



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 239 846**

51 Int. Cl.:
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **99937654 .4**
96 Fecha de presentación : **29.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1100529**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2001**

54 Título: **Mejora de la curación de heridas mediante la timosina β -4.**

30 Prioridad: **30.07.1998 US 94690 P**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **04.03.2011**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **04.03.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **04.03.2011**

73 Titular/es: **The Government of the United States of America, as Repres. by the Secretary of Health and Human Services, Nat. Inst. of Health Office of Technology Transfer Suite 325 6011 Executive Boulevard Rockville, Maryland 20852-3804, US**

72 Inventor/es: **Goldstein, Allan; Malinda, Katherine, M.; Kleinman, Hynda, K. y Sosne, Gabriel**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 239 846 T5

DESCRIPCIÓN

Esta invención se realizó en parte con fondos del Programa Intramural de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno puede tener ciertos derechos sobre esta invención.

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad desde la Serie de Solicitud Provisional N° 60/094,690 presentada el 30 de julio de 1998, para cuya solicitud se realiza una reivindicación prioritaria bajo 35 U. S. C. §119 (e).

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a la reparación de tejidos y más específicamente a los procedimientos de reparación de heridas que usan timosina β 4.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los procedimientos y composiciones inadecuados para cicatrizar de forma efectiva las heridas crónicas son un problema sanitario significativo. La mala cicatrización de heridas incrementa las posibilidades de mortalidad y morbilidad. Este problema es especialmente importante en pacientes con diabetes que desarrollan heridas en las extremidades graves que suponen una amenaza para su vida. Las úlceras crónicas del pie diabético a menudo conducen a amputaciones. Estas heridas son a menudo el resultado de una mala circulación derivada de las células comprometidas por la insulina de los pacientes diabéticos así como una mala vascularización del lecho de la herida, infiltración reducida de células que luchan contra los gérmenes y epitelización tisular reducida. Como resultado de ello, la mayoría de las terapias actuales incluyen intentos de revascularizar el lecho de la herida y prevenir la infección.

Las heridas de los tejidos no comprometidos siguen una compleja y ordenada serie de acontecimientos para reparar el tejido. La serie de acontecimientos puede incluir el infiltrado de células inmunes como parte del procedimiento para retirar y destruir el tejido necrótico, vascularización incrementada mediante factores angiogénicos y proliferación celular incrementada y depósito de matriz extracelular. Aunque se han caracterizado los procedimientos básicos de la reparación de los tejidos, no se conocen bien las etapas y factores individuales necesarios para llevar a cabo esta compleja serie de acontecimientos. La identificación de las etapas y factores individuales podría conducir a procedimientos

mejorados para el tratamiento de las enfermedades que resultan de procedimientos de reparación de heridas inadecuados.

Los estudios previos han usado el ensayo del cierre de “arañazos” para evaluar los efectos potenciales de un agente sobre la migración celular in vitro. Aunque es informativa, esta prueba no imita las condiciones dinámicas de cicatrización de heridas in vivo hasta el punto de que no todos los factores involucrados en el cierre de heridas están presentes en el ensayo in vitro. Por esta razón, se han desarrollado sistemas in vivo para evaluar la capacidad de un agente o factor para modular las actividades de cicatrización de heridas.

Usando este tipo de modelos in vitro, se han reconocido varios factores de crecimiento específicos por su efecto sobre la angiogénesis. Uno de estos factores de crecimiento es el TGF- β . Esta familia de proteínas diméricas incluye TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y TGF- β 5 que regulan el crecimiento y diferenciación de muchos tipos celulares. Esta familia de proteínas presenta un intervalo de efectos biológicos que van desde la estimulación del crecimiento de algunos tipos celulares (Noda y col., (1989) *Endocrinology*, 124:2991-2995) a la inhibición del crecimiento de otros tipos celulares (Goey y col., (1989) *J. Immunol.*, 143:877-880; Pietenpol y col., (1990) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EEUU*, 87:3758:3762). TGF- β ha mostrado también incrementar la expresión de las proteínas de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno y la fibronectina (Ignotz y col., (1986) *J. Biol. Chem.*, 261:4337-4345) y acelera la cicatrización de las heridas (Mustoe y col., (1987) *Science*, 237:1333-1335).

Otro factor de crecimiento reconocido por su efecto sobre la angiogénesis es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Originalmente se halló que PDGF era un potente mitógeno para las células derivadas del mesénquima (Ross R. y col., (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 71(4):1207-1210; Kohler N. y col., (1974) *Exp. Cell Res*, 87:297-301). Estudios adicionales han mostrado que PDGF incrementa la velocidad de celularidad y granulación de la formación del tejido. Las heridas tratadas con PDGF tienen la apariencia de una respuesta inflamatoria de fase temprana, incluyendo un incremento de los tipos celulares neutrófilos y macrófagos en el lugar de la herida. Estas heridas han mostrado también una función de los fibroblastos aumentada (Pierce, GF y col., (1988) *J. Exp. Med.* 167:974-987). Tanto PDGF como TGF- β han mostrado incrementar la formación de colágeno, el contenido de ADN y los niveles de proteínas en los estudios con animales. (Grotendorst, GR y col., (1985) *J. Clin. Invest.* 76:2323-2329; Sporn, MB y col., (1983) *Science* 219:1329). Se ha demostrado que el efecto de PDGF en la cicatrización de heridas es efectivo en las heridas humanas. En las heridas humanas, la expresión de PDGF-AA se incrementa en las úlceras por presión sometidas a cicatrización. El incremento de PDGF-AA

corresponde a un incremento de los fibroblastos activados, el depósito de matriz extracelular y la vascularización activa de la herida. Además, este incremento de PGDF-AA no se ve en heridas crónicas que no cicatrizan. Otros factores de crecimiento que tienen la capacidad de inducir la angiogénesis y la cicatrización de heridas incluyen el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF).

Sin embargo, la mayoría de estos factores de crecimiento y angiogénicos tienen efectos secundarios. Por consiguiente, se necesitan factores adicionales útiles en la promoción de la reparación de las heridas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la timosina $\beta 4$ (T $\beta 4$) acelera la cicatrización de las heridas y estimula la reparación de las heridas. En base a este hallazgo, ahora es posible desarrollar procedimientos para acelerar la cicatrización de las heridas de sujetos que tienen heridas que necesitan este tratamiento.

En una primera forma de realización, la invención proporciona el uso de la reivindicación 1. En una segunda forma de realización, la invención proporciona el uso de la reivindicación 4.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción posterior. Otros rasgos, objetivos, y ventajas de la invención quedarán claras de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un dibujo esquemático de una herida.

La figura 2 es un gráfico de barras que muestra el efecto de la liberación tópica y sistémica de T $\beta 4$ en la anchura de una herida de punzón comparado con el control. (A) La liberación tópica de 5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ se realizó en tres de las seis heridas de cada animal el día de la herida y a las 48 horas de la herida. (B) Las inyecciones intraperitoneales de 60 $\mu\text{g}/300 \mu\text{L}$ se realizaron el día de la herida y cada día después. Los animales control se trataron de forma similar con salino. Las medidas se expresan como el porcentaje de descenso medio $\pm$ SEM.

La figura 3 es una gráfica de barras que muestra el efecto de la liberación tópica y sistémica de T $\beta 4$ en el hueco de una herida de punzón comparado con el

- control. (A) La liberación tópica de 5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ se realizó en tres de las seis heridas de cada animal el día de la herida y a las 48 horas de la herida. (B) Las inyecciones intraperitoneales de 60 $\mu\text{g}/300 \mu\text{L}$ se realizaron el día de la herida y cada día después. Los animales control se trataron de forma similar con salino. Las medidas se expresan como el porcentaje de descenso medio $\pm$ SEM.
- 5 La figura 4 es una sección histológica, teñida con H&E, que demuestra la apariencia a pequeño aumento y a gran aumento de las heridas control y las tratadas con timosina $\beta 4$. Las heridas son del día 7 como se describe en la leyenda de la
- 10 figura 2. Las flechas indican los bordes de la herida original. (A) Herida control tratada con salino. La migración del epitelio es visible en los bordes de la herida y los restos son visibles a través de la herida no cicatrizada. (B) La reepitelización incrementada de la herida ocurrió cuando se inyectó T $\beta 4$ intraperitoneal (60 $\mu\text{g}/300 \mu\text{L}$ en días alternos). (C) El tratamiento tópico (5
- 15 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ de T $\beta 4$) dio como resultado la completa reepitelización de la epidermis de la herida. Las áreas encuadradas son la localización de los campos más aumentados (D-F). (D-F) Dermis junto a la unión dérmica y epidérmica. (D) Control que muestra pocas células junto a la dermis y poca neovascularización. (E) y (F) Dermis que muestra tejido de granulación infiltrado con fibroblastos y amplia neovascularización (cabezas de flecha).
- 20 (E) El tratamiento intraperitoneal y (F) la aplicación tópica dieron como resultado nuevos capilares significativos. (Barra de la escala = 1 mm).
- La figura 5 muestra secciones histológicas de heridas de 7 días que muestran depósito/acumulación de colágeno. La tinción tricrómica de Masson muestra
- 25 el colágeno y las células endoteliales. (A) Vista a pequeño aumento de una herida control tratada con salino. (B) y (C) Vistas a pequeño aumento de heridas en las que se inyectó T $\beta 4$ intraperitoneal (B) o se aplicó de forma tópica (A). Las áreas encuadradas son la localización de los campos más aumentados (D-F). Las flechas indican los bordes de la herida original. (D)
- 30 Herida de control a mayor aumento que muestra la acumulación basal de colágeno. El tratamiento intraperitoneal (E) o (F) tópico dio como resultado una producción/acumulación de colágeno aumentada comparada con las heridas tratadas con salino. (Barra de la escala = 1 mm).
- La figura 6 muestra la migración de queratinocitos estimulada por T $\beta 4$ en ensayos en
- 35 cámara de Boyden. (A) La T $\beta 4$ de los pocillos inferiores de la cámara dio

- como resultado un incremento del doble o el triple de la migración sobre filtros recubiertos con colágeno IV. El control positivo, con medio acondicionado, también mostró migración incrementada sobre el medio sólo.
- 5 La figura 7 muestra una gráfica que demuestra la migración de las células del epitelio corneal a distintas concentraciones de T β 4.
- La figura 8 muestra una gráfica que representa la reepitelización corneal de córneas de rata en presencia y ausencia de T β 4.
- La figura 9 muestra una gráfica que representa la reepitelización corneal en presencia y ausencia de distintas concentraciones de T β 4.
- 10 La figura 10 muestra una secuencia de aminoácidos de T β 4.
- La figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de varias isoformas conocidas de T β 4, y su distribución filogenética. La acetilación N-terminal se indica mediante "ac". Se piensa que los residuos entre 13 y 24 son importantes para la unión de la actina.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La timosina β 4 se identificó inicialmente como una proteína que se regula durante la migración y diferenciación in vitro de las células endoteliales. La timosina β 4 se aisló originalmente del timo y es un polipéptido de 43 aminoácidos y 4,9 kDa ubicuo identificado en variedad de tejidos. Se han asignado varios papeles a esta proteína incluyendo un papel en la diferenciación y migración de las células endoteliales, diferenciación de células T, secuestro de actina y vascularización. Una actividad biológica de la timosina β 4 (T β 4), como se muestra en la presente memoria descriptiva, tiene como efecto la reparación de tejidos y la cicatrización de heridas. Otra actividad de T β 4 es una actividad antiinflamatoria.

25 La presente invención resultó de la investigación de los efectos de T β 4 sobre la cicatrización de las heridas. Los resultados in vivo han demostrado que la liberación tópica y sistémica de T β 4 promueve la cicatrización de las heridas. Los experimentos adicionales demostraron que las heridas tratadas con T β 4 tienen un depósito de matriz extracelular incrementado en el lecho de la herida.

30 La presente invención identifica T β 4 como un factor activo en la promoción del cierre de heridas y la reparación tisular in vivo así como en el incremento de la migración de las células epiteliales. La administración in vivo de T β 4 indica que la migración celular, angiogénesis y depósito de matriz extracelular son estimuladas en o por encima de los niveles observados para la migración, angiogénesis y depósito de matriz de los animales control. T β 4 promueve el cierre de heridas cuando se administra de forma sistémica (por

35

ejemplo, intraperitoneal) y tópica en modelos animales con heridas. Los niveles incrementados de colágeno también se observaron en heridas tratadas que muestran que el tratamiento con T β 4 también puede acelerar la contracción de la herida y estimular el proceso de cicatrización.

