de cerca de 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluidos glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; otros azúcares como sacarosa, manitol, maltosa, trehalosa o sorbitol; 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 polietoxilados de ácidos acílicos, copolímeros de óxido de polietileno y óxido de polipropileno.

Un ejemplo de formulación farmacéutica ejemplo de una solución estéril para administración parenteral localizada de la presente invención, además de los agentes activos, puede opcionalmente o adicionalmente incluir lo siguiente:

fosfato amortiguador 0,01M a 0,1M, y

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

1 a 10 p/v % de maltosa (aunque se puede usar otro azúcar adecuado como alternativa), y

0,1 mg/ml mono-oleato de polioxietileno de sorbitán (Tween™ 80).

La persona versada en la técnica apreciará fácilmente que se puede preparar una "torta" de polvo liofilizado con base en la anterior solución.

Las versiones preferidas de la invención pueden ser presentadas en forma de un vial, una ampolla o una jeringa prellenada ya sea de una solución estéril; un polvo liofilizado estéril adecuado para reconstitución; una suspensión estéril o cualquier otra forma de presentación farmacéuticamente aceptable para la administración parenteral localizada de un fármaco.

En otra versión preferida de la invención las formulaciones terapéuticas de los agentes de la invención adecuados para administración tópica se pueden preparar mezclando la sustancia que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables en la forma de formulaciones en polvo liofilizado o no liofilizado, soluciones no acuosas o acuosas, dispersiones/suspensiones no acuosas o acuosas, incluidas emulsiones y formulaciones semisólidas. Los vehículos aceptables, incluidos los excipientes, son atóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero sin limitaciones, agua purificada, solución salina, solución salina con amortiguador de fosfato (PEiS) solución de Ringer, solución de lactato de Ringer, soluciones de dextrosa, solución de dextrosa en solución salina, soluciones hidro-alcohólicas, glucosa, sacarosa, dextrano, manosa, manitol, maltosa, sorbitol, 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. Se puede adicionalmente incluir agentes preservativos, estabilizadores, antioxidantes, antimicrobianos y amortiguadores adecuados como, por ejemplo, parabenos de metilo y/o propilo y/o butilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), ácido cítrico, ácido ascórbico y similares. Las bases para 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 vendajes de herida. Como alternativa se puede incorporar o encapsular el compuesto terapéutico de la invención en una matriz o membrana adecuada de polímero, lo cual

proporciona un dispositivo de liberación prolongada adecuado para colocar sobre o implantar cerca del sitio que se va a tratar.

Un ejemplo de una formulación farmacéutica ejemplo de un hidrogel semisólido para administración tópica de la presente invención, además del o los ingredientes activos, pueden incluir lo siguiente:

0,1% p/v a 2,0% p/v hidroxiceululosa, y
0,1% p/v a 1,0% p/v Carbopol 934™ (BF Goodrich Corp.), y
10 a 20% p/v propilenglicol, y
0,005% p/v a 0,020% p/v metilparaben, y
0,005% p/v a 0,020% p/v propilparaben, y
Hidróxido de sodio o ácido clorhídrico c.s. para pH 4 - 10
Agua purificada, c.s. para 100% p/v

Las composiciones adecuadas para aplicación tópica de conformidad con la invención (incluidas aquellas composiciones en las cuales los agentes activos de conformidad con la invención se formulan en presencia de maltosa) se pueden presentar en forma de un frasco, pote, tubo, aerosol, de ya sea una solución estéril; un polvo estéril liofilizado o no liofilizado para reconstitución, una dispersión/suspensión estéril, un semisólido estéril, o cualquier otra forma de presentación farmacéuticamente aceptable para la administración tópica de un fármaco.

Los agentes de conformidad con la invención se pueden proporcionar en un vendaje o parche estéril, el cual se puede usar para cubrir el sitio del daño epitelial que se va a tratar.

Se apreciará que el vehículo de la composición que comprende agentes de conformidad con la invención debe ser bien tolerado por el paciente y permitir la liberación del agente en el sitio del daño epitelial. Dicho vehículo de preferencia es biocompatible, biodegradable, biorreabsorbible, biorresoluble y/o no inflamatorio.

Las composiciones que comprenden agentes de conformidad con la invención se pueden usar de varias maneras. Así, por ejemplo, una composición puede ser aplicada en y/o alrededor del sitio del daño epitelial para regular la regeneración epitelial. Si la composición se va a aplicar en un sitio de daño epitelial "existente", entonces el vehículo farmacéuticamente aceptable será uno relativamente "suave" es decir, es decir, un vehículo que es biocompatible, biodegradable, biorresoluble y no inflamatorio.

Un agente de la invención, o un ácido nucleico que codifica a dicho agente, puede ser incorporado dentro de un dispositivo de liberación lenta o prolongada. Dichos dispositivos pueden, por ejemplo, ser colocados sobre o insertados bajo la piel y el agente o

26

ácido nucleico puede ser liberado en el curso de días, semanas o incluso meses. Dicho dispositivo puede ser especialmente útil para pacientes que requieren la promoción a largo plazo de la regeneración epitelial. Los dispositivos pueden ser especialmente ventajosos cuando se usan para la administración de un agente o ácido nucleico que normalmente requeriría administración frecuente (p.ej., por lo menos diaria por otras vías).

Las dosis diarias de un agente de la invención se pueden dar en una sola administración (p.ej., una aplicación diaria de una formulación tópica o una inyección diaria). Como alternativa, el agente de la invención puede requerir administración dos o más veces durante el día. En otra alternativa, se puede usar un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas de un agente de la invención a un paciente sin necesidad de administrar dosis repetidas.

En una versión un vehículo farmacéutico para la administración de un agente de la invención puede ser un líquido y una composición farmacéutica adecuada estaría en forma de solución. En otra versión, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sólido y una composición adecuada se encuentra en forma de polvo o tableta. En otra versión el agente de la invención puede ser formulado como parte de un parche transdérmico farmacéuticamente aceptable.

Un vehículo sólido puede incluir una o más sustancias las cuales también pueden actuar como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes suspensoros, rellenos, deslizantes, ayudas de compresión, ligantes o agentes desintegradores de tableta; también puede ser un material encapsulador. Cuando el vehículo está en polvo, es un sólido finamente dividido mezclado con el agente de la invención finamente dividido. Si es en tabletas, el agente de la invención se mezcla con un vehículo que tiene las propiedades necesarias de compresión en proporciones adecuadas y está compactado en la forma y tamaño deseados. Los polvos y tabletas de preferencia contienen hasta 99% del agente de conformidad con la invención. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico.

Los vehículos líquidos se pueden usar 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, a mezcla de los dos, o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados como solubilizantes, emulsionantes, amortiguadores,

29

preservativos, endulzantes, agentes saborizantes, agentes suspensores, agentes espesantes, colorantes, reguladores de viscosidad, estabilizadores u osmorreguladores. Algunos ejemplos de vehículos líquidos adecuado para administración oral y parenteral incluyen agua (que contienen parcialmente aditivos como los de arriba, p.ej., derivados de la celulosa, de preferencia 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 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 las 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 que son soluciones o suspensiones estériles se pueden utilizar para, por ejemplo, inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea inyección. Las soluciones estériles también se pueden administrar por vía intravenosa y tópicamente en aerosol o aplicación por debajo de un vendaje oclusivo o semioclusivo. El agente de la invención se puede preparar como una composición sólida estéril p.ej., por liofilización, la cual puede ser disuelta o suspendida en el momento de la administración usando agua estéril, solución salina, u otro medio inyectable estéril adecuado. Se pretende que los vehículos incluyan los ligantes, agentes suspensores, lubricantes, saborizantes, endulzantes, preservativos, tintes y recubrimientos necesarios e inertes.

En la situación en la cual se desea administrar un agente de la invención por medio de ingestión oral, se apreciará que el agente elegido de preferencia será un agente que tiene un elevado grado de resistencia a la degradación. Por ejemplo, el agente de la invención puede de preferencia no ser un péptido, o puede no tener componentes peptídicos.

Las composiciones de agentes de conformidad con la invención son adecuadas para usar en la reducción o control del daño del epitelio corneal (las células que cubren a las células estromales de la córnea). Tal daño puede ser el resultado de un traumatismo del ojo que surge como consecuencia de una lesión accidental (como se dijo arriba) o de operaciones quirúrgicas (p.ej., cirugía de la córnea con rayo láser). En este caso la composición o el medicamento de conformidad con la invención pueden estar en forma de colirio. Aunque las composiciones se pueden usar en la córnea, los inventores creen que los métodos de la invención de preferencia se pueden usar en tejidos, como la piel o el cuero cabelludo, que no tienen células estromales.

Los agentes de conformidad con la invención se pueden usar en una amplia gama de sitios del daño epitelial “interno” (es decir, aquellos sitios de daño epitelial situados dentro del organismo, en lugar de en una superficie externa). Así, por ejemplo, los medicamentos que comprenden agentes de conformidad con la invención se pueden formular para inhalación en sitios del daño epitelial que surgen en los pulmones u otro epitelio respiratorio.

Se pueden usar procedimientos conocidos, como los que convencionalmente se emplean en la industria farmacéutica (p.ej., experimentación *in vivo*, estudios clínicos, etc.), para establecer formulaciones específicas de composiciones que comprenden agentes de conformidad con la invención y regímenes terapéuticos precisos para la administración de dichas composiciones (como las dosis diarias del agente activo y la frecuencia de administración).

En general, las composiciones que comprenden agentes de conformidad con la invención se deben formular de tal manera que cuando se administren en el sitio del daño epitelial se alcance una concentración del agente de entre 0,01nM y 10mM por cm² o cm lineal en el sitio. De preferencia, composiciones que comprenden agentes composiciones que comprenden agentes conforme a la invención se deben formular de tal manera que cuando se administren en el sitio del daño epitelial se alcance una concentración del agente de entre 0,1nM y 1mM por cm² o cm lineal en el sitio. Más preferible, las composiciones que comprenden agentes de conformidad con la invención se deben formular de tal manera que cuando se administren en el sitio del daño epitelial se alcance una concentración del agente entre 0.1nM y 400μM por cm² o cm lineal en el sitio.

Meramente a manera de ejemplo, una solución inyectable que contiene entre 50 ng/100 μL y 500 ng/100 μL de un agente de la invención (como TGF-β₃) es adecuado para aplicación a un sitio de daño epidérmico de espesor parcial.

Una dosis diaria adecuada de un agente de la invención capaz de promover la regeneración epitelial depende de los factores que se discutieron arriba así como del tamaño del sitio del daño epitelial que se va a tratar. Típicamente la cantidad de un agente de la invención requerida para el tratamiento del sitio del daño epitelial estará dentro del intervalo de 0,01nM a 10mM del agente por cm² o cm lineal en 24 horas, dependiendo del área del sitio del daño epitelial entre otros varios factores.

Los agentes de conformidad con la invención se pueden usar para promover la regeneración epitelial en monoterapia (es decir, el uso del agente solo). Como alternativa, los usos, métodos o medicamentos de la invención se pueden usar en combinación con otros compuestos o tratamientos capaces de promover la regeneración epitelial. Por ejemplo

29

los usos los usos, métodos o medicamentos de la invención se pueden usar en combinación con vendajes (los cuales pueden incluir gasas, membranas de compuestos sintéticos y/o películas transparentes, cualquier de los cuales opcionalmente puede estar impregnado con agentes antiinfecciosos, alginatos, hidrocoloides o miel), piel artificial (como piel artificial generada de la propia epidermis de un individuo, o equivalentes comercialmente disponibles) o pomadas (como las que contienen compuestos antiinfecciosos a base de plata). Dos ejemplos de pieles artificiales comercialmente disponibles adecuadas para usar en combinación con los métodos, usos o medicamentos de la invención están disponibles con las marcas Apligraf (Graftskin) y Dermagraft.

Los usos, métodos o medicamentos de la invención también son adecuados para usar en combinación con otras terapias convencionales o en desarrollo. Los siguientes párrafos contemplan ejemplos de dichas terapias, y hacen referencia a las indicaciones en las cuales se puede preferir el uso de terapias combinadas.

Cuando se promueve la regeneración epitelial en el contexto de la cicatrización de la herida (y en especial la curación de quemaduras y úlceras de piel) se puede preferir combinar los usos, métodos o medicamentos de la invención con agentes debridantes. Algunos ejemplos apropiados de dichos agentes pueden incluir agentes enzimáticos como colagenasa (Smith & Nephew), agentes químicos, agentes quirúrgicos/mecánicos o agentes biológicos p.ej., terapia con larvas de mosca.

Como alternativa o además, cuando se promueve la regeneración epitelial en la cicatrización de la herida se puede preferir combinar los usos, métodos o medicamentos de la invención con péptidos líticos como citoporinas. Estos péptidos se pueden incorporar dentro de la membrana de la célula y causar la lisis de las células. Un ejemplo de una citoporina adecuado para usar en terapia combinada es la HB- 107 (producida por Helix BioMedix, Inc.).

La regeneración epitelial en la cicatrización de heridas (en especial en diabéticos), epidermolisis bullosa y enfermedades oculares (incluida la cicatrización de heridas en la córnea) puede ser promovida por el uso de timosina beta-4 en combinación con los usos, métodos y medicamentos de la invención. Una forma recombinante de timosina beta-4 adecuada para tal uso es producida por RegeneRx Biopharmaceuticals Inc.

Otro agente adecuado para usar en terapia combinada con los usos, métodos o medicamentos de la invención para la promoción de la regeneración epitelial asociada con la cicatrización de heridas y trastornos de la piel como úlceras es Pimilprost. Este compuesto es un análogo estable de la Prostaglandina II, y tiene actividad biológica tanto como inhibidor de agregación plaquetaria como vasodilatador. El Pimilprost adecuado para

20

usar en combinación con los usos, métodos y medicamentos reivindicados se puede ser obtener en Sumitomo Pharmaceuticals Co. Ltd.

La regeneración epitelial en la cavidad oral, por ejemplo, en el tratamiento de heridas o úlceras bucales, puede ser promovida por la combinación de usos, métodos y medicamentos de la invención con inhibidores de la degranulación de los mastocitos como amlexanox (comercialmente disponible en Access Pharmaceuticals, Inc.).

La regeneración de epitelios dañados en el cierre de heridas o como resultado de complicaciones diabéticas puede también ser promovida por la combinación de usos métodos y medicamentos conforme a la presente invención con la proteína-70 de choque térmico (HSP-70) o inductores de la proteína de choque térmico, Bimoclomal, producidos por Biorex Research and Development Co., y representa un ejemplo preferida de un inductor de HSP adecuado para usar en dicha terapia combinada.

Con el fin de promover la regeneración epitelial en tejidos como el revestimiento del estómago (por ejemplo en el caso de la reepitelización para la curación de úlceras gástricas), la epidermis, y el epitelio corneal se puede preferir combinar los usos, métodos y medicamentos de la presente invención con análogos de la melanostatina capaces de acelerar la regeneración del tejido. Un ejemplo de un análogo adecuado de este tipo es Alaptid, disponible comercialmente en VUFB.

Otro agente que se puede usar con provecho en combinación con los usos, métodos y medicamentos de la invención es la enzima heparinasa III. Tales combinaciones de preferencia se pueden usar para promover la regeneración epitelial asociada con la cicatrización de las heridas y el tratamiento de úlceras externas (en especial úlceras diabéticas). Una forma adecuada de heparinasa III para usar en dichas combinaciones es la producida por IBEX Technologies, Inc., bajo la designación IBT-9302.

Los usos, métodos y medicamentos de la invención adicionalmente o como alternativa se pueden usar en combinación con la trombina sintética peptidomimética Chrysalin producida por Chrysalis BioTechnology, Inc. Estas combinaciones se pueden preferir para la promoción de la regeneración epitelial asociado con cicatrización de heridas y úlceras diabéticas, en especial las úlceras diabéticas de los pies.

La promoción de la regeneración epitelial en sitios de daño por quemadura se puede efectuar con los usos, métodos o medicamentos de la invención en combinación con PV-707, manufacturado por GroPep Ltd. El PV-707 es un péptido agonista del factor de crecimiento.

La promoción de la regeneración epitelial en heridas, y en especial en quemaduras, puede ser promovida por el uso de sulfato de dehidroepiandrosterona sintético (DHEAS) en



combinación con los usos, métodos y medicamentos de la invención. Una forma de DHEAS sintético adecuado para tal uso es el manufacturado por Pharmadigm Inc., con el nombre PB-005.

La regeneración epitelial en el tratamiento de la enfermedad dermatológica y la cicatrización de las heridas puede ser promovida por los usos, métodos o medicamentos de la invención en combinación con lactoferrina recombinante. Una forma adecuada de lactoferrina recombinante humana es la manufacturada por Agennix Inc.

Otra terapia combinada adecuada para la promoción de la regeneración epitelial asociada con la respuesta de cicatrización de las heridas reside en la combinación de los usos, métodos o medicamentos de la invención con el suministro de desoxirribonucleósidos libres. Una fuente adecuada de dichos desoxirribonucleósidos es suministrada por PN- 105, que comprende una mezcla en pesos equivalentes de estas moléculas en un gel base y es manufacturada por Wellstat Therapeutics Corp.

Existe una amplia gama de métodos y composiciones diseñadas para mejorar o aumentar la regeneración epitelial que usan factores de crecimiento diferentes del TGF- β_3 . Se apreciará que los usos, métodos o medicamentos de la invención también se pueden usar en combinación con estos tratamientos existentes. Los siguientes párrafos dan orientación adicional sobre el uso de la presente invención en combinación con otros tratamientos a base de factores de crecimiento.

Los usos, métodos y medicamentos de la invención se pueden usar en combinación con miembros de la familia del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF). Por ejemplo, la presente invención se puede usar en combinación con el FGF básico (FGF-2). Esta combinación de los usos, métodos o medicamentos de la invención con FGF-2 puede ser especialmente preferida en la promoción de la regeneración epitelial luego de heridas. Algunos ejemplos de sitios de heridas que pueden obtener provecho de dicha combinación incluyen quemaduras, sitios donantes de injertos, y lesiones crónicas como úlceras (incluidas las úlceras que no sanan como úlceras del diabético o las úlceras por decúbito). El FGF-2 de preferencia puede ser FGF- 2 recombinante (rFGF-2) y más de preferencia FGF-2 recombinante humano (rhFGF-2). Un ejemplo adecuado de rFGF-2 apropiado para usar de conformidad con esta versión de la invención es el producido por Scios Inc. o Chiron.

Otro miembro de la familia del factor de crecimiento de los fibroblastos que se puede usar en combinación con los usos, métodos y medicamentos de la invención para promover la regeneración epitelial es el FGF-10 (también conocido como factor de crecimiento-2 de los queratinocitos o KGF-2) para promover la regeneración de epitelios

m²

dañados como a resultado de heridas, complicaciones del proceso de curación de la piel (como úlceras de la piel), enfermedades como mucositis oral o colitis ulcerativa, o daño del epitelio gastrointestinal como el que se presenta en la enfermedad de Crohn. Una forma adecuada de FGF- 10 que se puede usar en combinación con los usos, métodos o medicamentos de la invención es la producida por Human Genome Sciences, Inc., bajo el nombre de Repifermin.

Los usos, métodos y medicamentos de la invención también se pueden usar en combinación con miembros de la familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Por ejemplo, la combinación de los usos, métodos o medicamentos de la invención con PDGF-B puede ser útil para la promoción de la regeneración epitelial en la cicatrización de heridas, y en especial la curación de quemaduras heridas o úlceras del pie diabético. En una versión preferida de tales combinaciones el PDGF-B que se va a usar de preferencia se puede administrar por medio de un vector adenoviral. Selective Genetics, Inc. produce un ejemplo adecuado de dicho vector adenoviral con el nombre de AdPDGF-B/GAM.

