



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

08-99912

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TÍTULO** MEDICAMENTOS Y PROTEINAS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 38/18; A61P 17/02

71. **SOLICITANTE** RENOVO LIMITED

DOMICILIO MANCHESTER, INGLATERRA, REINO UNIDO

74. **APODERADO** GERMAN CASTILLO GRAU

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-099912- -00000-0000

Fecha: 2008-09-22 12:45:34 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 212

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

11 oct 2008

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 C.S.J.
Bogotá

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Mark William James Ferguson; Phillip Mellor; Hugh Gerard Laverthy; Nick Occleston;
Sharon O'Kane; Emma Atkinson

Dirección The Manchester Incubator Building, Grafton Street

Nacionalidad o Domicilio: Manchester, Inglaterra, Reino Unido

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2007/000834

Fecha: Marzo 12, 2007

Publicación Internacional No. WO 2007/104946 A3

Fecha: Septiembre 20, 2007

6

Título (54) MEDICAMENTOS Y PROTEÍNAS

7

Clasificación Internacional (51) A61K 38/18; A61P 17/02

8

Prioridad

Si

☒

No

☐

(33) País de origen

Gran Bretaña

(32) Fecha

Marzo 11, 2006

(31) Número de Solicitud

0604966.2

9

Comprobante de pago N°:

75050

Fecha:

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

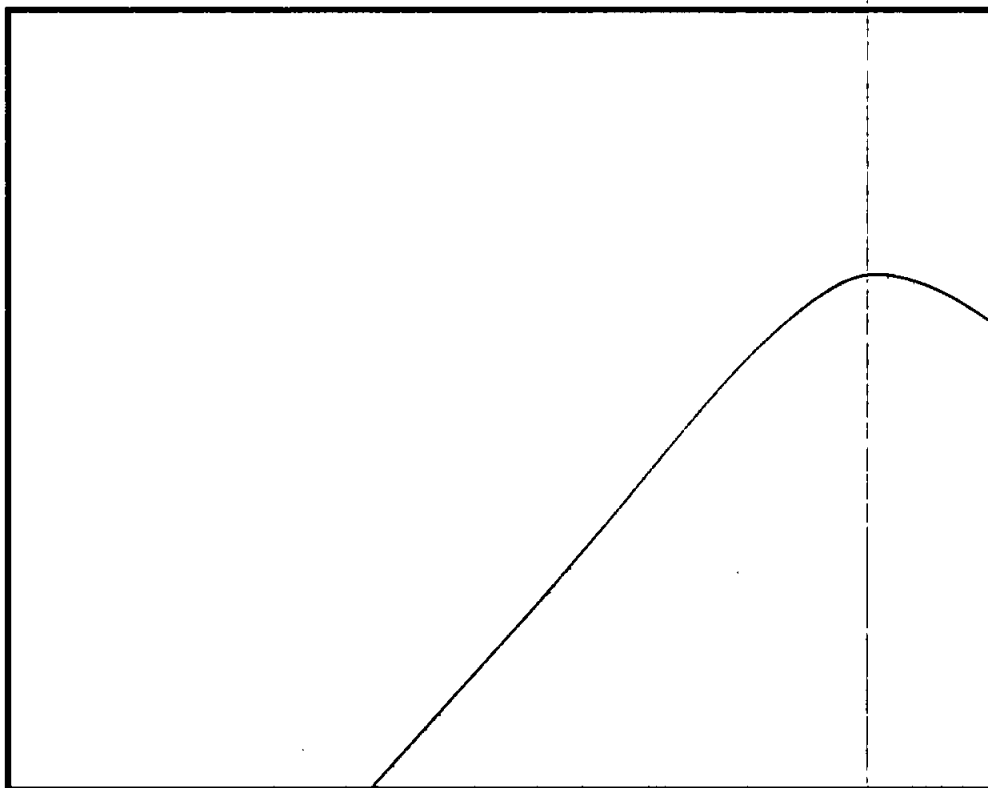
10

ANEXOS

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

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA:

C.C. 17.017.671
de 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

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 75,050
FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-099912- -00000-0000

Fecha: 2008-09-22 12:45:34 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 212

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	76145	22/09/2008	11,219,000.00

***** 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; A61P 17/02
.(22)	FECHA DE PRESENTACION		.(71)	SOLICITANTE:	
.(30)	PRIORIDAD			RENOVO LIMITED	
.(31)	No. DE SOLICITUD	0604966.2	.(72)	INVENTOR(ES):	
.(32)	FECHA DE PRESENTACION	Marzo 11, 2006		Mark William James Ferguson Phillip Mellor Hugh Gerard Laverthy Nick Occleston Sharon O'Kane Emma Atkinson	
.(33)	PAIS	Gran Bretaña	.(74)	APODERADO:	GERMAN CASTILLO GRAU

.(54) TITULO: MEDICAMENTOS Y PROTEÍNAS

.(57) RESUMEN

Se proporciona el uso de los TGF- β monoméricos, o sus fragmentos o derivados, como medicamentos. Estos medicamentos con preferencia comprenden TGF- β monoméricos o sus fragmentos o derivados. Los medicamentos provistos por el uso en la aceleración de heridas y/o la inhibición de formación de cicatrices, en la promoción de regeneración epitelial, o en la prevención y/o tratamiento de trastornos fibróticos.

FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN

COLOMBIA

PODER GENERAL

(1) RENOVO LIMITED

domiciliado en (2) Incubator Building, 48 Grafton Street, Manchester, Reino Unido

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12 en Bogotá, D.C., Colombia como sus representantes con poder especial amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la Obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Diseños Industriales, de Nombres y Enseñas Comerciales, lo mismo que traspasos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre y domicilio, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares, aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir, y tomar en fin todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades legales necesarias. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extra-judiciales

Dado y firmado en (4)

Firma/Signature

Firma/Signature

Corporate Seal to be Affixed

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(1) RENOVO LIMITED

domiciled in (2) Incubator Building, 48 Grafton Street, Manchester, Great Britain.

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe Castillo-Gibsone

with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in Bogotá, Colombia as our representatives with special ample and sufficient power to obtain from the offices and Colombian authorities, administrative, judicial and police, in first or in second instance, Patents of Invention, registration of Trade or Service Marks, Industrial Designs, of Commercial Names and Ensigns, as well as assignments, extensions, renewals, changes of names and addresses, registration of licences of exploitation and licences of use referring to said actions who are empowered to take before said authorities all of the necessary steps for the purposes indicated, to file applications, to formulate descriptions, corrections, protests, declarations, appeals and claims, apply for precautionary measures, to accept on our behalf and representation the assignment of rights on invention and titles of invention that may be given to us by any person, to pay all taxes, quotas and payments prescribed by law, to receive all the documents and proceeds giving the respective acquiescence or receipt, to fulfill any other requisites to desist and take in fact any other measures that may be deemed conducive to the safeguard of our interests, and in case oppositions are presented to intervene as plaintiff or defendant, with all necessary legal faculties. This power includes the faculties to receive, desist, compromise, transact, substitute it in all or in part, to revoke substitutions, to receive notifications and to appoint judicial or extra-judicial attorneys.

Given and signed as a deed in (4) Manchester, England.

Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C., Colombia.

18 SET 2008

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

DECLARACION NOTARIAL
(Individual)

A los días del mes de de 2007
compareció personalmente ante mí, Notario
Público el/la señor(a)

A quien(es) doy fe de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s)
del documento que precede, declarando ante mí
que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

El Notario Público

(Sociedades)

El infrascrito Notario certifica: que la(s) firma(s)
que antecede(n) y dice(n):

.....
es (son) auténtica(s); que el (los) signatario(s)
desempeña(n) el (los)
cargo(s) de

de **RENOVO LIMITED**

que tiene(n) facultad para otorgar este poder; y
que dicha compañía está domiciliada en
Manchester, Reino Unido.

y actualmente existe y está organizada de
acuerdo a las leyes del Estado de Delaware

.....
Todos los hechos anteriores le constan por
haber examinado los documentos respectivos y
a todo ello da fe.

.....
do y firmado en

El Notario Público

(Con Apostilla)

Como Notario Veintiseis del Circuito de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. - Colombia.

18 SET 2008

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

NOTARIAL CERTIFICATE
(Individuals)

On this day of 2007
personally appeared before me, a Notary Public,

.....
to me known, and known to be the person(s)
described in and who executed the foregoing
document, and he(they) duly acknowledged to
me that he(they) executed same for the uses
and purposes therein expressed.

Notary Public

(Corporations)

The undersigned Notary Public certifies: that

The preceeding signature(s) reading

Mark W. J. Ferguson

Sharon O'Hare

are authentic; that the signors at present each fill
the posts of

DIRECTOR

of **RENOVO LIMITED**

and that they are empowered to execute this
power; and that said company is domiciled in
Manchester, Great Britain

and actually exists and is organized in
accordance with the laws of England and Wales.

All the foregoing facts are known to the Notary
due to his/her having examined the respective
documents to which he/she, the Notary, attests.

Granted and signed in Manchester, England on
15th February 2008.

Notary Public

(With Apostille)

M. J. Copestake

MICHAEL JOHN COPESTAKE

M. J. COPESTAKE

NOTARY PUBLIC

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Michael John Copestake**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté
6. the/le **22 February 2008**

5. at London/à Londres
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **H688611**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **M. Western**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



[Handwritten signature]

[Handwritten mark]

MEDICAMENTS AND PROTEINS.

The present invention relates to the provision of new medicaments. In preferred embodiments the invention provides medicaments suitable for use in the acceleration of wound healing and/or the prevention, reduction or inhibition of scarring. The invention also provides a method for the acceleration of wound healing and/or the prevention, reduction or inhibition of scarring.

The Transforming Growth Factor-Betas (TGF- β s) are a family of cytokines having diverse biological activities. The TGF- β family comprises five isoforms, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, and TGF- β 5.

The TGF- β s have utility in many different therapeutic contexts. As a result of the therapeutic potential of TGF- β s there is much interest in the pharmaceutical application of members of the TGF- β family, particularly TGF- β s 1-3.

TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 are all known to play crucial roles in the regulation of the wound healing response. TGF- β activity may influence the rate of wound healing as well as the extent of scarring that occurs as a result of healing.

TGF- β 1 has uses in the prevention and/or treatment of scleroderma, angiogenesis disorders, renal disease, osteoporosis, bone disease, glomerulonephritis and renal disease.

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

TGF- β 3 may be used in the treatment of fibrotic disorders, pulmonary fibrosis, liver cirrhosis, scleroderma, angiogenesis disorders, restenosis, adhesions, endometriosis, ischemic disease, bone and cartilage induction *in vitro* fertilisation, oral mucositis, renal disease, prevention, reduction or inhibition of scarring, enhancement of neuronal

reconnection in the peripheral and central nervous system, preventing, reducing or inhibiting complications of eye surgery (such as LASIK or PRK surgery) or scarring at the back of the eye (such as scarring associated with proliferative vitreoretinopathy).

The members of the TGF- β family naturally exist in the form of dimers comprising two peptide chains. Active TGF- β dimers have a molecular weight of approximately 25.4kDa. The active TGF- β dimeric fragment is stabilized by hydrophobic and ionic interactions, which are further strengthened by an inter-subunit disulfide bridge. It is generally accepted that the biological activity, and so any therapeutic activity, of TGF- β family members is elicited solely by the active dimer.

In the light of the above it will be recognised that there is a well-established need to provide medicaments able to utilise the therapeutic properties of TGF- β family members. However, despite this well-recognised requirement for pharmaceutical compositions comprising TGF- β family members there are many acknowledged problems associated with the manufacture of TGF- β s for therapeutic use.

One of the greatest disadvantages of using TGF- β s as therapeutic agents is that in order to produce biologically (and so therapeutically) active protein dimers using a prokaryotic host, intensive renaturation to the biologically active dimeric form is required. Dimer formation can significantly extend the timelines of manufacture. This also has important implications in limiting the therapeutic use of any TGF- β .

It is an object of the present invention to obviate or mitigate at least some of the problems associated with prior art pharmaceutical compositions comprising TGF- β s. In particular it is an object of certain embodiments of the present invention to obviate or mitigate problems associated with the use of time-intensive manufacturing approaches used to produce biologically active dimers of these proteins.

In a first aspect of the invention there is provided a TGF- β monomer, or a biologically active fragment thereof, for use as a medicament.

The invention is based on the inventors' very surprising finding that monomeric TGF- β s are able to exert biological activities that were previously believed only to be provided by dimeric TGF- β proteins. This finding makes possible the use of monomeric TGF- β s in effective medicaments capable of utilising the biological properties of a selected TGF- β . As will be immediately appreciated this finding, and hence the present invention, greatly expands the practical applications in which TGF- β s may be therapeutically used, through the reduction of time and cost associated with the manufacture of suitable medicaments.

The inventors believe that the advantages of medicaments in accordance with the invention may be provided by medicaments comprising any monomeric TGF- β isoform. Accordingly, except for where the context requires otherwise, references to TGF- β or TGF- β s may be taken to encompass any biologically active monomeric form of a TGF- β isoform such as TGF- β 1, 2, 3, 4 and 5. Preferred monomers suitable for use in the medicaments of the invention are wild-type TGF- β monomers (of any desired isoform). Preferably monomeric TGF- β s suitable for use in accordance with the present invention are selected from the group consisting of TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3. More preferably the monomeric TGF- β is TGF- β 3, and in a second aspect of the invention there is provided a TGF- β 3 monomer, or a biologically active fragment thereof, for use as a medicament. It is preferred that TGF- β monomers to be used in accordance with the present invention are human TGF- β monomers. It is preferred that TGF- β s provided in medicaments in accordance with the present invention should be present in substantially entirely monomeric form. Monomeric TGF- β s suitable for use in the medicaments or methods of the invention may preferably have a molecular weight of approximately 12kDa, and more particularly approximately 12.5kDa.

The amino acid residue sequences of the human forms of the TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 isoforms are shown as Sequence ID Nos. 1, 2 and 3 respectively, and a monomeric TGF- β comprising any of these sequences, or a biologically active fragment of any of these sequences, constitutes a preferred monomer for use in accordance with the present invention. Monomeric TGF- β 3 (Sequence ID No. 3) constitutes a particularly preferred monomer for use in accordance with the various aspects of the present invention.

Except where the context requires otherwise, references in the present specification to monomeric TGF- β s (including references to particular isoforms) should be taken also to encompass biologically active fragments and derivatives of such monomeric TGF- β s. Biologically active fragments derivable from Sequence ID Nos. 1 to 3 represent preferred fragments for use in the medicaments of the invention, with biologically active fragments derivable from Sequence ID No. 3 constituting particularly preferred fragments. Preferred biologically active fragments may comprise the receptor-binding portion of the selected TGF- β isoform.

Suitable derivatives of monomeric TGF- β s that may be utilised in the medicaments or methods of the invention include: therapeutically effective peptide derivatives of monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective fragments or derivatives comprising or based on the pharmacophore of monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective peptoid derivatives of monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective D-amino acid derivatives of monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective peptidomimetics based on monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective peptide analogues of monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective pseudopeptides based on monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective retro-inverso peptides based on monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective depsipeptide derivatives based on monomeric TGF- β s (or their fragments); therapeutically effective β -peptide derivatives based on monomeric TGF- β s (or their fragments); and therapeutically effective retropeptoid derivatives based on monomeric TGF- β s (or their fragments).

The inventors have found that monomeric forms of human TGF- β 3 may be used in the same way as dimeric TGF- β 3, for example for the treatment of fibrotic disorders, scleroderma, angiogenesis disorders, restenosis, adhesions, endometriosis, ischemic disease, bone and cartilage induction, *in vitro* fertilisation, oral mucositis, renal disease, prevention, reduction or inhibition of scarring, enhancement of neuronal reconnection in the peripheral and central nervous system, preventing, reducing or inhibiting complications of eye surgery (such as LASIK or PRK surgery), treatment of cleft lip and palate, prevention, reduction or inhibition of scarring and accelerated healing of tendons

and ligaments. Monomeric forms of TGF- β 3 are also able to promote epithelial regeneration at sites of epithelial damage.

The inventors' findings also indicate that monomeric forms of TGF- β 1 and TGF- β 2 are able to exert all therapeutic activities associated with the dimeric forms of these growth factors.

"Biological activity" in the context of the present invention is preferably measured *in vivo*. The inventors have found that, in keeping with the findings published in the prior art, monomeric forms of TGF- β s generally do not exhibit biological activity as assessed by *in vitro* methods. However, in direct contrast to the prior art beliefs, the inventors have very surprisingly found that monomeric forms of TGF- β s are able to exert biological and therapeutic activity *in vivo*. Accordingly, it will be recognised that for a monomeric TGF- β , or a fragment or derivative thereof, to be deemed biologically active in accordance with the present invention it is not necessary for the monomeric TGF- β to exhibit biological activity measurable by both *in vitro* and *in vivo* means, but merely that it exhibits biological activity that can be measured either *in vitro* or *in vivo*, and preferably activity that can be measured *in vivo*.

Suitably, the biological activity of monomeric TGF- β s suitable for use in accordance with the first aspect of the invention may be measured with reference to the known biological activity of dimers of the given TGF- β . In a preferred embodiment biological activity may be measured with reference to the ability of a monomer (such as a monomer of Sequence ID No. 3) to accelerate wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring.

In the light of the preceding paragraphs, it will be recognised that medicaments in accordance with the first or second aspects of the invention are particularly suitable for use in the acceleration of wound healing and/or the prevention, reduction or inhibition of scarring. Furthermore, medicaments in accordance with the first or second aspects of the invention are also particularly suitable for use in the promotion of re-epithelialisation.

Indeed, in an third aspect of the invention there is provided the use of a TGF- β 3 monomer, or a biologically active fragment thereof, in the preparation of a medicament for use in the acceleration of wound healing and/or the inhibition of scarring.

In a fourth aspect of the invention there is provided use of a TGF- β 3 monomer, or a biologically active fragment thereof, in the preparation of a medicament for use in the promotion of epithelial regeneration.

In a fifth aspect of the invention there is provided the use of a TGF β 3 monomer, or a biologically active fragment thereof in the preparation of a medicament for use in the prevention and/or treatment of a fibrotic disorder. Preferred fibrotic disorders that may be prevented and/or treated using such medicaments may be selected from the group consisting of lung fibrosis, liver fibrosis, scleroderma, skin fibrosis, muscle fibrosis, radiation fibrosis, kidney fibrosis and uterine fibrosis.

Furthermore, in a sixth aspect of the invention there is provided a method of accelerating wound healing and/or inhibiting scarring, the method comprising administering to a patient in need of such treatment a therapeutically effective amount of a monomeric TGF- β 3, or a fragment thereof.

In an seventh aspect of the invention there is provided a method of promoting epithelial regeneration, the method comprising administering to a patient in need of such treatment a therapeutically effective amount of a monomeric TGF- β 3, or a fragment thereof.

In an eighth aspect of the invention there is provided a method of preventing and/or treating a fibrotic disorder, the method comprising administering to a patient in need of such prevention and/or treatment a therapeutically effective amount of a monomeric TGF- β 3, or a fragment thereof. Preferred fibrotic disorders that may be prevented and/or treated using such methods may be selected from the group consisting of lung fibrosis, liver fibrosis, scleroderma, skin fibrosis, muscle fibrosis, radiation fibrosis, kidney fibrosis and uterine fibrosis

For the purposes of the present invention a therapeutically effective amount of a monomeric TGF- β , or a fragment thereof, is an amount sufficient to bring about a required:

- i) acceleration in wound healing and/or inhibition of scarring; or
- ii) promotion of epithelial regeneration; or
- iii) prevention and/or treatment of a fibrotic disorder.

The extent of acceleration of wound healing and/or inhibition of scarring, or epithelial regeneration, or prevention or reduction of fibrosis that may be required will be apparent to, and indeed may readily be determined by, a clinician responsible for the care of the patient. A suitable assessment of the extent of acceleration of wound healing and/or the inhibition of scarring, or promotion of epithelial regeneration, or the prevention or reduction of fibrosis may be determined by the clinician, and may be with reference to suggested methods of measurement described herein.

Suitable and preferred monomeric TGF- β s for use in accordance with the invention may be selected with reference to any or all of the considerations described herein.

In the case where it is wished to effect accelerated wound healing with prevention, reduction or inhibition of scarring or to effect the prevention or treatment of fibrotic disorders e.g pulmonary fibrosis, liver cirrhosis, scleroderma, glomerulonephritis, or the like, it will generally be preferred to use monomeric TGF- β 3 or a suitable biologically active fragment.

Although the use of monomeric TGF- β 3 has particularly notable benefits, medicaments comprising monomeric forms of other TGF- β isoforms also have great value.

For example, medicaments comprising monomeric TGF- β 1, or biologically active fragments thereof, may have uses in the prevention and/or treatment of chronic non healing wounds e.g. venous ulcers, pressure sores, diabetic ulcers, angiogenesis disorders, renal disease, osteoporosis, bone disease, glomerulonephritis and renal disease. By way of example, locally delivered, wild type dimeric TGF- β 1 has been shown in animal

models to be a potent stimulator of bone growth and regeneration. Furthermore, administration of TGF- β 1 has been shown to protect tissues from ischemia-reperfusion injury, particularly in the brain (following stroke), and in the heart (following coronary artery occlusion).

Medicaments comprising monomeric TGF- β 2, or biologically active fragments thereof, may be used in the treatment of glioma, non-small-cell lung cancer, pancreas tumour, solid tumours, colon tumour, ovary tumour, age-related macular degeneration, ocular injury, osteoporosis, retinopathy, ulcers, carcinoma, mouth inflammation and scleroderma. By way of example, topical application of wild type dimeric TGF- β 2 has been shown in two clinical trials to accelerate the closure of chronic leg ulcers associated with venous stasis; and local delivery of recombinant human TGF- β 2 in animal models has been shown to promote bone re-growth and regeneration.

Medicaments comprising monomeric TGF- β 3, or biologically active fragments thereof, may be used in the treatment of wounds (including chronic wounds such as ulcers), scleroderma, fibrotic disorders e.g. pulmonary fibrosis, liver cirrhosis, kidney fibrosis etc., angiogenesis disorders, restenosis, adhesions, endometriosis, ischemic disease, bone and cartilage induction, *in vitro* fertilisation, oral mucositis and renal disease. By way of example, topical application of wild type, dimeric TGF- β 3 has been shown, in animal models and the clinic, to accelerate the healing rate of chronic, non-healing pressure ulcers; reduce the incidence, severity, and duration of oral mucositis; and reduce the adverse side effects of radiation gastro-intestinal syndrome resulting from damage to stem cells caused by radiotherapy and chemotherapy during cancer treatment. The inventors' findings indicate that monomeric TGF- β 3 may be used in all of these contexts in order to bring about the known therapeutic activities of dimeric TGF- β 3.

The ability of certain methods and medicaments of the invention (such as those utilising TGF- β monomers as set out in Sequence ID No. 3) to accelerate the healing of wounds may be readily appreciated and/or measured with reference to properties exhibited by treated wounds. For present purposes a "treated wound" may be considered to be a

wound exposed to a therapeutically effective amount of a medicament of the invention, or which has received treatment in accordance with the methods of the invention.

Acceleration of the healing of treated wounds may be illustrated by an increased rate of epithelialisation as compared to control wounds. Thus the methods and medicaments of the invention promote a more rapid re-constitution of a functional epithelial layer over a wounded area than would otherwise be the case.

Alternatively or additionally, accelerated healing of treated wounds may be illustrated by decreased width compared to control wounds at comparable time points. It will be appreciated that this reduction in wound width ensures that there is a relatively faster rate of wound closure (since there is less width of wound to be closed) and is indicative of the ability of such medicaments to accelerate the healing response. Narrower wounds may result in narrower scars that are aesthetically preferable to wider scars

Accordingly, accelerated wound healing in the context of the present invention should be taken to encompass any increase in the rate of healing of a treated wound as compared with the rate of healing occurring in control-treated or untreated wounds. Preferably the acceleration of wound healing may be assessed with respect to either comparison of the rate of re-epithelialisation achieved in treated and control wounds, or comparison of the relative width of treated and control wounds at comparable time points. More preferably accelerated wound healing may be defined as comprising both an increased rate of re-epithelialisation and a reduction of wound width compared to control wounds at comparable time points.

Preferably the promotion of accelerated wound healing may give rise to a rate of wound healing that is at least 5%, 10%, 20% or 30% greater than the rate of healing occurring in a control or untreated wound. More preferably the promotion of accelerated wound healing may give rise to a rate of healing that is at least 40%, 50% or 60% greater than healing in a control wound. It is even more preferred that promotion of accelerated wound healing may give rise to a rate of healing that is at least 70%, 80%, or 90% greater than that occurring in control wounds, and most preferably the promotion of accelerated

wound healing may give rise to a rate of healing that is at least 100% greater than the rate occurring in control wounds.

There exist a wide range of wound healing disorders that are characterised, or at least partially characterised, by inappropriate failure, delay or retardation of the normal wound healing response. The ability of certain methods and medicaments of the invention to promote accelerated wound healing are thus of utility in the prevention or treatment of such disorders.

Since certain methods and medicaments of the invention are able to bring about the acceleration of wound healing through the promotion of a stimulated re-epithelialisation response (thereby increasing the rate at which the wound closes) it will be appreciated that these methods and medicaments of the invention are particularly advantageous for treatment of wounds of patients that may otherwise be prone to defective, delayed or otherwise impaired re-epithelialisation. For example, it is well known that dermal wounds in the aged exhibit a less-vigorous re-epithelialisation response than do those of younger individuals. There are also many other conditions or disorders in which wound healing is associated with delayed or otherwise impaired re-epithelialisation. For example patients suffering from 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 wound healing with impaired re-epithelialisation. In many such cases the lack of a proper re-epithelialisation response contributes to the development of infections at the wound site, which may in turn contribute to the formation of chronic wounds such as ulcers. Accordingly it will be appreciated that such patients are particularly likely to benefit from suitable methods or medicaments of the invention.

Chronic wounds are perhaps the most important example of disorders associated with a delayed wound healing response. A wound may be defined as chronic if it does not show any healing tendency within eight weeks of formation when subject to appropriate

(conventional) therapeutic treatment. Well-known examples of chronic wounds include venous ulcers, diabetic ulcers and decubitus ulcers, however chronic wounds may arise from otherwise normal acute injuries at any time. Typically chronic wounds may arise as a result of infection of the wound site, inadequate wound treatment, or as a sequitur of progressive tissue breakdown caused by venous, arterial, or metabolic vascular disease, pressure, radiation damage, or tumour.

It will be appreciated that methods and medicaments of the invention capable of accelerating wound healing may be utilised in the treatment of existing chronic wounds in order to promote their healing. Such methods and medicaments may promote the re-epithelialisation of chronic wounds, thereby bringing about healing and closure of the disorder. Preferred methods and medicaments of the invention (such as those utilising monomeric TGF- β comprising Sequence ID No. 3) may also inhibit scarring associated with wound healing. The prevention of scarring in such contexts may be particularly advantageous since chronic wounds may typically extend over relatively large portions of a patient's body.

In addition, or alternatively, to their use in the treatment of existing chronic wounds, suitable methods and medicaments of the invention may be used to prevent acute wounds of patients predisposed to impaired wound healing developing into chronic wounds. Since suitable methods and medicaments of the invention are able to promote epithelial coverage of the damaged site they are able to reduce the likelihood of a treated wound becoming infected. Similarly, this promotion of re-epithelialisation may be of benefit in the treatment of chronic wounds arising as a result of other conditions such as diabetes or venous disease.

A further group of patients that may derive particular benefit from the methods and medicaments of the invention are those in which the immune system is compromised (for example patients undergoing chemotherapy or radiotherapy, or those suffering from HIV infection). It is well recognised that wounds of immunocompromised patients, who may be unable to mount a normal inflammatory response after wounding, tend to be associated

with poor healing outcomes. Such patients may benefit from treatment with suitable methods and medicaments of the invention.

The ability of medicaments and methods of the invention utilising monomeric TGF- β s comprising Sequence ID No. 3 to promote accelerated wound healing while preventing, reducing or inhibiting scarring is also of use in more general clinical contexts. Examples of these further benefits may be considered with reference to the healing of wounds by primary, secondary or tertiary intention, as described below.

For the purposes of the present invention, healing by primary intention may be considered to involve the closure by surgical means (such as sutures, adhesive strips or staples) of opposing edges of a wound. Healing by primary intention is typically employed in the treatment of surgical incisions or other clean wounds, and is associated with minimal levels of tissue loss. The skilled person will recognise that since suitable medicaments or methods in accordance with the invention (such as those utilising monomers comprising Sequence ID No. 3) are capable of reducing wound width they also facilitate the joining of opposing wound edges, and thus may be beneficial in wound healing by primary intention. Furthermore, such methods or medicaments may (as described further below) result in the prevention, reduction or inhibition of scarring that may otherwise occur on such healing. The inventors believe that treatment in this manner may have an impact on both the macroscopic and microscopic appearance of scars formed from treated wounds; macroscopically the scars may be less noticeable and blend with the surrounding skin, microscopically the scars may exhibit a regeneration of a more normal skin structure.

For the purposes of the present invention healing by secondary intention may be considered to constitute the closure of wounds by the wound healing process, without direct surgical intervention. Wounds to be healed by secondary intention may be subject to continued care (for example the dressing and re-dressing of the wound as well as the application of suitable medicaments), but it is the natural processes of granulation tissue formation and re-epithelialisation that bring about the closure of the wound. It will be appreciated that since preferred medicaments and methods of the invention (such as those utilising monomers comprising Sequence ID No. 3) are able to increase the rate of re-

epithelialisation and decrease subsequent scarring as compared to that occurring in control wounds they have utility in the promotion of wound healing by secondary intention.

Healing by tertiary intention may be considered to comprise the surgical closure of a wound that has previously been left open to allow at least partial granulation tissue formation and re-epithelialisation. The properties of preferred methods and medicaments of the invention that make them suitable for use in healing by primary or secondary intention are also beneficial in the context of promoting wound healing by tertiary intention.

The use of preferred methods and medicaments of the invention utilising monomers comprising Sequence ID No. 3 to stimulate re-epithelialisation (as part of their promotion of accelerated wound healing) while inhibiting scarring is also particularly effective in the treatment of wounds associated with grafting procedures. Treatment using such methods and medicaments of the invention is of benefit both at a graft donor site (where it can aid the re-establishment of a functional epithelial layer while preventing, reducing or inhibiting scar formation), and also at graft recipient sites (where the anti-scarring effects of the treatment inhibit scar formation, while the accelerated healing promotes integration of the grafted tissue). The inventors believe that the methods and medicaments of the invention confer advantages in the contexts of grafts utilising skin, artificial skin, or skin substitutes.

The inventors have found that the methods and medicaments of the invention utilising monomers comprising Sequence ID No. 3 are able to promote accelerated wound healing with inhibition of scarring when administered either prior to wounding, or once a wound has already been formed.

The inventors have found that methods or medicaments of the invention utilising monomeric TGF- β 3s, such as those comprising Sequence ID No. 3, are capable of promoting epithelial regeneration. 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 using suitable methods or medicaments 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).

Without wishing to be bound by any hypothesis the inventors believe that the promotion of epithelial regeneration achieved by monomeric forms of TGF- β 3 is mediated by the monomers' 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 treatment.

It will be appreciated that promotion of epithelial regeneration using monomers comprising Sequence ID No. 3 may be of use to induce effective re-epithelialisation in contexts in which the re-epithelialisation response is impaired, inhibited, retarded or otherwise defective. Promotion of epithelial regeneration may be also effected to accelerate the rate of defective or 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.

As has been set out above, certain methods or medicaments in accordance with the present invention (and particularly those utilising monomers comprising Sequence ID No. 3) are able to prevent, reduce or otherwise inhibit scarring. This inhibition of scarring can be effected at any body site and any tissue or organ, including the skin, eye, nerves, tendons, ligaments, muscle, and oral cavity (including the lips and palate), as well as internal organs (such as the liver, heart, brain, abdominal cavity, pelvic cavity, thoracic cavity, guts and reproductive tissue). In the skin, treatment may improve the macroscopic and microscopic appearance of scars; macroscopically the scars may be less visible and blend with the surrounding skin, microscopically the collagen fibres within the scar may have morphology and organisation that is more similar to those in the surrounding skin. The prevention, reduction or inhibition of scarring within the context of the present invention should be understood to encompass any degree of prevention, reduction or inhibition in scarring as compared to the level of scarring occurring in a control-treated or untreated wound (as defined elsewhere in the specification). Except where the context requires otherwise references to "prevention", "reduction" or "inhibition" of scarring may be taken to be equivalent mechanisms that are all manifested in anti-scarring activity.

The prevention, reduction or inhibition of dermal scarring achieved using methods and medicaments of the invention may be assessed and/or measured with reference to either the microscopic or, preferably, macroscopic appearance of a treated scar as compared to the appearance of an untreated scar. More preferably the prevention, reduction or inhibition of scarring may be assessed with reference to both macroscopic and microscopic appearance of a treated scar. For the present purposes a "treated scar" may be defined as a scar formed on healing of a treated wound, whereas an "untreated scar" may be defined as the scar formed on healing of an untreated wound, or a wound treated with placebo or standard care. Suitable comparison scars may preferably be matched to the treated scar with reference to scar age, site, size and patient.

In considering the macroscopic appearance of a scar resulting from a treated wound, the extent of scarring, and hence the magnitude of any prevention, inhibition or reduction in scarring achieved, may be assessed with reference to any of a number of parameters.

Suitable parameters for the macroscopic assessment of scars may include:

- i) Colour of the scar. As noted above, scars may typically be hypopigmented or hyperpigmented with regard to the surrounding skin. Inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the pigmentation of a treated scar more closely approximates that of unscarred skin than does the pigmentation of an untreated scar. Similarly, scars may be redder than the surrounding skin. In this case inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the redness of a treated scar fades earlier, or more completely, or to resemble more closely the appearance of the surrounding skin, compared to an untreated scar.
- ii) Height of the scar. Scars may typically be either raised or depressed as compared to the surrounding skin. Inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the height of a treated scar more closely approximates that of unscarred skin (i.e. is neither raised nor depressed) than does the height of an untreated scar.
- iii) Surface texture of the scar. Scars may have surfaces that are relatively smoother than the surrounding skin (giving rise to a scar with a "shiny" appearance) or that are rougher than the surrounding skin. Inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the surface texture of a treated scar more closely approximates that of unscarred skin than does the surface texture of an untreated scar.
- iv) Stiffness of the scar. The abnormal composition and structure of scars means that they are normally stiffer than the undamaged skin surrounding the scar. In this case, inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the stiffness of a treated scar more closely approximates that of unscarred skin than does the stiffness of an untreated scar.

A treated scar will preferably demonstrate prevention, inhibition or reduction of scarring as assessed with reference to at least one of the parameters for macroscopic assessment set out above. More preferably a treated scar may demonstrate prevented, inhibited or reduced scarring with reference to at least two of the parameters, even more preferably at least three of the parameters, and most preferably all four of these parameters. An overall assessment of scarring may be made using, for example, a Visual Analogue Scale or a digital assessment scale.

Suitable parameters for the microscopic assessment of scars may include:

- i) Thickness of extracellular matrix (ECM) fibres. Scars typically contain thinner ECM fibres than are found in the surrounding skin. This property is even more pronounced in the case of keloid and hypertrophic scars. Inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the thickness of ECM fibres in a treated scar more closely approximates the thickness of ECM fibres found in unscarred skin than does the thickness of fibres found in an untreated scar.
- ii) Orientation of ECM fibres. ECM fibres found in scars tend to exhibit a greater degree of alignment with one another than do those found in unscarred skin (which have a random orientation frequently referred to as "basket weave"). The ECM of pathological scars such as keloids and hypertrophic scars may exhibit even more anomalous orientations, frequently forming large "swirls" or "capsules" of ECM molecules. Accordingly, inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the orientation of ECM fibres in a treated scar more closely approximates the orientation of ECM fibres found in unscarred skin than does the orientation of such fibres found in an untreated scar.
- iii) ECM composition of the scar. The composition of ECM molecules present in scars shows differences from that found in normal skin, with a reduction in the amount of elastin present in ECM of scars. Thus inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the composition of ECM fibres in the dermis of a treated scar more closely approximates the composition of such fibres found in unscarred skin than does the composition found in an untreated scar.

- iv) Cellularity of the scar. Scars tend to contain relatively fewer cells than does unscarred skin. It will therefore be appreciated that inhibition or reduction of scarring may be demonstrated when the cellularity of a treated scar more closely approximates the cellularity of unscarred skin than does the cellularity of an untreated scar.

A treated scar will preferably demonstrate prevention, reduction or inhibition of scarring as assessed with reference to at least one of the parameters for microscopic assessment set out above. More preferably a treated scar may demonstrate prevention, reduction or inhibition of scarring with reference to at least two of the parameters, even more preferably at least three of the parameters, and most preferably all four of these parameters.

Prevention, reduction or inhibition of scarring of a treated wound may further be assessed with reference to suitable parameters used in the:

- i) macroscopic clinical assessment of scars, particularly the assessment of scars upon a subject;
- ii) assessment of photographic images of scars;
- iii) assessment of silicone moulds or positive plaster casts made from silicone moulds of scars; and
- iv) microscopic assessment of scars, for example by histological analysis of the microscopic structure of scars.

It will be appreciated that prevention, reduction or inhibition of scarring of a treated wound may be indicated by improvement of one or more of such suitable parameters, and that in the case of prevention, reduction or inhibition as assessed with reference to a number of parameters that these parameters may be combined from different assessment schemes (e.g. reduction, inhibition or improvement in at least one parameter used in macroscopic assessment and at least one parameter used in microscopic assessment).

Prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated by an improvement in one or more parameters indicating that a treated scar more closely approximates unscarred skin with reference to the selected parameter(s) than does an untreated or control scar.

Suitable parameters for the clinical measurement and assessment of scars may be selected based upon a variety of measures or assessments including those described by Beausang *et al* (1998) and van Zuijlen *et al* (2002).

Typically, suitable parameters may include:

1. *Assessment with regard to Visual Analogue Scale (VAS) scar score.*

Prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated by a reduction in the VAS score of a treated scar when compared to a control scar. A suitable VAS for use in the assessment of scars may be based upon the method described by Beausang *et al* (1998).

