

(11) Número de Publicação: **PT 1335743 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 38/08 (2007.10) **A61K 38/32** (2007.10)
C07K 7/06 (2007.10) **C07K 14/66** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.11.02**

(30) Prioridade(s): **2000.11.02 US 244901 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.08.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.12.23**
060/2010

(73) Titular(es):

REGENERX BIOPHARMACEUTICALS INC.
3 BETHESDA METRO CENTER BETHESDA, MD
20817 US

(72) Inventor(es):

ALLAN L. GOLDSTEIN US

(74) Mandatário:

GONÇALO DA CUNHA FERREIRA
AV. ENG. DUARTE PACHECO, TORRE 1 - 3º 1070-101
LISBOA PT

(54) Epígrafe: **INIBIÇÃO OU REVERSÃO DO ENVELHECIMENTO DA PELE POR MEIO DE PÉPTIDOS SEQUESTRANDO ACTINA**

(57) Resumo:

RESUMO

INIBIÇÃO OU REVERSÃO DO ENVELHECIMENTO DA PELE POR MEIO DE PÉPTIDOS SEQUESTRANDO ACTINA

A invenção diz respeito à degradação da pele associada ao seu envelhecimento, a qual é inibida ou reversiva pela administração de péptido sequestrando a actina, como a Timosina $\beta 4$ ($T\beta 4$), uma isoforma de $T\beta 4$, ou $T\beta 4$ oxidada.

DESCRIÇÃO

INIBIÇÃO OU REVERSÃO DO ENVELHECIMENTO DA PELE POR MEIO DE PÉPTIDOS SEQUESTRANDO ACTINA

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da invenção

A presente invenção é relativa ao campo de inibição ou reversão do envelhecimento da pele.

DESCRIÇÃO DOS ANTECEDENTES

O fenómeno chamado “envelhecimento” da pele pode ocorrer não só com o avançar da idade, mas devido a outras alterações degenerativas e a factores ambientais. O envelhecimento da pele resulta de alterações nocivas nas propriedades fisiológicas, bioquímicas e imunológicas da pele. Essas alterações incluem o emagrecimento da pele, a perda de elasticidade, a alteração nas proporções de actina polimerizada e volume de actina polimerizada, diminuição do colagénio e outras proteínas matriz, alterações na vascularização que diminui a capacidade de reparar o dano do ADN, aumentando a propensão para os cancros da pele tais como carcinoma de células escamosas, e risco aumentado de infecção.

Foram propostas numerosas fórmulas farmacêuticas, nutricêuticas ou cosmocêuticas para reduzir ou reverter o envelhecimento da pele ou a aparência de envelhecimento da pele. Para além disso, foram propostos “peelings” químicos, fototerapias e várias formas de cirurgia plástica.

Permanece a necessidade na arte de métodos e composições melhorados para inibir ou reverter o envelhecimento da pele.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao uso de uma quantidade efectiva de um polipeptído de inibição da degeneração da pele compreendendo uma sequência de aminoácidos LKKTET ou uma sua variante conservadora tendo actividade inibidora da degeneração da pele, para o fabrico de uma composição para promover a reversão ou a inibição da degeneração da pele associada ao envelhecimento da pele.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se numa descoberta que os péptidos que sequestram a actina tais como a timosina 134 (T β 4) e outros péptidos que sequestram actina compreendendo uma sequência de aminoácidos LKKTET ou suas variantes conservadoras, promovem a reversão ou a inibição da degeneração da pele associada com o envelhecimento da pele.

A Timosina β 4 foi inicialmente identificada como uma proteína que é regulada para cima durante a migração celular endotelial e diferenciação *in vitro*. A Timosina β 4 foi inicialmente isolada a partir de um timo e é um polipéptido ubíquo 4,9 kDa com 43 aminoácidos identificado numa variedade de tecidos. Já foram atribuídos muitos papéis a esta proteína incluindo um papel na diferenciação e migração celular endotelial de, diferenciação de células T, sequestro de actina e vascularização.

De acordo com uma concretização, a invenção é uma utilização de uma quantidade eficaz de um agente que estimula a produção de polipéptidos de inibição de degeneração da pele compreendendo uma sequência de aminoácidos LKKTET, ou uma sua variante conservadora tendo uma actividade de inibição de degeneração da pele, preferivelmente Timosina β 4, Timosina β 4 oxidada ou um antagonista de Timosina β 4, para o fabrico de uma composição

para promover a reversão ou a inibição da degeneração da pele associada ao envelhecimento da pele.

