

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613127-1 A2**



(22) Data de Depósito: 12/07/2006
(43) Data da Publicação: 21/12/2010
(RPI 2085)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/18
A61L 27/54
A61L 27/60
A61L 26/00

(54) Título: **USO DE UM AGENTE QUE POSSUI ATIVIDADE TGF-B3**

(30) Prioridade Unionista: 12/07/2005 GB 0514262.5

(73) Titular(es): RENOVO LTD

(72) Inventor(es): HUGH LAVERTY, MARK FERGUSON, NICK OCCLESTON, SHARON O KANE

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT GB2006002577 de 12/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/007098 de 18/01/2007

(57) Resumo: USO DE UM AGENTE QUE POSSUI ATIVIDADE TGF-B₃. A presente invenção refere-se ao uso de TGF-β₃, ou agentes que possuem atividade TGF-β₃, para promover regeneração epitelial. Métodos para fabricar medicamentos, e métodos para promover regeneração epitelial são proporcionados. Em particular, os medicamentos e métodos de tratamento da invenção são aplicáveis para a promoção de regeneração epitelial em pacientes saudáveis, e/ou em ferimentos agudos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE UM AGENTE QUE POSSUI ATIVIDADE TGF-B₃**".

A presente invenção refere-se à fabricação de medicamentos para a promoção de regeneração epitelial. Esta também proporciona um método para promover regeneração epitelial em um indivíduo necessitado de tal promoção.

O corpo compreende diversos tipos diferentes de epitélios, as cujas estruturas e complexidade variam dependendo de sua localização, papel e função.

A forma mais básica de epitélio é o epitélio simples, que compreende uma única camada de células epiteliais. Um exemplo de uma forma de epitélio simples é epitélio escamoso simples, que compreende uma única camada de células tipo escala achatadas. Exemplos de epitélios escamosos simples no corpo incluem mesotélio, endotélio, e revestimento de alvéolos pulmonares.

Outra forma comum de epitélio é o epitélio estratificado. Esta compreende uma série de camadas, e as células de camadas diferentes podem variar em tamanho, formato e função. Os epitélios estratificados podem ser adicionalmente caracterizados com referência ao tipo de células localizadas em sua superfície.

A guisa de exemplo, os epitélios escamosos estratificados possuem células tipo escala (escamosas) localizadas em sua superfície. O formato das células que compreendem epitélios escamosos estratificados pode variar com locais diferentes dentro do epitélio. Enquanto as células localizadas na superfície superior do epitélio geralmente possuem uma conformação tipo escala achatada, aquelas em direção à base do epitélio podem ter uma tendência a possuir um formato poliédrico. As células epiteliais podem ser estruturalmente fortificadas pela presença de queratina, e a quantidade desta molécula presente tende a aumentar com a altura crescente dentro dos epitélios. Os epitélios escamosos estratificados compreendem tipicamente diversas camadas de células dotadas de queratina. Os tipos de molécula de queratina presentes podem variar tanto por camada celular como sítio do

corpo.

O mais proeminente dos epitélios do corpo é a epiderme, a camada epitelial escamosa estratificada que cobre a pele. A epiderme, devido à sua localização, é o tecido que está mais freqüentemente em contato com o ambiente externo, e como um resultado é o tecido mais freqüentemente
5 exposto a dano ambiental e outros.

Exemplos adicionais de epitélios estratificados incluem epitélios colunares estratificados, e epitélios colunares ciliados, onde a camada mais elevada de células possui formato colunar, e proporcionada com cílios móveis.
10

Os epitélios em todo o corpo são submetidos a diversas formas diferentes de ferimento. Tal ferimento pode prejudicar ou destruir completamente a função dos epitélios danificados, e a consequência de tal ferimento depende da natureza e função do epitélio afetado. Conseqüentemente, a promoção de regeneração epitelial é vantajosa em diversos contextos diferentes.
15 Entretanto, apesar da necessidade da promoção de regeneração epitelial, ainda há uma exigência de medicamentos e métodos adicionais e mais eficazes, através dos quais tal regeneração promovida pode ser obtida.

Há uma variação significativa na faixa de terapias atualmente usadas para promover regeneração epitelial. Por exemplo, a administração de sítios doadores de enxerto de pele de espessura parcial (como analisado em Rakel et al. 1998) pode envolver simplesmente deixar o sítio doador de enxerto exposto e não-tratado, ou pode fazer uso alternativamente de tratamentos tais como a aplicação de curativos (tipicamente compressas de gaze, que podem ser usadas separadamente ou impregnadas com uma variedade de agentes anti-infectivos, alginatos, hidrocolóides, membrana de compósito sintético, películas transparentes ou mel), aplicação de pele artificial (que pode ser gerada a partir da epiderme do próprio indivíduo), aplicação de aloenxertos (tipicamente aloenxertos bovinos e suínos) ou aplicação
25 de pomadas (tipicamente pomadas que contém compostos baseados em prata como agentes anti-infectivos).
30

Esta ausência de uma terapia única universalmente aceita é in-

dicativa da necessidade de métodos novos através dos quais a regeneração epitelial pode ser promovida. Ademais, é bem reconhecido que há muitas falhas e desvantagens associadas com terapias atuais.

Os efeitos colaterais associados com tratamentos atuais incluem
5 tempos de cura demorados nos sítios receptores e/ou doadores de enxerto, o desenvolvimento de epitélio de substituição que pode ser mais grosso e/ou mais duro do que o originalmente presente, taxas aumentadas de infecção, edema e eritema, cicatrização hipertrófica em torno do local de tratamento, risco de infecção por prion ou viral de material de aloenxerto, o período de
10 tempo que leva para gerar o tratamento (no caso de geração de pele artificial das células dos próprios pacientes) e dor associada tanto com sítios receptores como doadores.

Um objetivo da presente invenção é proporcionar medicamentos novos para a promoção de regeneração epitelial que superam pelo menos
15 algumas desvantagens associadas com a técnica anterior.

De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção proporciona-se o uso de um agente que possui atividade de TGF- β_3 na fabricação de um medicamento para a promoção de regeneração epitelial.

O agente que possui atividade de TGF- β_3 pode ser, de preferência,
20 selecionado do grupo que compreende TGF- β_3 , fragmentos biologicamente ativos, variantes e derivados de TGF- β_3 , e substâncias capazes de promover e/ou imitar a atividade biológica de TGF- β_3 .

A promoção de regeneração epitelial dentro do contexto da presente invenção pode ser entendida abrangendo qualquer aumento na taxa
25 de regeneração epitelial como comparado com a regeneração que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado.

A taxa de regeneração epitelial obtida de acordo com a invenção pode ser facilmente comparada com aquela que ocorre em epitélios tratados por controle ou não-tratados utilizando qualquer modelo adequado de regeneração epitelial conhecido na técnica. Por exemplo, a taxa em tais sítios de
30 dano epitelial experimentais que regeneraram áreas conhecidas pode ser comparada utilizando modelos *in vivo* bem-conhecidos em camundongos,

ratos, coelhos ou porcos, tais como, aqueles descritos em Tomlinson and Ferguson (2003), Davidson et al. (1991) e Paddock et al (2003).

De acordo com um segundo aspecto da invenção proporciona-se um método para promover a regeneração epitelial, sendo que o método compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente que possui atividade de TGF- β_3 em um indivíduo necessitado de tal promoção.

Com relação a este aspecto da invenção, uma “quantidade terapeuticamente eficaz de um agente que possui atividade de TGF- β_3 ” é uma quantidade de um agente, que possui atividade de TGF- β_3 , que é suficiente para promover regeneração epitelial no indivíduo no qual a quantidade é administrada.

Conforme observado acima, os epitélios, e particularmente a epiderme, sofrem mais encontros diretos, freqüentes, e prejudiciais com o ambiente externo do que qualquer outro tecido no corpo. É, portanto, altamente desejado que o reparo e restauração de tecidos epiteliais, tal como, a epiderme, sejam capazes de ser influenciados para garantir sua máxima eficácia funcional. De fato, embora os métodos e medicamentos da invenção sejam adequados para a promoção de regeneração epitelial em todos os tipos de epitélios, e tenham sido eficazes em todos os epitélios testados, a promoção de regeneração epidérmica constitui uma aplicação particularmente preferida da invenção. Outras modalidades preferidas da invenção incluem a promoção de regeneração epitelial escamosa, e/ou a promoção de regeneração epitelial queratinizada. Será avaliado que os métodos e medicamentos da invenção podem ser benéficos à epiderme que cobre o escalpo.

A promoção de regeneração epitelial de acordo com a invenção é capaz de ocasionar a formação de uma barreira epitelial de funcionamento sobre áreas desnudas ou anteriormente feridas. A barreira epitelial formada é capaz de impedir o ingresso, e colonização, no tecido subjacente por elementos patogênicos tais como bactérias, fungos e vírus. Desta maneira, a promoção de regeneração epitelial pode proporcionar benefícios em contextos onde se deseja impedir ou reduzir a infecção em sítios onde a camada

epitelial foi rompida.

A presença de uma camada epitelial intacta também atua como uma barreira para movimento de fluido, e é, portanto, capaz de impedir a dessecação de tecido subjacente. Desta maneira, a promoção de regeneração epitelial é capaz de impedir ou reduzir a dessecação do tecido que surge como um resultado de perda de fluido através de uma camada epitelial danificada ou de outra maneira rompida.

A presente invenção se baseia na descoberta surpreendente que a regeneração epitelial pode ser estimulada pelo fornecimento da citocina TGF- β_3 ou um agente que partilha a atividade biológica característica de TGF- β_3 . TGF- β_s (que existe em três isoformas em mamífero, TGF- β_1 , β_2 e TGF- β_3) foi anteriormente considerada por inibir regeneração epitelial.

Os efeitos inibidores de TGF- β sobre a regeneração epitelial foram relatados baseados tanto em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os estudos dos efeitos de isoformas de TGF- β sobre ceratinócitos cultivados (células epiteliais cutâneas) sugeriram que, embora o tratamento com TGF- β aumente a expressão de ceratinócitos de integrinas associadas com migração, a taxa de proliferação de ceratinócitos, que é necessária para regeneração epidérmica, é consideravelmente reduzida. A inibição mediada por TGF- β de proliferação de célula epitelial requerida para regeneração epitelial também foi relatada utilizando estudos *in vivo*.

Embora os efeitos inibidores relatados de TGF- β sejam apresentados por todas as isoformas há diferenças nas potências relativas das isoformas diferentes. Os estudos mostraram que TGF- β_3 é a mais potente das isoformas em sua capacidade de inibir a síntese de DNA e proliferação em culturas primárias de ceratinócitos humanos, causando inibição mais forte do que tanto TGF- β_1 como TGF- β_2 .

Além de estudos que utilizam células cultivadas, inúmeros estudos *in vivo* foram recentemente realizados, utilizando compostos específicos ou tecnologias genéticas para interromper a via de sinalização de TGF- β . Estes estudos sugeriram adicionalmente que TGF- β_s , e particularmente TGF- β_3 inibem a regeneração epitelial.