2. *Scar height, scar width, scar perimeter, scar area or scar volume.*

The height and width of scars can be measured directly upon the subject, for example by use of manual measuring devices such as callipers. Scar width, perimeter and area may be measured either directly on the subject or by image analysis of photographs of the scar. The skilled person will also be aware of further non-invasive methods and devices that can be used to investigate suitable parameters, including silicone moulding, ultrasound, optical three-dimensional profilometry and high resolution Magnetic Resonance Imaging.

Prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated by a reduction in the height, width, area or volume, or any combination thereof, of a treated scar as compared to an untreated scar.

3. *Appearance and/or colour of scar compared to surrounding unscarred skin.*

The appearance or colour of a treated scar may be compared to that of surrounding unscarred skin, and the differences (if any) compared with the difference between the

6
9

appearance and colour of untreated scars and unscarred skin. Such a comparison may be made on the basis of a visual assessment of the respective scars and unscarred skin. The appearance of a scar may be compared with unscarred skin with reference to whether the scar is lighter or darker than the unscarred skin. The respective colours of the scars and skin may be perfectly matched to one another, slightly mismatched, obviously mismatched or grossly mismatched.

Alternatively or additionally to visual assessment, there are a number of non-invasive colourimetry devices which are able to provide data with respect to pigmentation of scars and unscarred skin, as well as redness of the skin (which may be an indicator of the degree of vascularity present in the scar or skin). Examples of such devices include the Minolta Chromameter CR-200/300; Labscan 600; Dr. Lange Micro Colour; Derma Spectrometer; laser-Doppler flow meter; and Spectrophotometric intracutaneous Analysis (SIA) scope.

Prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated by a smaller magnitude of difference between the appearance or colour of treated scars and unscarred skin than between untreated scars and unscarred skin.

4. *Scar distortion and mechanical performance*

Scar distortion may be assessed by visual comparison of a scar and unscarred skin. A suitable comparison may classify a selected scar as causing no distortion, mild distortion, moderate distortion or severe distortion.

The mechanical performance of scars can be assessed using a number of non-invasive methods and devices based upon suction, pressure, torsion, tension and acoustics. Suitable examples include of known devices capable of use in assessing mechanical performance of scars include Indentometer, Cutometer, Reviscometer, Visco-elastic skin analysis, Dermaflex, Durometer, Dermal Torque Meter, Elastometer.

Prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated by a reduction in distortion caused by treated scars as compared to that caused by untreated scars. It will

3

also be appreciated that prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated by the mechanical performance of unscarred skin being more similar to that of treated scars than of untreated scars.

5. Scar contour and scar texture

Scar contour may be investigated by means of visual assessment. Suitable parameters to consider in such an assessment include whether or not a scar is flush with surrounding skin, slightly proud, slightly indented, hypertrophic or keloid. The texture of a scar may be assessed with reference to the scar's appearance, and this may also be undertaken by a visual assessment as to whether the scar is, for instance, matt or shiny or has a roughened or smooth appearance as compared to unscarred skin.

Scar texture may additionally be assessed with reference to whether the scar has the same texture as unscarred skin (normal texture), is just palpable, firm or hard compared to unscarred skin. The texture of scars may also be assessed with reference to the Hamilton scale (described in Crowe *et al*, 1998).

In addition to the techniques set out above, there are a number of non-invasive profilometry devices that use optical or mechanical methods for assessment of scar contour and/or texture. Such assessments may be carried out on the body of the subject or, for example, on silicone mould impressions of scars, or on positive casts made from such impressions.

Prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated in the event that treated scars have scar profiles and textures more comparable to unscarred skin than do untreated scars.

Photographic Assessments

Independent Lay Panel

Photographic assessment of treated and untreated scars may be performed by an independent lay panel of assessors using standardised and calibrated photographs of the scars. The scars may be assessed by an independent lay panel to provide categorical

ranking data (e.g. that a given treated scar is "better", "worse" or "no different" when compared to an untreated scar) and quantitative data using a Visual Analogue Scale (VAS) based upon the method described by Beausang *et al* (1998). The capture of these data may make use of suitable software and/or electronic system(s) as described in the applicant's co-pending patent application.

Expert Panel

Photographic assessment of treated and untreated scars may alternatively or additionally be performed by a panel of expert assessors using standardised and calibrated photographs of the scars to be assessed. The panel of experts may preferably consist of suitable individuals skilled in the art such as plastic surgeons and scientists of suitable backgrounds.

Such assessment may provide categorical data, as described above or with respect to the comparison of a timecourse of images of selected treated and untreated scars.

Suitable assessments to be made may include:

Identification of the best scar, which for the purposes of the present invention may be considered that scar which most closely resembles the surrounding skin. Once the best scar has been identified the magnitude of the difference between scars may be considered, for example is the difference between scars slight or obvious. Further parameters that may be considered include the earliest time after scar formation at which a difference between scars may be detected, the time post-formation at which the difference between scars is most obvious (or alternatively the finding that the difference continues after the last timepoint assessed), as well as considering whether or not the better scar remains consistently better.

Consideration may also be given to whether or not one scar is consistently redder than the other, and whether the redness fades over the timepoints considered (or continues after the last timepoint) and if so at what time after scar formation. An expert panel may also

consider at what time after formation any difference in redness becomes detectable, as well as the time post-formation at which the difference in redness is most obvious.

An expert panel may also consider whether or not one of a treated or untreated scar is consistently whiter than the other, or whiter than unscarred skin. In the event that a difference in whiteness is detectable consideration may be given to the time after scar formation at which the difference may be detected, the time at which the difference is most obvious, and the time at which the difference disappears.

A further parameter that may be assessed by an expert panel is the texture of treated and untreated scars. In comparing treated and untreated scars the expert panel may consider which of the scars has the best skin texture, the earliest time after scar formation at which any difference present may be detected, the time post formation at which any difference is most obvious, and the time at which any difference disappears.

Comparison of treated and untreated scars may further assess which of the scars is narrowest, and which of the scars is shortest. Consideration may also be given to the shape of the scar and the proportion of the scar margin that is distinguishable from the surrounding skin. As with previously described visual assessments and assessments of colour the presence, degree and location of hyper-pigmentation may also be considered.

As noted above, one of the ways in which the quality of treated and untreated scars may be compared is by microscopic assessment. Microscopic assessment of scar quality may typically be carried out using histological sections of scars. The process of microscopically assessing and measuring scars may take into consideration categorical data based on the following suitable parameters:

1. Epidermal restitution. Particular attention may be paid to the degree of restoration of the rete ridges, and to the thickness of the restored epidermis.

- 
2. Angiogenesis and Inflammation. Consideration may be given to the number of blood vessels present, the size of the blood vessels present and evidence of inflammation, including an assessment of any level of inflammation present.
 3. Collagen organisation. In assessing collagen organisation reference may be made to the orientation of collagen fibres present in the scar, the density of such fibres and collagen fibre thickness in the papillary and reticular dermis.
 4. Visual analogue scale (VAS) assessment of collagen organisation for the papillary dermis and for the reticular dermis may also provide a useful index of scar quality.
 5. Other features that may be taken into account in assessing the microscopic quality of scars include elevation or depression of the scar relative to the surrounding unscarred skin, and the prominence or visibility of the scar at the normal dermal interface.
 6. It will be seen that the assessments described above allow the generation of scar ranking data which is able to provide an indication as to whether a treated scar is better, worse or no different compared to a control, untreated or other suitable comparator scar.

In addition to categorical data, quantitative data (preferably relating to the above parameters) can be generated using image analysis in combination with suitable visualisation techniques. Examples of suitable visualisation techniques that may be employed in assessing scar quality are specific histological stains or immuno-labelling, wherein the degree of staining or labelling present may be quantitatively determined by image analysis

Quantitative data may be usefully and readily produced in relation to the following parameters:

1. Scar width, height, elevation, volume and area.
2. Epithelial thickness and coverage (for example the area of epidermis present in a scar or the proportion of a wound with epidermal coverage).
3. Number, size, area (i.e. cross-section) and location of blood vessels.

4. Degree of inflammation, number, location and populations/types of inflammatory cells present.
5. Collagen organisation, collagen fibre thickness, collagen fibre density.

Prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated by a change in any of the parameters considered above such that a treated scar more closely resembles unscarred skin than does a control or untreated scar (or other suitable comparator).

The assessments and parameters discussed are suitable for comparisons of the effects of peptides or medicaments of the invention as compared to control, placebo or standard care treatment in animals or humans. Appropriate statistical tests may be used to analyse datasets generated from different treatments in order to investigate significance of results.

Preferably prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated with reference to more than one parameter. More preferably prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated with reference to both a clinical (i.e. observed on the subject) parameter and a photographic parameter. Even more preferably prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated with reference to a clinical parameter, a photographic parameter, and also a microscopic assessment parameter (for instance a histological parameter). Most preferably prevention, reduction or inhibition of scarring may be demonstrated with reference to a clinical VAS score, external lay panel VAS score and ranking (from photographic images) and microscopic VAS score of the reticular dermis.

The use of suitable methods and medicaments of the invention is able to bring about a rapid improvement in the cosmetic appearance of an injured area thus treated. Cosmetic considerations are important in a number of clinical contexts, particularly when wounds are formed at prominent body sites such as the face, neck and hands. Consequently the inhibition of scarring (which may preferably be in combination with accelerated wound healing) at such sites where it is desired to improve the cosmetic appearance of scar formed represents a preferred embodiment of the invention.

In addition to its cosmetic impact skin scarring is responsible for a number of deleterious effects afflicting those suffering from such scarring. For example, skin scarring may be associated with reduction of physical and mechanical function, particularly in the case of contractile scars (such as hypertrophic scars) and/or situations in which scars are formed across joints. In these cases the altered mechanical properties of scarred skin, as opposed to unscarred skin, and the effects of scar contraction may lead to dramatically restricted movement of a joint (articulation) so effected. Accordingly it is a preferred embodiment that suitable medicaments and methods of the invention be used to prevent, reduce or inhibit scarring of wounds covering joints of the body (preferably also accelerating healing of such wounds). In another preferred embodiment suitable medicaments and methods of the invention may be used to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring of wounds at increased risk of forming a contractile scar.

The extent of scar formation, and hence extent of cosmetic or other impairment that may be caused by the scar, may also be influenced by factors such as the tension of the site at which the wound is formed. For example, it is known that skin under relatively high tension (such as that extending over the chest, or associated with lines of tension) may be prone to formation of more severe scars than at other body sites. Thus in a preferred embodiment suitable medicaments and methods of the invention may be used to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring of wounds located at sites of high skin tension. There are many surgical procedures that may be used in scar revision to allow realignment of wounds and scars such that they are subject to reduced tension. Probably the best known of these is "Z-plasty" in which two V-shaped flaps of skin are transposed to allow rotation of a line of tension. Thus in a more preferred embodiment such medicaments and methods of the invention be used to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring of wounds during surgical revision of disfiguring scars.

Pathological scarring may have more pronounced deleterious effects than arise even as a result of relatively severe normal scarring. Common examples of pathological scars include hypertrophic scars and keloids. It is recognised that certain types of wound, or

certain individuals may be predisposed to pathological scar formation. For instance individuals of Afro-Caribbean, Japanese or Mongloid heritage, or those having a familial history of pathological scarring may be considered to be at increased risk of hypertrophic scar or keloid formation. Wounds of children, and particularly burns wounds of children, are also associated with increased hypertrophic scar formation. Accordingly it is a preferred embodiment of the invention that suitable medicaments and methods be used to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring of wounds in which there is an increased risk of pathological scar formation.

Although individuals already subject to pathological scarring suffer from a predisposition to further excessive scar formation it is often clinically necessary to surgically revise hypertrophic scars or keloids, with an attendant risk of consequential pathological scar formation. Thus it is a further preferred embodiment of the invention that suitable medicaments and methods be used to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring of wounds produced by surgical revision of pathological scars.

It is recognised that wounds resulting from burns injuries (which for the purposes of the present invention may be taken also to encompass scalding injuries involving hot liquids or gasses) may extend over great areas of an individual so afflicted. Accordingly, burns may give rise to scar formation covering a large proportion of a patient's body, thereby increasing the risk that the scar formed will cover areas of elevated cosmetic importance (such as the face, neck, arms or hands) or of mechanical importance (particularly the regions covering or surrounding joints). Burns injuries caused by hot liquids are frequently suffered by children (for example as a result of upsetting pans, kettles or the like) and, due to the relatively smaller body size of children, are particularly likely to cause extensive damage over a high proportion of the body area. It is a further preferred embodiment of the invention that suitable medicaments and methods be used to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring of wounds produced by burns injuries.

As noted above, wound healing in response to burns injuries is frequently associated with adverse scarring outcomes, such as the formation of hypertrophic scars. A further

consequence of the relatively large size of burns injuries is that they are particularly susceptible to complications such as infection and desiccation that arise due to lack of a functional epithelial layer. In the light of the above it will be appreciated that suitable methods and medicaments of the invention may be used in the treatment of burn injuries to reduce the level of scarring that occurs as a result of the wound and/or accelerate the reconstitution of a functional epithelial barrier.

The inventors have found that methods and medicaments of the invention utilising monomers such as those comprising Sequence ID No. 3 are able to promote re-epithelialisation. Accordingly such methods and medicaments are particularly effective in the treatment of all injuries involving damage to an epithelial layer. Such injuries are exemplified by, but not limited to, injuries to the skin, in which the epidermis is damaged. It will however be appreciated that such methods and medicaments of the invention are also applicable to other types of wounds in which epithelia are damaged, such as injuries involving the respiratory epithelia, digestive epithelia or epithelia surrounding internal tissues or organs (such as the epithelia of the peritoneum).

The healing of wounds involving the peritoneum (the epithelial covering of the internal organs, and/or the interior of the body cavity) may frequently give rise to adhesions. Such adhesions are a common sequitur of surgery involving gynaecological or intestinal tissues. The inventors believe that the ability of the methods and medicaments of the invention (utilising suitable monomers such as those comprising Sequence ID No. 3) to accelerate the regeneration of the peritoneum while reducing scarring may reduce the incidence of inappropriate attachment of portions of the peritoneum to one another, and thereby reduce the occurrence of adhesions. Accordingly, the use of such methods and medicaments of the invention to prevent the formation of intestinal or gynaecological adhesions represents a preferred embodiment of the invention. Indeed the use of such methods or medicaments of the invention in the healing of any wounds involving the peritoneum is a preferred embodiment.

The methods or medicaments of the invention may be used prophylactically, for example at sites where no wound exists but where a wound that would otherwise give rise to a scar

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

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

healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring. The methods and medicaments of the invention may, for instance, preferably be administered within the first 24 hours after a wound is formed, but may still promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring if administered up to ten, or more, days after wounding.

The methods and medicaments of the invention may be administered on one or more occasions as necessary in order to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring. For instance therapeutically effective amounts of the medicaments may be administered to a wound as often as required until the healing process has been completed. By way of example, the medicaments of the invention may be administered daily or twice daily to a wound for at least the first three days following the formation of the wound. The inventors have found that regimes involving two administrations of medicaments of the invention, the first prior to formation of a wound and the second after wounding, are particularly beneficial in reducing scar formation. Preferably such regimes may involve a first administration immediately prior to formation of a wound and a second administration 24 hours after wounding.

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

For the purposes of the present specification by "agent" or "agent of the invention" is meant biologically or therapeutically active monomeric TGF- β . Such agents may preferably be wild type monomeric TGF- β s, and more preferably may be monomeric TGF- β s capable of promoting accelerated wound healing and/or inhibiting scarring, of which a preferred example comprises the monomer set out in Sequence ID No. 3. It will be appreciated that all such agents may be incorporated in medicaments in accordance with the invention, and may be used in the methods or uses of the invention.

It will be appreciated that the amount of a medicament of the invention that should be applied to a wound depends on a number of factors such as the biological activity and bioavailability of the agent present in the medicament, which in turn depends, among other factors, on the nature of the agent and the mode of administration of the medicament. Other factors in determining a suitable therapeutic amount of a medicament may include:

- A) The half-life of the agent in the subject being treated.
- B) The specific condition to be treated (e.g. acute wounding or chronic wounds).
- 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 within the subject being treated.

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

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

Medicaments of the invention, may be administered by any suitable route capable of achieving the desired effect of promoting wound healing and/or preventing, reducing or inhibiting scarring, but it is preferred that the medicaments be administered locally at a wound site.

The inventors have found that the promotion of accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring may be effected by the administration of an agent of the invention by injection at the wound site. For instance, in the case of dermal wounds, agents of the invention may be administered by means of intradermal injection. Thus a preferred medicament in accordance with the invention comprises an injectable solution of an agent of 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 below.

Alternatively, or additionally, medicaments of the invention may also be administered in a topical form to promote accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring. Such administration may be effected as part of the initial and/or follow up care for the wounded area.

The inventors find that the promotion of accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring is particularly improved by topical application of an agent of the invention to a wound (or, in the case of prophylactic application, to a tissue or site where a wound is to be formed).

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

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

It will be appreciated that the vehicle of a composition comprising agents of the invention should be one that is well tolerated by the patient and allows release of the agent to the

wound. Such a vehicle is preferably biodegradable, bioresolvable, bioresorbable and/or non-inflammatory.

Medicaments and compositions comprising agents of the invention may be used in a number of ways. Thus, for example, a composition may be applied in and/or around a wound in order to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring. If the composition is to be applied to an "existing" wound, then the pharmaceutically acceptable vehicle will be one which is relatively "mild" i.e. a vehicle which is biocompatible, biodegradable, bioresolvable and non-inflammatory.

An agent of the invention, or a nucleic acid encoding such an agent (as considered further below), 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 (such as those suffering from chronic wounds) that require long-term promotion of accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring. The devices may be particularly advantageous when used for the administration of an agent or nucleic acid that would normally require frequent administration (e.g. at least daily administration by other routes).

Daily doses of an agent of 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 of 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 of the invention to a patient without the need to administer repeated doses.

In one embodiment a pharmaceutical vehicle for administration of an agent of 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 of the invention may be formulated as a part of a pharmaceutically acceptable transdermal patch.

A solid vehicle can include one or more substances that may also act as flavouring 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 that is in admixture with the finely divided agent of the invention. In tablets, the agent of 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 of 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 of the invention can be dissolved or suspended in a pharmaceutically acceptable liquid vehicle such as water, an organic solvent, a mixture of both or pharmaceutically acceptable oils or fats. The liquid vehicle can contain other suitable pharmaceutical additives such as solubilizers, emulsifiers, buffers, preservatives, sweeteners, flavouring agents, suspending agents, thickening agents, colours, viscosity regulators, stabilizers or osmo-regulators. 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). It may generally be preferred that the medicaments or methods of the invention utilise formulations in which monomeric TGF- β s, such as TGF- β 3, are provided in the absence of alcohols. Such alcohol-free formulations may be particularly preferred for use at wound sites (or sites where wounds are to be formed) due to their relatively "mild" nature. For parenteral administration, the vehicle can also be an oily ester such as ethyl oleate and isopropyl myristate. Sterile liquid vehicles are useful in sterile liquid form compositions for parenteral administration. The liquid vehicle for pressurized compositions can be halogenated hydrocarbon or other pharmaceutically acceptable propellant.

Liquid pharmaceutical compositions which are sterile solutions or suspensions can be utilized by for example, intramuscular, intrathecal, epidural, intraperitoneal, intradermal, intrastromal (cornea) or subcutaneous injection. Sterile solutions can also be administered intravenously. The agent of the invention may be prepared as a sterile solid composition that 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 and preservatives.

In the situation in which it is desired to administer an agent of 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 of the invention may be protected (for instance using the techniques described above) so that its rate of degradation in the digestive tract is reduced.

Compositions of agents of the invention are suitable to be used for promoting accelerated wound healing and/or inhibiting scarring in the cornea. Corneal wounds may result from trauma to the eye arising as a result of accidental injury (as considered above) or as a result of surgical operations (e.g. laser surgery on the cornea). In this case a preferred medicament of the invention may be in the form of an eye drop.

Agents of the invention may be used in a range of "internal" wounds (i.e. wounds occurring within the body, rather than on an external surface). Thus for example, medicaments in accordance with the invention may be formulated for inhalation for use in wounds 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 of the invention and precise therapeutic regimes for administration of such compositions (such as daily doses of the active agent and the frequency of administration).

42

A suitable daily dose of an agent in accordance with the invention able to promote accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring depends upon a range of factors including (but not limited to) the nature of the tissue wounded, area and/or depth of the wound to be treated, the severity of the wound, and the presence or absence of factors predisposing to pathological scar or chronic wound formation.

By way of example, the amount of an active agent that may be administered to a wound or site of epithelial damage in a single incidence of treatment may preferably be in the region of 50-200ng/linear cm of wound or cm² epithelial damage (if administered by injection), or 100-300ng/linear cm of wound or cm² of epithelial damage (if administered topically).

By way of further example, the preferred amount of an active agent to be administered daily to a wound or site of epithelial damage may be in the region of 50ng/linear cm of wound or cm² epithelial damage (if administered by injection), or 100ng/ linear cm of wound or cm² epithelial damage (if administered topically).

By way of example, the total amount of an active agent that may be administered by local injection to a wound or site of epithelial damage may be preferably be in the region of 50ng/100μL per linear centimetre of wound or cm² epithelial damage, given once a day for up to three days, thereby providing a total dose of 150ng/linear centimetre of wound or cm² epithelial damage.

In the case of topical application to acute wounds or sites of epithelial damage, a suitable amount of an active agent may preferably be in the region of 100ng/linear of wound or cm² or epithelial damage, given once a day for up to 3 days, thereby providing a total dose of 300ng/linear cm of wound or cm² of epithelial damage.

Without detracting from the above, the amount of an agent in accordance with the invention required for the treatment of wounds or other sites of epithelial damage will typically be within the range of 1pg to 1mg of the agent administered per linear centimetre of wound or epithelial damage per 24 hours, although this figure may be

modified upwards or downwards in response to the factors outlined above. The agent may preferably be provided in the form of a 1pg/100 μ L - 1mg/100 μ L solution of the agent, and 100 μ L of such a solution administered per linear centimetre of wound or epithelial damage over a 24 hour period.

The agent may more preferably be administered as a 10pg/100 μ L - 100 μ g/100 μ L solution with 100 μ L of such a solution administered per linear centimetre of wound or epithelial damage over a 24 hour period.

Most preferably the agent may be administered as a 1ng/100 μ L - 1000ng/100 μ L solution with 100 μ L of such a solution administered per linear centimetre of wound or epithelial damage over a 24 hour period.

Generally, compositions comprising agents of the invention should be formulated such that when administered to a wound a concentration of the agent of between 0.79pM and 0.79mM per linear centimetre of wound or epithelial damage is achieved. Preferably the agent may be provided at concentrations of between 7.9pM and 0.079mM per linear centimetre.

An agent of the invention (such as the peptide of Sequence ID No. 3) may be administered at a concentration of between 0.79pM and 0.79mM. Preferably an agent of the invention may be administered at a concentration of between 7.9pM and 0.079mM. Most preferably an agent of the invention may be administered at a concentration of between 0.79nM and 0.79 μ M.

Purely by way of example an injectable solution containing between 10pg/100 μ L and 100 μ g/100 μ L of an agent of the invention (such as the peptide of Sequence ID No. 3) is suitable for application to promote accelerated dermal wound healing and/or inhibition of scarring when administered as an intradermal injection and dosed with 100 μ L per linear cm of wound margin.

44

In the case of a monomeric peptide of Sequence ID No. 3, preferred dosages for administration to a wound may be in the region of 1ng/100 μ L–1000ng/100 μ L, and 100 μ L of such a solution administered per linear cm of wound margin.

Agents of the invention may be used to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scarring as a monotherapy (e.g. through use of medicaments of the invention alone). Alternatively the methods or medicaments of the invention may be used in combination with other compounds or treatments for the promotion of wound healing or scar inhibition. Suitable treatments that may be used as parts of such combination therapies will be well known to those skilled in the art.

The inventors have found that medicaments in accordance with the present invention, and particularly those comprising peptides of Sequence ID No. 3 may be advantageously formulated in the presence of a sugar. This sugar may be a reducing or non-reducing sugar and/or a phosphate or phosphonate derivative thereof. Examples of such sugars may be selected from, but are not limited to, the group comprising maltose, mannose, trehalose, arabinose, mannitol, sucrose, fructose, dextrose and glucose. Preferred sugars may be selected from the group consisting of maltose and trehalose. Medicaments of the invention, and particularly those in accordance with this embodiment of the invention, may preferably have a pH of between 5 and 7.

It will be appreciated that monomeric TGF- β peptides 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 peptides are required over a prolonged period, for example in contexts where it is desirable to augment over a period of time an otherwise defective wound healing response. It is particularly preferred that TGF- β monomers to be administered via cellular expression comprise peptides defined by Sequence ID No. 3.

Many known methods of administering peptide agents of the invention to tissues such as wounds have the disadvantage that it can be difficult to achieve sustained levels of the

agent of the invention at the treatment site over the course of even a few days because the peptide 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.

Furthermore, agents used to promote accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring need to be administered in a suitable vehicle and are often provided as a composition comprising the agent and the vehicle. As discussed, 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 with a wound 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 of the invention at an area to be treated by means of gene therapy.

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. The sequences of possible nucleic acids that may be used to encode peptides defined by Sequence ID Nos. 1 to 3 will be readily apparent to the skilled person, and suitable examples are provided as Sequence ID Nos. 4 to 7 respectively.

Gene therapy delivery systems are highly suitable for achieving sustained levels of an agent of the invention at a wound over a longer period of time than is possible for most conventional delivery systems. Agents of the invention suitable for promoting accelerated wound healing and/or inhibited scarring may be continuously expressed from cells at a wound site that have been transformed with the DNA molecule disclosed in the ninth aspect of the invention. Therefore, even if the agent of the invention has a very

46

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

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

A suitable gene therapy delivery system is preferably such that the DNA molecule is capable of being expressed (when the delivery system is administered to a patient) to produce a peptide defined by the group comprising Sequence ID Nos. 1 to 3. 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 gene therapy delivery systems of the invention for transforming cells with suitable DNA molecules.

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.

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 that 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 wound. 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 promotion of accelerated wound healing with reduced scarring has been effected).

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 wound topically or by injection.

Cellular expression of the agent of the invention may be by cells at the edge of the undamaged area surrounding the wound, or may alternatively be by cells therapeutically introduced into the wound (for example cultured endogenous or exogenous cells involved in the wound healing response).

It will be appreciated that cells that are to be introduced therapeutically to promote accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring may be manipulated *ex vivo* such that they express increased levels of an agent of the invention, and then introduced into the wounded area. Such cells may preferably be cells cultured *ex vivo* for use in the preparation or manufacture of artificial skin or skin substitutes to be used in the promotion of wound healing. The cells may more preferably be autologous cells, although it will be appreciated that any suitable cells may be used.

Accordingly, in a seventeenth aspect of the invention, there is provided a medicament comprising cells induced to express an agent of the present invention. Such cells may preferably express a monomeric TGF- β 3.

The induction of cellular expression of an agent of the invention may be effected by means of the incorporation in the cells of nucleic acids causing the expression of agents suitable for use in accordance with the invention.

49

The invention will now be further described by way of example with reference to the following experimental protocols and studies, and the accompanying Figures in which:

Figure 1 illustrates the results of comparison of monomeric and dimeric forms of TGF- β 3 by SDS-PAGE under both reduced and non-reduced conditions;

Figure 2 sets out the template used for positioning of incisional wounds on experimental rats;

Figure 3 summarises treatments administered to wound sites of experimental animals;

Figure 4 shows results of assessment, three days after wounding, of the appearance of experimental wounds treated with monomeric or dimeric TGF- β 3;

Figure 5 summarises treatments administered to wound sites of experimental animals;

Figure 6 shows results of assessment, 70 days after wounding, of the appearance of experimental scars treated with monomeric or dimeric TGF- β 3;

Figure 7 shows representative macroscopic images showing the appearance of experimental scars 70 days after wounding;

Figure 8 representative microscopic images showing the structure of experimental scars 70 days after wounding

Figure 9 illustrates production of TGF- β 3 monomers by successfully transformed host cells;

Figure 10 illustrates generation of dimeric and monomeric TGF- β 3 under experimental protein refolding conditions; and



Figure 11 illustrates isolation of TGF- β 3 proteins by ultrafiltration/hydrophobic interaction chromatography.

Information regarding amino acid or nucleic acid sequences of importance is provided in the section "Sequence Information" (including the amino acid sequences of the active fragments of human TGF- β isoforms suitable for use in accordance with the invention, as well as the sequences of DNA molecules encoding full-length peptides of the TGF- β isoforms, and DNA encoding the active fragment of wild type TGF- β 3; and the DNA sequences of primers used in the generation of cDNA encoding human TGF- β isoforms suitable for use in accordance with the invention).

PROTOCOLS AND EXAMPLES

1. METHODOLOGIES FOR THE PRODUCTION, REFOLDING, AND PURIFICATION OF TGF- β MONOMERIC PROTEINS

1.1 Nucleotide Sequences

DNA sequences encoding full-length TGF- β proteins are shown as Sequence ID Nos. 4 to 6. Full-length TGF- β proteins consist of a signal peptide (shown in italics), pro-peptide (shown in bold) as well as the active fragment (shown in normal text). The nucleotide sequence coding for the wild type TGF- β 3 active fragments is shown in Sequence ID No. 7.

1.2 cDNA Generation

Total RNA from a human incisional wound (taken day 5 post-wounding) was treated with 'DNA-Free' (Ambion) to remove any contaminating DNA. Using total RNA as a template, cDNA for each of the three mammalian TGF- β isoforms i.e., TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 was generated by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The RT-PCR master mix was prepared from Brilliant® QRT-PCR Core Reagent Kit, 1-Step (Stratagene). One microgram of RNA was added to 50 μ L of a solution containing: One-step QRT-PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 3.5mM MgCl₂, 1 μ L StrataScript reverse transcriptase, TaqPolymerase 2.5 units, 0.4 μ M Sense primer (Figure 1), 0.4 μ M Anti-Sense primer (as shown in Sequence Information). The reaction was placed in a thermal cycler (Hybaid PCR Expresses) and run under the following conditions: 30min at 45°C, 10min at 95°C, then 40 cycles of 95°C for 30 sec, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min. Final step of 72°C for 10 min. PCR samples were run on 2%(w/v) agarose gels to verify band size and purified using Wizard PCR Prep Kit (Promega).

1.3 Construction of Plasmid.

The pET-3d vector used is derived from pBR322 vector and contains a T7 promoter under *LacUV5* control and an Ampicillin resistant marker gene.

The three TGF- β isoform cDNA fragments (generated in Section 1.2) were sub-cloned into pET-3d vectors at the Nco I and Bam HI sites (5'-3' respectively). The resulting ligations were then transformed into XL10 Gold cells (Stratagene) and colony PCR analysis was performed to locate clones containing an insert. The final clones were grown up and their plasmid DNA extracted into water using Qiaprep®Spin Miniprep Kit (Qiagen). The plasmids were sequenced and verified using T7 promoter primer (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') and T7 terminator primer (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3').

1.4 Transformation and Cloning.

10 μ L (50 ng per μ l) of plasmid DNA encoding for each of the TGF- β isoforms (from Section 1.3) was added to 1mL of cold (4°C) competent *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Singles™ cells (Novagen). After 20 min the cells were heat shocked by incubation for 30 sec at 42°C in a water bath. 100 μ L of Psi medium was added to the cell/plasmid mixture and shaken at 37°C for 90 min. 50 μ l and 100 μ l aliquots were plated onto LB agar plates containing 100 μ g/mL Ampicillin (Sigma) and incubated for 18 hours at 37°C. Single colonies were cultivated and frozen cell stocks generated and stored at -80°C. Plasmid DNA was analysed from cells stocks to verify correct transformation.

1.5 Expression.

Ampoules of frozen *E.coli* cells that transformed with each of the TGF- β isoforms (from Section 1.4) were recovered and inoculated into baffled Erlenmeyer flasks, containing 100mL of LB media and 100 μ g/mL of Ampicillin. The flasks were incubated with shaking, overnight at 37°C. 5mL of this overnight culture were added to 2-litre Erlenmeyer flasks (500mL of LB media/amp) and incubated with shaking at 37°C. 2mL Broth samples were taken hourly to track growth and TGF- β isoform expression (post-induction). Growth was determined by measuring absorbance on a spectrophotometer, at a wavelength of 600nm. When the absorbance measured 0.6 Abs the cells were induced to express the TGF- β isoforms by the addition of Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) to a final

concentration of 1mM. The cultures were incubated for an additional 4 hours. The 0.5mL of broth samples were pelleted by centrifugation (10 min 10,000 rpm in a Sorvall Biofuge) and the supernatant discarded. The pellet was re-suspended in 50µL of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-polyacrylamide gel-electrophoresis (PAGE) sample buffer and heated for 10 minutes in a water bath at 95°C. 10µL samples were loaded onto SDS-PAGE. SDS-PAGE and Coomassie Blue staining was performed (as described in A.T Andrews, 1986) using a Hoefer®Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster (Amersham). The gels were 1mm thick and contained 15% (v/v) polyacrylamide gel.

1.6 Cell Harvesting and Isolation of Inclusion Bodies.

Cells from Section 1.5 were pelleted by centrifuging at 5000g for 10 min at 4°C in a Hettich Rotina 46R centrifuge with a 4315 Rotor. Cell disruption and recovery of each of the insoluble (inclusion bodies) TGF- β isoforms were performed at 4°C. The cells were suspended in 50mL of 100mM Tris/HCl (Sigma), 10mM EDTA (Sigma) pH 8.3 and were disrupted by sonication using a Sanjo Soniprep 150. 0.2%(w/w) Triton X-100 (Sigma) was added and the suspension stirred for one hour. The suspension was centrifuged at 12,000g for 40 min. The pellets were re-suspended in 50mL of 100mM Tris/HCl, 10mM EDTA pH 8.3 at room temperature before being centrifuged for 40 min at 15,000g.

1.7 Solubilisation of Inclusion bodies

The pellets from Section 1.6 were re-suspended in 40mL of 8M Urea 1%(w/w) DL-Dithiothreitol (DTT) and disrupted in a Heidolph Diax 900 homogeniser. The suspension was covered and left stirring for 1 hour to solubilise the inclusion bodies and reduce TGF- β isoforms to their denatured monomeric form. The suspensions were then centrifuged at 12,000g for 30 min at 4°C. The supernatants were dialysed to exchange buffer from 8M Urea (ICN Biomedical) to 10%(v/v) acetic acid. The *E.coli* proteins that were soluble in the 8M urea precipitate out of solution when the buffer is exchanged to 10%(v/v) acetic acid. 1%(w/v) DTT (Sigma) was added to the suspensions, covered and left stirring for 30 min to reduce any disulfide bonds that may have formed between TGF- β monomers during the buffer exchange. The suspensions were centrifuged to separate the soluble and non-soluble proteins. Samples were taken from Urea solubilisation and buffer exchange steps (acetic acid soluble and non-soluble material), and then analysed using SDS-PAGE.

1.8 Ultrafiltration

The 10% (v/v) acetic acid material from Section 1.7 underwent ultrafiltration with a 10kDa membrane on a Vivoflow50 (Vivascience). The purpose of this was to reduce the volume of 10%(v/v) acetic acid suspension to 3mL and to remove low molecular weight proteins (<10kDa).

1.9 Refolding and Purification

The solubilised TGF- β 1, 2 and 3 proteins were first concentrated by ultrafiltration and then run through a size-exclusion chromatography (SEC) column. The fractions from SEC containing TGF- β protein were then pooled and lyophilised. The lyophilised, monomeric, TGF- β 1, 2 and 3 were solubilised in 8M urea containing 10mM DTT until a final concentration of 10mg/mL was achieved. The TGF- β 1, 2 and 3 protein solutions were added drop wise, while stirring to re-folding solution (1M 3-((-Pyridino)-1-propane Sulfonate (NDSB-201), 20%(v/v) Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma), 2% (w/v) 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate (CHAPS), 1M NaCl(Sigma), 1%(w/v) reduced Glutathione (GSH, Sigma), 0.05M Trizma®Base (Sigma) pH 9.3) until final concentrations of 0.2mg/mL TGF- β 1, 2 and 3 proteins were achieved. It is important the pH is kept within a range of 9.2-9.4 using concentrated NaOH/HCl. The solution was covered with Parafilm, which was punctured to allow oxidation of the monomeric proteins and left stirring at 8°C. After 144 hours the solution was centrifuged at 15,000g for 40 minutes to remove the precipitate formed and the pH was adjusted to pH 3.5 with glacial acetic acid.

1.10 Purification of Refolded Monomeric Proteins

The resultant refolded TGF- β material was then further purified using standard chromatographic techniques followed by concentration of the relevant fractions (i.e. containing monomeric TGF- β proteins) by ultrafiltration prior to characterisation.

2. *IN-VITRO* AND *IN-VIVO* METHODOLOGY FOR THE CHARACTERISATION AND EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF MONOMERIC TGF- β PROTEINS

The TGF- β monomeric proteins were characterised and evaluated for biological activity via a number of methods including: SDS-PAGE; amino acid sequence analysis (by LCMS); *in-vivo* biological activity assay (using rat models of cutaneous wound healing and scarring described below).

2.1 *IN-VITRO* CHARACTERISATION OF TGF- β 3 MONOMERS

2.1.1 Non-Reducing and Reducing SDS-PAGE analysis of purified monomeric TGF- β 3.

2.1.1.1 Method

Purified wild type TGF- β 3 monomers were assessed by SDS-PAGE to determine purity and molecular mass. 3 μ g of purified TGF- β 3 monomers (reduced and non-reduced samples), 3 μ g dimeric TGF- β 3 positive control (reduced and non-reduced) and 10 μ L Invitrogen Mark 12 molecular weight standards were loaded onto a polyacrylamide gel (10%-20%(v/v) gradient of Acrylamide). Once the electrophoresis was complete the gel was stained with Coomassie Blue.

