

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

Organización y
Digitalización CSA Ltda

BT



PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

08-99910

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO PROTEINAS, ACIDOS NUCLEICOS Y MEDICAMENTOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/495

71. SOLICITANTE RENDVO LIMITED

DOMICILIO MANCHESTER, INGLATERRA, REINO UNIDO

74. APODERADO GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D. C.,

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-099910- -00000-0000

Fecha: 2008-09-22 12:43:03
Tra. 11 PATENTEYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 NUECREACION
Eve. 378 FASENACIONALI
Folios: 249FORMULARIO 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 APODERADONombre: **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/GB2007/000833Fecha: Marzo 12, 2007Publicación Internacional No. WO 2007/104945 A3Fecha: Septiembre 20, 2007

6

Título (54) **PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLEICOS Y MEDICAMENTOS**

7

Clasificación Internacional (51) **C07K 14/495**

8

Prioridad

Si



No

(33) País de origen
GRAN BRETANA(32) Fecha
Marzo 11, 2006(31) Número de Solicitud
0604938.1

9

Comprobante de pago N°:

75049

Fecha:

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

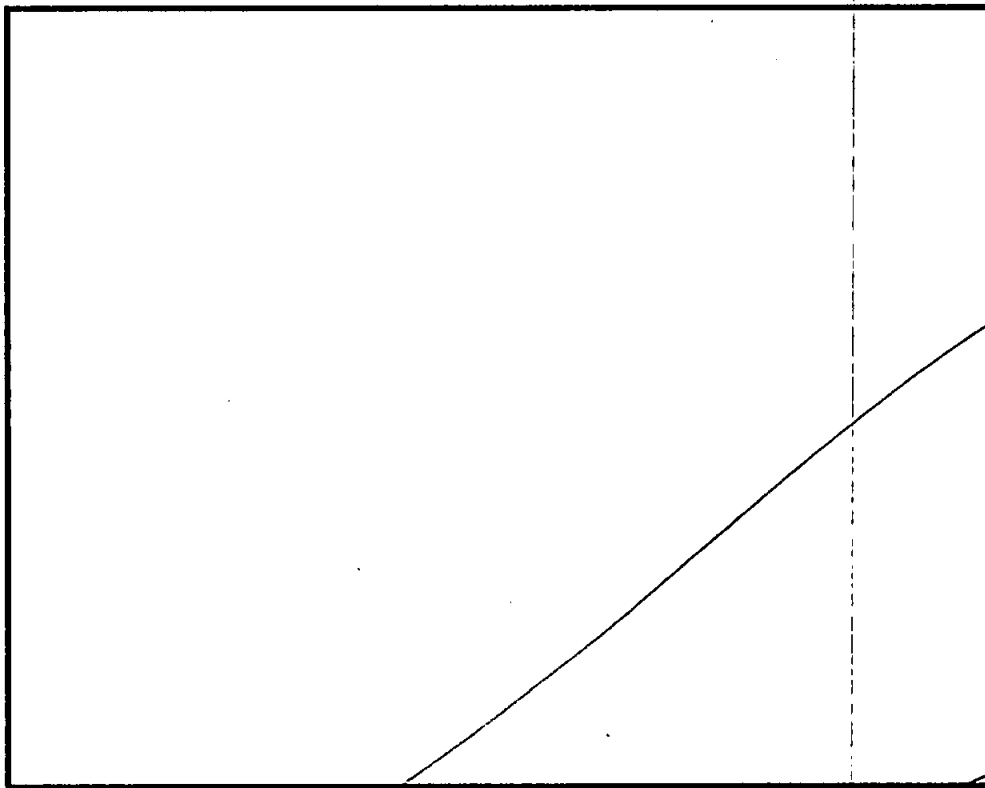
10

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

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 75,049
FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-099910- -00000-0000
Fecha: 2008-09-22 12:43:03 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249

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

***** C O N C E P T O *****

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. _____

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.

Director

DIRECTOR

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
todo ello da fe.

.....
do y firmado en

El Notario Público

(Con Apostilla)

Como Notario Veintiséis 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 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 preceding 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)

Michael John 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

5. at London/à Londres

Certified/Attesté
6. the/le 22 February 2008

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.

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

[Handwritten signature]

[Handwritten mark]

PROTEINS, NUCLEIC ACIDS AND MEDICAMENTS.

The present invention relates to proteins derived from TGF- β 3, to biologically active fragments of such proteins, and also to nucleic acids encoding said proteins. The invention also provides derivatives of such proteins or biologically active fragments. The invention further provides medicaments comprising the proteins, fragments, derivatives or nucleic acids of the invention, as well as methods of treatment utilising the proteins, fragments, derivatives or nucleic acids.

The transforming growth factor betas (TGF- β s) are part of a superfamily of growth factors involved in the regulation of many cellular processes including proliferation, migration, apoptosis, adhesion, differentiation, inflammation, immuno-suppression and expression of extracellular proteins.

There are three mammalian isoforms of TGF- β , termed TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3. TGF- β s are produced by a wide range of cell types including epithelial, endothelial, hematopoietic, neuronal, and connective tissue cells.

The TGF- β s have utility in many different therapeutic contexts, and the TGF- β 3 isoform in particular has many advantageous therapeutic uses. As a result of the therapeutic potential of TGF- β 3s there is much interest in its pharmaceutical applications. The amino acid sequence of full-length wild type TGF- β 3 is set out in Sequence ID No. 1, and cDNA encoding this TGF- β 3 is set out in Sequence ID No. 2.

TGF- β 3 is known to play a crucial role in the regulation of the wound healing response. The activity of TGF- β 3 may influence the rate of wound healing as well as the extent of scarring that occurs as a result of healing.

TGF- β 3 may also 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 proliferative vitreoretinopathy).

The therapeutic uses to which TGF- β 3 lends itself have established a well-recognised need for sources of biologically active TGF- β 3 proteins, and numerous attempts have been made to produce this valuable protein by recombinant methods. However, existing processes for the production of TGF- β 3 are severely limited due to the necessity for refolding of the complex protein in order to achieve biologically active molecules.

TGF- β s naturally exist as homodimeric proteins comprised of two 112 amino acid subunits. Each of these TGF- β 3 subunits contains an alpha-helix forming domain between the 58th and 67th residues of the active peptide fragment. In addition to the alpha-helix between residues 58 and 67, each TGF- β 3 subunit also contains a number of intra-subunit linkages including salt bridges and disulphide bonds.

TGF- β 3 is secreted as a 100-kDa latent inactive precursor molecules (LTGF- β 3). The LTGF- β 3 molecule consists of:

- i) C-terminal 25kDa dimer signal peptide (active fragment); and
- ii) latent-associated peptide (LAP).

LTGF- β is activated by dissociation of LAP from the active fragment. Cleavage of LTGF- β may be mediated by the action of enzymes such as endopeptidases like furin, plasmin and thrombin or by acidification of the pericellular space. The active TGF- β dimeric fragment is stabilized by hydrophobic and ionic interactions, which are further strengthened by an inter-subunit disulfide bridge. Each monomer comprises several extended beta strands interlocked by three of the four intra-disulfide bonds and forms a tight structure known as the "cysteine knot".

Due to the complexity of biologically active TGF- β 3 molecules (which are, as set out above, homodimeric proteins with 8 intra-chain disulfide bonds and one inter-chain

disulfide bond) they were originally expressed in eukaryotic organisms. However, the relatively low expression levels that may be achieved using eukaryotic expression systems, in combination with the high costs of such processes, mean that the use of microbial hosts was investigated in order to attempt to improve the commercial efficiency of TGF- β 3 production.

The disadvantage of using microbial hosts such as *E.coli* to express recombinant molecules, such as TGF- β 3, that contain multiple disulfide bonds is that the proteins produced are normally incorrectly folded, and often form insoluble inclusion bodies. These inclusion bodies require solubilisation followed by renaturation to allow the protein to re-fold into its native biological active conformation. To effectively renature TGF- β 3 homodimer, covalent disulfide bonds in the correct orientation need to be regenerated. The likelihood of forming the correct TGF- β 3 homodimer from the process of random disulfide bond formation is low given that there are nine disulfide bonds, allowing 34,459,245 possible disulfide bond combinations. It is therefore not surprising that the re-folding of recombinantly produced TGF- β 3 can severely impact on its manufacture, since this refolding may take up to 144 hours, and typically only achieves re-folding efficiencies of in the region of 20%.

It is an aim of the present invention to obviate or mitigate some of the problems associated with the prior art. It is an aim of certain aspects of the present invention to provide TGF- β 3s (or fragments or derivatives thereof) that have improved refolding efficiency as compared to wild type TGF- β 3. It is another aim of certain aspects of the invention to provide agents other than wild type TGF- β 3 that have TGF- β 3 activity. Such agents may provide valuable alternatives to naturally occurring TGF- β 3.

In a first aspect of the present invention there is provided a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, wherein the alpha-helix-forming domain between amino acid residues 58 and 67 of full-length wild type TGF- β 3 comprises at least one alpha-helix-stabilising substitution. The invention also provides a nucleic acid encoding a TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, in accordance with the first aspect of the invention.

The inventors have surprisingly found that the new TGF- β 3s disclosed in the first aspect of the invention share the same biological activity as naturally occurring TGF- β 3, and have much improved protein refolding efficiency when compared to wild-type TGF- β 3. This increased protein refolding efficiency constitutes a marked and important advantage since it both simplifies the refolding conditions that may be used to produce biologically active TGF- β 3s and also greatly increases the yield of such proteins (or fragments or derivatives of such proteins) that may be produced using prokaryotic protein expression systems.

Without wishing to be bound by any hypothesis, the inventors believe that the introduction of alpha-helix-stabilising substitutions into the alpha-helix-forming domain advantageously decreases the flexibility of the alpha-helix formed by this domain. This decreased flexibility helps to promote proper refolding of TGF- β 3s in accordance with the first aspect of the invention to produce biologically active proteins (or fragments or derivatives thereof). The decreased flexibility imparted by stabilisation of the alpha-helix through alpha-helix-stabilising substitutions is sufficient to increase yields of correctly refolded TGF- β 3 (particularly refolded dimeric TGF- β 3), but, surprisingly, the inventors have found that such substitutions do not alter the biological activity of TGF- β 3s in accordance with the first aspect of the invention, nor do they detract from their biological and therapeutic effectiveness.

Except for where the context requires otherwise, the numbering of amino acid residues in the present specification is based upon the amino acid sequence of the active peptide portions of TGF- β 3s. For example, references to "full-length wild type TGF- β 3" should generally be taken to refer to the amino acid sequence of the active peptide shown in Sequence ID No. 1, and references to the alpha-helix-forming domain between amino acid residues 58 and 67 are to be construed accordingly.

An alpha-helix-stabilising substitution may preferably comprise a substitution of the Glycine residue at position 63 of full-length wild type TGF- β 3. However, suitable substitutions may additionally or alternatively comprise substitutions of, for example, one or both of the Threonines at positions 60 or 67 of full-length wild type TGF- β 3, or of the

Asparagine at position 66 of full-length wild type TGF- β 3. It may be preferred that alpha-helix-stabilising substitutions for use in accordance with the invention do not comprise substitution of Valine 61.

An "alpha-helix-stabilising substitution" in accordance with the present invention should be understood to be a substitution in which a given amino acid residue present in wild type TGF- β 3 is substituted by a replacement residue having a greater propensity for alpha-helix formation. Thus the replacement amino acid residue introduced in an alpha-helix-stabilising substitution need not necessarily be one which is itself predisposed to stable integration into alpha-helices, but need only have a greater propensity for stable integration than does the amino acid substituted. However, it may generally be preferred that a replacement amino acid introduced as part of an alpha-helix-stabilising substitution is an amino acid residue that does favour integration into an alpha-helix.

The inventors have found that preferred replacement amino acid residues that may be introduced in alpha-helix-stabilising substitutions in accordance with the first aspect of the invention may be any one or combination of amino acids selected from the group comprising: Alanine, Serine, Threonine, Valine, Leucine, Isoleucine; Methionine and Phenylalanine. These preferred replacement amino acid residues are all considered to be suitable for use in alpha-helix-stabilising substitutions of the Glycine residue at position 63 of full-length wild type TGF- β 3. That said, replacement amino acid residues selected from this group may be substituted at any position in the alpha-helix-forming domain between amino acid residues 58 and 67 at which they may provide an alpha-helix-stabilising substitution.

Although the amino acid residues listed above represent preferred residues for use in alpha-helix-stabilising substitutions, it will be appreciated that there are a number of alternative qualitative and quantitative systems by which the propensity of an amino acid residue to contribute to alpha-helix formation (and thereby the suitability of the residue for use in an alpha-helix-stabilising substitution) may be measured, and that suitable amino acid residues for use in alpha-helix-stabilising substitutions may be selected with

reference to any of these systems in combination with knowledge of the sequence of TGF- β 3.

By way of example, a qualitative system described by Chou and Fasman identifies five different classifications of amino acid residues based on their propensity for alpha-helix formation. In order, these are:

Strong helix formers;

Weak helix formers;

Indifferent forms;

Weak helix breakers; and

Strong helix breakers.

For the purposes of the present specification, the amino acid residues Glutamic acid, Histidine, Tryptophan, Lysine, Alanine, Methionine, Valine, Isoleucine, Leucine, Glutamine and Phenylalanine may be considered to be helix formers, with Glutamine, Methionine, Alanine and Leucine constituting strong helix formers. In contrast, Asparagine, Glycine and Proline may be considered to constitute helix breakers, with Glycine and Proline being strong helix breakers.

Thus, if the propensity for alpha-helix formation is assessed with reference to this qualitative scale it will be recognised that, although an alpha-helix-stabilising substitution may preferably be one in which an amino acid residue is replaced with a helix former, suitable alpha-helix-stabilising substitutions may alternatively make use of indifferent forms or even helix breakers depending on the nature of the amino acid residue that is to be replaced. For example, in the case that an indifferent form amino acid residue is to be the subject of an alpha-helix-stabilising substitution, a suitable replacement amino acid residue may be a strong helix former or a weak helix former. In the case that a strong helix breaker is to be the subject of an alpha-helix-stabilising substitution, the replacement amino acid residue may be a strong helix former, a weak helix former, an indifferent form amino acid or a weak helix breaker.

Accordingly, an alpha-helix-stabilising substitution in accordance with the present invention may comprise the substitution of a strong helix breaker with a weak helix breaker, or an indifferent form amino acid residue, or a weak helix former, or a strong helix former. Alternatively or additionally, a suitable alpha-helix-stabilising substitution may comprise the substitution of a weak helix breaker with an indifferent form, a weak helix former, or a strong helix former. Alternatively or additionally, a suitable alpha-helix-stabilising substitution may comprise the substitution of an indifferent form amino acid with a weak helix former or a strong helix former. Alternatively or additionally, a suitable alpha-helix-stabilising substitution may comprise the substitution of a weak helix former with a strong helix former.

An alternative assessment of the propensity of an amino acid residue for alpha-helix formation, and therefore its suitability to be utilised as part of an alpha-helix-stabilising substitution, may be based upon any of the number of quantitative scales known to those skilled in the art.

An example of such a quantitative scale that may be used in determining an amino acid residue's suitability for use in an alpha-helix-stabilising substitution is set out in Table 1. This table provides values, calibrated in kcal/mol, reflecting the propensity of amino acids to contribute to alpha-helix formation. A high value in Table 1 is associated with a low tendency to alpha-helix formation.

Thus, when the suitability of an amino acid residue for use in an alpha-helix-stabilising substitution as required by the first aspect of the invention is assessed using a quantitative scale, such as that set out in Table 1, a suitable alpha-helix-stabilising substitution is one in which an amino acid residue is substituted by a replacement amino acid residue that has a greater helix-forming propensity (indicated in Table 1 by a lower kcal/mol value) than the residue being replaced.

Suitable substitutions that may be utilised in accordance with the invention include those that introduce artificial replacement amino acids. Suitable examples of artificial amino

acids that may be beneficially used to stabilise alpha-helices include amino acid residues having alkyl and hydroxyl side chains.

Alanine represents a particularly preferred replacement amino acid residue suitable for use in alpha-helix-stabilising substitutions. It is most preferred that a TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, in accordance with the first aspect of the invention comprises the replacement of Glycine at position 63 of full-length wild type TGF- β 3 with alanine.

The amino acid sequence of a preferred TGF- β 3 in accordance with the first aspect of the invention is set out in Sequence ID No. 3 (Gly-63Ala), and DNA encoding this TGF- β 3 is set out in Sequence ID No. 4. Fragments or derivatives of the TGF- β 3 of Sequence ID No. 3 containing the Alanine substitution at position 63 of full-length wild type TGF- β 3 represent preferred TGF- β 3 fragments or derivatives in accordance with the first aspect of the invention.

A suitable substitution may be one in which one or more amino acid residues located between 58 and 67 of full-length wild type TGF- β 3 are replaced with one or more natural or artificial amino acid residues. By way of further clarification, suitable substitutions may involve the substitution of a single amino acid residue with one or more replacement residues, or the substitution of more than one amino acid residues with one or more replacement residues. A preferred substitution may be one in which the number of amino acid residues is conserved, i.e. one in which the number of amino acid residues substituted is the same as the number of replacement amino acid residues introduced.

It will further be appreciated that preferred amino acid residue (or residues) to be replaced may be selected with reference to the qualitative or quantitative scales discussed above. Thus a suitable amino acid to be the subject of an alpha-helix-stabilising substitution may be one classified as a helix breaker, or preferably a strong helix breaker, with reference to the qualitative scale discussed above. With reference to the quantitative scale set out in Table 1, a suitable amino acid to be the subject of an alpha-helix-stabilising may preferably be one with a helix propensity value greater than or equal to 0.50, more

preferably with a helix propensity value greater than or equal to 0.60, and most preferably with a helix propensity value of 1.00.

The inventors believe that TGF- β 3s, or biologically active fragments or derivatives thereof, in accordance with the first aspect of the invention may be used in all contexts in which it may be wished to make use of the biological activities of wild type TGF- β 3. These particularly include, but are not limited to, therapeutic uses. In keeping with this therapeutic use the invention also provides the use of a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, in accordance with the first aspect of the invention as a medicament.

It will be appreciated that, although it may be preferred that a fragment or derivative of a TGF- β 3 in accordance with the first aspect of the invention comprise the full-length alpha-helix-forming domain containing an alpha-helix-stabilising substitution, this need not necessarily be the case. A suitable fragment or derivative may comprise a truncated alpha-helix-forming domain as long as this truncated alpha-helix forming domain comprises at least one alpha-helix-stabilising substitution.

In a second aspect of the invention there is provided a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, wherein the Glycine residue at position 63 of full-length wild type TGF- β 3 is replaced with Proline. The invention also provides a nucleic acid molecule encoding a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, in accordance with the second aspect of the invention.

The inventors have surprisingly found that proteins in accordance with the second aspect of the invention (or their fragments or derivatives) have biological activity comparable to that of wild type TGF- β 3. This finding is unexpected, since it may be thought that the presence of Proline in a region of TGF- β 3 normally associated with alpha-helix formation would interfere with the secondary structure of such proteins and thereby impair their biological function. Although the refolding efficiency of TGF- β 3s in accordance with the second aspect of the invention is lower than that of wild type TGF- β 3 the anticipated impairment of function surprisingly does not occur.

Thus proteins in accordance with the second aspect of the invention (or their fragments or derivatives) provide a valuable contribution to the art in that they expand the repertoire of compounds capable of exerting TGF- β 3 activity that are available to the skilled person. Such compounds may, for example, be used in contexts in which it is desired to use TGF- β 3 activity therapeutically.

The amino acid sequence of a preferred TGF- β 3 in accordance with the second aspect of the invention is set out in Sequence ID No. 5 (Gly-63Pro), and DNA encoding this TGF- β 3 is set out in Sequence ID No. 6. Fragments or derivatives of the TGF- β 3 of Sequence ID No. 5 containing the proline substitution at position 63 of full-length wild type TGF- β 3 represent preferred TGF- β 3 fragments or derivatives in accordance with the second aspect of the invention.

Given that TGF- β 3s, or fragments or derivatives thereof, in accordance with the second aspect of the invention may be used in contexts in which it is desired to utilise the therapeutic biological activity of wild type TGF- β 3 it will be appreciated that there is also provided the use of TGF- β 3s, or fragments or derivatives thereof, in accordance with the second aspect of the invention as medicaments. The inventors believe that such medicaments may be used in all clinical contexts in which it is known to make use of the biological activity of TGF- β 3.

In a third aspect of the invention there is provided a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, comprising a substitution of the glutamic acid residue at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 and/or the arginine residue at position 52 of full-length wild type TGF- β 3. The invention also provides a nucleic acid molecule encoding a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, in accordance with the third aspect of the invention.

It will be appreciated that the third aspect of the invention thus encompasses TGF- β 3s in which the Glutamic acid at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 is substituted but the arginine at position 52 of full-length wild type TGF- β 3 is retained. The third aspect of the invention also encompasses TGF- β 3s in which the Glutamic acid at position 12 of

full-length wild type TGF- β 3 is retained but the arginine at position 52 of full-length wild type TGF- β 3 is substituted.

However, it is preferred that TGF- β 3s in accordance with the third aspect of the invention comprise substitutions of both the Glutamic acid residue at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 and the arginine residue at position 52 of full-length wild type TGF- β 3.

The inventors have surprisingly found that proteins in accordance with the third aspect of the invention also have biological activity comparable to that of wild type TGF- β 3. This finding is unexpected, since the substitution of one or both of the Glutamic acid residue at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 and/or the Arginine residue at position 52 of full-length wild type TGF- β 3 disrupts the formation of one of the intra-subunit salt bridges normally found in wild type TGF- β 3. This failure to complete proper salt bridge formation may be expected to decrease the biological activity of TGF- β 3s in accordance with the third aspect of the invention since the biological activity of proteins such as TGF- β 3s is generally believed to be dependent on their conformation.

Furthermore, the inventors have further found that TGF- β 3s in accordance with the second aspect of the invention exhibit an efficiency of successful refolding of that is just as high as that observed for wild type TGF- β 3. This finding is highly surprising, since it would be expected by those skilled in the art that the lack of intra-subunit salt bridge formation that must take place in TGF- β 3s in accordance with the second aspect of the invention would deleteriously impact on the incidences of refolding and hence decrease the yield of biologically active TGF- β 3.

Thus proteins in accordance with the third aspect of the invention serve to expand the repertoire of compounds capable of exerting TGF- β 3 activity that are available to the skilled person. As noted above, that availability of such compounds is of important in contexts such as those in which it is desired to use TGF- β 3 activity therapeutically.

The inventors have found that one or other of the Glutamic acid at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 or the Arginine at position 52 of full-length wild type TGF- β 3

may be substituted by any one amino acid residue (or any combination of amino acid residues) selected from the group comprising Serine, Alanine, Threonine, Valine, Isoleucine, Methionine, Phenylalanine and Leucine.

It is preferred that Serine be used as a replacement amino acid residue in TGF- β 3s, or fragments or derivatives thereof, in accordance with the third aspect of the invention. Serine may be used as a replacement for the Glutamic acid at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 or the Arginine at position 52 of full-length wild type TGF- β 3. Most preferably serine is used to replace both the Glutamic acid at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 and the Arginine at position 52 of full-length wild type TGF- β 3.

A first example of a preferred TGF- β 3 in accordance with the third aspect of the invention is set out in Sequence ID No. 7. The invention encompasses biologically active fragments or derivatives of Sequence ID No. 7 comprising the Glu12-Ser substitution. cDNA encoding this preferred TGF- β 3 is set out in Sequence ID No. 8.

A second example of a preferred TGF- β 3 in accordance with the third aspect of the invention is set out in Sequence ID No. 9. Biologically active fragments or derivatives of Sequence ID No. 9 comprising the Arg52-Ser substitution also constitute preferred fragments or derivatives in accordance with the invention. cDNA encoding this preferred TGF- β 3 is set out in Sequence ID No. 10.

A third example of a preferred TGF- β 3 in accordance with the third aspect of the invention is set out in Sequence ID No. 11. Biologically active fragments or derivatives of Sequence ID No. 11 that comprise both the Glu12-Ser substitution and the Arg52-Ser substitution also constitute preferred fragments or derivatives in accordance with the invention. cDNA encoding this preferred TGF- β 3 is set out in Sequence ID No. 12.

The inventors believe that TGF- β 3s, or biologically active fragments or derivatives thereof, in accordance with the third aspect of the invention may be used in all contexts in which it may be wished to make use of the biological activities of wild type TGF- β 3. These include, but are not limited to, therapeutic uses of TGF- β 3. Accordingly the

invention also provides the use of a TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, in accordance with the third aspect of the invention as a medicament.

TGF- β 3s of the invention, or biologically active fragments or derivatives thereof, may be used in the treatment of wounds (including chronic wounds such as ulcers). They may particularly be used to promote accelerated wound healing with prevention, reduction or inhibition of scarring, and/or to promote re-epithelialisation of wounds. TGF- β 3s of the invention may also be used to effect the prevention or treatment of fibrotic disorders, which may be independently selected from the group comprising pulmonary fibrosis, liver cirrhosis, scleroderma and glomerulonephritis, lung fibrosis, liver fibrosis, skin fibrosis, muscle fibrosis, radiation fibrosis, kidney fibrosis, proliferative vitreoretinopathy and uterine fibrosis.

TGF- β 3s of the invention may be used in the treatment of scleroderma, 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 believe that TGF- β 3s of the invention, or fragments or derivatives thereof, may be used beneficially in all of these indications.

TGF- β 3s of the invention may be used in the same way as naturally occurring TGF- β 3, for example for the treatment of conditions which may, for example, be selected independently from the group comprising 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, and for preventing, reducing or inhibiting complications of eye surgery (such as LASIK or PRK surgery). TGF- β 3s of the invention may be used in the treatment

of cleft lip and palate (for example in conjunction with surgical repair of such conditions), and in the reduction or inhibition of scarring and accelerated healing of tendons. The mutant forms of TGF- β 3 disclosed in the present invention are able to promote accelerated wound healing and/or prevent, reduce or inhibit scar formation in the same manner as naturally occurring TGF- β 3. They are also able to promote epithelial regeneration at sites of epithelial damage.

A "TGF- β 3 of the invention" is to be taken to encompass any mutant TGF- β 3 in accordance with any of the first, second or third aspects of the present invention. It will be appreciated that TGF- β 3s of the invention do not encompass TGF- β 1 or TGF- β 2. The identity of a TGF- β 3 may be determined with reference to its sequence, or preferably with reference to its biological activity. Thus a TGF- β 3 may be differentiated from a TGF- β 1 or a TGF- β 2 on the basis that it is capable of reducing scar formation in a wound to which the TGF- β 3 is administered. TGF- β 3s in accordance with the present invention may preferably be non-natural TGF- β 3s.

A TGF- β 3 in accordance with any aspect of the invention may be used in the preparation of a medicament for the treatment of any condition in which it may be wished to utilise TGF- β 3. Such uses include, but are not limited to, treatment of any of the conditions considered in the present specification. It may be preferred that TGF- β 3s in accordance with the present invention are used in the preparation of medicaments for promoting accelerated healing of wounds, and/or the prevention, reduction or inhibition of scarring. Such scarring may be associated with wounds and/or with fibrotic disorders. Medicaments manufactured using TGF- β 3s of the invention may preferably be for use in the skin, or in the eye (for example in the acceleration of healing in the skin or eye, or for the prevention, reduction or inhibition of scarring in the skin or eye).

TGF- β 3s in accordance with the invention may be either latent or active TGF- β 3s (i.e. either with, or without, the latency associated peptide).

Save for where the context requires otherwise all references to TGF- β 3s in accordance with the invention should also be taken to encompass fragments or derivatives of such

TGF- β 3s, wherein such fragments or derivatives are characterised in that they comprise substitutions (in keeping with the first, second or third aspects of the invention as appropriate) that differentiate them from fragments or derivatives derivable from wild type TGF- β 3 (the amino acid sequences of which is taken for the present purposes to be represented by Sequence ID No. 1). Suitable fragments or derivatives of TGF- β 3s in accordance with the first, second or third aspects of the invention may comprise at least 10 amino acid residues, preferably at least 40 amino acid residues, more preferably at least 70 amino acid residues, and most preferably at least 100 amino acid residues.

References in the present specification to TGF- β 3s and fragments of TGF- β 3s also encompass derivatives of such proteins or fragments, except for where the context requires otherwise.

Without limitation, suitable examples of suitable forms of derivatives may be selected from the group consisting of: therapeutically effective peptide derivatives of TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective fragments or derivatives comprising or based on the pharmacophore of TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective peptoid derivatives of TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective D-amino acid derivatives of TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective peptidomimetics based on TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective peptide analogues of TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective pseudopeptides based on TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective retro-inverso peptides based on TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective depsipeptide derivatives based on TGF- β 3s of the invention (or their fragments); therapeutically effective β -peptide derivatives based on TGF- β 3s of the invention (or their fragments); and therapeutically effective retropeptoid derivatives based on TGF- β 3s of the invention (or their fragments).