Ao contrário dos relatórios anteriormente publicados, os inventores do presente pedido descobriram no momento que a aplicação de um agente, que possui atividade de TGF- β_3 a um tecido epitelial antes ou depois do ferimento àquele tecido, é capaz de promover a regeneração da camada epitelial, em vez de inibir tal regeneração. Sem se ater a qualquer hipótese os inventores acreditam que a promoção de regeneração epitelial é obtida por promoção mediada por TGF- β_3 de migração de célula epitelial. As células epiteliais (cuja migração foi promovida) são, desta forma, capazes de repopular e regenerar o epitélio danificado mais rapidamente do que ocorre na ausência de agentes que possuem atividade de TGF- β_3 .

Será avaliado que a promoção de regeneração epitelial de acordo com a invenção pode ser de uso para induzir reepitelialização eficaz em contextos onde a invenção pode ser benéfica em casos onde a resposta de reepitelialização é comprometida, inibida, retardada ou, de outra maneira, imperfeita. Entretanto, é particularmente preferido que os métodos e medicamentos da invenção que são usados na promoção de regeneração epitelial também possam ser efetuados para acelerar a taxa de respostas de regeneração epitelial normal em pacientes que sofrem de dano epitelial.

Há diversos contextos onde a resposta de reepitelialização do corpo pode ser imperfeita. Por exemplo, a reepitelialização imperfeita na pele está associada com condições tais como, pênfigo, doença de Hailey-Hailey (pênfigo familiar benigno), necrólise epidérmica tóxica (TEN)/síndrome de Lyell, epidermólise bolhosa, leishmaniose cutânea e ceratose actínica. A reepitelialização imperfeita dos pulmões pode estar associada com fibrose pulmonar idiopática (IPF) ou doença pulmonar intersticial. A reepitelialização imperfeita do olho pode estar associada com condições, tais como, deficiência de células-tronco do limbo parcial ou erosões corneanas. A reepitelialização imperfeita do trato gastrointestinal ou cólon pode estar associada com condições, tais como, fissuras anais crônicas (fissura no ânus), colite ulcerativa ou doença de Crohn, e outros distúrbios intestinais inflamatórios.

O processo da reepitelialização em resposta a lesões dérmicas

também pode ser observado em muitos indivíduos. Por exemplo, é bem-conhecido que lesões dérmicas em idosos apresentam regeneração epitelial menos vigorosas do que aquelas de indivíduos mais jovens. Também há muitas outras condições ou distúrbios que estão associados com regeneração epitelial retardada ou, de outra maneira, prejudicada em resposta à lesão. Por exemplo, os pacientes com diabetes, pacientes com polifarmácia (por exemplo, como um resultado da velhice), mulheres na pós-menopausa, pacientes suscetíveis a lesões por pressão (por exemplo, paraplégicos), pacientes com doença venosa, pacientes clinicamente obesos, pacientes que recebem quimioterapia, pacientes que recebem radioterapia, pacientes que recebem tratamento com esteróide ou pacientes imunocomprometidos podem sofrer de regeneração epitelial comprometida. Em muitos casos a falta de uma resposta de regeneração epitelial apropriada contribui para o desenvolvimento de infecções no local do ferimento, e para retardamento da resposta de cura do ferimento normal que pode resultar na formação de feridas crônicas, tais como, úlceras. Conseqüentemente, será avaliado que a promoção epitelial através dos métodos ou medicamentos da invenção serão benéficos a tais pacientes.

Sem depreciar a descrição acima, pode ser geralmente preferido que a promoção de regeneração epitelial de acordo com a invenção pode ser efetuada para aumentar uma resposta de reepitelialização avançada (ou seja, para produzir uma resposta máxima de regeneração epitelial maior do que a que poderia ser normalmente obtida sem promoção). Será avaliado que desta maneira sítios de dano epitelial que ocorre em indivíduos em outros casos saudáveis podem ser induzidos a se regenerar mais rapidamente.

Muito esforço experimental e pesquisa foram empenhados na identificação e desenvolvimento de agentes terapêuticos e técnicas que podem ser usadas para promover a regeneração epitelial naqueles onde a resposta de reepitelialização é comprometida. Entretanto, o grupo de pacientes que não sofrem de reepitelialização comprometida constitui um grande número da população total coberta pelos serviços de assistência médica, e uma proporção ainda maior da massa trabalhadora. O versado na técnica irá

avaliar imediatamente, portanto, que é um grande benefício que a sociedade seja beneficiada pelo desenvolvimento de agentes terapêuticos e técnicas que possam se dirigir à necessidades destes pacientes em outros contextos saudáveis. Conseqüentemente, a promoção de regeneração epitelial em
5 pacientes saudáveis é uma modalidade preferida de todos os aspectos da presente invenção. A promoção de reepitelialização de feridas agudas (opostas às feridas crônicas) também é uma modalidade preferida de todos os aspectos da invenção.

Para os propósitos da presente invenção, uma ferida crônica
10 pode ser definida como qualquer ferida que não mostra nenhuma tendência à cura dentro de oito semanas de formação quando submetida a tratamento terapêutico apropriado (convencional). As feridas agudas podem ser qualquer ferida que não uma ferida crônica. As feridas agudas preferidas podem ser feridas incisionais, destas as feridas incisionais cirúrgicas podem ser um
15 grupo particularmente preferido.

Os epitélios, tal como, a epiderme ou epitélio corneano, podem ser submetidos a ferimento como um resultado de muitos tipos diferentes de insulto. Os epitélios podem, por exemplo, ser lesionados como um resultado de insultos físicos ou lesões, que incluem escoriações, abrasões, feridas
20 (tanto feridas penetrantes como feridas não-penetrantes), incisões cirúrgicas, e outros procedimentos cirúrgicos (particularmente enxertos de espessura parcial de tecidos tal como a pele), "queimaduras" (que, exceto onde o contexto requer o contrário, podem ser considerados para incluir ferimento do tecido resultante de exposição tanto a alta como baixa temperatura, a-
25 gentes químicos ou radiação), e outras formas de trauma.

Os inventores descobriram que os medicamentos e métodos da invenção são particularmente eficazes na promoção de regeneração epitelial em resposta a lesões. Estes são exemplificados, particularmente de benefício, lesões na pele, onde a epiderme está ferida. Será avaliado, entretanto,
30 que os métodos da invenção também podem ser aplicáveis a outros tipos de lesão e feridas inclusive lesão, ferimento ou trama a epitélios tais como, epitélios respiratórios, ou aqueles que cercam tecidos ou órgãos internos. A

regeneração do epitélio deve ser promovida por um epitélio que não um epitélio digestivo. Por exemplo, o epitélio pode ser qualquer um exceto o epitélio intestinal ou gastrointestinal.

É reconhecido que o dano epitelial, e particularmente ferimento epidérmico, resultante de queimaduras pode se estender para grandes áreas de um indivíduo afligido. Como um resultado as lesões por queimadura são particularmente suscetíveis a complicações tais como infecção e dessecação que surgem devido à falta de uma camada epitelial funcional. Conseqüentemente, a promoção de regeneração epitelial em resposta a ferimento por queimadura representa uma aplicação preferida da invenção.

A promoção de regeneração epitelial, por exemplo, no local de lesões dérmicas, causa um aperfeiçoamento rápido na aparência cosmética da área lesionada. As considerações cosméticas são importantes em inúmeros contextos clínicos, particularmente quando ocorre dano epitelial em locais proeminentes do corpo, tais como, face, pescoço e mãos. Conseqüentemente, a promoção de regeneração epitelial em locais onde se deseja aperfeiçoar a aparência cosmética da área danificada representa uma modalidade preferida da invenção.

O ferimento aos epitélios também pode surgir como um resultado da ação de elementos patogênicos (tais como, bactérias, fungos, ou vírus), insultos químicos (tais como, queimadura químicas causadas por agentes cáusticos, ou através do efeito de fármacos citotóxicos, tais como, aqueles empregados em quimioterapia) ou como um resultado de ferimento por radiação (tanto através de radiação de particulado ou radiação eletromagnética tal como, radiação gama, radiação ultravioleta ou similares) tal como aquele que ocorre em queimadura de sol. A promoção de regeneração epitelial utilizando métodos e medicamentos de acordo com a invenção pode ser utilizada de forma eficaz em todos os contextos mencionados acima.

Será avaliado que muitas das mesmas considerações que surgem com relação a dano epitelial em seres humanos também podem ser problemáticas em outros animais, particularmente animais em geral ou domésticos (por exemplo, cavalos, gado, cães, gatos, etc). Desta maneira, os

métodos da invenção também podem ser aplicáveis em animais não-humanos.

O uso de agentes que possuem atividade de TGF- β_3 para promover a regeneração epitelial em resposta ao ferimento associado com procedimentos de enxerto epitelial representa uma modalidade preferida da invenção. O dano epitelial que ocorre como um resultado de enxertos de pele pode ser clinicamente problemático, além de considerações cosméticas. A regeneração epitelial é benéfica tanto no sítio doador de enxerto epitelial, onde esta ajuda no reestabelecimento de uma camada epitelial funcional, como também no sítio receptor onde a regeneração é capaz de aperfeiçoar e acelerar a integração do tecido enxertado. A regeneração epitelial em sítios receptores de enxerto também é vantajosa no caso de enxertos que utilizam pele, pele artificial ou substitutos de pele.

A promoção de regeneração epitelial em sítios doadores de enxerto epitelial reduz o tempo gasto para rearmazenar uma camada epitelial funcional, e conseqüentemente reduz o potencial de infecção de sítio doador. A promoção de regeneração epitelial também reduz as incidências de vesiculação blistering e ruptura de tecido que podem ocorrer no sítio doador.

É preferido que os enxertos epiteliais sejam enxertos epidérmicos (pele). Os métodos e medicamentos da invenção possuem utilidade na promoção de regeneração epitelial nos contextos tanto de enxertos de pele de espessura total como parcial. Tais enxertos de pele (ou seja, tanto enxertos de espessura total como parcial) podem ser tanto em malha como não-malha.

Os inventores descobriram que a presença ou ausência de uma camada epitelial intacta também é um fator para determinar o grau de dor associada com sítios onde o epitélio foi danificado ou removido, tais como, sítios doadores de pele. Desta maneira, a promoção da regeneração epitelial em tais sítios pode reduzir a dor associada com, por exemplo, a retirada de enxertos de pele.

Uma vantagem adicional de promoção de regeneração epitelial em sítios doadores epiteliais é que esta reduz o tempo requerido até que a

re-colheita de tecido do sítio doador possa ocorrer. Por re-colheita entende-se a remoção subsequente de tecido epitelial adicional de um sítio doador anteriormente usado. Isto é particularmente vantajoso em situações onde a pele disponível para colheita é limitada e/ou a área da pele requerida para ser colhida é grande. Exemplos de tais situações incluem ocasiões quando se necessita remover enxertos de crianças e/ou pacientes que sofrem de queimaduras que cobrem uma grande porcentagem da superfície do corpo.

Conseqüentemente, em um terceiro aspecto da invenção proporciona-se um método para preparar um sítio doador de enxerto epitelial para re-colheita, sendo que o método compreende administrar em um sítio doador epitelial necessitado de tal preparação, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente que possui atividade de TGF- β_3 . No contexto deste aspecto da invenção uma "quantidade terapêuticamente eficaz" é uma quantidade de um agente que possui atividade de TGF- β_3 suficiente para promover a regeneração epitelial em tal extensão que enxertos epiteliais adicionais podem ser retirados do sítio doador. Será avaliado que a decisão se um sítio doador é suficientemente regenerado para permitir a re-colheita será normalmente tomada por um médico competente, e que tal pessoa terá acesso a uma diversidade de orientação, tanto por meio de textos relativos como por sua própria experiência, para indicar quando tal re-colheita pode ser normalmente realizada sem o benefício de preparação de acordo com a invenção.