2.1.1.2 Results

The results of non-reducing and reducing SDS-PAGE analysis are shown in Figure 1, and illustrate that dimeric TGF- β 3 ran to expected positions on the gel (~13kDa for reduced as monomers and 25kDa for the non-reduced samples). The monomeric TGF- β ran to the expected ~13kDa (12.5kDa theoretical) position on the gel for reduced and non-reduced samples. No additional protein bands were detected by Coomassie Blue Staining, which has a sensitivity of approximately 1 μ g of protein.

2.1.2 Amino Acid Sequence Analysis

2.1.2.1 Method

50 micro litres of purified monomeric TGF- β 3 was vacuum dried and then re-suspended in 20 μ l of a solution containing 50mM NH_4HCO_3 and 10% (v/v) Acetonitrile. 20 μ g of sequencing grade Trypsin (Promega) was re-suspended in 10 μ l of kit supplied re-suspension buffer (Promega) to give a Trypsin concentration of 2 μ g/ μ l. This was then diluted into 50mM NH_4HCO_3 and 10% (v/v) Acetonitrile to give a final trypsin concentration of 0.2 μ g/ μ l. The digestion was performed overnight by the addition of trypsin in a 1:20 (w/w) ratio of monomeric TGF- β 3. The digestion was quenched by the addition of formic acid (Fluka) to a final concentration of 0.1% (v/v). The samples were then diluted to 1pmole/ μ l the peptides were then analysed by a process of nano-flow RP-LCMS (Ultimate system, Dionex online to a Q-ToF2, Micromass). The chromatography was performed on a 75 μ m C18 column (LC packings) utilising a 45 min gradient from 5% acetonitrile to 55% acetonitrile (Romil). The MS analysis took the form of data dependent analysis where the instrument measured the m/z of peptide ions eluting from the LC and selecting appropriate ions for MSMS analysis where collisionally induced decomposition was employed to fragment peptide ions to render sequence information.

2.1.2.2 Results

The amino acid sequence analysis confirmed that the TGF- β 3 'wild-type' monomer had the expected amino acid sequence (corresponding to Sequence ID No. 3).

2.2 *IN-VIVO* EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF TGF- β 3 MONOMERS

Data in the literature has demonstrated that dimeric TGF- β s including TGF- β 3, accelerate cutaneous healing and reduce scarring following wounding or injury (Shah, M et al 1995). The following Example investigated the biological effects of monomeric TGF- β 3 on incisional wound healing (3 days post-wounding) and scarring (70 days post-wounding) in adult, male rats.

2.2.1 The Effect of Monomeric 'Wild-type' and Mutated TGF- β 3 Proteins on Wound Healing (Day 3 Incisional Wounding).

2.2.1.1 Method

Male rats (Sprague Dawley) were anaesthetized with Halothane and their backs shaved. Wounding positions were marked using a standard proprietary template with skin marking ink as shown in Figure 2. Samples were diluted in sterile vehicle buffer containing 0.25M Maltose (Sigma), 0.002%(v/v) acetic acid and 0.33%(v/v) Isopropyl Alcohol to concentrations outlined in the Table of Figure 3. All samples were filter sterilised and endotoxin free. Four rats were used for each treatment group. 100 μ L of sample from each treatment group (Figure 3) was injected intra-dermally into marked wound positions A and B (except rats receiving no treatment – "naïve"). At wound positions A and B full thickness 1cm long incisions were made with a No. 11 scalpel blade. All animals were caged separately. After 24 hours the animals received a second dose of sample. After 3 days wounds were photographed and analysed using a macroscopic Visual Analogue Scoring system (modified from Beausang, E *et al.* 1998). Statistical analysis of the data was performed using Mann Whitney U/Student T tests. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

2.2.1.2 Results

Incisional wounds were examined after 3 days using macroscopic VAS system (see Figure 4). On this ten-point scale a score of 0 represents a well-healed wound and a score of 10 represents a very poorly healed wound. Data shows that:

Treatment with 50ng/100 μ L or 100ng/100 μ L of 'wild-type' monomeric TGF- β 3 decreases the VAS score (i.e., improves the macroscopic appearance of wounds) compared to both no treatment (naïve control) and placebo treatment. Treatment with the 100ng/100 μ L dose significantly improved ($p < 0.01$) the appearance of wounds compared to no treatment (naïve control). It is surprising to note that monomeric Wild-type TGF- β showed greater effectiveness than did the dimeric form.

2.2.2 The Effect of Monomeric 'Wild-type' TGF- β 3 Proteins on Scarring (Day 70 Incisional Wounding).

2.2.2.1 Method

Male rats (Sprague Dawley) were anaesthetized with Halothane and their backs shaved. Wounding positions were marked using a standardised template with skin marking ink as shown in Figure 5. Samples were diluted in sterile vehicle buffer containing 0.25M Maltose (Sigma), 0.002% (v/v) acetic acid and 0.33% (v/v) Isopropyl Alcohol to concentrations outlined in the Table of Figure 5. All samples were filter sterilised and endotoxin free. Four rats were used for each treatment group. 100 μ L of sample from each treatment group (Figure 5) was injected intra-dermally into marked wound positions A and B (except rats receiving no treatment – "naïve"). At wound positions A and B full thickness 1cm long incisions were made with a No. 11 scalpel blade. All animals were caged separately. After 24 hours the animals received a second dose of sample. After 70 days scars were photographed and analysed using a macroscopic Visual Analogue Scoring system (modified from Beausang, E *et al.* 1998). Representative examples of the macroscopic appearance of scars produced as described above are shown in Figure 7.

After macroscopic analysis, the wounds were excised and placed into 10% buffered saline before being processed for histological assessment into wax blocks. The wax blocks were cut into 5 μ m serial sections and placed on slides. The slides were stained with Massons Trichrome and analysed. Statistical analysis of the data was performed using Mann Whitney U/Student T tests. A value of $p < 0.05$ was considered significant. Representative examples of the microscopic appearance of scars produced as described above are shown in Figure 8.

2.2.2.2 Assessment of Day 70 Incisional wounds using Macroscopic VAS

Incisional wounds were examined after 70 days using a macroscopic VAS system. A score of 10 indicates a bad scar and a score of 0 is normal skin. The results of VAS analysis of the day 70 wounds are summarised in Figure 6. This shows that:

Monomeric 'Wild-type' TGF- β 3 (at 50ng/100 μ L and 100ng/100 μ L doses) reduced scarring compared to the placebo treated and naïve wounds. For the 100ng/100 μ L dose this reduction is statistically significant compared to placebo treated wounds ($p < 0.01$).

Dimeric TGF- β 3 at 50ng/100 μ L reduced scarring compared to the placebo treated and naïve wounds. This reduction is statistically significant compared to placebo treated wounds ($p < 0.01$).

3. DEVELOPMENT OF PREFERRED CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE MONOMERS

The inventors investigated whether or not improved methods of generating correctly folded, biologically active TGF- β monomers could be established. The following example is illustrative of the application of the methods of the invention to the re-folding monomeric of TGF- β 3.

A study was set up to screen re-fold reagents (see 3.12). Then methods of purifying the correctly refolded monomers were investigated (3.13).

These studies lead the inventors to realise that improved methods of generating biologically correctly folded TGF- β monomers may be established by following a method comprising adding solubilised, unfolded monomeric growth factor to a solution containing:

(i) 2-(cylcohexylamino)-ethanesulfonic acid (CHES) or a functional analogue thereof; and

(ii) a low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system; and

incubating the growth factor in the solution until dimeric biologically active growth factor is formed.

EXPERIMENTAL:

3.1 cDNA Generation

Total RNA from a human incisional wound (taken day 5 post-wounding) was treated with DNA-Free (Ambion) to remove any contaminating DNA. Using total RNA as a template, TGF- β 3 cDNA was generated by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The RT-PCR master mix was prepared from Brilliant® QRT-PCR Core Reagent Kit, 1-Step (Stratagene). One microgram of RNA was added to 50 μ L of a solution containing: One-step QRT-PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 3.5mM MgCl₂, 1 μ L StrataScript reverse transcriptase, Taq Polymerase 2.5 units, 0.4 μ M Sense primer (5' GAT ATA CCA TGG CTT TGG ACA CCA ATT ACT ACT GC 3'), 0.4 μ M Sense primer (5'-CAG CCG

GAT CCG GTC GAC TCA GCT ACA TTT ACA AGA C 3'). The reaction was placed in a thermal cycler (Hybaid PCR Express) and run under the following conditions: 30min at 45°C, 10min at 95°C, then 40 cycles of 95°C for 30 sec, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min. Final step of 72°C for 10 min. PCR samples were run on 2% (w/w) agarose gel to verify band size and purified using Wizard PCR Prep Kit (Promega).

3.2 Vector Cloning and Host Cell Transformation.

The pET-24d vector is derived from pBR322 vector and contains a T7 promoter under *LacUV5* control and a kanamycin resistant marker gene.

The TGF- β 3 cDNA fragments (generated in Section 1.1) were digested with 0.75 μ L of *Nco*I (New England Biolabs) and 0.75 μ L of *Bam*HI (New England Biolabs) with 1 X *Bam*HI Buffer (New England Biolabs) in a 15 μ L reaction (Nuclease Free Water, Novagen) at 37°C for 4 hours. One microliter of pET-24d plasmid (Novagen) was digested in the same manner. The digested cDNA and the large plasmid fragment were agarose gel purified and recovered using the SpinPrep Gel DNA extraction kit (Novagen).

The purified cDNA and plasmid fragments were ligated using T4 ligase kit (Novagen). The ligated cDNA /plasmid was transformed into HMS174 (DE3) (Novagen HMS174 (DE3) transformation kit). The transformants were selected by plating on Luria broth (LB) agar plates containing 50 μ g/mL kanamycin (Invitrogen). Three clones were selected for restriction digest and/or expression.

3.3 Clone Screening for Product Expression

Clones were grown in shake flask cultures of half strength 'Terrific Broth' (6g/L phytone peptone (Becton Dickinson), 12g/L yeast extract (Becton Dickinson), 2g/L glycerol (JT Baker), 1.16g/L potassium phosphate monobasic (JT Baker), 6.25g/L potassium phosphate dibasic (JT Baker), QS to 1 Litre with distilled water) and induced in exponential phase at OD₆₀₀ between 0.65 and 0.85 with 1mM isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Post-induction samples were taken 3 hours after the addition of IPTG and analysed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for product induction and expression. Clones 1-4 pre/post induction sample aliquots and Mark 12

3
6

molecular weight standards (Invitrogen- molecular weight range 2.5-200kDa) were run on NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris Gel, 1.0mm (Invitrogen) for approximately 40-50 minutes at 120milliAmps and 200 Volts and then stained with Coomassie Blue. A protein whose size is between 6 and 14.4 kDa (i.e., TGF- β 3 monomer) is clearly induced in each of these cultures (see Figure 9) with Clone 2 expressing the greatest amount of TGF- β 3 protein.

64

3.4 Frozen Cell stock

Clones 1-4 were grown in shake flasks in half strength Terrific Broth to an OD₆₀₀ of approximately 1. and stored as glycerol stocks by the addition of glycerol to 20%(v/v). 1.2mL of broth was aliquoted into 12 x 2mL cryovials (which contained 0.3mL of glycerol) and then stored at -70°C.

3.5 Sequence Confirmation of TGF-Beta 3 Gene.

Samples of the cultures used for frozen cell stocks were taken before the addition of glycerol and used for plasmid isolation using a Qiagen MiniPrep Kit. The isolated plasmid was sequenced and verified using a T7 promoter primer (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') and a T7 terminator primer (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3').

3.6 Seed Culture.

As Clone 2 expressed the highest amount of TGF-Beta 3 protein an ampoule of frozen stock (from Section 3.4) was recovered and inoculated into a 2 Litre baffled Erlenmeyer flask, containing 500mL of HySoy medium (12g/L Hy-Soy (Quest International), 24g/L yeast extract(Becton Dickinson), 10g/L NaCl (Sigma) and 10g/L glycerol(Sigma) and 50µg/mL of kanamycin. The flask was incubated with shaking at 37°C and 200rpm and sampled periodically to measure OD₅₅₀. When the OD of the culture reached 3.21 U/mL (after 7 hours) the cell broth was used to seed a 150L fermenter (100 L working volume).

3.7 Fermentation

Nine hundred millilitres of cell broth (from Section 3.6) was used to inoculate a 150 L fermenter (WHE) containing 90 L of Batch Culture Media (0.6g/L K₂HPO₄, 0.4g/L KH₂HPO₄, 1.25g/L NH₄SO₄, 12g/L HY-Soy, 24g/L yeast extract and 10g/L glycerol). The fermentation operating parameters were controlled as follows: temperature set point, 37°C; pH set point, 7.0 (maintained using 4N ammonium hydroxide and 4N phosphoric acid), and; dissolved oxygen (DO) initially calibrated to 100%. The vessel head pressure was 7 psi, and the agitation and airflow were 200-400rpm with one volume of air per volume of medium per minute (vvm or slpm), respectively. DO was maintained above 20% by adjusting the fermentation set point parameters in the following priority: Agitation (max 400rpm), aeration

(max 1.5 vvm), oxygen supplementation (max 33.3 lpm), and backpressure (max 12 psi). Foaming was controlled with Pluronic L-61 (25% v/v). When the OD of the culture reached 10U/mL a glycerol feed (50% v/v) was initiated at a flowrate of 45mL/min. When OD reached 40 U/mL, the cells were induced with the addition of IPTG to 0.2mM final concentration.

3.8 Harvest

After 4 hours post-induction, the fermenter was chilled to 10°C and the airflow and agitation were reduced to 0.3vvm and 100rpm respectively. Foam and pH controls were terminated and backpressure was adjusted to 3psi. The culture was harvested by continuous centrifugation with a Westfalia CSA 8 continuous centrifuge at 10°C. The centrifuge was operated at 15,000 rpm and a flow rate of 3 litres per min and cell slurries collected.

3.9 Cell Lysis and IB Recovery

The fermentation cell paste (from Section 3.8) was diluted 1:5 with Lysis Buffer (6.1g/L TrizmaBase(Tris), 3.7g/L ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 58.44g/L NaCl and 10g/L Triton X-100, pH 8.0) and re-suspended using a hand held homogenizer. The re-suspended cell paste was passed twice through a high-pressure homogenizer (parameters: pressure, 10,000 psig; flow rate, 450mL/min; and temperature, 15°C). The homogenised cell lysate was then centrifuged (bucket centrifuge, fixed-angle rotor) at 5,000xg for 20minutes at 4°C. The supernatant was discarded leaving insoluble (inclusion bodies) TGF- β 3. The inclusion body (IB) pellet was re-suspended in Wash Buffer (6.1g/L Tris and 3.72g/L EDTA, pH 8.0) using a hand held homogenizer and centrifuged (5,000 x g for 20 minutes at 4°C).

3.10 Inclusion Body Solubilization

The sediment from Section 3.9 was diluted 1:10 with Solubilization Buffer (6.1g/L Tris, 15.4g/L DL-dithiothreitol(DTT) and 360.4g/L urea, pH 8.0) and re-suspended using a hand held homogenizer. The suspension was covered and left stirring for 60-75 minutes, at room temperature to solubilize the inclusion bodies and reduce TGF- β 3 to its

monomeric form. The pH of the re-suspended pellet was adjusted to pH 9.4-9.6 with NaOH/acetic acid before incubation for a second time for 60-75 minutes.

3.11 Clarification/Ultrafiltration and Diafiltration

Solubilized material from Section 3.10 was clarified, concentrated and dia-filtered in a Tangential Flow Filtration (TFF) system (Millipore). Initial clarification and concentration was achieved with a pre-conditioned clarification TFF membrane (Millipore Pellicon 1000kDa, regenerated cellulose, screen V). The clarified TGF- β 3 was collected in the permeate. Switching to a Ultrafiltration/Diafiltration (UF/DF) membrane (Millipore Pellicon 5kDa, regenerated cellulose, screen C), the TGF- β 3 was then washed in 6 diavolumes of Solubilisation Buffer (6.1g/L Tris, 15.4g/L DTT and 360.4g/L urea, pH 9.5).

3.12 Re-fold Screening Matrix 1

3.12.1 Methodology

TGF- β 3 protein content in the clarified material from Section 1.12 was quantified using the RC DC™ Protein Assay (BioRad) in conjunction with SDS-PAGE, Coomassie Blue Staining and densitometry. The TGF-Beta 3 material was diluted into a series of refold buffers (See Tables 1 and 2). 1mL samples were taken daily over a 6-day timeline and analyzed under non-reducing conditions using SDS-PAGE. Sample aliquots and Mark 12 molecular weight standards (Invitrogen- molecular weight range 2.5-200kDa) were run on NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris Gels, 1.0mm (Invitrogen) for approximately 40-50 minutes at 120milliAmps and 200 Volts. The protein samples were then electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane (Invitrogen) using a Novex Blotting apparatus (Invitrogen). The membrane was blocked with 5%(w/v) skimmed milk powder, 1% (v/v) polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20;Sigma) in phosphate buffered saline (PBS). The membrane was washed (PBS, 0.1%(v/v) Tween 20) and incubated for 1 hour in primary antibody (Anti- TGF- β 3, MAB643(R&D systems) diluted 1:500 in PBS and 0.1(v/v) Tween 20). Following incubation with the primary antibody, the nitrocellulose was washed in washing buffer (PBS, 1% (v/v) Tween 20). The nitrocellulose was then incubated for an additional 1 hour in the secondary antibody (Goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Abcam PO397) diluted



1:2000 with PBS, 0.1% (v/v) Tween 20). The membrane was again washed (PBS, 1% (v/v) Tween 20 before developing with Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega).

The MAB 643 antibody detects correctly refolded monomeric and dimeric TGF-Beta 3 species.

3.12.2 Results

Tables 1 and 2 summarise the results obtained testing refolding of TGF- β 3 under 50 different experimental conditions

The inventors established that the conditions described below (i.e. experimental conditions 12, 19, 36, 37, 42, 43 and 44) produced correctly refolded dimeric TGF-Beta 3.

1. 0.7M 2-(cylcohexylamino) ethanesulfonic acid (CHES), 2mM reduced glutathione (GSH), 0.4mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 12).
2. 30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 19).
3. 1M NDSB-201, 2mM reduced glutathione (GSH), 2mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 36).
4. 0.7M CHES, 2mM reduced glutathione (GSH), 2mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 37).
5. 30mM Taurodeoxycholate plus 1M NDSB-221, 2mM reduced glutathione (GSH), 2mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 42).

68

6. 30mM Taurodeoxycholate plus 0.7M CHES, 2mM reduced glutathione (GSH), 2mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 43).

7. 30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 2mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 44).

By way of example Figure 10 illustrates the effectiveness of Experimental Condition 12.

Table 1. Re-fold Screening Matrix and Results

Experimental Condition	Temp	Detergent	TGF-Beta 3 conc.	GSH conc.	GSSG Conc.	Presence of correctly folded monomeric TGF-Beta 3 by Western Blot (MAB643) analysis
1	2-8°C	100mM Zwittergent 3-08	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
2	2-8°C	40mM Taurocholate	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
3	2-8°C	40mM Big CHAP	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
4	2-8°C	60mM Hexyl glucopyranoside	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
5	2-8°C	0.5%(w/v) ASB-14	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
6	2-8°C	0.5%(w/v) DDMAB	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
7	2-8°C	0.5%(w/v) CTAB	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
8	2-8°C	0.2%(w/v) SDS	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
9	2-8°C	0.1%(w/v) Dodecyl-b-D-maltoside	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
10	2-8°C	0.1%(w/v) Tween 20	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
11	2-8°C	1M NDSB-201	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
12	2-8°C	0.7M CHES	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	Present
13	2-8°C	20%(v/v) Sucrose	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
14	2-8°C	20%(v/v) Glycerol	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
15	2-8°C	20mM Zwittergent 3-12 + 0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
16	2-8°C	20mM Zwittergent 3-08 + 1M NDSB-221	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
17	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
18	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 1M NDSB-221	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
19	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 0.7M CHES	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	Present
20	2-8°C	0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
21	2-8°C	40mM Octyl-Thioglucopyranoside	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
22	2-8°C	60mM Hexylglucopyranoside + 0.1%(w/v) PEG-6000	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
23	2-8°C	30% (v/v) Ethanol	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
24	2-8°C	20% (v/v) Isopropyl Alcohol	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
25	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected

Table 2. Re-fold Screening Matrix and Results

Experimental Condition	Temp.	Detergent	TGF-Beta 3 conc.	GSH conc.	GSSG Conc.	Presence of correctly folded monomeric TGF-Beta 3 by Western Blot (MAB643) analysis.
26	2-8°C	100mM Zwittergent 3-08	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
27	2-8°C	40mM Taurocholate	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
28	2-8°C	40mM Big CHAP	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
29	2-8°C	60mM Hexyl glucopyranoside	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
30	2-8°C	0.5%(w/v) ASB-14	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
31	2-8°C	0.5%(w/v) DDMAB	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
32	2-8°C	0.5%(w/v) CTAB	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
33	2-8°C	0.2%(w/v) SDS	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
34	2-8°C	0.1%(w/v) Dodecyl- β -D-maltoside	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
35	2-8°C	0.1%(w/v) Tween 20	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
36	2-8°C	1M NDSB-201	0.12mg/mL	2mM	2mM	Present
37	2-8°C	0.7M CHES	0.12mg/mL	2mM	2mM	Present
38	2-8°C	20%(v/v) Sucrose	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
39	2-8°C	20%(v/v) Glycerol	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
40	2-8°C	20mM Zwittergent 3-12 + 0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
41	2-8°C	20mM Zwittergent 3-08 + 1M NDSB-221	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
42	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	2mM	Present
43	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 1M NDSB-221	0.12mg/mL	2mM	2mM	Present
44	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 0.7M CHES	0.12mg/mL	2mM	2mM	Present
45	2-8°C	0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
46	2-8°C	40mM Octyl-Thiogluconopyranoside	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
47	2-8°C	60mM Hexylglucopyranoside + 0.1%(w/v) PEG-6000	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
48	2-8°C	30% (v/v) Ethanol	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
49	2-8°C	20% (v/v) Isopropyl Alcohol	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
50	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected

3.13 Ultrafiltration/ Hydrophobic Interaction Chromatography.

The selected refolding solution was concentrated 5 fold by ultrafiltration (the membrane was a flat-sheet Millipore Pellicon 5kDa, 0.1m², Regenerated Cellulose, screen). The pH of the concentrated re-fold material was then adjusted to a pH of 2.5-2.8 using glacial acetic acid before being diluted 1:1 in Dilution Buffer (2.72g/L sodium acetate, 264.28g/L ammonium sulfate, 100g/L acetic acid, and 210.7g/L arginine hydrochloride pH 3.3). A Butyl Sepharose 4 Fast Flow Column (Amersham, 16cm Bed Height) was equilibrated with four column volumes of Buffer A (2.72g/L sodium acetate, 132.14g/L ammonium sulfate and 100g/L acetic acid pH 3.3). The refold material was filtered through 0.22μm membrane (Millipore Millipak filter) before being loaded onto the Butyl Sepharose column at a flow rate of 100cm/hr (this flow rate was used throughout procedure). The column was then washed in Buffer A for four-column volumes. The TGF-Beta 3 proteins were eluted off the column using Buffer B (2.72g/L sodium acetate, 100g/L acetic acid and 300g/L ethanol pH 3.3). The first peak, which contains TGF-β 3 proteins in both monomeric and dimeric forms, was pooled (see Figure 11), prior to separation of the monomeric proteins.

Sequence Information

TGF- β 1 (Sequence ID No. 1)

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYPHANFCLGPCPYIWSLDT
QYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

TGF- β 2 (Sequence ID No. 2)

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSDT
QHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCKCS

TGF- β 3 (Sequence ID No. 3)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYYANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS

DNA encoding full-length TGF-Beta 1 (Sequence ID No. 4), showing signal peptide (shown in *italics*), pro-peptide (shown in **bold**) as well as the active fragment (shown in normal text)

atgccgccct cccggctgcg gctgctgctg ctgctgctac cgtgctgtg gctactggtg
ctgacgcctg gccggccggc cgcgggacta tccacctgca agactatcga catggagctg
gtgaagcggg agcgcatcga ggccatccgc ggccagatcc tgtccaagct gcggctcgcc
agcccccca gccaggggga ggtgcgcgcc ggcccgctgc ccgaggccgt gctcgccctg
tacaacagca cccgcgaccg ggtggccggg gagagtgcag aaccggagcc cgagcctgag
gccgactact acgccaagga ggtcaccgcg gtgctaattg tggaaaccca caacgaaatc
tatgacaagt tcaagcagag tacacacagc atatatatgt tcttcaacac atcagagctc
cgagaagcgg tacctgaacc cgtgttgctc tcccgggcag agctgcgtct gctgaggctc
aagttaaaag tggagcagca cgtggagctg taccagaaat acagcaacaa ttcctggcga
tacctcagca accggctgct ggcacccagc gactcgccag agtggttata ttttgatgtc
accggagtgg tgcggcagtg gttgagccgt ggaggggaaa ttgagggtt tcgccttagc
gcccactgct cctgtgacag cagggataac acactgcaag tggacatcaa cgggttcact
accggccgcc gaggtgacct ggccaccatt catggcatga accggccttt cctgcttctc
atggccacc cgtggagag ggcccagcat ctgcaaagct cccggcaccc cgagccctg
gacaccaact attgcttcag ctccacggag aagaactgct gcgtgcggca gctgtacatt
gacttcgcga aggacctcgg ctggaagtgg atccacgagc ccaagggcta ccatgccaac
ttctgcctcg ggcctgccc ctacatttgg agcctggaca cgcagtacag caaggtcctg
gccctgtaca accagcataa cccgggcgcc tcggcggcgc cgtgctgcgt gccgcaggcg
ctggagccgc tgcccathgt gtactacgtg ggccgcaagc ccaaggtgga gcagctgtcc
aacatgatcg tgcgtcctg caagtgcagc tga

DNA encoding full-length TGF-Beta 2 (Sequence ID No. 5), showing signal peptide (shown in *italics*), pro-peptide (shown in **bold**) as well as the active fragment (shown in normal text)

ctgtctacct gcagcacact cgatatggac cagttcatgc gcaagaggat cgaggcgatc
cgcgggcaga tcctgagcaa gotgaagctc accagtcccc cagaagacta tcctgagccc
gaggaagtcc ccccgagggt gatttccatc tacaacagca ccagggaactt gctccaggag
aaggogagcc ggagggcggc cgctgcgag cgcgagagga gcgacgaaga gtactacgoc
aaggagggtt acaaaataga catgccgccc ttcttcccct cogaagccat ccgcccact
ttctacagac cctacttcag aattgttoga tttgacgtct cagcaatgga gaagaatgct
tccaatttgg tgaagcaga gttcagagto tttcgtttgc agaaccacaa agccagagtg
cctgaacaac ggattgagct atatcagatt ctcaagtoca aagatttaac atctccaacc
cagcgctaca tgcacagcaa agttgtgaaa acaagagcag aaggcgaatg gctctccttc
gatgtaactg atgctgttca tgaatggctt caccataaag acaggaacot gggattttaa
ataagcttac actgtccctg ctgcactttt gtaccatcta ataattacat catccocaaat
aaaagtgaag aactagaagc aagatttgca ggtattgatg gcacctccac atataaccagt
ggtgatcaga aaactataaa gtccactagg aaaaaaaca gtgggaagac cccacatctc
ctgctaattgt tattgccctc ctacagactt gagtcaaac agaccaaccg gcggaagaag
cgtgctttgg atgcggccta ttgctttaga aatgtgcagg ataattgctg cctacgtcca
ctttacattg atttcaagag ggatctaggg tggaaatgga tacacgaacc caaagggtag
aatgccaaact tctgtgctgg agcatgccg tatttatgga gttcagacac tcagcacagc
agggctcctga gcttatataa taccataaat ccagaagcat ctgcttctcc ttgctgcgtg
toccaagatt tagaacctct aaccattctc tactacattg gcaaacacc caagattgaa
cagctttcta atatgattgt aaagtcttgc aaatgcagct aa

DNA encoding full-length TGF-Beta 3 (Sequence ID No. 6), showing signal peptide (shown in *italics*), pro-peptide (shown in **bold**) as well as the active fragment (shown in normal text)

<i>atgaagatgc</i>	<i>acttgcaaag</i>	<i>ggctctggtg</i>	<i>gtcctggccc</i>	<i>tgctgaactt</i>	<i>tgccacggtc</i>	60
<i>agocctctctc</i>	<i>tgtccacttg</i>	<i>caccaccttg</i>	<i>gacttoggcc</i>	<i>acatcaagaa</i>	<i>gaagaggggtg</i>	120
<i>gaagccatta</i>	<i>ggggacagat</i>	<i>cttgagcaag</i>	<i>ctcagggtca</i>	<i>ccagccccc</i>	<i>tgagccaacg</i>	180
<i>gtgatgaccc</i>	<i>acgtccccta</i>	<i>tcaggtcctg</i>	<i>gccttttaca</i>	<i>acagcaccog</i>	<i>ggagctgctg</i>	240
<i>gaggagatgc</i>	<i>atggggagag</i>	<i>ggaggaaggc</i>	<i>tgcaoccagg</i>	<i>aaaacaccga</i>	<i>gtcggaatac</i>	300
<i>tatgccaaag</i>	<i>aaatccataa</i>	<i>attcgacatg</i>	<i>atocaggggc</i>	<i>tggcggagca</i>	<i>caacgaactg</i>	360
<i>gctgtctgcc</i>	<i>ctaaaggaat</i>	<i>tacctccaag</i>	<i>gttttcogct</i>	<i>tcaatgtgtc</i>	<i>ctcagtggag</i>	420
<i>aaaaatagaa</i>	<i>ccaacctatt</i>	<i>cogagcagaa</i>	<i>ttccgggtct</i>	<i>tgccgggtgcc</i>	<i>caaccccago</i>	480
<i>tctaagogga</i>	<i>atgagcagag</i>	<i>gatcgagctc</i>	<i>ttccagatcc</i>	<i>ttcggccaga</i>	<i>tgagcacatt</i>	540
<i>gccaaacago</i>	<i>gctatatcgg</i>	<i>tggaagaat</i>	<i>ctgcccacac</i>	<i>ggggcactgc</i>	<i>cgagtggctg</i>	600
<i>tcctttgatg</i>	<i>tcactgacac</i>	<i>tgtgogtgag</i>	<i>tggtgtttga</i>	<i>gaagagagtc</i>	<i>caacttaggt</i>	660
<i>ctagaaatca</i>	<i>gcattcactg</i>	<i>tccatgtcac</i>	<i>acctttcagc</i>	<i>ccaatggaga</i>	<i>tatcctggaa</i>	720
<i>aacattcaog</i>	<i>aggtgatgga</i>	<i>aatcaaattc</i>	<i>aaaggcgtgg</i>	<i>acaatgagga</i>	<i>tgaccatggo</i>	780
<i>cgtggagatc</i>	<i>tggggcgcct</i>	<i>caagaagcag</i>	<i>aaggatcaac</i>	<i>acaaocctca</i>	<i>tctaatectc</i>	840
<i>atgatgatcc</i>	<i>ccccacacog</i>	<i>gctcgacaac</i>	<i>cogggccagg</i>	<i>ggggtcagag</i>	<i>gaagaagogg</i>	900
<i>gcttttgaca</i>	<i>ccaattactg</i>	<i>cttcgcgaac</i>	<i>ttggaggaga</i>	<i>actgctgtgt</i>	<i>gcgccccctc</i>	960
<i>tacattgact</i>	<i>tccgacagga</i>	<i>tctgggctgg</i>	<i>aagtgggtcc</i>	<i>atgaacctaa</i>	<i>gggctactat</i>	1020
<i>gccaacttct</i>	<i>gctcaggccc</i>	<i>ttgcccatac</i>	<i>ctccgcagtg</i>	<i>cagacacaac</i>	<i>ccacagcacg</i>	1080
<i>gtgctgggac</i>	<i>tgtacaacac</i>	<i>tctgaaccct</i>	<i>gaagcatctg</i>	<i>cctcgccttg</i>	<i>ctgctgccc</i>	1140
<i>caggacctgg</i>	<i>agcccctgac</i>	<i>catcctgtac</i>	<i>tatgttggga</i>	<i>ggacccccaa</i>	<i>agtggagcag</i>	1200
<i>ctctccaaca</i>	<i>tggtggtgaa</i>	<i>gtcttgtaaa</i>	<i>tgtagctga</i>			

Sequence ID No. 7 – DNA encoding active fragment of wild-type human TGF- β 3

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG GAG GAG AAC TGC
TGT GTG CGC CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG GGC TGG
AAG TGG GTC CAT GAA CCT AAG GGC TAC TAT GCC AAC TTC TGC TCA
GGC CCT TGC CCA TAC CTC CGC AGT GCA GAC ACA ACC CAC AGC ACG
GTG CTG GGA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT GAA GCA TCT GCC TCG
CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG CCC CTG ACC ATC CTG TAC TAT
GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG
AAG TCT TGT AAA TGT AGC

Sense and Antisense Primers for the cDNA Generation of TGF-Beta 1, TGF-Beta 2 and TGF-Beta 3:**TGF-Beta 1**

Sense primer -5' GTT ACA CCA TGG CCC TGG ACA CCA ACT ATT 3'

Anti-Sense primer-3' CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT GCA CTT 5'

TGF-Beta 2

Sense primer-5' GTT ACA CCA TGG CTT TGG ATG CGG CCT ATT

Anti-Sense primer-3' CAG CCG GAT CC G GTC GAC TCA GCT GCA TTT G 5'

TGF-Beta 3

Sense primer -5' GAT ATA CCA TGG CTT TGG ACA CCA ATT ACT ACT GC 3'

Anti-Sense primer-5' CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT ACA TTT ACA AGA
C 3'

CLAIMS

1. A TGF- β monomer, or a biologically active fragment or derivative thereof, for use as a medicament.
2. A TGF- β 3 monomer, or a biologically active fragment or derivative thereof, for use as a medicament.
3. The use according to claim 1 or claim 2, wherein the TGF- β monomer has a molecular weight of approximately 12kDa.
4. The use according to claim 2 or claim 3, in the preparation of a medicament for use in the acceleration of wound healing and/or the inhibition of scarring.
5. The use according to any of claims 2 to 4, wherein the TGF- β 3 monomer, or fragment or derivative, is a wild type TGF- β 3 monomer comprising Sequence ID No. 3, or a biologically active fragment or derivative thereof.
6. The use according to claim 4 or claim 5, wherein the wound is a dermal wound.
7. The use according to claim 4 or claim 5, wherein the wound is an eye wound.
8. The use according to any of claims 4 to 7, wherein the wound is an acute wound.
9. The use according to claim 8, wherein the wound is a burn.
10. The use according to any of claims 4 to 7, wherein the wound is a chronic wound.
11. The use according to claim 2 or claim 3, in the preparation of a medicament for use in the promotion of epithelial regeneration.
12. The use according to claim 11, wherein the epithelium comprises the epidermis.

13. The use according to claim 11, wherein the epithelium comprises an epithelium of the eye.
14. The use according to claim 2 or claim 3, in the preparation of a medicament for use in the prevention and/or treatment of a fibrotic disorder.
15. The use according to claim 14, wherein the fibrotic disorder is selected from the group consisting of lung fibrosis, liver fibrosis, scleroderma, skin fibrosis, muscle fibrosis, radiation fibrosis, kidney fibrosis, ocular fibrosis and uterine fibrosis.
16. The use according to any preceding claim, wherein the monomer, or biologically active fragment or derivative thereof is provided at a concentration of between 0.78pM and 0.78mM.
17. The use according to any preceding claim, wherein the medicament has a pH of approximately 5 to 7.
18. The use according to any preceding claim, wherein the medicament is substantially free from alcohol.
19. The use according to any preceding claim, wherein the TGF- β monomer, or biologically active fragment or derivative thereof, is folded into its biologically active form by a method comprising adding solubilised, unfolded monomeric TGF- β (or fragment or derivative thereof) to a solution containing:
- (i) 2-(cylcohexylamino)-ethanesulfonic acid (CHES) or a functional analogue thereof; and
 - (ii) a low molecular weight sulphhydryl/disulfide redox system; and
- incubating the TGF- β in the solution until biologically active monomeric TGF- β is formed.

79

20. A method of accelerating wound healing and/or inhibiting scarring, the method comprising administering to a patient in need of such treatment a therapeutically effective amount of a monomeric TGF- β or a biologically active fragment or derivative thereof.
21. A method according to claim 20, wherein the TGF- β 3 monomer, or fragment, is a wild type TGF- β 3 monomer comprising Sequence ID No. 3, or a biologically active fragment or derivative thereof.
22. A method according to claim 20 or claim 21, wherein the wound is a dermal wound.
23. A method according to claim 20 or claim 21, wherein the wound is an eye wound.