It will be appreciated that, for the purposes of the present invention "a TGF- β 3" may be taken to encompass either the monomeric and dimeric forms of the TGF- β 3. The inventors have surprisingly found that TGF- β 3s in accordance with the present invention

72

are able to exert their biological effects in both monomeric and dimeric form. This contrasts surprisingly with that which has previously been reported in the prior art, where it is generally considered that TGF- β s such as TGF- β 3 may only exert biological activity when in dimeric form. The inventors' finding that TGF- β 3s in accordance with the present invention may be utilised in monomeric form provides great advantages in that such monomeric forms may be generated through relatively simple folding techniques (examples of which are discussed further below) thereby increasing the speed with which biologically active molecules may be generated, whilst also reducing the costs associated with the generation of such molecules.

It may be preferred that a monomeric TGF- β 3 of the invention be a TGF- β 3 as set out in Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11, or a fragment or derivative thereof.

A "medicament of the invention" is to be taken to comprise any medicament that comprises a TGF- β 3 in accordance with the invention. A medicament of the invention may additionally or alternatively be a medicament that comprises a nucleic acid encoding a TGF- β 3 in accordance with the invention. This encompasses both medicaments *per se* (i.e. irrespective of the use to which the medicament is to be put), and medicaments for use in specific therapeutic applications (for example, in the treatment or amelioration of the conditions considered in the present specification). It is also intended that medicaments of the invention should be understood to encompass medicaments that comprise suitable fragments or derivatives of TGF- β 3s of the invention, or nucleic acids encoding such fragments or derivatives.

A "method of treatment of the invention" (or "method of the invention") is to be taken to comprise any method of treatment that utilises a therapeutically effective amount of a TGF- β 3 in accordance with the invention, or a nucleic acid encoding such a TGF- β 3. It is also intended that methods of treatment of the invention should be understood to encompass methods of treatment that utilise suitable fragments or derivative of TGF- β 3s of the invention, or nucleic acids encoding such fragments or derivative.

Medicaments comprising TGF- β 3s of the invention, or biologically active fragments or derivatives thereof, may be used in the treatment of wounds (including chronic wounds such as ulcers). They may particularly be used to promote accelerated wound healing with prevention, reduction or inhibition of scarring, and/or to promote re-epithelialisation of wounds. TGF- β 3s of the invention may also be used to effect the prevention or treatment of fibrotic disorders such as pulmonary fibrosis, liver cirrhosis and fibrosis, scleroderma, glomerulonephritis, skin fibrosis, radiation fibrosis, renal fibrosis, proliferative vitreoretinopathy or uterine fibrosis.

TGF- β 3s of the invention may be used in the treatment of conditions selected independently from the group consisting of: scleroderma, angiogenesis disorders, restenosis, adhesions, endometriosis, ischemic disease, bone and cartilage induction, *in vitro* fertilisation, oral mucositis, renal disease, pulmonary fibrosis, liver cirrhosis and fibrosis, glomerulonephritis, skin fibrosis, radiation fibrosis, renal fibrosis and uterine fibrosis. 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 believe that TGF- β 3s of the invention, or fragments or derivatives thereof, may be used beneficially in all of these indications.

The biological activity to be exhibited by a TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, in accordance with the present invention may preferably be the anti-scarring activity of TGF- β 3, and this activity may preferably be investigated *in vivo*.

A therapeutically effective amount of a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, in accordance with the present invention 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.

24

The extent of acceleration of wound healing and/or inhibition of scarring, or epithelial regeneration that may be required will be apparent to, and indeed may readily be determined by, for example, 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, may be determined by the clinician, and may be with reference to suggested methods of measurement described herein.

Suitable TGF- β 3s in accordance with the invention, as well as preferred fragments or derivatives of such TGF- β 3s, may be selected with reference to any or all of the considerations described herein.

The ability of TGF- β 3s of the invention 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 TGF- β 3s comprising Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11) 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.

27

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 TGF- β 3s of the invention, such as those comprising Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11, 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 TGF- β 3s in accordance with the invention (such as those comprising Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11) are capable of reducing wound width they 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 TGF- β 3s of the invention (such as those comprising Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11) are able to increase the rate of re-epithelialisation 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 TGF- β 3s of the invention such as Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11 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 TGF- β 3s comprising Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11 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 TGF- β 3s, such as those comprising Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11, 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 TGF- β 3s of the invention is mediated by their 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 TGF- β 3s of the invention 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, TGF- β 3s of the present invention may be used 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 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.

- 32
- 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

34

- 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 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*

36

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 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 profilimetry 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,

44

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 peptide 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 the 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 TGF- β 3s of the invention 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 (such as those comprising TGF- β 3s set out in Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11) 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.

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" are meant biologically or therapeutically active TGF- β 3s of the invention; and/or biologically or therapeutically active fragments of TGF- β 3s of the invention; and/or biologically or

46

therapeutically active derivatives of TGF- β 3s of the invention. Agents of the invention may also include nucleic acids encoding TGF- β 3s of the invention (or fragments or derivatives thereof). 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). For

Q1

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).

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 total amount of an active agent that may be administered by local injection to a wound or site of epithelial damage may preferably be in the region of 50ng/100 μ L per linear centimetre of wound or epithelial damage. Such a dose may be given once a day for up to three days, thereby providing a total dose of 150ng/linear centimetre of wound or 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/cm². Such a dose may be given once a day for up to 3 days, thereby providing a total dose of 300ng/cm² of wound or epithelial damage.

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 centimetre of wound or epithelial damage (if administered by injection), or 100ng/cm² of wound or epithelial damage (if administered topically).

By way of still further 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 centimetre of wound or epithelial damage (if administered by injection), or 100-300ng/cm² of wound or epithelial damage (if administered topically).

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/100μL - 1mg/100μL solution of the agent, and 100μL 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/100μL - 100μg/100μL solution with 100μL 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/100μL - 1000ng/100μL solution with 100μL 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 peptides of Sequence ID Nos. 3 to 8) 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 0.79μM.

Purely by way of example an injectable solution containing between 10pg/100μL and 100μg/100μL of an agent of the invention (such as a TGF-β3 of Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11) is suitable for application to promote accelerated dermal wound healing and/or

3

inhibition of scarring when administered as an intradermal injection and dosed with 100 μ L per linear cm of wound margin.

In the case of a TGF- β 3 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.

In the case of a TGF- β 3 of Sequence ID No. 5, 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.

In the case of a TGF- β 3 of Sequence ID No. 7, 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.

In the case of a TGF- β 3 of Sequence ID No. 9, 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.

In the case of a TGF- β 3 of Sequence ID No. 11, 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 TGF- β 3s in accordance with the present invention 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, those selected from the group consisting of maltose, mannose, trehalose, arabinose, mannitol, sucrose, fructose, dextrose and glucose. Preferred sugars may be selected from the group consisting of maltose and trehalose.

It will be appreciated that peptides comprising TGF- β 3s of the invention 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 3s to be administered via cellular expression comprise those peptides defined by Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11, or fragments or derivatives thereof. Nucleic acids encoding these peptides are set out in Sequence ID Nos. 4, 6, 8, 10 or 12.

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.

According to a fourth aspect of the present invention there is provided a delivery system for use in a gene therapy technique, said delivery system comprising a DNA molecule encoding a peptide selected from the group consisting of those defined by Sequence ID No. 3, Sequence ID No. 5, Sequence ID No. 7, Sequence ID No. 9 and Sequence ID No. 11, said DNA molecule being capable of being transcribed to lead to the expression of the chosen peptide.

According to a fifth aspect of the present invention there is provided the use of a delivery system as defined in the preceding paragraph for use in the manufacture of a medicament for use in the promotion of accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring.

In a sixth aspect of the present invention there is provided the use of a delivery system as defined in above for use in the manufacture of a medicament for use in the promotion of epithelial regeneration.

According to a seventh aspect of the present invention there is provided a method of promoting accelerated wound healing and/or prevention, reduction or inhibition of scarring, the method comprising administering to a patient in need of such treatment a therapeutically effective amount of a delivery system as defined for the ninth aspect of the invention.

According to an eighth aspect of the present 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 delivery system as defined for the ninth aspect of the invention.

Due to the degeneracy of the genetic code, it is clear that nucleic acid sequences encoding agents suitable for use in accordance with the invention may be varied or changed without substantially affecting the sequence of the product encoded thereby, to provide a functional variant thereof. The sequences of possible nucleic acids that may be used to encode peptides defined by Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11 will be readily apparent to the skilled person, and the skilled person will be able to make reference to the examples provided as Sequence ID Nos. 4, 6, 8, 10 or 12 respectively.

The delivery systems according to the invention 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 fourth aspect of the invention. Therefore, even if the agent of the invention has a very short half-life *in vivo*, therapeutically effective amounts of the agent may be continuously expressed from the treated tissue.

Furthermore, the delivery system of the invention may be used to provide the DNA molecule (and thereby the agent 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.

The delivery system of the present invention 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 consisting of Sequence ID Nos. 3, 5, 7, 9 or 11, or a fragment or derivative of such a peptide. The DNA molecule may be contained within a suitable vector to form a recombinant vector. The vector may for example be a plasmid, cosmid or phage. Such recombinant vectors are highly useful in the delivery systems of the invention for transforming cells with the DNA molecule.

Recombinant vectors may also include other functional elements. For instance, recombinant vectors may be designed such that the vector will autonomously replicate in the nucleus of

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

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 ninth aspect of the invention, there is provided a medicament comprising cells induced to express an agent of the present invention.

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.

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:

Table 1 shows values indicative of amino acid residues' propensity for involvement in alpha-helix formation;

Table 2 sets out details of nomenclature used in reference to mutant TGF- β 3s of the invention;

Table 3 sets out re-folding efficiency of wild-type TGF- β 3 and TGF- β 3s of the invention;

Table 4 compares the biological activity of wild type TGF- β 3 and Gly63-Ala (a TGF- β 3 protein of the invention) as assessed by cell growth inhibition assay;

Table 5 sets out concentrations of reagents used in *in vivo* wound healing studies;

Table 6 sets out concentrations of reagents used in *in vivo* wound healing studies;

Figure 1 shows a chromatogram of TGF-Beta 3 'Wild-Type' on a Phenyl-Sepharose Column;

Figure 2 shows a chromatogram of TGF-Beta 3 'Wild-Type' Monomer and Dimer on UNO-S1 Column;

Figure 3 shows a comparison of TGF-Beta 3 Mutant Proteins and 'Wild-Type' TGF-Beta 3 by SDS-PAGE stained with Coomassie Blue (please note that the buffer exchange of Gly63-Ala and Gly63-Pro mutant proteins resulted in some sample loss therefore the actual concentration added to the gel were rather less than the 3 μ g stated);

Figure 4 shows the template used for excisional wounding;

Figure 5 shows day 3 average macroscopic assessment scores for incisional wounds (A and B) treated with wild type TGF-Beta 3 or TGF- β 3s of the invention, where "*" indicates significantly increased healing compared to naïve wounds ($p < 0.05$);

Figure 6 Day 3 microscopic average wound width for excisional wounds (C and D) Treated with 'wild-type' and mutant TGF-Beta 3 proteins;

Figure 7 shows the template used for incisional wounding;

60

Figure 8 illustrates macroscopic scar scores (day 70) for wounds treated with 'wild-type' TGF-Beta 3, Gly63-Ala and Gly63-Pro;

Figure 9 illustrates macroscopic scar images (day 70) for wounds treated with 'Wild-type' TGF-Beta 3, Gly63-Ala and Gly63-Pro;

Figure 10 illustrates macroscopic scar scores (day 70) for wounds treated with 'Wild-type' TGF-Beta 3, Glu12-Ser and double Serine mutant (Glu12-Ser & Arg52-ser), where "+" indicates significantly decreased scarring compared to placebo treated wounds ($p < 0.05$);

Figure 11 illustrates macroscopic scar images (day 70) for wounds treated with 'Wild-type' TGF-Beta 3, Glu12-Ser and double Serine mutant (Glu12-Ser & Arg52-Ser);

Figure 12 illustrates representative microscopic scar images of wounds treated with 'Wild-type' TGF-Beta 3, Gly63-Pro and Gly63-Ala Mutant Proteins (70 days Post-Wounding); and

Figure 13 illustrates representative microscopic scar images of wounds treated with Glu12-Ser and Double Serine mutant (Glu12-Ser and Arg 52-Ser) after 70 days Post-Wounding).

Details of sequences of particular interest are provided in the section "Sequence Information".

Experimental protocols and results

1 Generation, production, refolding, and purification of TGF- β 3s according to the first and second aspects of the invention.

1.1 Generation of cDNA

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 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/w) agarose gel to verify band size and purified using Wizard PCR Prep Kit (Promega).

1.2 Construction of plasmid

The pET-3d vector is derived from pBR322 vector and contains a T7 promoter under *LacUV5* control and an Ampicillin resistant marker gene. The TGF-Beta 3 cDNA fragments (generated in Section 3.2) were sub-cloned into pET-3d at the Nco I and Bam HI sites (5'-3' respectively). The resulting ligation was then transformed into XL10 Gold cells (Stratagene) and colony PCR analysis was performed to locate clones containing an insert. The final clone was grown up and plasmid DNA extracted into water using Qiaprep®Spin Miniprep Kit (Qiagen). The 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').

1.3 Site directed mutagenesis

The 'wild-type' TGF-Beta 3 construct from Section 1.2 underwent site directed mutagenesis to generate two mutated constructs encoding for TGF-Beta 3 mutant proteins. The construct/mutant nomenclature and nucleotide sequence change are summarised in Table 2. The nucleotide positions that underwent mutagenesis are shown in the Sequence Information section.

The *In-vitro* site-directed mutagenesis methodology was based on Stratagene's Quick Change® Site directed Mutagenesis kit. 100ng of plasmid (from Section 1.2) was added to a solution containing: 2.5µL 10 x Quick Change® Multi Reaction Buffer, Quick solution, 100ng of Mutagenic Primer, 1mL dNTP mix, Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene), made up to a final volume of 2.5mL with double distilled water. The reaction was placed in a thermal cycler (Hybaid PCR Expresses) and run under the following conditions: 1min at 95°C, 30 cycles of 1min at 95°C, 55°C for 1 min and a final step of 65°C for 2 min. Once the thermal cycling was complete the reactions were placed on ice for 2 min to reduce the temperature below 37°C. 1µL of DpnI restriction enzyme (10 U/µL) was added to each reaction and mixed thoroughly. The reaction mixture was centrifuged (1min 10,000 rpm in a Sorvall Biofuge) then incubated at 37°C to digest the parental ds-DNA. 1-5µL of DpnI-treated DNA from each mutagenesis reaction was added 45µL of resuscitated XLI-Blue *E.coli* (Stratagene) and 2µL β-ME mix (Stratagene). The suspension was mixed and incubated on ice for 30minutes. The suspension was heated to 42°C in a water bath for 30seconds. The mixture was incubated on ice for a further 2min. 0.5mL of pre-heated (42°C) NZY⁺ broth was added to each cell suspension. The transformation broth was incubated for 1 hour with shaking at 225-250rpm. 1µL, 10µL and 100µL of the transformation broth from each mutagenesis reaction was spread onto LB agar plates containing 100µg/mL of Ampicillin (Sigma), 80 µg/ml of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranranoside (X-gal, Stratagene), 20mM of Isopropyl β-D-Thiogalctopyranoside (IPTG, Sigma) and incubated for 18 hours at 37°C. The blue colonies contained the mutated plasmid. A single colony from each mutant type was picked off the agar and used to inoculate 10mL of LB medium containing 100µg/mL

Ampicillin. The plasmid was isolated using QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). The plasmids were sequenced and verified for correct mutation using pQE for and pQE Rev primers.

1.4 Transformation and cloning

10µL (50 ng per µl) of plasmid DNA (from Section 1.2 and 1.3) was added to 1mL of cold (4°C) competent *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Singles™ cells (Novagen). After 20min the cells were heat shocked by incubation for 30 sec at 42°C in a water bath. 100µL of Psi medium was added to the cell/plasmid mixture and shaken at 37°C for 90 min. 50µl and 100µl aliquots were plated onto LB agar plates containing 100 µg/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

An ampoule of frozen transformed *E.coli* cells (from Section 1.4) were recovered and inoculated into a baffled Erlenmeyer flask, containing 100mL of LB media and 100µg/mL of Ampicillin. The flask was incubated with shaking, overnight at 37°C. 5mL of this overnight culture were added to 2-litre Erlenmeyer flask (500mL of LB media/and 100µg/mL of Ampicillin) and incubated with shaking at 37°C. 2mL Broth samples were taken hourly to track growth and TGF-Beta 3 'wild-type' and mutant protein 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 'wild-type' and mutant TGF-Beta 3 proteins 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. 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

64

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 in a Hettich Rotina 46R centrifuge with a 4315 Rotor. Cell disruption and recovery of insoluble (inclusion bodies) TGF-Beta 3 protein was 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 15,000g for 40min. The pellet was re-suspended in 50mL of 100mM Tris/HCl, 10mM EDTA pH 8.3 before being centrifuged for 40minutes at 12,000g.

1.7 Solubilisation of inclusion bodies

The sediment from Section 1.6 was 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-Beta 3 'wild-type' and mutant proteins to their monomeric form. The suspension was then centrifuged for 30 minutes at 15,000g. The supernatant was 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/w) DTT (Sigma) was added to the suspension, covered and left stirring for 30 min to reduce any disulfide bonds that may have formed between TGF-β3 monomers during the buffer exchange. The suspension was centrifuged at 12,000g for 40 min 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 soluble material from Section 1.7 underwent ultrafiltration using 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 Gel filtration

The sample from Section 1.7 was chromatographed on a Hiprep 26/60 Sephacryl S-100 high-resolution column (Amersham, 320mL) in 10% (v/v) acetic acid at a flow rate of 1.5 mL/min. Fractions containing monomeric denatured TGF-Beta 3 (which eluted between 100 min and 140 min) were pooled.

1.10 Lyophilisation

The pooled fractions containing denatured monomeric TGF-Beta 3 were lyophilised using a IEC Lyoprep-3000 freeze dryer to remove acetic acid and water from the sample.

1.11 Refolding

The lyophilised, monomeric, TGF-Beta 3 from Section 1.10 was solubilised in 8M urea containing 10mM DTT until a final TGF-Beta 3 concentration of 10mg/mL was achieved. The TGF-Beta 3 solution was added dropwise, while stirring to re-folding solution (1M 3-(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 a final concentration of 0.2mg/mL TGF-Beta 3 was 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 TGF-Beta 3 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. The supernatant contained disulfide linked dimeric TGF-Beta 3, which was determined by SDS-PAGE (non-reduced) and Western Blotting. The SDS-PAGE was carried out as described in section 2.1.

For the Western Blotting, samples were loaded onto a 1mm thick, 15% (v/v) polyacrylamide gel. Once electrophoresis was completed the proteins within the gel were

then electrophoretically transferred on to nitrocellulose paper (Sigma) using TE22 Western-Blotting Apparatus (Pharmacia), as outlined in the instruction manual. Non-specific binding sites on the nitrocellulose were then blocked with blocking buffer (5% (w/v) Skimmed milk powder, 1% (v/v) Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate (Tween 20, Sigma) in Phosphate Buffered Saline (Invitrogen)). The nitrocellulose was then washed in washing buffer (PBS, 0.1% Tween 20). The nitrocellulose was then incubated for 1 hr with the primary antibody (MAB643(R&D systems)) diluted 1:500 with 0.1%(v/v) Tween 20 in PBS. The nitrocellulose was again washed before incubation for 1 hr with the secondary antibody goat anti-mouse antibody (Abcam) diluted 1:3000 with 0.1%(v/v) Tween 20 in PBS. The nitrocellulose received a final wash before the addition ECL reagent (Amersham) to visualise the antigen-antibody complexes. In a dark room X-ray film was exposed to the nitrocellulose before being immersed in developer, fix and stop solutions. The nitrocellulose was then left to dry. The re-folding the TGF-Beta 3 'wild-type' and mutant monomeric proteins showed varying levels of dimer formation. The percentage recovery of correctly re-folded dimer from other incorrectly re-folded or non-dimeric TGF-Beta 3 proteins are shown in Table 3.

Interestingly the amino acid substitutions within the alpha helix of the TGF-Beta 3 proteins that caused greatest impact on re-fold yield (dimer formation). Stabilisation of the alpha helix by substituting Glycine with Arginine increased re-fold yields from 20% to 50%. Conversely disruption of the alpha helix by substituting Glycine with Proline resulted in a much lower percentage of dimer formation. This indicates that the alpha helix plays an important role in the correct re-folding of the TGF-Beta 3 molecule. Substituting the amino acids involved in the formation of the 'salt-bridge' did not effect re-fold yields.

1.12 Hydrophobic interaction chromatography

The renaturation solution from Section 1.11 was concentrated to 50mL by Ultrafiltration with a 10kDa (molecular weight cut off) membrane on a Vivoflow50 (Vivascience). The renaturation solution was diluted 1:1 with a solution containing 2 M Ammonium Sulphate (Sigma) and 10%(v/v) acetic acid. A 2ml Biorad column filled with the Phenyl-Sepharose Flast Flow (Amersham) was equilibrated with buffer A (1.0M Ammonium sulphate and

10% (v/v) Acetic acid). 20mL of the diluted renaturation solution was applied to this column at a flow rate of 1mL/min (this flow rate was used through out the procedure). The column was then washed in buffer A until the absorbance reading at 280nm reached baseline level (10mL). 100% Buffer B (10%(v/v) acetic acid 30%(v/v) Isopropanol) was applied to the column. The first peak, which contains TGF-Beta 3 proteins in both monomeric and dimeric forms, was pooled (see Figure 1).

1.13 Cation exchange chromatography

Cation exchange chromatography was used to isolate the dimeric TGF-Beta 3 proteins from the monomers. A 2 mL UNO-S1 Column (Biorad) was equilibrated with buffer A containing 10% (v/v), acetic acid, 30% (v/v) Isopropanol). The pooled fractions from Section 3.12 were applied at flow rate of 1mL/min onto the UNO-S1 column. The column was then washed in buffer A until the absorbance reading at 280nm reached baseline level (5 min). A linear gradient was run over 5 mins ending with a mixture of 60% Buffer A and 40% Buffer B (10% (v/v) acetic acid, 30% (v/v) Isopropanol and 1M NaCl). The application of this buffer mixture was maintained for a further 15minutes. Monomeric TGF-Beta 3 was eluted from the column after 10min following sample injection. A second linear gradient was applied over 5 minutes ending with 100% Buffer B and maintained for a 10 minutes. Dimeric TGF-Beta 3 was eluted from the column 30 mins after sample injection (see Figure 2).

1.14 Ultrafiltration/diafiltration

The fractions containing purified monomeric and dimeric TGF-Beta 3 molecules from Section 1.13 underwent ultra filtration/ diafiltration to exchange the buffer to 20mM Acetic Acid, 20% (v/v) Isopropanol and concentrate the sample to ~10mg/mL (TGF-Beta 3 concentration was determined by U.V spectrometry). A Vivoflow50 (Vivascience) with a 10kDa cut off was used exchange buffer and concentrate the samples.

2 In vitro characterisation of TGF- β 3s of the invention.

2.1 SDS-PAGE analysis of purified TGF- β 3s of the invention

The purified TGF-Beta 3 mutant proteins (from Section 1.14) were assessed by SDS-PAGE to determine purity and molecular weight. Due to the low pH in the TGF-Beta 3 mutant samples from Section 3.14 the buffer was exchanged using protein desalting spin columns (Pierce) into SDS-PAGE sample buffer. 3 μ g of purified TGF-Beta 3 mutant proteins (reduced and non-reduced samples), 3 μ g 'wild-type' TGF-Beta 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.

As expected the 'wild-type' TGF-Beta 3 and the Gly63-Ala mutant protein ran to identical positions on the gel (~13kDa for reduced and 25kDa for the non-reduced samples). Interestingly no Gly63-Pro mutant protein bands were detected on the non-reduced gel but were detected on reduced gel. As the re-fold efficiency of Gly63-Pro was very low (<1%) it is likely multiple re-fold species were produced, which were below the levels detectable by Coomassie (>1 μ g). However when these species were reduced the concentration of the reduced Gly63-Pro monomer was above the 1 μ g Coomassie stain detection limit and therefore Gly63-Pro could be seen on the reduced gel. The reduced Gly63-Pro protein band position was slightly higher than the band for 'wild-type' TGF-Beta 3. This was to be expected as the substitution of Glycine 63 for a Proline made the Gly63-Pro mutant protein a larger molecule than 'wild-type' TGF-Beta 3 (see Figure 3).

2.2 Cell growth inhibition assay to compare the biological activity of TGF- β 3s of the invention with that of wild type TGF- β 3

The cell growth inhibition assay (A Meager, 1991) is an *in-vitro* biological activity test for TGF-Beta molecules. The colorimetric assay is based on the inhibitory effect of TGF-Beta molecules on the growth of Mink Lung Epithelial cells (MLEC). 100 μ L of cell suspension containing: 1 x10⁴ MLEC cells/mL and complete medium (DMEM

68

(Invitrogen), 0.01M Hepes buffer (Invitrogen), 2mM L-Glutamine (Invitrogen), L-Arginine (Invitrogen), L-Asparagine (Invitrogen), 100 units/mL Penicillin (Invitrogen), 50µg/mL Streptomycin (Invitrogen) and 5% Foetal Calf Serum (Invitrogen)) was added to each well of a 96 well tissue culture plate. After overnight incubation at 37°C, 5% CO₂, 100µL of serially diluted (10pg/mL to 500pg/mL) dimeric TGF-Beta 3 mutant samples (from Section 3.14) were added to the plate(s). Control wells received 200µL of complete medium and 10% (v/v) 0.25 M Maltose. The plates were incubated for a further 120hr and 50µL of 2mg/mL, 3-[4,5-dimethylthiazoni-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide: thiazolyl blue (MTT; Sigma) was added to each well. The plates were incubated for an additional 4 hours and media was then removed. 100µL of 0.05M HCl (BDH), absolute Isopropanol (BDH) was added to each well and the resultant solubilised formazan was quantified at 570 nm using a microplate reader (Victor² 1420).

Gly63-Ala, a TGF-β3 of the invention, had an inhibitory effect on MLEC cells over a concentration range of 0-500pg/mL. As can be seen from Table 4, Gly63-Ala mutant protein had an IC₅₀ of 34pg/mL compared to 'wild type' TGF-Beta 3 having an IC₅₀ of 26 pg/mL.

2.3 Amino acid sequence analysis

Fifty micro litres of purified 'wild-type' and mutant TGF-Beta 3 samples from Section 3.14 were vacuum dried and then re-suspended in 20µL of a solution containing 50mM NH₄HCO₃ and 10% (v/v) Acetonitrile. 20µg of sequencing grade Trypsin (Promega) was re-suspended in 10µL of kit supplied re-suspension buffer (Promega) to give a Trypsin concentration of 2µg/µL. This was then diluted into 50mM 50mM NH₄HCO₃ and 10% (v/v) Acetonitrile to give a final trypsin concentration of 0.2µg/µL. The digestion was performed overnight by the addition of trypsin in a 1:20 (w/w) ratio with 'wild-type' and mutant TGF-Beta 3 proteins. 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/µL. The peptides were then analysed by a process of nano-flow RPLC-MS (Ultimate system, Dionex online to a Q-ToF2, Micromass). The chromatography was performed on a 75µm C18 column (LC packings) utilising a 45 min gradient from

5%(v/v) Acetonitrile to 55%(v/v) Acetonitrile. 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 MS-MS analysis where collisionally induced decomposition was employed to fragment peptide ions to render sequence information.

3 In vivo characterisation of TGF- β 3s of the invention

The biological effects of re-folded active 'wild-type' and mutant TGF-Beta 3 proteins were investigated on incisional and excisional wound healing (3 days post-wounding) and scarring (70 days post-wounding) in adult, male rats.

3.1 Comparison of the effects of wild type TGF- β 3 and TGF- β 3s of the invention on wound healing

Male rats (Sprague Dawley) are anaesthetized with Halothane and their backs shaved. Wounding positions were marked using a standard template with skin marking ink as shown in Figure 4. 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 described in Table 4. 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 (Table 4) was injected intra-dermally into marked wound positions A and B (except rats receiving no treatment (naïve)) At wound positions A and B punch biopsies were made. 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.

3.2 Assessment of day 3 incisional wounds treated with wild type TGF- β 3 or TGF- β 3s of the invention on wound healing using a macroscopic visual analogue scale

Incisional wounds were examined after 3 days using a macroscopic Visual Analogue Scale (VAS). 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 TGF-Beta 3 decreases the VAS score (i.e., improves the macroscopic appearance of wounds) compared to no treatment (naïve control). Treatment with the 100ng/100 μ L dose significantly improved ($p < 0.05$) the appearance of wounds compared to no treatment (naïve control) i.e., accelerated healing.

Treatment with 50ng/100 μ L or 100ng/100 μ L of the Gly63-Ala mutant decreases the VAS score compared to no treatment (naïve control) and are comparable to wounds treated with 'wild-type' TGF-Beta 3 i.e., did not impair healing.