Os inventores descobriram que a promoção de regeneração epitelial causada por agentes que possuem atividade de TGF- β_3 pode ser efetuada utilizando o próprio TGF- β_3 , fragmentos biologicamente ativos, variantes e derivados de TGF- β_3 , e substâncias capazes de promover ou imitar a atividade biológica de TGF- β_3 . Os fragmentos biologicamente adequados, variantes e derivados de TGF- β_3 podem ser facilmente identificados por sua capacidade de replicar os efeitos de TGF- β_3 *in vivo* ou *in vitro*. A atividade de TGF- β_3 pode ser avaliada *in vivo* utilizando modelos de animal adequados onde a taxa de regeneração epitelial ocorrente em áreas de dano epitelial tratado com compostos de teste pode ser comparada com a taxa de regene-

ração epitelial ocorrente em áreas de controle de dano epitelial. Os modelos de animais adequados podem incluir feridas de espessura parcial ou espessura total de tecidos que contêm uma camada epitelial (tal como, a epiderme da pele).

5 O versado na técnica irá avaliar que quando se estima a taxa de regeneração epitelial (por exemplo, para identificar se a regeneração foi ou não promovida) o parâmetro relativo que será considerado é a extensão de cobertura epitelial atingida. Deve-se tomar cuidado ao diferenciar tal cobertura epitelial de outros fatores, tal como, a quantidade de tecido de granulação
10 (ou outros materiais, tal como, matriz associada com formação de coágulo) presente em uma ferida. O tecido de granulação deste tipo pode contribuir para o fechamento da ferida, ao preencher uma parte oca da ferida ou o leito de uma ferida, não contribui para a regeneração epitelial, uma vez que este é essencialmente composto de tipos de célula não-epitelial. No caso de análises de feridas (tais como, feridas na pele), as células epiteliais podem ser
15 tipicamente identificadas devido à sua morfologia achatada (oposta a fibroblastos em formato de "fuso", ou células arredondadas da resposta inflamatória).

20 A seqüência aminoácido de TGF- β_3 humano nativo é proporcionada como Seqüência ID No. 1 abaixo:

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

(seqüência ID N° 1)

A técnica anterior contém inúmeras formas variantes de TGF- β_3 que são adequadas para uso nos métodos e medicamentos da invenção. Por exemplo, EP-A-O 684 260 descreve um polipeptídeo que compreende uma forma modificada de TGF- β_3 que possui atividade biológica adequada
25 para uso de acordo com a presente invenção, bem como ácidos nucleicos que codificam o mesmo. As descrições de EP-A-O 684 260 representam polipeptídeos e ácidos nucleicos preferidos para uso de acordo com a presente invenção.

As variantes de TGF- β_3 que podem ser usadas de acordo com a invenção incluem proteínas que contêm substituições de aminoácido conservadas que mantêm a atividade biológica de TGF- β_3 como caracterizado por sua capacidade de promover regeneração epitelial. É preferido que as substituições conservadas possam ser substituições projetadas para remover sítios de clivagem da protease, ou outras estruturas de peptídeo que possam estar envolvidas na degradação ou depuração de TGF- β_3 . Detalhes adicionais de variantes e derivados de TGF- β_3 que podem ser empregados nos medicamentos e métodos da invenção são proporcionados abaixo.

10 As formas variantes adequadas de TGF- β_3 podem ser aquelas onde certos aminoácidos nativos são substituídos por aminoácidos que possuem uma cadeia lateral de propriedades biofísicas similares às do aminoácido que é substituído, para produzir uma alteração conservativa. Por exemplo pequenos aminoácidos não-polares, hidrofóbicos incluem glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina e metionina. Grandes aminoácidos não-polares, hidrofóbicos incluem fenilalanina, triptofano e tirosina. Os aminoácidos neutros polares incluem serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina. Os aminoácidos positivamente carregados (básicos) incluem lisina, arginina e histidina. Os aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico.

20 Outras modificações em seqüências protéicas tais como aquelas que ocorrem durante ou após a tradução, por exemplo, por acetilação, amidação, carboxilação, fosforilação, clivagem proteolítica ou ligação a um ligante podem proporcionar formas variantes adicionais de TGF- β_3 adequadas para uso nos medicamentos e métodos da invenção.

25 Os derivados de TGF- β_3 adequados para uso nos métodos e medicamentos da invenção podem incluir derivados que aumentam ou diminuem a meia-vida de TGF- β_3 *in vivo*. Exemplos de derivados capazes de aumentar a meia-vida de TGF- β_3 incluem derivados de peptídeo de TGF- β_3 , derivados de D-aminoácido de TGF- β_3 , e híbridos peptídeo-peptídeo.

30 Será avaliado que, uma vez que TGF- β_3 e seus fragmentos (bem como muitas das variantes possíveis e derivados destas) são proteínas ou

podem conter componentes de peptidil, estes podem ser submetidos à degradação através de inúmeros meios (tal como atividade da protease em sistemas biológicos). Tal degradação pode limitar a biodisponibilidade dos polipeptídeos e, conseqüentemente a capacidade de os polipeptídeos atingirem sua função biológica. Há grandes faixas de técnicas bem estabelecidas por meio das quais os derivados de peptídeo que tiveram a estabilidade aumentada em contextos biológicos podem ser projetados e produzidos. Tais derivados de peptídeo podem ter a biodisponibilidade aperfeiçoada como um resultado de resistência aumentada à degradação mediada por protease. De preferência, um derivado de peptídeo ou análogo adequado para uso de acordo com a invenção é mais resistente à protease do que o peptídeo a partir do qual este é derivado.

De preferência, TGF- β_3 , suas variantes ou fragmentos, podem ser tornar mais resistentes à protease ao proteger o terminal N e/ou C. Por exemplo, o terminal N pode ser protegido por um grupo acetila. O terminal C pode ser protegido por um grupo amida.

A resistência à protease de um derivado de TGF- β_3 pode ser comparada com a resistência à protease do próprio TGF- β_3 por meio de análises de degradação de proteína bem-conhecidas descritas na técnica anterior.

Os derivados de peptídeo de TGF- β_3 podem ser facilmente projetados a partir do conhecimento da estrutura de TGF- β_3 . O software comercialmente disponível pode ser usado para desenvolver derivados de peptídeo de acordo com protocolos bem estabelecidos.

Os retropeptídeos, (onde todos os aminoácidos são substituídos por resíduos de peptídeo em ordem inversa) também são capazes de imitar as propriedades promotoras de regeneração epitelial de TGF- β_3 . Espera-se que um retropeptídeo seja ligado na direção oposta no sulco de ligação ao ligante, como comparado com um peptídeo ou híbrido peptídeo-peptídeo que contém um resíduo de peptídeo. Como um resultado, as cadeias laterais dos resíduos de peptídeo são capazes de apontar na mesma direção que as cadeias laterais no peptídeo original.

As formas de D-aminoácido de TGF- β_3 constituem uma modalidade adicional de um derivado de TGF- β_3 adequado para uso de acordo com os métodos e medicamentos da invenção. Neste caso, a ordem dos resíduos de aminoácido que compreendem o derivado é invertida como comparado com TGF- β_3 original. A preparação de derivados que utilizam D-aminoácidos em vez de L-aminoácidos reduz bastante qualquer ruptura indesejada de tal agente por meio de processos metabólicos normais, reduzindo as quantidades de agentes que precisam ser administradas, juntamente com a frequência de sua administração.

10 Será avaliado que, para constituir um fragmento biologicamente ativo, variante, ou derivado de TGF- β_3 adequado para uso de acordo com os métodos e medicamentos da invenção, um fragmento, variante, ou derivado deve manter a atividade promotora de regeneração epitelial de TGF- β_3 .

15 TGF- β_3 (ou fragmentos biologicamente ativos, variantes, ou derivados destes) pode ser proporcionado para uso nos métodos ou medicamentos da invenção em uma forma ativa ou inativa. TGF- β_3 pode ser inativado por meio de inúmeros mecanismos, por exemplo, por encapsulação. As cápsulas podem ser degradáveis por um estímulo externo para liberar o agente ativo quando requerido. Os estímulos externos adequados para uso desta maneira incluem luz UV, ultrassom, enzimas *in vivo* ou calor.

20 TGF- β_3 também pode ser proporcionado como um precursor inativo, que pode ser ativado mediante contato com o tecido que contém as enzimas de clivagem natural requeridas para converter o precursor para sua forma ativa. A seqüência de aminoácido de um precursor naturalmente ocorrente de TGF- β_3 humano é proporcionada como Seqüência ID No. 2 abaixo:

MKMHLQRALV	VLALLNFATV	SLSLSTCTTL
DFGHIKKKRV	EAIRGQILSK	LRLTSPPEPT
VMTHVPYQVL	ALYNSTRELL	EEMHGEREEG
CTQENTESEY	YAKEIHKFDM	IQGLAEHNEL
AVCPKGITSK	VFRFNVSSVE	KNRTNLFRAE
FRVLRVPNPS	SKRNEQRIEL	FQILRPDEHI

AKQRYIGGKN	LPTRGTAEWL	SFDVTDTVRE
WLLRRESNLG	LEISIHCPCH	TFQPNGDILE
NIHEVMEIKF	KGVDNEDDHG	RGDLGRLKKQ
KDHHNPHLIL	MMIPPHRLDN	PGQGGQRKKR
ALDTNYCFRN	LEENCCVRPL	YIDFRQDLGW
KWVHEPKGYG	ANFCSGPCPY	LRSADTTHST
VLGLYNTLNP	EASASPCCV	QDLEPLTILY
YVGRTPKVEQ	LSNMVVKSC	CS

(seqüência ID N° 2)

A inativação pode ser, alternativamente atingida pela adição molecular de uma molécula de ligação. A molécula de ligação pode ser separável quando requerida por um estímulo externo tal como luz UV, ultrassom, enzimas *in vivo* ou calor.

- 5 Os peptídeos adequados para uso na produção de TGF- β_3 inativo são bem-conhecidos na técnica, uma vez que TGF- β_3 são geralmente secretados de células em uma forma inativa conhecida como TGF- β_3 latente. O TGF- β_3 latente consiste em um Peptídeo Associado à Latência de N terminal e o TGF- β_3 e também é referido como o Complexo Latente Pequeno.
- 10 Adicionalmente, o Complexo Latente Pequeno pode se ligar a outro peptídeo (derivado de um gene diferente) de tamanho variável que se chama Proteína de Ligação de TGF- β_3 (LTBP) em tal caso todo o complexo é conhecido como o Grande Complexo de TGF- β_3 Latente.

- O TGF- β_3 latente é ativado quando o TGF- β_3 for motivado a ser dissociado do LAP. Esta dissociação pode ser coordenada em um manose-15 6-fosfato/receptor de Fator de Crescimento Tipo Insulina II (M6P-R) e envolve proteases tais como plasmina, sendo que os substratos estão associados na superfície celular por transglutaminase de tecido. Os radicais livres e espécies de oxigênio reativo também podem ativar TGF- β_3 motivando a dissociação do LAP.
- 20

A invenção também abrange o uso de substâncias capazes de promover ou imitar a atividade biológica de TGF- β_3 para a fabricação de um medicamento para promover a regeneração epitelial.