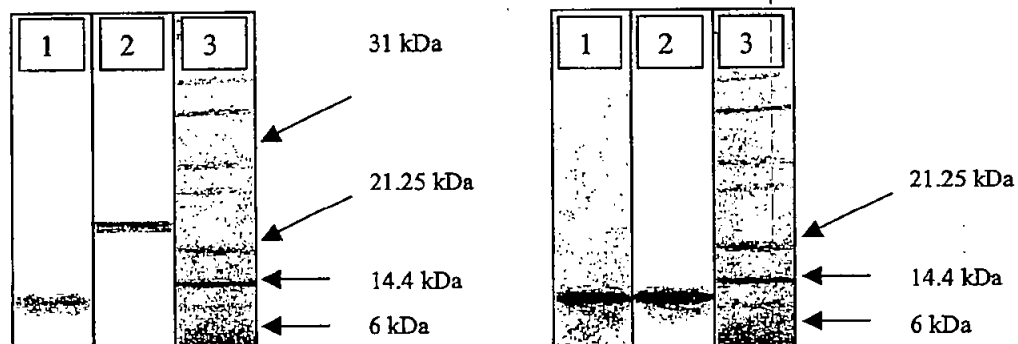
80

Figure 1. Comparison of Monomeric TGF-Beta 3 With Dimeric TGF-Beta 3 by SDS-PAGE (Coomassie Blue stained)

Track	Sample	Concentration loaded per track
1	Monomeric TGF-Beta 3	3 μ g
2	Dimeric TGF-Beta 3	3 μ g
3	Invitrogen Mark 12 molecular weight standards	10 μ g

Non-Reduced Conditions

Reduced Conditions

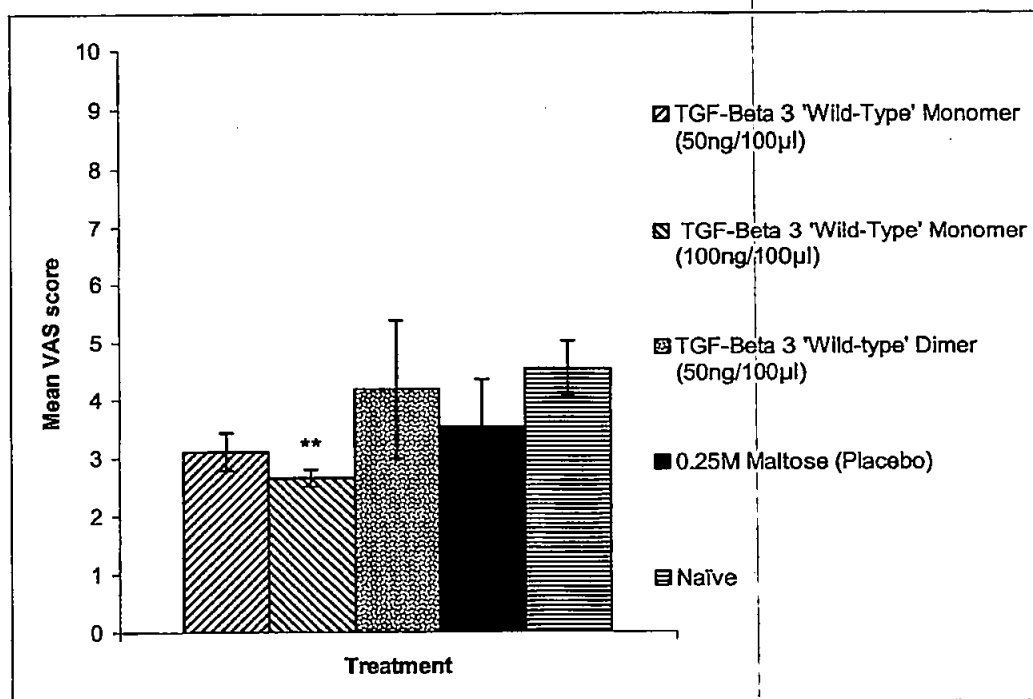


2
8**Figure 3** **Wound Site Treatment.**

Group	Treatment/sample	Concentration (ng/100µL)
A	Monomeric 'Wild-type' TGF-Beta 3	50
B	Monomeric 'Wild-type' TGF-Beta 3	100
G	TGF-Beta 3 'Wild-type' Dimer	50
H	0.25 M Maltose (Placebo control)	N/A
I	Naïve (no treatment control)	N/A

83

Figure 4. Day 3 Mean ($\pm$ SD) Macroscore for Incisional wounds (A and B) Treated with Monomeric and Dimeric 'Wild-type' TGF-Beta 3.



** Significantly increased healing compared to naïve wounds ($p < 0.01$)

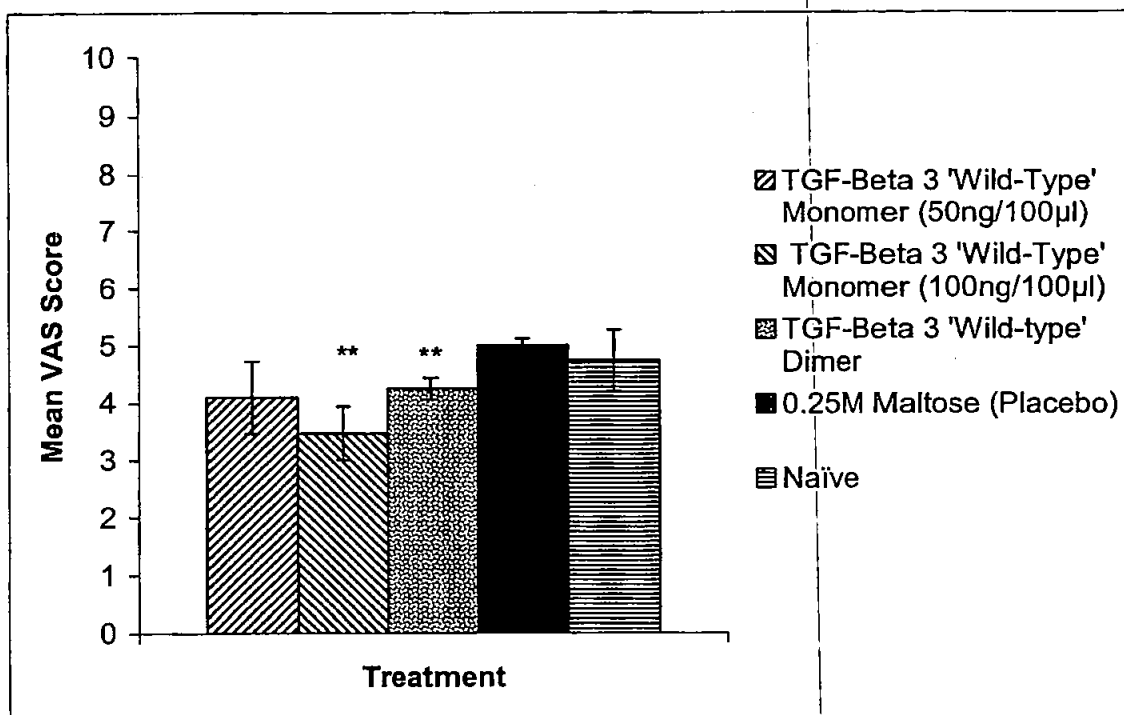
64

Figure 5. Wound site treatment.

Group	Treatment/sample	Concentration (ng/100µL)
A	Monomeric 'Wild-type' TGF-Beta 3	50
B	Monomeric 'Wild-type' TGF-Beta 3	100
K	TGF-Beta 3 'Wild-type' Dimer	50
L	0.25 M Maltose (Placebo control)	N/A
M	Naïve (no treatment control)	N/A

6

Figure 6. Day 70 Mean ($\pm$ SD) Macroscore for Incisional Wounds (A and B) Treated with Monomeric and Dimeric 'Wild-type' TGF-Beta 3.

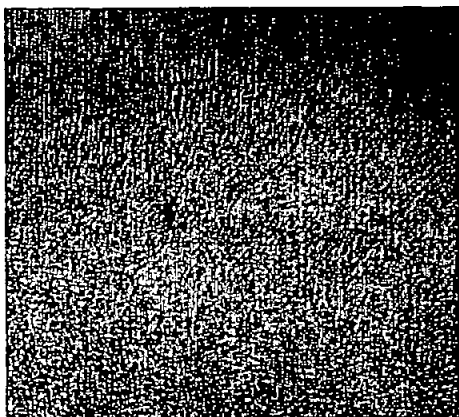


** Significantly decreased scarring compared to placebo treated wounds ($p < 0.01$)

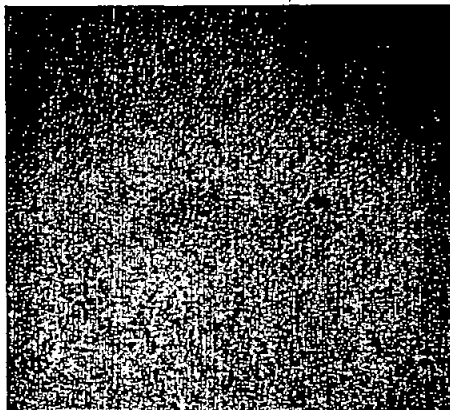
86

Figure 7. Representative Macroscopic Scar Images (70 days Post-Wounding).

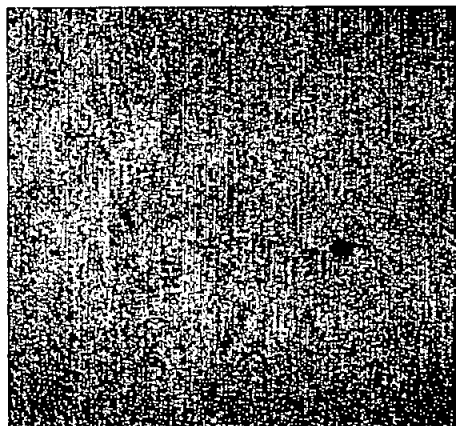
**TGF-Beta 3 'Wild-type'
Monomer (50ng/100 μ L)**



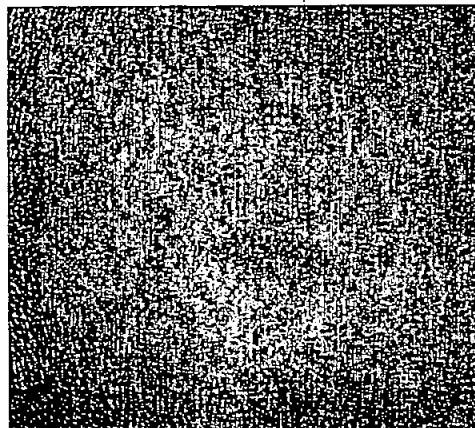
**TGF-Beta 3 'Wild-type'
Monomer (100ng/100 μ L)**



**TGF-Beta 3 'Wild-type'
Dimer (50ng/100 μ L)**



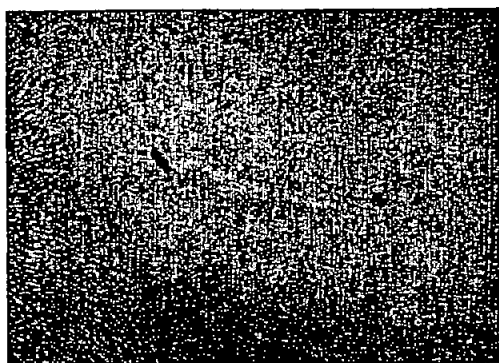
Placebo (0.25M Maltose)



87

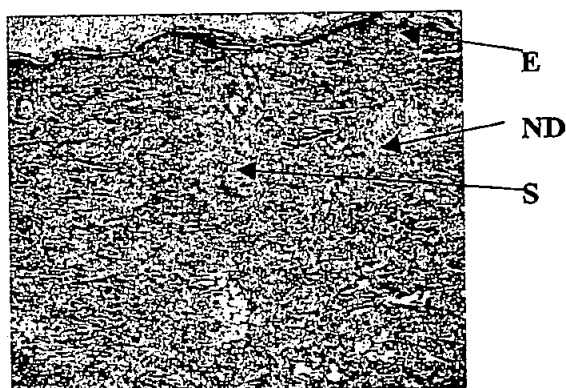
Figure 7 Cont'd. Representative Macroscopic Scar Images (70 days Post-Wounding).

Naïve



JG

Figure 8. Representative Microscopic Scar Images of Wounds treated with Monomeric and Dimeric 'Wild-type' TGF-Beta 3 (70 days Post-Wounding).



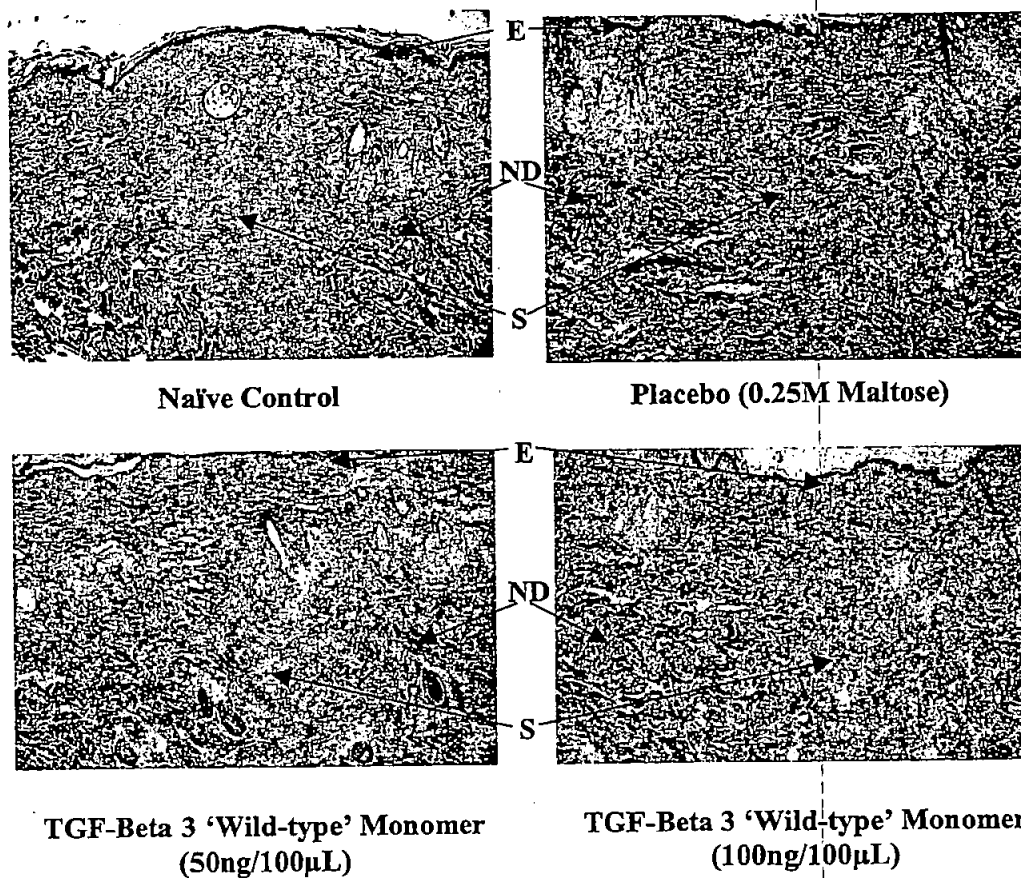
**TGF-Beta 3 'Wild-type' Dimer
(50ng/100μl)**

Key

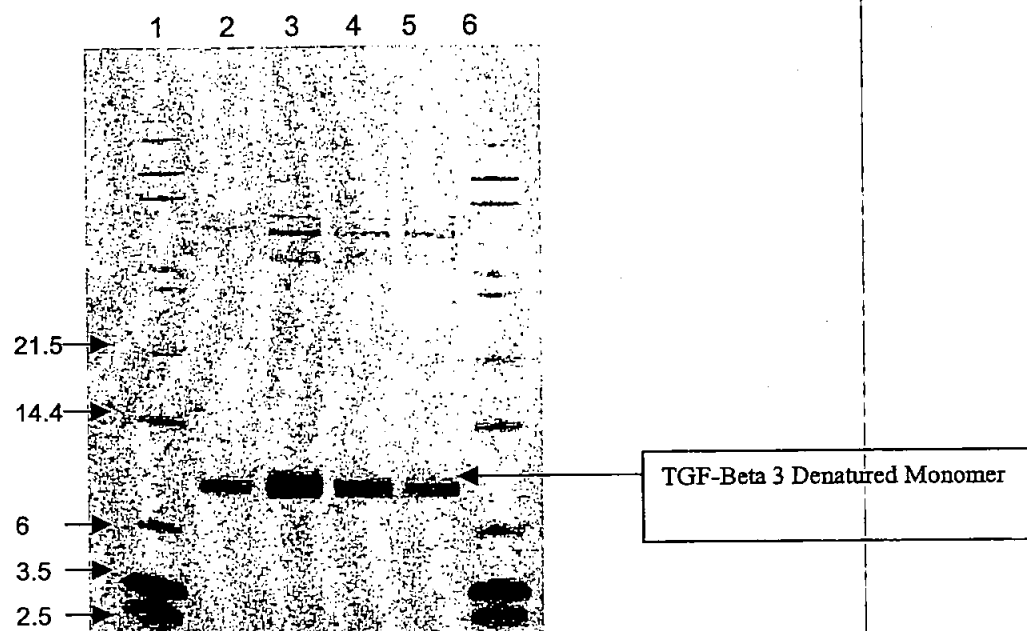
E = Epidermis
ND = Normal
Dermis
S = Scar

89

Figure 8 Cont'd. Representative Microscopic Scar Images of Wounds treated with Monomeric and Dimeric 'Wild-type' TGF-Beta 3 (70 days Post-Wounding) .



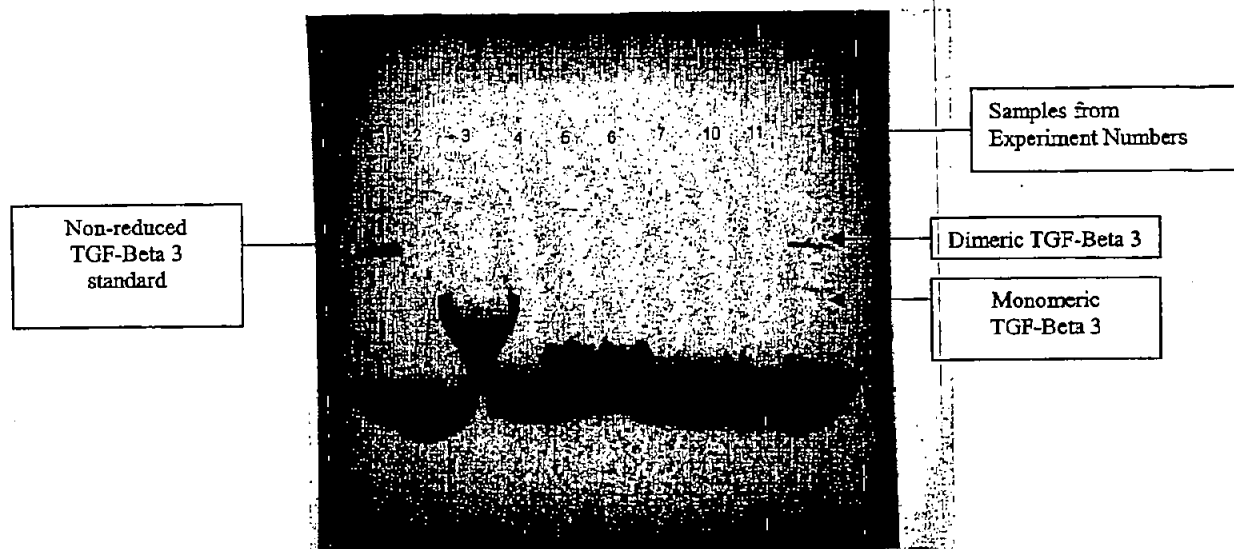
90

FIG. 9

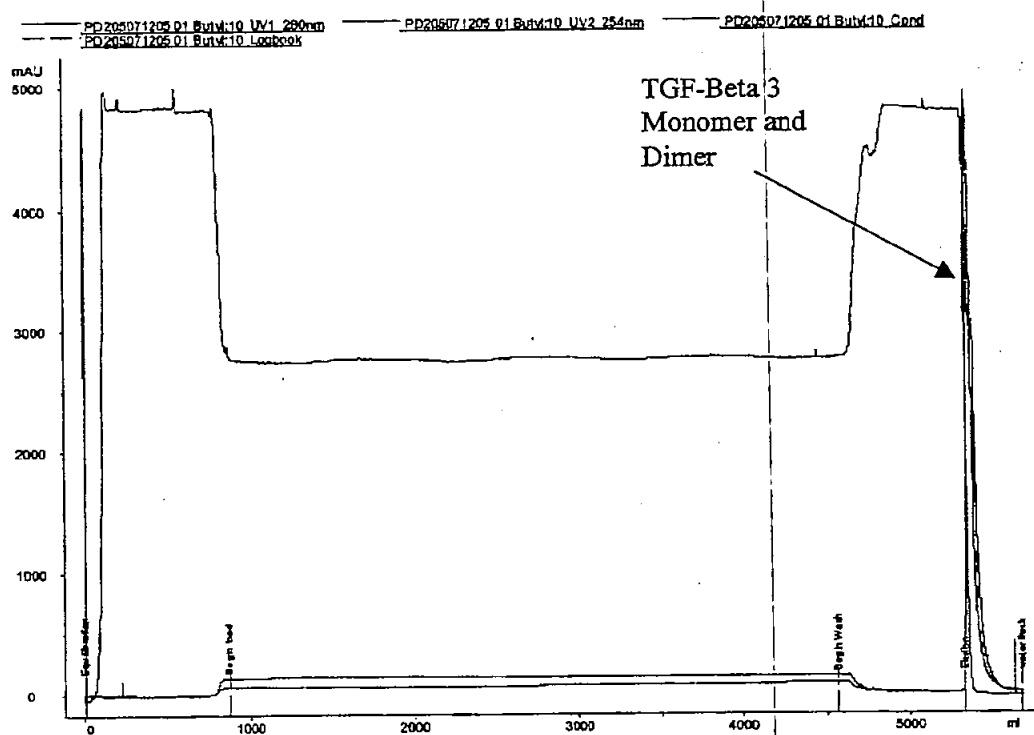
Lane	Sample
1	Mark 12 Standard
2	Clone 1 3hr Post-Induction (3 μ L)
3	Clone 2 3hr Post-Induction (3 μ L)
4	Clone 3 3hr Post-Induction (3 μ L)
5	Clone 4 3hr Post-Induction (3 μ L)
6	Mark 12 standard

91

FIG. 10



Q2

FIG. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/18 A61P17/02

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2007/007098 A (RENOVO LTD [GB]; FERGUSON MARK [GB]; O'KANE SHARON [GB]; LAVERTY HUGH) 18 January 2007 (2007-01-18) the whole document	1-18, 21-23
X	US 5 650 494 A (CERLETTI NICO [CH] ET AL) 22 July 1997 (1997-07-22) the whole document	1-18, 20-23
X	EP 0 433 225 A (CIBA GEIGY AG [CH] NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH [AT]) 19 June 1991 (1991-06-19) page 2, line 38 - page 3, line 42 page 5, line 23 - page 6, line 57 page 8, line 43 - page 9, line 42 claims 1-37	1-23

—/—

☒ 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
- *S* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 February 2008

Date of mailing of the international search report

04/03/2008

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) 340-3018

Authorized officer

Greif, Gabriela

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2007/000834

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 411 940 A (NIXON JON C [US] ET AL) 2 May 1995 (1995-05-02) the whole document	1-4,7, 11,13, 20,23
X	WO 97/05166 A (CIBA GEIGY AG [CH]; MITTL PEER [DE]; GRUETTER MARKUS [CH]; ARVINTE TUD) 13 February 1997 (1997-02-13) abstract page 3, paragraph 5 - page 5, paragraph 2 page 8, paragraph 4 sequence ID NO 2	1-3,5
X	WO 02/12336 A (CURIS INC [US]; WANG MONICA [US]; PANG KEVIN [US]) 14 February 2002 (2002-02-14) claims 1-7; sequence ID NO 8	1-3,5
Y	O'KANE ET AL: "Transforming growth factor betas and wound healing" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, EXETER, GB, vol. 29, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 63-78, XP005876979 ISSN: 1357-2725 the whole document	1-23
Y	SCHMID PETER ET AL: "TGF-BETA-S AND TGF-BETA TYPE II RECEPTOR IN HUMAN EPIDERMIS: DIFFERENTIAL EXPRESSION IN ACUTE AND CHRONIC SKIN WOUNDS" JOURNAL OF PATHOLOGY, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 171, no. 3, 1993, pages 191-197, XP008075690 ISSN: 0022-3417 the whole document	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/000834

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007007098 A	18-01-2007	AU 2006268091 A1	18-01-2007
US 5650494 A	22-07-1997	NONE	
EP 0433225 A	19-06-1991	AT 178616 T	15-04-1999
		AU 638075 B2	17-06-1993
		AU 6701890 A	13-06-1991
		CA 2031430 A1	07-06-1991
		DE 69033040 D1	12-05-1999
		DE 69033040 T2	09-09-1999
		DK 433225 T3	25-10-1999
		ES 2132066 T3	16-08-1999
		FI 905956 A	07-06-1991
		GR 3030703 T3	30-11-1999
		HU 56880 A2	28-10-1991
		IE 904386 A1	19-06-1991
		IE 990992 A1	13-12-2000
		IL 96549 A	31-10-2000
		JP 3048061 B2	05-06-2000
		JP 3191791 A	21-08-1991
		MX 172600 B	03-01-1994
		NO 905264 A	07-06-1991
		NZ 236333 A	26-03-1992
		PH 31649 A	12-01-1999
		PT 96068 A	30-09-1991
		SG 52690 A1	28-09-1998
		ZA 9009762 A	28-08-1991
US 5411940 A	02-05-1995	WO 9632131 A1	17-10-1996
WO 9705166 A	13-02-1997	AT 236929 T	15-04-2003
		AU 6700696 A	26-02-1997
		CA 2225963 A1	13-02-1997
		DE 69627340 D1	15-05-2003
		DE 69627340 T2	05-02-2004
		DK 840748 T3	28-07-2003
		ES 2196164 T3	16-12-2003
		JP 2000502243 T	29-02-2000
		PT 840748 T	29-08-2003
		US 6294656 B1	25-09-2001
		ZA 9606274 A	27-01-1997
WO 0212336 A	14-02-2002	AU 3809101 A	18-02-2002

Título: MEDICAMENTOS Y PROTEÍNAS

Resumen: Se proporciona el uso de los TGF- β monoméricos, o sus fragmentos o derivados, como medicamentos. Estos medicamentos con preferencia comprenden TGF- β monoméricos o sus fragmentos o derivados. Los medicamentos provistos por el uso en la aceleración de heridas y/o la inhibición de formación de cicatrices, en la promoción de regeneración epitelial, o en la prevención y/o tratamiento de trastornos fibróticos.

q/b

97

MEDICAMENTOS Y PROTEÍNAS.

La presente invención se refiere a la provisión de nuevos medicamentos. En realizaciones preferidas la invención proporciona medicamentos adecuados para el uso en la aceleración de la curación de heridas y/o la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices. La invención también proporciona un método para la aceleración de la curación de heridas y/o la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices.

Los factores de crecimiento transformante betas (TGF- β) son una familia de citoquinas que tienen diversas actividades biológicas. La familia TGF- β comprende cinco isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, y TGF- β 5.

Los TGF- β tienen utilidad en muchos contextos terapéuticos diferentes. Como resultado del potencial terapéutico de los TGF- β existe mucho interés en la aplicación farmacéutica de los miembros de la familia TGF- β , en particular TGF- β 1-3.

TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 son bien conocidos por cumplir funciones cruciales en la regulación de la respuesta de curación de heridas. La actividad de TGF- β puede influir la tasa de curación de heridas así como el grado de formación de cicatrices que ocurre como resultado de la curación.

TGF- β 1 se usa en la prevención y/o tratamiento de escleroderma, trastornos de angiogénesis, enfermedad renal, osteoporosis, enfermedad ósea, glomerulonefritis y enfermedad renal.

TGF- β 2 se puede usar en el tratamiento de glioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tumor de páncreas, tumores sólidos, tumor de colon, tumor de

qcl

ovario, degeneración macular relacionada con la edad, lesión injuria, osteoporosis, retinopatía, úlceras, carcinoma, inflamación bucal y escleroderma.

TGF- β 3 se puede usar en el tratamiento de los trastornos fibróticos, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, escleroderma, trastornos de angiogénesis, restenosis, adhesiones, endometriosis, enfermedad isquémica, hueso e inducción de cartílago, fertilización in vitro, mucositis oral, enfermedad renal, prevención, reducción o inhibición de formación de cicatrices, mejora de la reconexión neuronal en el sistema nervioso periférico y central, prevención, reducción o inhibición de complicaciones de la cirugía ocular (tal como cirugía LASIK o PRK) o formación de cicatrices en el fondo de ojo (tal como la formación de cicatrices asociada con vitreorretinopatía proliferativa).

Los miembros de la familia TGF- β existen naturalmente en la forma de dímeros que comprenden dos cadenas de péptidos. Los dímeros de TGF- β activos tienen un peso molecular de aproximadamente 25,4 kDa. El fragmento del TGF- β dimérico activo está estabilizado por las interacciones hidrofóbicas y iónicas, que están reforzadas adicionalmente por un puente disulfuro entre subunidades. Se acepta generalmente que la actividad biológica y de este modo la actividad terapéutica de los miembros de la familia de TGF- β es estimulada solo por el dímero activo.

A la luz de lo anterior, se reconocerá que existe una necesidad bien establecida de proporcionar medicamentos que pueden utilizar las propiedades terapéuticas de los miembros de la familia TGF- β . Sin embargo, a pesar de este requerimiento bien reconocido para las composiciones farmacéuticas que comprenden

99

miembros de la familia TGF- β existen muchos problemas admitidos asociados con la fabricación de los TGF- β para uso terapéutico.

Una de las más grandes desventajas de usar los TGF- β como agentes terapéuticos es que a fin de producir dímeros proteicos biológicamente (y de este modo terapéuticamente) usando un huésped procariótico, se necesita la renaturalización intensiva a la forma dimérica biológicamente activa. La formación de dímeros puede extender el plan de tiempo de la fabricación. Esto también tiene consecuencias importantes en la limitación del uso terapéutico de alguno de los TGF- β .

Es un objeto de la presente invención obviar a aliviar al menos algunos de los problemas asociados con las composiciones farmacéuticas del arte previo que comprenden los TGF- β . En particular, un objeto de ciertas realizaciones de la presente invención es obviar o aliviar los problemas asociados con el uso de métodos que requieren mucho tiempo usados para producir dímeros biológicamente activos de estas proteínas.

En un primer aspecto de la invención se proporciona un monómero de TGF- β , o un fragmento biológicamente activo de este, para uso como medicamento.

La invención se basa en el muy sorprendente hallazgo de los inventores de que los TGF- β monoméricos pueden ejercer actividades biológicas que anteriormente se consideraban que solo las proporcionaban las proteínas de TGF- β dimérico. Este hallazgo hace posible el uso de los TGF- β monoméricos en medicamentos efectivos que pueden utilizar la propiedades biológicas de un TGF- β seleccionado. Como se apreciará inmediatamente este hallazgo y en consecuencia la presente invención, expande en grana parte las aplicaciones prácticas en las que los

TGF- β se pueden usar en forma terapéutica, a través de la reducción del tiempo y costo asociados con la fabricación de medicamentos adecuados.

Los inventores consideran que las ventajas de los medicamentos de acuerdo con la invención pueden ser provistas por medicamentos que comprenden cualquier isoforma monomérica de TGF- β . Por consiguiente, excepto cuando el contexto lo requiera de otro modo, las referencias a TGF- β o los TGF- β se entienden que abarcan cualquier forma monomérica biológicamente activa de una isoforma de TGF- β tal como TGF- β 1, 2, 3, 4 y 5. Los monómeros adecuados preferidos para uso en los medicamentos de la invención son los monómeros de TGF- β (de cualquier forma deseada). Los TGF- β monoméricos adecuados para el uso de acuerdo con la presente invención seleccionan del grupo que consiste en TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Con más preferencia el TGF- β monomérico es TGF- β 3, y en un segundo aspecto de la invención se proporciona un monómero de TGF- β 3, o un fragmento biológicamente activo de este, para uso como medicamento. Se prefiere que los monómeros de TGF- β usados de acuerdo con la presente invención sean los TGF- β monoméricos humanos. Se prefiere que los TGF- β provistos en los medicamentos de acuerdo con la presente invención estén presentes sustancialmente y completamente en forma monomérica. Los TGF- β monoméricos adecuados para usar en los medicamentos o métodos de la invención con preferencia pueden tener un peso molecular de aproximadamente 12 kDa, y más particularmente aproximadamente 12,5 kDa.

Las secuencias del residuo de aminoácido de las formas humanas de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 se muestran como las Secuencias ID Nos. 1, 2 y 3 respectivamente, y

un TGF- β monomérico que comprende cualquiera de estas secuencias, o un fragmento biológicamente activo de cualquiera de estas secuencias, constituye un monómero preferido para el uso de acuerdo con la presente invención. El TGF- β 3 monomérico (Secuencia ID No. 3) constituye un monómero particularmente preferido para el uso de acuerdo con diversos aspectos de la presente invención.

Excepto cuando el contexto requiera otra cosa, se debe considerar que las referencias de la presente memoria descriptiva a los TGF- β monoméricos (que incluyen referencias a las isoformas particulares) abarcan también a los fragmento biológicamente activos y derivados de dichos TGF- β monoméricos. Los fragmentos biológicamente activos que pueden derivar de la Secuencias ID Nos. 1 a 3 representan fragmentos preferidos para uso en los medicamentos de la invención, con fragmentos biológicamente activos derivables de la Secuencia ID No. 3 que constituye fragmentos particularmente preferidos. Los fragmentos biológicamente activos preferidos pueden comprender la porción de unión al receptor de la isoforma de TGF- β seleccionada.

Los derivados adecuados de los TGF- β monoméricos que se pueden utilizar en los medicamentos o métodos de la invención incluyen: derivados de péptidos terapéuticamente efectivos de los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); fragmentos o derivado terapéuticamente efectivos que comprenden o se basan en el farmacóforo de los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); derivados de peptoides terapéuticamente efectivos de los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); derivados de D-aminoácidos terapéuticamente efectivos de los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); peptidomiméticos

terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); análogos de péptidos terapéuticamente efectivos de los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); pseudopéptidos terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); péptidos retro-inversos terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); derivados de depsipéptidos terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); derivados de péptidos β terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos); y derivados retropeptoides terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β monoméricos (o sus fragmentos).

Los inventores han hallado que las formas monoméricas del TGF- β 3 humano se puede usar de la misma manera que el TGF- β 3 dimérico, por ejemplo para el tratamiento de los trastornos fibróticos, escleroderma, trastornos de angiogénesis, restenosis, adhesiones, endometriosis, enfermedad isquémica, hueso e inducción de cartílago, fertilización in vitro, mucositis oral, enfermedad renal, prevención, reducción o inhibición de formación de cicatrices, mejora de la reconexión neuronal en el sistema nervioso periférico y central, prevención, reducción o inhibición de complicaciones de la cirugía ocular (tal como cirugía LASIK o PRK), tratamiento de labio y paladar fisurado, prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices y curación acelerada de tendones y ligamentos. Las formas monoméricas de TGF- β 3 también pueden promover la regeneración epitelial en los sitios de daño epiteliales.

Los hallazgos de los inventores también indican que las formas monoméricas de TGF- β 1 y TGF- β 2 pueden ejercer

103

todas las actividades terapéuticas asociadas con las formas diméricas de estos factores de crecimiento.

"Actividad biológica" en el contexto de la presente invención con preferencia se mide in vivo. Los inventores han hallado que, de acuerdo con los hallazgos publicados en el arte previo, las formas monoméricas de los TGF- β generalmente no exhiben actividad biológica evaluadas por métodos in vitro. Sin embargo, en contraste directo con las creencias del arte previo, los inventores han hallado en forma muy sorprendente que las formas monoméricas de los TGF- β puede ejercer actividad biológica y terapéutica in vivo. Por consiguiente, se reconocerá que un TGF- β monomérico, o un fragmento o derivado de este, considerado biológicamente activo de acuerdo con la presente invención no es necesario para el TGF- β monomérico exhibir actividad biológica medible por medios in vitro e in vivo, sino solamente que exhiba actividad biológica que se pueda medir ya sea in vitro o in vivo, y con preferencia la actividad se puede medir in vivo.

En forma adecuada, la actividad biológica de los TGF- β monoméricos adecuados para el uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención se puede medir con referencia a la actividad biológica conocida de los dímeros del TGF- β 3 dado. En una realización preferida, la actividad biológica se puede medir con referencia a la capacidad de un monómero (tal como un monómero de la Secuencia ID No. 3) para acelerar la cura de heridas y/o prevenir, reducir o inhibir la formación de cicatrices.

A luz de los párrafos precedentes, se reconocerá que los medicamentos de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención son particularmente adecuados para usar en la aceleración de la curación de heridas y/o la prevención, reducción o inhibición de la formación de

104

cicatrices. Además, los medicamentos de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención también son particularmente adecuados para el uso en la promoción de la reepitelización.

En efecto, en un tercer aspecto de la invención se proporciona el uso de un monómero de TGF- β 3, o un fragmento biológicamente activo de este, en la preparación de un medicamento para uso en la aceleración de la curación de heridas y/o la inhibición de la formación de cicatrices.

En un cuarto aspecto de la invención se proporciona el uso de un monómero de TGF- β , o un fragmento biológicamente activo de este, en la preparación de un medicamento para uso en la promoción de la regeneración epitelial.

En un quinto aspecto de la invención se proporciona el uso de un monómero de TGF β 3, o un fragmento biológicamente activo de este en la preparación de un medicamento para uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno fibrótico. Los trastornos fibróticos preferidos que se pueden prevenir y/o tratar usando dichos medicamentos se pueden seleccionar del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, escleroderma, fibrosis cutánea, fibrosis muscular, fibrosis por radiación, fibrosis renal y fibrosis uterina.

Además, en un sexto aspecto de la invención se proporciona un método de acelerar la curación de heridas y/o inhibir la formación de cicatrices, el método comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β 3 monomérico, o un fragmento de este.

101

En un séptimo aspecto de la invención se proporciona un método de promoción de la regeneración epitelial, el método comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β 3 monomérico, o un fragmento de este.

En un octavo aspecto de la invención se proporciona un método de prevención y/o tratamiento de un trastorno fibrótico, el método comprende administrar a un paciente que necesita dicha prevención y/o tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β 3 monomérico, o un fragmento de este. Los trastornos fibróticos preferidos que se pueden prevenir y/o tratar usando dichos medicamentos se pueden seleccionar del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, escleroderma, fibrosis cutánea, fibrosis muscular, fibrosis por radiación, fibrosis renal y fibrosis uterina

Para los fines de la presente invención una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β monomérico, o un fragmento de este, es una cantidad suficiente para provocar una acción requerida:

- i) aceleración de la curación de heridas y/o inhibición de la formación de cicatrices; o
- ii) promoción de la regeneración epitelial; o
- iii) prevención y/o tratamiento de un trastorno fibrótico.