5 Los procedimientos de la invención resultan de la identificación del efecto de T β 4 sobre la cicatrización de las heridas. In vivo, T β 4 estimula la cicatrización de las heridas en todo el espesor de una herida de punzón (ver ejemplo 1) y en la reparación de heridas relacionadas con los ojos (ejemplo 4). Cuando se administra de forma tópica o sistémica (por ejemplo, intraperitoneal) T β 4 aceleró el cierre y la cicatrización de las heridas (ver
10 ejemplo 1, 4 y 5).

Promoción de la regeneración tisular

En una forma de realización, la invención proporciona medios para acelerar la cicatrización de las heridas de un sujeto mediante el contacto de la herida con una cantidad
15 efectiva para la cicatrización de la herida de una composición que contiene T β 4. El contacto puede ser de forma tópica o sistémica. Los ejemplos de administración tópica incluyen, por ejemplo, el contacto de la herida con una loción, bálsamo, gel, crema, pasta, spray, suspensión, dispersión, hidrogel, ungüento, o aceite que comprenden T β 4. La administración sistémica incluye, por ejemplo, inyecciones intravenosas, intraperitoneales e
20 intramusculares de una composición que contiene T β 4. Un sujeto puede ser cualquier mamífero, preferentemente humano.

Además, T β 4 tiene valor terapéutico en casos en los que hay un proceso de cicatrización de heridas mermado, como en los sujetos con la cicatrización de las heridas comprometida. Por “cicatrización de las heridas comprometida” se entiende los sujetos que
25 tienen reducida, disminuida, o incapacidad para recuperarse de una herida o un trauma, debido a heridas, trauma, o incapacidad recurrente del sistema natural del individuo para efectuar apropiadamente la cicatrización de las heridas. Por ejemplo, los esteroides reducen la capacidad de cicatrizar de un sujeto comparada con un sujeto que no consume esteroides. Otras heridas presentes en sujetos comprometidos incluyen, pero no se limitan a,
30 a, heridas cutáneas como úlceras diabéticas, úlceras venosas o úlceras por presión. Además, T β 4 tiene valor terapéutico para aumentar el proceso de cicatrización normal.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, una “cantidad efectiva para la cicatrización de heridas” de una composición que contiene T β 4 para usar en la cicatrización de heridas se define como la cantidad que es efectiva para promocionar la regeneración y
35 reparación tisular. La “cantidad efectiva para la cicatrización de heridas” puede ser la

cantidad efectiva terapéuticamente. Las enfermedades, alteraciones o quejas posiblemente moduladas mediante T β 4 incluyen las reparaciones tisulares secundarias a lesiones traumáticas o situaciones que incluyen artritis, osteoporosis y otras alteraciones músculo esqueléticas, quemaduras, úlceras y otras lesiones cutáneas, enfermedades neurológicas y nerviosas y enfermedades cardiovasculares que incluyen isquemia y arterioesclerosis. Otros tejidos potenciales que se pueden tratar mediante los procedimientos y composiciones de la invención incluyen los tejidos epidérmico, ocular, urogenital, gastrointestinal, cardiovascular, muscular, conectivo y neural. El término "inducir", "inducción" o "efecto" como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a la activación, estimulación, aumento, inicio y/o mantenimiento de los mecanismos o procedimientos celulares necesarios para la formación de un tejido o una porción del mismo, procedimientos de reparación o desarrollo tisular como se describe en la presente memoria descriptiva.

Modulación de la cicatrización de heridas

La cicatrización de heridas, regeneración tisular y reparación tisular resultan de un complejo procedimiento que incluye la proliferación y migración de células inflamatorias, células endoteliales, células estromales y células parenquimatosas, el depósito de materiales de matriz extracelular y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, en particular capilares. Este complejo procedimiento desempeña un papel crucial en funciones beneficiosas como la embriogénesis, el ciclo reproductor femenino, así como en funciones anómalas como la artritis, ulceraciones crónicas y enfermedades neurodegenerativas.

En otra forma de realización, la invención proporciona medios para modular la cicatrización de las heridas de un sujeto o un tejido que incluye poner en contacto al sujeto o el tejido con una cantidad efectiva para la cicatrización de heridas de una composición que contiene T β 4. Se prevé que T β 4 se puede administrar de forma tópica o sistémica para prevenir o tratar un tejido dañado incluyendo, por ejemplo, tejidos dañados debido a isquemia, incluyendo enfermedad isquémica del cerebro, hueso y corazón, daño del tejido corneal o retiniano del ojo, y daño del tejido epitelial, incluyendo la piel.

Además, el uso de la invención es útil en la promoción de la cicatrización de las heridas de los tejidos mediante la promoción de la angiogénesis del tejido privado de un flujo sanguíneo adecuado. Por ejemplo, una composición que contiene T β 4 puede promover la cicatrización de las úlceras crónicas mediante el incremento del aporte sanguíneo al tejido así como el incremento de la migración de queratinocitos para cerrar una herida.

Se han identificado isoformas, que no forman parte de la invención, de T β 4 y tienen aproximadamente el 70%, o aproximadamente el 75%, o aproximadamente el 80% o más

de homología con la secuencia de aminoácidos de T β 4 expuesta en la figura 10. Estas isoformas incluyen, por ejemplo, T β 4^{ala}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 y T β 15 (figura 11; ver también, Mihelic y col., (1994) Amino Acids, 6:1-13, que describe la secuencia de aminoácidos de otras isoformas de T β 4, y se incorpora en la presente memoria descriptiva como antecedente). De forma similar a T β 4, se ha demostrado que las isoformas de T β 10 y T β 15 secuestran actina. T β 4, T β 10 y T β 15, así como estas otras isoformas se reparten una secuencia de aminoácidos, LKKTET, que parece estar involucrada en la mediación del secuestro o unión de la actina. Aunque sin desear que se una a una teoría en particular, la actividad cicatrizante de heridas de T β 4 y las isoformas de T β 4 se puede deber, en parte, a la capacidad de polimerizar la actina. Por ejemplo, T β 4 puede modular la polimerización de la actina de las heridas para promover la cicatrización (por ejemplo, parece que las timosinas β despolimerizan la F-actina mediante el secuestro de G-actina libre). La capacidad de T β 4 para modular la polimerización de la actina puede deberse por lo tanto en su totalidad, o en parte, a su habilidad para unirse o secuestrar actina vía secuencia LKKTET. De este modo, al igual que con T β 4, es probable que otras proteínas que unen o secuestran actina, o modulan la polimerización de la actina, incluyendo las isoformas de T β 4 que tienen la secuencia de aminoácidos LKKTET, promuevan la cicatrización de heridas solas, o en combinación con T β 4, como se expone en la presente memoria descriptiva.

T β 4 se ha localizado en varios tejidos y tipos celulares y así, se pueden añadir agentes que estimulan la producción de T β 4 a una composición para efectuar la producción de T β 4 de un tejido y/o una célula. Los agentes que efectúan la reparación de heridas también se pueden incluir en una composición para aumentar el proceso de cicatrización de la herida. Estos agentes incluyen miembros de la familia de los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), timosina α 1 (T α 1) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Con más preferencia, el agente es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) u otros miembros de la superfamilia TGF- β . Las composiciones de T β 4 ayudan en la cicatrización de heridas al efectuar el crecimiento del tejido conectivo a través del depósito de matriz extracelular, migración celular y vascularización del lecho de la herida.

Además, los agentes que ayudan o estimulan el proceso de cicatrización de la herida se pueden añadir a una composición junto con T β 4 para modular el proceso de cicatrización de la herida. Estos agentes incluyen agentes angiogénicos, factores de crecimiento, agentes

que dirigen la diferenciación de células, agentes que promueven la migración de células y agentes que estimulan la provisión de materiales de matriz extracelular en el lecho de la herida. Por ejemplo, y no como limitación, se puede añadir T β 4 con uno o más de los siguientes agentes: VEGF, KGF, FGF, PDGF, TGF β , IGF-1, IGF-2, IL-1, protimosina α y timosina α 1 en una cantidad efectiva para la cicatrización de heridas.

En otro aspecto, la invención es útil para la reparación de tejidos que resultan de daños debidos a procedimientos quirúrgicos, irradiación, laceración, químicos tóxicos, infecciones virales, infecciones bacterianas o quemaduras. Además, la invención es útil para revitalizar el tejido de costra que resulta de distintos procedimientos, accidentes o traumas. El término “tejido de costra” significa tejido fibrótico o colágeno formado durante la cicatrización de una herida u otro proceso mórbido. Por ejemplo, se puede incluir T β 4 en una matriz de liberación controlada que se puede colocar cerca de un tejido dañado para promover así la regeneración, reparación y/o revascularización de este tejido. El término “matriz de liberación controlada” significa cualquier composición que permite la liberación de una sustancia bioactiva que se mezcla o adiciona a la misma. La matriz puede ser una composición sólida, un material poroso (como un esqueleto, malla o esponja), o una suspensión semisólida, en gel o líquida que contiene sustancias bioactivas. El término “material bioactivo” significa cualquier composición que modula la reparación del tejido cuando se usa de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. Los materiales o matrices bioactivas se pueden introducir mediante inyección, cirugía, catéteres o cualquier otro medio adecuado para modular la reparación del tejido.

Se prevé que los usos de la invención se pueden usar para ayudar a la cicatrización y reparación de heridas de los procedimientos de regeneración tisular de las guías (GTR). Estos procedimientos se usan actualmente por los expertos en las materias médicas para acelerar la cicatrización de la herida. Normalmente, se usan materiales no reabsorbibles o bioabsorbibles para acelerar la cicatrización de la herida mediante la promoción de la repoblación del área de la herida con células que forman la matriz arquitectural y estructural del tejido. Por ejemplo, los usos de la invención se pueden usar para ayudar en la reparación o regeneración tisular en una úlcera de un ser humano u otro sujeto mediante la colocación de una composición que contiene un polímero bioreabsorbible y T β 4 en el lugar que necesita la reparación o regeneración tisular de modo que la composición es efectiva para ayudar en la regeneración tisular mediante la liberación en el lugar de una cantidad efectiva, para la cicatrización de heridas, de T β 4.

En otro aspecto, la invención es útil para los propósitos de promover el crecimiento del tejido durante el proceso de ingeniería tisular. Como se usa en la presente memoria

descriptiva, “ingeniería tisular” se define como la creación, diseño, y fabricación de dispositivos prostéticos biológicos, en combinación con materiales sintéticos o naturales, para la creación, mejora o reemplazamiento de tejidos y órganos corporales. Por lo tanto, el presente procedimiento se puede usar para mejorar el diseño y crecimiento de tejidos humanos fuera del cuerpo, para una implantación posterior en el cuerpo, o mejorar el diseño y crecimiento de un tejido dentro del cuerpo para reparar o reemplazar un tejido enfermo o dañado. Por ejemplo, T β 4 puede ser útil en la promoción del crecimiento de reemplazamientos de injertos cutáneos que se usan como terapia en el tratamiento de quemaduras y úlceras.

En otro aspecto de la ingeniería tisular, se puede incluir T β 4 en dispositivos externos o internos que contienen tejidos humanos diseñados para reemplazar la función de un tejido interno enfermo. Este enfoque incluye células aisladas del cuerpo, que se colocan sobre o dentro de matrices tridimensionales y el nuevo sistema se implanta dentro del cuerpo o se usa el sistema fuera del cuerpo. Los usos de la invención se pueden usar e incluir en estas matrices para promover el crecimiento de los tejidos contenidos en las matrices. Por ejemplo, se puede incluir T β 4 en un constructo de ingeniería tisular para promover el crecimiento de las células contenidas en el constructo. Se prevé que el uso de la invención se puede usar para mejorar la reparación, regeneración e ingeniería del tejido de productos relacionados con células endoteliales que pueden contener cartílago, compuestos cartílago-hueso, hueso, tejidos del sistema nervioso central, músculo, hígado, células de los islotes pancreáticos (productores de insulina), tejidos urogenitales, mamas y tejidos para solicitudes de terapia génica.