Treatment with 50ng/100 μ L or 100ng/100 μ L of the Gly63-Pro mutant decreases the VAS score compared to no treatment (naïve control) and are comparable to wounds treated with 'wild-type' TGF-Beta 3 i.e., did not impair healing.

3.3 Microscopic Assessment of Wound Width for Day 3 Excisional Wounds Treated with wild-type and Mutant TGF-Beta 3 proteins

Excisional wound width was assessed microscopically after 3 days. All wounds treated with TGF-Beta 3 'wild-type' and mutant proteins showed comparable wound width to the placebo and no treatment (naïve) controls, confirming that TGF-Beta 3 mutant proteins have no adverse effect on healing (Figure 6).

3.4 The Effect of 'Wild-type' and Mutant TGF-Beta 3 Proteins on Wound Scarring (Day 70 Wounding).

Male rats (Sprague Dawley) are anaesthetized with Halothane and their backs shaved. Wounding positions were marked using a standard template with skin marking ink as shown in Figure 7. 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 Table 5. All samples were sterile, endotoxin free, and pyrogen free. Four rats were used for each treatment group. 100 μ L of sample from each treatment

group (Table 6) 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). The wounds were excised and placed into 10% Buffered saline before being processed into a wax block. The wax blocks were cut into 5µM 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.

3.5 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 (Figure 8). VAS analysis of the day 70 wounds shows that:

'Wild-type' TGF-Beta 3 (at 50ng/100µL and 100ng/100µL doses) reduced scarring compared to the placebo treated and naïve wounds. For both doses this reduction is statistically significant ($p < 0.05$) compared to the placebo treated wounds.

Gly63-Ala mutant (at 50ng/100µL and 100ng/100µL doses) reduced scarring compared to the placebo treated and naïve wounds. For the 50ng/100µL dose this reduction is statistically significant ($p < 0.05$) compared to the placebo treated wounds.

Gly63-Pro mutant (at 50ng/100µL and 100ng/100µL doses) reduced scarring compared to the placebo treated and naïve wounds.

Glu12-Ser mutant (at 50ng/100µL and 100ng/100µL doses) reduced scarring compared to the placebo treated and naïve wounds. For the 50ng/100µL dose this reduction is statistically significant ($p < 0.05$) compared to the placebo treated wounds.

Double serine mutant (Glu12-Ser & Arg52-Ser) at 50ng/100 μ L and 100ng/100 μ L doses reduced scarring compared to the placebo treated and naïve wounds.

3.6 Microscopic assessment of day 70 incisional wounds.

The macroscopic effects noted using the VAS scoring system were confirmed by histological analysis. Representative examples of histological slides are shown in Figures 12 and 13. The histological photomicrographs show that addition of TGF- β 3 proteins in accordance with the invention induces a similar improvement to that seen with "wild-type" TGF- β 3. The proteins of the invention induce the collagen fibres within the scar to have similar morphology and organisation to those in the surrounding normal skin.

4 Conclusions

The flexibility of the alpha helix (between amino acid residues 58-67) impacts on the formation of functional, correctly re-folded, dimeric TGF-Beta 3 during re-folding. Stabilising the alpha helix by substituting Glycine63 with Alanine greatly improves the re-fold efficiency where as destabilising the alpha helix by substituting Glycine63 with Proline has the opposite effect.

Substituting the Glycine 63 with Alanine or Proline does not alter the wound healing compared to 'Wild-type' TGF-Beta 3.

Gly63-Ala and Gly63-Pro reduce scarring compared placebo treated and untreated wounds.

The formation of the 'Salt-Bridge' (between Arg52 and Glu12) does not alter the re-fold efficiency of TGF-Beta 3.

Glu12-Ser and double Serine Mutant reduces scarring compared placebo treated and untreated wounds.

5. Preferred protocols for the production of monomeric or dimeric TGF- β 3s in accordance with the present invention.

Preferred conditions for the generation of correctly refolded monomeric TGF-Beta 3s in accordance with the present invention are as follows:

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.

30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C.

1M NDSB-201, 2mM reduced glutathione (GSH), 2mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C.

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

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.

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.

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

In general a TGF- β 3 in accordance with the present invention may be folded into a dimeric, biologically active form by a method comprising adding the solubilized, unfolded monomeric TGF- β 3 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 TGF- β 3 is formed.

Preferred conditions for the generation of correctly refolded dimeric TGF-Beta 3s in accordance with the present invention are as follows:

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.

30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C.

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

PREFERRED EXPERIMENTAL CONDITIONS:

5.1 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.

DNA encoding TGF- β 3s of the invention may be 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) may be digested in the same manner. The digested cDNA and the large plasmid fragment are agarose gel purified and recovered using the SpinPrep Gel DNA extraction kit (Novagen).

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

5.2 Clone Screening for Product Expression

Clones are 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 are taken 3 hours after the addition of IPTG and analysed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for product induction and expression. Samples from suitable clones 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. Expression of TGF-β3s in accordance with the invention may thus be induced in these cultures.

5.3 Frozen Cell stock

Clones are 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.

5.4 Sequence Confirmation of TGF-Beta 3 Gene.

Samples of cultures used for frozen cell stocks are taken before the addition of glycerol and used for plasmid isolation using a Qiagen MiniPrep Kit. The isolated plasmid is 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').

5.5 Seed Culture.

A selected suitable clone is 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 is incubated with shaking at 37°C and 200rpm and sampled periodically to measure OD₅₅₀. When the OD of the culture reaches 3.21 U/mL (after 7 hours) the cell broth is used to seed a 150L fermenter (100 L working volume).

5.6 Fermentation

Nine hundred millilitres of cell broth (from Section 3.6) is 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 are 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 is 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 reaches 10U/mL a glycerol feed (50% v/v) is initiated at a flowrate of 45mL/min. When OD reaches 40 U/mL, the cells are induced with the addition of IPTG to 0.2mM final concentration.

5.7 Harvest

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

5.8 Cell Lysis and IB Recovery

The fermentation cell paste (from Section 5.7) is 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 is passed twice through a high-pressure homogenizer (parameters: pressure, 10,000 psig; flow rate, 450mL/min; and temperature, 15°C). The homogenised cell lysate is then centrifuged (bucket centrifuge, fixed-angle rotor) at 5,000xg for 20minutes at 4°C. The supernatant is discarded leaving insoluble (inclusion bodies) TGF- β 3. The inclusion body (IB) pellet is 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).

5.9 Inclusion Body Solubilization

The sediment from Section 5.8 is 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 is 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 is adjusted to pH 9.4-9.6 with NaOH/acetic acid before incubation for a second time for 60-75 minutes.

5.10 Clarification/Ultrafiltration and Diafiltration

Solubilized material from Section 5.9 is clarified, concentrated and dia-filtered in a Tangential Flow Filtration (TFF) system (Millipore). Initial clarification and concentration is achieved with a pre-conditioned clarification TFF membrane (Millipore Pellicon 1000kDa, regenerated cellulose, screen V). The clarified TGF- β 3 is collected in the permeate. Switching to a Ultrafiltration/Diafiltration (UF/DF) membrane (Millipore Pellicon 5kDa, regenerated cellulose, screen C), the TGF- β 3 is then washed in 6 diavolumes of Solubilisation Buffer (6.1g/L Tris, 15.4g/L DTT and 360.4g/L urea, pH 9.5).

5.11 Ultrafiltration/ Hydrophobic Interaction Chromatography.

The selected refolding solution is concentrated 5 fold by ultrafiltration (the membrane may be a flat-sheet Millipore Pellicon 5kDa, 0.1m², Regenerated Cellulose, screen). The pH of the concentrated re-fold material is 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) is 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 is filtered through 0.22 μ M 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 is then washed in Buffer A for four-column volumes. The TGF-Beta 3 proteins are 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, is pooled, prior to separation of the monomeric and dimeric proteins.

Sequence Information**TGF- β 3 (Sequence ID No. 1)**

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS

Mutant TGF- β 3 "Gly63-Ala" (Sequence ID No. 3)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADT
 THSTVLALYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS

Mutant TGF- β 3 "Gly63-Pro" (Sequence ID No. 5)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADT
 THSTVLPLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS

Mutant TGF- β 3 "Glu12-Ser" (Sequence ID No. 7)

ALDTNYCFRNLSENCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS

Mutant TGF- β 3 "Arg52-Ser" (Sequence ID No. 9)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLSSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS

Mutant TGF- β 3 "Glu12-Ser/Arg52-Ser" (Sequence ID No. 11)

ALDTNYCFRNLSENCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYANFCSGPCPYLSSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVKCKCS

Sequence ID No. 2 – DNA encoding 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

Sequence ID No. 4 – DNA encoding Gly63-Ala mutant

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 GCA 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

Sequence ID No. 6 -- DNA encoding Gly63-Pro mutant

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 CCA 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

Sequence ID No. 8 -- DNA encoding Glu12-Ser mutant

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG TCG 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

Sequence ID No. 10 -- DNA encoding Arg52-Ser mutant

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 AGC 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

Sequence ID No. 12 -- DNA encoding Glu12-Ser/Arg52-Ser mutant

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG TCG 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 AGC 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

TABLE 1 A helix propensity scale based on experimental studies of proteins and peptides

Amino acid	Helix propensity (kcal/mol)
Ala	0.00
Glu ⁰	0.16
Leu	0.21
Met	0.24
Arg ⁺	0.21
Lys ⁺	0.26
Gln	0.39
Glu ⁻	0.40
Ile	0.41
Asp ⁰	0.43
Ser	0.50
Trp	0.49
Tyr	0.53
Phe	0.54
Val	0.61
Thr	0.66
His ⁰	0.56
His ⁺	0.66
Cys	0.68
Asn	0.65
Asp ⁻	0.69
Gly	1.00
Pro	3.16

81

Table 2

Mutant Nomenclature	Amino Acid Substitution	Effect on Structure
Gly63-Ala	Glycine 63 replaced with Alanine	Stabilises Alpha Helix
Gly63-Pro	Glycine 63 replaced with Proline	Destabilises Alpha Helix
Glu12-Ser	Glutamic acid 12 replaced with Serine	Prevents Salt Bridge Formation
Arg52-Ser	Arginine 52 replaced with Serine	Prevents Salt Bridge Formation
Glu12-Ser and Arg52-Ser	Double substitution in which Glutamic acid 12 is replaced with Serine and Arginine 52 is also replaced with Serine	Prevents Salt Bridge Formation

Table 3

Re-folding Efficiency of wild-type TGF- β 3 and TGF- β 3s of the invention.

TGF-Beta 3 Mutant	Percentage of Correctly folded Dimer
Gly63-Ala	50
'Wild-Type' TGF-Beta 3	20
Gly63-Pro	1
Glu12-Ser	20
Glu12-Ser & Arg52-Ser	20

Table 4

Biological Activity of Wild-Type TGF- β 3 and Gly63-Ala (a TGF- β 3 Protein of the invention) Assessed by Cell Growth inhibition Assay

Protein	IC ₅₀
'Wild-Type' TGF-Beta 3	26pg/mL
Gly63-Ala	34pg/mL

Table 5. Wound site treatment.

Group	Treatment/sample	Concentration (ng/100 μ L)
A	'Wild-type' TGF-Beta 3	50
B	'Wild-type' TGF-Beta 3	100
C	Gly63-Ala	50
D	Gly63-Ala	100
E	Gly63-Pro	50
F	Gly63-Pro	100
G	0.25 M Maltose (Placebo Control)	N/A
H	No treatment (Naïve control)	N/A

Table 6. Wound site treatment.

Group	Treatment/sample	Concentration (ng/100 μ L)
A	'Wild-type' TGF-Beta 3	50
B	'Wild-type' TGF-Beta 3	100
C	Gly63-Ala	50
D	Gly63-Ala	100
E	Gly63-Pro	50
F	Gly63-Pro	100
G	Glu12-Ser	50
H	Glu12-Ser	100
I	Glu12-Ser& Arg52-Ser	50
J	Glu12-Ser& Arg52-Ser	100
K	0.25 M Maltose (Placebo)	N/A
L	Naïve	N/A

84

CLAIMS

1. A TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, wherein the alpha-helix-forming domain between amino acid residues 58 and 67 of full-length wild type TGF- β 3 comprises at least one alpha-helix-stabilising substitution.
2. A TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, according to claim 1, wherein the glycine residue at position 63 of full-length wild type TGF- β 3 is replaced with an alpha-helix-stabilising amino acid residue.
3. A TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, according to claim or claim 2, wherein the alpha-helix-stabilising substitution comprises introduction of a residue selected from the group consisting of Alanine, Serine, Threonine, Valine, Leucine, Isoleucine; Methionine and Phenylalanine.
4. A TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to claim 3, wherein the Glycine residue at position 63 of full-length wild type TGF- β 3 is replaced with alanine.
5. A TGF- β 3 according to claim 4 comprising Sequence ID No. 3, or a fragment or derivative thereof.
6. A TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to any preceding claim, which does not comprise a substitution of the Valine residue at position 61 of full-length wild type TGF- β 3.
7. A TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, wherein the Glycine residue at position 63 of full-length wild type TGF- β 3 is replaced with Proline.
8. A TGF- β 3 according to claim 7 comprising Sequence ID No. 5, or a fragment or derivative thereof.

9. A TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, comprising a substitution of the Glutamic acid residue at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 and/or the Arginine residue at position 52 of full-length wild type TGF- β 3.
10. A TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to claim 9, wherein the substitution, or substitutions, is with an amino acid residue selected from the group consisting of: Serine; Alanine; Threonine; Valine; Isoleucine; Methionine; Phenylalanine; and Leucine.
11. A TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to claim 9 or claim 10, wherein the Glutamic acid residue at position 12 of full-length wild type TGF- β 3 is substituted by Serine
12. A TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to any one of claims 9 to 11, wherein the Arginine residue at position 52 of full-length wild type TGF- β 3 is substituted by Serine.
13. A TGF- β 3 selected from the group consisting of Sequence ID. No. 7, Sequence ID. No. 9 and Sequence ID. No. 11, or a fragment or derivative thereof.
14. A monomeric TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to any one of claims 1 to 13.
15. A dimeric TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to any one of claims 1 to 13.
16. The use of a TGF- β 3, or TGF- β 3 fragment, or a TGF- β 3 derivative, according to any preceding claim as a medicament.
17. The use of a TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, according to any of claims 1 to 15 in the preparation of a medicament for use in the acceleration of wound healing and/or the prevention, reduction or inhibition of scarring.

gb

18. The use of a TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, according to any of claims 1 to 15 in the preparation of a medicament for use in the promotion of epithelial regeneration.
19. The use according to claim 17 or claim 18, wherein the medicament is for use in the skin.
20. The use according to claim 17 or claim 18, wherein the medicament is for use in the eye.
21. The use of a TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, according to any of claims 1 to 15 in the preparation of a medicament for use in the prevention and/or treatment of fibrotic disorders.
22. The use according to claim 22, wherein the fibrotic disorder is selected from the group consisting of lung fibrosis, liver fibrosis, scleroderma, skin fibrosis, muscle fibrosis, radiation fibrosis, kidney fibrosis, proliferative vitreoretinopathy and uterine fibrosis.
23. The use of a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to any one of claims 1 to 15 in the preparation of a medicament for the treatment of angiogenic disorders, restenosis, adhesions, endometriosis, ischemic disease, oral mucositis and renal disease.
24. The use of a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, according to any one of claims 1 to 15 in the preparation of a medicament for use in the induction bone and cartilage, or in *in vitro* fertilisation.
25. A nucleic acid encoding a TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, according to any one of claims 1 to 15.

g

26. A method of accelerating wound healing, and/or preventing reducing or inhibiting scarring, the method comprising providing a therapeutically effective amount of a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, as described in any of claims 1 to 13, to a patient in need thereof.

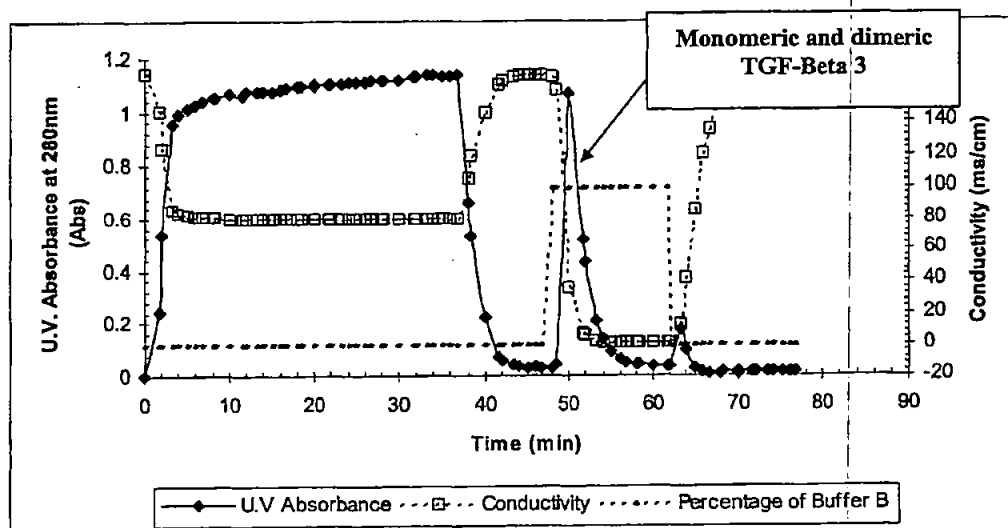
27. A method of preventing and/or treating a fibrotic disorder, the method comprising providing a therapeutically effective amount of a TGF- β 3, or a fragment or derivative thereof, as described in any of claims 1 to 13, to a patient in need of such prevention and/or treatment.

28. A method according to claim 26 or claim 27, wherein the TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, is provided to the skin of the patient.

29. A method according to claim 26 or claim 27, wherein the TGF- β 3, or fragment or derivative thereof, is provided to the eye of the patient.

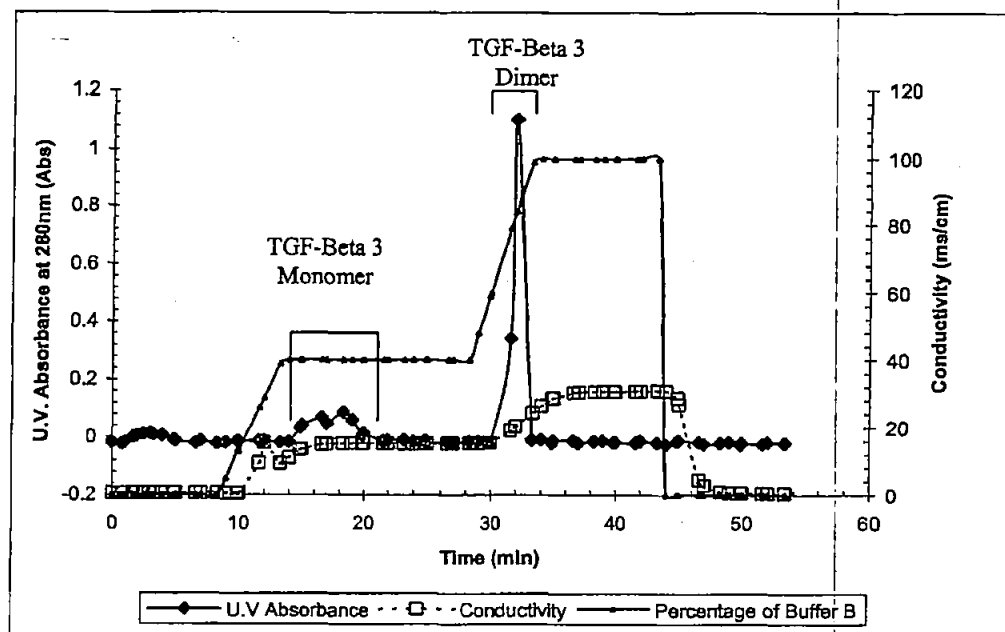
88

Figure 1. Chromatogram of TGF-Beta 3 'Wild-Type' on a Phenyl-Sepharose Column



49

Figure 2. Chromatogram of TGF-Beta 3 'Wild-Type' Monomer and Dimer on UNO-S1 Column.



99

Figure 3. Comparison of TGF-Beta 3 Mutant Proteins and 'Wild-Type' TGF-Beta 3 by SDS-PAGE (Coomassie Blue stained)

Track	Sample	Concentration loaded per track
1	TGF-Beta 3 'Wild-Type'	3 μ g
2	Gly63-Ala	3 μ g*
3	Gly63-Pro	3 μ g*
4	Invitrogen Mark 12 molecular weight standards	10 μ l

* The buffer exchange of Gly63-Ala and Gly63-Pro mutant proteins resulted in some sample loss therefore the actual concentration added to the gel will be less than the 3 μ g stated.

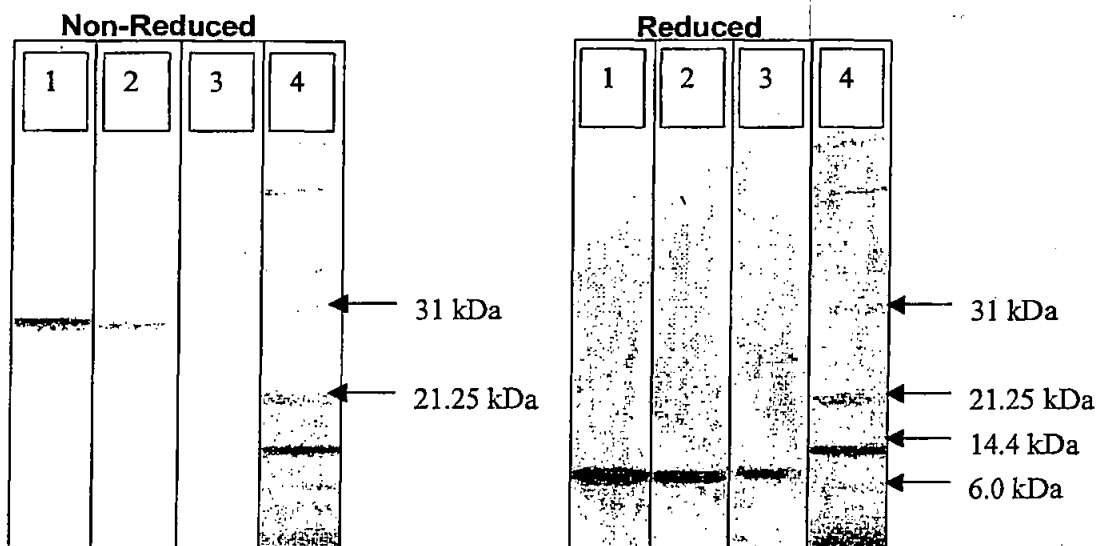
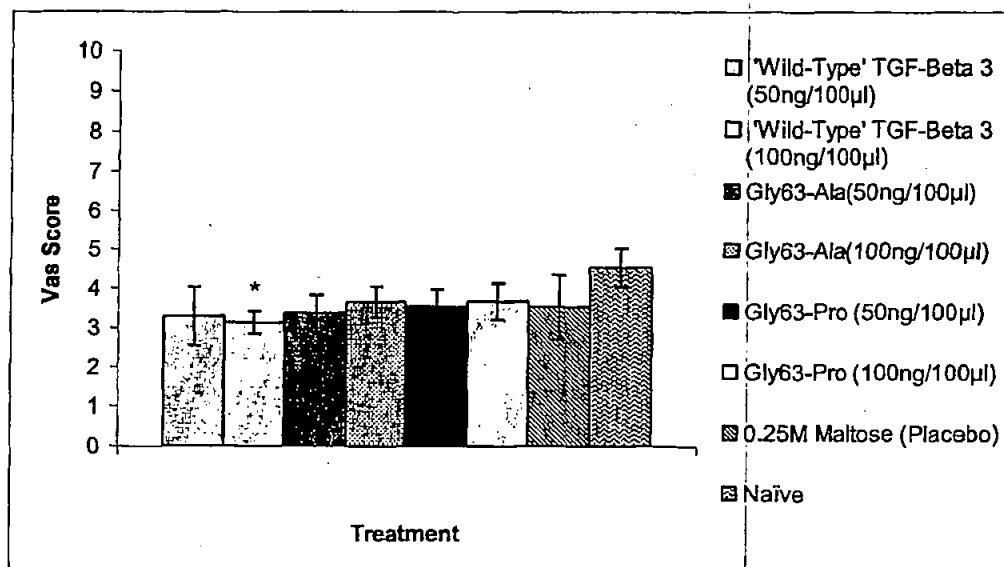


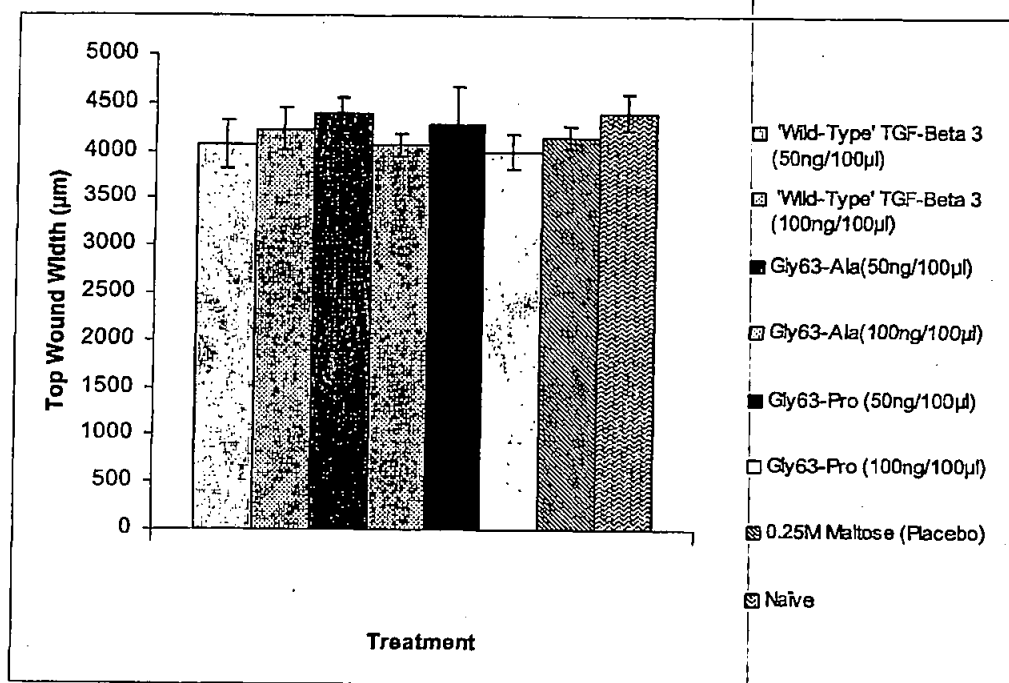
Figure 5. Day 3 Average Macroscore for Incisional wounds (A and B) treated with TGF-Beta 3 Wild-type' and Mutant proteins.



* Significantly increased healing compared to naïve wounds ($p < 0.05$).

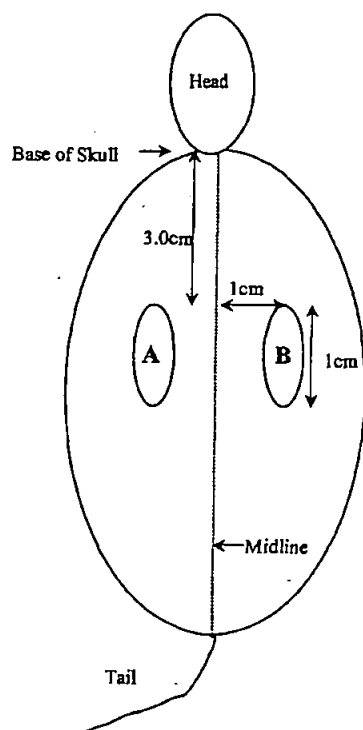
23

Figure 6. Day 3 Microscopic Average Wound Width for Excisional wounds (C and D) Treated with 'Wild-type' and Mutant TGF-Beta 3 proteins.



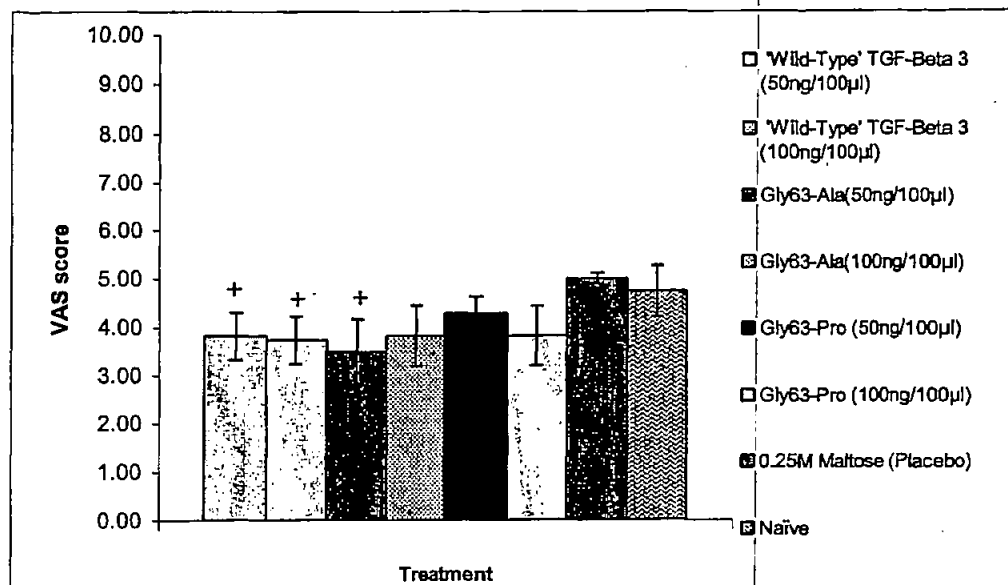
9/16

Figure 7. Template for Incisional Wounding.