El grado de aceleración de la curación de heridas y/o inhibición de la formación de cicatrices, o regeneración epitelial, o prevención o reducción de fibrosis que se puede necesitar será evidente, y efectivamente fácilmente determinado por un médico responsable de la atención del paciente. Una evaluación

106

adecuada del grado de aceleración de la curación de heridas y/o la inhibición de la formación de cicatrices, o promoción de la regeneración epitelial, o la prevención o reducción de la fibrosis puede ser determinada por el clínico, y puede ser con referencia a los métodos de medición sugeridos descriptos en la presente.

Los TGF- β monoméricos preferidos y adecuados para el uso de acuerdo con la invención se pueden seleccionar con referencia a alguna o todas las consideraciones descriptas en la presente.

En el caso que se desee efectuar la curación de heridas acelerada con prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices o efectuar la prevención o tratamiento de trastornos fibróticos, por ejemplo, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, escleroderma, glomerulonefritis, o similares, generalmente se preferirá usar TGF- β 3 monomérico o un fragmento biológicamente activo adecuado.

Si bien el uso de TGF- β 3 monomérico tiene beneficios particularmente notables, los medicamentos que comprenden formas monoméricas de otras isoformas de TGF- β también son de gran valor.

Por ejemplo, los medicamentos que comprenden TGF- β 1 monomérico o fragmentos biológicamente activos de este, pueden tener usos en la prevención y/o tratamiento de heridas que no curan crónicas, por ej., úlceras venosas, llagas por presión, úlceras diabéticas, trastornos de angiogénesis, enfermedad renal, osteoporosis, enfermedad ósea, glomerulonefritis y enfermedad renal. A modo de ejemplo, se ha demostrado en modelos animales que el TGF- β 1 dimérico de tipo salvaje administrado en forma local es un potente estimulador del crecimiento y regeneración ósea. Además, se ha demostrado que la administración de

107

TGF- β 1 protege los tejidos de la lesión por isquemia-reperusión, en particular en el cerebro (después de un accidente cerebrovascular), y en el corazón (después de una oclusión de las arterias coronarias).

Los medicamentos que comprenden TGF- β 2 monomérico, o fragmentos biológicamente activos de este, se pueden usar en el tratamiento de glioma, glioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tumor de páncreas, tumores sólidos, tumor de colon, tumor de ovario, degeneración macular relacionada con la edad, lesión injuria, osteoporosis, retinopatía, úlceras, carcinoma, inflamación bucal y escleroderma. A modo de ejemplo, se ha demostrado en dos ensayos clínicos que la aplicación tópica del TGF- β 2 dimérico de tipo salvaje acelera el cierre de la úlceras de pierna crónicas asociadas con estasis venosa; y se ha demostrado en modelos animales que la aplicación local de TGF- β 2 recombinante humana promueve el re-crecimiento y regeneración del hueso.

Los medicamentos que comprenden TGF- β 3 monomérico, o fragmentos biológicamente activos de este se pueden usar en el tratamiento de heridas (que incluyen heridas crónicas tales como úlceras), escleroderma, trastornos fibróticos, por ej., fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, fibrosis renal etc., trastornos de angiogénesis, restenosis, adhesiones, endometriosis, enfermedad isquémica, inducción de hueso y cartílago, fertilización in vitro, mucositis oral y enfermedad renal. A modo de ejemplo, se ha demostrado en modelos animales y en la clínica que la aplicación tópica de TGF- β 3 dimérico de tipo salvaje acelera la tasa de curación de las úlceras por presión que no curan, crónicas; reduce la incidencia, gravedad y duración de la mucositis oral; y reduce los efectos adversos del síndrome

108

gastrointestinal por radiación resultante del daño a las células madre causado por la radioterapia o quimioterapia durante el tratamiento del cáncer. Los hallazgos de los inventores indican que el TGF- β 3 monomérico se puede usar en todos estos contextos con en fin de producir actividades terapéuticas del TGF- β 3 dimérico.

La capacidad de ciertos métodos y medicamentos de la invención (tal como los que usan monómeros de TGF- β se exponen en la Secuencia ID No. 3) para acelerar la curación de heridas puede la curación de heridas puede ser fácilmente apreciada y/o medida con referencia a las propiedades exhibidas por las heridas tratadas. Para los presentes propósitos una "herida tratada" se puede considerar a una herida expuesta a una cantidad terapéuticamente efectiva de un medicamento de la invención, o que ha recibido tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención.

La aceleración de la curación de las heridas tratadas se puede ilustrar por un aumento en la tasa epitelización en comparación con las heridas control. En consecuencia los métodos y medicamentos de la invención promocionan una reconstitución más rápida de una capa epitelial funcional sobre un área herida que lo sería de otro modo.

En forma alternativa o adicional, la curación acelerada de las heridas tratadas se puede ilustrar por un ancho de herida disminuido en comparación con las heridas de control en puntos de tiempo comparables. Se apreciará que esta reducción del ancho de la herida asegura que exista una tasa de cierre de la herida relativamente más rápido (ya que existe menos ancho de la herida por cerrar) y es indicativo de la capacidad de dichos medicamentos para acelerar la respuesta de

109

curación. Las heridas más angostas pueden producir cicatrices más angostas que son estéticamente preferibles que las cicatrices más anchas.

Por consiguiente, se debe considerar que la curación de heridas acelerada en el contexto de la presente invención abarca cualquier aumento de la tasa de curación de una herida tratada en comparación con la tasa de curación que se produce en heridas tratadas control o heridas no tratadas. Con preferencia la aceleración de la curación de heridas se puede evaluar con respecto a la comparación de la tasa de reepitelización obtenida en heridas tratadas y control, o la comparación de la del ancho relativo de las heridas tratadas y control en puntos de tiempo comparables. Con más preferencia la curación de heridas acelerada se puede definir como que comprende tanto una tasa de reepitelización aumentada como una reducción del ancho de la herida en comparación con las heridas de control en puntos de tiempo comparables.

Con preferencia la promoción de la curación de heridas acelerada puede dar origen a una tasa de curación de heridas que es al menos 5%, 10%, 20% o 30% mayor que la tasa de curación que ocurre en una herida control o no tratada. Con más preferencia la promoción de la curación de heridas acelerada puede dar origen a una tasa de curación de heridas que es al menos 40%, 50% o 60% mayor que la curación en una herida control. Aun es más preferido que la promoción de curación de heridas acelerada puede dar origen a una tasa de curación de heridas que es al menos 70%, 80%, o 90% mayor que la que ocurre en las heridas control, y con máxima preferencia la promoción de la curación de heridas acelerada puede dar origen a una tasa de curación de heridas que es al

110

menos 100% mayor que la tasa que se produce en las heridas control.

Existe un amplio rango de trastornos de la curación de heridas que se caracterizan, o al menos se caracterizan parcialmente por el fracaso, retraso o retardación inapropiados de la respuesta normal de curación de heridas. La capacidad de cierto métodos y medicamentos de la invención para promover la curación de heridas acelerada en consecuencia es de utilidad en la prevención o tratamiento de dichos trastornos.

Debido a que métodos y medicamentos de la invención pueden provocar la aceleración de la curación de heridas mediante la promoción de una respuesta de reepitelización estimulada (de este modo aumenta la velocidad en que se cierra la herida) se apreciará que estos métodos y medicamentos de la invención son particularmente ventajosos para el tratamiento de heridas de pacientes que de otro modo están propensos a la reepitelización defectuosa, retrasada o alterada de otro modo. Por ejemplo, es bien sabido que las heridas dérmicas de la persona de edad avanzada exhiben una respuesta de reepitelización menos vigorosa que la de los individuos más jóvenes. También existen otras patologías o trastornos en los que la curación de heridas está asociada con reepitelización retrasada o alterada de otro modo. Por ejemplo, los pacientes que sufren de diabetes, pacientes con polifarmacia (por ejemplo, como resultado de una edad avanzada), mujeres posmenopálicas, pacientes susceptibles a lesiones por presión (por ejemplo parapléjicos), pacientes con enfermedad venosa, pacientes clínicamente obesos, pacientes que reciben quimioterapia, pacientes que reciben radioterapia, pacientes que reciben tratamientos de esteroides o pacientes

inmunocomprometidos puede sufrir de curación de heridas con reepitelización alterada. En muchos casos la falta de una respuesta de reepitelización apropiada contribuye al desarrollo de las infecciones en el sitio de la herida, que puede a su vez contribuir a la formación de heridas crónicas tales como úlceras. Por consiguiente se apreciará que dichos pacientes probablemente se beneficiarán particularmente con los métodos o medicamentos adecuados de la invención.

Las heridas crónicas son quizás el ejemplo más importante de los trastornos asociados con una respuesta de curación de heridas retrasada. Una herida se puede definir como crónica si no muestra ninguna tendencia de curación dentro de las ocho semanas de la formación cuando está sometida al tratamiento terapéutico apropiado (convencional). Los ejemplos bien conocidos de heridas crónicas incluyen úlceras venosas, úlceras diabéticas y úlceras decúbito, sin embargo las heridas crónicas pueden surgir en algún momento de otro modo de lesiones agudas normales. Típicamente las heridas crónicas puede surgir como resultado de infección del sitio de la herida, tratamiento de herida inadecuado, o como una consecuencia de una ruptura de tejido progresiva causada por enfermedad vascular venosa, arterial, o metabólica, presión, daño por radiación o tumor.

Se apreciará que los métodos y medicamentos de la invención capaces de acelerar la curación de heridas se pueden utilizar en el tratamiento de heridas crónicas existentes con el fin de promover su curación. Dichos métodos y medicamentos pueden promover la reepitelización de las heridas crónicas, de este modo producen la curación y cierre del trastorno. Los métodos y medicamentos de la invención preferidos (tales como los

que utilizan TGF- β monomérico que comprenden la Secuencia ID No. 3) también pueden inhibir la formación de cicatrices asociada con la curación de heridas. La prevención de la formación de cicatrices en dichos contexto puede ser particularmente ventajoso ya que las heridas crónicas normalmente se extienden sobre otras porciones relativamente grandes del cuerpo de un paciente.

Además o alternativamente, para su uso en el tratamiento de las heridas crónicas existentes, los métodos y medicamentos de la invención adecuados se pueden usar para prevenir heridas agudas de pacientes predispuestos a la curación de heridas alterada que se convierten en heridas crónicas. Debido a que los métodos y medicamentos adecuados de la invención pueden promover la cobertura epitelial del sitio dañado, ellos pueden reducir la probabilidad de que una herida tratada se infecte. De modo similar, esta promoción de reepitelización puede ser beneficiosa en el tratamiento de las heridas crónicas que surgen como resultado de otras patologías tales como diabetes o enfermedad venosa.

Un grupo adicional de pacientes que puede obtener beneficio particular de los métodos y medicamentos de la invención son aquellos en los que el sistema inmune está comprometido (por ejemplo, pacientes que se someten a quimioterapia o radioterapia o los que sufren de infección con HIV). Está bien reconocido que las heridas de los inmunocomprometidos, que no pueden desarrollar una respuesta inflamatoria normal después de la herida, tienden a asociarse con malos resultados de curación. Dichos pacientes se pueden beneficiar por el tratamiento con los métodos y medicamentos adecuados de la invención.

113

La capacidad de los medicamentos y métodos de la invención de utilizar los TGF- β monoméricos que comprenden la Secuencia ID No. 3 para promover la curación de heridas acelerada a la vez que prevenir, reducir o inhibir la formación de cicatrices también se usa en contextos clínicos más generales. Los ejemplos de estos otros beneficios se pueden considerar en referencia con la curación de heridas por intención primaria, secundaria o terciaria, como se describe a continuación.

Para los fines de la presente invención, se puede considerar que la curación por intención primaria involucra el cierre por medios quirúrgicos (tal como suturas, tiras adhesivas o grapas) de los márgenes opuestos de una herida. La curación por intención primaria se emplea normalmente en el tratamiento de incisiones quirúrgicas u otras heridas limpias, y se asocia con niveles mínimos de pérdida de tejido. Los expertos reconocerán debido a que los medicamentos o métodos adecuados de acuerdo con la invención (tal como los que utilizan monómeros que comprenden la Secuencia ID No. 3) son capaces de reducir el ancho de la herida, también facilitan la unión de los bordes opuesto de la herida, y en consecuencia pueden ser beneficiosos para la curación de heridas por intención primaria. Además, dichos métodos o medicamentos may (como se describen a continuación) producen la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices que de otro modo pueden ocurrir en dicha curación. Los inventores consideran que el tratamiento de esta manera puede tener impacto en la apariencia tanto macroscópica como microscópica de las cicatrices que se forman a partir de las heridas tratadas; microscópicamente las cicatrices pueden ser menos perceptibles y combinarse con la piel

114

circundante, microscópicamente las cicatrices pueden exhibir una regeneración de una estructura de piel más normal.

Para los fines de la presente invención, se considera que la curación por intención secundaria constituye el cierre de las heridas por la curación del proceso de las heridas, sin intervención quirúrgica directa. Las heridas curadas por intención secundaria se pueden someter a cuidado continuo (por ejemplo el vendaje y re-vendaje de la herida así como la aplicación de los medicamentos adecuados), pero es el proceso natural de formación del tejido de granulación y la reepitelización los que causan el cierre de la herida. Se apreciará que debido a que los medicamentos y métodos de la invención preferidos (tal como los que utilizan monómeros que comprenden la Secuencia ID No. 3) pueden aumentar la velocidad de reepitelización y disminuir la posterior formación de cicatrices en comparación con lo que ocurre en las heridas control estos tienen utilidad en la promoción de la curación de heridas por intención secundaria.

La curación por intención terciaria se pueden considerar que comprende el cierre quirúrgico de una herida que previamente se ha dejado abierta para permitir al menos formación del tejido de granulación y la reepitelización parciales. Las propiedades de los métodos y medicamentos de la invención preferidos los hacen adecuados para el uso en la curación por intención primaria o secundaria son también beneficiosos en el contexto de la promoción de la curación de heridas por intención terciaria.

El uso de métodos y medicamentos de la invención preferidos que utilizan monómeros que comprenden la

115

Secuencia ID No. 3 para estimular la reepitelización (como parte de su promoción de la curación de heridas acelerada) mientras que inhibe la formación de cicatrices también es particularmente efectivo en el tratamiento de las heridas asociadas con procedimientos de injerto. El tratamiento mediante estos métodos y medicamentos de la invención es beneficioso tanto en un sitio dador del injerto (donde puede ayudar en el restablecimiento de una capa epitelial funcional a la vez que previene, reduce o inhibe la formación de cicatrices), y como en los sitios receptores del injerto (donde los efectos anti-formación de cicatrices del tratamiento inhibe la formación de cicatrices, a la vez que curación acelerada promueve la integración del tejido injertado). Los inventores consideran que los métodos y medicamentos de la invención confieren ventajas en los contextos de los injertos que utilizan piel, piel artificial o sustitutos de piel.

Los inventores han hallado que los métodos y medicamentos de la invención que utilizan monómeros que comprenden la Secuencia ID No. 3 pueden promover la curación de heridas acelerada con inhibición de la formación de cicatrices cuando se administran antes de la herida, o una vez que la herida ya se ha formado.

Los inventores han hallado que los o medicamentos de la invención que utiliza TGF- β 3 monoméricos, tal como los que comprenden la Secuencia ID No. 3, son capaces de promover la regeneración epitelial. La promoción de la regeneración epitelial dentro del contexto de la presente invención se puede considerar que abarca cualquier aumento de la regeneración epitelial en comparación con la regeneración que ocurre en el epitelio control tratado o no tratado.

116

La velocidad de regeneración epitelial obtenida usando los métodos o medicamentos adecuados de acuerdo con la invención se pueden comparar fácilmente con el que tiene lugar en los epitelios control tratados o no tratados usando cualquier modelo de regeneración epitelial conocido en el arte. Por ejemplo, se puede comparar la velocidad en la que se regeneran los sitios de daño epitelial experimental que tienen áreas conocidas usando modelos in vivo bien conocidos en ratones, ratas, conejos o cerdos tales como los descritos en Tomlinson y Ferguson (2003), Davidson et al. (1991) y Paddock et al. (2003).

Sin desear estar ligado a ninguna hipótesis los inventores consideran que la promoción de la regeneración epitelial obtenida por las formas monoméricas de TGF- β 3 es mediada por la promoción de los monómeros de la migración de las células epiteliales. Las células epiteliales (cuya migración se ha promovido) en consecuencia son capaces de repoblar y regenerar el epitelio dañado más rápidamente que los que ocurre en ausencia de tratamiento.

Se apreciará que la promoción de la regeneración epitelial usando monómeros que comprenden la Secuencia ID No. 3 puede ser útil para inducir la reepitelización efectiva en contextos en que la respuesta de reepitelización está alterada, inhibida, retardada o defectuosa de algún otro modo. La promoción de la regeneración epitelial también se puede efectuar para acelerar la tasa de respuestas de regeneración epitelial normal o defectuosa de los pacientes que sufren de daño epitelial.

Existen muchos contextos en los que la respuesta de reepitelización del cuerpo puede ser defectuosa. Por

ejemplo, la reepitelización defectuosa de la piel es asocia con patologías tales como pénfigo, enfermedad de Hailey-Hailey (pénfigo benigno familiar), necrólisis 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 pulmonar intersticial. La reepitelización defectuosa del ojo se puede asociar con patologías tales como deficiencia parcial de células madre limáticas o erosiones corneanas. La reepitelización defectuosa del aparato gastrointestinal o colon se puede asociar con patologías tales como fisuras anales crónicas (fisura de ano), colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn, y otros trastornos intestinales inflamatorios.

Tal como se estableció anteriormente, ciertos métodos o medicamentos de acuerdo con la presente invención (y en particular los que utilizan monómeros que comprenden la Secuencia ID No. 3) pueden prevenir, reducir o inhibir de otro modo la formación de cicatrices. Esta inhibición de la formación de cicatrices se puede efectuar en cualquier sitio del cuerpo y cualquier tejido u órgano, que incluye piel, ojo, nervios, tendones, ligamentos, músculo y cavidad oral (que incluye los labios y el paladar), así como órganos internos (tal como hígado, corazón, cerebro, cavidad abdominal, cavidad pélvica, cavidad torácica, intestinos y tejido reproductor). En la piel, el tratamiento puede mejorar el aspecto macroscópico y microscópico de las cicatrices; desde el punto de vista macroscópico las cicatrices pueden ser menos visibles y combinarse con la piel circundante, desde el punto de vista microscópico las fibras de colágeno de la cicatriz pueden tener una

118

morfología y organización que es más similar que la de la piel circundante. Se debe entender que la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices dentro del contexto de la presente invención abarca cualquier grado de prevención, reducción o inhibición en formación de cicatrices en comparación con el nivel de formación de cicatrices que ocurre en la herida control tratada y no tratada (definida en otra parte de la memoria descriptiva). Excepto cuando el contexto lo requiera lo contrario las referencias a "prevención", "reducción" o "inhibición" de la formación de cicatrices se pueden tomar como mecanismos equivalentes que se manifiestan en la actividad de anti-formación de cicatrices.

La prevención, reducción o inhibición de formación de cicatrices dérmicas obtenida usando métodos y medicamentos de la invención se puede evaluar y/o medir con referencia al aspecto microscópico o, con preferencia, macroscópico de una cicatriz tratada en comparación con el aspecto de una cicatriz no tratada. Con más preferencia al prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede evaluar con referencia al aspecto tanto macroscópico como microscópico de una cicatriz tratada. Para los presentes fines una "cicatriz tratada" se puede definir como una cicatriz formada por la curación de una herida tratada, mientras que una "cicatriz no tratada" se puede definir como una cicatriz formada por la curación de una herida no tratada, o una herida tratada con placebo o atención estándar. Las cicatrices de comparación adecuadas con preferencia se pueden emparejar con la cicatriz tratada con respecto a edad, sitio, tamaño de la cicatriz y el paciente.

119

Al considerar el aspecto macroscópico de una cicatriz resultante de una herida tratada, se puede evaluar el grado de formación de cicatrices, y en consecuencia la magnitud de cualquier prevención, inhibición o reducción de la formación de cicatrices obtenida con referencia a algunos de muchos parámetros.

Los parámetros adecuados para la evaluación macroscópica de cicatrices pueden incluir:

i) Color de la cicatriz. Como se indicó anteriormente, las cicatrices normalmente pueden ser hipopigmentada o hiperpigmentada con respecto a la piel circundante. La inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando la pigmentación de una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente a la de piel sin cicatrices que la pigmentación de una cicatriz no tratada. De modo similar, las cicatrices pueden ser más rojas que la piel circundante. En este caso la inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando el enrojecimiento de una cicatriz tratada se atenúa más temprano o más completamente, o se asemeja más estrechamente al aspecto de la piel circundante, en comparación con una cicatriz no tratada.

ii) Altura de la cicatriz. Las cicatrices normalmente pueden estar elevadas o hundidas en comparación con la piel circundante. La inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando la altura de una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente a la de una piel sin cicatrices (es decir, ni levantada ni hundida) que a la altura de una cicatriz no tratada.

iii) Textura superficial de la cicatriz. Las cicatrices pueden tener superficies que son relativamente

201

más suaves que la piel circundante (que genera una cicatriz con un aspecto "brillante") o que son más rugosas que la piel circundante. La inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando la textura de superficie de una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente a la de una piel sin cicatrices que a la textura de superficie de una cicatriz no tratada.

iv) Rigidez de la cicatriz. La composición y estructura anormales de las cicatrices hacen que estas sean normalmente más rígidas que la piel no dañada que rodea la cicatriz. En este caso, la inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando la rigidez de una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente a la de una piel sin cicatrices que a la rigidez de una cicatriz no tratada.

Una cicatriz tratada con preferencia demostrará prevención, inhibición o reducción de la formación de cicatrices evaluada con referencia a al menos uno de los parámetros de evaluación macroscópica expuestos anteriormente. Con más preferencia, una cicatriz tratada puede demostrar una formación de cicatrices prevenida, reducida o inhibida con al menos dos de los parámetros, aun con más preferencia al menos tres de los parámetros, y con máxima preferencia con los cuatro parámetros. Se puede realizar una evaluación global de la formación de cicatrices usando, por ejemplo, una escala visual analógica o una escala de evaluación digital.

Los parámetros adecuados para la evaluación microscópica de las cicatrices pueden incluir:

i) Espesor de fibras de la matriz extracelular (ECM). Las cicatrices normalmente contienen fibras de la ECM más delgadas que las halladas en la piel circundante.

121

Esta propiedad es aún más pronunciada en el caso las cicatrices queloides e hipertróficas. La inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando el espesor de las fibras de ECM de una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente al espesor de las fibras de ECM halladas en la piel sin cicatrices que al espesor de las fibras halladas en una cicatriz no tratada.

ii) Orientación de Las fibras de ECM. Las fibras de ECM halladas en las cicatrices tienden a exhibir un mayor grado de alineamiento entre sí que las halladas en la piel sin cicatrices (que tienen una orientación al azar frecuentemente denominada como "tejido de canasta"). La ECM de las cicatrices patológicas tales como cicatrices queloides e hipertróficas pueden exhibir orientaciones aún más anómalas, con frecuencia forman grandes "espirales" o "cápsulas" moléculas de ECM. Por consiguiente, la inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando la orientación de las fibras de ECM en una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente a la orientación de las fibras de ECM halladas en la piel sin cicatrices que a la orientación de dicha fibras en una cicatriz no tratada.

iii) Composición de ECM de la cicatriz. La composición de las moléculas de ECM presentes en las cicatrices muestra diferencias de las halladas en la piel normal con una reducción de la cantidad de elastina presente en la ECM de las cicatrices. En consecuencia la inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando la composición de las fibras de ECM de la dermis de una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente a la composición de dichas fibras halladas

21

en la piel sin cicatrices que a la composición hallada en una cicatriz no tratada.

iv) Celularidad de la cicatriz. Las cicatrices tienden a contener relativamente menos células que la piel sin cicatrices. En consecuencia se apreciará que la inhibición o reducción de la formación de cicatrices se puede demostrar cuando la celularidad de una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente a la celularidad de la piel sin cicatrices que a la celularidad de una cicatriz no tratada.

Una cicatriz tratada con preferencia demostrará la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices evaluada con referencia a al menos uno de los parámetros de la evaluación microscópica expuesta anteriormente. Con más preferencia a cicatriz tratada, se puede demostrar la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices con referencia a al menos dos de los parámetros, aun con más preferencia al menos tres de los parámetros, y con máxima preferencia a cuatro de estos parámetros.

La prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices de una herida tratada se puede evaluar adicionalmente con referencia a parámetros adecuados en:

i) evaluación clínica macroscópica de las cicatrices, en particular la evaluación de las cicatrices en un sujeto;

ii) evaluación de imágenes fotográficas de las cicatrices;

iii) evaluación de moldes de silicona o moldes de plástico positivos hechos de molde de silicona de las cicatrices; y

123

iv) evaluación microscópica de las cicatrices, por ejemplo por análisis histológico de la estructura microscópica de las cicatrices.

Se apreciará que la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices de una herida tratada puede estar indicada por la mejora de uno o más de dichos parámetros adecuado, y que en el caso de la prevención, reducción o inhibición evaluada con referencia a diversos parámetros, que estos parámetros se pueden combinar en diferentes esquemas de evaluación (por ej., reducción, inhibición o mejora de al menos un parámetro usado en la evaluación macroscópica y al menos un parámetro usado en la evaluación microscópica).

La prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar por una mejora de uno o más de los parámetros que indican que una cicatriz tratada se aproxima más estrechamente a la piel sin cicatrices con referencia a los parámetros seleccionados que una cicatriz no tratada o control.

Los parámetros adecuados para la medición y evaluación clínica de las cicatrices se pueden seleccionar sobre la base de una variedad de medidas o evaluaciones que incluyen las descritas por Beausang et al (1998) y van Zuijlen et al (2002).

Normalmente, los parámetros adecuados pueden incluir:

1. Evaluación con respecto a la escala visual analógica (VAS) de clasificación de cicatriz.

La prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar por una reducción en el puntaje de la VAS de una cicatriz tratada cuando se compara con una cicatriz control. Una VAS

124

adecuada para usar en la evaluación de las cicatrices se puede basar en el método descrito por Beausang et al (1998).

2. Altura de la cicatriz, ancho de la cicatriz, perímetro de cicatriz, área de cicatriz o volumen de cicatriz.

La altura y el ancho de las cicatrices se pueden medir directamente en el sujeto, por ejemplo, por el uso de dispositivos de medición manual tales como calibres. El ancho, el perímetro y el área de la cicatriz se pueden medir directamente en el sujeto o por análisis de imagen de las fotografías de la cicatriz. Los expertos conocerán los métodos y dispositivos no invasivos que se pueden usar para investigar parámetros adecuados, que incluyen moldeado en silicona, ultrasonido, perfilometría óptica tridimensional e imágenes de resonancia magnética de alta resolución.

La prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar por una reducción de altura, ancho, área o volumen, o cualquiera de sus combinaciones de una cicatriz tratada en comparación con una cicatriz no tratada.

3. Aspecto y/o color de la cicatriz comparada con la piel circundante sin cicatrices

El aspecto o color de una cicatriz tratada se puede comparar con el de la piel circundante sin cicatrices, y las diferencias (si existen) se compararon con la diferencia entre el aspecto y el color de las cicatrices no tratadas y la piel sin cicatrices. Dicha comparación se puede realizar sobre la base de una evaluación visual de las cicatrices respectivas y la piel sin cicatrices. El aspecto de una cicatriz se puede comparar con la piel

125

sin cicatrices con referencia a si la cicatriz es más clara o más oscura que la piel sin cicatrices. Los colores respectivos de las cicatrices y la piel puede estar perfectamente emparejados entre sí, relativamente mal emparejados, obviamente mal emparejados o extremadamente mal emparejados.

En forma alternativa o adicional a la evaluación visual, existen numerosos dispositivos colorimétricos no invasivos que pueden proporcionar datos con respecto a la pigmentación de las cicatrices y piel sin cicatrices, así como del enrojecimiento de la piel (que puede ser un indicador del grado de vascularización presente en la cicatriz o la piel). Los ejemplos de dichos dispositivos incluyen Minolta Chromameter CR-200/300; Labscan 600; Dr. Lange Micro Colour; Derma Spectrometer; medidor de flujo láser-Doppler; y análisis espectrofotométrico intracutáneo (SIA).

La prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar por una menor magnitud de diferencia entre el aspecto o el color de las cicatrices tratadas y la piel sin cicatrices que entre las cicatrices no tratadas y la piel sin cicatrices.

4. ***Distorsión de la cicatriz y desempeño mecánico***

La distorsión de la cicatriz se puede evaluar por la comparación visual de una cicatriz y la piel sin cicatrices. Una comparación adecuada puede clasificar una cicatriz seleccionada como que no causa distorsión, distorsión leve, distorsión moderada o distorsión severa.

El desempeño mecánico de las cicatrices se puede evaluar usando varios métodos y dispositivos no invasivos basados en succión, presión, torsión, tensión y acústica. Los ejemplos adecuados que incluyen los dispositivos

281

conocidos que se pueden usar en la evaluación del desempeño mecánico de las cicatrices incluyen el indentómetro, cutómetro, reviscómetro, análisis viscoelástico de la piel, Dermaflex, durómetro, medido de torque térmico, elastómetro.

La prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar por una reducción de la distorsión causada por las cicatrices tratadas en comparación con la causada por las cicatrices no tratadas. Se apreciará que la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar por el desempeño mecánico de la piel sin cicatrices que es más similar al de las cicatrices tratadas que al de las cicatrices no tratadas.

5. Contorno de la cicatriz y textura de la cicatriz

El contorno de la cicatriz se puede investigar por medio de la evaluación visual. Los parámetros adecuados para considerar en dicha evaluación incluye si una cicatriz está nivelada o no con la piel circundante, ligeramente sobresalientes, ligeramente hendida, hipertrófica o queloide. La textura de una cicatriz se puede evaluar con referencia a aspecto de la cicatriz, y esto se puede realizar por una evaluación visual respecto de si la cicatriz, por ejemplo, es mate o brillante o tiene aspecto rugoso o liso en comparación con la piel sin cicatrices.

La textura de la cicatriz se puede evaluar adicionalmente con referencia a si la cicatriz tiene la misma textura que la piel sin cicatrices (textura normal), es solo palpable, firme o dura en comparación con la piel sin cicatrices. La textura de las cicatrices

también se puede evaluar con referencia a la escala de Hamilton (descripta en Crowe et al, 1998).

Además de las técnicas expuestas anteriormente, existen numerosos dispositivos perfilométricos no invasivos que usan métodos ópticos o mecánicos para la evaluación del contorno y/o la textura de la cicatriz. Dichas evaluaciones se pueden llevar a cabo en el cuerpo del sujeto o, por ejemplo, en impresiones de molde de silicona de las cicatrices, o en moldes positivos hechos con estas impresiones.

La prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar en el caso de que las cicatrices tratadas tengan perfiles y textura de cicatriz más comparables con la piel sin cicatrices que las cicatrices no tratadas.

Evaluaciones fotográficas

Panel de posición independiente

La evaluación fotográfica de las cicatrices tratadas y no tratadas puede ser realizada por un panel de asesores de posición independiente y las fotografías estandarizadas y calibradas de las cicatrices. Las cicatrices pueden ser evaluadas por un panel de posición independiente para proporcionar datos de clasificación en categorías (por ej., que una cicatriz tratada dada "mejor", "peor" o "no diferente" cuando se compara con una cicatriz no tratada) y datos cuantitativos usando una escala visual analógica (VAS) basada en el método descrito por Beausang et al (1998). La captura de estos datos puede utilizar programas de computación y/o sistemas electrónicos adecuados descritos en la solicitud de patente en trámite de los solicitantes.

122

128

Panel de expertos

La evaluación fotográfica de las cicatrices tratadas y no tratadas puede ser realizada en forma alternativa por un panel de asesores expertos fotografías estandarizadas y calibradas de las cicatrices por evaluar. El panel de expertos con preferencia consiste en experto en el arte tales como cirujanos plásticos y científicos de antecedentes adecuados.

Dicha evaluación puede proporcionar datos de categorización, como se describió antes o con respecto a la comparación de imágenes con el transcurso del tiempo de cicatrices tratadas y no tratadas seleccionadas.

Las evaluaciones adecuadas realizadas pueden incluir:

La identificación de la mejor cicatriz, que a los fines de la presente invención se puede considerar que es la cicatriz que se asemeja más estrechamente a la piel circundante. Una vez que la mejor cicatriz ha sido identificada se puede considerar la magnitud de diferencia entre las cicatrices, por ejemplo es la diferencia entre las cicatrices leves u obvias. Otros parámetros que se pueden considerar incluyen el tiempo más inmediato después la formación de cicatriz en el que se pueden detectar diferencias entre las cicatrices, el tiempo después de la formación en que la diferencia entre las cicatrices es más obvia (o alternativamente el hallazgo de que la diferencia continúa después del último punto de tiempo evaluado), así como considerar si la cicatriz mejor permanece o no en forma constante mejor.

También se toma en consideración si una cicatriz es o no proporcionalmente más roja que la otra, y si el enrojecimiento se atenúa en los tiempo de tiempo considerados (o continúa después del último punto de

129

tiempo) y si es así, a qué tiempo después de la formación de la cicatriz. Un panel experto también puede considerar en qué tiempo después de la formación se hace detectable cualquier diferencia de enrojecimiento, así como el tiempo después de la formación en que la diferencia de enrojecimiento es más obvia.

Un panel experto también puede considerar si una cicatriz tratada o no tratada es o no proporcionalmente más blanca que la piel sin cicatrices. En el caso que sea detectable una diferencia en la blancura se puede tomar en consideración el tiempo después de la formación de la cicatriz en que se puede detectar la diferencia, el tiempo en que la diferencia es más obvia y el tiempo en que la diferencia desaparece.

Otro parámetro que puede ser evaluado por un panel de expertos es la textura de cicatrices tratadas y no tratadas. En la comparación de cicatrices tratadas y no tratadas panel de expertos puede considerar cual de las cicatrices tiene la mejor textura de piel, el tiempo más inmediato después de la formación de la cicatriz en que se puede detectar cualquier diferencia presente, el tiempo posterior a la formación en que cualquier diferencia es más obvia, y el tiempo en que cualquier diferencia desaparece.

La comparación de cicatrices tratadas y no tratadas puede evaluar adicionalmente, cuál de las cicatrices es más angosta, y cuál de las cicatrices es más corta. También se puede tomar en consideración la forma de la cicatriz y la proporción del margen de la cicatriz que se puede distinguir de la piel circundante. Como se describió previamente también se pueden considerar las evaluaciones visuales y las evaluaciones de color, presencia, grado y ubicación de la hiperpigmentación.

130

Como se indicó anteriormente, una de las maneras en que se puede comparar la calidad de las cicatrices tratadas y no tratadas es por la evaluación microscópica. La evaluación microscópica de la calidad de la cicatriz normalmente se puede llevar a cabo usando secciones histológicas de las cicatrices. El proceso de la evaluación y medición microscópica de las cicatrices puede tomar en consideración los datos de categorización basados en los siguientes parámetros adecuados:

1. Restitución epidérmica. Se debe prestar atención particular al grado de restauración de las crestas interpapilares y el espesor de la epidermis restaurada.

2. Angiogénesis e inflamación. Se puede tomar en consideración el número de vasos sanguíneos presentes, el tamaño de los vasos sanguíneos presentes y la evidencia de inflamación, que incluye una evaluación de cualquier nivel de inflamación presente.

3. Organización del colágeno. En la evaluación de la organización del colágeno se puede hacer referencia de las fibras de colágeno presentes en la cicatriz, la densidad de dichas fibras y el grosor de la fibra de colágeno en la dermis papila y reticular.

4. La evaluación de la escala visual analógica (VAS) de la organización del colágeno para la dermis papilar y para la dermis reticular también puede proporcionar un índice de la calidad de la cicatriz.

191

5. Otros rasgos que se pueden tomar en cuenta para evaluar la calidad microscópica de las cicatrices incluyen la elevación o depresión de la cicatriz respecto de la piel circundante sin cicatrices y la prominencia o visibilidad de la cicatriz en la interfaz dérmica normal.

6. Se observará que las evaluaciones descritas anteriormente permiten la generación de datos de clasificación de cicatrices que permiten proporcionar una indicación respecto de si una cicatriz tratada es mejor, peor o no diferente comparada con una cicatriz control, no tratada u otro comparador adecuado.

Además de los datos de categorización, se pueden generar datos cuantitativos (con preferencia relacionados con los parámetros anteriores) usando análisis de imagen en combinación con técnicas de visualización adecuadas. Los ejemplos de técnicas de visualización adecuadas que se pueden emplear en la evaluación de la calidad de la cicatriz son tinturas histológicas o de inmunomarcación específicas, en donde se puede determinar cuantitativamente el grado de tinción o marcación por análisis de imagen.

Los datos cuantitativos se pueden producir en forma útil y fácil en relación con los siguientes parámetros:

1. Ancho, altura, elevación, volumen y área de la cicatriz.

2. Espesor epitelial y área de cobertura (por ejemplo, el área de epidermis presente en una cicatriz o la proporción de una herida con cobertura epidérmica).

3. Número, tamaño, área (es decir, transversal) y ubicación de los vasos sanguíneos.

4. Grado de inflamación, número, ubicación y poblaciones/tipos de células inflamatorias presentes.

231

5. Organización del colágeno, espesor de la fibra de colágeno, densidad de la fibra de colágeno.

La prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar por un cambio en cualquiera de los parámetros considerados anteriormente, de modo que una cicatriz tratada se asemeje más estrechamente a una piel sin cicatrices que una cicatriz control o no tratada (u otro comparador adecuado).

Las evaluaciones y parámetros descriptos son adecuados para las comparaciones de los efectos de los péptidos o medicamentos de la invención en comparación con el tratamiento control, placebo o atención estándar en animales o humanos. Se pueden usar pruebas estadísticas apropiadas para analizar los conjuntos de datos generados a partir de diferentes tratamientos a fin de investigar la significación de los resultados.