A presente invenção promove a melhoria na condição da pele seleccionada do grupo consistindo num aumento da elasticidade da pele, redução da dimensão de uma área de escurecimento da pele associada à idade (manchas da pele resultantes da idade), branqueamento de uma área de escurecimento da pele resultante da idade, e suas combinações.

As composições que podem ser usadas de acordo com a presente invenção incluem Timosina $\beta 4$ (T $\beta 4$), isoformas de T $\beta 4$, T $\beta 4$ oxidada, polipéptidos compreendendo a sequência de aminoácidos LKKTET ou suas variantes conservadoras tendo actividade de inibição da degeneração da pele. A WO 00/06190 divulga isoformas de T $\beta 4$ que podem ser úteis de acordo com a presente invenção assim como a sequência de aminoácidos LKKTET e suas variantes conservadoras tendo actividade de inibição de degeneração da pele, que podem ser utilizadas na presente invenção. A WO 99/49883 divulga Timosina T $\beta 4$ oxidada que pode ser utilizada de acordo com a presente invenção. Embora a presente invenção seja descrita de ora em diante principalmente em relação à T $\beta 4$ e às isoformas de T $\beta 4$ deverá ser entendido que se pretende que a descrição que se segue seja igualmente aplicável à sequência de aminoácidos LKKTET, às suas variantes conservadoras tendo actividade de inibição de degeneração da pele, assim como à Timosina $\beta 4$ oxidada.

Numa concretização, a invenção refere-se a um uso de uma quantidade eficaz na inibição da degeneração da pele de T $\beta 4$ ou de uma isoforma de T $\beta 4$ para o fabrico de uma composição para a inibição ou reversão de envelhecimento da pele num sujeito, em que a composição pode ser para administração tópica ou sistémica. Os exemplos de administração tópica incluem, por exemplo, contacto da pele com uma loção, pomada, gel, creme,

pasta, spray, suspensão, dispersão, hidrogel, unguento, ou óleo compreendendo T β 4. A administração sistémica inclui, por exemplo, injeções intravenosas, intraperitoniais, intramusculares de uma composição contendo T β 4 ou uma isoforma de T β 4. Um sujeito pode ser qualquer mamífero, preferivelmente humano.

Uma composição de acordo com a presente invenção pode ser administrada diariamente, dia sim, dia não, etc., com uma aplicação única ou múltiplas aplicações por dia da administração, tais como aplicações de 2, 3, 4 ou mais vezes por dia de administração.

As isoformas de T β 4 foram identificadas e têm cerca de 70%, ou cerca de 75%, ou cerca de 80% ou mais de homologia com a sequência de aminoácidos de T β 4 conhecida. Essas isoformas incluem, por exemplo, T β 4^{ala}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 e T β 15. Tal como a T β 4, as isoformas T β 10 e T β 15 sequestram a actina. As T β 4, T β 10 e T β 15, bem como estas, outras isoformas partilham uma sequência de aminoácidos, LKKTET, que parece estar envolvido na mediação da sequestração ou ligação de actina. Embora não desejando estar vinculado a qualquer teoria particular, a actividade de isoformas de T β 4 pode ser devida, em parte, à capacidade de polimerizar a actina. Por exemplo, a T β 4 pode modular a polimerização da actina na pele, (p.ex. as β -timosinas parecem despolimerizar a F-actina ao sequestrar a G-activa livre). A capacidade da T β 4 para modular a polimerização da actina pode ser devida no todo, ou em parte, à sua capacidade para ligar ou sequestrar a actina via a sequência LKKTET. Assim, tal como com a T β 4, outras proteínas que ligam ou sequestram a actina, ou modulam a polimerização da actina, incluindo as isoformas de T β 4 tendo a sequência de aminoácidos LKKTET, são susceptíveis de reduzir o envelhecimento da pele, sozinhas ou em combinação com T β 4, conforme aqui estabelecido.

Assim, é especialmente contemplado que as isoformas de T β 4, tal como T β 4^{ala}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 e T β 15, assim como as isoformas de T β 4 ainda não identificadas, serão úteis na invenção. A invenção proporciona assim composições farmacêuticas compreendendo T β 4, assim como isoformas T β 4, T β 4^{ala}, T β 9, T β 10, T β 11, T β 12, T β 13, T β 14 e T β 15 e um transportador farmacêutico aceitável.