98

Figure 8. Day 70 Average Macroscore for Incisional wounds (A and B) treated with 'Wild-type' and Mutant TGF-Beta 3 proteins.

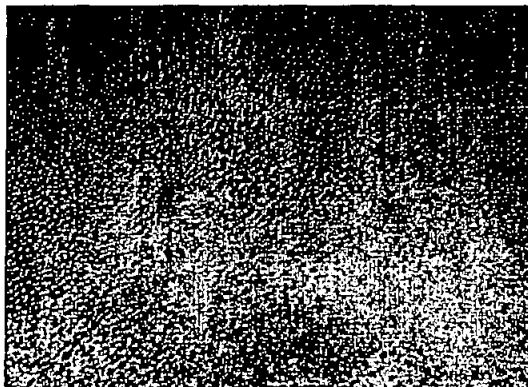


+ Significantly decreased scarring compared to placebo treated wounds ($p < 0.05$)

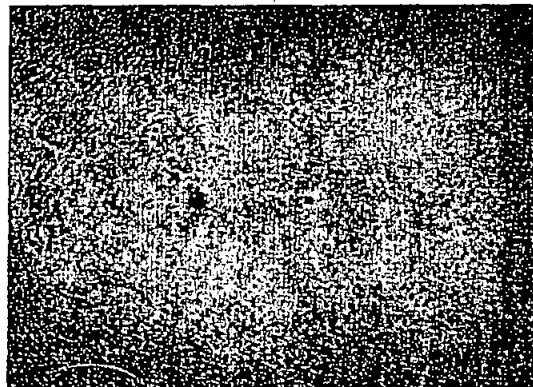
gb

Figure 9. Representative Macroscopic Scar Images (70 days Post wounding)

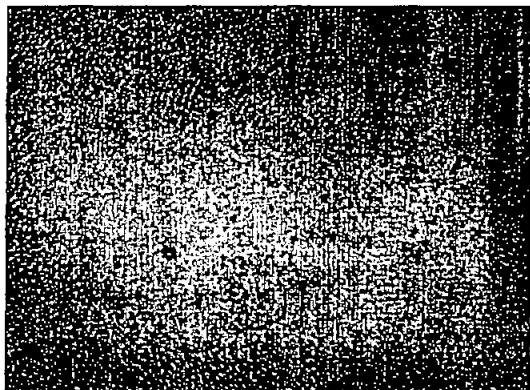
**'Wild-Type' TGF-Beta 3
(50ng/100 μ L)**



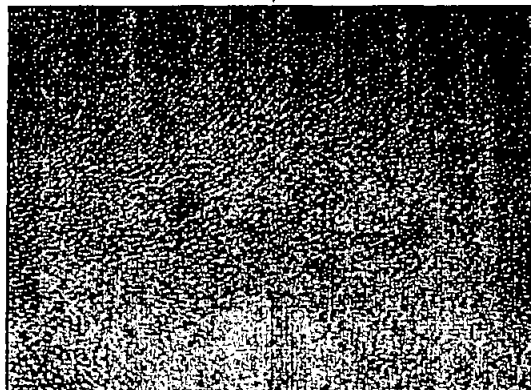
**'Wild-Type' TGF-Beta 3
(100ng/100 μ L)**



**Gly63-Ala TGF-Beta 3
(50ng/100 μ L)**



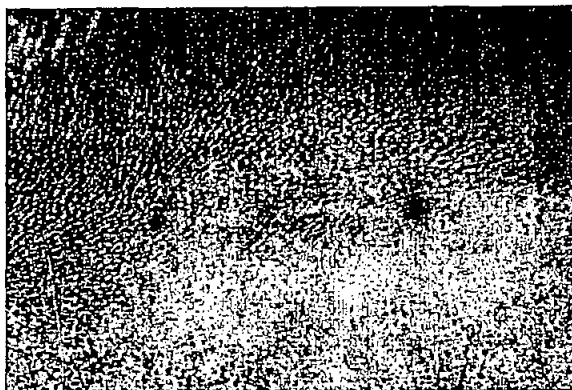
**Gly63-Ala TGF-Beta 3
(100ng/100 μ L)**



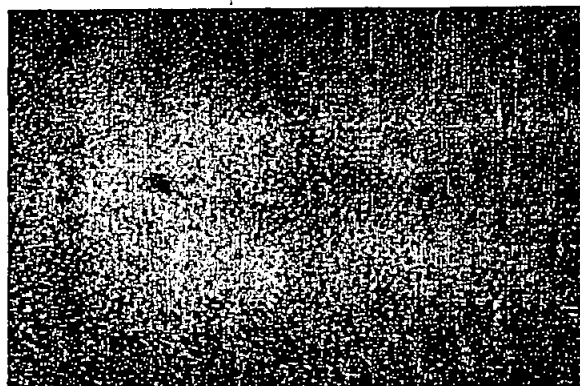
42

Figure 9. Representative Macroscopic Scar Images (70 days Post wounding) Cont'd

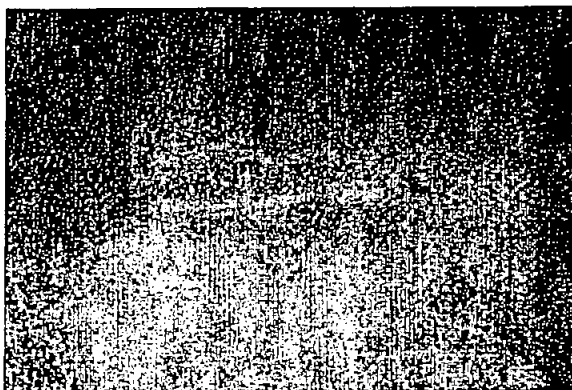
**Gly63-Pro
(50ng/100 μ L)**



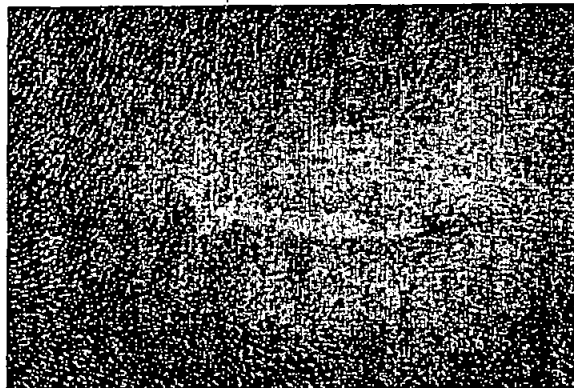
**Gly63-Pro
(100ng/100 μ L)**



**Placebo (0.25M
Maltose)**

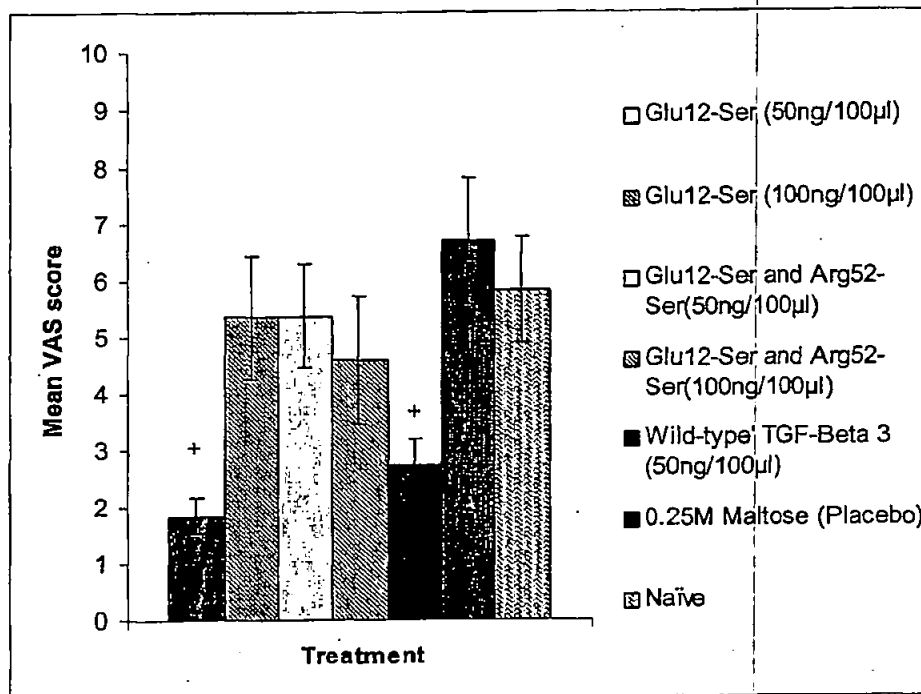


Naïve



98

Figure 10. Day 70 Average Macroscore for Incisional wounds (A and B) treated with 'Wild-type' and Mutant TGF-Beta 3 proteins.

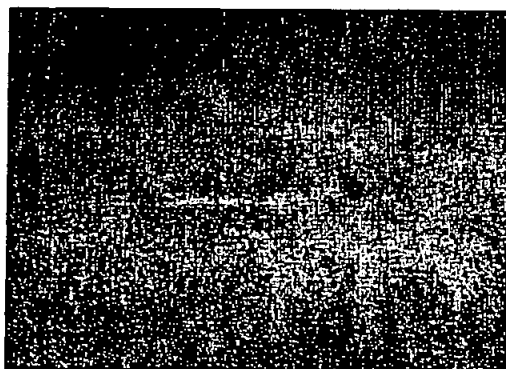


+ Significantly decreased scarring compared to placebo treated wounds ($p < 0.05$)

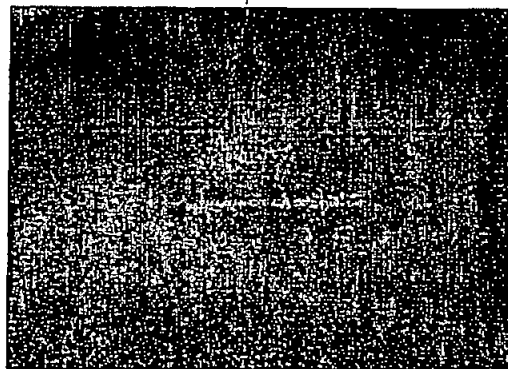
gg

Figure 11. Representative Macroscopic Scar Images (70 days Post wounding)

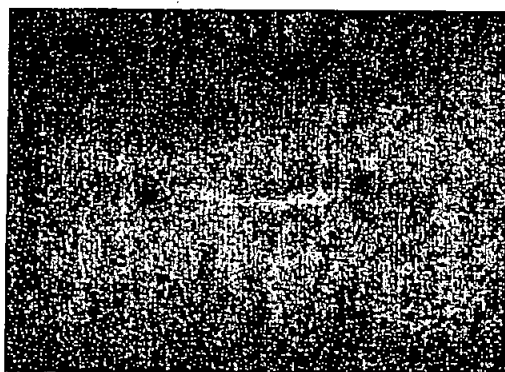
Glu12-Ser (50ng/100 μ L)



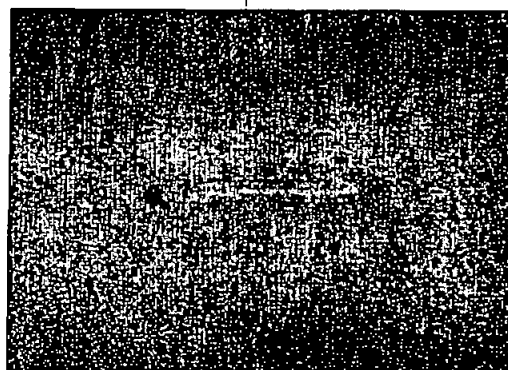
Glu12-Ser (100ng/100 μ L)



**Glu12-Ser & Arg52-Ser
(50ng/100 μ L)**



**Glu12-Ser & Arg52-Ser
(100ng/100 μ L)**



100

Figure 11. Representative Macroscopic Scar Images (70 days Post wounding) Cont'd

Wild-Type TGF-Beta 3(50ng/100 μ L)



Placebo (0.25M Maltose) Control

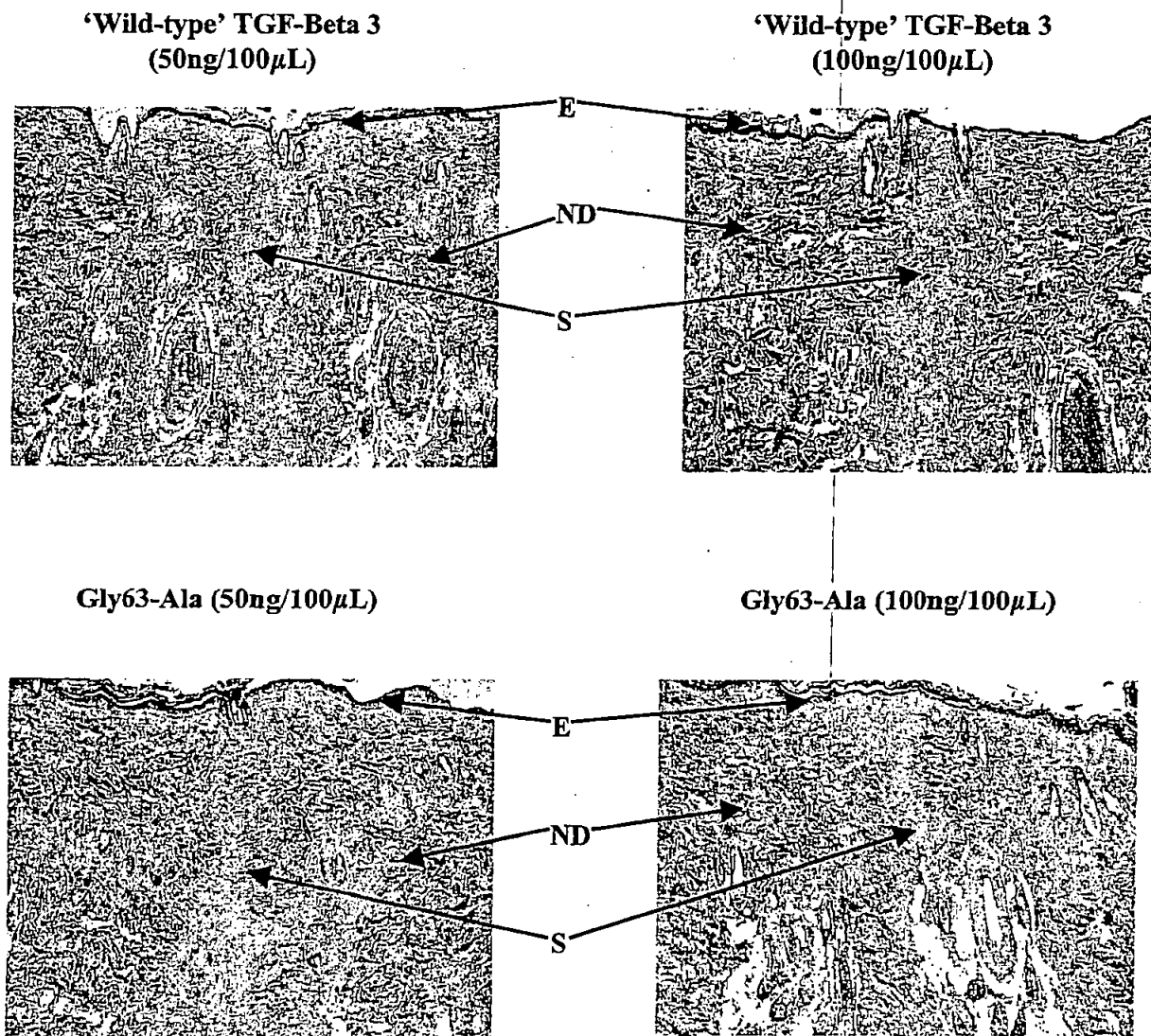


Naïve (Control)



101

Figure 12. Representative Microscopic Scar Images of Wounds Treated with 'Wild-type' TGF-Beta 3, Gly63-Pro and Gly63-Ala Mutant Proteins (70 days Post-Wounding).

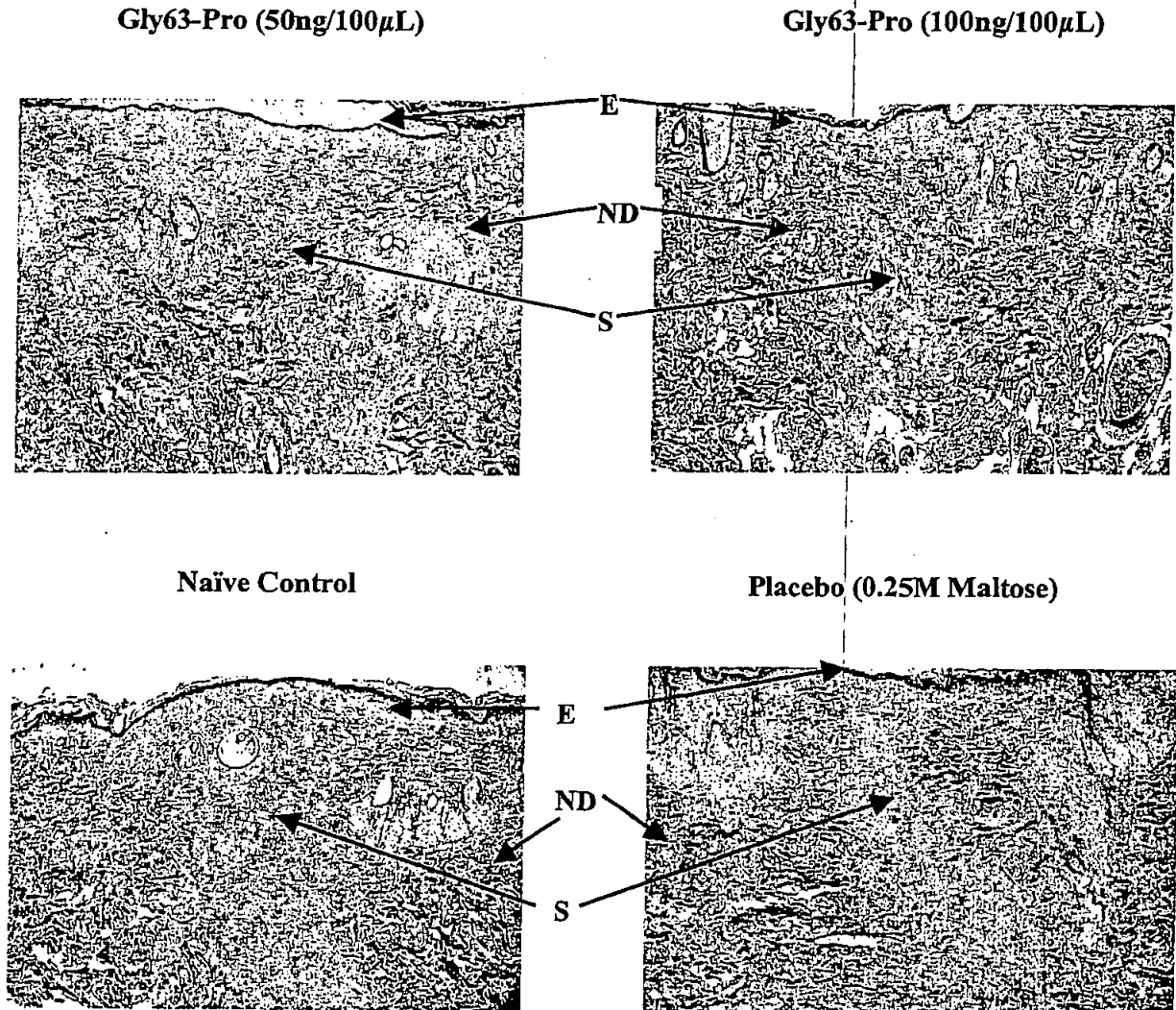


Key

E= Epidermis
ND= Normal Dermis
S= Scar

102

Figure 12. Representative Microscopic Scar Images of Wounds Treated with 'Wild-type' TGF-Beta 3, Gly63-Pro and Gly63-Ala Mutant Proteins (70 days Post-Wounding) Cont'd.

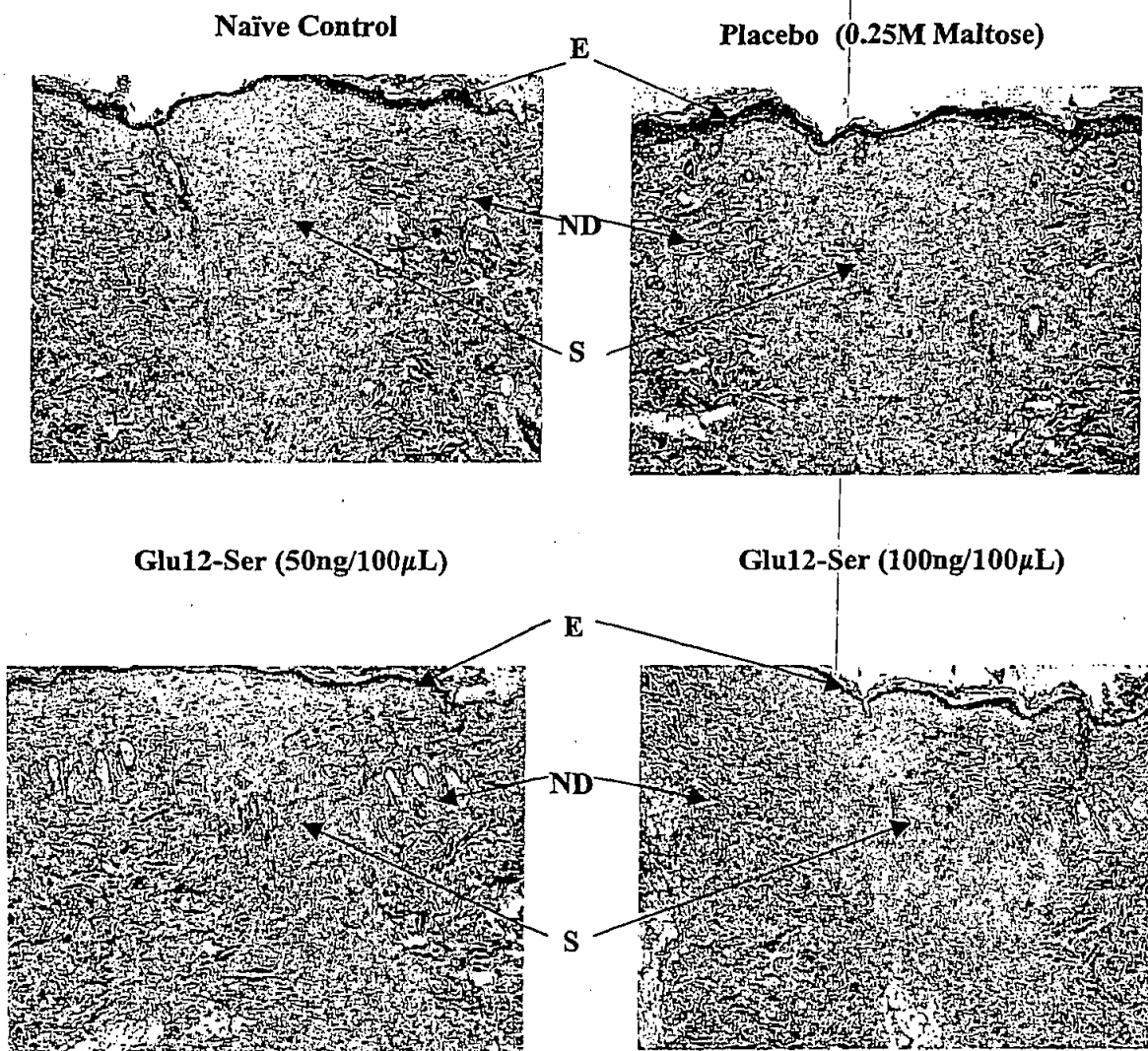


Key

E= Epidermis
ND= Normal Dermis
S= Scar

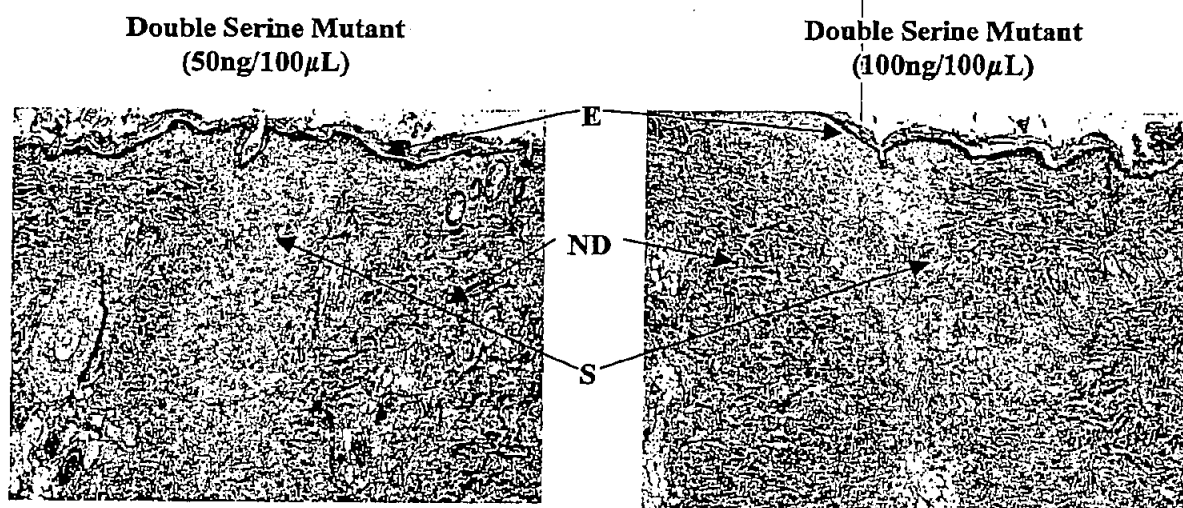
103

Figure 13. Representative Microscopic Scar Images of Wounds Treated with Glu12-Ser and Double Serine mutant (Glu12-Ser and Arg 52-Ser) after 70 days Post-Wounding).



108

Figure 13. Representative Microscopic Scar Images of Wounds Treated with Glu12-Ser and Double Serine mutant (Glu12-Ser and Arg 52-Ser) after 70 days Post-Wounding) Cont'd



Key

E= Epidermis
ND= Normal Dermis
S= Scar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/6B2007/000833

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/495

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)

C07K

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, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/92298 A2 (SEBALD WALTER [DE]; NICKEL JOACHIM [DE]) 6 December 2001 (2001-12-06) figure 1	1-3,5,6, 16-29
A	WO 00/20607 A2 (STRYKER CORP [US]) 13 April 2000 (2000-04-13) claims 1,14,24; figure 1	1-6, 14-29
X	WO 91/05565 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC [US]) 2 May 1991 (1991-05-02) claim 11	9,13-16, 18,25



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, each combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 February 2008

Date of mailing of the international search report

14/03/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 6818 Patentkanal 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

SCHWACHTGEN, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2007/000833

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international searching authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ASA/ 210

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

1. claims: 1-6 (completely); 14-29 (partially)

A TGF-beta3, or a fragment or a derivative thereof, wherein the domain between aa 58 and 67 comprises at least one helix stabilising substitution

2. claims: 7, 8 (completely); 14-29 (partially)

A TGF-beta3, or a fragment or a derivative thereof, wherein the Gly residue at position 63 is replaced with Proline.

3. claims: 11 (completely); 9, 10, 13-29 (partially)

A TGF-beta3, or a fragment or a derivative thereof, comprises a substitution of the Glu residue at position 12.

4. claims: 12 (completely); 9, 10, 13-29 (partially)

A TGF-beta3, or a fragment or a derivative thereof, comprises a substitution of the Arg residue at position 52.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/000833

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0192298	A2	06-12-2001	AU DE	7843501 A 10026713 A1		11-12-2001 06-12-2001
WO 0020607	A2	13-04-2000	AT AU AU CA EP JP JP JP US	364704 T 772930 B2 1103800 A 2344974 A1 1117804 A2 3971107 B2 2002526115 T 2005290016 A 6677432 B1		15-07-2007 13-05-2004 26-04-2000 13-04-2000 25-07-2001 05-09-2007 20-08-2002 20-10-2005 13-01-2004
WO 9105565	A	02-05-1991	AU CA EP JP	6870791 A 2070393 A1 0496833 A1 5501500 T		16-05-1991 19-04-1991 05-08-1992 25-03-1993

108

109

4495

Título: PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLEICOS Y MEDICAMENTOS

Resumen: La invención proporciona TGF- β 3, o fragmentos o derivados de este, en donde el dominio formador de alfa-hélice entre los residuos de aminoácidos (58) y (67) de TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa comprende al menos una sustitución para estabilizar la alfa hélice.