As substâncias capazes de promover ou imitar a atividade bioló-

gica de TGF- β_3 podem atingir seu efeito através de inúmeros meios. Por exemplo, tais substâncias podem aumentar a expressão de TGF- β_3 ou estas podem aumentar a meia-vida de TGF- β_3 , por exemplo reduzindo a renovação de TGF- β_3 . Exemplos de substâncias capazes de promover ou imitar a
5 atividade biológica de TGF- β_3 incluem tanto substâncias proteínicas como não-proteínicas. Por exemplo, tais substâncias capazes de promover ou imitar a atividade biológica de TGF- β_3 incluem fatores de transcrição reguladores de atividade de TGF- β_3 , anticorpos de ativação capazes de imitar a atividade biológica de TGF- β_3 , pequenas moléculas inorgânicas que repli-
10 cam os efeitos de ligação a receptor de TGF- β_3 , bem como substâncias capazes de induzir as cascatas de sinalização intracelular que retêm as características daquelas geradas mediante ligação de receptor de TGF- β_3 .

De preferência, a promoção de regeneração epitelial pode originar uma taxa de regeneração epitelial que é pelo menos 5%, 10%, 20% ou
15 30% maior do que a regeneração que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado. Mais preferivelmente, a regeneração epitelial promovida pode dar origem a uma taxa de regeneração epitelial que é pelo menos 40%, 50% ou 60% maior do que a regeneração que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado. É ainda mais preferido que a regeneração epite-
20 lial promovida possa dar origem a uma taxa de regeneração epitelial que seja pelo menos 70%, 80%, ou 90% maior do que a regeneração que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado, e mais preferivelmente, a regeneração epitelial promovida pode dar origem a uma taxa de regeneração epitelial que é pelo menos 100% maior do que a regeneração que ocorre
25 em um epitélio tratado por controle ou não-tratado.

De preferência, a promoção de regeneração epitelial pode dar origem a um tempo para se reepitelializar 1 dia, 2 dias, ou 3 dias mais rápido do que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado. Mais preferivelmente, a regeneração epitelial promovida pode dar origem a um tempo
30 para se reepitelializar que é pelo menos 4 dias, 5 dias ou 6 dias mais rápido do que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado. É ainda mais preferido que a regeneração epitelial promovida possa dar origem a um

tempo para se reepitelializar que seja pelo menos 7 dias, 8 dias ou 9 dias mais rápido do que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado, e mais preferivelmente, a regeneração epitelial promovida pode dar origem a um tempo para se reepitelializar que é pelo menos 10 dias ou mais do que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado.

Com relação ao tempo para re-colheita de epitélio, por exemplo, de sítios doadores para enxertos de pele de espessura dividida, de preferência, a promoção de regeneração epitelial pode dar origem a um tempo para re-colheita que é 1 dia, 2 dias, ou 3 dias mais rápido do que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado. Mais preferivelmente, a regeneração epitelial promovida pode dar origem a um tempo para re-colheita que é pelo menos 4 dias, 5 dias ou 6 dias mais rápido do que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado. É ainda mais preferido que a regeneração epitelial promovida possa dar origem a um tempo para re-colheita que é pelo menos 7 dias, 8 dias ou 9 dias mais rápido do que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado, e mais preferivelmente, e mais preferivelmente, a regeneração epitelial promovida pode dar origem a um tempo para re-colheita que é pelo menos 10 dias ou mais do que ocorre em um epitélio tratado por controle ou não-tratado.

Os medicamentos de acordo com a invenção podem proporcionar quantidades terapêuticamente eficazes de agentes, de acordo com a invenção, adequadas para promover a regeneração epitelial. Os inventores descobriram que tais medicamentos são capazes de promover regeneração epitelial quando administrados tanto antes do dano epitelial, como uma vez que o ferimento já ocorreu.

O uso profilático de agentes de acordo com a invenção para promover regeneração epitelial é um modo preferido de uso de acordo com a invenção. Será avaliado que tal uso é mais adequado no caso onde o tempo e localização de possível dano epitelial são conhecidos, por exemplo, ferimento ocorrente como um resultado de procedimentos eletivos, porém o pré-tratamento com agentes de acordo com a invenção também é considerado em situações onde há uma probabilidade de surgir dano epitelial. Os

inventores descobriram que a administração de agentes de acordo com a invenção imediatamente antes do dano epitelial (ou seja, na hora, ou de preferência meia hora, antes da ocorrência de ferimento) é altamente eficaz, apesar de a administração em momentos anteriores (por exemplo, até 24 ou
5 48 horas antes do dano epitelial) também ser eficaz. O uso profilático de usos, métodos e medicamentos de acordo com a invenção é uma modalidade preferida da invenção, e é particularmente preferido na preparação de sítios doadores e/ou receptores de enxerto de pele.

Os agentes de acordo com a invenção também são eficazes na
10 promoção de regeneração epitelial quando administrados após ocorrer o dano epitelial. É preferido que tal administração ocorra o quanto antes após a iniciação do ferimento, porém os agentes de acordo com a invenção são capazes de promover regeneração epitelial em qualquer momento até ocorrer a restauração total do epitélio danificado. Será avaliado que a “janela”
15 onde os agentes de acordo com a invenção podem ser administrados de forma eficaz de modo que estes sejam capazes de promover a regeneração epitelial é dependente de inúmeros fatores, inclusive a natureza do epitélio em questão (inclusive a taxa de reparo natural do epitélio), o grau de ferimento que ocorreu, e o tamanho da área danificada. Desta maneira, no caso
20 de uma grande área de dano epitelial, ou no caso de ferimento a um epitélio que é naturalmente mais lento de se regenerar, os agentes de acordo com a invenção ainda podem ser administrados de forma eficaz relativamente atrasados na resposta de regeneração. Os agentes de acordo com a invenção podem ser, por exemplo, de preferência administrados dentro da primeira a
25 24 horas após ocorrer o dano epitelial, porém ainda podem atingir a promoção benéfica de regeneração epitelial se administrados até dez, ou mais dias após a iniciação do ferimento.

A promoção de regeneração epitelial pode ser atingida por administração repetida de agentes de acordo com a invenção em sítios de dano epitelial. Por exemplo, as quantidades terapêuticamente eficazes de
30 agentes de acordo com a invenção podem ser administradas em epitélios danificados como requerido até atingir a regeneração epitelial total. A guisa de

exemplo os agentes de acordo com a invenção podem ser administrados diariamente ou duas vezes ao dia em um sítio de dano epitelial durante pelo menos os primeiros três dias após a ocorrência do dano.

5 Mais preferivelmente, os agentes de acordo com a invenção são administrados tanto antes como depois de incidências de dano epitelial. Os inventores descobriram que a administração de agentes de acordo com a invenção imediatamente antes do dano epitelial, seguida por administração diária de tais agentes durante os três dias após o dano epitelial, é particularmente eficaz na promoção de regeneração epitelial.

10 Será avaliado que a quantidade de um agente de acordo com a invenção que será aplicada em um sítio de dano epitelial depende de inúmeros fatores tais como a atividade biológica e biodisponibilidade do agente, que sucessivamente depende do modo de administração e das propriedades físico-químicas do agente. Outros fatores podem incluir:

- 15
- A) a meia vida do agente no indivíduo que será tratado.
 - B) A condição específica que será tratada.
 - C) A idade do indivíduo.

A freqüência de administração também será influenciada pelos fatores mencionados acima e particularmente a meia-vida do agente selecionado de acordo com a invenção no indivíduo que será tratado.

20

Geralmente quando os indivíduos de acordo com a invenção forem usados para tratar sítios existentes de dano epitelial o agente deveria ser administrado assim que o dano epitelial ocorreu ou foi diagnosticado. A terapia com agentes de acordo com a invenção deveria continuar até o epitélio danificado ser regenerado até a satisfação do médico.

25

A freqüência de administração irá depender da meia-vida biológica do agente usado de acordo com a invenção. Tipicamente, um creme ou pomada que contém um agente de acordo com a invenção deveria ser administrado em um tecido alvo de modo que a concentração do agente no sítio de dano epitelial seja mantida em um nível adequado para obter um efeito terapêutico. Este pode requerer administração diária ou ainda diversas vezes ao dia.

30

As quantidades terapêuticamente eficazes de agentes de acordo com a invenção, por exemplo, na forma de medicamentos de acordo com a invenção, podem ser administradas por qualquer rota adequada capaz de obter o efeito desejado para promover a regeneração epitelial, porém podem ser, de preferência, administradas localmente em sítios de dano epitelial.

Os inventores descobriram que a regeneração epitelial pode ser promovida de forma eficaz através da administração de um agente de acordo com a invenção (particularmente TGF- β_3) na forma de injeções em sítios de dano epitelial. Por exemplo, no caso de dano à epiderme, o agente de acordo com a invenção pode ser administrado por meio de injeção intradérmica. Desta maneira, uma composição preferida da invenção compreende uma solução injetável de um agente de acordo com a invenção (por exemplo, para injeção em torno das margens de um sítio de dano epitelial ou um sítio que provavelmente será danificado). As formulações adequadas para uso nesta modalidade da invenção são consideradas no Apêndice abaixo.

Alternativa ou adicionalmente, um agente de acordo com a invenção também pode ser administrado em uma forma tópica para promover a regeneração epitelial. Tal administração pode ser efetuada como parte do tratamento inicial e/ou acompanhamento da área danificada. Os detalhes de formulações adequadas para administração tópica estão estabelecidos adiante. As formulações tópicas podem ser aplicadas por injeção sobre a superfície da ferida, por pulverização de aerossol e também por aplicação sobre a superfície da ferida sob um curativo oclusivo ou semi-oclusivo, por exemplo, Opsite, Bioclusive, Tegaderm ou similares.

Os inventores descobriram que a promoção de regeneração epitelial de acordo com a presente invenção é particularmente aperfeiçoada por aplicação tópica de um agente de acordo com a invenção a epitélios danificados (ou no caso de aplicação profilática, a epitélios que serão danificados).

É preferido que as composições que contêm agentes de acordo com a invenção sejam formuladas de modo que estas compreendam adicionalmente um açúcar. O açúcar pode ser, de preferência, selecionado do

grupo que compreende maltose, manose, sacarose e glicose. É particularmente preferido que o açúcar seja maltose. O açúcar, tal como maltose, pode estar presente em quantidade suficiente onde a composição é substancialmente isotônica com relação ao sítio onde a composição será administrada.

Os inventores descobriram que o uso de açúcares tal como maltose em formulações proporciona um aperfeiçoamento notável e surpreendente em termos tanto da quantidade de material ativo que pode ser recuperada de frascos que contêm TGF- β_3 (por exemplo, seringas pré-carregadas) como da atividade biológica da molécula de TGF- β_3 . Com relação à recuperação do material de TGF- β_3 , a formulação em maltose resultou em um aumento de 4 dobras em material recuperável (como medido por ELISA) comparada com uma formulação baseada em manitol. Com relação à atividade biológica inerente de TGF- β_3 , a formulação em maltose resultou em um aumento de 4 dobras em atividade (IC_{50} na análise de Mink Lung Epitelial Cell de 7,309 [\pm 1,044] pg/mL) comparada com a formulação de manitol (IC_{50} na análise de Mink Lung Epitelial Cell de 30,104 [\pm 7,093] pg/mL).