Para além disso, outras proteínas com capacidade de sequestro de ligação de actina, ou que possam mobilizar a actina ou modular a polimerização de actina, conforme demonstrado num ensaio de sequestro, ligação, mobilização ou polimerização adequado, ou identificado pela presença de uma sequência de amino-ácidos que medeia a ligação da actina, tal como LKKTET, por exemplo, podem ser empregues igualmente na invenção. Essas proteínas incluem gelsolina, proteína de ligação da vitamina D (DBP), profilina, cofilina, depactina, Dnasel, vilina, fragmina, severina, proteína terminal, β -actinina e acumentina, por exemplo.

A invenção proporciona ainda composições farmacêuticas compreendendo gelsolina, proteína de ligação da vitamina D (DBP), profilina, cofilina, depactina, Dnasel, vilina, fragmina, severina, proteína terminal, p-actina e acumentina conforme estabelecido na presente. Assim, a invenção inclui o uso de um polipéptido de redução do envelhecimento da pele compreendendo a sequência de aminoácidos LKKTET e as suas variantes conservadoras.

Conforme usado aqui, o termo “variante conservadora” ou as suas variações gramaticais denota a substituição de um resíduo de aminoácido por outro resíduo biologicamente semelhante. Os exemplos de variações conservadoras incluem a substituição de um resíduo hidrofóbico tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro, a substituição de um resíduo polar por outro, tal como a substituição de arginina por lisina, ácidos

glutâmico por aspártico, ou glutamina por asparagina, e assim por diante.

A T β 4 foi localizada em vários tipos de tecidos de células e assim, os agentes que estimulam a produção de T β 4 podem ser adicionados ou constituir uma composição para a produção de T β 4 a partir de um tecido e/ou de uma célula. Esses agentes incluem membros da família de factores de crescimento, tal como o factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento transformador beta (TGF- β), factor de crescimento fibroblástico básico (bFGF), timosina α 1 (T α 1) e factor de crescimento endotelial vascular (VEGF). Mais preferivelmente, o agente é o factor de crescimento transformador beta (TGF- β) ou outros membros da superfamília TGF- β . As composições T β 4 da invenção podem reduzir o envelhecimento da pele ao efectuar o crescimento do tecido conectivo através de deposição na matriz extracelular, migração celular e vascularização da pele.

Adicionalmente os agentes que assistem ou estimulam a redução do envelhecimento da pele podem ser adicionados à composição juntamente com T β 4 ou uma isoforma da T β 4. Esses agentes incluem agentes angiogénicos, factores de crescimento, agentes que direccionam a diferenciação das células, agentes que promovem a migração de células e agentes que estimulam a provisão de material na matriz extracelular da pele. Por exemplo, e não por via da limitação, T β 4 ou a isoforma T β 4 sozinha ou em combinação podem ser adicionadas a qualquer um ou mais dos seguintes agentes: VEGF, KGF, FGF, PDGF, TGF β , IGF-1, IGF-2, IL-1, protimosina α e timosina α 1 numa quantidade eficaz.

A invenção também inclui uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de T β 4 ou uma isoforma de T β 4 num transportador farmacêuticamente

aceitável. Esses transportadores incluem os referidos acima com referência à administração parentérica.

A dosagem actual ou reagente, formulação ou composição que inibe ou promove a reversão do envelhecimento da pele pode depender de muitos factores, incluindo o tamanho e a saúde do sujeito. Contudo, as pessoas de competência normal na arte podem usar ensinamentos descrevendo os métodos e técnicas para determinar as dosagens clínicas conforme divulgado em WO 00/06190 *supra*, e as referências aí citadas, para determinar a dosagem adequada a utilizar.

As formulações tópicas adequadas incluem T β 4 ou uma isoforma de T β 4 numa concentração na gama de cerca de 0.001-10% em peso, mais preferivelmente dentro do limite de cerca de 0.01-0.1% em peso, mais preferivelmente cerca de 0.05% em peso.

As abordagens terapêuticas aqui descritas envolvem várias vias de administração ou entrega de reagentes ou composições compreendendo a T β 4 ou outros compostos da invenção, incluindo quaisquer técnicas de administração convencionais (por exemplo, mas não limitado a, administração tópica, injeção local, inalação, ou administração sistémica) a um sujeito. As composições compreendendo T β 4 ou outros compostos da invenção podem ser formuladas em composições farmacêuticas pela mistura com excipientes ou transportadores não tóxicos farmacêuticamente aceitáveis.