La invención también proporciona los TGF- β 3, o fragmentos o derivados de este, en donde el residuo glicina de la posición (63) de los TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa está reemplazado con prolina. Aún otra invención proporciona los TGF- β 3, o fragmentos o derivados de este, que comprende una sustitución del residuo de ácido glutámico de la posición (12) del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa y/o el residuo de arginina de la posición (52) del de TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa. La invención también proporciona medicamentos y métodos de tratamiento mediante dichos de TGF- β 3.

110

PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLEICOS Y MEDICAMENTOS

La presente invención a proteínas derivadas de TGF- β 3, a fragmentos biológicamente activos de dichas proteínas, y también a dichos ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas. La invención también proporciona derivados de dicha proteínas o fragmentos biológicamente activos. La invención además proporciona medicamentos que comprenden las proteínas, fragmentos, derivados de ácidos nucleicos de la invención, así como métodos de tratamiento que utilizan las proteínas, fragmentos, derivados o ácidos nucleicos.

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) de los factores de crecimiento está involucrada en la regulación de muchos procesos celulares que incluye proliferación, migración, apoptosis, adhesión, diferenciación, inflamación, inmunosupresión y expresión de proteínas extracelulares.

Existen tres isoformas de mamíferos de TGF- β , denominadas TGF- β 1, TGF- β y TGF- β 3. Las TGF- β son producidas prácticamente por todos los tipos celulares que incluyen células de tejido epitelial, endotelial, hematopoyético, neuronal, y conectivo.

Los TGF- β tienen utilidad en muchos contextos terapéuticos diferentes y la isoforma TGF- β 3 en particular tiene muchos usos terapéuticos ventajosos. Como resultado del potencial terapéutico de los TGF- β 3 existe mucho interés en la sus aplicaciones farmacéuticas. La secuencia de aminoácidos de TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa se expone en la Secuencia ID No. 1, y el ADNc que codifica este TGF- β 3 se expone en la Secuencia ID No. 2.

TGF- β 3 es conocidos por cumplir una función crucial en la regulación de la respuesta de curación de heridas. La actividad de TGF- β 3 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 3 también se puede usar en el tratamiento de los trastornos fibróticos, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, escleroderma, trastornos de angiogénesis, restenosis, adhesiones, endometriosis, enfermedad isquémica, inducción de cartílago y hueso, 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 usos terapéuticos en los que se usan TGF- β 3 por sí mismo han establecido una bien reconocida necesidad de fuentes de proteínas TGF- β 3 biológicamente activas, y se han realizado numerosos intentos para producir esta valiosa proteína por métodos recombinantes. Sin embargo, los procesos existentes para la producción de TGF- β 3 están muy limitados debido a la necesidad de replegar la proteína del complejo con el fin de obtener moléculas biológicamente activas.

Los TGF- β existen naturalmente como proteínas homodiméricas compuestas de 112 subunidades de aminoácidos. Cada uno de estas subunidades de TGF- β 3 contiene un dominio formador de alfa hélice entre los residuos 58^{vo} y 67^{vo} del fragmento del péptido activo. Además de la alfa hélice entre los residuos 58 y 67, cada

112

subunidad de TGF- β 3 también contiene numerosas uniones entre intra-subunidades que incluye puentes salinos y enlaces disulfuroas.

El TGF- β 3 se secreta como moléculas precursoras inactivas latentes de 100 kDa (LTGF- β 3). La molécula LTGF- β 3 consiste en:

- i) péptido señal dimérico de C-terminal de 25 kDa (fragmento activo) y
- ii) péptido asociado latente (LAP).

LTGF- β 3 se activa por la disociación de LAP del fragmento activo. La escisión de LTGF- β 3 puede estar mediada por las endopeptidasas tales como furina, plasmina, trombina y la acidificación del espacio pericelular. El fragmento dimérico activo de TGF- β 3 liberado se estabiliza por interacciones hidrofóbicas, que además están reforzadas por un puente disulfuro entre las subunidades. Además cada monómero comprende varias cadenas beta extendidas entrelazadas por tres o cuatro enlaces intra-disulfuro y forma una estructura apretada conocida como "nudo de cisteína".

Debido a la complejidad de las moléculas de TGF- β 3 biológicamente activas (que son como se describió anteriormente, proteínas homodiméricas con 8 enlaces disulfuro intracatenarios y un enlace disulfuro entre cadenas), ellas se expresaron originalmente en organismos eucarióticos. Sin embargo, debido a los niveles de expresión de expresión relativamente bajos que se pueden obtener en los sistemas de expresión eucarióticos, en combinación con los altos costos de dichos procesos, se investigó el uso de huéspedes microbianos con el fin de intentar mejorar la eficiencia comercial de la producción de TGF- β 3.

113

La desventaja de usar huésped microbianos tales como *E.coli* para expresar moléculas recombinantes, tales como TGF- β 3, que contiene múltiples enlaces disulfuro es que las proteínas producidas normalmente se pliegan incorrectamente y con frecuencia forman cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión requieren la solubilización seguida por la renaturalización para permitir que la proteína se repliegue en su conformación nativa biológicamente activa. Para renaturalizar efectivamente el homodímero de TGF- β 3, se necesita regenerar los enlaces disulfuro covalentes en la orientación correcta. La probabilidad de formar el homodímero de TGF- β 3 correcto a partir del proceso de formación de enlaces disulfuro aleatorios es baja dado que existen nueve puentes disulfuro que permiten 34.459.245 combinaciones posibles de enlaces disulfuro. En consecuencia no sorprende que el replegamiento de TGF- β 3 producido en forma recombinante puede impactar gravemente en su fabricación, ya que este replegamiento puede llevar hasta 144 horas, y normalmente se obtiene solo eficiencias de replegamiento en la región del 20%.

Es un objetivo de la presente invención obviar a aliviar al menos algunos de los problemas asociados con el arte previo. Es un objetivo de la de ciertos aspectos de la presente invención proporcionar TGF- β 3 (o fragmentos o derivados de este) que tienen mejor eficiencia de replegamiento en comparación con el TGF- β 3 de tipo salvaje. Es otro objetivo de ciertos aspectos de la presente invención proporcionar agentes diferentes que los TGF- β 3 de tipo salvaje que tengan actividad de TGF- β 3. Dichos agentes pueden proporcionar alternativas valiosas los TGF- β 3 naturales.

114

En un primer aspecto de la presente invención proporciona un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, en donde el dominio formador de doble hélice entre los residuos de aminoácidos 58 y 67 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa comprende al menos una sustitución para estabilizar la alfa hélice. La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Los inventores han hallado en forma sorprendente que los nuevos TGF- β 3 descriptos en el primer aspecto de la invención comparten la misma actividad biológica que TGF- β 3 natural, y mejor eficiencia de replegamiento en comparación con el TGF- β 3 tipo salvaje. Esta eficiencia de replegamiento aumentada constituye una destacada e importante ventaja ya que simplifica las condiciones de replegamiento que se pueden usar para producir TGF- β 3 biológicamente activos y también aumenta mucho el rendimiento de dichas proteínas (o fragmentos o derivados de dichas proteínas) que se pueden producir usando sistemas de expresión procarióticos.

Sin desear estar ligado a ninguna hipótesis, los inventores consideran que la introducción de una sustitución para estabilizar la alfa hélices en el dominio formador de doble hélice disminuye ventajosamente la flexibilidad de la alfa hélice formada por este dominio. Esta flexibilidad disminuida ayuda a promover el replegamiento apropiado de los TGF- β 3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención para producir proteínas biológicamente activas (o fragmentos o derivados de estas). La flexibilidad disminuida impartida por la estabilización de la alfa hélice a través de la sustitución para estabilizar alfa hélices es suficiente

115

para aumentar los rendimientos de los TGF- β 3 replegados correctamente (en particular TGF- β 3 dimérico replegado), pero de modo sorprendente, los inventores hallaron que dichas sustituciones no alteran la actividad biológica de los TGF- β 3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención, ni estos disminuyen su efectividad biológica y terapéutica.

Excepto donde el contexto requiera lo contrario, la numeración de residuos de aminoácidos en la presente memoria descriptiva se basa en la secuencia de aminoácidos de las porciones peptídicas activas de los TGF- β 3. Por ejemplo, las referencias a "TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa" en general se refieren a la secuencia de aminoácidos del péptido activo que se muestra en la Secuencia ID No. 1, y las referencias al dominio formador de doble hélice entre los residuos de aminoácidos 58 y 67 se deben interpretar conforme a ello.

Una sustitución para estabilizar la alfa hélice con preferencia puede comprender una sustitución del residuo glicina de la posición 63 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa. Sin embargo, las sustituciones adecuadas en forma alternativa o adicional pueden comprender sustituciones de, por ejemplo, uno o ambas treoninas de las posiciones 60 o 67 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa, o of the Asparagine de la posición 66 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa. Se puede preferir que la sustitución para estabilizar la alfa hélices para uso de acuerdo con la invención no comprenda la sustitución de valina 61.

Se debe entender que una "sustitución para estabilizar la alfa hélice" de acuerdo con la presente invención es una sustitución en la que un residuo de aminoácido dado presente en TGF- β 3 tipo salvaje está sustituido con un

116

residuo de reemplazo que tiene una mayor propensión a la formación de alfa hélice. En consecuencia el residuo de reemplazo del aminoácido introducido en una sustitución para estabilizar la alfa hélice no debe ser necesariamente uno que por sí mismos este predispuesto a la integración estable en alfa-hélices estables, sino que solo necesita tener una mayor propensión a la integración estable que el aminoácido sustituido. Sin embargo, en general se puede preferir que un aminoácido de reemplazo introducido como parte de una sustitución para estabilizar la alfa hélice sea un residuo de aminoácido que favorece la integración en una alfa hélice.

Los inventores han hallado que los residuos de aminoácidos de reemplazo preferidos que se pueden introducir en la sustitución para estabilizar la alfa hélices de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede ser uno o una combinación de aminoácidos seleccionados del grupo que comprende: alanina, serina, treonina, valina, leucina, isoleucina; metionina y fenilalanina. Estos residuos de aminoácidos de reemplazo preferidos son todos los que se consideran adecuados para usar en la sustitución para estabilizar la alfa hélices del residuo glicina de la posición 63 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa. Es decir, los residuos de aminoácidos de reemplazo seleccionados de este grupo pueden sustituir alguna posición del dominio formador de doble hélice entre los residuos de aminoácidos 58 y 67 en que estos pueden proporcionar una sustitución para estabilizar la alfa hélice.

Si bien los residuos de aminoácidos enumerados anteriormente representan los residuos preferidos para usar en la sustitución para estabilizar la alfa hélices, se apreciará que existen numerosos sistemas cualitativos

112

y cuantitativos alternativos por los cuales se puede medir la propensión de un residuo de aminoácido a contribuir la formación de alfa hélice (y en consecuencia la adecuación del residuo para uso en una sustitución para estabilizar la alfa hélice) y que los residuos de aminoácidos adecuados para uso en la sustitución para estabilizar la alfa hélices se pueden seleccionar con referencia a cualquiera de los sistemas en combinación con conocimiento de la secuencia de TGF- β 3.

A modo de ejemplo, un sistema cualitativo descrito por Chou y Fasman identifica cinco clasificaciones diferentes de residuos de aminoácidos sobre la base de su propensión a la formación de alfa hélice. En orden, estos son:

- Formadores de hélices fuertes;
- Formadores de hélices débiles;
- Formas indiferentes;
- disruptores de hélice débiles;
- y disruptores de hélice fuertes.

Para los fines de la presente memoria descriptiva, los residuos de aminoácidos ácido glutámico, histidina, triptofano, lisina, alanina, metionina, valina, isoleucina, leucina, glutamina y fenilalanina se pueden considerar formadores de hélice, con glutamina, metionina, alanina y leucina que constituyen los formadores de hélice fuertes. En contraste, asparagina, glicina y prolina se pueden considerar disruptores de hélice, con glicina y prolina como los disruptores de hélice fuertes.

De este modo, si la propensión a la formación de alfa hélice se evalúa con referencia a esta escala cualitativa, se reconocerá que, si bien una sustitución para estabilizar la alfa hélice con preferencia puede ser

1/18

una en la que un residuo de aminoácido se reemplaza con un formador de hélice, la sustitución adecuada para estabilizar las alfa hélices pueden usar en forma alternativa formas indiferentes o incluso disruptores de hélice, lo que depende de la naturaleza del residuo de aminoácido que se reemplaza. Por ejemplo, en el caso que un residuo de aminoácido de forma indiferente sea el sujeto de una sustitución para estabilizar la alfa hélice, un residuo de aminoácido de reemplazo adecuado puede ser un formador de hélice fuerte o un formador de hélice débil. En el caso que un formador de hélice fuerte sea sujeto de una sustitución para estabilizar la alfa hélice, residuo de aminoácido de reemplazo adecuado puede ser un formador de hélice fuerte, un formador de hélice débil, un aminoácido de forma indiferente o un disruptor de hélice débil.

Por consiguiente, una sustitución para estabilizar la alfa hélice de acuerdo con la presente invención puede comprender la sustitución de un disruptor de hélice fuerte con un disruptor de hélice débil, o un residuo de aminoácido de forma indiferente, o un formador de hélice débil, o un formador de hélice fuerte. En forma alternativa o adicional, una sustitución adecuada para estabilizar la alfa hélice puede comprender la sustitución de un disruptor de hélice débil con una forma indiferente, un formador de hélice débil, o un formador de hélice fuerte. En forma alternativa o adicional, una sustitución adecuada para estabilizar la alfa hélice puede comprender sustitución de un aminoácido de forma indiferente con un formador de hélice débil o un formador de hélice fuerte. En forma alternativa o adicional, una sustitución adecuada para estabilizar la alfa hélice

119

puede comprender la sustitución de un formador de hélice débil con un formador de hélice fuerte.

Una evaluación alternativa de la propensión de un residuo de aminoácido para la formación de alfa hélice, y en consecuencia su adecuación para utilizarlo como parte de una sustitución para estabilizar la alfa hélice, se puede basar en alguna de las numerosas escalas cuantitativas conocidas por los expertos en el arte.

Un ejemplo de dicha escala cuantitativa que se puede usar para determinar la adecuación de un residuo de aminoácido para el uso en una sustitución para estabilizar la alfa hélice se expone en la Tabla 1. Esta tabla proporciona valores, calibrados en kcal/mol, que reflejan la propensión de los aminoácidos a contribuir en la formación de alfa hélice. UN alto valor en la Tabla 1 se asocia con una baja tendencia a la formación de alfa hélice.

En consecuencia, cuando se evalúa la adecuación de un residuo de aminoácido para usar en una sustitución para estabilizar la alfa hélice, como se requiere en el primer aspecto de la invención usando una escala cuantitativa, tal como la que es expone en la Tabla 1, una sustitución adecuada para estabilizar la alfa hélice es una en que un residuo de aminoácido está sustituido con un residuo de aminoácido de reemplazo que tiene una propensión a formar hélices mayor (indicado en la Tabla 1 por valor de kcal/mol menor) que el residuo que se reemplaza.

Las sustituciones adecuadas que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen las que introducen aminoácidos de reemplazo artificiales. Los ejemplos adecuados de aminoácidos artificiales que se pueden usar beneficiosamente para estabilizar las alfa-hélices

incluyen los residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales de alquilo e hidroxilo.

Alanina representa un residuo de aminoácido de reemplazo particularmente preferido adecuado para usar en la sustitución para estabilizar la alfa hélices. Es de máxima preferencia que un TGF- β 3 o fragmento o derivado de este, de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprenda el reemplazo de glicina de la posición 63 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa con alanina.

La secuencia de aminoácidos de un TGF- β 3 preferido de acuerdo con el primer aspecto de la invención se expone en la Secuencia ID No. 3 (Gly-63Ala), y ADN que codifica este TGF- β 3 se expone en la Secuencia ID No. 4. Los fragmentos o derivados del TGF- β 3 de la Secuencia ID No. 3 que contienen la sustitución de alanina de la posición 63 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa representan los fragmentos de TGF- β 3 o derivados preferidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Una sustitución adecuada puede ser una en que uno o más residuos de aminoácidos ubicados entre 58 y 67 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa se reemplazan con uno o más residuos de aminoácidos naturales o artificiales. A modo de clarificación adicional, las sustituciones adecuadas pueden involucrar la sustitución de un residuo de aminoácido único con uno o más residuos de reemplazo, o la sustitución de más de un residuo de aminoácidos con uno o más residuos de reemplazo. Una sustitución preferida puede ser una en que el número de residuos está conservado, es decir, uno en que el número de residuos de aminoácidos sustituido es el mismo que el número de residuos de aminoácidos de reemplazo introducidos.

121

También se apreciará que el residuo de aminoácido (o residuos) preferido para reemplazar se pueden seleccionar con referencia a las escalas cualitativas o cuantitativas descriptas anteriormente. En consecuencia un aminoácido adecuado es el sujeto de una sustitución para estabilizar la alfa hélice puede ser uno clasificado como disruptor de hélice, o con preferencia un disruptor de hélice fuerte, seleccionar con referencia a la escala cualitativa descripta anteriormente. Con referencia a la escala cuantitativa expuesta en la Tabla 1, un aminoácido adecuado es el sujeto de una estabilización de alfa hélice con preferencia puede ser uno con un valor de propensión a hélice mayor o igual a 0,50, con más preferencia con un valor de propensión a hélice mayor o igual a 0,60, y con máxima preferencia con un valor de propensión a hélice de 1,00.

Los inventores consideran que los TGF- β 3, o sus fragmentos biológicamente activos o derivados, de acuerdo con el primer aspecto de la invención se pueden usar en todos los contextos en que se desee usar las actividades biológicas de TGF- β 3 tipo salvaje. Estas incluyen en particular, pero sin limitación, usos terapéuticos. De acuerdo con este uso terapéutico, la invención también proporciona el uso de un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con el primer aspecto de la invención como un medicamento.

Se apreciará que, si bien se prefiere que un fragmento o derivado de un TGF- β 3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprenda el dominio formador de alfa hélice de longitud completa que contiene una sustitución para estabilizar la alfa hélice, esto no debe ser necesariamente el caso. Un fragmento o derivado adecuado puede comprender un dominio formador de alfa hélice

truncado siempre que este dominio formador de alfa hélice comprenda al menos una sustitución para estabilizar la alfa hélice.

En un segundo aspecto la invención proporciona un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, en donde el residuo glicina de la posición 63 de TGF- β 3 tipo salvaje de longitud completa está reemplazado con prolina. La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

Los inventores hallaron en forma sorprendente que las proteínas de acuerdo con el segundo aspecto de la invención (o sus fragmentos o derivados) tienen actividad biológica comparable a la del TGF- β 3 tipo salvaje. Este hallazgo es inesperado, ya que se puede pensar que la presencia de prolina en una región de TGF- β 3 normalmente asociada con la formación de alfa hélice debería interferir en la estructura secundaria de dichas proteínas y de este modo alterar su función biológica. Si bien la eficiencia de replegamiento de los TGF- β 3 de acuerdo con el segundo aspecto de la invención es menor que la de TGF- β 3 tipo salvaje, el deterioro previsto de la función sorprendentemente no se produce.

En consecuencia, las proteínas de acuerdo con el segundo aspecto de la invención (o sus fragmentos o derivados) proporcionan una valiosa contribución al arte ya que expanden el repertorio de compuestos capaces de ejercer la actividad de TGF- β 3 que están disponibles para los expertos. Dichos compuestos, por ejemplo, se pueden usar en contextos en que se desea usar la actividad de TGF- β 3 en forma terapéutica.

La secuencia de aminoácidos de un TGF- β 3 preferido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención se expone en la Secuencia ID No. 5 (Gly-63Pro), y ADN que codifica este TGF- β 3 se expone en la Secuencia ID No. 6. Los fragmentos o derivados del TGF- β 3 de la Secuencia ID No. 5 que contiene la sustitución de prolina de la posición 63 de TGF- β 3 tipo salvaje de longitud completa representan el fragmento de TGF- β 3 o derivados preferidos de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

Dado que los TGF- β 3, o sus fragmentos o derivados, de acuerdo con el segundo aspecto de la invención se pueden usar en contextos en los que se desea utilizar la actividad biológica terapéutica de TGF- β 3 tipo salvaje se apreciará que también se proporciona el uso de los TGF- β 3, o sus fragmentos o derivados, de acuerdo con el segundo aspecto de la invención como medicamentos. Los inventores consideran que dichos medicamentos se pueden usar en todos los contextos clínicos en los que es conocido el empleo de la actividad biológica de TGF- β 3.

En un tercer aspecto de la invención se proporciona un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, que comprende una sustitución del residuo de ácido glutámico de la posición 12 TGF- β 3 tipo salvaje de longitud completa y/o el residuo de arginina de la posición 52 del TGF- β 3 tipo salvaje de longitud completa. La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

Se apreciará que el tercer aspecto de la invención en consecuencia abarca los TGF- β 3 en los que el ácido glutámico de la posición 12 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa está sustituido pero la arginina de la posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud

124

completa está retenido. El tercer aspecto de la invención también abarca los TGF- β 3 en los que el ácido glutámico de la posición 12 de TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa está retenido pero la arginina de la posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa está sustituida.

Sin embargo, se prefiere que los TGF- β 3 de acuerdo con el tercer aspecto de la invención comprendan sustituciones tanto del residuo de ácido glutámico de la posición 12 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa como del residuo arginina de la posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa.

Los inventores hallaron en forma sorprendente que las proteínas de acuerdo con el tercer aspecto de la invención también tienen actividad biológica comparable a la del TGF- β 3 de tipo salvaje. Este hallazgo es inesperado, ya que la sustitución de uno o ambos residuos de ácido glutámico de la posición 12 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa y/o el residuo de arginina de la posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa altera la formación de uno de los puentes salinos intra-subunidades hallados normalmente en TGF- β 3 tipo salvaje. Se puede esperar que esta falla para completar la formación del puente salino apropiado reduzca la actividad biológica de los TGF- β 3 de acuerdo con el tercer aspecto de la invención debido a que generalmente se considera que la actividad biológica de las proteínas tales como los TGF- β 3 es dependiente de su conformación.

Además, los inventores también han hallado que los TGF- β 3 de acuerdo con el segundo aspecto de la invención exhiben una eficiencia de replegamiento exitosa que es exactamente tan alta como la observada para TGF- β 3 tipo

125

salvaje. Este hallazgo es muy sorprendente, debido a que los expertos en el arte esperarían que la falta de formación del puente salino intra-subunidades que debe ocurrir en los TGF- β 3 de acuerdo con el segundo aspecto de la invención debiera impactar en forma deletérea en los casos de replegamiento y en consecuencia disminuye el rendimiento de un TGF- β 3 biológicamente activo.

En consecuencia las proteínas de acuerdo con el tercer aspecto de la invención sirven expandir el repertorio de compuestos capaces de ejercer la actividad de TGF- β 3 que están disponibles para los expertos. Como se indicó anteriormente, esta disponibilidad de dichos compuestos es de importancia en contextos en los que se desea usar la actividad de TGF- β 3 en forma terapéutica.

Los inventores hallaron que uno u otro del ácido glutámico de la posición 12 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa o la arginina de la posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa se puede sustituir con algún un residuo de aminoácido (o cualquier combinación de residuos de aminoácidos) seleccionado del grupo que comprende serina, alanina, treonina, valina, isoleucina, metionina, fenilalanina y leucina.

Se prefiere que la serina se use como un residuo de aminoácido de reemplazo en los TGF- β 3, o sus fragmentos o derivados, de acuerdo con el tercer aspecto de la invención. La serina se puede usar como reemplazo para el ácido glutámico de la posición 12 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa o la arginina de la posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa. Con máxima preferencia la serina se usa para reemplazar tanto el ácido glutámico de la posición 12 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa como la arginina de la

126

posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa.

Un primer ejemplo del TGF- β 3 preferido de acuerdo con el tercer aspecto de la invención se expone en la Secuencia ID No. 7. La invención abarca fragmentos biológicamente activos o derivados de la Secuencia ID No. 7 que comprenden la sustitución Glu12-Ser. El ADNc que codifica este TGF- β 3 preferido se expone en la Secuencia ID No. 8.

Un segundo ejemplo de un TGF- β 3 preferido de acuerdo con el tercer aspecto de la invención se expone en la Secuencia ID No. 9. Los fragmentos biológicamente activos o derivados de la Secuencia ID No. 9 que comprenden la sustitución Arg52-Ser también constituyen los fragmentos o derivados preferidos de acuerdo con la invención. El ADNc que codifica este TGF- β 3 preferido se expone en la Secuencia ID No. 10.

Un tercer ejemplo de un TGF- β 3 preferido de acuerdo con el tercer aspecto de la invención se expone en la Secuencia ID No. 11. Los fragmentos biológicamente activos o derivados de la Secuencia ID No. 11 que comprende tanto la sustitución Glu12-Ser y la sustitución Arg52-Ser también constituyen los fragmentos o derivados preferidos de acuerdo con la invención. El ADNc que codifica este TGF- β 3 preferido se expone en la Secuencia ID No. 12.

Los inventores consideran que los TGF- β 3, o sus fragmentos o derivados biológicamente activos, de acuerdo con el tercer aspecto de la invención se pueden usar en todos los contextos en los que se puede hacer uso de las actividades biológicas del TGF- β 3 tipo salvaje. Estas incluyen, pero sin limitación, usos terapéutico de TGF- β 3. Por consiguiente la invención también proporciona el

127

uso de un TGF- β 3 o fragmento o derivado de este, de acuerdo con el tercer aspecto de la invención como medicamento.

Los TGF- β 3 de la invención, o fragmentos o derivados biológicamente activos, se pueden usar en el tratamiento de heridas (que incluyen heridas crónicas tale como úlceras). Estos se pueden usar en particular para promover la curación de heridas acelerada con prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices, y/o promover la reepitelización de heridas. Los TGF- β 3 de la invención también se pueden usar para la prevención o tratamiento de de trastornos fibróticos, que se pueden seleccionar de modo independiente del grupo que comprende fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, escleroderma y glomerulonefritis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar, fibrosis cutánea, fibrosis muscular, fibrosis por radiación, fibrosis renal, vitrorretinopatía proliferativa y fibrosis uterina.

Los TGF- β 3 de la invención se pueden usar en el tratamiento de escleroderma, trastornos de angiogénesis, restenosis, adhesiones, endometriosis, enfermedad isquémica, inducción de cartílago y hueso, 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; reducen la incidencia, gravedad y duración de la mucositis oral; y reducen los efectos adversos del síndrome gastrointestinal por radiación resultante del daño a las células madre causado por la radioterapia o quimioterapia durante el tratamiento del cáncer. Los inventores consideran que los TGF- β 3 de la invención, o sus

128

fragmentos o derivados, se pueden usar en forma benficiosa en todas estas indicaciones.

Los TGF- β 3 de la invención se pueden usar de la misma manera que el TGF- β 3 natural, por ejemplo para el tratamiento de las patologías, por ejemplo, que se pueden seleccionar de modo independiente del grupo que comprende trastornos fibróticos, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, escleroderma, trastornos de angiogénesis, restenosis, adhesiones, endometriosis, enfermedad isquémica, inducción de cartílago y hueso, 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 y para la prevención, reducción o inhibición de complicaciones de la cirugía ocular (tal como cirugía LASIK o PRK). Los TGF- β 3 de la invención también se pueden usar en el tratamiento de labio y paladar figurado (por ejemplo, en conjunto con la reparación quirúrgica de dicha patología) y en la reducción o inhibición de la formación de cicatrices y curación acelerada de tendones. Las formas mutantes de TGF- β 3 descriptas en la presente invención pueden promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o inhibir la formación de cicatrices de la misma manera que el TGF- β 3 natural. Estos también pueden promover la regeneración epitelial en sitios de daño epitelial.

Se considera que un "TGF- β 3 de la invención" abarca cualquier mutante de TGF- β 3 de acuerdo con alguno del primer, segundo o tercer aspecto de la presente invención. Se apreciará que los TGF- β 3 de la invención no abarcan TGF- β 1 o TGF- β 2. La identidad de un TGF- β 3 se puede determinar con referencia a su secuencia, o con

129

preferencia con referencia a su actividad biológica. En consecuencia un TGF- β 3 se puede diferenciar de TGF- β 1 o TGF- β 2 sobre la base de que es capaz de reducir la formación de cicatrices en una herida en la que se administra TGF- β 3. Los TGF- β 3 de acuerdo con la presente invención con preferencia pueden ser TGF- β 3 no naturales.

Un TGF- β 3 de acuerdo con cualquier aspecto de la invención se puede usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquier patología en la que se desea utilizar TGF- β 3. Dichos usos incluyen, pero sin limitación, el tratamiento de cualquiera de las patologías consideradas en la presente memoria descriptiva. Se puede preferir que los TGF- β 3 de acuerdo con la presente invención se usan en la preparación de medicamentos para promover la cura de heridas acelerada y/o la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices. Dicha formación de cicatrices se puede asociar con heridas y/o con trastornos fibróticos. Los medicamentos fabricados que usan los TGF- β 3 de la invención con preferencia se pueden usar en la piel o en el ojo (por ejemplo en la aceleración de la curación de la piel o el ojo, o para la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices en la piel o el ojo).