En otra combinación adecuada se emplean los usos, métodos o medicamentos de la invención con PDGF-BB. Un ejemplo de PDGF-BB que se puede usar en dicha combinación se encuentra comercialmente disponible con el nombre de Regranex.

La combinación de los usos, métodos o medicamentos de la invención con inhibidores de las citocinas también se pueden usar para promover la regeneración epitelial. Tales combinaciones, por ejemplo, se pueden usar en la promoción de la regeneración epitelial en respuesta a lesiones, o para tratar el daño epitelial que se presenta como resultado de afecciones como la enfermedad del intestino irritable (IBD) o la enfermedad de Crohn. Un ejemplo adecuado de tal inhibidor es Semapimod (CNI- 1493) un inhibidor a sintético de la guanilhidrazona MAPK producido por el Picower Institute for Medical Research.

Se pueden proporcionar los agentes conforme a la invención pueden como alternativa o adicionalmente en combinación con compuestos capaces de inhibir la actividad de la proteasa. Los inhibidores de la proteasa se pueden elegir con base en un amplio espectro de actividad inhibitoria, o por la capacidad de inhibir selectivamente las proteasas (o familias de proteasas) presentes en sitios de daño epitelial. Las proteasas que se van a inhibir pueden incluir la elastasa de los neutrófilos, las metaloproteinasas de matriz, los activadores del plasminógeno (por ejemplo la uroquinasa activadora del plasminógeno o el activador del plasminógeno tisular), plasmina, catepsinas, furina y miembros de la familia “una desintegrina y una metaloproteinasa” como ADAM o ADAM-

TS. Los inhibidores adecuados de la proteasa pueden incluir péptidos, proteínas, o pequeñas moléculas inhibidoras.

Se apreciará que el TGF- β_3 , sus fragmentos, derivados y variantes, así como los agentes capaz de aumentar la actividad biológica del TGF- β_3 pueden representar agentes favorables para ser administrados por técnicas que implican la expresión celular de secuencias de ácidos nucleicos que codifican a dichas moléculas. Tales métodos de expresión celular son especialmente adecuados para usos médicos en los cuales los efectos terapéuticos de los polipéptidos, derivados y análogos son requeridos durante un periodo prolongado, por ejemplo en contextos en donde resulta deseable acrecentar durante un tiempo una respuesta por lo demás defectuosa de regeneración epitelial.

Muchos métodos conocidos de administración de agentes de conformidad con la invención a un tejido epitelial dañado relevante tienen la desventaja que puede ser difícil alcanzar niveles sostenidos del agente en el sitio del daño epitelial en el curso incluso de unos pocos días porque muchos agentes adecuados pueden tener vidas medias cortas *in vivo*. Las vidas medias de los agentes pueden ser cortas por diversas razones que incluyen:

- (i) Degradación por proteasas y similares.
- (ii) Depuración por proteínas de unión.
- (iii) Unión e inhibición de la actividad del por moléculas de la matriz extracelular como decorina y fibronectina.

Además, los agentes que se usan para tratar sitios de curación de daño epitelial tienen que ser administrados en un vehículo adecuado y a menudo se proporcionan como una composición que comprende el agente activo y el vehículo. Como se examina en detalle más adelante, dichos vehículos son de preferencia no inflamatorios, biocompatibles, biorreabsorbibles y no deben degradar o inactivar al agente (en almacenamiento o en uso). Sin embargo, suele ser difícil proporcionar un vehículo satisfactorio para administrar agentes a un tejido que va a ser tratado.

Una forma conveniente de obviar o mitigar estos problemas es proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de la invención en el sitio del daño epitelial por medio de terapia génica.

Conforme a un quinto aspecto de la presente invención se proporciona un sistema de administración para usar en una técnica de terapia génica, el cual sistema de administración comprende una molécula de ADN que codifica un agente de la invención, la cual molécula de ADN es capaz de ser transcrita para liderar la expresión del agente elegido.

34

Conforme a un sexto aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un sistema de administración como el definido en el párrafo precedente para usar en la manufactura de un medicamento para usar en la promoción de la regeneración epitelial.

Conforme a un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona un método de promoción de la regeneración epitelial, el cual método comprende administrar a un paciente que necesita el tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un sistema de administración como el definido para el quinto aspecto de la invención.

Debido a la degeneración del código genético, está claro que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican agentes adecuados para usar de conformidad con la invención se puede variar o cambiar sin afectar sustancialmente la secuencia del producto codificado por ellos, para dar una variante funcional del mismo. Como se anotó antes, un agente adecuado para usar de conformidad con la invención tiene que conservar la actividad promotora de la regeneración epitelial del TGF- β_3 .

Los nucleótido adecuados que codifican variantes del TGF- β_3 incluyen aquellos que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican al mismo aminoácido dentro de la secuencia, con lo cual se produce un cambio silencioso. otro adecuado variantes son aquellos que tienen secuencias homólogas de nucleótidos pero comprende toda, o porciones de la secuencia que son alterados por la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares a las del aminoácido al que sustituyen, para producir un cambio conservador. Por ejemplo aminoácidos pequeños, no polares, hidrófobos incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, y metionina. Los aminoácidos grandes, no polares, hidrófobos incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos de carga positiva (básicos) incluyen lisina, arginina y histidina. Los aminoácidos de carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Los sistemas de administración conforme a la invención son altamente adecuados para alcanzar niveles sostenidos de un agente de la invención en un sitio del daño epitelial durante un tiempo prolongado que es posible para la mayoría de los sistemas convencionales de administración. Los agentes de conformidad con la invención adecuados para promoción de la regeneración epitelial pueden ser expresados de forma continua por las células en el sitio del daño epitelial que han sido transformadas con la molécula de ADN revelada en el quinto aspecto de la invención. En consecuencia, aun si el agente de la invención tiene una vida media muy corta *in vivo*, el tejido tratado puede expresar de forma continua cantidades terapéuticamente efectivas del agente.

Además, el sistema de administración de la invención se puede usar para proporcionar la molécula de ADN (y, por ende, el agente de la invención) sin necesidad de usar vehículos farmacéuticos convencionales como los que se requieren en pomadas o cremas que entran en contacto con el sitio del daño epitelial.

El sistema de administración de la presente invención es tal que la molécula de ADN es capaz de ser expresada (cuando el sistema de administración se le administra a un paciente) para producir un agente de la invención el cual directa o indirectamente tiene actividad de promoción de la regeneración epitelial. "Directamente" significa que el producto de expresión genética *per se* tiene la actividad requerida de promoción de la regeneración epitelial. "Indirectamente" quiere decir que el producto de expresión genética sufre o media (p.ej., como una enzima) por lo menos otra reacción para proporcionar un agente activo efectivo para la promoción de la regeneración epitelial.

La molécula de ADN puede estar contenida dentro de un vector adecuado para formar un vector recombinante. El vector puede, por ejemplo, ser un plásmido, cósmido o fago. Dichos vectores recombinantes son altamente útiles en los sistemas de administración de la invención para transformar las células con la molécula de ADN.

Los vectores recombinantes también pueden incluir otros elementos funcionales. Por ejemplo, se pueden diseñar vectores recombinantes tales que el vector se replique de forma autónoma en el núcleo de la célula. En este caso, se pueden necesitar elementos que inducen la replicación del ADN en el vector recombinante. Como alternativa, se puede diseñar el vector recombinante de tal manera que el vector y la molécula de ADN recombinante se integren dentro del genoma de una célula. En este caso son deseables las secuencias de ADN que favorezcan la integración dirigida (p.ej., por recombinación homóloga) son deseable. Los vectores recombinantes también pueden tener ADN que codifica genes que se pueden usar como marcadores seleccionables en el proceso de clonación.

El vector recombinante además también puede comprender un promotor o regulador para controlar la expresión requerida del gen.

La molécula de ADN puede (pero no necesariamente) incorporarse al ADN de las células del sujeto que está siendo tratado. Se pueden transformar de forma estable células indiferenciadas lo cual conduce a la producción de células hijas genéticamente modificadas. Cuando éste es el caso, se puede requerir la regulación de la expresión en el sujeto puede, p.ej., con factores de transcripción específicos, activadores de genes o más de preferencia con promotores inducibles que transcriben al gen en respuesta a una señal que se encuentra específicamente en el sitio del daño epitelial. Como alternativa, se puede diseñar el sistema

36

de administración para favorecer la transformación inestable o transitoria de células diferenciadas en el sujeto que se está tratando. En este caso, la regulación de la expresión puede ser menos importante porque la expresión de la molécula de ADN se detendrá cuando las células transformadas mueran o dejen de expresar la proteína (idealmente cuando el sitio del daño epitelial se ha regenerado efectivamente).

El sistema de administración puede proporcionar la molécula de ADN a un sujeto sin incorporarla a un vector. Por ejemplo, se puede incorporar la molécula de ADN dentro de un liposoma o partícula viral. Como alternativa, se puede insertar la molécula “desnuda” de ADN dentro de las células del sujeto por medios adecuados p.ej., captación por endocitosis directa.

La molécula de ADN puede ser transferida a las células de un sujeto que va a ser tratado mediante transfección, infección, microinyección, fusión celular, fusión de protoplasto o bombardeo balístico. Por ejemplo, la transferencia se puede hacer por transfección balística con partículas de oro recubiertas, liposomas que contienen la molécula de ADN, vectores virales (p.ej., adenovirus) y medios de proporcionar la captación directa del ADN (p.ej., endocitosis) por aplicación de ADN de un plásmido directamente al sitio del daño epitelial tópicamente o por inyección.

El agente de la invención expresado desde la molécula de ADN puede regular hacia arriba de forma directa o indirecta la expresión y/o actividad del TGF- β_3 , con lo cual promueve la regeneración epitelial.

Los métodos de la invención pueden ser llevados a la práctica induciendo un aumento de la expresión celular de un agente de la invención, el cual puede entonces promover la regeneración epitelial. Es posible lograr dicha expresión terapéutica de un agente de la invención aumentando la expresión natural del agente (por ejemplo, la expresión natural de un agente natural como el TGF- β_3), o induciendo la expresión no natural del agente (p.ej., inducción de la expresión del TGF- β_3 por células que naturalmente no lo expresan) o induciendo la sobreexpresión del agente.

La expresión celular del agente de la invención, ya sea natural o no natural, puede ser hecha por células epiteliales, las cuales pueden ser las células epiteliales que existen en el borde del área dañada, o como alternativa pueden ser células epiteliales terapéuticamente introducidas dentro del área dañada (por ejemplo, células epiteliales endógenas o exógenas cultivadas). Como alternativa, la expresión celular del agente de la invención se puede efectuar mediante la expresión del agente por células en proximidad o contacto con el epitelio cuya regeneración se va a promover. Por ejemplo, en el caso en el cual se desee



promover la regeneración epidérmica, el agente de la invención puede ser expresado por células situadas en la dermis que subyace o rodea al epitelio dañado.

Se apreciará que las células que se van a introducir terapéuticamente para promover la regeneración epitelial pueden ser manipuladas *ex vivo* de manera que expresen niveles elevados de un agente de la invención, y luego introducidas en el área dañada. Como se dejó entrever arriba, dichas células pueden ser ellas mismas células epiteliales, o células situadas suficientemente cerca del epitelio dañado para que el agente expresado por las células sea capaz de promover la regeneración epitelial deseada. Las células de preferencia pueden ser células cultivadas *ex vivo* para usar en la preparación o la manufactura de piel artificial o sustitutos de la piel. Las células pueden, más de preferencia, ser células autólogas, aunque se apreciará que se pueden usar cualesquiera células adecuadas.

Según esto, en un octavo aspecto de la invención, se proporciona un medicamento que comprende cualquier tipo relevante de célula (por ejemplo células epiteliales, macrófagos, monocitos, fibroblastos, endoteliales o células madre) a las que se les ha inducido que expresen un agente de conformidad con la presente invención.

La inducción de expresión celular de un agente de la invención puede efectuarse por medio de señales externas que influyen sobre las células, o por medio de la incorporación en las células de ácidos nucleicos que causan la expresión del agente de conformidad con los aspectos cuarto a sexto de la invención.

La presente invención se describirá en detalle en los siguientes Ejemplos 1 y 2 no limitantes. El Ejemplo 1 ilustra la promoción de la regeneración epitelial por TGF- β_3 de heridas de espesor total en la piel humana, mientras que el Ejemplo 2 ilustra que el TGF- β_3 es capaz de promover la regeneración epitelial en heridas de espesor parcial en la piel humana.

Los ejemplos se refieren a las Figuras acompañantes, en las cuales:

La Figura 1, ilustra:

- i) fotografías, tomadas en los puntos de tiempo tres y siete días después de la lesión, ilustrando la apariencia macroscópica de las heridas humanas de espesor total durante la regeneración epitelial; y
- ii) microfotografías de los mismos puntos de tiempo que muestran la histología de los sitios afectados durante la regeneración epitelial.

La Figura 1 muestra ejemplos de imágenes macroscópicas e histológicas de heridas tratadas con 50 ng/100 μ L de TGF β_3 , Placebo o cuidados convencionales. Los resultados se muestran a los 3 y 7 días después de la lesión.

48

Específicamente, los paneles A y B respectivamente muestran la apariencia macroscópica y microscópica de las heridas tratadas con TGF- β 3 tres días después de la lesión. El análisis de la imagen histológica revela una reepitelización del 54%.

Los paneles C y D respectivamente muestran la apariencia macroscópica y microscópica de heridas tratadas con placebo tres días después de la lesión. El análisis de la imagen histológica revela una reepitelización del 20%.

Los paneles E y F muestran respectivamente la apariencia macroscópica y microscópica de heridas tratadas con cuidados convencionales tres días después de la lesión. El análisis de la imagen histológica revela una reepitelización del 19%.

Los paneles G y H muestran respectivamente la apariencia macroscópica y microscópica de heridas tratadas con TGF- β 3 siete días después de la lesión. El análisis de la imagen histológica revela una reepitelización del 100%.

Los paneles I y J muestran respectivamente la apariencia macroscópica y microscópica de heridas tratadas con placebo siete días después de la lesión. El análisis de la imagen histológica revela una reepitelización del 100%.

Los paneles K y L muestran respectivamente la apariencia macroscópica y microscópica de heridas tratadas con cuidados convencionales siete días después de la lesión. El análisis de la imagen histológica revela una reepitelización del 100%.

La Figura 2 ilustra la comparación entre porcentaje promedio de reepitelización alcanzado en las heridas tratadas y sin tratar con TGF- β 3 / heridas tratadas con placebo a los tres y siete días después de la lesión. Se muestran los resultados de reepitelización de heridas tratadas con 50 ng/100 μ L de TGF- β 3, Placebo o Cuidados convencionales a los 3 y 7 días después de la lesión. Los resultados se produjeron mediante el análisis de imágenes de cortes histológicos. * Indica un resultado significativo valorado con una prueba t no pareada ($p=0,05$).

La Figura 3 muestra fotografías que ilustran la apariencia macroscópica, y por tanto el avance de la regeneración epitelial, en heridas de piel de espesor parcial en el curso de 21 días desde el momento de la lesión.

Los paneles A hasta I muestran las heridas tratadas con placebo en los días 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 15 y 21 respectivamente. En contraposición, los Paneles J a R muestran las heridas tratadas con TGF- β 3 en los días 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 15 y 21 respectivamente

EJEMPLO 1

Efectos del TGF- β 3 sobre la reepitelización heridas de espesor total en seres humanos

Se llevó a cabo un estudio de Fase I con aprobación del comité de ética local, que comprendió un estudio de aumento gradual de la dosis en seres humanos (FIM) en casos de

39

daño epidérmico para determinar la máxima dosis tolerada (MTD) del TGF- β_3 administrado por inyección intradérmica. El estudio se llevó a cabo con un diseño doble ciego, controlado con placebo (vehículo) y cuidados convencionales, aleatorizado, de grupos paralelos con el objeto de investigar la seguridad clínica, tolerancia, farmacocinética sistémica y farmacodinamia local de concentraciones repetidas gradualmente crecientes de TGF- β_3 intradérmico en voluntarios sanos de raza blanca y sexo masculino con edades de 18-45 años (Número de Referencia de Estudio y Protocolo: RN 1001 -319- 1001-001).

El estudio se planificó con un total de setenta y dos sujetos, con dosis programadas de TGF- β_3 (y placebos idénticos) de 50 ng/100 μ L, 100 ng/100 μ L, 500 ng/100 μ L, 1000 ng/100 μ L, 10 μ g/100 μ L y 100 μ g/100 μ L.

Los datos del estudio se ingresaron en una base de datos de cumplimiento de regulación que se selló el 8 de diciembre de 2003 y el estudio fue desvelado (es decir, se divulgaron los códigos de asignación aleatoria) el 19 de diciembre de 2003.

Todos los sujetos del estudio se sometieron a dos biopsias en sacabocados de espesor total de 3 mm en cada brazo y las heridas recibieron cuidados convencionales. Los cuidados convencionales resultaron óptimos para la cicatrización de heridas húmedas en todos los casos. Además de esto, para el par de heridas en el brazo de cada sujeto, las heridas recibieron TGF- β_3 frente a placebo de TGF- β_3 , TGF- β_3 frente a nada (denotado como cuidados convencionales) o placebo de TGF- β_3 frente a nada (cuidados convencionales). El diseño del estudio fue tal que las comparaciones de los efectos de los tratamientos de las heridas se podían hacer tanto en el mismo sujeto como entre sujetos, es decir, que los individuos actuaron como sus propios controles.

La sustancia medicamentosa a granel TGF- β_3 empleada en el estudio fue manufacturada siguiendo las GMP y contenía ácido y alcohol como excipientes. Este material se diluyó de forma seriada para proporcionar jeringas estériles prellenadas para inyección intradérmica en el estudio (también manufacturadas en adherencia a las GMP). Las concentraciones de los excipientes ácido y alcohol variaron debido al proceso de dilución seriada de las dosis requeridas de inyección de TGF- β_3 de la sustancia medicamentosa a granel. Como los efectos de estos excipientes a diferente concentraciones tanto sobre la seguridad / tolerancia como sobre los efectos en la curación en la especie humana eran desconocidos, también se prepararon placebos idénticos en adherencia de las GMP de la misma forma (es decir, el placebo contenía excipientes a concentraciones equivalentes pero no la proteína del TGF- β_3). Esto también permitió hacer la comparación de los placebos idénticos con los cuidados convencionales solos, para demostrar si los excipientes mismos tenían algún efecto adverso sobre el proceso de curación.

El estudio se diseñó para que 9 sujetos de cada grupo de dosificación se sometiera a dos biopsias en sacabocados en cada brazo que había sido tratado bien sea con TGF- β_3 , placebo o cuidados convencionales como se describió arriba. En el brazo de cada sujeto los dos sitios de biopsia se marcaron en la cara interna y bajo anestesia local. Se inyectó por vía intradérmica TGF- β_3 , placebo o nada (cuidados convencionales) en el sitio. Se tomó una biopsia de espesor total en sacabocados de 3 mm de cada uno de los sitios marcados. Al día siguiente de la lesión los sitios fueron tratados de nuevo, como se dijo arriba, con los mismos tratamientos, es decir, TGF- β_3 , placebo o nada (cuidados convencionales) bajo anestesia local. Entonces se resecaron las heridas ya sea al día 3 o al día 7 después de la lesión para estudio de histología, para facilitar el análisis de los efectos del tratamiento sobre la cicatrización de la herida a los 3 y 7 días después de las biopsias en sacabocados. Entonces los sujetos se sometieron a seguimiento. Se recogió información de seguridad y tolerancia a lo largo del estudio.