O uso de composições onde os agentes de acordo com a invenção são formulados na presença de açúcares, tal como, maltose são particularmente preferidos em contextos onde as composições serão administradas por meio de injeção. Os inventores descobriram surpreendentemente que o uso de açúcares, tal como, maltose em tais formulações proporciona vantagens notáveis em termos de níveis reduzidos de dor experimentada por aqueles que recebem injeções das composições, como comparada com formulações onde outros agentes de tamponamento de tonicidade (tal como manitol) são usados.

De fato, as composições benéficas são as que compreendem agentes ativos de acordo com a invenção e açúcares, tal como, maltose que constituem um aspecto separado da invenção. Conseqüentemente, em um quarto aspecto da invenção proporciona-se uma composição que compreende um agente que possui atividade de TGF- β_3 formulada na presença de um açúcar selecionado do grupo que compreende maltose, manose, sacaro-

se e glicose. É preferido que o açúcar compreenda maltose.

As composições adequadas para uso de acordo com qualquer um dos aspectos anteriores da invenção podem compreender agentes ativos formulados na presença de um açúcar, tal como, maltose em uma concentração entre 0,1 M e 0,4 M do açúcar. Mais preferivelmente, as formulações adequadas podem compreender os agentes ativos formulados na presença de 0,25M de açúcar.

As composições que compreende agentes ativos de acordo com a invenção podem tomar inúmeras formas diferentes dependendo, em particular, da maneira na qual estas serão usadas. Desta maneira, por exemplo, estas podem estar na forma de um líquido, pomada, creme, gel, hidrogel, pó ou aerossol. Todas tais composições são adequadas para aplicação tópica a um epitélio danificado, que é um meio preferido de administrar agentes de acordo com a invenção em um indivíduo (pessoa ou animal) necessitado de tratamento.

Em uma modalidade preferida, as formulações terapêuticas dos agentes da invenção adequadas para administração parenteral localizada (por exemplo, intradérmica e subcutânea) podem ser preparadas ao misturar o agente (que possui o grau desejado de pureza) com transportadores fisiologicamente aceitáveis opcionais, excipientes ou estabilizantes na forma de formulações em pó liofilizados e não-liofilizados para reconstituição, soluções não-aquosas e aquosas, dispersões/suspensões não-aquosas e aquosas inclusive emulsões e formulações semi-sólidas. Os transportadores aceitáveis, inclusive excipientes, são não-tóxicos a receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem, porém sem caráter limitativo, tampões tais como fosfatos, citratos, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes inclusive ácido ascórbico e metionina; modificadores de tonicidade, tais como, cloreto de sódio, glicose, glicerol, e similares; conservantes tais como, cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benazalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butila ou álcool benzílico; alquil parabenos, tais como metila/ou propila e/ou butil parabenos; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3-pentanol; e m-cresol; polipeptídeos de baixo peso mole-

cular (menor que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tal como, polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos inclusive glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes, tal como, EDTA; outros açúcares, tais como, sacarose, manitol, maltose, trealose ou sorbitol; contraíons formadores de sal, tal como, sódio; complexos de metal (por exemplo, complexos de proteína-Zn); tensoativos aniônicos, tais como, sabões de ácido graxo, sulfatos de acila, ou sulfossuccinatos de acila; tensoativos catiônicos, tais como, alquilaminas primárias, secundárias, terciárias, ou quaternárias; tensoativos não-iônicos, por exemplo, ésteres de sorbitano ou ésteres polietoxilados de ácidos de acila, copolímeros de óxido de polietileno e óxido de polipropileno.

Um exemplo de formulação farmacêutica de uma solução estéril para administração parenteral localizada da presente invenção, além dos agentes ativos, podem incluir opcional ou adicionalmente os seguintes:

0,01 M a 0,1 M de tampão fosfato, e
Cloreto de sódio até 0,9% p/v (para atingir a iso-tonicidade com sangue, 290-300 mOsm/L))
1 a 10% p/v % de maltose (embora outro açúcar possa ser usado na alternativa), e
0,1 mg/ml de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween(TM) 80).

Será avaliado pelo versado na técnica que uma massa em pó liofilizada (secada por congelamento) pode ser preparada baseada na solução acima.

As modalidades preferidas da invenção podem ser apresentadas na forma de um frasco, uma ampola, ou uma seringa pré-carregada tanto com; uma solução estéril; um pó liofilizado estéril (seco por congelamento) adequado para reconstituição; uma suspensão estéril ou qualquer outra forma farmacêuticamente aceitável de apresentação adequada para entrega de fármaco parenteral localizada.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, formulações terapêuticas dos agentes da invenção adequadas para administração tópica podem ser preparadas ao misturar a substância que possui o grau desejado de pureza com transportadores, excipientes ou estabilizantes fisiologicamente aceitáveis opcionais na forma de formulações em pó liofilizadas ou não-liofilizadas, soluções não-aquosas ou aquosas, dispersões/suspensões não-aquosas ou aquosas, inclusive emulsões e formulações semi-sólidas. Os transportadores aceitáveis, inclusive excipientes, são não-tóxicos a receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem, porém sem caráter limitativo, água purificada, salina, salina tamponada com fosfato (PBS), solução de Ringer, solução de lactato de Ringer, soluções de dextrose, solução de dextrose/salina, soluções hidroalcoólicas, glicose, sacarose, dextrano, manose, manitol, maltose, sorbitol, polietileno glicol (PEG), propileno glicol (PG), fosfatos, acetatos, gelatina, colágenos, Carbopol 934[®] (BF Goodrich Corp.), óleos vegetais e sintéticos e ceras, tensoativos aniônicos, tais como, sabões de ácido graxo, sulfatos de acila, ou sulfosuccinatos de acila; tensoativos catiônicos, tais como, alquilaminas primárias, secundárias, terciárias ou quaternárias; tensoativos não-iônicos, por exemplo, ésteres de sorbitano ou ésteres polietoxilados de ácidos de acila, copolímeros de óxido de polietileno e óxido de polipropileno, e similares. Uma pessoa pode incluir adicionalmente agentes conservantes, estabilizantes, antioxidantes, antimicrobianos e de tamponamento adequados, por exemplo, metila e/ou propila e/ou butilparabenos, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), ácido cítrico, ácido ascórbico e, similares. As bases de emulsão, creme ou pomada úteis na formulação pode incluir cremes e emulsões de base aquosa (óleo-em-água), cremes e emulsões à base de óleo (água-em-óleo), pomadas (hidrocarboneto emulsificante e não-emulsificante), géis, hidrogéis, e similares. Outras formulações para entrega tópica podem incluir aerossóis, bandagens, e outros curativos para ferida. Alternativamente, uma pessoa pode incorporar ou encapsular o composto terapêutico da invenção em uma matriz ou membrana polimérica adequada, proporcionando, desta maneira, um dispositivo de entrega de liberação cons-

tante adequado para posicionamento, ou implantação próximo ao local que será tratado.

Um exemplo de formulação farmacêutica de uma formulação de hidrogel semi-sólido para administração tópica da presente invenção, além do(s) ingrediente(s) ativo(s), pode incluir os seguintes:

- 0,1% p/v a 2,0% p/v de hidroxixelulose, e
- 0,1% p/v a 1,0% p/v de Carbopol 934[®] (BF Goodrich Corp.), e
- 10 a 20% p/v de propileno glicol, e
- 0,005% p/v a 0,020% p/v de metilparabeno, e 0,005% p/v a
- 10 0,020% p/v de propilparabeno, e
- Hidróxido de sódio ou ácido clorídrico q.s. ad pH 4 – 10
- Água purificada, q.s. ad 100% p/v

As composições adequadas para aplicação tópica de acordo com a invenção (inclusive aquelas composições onde os agentes ativos de acordo com a invenção são formulados na presença de maltose) podem ser apresentadas na forma de uma garrafa, a jarra, um tubo, um pulverizador, tanto de; uma solução estéril; um pó estéril liofilizado (seco por congelamento) ou não-liofilizado para reconstituição, uma dispersão/suspensão estéril, um semi-sólido estéril, ou qualquer outra forma farmacêuticamente aceitável de apresentação adequada para entrega de tópica de fármaco.

Os agentes de acordo com a invenção podem ser proporcionados sobre um curativo ou adesivo estéril, que podem ser usados para cobrir um sítio de dano epitelial que será tratado.

Será avaliado que o veículo da composição que compreende agentes de acordo com a invenção deve ser um que seja bem tolerado pelo paciente e permita a liberação do agente no sítio de dano epitelial. Tal veículo é, de preferência biocompatível, biodegradável, biorreabsorvível e/ou não-inflamatório.

As composições que compreendem agentes de acordo com a invenção podem ser usadas de numerosas maneiras. Desta maneira, por exemplo, uma composição pode ser aplicada em e/ou em torno de um sítio de dano epitelial para regular a regeneração epitelial. Se a composição for

aplicada em um sítio “existente” de dano epitelial, então o veículo farmacêuticamente aceitável será um que é relativamente “suave”, ou seja, um veículo que é biocompatível, biodegradável, biorreabsorvível e não-inflamatório.

Um agente de acordo com a invenção, ou um ácido nucléico que codifica tal agente, pode ser incorporado dentro de um dispositivo de liberação lenta ou atrasada. Tais dispositivos podem ser, por exemplo, colocados ou inseridos sob a pele e o agente ou ácido nucléico pode ser liberado durante dias, semanas ou ainda meses. Tal dispositivo pode ser particularmente útil para pacientes que requerem promoção em longo prazo de regeneração epitelial. Os dispositivos podem ser particularmente vantajosos quando usados para a administração de um agente ou ácido nucléico que poderia requerer normalmente administração freqüente (por exemplo, pelo menos administração diária por outras rotas).

As doses diárias de um agente de acordo com a invenção podem ser dadas como uma única administração (por exemplo, uma aplicação diária de uma formulação tópica ou uma injeção diária). Alternativamente, o agente de acordo com a invenção pode requerer administração duas vezes ou mais vezes durante um dia. Em uma modalidade alternativa, um dispositivo de liberação lenta pode ser usado para proporcionar doses ótimas de um agente de acordo com a invenção em um paciente sem a necessidade de administrar doses repetidas.

Em uma modalidade, um veículo farmacêutico para administração de um agente de acordo com a invenção pode ser um líquido e uma composição farmacêutica adequada poderia estar na forma de uma solução. Em outra modalidade, o veículo farmacêuticamente aceitável é um sólido e uma composição adequada está na forma de um pó ou comprimido. Em uma modalidade adicional, o agente de acordo com a invenção pode ser formulado como uma parte de um adesivo transdérmico farmacêuticamente aceitável.