Con preferencia la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar con referencia a más de un parámetro. Con más preferencia, la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar con referencia a un parámetro clínico (es decir, observado en el sujeto) y un parámetro fotográfico. Aun con más preferencia la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar con referencia a un parámetro clínico, un parámetro fotográfico y también un parámetro de evaluación microscópica (por ejemplo un parámetro histológico). Con máxima preferencia, la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede demostrar con referencia a un puntaje de VAS clínico, puntaje VAS de panel de posición externa

133

y clasificación (a partir de imágenes fotográficas) y puntaje VAS microscópico de la dermis reticular.

El uso de métodos y medicamentos de la invención adecuados permite producir una rápida mejora del aspecto cosmético de un área lesionada así tratada. Las consideraciones cosméticas son importantes en varios contextos clínicos, en particular cuando las heridas se forman en sitios del cuerpo importantes tales como cara, cuello y manos. En consecuencia la inhibición de la formación de cicatrices (que con preferencia puede estar en combinación con la curación de heridas acelerada) en dichos sitios donde se desea mejorar el aspecto cosmético de la cicatriz formada representa una realización preferida de la invención.

Además de su impacto cosmético la formación de cicatrices de la piel es responsable de una cantidad de efecto deletéreos que afectan a los sufren de dicha formación de cicatrices. Por ejemplo, la formación de cicatrices en la piel se puede asociar con reducción de la función física y mecánica, en particular en el caso de las cicatrices contráctiles (tales como las cicatrices hipertróficas) y/o situaciones en las que las cicatrices se forman en las articulaciones. En estos casos, las propiedades mecánicas alteradas de la piel con cicatrices, en contraste con la piel sin cicatrices, y los efectos de la contracción de la cicatriz pueden llevar al movimiento drásticamente restringido de una unión (articulación) efectuada de este modo. Por consiguiente se prefiere una realización en que los medicamentos y métodos de la invención adecuados sean usados para prevenir, reducir o inhibir la formación de cicatrices e heridas que cubren las articulaciones del cuerpo (con preferencia que también aceleren la curación

134

de dichas heridas). En otra realización preferida, los medicamentos y métodos de la invención adecuados se pueden usar para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir la formación de cicatrices de heridas con alto riesgo de formar una cicatriz contráctil.

El grado de formación de la cicatriz, y en consecuencia el grado de deterioro cosmético u otro que puede ser causado por la cicatriz, también puede estar influido por factores tales como la tensión del sitio en que se forma la herida. Por ejemplo, se sabe que la piel bajo tensión relativamente alta (tal como la que se extiende sobre el tórax, o asociada con líneas de tensión) puede estar predispuesta a la formación de cicatrices más graves que en otros sitios corporales. En consecuencia, en una realización preferida los medicamentos y métodos de la invención adecuados se pueden usar para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir la formación de cicatrices de heridas ubicadas en sitios de alta tensión cutánea. Existen muchos procedimientos quirúrgicos que se pueden usar en la corrección de la cicatriz para permitir el realineamiento de las heridas y las cicatrices de modo que estas sean sujeto para la tensión reducida. Probablemente el más conocido de estos es la "plastia en Z" en la que dos colgajos en forma de V de la piel se transponen para permitir la rotación de una línea de tensión. En consecuencia en una realización más preferida dichos medicamentos y métodos de la invención se usan para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices de heridas durante la corrección quirúrgica de las cicatrices desfigurantes.

135

La formación de cicatrices patológicas puede tener efectos deletéreos más pronunciados que se originan como resultado de la formación normal de cicatrices relativamente severas. Los ejemplos comunes de cicatrices patológicas incluyen cicatrices hipertróficas y queloides. Se reconoce que ciertos tipos de heridas o ciertos individuos pueden estar predispuestos a la formación de cicatrices patológicas. Por ejemplo, se puede considerar que los individuos de herencia afrocaribeña, japonesa o mongoloide, o los que tienen antecedentes familiares de formación de cicatrices patológicas tienen riesgo aumentado de formación de cicatriz hipertrófica o queloide. Las heridas de niños, y en particular las heridas de quemaduras de niños, también se asocian con aumento de la formación de cicatrices hipertróficas. Por consiguiente se prefiere una realización de la invención en que los medicamentos y métodos adecuados se usen para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir la formación de cicatrices de las heridas en las que hay un riesgo aumentado de formación de cicatrices patológicas.

Si bien los individuos ya sujeto de la formación de cicatrices patológicas sufren de una predisposición para la formación de cicatriz adicional excesiva a menudo es clínicamente necesario corregir quirúrgicamente las cicatrices hipertróficas o queloides, con un riesgo acompañante de la consecuente formación de cicatrices patológicas. En consecuencia, en una realización preferida de la invención, los medicamentos y métodos adecuados se usan para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices de heridas producidas por la corrección quirúrgica de cicatrices patológicas.

136

Se reconoce que las heridas resultantes de las lesiones por quemaduras (que para los fines de la presente invención también abarcan las lesiones por escaldadura que involucran los gases o líquidos calientes) se pueden extender en grandes áreas de un individuo afectado de este modo. Por consiguiente, las quemaduras puede originar la formación de la cicatriz que cubre una gran proporción del cuerpo de un paciente, de este modo aumenta el riesgo de que la cicatriz formada cubra área de importancia cosmética elevada (tal como cara, cuello, brazos o manos) o de importancia mecánica (en particular las regiones que cubren o rodean a las articulaciones). Las lesiones por quemaduras causadas por líquidos calientes con frecuencia son sufridas por los niños (por ejemplo como resultado del volcado de sartenes, pavas o similares) y, debido al tamaño corporal relativamente más pequeño de los niños, es particularmente probable que estas lesiones causen daño extenso en una alta proporción del área corporal. En otra realización preferida de la invención los medicamentos y métodos adecuados se usan para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices de heridas producidas por lesiones por quemaduras.

Como se indicó anteriormente, la curación de heridas como respuesta a las lesiones por quemaduras con frecuencia se asocia con los resultados adversos de la formación de cicatrices, tal como la formación de las cicatrices hipertróficas. Otra consecuencia del tamaño relativamente grande de las lesiones por quemaduras es que estas son particularmente sensibles a las complicaciones tales como infección y desecación que se originan debido a la carencia de una capa epitelial

137

funcional. A la luz de lo anterior se apreciará que los métodos y medicamentos de la invención adecuados se pueden usar en el tratamiento de las lesiones por quemaduras para reducir el nivel de formación de cicatrices producidas como resultado de la herida y/o acelerar la reconstitución de una barrera epitelial funcional.

Los inventores han hallado que los métodos y medicamentos de la invención que utilizan monómeros tales como los que comprenden la Secuencia ID No. 3 son capaces de promover la reepitelización. Por consiguiente dichos métodos y medicamentos son particularmente efectivos en tratamiento de todas las lesiones que involucran el daño a una capa epitelial. Dichas lesiones se ejemplifica, sin limitación por lesiones en la piel, en que se daña la epidermis. Sin embargo se apreciará que dichos métodos y medicamentos de la invención también son aplicables a otros tipos de heridas en las que se dañan los epitelios, tales como lesiones que involucran los epitelios respiratorios, epitelios digestivos o epitelios circundantes de los tejidos u órganos internos (tales como los epitelios del peritoneo).

La curación de las heridas que involucran el peritoneo (el revestimiento epitelial de los órganos internos, y/o el interior de la cavidad corporal) con frecuencia puede originar adhesiones. Dichas adhesiones con una consecuencia común de la cirugía que involucra tejidos ginecológicos o intestinales. Los inventores consideran que la capacidad de los métodos y medicamentos de la invención (que utilizan monómeros adecuados tales como los que comprenden la Secuencia ID No. 3) para acelerar la regeneración del peritoneo a la vez que reducir la formación de cicatrices puede reducir la

138

incidencia de fijación inapropiada de porciones del peritoneo entre sí, y de este modo se reduce la aparición de adhesiones. Por consiguiente, el uso de dichos métodos y medicamentos de la invención para prevenir la formación de adhesiones intestinales o ginecológicas representa una realización preferida de la invención. En efecto el uso de dichos métodos o medicamentos de la invención en la curación de cualquier herida que involucre al peritoneo es una realización preferida.

Los métodos y medicamentos de la invención se pueden usar profilácticamente, por ejemplo en sitios donde no existe herida pero donde de otro modo se podría originar una cicatriz o formarse una herida crónica. A modo de ejemplo los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden administrar en sitios que experimentarán herida como resultado de procedimientos elegidos (tales como cirugía), o en sitios que se consideran de alto riesgo de herida. Se puede preferir que los medicamentos de la invención se administren en el sitio alrededor del momento de la herida, o inmediatamente antes de la formación de una herida (por ejemplo en período de hasta seis horas antes de la herida) o los medicamentos se pueden administrar en un tiempo inmediatamente antes de la herida (por ejemplo hasta 48 antes de la formación de la herida). Los expertos apreciarán que los momentos de máxima preferencia de administración antes de la formación de una herida se determinarán con referencia a diversos factores, que incluyen la formulación y vía de administración del medicamento seleccionado, la dosis del medicamento administrado, el tamaño y naturaleza de la herida que se forma y el estado biológico del paciente (que se puede determinar con referencia a factores tales como edad, salud y predisposición a las complicaciones de

139

curación o formación de cicatrices adversas del paciente). El uso profiláctico de los métodos y medicamentos de acuerdo con la invención es una realización preferida de la invención, y es particularmente preferida para la promoción de la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices en el contexto de las heridas quirúrgicas.

Los métodos y medicamentos de la invención también pueden promover la curación de heridas acelerada y/o la formación de cicatrices inhibida si se administra después de que se ha formado una herida. Se prefiere que dicha administración debería ocurrir tan temprano como sea posible después de la formación de la herida, pero los agentes de la invención pueden promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices en cualquier momento hasta que se haya completado el proceso de curación (es decir, incluso en el caso de una herida ya se haya curado parcialmente, los métodos y medicamentos de la invención se pueden usar para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices respecto de la porción no curada restante). Se apreciará que la "ventana" en que se pueden usar los métodos y medicamentos de la invención para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices depende de la naturaleza de la herida en cuestión (que incluye el grado de daño que ha producido y el tamaño del área herida). De este modo en el caso de una herida grande los métodos y medicamentos de la invención se pueden administrar relativamente tarde en la respuesta de curación, ya que aún pueden promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o

OK

inhibir formación de cicatrices. Los métodos y medicamentos de la invención, por ejemplo, con preferencia se pueden administrar dentro de las primeras 24 horas después de que se forma una herida, pero aún pueden promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices si se administran hasta diez, o más días después de la herida.

Los métodos y medicamentos de la invención se pueden administrar en una o más ocasiones, según corresponda, a fin de promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices. Por ejemplo, se pueden administrar cantidades terapéuticamente efectivas de los medicamentos a una herida tan frecuentemente como se requiera hasta completar el proceso de curación. A modo de ejemplo, los medicamentos de la invención se pueden administrar diariamente o dos veces por día a una herida durante al menos los primeros tres días posteriores a la formación de la herida. Los inventores han hallado que los regímenes que involucran dos administraciones de medicamentos de la invención, el primero antes de la formación de una herida y el segundo después de la herida son particularmente beneficiosos para reducir la formación de la cicatriz. Con preferencia dichos regímenes pueden incluir una primera administración inmediatamente antes de la formación de una herida y una segunda administración 24 horas después de la herida.

Con máxima preferencia los métodos y medicamentos de la invención se pueden administrar tanto antes como después de la formación de una herida. Los inventores han hallado que la administración de los medicamentos de la invención inmediatamente antes de la formación de una herida, seguido por la administración diaria de dichos

191

agentes en los días posteriores a la herida, es particularmente efectivo para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices.

Para los fines de la presente memoria descriptiva por "agente" o "agente de la invención" se entiende TGF- β monomérico biológica o terapéuticamente activo. Dichos agentes con preferencia pueden ser TGF- β monoméricos tipo salvaje y con más preferencia pueden ser TGF- β monoméricos capaces de promover la curación de heridas acelerada y/o inhibir la formación de cicatrices, el ejemplo preferido comprende el monómero expuesto en la Secuencia ID No. 3. Se apreciará que todos estos se pueden incorporar en los medicamentos de acuerdo con la invención, y se pueden usar en los métodos o usos de la invención.

Se apreciará que la cantidad de un medicamento de la invención que se debe aplicar a una herida depende varios factores tales como la actividad biológica y biodisponibilidad del agente presente en el medicamento, que a su vez depende, entre otros factores, de la naturaleza del agente y el modo de administración del medicamento. Otros factores para determinar una cantidad terapéutica adecuada de un medicamento pueden incluir:

A) La vida media del agente en el sujeto tratado.

B) La patología específica tratada (por ej., herida aguda o heridas crónicas).

C) La edad del sujeto.

La frecuencia de administración también estará influida por los factores mencionados anteriormente y en particular la vida media del agente elegido dentro del sujeto tratado.

142

En general cuando se usan los medicamentos de acuerdo con la invención para tratar heridas existentes, el medicamento se debería administrar tan pronto como se produzca la herida (o en el caso de las heridas que no sean inmediatamente evidentes, tales como las de los sitios corporales internos, tan pronto como la herida ha sido diagnosticada). La terapia con los métodos o medicamentos de acuerdo con la invención debería continuar hasta que el proceso de curación sea acelerado y/o prevenido, reducido o inhibido la formación de cicatrices hasta la satisfacción del médico.

La frecuencia de administración dependerá de la vida media biológica del agente usado. Normalmente se debería administrar una crema o ungüento que contiene un agente de la invención a un tejido blanco de modo que la concentración del agente en una herida se mantenga en un nivel adecuado para tener un efecto terapéutico. Esto puede requerir la administración diaria o incluso varias veces por día.

Los medicamentos de la invención, se pueden administrar por cualquier vía adecuada capaz de obtener el efecto deseado de promover la curación de heridas y/o prevenir, reducir o inhibir la formación de cicatrices, pero se prefiere que los medicamentos se administren en forma local en un sitio de la herida.

Los inventores han hallado que la promoción de la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se puede efectuar por la administración de un agente de la invención por inyección en el sitio de la herida. Por ejemplo, en el caso de las heridas dérmicas, los agentes de la invención se pueden administrar por medio de inyección intradérmica. En consecuencia un medicamento

143

preferido de acuerdo con la invención comprende una solución inyectable de un agente de la invención (por ej., para la inyección alrededor de los márgenes de un sitio de daño epitelial o un sitio con probabilidades de daño). Las formulaciones adecuadas para usar en esta realización de la invención se consideran a continuación.

En forma alternativa o adicional, los medicamentos de la invención también se pueden administrar en forma tópica para promover la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices. Dicha administración se puede efectuar como parte de la atención inicial y/o de seguimiento del área herida.

Los inventores hallan que la promoción de la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices está particularmente mejorada por la aplicación tópica de un agente de la invención a una herida (o, en el caso de la aplicación profiláctica a un tejido o sitio donde se forma una herida).

Las composiciones o los medicamentos que contienen los agentes de la invención pueden adoptar muchas formas diferentes que dependen en particular de la manera en que estos se usan. En consecuencia, por ejemplo, estos pueden estar en forma de un líquido, ungüento, crema, gel, hidrogel, polvo o aerosol. Todas estas composiciones son adecuadas para la aplicación tópica a una herida, que es un medio de administración preferido de los agentes de la invención a un sujeto (persona o animal) que necesita el tratamiento.

Los agentes de la invención se pueden proporcionar en un vendaje o parche esmeril, que se puede usar para cubrir una herida u otro sitio de daño epitelial tratado.

1244

Se apreciará que el vehículo de una composición que comprende los agentes de la invención debe ser uno que sea bien tolerado por el paciente y que permita la liberación del agente a la herida. Dicho vehículo con preferencia es biodegradable, bioresoluble, bioresorbible y/o no inflamatorio.

Los medicamentos y las composiciones que comprenden los agentes de la invención se pueden usar de varias maneras. En consecuencia, por ejemplo, una composición se puede aplicar en la herida y/o alrededor de ella a fin de promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices. Si la composición se aplica a una herida "existente", entonces el vehículo aceptable para uso farmacéutico será uno que sea relativamente "moderado", es decir, un vehículo que es biocompatible, biodegradable, bioresoluble y no inflamatorio.

Un agente de la invención, o un ácido nucleico que codifica dicho agente (como se considera también a continuación), se puede incorporar en un dispositivo de liberación lenta o retardada. Dichos dispositivos, por ejemplo, se pueden colocar sobre la piel o insertar debajo de ella y el agente o ácido nucleico se puede liberar durante días, semanas o aun meses. Dicho dispositivo puede ser particularmente útil para los pacientes (tal como los que sufren de heridas crónicas) que requieren la promoción de la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices a largo plazo. Los dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se usan para la administración de agente o ácido nucleico que normalmente requeriría administración frecuente (por ej., al menos administración diaria por otras vías).

145

Las dosis diarias de un agente de la invención se pueden dar como administración única (por ej., una aplicación diaria de una formulación tópica o una inyección diaria). Alternativamente, el agente de la invención puede requerir administración dos veces o más durante un día. En otra alternativa, se puede usar un dispositivo de liberación lenta para proveer dosis óptimas de un agente de la invención a un paciente sin la necesidad de administrar dosis repartidas.

En una realización un vehículo farmacéutico para la administración de un agente de la invención puede ser un líquido y una composición farmacéutica adecuada en forma de solución. En otra realización, vehículo aceptable para uso farmacéutico es un sólido y una composición adecuada está en forma de un polvo o comprimido. En una realización adicional el agente de la invención se puede formular como parte de un parche transdérmico aceptable para uso farmacéutico.

Un vehículo sólido puede incluir una o mas sustancias que también pueden actuar como agentes saborizantes lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, rellenos, deslizantes, auxiliares de compresión, aglutinantes o agentes de desintegración de comprimidos; también puede ser un material de encapsulado. En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el agente de la invención finamente dividido. En los comprimidos, el agente de la invención se mezcla con un vehículo que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y se compactan en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos con preferencia contienen hasta 99% del agente de la invención. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo,

146

fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de fusión baja y resinas de intercambio iónico.

Los vehículos líquidos se pueden usar para preparar soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El agente de la invención se puede disolver o suspender en un vehículo líquido aceptable para uso farmacéutico tal como agua, un solvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas aceptables para uso farmacéutico. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, buffer, conservantes, edulcorantes, agentes saborizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colorantes, reguladores de viscosidad, estabilizantes o reguladores osmóticos. Los ejemplos adecuados de los vehículos líquidos para la administración oral y parenteral incluyen agua (que parcialmente contienen aditivos como anteriores por ej., derivados de celulosa, con preferencia solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (que incluyen alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos, por ej., glicoles) y sus derivados, y aceites (por ej., aceite de coco fraccionado y aceite de maní). En general se prefiere que los medicamentos o métodos de la invención utilicen formulaciones en las que los TGF- β monoméricos, tales como TGF- β 3, se proporcionan en ausencia de alcoholes. Dichas formulaciones libres de alcohol pueden ser particularmente preferidos para usar en sitios de la herida (o sitios donde se forman las heridas) debido a su naturaleza relativamente "moderada". Para la administración parenteral, el vehículo también puede ser

147

un éster oleoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos adecuados son útiles en las composiciones forma líquida estéril para la administración parenteral. El vehículo líquido para las composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propelente aceptable para uso farmacéutico.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles se pueden utilizar por ejemplo, para inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intradérmica, intraestromal (córnea) o subcutánea. Las soluciones estériles también se pueden administrar por vía intravenosa. El agente de la invención se puede preparar como una composición sólida estéril que se puede disolver o suspender en el momento de la administración usando agua estéril, solución salina u otro medio inyectable estéril apropiado. Los vehículos deben incluir aglutinantes, agentes de suspensión, lubricantes y conservantes inertes y necesarios.

En la situación en que se desea administrar un agente de la invención por medio de ingestión oral, se apreciará que el agente elegido con preferencia será un agente que tenga un grado elevado de resistencia a la degradación. Por ejemplo, el agente de la invención se puede proteger (por ejemplo usando las técnicas descriptas anteriormente) de modo que se reduce su velocidad de degradación en el aparato digestivo.

Las composiciones de los agentes de la invención son adecuados para usar para promover la curación de heridas acelerada y/o inhibir la formación de cicatrices en la córnea. Las heridas en la córnea pueden provenir del trauma en el ojo que surge como resultado de la lesión

148

accidental (considerada anteriormente) o como resultado de las operaciones quirúrgicas (por ej., cirugía láser en la córnea). En este caso un medicamento de la invención preferido puede estar en forma de una gota ocular.

Los agentes de la invención se pueden usar en una variedad de heridas "internas" (es decir, heridas que aparecen dentro del cuerpo, más que en una superficie externa). En consecuencia por ejemplo, los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden formular para la inhalación para el uso en las heridas que se originan en los pulmones u otros epitelios respiratorios.

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

Una dosis diaria adecuada de un agente de acuerdo con la invención puede promover la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices depende de una variedad de factores que incluyen (pero sin limitación) la naturaleza del tejido herido, área y/o profundidad de la herida tratada, la gravedad de la herida, y la presencia o ausencia de factores predisponentes a la formación de cicatrices patológicas o heridas crónicas.

A modo de ejemplo, la cantidad de un agente activo que se puede administrar a una herida o sitio de daño epitelial en una única frecuencia de tratamiento con preferencia puede estar en la región de 50-200 ng/cm

149

lineal de herida o cm^2 de daño epitelial (si se administra por inyección), o 100-300 ng/cm lineal de herida o cm^2 de daño epitelial (si se administra por vía tópica).

A modo de ejemplo adicional, la cantidad de un agente activo preferida para administrarse en forma diaria a una herida o sitio de daño epitelial puede estar en la región de 50 ng/cm lineal de herida o cm^2 de daño epitelial (si se administra por inyección), o 100 ng/cm lineal de herida o cm^2 de daño epitelial (si se administra por vía tópica).

A modo de ejemplo, la cantidad total de un agente activo que se puede administrar por inyección local a una herida o sitio de daño epitelial con preferencia puede estar en la región de 50 ng/100 μL por centímetro lineal de herida o cm^2 de daño epitelial, dado una vez por día hasta a tres días, de este modo proporciona una dosis total de 150 ng/cm lineal de herida o cm^2 de daño epitelial.

En el caso de la aplicación tópica a heridas agudas o sitios de daño epitelial, una cantidad adecuada de un agente activo con preferencia puede estar en la región de 100 ng/lineal de herida o cm^2 de daño epitelial, dado una vez por día hasta 3 días, de este modo proporciona una dosis total de 300 ng/cm lineal de herida o cm^2 de daño epitelial.

Sin restar mérito a lo anterior, la cantidad de un agente de acuerdo con la invención necesaria para el tratamiento de las heridas u otros sitios de daño epitelial normalmente estarán en el rango de 1 pg a 1 mg del agente administrado por centímetro lineal de herida o daño epitelial durante 24 horas, si bien esta figura se puede modificar hacia arriba o hacia abajo en

139

respuesta a los factores descriptos anteriormente. El agente con preferencia se puede proporcionar en la forma de una solución 1 pg/100 μ L - 1 mg/100 μ L del agente, y 100 μ L de dicha solución administrada por centímetro lineal de herida o daño epitelial durante un período de 24 horas.

El agente con más preferencia se puede administrar como una solución 10 pg/100 μ L - 100 pg/100 μ L con 100 μ L de dicha solución administrada por centímetro lineal de herida o daño epitelial durante un período de 24 horas.

Con máxima preferencia el agente se puede administrar como una solución de 1 ng/100 μ L - 1000 ng/100 μ L con 100 μ L de dicha solución administrada por centímetro lineal de herida o daño epitelial durante un período de 24 horas.

En general, las composiciones que comprenden los agentes de la invención se deberían formular de modo que cuando se administran a una herida se obtenga una concentración del agente entre 0,79 pM y 0,79 mM por centímetro lineal de herida o daño epitelial. Con preferencia el agente se puede proporcionar a concentraciones de entre 7,9 pM y 0,079 mM por centímetro lineal.

Un agente de la invención (tal como el péptido de la Secuencia ID No. 3) se puede administrar a una concentración de entre 0,79 pM y 0,79 mM. Con preferencia un agente de la invención se puede administrar a una concentración de entre 7,9 pM y 0,079 mM. Con máxima preferencia un agente de la invención se puede administrar a una concentración de entre 0,79 nM y 0,79 μ M.

Solo a modo de ejemplo una solución inyectable que contiene entre 10 pg/100 μ L y 100 μ g/100 μ L de un agente

de la invención (tal como el péptido de la Secuencia ID No. 3) es adecuada para la aplicación para promover la curación acelerada de heridas dérmicas y/o inhibición de la formación de cicatrices cuando se administra como una inyección intradérmica y se dosifica con 100 μ L por centímetro lineal de margen de herida.

En el caso de un péptido monomérico de la Secuencia ID No. 3, las dosis preferidas para la administración en una herida pueden ser 1 ng/100 μ L-1000 ng/100 μ L, y 100 μ L de dicha solución administrada por centímetro lineal de margen de herida.

Los agentes de la invención se pueden usar para promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir formación de cicatrices como monoterapia (por ej., mediante el uso de medicamentos de la invención solos). Alternativamente los métodos y medicamentos de la invención se pueden usar en combinación con otros compuestos o tratamientos para la promoción de la curación de heridas o inhibición de formación de cicatrices. Los expertos en el arte conocerán tratamientos adecuados que se pueden usar como partes de dichas terapias de combinación.

Los inventores han hallado que los medicamentos de acuerdo con la presente invención, y en particular los que comprenden péptidos de la Secuencia ID No. 3 se pueden formular ventajosamente en presencia de un azúcar. Este azúcar pueden ser un azúcar reductor o no reductor y/o aun fosfato o fosfonato derivado de este. Los ejemplos de dichos azúcares se pueden seleccionar, pero sin limitación, del grupo que comprende maltosa, manosa, trehalosa, arabinosa, manitol, sacarosa, fructosa, dextrosa y glucosa. Los azúcares preferidos se pueden seleccionar del grupo que consiste en maltosa y

152

trehalosa. Los medicamentos de la invención, y en particular los de acuerdo con esta realización de la invención, con preferencia puede tener un pH de entre 5 y 7.

Se apreciará que los péptidos de TGF- β monoméricos pueden representar agentes favorables administrados por técnicas que involucran la expresión celular de secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas. Dichos métodos de expresión celular son particularmente adecuados para uso médico en que se requieren efectos terapéuticos de los péptidos durante un período prolongado, por ejemplo en contextos donde se desea aumentar durante período de tiempo una respuesta defectuosa de curación de heridas. Es particularmente preferido que los monómeros de TGF- β se administren por medio de expresión celular que comprende los péptidos definidos por la Secuencia ID No. 3.

Muchos métodos conocidos de administrar agentes peptídicos de la invención a los tejidos tales como heridas tienen la desventaja de que pueden dificultar la obtención de niveles sostenidos del agente de la invención en el sitio de tratamiento durante el curso de incluso pocos días debido a que los agentes peptídicos pueden tener vida media corta in vivo. La vida media de los agentes puede ser corta por numerosas razones que incluyen:

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

Además, los agentes usados para promover la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices necesitan

153

administrarse en un vehículo adecuado y con frecuencia se proporcionan como una composición que comprende el agente y el vehículo. Tal como se describió, dichos vehículos con preferencia son no inflamatorios, biocompatibles, bioresorbibles y no deben degradar o inactivar el agente (en el almacenamiento o el uso). Sin embargo, con frecuencia puede ser difícil proporcionar un vehículo satisfactorio para administrar agentes a un tejido con una herida para tratar.

Una manera conveniente de obviar o atenuar estos problemas es proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de la invención en un área tratada por medio de terapia génica.

Debido a la degeneración del código genético, es claro que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican agentes adecuados para el uso de acuerdo con la invención se pueden variar o cambiar sin afectar sustancialmente la secuencia del producto codificado de este modo, para proporcionar una variante funcional de este. Las secuencias de los ácidos nucleicos posibles que se pueden usar codifican péptidos definidos por las Secuencias ID Nos. 1 a 3 serán evidentes para los expertos y los ejemplos adecuados se proporcionan como las Secuencias ID Nos. 4 a 7 respectivamente.

Los sistemas de administración de terapia génica son muy adecuados para alcanzar los niveles sostenidos de un agente de la invención en una herida durante un período más largo del que es posible para la mayoría de los sistemas de administración convencionales. Los agentes de la invención adecuados para promover la curación de heridas acelerada y/o inhibir la formación de cicatrices se pueden expresar en forma continua en las células en un sitio de la herida que ha sido transformado con la

154

molécula de ADN descrita en el noveno aspecto de la invención. En consecuencia, aun cuando el agente de la invención tenga una vida media muy corta in vivo, se pueden expresar en forma continua cantidades terapéuticamente efectivas del agente a partir del tejido tratado.

Además, los sistemas de administración de terapia génica se pueden usar para proporcionar la molécula de ADN (y de este modo el agente de la invención) sin la necesidad de usar vehículos farmacéuticos convencionales tales como los que se requieren en ungüentos o cremas que se ponen en contacto con la herida.

Un sistema de administración de terapia génica adecuado es con preferencia de modo tal que una molécula de ADN es capaz de expresarse (cuando el sistema de administración se administra a un paciente) para producir un péptido definido por el grupo que comprende las Secuencia ID Nos. 1 a 3. La molécula de ADN se puede combinar dentro de un vector adecuado para formar un vector recombinante. El vector recombinante por ejemplo puede ser un plásmido, cósmido o fago. Dichos vectores recombinantes son muy útiles en los sistemas de administración de terapia génica de la invención para transformar células con moléculas de ADN adecuadas.

Los vectores recombinantes también pueden incluir otros elementos funcionales. Por ejemplo, los vectores recombinantes se pueden diseñar de modo que el vector se replicará autónomamente en el núcleo de la célula. En este caso, los elementos que inducen la replicación de ADN pueden ser necesarios en el vector recombinante. Alternativamente el vector recombinante se puede diseñar de modo que el vector y la molécula de ADN recombinante se integran en el genoma de una célula. En este caso las

15

secuencias de ADN que favorecen la integración específica (por ej., por recombinación homóloga) son deseables. Los vectores recombinantes también pueden tener ADN que codifica los genes que se pueden usar como marcadores seleccionables en el proceso de clonación.

El vector recombinante también puede comprender un promotor o regulador para controlar la expresión del ge, según corresponda.

La molécula de ADN puede (pero no necesariamente) incorporarse en el ADN de las células del sujeto tratado. Las células no diferenciadas se pueden transformar en forma estable lo que lleva a la producción de células hija modificadas genéticamente. En este caso, se puede requerir la regulación de la expresión en el sujeto por ej., con factores de transcripción específicos, activadores del gen o con más preferencia con promotores inducibles que transcriben el gen en respuesta a una señal que se halla específicamente en una herida. En forma alternativa, se puede diseñar el sistema de administración para favorecer la transformación estable o transitoria de células diferenciadas en el sujeto tratado. En este caso, la regulación de la expresión puede ser menos importante debido a que la expresión de la molécula de ADN se detendrá cuando las células transformadas mueran o detengan la expresión de la proteína (idealmente cuando se ha efectuado la promoción de la curación de heridas acelerada con reducción de la formación de cicatrices).

EL sistema de administración puede proporcionar la molécula de ADN a un sujeto sin incorporarse al vector. Por ejemplo, la molécula de ADN se puede incorporar dentro de un liposoma o partícula viral. Alternativamente la molécula de ADN "desnudo" se puede insertar en las

156

células del sujeto por un medio adecuado, por ej., captación endocitótica directa.

La molécula de ADN se puede transferir a las células de un sujeto tratado por transfección, infección, microinyección, fusión celular, fusión de protoplasto o bombardeo balístico. Por ejemplo, la transferencia puede ser por bombardeo balístico con partículas de oro recubiertas, liposomas que contienen la molécula de ADN, vectores virales (por ej., adenovirus) y medios de provisión de de captación directa de ADN (por ej., endocitosis) por la aplicación de ADN de plásmido directamente en una herida en forma tópica o por inyección.

La expresión celular del agente de la invención puede ser por células del borde del área no dañada circundante de la herida o en forma alternativa puede ser por células introducidas terapéuticamente en la herida (por ejemplo células endógenas o exógenas cultivadas involucradas en la respuesta de curación de heridas).

Se apreciará que las células que se introducen en forma terapéutica para promover la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices se pueden manipular ex vivo de modo que ellas expresen niveles aumentados de un agente de la invención, y luego se introducen en el área herida. Dichas células con preferencia pueden ser células cultivadas ex vivo para usar en la preparación o fabricación de piel artificial o sustitutos de piel que se usan en la promoción de la curación de heridas. Las células con más preferencia pueden ser células autólogas, si bien se apreciará que se pueden usar cualquier célula adecuada.

157

Por consiguiente, en un decimoséptimo aspecto de la invención, se proporciona un medicamento que comprende células inducidas para expresar un agente de la presente invención. Dichas células con preferencia pueden expresar una TGF- β 3 monomérico.

La inducción de la expresión celular de un agente de la invención se puede efectuar por medio de la incorporación en las células de ácidos nucleicos que producen la expresión de agentes adecuados para el uso de acuerdo con la invención.

La invención se describirá adicionalmente por medio de ejemplos con referencia a los siguientes protocolos y estudios experimental, y las Figuras acompañante en las que:

La Figura 1 ilustra los resultados de la comparación de las formas monoméricas y diméricas de TGF- β 3 por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras;

La Figura 2 establece el molde usado para la ubicación de las heridas incisional en las ratas experimentales;

La Figura 3 sintetiza los tratamientos administrados a los sitios de herida de los animales experimentales;

La Figura 4 muestra los resultados de la evaluación, tres días después de la herida, del aspecto de las heridas experimentales tratadas con TGF- β 3 monomérico o dimérico;

La Figura 5 sintetiza los tratamientos administrados a los sitios de herida de los animales experimentales;

15

La Figura 6 muestra los resultados de evaluación, 70 días después de la herida, del aspecto de las heridas experimentales tratadas con TGF- β 3 monomérico o dimérico;

La Figura 7 muestra imágenes macroscópicas representativas que muestran el aspecto de las cicatrices experimentales las cicatrices días después de la herida;

La Figura 8 muestra imágenes microscópicas representativas que muestran la estructura de las cicatrices experimentales las cicatrices días después de la herida;

La Figura 9 ilustra la producción de monómeros de TGF- β 3 por células huésped transformadas con éxito;

La Figura 10 ilustra la generación de TGF- β 3 dimérico y monomérico en condiciones de replegamiento de proteínas experimentales; y

La Figura 11 ilustra el aislamiento de las proteínas de de TGF- β 3 por ultrafiltración/cromatografía de interacción hidrofóbica.

La información respecto de las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos de importancia se proporciona en la sección "Información de secuencia" (que incluye las secuencias de aminoácidos de los fragmentos activos de las isoformas de TGF- β humana adecuadas para el uso de acuerdo con la invención, además de las secuencias de las moléculas de ADN que codifican los péptidos de longitud completo de las isoformas de TGF- β 3,

159

y el ADN que codifica el fragmento activo de TGF- β 3 de tipo salvaje; y las secuencias de ADN de los cebadores usados en la generación de ADNc de las isoformas humanas de TGF- β adecuadas para el uso de acuerdo con la invención).

PROTOSCOLOS Y EJEMPLOS

1. METODOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN, REPLEGAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MONOMÉRICAS DE TGF- β

1.1 Secuencia de nucleótidos

Las secuencias de ADN que codifican las proteínas de TGF- β de longitud completa se muestran como las secuencias ID Nos. 4 a 6. Las proteínas de TGF- β de longitud completa consisten en un péptido señal (mostrado en *itálica*), pro-péptido (mostrado en **negrita**) así como el fragmento activo (mostrado en texto normal). La secuencia de nucleótidos que codifica para los fragmentos activos del TGF- β 3 tipo salvaje se muestran la Secuencia ID No. 7.

1.2 Generación de ADNc

El ARN total de un herida incisional humana (tomado el día 5 pos-herida) se trató con ADN libre (Ambion) para eliminar cualquier ADN contaminante. Usando ARN total como templado, se generó ADNc para cada uno de las tres isoformas de TGF- β de mamífero es decir, TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 por la reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR). Se preparó la mezcla maestra de RT-PCR a partir del kit de QRT-PCR Core Reagent 1-paso Brilliant® (Stratagene). Se agregó un microgramo de ARN a 50 μ l de una solución que contiene: buffer QRT-PCR de 1 paso, 0,2 mM de dNTP, 3,5 mM de

160

MgCl₂, 1 µL de transcriptasa reversas StrataScript, 2,5 unidades de Taq Polimerasa, 0,4 µM de cebador de sentido (Figura 1), 0,4 µM de cebador de antisentido (como se muestra en la información de secuencia). La reacción se colocó en un ciclador térmico (Hybaid PCR Express) y se corrió en las siguientes condiciones: 30 min a 45°C, 10 min a 95°C, luego 40 ciclos de 95°C durante 30 seg, 65°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. La etapa final fue de 72°C durante 10 min. Las muestras de PCR se corrieron en gel de agarosa 2% (p/p) para verificar el tamaño de banda y se purificó usando el kit Wizard PCR Prep (Promega).

1.3 Construcción del plásmido.

El vector pET-3d se deriva del vector pBR322 y contiene un promotor T7 bajo control de *LacUV5* control y un gen marcador resistente a ampicilina.

Los fragmentos de las tres isoformas de TGF-β 3 (generados en la Sección 1.2) se subclonaron en los vectores pET-3d en los sitios Nco I y Bam HI (5'-3' respectivamente). Los ligamiento resultantes luego se transformaron en células XL10 Gold (Stratagene) y se realizó el análisis de PCR de colonia para ubicar los clones que contienen un inserto. Los clones finales se cultivaron y sus ADN del plásmidos se extrajeron en agua usando Qiaprep®Spin Miniprep Kit (Qiagen). Los plásmidos se secuenciaron y verificaron usando el cebador del promotor T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y cebador del terminador T7 (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3').