Las heridas se resecaron y se procesaron histológicamente en bloques de parafina para cortes de tejido y se estudió la reepitelización con el análisis de las imágenes. En total se generaron 36 heridas de esta forma para cada grupo de dosificación de manera que en total 16 heridas fueron tratadas con TGF- β_3 , 10 heridas con placebo y 10 heridas con cuidados convencionales. Esto dio lugar a los siguientes números de heridas por tratamiento en dos puntos de tiempo diferente después de la lesión para análisis histológico:

8 heridas tratadas con TGF- β_3 , 5 heridas tratadas con placebo y 5 heridas tratadas con cuidados convencionales resecadas en el día 3 después de la lesión.

8 heridas tratadas con TGF- β_3 , 5 heridas tratadas con placebo y 5 heridas tratadas con cuidados convencionales resecadas en el día 7 después de la lesión.

El porcentaje de reepitelización en los sitios de daño epidérmico se calculó conforme a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reepitelización} = \frac{(\text{diámetro total de la herida} - \text{diámetro de la herida no reepitelizada})}{\text{diámetro total de la herida}} \times 100$$

Resultados

Aceleración de la reepitelización en heridas de espesor total en seres humanos por el TGF- β_3 .

El avance de la regeneración epidérmica en heridas de espesor total en seres humanos se ilustra en la Figura 1, que incluye:

41

iii) Fotografías tomadas en los puntos de tiempo tres y siete días después de la lesión, que ilustran la apariencia macroscópica de las heridas de espesor total durante la regeneración epitelial; y

iv) microfotografías de los puntos de tiempo que ilustran la histología de los sitios afectados durante el proceso de regeneración epitelial.

El análisis de los cortes histológicos demostró que se presentó una reepitelización equivalente en las heridas tratadas con placebo y con cuidados convencionales en los dos puntos de tiempo posteriores a la lesión y por tanto estos grupos se combinaron para compararlos con las heridas tratadas con TGF- β_3 .

En la Figura 1 se puede ver que el tratamiento con TGF- β_3 de heridas de piel de espesor total logra promover la regeneración epitelial, llevando a la reconstitución de la epidermis más pronto de lo que es el caso en heridas sin tratar o tratadas con placebo.

Los resultados del Ejemplo 1 se muestran en la Figura 2, en la cual se compara el porcentaje promedio de reepitelización en heridas tratadas y sin tratar con TGF- β_3 / heridas tratadas con placebo en los días tres y siete después de la lesión.

La Figura 2 claramente ilustra que el tratamiento con TGF- β_3 a una concentración de 50 ng/100 μ L aceleró en grado significativo la reepitelización de la herida comparado con la reepitelización que se observó en las heridas de control. La promoción de la regeneración epitelial en heridas tratadas con fármaco frente a heridas de control también se observó en individuos que recibieron TGF- β_3 hasta (500 ng/100 μ L).

EJEMPLO 2

Efectos del TGF- β_3 sobre la reepitelización de heridas de espesor parcial en seres humanos / Sitios donantes de injertos de piel

Se llevó a cabo un estudio piloto (sin enmascarar) con aprobación del comité de ética local con el propósito de investigar los efectos de las aplicaciones intradérmica y tópica del TGF- β_3 a sitios donantes de injertos de piel de espesor parcial en dos voluntarios masculinos de raza blanca con edades de 18-45 años. La concentración del TGF- β_3 empleada fue de 50 ng/100 μ L, y la velocidad de regeneración epitelial alcanzada se comparó con la de placebos idénticos de TGF- β_3 a la concentración equivalente. Tanto el TGF- β_3 como el placebo se prepararon con adherencia a las GMP como se describió arriba.

Los sitios donantes fueron identificados y marcados a cada lado de la línea media en la parte baja de la espalda, con dimensiones de 1,5 por 2 cm, y luego se los infiltró con un anestésico local que contenía epinefrina 1 en 200.000. Entonces, a cada sitio se le aplicó una inyección intradérmica de manera que un lado recibió TGF- β_3 en dosis de 50 ng/cm² y el otro lado recibió placebo idéntico. Los sujetos descansaron luego en decúbito prono

42

durante 30 minutos antes de tomar un injerto de piel de aproximadamente 0.55 mm de espesor parcial de cada uno de los sitios marcados, haciendo hemostasia con presión suave. Inmediatamente después de la obtención del injerto en cada sitio donante se hizo una aplicación tópica bien sea de TGF- β_3 o placebo. Entonces se vendaron las heridas y se dio de alta al sujeto. Los sujetos regresaron al día siguiente y recibieron otra tópica aplicación ya sea de TGF- β_3 o placebo de manera que en todas las etapas cada herida recibió el mismo tratamiento, es decir, tres aplicaciones de TGF- β_3 o tres aplicaciones de placebo. Entonces se examinaron los sujetos todos los días durante dos semanas y luego a los 21 días, con seguimiento posterior.

Resultados:

Aceleración de la reepitelización de heridas de espesor parcial / sitios donantes de injertos de piel en seres humanos con TGF- β_3 .

El análisis macroscópico, valorado usando fotografías de los sitios afectados, demostró que el TGF- β_3 aceleró de forma marcada la promoción de la regeneración epidérmica, aumentando la velocidad de reepitelización en sitios donantes de injertos de piel de espesor parcial, comparada con la velocidad observada en controles tratados con placebo, hasta el día 8 después de la lesión.

La Figura 3 muestra fotografías que ilustran la apariencia macroscópica, y por ende el avance de la regeneración epitelial, en heridas de piel de espesor parcial en el curso de 21 días desde el momento de la lesión. Las fotografías que demuestran la promoción de la regeneración epitelial están marcadas con un asterisco (*) en la Figura 3.

Se puede observar que en los días 15 y 21 después de la lesión la diferencia entre las heridas tratadas y sin tratar con TGF- β_3 / herida tratada con placebo es menos clara desde el punto de vista macroscópico. Este efecto se explica por el hecho de que los sitios tratados con TGF- β_3 se encuentran totalmente reepitelizados en o antes de día 8, mientras que los sitios tratados con placebo sólo alcanzan el mismo grado de reepitelización alrededor del día 15.

CONCLUSIONES (EJEMPLOS 1 y 2)

Los resultados que se acaban de describir demuestran de forma sorprendente que un miembro específico de la familia del TGF- β , el TGF- β_3 , es capaz de promover la regeneración epitelial. Este hallazgo contrasta de forma directa con lo que la persona versada en la técnica esperaría a la luz del estado de la técnica, dado que informes previos han sugerido que los miembros de la familia del TGF- β inhiben la regeneración de la epidermis en las heridas de la piel, y que la isoforma TGF- β_3 es el más potente inhibidor de este proceso. La promoción de la regeneración epitelial estimulada por el tratamiento con

43

TGF- β_3 se logra tanto en las heridas de espesor total como en las de espesor parcial (lo cual, por ejemplo, podría servir como sitios donantes de injertos de piel). Los efectos terapéuticos en los seres humanos se observan en el tratamiento con TGF- β_3 en dosis de hasta 500 ng/100 μ L del agente activo.

APÉNDICE

Formulaciones

En los siguientes apartes se dan detalles de las formulaciones empleadas en estudios clínicos para establecer la capacidad de los agentes que tienen actividad TGF- β_3 para promover la regeneración epitelial.

La sustancia medicamentosa TGF- β_3 empleada en los estudios se suministró a una concentración de 9,1 mg/mL en ácido acético 20 mM y alcohol isopropílico al 20%. Este material se diluyó de forma seriada para producir jeringas que contenían TGF- β_3 a las concentraciones declaradas en los datos del ejemplo. La persona versada en la técnica apreciará que, cualesquiera que sean los demás diluyentes que se usen para producir las soluciones final, las diluciones seriadas seguirán llevando niveles traza de ácido acético y alcohol isopropílico.

Al. Formulaciones empleadas en el tratamiento de la biopsia en sacabocados (heridas dérmicas de espesor total)

En los estudios de biopsias en sacabocados / heridas de espesor total, la sustancia medicamentosa se diluyó en PBS que contenía 5% p/v de manitol, y se ajustó hasta un pH de 3.8 usando ácido acético. Se encontró que esta formulación promovió efectivamente la regeneración epitelial.

Como alternativa a la formulación a base de manitol arriba descrita, también se preparó una formulación a base de maltosa (que se describe en más detalle adelante). De manera sorprendente se encontró que esta formulación de agentes de conformidad con la invención en combinación con maltosa redujo de forma radical el dolor asociado con la inyección de la composición. Los estudios realizados por los inventores demostraron clínicamente que el dolor asociado con la inyección de la formulación a base de manitol en el estudio de la biopsia en sacabocados estudio se alivió cuando los agentes de conformidad con la invención se formularon en presencia de azúcares, y en particular en presencia de concentraciones isotónicas de maltosa.

El análisis *in vitro* de la eficacia de las formulaciones a base de maltosa y a base de manitol reveló otra ventaja sorprendente de las composiciones que comprenden agentes activos de conformidad con la invención en combinación con maltosa. La investigación realizada usando un examen de ELISA y un examen de células del epitelio pulmonar del

44

visión para comparar la formulación PBS/manitol con la formulación maltosa 0,25M demuestra que la formulación de maltosa da lugar a un aumento de aproximadamente 4 veces en la actividad del TGF- β 3.

A2. Formulaciones empleadas en el tratamiento de sitios donantes de injertos de piel de espesor parcial:

Para este estudio se formuló el TGF- β 3 en maltosa 0,25M (es decir, 90 g de maltosa por litro de agua para inyección; equivalente a 9% (p/v) de maltosa en agua para inyección).

Esta formulación se aplicó tanto por vía intradérmica como por vía tópica para promover la regeneración epitelial.

REFERENCIAS:

Tomlinson A, Ferguson MW. Wound healing: a model of dermal wound repair. *Methods Mol Biol* 2003; 225: 249-260,

Davidson JM, Nanney LB, Broadley KN, Whitsett JS, Aquino AM, Beccaro M, Rastrelli A. Hyaluronate derivatives and their application to wound healing: preliminary observations. *Clin Mater*. 1991; 8(1-2):171-7.

Padock BDST, Schultz GS, Mast BA. Methods in reepithelialization. A porcine model of partial-thickness wounds. *Methods Mol Med*. 2003; 78:17-36.

Rakel BA, Bermel MA, Abbott LI, Baumler SK, Burger MR, Dawson CJ, Heinle JA, Ocheltree IM. Split-thickness skin graft donor site care: a quantitative synthesis of the research. *Appl Nurs Res*. 1998 Nov; 11 (4):174-82.

Reivindicaciones:

1. El uso de un agente que tiene actividad TGF- β 3 en la manufactura de un medicamento para la promoción de la regeneración epitelial.
2. El uso conforme a la reivindicación 1, en donde el agente es TGF- β 3.
3. El uso conforme a la reivindicación 1, en donde el agente es un fragmento, derivado o variante del TGF- β 3.
4. El uso conforme a la reivindicación 1, en donde el agente es una sustancia capaz de promover y/o imitar la actividad biológica del TGF- β 3.
5. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la regeneración epitelial tiene lugar en una herida aguda.
6. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la regeneración epitelial tiene lugar en un paciente joven y/o sano.
7. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el epitelio cuya regeneración se va a promover es un epitelio escamoso estratificado.
8. El uso conforme a la reivindicación 7, en donde el epitelio es la epidermis.
9. El uso conforme a la reivindicación 7, en donde el epitelio es el epitelio de la córnea.
10. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el epitelio es un epitelio respiratorio.
11. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el epitelio es el epitelio que reviste las cavidades abdominal, torácica o pélvica.
12. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el medicamento se usa para la promoción de la regeneración epitelial después de una lesión.
13. El uso conforme a la reivindicación 10, en donde el medicamento se usa para la promoción de la regeneración epitelial después de cirugía.
14. El uso conforme a la reivindicación 12, en donde la cirugía comprende injertos de epitelio.
15. El uso conforme a la reivindicación 14, en donde la cirugía comprende: i) extracción de injerto epitelial; ii) opcionalmente enmallado del injerto epitelial; y iii) aplicación del injerto a un sitio receptor.
16. El uso conforme a la reivindicación 14, en donde el medicamento es para administración al sitio donante de injerto.
17. El uso conforme a la reivindicación 14, en donde el medicamento es para administración al sitio receptor del injerto.

46

18. El uso conforme a la reivindicación 14, en donde el medicamento es para administración al injerto.
19. El uso conforme a cualquier de reivindicaciones 12 a 18, en donde la cirugía comprende injertos de piel.
20. El uso conforme a la reivindicación 19, en donde el injerto de piel es un injerto de piel de espesor total.
21. El uso conforme a la reivindicación 19, en donde el injerto de piel es un injerto de piel de espesor parcial.
22. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el medicamento es para la promoción de la regeneración epitelial después de una lesión por quemadura.
23. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el medicamento es para aplicación tópica.
24. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde el medicamento es para inyección local.
25. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde el medicamento es una crema o pomada.
26. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la promoción de la regeneración epitelial es profiláctica.
27. El uso conforme a cualquier de reivindicaciones 1 a 5, ó 7 a 26, para la preparación de un medicamento para promover una regeneración epitelial deteriorada, inhibida, retardada, o defectuosa por otra razón.
28. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 para la preparación de un medicamento para acelerar la regeneración epitelial normal.
29. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la preparación de un medicamento para promover la regeneración epitelial en sujetos de edad avanzada.
30. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente se formula en presencia de maltosa.
31. El uso conforme a la reivindicación 30, en donde la maltosa está presente en una concentración de entre 0,1M y 0,4M.
32. El uso conforme a la reivindicación 30, en donde la maltosa está presente en una concentración de 0,25M.

Figura 1 (parte 1)

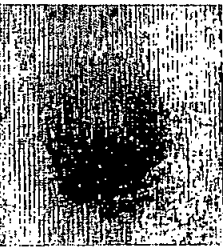
Ejemplos de Imágenes Macroscópicas e Histológicas de Heridas Tratadas con 50ng/100µL TGFβ3, Placebo o Cuidados Convencionales a 3 Días Posterior a la Lesión

Herida tratado con RN1001
Día 3, macroscópico



A

Herida tratada con placebo
Día 3, macroscópico



C

Herida tratada con
cuidados convencionales
Día 3, macroscópico



E

Herida tratada con RN1001
Día 3, Histología:



B

Herida tratada con placebo
Día 3, histología:



D

Herida tratada con
cuidados convencionales
Día 3, histología:



F

Reepitelización del 54%

Reepitelización del 20%

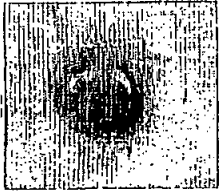
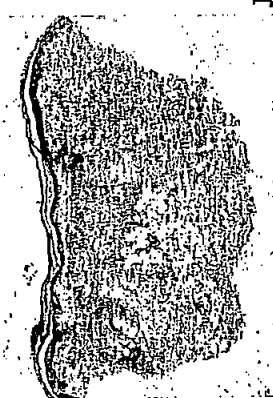
Reepitelización del 19%

(Nota: Las flechas se aprecian en las imágenes de histología indican el borde principal del epitelio)

48

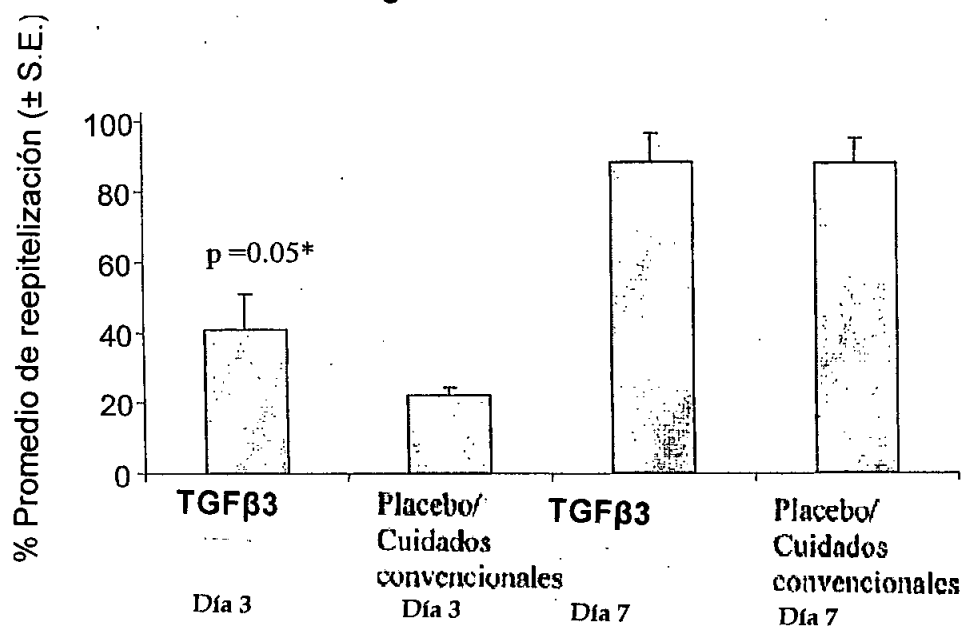
Figura 1 (parte 2)

Ejemplos de Imágenes Macroscópicas e Histológicas de Heridas Tratadas con 50ng/100µL TGFβ3, Placebo o Cuidados Convencionales a 7 Días Posterior a la Lesión

Herida tratado con RN1001 Día 7, macroscópico	 G	Herida tratada con placebo Día 7, macroscópico	 I	Herida tratada con cuidados convencionales Día 7, macroscópico	 K
Herida tratada con RN1001 Día 7, Histología:	 H	Herida tratada con placebo Día 7, histología:	 J	Herida tratada con cuidados convencionales Día 7 histología:	 L
Reepitelización del 100%		Reepitelización del 100%		Reepitelización del 100%	

49

Reepitelización de Heridas Tratadas con 50 ng/100µL de TGFβ3, Placebo o Cuidados Convencionales a los 3 y 7 Días Después de la Lesión Mediante el Análisis de Imágenes de Cortes Histológicos.