Um veículo sólido pode incluir uma ou mais substâncias que também podem atuar como agentes aromatizantes, lubrificantes, solubilizantes, agentes de suspensão, cargas, fluidificantes, auxiliares de compressão,

aglutinantes ou agentes desintegrantes de comprimido; este também pode ser um material de encapsulamento. Em pós, o veículo é um sólido finamente dividido que é misturado com o agente finamente dividido de acordo com a invenção. Em comprimidos, o agente de acordo com a invenção é misturado com um veículo que possui as propriedades de compressão necessárias em proporções adequadas e compactado no formato e tamanho desejado. Os pós e comprimidos contêm, de preferência, até 99% do agente de acordo com a invenção. Os veículos sólidos adequados incluem, por exemplo, fosfato de cálcio, estearato de magnésio, talco, açúcares, lactose, dextrina, amido, gelatina, celulose, polivinilpirrolidina, ceras de baixa fusão e resinas de troca iônica.

Os veículos líquidos podem ser usados para preparar soluções, suspensões, emulsões, xaropes, elixires e composições pressurizadas. O agente de acordo com a invenção pode ser dissolvido ou suspenso em um veículo líquido farmacologicamente aceitável tal como água, um solvente orgânico, uma mistura tanto de óleos como gorduras farmacologicamente aceitáveis. O veículo líquido pode conter outros aditivos farmacêuticos adequados tais como, solubilizantes, emulsificantes, tampões, conservantes, adoçantes, agentes aromatizantes, agentes de suspensão, agentes espessantes, corantes, reguladores de viscosidade, estabilizantes ou osmorreguladores. Exemplos adequados de veículos líquidos para administração oral e parenteral incluem água (que contém parcialmente aditivos como acima, por exemplo, derivados de celulose, de preferência, solução de celulose de carboximetil de sódio), álcoois (inclusive álcoois monoídricos e álcoois poliídricos, por exemplo, glicóis) e seus derivados, e óleos (por exemplo, óleo de coco fracionado e óleo de amendoim). Para administração parenteral, o veículo também pode ser um éster oleoso tal como oleato de etila e miristato de isopropila. Os veículos líquidos estéreis são úteis em composições em forma líquida estéril para administração parenteral. O veículo líquido para composições pressurizadas pode ser um hidrocarboneto halogenado ou outro propelente farmacologicamente aceitável.

As composições farmacêuticas líquidas são soluções estéreis ou

suspensões que podem ser utilizadas, por exemplo, por injeção intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intradérmica ou subcutânea. As soluções estéreis também podem ser administradas de forma intravenosa e tópica por pulverização de aerossol ou aplicação sob um curativo oclusivo ou semi-oclusivo. O agente de acordo com a invenção pode ser preparado como uma composição sólida estéril, por exemplo, por secagem por congelamento ou liofilização que pode ser dissolvida ou suspensa no momento da administração utilizando água estéril, salina, ou outro meio injetável estéril apropriado. Os veículos são projetados para incluir aglutinantes inertes, agentes de suspensão, lubrificantes, aromatizantes, adoçantes, conservantes, corantes e coberturas.

Na situação onde se deseja administrar um agente de acordo com a invenção por meio de ingestão oral, será avaliado que o agente selecionado será, de preferência, um agente que possui um grau elevado de resistência à degradação. Por exemplo, o agente de acordo com a invenção não pode ser, de preferência, um peptídeo, ou pode não possuir componentes peptídicos.

As composições de agentes de acordo com a invenção são adequadas para serem usadas para reduzir ou controlar dano ao epitélio corneano (células situadas sobre as células estromais da córnea). Tal dano pode resultar de trauma no olho que surge como um resultado de lesão acidental (como considerado acima) ou como um resultado de operações cirúrgicas (por exemplo, cirurgia a laser sobre a córnea). Neste caso a composição ou medicamento de acordo com a invenção pode estar na forma de um colírio. Embora as composições possam ser usadas na córnea, os inventores acreditam que os métodos da invenção podem ser usados, de preferência, em tecidos, tal como, a pele ou escalpo, sem células estromais.

Os agentes de acordo com a invenção podem ser usados em uma faixa de sítios "internos" de dano epitelial (ou seja, aqueles sítios de dano epitelial ocorrente dentro do corpo, em vez de uma superfície externa). Desta maneira, por exemplo, os medicamentos que compreendem agentes de acordo com a invenção podem ser formulados para inalação para uso em

sítios de dano epitelial que surge nos pulmões ou outros epitélios respiratórios.

Os procedimentos conhecidos, tais como aqueles convencionalmente empregados pela indústria farmacêutica (por exemplo, experimentação *in vivo*, exames clínicos, etc.), podem ser usados para estabelecer formulações específicas de composições que compreendem agentes de acordo com a invenção e regimes terapêuticos precisos para administração de tais composições (tais como, doses diárias do agente ativo e a frequência de administração).

10 Geralmente, as composições que compreendem agentes de acordo com a invenção deveriam ser formuladas de modo que quando administradas em um sítio de dano epitelial uma concentração de um agente entre 0,01 nM e 10 mM por cm² ou cm linear seja atingida no sítio. De preferência, as composições que compreendem agentes de acordo com a invenção deveriam ser formuladas de modo que quando administradas em um sítio de dano epitelial uma concentração do agente entre 0,1 nM e 1 mM por cm² ou cm linear seja atingida no sítio. Mais preferivelmente, as composições que compreende agentes de acordo com a invenção deveriam ser formuladas de modo que quando administradas em um sítio de dano epitelial uma concentração do agente entre 0,1 nM e 400 μM por cm² ou cm linear seja atingida no sítio.

25 Simplesmente a guisa de exemplo uma solução injetável que contém entre 50ng/100μl e 500ng/100μl de um agente de acordo com a invenção (tal como TGF-β₃) é adequada para aplicação em um sítio de dano epidérmico de espessura parcial.

30 Uma dose diária adequada de um agente de acordo com a invenção capaz de promover regeneração epitelial depende dos fatores discutidos acima bem como do tamanho do sítio de dano epitelial que será tratado. Tipicamente a quantidade de um agente de acordo com a invenção requerida para o tratamento de sítio de dano epitelial estará dentro da faixa de 0,01nM a 10mM do agente por cm² ou cm linear por 24 horas, dependendo da área do sítio de dano epitelial entre diversos outros fatores.

Os agentes de acordo com a invenção podem ser usados para promover regeneração epitelial como uma monoterapia (ou seja, uso do agente separadamente). Alternativamente os usos, métodos ou medicamentos da invenção podem ser usados em combinação com outros compostos ou tratamentos capazes de promover regeneração epitelial. Por exemplo, os usos, métodos ou medicamentos da invenção podem ser usados em combinação com curativos (que podem incluir gazes, membranas de compósito sintético e/ou películas transparentes, sendo que qualquer um destes pode ser opcionalmente impregnado com agentes anti-infectivos, alginatos, hidrocolóides ou mel), pele artificial (tal como pele artificial gerada da própria epiderme de um indivíduo, ou equivalentes comercialmente disponíveis) ou pomadas (tais como aquelas que compreendem compostos antiinfectivos a base de prata). Dois exemplos de peles comercialmente disponíveis adequadas para uso em combinação com os métodos, usos ou medicamentos da invenção estão disponíveis sob os nomes Apligraf (Graftskin) e Derma-graft.

Os usos, métodos ou medicamentos da invenção também são adequados para uso em combinação com outras terapias convencionais ou do desenvolvimento. Os seguintes parágrafos contemplam exemplos de tais terapias, e fazem referência às indicações onde o uso de terapias de combinação pode ser preferido.

Quando se promove regeneração epitelial no contexto de cura de ferida (e particularmente a cura de queimaduras e úlceras de pele) pode ser preferido combinar os usos, métodos ou medicamentos da invenção com agentes de desbridamento. Exemplos adequados de tais agentes podem incluir agentes enzimáticos tais como colagenase (Smith & Nephew), agentes químicos, agentes cirúrgicos/mecânicos ou agentes biológicos, por exemplo, larvoterapia.

Alternativa ou adicionalmente, quando se promove regeneração epitelial em cura de feridas pode ser preferido combinar os usos, métodos ou medicamentos da invenção com peptídeos líticos tais como, citoporinas. Estes peptídeos podem se incorporar em membranas celulares biológicas cau-

sando, desse modo, a lise das células. Um exemplo de uma citoporina adequada para uso em terapia de combinação é HB-107 (produzida por Helix BioMedix, Inc.).

5 A regeneração epitelial em cura de feridas (particularmente de diabéticos), epidermólise bolhosa e doenças oculares (inclusive cura de ferida corneana) pode ser promovida pelo uso de timosina beta-4 em combinação com usos, métodos e medicamentos da invenção. Uma forma recombinante de timosina beta-4 adequada para tal uso é produzida por RegeneRx Biopharmaceuticals Inc.

10 Outro agente adequado para uso em terapia de combinação com os usos, métodos ou medicamentos da invenção para a promoção de regeneração epitelial associada com cura de feridas e distúrbios da pele tais como úlceras é Pimilprost. Este composto é um análogo estável de Prostaglandina II, e possui atividade biológica tanto como um inibidor de agregação
15 de plaquetas como um vasodilatador. Pimilprost adequado para uso em combinação com os usos, métodos e medicamentos reivindicados pode ser obtido junto a Sumitomo Pharmaceuticals Co. Ltd.

A regeneração epitelial na cavidade oral, por exemplo, no tratamento de feridas ou úlceras na boca, pode ser promovida pela combinação
20 de usos, métodos e medicamentos da invenção com inibidores de degranulação de mastócitos tal como amlexanox (comercialmente disponível junto a Access Pharmaceuticals, Inc.).

A regeneração de epitélios danificados em cura de feridas ou como um resultado de complicações diabéticas também pode ser promovida
25 pela combinação de usos, métodos e medicamentos de acordo com a presente invenção com proteína-70 (HSP-70) de choque térmico ou indutores de proteína de choque térmico, Bimoclomal, produzida por Biorex Research and Development Co., representa um exemplo preferido de um indutor de HSP adequado em tal terapia de combinação.

30 Para promover a regeneração epitelial em tecidos, tal como, a mucosa do estômago (por exemplo, no caso de reepitelialização para promover a cura de úlceras do estômago), a epiderme, e epitélio corneano pode

ser preferido combinar os usos, métodos e medicamentos da presente invenção com análogos de melanostatina capazes de acelerar a regeneração do tecido. Um exemplo de um análogo adequado deste tipo é Alaptid, que está comercialmente disponível junto a VUFB.

5 Outro agente que pode ser vantajosamente usado em combinação com os usos, métodos e medicamentos da invenção é a enzima heparinase III. Tais combinações podem ser preferivelmente usadas para promover a regeneração epitelial associada com cura de feridas e o tratamento de úlceras externas (particularmente úlceras diabéticas). Uma forma adequada
10 de heparinase III para uso em tais combinações é produzida por IBEX Technologies, Inc. sob a designação IBT-9302.

Os usos, métodos e medicamentos da invenção podem ser adicional ou alternativamente usados em combinação com o pipetidomimético da trombina sintético Chrysalin produzido por Chrysalis BioTechnology, Inc.
15 Tais combinações podem ser preferidas para a promoção de regeneração epitelial associada com cura de feridas e úlceras diabéticas, particularmente úlceras do pé diabético.

A promoção de regeneração epitelial em sítios de dano por queimadura pode ser efetuada pelos usos, métodos ou medicamentos da
20 invenção em combinação com PV-707, fabricado por GroPep Ltd. PV-707 é um agonista do fator de crescimento de peptídeo.