Además, la administración de T β 4 podría usarse para mejorar las funciones uterinas en una situación en la que se desea la promoción del crecimiento de las células endoteliales. Por ejemplo, el útero se puede tratar con T β 4 para promocionar la reparación de las membranas de la placenta de estos tejidos que siguen a la lesión tisular.

Los enfoques terapéuticos descritos en la presente memoria descriptiva incluyen distintas vías de administración o liberación de reactivos o composiciones que comprenden la T β 4 de la invención incluyendo cualquier técnica de administración convencional (por ejemplo, pero sin limitarse a, administración tópica, inyección local, inhalación, o administración sistémica), a un sujeto con una herida o tejido con necesidad de cicatrización o reparación. La administración de T β 4, como se describe anteriormente, puede acelerar la cicatrización de la herida, incrementar la migración celular en una herida, inducir la formación de tejido de reparación o regeneración, o promocionar el crecimiento y desarrollo del endometrio. El reactivo, formulación o composición también se puede dirigir a células o

receptores específicos mediante cualquier procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva o mediante cualquier procedimiento conocido en la materia de liberar, dirigir polipéptidos T β 4 y expresar genes que codifican para T β 4. Por ejemplo, los procedimientos y composiciones que usan o contienen la T β 4 se pueden formular en composiciones farmacéuticas mediante la adición de excipientes o vehículos no tóxicos aceptables farmacéuticamente. Estas composiciones se pueden preparar para administración parenteral, particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas en soluciones tampón acuosas fisiológicas; para administración oral, en particular en forma de comprimidos o cápsulas; o para administración intranasal, en particular en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles. Las composiciones de liberación sostenida también quedan abarcadas por la presente invención. Las composiciones para otras vías de administración se pueden preparar si se desean usando procedimientos estándar.

Una composición que contiene T β 4 se puede administrar convenientemente en forma de dosis única, y se puede preparar mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en materia farmacéutica, por ejemplo, como se describe en Ciencias Farmacéuticas de Remington (Mack Pub. Co., PA, 1990). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener como excipientes habituales agua estéril o salino, glicoles de polialquileno como el polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y similares. En particular, los polímeros de lactato biodegradables y biocompatibles, copolímeros de lactato/glicolato, o los copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno son ejemplos de excipientes para controlar la liberación de un compuesto de la invención in vivo. Otros sistemas de liberación parenteral adecuados incluyen partículas de copolímero de acetato de etilenevinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para la administración inhalada pueden contener excipientes como lactosa, si se desea. Las formulaciones para inhalación pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, éter de polioxietilén-9-laurilo, glicocolato y deoxicolato, o pueden ser soluciones oleosas para administrar en forma de gotas nasales. Si se desea, los compuestos se pueden formular como un gel que se va a aplicar de forma intranasal. Las formulaciones para administración parenteral también pueden incluir glicocolato para administración bucal.

La composición del liposoma normalmente es una combinación de fosfolípidos, en particular fosfolípidos de transición de fase a alta temperatura, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. Se pueden usar también otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes.

Ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidos y gangliósidos. Son particularmente útiles los diacilfosfatidilgliceroles, en los que las fracciones de lípidos contienen de 14-18 átomos de carbono, en particular de 16-18 átomos de carbono, y es saturado. Fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina.

La diana de los liposomas se ha clasificado basándose en factores anatómicos y mecánicos. La clasificación anatómica se basa en el nivel de selectividad, por ejemplo, específica de órgano, específica de célula, y específica de organela. La diana mecánica se puede distinguir basándose en si es pasiva o activa. La diana pasiva utiliza la tendencia natural de los liposomas a distribuirse en células del sistema retículo endotelial (RES) de órganos que contienen capilares sinusoidales. La diana activa, por otra parte, incluye la alteración del liposoma mediante la unión del liposoma a un ligando específico como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glucolípido, o proteína, o mediante el cambio de la composición o el tamaño del liposoma para lograr dianas en órganos y tipos celulares distintas de los lugares de localización que ocurren de forma natural.

La superficie de los sistemas de liberación diana se puede modificar de distintas formas. En el caso de un sistema de liberación diana liposomal, se pueden incorporar grupos de lípidos en la bicapa lipídica del liposoma para mantener al ligando diana en asociación estable con la bicapa lisosomal. Se pueden usar varios grupos de enlace para unir las cadenas lipídicas al ligando diana. En general, los compuestos unidos a la superficie del sistema de liberación diana serán ligandos y receptores que permitirán al sistema de liberación diana encontrar y “alojarse” en las células deseadas. Un ligando puede ser cualquier compuesto de interés que se enlace a otro compuesto, como un receptor.

Los agentes terapéuticos útiles en el uso de la invención se pueden administrar de forma parenteral mediante inyección o mediante perfusión gradual en el tiempo. La administración puede ser intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria o transdérmica.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones, y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen salino y medios tampón. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, vehículos intravenosos de Ringer lactato que incluyen expansores fluidos y

con nutrientes, expansores con electrolitos (como los basados en la dextrosa de Ringer), y similares. Los conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva terapéuticamente de T β 4 o una isoforma de T β 4 en un vehículo aceptable farmacéuticamente. Estos vehículos incluyen los enumerados anteriormente en relación a la administración parenteral.

La dosis actual de reactivo, formulación o composición que modula un proceso de reparación tisular, alteración fibrótica, una alteración esclerótica, una alteración proliferativa celular, o la cicatrización de heridas depende de muchos factores, incluyendo el tamaño y la salud del sujeto. Sin embargo, un experto en la materia puede usar las siguientes enseñanzas que describen los procedimientos y técnicas para determinar las dosis clínicas (Spilker B., Guide to Clinical Studies and Developing Protocols, Raven Press Books, Ltd., Nueva York, 1984, pág. 7-13, 54-60; Spilker B., Guide to Clinical Trials, Raven Press, Ltd., Nueva York, 1991, pág. 93-101; Craig C., y R. Stitzel, eds., Modern Pharmacology 2^a edición, Little, Brown and Co., Boston, 1986, pág. 127-33; T. Speight, ed., Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3^a edición, Williams and Wilkins, Baltimore, 1987, pág. 50-56; R. Tallarida, R. Raffa y P. McGonigle, Principles in General Pharmacology, Springer-Verlag, Nueva York, 1988, pág. 18-20) o para determinar la dosis de uso apropiada.

Anticuerpos que se unen a T β 4

Los anticuerpos frente a péptidos o fragmentos de T β 4 pueden ser valiosos como herramientas diagnósticas para ayudar en la detección de enfermedades en las que T β 4 es un factor patológico. Además, se incluye en la presente invención el uso de anticuerpos que se unen a T β 4 e inhiben o previenen las acciones de T β 4. Terapéuticamente, los anticuerpos o fragmentos de la molécula de anticuerpo también se pueden usar para neutralizar la actividad biológica de T β 4 en enfermedades en las que T β 4 está sobreexpresada. Estos anticuerpos pueden reconocer un epítipo de T β 4 o fragmentos del mismo adecuados para el reconocimiento antigénico y la neutralización de la actividad de T β 4. Como se usa en la presente invención, el término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico de un antígeno, como un péptido T β 4, al que se une el paratopo de un anticuerpo, como un anticuerpo específico de T β 4. Los determinantes antigénicos normalmente consisten en agrupamientos de moléculas de superficie activas químicamente, como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y pueden tener características

estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

La preparación de un anticuerpo requiere una fracción sustancialmente purificada que puede proporcionar un determinante antigénico. El término “sustancialmente puro” como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a T β 4, o variantes de la misma, que están sustancialmente libres de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que se asocian de forma natural. Sustancialmente purificado o “aislado” se refiere a moléculas, tanto secuencias de ácidos nucleicos como de aminoácidos, que se extraen de su medio ambiente natural, se aíslan o se separan, y están libres en un 60%, preferentemente en un 75%, y con más preferencia en un 90% de otros componentes con los que se asocian de forma natural. Un experto en la materia puede aislar T β 4 usando técnicas estándar para la purificación de proteínas. El péptido sustancialmente puro ocupará una banda principal única en un gel de poliacrilamida no reductor. La pureza del péptido T β 4 también se puede determinar mediante análisis de secuencias de aminoácidos amino terminales. T β 4 incluye fragmentos funcionales del péptido, mientras permanece la actividad de T β . Los péptidos más pequeños que contienen la actividad biológica de T β 4 se incluyen en la invención. El término “anticuerpo” incluye, además de los anticuerpos convencionales, fragmentos de proteínas que tienen la capacidad de reconocer específicamente y unirse a la proteína T β 4 o a variantes de la misma. Las regiones del gen que difieren en el nivel de la proteína están bien definidas. Una proteína puede estar elevada mediante la expresión del gen tipo salvaje (wt) o de las variantes, o, preferentemente, fracciones del mismo. Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos se puede clonar en vectores de expresión. De acuerdo con esta forma de realización, la secuencia de interés se puede obtener primero mediante el empleo de PCR, como se describe anteriormente, o de una construcción genética sintética con superposición y oligonucleótidos sintéticos ligados. Otra alternativa incluiría la síntesis de un péptido corto. Todas estas metodologías son conocidas por los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, Ausubel y col., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, volúmenes 1 y 2 (1987), con suplementos, y Maniatis y col., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory.

Un procedimiento para detectar T β 4, que incluye el contacto de un anticuerpo anti-T β 4 con una muestra susceptible de contener T β 4, (por ejemplo, una célula o proteína) y la detección de la unión al anticuerpo. Un anticuerpo que se une al péptido T β 4 se etiqueta con un compuesto que permite la detección de la unión a T β 4. Hay muchas etiquetas y procedimientos de etiquetado diferentes conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos de estos tipos de etiquetas que se pueden usar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos

quimioluminiscentes, compuestos fosforescentes, y compuestos bioluminiscentes. Los expertos en la materia conocerán otras etiquetas adecuadas para unirse al anticuerpo, o serán capaces de determinarlas usando experimentos de rutina. Para los propósitos de la invención, se puede usar un anticuerpo específico para el péptido T β 4 para detectar el nivel de T β 4 en los fluidos biológicos y los tejidos. Se puede usar cualquier espécimen que contiene una cantidad detectable de antígeno. El nivel de T β 4 de la célula susceptible se puede comparar con el nivel de una célula normal para determinar si el sujeto está predispuesto a un incremento de la angiogénesis o de la cicatrización de heridas asociado a T β 4.

El uso de anticuerpos para los procedimientos diagnósticos de la invención incluye, por ejemplo, inmunoensayos en los que se pueden utilizar los anticuerpos en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida. Además, los anticuerpos de estos inmunoensayos se pueden etiquetar de forma detectable de varias maneras. Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar los anticuerpos son inmunoensayos competitivos y no competitivos de formato directo o indirecto. Ejemplos de estos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo sandwich (inmunométrico). La detección de los antígenos usando los anticuerpos de la invención se puede realizar utilizando inmunoensayos que corren hacia delante, hacia atrás, o en modos simultáneos, que incluyen ensayos inmunohistoquímicos sobre muestras fisiológicas. Los expertos en la materia conocerán, o pueden discernir fácilmente, otros formatos de inmunoensayos sin experimentación excesiva.

Los anticuerpos T β 4 se pueden unir a muchos vehículos diferentes y se pueden usar para detectar la presencia de un antígeno que comprende el péptido de la invención. Ejemplos de vehículos conocidos incluyen el cristal, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para unir anticuerpos, o serán capaces de determinarlos, usando experimentos de rutina.

Otra técnica que también puede dar como resultado una mayor sensibilidad consiste en parejas de anticuerpos con haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos pueden luego detectarse específicamente mediante una segunda reacción. Por ejemplo, es habitual usar haptenos como la biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenilo, puridoxal, y fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos antihaptenos específicos.

Anticuerpos inmunorreactivos se pueden usar con el péptido T β 4. Se proporcionan anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos monoclonales unidos con epítomos

de diferentes especificidades, así como distintas preparaciones de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se fabrican de antígenos que contienen fragmentos de la proteína mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia (Kohler, y col., Nature, 256:495, 1975). EL término anticuerpo significa incluir moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, como Fab y $F(ab')_2$, Fv fragmentos de SCA que son capaces de unirse a un determinante epítipo de T β 4.