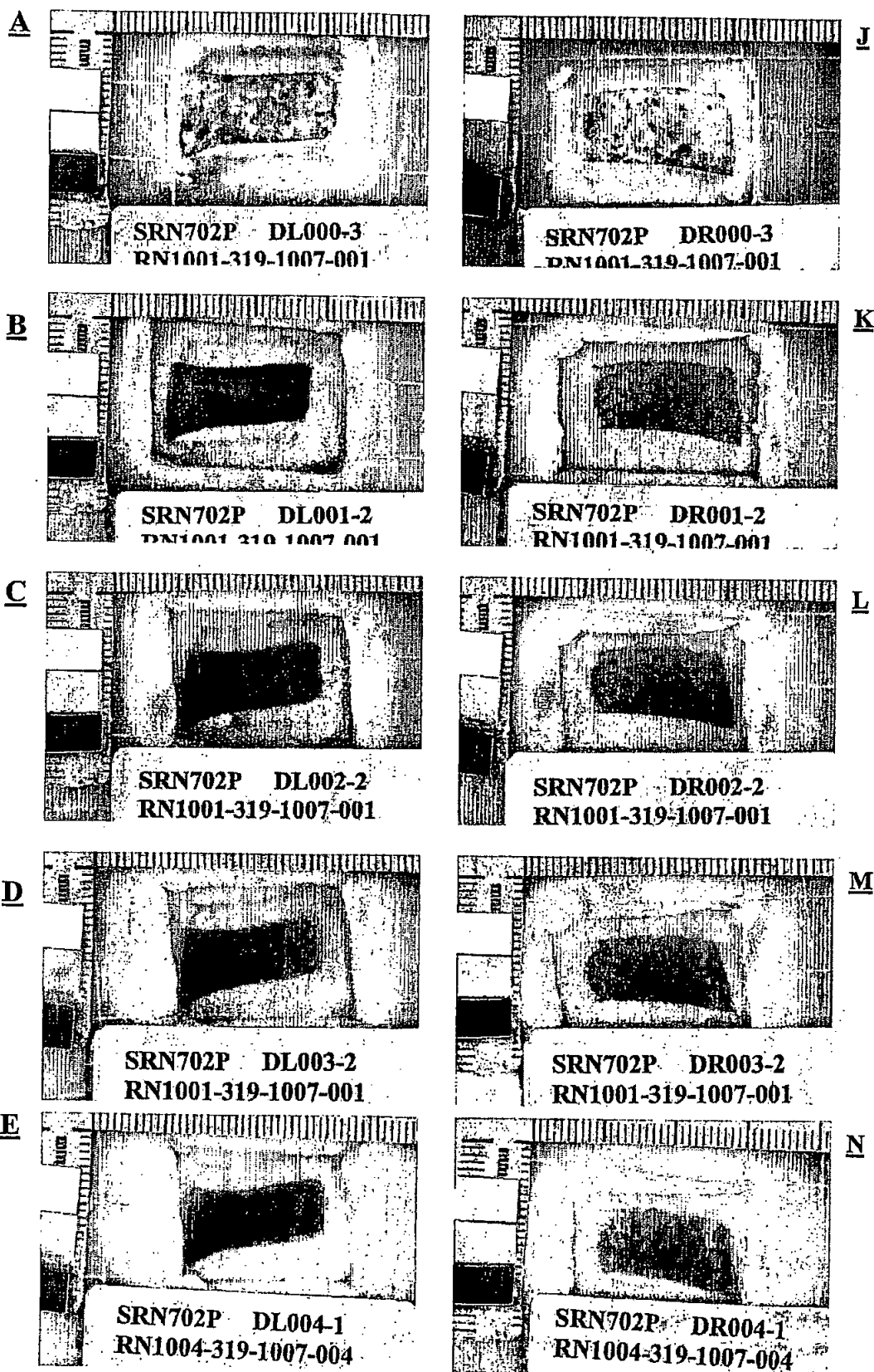


*significativo con prueba t no pareada

Figura 2

50

Figura 3 (parte 1)



51

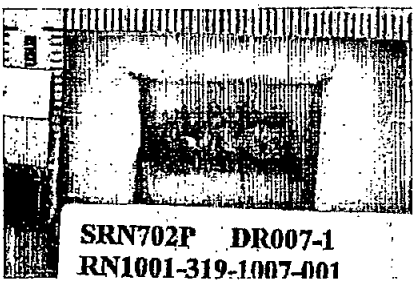
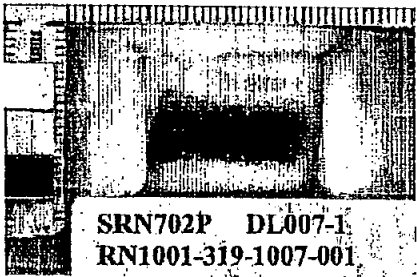
TRATADO CON
PLACEBO

Figura 3 (Parte 2)

TRATADO CON
TGFβ3

Día 7
Posterior a
La Lesión

F

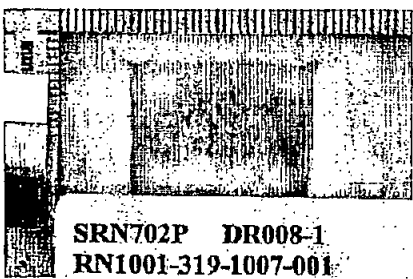
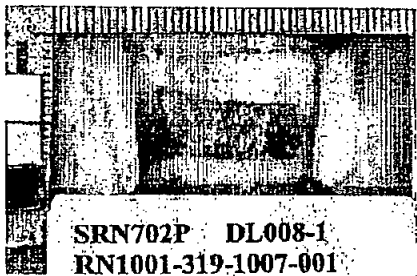


O

Día 7
Posterior a
La Lesión
(*)

Día 8
Posterior a
La Lesión

G

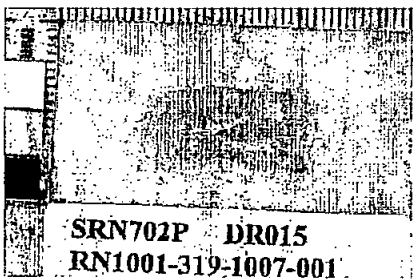
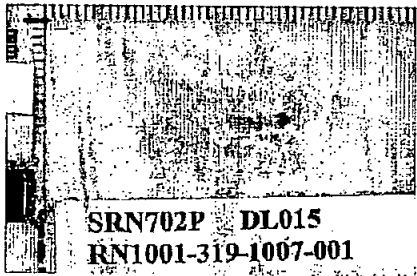


P

Día 8
Posterior a
La Lesión
(*)

Día 15
Posterior a
La Lesión

H

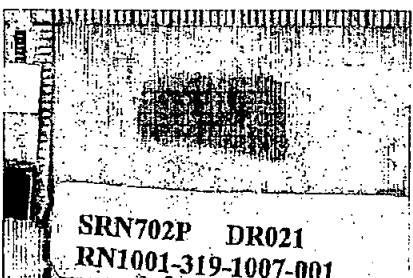
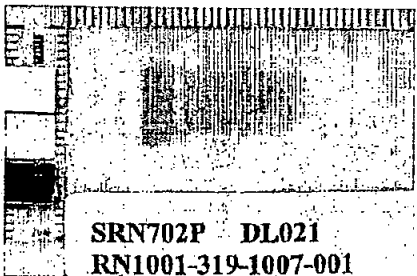


Q

Día 15
Posterior a
La Lesión

Día 21
Posterior a
La Lesión

I



R

Día 21
Posterior a
La Lesión

PROMOTION OF EPITHELIAL REGENERATION.

The present invention relates to the manufacture of medicaments for the promotion of epithelial regeneration. It also provides a method of promoting epithelial regeneration in an individual in need of such promotion.

The body comprises many different types of epithelia, the structures and complexity of which vary depending on their location, role, and function.

The most basic form of epithelium is the simple epithelium, which comprises a single layer of epithelial cells. An example of a form of simple epithelium is simple squamous epithelium, which comprises a single layer of flattened scale-like cells. Examples of simple squamous epithelia in the body include mesothelium, endothelium, and the lining of pulmonary alveoli.

Another common form of epithelium is the stratified epithelium. This comprises a series of layers, and the cells of different layers may vary in size, shape and function. Stratified epithelia may be further characterised with reference to the type of cells located at their surface.

By way of example, stratified squamous epithelia have scale-like (squamous) cells located at their surface. The shape of the cells comprising stratified squamous epithelia may vary with different locations within the epithelium. Whilst cells located at the upper surface of the epithelium generally have a flattened scale-like conformation, those towards the base of the epithelium may tend to have a polyhedral shape. Epithelial cells may be structurally fortified by the presence of keratin, and the quantity of this molecule present tends to increase with increasing height within the epithelia. Stratified squamous epithelia typically comprise several layers of keratin-containing cells. The types of keratin molecule present may vary by both cell layer and body site.

The most prominent of the body's epithelia is the epidermis, the stratified squamous epithelial layer that covers the skin. The epidermis, by virtue of its location, is the tissue most frequently in contact with the external environment, and as a result is the tissue most frequently exposed to environmental, and other, damage.

Further examples of stratified epithelia include stratified columnar epithelia, and stratified ciliated columnar epithelia, in which the uppermost layer of cells are columnar in shape, and provided with motile cilia.

Epithelia throughout the body are subject to many different forms of damage. Such damage may impair or entirely destroy the function of the epithelia injured, and the outcome of such damage depends on the nature and role of the epithelium affected. Accordingly the promotion of epithelial regeneration is advantageous in many different contexts. However, despite the desirability of the promotion of epithelial regeneration, there remains a requirement for further, and more effective, medicaments and methods by which such promoted regeneration may be attained.

There is significant variation in the range of therapies currently used to promote epithelial regeneration. For example, the management of split thickness skin graft donor sites (as reviewed in Rakel *et al.* 1998) may merely involve leaving the graft donor site exposed and untreated, or may alternatively make use of treatments such as the application of dressings (typically gauze dressings, which may be used alone or impregnated with a variety of anti-infective agents, alginates, hydrocolloids, synthetic composite membranes, transparent films or honey), application of artificial skin (which may be generated from the individuals own epidermis), application of allografts (typically bovine or porcine allografts) or application of ointments (typically ointments containing silver based compounds as anti-infective agents).

This absence of a single universally accepted therapy is indicative of the need for novel methods by which epithelial regeneration may be promoted. Furthermore, it is well recognised that there are many failings and disadvantages associated with current therapies.

54

The adverse effects associated with current treatments include protracted healing times at the graft donor and/or recipient sites, the development of replacement epithelium that may be rougher and/or thinner than that originally present, increased rates of infection, edema and erythema, hypertrophic scarring around the treatment site, risk of prion or viral infection from allograft material, the length of time taken to generate the treatment (in the case of artificial skin generation from the patients own cells) and pain associated with both donor and recipient sites.

It is an object of the present invention to provide new medicaments for the promotion of epithelial regeneration that overcome at least some of the disadvantages associated with the prior art.

According to a first aspect of the present invention there is provided the use of an agent having TGF- β_3 activity in the manufacture of a medicament for the promotion of epithelial regeneration.

The agent having TGF- β_3 activity may preferably be selected from the group comprising TGF- β_3 , biologically active fragments, variants and derivatives of TGF- β_3 , and substances able to promote and/or mimic the biological activity of TGF- β_3 .

The promotion of epithelial regeneration within the context of the present invention may be understood to encompass any increase in the rate of epithelial regeneration as compared to the regeneration occurring in a control-treated or untreated epithelium.

The rate of epithelial regeneration attained by methods in accordance with the invention may readily be compared with that taking place in control-treated or untreated epithelia using any suitable model of epithelial regeneration known in the art. For example, the rate at which sites of experimental epithelial damage having known areas regenerate may be compared using well known *in vivo* models in mice, rats, rabbits or pigs such as those described in Tomlinson and Ferguson (2003), Davidson *et al.* (1991) and Paddock *et al.* (2003).

In accordance with a second aspect of the invention there is provided a method of promoting epithelial regeneration, the method comprising administering a therapeutically effective amount of an agent having TGF- β_3 activity to a subject in need of such promotion.

In relation to this aspect of the invention a "therapeutically effective amount of an agent having TGF- β_3 activity" is an amount of an agent, having TGF- β_3 activity, that is sufficient to promote epithelial regeneration in the subject to whom the amount is administered.

As noted above, epithelia, and particularly the epidermis, suffer more direct, frequent, and damaging encounters with the external environment than any other tissue in the body. It is therefore highly desirable that the repair and renewal of epithelial tissues, such as the epidermis, be able to be influenced in order to ensure their maximum functional effectiveness. Indeed, although the methods and medicaments of the invention are suitable for the promotion of epithelial regeneration in all types of epithelia, and have been effective in all epithelia tested, the promotion of epidermal regeneration constitutes a particularly preferred application of the invention. Other preferred embodiments of the invention include the promotion of squamous epithelial regeneration, and/or the promotion of keratinised epithelial regeneration. It will be appreciated that the methods and medicaments of the invention may be of benefit to the epidermis covering the scalp.

The promotion of epithelial regeneration in accordance with the invention is able to bring about the formation of a functioning epithelial barrier over previously damaged or denuded areas. The epithelial barrier formed is able to prevent ingress into, and colonisation of, the underlying tissue by pathogens such as bacteria, fungi and viruses. Thus the promotion of epithelial regeneration may provide benefits in contexts in which it is desirable to prevent or reduce infection at sites where the epithelial layer has been breached.

56

The presence of an intact epithelial layer also acts as a barrier to fluid movement, and is therefore able to prevent desiccation of underlying tissue. Thus promotion of epithelial regeneration is able to prevent or reduce tissue desiccation arising as a result of fluid loss across a damaged or otherwise breached epithelial layer.

The present invention is based on the very surprising finding that epithelial regeneration may be stimulated by the provision of the cytokine TGF- β_3 , or an agent that shares the characteristic biological activity of TGF- β_3 . TGF- β s (which exist in three mammalian isoforms, TGF- β_1 , TGF- β_2 and TGF- β_3) have previously been thought to inhibit epithelial regeneration.

The inhibitory effects of TGF- β on epithelial regeneration have been reported based on both *in vitro* and *in vivo* assays. Studies of the effects of TGF- β isoforms on cultured keratinocytes (cutaneous epithelial cells) have suggested that, although TGF- β treatment increases keratinocytes' expression of integrins associated with migration, the rate of keratinocyte proliferation, which is necessary for epidermal regeneration, is considerably reduced. TGF- β -mediated inhibition of epithelial cell proliferation required for epithelial regeneration has also been reported using *in vivo* studies.

Although the reported inhibitory effects of TGF- β are exhibited by all isoforms there are differences in the relative potencies of the different isoforms. Studies have shown that TGF- β_3 is the most potent of the isoforms in its ability to inhibit DNA synthesis and proliferation in primary cultures of human keratinocytes, bringing about stronger inhibition than do either TGF- β_1 or TGF- β_2 .

In addition to studies using cultured cells, a number of *in vivo* studies have recently been undertaken, utilising specific compounds or genetic technologies to disrupt the TGF- β signalling pathway. These studies have further suggested that TGF- β s, and particularly TGF- β_3 , inhibit epithelial regeneration.

S

In contrast to the previously published reports, the inventors of the present application have now discovered that the application of an agent having TGF- β_3 activity to an epithelial tissue before or after damage to that tissue is able to promote the regeneration of the epithelial layer, rather than inhibiting such regeneration. Without wishing to be bound by any hypothesis the inventors believe that the promotion of epithelial regeneration is achieved by TGF- β_3 -mediated promotion of epithelial cell migration. The epithelial cells (the migration of which has been promoted) are thereby able to re-populate and regenerate the damaged epithelium more rapidly than occurs in the absence of agents having TGF- β_3 activity.

It will be appreciated that promotion of epithelial regeneration in accordance with the invention may be of use to induce effective re-epithelialisation in contexts in which invention may be of benefit in instances where the re-epithelialisation response is impaired, inhibited, retarded or otherwise defective. However, it is particularly preferred that the methods and medicaments of the invention are use in the promotion of epithelial regeneration may be also effected to accelerate the rate of normal epithelial regeneration responses in patients suffering from epithelial damage.

There are many contexts in which the body's re-epithelialisation response may be defective. For example, defective re-epithelialisation in the skin is associated with conditions such as pemphigus, Hailey-Hailey disease (familial benign pemphigus), toxic epidermal necrolysis (TEN)/Lyell's syndrome, epidermolysis bullosa, cutaneous leishmaniasis and actinic keratosis. Defective re-epithelialisation of the lungs may be associated with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) or interstitial lung disease. Defective re-epithelialisation of the eye may be associated with conditions such as partial limbal stem cell deficiency or corneal erosions. Defective re-epithelialisation of the gastrointestinal tract or colon may be associated with conditions such as chronic anal fissures (fissure in ano), ulcerative colitis or Crohn's disease, and other inflammatory bowel disorders.

The process of re-epithelialisation in response to dermal injuries may also be perturbed in many individuals. For example, it is well known that dermal injuries in

the aged exhibit less-vigorous epithelial regeneration than do those of younger individuals. There are also many other conditions or disorders that are associated with delayed or otherwise impaired epithelial regeneration in response to injury. For example patients with diabetes, patients with polypharmacy (for example as a result of old age), post-menopausal women, patients susceptible to pressure injuries (for example paraplegics), patients with venous disease, clinically obese patients, patients receiving chemotherapy, patients receiving radiotherapy, patients receiving steroid treatment or immuno-compromised patients may all suffer from impaired epithelial regeneration. In many such cases the lack of a proper epithelial regeneration response contributes to the development of infections at the wound site, and to retardation of the normal wound healing response that may lead to the formation of chronic wounds such as ulcers. Accordingly, it will be appreciated that epithelial promotion by the methods or medicaments of the invention will be of benefit to such patients.

Without detracting from the above, it may generally be preferred that promotion of epithelial regeneration in accordance with the invention may be effected in order to augment an ongoing re-epithelialisation response (i.e. to produce a greater maximal epithelial regeneration response than would normally be achieved without promotion). It will be appreciated that in this way sites of epithelial damage occurring in otherwise healthy subjects may be induced to regenerate more rapidly.

Much experimental and research effort has been expended on the identification and development of therapeutic agents and techniques that may be used to promote epithelial regeneration in those for whom the re-epithelialisation response is impaired. However, the group of patients who do not suffer from impaired re-epithelialisation constitutes a greater number of the total population covered by the healthcare services, and a far larger proportion of the working populace. The skilled person will immediately appreciate, therefore, that there is a great benefit to be gained by society from the development of therapeutic agents and techniques that can address the needs of these otherwise healthy patients. Accordingly, the promotion of epithelial regeneration in healthy patients is a preferred embodiment of all aspects of the present

invention. The promotion of re-epithelialisation of acute wounds (as opposed to chronic wounds) is also a preferred embodiment of all aspects of the invention.

For the purposes of the present invention, a chronic wound may be defined as any wound that does not show any healing tendency within eight weeks of formation when subject to appropriate (conventional) therapeutic treatment. Acute wounds may be any wound other than a chronic wound. Preferred acute wounds may be incisional wounds, of which surgical incisional wounds may be a particularly preferred group.

Epithelia, such as the epidermis or corneal epithelium, may be subject to damage as a result of many different types of insult. Epithelia may, for example, be injured as a result of physical insults or injuries, which include grazes, abrasions, wounds (both penetrating wounds and non-penetrating wounds), surgical incisions, and other surgical procedures (particularly partial thickness grafts of tissues such as the skin), "burns" (which, except for where the context requires otherwise, may be considered to include tissue damage resulting from exposure to either high or low temperature, chemical agents or radiation), and other forms of trauma.

The inventors have found that the medicaments and methods of the invention are particularly effective in the promotion of epithelial regeneration in response to injuries. These are exemplified, a particularly of benefit to, injuries to the skin, in which the epidermis is damaged. It will however be appreciated that the methods of the invention may also be applicable to other types of injury and wounds including injury, damage or trauma to epithelia such as the respiratory epithelia, or those surrounding internal tissues or organs. The epithelium regeneration of which is to be promoted may be an epithelium other than a digestive epithelium. For instance the epithelium may be other than the intestinal or gastrointestinal epithelium.

It is recognised that epithelial damage, and particularly epidermal damage, resulting from burns may extend over great areas of an individual so afflicted. As a result burn injuries are particularly susceptible to complications such as infection and desiccation

that arise due to lack of a functional epithelial layer. Accordingly, the promotion of epithelial regeneration in response to burn damage represents a preferred application of the invention.

The promotion of epithelial regeneration, for instance at the site of dermal injuries, brings about a rapid improvement in the cosmetic appearance of the injured area. Cosmetic considerations are important in a number of clinical contexts, particularly when epithelial damage occurs at prominent body sites such as the face, neck and hands. Consequently the promotion of epithelial regeneration at sites where it is desired to improve the cosmetic appearance of the damaged area represents a preferred embodiment of the invention.

Damage to epithelia may also arise as a result of the action of pathogens (such as bacteria, fungi, or viruses), chemical insults (such as chemical burns caused by caustic agents, or through the effect of cytotoxic drugs such as those employed in chemotherapy) or as a result of radiation damage (either through particulate radiation or electromagnetic radiation such as gamma radiation, ultraviolet radiation, or the like) such as that occurring in sunburn. Promotion of epithelial regeneration using methods and medicaments in accordance with the invention may be utilised effectively in all of the above-mentioned contexts.

It will be appreciated that many of the same considerations that arise in relation to epithelial damage in humans can also be problematic in other animals, particularly veterinary or domestic animals (e.g. horses, cattle, dogs, cats etc). Thus the methods of the invention may also be applicable to non-human animals.

The use of agents having TGF- β_3 activity to promote epithelial regeneration in response to damage associated with epithelial grafting procedures represents a preferred embodiment of the invention. Epithelial damage occurring as a result of skin grafts can be clinically problematic, in addition to cosmetic considerations.