Los TGF- β 3 de acuerdo con la invención pueden ser TGF- β 3 latentes o activos (es decir, con o sin, el péptido asociado a latencia).

Excepto cuando el contexto requiera otra cosa, las referencias a los TGF- β 3 de acuerdo con la invención también abarcan los fragmentos o derivados de dichos TGF- β 3, en donde dichos fragmentos o derivados se caracterizan porque comprenden substituciones (de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspecto de la invención,

130

según corresponda) que los diferencian de los fragmentos o derivados derivables de del TGF- β 3 tipo salvaje (las secuencias de aminoácidos de las que se toman para los presentes propósitos están representadas por la Secuencia ID No. 1). Los fragmentos o derivados adecuados de los TGF- β 3 de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspecto de la invención puede comprender al menos 10 residuos de aminoácidos, con preferencia al menos 40 residuos de aminoácidos, con más preferencia al menos 70 residuos de aminoácidos, y con máxima referencia al menos 100 residuos de aminoácidos.

Las referencias en la presente memoria descriptiva a los o TGF- β 3 y los fragmentos de TGF- β 3 también abarcan los derivados de dichas proteínas o fragmentos, excepto cuando el contexto requiera lo contrario.

Sin limitación, los ejemplos adecuados de las formas adecuadas de los derivados se pueden seleccionar del grupo que consiste: derivados de péptidos terapéuticamente efectivos de los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); fragmentos o derivados terapéuticamente efectivos que comprenden o se basa en el farmacóforo de los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); derivados de peptoide terapéuticamente efectivos de los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); derivados de D-aminoácidos terapéuticamente efectivos de los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); peptidomiméticos terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); análogos de péptidos terapéuticamente efectivos de los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); pseudopéptidos terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); péptidos retro-inversos terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β 3 de la

12/

invención (o sus fragmentos); derivados de depsipéptidos terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); derivados de péptidos β terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos); y derivados retropeptoides terapéuticamente efectivos basados en los TGF- β 3 de la invención (o sus fragmentos).

Se apreciará que, para los fines de la presente invención se puede tomar que "un TGF- β 3" abarca las monoméricas y diméricas del TGF- β 3. Los inventores hallaron en forma sorprendente que los TGF- β 3 de acuerdo con la presente invención pueden ejercer sus efectos biológicos tanto en formas monoméricas como diméricas. Esto contrasta en forma sorprendente con lo que se ha informado previamente en el arte previo, donde generalmente se considera que los TGF- β tales como TGF- β 3 solo pueden tener actividad biológica en la forma dimérica. El hallazgo de los inventores de que los TGF- β 3 de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en forma monomérica proporciona grandes ventajas ya que dichas formas monoméricas se pueden generar mediante técnicas de plegamiento relativamente simples (cuyos ejemplos se describen a continuación) de este modo aumenta la velocidad con la que se pueden generar las moléculas biológicamente activas, mientras que también se reducen los costos asociados con la generación de dichas moléculas.

Se puede preferir que un TGF- β 3 monomérico de la invención sea un TGF- β 3 que se expone en las Secuencias ID Nos. 3, 5, 7, 9 o 11, o un fragmento o derivado de este.

Se considera que un "medicamento de la invención" comprende cualquier medicamento que comprende un TGF- β 3

132

de acuerdo con la invención. Un medicamento de la invención en forma adicional o alternativa puede ser un medicamento que comprende un ácido nucleico que codifica un TGF- β 3 de acuerdo con la invención. Este abarca tanto los medicamentos *per se* (es decir, sin tener cuenta el uso para que se pone el medicamento), y los medicamentos para uso en aplicaciones terapéuticas específicas (por ejemplo, en el tratamiento de mejora de las patologías consideradas en la presente memoria descriptiva). También se entiende que los medicamentos de la invención abarcan los medicamentos que comprenden fragmentos o derivados adecuados de TGF- β 3 de la invención, o ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos o derivados.

Un "método de tratamiento de la invención" (o "método de la invención") comprende cualquier método de tratamiento que utiliza una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β 3 de acuerdo con la invención, o un ácido nucleico que codifica dicho TGF- β 3. También se entiende que los métodos de tratamiento de la invención abarcan métodos de tratamiento que utilizan fragmentos o derivados adecuados de los TGF- β 3 de la invención, o ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos o derivados.

Los medicamentos que comprenden los TGF- β 3 de la invención, o sus fragmentos o derivados biológicamente activos se pueden usar en el tratamiento de heridas (que incluyen heridas crónicas tales como úlceras). Estos se pueden usar en particular para promover la curación de heridas acelerada con prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices, y/o promover la reepitelización de heridas. Los TGF- β 3 de la invención también se pueden usar para efectuar la prevención o tratamiento de los trastornos fibróticos, que se pueden

193

seleccionar de modo independiente del grupo que comprende fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, escleroderma y glomerulonefritis, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar, fibrosis cutánea, fibrosis muscular, fibrosis por radiación, fibrosis renal, vitrorretinopatía proliferativa y fibrosis uterinas.

Los TGF- β 3 de la invención se pueden usar en el tratamiento de las patologías seleccionada de modo independiente del grupo que consiste en: escleroderma, trastornos de angiogénesis, restenosis, adhesiones, endometriosis, enfermedad isquémica, inducción de cartílago y hueso, fertilización in vitro, mucositis oral, enfermedad renal, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, glomerulonefritis, fibrosis cutánea, fibrosis por radiación, fibrosis renal y fibrosis uterina. 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; reducen la incidencia, gravedad y duración de la mucositis oral; y reducen los efectos adversos del síndrome gastrointestinal por radiación resultante del daño a las células madre causado por la radioterapia o quimioterapia durante el tratamiento del cáncer. Los inventores consideran que los TGF- β 3 de la invención, o sus fragmentos o derivados, se pueden usar en forma beneficiosa en todas estas indicaciones.

La actividad biológica exhibida por un TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, de acuerdo con la presente invención con preferencia puede ser actividad anti-formación de cicatrices de TGF- β 3, y esta con preferencia se puede investigar *in vivo*.

134

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con la presente invención es una cantidad suficiente para producir un efecto requerido:

- 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 ejemplo, por un médico responsable de la atención del paciente. Una evaluación 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 3 adecuados para el uso de acuerdo con la invención, así como los fragmentos o derivados preferidos de dichos TGF- β 3 se pueden seleccionar con referencia a alguna o todas las consideraciones descriptas en la presente.

La capacidad de los TGF- β 3 de la invención 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

125

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 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

138

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 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 ciertos 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

38

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 pueden 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 3 que comprenden la Secuencia ID No. 3, 5, 7, 9 o 11) 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

139

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.

La capacidad de los TGF- β 3 de la invención, tales como los que comprenden la Secuencia ID No. 3, 5, 7, 9 o 11 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

140

expertos reconocerán debido a que los TGF- β 3 de la invención (tal como los que comprenden las Secuencias ID No. 3, 5, 7, 9 o 11) 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 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 TGF- β 3 de la invención (tal como los que comprenden las Secuencias ID No. 3, 5, 7, 9 o 11) 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

149

promoción de la curación de heridas por intención secundaria.

La curación por intención terciaria se puede 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 los TGF- β 3 de la invención tales como las Secuencias ID No. 3, 5, 7, 9 o 11 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 TGF- β 3 que

142

comprenden la Secuencia ID No. 3, 5, 7, 9 o 11 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, tal como los que comprenden las Secuencias ID No. 3, 5, 7, 9 o 11, 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.

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 los TGF- β 3 de la invención 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.

143

Se apreciará que la promoción de la regeneración epitelial usando los TGF- β 3 de la invención 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 (EPF) o enfermedad pulmonar intersticial. La reepitelización defectuosa del ojo se puede asociar con patologías tales como deficiencia parcial de células madre límbricas 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, los TGF- β 3 de la presente invención se pueden usar para prevenir, reducir o inhibir de otro modo la formación de cicatrices. Esta inhibición de la formación de cicatrices se puede efectuar en cualquier sitios 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 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 in 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 toma 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 un cicatriz tratada. Para los presentes

145

✓
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.

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.

146

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 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.

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,

147

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. 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.

148

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 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:

149

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

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:

150

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

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

151

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 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 pueden 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.

152

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 conocidos que se pueden usar en la evaluación del desempeño mecánico de las cicatrices incluyen el indentómetro, cutómetro, reviscómetro, analizas 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.

153

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 (descrita 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

154

datos pueden utilizar programas de computación y/o sistemas electrónicos adecuados descritos en la solicitud de patente en trámite de los solicitantes.

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 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

156

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.

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 papilar 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.

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 descriptas 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).

158

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.

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 descritos 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

159

cicatrices se puede demostrar con referencia a un puntaje de VAS clínico, puntaje VAS de panel de posición externa 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

150

cicatrices e heridas que cubren las articulaciones del cuerpo (con preferencia que también aceleren la curación 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

161

heridas durante la corrección quirúrgica de las cicatrices desfigurantes.

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

162

cicatrices de heridas producidas por la corrección quirúrgica de cicatrices patológicas.

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 individual 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

163

complicaciones tales como infección y desecación que se originan debido a la carencia de una capa epitelial 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 los TGF- β 3 de la invención son capaces de promover la re-epitelización. 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 (tales como los que comprenden los TGF- β 3 expuestos en las Secuencias ID Nos. 3, 5, 7, 9 o 11) para

164

acelerar la regeneración del peritoneo a la vez que reducir la formación de cicatrices puede reducir la 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 horas 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

165

(que se puede determinar con referencia a factores tales como edad, salud y predisposición a las complicaciones de 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

166

en la respuesta de curación, ya que aún pueden promover la curación de heridas acelerada y/o prevenir, reducir o 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.

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 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 3 de

157

la invención biológica o terapéuticamente activo, los fragmentos biológica o terapéuticamente activos de los TGF- β 3 de la invención; y/o los derivados activos biológica o terapéuticamente activos de los TGF- β 3 de la invención. Los agentes de la invención también pueden incluir lo ácidos nucleicos que codifican los TGF- β 3 de la invención (o fragmentos o derivados de este). Se apreciará que todos estos agentes 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, entro 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.

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

168

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 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.

Se apreciará que el vehículo de una composición que comprende los agentes de la invención deber uno que sea bien tolerado por el paciente y que permita la liberación del agente a la herida. Dicho vehículo con preferencia es

170

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 aplicaren 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).

121

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 repetidas.

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

172

comprimidos con preferencia contienen hasta 99% del agente de la invención. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de 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). Para la administración parenteral, el vehículo también puede ser 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

123

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 accidental (considerada anteriormente) o como resultado de las operaciones quirúrgicas (por ej., cirugía láser en la

178

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 total un agente activo que se puede administrar a una por inyección local a una herida o sitio de daño epitelial con preferencia puede

175

estar en la región de 50ng/100µL por centímetro lineal de herida o cm² de daño epitelial. Dicha dosis se puede dar una vez por día hasta tres días, de este modo se proporciona una dosis total de 150 ng/centímetro lineal de herida de daño epitelial.

En el caso de la aplicación tópica en herida agudas o sitios de daño epitelial, una cantidad adecuada de un agente activo puede estar con preferencia en la región de 100 ng/cm². Dicha dosis se puede dar una vez por día hasta 3 días, de este modo se proporciona una dosis total de 300 ng/cm² de herida o daño epitelial.

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

A modo de otro ejemplo adicional, la cantidad de un agente activo que se puede administrar a una herida o sitio de daño epitelial en una sola incidencia de tratamiento con preferencia puede estar en la región de 50-200 ng/centímetro lineal de herida o daño epitelial (si se administra por inyección), o 100-300 ng/cm² de herida o daño epitelial (si se administra en forma tópica).

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

176

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 los péptidos de las Secuencia ID No. 3 a 8) 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 un TGF- β 3 de la Secuencia ID Nos. 3,

177

5, 7, 9 o 11) 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 TGF- β 3 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.

En el caso de un TGF- β 3 de la Secuencia ID No. 5, 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.

En el caso de un TGF- β 3 de la Secuencia ID No. 7, 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.

En el caso de un TGF- β 3 de la Secuencia ID No. 9, 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.

En el caso de un TGF- β 3 de la Secuencia ID No. 11, 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.

178

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 TGF- β 3 de acuerdo con la presente invención 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 trehalosa.

Se apreciará que los péptidos que comprenden los TGF- β 3 de la invención 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 TGF- β 3 se administren por medio de expresión celular que comprende los péptidos definidos por las Secuencias ID No. 3, 5, 7, 9 o 11, o fragmentos o derivados de este. Los ácidos nucleicos que codifican estos péptidos se exponen en las Secuencias ID Nos. 4, 6, 8, 10 o 12.

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 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.

180

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.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona a sistema de administración para usar en una técnica de terapia génica, dicho sistema de administración que comprende un Molécula de ADN que codifica un péptido seleccionado del grupo que consiste en los definidos por las Secuencia ID No. 3, Secuencia ID No. 5, Secuencia ID No. 7, Secuencia ID No. 9 y Secuencia ID No. 11, dicha molécula de ADN es capaz de transcribirse para producir la expresión del péptido elegido.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un sistema de administración definido en el párrafo precedente para usar en la fabricación de un medicamento para usar en la promoción de la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices.

En un sexto aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un sistema de administración definido anteriormente para usar en la fabricación de un medicamento para usar en la promoción de la regeneración epitelial.

De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona un método de promover la curación de heridas acelerada y/o prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices formación de cicatrices, el método que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de

181

un sistema de administración definido en el noveno aspecto de la invención.

De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención se proporciona un método de promover la regeneración epitelial, el método comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de a sistema de administración definido en el noveno aspecto de la invención.

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. 3, 5, 7, 9 o 11 serán evidentes para los expertos y los expertos en arte harán referencia a los ejemplos provistos por Secuencias ID Nos. 4, 6, 8, 10 o 12 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 molécula de ADN descrita en el cuarto aspecto de la invención. En consecuencia, aun cuando el agente de la invención tenga una vida media muy

182

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 la invención 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.

El sistema de administración de la presente invención 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. 3, 5, 7, 9 o 11, o un fragmento o derivado de dichos péptidos. 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 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

184

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 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

185

curación de heridas. Las células con más preferencia pueden ser células autólogas, si bien se apreciará que se pueden usar cualquier célula adecuada.

Por consiguiente, en un noveno aspecto de la invención, se proporciona un medicamento que comprende células inducidas para expresar un agente de la presente invención. 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 Tabla 1 muestra valores indicadores de la propensión de los residuos de aminoácidos a participar en la formación de alfa hélice;

La Tabla 2 expone detalles de la nomenclatura usada en referencia con las mutantes de TGF- β 3 de la invención;

La Tabla 3 expone la eficiencia de replegamiento de los TGF- β 3 tipo salvaje y TGF- β 3 de la invención;

La Tabla 4 compara la actividad biológica del TGF- β 3 tipo salvaje y Gly63-Ala (una proteína de TGF- β 3 de la invención) evaluada por ensayo de inhibición de crecimiento celular;

La Tabla 5 expone concentraciones de reactivos usados en estudios de curación de heridas *in vivo*;

La Tabla 6 expone concentraciones de reactivos usados en estudios de curación de heridas *in vivo*;

186

La Figura 1 muestra un cromatograma de TGF-Beta 3 tipo salvaje en una columna de Fenil-Sefarosa;

La Figura 2 muestra un cromatograma de TGF-Beta 3 tipo salvaje monomérico y dimérico en una columna UNO-S1;

La Figura 3 muestra una comparación de proteínas mutantes de TGF-Beta 3 y TGF-Beta 3 tipo salvaje por SDS-PAGE teñido con azul Coomassie (por favor advertir que el intercambio de buffer de las proteínas mutantes de Gly63-Ala y Gly63-Pro produjeron alguna pérdida de muestra, en consecuencia se la concentración real que se agregó era menos que los 3 µg indicados);

La Figura 4 muestra el molde usado para la herida excisional;

La Figura 5 muestra los puntajes promedio de evaluación macroscópica del día 3 para las heridas incisionales (A y B) tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje o los TGF-β de la invención, donde "*" indica curación significativamente aumentada en comparación con las heridas sin tratamiento ($p < 0,05$);

La Figura 6 muestra ancho de herida promedio microscópica el Día 3 para heridas excisional (C y D) tratadas con las proteínas de TGF-Beta 3 tipo salvaje y TGF-Beta 3 mutante;

La Figura 7 muestra el molde usado para la herida incisional;

La Figura 8 ilustra puntajes macroscópicos de cicatriz (día 70) para heridas tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje, Gly63-Ala y Gly63-Pro;

187

La Figura 9 ilustra imágenes macroscópicas de cicatriz (día 70) para heridas tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje, Gly63-Ala y Gly63-Pro;

La Figura 10 ilustra puntajes macroscópicos de cicatriz (día 70) para heridas tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje, Glu12-Ser y mutante de serina doble (Glu12-Ser & Arg52-ser), donde "+" indica formación de cicatrices significativamente disminuida en comparación con las heridas tratadas con placebo ($p < 0.05$);

La Figura 11 ilustra imágenes macroscópicas de cicatriz (día 70) para heridas tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje, Glu12-Ser y mutante de serina doble (Glu12-Ser & Arg52-Ser);

La Figura 12 ilustra imágenes macroscópicas de cicatriz representativas de heridas tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje, proteínas mutantes Gly63-Pro y Gly63-Ala (70 días después de la herida); y

La Figura 13 ilustra imágenes microscópicas de cicatriz representativas de heridas tratadas con Glu12-Ser y mutante de serina doble (Glu12-Ser y Arg 52-Ser) después de 70 días de la herida).

Los detalles de las secuencias de interés particular se proporcionan en la sección "Información de secuencia".

Protocolo experimental y resultados

1 Generación, producción, replegamiento, y purificación de los TGF- β 3 de acuerdo con el primer y segundo aspectos de la invención.

1.1 Generación de ADNc

188

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 TGFβ-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 Polimerasa, 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).

1.2 Construcción de 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 ADNc del TGF-β 3 (generados en la Sección 3.2) 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

189

realizó el análisis de 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 un cebador del terminador T7 (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3').

1.3 Mutagénesis dirigida al sitio

El constructo de TGF-Beta 3 tipo salvaje de la Sección 1.2 se sometió a mutagénesis dirigida al sitio para generar dos contractos mutados que codifican las proteínas de TGF-Beta 3 mutantes. La nomenclatura constructo/mutante y el cambio de secuencia de nucleótidos se sintetizan en la Tabla 2. Las posiciones de nucleótidos que se sometieron a mutagénesis se muestran en la sección de Información de secuencia.

La metodología de mutagénesis dirigida al sitio in vitro se basó en el kit Stratagene's Quick Change® Site directed Mutagenesis. Se agregaron 100 ng de plásmido (de la Sección 1.2) a una solución que contiene: 2,5 uL de buffer de reacción 10 x Quick Change® Multi, solución de Quick, 100 ng de cebador mutagénico, 1 ml de mezcla de dNTP, ADN polimerasa Pfu Turbo (Stratagene), a un volumen final de 2,5 ml con agua destilada doble. La reacción se colocó en un ciclador térmico (Hybaid PCR Expresses) y se corrió en las siguientes condiciones: 1 min a 95°C, 30 ciclos de 1 min a 95°C, 55°C durante 1 min y un paso final de 65°C durante 2 min. Una vez que terminó el ciclado térmico, las reacciones se colocaron en hielo durante 2 min para reducir la temperatura por debajo de 37°C. Se agregó 1 uL de enzima

190

de restricción DpnI (10 U/uL) a cada reacción y se mezclaron por completo. La mezcla de reacción se centrifugó (1 min, 10,000 rpm en una Sorvall Biofuge) luego se incubó a 37°C para digerir el ADNds progenitor. 1-5 uL de ADN tratado con DpnI de cada reacción de mutagénesis reacción se agregaron a 45 uL de XLI-Blue *E.coli* resucitado (Stratagene) y 2 uL de mezcla P-ME (Stratagene). La suspensión se mezcló e incubó en hielo durante 30 minutos. La suspensión se calentó a 42°C en un baño de agua durante 30 segundos. La mezcla se incubó en hielo durante 2 min más. Se agregaron 0,5 mL de caldo (42°C) NZY⁺ precalentado a cada suspensión celular. El caldo de transformación se incubó durante 1 hora con agitación a 225-250 rpm. Se sembraron 1 uL, 10 uL y 100 uL del caldo de transformación de cada reacción de mutagénesis en placas de agar LB que contienen 100 µg/mL de ampicilina (Sigma), 80 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-P-D-galactopiranosido (X-gal, Stratagene), 20 mM de P-D-Tiogalctopiranosito de isopropilo (IPTG, Sigma) y se incubó durante 18 horas a 37°C. Las colonias azules contenían el plásmido mutado. Se seleccionó una colonia única de cada tipo de mutante de agar y se usó para inocular 10 ml de medio LB que contiene 100 µg/mL de Ampicilina. Se aisló el plásmido usando el kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen). Los plásmidos se secuenciaron y se verificó la mutación correcta usando los cebadores pQE y pQE Rev.

1.4 Transformación y clonación

10 µL (50 ng por µl) de ADN de plásmido (de la Sección 1.2 y 1.3) se agregaron a 1 ml de células *E.coli* BL21 (DE3)

pLysS Singles™ (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 transformación.

1.5 Expresión

Las ampollas de las células de E.coli congeladas (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/100 pg/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 (pos-inducción) de TGF-Beta 3 tipo salvaje y proteína mutante. 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 las proteínas de TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutante por la adición de R-D-Tiogalactopiranósido

192

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 min, 10.000 rpm en Sorvall Biofuge) y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 50 µl 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 µL 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

193

EDTA pH 8,3 a temperatura ambiente antes de centrifugar durante 40 min a 12.000g.

1.7 Solubilización de los cuerpos de inclusión

El sedimento 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 solubilizar los cuerpos de inclusión y reducir el TGF-Beta 3 tipo salvaje y las proteínas mutantes a sus formas monoméricas desnaturalizadas. Luego las suspensiones se centrifugaron a 15.000 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

198

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 Filtración en gel

La muestra de la Sección 1.7 se cromatografió en una columna de Hiprep 26/60 Sephacryl S-100 de alta resolución (Amersham, 320 mL) en 10% (v/v) de ácido acético con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. Las fracciones que contienen TGF-Beta 3 monomérico desnaturalizado (que eluyeron entre 100 min y 140 min) se mezclaron.

1.10 Liofilización

Las fracciones combinadas que contienen TGF-Beta 3 monomérico desnaturalizado se liofilizaron usando un secador por congelación TEC Lyoprep-3000 para eliminar ácido acético y agua de la muestra.

1.11 Replegamiento

Los TGF-Beta 3 monomérico liofilizados de la Sección 1.10 se solubilizaron en urea 8 M que contenía 10 mM de DTT hasta obtener una concentración final de 10 mg/ml. La solución de TGF-Beta 3 se agregó 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

195

alcanzar las concentraciones finales de 0,2 mg/ml de TGF-Beta 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 TGF-Beta 3 monomérica 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. El sobrenadante contenía TGF-Beta 3 dimérico unido a disulfuro, que se determinó por SDS-PAGE (no reducido) y transferencia Western. El SDS-PAGE se llevó a cabo como se describe en la sección 2.1.

Para la transferencia Western, las muestras se cargaron en un gel de 1 mm de espesor, 15% de (v/v). Una vez que terminó la electroforesis las proteínas se transfirieron electroforéticamente a un papel de nitrocelulosa (Sigma) usando un aparato TE22 Western-Blotting (Pharmacia), como se describe en el manual de instrucciones. Los sitios de unión inespecífica sobre la nitrocelulosa luego se bloquearon con buffer de bloqueo (5% (p/v) de leche en polvo descremada, 1% (v/v) de monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween 20; Sigma) en solución buffer salina (PBS). La nitrocelulosa se lavó en buffer de lavado (PBS, 0,1% (v/v) Tween 20). La nitrocelulosa se incubó durante 1 hora en anticuerpo primario (MAB643 (sistemas R&D) diluido 1:500 en PBS y 0,1 (v/v) de Tween 20). La nitrocelulosa se lavó de nuevo antes de la incubación durante 1 hora con el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Abeam) diluida 1:3000 con PBS, 0,1% (v/v) de Tween 20). La nitrocelulosa

196

recibió un lavado final antes de la adición del reactivo ECL (Amersham) para visualizar los complejos antígeno-anticuerpo. En una habitación oscura se expuso una película de rayos X la nitrocelulosa antes de sumergirse en una solución del desarrollador, fijador y detención. Luego la nitrocelulosa se dejó secar. El replegamiento de TGF-Beta 3 tipo salvaje y las proteínas monoméricas mutantes mostraron variados niveles de formación de dímeros. El porcentaje de recuperación de los dímeros correctamente replegados de otros replegados incorrectamente o las proteínas de TGF-Beta 3 no diméricas se muestran en la Tabla 3.

De modo interesante las sustituciones de aminoácidos dentro de la alfa-hélice de las proteínas de TGF-Beta 3 que causaron mayor impacto en el rendimiento de replegamiento (formación de dímeros). La estabilización de la alfa hélice por la sustitución de glicina con arginina aumentó los rendimientos de replegamiento de 20% a 50%. A la inversa la disrupción de la alfa hélice por la sustitución de glicina con prolina produjo mucho menor porcentaje de formación de dímeros. Esto indica que el alfa hélice cumple un papel importante en el replegamiento correcto de la molécula de TGF-Beta 3. La sustitución de aminoácidos involucrados en la formación de 'puente salino' no efectuó rendimientos de replegamiento.

1.12 Cromatografía de interacción hidrofóbica

La solución de renaturalización de la Sección 1.11 se concentró a 50 mL por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa (peso molecular límite) en una Vivoflow50 (Vivascience). La solución de renaturalización se diluyó

197

1:1 con una solución que contiene 2 M de sulfato de amonio (Sigma) y 10% (v/v) de ácido acético. Se equilibró una columna de 2 ml Biorad llena con flujo rápido de Butilsefaroza 4 (Amersham) con Buffer A (1,0M de sulfato de amonio y 10% (v/v) de ácido acético). 20 ml de la solución de renaturalización diluida se aplicó a esta columna a una velocidad de flujo de 1 ml/min (esta velocidad de flujo se usó en todo el procedimiento). La columna luego se lavó en Buffer A hasta que la lectura de absorbancia a 280 nm alcanzó el nivel basal (10 ml). Se aplicó a la columna 100% de Buffer B (10% (v/v) de ácido acético, 30% (v/v) de isopropanol). Se mezcló el primer pico, que contiene proteínas TGF- β 3 en formas monoméricas y dimericas (ver, Figura 1).

1.13 Cromatografía de intercambio catiónico

Se usó cromatografía de intercambio catiónico para aislar las proteínas de TGF-Beta 3 dimericas de los monómeros. Se equilibró una columna de 2 ml UNO-SI Biorad llena con Buffer A que contiene 10% (v/v) de ácido acético, 30% (v/v) de isopropanol). Las fracciones combinadas de la Sección 3.12 se aplicaron a una velocidad de flujo de 1 ml/min en una columna UNO-SI. Luego la columna luego se lavó en Buffer A hasta que la lectura de absorbancia a 280 nm alcanzó el nivel basal (5 min). Se corrió en un gradiente lineal durante 5 finalizando con una mezcla de 60% de Buffer A y 40% de Buffer B (10% (v/v) de ácido acético, 30% (v/v) de isopropanol y 1 M de NaCl). La aplicación de esta mezcla de buffer se mantuvo durante 15 minutos adicionales. El TGF-Beta 3 monomérico eluyó de la

198

columna después 10 minutos posteriores a la inyección de la muestra. Se aplicó un segundo gradiente lineal durante 5 minutos finalizando con 100% de Buffer B y mantenido durante 10 minutos. El TGF-Beta 3 dimérico se eluyó de la columna 30 minutos después de la inyección de la muestra (ver Figura 2).

1.14 Ultrafiltración/diafiltración

Las fracciones que contienen moléculas de TGF-Beta 3 monomérico y dimérico de la Sección 1.13 se sometieron a ultrafiltración/diafiltración para intercambiar el buffer a 20 mM de ácido acético, 20% (v/v) de isopropanol y concentrar la muestra a ~10 mg/ml (se determinó la concentración de TGF-Beta 3 por espectrometría U.V). Se usó una Vivoflow50 (Vivascience) con un límite de 10 kDa, con un buffer de intercambio y se concentraron las muestras

2 Caracterización in vitro de los TGF- β 3 de la invención.

2.1 Análisis SDS-PAGE de los TGF- β 3 purificados de la invención

Las proteínas mutantes de TGF-Beta 3 purificadas (de la Sección 1.14) se evaluaron por SDS-PAGE para determinar la pureza y peso molecular. Debido al pH bajo las muestras de TGF-Beta 3 mutante de la Sección 3.14 se intercambió el buffer usando columnas de de giro de desalinización de proteína (Pierce) en buffer de muestra de SDS-PAGE. Se cargaron 3 μ g de las proteínas mutantes de TGF-Beta 3 (muestras reducidas y no reducidas), 3 μ g de TGF-Beta 3 tipo salvaje control positivo (reducido y no reducido) y 10

199

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.