(1) Un fragmento Fab consiste en un fragmento de una molécula de anticuerpos monovalente que une antígenos, y puede producirse mediante la digestión de una molécula completa de anticuerpos con la enzima papaína, para obtener un fragmento que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de cadena pesada.

(2) Un fragmento Fab' de una molécula de anticuerpos se puede obtener mediante el tratamiento de una molécula de anticuerpos completa con pepsina, seguida de reducción, para producir una molécula que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de cadena pesada. Los dos fragmentos de Fab' se obtienen por moléculas de anticuerpos tratadas de esta manera.

(3) Un fragmento $(Fab')_2$ de un anticuerpo se puede obtener mediante el tratamiento de una molécula de anticuerpos completa con la enzima pepsina, sin reducción posterior. Un fragmento $(Fab')_2$ es un dímero de dos fragmentos Fab' , mantenidos juntos mediante dos enlaces disulfuro.

(4) Un fragmento Fv se define como un fragmento de ingeniería genética que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada expresada como dos cadenas.

(5) Un anticuerpo de cadena simple (SCA) es una molécula de cadena simple de ingeniería genética que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada, unidas mediante un polipéptido de unión adecuado y flexible.

Por otra parte, un anticuerpo anti-T β 4 útil de forma terapéutica o diagnóstica puede derivar de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen mediante la transferencia de regiones determinantes complementarias de ratón de las cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina del ratón a un dominio variable humano, y después la sustitución de los residuos humanos en las regiones de la estructura de los equivalentes murinos. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas. Las técnicas generales para clonar los dominios variables de las inmunoglobulinas murinas se describen, por ejemplo, por Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 86:3833 (1989), que

se incorpora a la presente memoria descriptiva como antecedente. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describen, por ejemplo, por Jones y col., Nature 321:522 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen y col., Science 239:1534 (1988); Carteret y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 89:4285 (1992); Sandhu, Crit. Rev. Biotech 12:437 (1992); y Singer y col., J. Immunol. 150:2844 (1993).

Los anticuerpos también pueden derivar de fragmentos de anticuerpos humanos aislados de una biblioteca combinatorial de inmunoglobulinas. Ver, por ejemplo, Barbas y col., METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZIMOLOGY, volumen 2, página 119 (1991); Winter y col., Ann. Rev. Immunol. 12:433 (1994), que se incorporan a la presente memoria descriptiva como antecedentes. Los vectores de clonación y expresión que son útiles para producir una biblioteca de fagos para inmunoglobulinas humanas se pueden obtener, por ejemplo, de STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA).

Procedimientos y composiciones para el tratamiento o el diagnóstico de alteraciones asociadas a Tβ4

Se proporcionan los medios para diagnosticar una situación patológica en un sujeto susceptible de tener una patología caracterizada por una alteración asociada con Tβ4. El uso incluye la determinación del nivel de Tβ4 de una muestra susceptible de contener Tβ4 del sujeto, y comparar el nivel de Tβ4 de la muestra con el nivel de Tβ4 de una muestra estándar normal. Estas situaciones incluyen, pero no se limitan a, sujetos que tienen alteraciones en la proliferación celular, heridas recurrentes, alteraciones en la reparación de los tejidos, alteraciones fibróticas de los tejidos, úlceras crónicas y otras alteraciones descritas en la presente memoria descriptiva. Estas alteraciones incluyen además las asociadas con las isoformas de Tβ4, conocidas o aún no identificadas.

El término “alteración de la proliferación celular” denota poblaciones de células malignas y no malignas que a menudo parecen diferir del tejido circundante tanto morfológica como genotípicamente. Las células malignas (es decir, el cáncer) se desarrollan como resultado de un proceso en múltiples etapas. Estas alteraciones se pueden detectar usando los procedimientos de la invención actual. Por ejemplo, se obtiene una muestra susceptible de contener Tβ4 de un sujeto, se determina el nivel del péptido Tβ4 y se compara con el nivel de péptido Tβ4 de una muestra de tejido normal. El nivel de Tβ4 se puede determinar mediante varios procedimientos que incluyen, por ejemplo, el inmunoensayo que usa anticuerpos anti-péptidos Tβ4. Otras variaciones de estos ensayos incluyen el radioinmunoanálisis (RIA), ELISA y la inmunofluorescencia. Por otro lado, se pueden usar sondas de ácidos nucleicos para detectar y cuantificar el ARNm del péptido

Tβ4 para el mismo propósito. Estos procedimientos de detección son estándar en la materia.

Además, la invención proporciona medios para mejorar una alteración de la cicatrización de heridas asociada con Tβ4, usando una composición que regula la actividad de Tβ4. El término “mejorar” denota una disminución del detrimento de la respuesta inducida por la enfermedad en el sujeto que recibe la terapia. En los casos en los que la enfermedad se debe a un alto nivel anómalo de Tβ4, la administración de un agente, como un antagonista de la actividad de Tβ4, puede ser efectiva para disminuir la cantidad de actividad de Tβ4. Por otro lado, en los casos en los que la enfermedad se debe a un bajo nivel anómalo de Tβ4, la administración de Tβ4 o un agente que incrementa la actividad de Tβ4, como un agonista, puede ser efectiva para incrementar la cantidad de actividad de Tβ4.

La invención proporciona medios para tratar a un sujeto que tiene una alteración en la cicatrización de las heridas caracterizada por heridas recurrentes o lentas en cicatrizar o heridas que son heridas crónicas no cicatrizantes asociadas con la expresión génica de Tβ4 alterada en un sujeto. Una cantidad efectiva para la cicatrización de heridas de un agente que modula la expresión de Tβ4 se va a administrar a un sujeto que tiene la alteración, tratando por lo tanto la alteración. El término “modular” se refiere a la inhibición o supresión de la expresión de Tβ4 cuando está sobreexpresada, y la inducción de la expresión cuando Tβ4 está infraexpresada. El término “cantidad efectiva para la cicatrización de heridas” significa la cantidad de agente Tβ4 que es efectiva para modular la expresión génica de Tβ4 que da como resultado la reducción de los síntomas de la alteración de la cicatrización de heridas asociada a Tβ4.

Un agente que modula la expresión génica de Tβ4 o una isoforma de Tβ4 puede ser un polinucleótido por ejemplo. El polinucleótido puede ser un antisentido, un agente triple, o una ribozima. Por ejemplo, se puede utilizar un antisentido que se puede dirigir a la región génica estructural o a la región promotora de Tβ4.

Cuando una alteración de la cicatrización de heridas se asocia con la expresión de Tβ4, es posible un enfoque terapéutico que interfiere directamente con la traducción del ARNm de Tβ4 a proteínas. Por ejemplo, se puede usar un ácido nucleico antisentido o una ribozima para unir el ARN de Tβ4 o adherirse a él. Las moléculas de ARN o ADN antisentido se unen específicamente a un mensaje ARN del gen diana, que interrumpe la expresión del producto proteico del gen. El antisentido se une al ARNm formando una molécula de doble cadena que no puede traducir la célula. Los oligonucleótidos antisentido de aproximadamente 15-25 nucleótidos se prefieren ya que se sintetizan fácilmente y tienen un efecto inhibitorio muy similar a las moléculas de ARN antisentido. Además, el grupo químicamente reactivo, como el ácido etilenodiaminotetraacético unido a hierro (EDTA-Fe)

se puede unir a un oligonucleótido antisentido, produciendo la adherencia del ARN al lugar de hibridación. Estos y otros usos de los procedimientos antisentido para inhibir la traducción in vitro de genes son conocidos en la materia (Marcus-Sakura, Anal., Biochem., 172:289, 1988).

5 Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias en al menos una porción de una molécula de ARNm específica (Weintraub, Scientific American, 262:40, 1990). En las células, los ácidos nucleicos antisentido se hibridan con el ARNm correspondiente, formando una molécula de doble cadena. Los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la traducción del ARNm, ya que la
10 célula no traducirá un ARNm que es una doble cadena. Se prefieren los oligómeros antisentido de aproximadamente 15 nucleótidos, ya que se sintetizan fácilmente y es menos probable que produzcan problemas que las moléculas mayores cuando se introducen en la célula productora de T β 4 diana. El uso de procedimientos antisentido para inhibir la traducción in vitro de genes se conoce en la materia (Marcus-Sakura, Anal. Biochem.,
15 172:289, 1988).

El uso de un oligonucleótido para detener la transcripción se conoce como la triple estrategia ya que los oligómeros se enrollan alrededor del ADN de doble hélice, formando una hélice de triple cadena. Por lo tanto, se pueden diseñar estos compuestos triples para reconocer un único sitio de un gen elegido (Maher y col., Antisense Res. and Dev., 1(3):227,
20 1991; Helene, C., Anticancer Drug Design, 6(6):559, 1991).

Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de adherirse específicamente a otro ARN de cadena simple de manera análoga a las endonucleasas de restricción del ADN. A través de la modificación de secuencias de nucleótidos que codifican para estos ARNs, es posible ingeniar moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos
25 específicas de una molécula de ARN y adherirse a ellas (Cech, J. Amer. Med. Assn., 260:3030, 1988). Una ventaja principal de este enfoque es que, debido a que son específicas de secuencia, sólo los ARNm con secuencias particulares se inactivan.

Hay dos tipos básicos de ribozimas llamadas tipo tetrahimena (Hasselhoff, Nature, 334:585, 1988) y tipo "pez martillo". Las ribozimas tipo tetrahimena reconocen secuencias
30 que tienen una longitud de cuatro bases, mientras que las ribozimas tipo "pez martillo" reconocen secuencias de una longitud de 11-18 bases. A mayor longitud de la secuencia de reconocimiento, mayor probabilidad de que la secuencia ocurra exclusivamente en las especies de ARNm diana.

Estos y otros usos de los procedimientos antisentido para inhibir la traducción in vivo
35 de genes son conocidos en la materia (por ejemplo, De Mesmaeker, y col., 1995. Backbone

modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:343-355; Gewirtz, A. M., y col., 1996b. Facilitating delivery of antisense oligodeoxynucleotides: Helping antisense deliver on its promise; *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU.* 93:3161-3163; Stein, C. A. A discussion of G-tetrads 1996. Exploiting the potencial of antisense: beyond phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Chem. and Biol.* 3:319-323).

La liberación de antisentidos, triples agentes, ribozimas, inhibidores competitivos y similares se puede lograr usando un vector de expresión recombinante como un virus quimérico o un sistema de dispersión coloidal. Los distintos vectores virales que se pueden utilizar para la terapia génica como se enseña en la presente memoria descriptiva incluyen adenovirus, virus herpes, vaccinia o, preferentemente, un virus ARN como un retrovirus. Preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o de ave. Ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un solo gen extraño incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable de modo que se pueden identificar y generar las células transducidas. Mediante la inserción de una secuencia de polinucleótidos de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica para el ligando de un receptor de una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico de la diana. Los vectores retrovirales se pueden fabricar específicos de diana mediante la inserción, por ejemplo, de un polinucleótido que codifica para un azúcar, un glucolípido, o una proteína. La diana preferida se consigue mediante el uso de un anticuerpo para localizar el vector retroviral. Los expertos en la materia conocerán, o pueden determinar fácilmente sin excesiva experimentación, secuencias de polinucleótidos específicas que se pueden insertar en el genoma retroviral para permitir la liberación específica de diana del vector retroviral que contiene el polinucleótido antisentido.

Ya que los retrovirus recombinantes son defectuosos, requieren ayuda para producir partículas de vectores infecciosas. Esta ayuda se puede proporcionar, por ejemplo, mediante el uso de líneas celulares colaboradoras que contienen plásmidos que codifican para todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras del LTR. Estos plásmidos pierden una secuencia de nucleótidos que posibilita el mecanismo de empaquetamiento para reconocer una transcripción de ARN para la encapsulación. Las líneas celulares colaboradoras que tienen delecciones en la señal de empaquetamiento incluyen pero no se limitan a Ψ 2, PA317 y PA12, por ejemplo. Estas líneas celulares producen viriones vacíos, ya que no se empaqueta el genoma. Si un vector retroviral se

introduce en estas células en las que la señal de empaquetamiento está intacta, pero los genes estructurales se reemplazan por otros genes de interés, el vector se puede empaquetar y producir el virión.