Epithelial regeneration is of benefit both at the epithelial graft donor site, where it aids in the re-establishment of a functional epithelial layer, and also at the recipient site where regeneration is able to improve and accelerate integration of the grafted tissue. Epithelial regeneration at graft recipient sites is also advantageous in the case of grafts utilising skin, artificial skin, or skin substitutes.

Promotion of epithelial regeneration at epithelial graft donor sites decreases the time taken to restore a functioning epithelial layer, and consequently reduces the potential for donor site infection. The promotion of epithelial regeneration also decreases incidences of blistering and tissue breakdown that may otherwise occur at the donor site.

It is preferred that the epithelial grafts are epidermal (skin) grafts. The methods and medicaments of the invention have utility in promoting epithelial regeneration in the contexts of both full and partial thickness skin grafts. Such skin grafts (i.e. either full or partial thickness grafts) may be either meshed or unmeshed.

The inventors have found that the presence or absence of an intact epithelial layer is also a factor in determining the degree of pain associated with sites at which the epithelium has been damaged or removed, such as skin donor sites. Thus by promoting epithelial regeneration at such sites it is possible to reduce the pain associated with, for example, the taking of skin grafts.

A further advantage of promotion of epithelial regeneration at epithelial donor sites is that this decreases the time required until re-harvesting of tissue from the donor site can take place. By re-harvesting is meant the subsequent removal of further epithelial tissue from a previously used donor site. This is particularly advantageous in situations where the skin available for harvesting is limited and/or the area of skin required to be harvested is large. Examples of such situations include occasions when it is necessary to take grafts from children and/or patients suffering from burns covering a large percentage of the body surface.

Accordingly, in a third aspect of the invention there is provided a method of preparing an epithelial graft donor site for re-harvesting, the method comprising administering to an epithelial donor site in need of such preparation a therapeutically effective amount of an agent having TGF- β_3 activity. In the context of this aspect of the invention a "therapeutically effective amount" is an amount of an agent having TGF- β_3 activity sufficient to promote epithelial regeneration to such an extent that further epithelial grafts may be taken from the donor site. It will be appreciated that the decision as to whether a donor site is sufficiently regenerated to allow re-harvesting will normally be one undertaken by a competent physician, and that such a person will have access to a wealth of guidance, both by way of relevant texts and their own experience, to indicate how soon such re-harvesting may normally be undertaken without the benefit of preparation in accordance with the invention.

The inventors have found that the promotion of epithelial regeneration brought about by agents having TGF- β_3 activity may be effected using TGF- β_3 itself, biologically active fragments, variants and derivatives of TGF- β_3 , and substances able to promote or mimic the biological activity of TGF- β_3 . Suitable biologically active fragments, variants and derivatives of TGF- β_3 may readily be identified by their ability to replicate the effects of TGF- β_3 *in vivo* or *in vitro*. TGF- β_3 activity may be assessed *in vivo* using suitable animal models in which the rate of epithelial regeneration occurring in areas of epithelial damage treated with test compounds may be compared with the rate of epithelial regeneration occurring in control areas of epithelial damage. Suitable animal models may include partial thickness or full thickness wounds of tissues containing an epithelial layer (such as the epidermis of skin).

The skilled person will appreciate that when assessing the rate of epithelial regeneration (for example, in order to identify whether or not regeneration has been promoted) the relevant parameter to be considered is the extent of epithelial coverage achieved. Care should be taken to differentiate such epithelial coverage from other factors, such as the amount of granulation tissue (or other materials such as matrix associated with clot formation) present in a wound. Granulation tissue of this sort

may contribute to wound closure, by filling a wound void or the bed of a wound, but does not contribute to epithelial regeneration, since it is essentially composed of non-epithelial cell types. In the case of analysis of wounds (such as skin wounds) epithelial cells may typically be identified by virtue of their flattened morphology (as opposed to "spindle" shaped fibroblasts, or rounded cells of the inflammatory response).

The amino acid sequence of native human TGF- β_3 is provided as Sequence ID No. 1 below:

ALDTNYCFRN	LEENCCVRPL	YIDFRQDLGW
KWVHEPKGY	ANFCSGPCPY	LRSADTTTST
VLGLYNTLNP	EASASPCCVP	QDLEPLTILY
YVGRTPKVEQ	LSNMVVKSC	CS

(Sequence ID No. 1)

The prior art contains a number of variant forms of TGF- β_3 that are suitable for use in the methods and medicaments of the invention. For example, EP-A-0 684 260 describes a polypeptide comprising a modified form of TGF- β_3 having suitable biological activity for use in accordance with the present invention, as well as nucleic acids encoding the same. The disclosures of EP-A-0 684 260 represent preferred polypeptides and nucleic acids for use in accordance with the present invention.

Variants of TGF- β_3 that may be used in accordance with the invention include proteins containing conserved amino acid substitutions that retain the biological activity of TGF- β_3 as characterised by its ability to promote epithelial regeneration. It is preferred that conserved substitutions may be substitutions designed to remove protease cleavage sites, or other peptide structures that may be involved in the degradation or clearance of TGF- β_3 . Further details of variants and derivatives of TGF- β_3 that may be employed in the medicaments and methods of the invention are provided below.

64

Suitable variant forms of TGF- β_3 may be ones in which certain of the native amino acids are replaced with amino acids having a side chain of similar biophysical properties to the amino acid it substitutes, to produce a conservative change. For example small non-polar, hydrophobic amino acids include glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, and methionine. Large non-polar, hydrophobic amino acids include phenylalanine, tryptophan and tyrosine. The polar neutral amino acids include serine, threonine, cysteine, asparagine and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include lysine, arginine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid.

Other modifications in protein sequences such as those which occur during or after translation, e.g. by acetylation, amidation, carboxylation, phosphorylation, proteolytic cleavage or linkage to a ligand may provide further variant forms of TGF- β_3 suitable for use in the medicaments and methods of the invention.

Derivatives of TGF- β_3 suitable for use in the methods and medicaments of the invention may include derivatives that increase or decrease the TGF- β_3 's half-life *in vivo*. Examples of derivatives capable of increasing the half-life of TGF- β_3 include peptoid derivatives of TGF- β_3 , D-amino acid derivatives of TGF- β_3 , and peptide-peptoid hybrids.

It will be appreciated that, since TGF- β_3 and its fragments (as well as many of the possible variants and derivatives thereof) are proteins or may contain peptidyl components, they may be subject to degradation by a number of means (such as protease activity in biological systems). Such degradation may limit the bioavailability of the polypeptides and hence the ability of the polypeptides to achieve their biological function. There are wide ranges of well-established techniques by which peptide derivatives that have enhanced stability in biological contexts can be designed and produced. Such peptide derivatives may have improved bioavailability as a result of increased resistance to protease-mediated degradation. Preferably, a

peptide derivative or analogue suitable for use according to the invention is more protease-resistant than the peptide from which it is derived.

Preferably, TGF- β_3 , its variants or fragments, may be made more protease-resistant by protecting the N and/or C terminal. For example, the N terminal may be protected by an acetyl group. The C terminal may be protected by an amide group.

Protease-resistance of a derivative of TGF- β_3 may be compared with protease-resistance of TGF- β_3 itself by means of well-known protein degradation assays described in the prior art.

Peptoid derivatives of TGF- β_3 may be readily designed from knowledge of TGF- β_3 's structure. Commercially available software may be used to develop peptoid derivatives according to well-established protocols.

Retropeptoids, (in which all amino acids are replaced by peptoid residues in reversed order) are also able to mimic the epithelial regeneration promoting properties of TGF- β_3 . A retropeptoid is expected to bind in the opposite direction in the ligand-binding groove, as compared to a peptide or peptoid-peptide hybrid containing one peptoid residue. As a result, the side chains of the peptoid residues are able to point in the same direction as the side chains in the original peptide.

D-amino acid forms of TGF- β_3 constitute a further embodiment of a derivative of TGF- β_3 suitable for use in accordance with the methods and medicaments of the invention. In this case, the order of the amino acid residues comprising the derivative is reversed as compared to the original TGF- β_3 . The preparation of derivatives using D-amino acids rather than L-amino acids greatly decreases any unwanted breakdown of such an agent by normal metabolic processes, decreasing the amounts of agent which need to be administered, along with the frequency of its administration.

It will be appreciated that, in order to constitute a biologically active fragment, variant, or derivative of TGF- β_3 suitable for use in accordance with the methods and medicaments of the invention a fragment, variant, or derivative must retain the epithelial regeneration promoting activity of TGF- β_3 .

TGF- β_3 (or biologically active fragments, variants, or derivatives thereof) may be provided for use in the methods or medicaments of the invention in an active or inactive form. TGF- β_3 may be inactivated by any of a number of mechanisms, for example, by encapsulation. Capsules may be degradable by an external stimulus to release the active agent when required. External stimuli suitable for use in this manner include UV light, ultrasound, *in vivo* enzymes or heat.

TGF- β_3 may also be provided as an inactive precursor, which may be activated upon contact with tissue containing the natural cleavage enzymes required to convert the precursor into its active form. The amino acid sequence of a naturally occurring precursor of human TGF β_3 is provided as Sequence ID No. 2 below:

MKMHLQRALV	VLALLNFATV	SLSLSTCTTL
DFGHIKKKRV	EAIRGQILSK	LRLTSPPEPT
VMTHVPYQVL	ALYNSTRELL	EEMHGEREEG
CTQENTESEY	YAKEIHKFDM	IQGLAEHNEL
AVCPKGITSK	VFRFNVSSVE	KNRTNLFRAE
FRVLRVPNPS	SKRNEQRIEL	FQILRPDEHI
AKQRYIGGKN	LPTRGTAEWL	SFDVTDTVRE
WLLRRESNLG	LEISIHCPCH	TFQPNGDILE
NIHEVMEIKF	KGVDNEDDHG	RGDLGRLKKQ
KDHHNPHLIL	MMIPPHRLDN	PGQGGQRKKR
ALDTNYCFRN	LEENCCVRPL	YIDFRQDLGW
KWVHEPKGYG	ANFCSGPCPY	LRSADTTHST
VLGLYNTLNP	EASASPCCVP	QDLEPLTILY
YVGRTPKVEQ	LSNMVVKSC	CS

67

(Sequence ID No. 2)

Inactivation may, alternatively be achieved by the molecular addition of a binding molecule. The binding molecule may be detachable when required by an external stimulus such as UV light, ultrasound, *in vivo* enzymes or heat.

Suitable peptides for use in the production of inactive TGF- β_3 are well known in the art, since TGF- β s are often secreted from cells in an inactive form known as latent TGF- β . Latent TGF- β consists of an N terminal Latency Associated Peptide (LAP) and the TGF- β and is also referred to as the Small Latent Complex. Additionally the Small Latent Complex can bind to another peptide (derived from a different gene) of variable size called Latent TGF- β Binding Protein (LTBP) in which case the entire complex is known as the Large Latent TGF- β Complex.

Latent TGF- β is activated when the TGF- β is caused to be dissociated from the LAP. This dissociation may be co-ordinated at a mannose-6-phosphate / Insulin Like Growth Factor II receptor (M6P-R) and involve proteases such as plasmin, the substrates being associated at the cell surface by tissue transglutaminase. Free radicals and reactive oxygen species can also activate TGF- β by causing dissociation from the LAP.

The invention also encompasses the use of substances capable of promoting or mimicking the biological activity of TGF- β_3 for the manufacture of a medicament for promoting epithelial regeneration.

Substances capable of promoting or mimicking the biological activity of TGF- β_3 may achieve their effect by a number of means. For instance, such substances may increase the expression of TGF- β_3 , or they may increase the half-life of TGF- β_3 , for example by decreasing turnover of TGF- β_3 . Examples of substances capable of promoting or mimicking the biological activity TGF- β_3 include both proteinaceous and non-proteinaceous substances. For example, such substances capable of promoting or

68

mimicking the biological activity of TGF- β_3 include transcription factors regulating TGF- β_3 activity, activating antibodies capable of mimicking the biological activity of TGF- β_3 , small inorganic molecules that replicate the receptor-binding effects of TGF- β_3 , as well as substances able to induce intracellular signaling cascades that retain the characteristics of those generated on receptor binding of TGF- β_3 .

Preferably the promotion of epithelial regeneration may give rise to a rate of epithelial regeneration that is at least 5%, 10%, 20% or 30% greater than the regeneration occurring in a control-treated or untreated epithelium. More preferably promoted epithelial regeneration may give rise to a rate of epithelial regeneration that is at least 40%, 50% or 60% greater than regeneration occurring in a control-treated or untreated epithelium. It is even more preferred that promoted epithelial regeneration may give rise to a rate of epithelial regeneration that is at least 70%, 80%, or 90% greater than regeneration occurring in a control-treated or untreated epithelium, and most preferably promoted epithelial regeneration may give rise to a rate of epithelial regeneration that is at least 100% greater than regeneration occurring in a control-treated or untreated epithelium.

Preferably the promotion of epithelial regeneration may give rise to a time to re-epithelialise 1 day, 2 days, or 3 days faster than that occurring in a control-treated or untreated epithelium. More preferably promoted epithelial regeneration may give rise to a time to re-epithelialise that is at least 4 days, 5 days or 6 days faster than that occurring in a control-treated or untreated epithelium. It is even more preferred that promoted epithelial regeneration may give rise to a time to re-epithelialise that is at least 7 days, 8 days or 9 days faster than that occurring in a control-treated or untreated epithelium, and most preferably promoted epithelial regeneration may give rise to a time to re-epithelialise that is at least 10 days or greater than that occurring in a control-treated or untreated epithelium.

With respect to the time to re-harvesting of epithelium, for example from donor sites for split thickness skin grafts, preferably the promotion of epithelial regeneration may

give rise to a time to re-harvesting that is 1 day, 2 days, or 3 days faster than that occurring in a control-treated or untreated epithelium. More preferably promoted epithelial regeneration may give rise to a time to re-harvesting that is at least 4 days, 5 days or 6 days faster than that occurring in a control-treated or untreated epithelium. It is even more preferred that promoted epithelial regeneration may give rise to a time to re-harvesting that is at least 7 days, 8 days or 9 days faster than that occurring in a control-treated or untreated epithelium, and most preferably promoted epithelial regeneration may give rise to a time to re-harvesting that is at least 10 days or greater than that occurring in a control-treated or untreated epithelium.

Medicaments in accordance with the invention may provide therapeutically effective amounts of agents in accordance with the invention suitable for promoting epithelial regeneration. The inventors have found that such medicaments are able to promote epithelial regeneration when administered either prior to epithelial damage, or once such damage has already occurred.

The prophylactic use of agents in accordance with the invention to promote epithelial regeneration is a preferred mode of use in accordance with the invention. It will be appreciated that such use is most suitable in the case where the time and location of prospective epithelial damage is known, for example damage occurring as a result of elective procedures, but pre-treatment with agents in accordance with the invention is also considered in situations where there is a likelihood of epithelial damage arising. The inventors have found that administration of agents in accordance with the invention immediately prior to epithelial damage (i.e. in the hour, or preferably half hour, preceding the occurrence of damage) is highly effective, though administration at earlier times (e.g. up to 24 or 48 hours before epithelial damage) is also effective. The prophylactic use of uses, methods and medicaments in accordance with the invention is a preferred embodiment of the invention, and is particularly preferred in the preparation of skin graft donor and/or recipient sites.

Agents in accordance with the invention are also effective in promoting epithelial regeneration when administered after epithelial damage has occurred. It is preferred

20

that such administration should occur as early as possible after the initiation of damage, but agents in accordance with the invention are able to promote epithelial regeneration at any time up until full restoration of the damaged epithelium has taken place. It will be appreciated that the "window" in which agents in accordance with the invention may be effectively administered such that they are able to promote epithelial regeneration is dependent on a number of factors, including the nature of the epithelium in question (including the epithelium's natural rate of repair), the degree of damage that has occurred, and the size of the damaged area. Thus in the case of a large area of epithelial damage, or in the case of damage to an epithelium that is naturally slow to regenerate, agents in accordance with the invention may be still be effectively administered relatively late in the regeneration response. Agents in accordance with the invention may, for instance, preferably be administered within the first one to 24 hours after epithelial damage has occurred, but may still achieve beneficial promotion of epithelial regeneration if administered up to ten, or more, days after the initiation of damage.

Promotion of epithelial regeneration may be achieved by repeated administration of agents in accordance with the invention at sites of epithelial damage. For instance therapeutically effective amounts of agents in accordance with the invention may be administered to damaged epithelia as required until full epithelial regeneration has been achieved. By way of example agents in accordance with the invention may be administered daily or twice daily to a site of epithelial damage for at least the first three days following the occurrence of the damage.

Most preferably agents in accordance with the invention are administered both before and after incidences of epithelial damage. The inventors have found that administration of agents in accordance with the invention immediately prior to epithelial damage, followed by daily administration of such agents for the three days following epithelial damage, is particularly effective in promoting epithelial regeneration.

21

It will be appreciated that the amount of an agent in accordance with the invention to be applied to a site of epithelial damage depends on a number of factors such as the biological activity and bioavailability of the agent, which in turn depends on the mode of administration and the physicochemical properties of the agent. Other factors may include:

- A) The half-life of the agent in the subject being treated.
- B) The specific condition to be treated.
- C) The age of the subject.

The frequency of administration will also be influenced by the above mentioned factors and particularly the half-life of the chosen agent in accordance with the invention within the subject being treated.

Generally when agents in accordance with the invention are used to treat existing sites of epithelial damage the agent should be administered as soon as the epithelial damage has occurred or has been diagnosed. Therapy with agents in accordance with the invention should continue until the damaged epithelium has regenerated to a clinician's satisfaction.

Frequency of administration will depend upon the biological half-life of the agent in accordance with the invention used. Typically a cream or ointment containing an agent in accordance with the invention should be administered to a target tissue such that the concentration of the agent at the site of epithelial damage is maintained at a level suitable for having a therapeutic effect. This may require administration daily or even several times daily.

Therapeutically effective amounts of agents in accordance with the invention, for instance in the form of medicaments in accordance with the invention, may be administered by any suitable route capable of achieving the desired effect of promoting epithelial regeneration, but may preferably be administered locally at sites of epithelial damage.

The inventors have found that epithelial regeneration may be effectively promoted by the administration of an agent in accordance with the invention (particularly TGF- β_3) in the form of injections at sites of epithelial damage. For instance, in the case of damage to the epidermis, the agent in accordance with the invention may be administered by means of intradermal injection. Thus a preferred composition of the invention comprises an injectable solution of an agent in accordance with the invention (e.g. for injection around the margins of a site of epithelial damage or a site likely to be damaged). Suitable formulations for use in this embodiment of the invention are considered in the Appendix below.

Alternatively, or additionally, an agent in accordance with the invention may also be administered in a topical form to promote epithelial regeneration. Such administration may be effected as part of the initial and/or follow up care for the damaged area. Details of formulations suitable for topical administration are set out later. Topical formulations may be applied by injection onto the wound surface, by aerosol spray and also by application onto the surface of the wound under an occlusive or semi-occlusive dressing e.g., Opsite, Bioclusive, Tegaderm or the like.

The inventors find that the promotion of epithelial regeneration in accordance with the present invention is particularly improved by topical application of an agent in accordance with the invention to damaged epithelia (or, in the case of prophylactic application, to epithelia that are to be damaged).

It is preferred that compositions containing agents in accordance with the invention are formulated such that they additionally comprise a sugar. The sugar may preferably be selected from the group comprising maltose, mannose, sucrose and glucose. It is particularly preferred that the sugar is maltose. The sugar, such as maltose, may be present in sufficient quantity that the composition is substantially isotonic having regard to the site at which the composition is to be administered.