A promoção de regeneração epitelial em feridas, e particularmente queimaduras, pode ser promovida pelo uso de sulfato de deidroepiandrosterona sintética (DHEAS) em combinação com os usos, métodos e
25 medicamentos da invenção. Uma forma de DHEAS sintética adequada para tal uso é fabricada por Pharmadigm Inc. sob o nome PB-005.

A regeneração epitelial no tratamento de doença dermatológica e cura de feridas pode ser promovida pelos usos, métodos ou medicamentos da invenção em combinação com lactoferrina recombinante. Uma forma adequada de lactoferrina recombinante humana é fabricada por Agennix Inc.
30

Outra terapia de combinação adequada para a promoção de regeneração epitelial associada com a resposta de cura de feridas consiste na

combinação dos usos, métodos ou medicamentos da invenção com o fornecimento de desoxirribonucleosídeos livres. Uma fonte adequada de tais desoxirribonucleosídeos é fornecida por PN-105, que compreende uma mistura de equponderação destas moléculas em uma base de gel e é fabricada por
5 Wellstat Therapeutics Corp.

Há uma faixa de métodos e composições projetada para aperfeiçoar ou aumentar a regeneração epitelial que utiliza fatores de crescimento em vez de TGF- β_3 . Será avaliado que os usos, métodos ou medicamentos da invenção também podem ser usados em combinação com estes tratamentos existentes. Os seguintes parágrafos proporcionam uma orientação
10 adicional de como a presente invenção pode ser usada em combinação com outros tratamentos baseados em fator de crescimento. Os usos, métodos e medicamentos da invenção podem ser usados em combinação com elementos da família de fator de crescimento de fibroblasto (FGF). Por exemplo, a presente invenção pode ser usada em combinação com FGF (FGF-2) básico. Esta combinação dos usos, métodos ou medicamentos da invenção com FGF-2 pode ser particularmente preferida na promoção de regeneração epitelial após dano de ferida. Exemplos de sítios de ferida que podem tirar proveito de tal combinação incluem queimaduras, sítios doadores de enxerto, e
15 feridas crônicas, tais como, úlceras (inclusive úlceras que não cicatrizam, tais como, úlceras diabéticas ou decúbitos). O FGF-2 pode ser, preferênciamente, FGF-2 (rFGF-2) recombinante e mais preferivelmente, FGF-2 (rhFGF-2) humano recombinante. Um exemplo adequado de rFGF-2 adequado para uso de acordo com esta modalidade da invenção é aquele produzido por Scios
20 Inc. ou Chiron.

Outro elemento da família de fator de crescimento de fibroblasto que pode ser usado em combinação com os usos, métodos e medicamentos da invenção para promover a regeneração epitelial é FGF-10 (também conhecido como fator-2 de crescimento de queratinócito ou KGF-2) para promover a regeneração de epitélios danificados como um resultado de feridas, complicações do processo de cura dérmica (tais como, úlceras de pele), doenças, tais como, mucosite oral ou colite ulcerativo, ou dano epitelial gastro-
30

intestinal tal como aquele que ocorre em doença de Crohn. Uma forma adequada de FGF-10 adequado para uso em combinação com os usos, métodos ou medicamentos da invenção é produzida por Human Genome Sciences, Inc. sob o nome Repifermin.

5 Os usos, métodos e medicamentos da invenção também podem ser usados em combinação com elementos da família do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF). Por exemplo, a combinação dos usos, métodos ou medicamentos da invenção com PDGF-B pode ser de uso na promoção de regeneração epitelial em cura de feridas, e particularmente a cura
10 de feridas por queimadura ou úlceras do pé diabético. Em uma modalidade preferida de tais combinações o PDGF-B que será usado pode ser, de preferência, entregue por meio de um vetor adenoviral. Selective Genetics, Inc. produz um exemplo adequado de tal vetor adenoviral sob o nome AdPDGF-B/GAM.

15 Outra combinação adequada utiliza os usos, métodos ou medicamentos da invenção em combinação com PDGF-BB. Um exemplo de PDGF-BB que pode ser usado em tal combinação está comercialmente disponível sob o nome Regranex.

A combinação dos usos, métodos ou medicamentos da invenção
20 com inibidores de citocina também pode ser usada para promover a regeneração epitelial. Tais combinações podem ser usadas, por exemplo, na promoção de regeneração epitelial em resposta à lesão, ou para tratar dano epitelial ocorrente como um resultado de doenças, tal como, doença do intestino irritável (IBD) ou doença de Crohn. Um exemplo adequado de tal inibidor é Semapimod (CNI- 1493) um inibidor de MPK guanilidrazona sintético
25 produzido por Picower Institute para Pesquisa Médica.

Os agentes de acordo com a invenção podem ser alternativa ou adicionalmente proporcionados em combinação com compostos capazes de inibir a atividade da protease. Os inibidores da protease podem ser selecionados na base de um amplo espectro de atividade inibidora, ou para a capacidade de inibir seletivamente proteases (ou famílias de protease) presentes
30 em sítios de dano epitelial. As proteases que serão inibidas podem incluir

elastase de neutrófilo, metaloproteinases da matriz, ativadores de plasminogênio (por exemplo, ativador de plasminogênio uroquinase ou ativador de plasminogênio de tecido), plasmina, catepsinas, furina, e elementos da família “uma desintegrina e uma metaloproteinase” tal como ADAM ou ADAM-5 TS. Os inibidores da protease adequados podem incluir peptídeo, proteína, ou inibidores de molécula pequena.

Será avaliado que TGF- β^3 , seus fragmentos, derivados e variantes, bem como agentes capazes de aumentar a atividade biológica de TGF- β^3 podem representar agentes favoráveis que serão administrados por técnicas que envolvem expressão celular de seqüências de ácido nucléico que codificam tais moléculas. Tais métodos de expressão celular são particularmente adequados para uso médico com os efeitos terapêuticos dos polipeptídeos, derivados e análogos são requeridos durante um período prolongado, por exemplo, em contextos onde se deseja aumentar, durante um período de tempo, uma resposta de outra forma imperfeita.

Muitos métodos conhecidos de administrar agentes de acordo com a invenção em um tecido epitelial danificado relativo possuem a desvantagem que pode ser difícil de atingir níveis constantes do agente no sítio de dano epitelial durante poucos dias, pois muitos agentes adequados podem possuir meias-vidas curtas *in vivo*. As meias-vidas dos agentes podem ser curtas devido a numerosas razões que incluem:

- (i) Degradação por proteases e similares.
- (ii) Depuração por proteínas de ligação.
- (iii) Ligação e inibição de atividade de agente por moléculas de matriz extracelular, tais como, decorina e fibronectina.

Ademais, os agentes usados para tratar sítios de cura de dano epitelial precisam ser administrados em um veículo adequado e são geralmente proporcionados como uma composição que compreende o agente ativo e o veículo. Como discutido adicionalmente abaixo, tais veículos são, de preferência, não-inflamatórios, biocompatíveis, biorreabsorvíveis e não devem degradar ou inativar o agente (em armazenamento ou em uso). Entretanto, pode ser geralmente difícil proporcionar um veículo satisfatório para

entrega de agentes em um tecido que será tratado.

Uma maneira conveniente em que estes problemas podem ser prevenidos ou mitigados é proporcionar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de acordo com a invenção em um sítio de dano epitelial por meio de terapia genética.

De acordo com um quinto aspecto da presente invenção proporciona-se um sistema de entrega para uso em uma técnica de terapia genética, sendo que o sistema de entrega compreende uma molécula de DNA que codifica um agente de acordo com a invenção, sendo que a dita molécula de DNA é capaz de ser transcrita para resultar na expressão do agente selecionado.

De acordo com um sexto aspecto da presente invenção proporciona-se o uso de um sistema de entrega conforme definido no parágrafo anterior para uso na fabricação de um medicamento para uso na promoção de regeneração epitelial.

De acordo com um sétimo aspecto da presente invenção proporciona-se um método para promover a regeneração epitelial, sendo que o método compreende administrar em um paciente, necessitado de tratamento, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sistema de entrega conforme definido no quinto aspecto da invenção.

Devido à degeneração do código genético, é claro que as seqüências de ácido nucléico que codificam agentes adequados para uso de acordo com a invenção podem ser variadas ou alteradas sem afetar substancialmente a seqüência do produto codificado pelas mesmas, para proporcionar uma variante funcional destas. Conforme observado acima, um agente adequado para uso de acordo com a invenção deve manter a atividade de promoção de epitelial de TGF- β_3 .

As variantes codificadoras de nucleotídeos de TGF- β_3 incluem aquelas que possuem uma seqüência alterada pela substituição de códons diferentes que codificam o mesmo aminoácido dentro da seqüência, desta maneira, produzindo uma alteração silenciosa. Outras variantes adequadas são aquelas que possuem seqüências de nucleotídeo homólogas, porém

que compreende todas, ou partes de, seqüências que são alteradas pela substituição de códons diferentes que codificam um aminoácido com uma cadeia lateral de propriedades biofísicas similares ao aminoácido que estas substituem, para produzir uma alteração conservadora. Por exemplo, pe-
5 quenos aminoácidos hidrofóbicos não-polares incluem glicina, alanina, leuci-
na, isoleucina, valina, prolina e metionina. Grandes aminoácidos hidrofóbicos
não-polares incluem fenilalanina, triptofano e tirosina. Os aminoácidos neu-
tros polares incluem serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina. Os
10 aminoácidos positivamente carregados (básicos) incluem lisina, arginina e
histidina. Os aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem áci-
do aspártico e ácido glutâmico.

Os sistemas de entrega de acordo com a invenção são altamen-
te adequados para atingir níveis constantes de um agente de acordo com a
invenção em um sítio de dano epitelial durante um período mais longo de
15 tempo do que é possível com a maioria dos sistemas de entrega convencio-
nais. Os agentes de acordo com a invenção adequados para promover a
regeneração epitelial podem ser continuamente expressos de células no sítio
de dano epitelial que foi transformado com a molécula de DNA descrita no
quinto aspecto da invenção. Portanto, mesmo que o agente de acordo com a
20 invenção possua uma meia-vida muito curta *in vivo*, a quantidade terapeti-
camente eficaz do agente pode ser continuamente expressa a partir do teci-
do tratado.

Ademais, o sistema de entrega da invenção pode ser usado para
proporcionar a molécula de DNA (e dessa forma, o agente de acordo com a
25 invenção) sem a necessidade de utilizar veículos farmacêuticos, tais como,
aqueles requeridos em pomadas ou cremes que são colocados em contato
com o sítio de dano epitelial.

O sistema de entrega da presente invenção é tal que a molécula
de DNA é capaz de ser expressa (quando o sistema de entrega for adminis-
30 trado em um paciente) para produzir um agente de acordo com a invenção
que direta ou indiretamente possui atividade para promover a regeneração
epitelial. Por "diretamente" entende-se que o produto de expressão genética

per se possui a atividade requerida para promover a regeneração epitelial. Por "indiretamente" entende-se que o produto de expressão genética se submete a ou media (por exemplo, como uma enzima) pelo menos uma reação adicional para proporcionar um agente ativo eficaz para promover a regeneração epitelial.

5 A molécula de DNA pode estar contida dentro de um vetor adequado para formar um vetor recombinante. O vetor pode ser, por exemplo, um plasmídeo, cosmídeo ou fago. Tais vetores recombinantes são altamente úteis nos sistemas de entrega da invenção para transformar células em uma molécula de DNA.