1.4 Transformación y clonación.

10 µL (50 ng por µl) de ADN de plásmido que codifica para cada un de las isoformas de TGF-β (de la Sección 1.3) se agregaron a 1 ml de células E.coli BL21 (DE3)

pLysS SinglesTM (Novagen) competentes en frío (4°C). Después de 20 min las células se sometieron a shock térmico por la incubación durante 30 segundos a 42°C en baño de agua. Se agregaron 100 µL de medio Psi a la mezcla de células/plásmido y se agitaron a 37°C durante 90 min. Se sembraron alícuotas de 50 µL y 100 µL en placas de agar LB que contienen 100 µg/ml de ampicilina (Sigma) y se incubaron durante 18 horas a 37°C. Se cultivaron colonias únicas y se congelaron patrones de las células generadas y se almacenaron a -80°C. El plásmido de ADN se analizó a partir de las células patrón para verificar la correcta transformación.

1.5 Expresión.

Las ampollas de las células de E.coli congeladas que se transformaron con cada una de las isoformas de cells that TGF-β (de la Sección 1.4) se recuperaron y se inocularon en matraces erlenmeyer con tabique, que contiene 100 ml de medio LB y 100 µg/ml de ampicilina. Los matraces se incubaron con agitación a 37°C toda la noche. Se agregaron 5 ml de este cultivo de la noche a matraces Erlenmeyer de 2 litros (500 ml de medio LB/amp) y se incubaron con agitación a 37°C. Se tomaron muestra de 2 ml de caldo por hora para rastrear el crecimiento y la expresión de la isoforma TGF-β (pos-inducción). El crecimiento se determinó por la medición de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Cuando la absorbancia se midió a 0,6 de Abs las células se indujeron a expresar las isoformas de TGF-β por la adición de R-D-Tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG, Sigma) a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se incubaron durante 4 horas adicionales. Las muestras de caldo de 0,5 ml se sedimentaron por centrifugación (10

162

min, 10.000 rpm en Sorvall Biofuge) y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 50 μ l de buffer de muestra electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en dodecilsulfato de sodio (SDS) y se calentó durante 10 minutos en baño de agua a 95°C. Se cargaron 10 μ L de muestras en SDS-PAGE. Se realizaron SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (como se describe en A.T Andrews, 1986) usando un Hoefer®Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster (Amersham). Los geles eran de 1 mm de espesor y contenían 15% (v/v) de gel de poliacrilamida.

1.6 Recolección de células y aislamiento de cuerpos de inclusión

Las células de Sección 1.5 se sedimentaron por centrifugación a 5000 g durante 0 min a 4°C en un centrífuga Hettich Rotina 46R con un rotor 4315. La ruptura celular y la recuperación de cada una de las isoformas de TGF- β insolubles insoluble (cuerpos de inclusión) se llevaron a cabo a 4°C. Las células se suspendieron en 50 ml de 100 mM de Tris/HCl (Sigma), 10 mM de EDTA (Sigma) pH 8,3 y se disgregaron por sonicación usando un Sanjo Soniprep 150. Se agregó 0,2% (p/p) de Triton X-100 (Sigma) y la suspensión y se agitó durante una hora. La suspensión se centrifugó a 12.000 g durante 40 min. Los pellet se resuspendieron en 50 ml de 100 mM de Tris/HCl, 10 mM de EDTA pH 8,3 a temperatura ambiente antes de centrifugar durante 40 min a 15.000g.

1.7 Solubilización de los cuerpos de inclusión

Los pellet de la Sección 1.6 se resuspendieron en 40 ml de urea 8 M, 1% (p/p) DL-ditiotreitol (DTT) y se disgregaron en un homogenizador Heidolph Diax 900. La suspensión se cubrió y dejó agitar durante 1 hora para

163

solubilizar los cuerpos de inclusión y reducir el TGF- β a su forma monomérica desnaturalizada. Luego las suspensiones se centrifugaron a 12.000 g durante 30 min a 4°C. Los sobrenadantes se dializaron para intercambiar el buffer de 8 M de urea (ICN Biomedical) a 10% (v/v) de ácido acético. Las proteínas de E.coli que fueron solubles en urea 8 M precipitaron fuera de la solución cuando se intercambió el buffer a 10% (v/v) de ácido acético. Se agregó 1% (p/v) de DTT (Sigma) a las suspensiones, se cubrieron y dejaron agitar durante 30 min para reducir los puentes disulfuro que se pueden haber formado entre los monómeros de TGF- β durante el intercambio del buffer. Las suspensiones se centrifugaron para separar las proteínas solubles y las proteínas no solubles. Se tomaron muestras de la solubilización de urea y las etapas de intercambio de buffer (material de ácido acético soluble y no soluble), y luego se analizó mediante SDS-PAGE.

1.8 Ultrafiltración

El material de 10% (v/v) de ácido acético de la Sección 1.7 se sometió a ultrafiltración con una membrana de 10 kDa en una Vivoflow50 (Vivascience). El fin de esto fue reducir el volumen de la suspensión de 10% (v/v) de ácido acético a 3 ml y eliminar las proteínas de bajo peso molecular (<10 kDa).

1.9 Replegamiento y purificación

Las proteínas solubilizadas de TGF- β 1, 2 y 3 se concentraron primero por ultrafiltración y luego se corrieron en una columna de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Las fracciones de la SEC que contenían proteína de TGF- β luego se mezclaron y liofilizaron. Las

164

TGF- β 1, 2 y 3 monoméricas liofilizadas se solubilizaron en urea 8 M que contenía 10 mM de DTT hasta obtener una concentración final de 10 mg/ml. Las soluciones de proteína de TGF- β 1, 2 y 3 se agregaron gota a gota, mientras se agitaba la solución de replegamiento (1 M de sulfonato de 3-(-piridino)-1-propano (NDSB-201), 20% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), 2% (p/v) de 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-1-propanosulfonato (CHAPS), 1 M de NaCl (Sigma), 1% (p/v) de glutatión reducido (GSH, Sigma), 0,05 M de Trizma®Base (Sigma) pH 9,3) hasta alcanzar las concentraciones finales de 0,2 mg/ml de proteínas de TGF- β 1, 2 y 3. Es importante que el pH se mantenga dentro de un rango de 9,2-9,4 usando NaOH/HCl concentrado. La solución se cubrió con Parafilm, que se perforó para permitir la oxidación de las proteínas monoméricas y se dejó agitar a 8°C. Después de 144 horas la solución se centrifugó a 15.000g durante 40 minutos para eliminar el precipitado formado y el pH se ajustó a pH 3,5 con ácido acético glacial.

1.10 Purificación de proteínas monoméricas replegadas

El material replegado resultante de TGF- β luego se también se purificó usando técnicas cromatográficas estándares seguidas por la concentración de las fracciones relevantes (es decir, que contienen TGF- β monoméricas) por ultrafiltración antes de la caracterización.

2. METODOLOGÍA IN-VITRO E IN-VIVO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS DE TGF- β MONOMÉRICAS

163

Las proteínas TGF- β monoméricas se caracterizaron y evaluaron para determinar la actividad biológica por medio de varios métodos que incluyen: SDS-PAGE; análisis de secuencia de aminoácidos (por LCMS); ensayo de actividad biológica in-vivo (usando modelos de rata de curación de de heridas cutáneas y formación de cicatrices que se describe a continuación).

2.1 CARACTERIZACIÓN IN VIVO DE MONOMEROS DE TGF- β 3

2.1.1 Análisis de SDS-PAGE no reductor y reductor de TGF- β 3 monoméricas purificadas

2.1.1.1 Método

Los monómeros de TGF- β purificados se evaluaron por SDS-PAGE para determinar la pureza y masa molecular. Se cargaron 3 μ g de los TGF- β 3 monoméricos purificados (muestras reducidas y no reducidas), 3 μ g de TGF-TGF- β 3 diméricos control positivo (reducido y no reducido) y 10 μ L de estándares de peso molecular Invitrogen Mark 12 en un gel de poliacrilamida (10%-20% (v/v) de gradiente de acrilamida). Una vez que la electroforesis finalizó el gel se tiñó con azul Coomassie.

2.1.1.2 Resultados

Los resultados del análisis SDS-PAGE no reductor y reductor se muestran en la Figura 1, y se ilustra que los TGF-TGF- β 3 diméricos corrieron a las posiciones esperadas en el gel (~13 kDa para reducido como monómeros y 25 kDa para las muestra no reducidas). El TGF-TGF- β monomérico corrió a la posición esperada ~13 kDa (teórica 12,5 kDa) del gel para las muestras reducidas y no reducidas. No se detectaron bandas de proteínas adicionales por la tinción

166

de azul Coomassie, que tiene una sensibilidad de aproximadamente 1 μg de proteína.

2.1.2 Análisis de secuencia de aminoácidos

2.1.2.1 Método

Se secaron al vacío 50 microlitros de TGF- β 3 monomérico purificado y luego se resuspendieron en 20 μl de una solución que contiene 50 mM de NH_4HCO_3 y 10% (v/v) de acetonitrilo. Se resuspendieron 20 μg de tripsina de calidad de secuenciación (Promega) en 10 μl de buffer de resuspensión provisto por el kit (Promega) para dar una concentración de tripsina de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Esto luego se diluyó en 50 mM de NH_4HCO_3 y 10% (v/v) de acetonitrilo para dar una concentración final de tripsina de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La digestión se realizó durante la noche por la adición de tripsina en una relación de 1:20 (p/p) de TGF- β 3 monomérico. La digestión se inactivó por la adición de ácido fórmico (Fluka) a una concentración final de 0,1% (v/v). Las muestras luego se diluyeron a 1 pmol/ μl de péptidos y luego se analizaron por un proceso de nanoflujo RPLCMS (sistema Ultimate. Dionex en línea con un Q-ToF2, Micromass). Se realizó la cromatografía en una columna de 75 μm C18 (empacamiento LC) que utiliza un gradiente de 45 min desde 5% de acetonitrilo a 55% de acetonitrilo (Romil). El análisis MS adoptó la forma de análisis dependiente datos donde el instrumento midió la m/z de los iones peptídicos que eluyen de la LC y se seleccionaron los iones apropiados por análisis MSMS donde se empleó la descomposición inducida por colisión para obtener la información de secuencia de los iones peptídicos fragmentados.

2.1.2.2 Resultados

El análisis de la secuencia de aminoácidos confirmó que el monómero de TGF- β 3 tipo salvaje tenía la secuencia de aminoácidos esperada (correspondiente a la Secuencia ID No. 3).

2.2 EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS MONÓMEROS DE TGF- β 3

Los datos de la bibliografía han demostrado que los TGF- β 3 diméricos que incluyen TGF- β 3 aceleran la curación de heridas cutáneas y reducen formación de cicatrices después de una herida o lesión (Shah, M et al 1995). El siguiente ejemplo investigó los efectos biológicos de TGF- β 3 monoméricos en la curación de heridas incisionales (3 días después de la herida) y la formación de cicatrices (70 días después de la herida) en ratas macho adultas.

2.2.1 El efecto de las proteínas monoméricas de TGF- β 3 tipo salvaje y mutado sobre la curación de heridas (Día 3 de herida incisional)

2.2.1.1 Método

Las ratas macho (Sprague Dawley) se anestesiaron con halotano y se afeitaron sus lomos. Se marcaron las posiciones de las heridas usando un molde patentado con tinta marcadora de la piel como se muestra en la Figura 2. Las muestras se diluyeron en buffer de vehículo estéril que contiene 0,25 M de Maltosa (Sigma), 0,002% (v/v) de ácido acético y 0,33% (v/v) de alcohol isopropílico a las concentraciones descritas en la Figura 3. Todas las muestras se esterilizaron con

168

filtración y eran libres de endotoxina. Se usaron cuatro ratas por cada grupo de tratamiento. Se inyectaron por vía intradérmica 100 μ L de muestra de cada grupo de tratamiento (Figura 3) en las posiciones de heridas marcadas A y B (excepto en las ratas que no recibieron tratamiento - "naive"). En las posiciones A y B se realizaron incisiones larga de 1 cm de grosor completo con una hoja de escalpelo No. 11. Todos los animales se alojaron en jaulas separadas. Después de 24 horas los animales recibieron una segunda dosis de muestra. Después de 3 días se fotografiaron las heridas y analizaron usando un sistema de clasificación analógico visual macroscópico (modificado de Beausang, E et al. 1998). Se realizó el análisis estadístico de los datos usando las pruebas de Mann Whitney U/T de Student. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

2.2.1.2 Resultados

Se examinaron las heridas incisionales después de 3 días usando un sistema VAS macroscópico (ver Figura 4). En esta escala de 10 puntos un puntaje de 0 representa una herida bien curada y un puntaje de 10 representa una herida muy mal curada. Los datos muestran que:

El tratamiento con 50 ng/100 μ L o 100 ng/100 μ L de TGF- β 3 monomérico de tipo salvaje disminuye el puntaje de VAS (es decir, mejora el aspecto macroscópico de las heridas) en comparación con no tratamiento (control sin tratamiento) y tratamiento con placebo. El tratamiento con la dosis de 100 ng/100 μ L mejoró significativamente ($p < 0,01$) el aspecto de las heridas en comparación con no tratamiento (control sin tratamiento). Es sorprendente advertir que de TGF- β 3 monomérico de tipo salvaje mostró mayor efectividad que las forma dimérica.

169

2.2.2 El efecto de las proteínas de TGF- β 3 monomérico de tipo salvaje sobre la formación de cicatrices (Día 70 de herida incisional)

2.2.2.1 Método

Las ratas macho (Sprague Dawley) se anestesiaron con halotano y se afeitaron sus lomos. Se marcaron las posiciones de las heridas usando un molde estandarizado con tinta marcadora de la piel como se muestra en la Figura 5. Las muestras se diluyeron en buffer de vehículo estéril que contiene 0,25 M de Maltosa (Sigma), 0,002% (v/v) de ácido acético y 0,33% (v/v) de alcohol isopropílico a las concentraciones descritas en la Figura 5. Todas las muestras se esterilizaron con filtración y eran libres de endotoxina. Se usaron cuatro ratas por cada grupo de tratamiento. Se inyectaron por vía intradérmica 100 μ L de muestra de cada grupo de tratamiento (Figura 5) en las posiciones de heridas marcadas A y B (excepto en las ratas que no recibieron tratamiento - "naive"). En las posiciones A y B se realizaron incisiones largad de 1 cm de grosor completo con una hoja de escalpelo No. 11. Todos los animales se alojaron en jaulas separadas. Después de 24 horas los animales recibieron una segunda dosis de muestra. Después de 70 días se fotografiaron las cicatrices y analizaron usando un sistema de clasificación analógico visual macroscópico (modificado de Beausang, E et al. 1998). Los ejemplos representativos del aspecto macroscópico producidos como se describió anteriormente se muestran en la Figura 7.

Después del análisis macroscópico, las heridas se extirparon y colocaron en solución salina buferizada 10%

antes de procesarlas para la evaluación histológica en bloques de cera. Los bloques de cera se cortaron en secciones seriadas de 5 μm y se colocaron en portaobjetos. Los portaobjetos se tiñeron con Massons Tricrómico y se analizaron. Se realizó el análisis estadístico de los datos usando las pruebas de Mann Whitney U/T de Student. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Los ejemplos representativos del aspecto macroscópico de las cicatrices producidas como se describió anteriormente se muestran en la Figura 8.

2.2.2.2 Evaluación de las heridas incisionales al día 70 usando VAS macroscópico

Las heridas incisionales se examinaron después de 70 días usando un sistema VAS macroscópico. Un puntaje 10 indica una mala cicatriz y un puntaje de 0 es piel normal. Los resultados del análisis VAS de las heridas el día 70 se sintetizan en la Figura 6. Esta muestra que:

El TGF- β 3 monomérico de tipo salvaje (en dosis de 50 ng/100 μL y 100 ng/100 μL) redujo la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y sin tratamiento. Para la dosis de 100 ng/100 μL esta reducción es estadísticamente significativa en comparación con las heridas tratadas con placebo ($p < 0,01$).

El TGF- β 3 dimérico a 50 ng/100 μL redujo la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y sin tratamientos. Esta reducción es estadísticamente significativa en comparación con las heridas tratadas con placebo ($p < 0.01$).

121

3. DESARROLLO DE CONDICIONES PREFERIDAS PARA LA PRODUCCIÓN DE MONÓMEROS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

Los inventores investigaron si se podrían establecer o no métodos mejorados de re-plegamiento de monómeros de TGF- β biológicamente activos. El siguiente ejemplo es ilustrativo de la aplicación de los métodos de la invención al re-plegamiento de TGF β 3 monomérico.

Se estableció un estudio para analizar reactivos de replegamiento (ver 3.12).

Luego se investigaron los métodos de purificar los monómeros correctamente replegados (3.13).

Estos estudios llevaron a los inventores a darse cuenta que los métodos mejorados de generación de monómeros de TGF- β correctamente plegados se pueden establecer por el siguiente método que comprende agregar un factor de crecimiento monomérico no plegado solubilizado a una solución que contiene:

(i) ácido 2-(ciclohexilamino)-etansulfónico (CHES) o un análogo funcional de este; y

(ii) un sistema redox sulfidrido/disulfuro de bajo pesos molecular; e

incubar el factor de crecimiento en la solución hasta que se forma factor de crecimiento dimérico biológicamente activo.

EXPERIMENTAL

3.1 Generación de ADNc

El ARN total de un herida incisional humana (tomado el día 5 pos-herida) se trató con ADN libre (Ambion) para eliminar cualquier ADN contaminante. Usando ARN total como templado, se generó ADNc de TGF- β 3 por la reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR). Se preparó la mezcla maestra de RT-PCR a partir del kit

de QRT-PCR Core Reagent 1-paso Brilliant® (Stratagene). Se agregó un microgramo de ARN a 50 µl de una solución que contiene: buffer QRT-PCR de 1 paso, 0,2 mM de dNTP, 3,5 mM de MgCl₂, 1 µL de transcriptasa reversa StrataScript, 2,5 unidades de Taq Polymerase, 0,4 µM de cebador de sentido (5' GAT ATA CCA TGG CTT TGG ACA CCA ATT ACT ACT GC 3'), ,4 µM de cebador de sentido (5'-CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT ACA TTT ACA AGA C 3').). La reacción se colocó en un ciclador térmico (Hybaid PCR Express) y se corrió en las siguientes condiciones: 30 min a 45°C, 10 min a 95°C, luego 40 ciclos de 95°C durante 30 seg, 65°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. La etapa final fue de 72°C durante 10 min. Las muestras de PCR se corrieron en gel de agarosa 2% (p/p) para verificar el tamaño de banda y se purificó usando el kit Wizard PCR Prep (Promega).

3.2 Clonación del vector y transformación en célula huésped.

El vector pET-24d se deriva del vector pBR322 y contiene un promotor T7 bajo control de *LacUV5* control y un gen marcador resistente a kanamicina.

Los fragmentos de ADNc de TGF-β3 (generados en la Sección 1.1) se digirieron con 0,75 µl de NcoI (New England Biolabs) y 0,75 µl de BamHI (New England Biolabs) con buffer BamHI 1X (New England Biolabs) en una reacción de 15 µL (agua libre de nucleasa, Novagen) a 37°C durante 4 horas. Se digirió un microlitro de plásmido pET-24d (Novagen) de la misma manera. El ADNc digerido y el fragmento del plásmido mayor se purificaron en gel de agarosa y se recuperaron usando el kit de extracción de ADN en gel SpinPrep (Novagen).

123

El ADNc y los fragmentos de plásmido purificados se ligaron usando un kit de T4 ligasa (Novagen). El ADNc/plásmido ligado se transformó en HMS174 (DE3), (kit de transformación Novagen HMS174 (DE3)). Se seleccionaron los transformantes por sembrado en placas de agar con caldo Luria (LB) que contienen 50 µg/ml de kanamicina (Invitrogen). Se seleccionaron tres clones para la digestión por restricción y/o expresión.

3.3 Selección del clon para la expresión del producto

Los clones se cultivaron en cultivos en matraces de agitación de "caldo Terrific" de concentración media (6 g/L de peptona de fitona (Becton Dickinson), 12 g/L de extracto de levadura (Becton Dickinson), 2 g/L de glicerol (IT Baker), 1,16 g/L de fosfato de potasio monobásico (JT Baker), 6,25 g/L de fosfato de potasio dibásico (IT Baker), con cs a 1 litro de agua destilada) y se induce una fase exponencial a una DO_{600} entre 0,65 y 0,85 con 1 mM de beta-D-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG). Se tomaron las muestras pos-inducción 3 horas después de la adición de IPTG y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para la inducción y expresión del producto. Se corrieron alícuotas de muestra de los clones 1-4 pre/pos-inducción y estándares de peso molecular Mark 12 (Invitrogen- rango de peso molecular 2,5-200 kDa) en un gen NuPAGE® Novex 12% de Bis-Tis, 1,0 mm (Invitrogen) durante aproximadamente 40-50 minutos a 120 miliAmp y 200 voltios y luego se tiñeron con azul de Coomassie. Una proteína con un tamaño entre 6 y 14,4 kDa (es decir, monómero de TGF-β3) es claramente inducida en cada uno de

174

estos cultivos (ver Figura 9) con el Clon 2 que expresa la mayor cantidad de proteína de TGF- β 3.

3.4 Patrón de células congeladas

Los clones 1-4 se cultivaron en un matraces de agitación en caldo Terrific de concentración media a una DO_{600} de aproximadamente 1 y se conservaron como patrones de glicerol por la adición de glicerol a 20% (v/v). Se alicuotaron 1,2 ml de caldo en crioviales de 12 x 2 ml (que contenían 0,3 ml de glicerol) y luego se conservaron a -70°C .

3.5 Confirmación de secuencia del gen de TGF-Beta 3.

Se tomaron muestras de los cultivos usados para los patrones de células congeladas antes de la adición de glicerol y se usaron para el aislamiento del plásmido usando un kit Qiagen MiniPrep. El plásmido aislado se secuenció y verificó usando un cebador promotor T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y un cebador terminador T7 (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3').

3.6 Cultivo de semilla.

Debido a que el Clon 2 expresó la mayor cantidad de proteína de TGF-Beta 3, se recuperó una ampolla de patrón congelado (de la Sección 3.4) y se inoculó en un matraz erlenmeyer con tabique de 2 litros, que contiene 500 ml de medio HySoy (12 g/L de Hy-Soy (Quest Internacional), 24 g/L de extracto de levaduras (Becton Dickinson), 10 g/L de NaCl (Sigma) y 10 g/L de glicerol (Sigma) y 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. El matraz se incubó con agitación a 37°C y 200 rpm y se muestreó periódicamente para medir la DO_{550} . Cuando la DO del cultivo alcanzó 3,21 U/ml (después

125

de 7 horas) se usó el caldo de células para sembrar un fermentador de 150 L (volumen de trabajo de 100 L).

3.7 Fermentación

Se usaron novecientos mililitros de caldo celular (de la Sección 3.6) para inocular un fermentador de 150 L (WHE) que contiene 90 L de medio de cultivo en lote (0,6 g/L de K_2HPO_4 , 0,4 g/L de KH_2PO_4 , 1,25 g/L de NH_4SO_4 , 12 g/L de HY-Soy, 24 g/L de extracto de levaduras y 10 g/L de glicerol). Los parámetros operativos de la fermentación se controlaron de la siguiente manera: punto de ajuste de temperatura 37°C; punto de ajuste de pH, 7,0 (mantenido usando 4 N de hidróxido de amonio y 4 N de ácido fosfórico), y oxígeno disuelto (DO) calibrado inicialmente a 100%. La presión del cabezal del recipiente fue 7 psi, y la agitación y flujo de aire fueron de 200-400 rpm con un volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm o slpm), respectivamente. El DO se mantuvo por encima de 20% por el ajuste de los parámetros de ajuste con la siguiente prioridad: agitación (máx. 400 rpm), aeración (máx. 1,5 vvm), suplemento de oxígeno (máx. 33,3 lpm), y presión trasera (máx 12 psi). La formación de espuma se controló con Pluronic L-61 (25% v/v). Cuando la DO del cultivo alcanzó 10 U/ml se inició una alimentación de glicerol (50% v/v) con una velocidad de flujo de 45 ml/min. Cuando la DO alcanzó 40 U/ml, las células se indujeron con la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM.

3.8 Recolección

Después de 4 horas pos-inducción, el fermentador se refrigeró a 10°C y se redujeron el flujo de aire y la agitación a 0,3 vvm y 100 rpm respectivamente. Los

176

controles de espuma y pH terminaron y se ajustó la presión trasera a 3 psi. Se recolectó el cultivo por centrifugación continua con centrífuga continua Westfalia CSA8 a 10°C. La centrífuga operó a 15.000 rpm y una velocidad de flujo de 3 litros por minutos y se recolectaron las suspensiones celulares.

3.9 Lisis celular y recuperación de IB

La pasta de células de fermentación (de la Sección 3.8) se diluyó 1:5 con buffer de lisis (6,1 g/L de TrizmaBase (Tris), 3,7 g/L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 58,44 g/L de NaCl y 10 g/L de Triton X-100, pH 8,0) y se resuspendió usando un homogenizador manual. La pasta celular resuspendida se pasó dos veces a través de un homogenizador de alta presión (parámetros: presión, 10.000 psig; velocidad de flujo, 450 ml/min; y temperatura, 15°C). El lisado celular homogenizado luego se centrifugó (centrífuga de cabezal, rotor de ángulo fijo) a 5.000 xg durante 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante dejando el TGF-Beta 3 insoluble (cuerpos de inclusión). El pellet de cuerpos de inclusión (IB) se resuspendió en buffer de lavado (6,1 g/L de Tris y 3,72 g/L de EDTA, pH 8,0) usando un homogenizador manual y se centrifugó (5.000 xg durante 20 minutos a 4°).

3.10 Solubilización de cuerpos de inclusión

El sedimento de la Sección 3.9 se diluyó 1:10 con el buffer de solubilización (6,1 g/L de Tris, 15,4 g/L de DL-ditiotreitol (DTT) y 360,4 g/L de urea, pH 8,0) y resuspendió en un homogenizador manual. La suspensión se cubrió y dejó agitar durante 60-75 minutos, a temperatura ambiente para solubilizar los cuerpos de inclusión y

reducir el TGFBeta 3 a sus forma monomérica. El pH del pellet resuspendido se ajustó a pH 9,4-9,6 con NaOH/ácido acético antes de la incubación durante un segundo tiempo de 60-75 minutos.

3.11 Clarificación/ultrafiltración y diafiltración

El material solubilizado de la Sección 3.10 se clarificó, concentró y diafiltró en un sistema de flujo tangencial (TFF) (Millipore). La clarificación y concentración iniciales se obtuvo con una membrana de clarificación TFF preacondicionada (Millipore Pellicon 1000 kDa, celulosa regenerada, prueba V). El TGFBeta 3 clarificado se recolectó en el permeato. Luego se cambia a una membrana de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) (Millipore Pellicon 5kDa, celulosa regenerada, prueba C), el TGF-Beta 3 luego se lava en 6 volúmenes de diafiltración del buffer de solubilización (6,1 g/L de Tris, 15,4 g/L de DTT y 360,4 g/L de urea, pH 9,5).

3.12 Prueba de replegamiento en matriz 1

3.12.1 Metodología

El contenido de proteína de TGF-Beta 3 en el material clarificado de la Sección 1.12 se cuantificó usando el ensayo de proteína RC DCTM (BioRad) en conjunto con SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie y densitometría. El material de TGF-Beta3 se diluyó en una serie de bufferes de replegamiento (ver Tablas 1 y 2). Se tomaron diariamente muestras de 1 ml durante un cronograma de 6 días y se analizaron en condiciones no reductoras usando SDS-PAGE. Se corrieron las alícuotas de las muestras y los estándares de peso molecular Mark 12 (Invitrogen- rango de peso molecular 2,5-200 kDa) en gel NuPAGE® Novex 12% de Bis-Tris 1,0 mm (Invitrogen) durante

aproximadamente 40-50 minutos a 120 miliAmp y 200 voltios. Las muestras de proteína luego transfirieron por electroforesis a la membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) usando un aparato Novex Blotting (Invitrogen). La membrana se bloqueó con 5% (p/v) de leche en polvo descremada, 1% (v/v) de monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween 20;Sigma) en solución buffer salina (PBS). Se lavó la membrana (PBS, 0,1% (v/v) Tween 20) y se incubó durante 1 hora en anticuerpo primario (Anti-TGF-Beta 3, MAB643 (sistemas R&D) diluido 1:500 en PBS y 0,1 (v/v) de Tween 20). Después de la incubación con el anticuerpo primario, la nitrocelulosa se lavó con buffer de lavado (PBS, 1% (v/v) de Tween 20). Luego la nitrocelulosa se incubó durante 1 hora adicional en el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Abcam PO397) diluida 1:2000 con PBS, 0,1% (v/v) de Tween 20). La membrana se lavó nuevamente (PBS, 1% (v/v) de Tween 20 antes de desarrollar color con el substrato estabilizado Western Blue para fosfatasa alcalina (Promega).

El anticuerpo MAB 643 detecta especies de TGF-Beta 3 monoméricas y diméricas correctamente replegadas.

3.12.2 Resultados

Las tablas 1 y 2 sintetizan los resultados obtenidos por el análisis de replegamiento de TGF-Beta 3 en 50 condiciones experimentales diferentes.

Los inventores establecieron que las condiciones que se describen a continuación (es decir, las condiciones experimentales 12, 19, 36, 37, 42, 43 y 44) produjeron TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado:

1. 0,7 M de ácido 2-(ciclohexilamino)etansulfónico (CHES), 2 mM de glutatión reducido (GSH), 0,4 mM de

179

glutación oxidado (GSSG), 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C (Condición experimental 12).

2. 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C (Condición experimental 19).

3. 1M de NDSB-201, 2 mM glutación reducido (GSH), 2 mM de de glutación oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta3, pH 9,5 at 2-8°C (Condición experimental 36).

4. 0,7 M de CHES, 2 mM glutación reducido (GSH), 2 mM de de glutación oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta3, pH 9,5 at 2-8°C (Condición experimental 37).

5. 30 mM de taurodesoxicolato más 1 M de NDSB-221, 2 mM glutación reducido (GSH), 2 mM de de glutación oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta3, pH 9,5 at 2-8°C (Condición experimental 42).

6. 30 mM de taurodesoxicolato más 0.7 M de CHES, 2 mM glutación reducido (GSH), 2 mM de de glutación oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta3, pH 9,5 at 2-8°C (Condición experimental 43).

7. 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 2 mM de GSSG, 0,12 mg/mL de TGF-Beta3, pH 9,5 at 2-8°C (Condición experimental 44).

A modo de ejemplos la Figura 10 ilustra la efectividad de de la Condición experimental 12.

081

Condición experimental	Temp	Detergente	TGF-Beta 3 conc.	GSH conc.	GSSG Conc.	Presencia de TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado por análisis de transferencia Western (MAB643) analysis
1	2-8°C	100 mM de Zwittergent 3-08	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
2	2-8°C	40 mM de Taurocolato	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
3	2-8°C	40 mM de Big CHAP	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
4	2-8°C	60 mM de glucopiranoído de hexilo	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
5	2-8°C	0,5% (p/v) de ASB-14	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
6	2-8°C	0,5% (p/v) de DDMAB	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
7	2-8°C	0,5% (p/v) de CTAB	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
8	2-8°C	0,2% (p/v) de SDS	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
9	2-8°C	0,1% (p/v) de Dodecil-b-D-maltósido	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
10	2-8°C	0,1% (p/v) de Tween	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
11	2-8°C	1M de NDSB-201	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
12	2-8°C	0,7 M de CHES	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Presente
13	2-8°C	20% (v/v) sacarosa	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
14	2-8°C	20% (v/v) de glicerol	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
15	2-8°C	20 mM de Zwittergent e 3-12 + 0,5M	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado

181

16	2-8°C	20 mM de Zwittergent e	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
17	2-8°C	30 mM de taurodesoxico	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
18	2-8°C	30 mM de taurodesoxico	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
19	2-8°C	30 mM taurodesoxicolato	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Presente
20	2-8°C	0,5 M de arginina	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
21	2-8°C	40 mM de Octil-Tioglucopiranósido	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
22	2-8°C	60 mM de hexilglucopiranósido 0,1% (p/v) PEG-6000	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
23	2-8°C	30% (v/v) de etanol	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
24	2-8°C	20% (v/v) de alcohol isopropílico	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
25	2-8°C	30 mM de taurodesoxico	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado

Tabla 2. Matriz de prueba de replegamiento y resultados

Condición experimental	Temp	Detergente	Conc de TGF-Beta 3	Conc de GSH	Conc de GSSG	Presencia de TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado por análisis de transferencia
26	2-8°C	100 mM de Zwittergente 3-08	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
27	2-8°C	40 mM de Taurocolato	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
28	2-8°C	40 mM de Big CHAP	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado

29	2- 8°C	60 mM de Hexil glucopiranosido	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
30	2- 8°C	0,5% (p/v) de ASB-14	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
31	2- 8°C	0,5% (p/v) de DDMAB	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
32	2- 8°C	0,5% (p/v) de CTAB	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
33	2- 8°C	0,2% (p/v) de SDS	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
34	2- 8°C	0,1% (p/v) de Dodecil- b-D-maltósido	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
35	2- 8°C	0,1% (p/v) de Tween 20	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
36	2- 8°C	1M de NDSB-201	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Presente
37	2- 8°C	0,7 M de CHES	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Presente
38	2- 8°C	20% (v/v) de sacarosa	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
39	2- 8°C	20% (v/v) de glicerol	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
40	2- 8°C	20 mM de Zwittergente 3-12 + 0,5M Arginine	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
41	2- 8°C	20 mM de Zwittergente 3-08 + 1M NDSB-221	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
42	2- 8°C	30 mM de taurodesoxicolato + 0,5M Arginina	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Presente
43	2- 8°C	30mM taurodesoxicola-to + 1M NDSB-221	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Presente
44	2- 8°C	30 mM de taurodesoxicolato + 0,7 M de CHES	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Presente
45	2- 8°C	0,5 M de arginina	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado

183

46	2- 8°C	40 mM de Octil- Tioglucopiranosido	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
47	2- 8°C	60 mM de Hexilglucopiranosido 0,1 % (p/v) PEG-6000	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
48	2- 8°C	30% (v/v) de Etanol	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
49	2- 8°C	20% (v/v) de alcohol isopropílico	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
50	2- 8°C	30 mM de taurodesoxicola-to	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado

3.13 Ultrafiltración/Cromatografía de interacción hidrofóbica.

La solución replegada seleccionada se concentró 5 veces por ultrafiltración (la membrana fue una lámina plana Millipore Pellicon 5 kDa, 0,1 m², prueba de celulosa regenerada). El pH del material replegado concentrado luego se ajustó a un pH de 2,5-2,8 usando ácido acético glacial antes de diluir 1:1 en buffer de dilución (2,72 g/L de acetato de sodio, 264,28 g/L de sulfato de amonio, 100 g/L de ácido acético, y 210,7 g/L de clorhidrato de arginina de pH 3,3). Se equilibró una columna de flujo rápido de Butilsefarosa 4 (Amersham, 16 cm de altura de lecho) con cuatro volúmenes de columna de Buffer A (2,72 g/L de acetato de sodio, 132,14 g/L de sulfato de amonio y 100 g/L de ácido acético a pH 3,3). El material replegado se filtró a través de una membrana de 0,22 µm (filtro Millipore Millipak) antes de cargarse en una columna de butilsefarosa a una velocidad de flujo de 100 cm/hora (esta velocidad de flujo se usó en todo el procedimiento). La columna luego se lavó en Buffer A para cuatro volúmenes de columna. Las proteínas de TGF-Beta 3

184

se eluyeron de la columna usando Buffer B (2,72 g/L de acetato de sodio, 100 g/L de ácido acético y 300 g/L de etanol, pH 3,3). Se mezcló el primer pico, que contiene proteínas TGF- β 3 en formas monoméricas y diméricas (ver, Figura 11), antes de la separación de las proteínas monoméricas.