The inventors have found that the use of sugars such as maltose in formulations provides a marked and surprising improvement in terms of both the amount of active

material that can be recovered from vessels containing TGF- β_3 (e.g., pre-filled syringes) and the inherent biological activity of the TGF- β_3 molecule. With respect to the recovery of TGF- β_3 material, formulation in maltose resulted in a 4-fold increase in recoverable material (as measured by ELISA) compared to a mannitol-based formulation. With respect to the inherent biological activity of TGF- β_3 , formulation in maltose resulted in a 4-fold increase in activity (IC₅₀ in the Mink Lung Epithelial Cell assay of 7.309 [$\pm$ 1.044] pg/mL) compared to the mannitol formulation (IC₅₀ in the Mink Lung Epithelial Cell assay of 30.104 [$\pm$ 7.093] pg/mL).

The use of compositions in which agents in accordance with the invention are formulated in the presence of sugars such as maltose are particularly preferred in contexts where the compositions are to be administered by means of injection. The inventors have surprisingly found that the use of sugars such as maltose in such formulations provides notable advantages in terms of reduced levels of pain experienced by those receiving injections of the compositions, as compared to formulations in which other tonicity buffering agents (such as mannitol) are used.

Indeed, so beneficial are compositions comprising active agents in accordance with the invention and sugars such as maltose that they constitute a separate aspect of the invention. Accordingly, in a fourth aspect of the invention there is provided a composition comprising an agent having TGF- β_3 activity formulated in the presence of a sugar selected from the group comprising maltose, mannose, sucrose and glucose. It is preferred that the sugar comprises maltose.

Suitable compositions for use in accordance with any of the preceding aspects of the invention may comprise active agents formulated in the presence of a sugar such as maltose at a concentration of between 0.1M and 0.4M of the sugar. More preferably suitable formulations may comprise the active agents formulated in the presence of 0.25M sugar.

Compositions comprising active agents in accordance with the invention may take a number of different forms depending, in particular, on the manner in which they are to

74

be used. Thus, for example, they may be in the form of a liquid, ointment, cream, gel, hydrogel, powder or aerosol. All of such compositions are suitable for topical application to a damaged epithelium, which is a preferred means of administering agents in accordance with the invention to a subject (person or animal) in need of treatment.

In a preferred embodiment therapeutic formulations of the agents of the invention suitable for localised parenteral administration (e.g. intradermal and sub-cutaneous) may be prepared by mixing the agent (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, non-aqueous and aqueous solutions, non-aqueous and 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, buffers such as phosphates, citrates, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; tonicity modifiers such as sodium chloride, glucose, glycerol, and alike; 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 (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; other sugars such as sucrose, mannitol, maltose, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); anionic surfactants such as fatty acid soaps, acyl sulphates, 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.

A pharmaceutical formulation example of a sterile solution for localised parenteral administration of the present invention, in addition to the active agents, may optionally or additionally include the following:

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))

1 to 10 w/v % maltose (although another suitable sugar may be used in the alternative), and

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

It will be readily appreciated by the skilled person that a lyophilised (freeze-dried) powder 'cake' may be prepared based on the above solution.

Preferred embodiments of the invention may be presented in the form of a vial, an ampoule, or a pre-filled syringe of either; a sterile solution; a sterile lyophilised (freeze-dried) powder suitable for reconstitution; a sterile suspension or any other pharmaceutically acceptable form of presentation suited to localised parenteral drug delivery.

In a further preferred embodiment of the invention therapeutic formulations of the agents of the invention suitable for topical administration may be prepared by mixing the substance 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,

76

saline, phosphate-buffered saline (PBS) Ringer's solution, Ringer's-lactate solution, dextrose solutions, dextrose/saline solution, hydro-alcoholic solutions, glucose, sucrose, dextran, mannose, mannitol, maltose, sorbitol, 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. One 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, 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 one may incorporate or encapsulate the therapeutic compound of the invention in a suitable polymer matrix or membrane, thus providing a sustained-release delivery device suitable for placement on, or implantation near, the site to be treated.

A pharmaceutical formulation example of a semi-solid hydrogel formulation for topical administration of the present invention, in addition to the active ingredient/s, may include the following:

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

0.1% w/v to 1.0% w/v Carbopol 934™ (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 compositions for topical application in accordance with the invention (including those compositions in which active agents in accordance with the invention are formulated in the presence of maltose) may be presented in the form of a bottle, a jar, a tube, a spray, of, either; a sterile solution; a sterile lyophilised (freeze-dried) or non-lyophilised powder for reconstitution, a sterile dispersion/suspension, a sterile semi-solid, or any other pharmaceutically acceptable form of presentation suited to topical drug delivery.

The agents in accordance with the invention may be provided on a sterile dressing or patch, which may be used to cover a site of epithelial damage to be treated.

It will be appreciated that the vehicle of the composition comprising agents in accordance with the invention should be one which is well tolerated by the patient and allows release of the agent to the site of epithelial damage. Such a vehicle is preferably biocompatible, biodegradable, bioresorbable, bioresolvable and/or non-inflammatory.

Compositions comprising agents in accordance with the invention may be used in a number of ways. Thus, for example, a composition may be applied in and/or around a site of epithelial damage to regulate epithelial regeneration. If the composition is to be applied to an "existing" site of epithelial damage, then the pharmaceutically acceptable vehicle will be one which is relatively "mild" i.e. a vehicle which is biocompatible, biodegradable, bioresolvable and non-inflammatory.

78

An agent in accordance with the invention, or a nucleic acid encoding such an agent, may be incorporated within a slow or delayed release device. Such devices may, for example, be placed on or inserted under the skin and the agent or nucleic acid may be released over days, weeks or even months. Such a device may be particularly useful for patients requiring long-term promotion of epithelial regeneration. The devices may be particularly advantageous when used for the administration of an agent or nucleic acid which would normally require frequent administration (e.g. at least daily administration by other routes).

Daily doses of an agent in accordance with the invention may be given as a single administration (e.g. a daily application of a topical formulation or a daily injection). Alternatively, the agent 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 optimal doses of an agent in accordance with the invention to a patient without the need to administer repeated doses.

In one embodiment a pharmaceutical vehicle for administration of an agent in accordance with the invention may be a liquid and a suitable pharmaceutical composition would be in the form of a solution. In another embodiment, the pharmaceutically acceptable vehicle is a solid and a suitable composition is in the form of a powder or tablet. In a further embodiment the agent in accordance with the invention may be formulated as a part of a pharmaceutically acceptable transdermal patch.

A solid vehicle can include one or more substances which may also act as flavoring agents, lubricants, solubilizers, suspending agents, fillers, glidants, compression aids, binders or tablet-disintegrating agents; it can also be an encapsulating material. In powders, the vehicle is a finely divided solid which is in admixture with the finely divided agent in accordance with the invention. In tablets, the agent in accordance with the invention is mixed with a vehicle having the necessary compression properties in suitable proportions and compacted in the shape and size desired. The powders and tablets preferably contain up to 99% of the agent in accordance with the

invention. Suitable solid vehicles include, for example, calcium phosphate, magnesium stearate, talc, sugars, lactose, dextrin, starch, gelatin, cellulose, polyvinylpyrrolidone, low melting waxes and ion exchange resins.

Liquid vehicles may be used in preparing solutions, suspensions, emulsions, syrups, elixirs and pressurized compositions. The agent in accordance with 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. 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 a halogenated hydrocarbon or other pharmaceutically acceptable propellant.

Liquid pharmaceutical compositions which are sterile solutions or suspensions can be utilized by for example, intramuscular, intrathecal, epidural, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous injection. Sterile solutions can also be administered intravenously and topically by aerosol spray or application below an occlusive or semi occlusive dressing. The agent in accordance with the invention may be prepared as a sterile solid composition e.g. by freeze drying or lyophilisation which may be dissolved or suspended at the time of administration using sterile water, saline, or other appropriate sterile injectable medium. Vehicles are intended to include necessary and inert binders, suspending agents, lubricants, flavorants, sweeteners, preservatives, dyes, and coatings.

80

In the situation in which it is desired to administer an agent in accordance with the invention by means of oral ingestion, it will be appreciated that the chosen agent will preferably be an agent having an elevated degree of resistance to degradation. For example, the agent in accordance with the invention may preferably not be a peptide, or may not have peptide components.

Compositions of agents in accordance with the invention are suitable to be used for reducing or controlling damage to the corneal epithelium (cells overlying the stromal cells of the cornea). Such damage 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). In this case the composition or medicament in accordance with the invention may be in the form of an eye drop. Although the compositions may be used in the cornea, the inventors believe that the methods of the invention may preferably be used in tissues, such as the skin or scalp, without stromal cells.

Agents in accordance with the invention may be used in a range of "internal" sites of epithelial damage (i.e. those sites of epithelial damage occurring within the body, rather than on an external surface). Thus for example, medicaments comprising agents in accordance with the invention may be formulated for inhalation for use in sites of epithelial damage arising in the lungs or other respiratory epithelia.

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 formulations of compositions comprising agents in accordance with the invention and precise therapeutic regimes for administration of such compositions (such as daily doses of the active agent and the frequency of administration).

Generally, compositions comprising agents in accordance with the invention should be formulated such that when administered to a site of epithelial damage a concentration of the agent of between 0.01nM and 10mM per cm² or linear cm is achieved at the site. Preferably, compositions comprising agents in

accordance with the invention should be formulated such that when administered to a site of epithelial damage a concentration of the agent between 0.1nM and 1mM per cm² or linear cm is achieved at the site. More preferably, compositions comprising agents in accordance with the invention should be formulated such that when administered to a site of epithelial damage a concentration of the agent between 0.1nM and 400μM per cm² or linear cm is achieved at the site.

Purely by way of example an injectable solution containing between 50ng/100μl and 500ng/100μl of an agent in accordance with the invention (such as TGF-β₃) is suitable for application to a site of partial thickness epidermal damage.

A suitable daily dose of an agent in accordance with the invention able to promote epithelial regeneration depends upon the factors discussed above as well as upon the size of the site of epithelial damage to be treated. Typically the amount of an agent in accordance with the invention required for the treatment of site of epithelial damage will be within the range of 0.01nM to 10mM of the agent per cm² or linear cm per 24 hours, depending upon the area of the site of epithelial damage amongst several other factors.

Agents in accordance with the invention may be used to promote epithelial regeneration as a monotherapy (i.e. use of the agent alone). Alternatively the uses, methods or medicaments of the invention may be used in combination with other compounds or treatments able to promote epithelial regeneration. For example the uses, methods or medicaments of the invention may be used in combination with dressings (which may include gauzes, synthetic composite membranes and/or transparent films, any of which may optionally be impregnated with anti-infective agents, alginates, hydrocolloids or honey), artificial skin (such as artificial skin generated from an individual's own epidermis, or commercially available equivalents) or ointments (such as those comprising silver-based anti-infective compounds). Two examples of commercially available artificial skins suitable for use in combination with the methods, uses or medicaments of the invention are available under the names Apligraf (Graftskin) and Dermagraft.

The uses, methods or medicaments of the invention are also suitable for use in combination with other conventional or developmental therapies. The following paragraphs contemplate examples of such therapies, and make reference to the indications in which use of combination therapies may be preferred.

When promoting epithelial regeneration in the context of wound healing (and particularly the healing of burns and skin ulcers) it may be preferred to combine the uses, methods or medicaments of the invention with debriding agents. Suitable examples of such agents may include enzymic agents such as collagenase (Smith & Nephew), chemical agents, surgical/mechanical agents or biological agents e.g. maggot therapy.

Alternatively or additionally, when promoting epithelial regeneration in wound healing it may be preferred to combine the uses, methods or medicaments of the invention with lytic peptides such as cytoporins. These peptides may incorporate into biological cell membranes thereby causing lysis of the cells. An example of a suitable cytoporin for use in combination therapy is HB-107 (produced by Helix BioMedix, Inc.).

Epithelial regeneration in wound healing (particularly of diabetics), epidermolysis bullosa and ocular diseases (including corneal wound healing) may be promoted by the use of thymosin beta-4 in combination with the uses, methods and medicaments of the invention. A recombinant form of thymosin beta-4 suitable for such use is produced by RegeneRx Biopharmaceuticals Inc.

Another agent suitable for use in combination therapy with the uses, methods or medicaments of the invention for the promotion of epithelial regeneration associated with wound healing and disorders of the skin such as ulcers is Pimilprost. This compound is a stable analogue of Prostaglandin I₁, and has biological activity as both an inhibitor of platelet aggregation and a vasodilator. Pimilprost suitable for use in

cf 3

combination with the claimed uses, methods and medicaments may be obtained from Sumitomo Pharmaceuticals Co. Ltd.

Epithelial regeneration in the oral cavity, for instance in the treatment of wounds or mouth ulcers, may be promoted by the combination of uses, methods and medicaments of the invention with mast cell degranulation inhibitors such as amlexanox (commercially available from Access Pharmaceuticals, Inc.).

Regeneration of epithelia damaged in wound healing or as a result of diabetic complications may also be promoted by the combination of uses methods and medicaments according to the present invention with heat shock protein-70 (HSP-70) or heat shock protein inducers, Bimoclomal, produced by Biorex Research and Development Co., represents a preferred example of a HSP inducer suitable for use in such combination therapy.

In order to promote epithelial regeneration in tissues such as the lining of the stomach (for example in the case of re-epithelialisation to promote healing of stomach ulcers), the epidermis, and corneal epithelium it may be preferred to combine the uses, methods and medicaments of the present invention with melanostatin analogues able to accelerate tissue regeneration. An example of a suitable analogue of this sort is Alaptid, which is available commercially from VUFB.

Another agent that may be advantageously used in combination with the uses, methods and medicaments of the invention is the enzyme heparinase III. Such combinations may preferably be used to promote epithelial regeneration associated with wound healing and the treatment of exterior ulcers (particularly diabetic ulcers). A suitable form of heparinase III for use in such combinations is produced by IBEX Technologies, Inc. under the designation IBT-9302.

The uses, methods and medicaments of the invention may additionally or alternatively be used in combination with the synthetic thrombin peptidomimetic Chrysalin produced by Chrysalis BioTechnology, Inc. Such combinations may be preferred for

84

the promotion of epithelial regeneration associated with wound healing and diabetic ulcers, particularly diabetic foot ulcers.

The promotion of epithelial regeneration at sites of burn damage may be effected by the uses, methods or medicaments of the invention in combination with PV-707, manufactured by GroPep Ltd. PV-707 is a peptide growth factor agonist.

Promotion of epithelial regeneration in wounds, and particularly burns, may be promoted by the use of synthetic dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) in combination with the uses, methods and medicaments of the invention. A form of synthetic DHEAS suitable for such use is manufactured by Pharmadigm Inc. under the name PB-005.

Epithelial regeneration in the treatment of dermatological disease and wound healing may be promoted by the uses, methods or medicaments of the invention in combination with recombinant lactoferrin. A suitable form of recombinant human lactoferrin is manufactured by Agennix Inc.

Another combination therapy suitable for the promotion of epithelial regeneration associated with the wound healing response lies in the combination of the uses, methods or medicaments of the invention with the provision of free deoxyribonucleosides. A suitable source of such deoxyribonucleosides is provided by PN-105, which comprises an equiweight mixture of these molecules in a gel base and is manufactured by Wellstat Therapeutics Corp.

There exists a range of methods and compositions designed to improve or augment epithelial regeneration that utilise growth factors other than TGF- β_3 . It will be appreciated that the uses, methods or medicaments of the invention may also be used in combination with these existing treatments. The following paragraphs provide further guidance as to how the present invention may be used in combination with other growth factor-based treatments.

The uses, methods and medicaments of the invention may be used in combination with members of the fibroblast growth factor (FGF) family. For instance, the present invention may be used in combination with basic FGF (FGF-2). This combination of the uses, methods or medicaments of the invention with FGF-2 may be particularly preferred in the promotion of epithelial regeneration following wound damage. Examples of wound sites that may benefit from such a combination include burns, graft donor sites, and chronic wounds such as ulcers (including non-healing ulcers such as diabetic ulcers or decubiti). The FGF-2 may preferably be recombinant FGF-2 (rFGF-2) and more preferably recombinant human FGF-2 (rhFGF-2). A suitable example of rFGF-2 suitable for use in accordance with this embodiment of the invention is that produced by Scios Inc. or Chiron.

Another member of the fibroblast growth factor family that may be used in combination with the uses, methods and medicaments of the invention to promote epithelial regeneration is FGF-10 (also known as keratinocyte growth factor-2 or KGF-2) to promote the regeneration of epithelia damaged as a result of wounding, complications of the dermal healing process (such as skin ulcers), diseases such as oral mucositis or ulcerative colitis, or gastrointestinal epithelial damage such as that occurring in Crohn's disease. A suitable form of FGF-10 suitable for use in combination with the uses, methods or medicaments of the invention is produced by Human Genome Sciences, Inc. under the name Repifermin.

The uses, methods and medicaments of the invention may also be used in combination with members of the platelet derived growth factor (PDGF) family. For example, the combination of the uses, methods or medicaments of the invention with PDGF-B may be of use in promoting epithelial regeneration in wound healing, and particularly the healing of burns wounds or diabetic foot ulcers. In one preferred embodiment of such combinations the PDGF-B to be used may preferably be delivered by means of an adenoviral vector. Selective Genetics, Inc. produces a suitable example of such an adenoviral vector under the name AdPDGF-B/GAM.

96

Another suitable combination utilises the uses, methods or medicaments of the invention in combination with PDGF-BB. An example of PDGF-BB which may be used in such a combination is commercially available under the name Regranex.

The combination of the uses, methods or medicaments of the invention with cytokine inhibitors may also be used to promote epithelial regeneration. Such combinations may, for instance, be used in promoting epithelial regeneration in response to injury, or to treat epithelial damage occurring as a result of diseases such as irritable bowel disease (IBD) or Crohn's disease. A suitable example of such an inhibitor is Semapimod (CNI-1493) a synthetic guanylylhydrazone MAPK inhibitor produced by the Picower Institute for Medical Research.

Agents according to the invention may alternatively or additionally be provided in combination with compounds able to inhibit protease activity. Protease inhibitors may be chosen on the basis of a broad spectrum of inhibitory activity, or for the ability to selectively inhibit proteases (or protease families) present at sites of epithelial damage. Proteases to be inhibited may include neutrophil elastase, matrix metalloproteinases, plasminogen activators (for example urokinase plasminogen activator or tissue plasminogen activator), plasmin, cathepsins, furin, and members of the "a disintegrin and a metalloproteinase" family such as ADAM or ADAM-TS. Suitable protease inhibitors may include peptide, protein, or small molecule inhibitors.

It will be appreciated that TGF- β_3 , its fragments, derivatives and variants, as well as agents capable of increasing the biological activity of TGF- β_3 may represent favourable agents to be administered by techniques involving cellular expression of nucleic acid sequences encoding such molecules. Such methods of cellular expression are particularly suitable for medical use in which the therapeutic effects of the polypeptides, derivatives and analogues are required over a prolonged period, for example in contexts where it is desirable to augment over a period of time an otherwise defective epithelial regeneration response.

47

Many known methods of administering agents in accordance with the invention to a relevant damaged epithelial tissue have the disadvantage that it can be difficult to achieve sustained levels of the agent at the site of epithelial damage over the course of even a few days because many suitable agents may have short half-lives *in vivo*. The half-lives of the agents may be short for a number of reasons which include:

- (i) Degradation by proteases and the like.
- (ii) Clearance by binding proteins.
- (iii) Binding and inhibition of agent activity by extracellular matrix molecules such as decorin and fibronectin.

Furthermore, agents used to treat sites of epithelial damage healing need to be administered in a suitable vehicle and are often provided as a composition comprising the active agent and the vehicle. As discussed further below, such vehicles are preferably non-inflammatory, biocompatible, bioresorbable and must not degrade or inactivate the agent (in storage or in use). However, it can often be difficult to provide a satisfactory vehicle for delivering agents to a tissue to be treated.