Embora não ligada a qualquer teoria particular, acredita-se que a presente invenção pode promover a reversão ou a inibição da degeneração da pele associada ao envelhecimento da pele induzindo a desoxinucleotidil transferase terminal (uma polimerasa não templada dirigida ao ADN), para diminuir os níveis de uma ou mais citocinas inflamatórias, e para actuar como um factor quimiotáctico para as células endoteliais, e

assim inibir ou promover a reversão das alterações degenerativas na pele que surgem com o envelhecimento ou outros factores degenerativos ou ambientais.

A invenção é ainda ilustrada pelo exemplo não limitativo que se segue:

Exemplo 1

Foi preparada uma formulação de Timosina $\beta 4$ a 0.05% em peso, i.e. 50 mg de Timosina $\beta 4$ por 100 mg de gel, dissolvendo primeiro a timosina $\beta 4$ em água e misturando muito bem o preparado numa fórmula em gel de grau farmacêutico. Foi tratado um voluntário com uma mancha de idade escura com 1 cm na região dorsal da mão abaixo da articulação média. O gel de Timosina $\beta 4$ a 0.05% em peso foi aplicado a uma região de 5 x 5 cm abrangendo a mancha de idade, duas vezes por dia durante 28 dias. Em sete dias a mancha de idade começou a desaparecer e em 14 dias, a mancha de idade começou notoriamente a diminuir de tamanho. No final do período de 28 dias, a mancha de idade tinha-se esbatido significativamente e o diâmetro da mancha diminuiu em mais de 50%. Adicionalmente, a pele na área tratada ficou mais macia e parecia ter aumentado a elasticidade. O voluntário foi subsequentemente observado durante quatro semanas, e as alterações observadas durante o tratamento persistiram.

Lisboa, 23 de Março de 2010.

LISTA DE SEQUÊNCIA

<110> REGENERX BIOPHARMACEUTICALS, INC.

<120> INIBIÇÃO OU REVERSÃO DO ENVELHECIMENTO DA PELE POR
PÉPTIDOS DE SEQUESTRO DE ACTINA

<130> BYP-5719-EP

<140> EP 1981902.8

<141> 2001-11-02

<150> US60/244,901

<151> 2000-11-02

<150> PCT/US01/42900

<151> 2001-01-02

<160> 1

<170> Patentin version 3.1

<210> 1

>211> 6

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de aminoácidos presente na timosina $\beta 4$ (T $\beta 4$) e
outros péptidos de sequestro de actina.

<400> 1

Leu	Lis	Lis	Tre	Glu	Tre
1				5	

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de uma quantidade eficaz de um polipéptido inibidor da degeneração da pele compreendendo uma sequência de aminoácidos LKKTET, ou uma variante conservadora da referida sequência de aminoácidos tendo uma actividade inibidora da degeneração da pele, para o fabrico de uma composição para promover a reversão ou a inibição da degeneração da pele associada ao envelhecimento da pele.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, para a promoção de uma melhoria da condição da pele seleccionada do grupo consistindo num aumento da elasticidade da pele, redução da dimensão de uma área de escurecimento da pele relacionada com a idade, branqueamento de uma área de escurecimento da pele relacionada com a idade, e suas combinações.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido polipéptido compreende Timosina β 4 (T β 4), uma isoforma de T β 4, ou T β 4 oxidada.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, em conjunto com uma quantidade eficaz de pelo menos um agente que auxilia ou estimula a redução do envelhecimento da pele, em que o referido agente é seleccionado de entre um grupo consistindo num factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), factor de crescimento de queratinocitos (KGF), factor de crescimento fibroblástico (FGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crescimento transformador beta (TGF- β), factor de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), factor de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF-2), interleucina 1 (IL-1), protimosina α e timosina α 1 (T α 1).

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que o referido factor de crescimento é TGF- β .

6. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida composição é para administração sistémica.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que referida composição é para administração tópica.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a referida composição está na forma de um gel, creme, pasta, loção, spray, suspensão, dispersão, hidrogel ou unguento.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido polipéptido é recombinante ou sintético.

10. Utilização de uma quantidade eficaz de um agente que estimula a produção de um polipéptido de inibição da degeneração da pele compreendendo uma sequência de aminoácidos LKKTET, para o fabrico de uma composição para a promoção da reversão ou inibição da degeneração da pele associada ao envelhecimento da pele, em que o referido polipéptido é Timosina β 4 (T β 4) e em que o referido agente é um factor de crescimento seleccionado do grupo consistindo num factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento transformador beta (TGF- β), factor de crescimento fibroblástico básico (bFGF), timosina α 1 (T α 1) e factor de crescimento endotelial vascular (VEGF).