Información de secuencia

TGF- β 1 (Secuencia ID No. 1)

ALDTNYCFSSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT
QYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

TGF- β 2 (Secuencia ID No. 2)

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANECAGACPYLWSSDT
QHSRVLSLYNTINPEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS

TGF- β 3 (Secuencia ID No. 3)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSKCS

187

El ADN que codifica el TGF-Betal de longitud completa (Secuencia ID No. 4), que muestra péptidos señal (mostrado en *itálica*), pro-péptido (mostrado en **negrita**) así como el fragmento activo (mostrado en texto normal)

```

atgccgccct cccggctgcg gctgctgctg ctgctgctac cgtgctgtg gctactggtg
ctgacgcctg gccggccggc cgcgggacta tccacctgca agactatcga catggagctg
gtgaagcggg agcgcacgga ggccatccgc ggccagatcc tgtccaagct gcggctcgcc
agccccccga gccaggggga ggtgcgcgcc ggcccgctgc ccgaggccgt gctcgccctg
tacaacagca cccgcgaccg ggtggccggg gagagtgcag aaccggagcc cgagcctgag
gccgactact acgccaagga ggtcaccgcc gtgctaattg tggaaaccca caacgaatc
tatgacaagt tcaagcagag tacacacagc atatatatgt tcttcaacac atcagagctc
cgagaagcgg tacctgaacc cgtgttgctc tcccgggcag agctgcgtct gctgaggctc
aagttaaaag tggagcagca cgtggagctg taccagaaat acagcaaca ttcctggcga
tacctcagca accggctgct ggcacccagc gactcgccag agtgggtatc ttttgyatgc
accggagttg tgccgcagtg gttgagccgt ggaggggaaa ttgagggctt tcgccttagc
gcccactgct cctgtgacag cagggataac acactgcaag tggacatcaa cgggttcact
accggccgcc gaggtgacct ggccaccatt catggcatga accggccttt cctgcttctc
atggccaccc cgtgggagag ggcccagcat ctgcaaagct cccggcaccg ccgagccctg
gacaccaact attgcttcag ctccacggag aagaactgct gcgtgcggca gctgtacatt
gacttcgcga aggacctcgg ctggaagtgg atccacgagc ccaagggcta ccatgccaac
ttctgcctcg ggcctgccc ctacatttgg agcctggaca cgcagtacag caaggtcctg
gcctgtaca accagcataa cccgggcgcc tcggcggcgc cgtgctgcgt gccgcaggcg
ctggagccgc tgccathgt gtactacgtg ggccgcaagc ccaagggtga gcagctgtcc
aacatgatcg tgcgctcctg caagtgcagc tga

```

186

El ADN que codifica el TGF-Beta 2 de longitud completa (Secuencia ID No. 5), que muestra péptidos señal (mostrado en *itálica*), pro-péptido (mostrado en **negrita**) así como el fragmento activo (mostrado en texto normal)

```

ctgtctacct gcagcacact cgatatggac cagttcatgc gcaagaggat cgaggcgatc
cgcgggcaga tcoctgagaa gotgaagctc accagtcgcc cagaagacta tcoctgagccc
gagggaagtcc ocoogggaggt gatttccatc tacaacagca ccagggactt gctccaggag
aaggcgagoc ggagggcggc cgactgcgag cgcgagagga gcgacgaaga gtactacgcc
aaggagggttt acaaaataga catgocgcco ttottocccct ccgaagccat cccgcccact
ttctacagac octacttcag aattgttcga tttgaogtct cagcaatgga gaagaatgct
tccaattttgg tgaaagcaga gttcagagtc tttcgtttgc agaaccocaaa agccagagtg
cctgaacaac ggattgagct atatcagatt ctcaagtcca aagatttaac atotocaaac
cagcgctaca tcgacagcaa agttgtgaaa acaagagcag aaggcgaatg gotctcotte
gatgtaactg atgctgttca tgaatggctt caccataaag acaggaacct gggattttaa
ataagcttaa actgtccctg ctgcactttt gtaccatcta ataattacat catcccaaat
aaaagtgaag aactagaagc aagatttgca ggtattgatg gcacctccac atataccagt
ggtgatcaga aaactataaa gtccactagg aaaaaaaaca gtgggaagac cccacatoto
ctgctaattgt tattgcccto ctacagactt gagtcacaac agaccaaccg gcggaagaag
cgtgcttttg atgcggccta ttgctthaga aatgtgcagg ataattgctg cctacgtcca
ctttacattg atttcaagag ggatctaggg tggaaatgga tacacgaacc caaagggtag
aatgccaact tctgtgctgg agcatgccg tatttatgga gttcagacac tcagcacagc
agggctctga gcttatataa taccataaat ccagaagcat ctgcttctcc ttgctgctg
tcccaagatt tagaacctct aaccattctc tactacattg gcaaaacacc caagattgaa
cagctttcta atatgattgt aaagtcttgc aaatgcagct aa

```

187

El ADN que codifica el TGF-Beta 3 de longitud completa (Secuencia ID No. 6), que muestra péptidos señal (mostrado en *itálica*), pro-péptido (mostrado en **negrita**) así como el fragmento activo (mostrado en texto normal)

<i>atgaagatgc</i>	<i>aactgc</i>	<i>aaag</i>	<i>ggctctggtg</i>	<i>gtcttgccc</i>	<i>tgtgaactt</i>	<i>tgccacggtc</i>	60
<i>agcctctctc</i>	<i>tgccacttg</i>	<i>caccaccttg</i>	<i>gaattcggcc</i>	<i>acatcaagaa</i>	<i>gaagagggtg</i>		120
<i>gaagccatta</i>	<i>ggggacagat</i>	<i>cttgagcaag</i>	<i>ctcaggctca</i>	<i>ccagccccc</i>	<i>tgagccaacg</i>		180
<i>gtgatgaccc</i>	<i>acgtccocota</i>	<i>tcaggctctg</i>	<i>gccctttaca</i>	<i>acagcaccog</i>	<i>ggagctgctg</i>		240
<i>gaggagatgc</i>	<i>atggggagag</i>	<i>ggaggaaggc</i>	<i>tgccaccagg</i>	<i>aaaacaccga</i>	<i>gtcggaatac</i>		300
<i>tatgcaaaag</i>	<i>aaatccataa</i>	<i>attcgacatg</i>	<i>atccaggggc</i>	<i>tgccggagca</i>	<i>caacgaactg</i>		360
<i>gctgtctgco</i>	<i>ctaaaggaat</i>	<i>tacctccaag</i>	<i>gttttcogct</i>	<i>tcaatgtgtc</i>	<i>ctcagtgag</i>		420
<i>aaaaatagaa</i>	<i>ccaaactatt</i>	<i>ccagacagaa</i>	<i>ttoogggtot</i>	<i>tgccgggtgc</i>	<i>caaccccgagc</i>		480
<i>tctaaagcga</i>	<i>atgagcagag</i>	<i>gatcgagcto</i>	<i>ttccagatcc</i>	<i>ttccggccga</i>	<i>tgagccacatt</i>		540
<i>gccaaacagc</i>	<i>gctatatcgg</i>	<i>tgccaagaat</i>	<i>ctgccacac</i>	<i>ggggcactgc</i>	<i>cgagtggctg</i>		600
<i>tcctttgatg</i>	<i>tcactgacac</i>	<i>tgtgcgtgag</i>	<i>tggtgtttga</i>	<i>gaagagagtc</i>	<i>caacttaggt</i>		660
<i>ctagaatca</i>	<i>gcattcactg</i>	<i>tccatgtcac</i>	<i>acctttcagc</i>	<i>ccaatggaga</i>	<i>tatcctggaa</i>		720
<i>aacattcacg</i>	<i>aggtgatgga</i>	<i>aatcaaatto</i>	<i>aaaggcgtgg</i>	<i>acuatgagga</i>	<i>tgacctggc</i>		780
<i>cgtagagato</i>	<i>tggtggcgtc</i>	<i>caagaagcag</i>	<i>aaggatoccc</i>	<i>acaaacctca</i>	<i>tctaactctc</i>		840
<i>atgatgatcc</i>	<i>ccccaccccg</i>	<i>gctcgacac</i>	<i>ccgggcccag</i>	<i>gggtctcagag</i>	<i>gaagaagcgg</i>		900
<i>gcttttgaca</i>	<i>cccaattactg</i>	<i>cttcggcaac</i>	<i>ttggaggaga</i>	<i>actgctgtgt</i>	<i>gcgccccctc</i>		960
<i>tacattgact</i>	<i>tcagacagga</i>	<i>tctgggctgg</i>	<i>agtgggctcc</i>	<i>atgaacctaa</i>	<i>gggtactat</i>		1020
<i>gccaaactct</i>	<i>gctcaggccc</i>	<i>ttgccatac</i>	<i>ctccgcagtg</i>	<i>cagacacaa</i>	<i>ccacagcag</i>		1080
<i>gtgctgggac</i>	<i>tgtacaacac</i>	<i>tctgaacct</i>	<i>gaagcatctg</i>	<i>cctcgccctg</i>	<i>ctgcgtgccc</i>		1140
<i>caggacctgg</i>	<i>agccctgac</i>	<i>catcctgtac</i>	<i>tatgttgga</i>	<i>ggcccccaa</i>	<i>agtggagcag</i>		1200
<i>ctctccaaca</i>	<i>tggtggtgaa</i>	<i>gtcttgtaaa</i>	<i>tgtagctga</i>				

Secuencia ID No. 7 ADN que codifica fragmento activo de TGF- β 3 humano tipo salvaje

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG GAG GAG AAC TGC
TGT GTG CGC CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG GGC TGG
AAG TGG GTC CAT GAA CCT AAG GGC TAC TAT GCC AAC TTC TGC TCA
GGC CCT TGC CCA TAC CTC CGC AGT GCA GAC ACA ACC CAC AGC ACG
GTG CTG GGA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT GAA GCA TCT GCC TCG
CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG CCC CTG ACC ATC CTG TAC TAT
GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG CTG
AAG TCT TGT AAA TGT AGC

Cebadores de sentido y antisentido para la generacion de ADNc de TGF-Beta 1, TGF-Beta 2 y TGF-Beta 3:

TGF-Beta 1

Cebador sentido -5' GTT ACA CCA TGG CCC TGG ACA CCA ACT ATT 3'
Cebador antisentido-3' CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT GCA CTT 5'

TGF-Beta 2

Cebador sentido -5' GTT ACA CCA TGG CTT TGG ATG CGG CCT ATT
Cebador antisentido-3' CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT GCA TTT G 5'

TGF-Beta 3

Cebador sentido -5' GAT ATA CCA TGG CTT TGG ACA CCA ATT ACT ACT GC 3'
Cebador antisentido-5' CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT ACA TTT ACA AGA
C 3'

189

REIVINDICACIONES

1. Un monómero TGF- β o un fragmento biológicamente activo o derivado de este para uso como medicamento.
2. Un monómero TGF- β 3, o un fragmento biológicamente activo o derivado de este para uso como medicamento.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el monómero TGF- β tiene un peso molecular de aproximadamente 12 kDa.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en la preparación de un medicamento para usar en la aceleración de la cura de heridas y/o la inhibición de la formación de cicatrices.
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el monómero TGF- β 3, o fragmento o derivado es monómero TGF- β 3 que comprende la Secuencia ID No. 3, o un fragmento biológicamente activo o derivado de este.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 o reivindicación 5, en donde la herida es una herida dérmica.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 4 o reivindicación 5, en donde la herida es una herida ocular.
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la herida es una herida aguda.

1990

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la herida es una quemadura.

10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la herida es una herida crónica.

11. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en la preparación de un medicamento para usar en la promoción de la regeneración epitelial.

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el epitelio comprende la epidermis.

β. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el epitelio comprende el epitelio ocular.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en la preparación de un medicamento para usar en la prevención y/o tratamiento de un trastorno fibrótico.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, escleroderma, fibrosis cutánea, fibrosis muscular, fibrosis por radiación, fibrosis renal, fibrosis ocular y fibrosis uterina.

16. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el monómero, o fragmento

1991

biológicamente activo o derivado de este se proporciona en una concentración de entre 0,78 pM y 0,78 mM.

17. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el medicamento tiene un pH de aproximadamente 5 a 7.

18. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el medicamento es sustancialmente libre de alcohol.

19. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el monómero TGF- β , o fragmento biológicamente activo o derivado de este, se pliega en su forma biológicamente activa por un método que comprende agregar TGF- β monomérico no plegado, solubilizado (o fragmento o derivado de este) a una solución que contiene:

(i) ácido 2-(ciclohexilamino)-etansulfónico (CHES) o un βanálogo funcional de este; y

(ii) un sistema redox de sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular; e
incubar el TGF- β en la solución hasta que se forma TGF- β monomérico biológicamente activo.

20. Un método de acelerar la curación de heridas y/o inhibir la formación de cicatrices, el método que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β monomérico o un fragmento biológicamente activo o derivado de este.

192

21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el monómero de TGF- β 3, o fragmento, es un TGF- β 3 monomérico de tipo salvaje que comprende la Secuencia ID No. 3, o un fragmento biológicamente activo o derivado de este.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 o reivindicación 21 en donde la herida es un herida dérmica.

23. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 o reivindicación 21 en donde la herida es un herida ocular.

194

Figura 1. Comparación de TGF-Beta 3 monomérico con TGF-Beta 3 dimérico por SDS-PAGE (teñido con azul Coomassie)

Vía	Muestra	Concentración cargada por vía
1	TGF-Beta 3 monomérico	3 µg
2	TGF-Beta 3 dimérico	3 µg
2	Estándares de peso molecular Invitrogen Mark 12	10 µg

Condiciones no reducidas

Condiciones reducidas

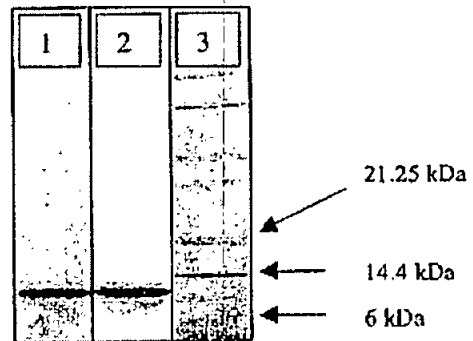
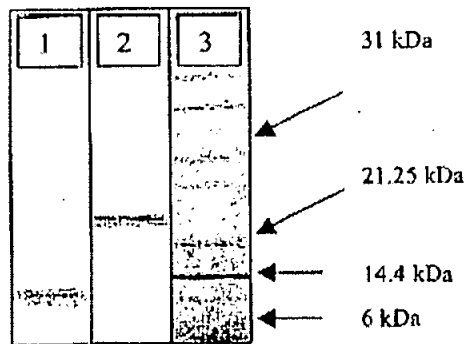
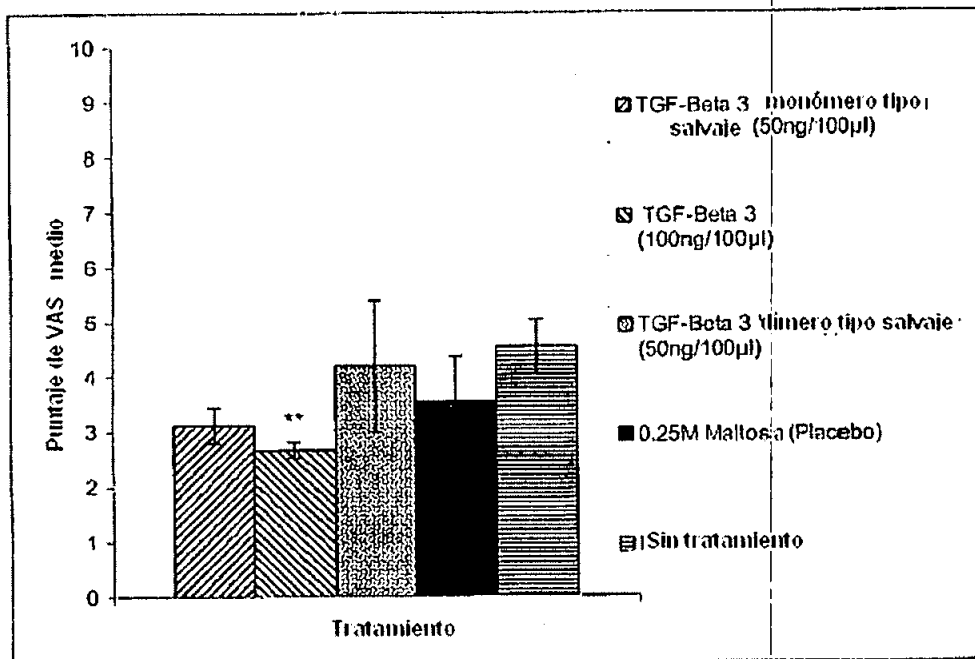


Figura 3 Tratamiento del sitio de la herida

Grupo	Tratamiento/ muestra	Concentración (ng/100 μ L)
A	TGF-Beta3 monomérico tipo salvaje	50
B	TGF-Beta3 monomérico tipo salvaje	100
G	TGF-Beta3 dimérico tipo salvaje	50
H	0.25 M de maltosa (control con placebo)	N/A
I	Naive (sin tratamiento) control)	N/A

Figura 4. Media de puntaje macroscópico del Día 3 ($\pm$ SD) para heridas incisionales (A y B) tratadas con TGF-Beta 3 monomérico y dimérico tipo salvaje



** Curación significativamente aumentada en comparación con heridas sin tratamiento ($p < 0.01$)

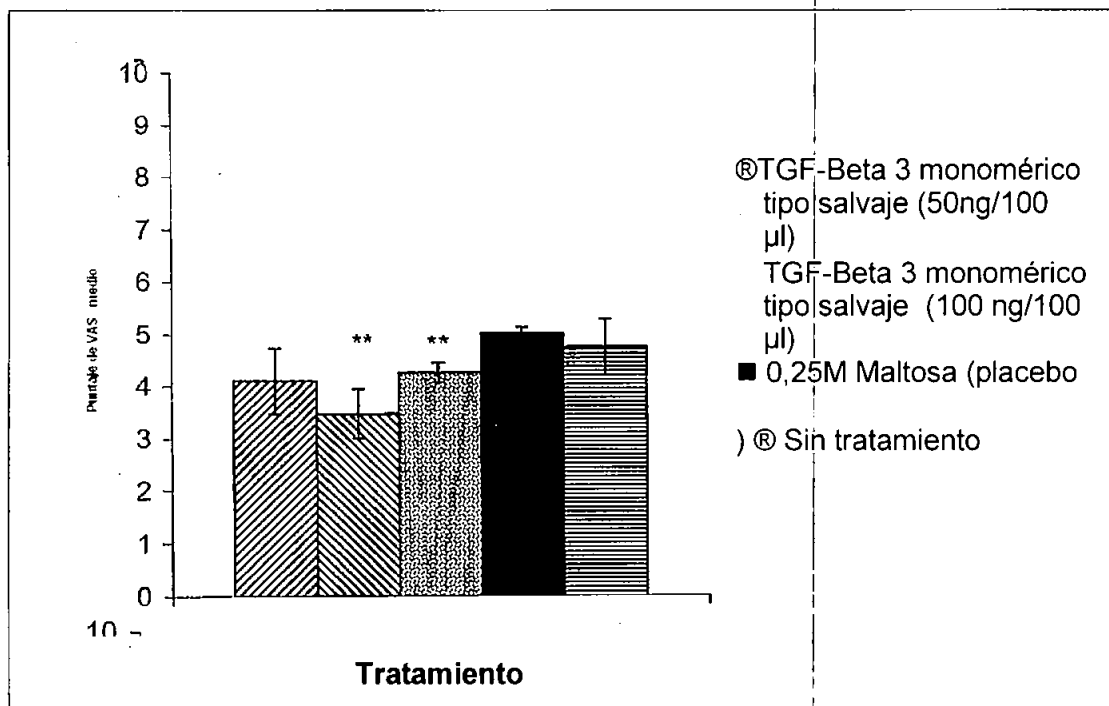
198

Figura 5. Tratamiento del sitio de la herida

Grupo	Tratamiento/ muestra	Concentración (ng/100 μ L)	
A	TGF-Beta3 monomérico tipo salvaje	50	
B	TGF-Beta3 monomérico tipo salvaje	100	
K	TGF-Beta3 dimérico tipo salvaje	50	
L	0.25 M de maltosa (control con placebo)	N/A	
M	Naive (sin tratamiento) control)	N/A	

199

Figura 6. Media de puntaje macroscópico del Día 70 ($\pm$ SD) para heridas incisionales (A y B) tratadas con TGF-Beta 3 monomérico y dimérico tipo salvaje

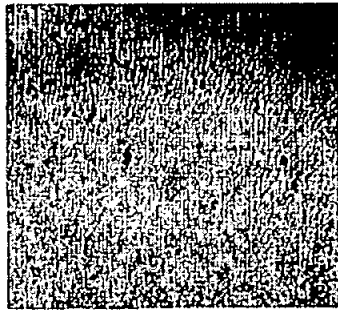


** Formación de cicatrices significativamente disminuida en comparación con las heridas tratadas con placebo ($p < 0,01$)

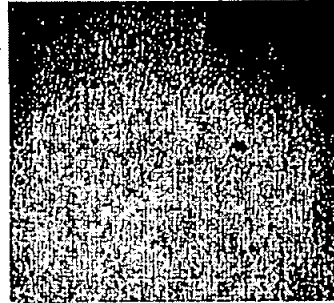
200

Figura 7. Imágenes de cicatriz macroscópicas representativas (70 días después de la herida)

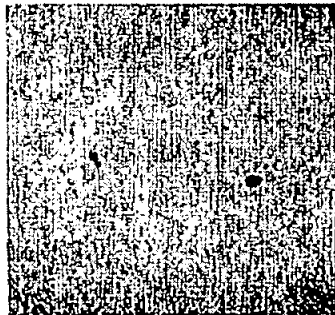
**TGF-Beta 3 monomérico
tipo salvaje (50ng/100 μ L)**



**TGF-Beta 3 monomérico
tipo salvaje (100ng/100 μ L)**



**TGF-Beta 3 dimerico tipo salvaje
(50ng/100 μ L)**



Placebo (0.25 M de maltosa)

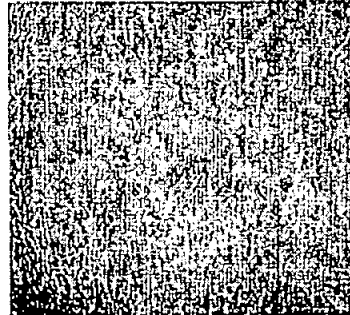
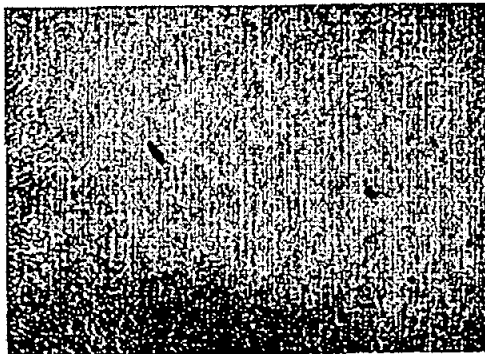


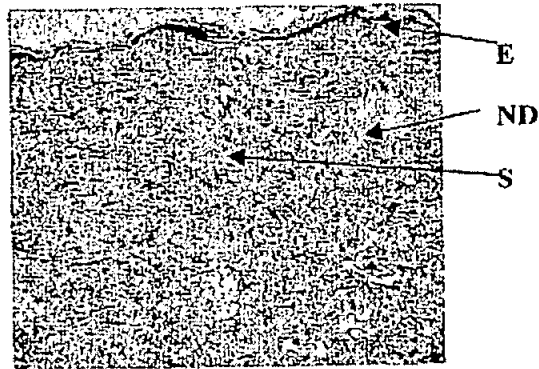
Figura 7 Continuación. Imágenes de cicatriz macroscópicas representativas (70 días después de la herida)

Sin tratamiento



202

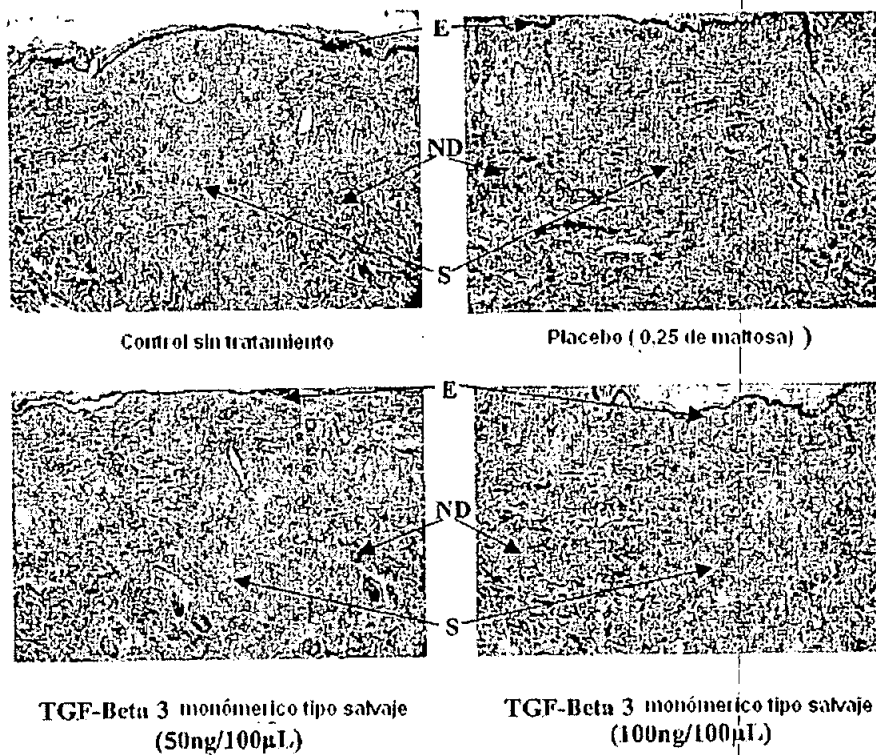
Figura 8. Imágenes de cicatriz microscópicas representativas de heridas tratadas con TGF β 3 monomérico y dimérico tipo salvaje (70 días después de la herida)



Clave
E = Epidermis
ND = Dermis
normal
S=Cicatriz

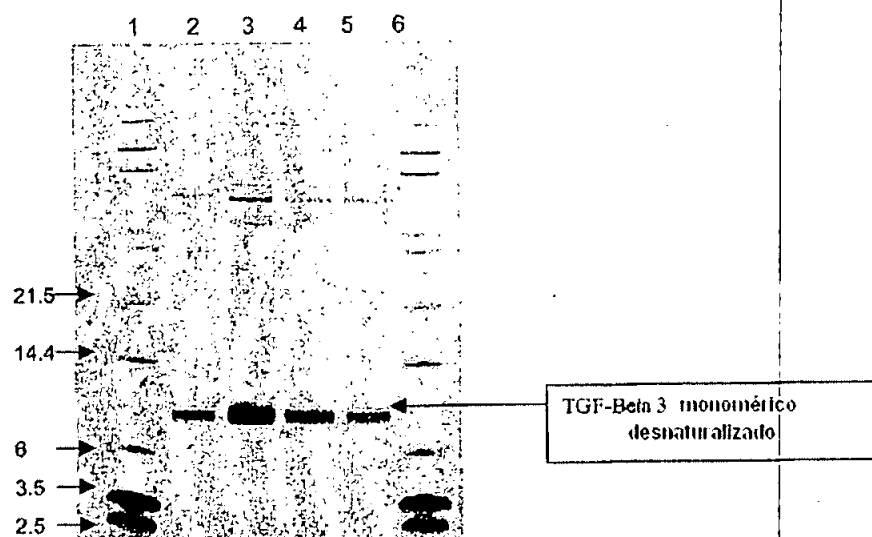
TGF-Beta3 dimérico tipo salvaje
(50 ng/100 μ l)

Figura 8 Continuación. Imágenes de cicatriz microscópicas representativas de heridas tratadas con TGFBeta 3 monomérico y dimérico tipo salvaje (70 días después de la herida)



204

Figura 9



Calle	Muestra
1	Estándar Mark 12 Standard
2	Clon 1 3hr Pos-inducción (3 μ L)
3	Clon 2 3hr Pos-inducción (3 μ L)
4	Clon 3 3hr Pos-inducción (3 μ L)
5	Clon 4 3hr Pos-inducción (3 μ L)
6	Estándar Mark 12

205

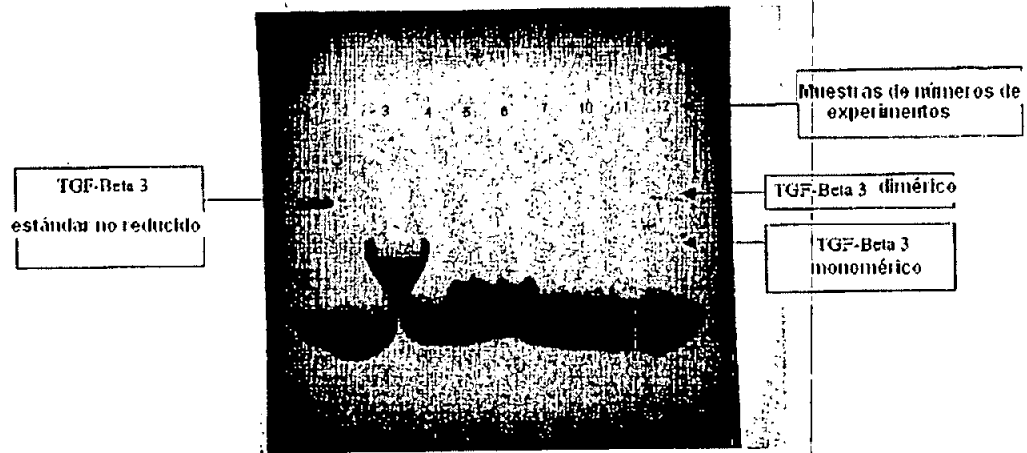
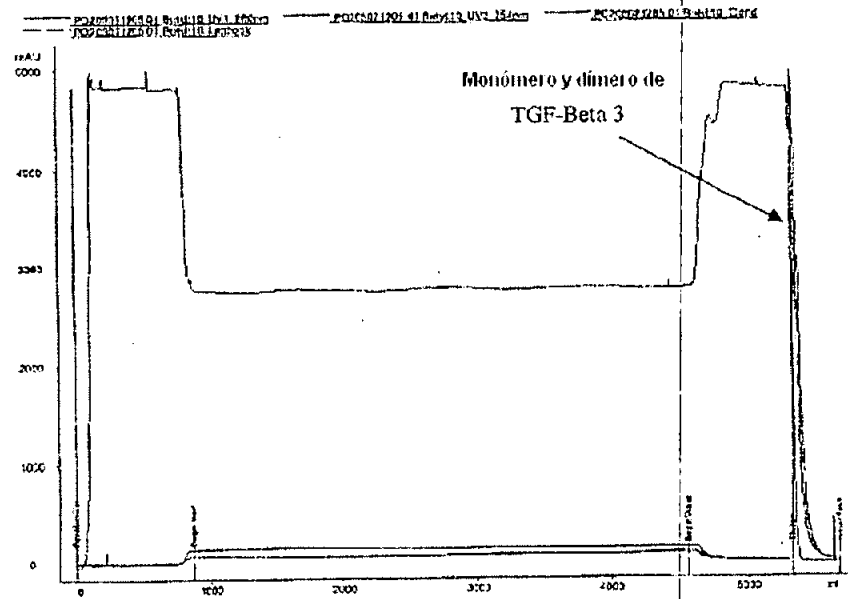
FIG. 10

FIG. 11

207

P122997 WO ST25 sequence listing
SEQUENCE LISTING

<110> Renovo Limited
Ferguson, Mark
Mellors, Phil
Lavery, Hugh
Occleston, Nick
O'Kane, Sharon
Atkinson, Emma

<120> MEDICAMENTS AND PROTEINS

<130> P90083PWO

<150> GB0604966.2

<151> 2006-03-11

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp
Página 1

208

P122997 WO ST25 sequence listing

20

25

30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 4
<211> 1173
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4

atgccgccct ccgggctgctg gctgctgctg ctgctgctac cgctgctgtg gctactgggtg 60

ctgacgcctg gccggccggc cgcgggacta tccacctgca agactatcga catggagctg 120

209

P122997 wo ST25 sequence listing

gtgaagcgga agcgcatcga ggccatccgc ggccagatcc tgtccaagct gcggctcgcc	180
agccccccga gccaggggga ggtgccgccc ggcccgtgc ccgaggccgt gctcgccctg	240
tacaacagca cccgcgaccg ggtggccggg gagagtgcag aaccggagcc cgagcctgag	300
gccgactact acgccaagga ggtcaccgc gtgctaattg tggaaacca caacgaaatc	360
tatgacaagt tcaagcagag tacacacagc atatatatgt tcttcaacac atcagagctc	420
cgagaagcgg tacctgaacc cgtgttgctc tcccgggcag agctgcgtct gctgaggctc	480
aagttaaaag tggagcagca cgtggagctg taccagaaat acagcaaca ttcctggcga	540
tacctcagca accggctgct ggcaccagc gactcgccag agtggttatc ttttgatgtc	600
accggagttg tgcggcagtg gttgagccgt ggaggggaaa ttgagggtt tcgccttagc	660
gcccactgct cctgtgacag cagggataac aactgcaag tggacatcaa cgggttact	720
accggccgcc gaggtgacct ggccaccatt catggcatga accggccttt cctgcttctc	780
atggccaccc cgctggagag ggcccagcat ctgcaaagct cccggcaccg ccgagccctg	840
gacaccaact attgcttcag ctccacggag aagaactgct gcgtgcggca gctgtacatt	900
gacttccgca aggacctcgg ctggaagtgg atccacgagc ccaagggcta ccatgccaac	960
ttctgcctcg ggccctgccc ctacatttgg agcctggaca cgcagtacag caaggctcctg	1020
gccctgtaca accagcataa cccgggcgcc tcggcggcgc cgtgctgcgt gccgcaggcg	1080
ctggagccgc tgcccathgt gtactacgtg ggccgcaagc ccaaggtgga gcagctgtcc	1140
aacatgatcg tgcgctcctg caagtgcagc tga	1173

<210> 5
 <211> 1182
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5	
ctgtctacct gcagcacact cgatatggac cagttcatgc gcaagaggat cgaggcgatc	60
cgcgggcaga tcctgagcaa gctgaagctc accagtcccc cagaagacta tcctgagccc	120
gaggaagtcc ccccgagggt gatttccatc tacaacagca ccagggactt gctccaggag	180
aaggcgagcc ggagggcggc cgcctgcgag cgcgagagga gcgacgaaga gtactacgcc	240
aaggaggttt acaaaataga catgccgccc ttcttcccct ccgaagccat cccgcccact	300
ttctacagac cctacttcag aattgttcga tttgacgtct cagcaatgga gaagaatgct	360
tccaatttgg tgaaagcaga gttcagagtc tttcgtttgc agaaccctaa agccagagtg	420
cctgaacaac ggattgagct atatcagatt ctcaagtcca aagatttaac atctccaacc	480
cagcgctaca tcgacagcaa agttgtgaaa acaagagcag aaggcgaatg gctctccttc	540
gatgtaactg atgctgttca tgaatggctt caccataaag acaggaacct gggatttaaa	600
ataagcttac actgtccctg ctgcactttt gtaccatcta ataattacat catcccaa	660
aaaagtgaag aactagaagc aagatttgca ggtattgatg gcacctccac atataccagt	720
ggtgatcaga aaactataaa gtccactagg aaaaaaaca gtgggaagac cccacatctc	780

210

P122997 WO ST25 sequence listing

ctgctaattgt tattgccctc ctacagactt gagtcacaac agaccaaccg gcggaagaag	840
cgtgcttttg atgcggccta ttgctttaga aatgtgcagg ataattgctg cctacgtcca	900
ctttacattg atttcaagag ggatctaggg tggaaatgga tacacgaacc caaagggtag	960
aatgccaaact tctgtgctgg agcatgcccg tatttatgga gttcagacac tcagcacagc	1020
agggtcctga gcttatataa taccataaat ccagaagcat ctgcttctcc ttgctgcgtg	1080
tcccaagatt tagaacctct aaccattctc tactacattg gcaaaacacc caagattgaa	1140
cagctttcta atatgattgt aaagtcttgc aaatgcagct aa	1182

<210> 6
 <211> 1239
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6	
atgaagatgc acttgcaaag ggctctgggtg gtcctggccc tgctgaactt tgccacgggtc	60
agcctctctc tgtccacttg caccaccttg gacttcggcc acatcaagaa gaagaggggtg	120
gaagccatta ggggacagat cttgagcaag ctcaggctca ccagcccccc tgagccaacg	180
gtgatgaccc acgtccccta tcaggctctg gccctttaca acagcacccg ggagctgctg	240
gaggagatgc atggggagag ggaggaaggc tgcacccagg aaaacaccga gtcggaatac	300
tatgccaaag aaatccataa attcgacatg atccagggggc tggcggagca caacgaactg	360
gctgtctgcc ctaaaggaat tacctccaag gttttccgct tcaatgtgtc ctcagtggag	420
aaaaatagaa ccaacctatt ccgagcagaa ttccgggtct tgcgggtgcc caaccccagc	480
tctaagcggg atgagcagag gatcgagctc ttccagatcc ttcggccaga tgagcacatt	540
gccaacacgc gctatatcgg tggcaagaat ctgcccacac ggggcactgc cgagtggctg	600
tcctttgatg tcaactgacac tgtgcgtgag tggctgttga gaagagagtc caacttaggt	660
ctagaaatca gcattcactg tccatgtcac acctttcagc ccaatggaga tatcctggaa	720
aacattcacg aggtgatgga aatcaaattc aaaggcgtgg acaatgagga tgaccatggc	780
cgtggagatc tggggcgcct caagaagcag aaggatcacc acaaccctca tctaactctc	840
atgatgattc cccacacccg gctcgacaac ccggggccagg ggggtcagag gaagaagcgg	900
gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttggaggaga actgctgtgt gcgccccctc	960
tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat	1020
gccaacttct gctcaggccc ttgcccatat ctccgcagtg cagacacaac ccacagcacg	1080
gtgctgggac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgctgcccc	1140
caggacctgg agccccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag	1200
ctctccaaca tggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagctga	1239

<210> 7
 <211> 336
 <212> DNA

24

P122997 WO ST25 sequence listing

<213> Homo sapiens

<400> 7
gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttggaggaga actgctgtgt gcgcccctc 60
tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat 120
gccaacttct gctcaggccc ttgcccatat ctccgcagtg cagacacaac ccacagcacg 180
gtgctgggac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgcgtgccc 240
caggacctgg agccccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag 300
ctctccaaca tggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagc 336

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sense primer for TGF-beta 1

<400> 8
gttacaccat ggccctggac accaactatt 30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Antisense primer for TGF-beta 1

<400> 9
cagccggatc cggtcgactc agctgcactt 30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sense primer for TGF-beta 2

<400> 10
gttacaccat ggctttggat gcggcctatt 30

<210> 11
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Antisense primer for TGF-beta 2

<400> 11
cagccggatc cggtcgactc agctgcattt g 31

<210> 12
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

2/2

P122997 WO ST25 sequence listing

<220>
<223> Sense primer for TGF-beta 3

<400> 12
gatataccat ggcttttgac accaattact actgc 35

<210> 13
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Antisense primer for TGF-beta 3

<400> 13
cagccggatc cggtcgactc agctacattt acaagac 37

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> T7 promoter primer

<400> 14
taatacgact cactataggg 20

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> T7 terminator primer

<400> 15
gctagttatt gctcagcgg 19

212

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-099912- -00000-0000

Fecha: 2008-09-22 12:45:34 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 212



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD []

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

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 []

Sandra Rodríguez
Firma Responsable

Fecha Sept 22 08

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

214

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN
Apoderado(a) y/o Representante de
RENOVO LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	8 99912
	Solicitud internacional	PCT/GB2007/000834
	Fecha inicio fase nacional	11/10/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 1 3 7 4 0

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. El solicitante debe aclarar la numeración de las reivindicaciones.
2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5.2.9)
3. 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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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

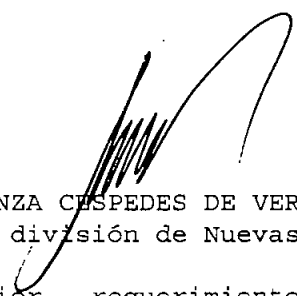
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

215

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 99912



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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 31 OCT. 2008
jfernand