A convenient way in which these problems can be obviated or mitigated is to provide a therapeutically effective amount of an agent in accordance with the invention at a site of epithelial damage by means of gene therapy.

According to a fifth aspect of the present invention there is provided a delivery system for use in a gene therapy technique, said delivery system comprising a DNA molecule encoding for an agent in accordance with the invention, said DNA molecule being capable of being transcribed to lead to the expression of the chosen agent.

According to a sixth aspect of the present invention there is provided the use of a delivery system as defined in the preceding paragraph for use in the manufacture of a medicament for use in the promotion of epithelial regeneration.

According to a seventh aspect of the present invention there is provided a method of promoting epithelial regeneration, the method comprising administering to a patient in

58

need of treatment a therapeutically effective amount of a delivery system as defined for the fifth aspect of the invention.

Due to the degeneracy of the genetic code, it is clear that nucleic acid sequences encoding agents suitable for use in accordance with the invention may be varied or changed without substantially affecting the sequence of the product encoded thereby, to provide a functional variant thereof. As noted above, an agent suitable for use in accordance with the invention must retain the epithelial regeneration promoting activity of TGF- β_3 .

Suitable nucleotide encoding variants of TGF- β_3 include those having a sequence altered by the substitution of different codons that encode the same amino acid within the sequence, thus producing a silent change. Other suitable variants are those having homologous nucleotide sequences but comprising all, or portions of, sequence which are altered by the substitution of different codons that encode an amino acid with a side chain of similar biophysical properties to the amino acid it substitutes, to produce a conservative change. For example small non-polar, hydrophobic amino acids include glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, and methionine. Large non-polar, hydrophobic amino acids include phenylalanine, tryptophan and tyrosine. The polar neutral amino acids include serine, threonine, cysteine, asparagine and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include lysine, arginine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid.

The delivery systems according to the invention are highly suitable for achieving sustained levels of an agent in accordance with the invention at a site of epithelial damage over a longer period of time than is possible for most conventional delivery systems. Agents in accordance with the invention suitable for promoting epithelial regeneration may be continuously expressed from cells at the site of epithelial damage that have been transformed with the DNA molecule disclosed in the fifth aspect of the invention. Therefore, even if the agent in accordance with the invention has a very

49

short half-life *in vivo*, therapeutically effective amounts of the agent may be continuously expressed from the treated tissue.

Furthermore, the delivery system of the invention may be used to provide the DNA molecule (and thereby the agent in accordance with the invention) without the need to use conventional pharmaceutical vehicles such as those required in ointments or creams that are contacted with the site of epithelial damage.

The delivery system of the present invention is such that the DNA molecule is capable of being expressed (when the delivery system is administered to a patient) to produce an agent in accordance with the invention which directly or indirectly has activity for promoting epithelial regeneration. By "directly" we mean that the product of gene expression *per se* has the required activity for promoting epithelial regeneration. By "indirectly" we mean that the product of gene expression undergoes or mediates (e.g. as an enzyme) at least one further reaction to provide an active agent effective for promoting epithelial regeneration.

The DNA molecule may be contained within a suitable vector to form a recombinant vector. The vector may for example be a plasmid, cosmid or phage. Such recombinant vectors are highly useful in the delivery systems of the invention for transforming cells with the DNA molecule.

Recombinant vectors may also include other functional elements. For instance, recombinant vectors may be designed such that the vector will autonomously replicate in the nucleus of the cell. In this case, elements which induce DNA replication may be required in the recombinant vector. Alternatively the recombinant vector may be designed such that the vector and recombinant DNA molecule integrates into the genome of a cell. In this case DNA sequences which favour targeted integration (e.g. by homologous recombination) are desirable. Recombinant vectors may also have DNA coding for genes that may be used as selectable markers in the cloning process.

90

The recombinant vector may also further comprise a promoter or regulator to control expression of the gene as required.

The DNA molecule may (but not necessarily) be one which becomes incorporated in the DNA of cells of the subject being treated. Undifferentiated cells may be stably transformed leading to the production of genetically modified daughter cells. When this is the case, regulation of expression in the subject may be required e.g. with specific transcription factors, gene activators or more preferably with inducible promoters which transcribe the gene in response to a signal specifically found at a site of epithelial damage. Alternatively, the delivery system may be designed to favour unstable or transient transformation of differentiated cells in the subject being treated. In this instance, regulation of expression may be less important because expression of the DNA molecule will stop when the transformed cells die or stop expressing the protein (ideally when the site of epithelial damage has been effectively regenerated).

The delivery system may provide the DNA molecule to a subject without it being incorporated in a vector. For instance, the DNA molecule may be incorporated within a liposome or virus particle. Alternatively the "naked" DNA molecule may be inserted into a subject's cells by a suitable means e.g. direct endocytotic uptake.

The DNA molecule may be transferred to the cells of a subject to be treated by transfection, infection, microinjection, cell fusion, protoplast fusion or ballistic bombardment. For example, transfer may be by ballistic transfection with coated gold particles, liposomes containing the DNA molecule, viral vectors (e.g. adenovirus) and means of providing direct DNA uptake (e.g. endocytosis) by application of plasmid DNA directly to a site of epithelial damage topically or by injection.

The agent in accordance with the invention expressed from the DNA molecule may be one which directly or indirectly up-regulates TGF- β_3 expression and/or activity, thereby promoting epithelial regeneration.

Methods of the invention may be put into practice by inducing increased cellular expression of an agent in accordance with the invention, which may then promote epithelial regeneration. Such therapeutic expression of an agent in accordance with the invention may be achieved by increasing naturally occurring expression of the agent (for example the natural expression of a naturally occurring agent such as TGF- β_3), or by inducing unnatural expression of the agent (e.g. induction of TGF- β_3 expression by cells that do not naturally express TGF- β_3) or inducing over-expression of the agent.

Cellular expression of the agent in accordance with the invention, whether natural or unnatural expression, may be by epithelial cells, which may be existing epithelial cells at the edge of the damaged area, or may alternatively be epithelial cells therapeutically introduced into the damaged area (for example cultured endogenous or exogenous epithelial cells). Alternatively cellular expression of the agent in accordance with the invention may be effected by expression of the agent by cells in proximity or contact with the epithelium regeneration of which is to be promoted. For example, in the case where it is wished to promote epidermal regeneration the agent in accordance with the invention may be expressed by cells located in the dermis underlying or surrounding the damaged epithelium.

It will be appreciated that cells that are to be introduced therapeutically to promote epithelial regeneration may be manipulated *ex vivo* such that they express increased levels of an agent in accordance with the invention, and then introduced into the damaged area. As outlined above such cells may themselves be epithelial cells, or may be cells which are situated sufficiently closely to the damaged epithelium that the agent expressed by the cells is able to promote the desired epithelial regeneration. The cells may preferably be cells cultured *ex vivo* for use in the preparation or manufacture of artificial skin or skin substitutes. The cells may more preferably be autologous cells, although it will be appreciated that any suitable cells may be used.

Accordingly, in a eighth aspect of the invention, there is provided a medicament comprising any relevant cell type (for example epithelial, macrophage, monocyte,

92

fibroblast, endothelial or stem cells) induced to express an agent in accordance with the present invention.

The induction of cellular expression of an agent in accordance with the invention may effected by means of external signals influencing the cells, or by means of the incorporation in the cells of nucleic acids causing the expression of the agent in accordance with the fourth to sixth aspects of the invention.

The present invention will further be described in the following non-limiting Examples 1 and 2. Example 1 illustrates the promotion of epithelial regeneration by TGF- β_3 of full thickness human skin wounds, while Example 2 illustrates that TGF- β_3 is able to promote epithelial regeneration in partial thickness human skin wounds.

The Examples refer to the accompanying Figures, in which:

Figure 1, illustrates:

- i) photographs, taken at time-points three and seven days post-wounding, illustrating the macroscopic appearance of the full thickness human wounds during epithelial regeneration; and
- ii) micrographs from the same time-points illustrating the histology of the damaged sites during epithelial regeneration.

Figure 1 shows examples of macroscopic and histological images of wounds treated with 50ng/100 μ L TGF β_3 , Placebo or standard care. The results are shown at 3 and 7 days post-wounding.

Specifically, panels A and B respectively show macroscopic and microscopic appearance of TGF- β_3 treated wounds three days post-wounding. Analysis of the histological image reveals 54% re-epithelialisation.

93

Panels C and D respectively show macroscopic and microscopic appearance of placebo treated wounds three days post-wounding. Analysis of the histological image reveals 20% re-epithelialisation.

Panels E and F respectively show macroscopic and microscopic appearance of standard care treated wounds three days post-wounding. Analysis of the histological image reveals 19% re-epithelialisation.

Panels G and H respectively show macroscopic and microscopic appearance of TGF- β_3 treated wounds seven days post-wounding. Analysis of the histological image reveals 100% re-epithelialisation.

Panels I and J respectively show macroscopic and microscopic appearance of placebo treated wounds seven days post-wounding. Analysis of the histological image reveals 100% re-epithelialisation.

Panels K and L respectively show macroscopic and microscopic appearance of standard care treated wounds seven days post-wounding. Analysis of the histological image reveals 100% re-epithelialisation.

Figure 2, illustrates the comparison between mean percentage re-epithelialisation achieved in TGF- β_3 treated and untreated/placebo-treated wounds at days three and seven post-injury. Results shown are for re-epithelialisation of wounds treated with 50ng/100 μ L TGF β_3 , Placebo or Standard Care at 3 and 7 Days Post-Wounding. Results were produced by image analysis of histological sections. * Indicates a significant result as assessed by unpaired t-test ($p=0.05$).

Figure 3, shows photographs illustrating the macroscopic appearance, and thereby progression of epithelial regeneration, in partial thickness skin wounds over 21 days from the time of injury.

Panels A to I show the placebo-treated wounds on days 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 15 and 21 respectively. In contrast Panels J to R show the TGF- β ₃-treated wounds on days 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 15 and 21 respectively

EXAMPLE 1.

Effects of TGF- β ₃ on Re-epithelialisation of Human Full Thickness Wounds

A Phase I study under local Ethical Committee approval was undertaken, comprising a dose escalating first in man (FIM) study in instances of epidermal damage to determine the maximal tolerated dose (MTD) of TGF- β ₃ administered by intra-dermal injection. The study was performed as a double blind, placebo (vehicle) and standard care controlled, randomised, parallel group study to investigate the clinical safety, toleration, systemic pharmacokinetics and local pharmacodynamics of repeated, escalating concentrations of intradermal TGF- β ₃ in Caucasian healthy male volunteer subjects aged 18-45 years (Study and Protocol Reference Number: RN1001-319-1001-001).

A total of seventy two subjects were planned in the study, with planned doses of TGF- β ₃ (and perfectly matching placebos) being 50ng/100 μ L, 100ng/100 μ L, 500ng/100 μ L, 1000ng/100 μ L, 10 μ g/100 μ L and 100 μ g/100 μ L.

The data from the study was entered into a Regulatory compliant database that was locked on the 8th December 2003 and the study un-blinded (i.e., randomisation codes released) on the 19th December 2003.

All subjects in the study received two full thickness 3mm punch biopsies to each of their two arms and standard care to all of their wounds. Standard care provided optimal care for moist wound healing in all cases. In addition to this for the pair of wounds in each subject's arms, wounds received TGF- β ₃ versus TGF- β ₃ placebo, TGF- β ₃ versus nothing (denoted as standard care) or TGF- β ₃ placebo versus nothing (standard care). The design of the study was such that comparisons of the effects of

treatments on wounds could be made both within and between subjects i.e., individuals acted as their own controls.

The TGF- β_3 bulk drug substance used in the study was manufactured to GMP and contained acid and alcohol as excipients. This material was serially diluted to provide pre-filled sterile syringes for intra-dermal injection in the study (again manufactured to GMP). The acid and alcohol excipient concentrations varied due to the process of serial dilution to the required TGF- β_3 injection doses from the bulk drug substance. As the effects of these excipients at different concentrations on both the safety / toleration and effects on healing in man were not known, perfectly matched placebos were also prepared to GMP in the same fashion (i.e., the placebo contained excipients at equivalent concentrations but not TGF- β_3 protein). This also allowed comparison of the perfectly matched placebos to standard care alone, to demonstrate whether the excipients themselves had any adverse effect on healing.

The study design was such that 9 subjects in each dose group had two punch biopsies made on each arm which had been treated with either TGF- β_3 , placebo or standard care as described above. For each subject's arm the two biopsy sites were marked on the inner aspect and under local anaesthesia TGF- β_3 , placebo or nothing (standard care) was intradermally injected into the site. A 3mm full thickness punch biopsy was then taken from each of the marked sites. On the day after wounding the sites were then treated again, as above, with the same treatment i.e., TGF- β_3 , placebo or nothing (standard care) under local anaesthesia. The wounds were then excised on either day 3 or day 7 post-wounding for histology, to enable analysis of the effects of treatment on wound healing at 3 and 7 days following the initial punch biopsies. The subjects were then followed-up. Safety and toleration data were collected throughout the study.

The wounds were excised, histologically processed into paraffin wax blocks, tissue sections cut and then analysed for re-epithelialisation using image analysis. A total of 36 wounds were generated in this way for each dose group such that a total of 16 wounds were treated with TGF- β_3 , 10 wounds with placebo and 10 wounds with

standard care. This resulted in the following wound numbers per treatment at two different time-points post-wounding for histological analysis:

8 TGF- β_3 treated wounds, 5 placebo treated wounds and 5 standard care treated wounds excised at day 3 post-wounding.

8 TGF- β_3 treated wounds, 5 placebo treated wounds and 5 standard care treated wounds excised at day 7 post-wounding.

The percentage re-epithelialisation at sites of epidermal damage was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ re-epithelialisation} = \frac{(\text{total wound diameter} - \text{non-epithelialised wound diameter})}{\text{total wound diameter}} \times 100$$

Results.

Acceleration of Re-epithelialisation in Full Thickness Wounds in Humans by TGF- β_3 .

Progression of epidermal regeneration in full thickness human wounds is illustrated in Figure 1, which includes:

- iii) Photographs, taken at time-points three and seven days post-wounding, illustrating the macroscopic appearance of the full thickness wounds during epithelial regeneration; and
- iv) micrographs from the same time-points illustrating the histology of the damaged sites during epithelial regeneration.

Analysis of histological sections demonstrated that equivalent re-epithelialisation of wounds occurred in placebo and standard care control treated wounds at both time points post-wounding and as such these groups were combined to compare to TGF- β_3 treated wounds.

It can be seen from Figure 1 that TGF- β_3 treatment of full thickness skin wounds is able to promote epithelial regeneration, leading to reconstitution of the epidermis earlier than is the case in untreated or placebo-treated wounds.

The results of Example 1 are shown in Figure 2, which compares mean percentage re-epithelialisation in TGF- β_3 treated and untreated/placebo-treated wounds at days three and seven post-injury.

Figure 2 clearly illustrates that treatment with TGF- β_3 at a concentration of 50ng/100 μ L significantly accelerated wound re-epithelialisation when compared to re-epithelialisation occurring in control wounds. The promotion of epithelial regeneration in drug treated versus control wounds was also observed in individuals receiving TGF- β_3 at up to (500ng/100 μ L).

EXAMPLE 2.

Effects of TGF- β_3 on Re-epithelialisation of Human Partial Thickness Wounds / Skin Graft Donor Sites

A pilot study (non-blinded) was carried out under local Ethical Committee approval, to investigate the effects of intra-dermal and topical applications of TGF- β_3 when applied to split thickness skin graft donor sites in two healthy Caucasian male human volunteer subjects aged 18-45 years. The concentration of TGF- β_3 used was 50ng/100 μ L, and the rate of epithelial regeneration achieved was compared to a perfectly matched TGF- β_3 placebo at the equivalent concentration. Both the TGF- β_3 and placebo were prepared to GMP as described above.

The donor sites were firstly identified and marked out on each side of the midline on the lower back, each measuring 1.5 by 2cm, and then infiltrated with local anaesthetic containing 1 in 200,000 adrenalin. Each site then received an intradermal injection such that one side received TGF- β_3 at a dose of 50ng/cm² and the other side received perfectly matched placebo. Subjects then rested in the prone position for 30 minutes

before an approximately 0.55mm thick split thickness skin graft was harvested from each of the marked sites, with haemostasis being achieved with gentle pressure. Immediately following graft harvest each donor site was given a topical application of either TGF- β_3 or placebo the wounds were then dressed and the subject discharged. Subjects returned the next day and had a further topical application of either TGF- β_3 or placebo such that at all stages each wound received the same treatment, i.e., three applications of TGF- β_3 or three applications of placebo. Subjects were then reviewed on a daily basis for a two week period and then at 21 days, with subsequent follow-up.

Results:

Acceleration of Re-epithelialisation of Partial Thickness Wounds / Skin Graft Donor Sites in Humans by TGF- β_3 .

Macroscopic analysis, assessed using photographs of the damaged sites, demonstrated that TGF- β_3 markedly accelerated the promotion of epidermal regeneration, increasing the rate of re-epithelialisation at partial thickness skin graft donor sites, as compared to the rate occurring in placebo treated controls, up to day 8 post-wounding.

Figure 3, which shows photographs illustrating the macroscopic appearance, and thereby progression of epithelial regeneration, in partial thickness skin wounds over 21 days from the time of injury. Photographs demonstrating the promotion of epithelial regeneration are marked with an asterisk (*) in Figure 3.

It can be observed that at days 15 and 21 post-wounding the difference between TGF- β_3 treated and untreated/placebo-treated wound is less clear macroscopically. This effect is explained by the fact that TGF- β_3 treated sites are totally re-epithelialised on or before day 8, while the placebo treated sites only reach the same degree of re-epithelialisation at around day 15.

CONCLUSIONS (EXAMPLES 1 & 2).

The results set out above surprisingly demonstrate that a specific member of the TGF- β family, TGF- β_3 , is able to promote epithelial regeneration. This finding is in direct contrast to that which the skilled person would expect in the light of the prior art, since previous reports have suggested that members of the TGF- β family inhibit regeneration of the epidermis in skin wounds, with the TGF- β_3 isoform being the most potent inhibitor of this process. The promotion of epithelial regeneration brought about by treatment with TGF- β_3 is achieved in both full thickness wounds and partial thickness wounds (which may, for instance, serve as skin graft donor sites). The therapeutic effects in humans are observed in TGF- β_3 treatment utilising doses up to 500ng/100 μ L of the active agent.

APPENDIX

Formulations.

Details of the formulations used in clinical studies to establish the ability of agents having TGF- β_3 activity to promote epithelial regeneration are provided under the following headings.

TGF- β_3 drug substance used in the studies was supplied at a concentration of 9.1mg/mL in 20mM acetic acid and 20% isopropyl alcohol. This material was serially diluted to produce syringes containing TGF- β_3 at the concentrations stated in the exemplar data. It will be appreciated by the skilled person that, irrespective of the further diluents used to produce the final solutions, trace levels of acetic acid and isopropyl alcohol will be carried through by serial dilution.

A1. Formulations used in treatment of punch biopsy (full thickness dermal wounds)

For the punch biopsy / full thickness wound studies the drug substance was diluted in PBS containing 5% w/v mannitol, and adjusted to pH 3.8 using acetic acid. This formulation was found to be effective in the promotion of epithelial regeneration.

By way of an alternative to the mannitol-based formulation described above, a maltose-based formulation (described more fully below) was also prepared. This formulation of agents in accordance with the invention in combination with maltose was surprisingly found to dramatically reduce pain associated with injection of the composition. Studies undertaken by the inventors demonstrated clinically that the pain associated with injection of the mannitol-based formulation in the punch biopsy study was alleviated when agents in accordance with the invention were formulated in the presence of sugars, and in particular in the presence of isotonic concentrations of maltose.