5 Por otra parte, NIH 3T3 u otras células de cultivos tisulares se pueden transfectar directamente con plásmidos que codifican para los genes estructurales retrovirales gag, pol y env, mediante transfección convencional con fosfato cálcico. Estas células se transfectan entonces con el vector plásmido que contiene los genes de interés. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

10 Un sistema de liberación diana para la liberación de ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria descriptiva incluye un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, gotas, matrices génicas activadas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones aceite-agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas con membranas artificiales
15 que son útiles como vehículos de liberación in vitro e in vivo. Se ha demostrado que las vesículas unilamelares grandes (LUV), que oscilan en tamaño de 0,2-4,0 μm pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. El ARN, ADN y los viriones intactos se pueden encapsular en el interior acuoso y liberarse a las células de una forma biológicamente activa (Fraley, y col., Trends Biochem.
20 Sci., 6:77, 1981). Además de las células de mamíferos, los liposomas se han usado para liberar polinucleótidos en células de plantas, levaduras y bacterias. Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficiente, deberían estar presentes las siguientes características: (1) encapsulación de los genes de interés con alta eficiencia ya que no se compromete su actividad biológica; (2) unión preferente y sustancial a una célula diana en
25 comparación con las células no diana; (3) liberación del contenido acuoso de la vesícula al citoplasma de la célula diana con alta eficiencia; y (4) expresión segura y efectiva de la información genética (Mannino, y col., Biotechniques, 6:682, 1988).

Patológicamente, T β 4 se puede incluir en enfermedades en las que hay un sobrecrecimiento de vasos sanguíneos, como el cáncer, formación y crecimiento de
30 tumores, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, artritis reumatoide y psoriasis.

El crecimiento de capilares y vasos sanguíneos secundarios es esencial para el crecimiento de tumores sólidos y es por lo tanto una respuesta fisiológica no deseada que facilita la extensión del tejido maligno y las metástasis. La inhibición de la angiogénesis y el crecimiento resultante de capilares y vasos sanguíneos es un componente del tratamiento
35 efectivo de la malignidad en el uso del tratamiento de los pacientes con cáncer.

Se describen medios para inhibir la angiogénesis en un sujeto, usando una composición que contiene un agente que regula la actividad de T β 4. La composición puede incluir agentes que regulan la angiogénesis, por ejemplo agentes que tienen que ver con la timosina α 1, PDGF, VEGF, IGF, FGF y TGF β . Por ejemplo, la inhibición de la angiogénesis y la migración de las células endoteliales pueden ser beneficiosas en el control del crecimiento de los tumores sólidos. La mayoría, si no todos los tumores sólidos, como los tejidos normales, requieren un aporte sanguíneo constante y suficiente para un crecimiento óptimo. Se sabe que los tumores hacen uso de factores de crecimiento angiogénicos para atraer nuevos vasos sanguíneos y determinar un aporte con cantidades suficientes de nutrientes para mantener su crecimiento. Muchos tumores están bien vascularizados y la inhibición de la formación de un adecuado aporte sanguíneo al tumor mediante la inhibición de la vascularización del tumor, como resultado de la inhibición de la angiogénesis, es beneficioso en el control del crecimiento del tumor. Sin un aporte sanguíneo fuerte, no se puede sostener el rápido y prolongado crecimiento del tejido tumoral. Así pues, los agentes que inhiben la actividad de T β 4 se pueden usar para prevenir el crecimiento neoplásico. El agente inhibidor de T β 4 puede administrarse de forma oral, parenteral, tópica, intravenosa, o sistémica. Además, para inhibir la proliferación de las células tumorales y el crecimiento tumoral, el agente se puede administrar localmente de forma directa en el tumor o como parte de una formulación depositada de liberación lenta. La administración puede ser diariamente durante el tiempo necesario para inhibir la angiogénesis, la proliferación de las células endoteliales, la proliferación de las células tumorales o el crecimiento tumoral. Por otra parte, una formulación de liberación lenta puede continuar durante el tiempo necesario para controlar el crecimiento del tumor. Este régimen de dosis se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o se puede reducir la dosis proporcionalmente como se indica según las exigencias de la situación terapéutica.

A este respecto, las composiciones de esta invención que son útiles como inhibidores de la angiogénesis, la proliferación de las células endoteliales, la proliferación de las células tumorales o el crecimiento tumoral contienen un vehículo aceptable farmacéuticamente y una cantidad de agente modulador de T β 4 efectiva para inhibir la proliferación de las células tumorales o endoteliales. Estas composiciones pueden también incluir conservantes, antioxidantes, inmunosupresores y otros agentes biológica y farmacéuticamente efectivos que tienen efectos sobre el crecimiento tumoral pero que no ejercen detrimento sobre el agente modulador de T β 4. Para el tratamiento de las células tumorales la composición puede incluir un agente quimioterápico, por ejemplo un agente

anticanceroso que mata selectivamente las células tumorales de replicación más rápida, muchos de los cuales se conocen y se usan clínicamente. Agentes anticancerosos de ejemplo incluyen el mefalán, ciclofosfamida, metotrexate, adriamicina y bleomicina.

5 **Exploración de compuestos que modulan la actividad T β 4.**

Se describe un procedimiento para identificar un compuesto que modula la actividad de T β 4, la actividad angiogénica o la actividad cicatrizante de la herida. El procedimiento incluye la incubación de los componentes incluyendo el compuesto y la T β 4 bajo las condiciones suficientes para permitir que los componentes interactúen y la determinación del efecto del compuesto sobre la actividad de T β 4 antes y después de la incubación en presencia del compuesto. Los compuestos que tienen relación con la actividad de T β 4 (por ejemplo, antagonistas y agonistas) incluyen péptidos, peptidomiméticos, polipéptidos, compuestos químicos, minerales como el cinc, y agentes biológicos. La actividad de T β 4 se puede ensayar usando la metodología como se describe en los presentes ejemplos.

Los presentes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar el ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, el experto en la materia reconocerá varios materiales y procedimientos equivalentes.

EJEMPLO 1

20 **La cicatrización de heridas in vivo se acelera mediante T β 4**

T β 4, administrada de forma tópica o intraperitoneal, acelera significativamente la cicatrización de heridas comparado con las heridas no tratadas (figura 2 y 3). Se hicieron heridas de punción biopsia de 8 mm de grosor total en la superficie dorsal de ratas como se comunica anteriormente (Bhartiya y col., J. Cell. Physiol. 150:312, 1992; Sihhu y col., J. Cell. Physiol. 169:108, 1996) y se administró T β 4 de forma tópica en el momento de la herida (5 μ g en 50 μ L) y otra vez después de 48 horas. Los controles para el tratamiento tópico recibieron idénticas cantidades de salino en el momento de la herida y a las 48 horas. Otras ratas recibieron inyecciones intraperitoneales en el momento de la herida (60 μ g en 300 μ L) y otra vez cada día (por ejemplo, los días 0, 2, 4 y 6). Los controles para estos animales recibieron cantidades idénticas de salino intraperitoneal en el mismo régimen de inyecciones. En los días 4 y 7 post-herida, se realizaron medidas del tamaño de la herida. En los días 8 y 9 post-herida, se recogió tejido y se fijó en formalina tamponada al 10%. Las muestras se seccionaron y tiñeron con H&E y tricómico de Masson (American Histolabs, Gaithersburg, MD).

Las secciones histológicas se usaron para medir la reepitelización y la contracción

de la herida usando un micrómetro ocular. La migración epidérmica se determinó mediante la medida de las longitudes de las lenguas de la forma migrante de epitelio de cada lado de la herida sobre el lecho de la herida desde la zona de proliferación en el margen de la piel no dañada y herida. El grosor epidérmico también se midió comenzando en la unión de la epidermis no dañada y proliferante. El grosor se midió verticalmente desde la membrana basal a la capa más superficial de la epidermis migrante cada 200 micras. El grosor epidérmico medio de cada lengua de epidermis migrante se sumó en cada herida. El conteo de los vasos se realizó identificando primero los espacios vasculares mediante su línea endotelial. Todos estos vasos del lecho de la herida se contaron incluyendo los de la unión de la dermis y el subcutis, ya que la angiogénesis en las heridas ocurre a mayor extensión desde estos vasos. Los números se promediaron en los conteos de los vasos por 10 campos de gran aumento (40x).

El efecto de T β 4 sobre la cicatrización de heridas se estudió en un modelo de herida cutánea de grosor completo de una rata. La figura 1 muestra un diagrama del lugar de la herida que se extiende desde la epidermis hasta la capa de grasa/músculo. Este modelo permitió la medida de dos parámetros: la reepitelización (hueco) y la contracción (anchura) de la herida. Las heridas tratadas de forma tópica con T β 4 mostraron aproximadamente un descenso del 15% de la anchura y aproximadamente un 15% de descenso del hueco en los tratados frente a los controles (figura 2 y 3, respectivamente).

La figura 2 muestra un descenso del 15% en la anchura de la herida comparada con los controles de salino ya en los 4 días después de la herida y continuó hasta el día 7. La inyección intraperitoneal de T β 4 dio como resultado un descenso del 18% de la anchura de la herida en relación con los controles tratados con salino en el día 4 y un 11% de descenso en el día 7. Esta tendencia se observó al cuarto día post-herida y continuó hasta el día 7 (*P $\leq$ 0,0001, **P $\leq$ 0,08, diferencia significativa de la media sola, test de la t de student). Estos datos demuestran que T β 4, cuando se administra de forma tópica o sistémica, incrementa la reepitelización y la contracción. Tanto el tratamiento tópico como el sistémico son igualmente efectivos. Se probaron dosis inferiores de T β 4 incluyendo 2,5 μ g y 0,5 μ g en 50 μ L para la administración tópica y 30 μ g y 6 μ g en 300 μ L para la inyección intraperitoneal pero se observaron efectos reducidos o no se observaron, respectivamente, sobre la cicatrización de heridas.

La figura 3 muestra un descenso del 18% en la longitud del hueco comparada con los controles de salino cuando se administra T β 4 de forma tópica, ya en los 4 días después de la herida. Esta tendencia continúa hasta la determinación del día 7 (*P $\leq$ 0,04, test de la t de student). Las inyecciones intraperitoneales dieron como resultado un descenso del 42%

en el tamaño del hueco en relación con los controles tratados con salino. Este descenso se observó en el cuarto día post-herida y continuó hasta el día 7 (** $P \leq 0,0007$, test de la t de student). El incremento en la reepitelización se observó en las heridas tratadas durante 7 días y la velocidad de cierre del hueco se aceleró ligeramente sobre la observada en el día 4. Se observó un descenso del 62% en el tamaño del hueco de las heridas tratadas con T β 4. La cuantificación de la migración epidérmica mostró un incremento estadísticamente significativo de 1,5 veces en la migración de las lenguas epidérmicas sobre el lecho de la herida después del tratamiento tópico (tabla 1). La cuantificación de la migración epidérmica en las heridas tratadas de forma intraperitoneal mostraron un incremento estadísticamente significativo en la migración de las lenguas epidérmicas comparadas con los controles (tabla 1). No hubo diferencias en el grosor de la epidermis migrante entre los tratamientos con T β 4 y el control (tabla 1). Las secciones histológicas de las heridas mostraron claramente una reepitelización incrementada de las heridas tratadas comparadas con los controles en los 7 días de la herida (figura 4).

Tabla 1

Medidas morfométricas de las muestras control y las tratadas con timosina β 4			
Parámetro	Control	IP	Tópico
Migración epidérmica (μ m)	2403,3 $\pm$ 9,7	3168,3 $\pm$ 38,4*	3668,7 $\pm$ 56,6*
Grosor epidérmico (μ m)	128,2 $\pm$ 19,3	135,0 $\pm$ 11,7	142,3 $\pm$ 19,8
Vasos/10 HPF	1364,0 $\pm$ 15,0	2415,0 $\pm$ 24,3*	2186,0 $\pm$ 11,8*
HPF: campo de gran aumento			
* $P \leq 0,00001$ mediante el test de Welch, significativamente diferente del control.			