Cono se esperaba el TGF-Beta 3 tipo salvaje y la proteína mutante Gly63-Ala corrieron en posiciones idénticas en el gel (~13 kDa para las muestra reducidas y 25 kDa para las no reducidas). De modo interesante no se detectaron bandas de proteína mutante Gly63-Pro en el gel no reducido pero se detectaron en gel reducido. Como la eficiencia de replegamiento de Gly63-Pro fue muy baja (<1%) es probable que se produjeran múltiples especies de replegamiento, las que estuvieron por debajo de los niveles detectables por Coomassie (>1 ug). Sin embargo, cuando estas especies se redujeron la concentración del monómero de Gly63-Pro reducido fue superior a 1 ug de del límite de detección del colorante de Coomassie y en consecuencia se puede observar Gly63-Pro en el gel reducido. La posición de la banda proteica de Gly63-Pro reducida fue ligeramente superior que la banda para el TGF-Beta 3 tipo salvaje. Esto fue los esperado ya que la sustitución de glicina 63 con una prolina hizo a la proteína mutante Gly63-Pro una molécula más grande que TGF-Beta 3 tipo salvaje (vera Figura 3).

2.2 Ensayo de inhibición de crecimiento celular para comparar la actividad biológica de los TGF- β 3 de la invención con los TGF- β 3 tipo salvaje

En ensayo de inhibición de crecimiento celular (A Meager, 1991) es una prueba de actividad biológica *in-vitro*

para las moléculas de TGF-Beta. El ensayo colorimétrico se basa en el efecto inhibitorio de las moléculas de TGF-Beta sobre el crecimiento de ensayo colorimétrico se basa en el efecto inhibitorio de las moléculas de TGF Beta sobre el crecimiento de las células epiteliales de pulmón Mink (MLEC). Se agregaron 100 μ L de medio de suspensión celular que contiene : 1×10^4 de células MLEC/ml y se agregó medio completo (DMEM(Invitrogen), 0,01 M de buffer Hepes (Invitrogen), 2 mM de L-Glutamina (Invitrogen), L-arginina (Invitrogen), L-Asparagina (Invitrogen), 100 unidades/ml de penicilina (Invitrogen), 50 μ g/ml de estreptomicina (Invitrogen) y 5% de suero fetal de carnero (Invitrogen)) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de la incubación toda la noche a 37°C, 5% de CO₂, se agregaron diluciones seriada (10 pg/mL a 500 pg/mL) de muestras de TGF-Beta 3 diméricas mutantes (de la Sección 3.14) a la placa(s). Los pocillos control recibieron 200 μ L de medio completo y 10% (v/v) de 0,25 M de maltosa. Las placas se incubaron durante 120 hr y se agregaron 50 μ L de 2 mg/mL de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazonil-2-il]-2,5-difeniltetrazolio: azul de fiazolilo (MTT; Sigma) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas adicionales y luego se extrajo el medio. Se agregaron 100 μ L de 0,05 M de HCl (BDH), isopropanol absoluto (BDH) a cada pocillo y el formazán resultante solubilizado se cuantificó a 570 nm usando un lector de microplaca (Victor² 1420).

Gly63-Ala, un TGF- β 3 de la invención, presentó un efecto inhibitorio sobre las células MLEC en un rango de concentración de 0-500 pg/mL. Como se puede observar en la

201

Tabla 4, la proteína mutante Gly63-Ala tuvo una IC_{50} de 34 pg/mL en comparación con TGF-Beta 3 tipo salvaje que tiene una IC_{50} de 26 pg/mL.

2.3 Análisis de secuencia de aminoácidos

Se secaron al vacío 50 microlitros de muestras de TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutante de la Sección 3.14 y luego se resuspendieron en 20 μ l de una solución que contiene 50 mM de NH_4HCO_3 y 10% (v/v) de acetonitrilo. Se resuspendieron 20 μ g de tripsina de calidad de secuenciación (Promega) en 10 μ l de buffer de resuspensión provisto por el kit (Promega) para dar una concentración de tripsina de 2 μ g/ μ 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 μ g/ μ l. La digestión se realizó durante la noche por la adición de tripsina en una relación de 1:20 (p/p) de las proteínas de TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutante. 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/ μ l 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 μ m 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 MS-MS donde se empleó la descomposición inducida por colisión para obtener la información de secuencia de los iones peptídicos fragmentados.

3 Caracterización in vivo de los TGF- β 3 de la invención

Los efectos biológicos de las proteínas de TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutantes activas replegadas se investigaron sobre la curación de heridas incisionales y excisionales (3 días después de la herida) y formación de cicatrices (70 días después de la herida) en ratas macho adultas.

3.1 Comparación de los efectos de TGF- β 3 tipo salvaje y TGF- β 3 de la invención sobre la curación de heridas

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 4. 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 Tabla 4. 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 (Tabla 4) 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 tomaron muestras de biopsias. 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

203

análisis estadístico de los datos usando las pruebas de Mann Whitney U/T de Student. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

3.2 Evaluación de heridas incisionales al día 3 tratadas con TGF- β 3 tipo salvaje o TGF- β 3 de la invención sobre la curación de heridas usando una escala visual analógica macroscópica

Se examinaron las heridas incisionales después de 3 días usando un sistema analógico visual (VAS) macroscópico. 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-Beta 3 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). El tratamiento con la dosis de 100 ng/100 μ L mejoró significativamente ($p < 0,05$) el aspecto de las heridas en comparación con no tratamiento (control sin tratamiento), es decir curación acelerada.

El tratamiento con 50 ng/100 μ L o 100 ng/100 μ L de Gly63-Ala mutante disminuye el puntaje VAS en comparación con no tratamiento (control sin tratamiento) y son comparables a las heridas tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje es decir, no empeora la curación.

El tratamiento con 50 ng/100 μ L o 100 ng/100 μ L de Gly63-Pro mutante disminuye el puntaje VAS en comparación con no tratamiento (control sin tratamiento) y son

204

comparables a las heridas tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje es decir, no empeora la curación.

3.3 Evaluación microscópica de ancho de herida para heridas excisionales del día 3 tratada con proteínas de TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutante

Se evaluó microscópicamente el ancho de la herida excisional después de 3 días. Todas las heridas tratadas con proteínas de TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutantes mostraron ancho de la herida comparables con el control de placebo y no tratamiento (naive), lo que confirma que las proteínas de TGF-Beta 3 mutantes no tienen efectos adversos sobre la curación (Figura 6).

3.4 El efecto de las proteínas de TGF-Beta 3 de tipo salvaje y mutante sobre la

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 7. 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 descriptas en la Tabla 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 (Tabla 6) en las posiciones de heridas marcadas A y B (excepto en las ratas que no recibieron tratamiento - "naive"). En las posiciones

205

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 70 días se fotografiaron las cicatrices y analizaron usando un sistema de clasificación analógico visual macroscópico (modificado de Beausang, E et al. 1998). 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 μ M 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.

3.5 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 (Figura 8). Los resultados del análisis VAS de las heridas el día 70 muestran que:

El TGF-Beta 3 tipo salvaje (en dosis de 50 ng/100 μ L y 100 ng/100 μ L) redujo la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y sin tratamiento. Para ambas dosis esta reducción es estadísticamente significativa en comparación con las heridas tratadas con placebo ($p < 0,05$).

206

El Gly63-Ala mutante (en dosis de 50 ng/100 μ L y 100 ng/100 μ L) redujo la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y sin tratamiento. Para la dosis de 50 ng/100 μ L esta reducción es estadísticamente significativa en comparación con las heridas tratadas con placebo ($p < 0,05$).

Gly63-Pro mutante (en dosis de 50 ng/100 μ L y 100 ng/100 μ L) redujo la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y sin tratamiento.

Glul2-Ser mutante (en dosis de 50 ng/100 μ L y 100 ng/100 μ L) redujo la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y sin tratamiento. Para la dosis de 50 ng/100 μ L esta reducción es estadísticamente significativa en comparación con las heridas tratadas con placebo ($p < 0,05$).

La mutante de serina doble (Glul2-Ser & Arg52-Ser) en dosis de 50 ng/100 μ L y 100 ng/100 μ L redujo la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y sin tratamiento.

3.6 Evaluación microscópica de las heridas incisionales al día 70.

Los efectos macroscópicos indicados usando el sistema de puntuación VAS se confirmaron por análisis histológico. Los ejemplos representativos de los portaobjetos histológicos se muestran en las Figuras 12 y 13. Las microfotografías histológicas muestran que la adición de proteínas de TGF- β 3 de acuerdo con la invención induce una mejora similar a la que se observa con TGF- β 3 tipo salvaje. Las proteínas de la invención inducen las fibras de

207

colágeno dentro de la cicatriz a adoptar morfología y organización similar a la de la piel normal circundante.

4 Conclusiones

La flexibilidad de la alfa hélice (entre los residuos de aminoácidos 58-67) impacta sobre la formación de TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado funcional durante el replegamiento. La estabilización de la alfa hélice por la sustitución de glicina 63 con alanina mejora mucho la eficiencia de replegamiento ya que la desestabilización de la alfa hélice por la sustitución de glicina 63 con prolina tiene un efecto opuesto.

La sustitución de glicina 63 con alanina o prolina no altera la curación de herida en comparación con TGF-Beta 3 tipo salvaje.

Gly63-Ala y Gly63-Pro reducen la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y no tratadas.

La formación del 'puente salino' (entre Arg52 y Glu12) no altera la eficiencia de replegamiento de TGF-Beta 3.

Glu12-Ser y la mutante de serina doble reducen la formación de cicatrices en comparación con las heridas tratadas con placebo y no tratadas.

5. Protocolos preferidos para la producción TGF- β 3 monoméricas y diméricas de acuerdo con la presente invención.

Las condiciones preferidas para generación de TGF-Beta 3 monoméricos correctamente replegados de acuerdo con la presente invención son las siguientes:

206

0,7 M de ácido 2-(ciclohexilamino)etansulfónico (CHES), 2 mM de glutatión reducido (GSH), 0,4 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

30 mM de taurodeoxicolato, 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.

1M de NDSB-201, 2 mM de glutatión reducido (GSH), 2 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

0,7 M de CHES, 2 mM de glutatión reducido (GSH), 2 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

30 mM de taurodeoxicolato más 1M de NDSB-221, 2 mM de glutatión reducido (GSH), 2 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

30 mM de taurodeoxicolato más 0,7 M de CHES, 2 mM de glutatión reducido (GSH), 2 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

30 mM de taurodeoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 2mM GSSG, 0,12 mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

En general un TGF- β 3 de acuerdo con la presente invención se puede plegar en una forma dimérica biológicamente activa por un método que comprende agregar TGF- β 3 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 sulfhidrilo/disulfuro de bajo pesos molecular; e

incubar el factor de crecimiento en la solución hasta que se forma el TGF- β 3 dimérico biológicamente activo.

209

Las condiciones preferidas para la generación TGF-Beta 3 diméricos correctamente replegados de acuerdo con la presente invención son los siguientes:

0,7 M de ácido 2-(ciclohexilamino)etansulfónico (CHES), 2 mM de glutatión reducido (GSH), 0,4 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

30 mM de taurodeoxicolato, 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.

30 mM de taurodeoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 2mM GSSG, 0,12 mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

CONDICIONES EXPERIMENTALES PREFERIDAS:

5.1 CLONACIÓN DEL VECTOR Y TRANSFORMACIÓN EN CÉLULA HUÉSPED.

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

El ADNc que codifica los TGF- β 3 de la invención se pueden digerir con 0,75 μ l de NcoI (New England Biolabs) y 0,75 μ l de BamHI (New England Biolabs) con buffer BamHI 1X (New England Biolabs) en una reacción de 15 μ L (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).

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

210

transformantes por sembrado en placas de agar con caldo Luria (LB) que contienen 50 µg/ml de kanamicina (Invitrogen). Se seleccionaron los clones adecuados para la digestión por restricción y/o expresión.

5.2 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 DO₆₀₀ 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 muestras de los clones en un gel 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. La expresión de los TGF-β3 de acuerdo con la invención en consecuencia se puede inducir en estos cultivos.

5.3 Patrón de células congeladas

Los clones se cultivaron en un matraces de agitación en caldo Terrific de concentración media a una DO₆₀₀ de aproximadamente 1 y se conservaron como patrones de

211

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.

5.4 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').

5.5 Cultivo de semilla.

Un clon adecuado seleccionado 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 µg/ml de kanamicina. El matraz se incubó con agitación a 37°C y 200 rpm y se muestreó periódicamente para medir la DO₅₅₀. Cuando la DO del cultivo alcanzó 3,21 U/ml (después de 7 horas) se usó el caldo de células para sembrar un fermentador de 150 L (volumen de trabajo de 100 L).

5.6 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

212

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 alcanza 10 U/ml se inicia una alimentación de glicerol (50% v/v) con una velocidad de flujo de 45 ml/min. Cuando la DO alcanza 40 U/ml, las células se inducen con la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM.

5.7 Recolección

Después de 4 horas pos-inducción, el fermentador se refrigera a 10°C y se reducen el flujo de aire y la agitación a 0,3 vvm y 100 rpm respectivamente. Los controles de espuma y pH terminan y se ajusta la presión trasera a 3 psi. Se recolecta el cultivo por centrifugación continua con una centrífuga continua Westfalia CSA8 a 10°C. La centrífuga operó a 15.000 rpm y una velocidad de flujo

213

de 3 litros por minutos y se recolectaron las suspensiones celulares.

5.8 Lisis celular y recuperación de IB

La pasta de células de fermentación (de la Sección 5.7) 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°).

5.9 Solubilización de cuerpos de inclusión

El sedimento de la Sección 5.8 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 TGF- β 3 a sus forma monomérica. El pH del pellet resuspendido se ajustó a pH 9,4-9,6 con NaOH/ácido acético

224

antes de la incubación durante un segundo tiempo de 60-75 minutos.

5.10 Clarificación/ultrafiltración y diafiltración

El material solubilizado de la Sección 5.9 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 TGF-Beta 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).

5.11 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 Butilsefara 4 (Amersham, 16 cm de altura de lecho) con cuatro volúmenes de columna de Buffer A (2,72 g/L de

215

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 μ M (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 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). El primer pico, que contiene las proteínas de TGF-Beta 3 en ambas formas monoméricas y diméricas se mezcló antes de la separación de las proteínas monoméricas y diméricas.

Información de secuencia

TGF- β 3 (Secuencia ID No. 1)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKCKCS

Mutante de TGF- β 3 "Gly63-Ala" (Secuencia ID No. 3)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLALYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKCKCS

Mutante de TGF- β 3 "Gly63-Pro" (Secuencia D3 No. 5)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLPLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKCKCS

Mutante de TGF- β 3 "Glu12-Ser" (Secuencia ID No. 7)

ALDTNYCFRNLSENCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKCKCS

Mutante de TGF- β 3 TGF-/3 3 "Arg52-Ser" (Secuencia ID No. 9)

2/6

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLSSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKCKCS

Mutante de TGF- β 3 "G112-Ser/Arg52-Ser" (Secuencia ID No. 11)

ALDTNYCFRNLS~~EN~~CCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLSSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKCKCS

Secuencia ID No. 2 - ADN que codifica TGF- β 3 tipo salvaje humana

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 ACC 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

Secuencia ID No. 4 - ADN que codifica Gly63-Ala mutante

217

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 GCA 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

Secuencia ID No. 6 - ADN que codifica Gly63-Pro mutante

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 CCA 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

Secuencia ID No. 8 - ADN que codifica Glu12-Ser mutante

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG TCG 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

Secuencia ID No. 10 - ADN que codifica Arg52-Ser mutante

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 AGC 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

Secuencia ID No. 12 - ADN que codifica Glu12-Ser/Arg52-

Ser mutante

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG TCG 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 AGC 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

TABLA I Escala de propensión de hélice basado en los estudios experimentales de proteínas y péptidos

Aminoácido	Propensión de hélice (kcal/mol)
Ala	0,00
Glu ^o	0,16
Leu	0,21
Met	0,24
Arg ⁺	0,21
Lys ⁺	0,26
Gin	0,39
Glu	0,40
He	0,41
Asp ^o	0,43
Ser	0,50
Trp	0,49
Tyr	0,53
Phe	0,54
Val	0,61
Tlir	0,66
His ^o	0,56
His ⁺	0,66
Cys	0,68
Asn	0,65
Asp ^o	0,69
Gly	1,00
Pro	3,16

218

219

Tabla 2

Nomenclatura de mutante	Sustitución de aminoácido	Efecto sobre la estructura
Gly63-Ala	glicina 63 reemplazado con alanina	Estabiliza alfa hélice
Gly63-Pro	glicina 63 reemplazado con prolina	Desestabiliza alfa hélice
Glul2-Ser	ácido glutámico 12 reemplazado con serina	Impide la formación de puente
Arg52-Ser	arginina 52 reemplazado con serina	Impide la formación de puente
Glul2-Ser y Arg52-Ser	Doble sustitución en la que ácido glutámico 12 es reemplazado con serina y arginina 52 también está	Impide la formación de puente salino

Tabla 3

Eficiencia de replegamiento de TGF- β 3 tipo salvaje y TGF- β 3 de la invención.

TGF-Beta mutante	3	Porcentaje de dímero correctamente plegado
Gly63-Ala		50
TGF-Beta tipo salvaje	3	20
Gly63-Pro		1
Glul2-Ser		20
Glul2-Ser & Arg52-Ser		20

220

Tabla 4

Actividad biológica de TGF- β 3 tipo salvaje y Gly63-Ala (proteína de TGF- β 3 de la invención) evaluada por el ensayo de inhibición de crecimiento celular

Proteína	IC ₅₀
TGF- β 3 tipo salvaje	26 pg/mL
Gly63-Ala.	34 pg/mL

Tabla 5

Tratamiento del sitio de herida

Gr	Tratamiento/muestra	Concentraci
A	TGF-Beta 3 tipo	50
B	TGF-Beta 3 tipo	100
C	Glv63-Ala	50
D	Glv63-Ala	100
E	Glv63-Pro	50
F	Glv63-Pro	100
G	0,25 M Maltosa (Placebo Control)	N/A
H	No tratamiento	N/A

Tabla 6. Tratamiento del sitio de herida

Gr	Tratamiento/muestra	Concentración
A	TGF-Beta3 tipo	50
B	TGF-Beta3 tipo	100
C	Glv63-Ala	50
D	Glv63-Ala	100
E	Glv63-Pro	50
F	Glv63-Pro	100
G	Glul2-Ser	50
H	Glul2-Ser	100
I	Glul2-Ser& Arg52-	50
J	Glul2-Ser& Arg52-	100
K	0,25 M Maltosa (control de placebo)	N/A
L	No tratamiento	N/A

REIVINDICACIONES

1. Un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, en donde el dominio formador de doble hélice entre residuos de aminoácidos 58 y 67 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa comprende al menos una sustitución para estabilizar la alfa hélice.

2. Un TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el residuo glicina de la posición 63 de TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa se reemplaza con un residuo de aminoácido que estabiliza la alfa hélice.

3. Un TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, de acuerdo con la reivindicación o reivindicación 2, en donde la sustitución para estabilizar la alfa hélice comprende la introducción de residuo seleccionado del grupo que consiste en alanina, serina, treonina, valina, leucina, isoleucina; metionina y fenilalanina.

4. Un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el residuo glicina de la posición 63 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa se reemplaza con alanina.

5. Un TGF- β 3 de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende la Secuencia ID No. 3, o un fragmento o derivado de este.

6. Un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que no comprende una sustitución del residuo valina de la posición 61 de TGF- β 3 tipo salvaje de longitud completa.

7. Un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, en donde el residuo glicina de la posición 63 del TGF- β 3 de

222

tipo salvaje de longitud completa se reemplaza con prolina.

8. Un TGF- β 3 de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende la Secuencia ID No. 5, o un fragmento o derivado de este.

9. Un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, que comprende una sustitución del residuo de ácido glutámico de la posición 12 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa y/o el residuo de arginina de la posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa.

10. Un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la sustitución, o sustituciones, es con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste: serina; alanina; treonina; valina; isoleucina; metionina; fenilalanina; y leucina.

11. Un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con la reivindicación 9 o reivindicación 10, en donde el residuo de ácido glutámico de la posición 12 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa está sustituido con serina

12. Un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el residuo de arginina de la posición 52 del TGF- β 3 de tipo salvaje de longitud completa está sustituido con serina.

13. Un TGF- β 3 seleccionado del grupo que consiste Secuencia ID. No. 7, Secuencia ID. No. 9 y Secuencia ID. No. 11, o un fragmento o derivado de este.

14. Un TGF- β 3 monomérico, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a

223

13.

15. Un TGF- β 3 dimérico o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. El uso de a TGF- β 3, o fragmento de TGF- β 3, o un derivado de TGF- β 3, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes como un medicamento.

17. El uso de un TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para usar en aceleración de la curación de heridas y/o la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices.

18. El uso de un TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para usar in la promoción de regeneración epitelial.

19. El uso de acuerdo con la reivindicación 17 o reivindicación 18, en donde el medicamento es para usar en la piel.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 17 o reivindicación 18, en donde el medicamento es para usar en el ojo.

21. El uso de un TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para usar en la prevención y/o tratamiento de un trastorno fibrótico.

22. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde donde el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, escleroderma, fibrosis cutánea, fibrosis muscular, fibrosis

224

por radiación, fibrosis renal, vitrorretinopatía proliferativa y fibrosis uterina.

23. El uso de un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos angiogénicos, restenosis, adhesiones, endometriosis, enfermedad isquémica, mucositis oral y enfermedad renal.

24. El uso de un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para usar en la inducción del hueso y cartílago, o en fertilización *in vitro*.

25. Un ácido nucleico que codifica un TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

26. Un método de acelerar la curación de heridas y/o la prevención, reducción o inhibición de la formación de cicatrices, el método que comprende proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, a un paciente que necesita dicho tratamiento.

27. Un método de prevención y/o tratamiento de un trastorno fibrótico, el método que comprende proporcionar una cantidad terapéuticamente efectiva de un TGF- β 3, o un fragmento o derivado de este, como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, a un paciente que necesita dicha prevención o tratamiento.

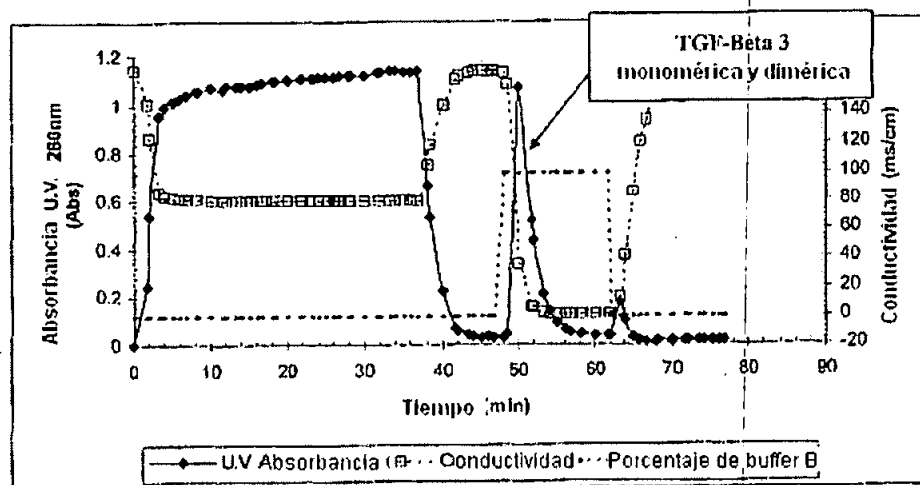
28. Un método de acuerdo con la reivindicación 26 o

225

reivindicación 27, en donde el TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, se proporciona en la piel del paciente.

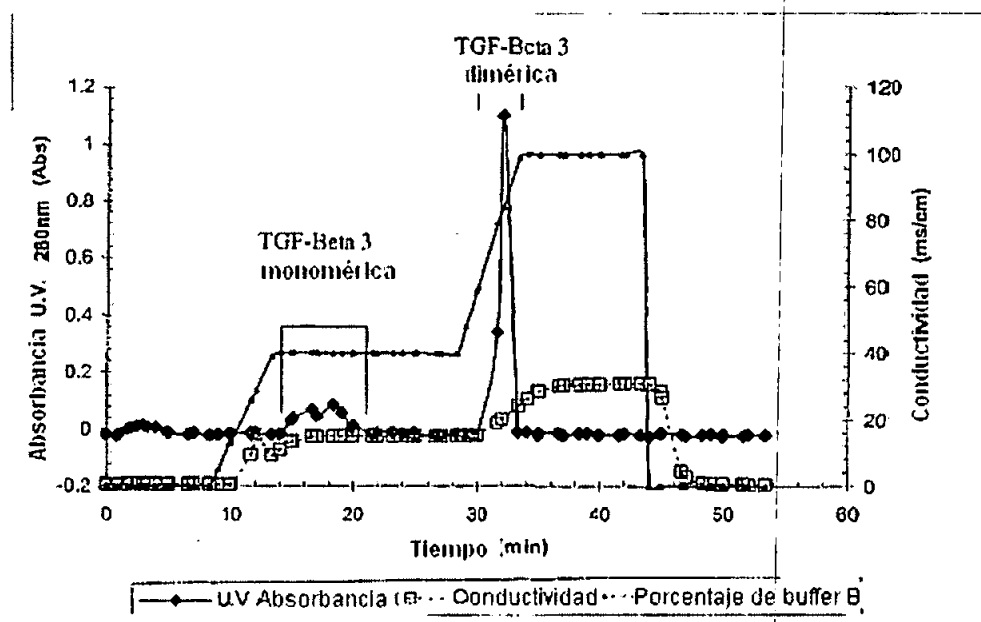
29. Un método de acuerdo con la reivindicación 26 o reivindicación 27, en donde el TGF- β 3, o fragmento o derivado de este, se proporciona en el ojo del paciente.

FIGURA 1 Cromatograma de TGF-Beta 3 tipo salvaje en una columna de butil sefarosa



227

Figura 2. Cromatograma de TGF-Beta 3 monomérico y dimérico en una columna de UNO-S1



228

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 tipo salvaje	3 µg
2	Gly63-Ala	3µg*
3	Gly63-Pro	3µg*
4	Estándares de peso molecular Mark 12	10µl

* el buffer de intercambio de las proteínas mutantes de Gly63-
 Ala y Gly63-Pro produjeron pérdida de algunas muestras, por lo que
 la concentración agregada al gel será menor de los 3 µg indicados.