In vitro analysis of the efficacy of the maltose-based and mannitol-based formulations revealed a further surprising advantage of the compositions comprising active agents in accordance with the invention in combination with maltose. Investigation using an ELISA assay and a Mink Lung Epithelial Cell assay to compare the PBS/mannitol formulation with the 0.25M maltose formulation demonstrates that the maltose formulation results in approximately a 4-fold increase in TGF- β_3 activity.

A2. Formulations used in treatment of split thickness skin graft donor sites:

For this study TGF- β_3 was formulated in 0.25M maltose (i.e., 90g maltose per litre of water for injection; equivalent to 9% (w/v) maltose in water for injection).

This formulation was applied both intradermally and topically to promote epithelial regeneration.

REFERENCES:

Tomlinson A, Ferguson MW. Wound healing: a model of dermal wound repair. *Methods Mol Biol* 2003; 225: 249-260.

Davidson JM, Nanney LB, Broadley KN, Whitsett JS, Aquino AM, Beccaro M, Rastrelli A. Hyaluronate derivatives and their application to wound healing: preliminary observations. *Clin Mater*. 1991; 8(1-2):171-7.

Paddock HN, Schultz GS, Mast BA. Methods in reepithelialization. A porcine model of partial-thickness wounds. *Methods Mol Med*. 2003; 78:17-36.

Rakel BA, Bernel MA, Abbott LI, Baumler SK, Burger MR, Dawson CJ, Heinle JA, Ocheltree IM. Split-thickness skin graft donor site care: a quantitative synthesis of the research. *Appl Nurs Res*. 1998 Nov; 11(4):174-82.

102

Claims:

1. The use of an agent having TGF- β_3 activity in the manufacture of a medicament for the promotion of epithelial regeneration.
2. The use according to claim 1, wherein the agent is TGF- β_3 .
3. The use according to claim 1, wherein the agent is a fragment, derivative or variant of TGF- β_3 .
4. The use according to claim 1, wherein the agent is a substance able to promote and/or mimic the biological activity of TGF- β_3 .
5. The use according to any one of claims 1 to 4, wherein the epithelial regeneration is at a site of an acute wound.
6. The use according to any one of claims 1 to 5, wherein the epithelial regeneration is of a young and/or healthy patient.
7. The use according to any one of claims 1 to 6, wherein the epithelium regeneration of which is to be promoted is a stratified squamous epithelium.
8. The use according to claim 7, wherein the epithelium is the epidermis.
9. The use according to claim 7, wherein the epithelium is the corneal epithelium.
10. The use according to any one of claims 1 to 6, wherein the epithelium is a respiratory epithelium.
11. The use according to any one of claims 1-6, wherein the epithelium is the lining epithelium of the abdomen, thoracic or pelvic cavities.

103

12. The use according to any preceding claim, wherein the medicament is for the promotion of epithelial regeneration after injury.
13. The use according to claim 10, wherein the medicament is for the promotion of epithelial regeneration after surgery.
14. The use according to claim 12, wherein the surgery comprises epithelial grafting.
15. The use according to claim 14, wherein the surgery comprises:
 - i) epithelial graft removal;
 - ii) optionally meshing of the epithelial graft: and
 - iii) application of the graft to a recipient site.
16. The use according to claim 14, wherein the medicament is for administration to the graft donor site.
17. The use according to claim 14, wherein the medicament is for administration to the graft recipient site.
18. The use according to claim 14, wherein the medicament is for administration to the graft.
19. The use according to any of claims 12 to 18, wherein the surgery comprises skin grafting.
20. The use according to claim 19, wherein the skin graft is a full thickness skin graft.
21. The use according to claim 19, wherein the skin graft is a partial thickness skin graft.

104

22. The use according to any preceding claim, wherein the medicament is for the promotion of epithelial regeneration after burn injury.
23. The use according to any preceding claim, wherein the medicament is for topical application.
24. The use according to any one of claims 1 to 23, wherein the medicament is for local injection.
25. The use according to any one of claims 1 to 232, wherein the medicament is a cream or ointment.
26. The use according to any preceding claim, wherein the promotion of epithelial regeneration is prophylactic promotion.
27. The use according to any of claims 1 to 5, or 7 to 26, for the preparation of a medicament to promote impaired, inhibited, retarded, or otherwise defective epithelial regeneration.
28. The use according to any one of claims 1 to 26 for the preparation of a medicament to accelerate normal epithelial regeneration.
29. The use according to any of the preceding claims for the preparation of a medicament to promote epithelial regeneration in the aged.
30. The use according to any preceding claim, wherein the agent is formulated in the presence of maltose.
31. The use according to claim 30, wherein the maltose is present at a concentration between 0.1M and 0.4M maltose

105

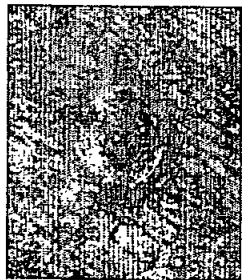
32. The use according to claim 30, wherein the maltose is present at a concentration of 0.25M maltose.

106

Figure 1 (part 1)

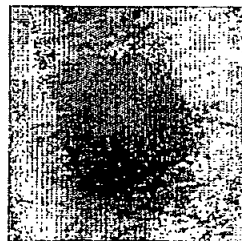
Examples of Macroscopic and Histological Images of Wounds Treated with 50ng/100µL TGFβ3, Placebo or Standard Care at 3 Days Post-Wounding

*RN1001 Treated Wound
Day 3 Macroscopic*



A

*Placebo Treated Wound
Day 3 Macroscopic*



C

*Standard Care Treated Wound
Day 3 Macroscopic*



E

*RN1001 Treated Wound
Day 3 Histology*



B

54% re-epithelialisation

*Placebo Treated Wound
Day 3 Histology*



D

20% re-epithelialisation

*Standard Care Treated Wound
Day 3 Histology*



F

19% re-epithelialisation

(Note: arrows on histology images indicate the leading edge of the epithelium)

109

Figure 1 (part 2)

Examples of Macroscopic and Histological Images of Wounds Treated with 50ng/100µL TGFβ3, Placebo or Standard Care at 7 Days Post-Wounding

*RN1001 Treated Wound
Day 7 Macroscopic*



G

*Placebo Treated Wound
Day 7 Macroscopic*



I

*Standard Care Treated Wound
Day 7 Macroscopic*



K

*RN1001 Treated Wound
Day 7 Histology*



H

100% re-epithelialisation

*Placebo Treated Wound
Day 7 Histology*



J

100% re-epithelialisation

*Standard Care Treated Wound
Day 7 Histology*

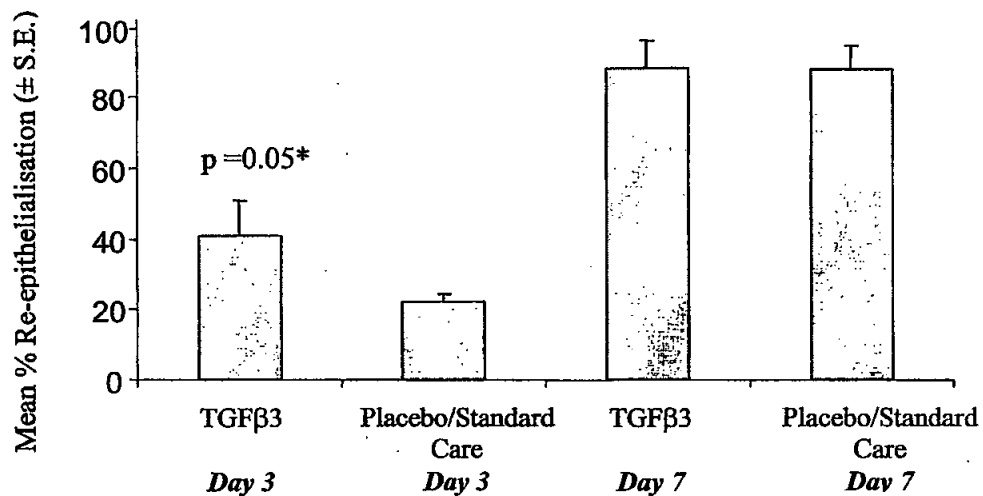


L

100% re-epithelialisation

108

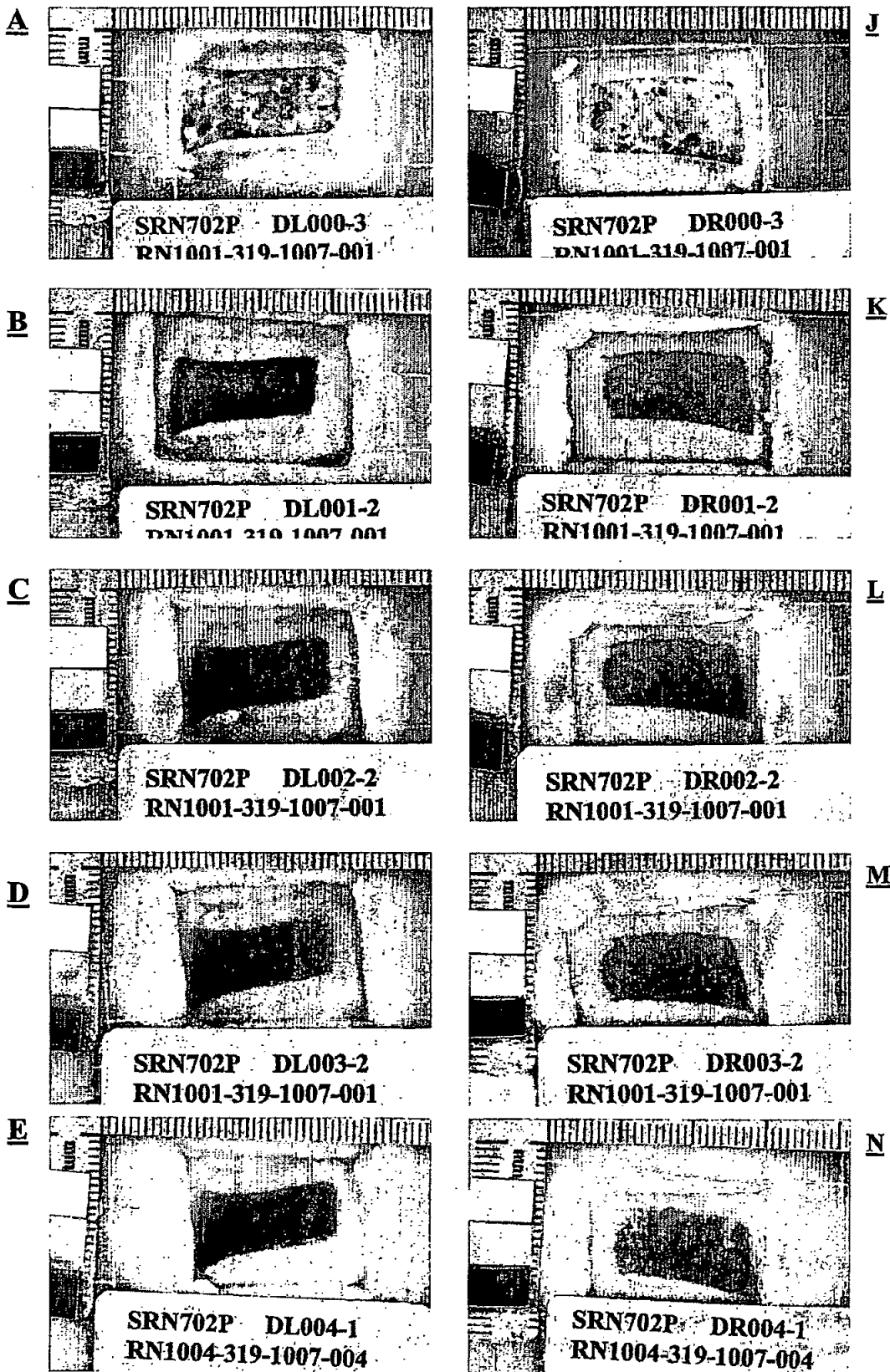
Re-epithelialisation of Wounds Treated with 50ng/100 μ L TGF β 3, Placebo or Standard Care at 3 and 7 Days Post-Wounding by Image Analysis of Histological Sections



* significant by unpaired t-test.

Figure 2

109

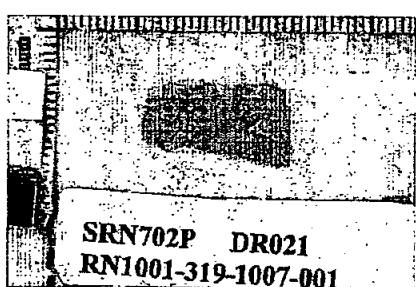
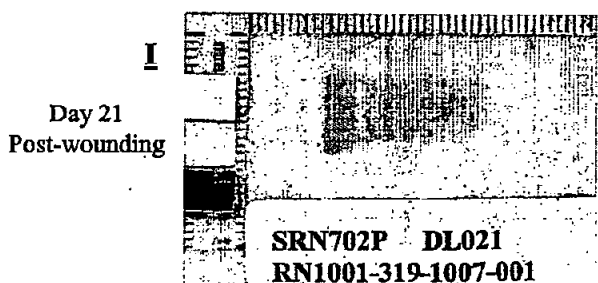
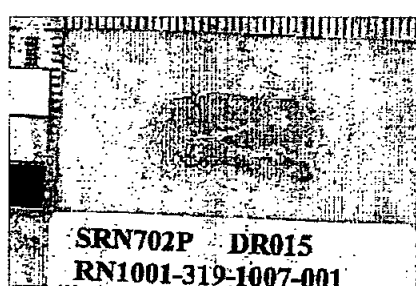
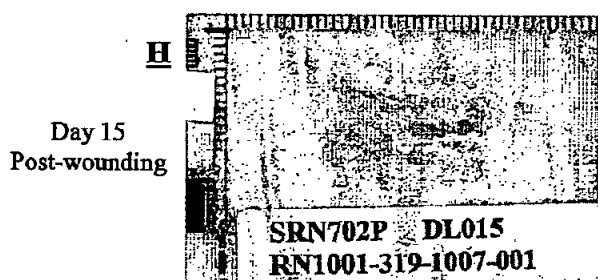
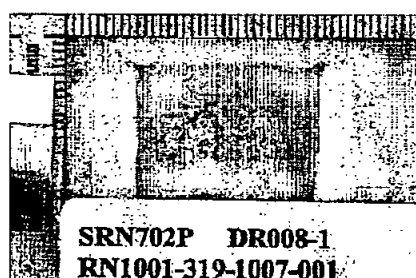
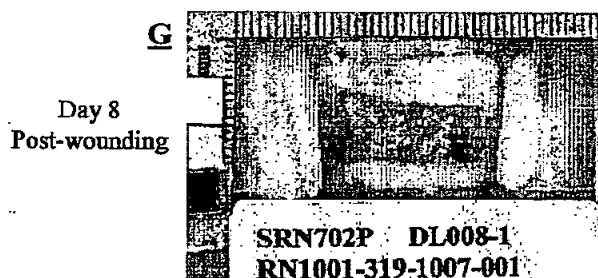
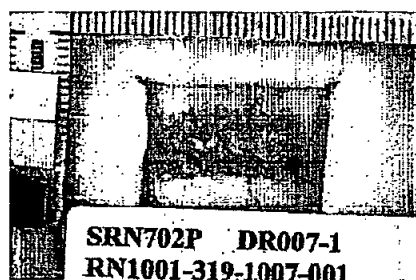
Figure 3 (part 1)

110

Figure 3 (part 2)

**Placebo
Treated**

**TGFβ3
Treated**



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/002577

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/18 A61L27/54 A61L27/60 A61L26/00

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 A61L

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, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 057 430 A (CERLETTI NICO [CH]) 2 May 2000 (2000-05-02) examples 8,8B	1,3-5,7, 8,11-13, 22,23, 25,27,29
X	VOOIJIS D P P ET AL: "TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA3-LOADED MICROTEXTURED MEMBRANES FOR SKIN REGENERATION IN DERMAL WOUNDS" JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH. PART A, WILEY, HOBOKEN, NY, US, vol. 70, no. 3, 11 June 2004 (2004-06-11), pages 402-411, XP008075533 ISSN: 1549-3296 the whole document -/-	1,2,5,7, 8,11-13, 23,27

☒ 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 2007

Date of mailing of the international search report

08/03/2007

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

FISCHER, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/002577

112

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 90/03812 A (GENENTECH INC [US]) 19 April 1990 (1990-04-19) page 5, line 1 - page 7, line 36 page 8, line 21 - line 37; claims 1-4, 10-15, 37, 38, 43, 46-51; example 1	1, 2, 5, 7-11, 13-21, 23-25, 27
X	SCHMID ET AL.: "TGF-BetaS and TGF-Beta type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds" JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 171, no. 3, 1993, pages 191-197, XP008075690 the whole document	1, 2, 5-8, 12, 23, 25-28
X	WO 96/32131 A (ALCON LAB INC [US]) 17 October 1996 (1996-10-17) page 4, line 17 - page 5, line 19 page 6, line 16 - page 8, line 10 page 10, line 2 - line 7; claims 1-10	1, 2, 7, 9, 12, 13, 23, 25
X	WO 00/54797 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH [AT]; ARVINTE TUDOR [CH] 21 September 2000 (2000-09-21) page 3, paragraph 4 - page 5, paragraph 2; claims 1, 2, 5-8; example 5	1, 2, 5, 7, 8, 12, 13, 23-25, 30-32
A	WO 93/19769 A (UNIV MANCHESTER [GB]; FERGUSON MARK WILLIAM JAMES [GB]; SHAH MAMTA [GB] 14 October 1993 (1993-10-14) the whole document	1-32
A	WO 02/076494 A2 (BIOPH BIOTECH ENTW PHARM GMBH [DE]; PAULISTA MICHAEL [DE]; POHL JENS [] 3 October 2002 (2002-10-03) the whole document	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2006/002577

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6057430	A	02-05-2000	NONE	
WO 9003812	A	19-04-1990	AT 111361 T CA 1339092 C DE 68918285 D1 DE 68918285 T2 EP 0438526 A1 JP 4501264 T US 5135915 A	15-09-1994 29-07-1997 20-10-1994 02-03-1995 31-07-1991 05-03-1992 04-08-1992
WO 9632131	A	17-10-1996	US 5411940 A	02-05-1995
WO 0054797	A	21-09-2000	AU 3556400 A EP 1161257 A2 JP 2002539172 T US 2002064516 A1	04-10-2000 12-12-2001 19-11-2002 30-05-2002
WO 9319769	A	14-10-1993	AT 230605 T AU 673161 B2 AU 3762393 A BR 9306226 A CA 2131383 A1 CZ 9402366 A3 DE 69332624 D1 DE 69332624 T2 DK 646012 T3 EP 0646012 A1 ES 2189790 T3 HU 68905 A2 JP 7505378 T JP 2005290009 A NO 943466 A NZ 249937 A PT 646012 T SK 116894 A3 US 6331298 B1	15-01-2003 31-10-1996 08-11-1993 03-12-1996 14-10-1993 12-04-1995 13-02-2003 02-10-2003 03-03-2003 05-04-1995 16-07-2003 28-08-1995 15-06-1995 20-10-2005 16-09-1994 25-09-1996 31-03-2003 08-02-1995 18-12-2001
WO 02076494	A2	03-10-2002	AU 2002257703 A1 CA 2441588 A1 JP 2004525930 T US 2004097456 A1	08-10-2002 03-10-2002 26-08-2004 20-05-2004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No 08 007818 00000 0000

Fecha 2008 01 28 15 53 02 Dep 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 113

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**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 ☐


Firma Responsable

Fecha Ene 10 28 108

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

119

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN

REFERENCIA	Radicación No.	8 7818
	Solicitud internacional	PCT/GB2006/002577
	Fecha inicio fase nacional	12/02/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3122

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 del 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 fuere 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 Unica No.10 de 2001.

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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29 FEB. 2008
adpall