La figura 4 muestra una comparación de secciones del control normal (D) y tratadas con T β 4 (E y F) a los 7 días de la herida. El tratamiento con T β 4 dio como resultado un crecimiento considerable de capilares (figura 4E y F, flechas). El conteo de los vasos mostró un incremento significativo (aproximadamente 2 veces) en el número de vasos de las heridas tratadas con T β 4 (tabla 1). No se observaron incrementos en el número de macrófagos de las heridas. No hubo incremento aparente en la acumulación/biosíntesis de colágeno de las heridas tratadas con T β 4 (figura 5B y C vs A) que soportan una anchura de herida disminuida y un papel para T β 4 en la contracción de la herida. Tanto las heridas tratadas de forma tópica como sistémica parecen similares aunque la contracción de la herida progresa algo más rápidamente con el tratamiento tópico.

La reducción del tamaño de la herida se observó en ambos grupos experimentales comparados con los grupos control (figura 2 - 4). Se percibieron más vasos sanguíneos y

mayores en los grupos experimentales comparado con los controles (figura 4). Además, un incremento en la acumulación/biosíntesis de colágeno por las heridas tratadas con T β 4 comparadas con el control sugiere un papel para T β 4 en la contracción de la herida y el depósito de matriz extracelular. La tinción histológica de estas heridas demostró un incremento en la densidad del colágeno y el depósito de matriz extracelular cuando se compara con los controles (figura 5).

EJEMPLO 2

Ensayos sobre migración de queratinocitos

Se prepararon queratinocitos primarios de ratones neonatos Balb/c o CD-1 como se describe anteriormente (Dlugosz y col., 1995). Las células se pusieron en medio esencial mínimo de Eagle libre de calcio y magnesio (EMEM) que contiene 8% de suero de ternero fetal tratado con 8% de Chelex (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 20 unidades/mL de penicilina/estreptomicina, y la concentración de calcio se ajustó a 0,25 mM. Al día siguiente, los cultivos se lavaron con salino tamponado con fosfato libre de calcio y magnesio, tratado brevemente con tripsina (Life Technologies, Gaithersburg, MD), lavado con medio de cultivo y resuspendido en EMEM que contiene calcio 0,05 mM. Las células se usaron inmediatamente en ensayos de migración.

Los ensayos sobre migración de queratinocitos se llevaron a cabo en una cámara de Boyden usando membranas de poliéster de poros de 12 μ m (Poretics, Livermore, CA) recubiertas con 0,1 mg/mL de una solución de colágeno IV en dH₂O (Trevigen, Gaithersburg, MD). Los filtros se secaron después al menos 1 hora. Las células se recogieron usando varseno o tripsina (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y se resuspendieron en medio esencial mínimo de Eagle con Ca²⁺ 0,05 mM. La base de la cámara se cargó con EMEM que contiene 0,01, 0,1, 10, 100 y 1000 ng/mL de T β 4 sintética. Se añadió medio acondicionado de fibroblastos dérmicos primarios y/o factor de crecimiento de queratinocitos a varios pocillos como control positivo. Se añadieron las células a la cámara superior a una concentración de 50.000 células por pocillo. Las cámaras se incubaron a 35°C/ 7% de CO₂ durante 4-5 horas y los filtros se fijaron y se tiñeron después usando Diff-Quik (Baxter Healthcare Corporation, McGraw Park, IL). Las células que migraron a través del filtro se cuantificaron mediante el conteo del centro de cada pocillo a 10x usando un microscopio Olympus CK2. Cada situación se ensayó en pocillos triplicados y cada experimento se repitió cuatro veces con diferentes preparaciones de células.

Los resultados demostraron que los queratinocitos migraban en respuesta a T β 4 después de 4-5 horas de exposición. La migración aumentó 2-3 veces ($P \leq 0,003$) sobre la

migración en presencia del medio solo (figura 6) y a la máxima dosis de respuesta superó al control positivo. El efecto de T β 4 sobre la migración, aunque muestra curvas de dosis ligeramente diferentes dependiendo de la preparación de las células y la fuente, mostró claramente un patrón bifásico con 1000 ng/mL y 0,01 ng/mL que muestran la mayoría de la migración y las dosis medias que muestran menos estimulación (pero todavía mayor que con el medio de control) en los 4 ensayos.

EJEMPLO 3

Ensayos sobre migración de células epiteliales de la córnea

Los ensayos sobre migración de las células epiteliales de la córnea se llevaron a cabo en una cámara de Boyden usando membranas de poliéster de poros de 12 μ m (Poretics, Livermore, CA) recubiertas con 0,1 mg/mL de una solución de colágeno IV en dH₂O (Trevigen, Gaithersburg, MD). Los filtros se secaron después al menos 1 hora. y se resuspendieron en medio esencial mínimo de Eagle con Ca²⁺ 0,05 mM. La base de la cámara se cargó con EMEM que contiene 0,01, 0,1, 10, 100 y 1000 ng/mL de T β 4 sintética. Se añadió medio acondicionado de fibroblastos dérmicos primarios y/o factor de crecimiento de queratinocitos a varios pocillos como control positivo. Se añadieron las células a la cámara superior a una concentración de 50.000 células por pocillo. Las cámaras se incubaron a 35°C/ 7% de CO₂ durante 4-5 horas y los filtros se fijaron y se tiñeron después usando Diff-Quik (Baxter Healthcare Corporation, McGraw Park, IL). Las células que migraron a través del filtro se cuantificaron mediante el conteo del centro de cada pocillo a 10x usando un microscopio Olympus CK2. Cada situación se ensayó en pocillos triplicados y cada experimento se repitió cuatro veces con diferentes preparaciones de células. Los resultados demostraron que las células epiteliales de la córnea migraban en respuesta a T β 4 después de 4-5 horas de exposición. La migración aumentó 2-3 veces sobre la migración en presencia del medio solo (figura 7) con el nivel de migración más alto visto a 100 ng/mL de T β 4.

EJEMPLO 4

Reepitelización corneal in vivo

Para determinar el efecto de T β 4 sobre la reepitelización corneal in vivo, se desepitelizaron córneas de rata y se trataron con T β 4. Los filtros se bañaron en etanol, y se aplicaron al ojo durante 30 segundos, y después se desechó el epitelio. Se aplicaron al ojo distintas concentraciones de T β 4 en salino y a las 24 horas se sacrificó a las ratas. Se fijaron los ojos, se seccionaron y se determinó el grado de migración del epitelio corneal (medido

en píxeles) usando un microscopio con un calibrador interno mediante un objetivo enmascarado. Los resultados demostraron que la reepitelización de la córnea se incrementó 2 veces sobre los controles no tratados en presencia de aproximadamente 1 a 25 µg de Tβ4 (figura 8 y 9). Además, se percibió que los ojos tratados con Tβ4 tenían una inflamación reducida comparada con las córneas no tratadas.

EJEMPLO 5

Modelo de mala cicatrización

La timosina β4 también aumenta la cicatrización de heridas en un modelo mermado. El tratamiento con esteroides reduce la velocidad de reparación de heridas en los mamíferos. Las ratas tratadas con esteroides como hidrocortisona sirven como modelo de cicatrización de heridas mermada debido al retraso observado en el cierre de la herida. Se inyectó a los animales hidrocortisona intramuscular todos los días. Las ratas tratadas con esteroides mostraron un incremento significativo en el nivel de cicatrización cuando se añadió Tβ4 de forma tópica o inyectada intraperitonealmente. En el momento inicial, día 4, los animales tratados de forma tópica mostraron poca respuesta (≤7% en el cierre del hueco o en la anchura, N = 3) comparada con el tratamiento con salino. La inyección intraperitoneal, sin embargo, dio como resultado un descenso del 28% en el tamaño de 3 huecos y un descenso del 14% en la anchura de la herida. En el día 7, se observó respuesta tanto con el tratamiento tópico como con la inyección intraperitoneal.

El hueco en los animales tratados de forma tópica descendió un 39% comparado con el tratamiento con salino. La anchura de la herida descendió un 23%. La inyección intraperitoneal dio como resultado un descenso del 26% en el tamaño del hueco y un descenso del 10% en la anchura de la herida. Tomando ambos resultados, demuestran que Tβ4 es útil para tratar las heridas crónicas así como las agudas.

REIVINDICACIONES

1. El uso de una composición que comprende timosina beta 4 que tiene la secuencia
SDKP DMAEI EKFDK SKLKK TETQE KNPLP SKETI EQEDQ AGES, en la
5 fabricación de un medicamento para promover la reparación de heridas, en el que
dicha timosina beta 4 comprende las propiedades de tener capacidad
secuestradora de actina o de unión a actina, de estimular la migración de células
epiteliales y cicatrización de heridas, y de promover la reparación de heridas, y en
10 el que la composición es adecuada para el suministro tópico, inhalación,
administración sistémica, administración oral, administración intranasal,
administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración
intramuscular, administración intracavidad o administración transdérmica.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende un segundo
15 agente capaz de ayudar a o estimular la actividad de cicatrización de heridas, en
el que dicho segundo agente se selecciona del grupo que consiste en agentes
angiogénicos, factores de crecimiento, agentes que dirigen la diferenciación de
células, agentes que promueven la migración de células y agentes que estimulan
la provisión de materiales de la matriz extracelular en el lecho de la herida.
20
3. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende un segundo
agente capaz de estimular la producción de timosina $\beta 4$, en el que el segundo
agente se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento de tipo
insulina (IGF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de
25 crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-),
factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), timosina 1 (T1) y factor de
crecimiento endotelial vascular (VEGF).
4. El uso de una composición que comprende TB4 que tiene la secuencia SDKP
30 DMAEI EKFDK SKLKK TETQE KNPLP SKETI EQEDQ AGES, en la fabricación
de un medicamento para reducir la inflamación en un ojo de un paciente en el que
dicha TB4 comprende las propiedades de tener capacidad secuestradora de
actina o de unión a actina y de estimular la migración de células epiteliales, y
actividad reductora de la inflamación.
35
5. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición comprende además un
polipéptido seleccionado de gelsolina, proteína de unión a vitamina D (DBP),

profilina, cofilina, depactina, Dnasal, vilina, fragmina, severina, proteína caperuza, beta-actinina, acumentina.

- 5 6. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la composición es adecuada para el suministro tópico.
- 10 7. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la composición está contenida en una formulación tópica seleccionada de un gel, crema, pasta, loción, pulverizador, suspensión, dispersión, bálsamo, hidrogel y pomada.
- 15 8. El uso de las reivindicaciones 1-5, en el que la composición es adecuada para el suministro sistémico.
9. El uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la TB4 es recombinante o sintética.
- 20 10. El uso de las reivindicaciones 1-3 y 5-9, en el que la composición es adecuada para la cicatrización de heridas en un tejido.
11. El uso de la reivindicación 10, en el que el tejido se selecciona de epidérmico, ocular, urogenital, gastrointestinal, cardiovascular, muscular, conjuntivo o neuronal.
12. El uso de la reivindicación 11, en el que el tejido es tejido de la piel.
- 25 13. El uso de la reivindicación 3, en el que el agente es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).
14. El uso de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la composición contiene además un agente que estimula la producción del péptido de timosina 4.
- 30 15. El uso de la reivindicación 14, en el que el agente es el cinc.