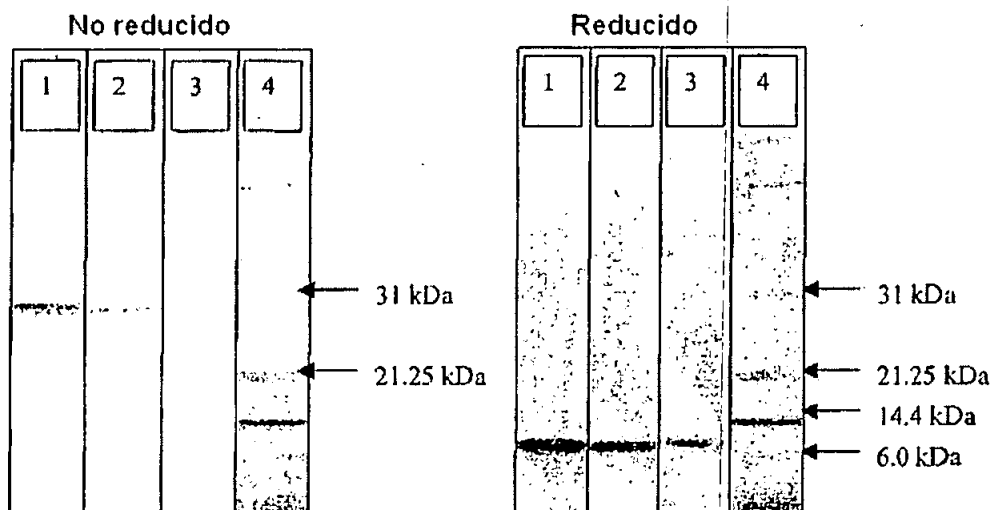
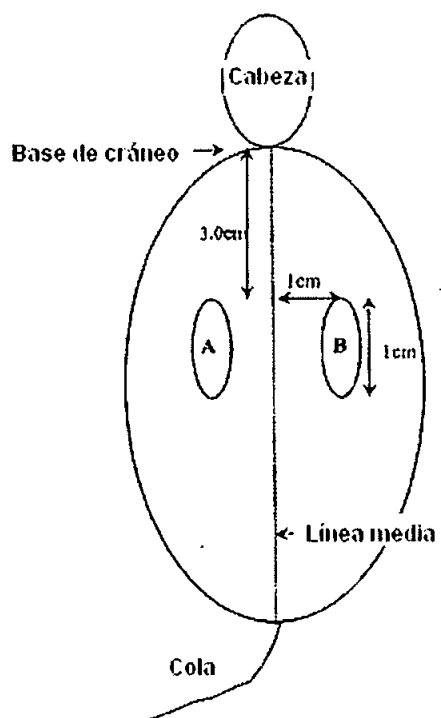
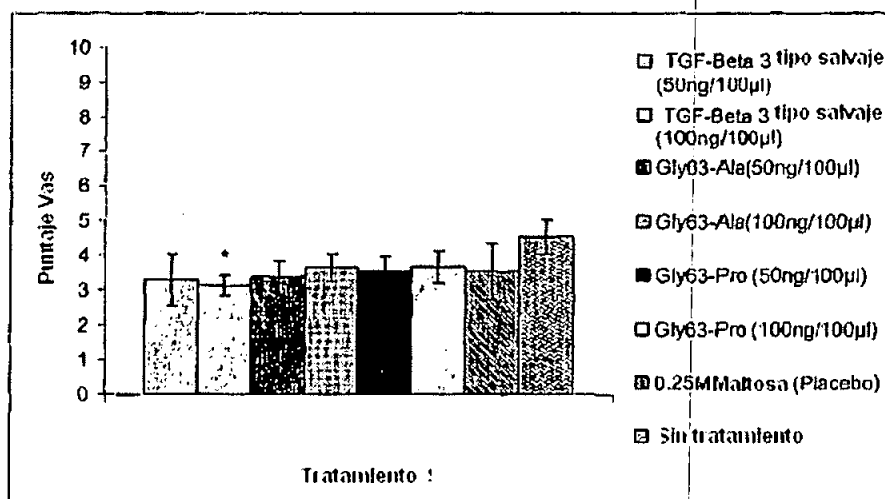


Figura 4. Molde para herida excisional de rata



230

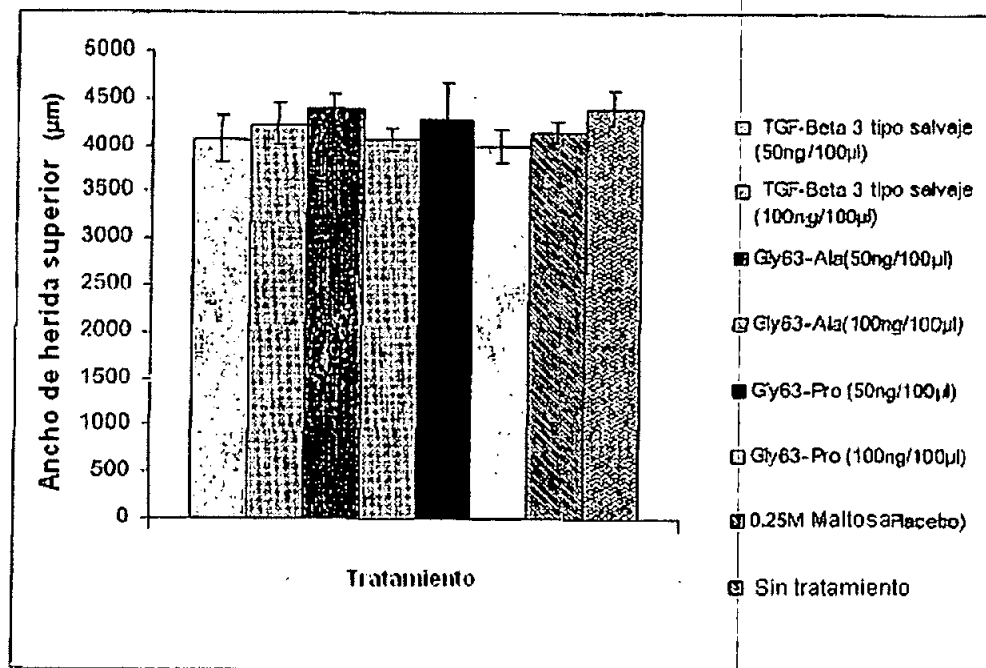
Figura 5 Media de puntaje macroscópico del Día 3 ($\pm$ SD) para heridas incisionales (A y B) tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje y proteínas mutantes



* Curación de herida significativamente aumentada en comparación con las heridas sin tratamiento ($p < 0.05$)

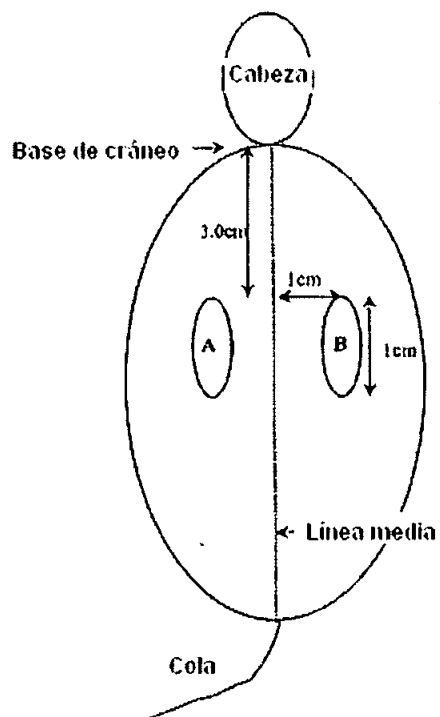
231

Figura 6. Ancho de herida promedio microscópico de día 3 para heridas excisionales (C y D) tratadas con proteínas TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutantes.



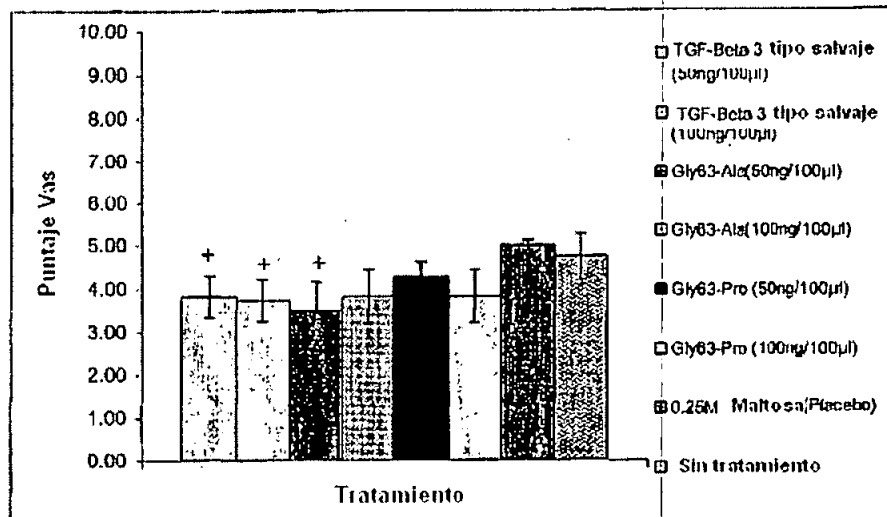
232

Figura 7. Molde para herida incisional de rata



233

Figura 8. Media de puntaje macroscópico del Día 70 ($\pm$ SD) para heridas incisionales (A y B) tratadas con proteínas de TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutantes

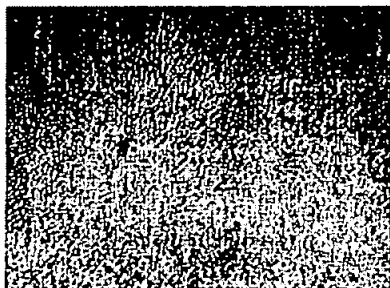


+ Formación de cicatrices significativamente disminuida en comparación con heridas tratadas ($p < 0.05$)

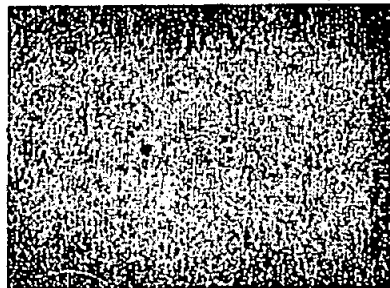
234

Figura 9. Imágenes de cicatriz macroscópicas representativas (70 días después de la herida)

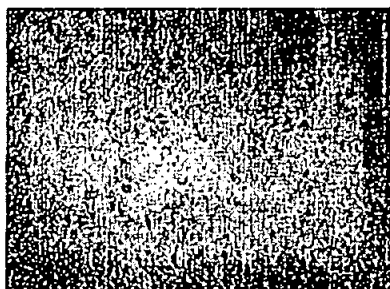
**TGF-Beta 3 tipo salvaje
(50ng/100 μ L)**



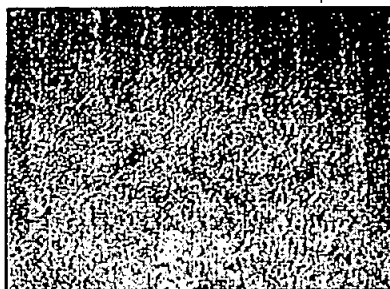
**TGF-Beta 3 tipo salvaje
(100ng/100 μ L)**



**Gly63-Ala TGF-Beta 3
(50ng/100 μ L)**



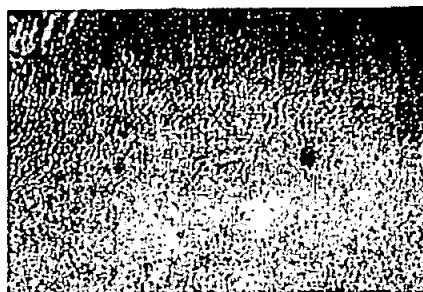
**Gly63-Ala TGF-Beta 3
(100ng/100 μ L)**



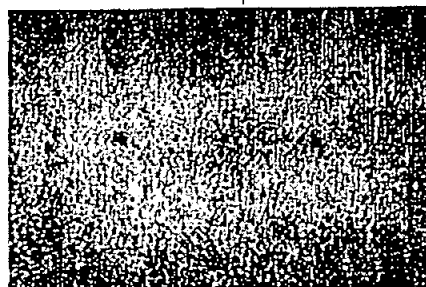
235

Figura 9 Continuación. Imágenes de cicatriz macroscópicas representativas (70 días después de la herida)

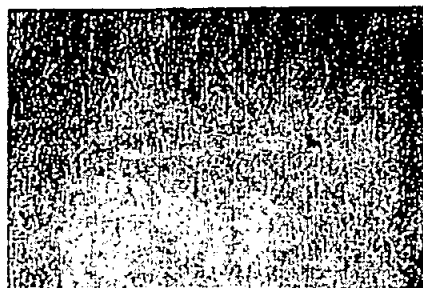
Gly63-Pro
(50ng/100 μ L)



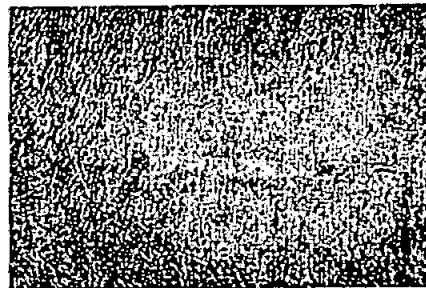
Gly63-Pro
(100ng/100 μ L)



Placebo (0.25M
maltoza)

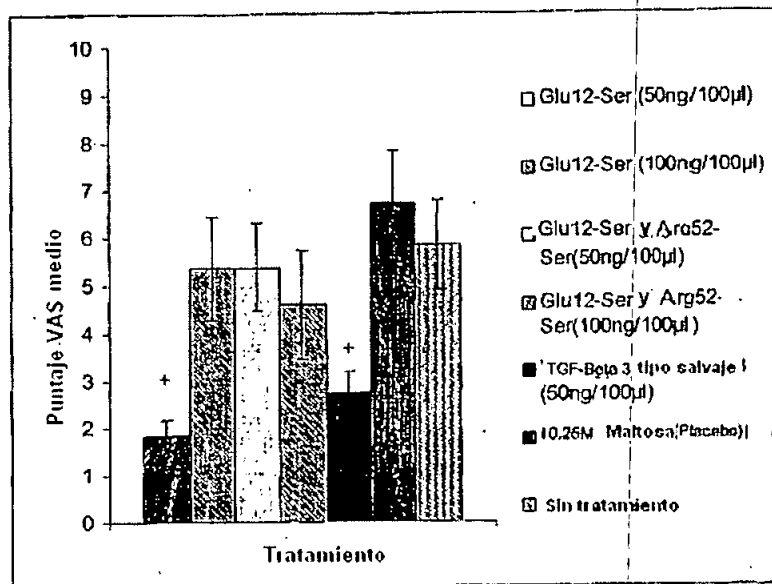


Sin tratamiento



236

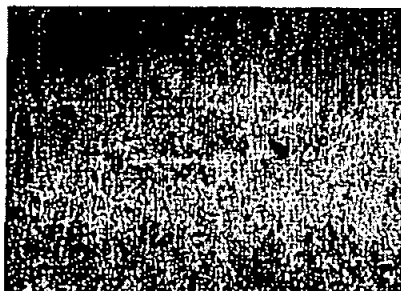
Figura 10. Puntaje microscópico promedio del día 70 para heridas incisionales (A y B) tratadas con proteínas de TGF-Beta 3 tipo salvaje y mutantes



+ Formación de cicatrices significativamente disminuida en comparación con heridas tratadas ($p < 0.05$)

Figura 11. Imágenes de cicatrices microscópicas representativas (70 días después de la herida)

Glu12-Ser (50ng/100 μ L)



Glu12-Ser (100ng/100 μ L)



Glu12-Ser & Arg52-Ser
(50ng/100 μ L)



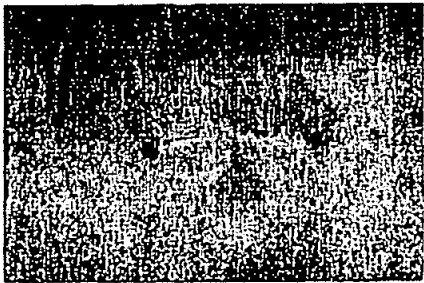
Glu12-Ser & Arg52-Ser
(100ng/100 μ L)



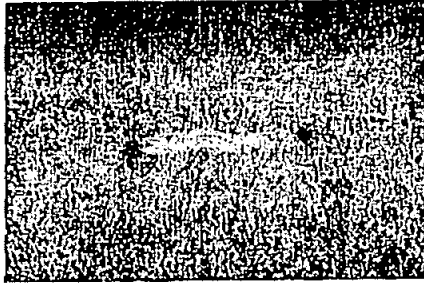
238

Figura 11 continuación Imágenes de cicatrices
microscópicas representativas (70 días después de la
herida)

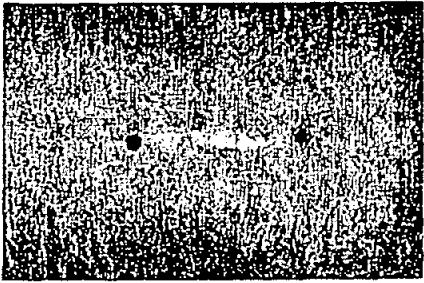
TGF-Beta 3 tipo salvaje 50ng/100µL)



Placcho (0.25M Maltosa) Control

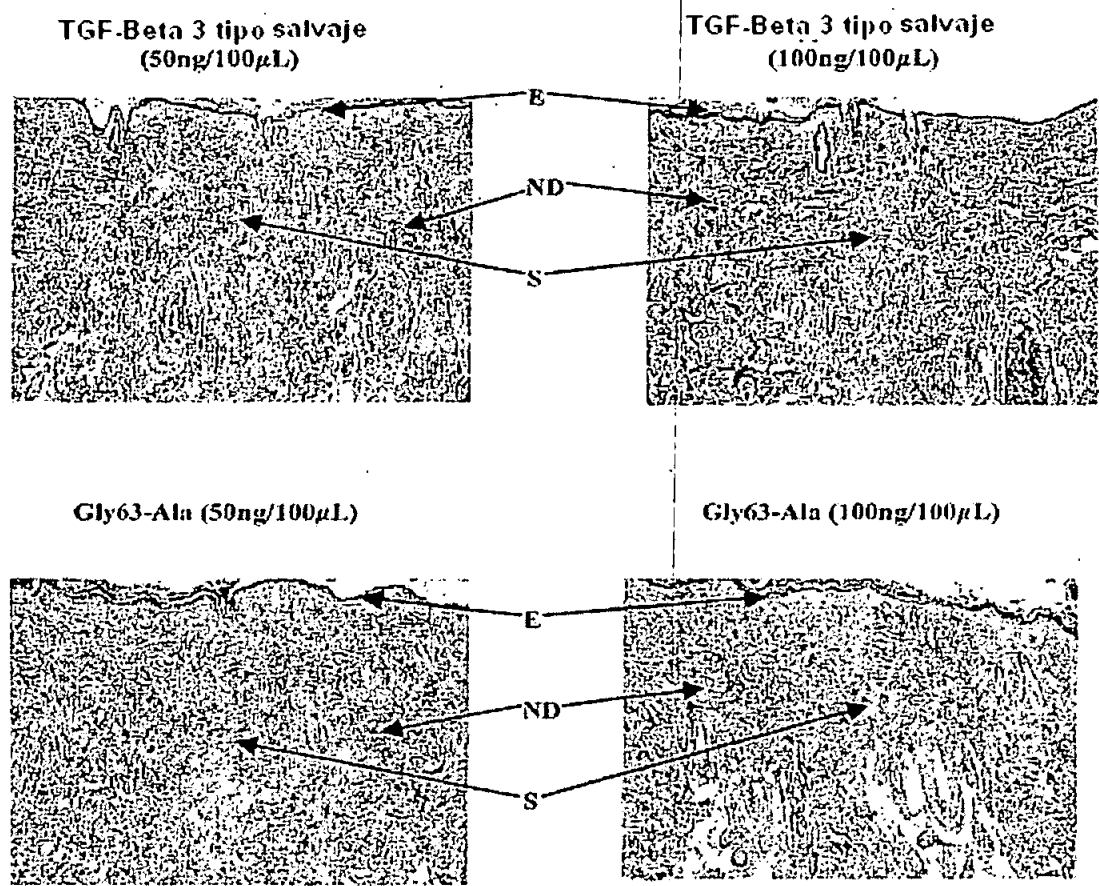


Sin tratamiento (Control)



239

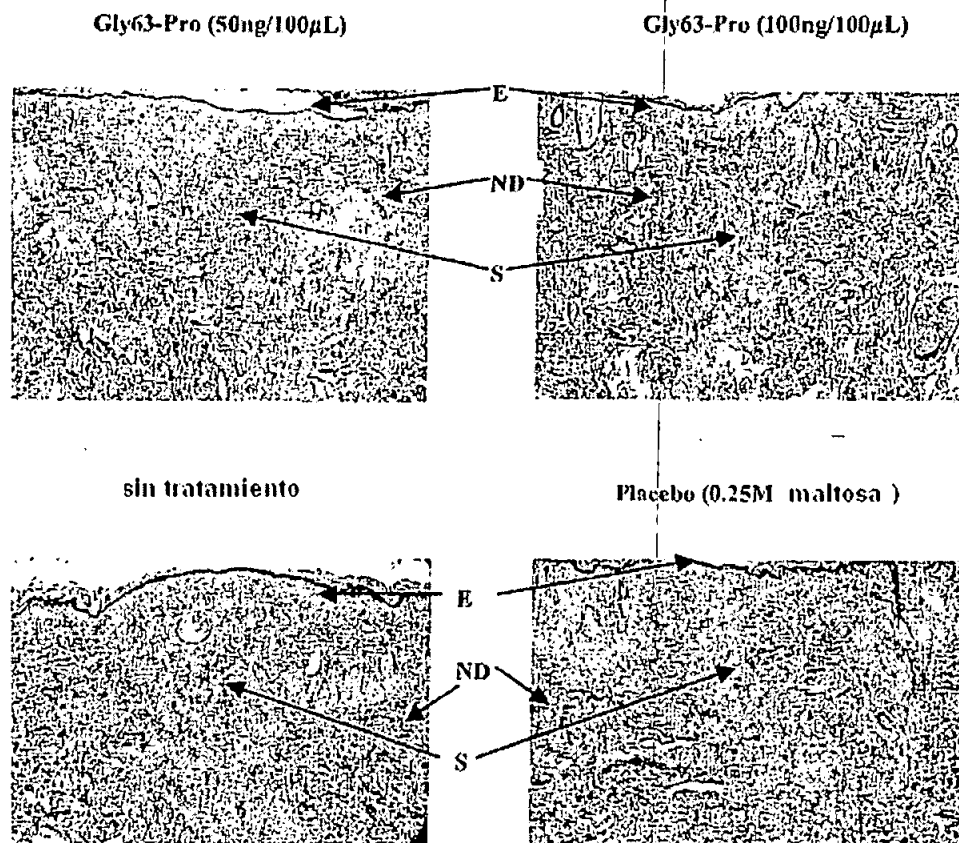
Figura 12. Imágenes de cicatrices microscópicas representativas de heridas tratadas con TGF β 3 tipo salvaje, proteínas mutantes Gly63Pro y Gly63Ala (70 días después de la herida)



Clave
E =
Epidermis
ND=Dermis
normal
S=Cicatriz

240

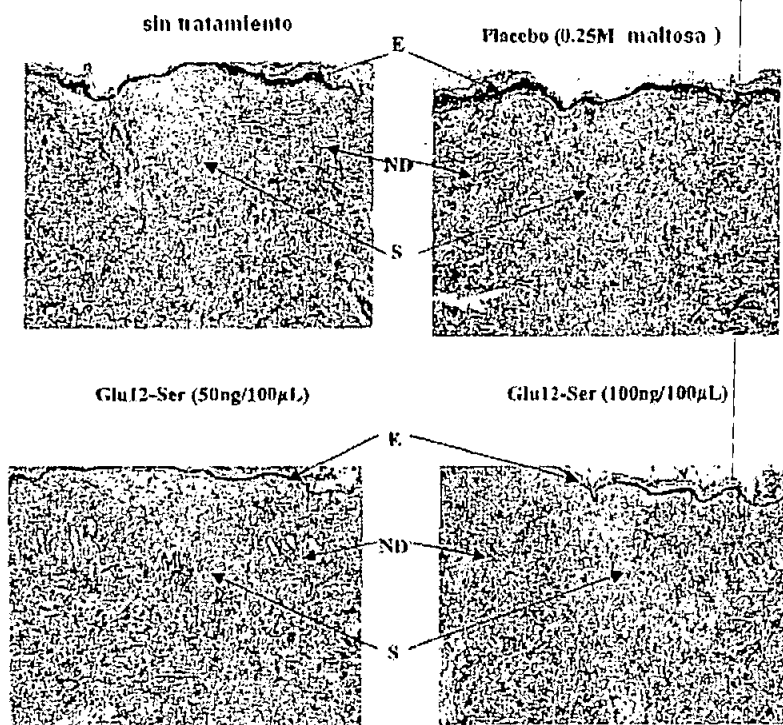
Figura 12 continuación. Imágenes de cicatrices microscópicas representativas de heridas tratadas con TGF-Beta 3 tipo salvaje, proteínas mutantes Gly63Pro y Gly63Ala (70 días después de la herida)



Clave	
E	=
Epidermis	
ND	=
Dermis	
normal	

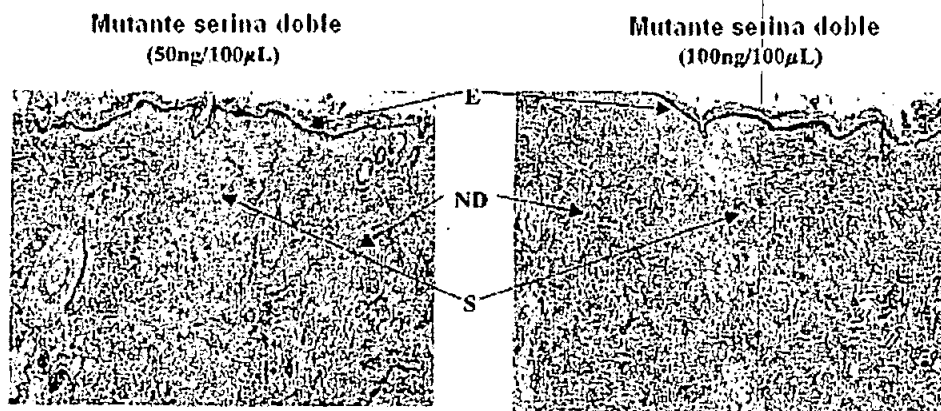
241

Figura 13 Imágenes de cicatrices microscópicas representativas de heridas tratadas con Glu12Ser y mutante de serina doble (Glu12Ser y Arg52Ser) 70 días después de la herida)



242

Figura 13 Continuación Imágenes de cicatrices microscópicas representativas de heridas tratadas con Glu12Ser y mutante de serina doble (Glu12Ser y Arg52Ser) 70 días después de la herida)



Clave	
E=	Epidermis
ND=	Dermis normal
S=	Cicatriz

P122996 WO sequence listing
SEQUENCE LISTING

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

<120> PROTEINS, NUCLEIC ACIDS AND MEDICAMENTS

<130> P90082PWO

<150> GB0604938.1

<151> 2006-03-11

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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> 2

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gcttttgaca ccaattactg cttccgcaac ttggaggaga actgctgtgt gcgccccctc 60

tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat 120

gccaaacttct gctcaggccc ttgcccatat ctccgcagtg cagacacaac ccacagcacg 180

24K

P122996 wo sequence listing

gtgctgggac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgcgtgccc	240
caggacctgg agcccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag	300
ctctccaaca tgggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagc	336

<210> 3
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Mutant TGF-beta 3 "Gly63-Ala"

<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	Ala	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> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> DNA encoding Gly63-Ala mutant

<400> 4

gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttggaggaga actgctgtgt gcgccccctc	60
tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat	120
gccaaacttct gctcaggccc ttgcccatat ctccgcagtg cagacacaac ccacagcacg	180
gtgctggcac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgcgtgccc	240
caggacctgg agcccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag	300
ctctccaaca tgggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagc	336

<210> 5

245

P122996 WO sequence listing

<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mutant TGF-beta 3 "Gly63-Pro"

<400> 5

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 Pro 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> 6
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA encoding Gly63-Pro mutant

<400> 6

gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttggaggaga actgctgtgt gcgccccctc	60
tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat	120
gccaacttct gctcaggccc ttgcccatat ctccgcagtg cagacacaac ccacagcacg	180
gtgctgccac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgcgtgccc	240
caggacctgg agccccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag	300
ctctccaaca tgggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagc	336

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mutant TGF-beta 3 "Glu12-Ser"

<400> 7

246

P122996 WO sequence listing

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Ser 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> 8
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA encoding Glu12-Ser mutant

<400> 8
gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttgtcggaga actgctgtgt gcgccccctc 60
tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat 120
gccaaattct gctcaggccc ttgccatac ctccgcagtg cagacacaac ccacagcacg 180
gtgctgggac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgcgtgccc 240
caggacctgg agccccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag 300
ctctccaaca tgggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagc 336

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mutant TGF-beta 3 "Arg52-Ser"

<400> 9

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

247

P122996 WO sequence listing

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

Pro Tyr Leu Ser 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> 10
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA encoding Arg52-Ser mutant

<400> 10
gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttggaggaga actgctgtgt gcgccccctc 60
tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat 120
gccaacttct gctcaggccc ttgccatac ctcagcagtg cagacacaac ccacagcacg 180
gtgctgggac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgcgtgccc 240
caggacctgg agccccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag 300
ctctccaaca tgggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagc 336

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mutant TGF-beta 3 "Glu12-Ser/Arg52-Ser"

<400> 11

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Ser 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 Ser Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu
50 55 60

248

P122996 WO sequence listing

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> 12
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA encoding Glu12-Ser/Arg52-Ser mutant

<400> 12
gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttgtcggaga actgctgtgt gcgccccctc 60
tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat 120
gccaacttct gctcaggccc ttgcccatac ctcagcagtg cagacacaac ccacagcacg 180
gtgctgggac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgcgtgccc 240
caggacctgg agccccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag 300
ctctccaaca tgggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagc 336

<210> 13
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sense primer

<400> 13
gatataccat ggctttggac accaattact actgc 35

<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sense primer

<400> 14
cagccggatc cggtcgactc agctacattt acaagac 37

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> T7 promoter primer

<400> 15

249

taatacgact cactataggg P122996 WO sequence listing

20

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> T7 terminator primer

<400> 16
gctagttatt gctcagcgg

19

250

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-099910- -00000-0000

Fecha: 2008-09-22 12:43:03 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Evt: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 249



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

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

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

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

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Sandra Rodríguez
Firma Responsable

Fecha SEP-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

251

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 99910
	Solicitud internacional	PCT/GB2007/000833
	Fecha inicio fase nacional	11/10/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 13739

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 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)

2. 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.

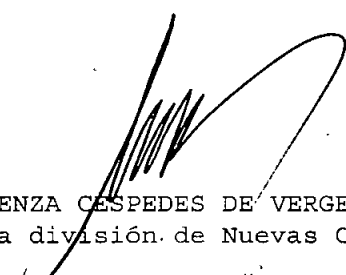
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

252

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 99910



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