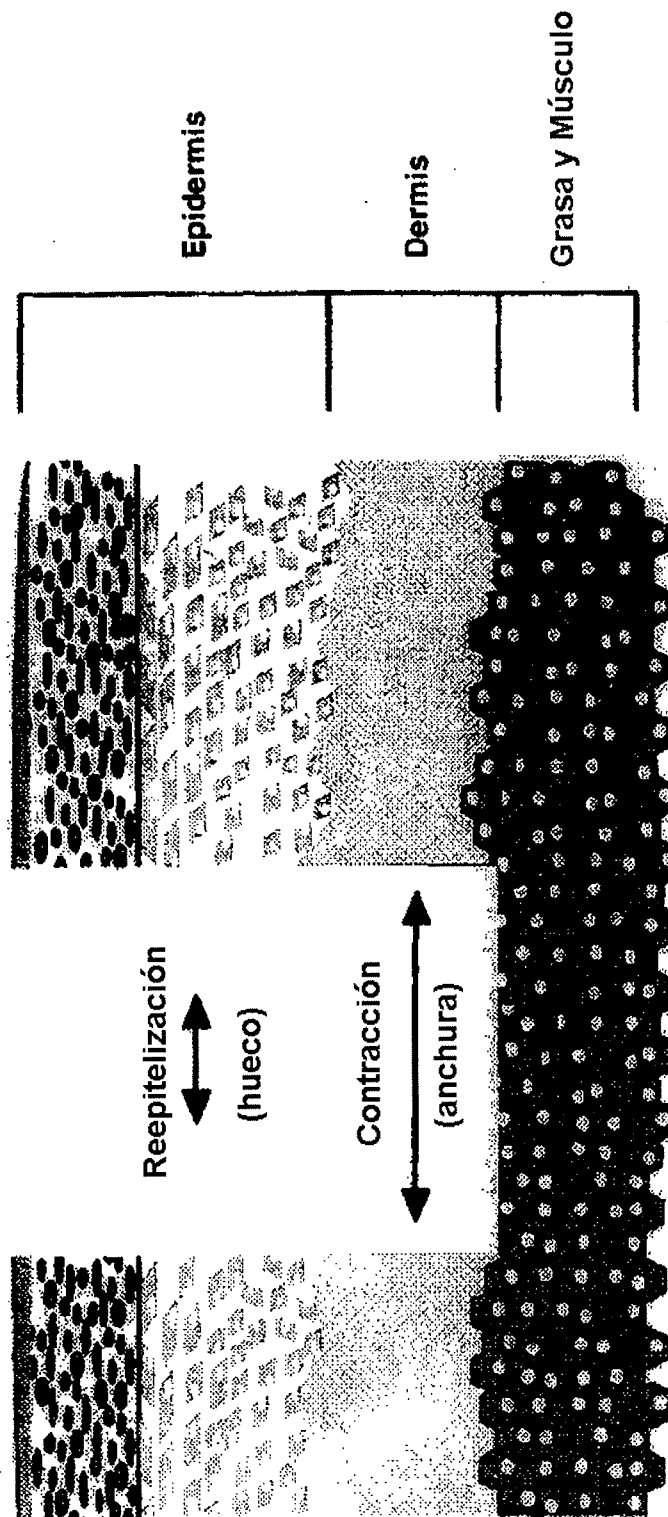


FIG. 1

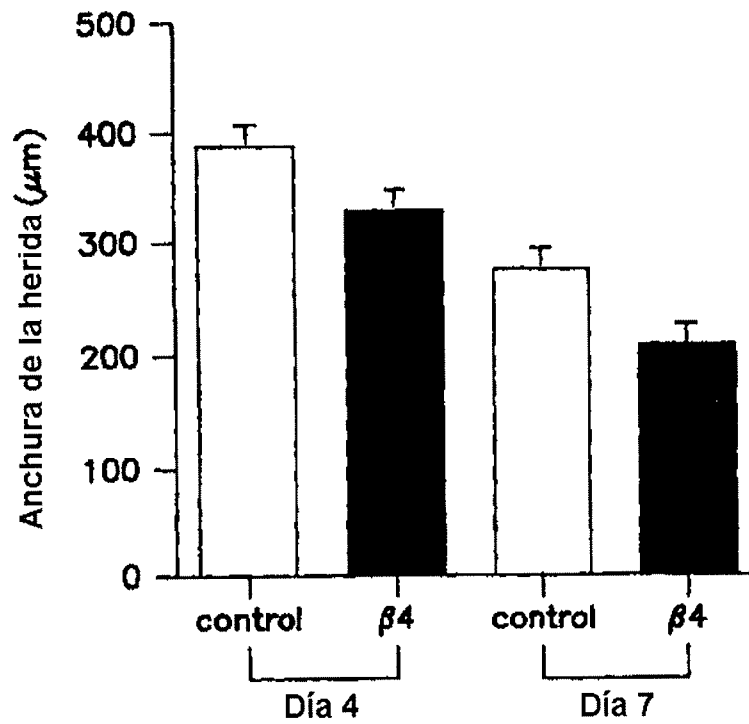


FIG. 2A

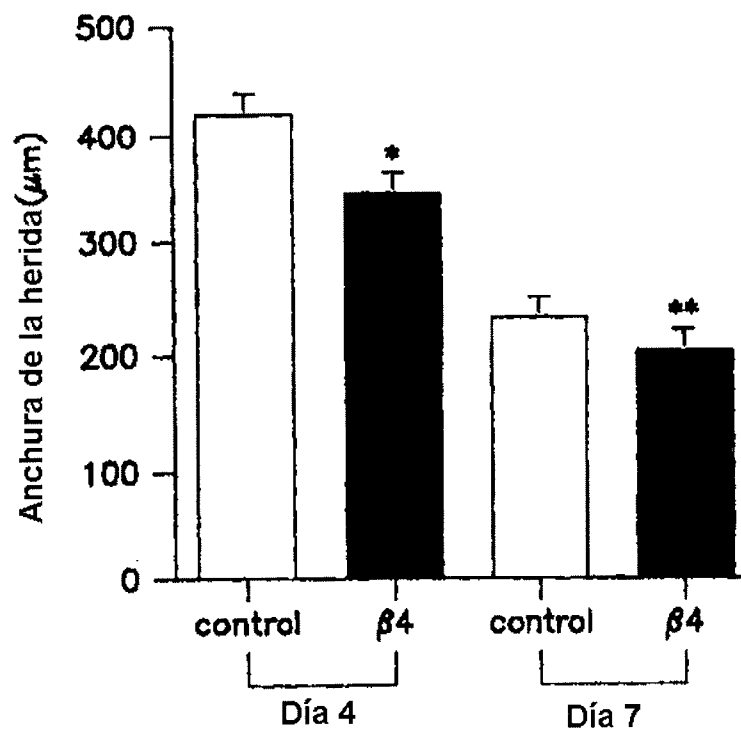


FIG. 2B

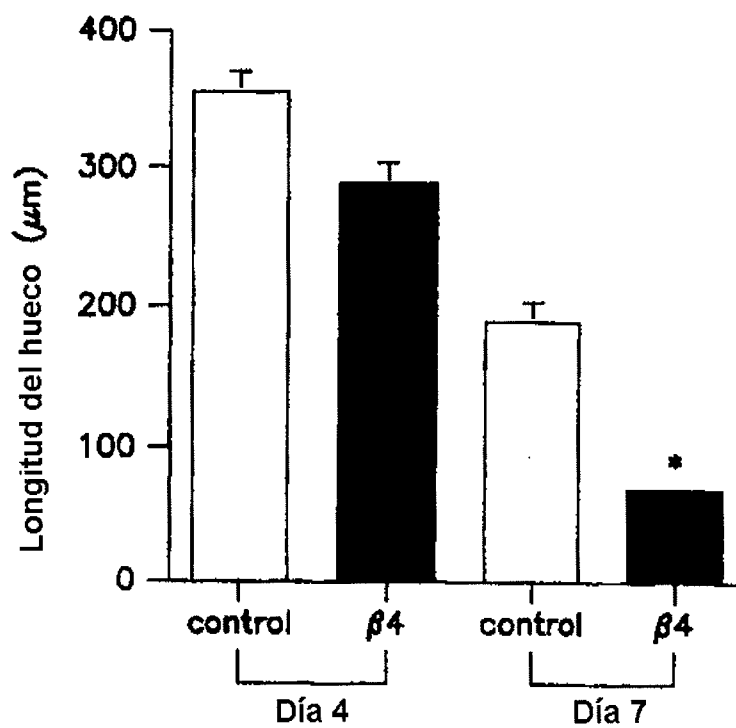


FIG. 3A

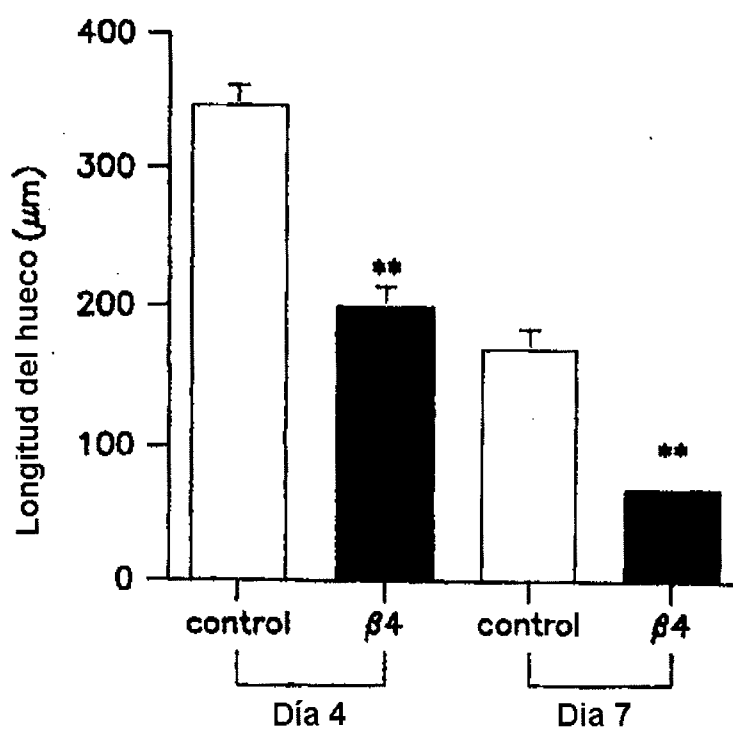


FIG. 3B

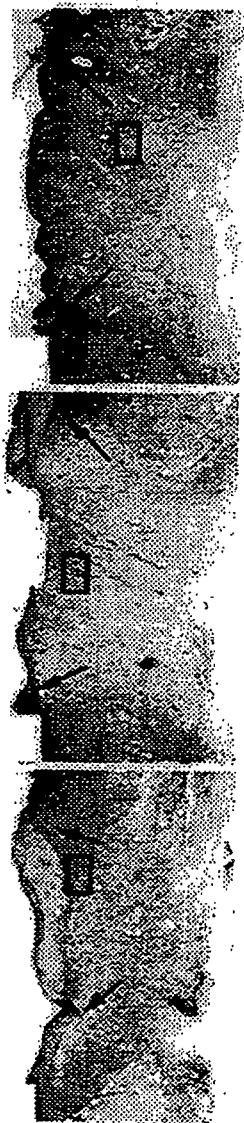


FIG. 4a FIG. 4b FIG. 4c

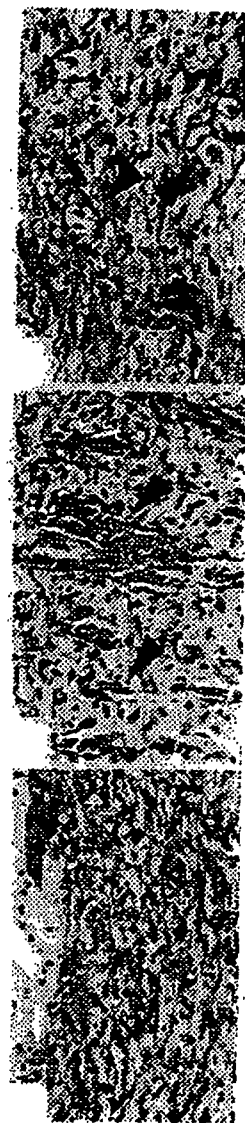


FIG. 4d FIG. 4e FIG. 4f



FIG. 5a

FIG. 5b

FIG. 5c



FIG. 5d

FIG. 5e

FIG. 5f

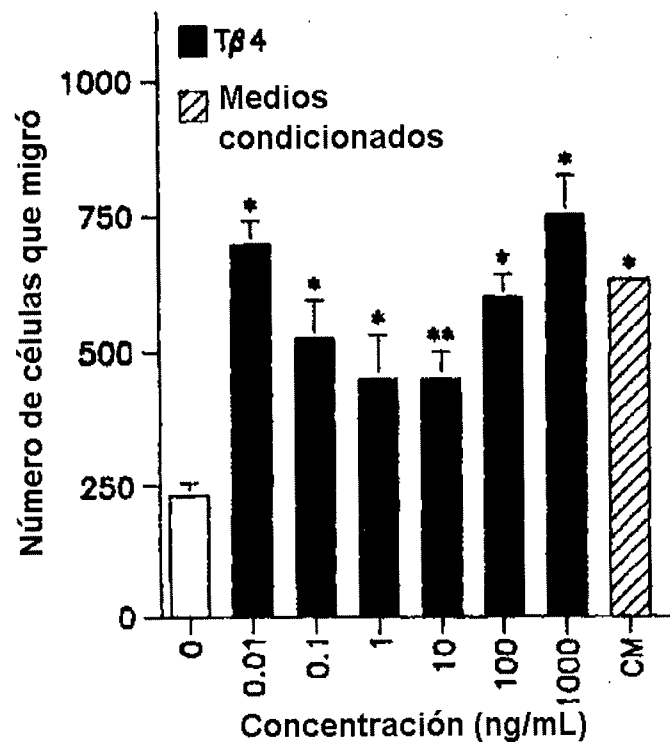


FIG. 6

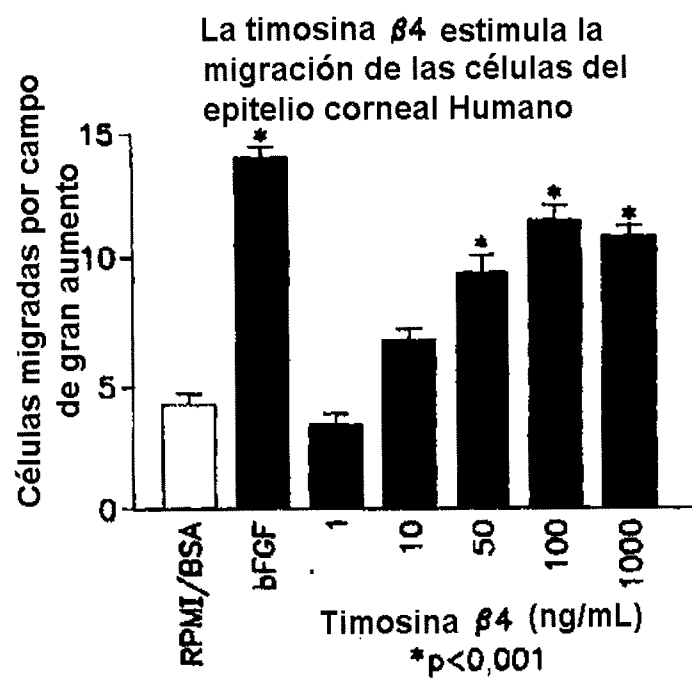
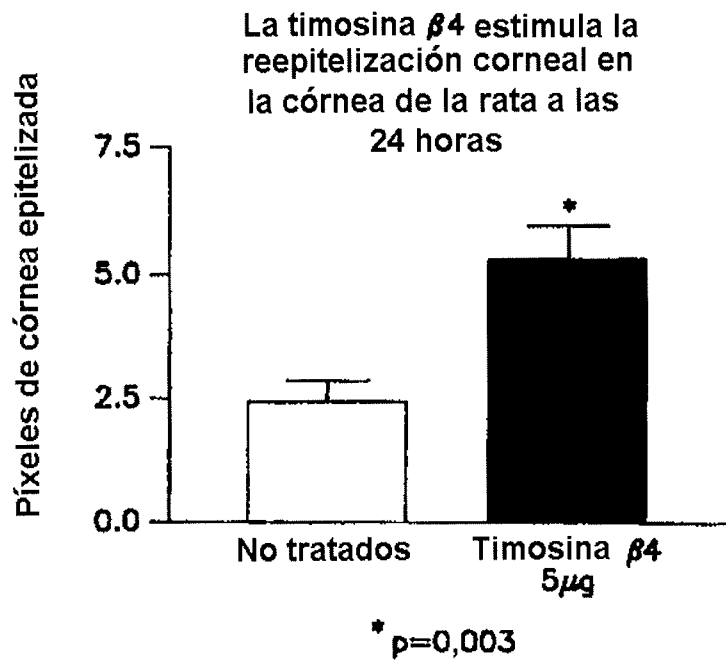


FIG. 7



n=6

FIG. 8

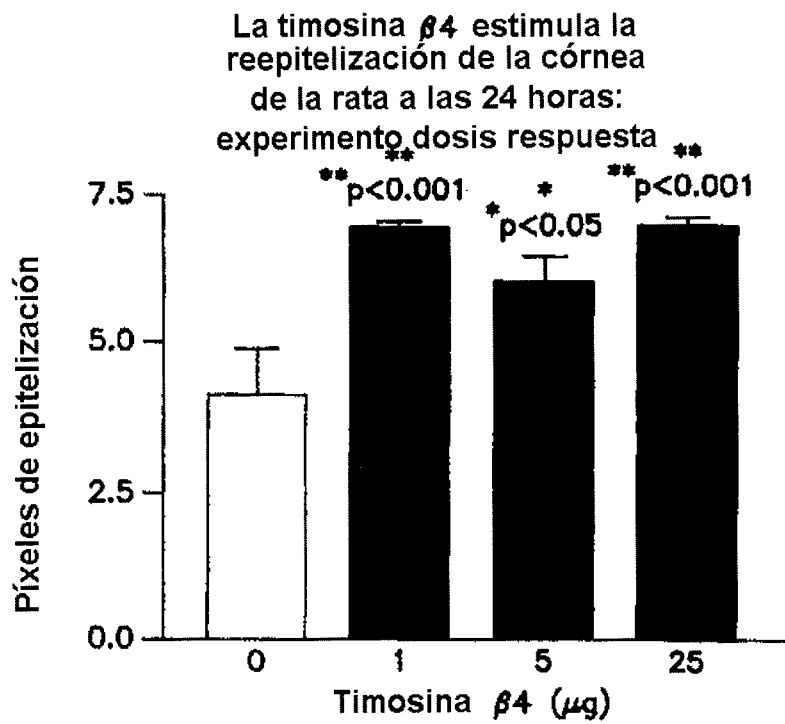


FIG. 9

Fórmula estructural de la timosina Beta 4

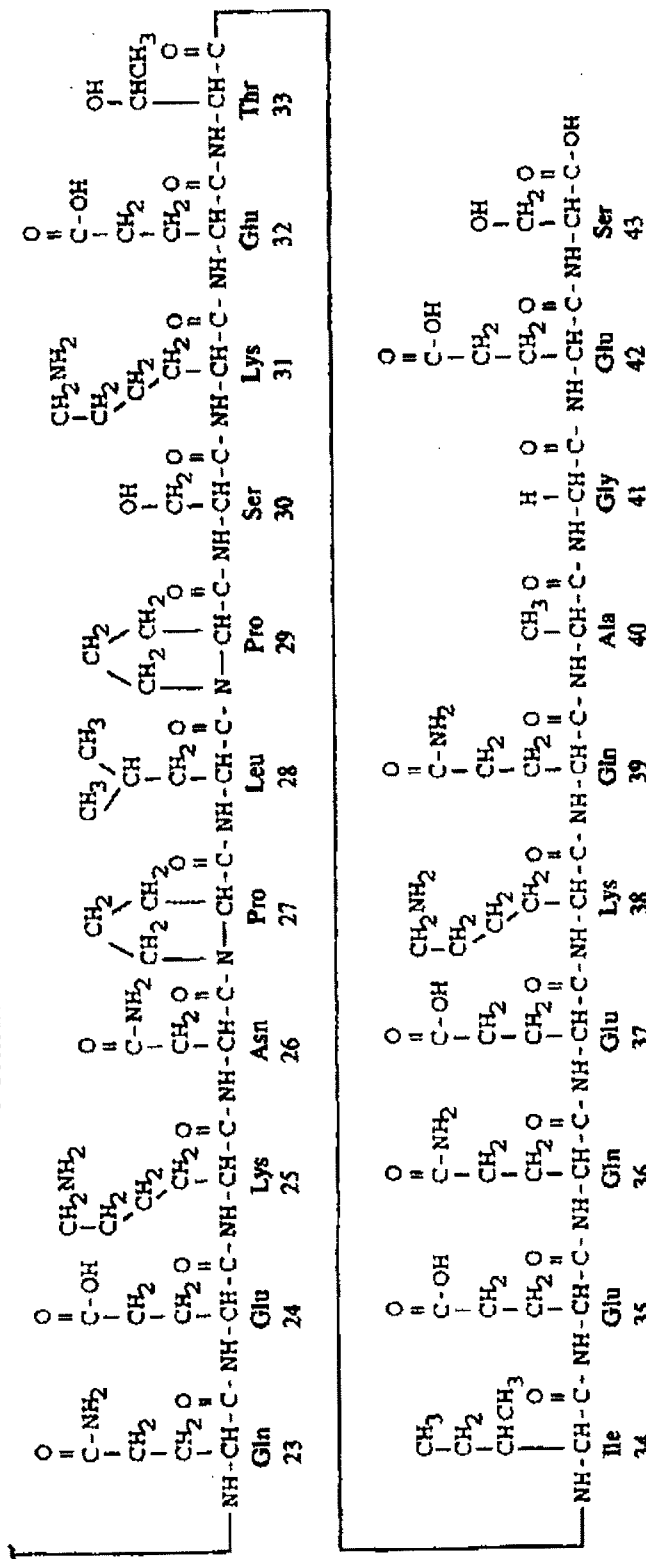


FIG. 10b

Secuencia de aminoácidos de la timosina β_4 y otras β - timosinas

	5	10	15	20	25	30	35	40
	HELIX.....					HELIX.....		
$T\beta_4$	ac-SDKP DMAEI EKFDK SKLKK TETQE KNPLP SKETI EQEDQ AGES							
$T\beta_4^{Ala}$	ac-ADKP DMAEI EKFDK SKLKK TETQE KNPLP SKETI EQEKQ AGES							
$T\beta_4^{Xen}$	ac-SDKP DMAEI EKFDK AKLKK TETQE KNPLP SKETI EQEKQ STES							
$T\beta_9$	ac-ADKP DLGEI NSFDK AKLKK TETQE KNPLP TKETI EQEKQ AK							
$T\beta_9^{Met}$	ac-ADKP DMGEI NSFDK AKLKK TETQE KNPLP TKETI EQEKQ AK							
$T\beta_{10}$	ac-ADKP DMGEI ASFDK AKLKK TETQE KNPLP TKETI EQEKQ SEIS							
$T\beta_{11}$	ac-SDKP NLEEV ASFDK TKLKK TETQE KNPLP TKETI EQEKQ AS							
$T\beta_{12}$	ac-SDKP DLAEV SNFDK TKLKK TETQE KNPLP TKETI EQEKQ ATA							
$T\beta_{12}^{perch}$	ac-SDKP DISEV TSFDK TKLKK TETQE KNPLP SKETI EQEKQ AATS							
$T\beta_{13}$	ac-ADKP DMGEI ASFDK AKLKK TETQE KNPLP TKETI EQEKQ AK							
$T\beta_{14}$	ac-SDKP DISEV SSFDK TKLKK TETAE KNPLP TKETI EQELT A							
$T\beta_{15}$	ac-SDKP DISEV EHFDD SKLKK TETAE KNPLP SKETI EQEKQ YNQRS							
$T\beta^{scallops}$	ac-SDKP FVSEV ANFDK SKLKK TETAE KNPLP TKETI EQEKQ A							
$T\beta^{sea urch}$	ac-ADKP DVSEV STFDK SKLKK TETQE KNPLP TKGTI EQEKQ G							

FIG. 11a

Distribución filogenética de los péptidos similares a la timosina Beta 4

Especies	Primer péptido	Segundo péptido	Tercer péptido
Humanos	β_4	β_{10}	β_{15}
Rata, ratón, gato	β_4	β_{10}	β_{15} (tumor de rata)
Ternero	β_4	β_9	
Cerdo, oveja	β_4	β_9^{Met}	
Caballo, pollo, geco	β_4		
Xenopus laevis	β_4^{Xen}		
Trucha arcoiris	β_{11}	β_{12}	
Perca	$\beta_{12}^{\text{perca}}$		
Ballena	β_{13}		
Erizo de mar	β_{14}	$\beta_{\text{erizo de mar}}$	
Vieira	β^{vieira}		

FIG. 11b