10 Os vetores recombinantes também podem incluir outros elementos funcionais. Por exemplo, os vetores recombinantes podem ser projetados de modo que o vetor irá se replicar de forma independente no núcleo da célula. Neste caso, os elementos que induzem a replicação de DNA podem ser requeridos no vetor recombinante. Alternativamente, o vetor recombinante pode ser projetado de modo que o vetor e molécula de DNA recombinante se integre no genoma de uma célula. Neste caso, as seqüências de DNA que auxiliam a integração almejada (por exemplo, por recombinação homóloga) são desejadas. Os vetores recombinantes também podem possuir DNA que codifica genes que podem ser usados como marcadores selecionáveis no processo de clonagem.

20 O vetor recombinante também pode compreender adicionalmente um promotor ou regulador para controlar a expressão do gene, como requerido.

25 A molécula de DNA pode (porém, não necessariamente) ser uma que se incorpora no DNA de células do indivíduo que será tratado. As células não-diferenciadas podem ser transformadas de forma estável resultando na produção de células-filhas geneticamente modificadas. Quando este for o caso, a regulação da expressão no indivíduo pode ser requerida, por exemplo, com fatores de transcrição específicos, ativadores genéticos ou mais preferivelmente com promotores induzíveis que transcrevem o gene em resposta a um sinal especificamente encontrado em um sítio de dano epiteli-

al. Alternativamente, o sistema de entrega pode ser projetado para auxiliar a transformação instável ou transitória de células diferenciadas no indivíduo que será tratado. Neste caso, a regulação de expressão pode ser menos importante, pois a expressão da molécula de DNA irá parar quando as células transformadas morrerem ou pararem de expressar a proteína (idealmente quando o sítio de dano epitelial for regenerado de forma eficaz).

O sistema de entrega pode fornecer a molécula de DNA a um indivíduo sem que esta seja incorporada em um vetor. Por exemplo, a molécula de DNA pode ser incorporada dentro de um lipossoma ou partícula de vírus. Alternativamente, a molécula de "nua" pode ser inserida na célula de um indivíduo através de um meio adequado, por exemplo, absorção endocitótica direta.

A molécula de DNA pode ser transferida para as células de um indivíduo que será tratado por transfecção, infecção, microinjeção, fusão celular, fusão de protoplasto ou bombardeio balístico. Por exemplo, a transferência pode ser por transfecção balística com partículas de ouro cobertas, lipossomas que contêm a molécula de DNA, vetores virais (por exemplo, adenovírus) e meio para proporcionar absorção de DNA direta (por exemplo, endocitose) por aplicação de DNA do plasmídeo diretamente em um sítio de dano epitelial de forma tópica ou por injeção.

O agente de acordo com a invenção expresso a partir da molécula de DNA pode ser um que regula direta ou indiretamente a expressão e/ou atividade de TGF- β_3 , promovendo desta forma a regeneração epitelial.

Os métodos da invenção podem ser colocados em prática ao induzir a expressão celular aumentada de um agente de acordo com a invenção, podendo então promover a regeneração epitelial. Tal expressão terapêutica de um agente de acordo com a invenção pode ser obtida ao aumentar a expressão naturalmente ocorrente do agente (por exemplo, a expressão natural de um agente naturalmente ocorrente tal como TGF- β_3 , ou ao induzir expressão não-natural do agente (por exemplo, indução de TGF- β_3 por células que não expressam TGF- β_3) ou induzir a superexpressão do agente.

A expressão celular do agente de acordo com a invenção, seja expressão natural ou não-natural, pode ser por células epiteliais, que podem ser células epiteliais existentes ao redor da área danificada, ou podem ser alternativamente células epiteliais terapêuticamente introduzidas na área danificada (por exemplo, as células epiteliais endógenas e exógenas cultivadas). Alternativamente, a expressão celular do agente de acordo com a invenção pode ser efetuada pela expressão do agente por células em proximidade ou contato com o epitélio cuja regeneração será promovida. Por exemplo, no caso onde se deseja promover a regeneração o agente de acordo com a invenção pode ser expresso por células localizadas na derme subjacente que envolve o epitélio danificado.

Será avaliado que as células que serão introduzidas de forma terapêutica para promover a regeneração epitelial podem ser manipuladas *ex vivo* tais como aquelas que expressam níveis aumentados de um agente de acordo com a invenção, e então introduzidas na área danificada. Conforme descrito acima, tais células podem ser por si só células epiteliais, ou podem ser células que estão situadas suficientemente próximas ao epitélio danificado onde o agente expresso pelas células é capaz de promover a regeneração epitelial desejada. As células podem ser, de preferência, células cultivadas *ex vivo* para uso na preparação ou fabricação de pele artificial ou substitutos de pele. As células podem ser, mais preferivelmente, células autólogas, embora será avaliado que qualquer células pode ser usada.

Conseqüentemente, em um oitava aspecto da invenção, proporciona-se um medicamento que compreende qualquer tipo celular relativo (por exemplo, epitelial, macrófago, monócito, fibroblasto, células-tronco ou endoteliais) induzido para expressar um agente de acordo com a presente invenção.

A indução de expressão celular de um agente de acordo com a invenção pode ser efetuada por meio de sinais externos que influenciam as células, ou por meio da incorporação nas células de ácido nucléico causando a expressão do agente de acordo com os quarto a seis aspectos da invenção.

A presente invenção será adicionalmente descrita nos seguintes Exemplos não-limitativos 1 e 2. O Exemplo 1 ilustra a promoção de regeneração epitelial por TGF- β_3 de feridas de pele humana de espessura total, enquanto o Exemplo 2 mostra que TGF- β_3 é capaz de promover regeneração epitelial em feridas de pele humana de espessura parcial.

Os Exemplos se refere às figuras em anexo, nos quais:

A figura 1, ilustra:

i) fotografias, tiradas nos pontos de tempo três e sete dias após sofrer o ferimento, ilustrando a aparência macroscópica das feridas humanas de espessura total durante a regeneração epitelial; e

ii) macrófagos dos mesmos pontos de tempo que ilustram a histologia dos sítios danificados durante a regeneração epitelial.

A figura 1 mostra exemplos de imagens macroscópicas e histológicas de feridas tratadas com 50ng/100 μ L de TGF β_3 , Placebo ou tratamento padrão. Os resultados são mostrados em 3 e 7 dias após sofrer o ferimento.

Especificamente, os painéis A e B mostram respectivamente aparência macroscópica e microscópica de feridas tratadas com TGF- β_3 três dias após sofrer o ferimento. A análise da imagem histológica revela 54% de reepitelialização.

Os painéis C e D mostram, respectivamente, a aparência macroscópica e microscópica de feridas tratadas com placebo três dias após sofrer o ferimento. A análise da imagem histológica revela 20% de reepitelialização.

Os painéis E e F mostram, respectivamente, a aparência macroscópica e microscópica de feridas tratadas com tratamento padrão três dias após sofrer o ferimento. A análise da imagem histológica revela 19% de reepitelialização.

Os painéis G e H mostram, respectivamente, a aparência macroscópica e microscópica de feridas tratadas com TGF- β_3 sete dias após sofrer o ferimento. A análise da imagem histológica revela 100% de reepitelialização.

Os painéis I e J mostram, respectivamente, a aparência macroscópica e microscópica de feridas tratadas com placebo sete dias após sofrer o ferimento. A análise da imagem histológica revela 100% de reepitelialização.

5 Os painéis K e L mostram, respectivamente, a aparência macroscópica e microscópica de feridas tratadas com tratamento padrão sete dias após sofrer o ferimento. A análise da imagem histológica revela 100% de reepitelialização.

10 A figura 2, ilustra a comparação entre a porcentagem média de reepitelialização obtida em feridas tratadas com TGF- β_3 e não-tratadas/tratadas com placebo em três dias e sete dias após sofrer a lesão. Os resultados mostrados são de reepitelialização de feridas tratadas com 50ng/100 μ L de TGF- β_3 , Placebo ou Tratamento Padrão em 3 e 7 dias após sofrer o ferimento. Os resultados foram produzidos por análise de imagem
15 de cortes histológicos. * Indica um resultado significativo como avaliado por t-teste não-emparelhado ($p=0,05$).

20 A figura 3, mostra fotografias que ilustram a aparência macroscópica, e dessa forma, progresso de regeneração epitelial, em feridas de pele de espessura parcial durante 21 dias a partir do momento que sofreu a lesão.

Os painéis A a I mostram as feridas tratadas com placebo nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 15 e 21 respectivamente. Ao contrário dos Painéis J a R que mostram as feridas tratadas com TGF- β_3 nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 15 e 21 respectivamente.

25 Exemplo 1

Efeitos de TGF- β_3 sobre a Reepitelialização de Feridas de Espessura Total em Humanos

Um estudo de Fase I sob aprovação do Comitê Ético local foi realizado, compreendendo um estudo em escala gradativa de dose primeiro-
30 em-homem (FIM) em casos de dano epidérmico para determinar a dose máxima tolerada (MTD) de TGF- β_3 administrada por injeção intradérmica. O estudo foi realizado como um estudo duplo cego, placebo (veículo) e trata-

mento padrão controlado, randomizado, grupo paralelo para investigar a segurança clínica, tolerância, farmacocinética sistêmica e farmacodinâmica local de concentrações repetidas, em escala de TGF- β_3 intradérmicas em indivíduos voluntários homens Caucasianos saudáveis com idade de 18 a 45
5 anos (Número de Referência de Estudo e Protocolo: RN 1001 -319- 1001-001).

Um total de setenta e dois indivíduos participaram do estudo, com doses planejadas de TGF- β_3 (e placebos perfeitamente compatíveis) sendo que 50ng/100 μ L, 100 ng/100 μ L, 500ng/100 μ L, 1000ng/100 μ L,
10 μ g/100 μ L e 100 μ g/100 μ L.

Os dados do estudo foram introduzidos em um banco de dados complacente Regulador que foi fechado em 8 de dezembro de 2003 e o estudo randomizado não-cego (ou seja, códigos de randomização liberados) em 19 de dezembro de 2003.

15 Todos os indivíduos no estudo receberam duas biópsias incisoinais de 3 mm de espessura total em cada braço e tratamento padrão em todas as feridas. O tratamento padrão proporcionou tratamento ótimo para cura de ferida úmida em todos os casos. Ademais para o par de feridas nos braços de cada indivíduo, as feridas receberam TGF- β_3 versus placebo de
20 TGF- β_3 , TGF- β_3 versus nada (marcadas como tratamento padrão) ou placebo de TGF- β_3 versus nada (tratamento padrão). O desenho do estudo foi tal que as comparações dos efeitos de tratamentos sobre feridas poderiam ser feitas no e entre os indivíduos ou seja, indivíduos atuados como seus próprios controles.

25 A substância de fármaco de volume de TGF- β_3 usada no estudo foi fabricada em GMP continha ácido e álcoois como excipientes. Este material foi diluído em série para proporcionar seringas estéreis pré-carregadas para injeção intradérmica no estudo (novamente fabricado em GMP). As concentrações de excipiente de ácido e álcool variaram devido ao processo
30 de diluição em série com as doses de injeção de TGF- β_3 requeridas da substância de fármaco de volume. Visto que os efeitos destes excipientes em concentrações diferentes tanto sobre a segurança/tolerância como efeitos

sobre a cura em homens que não era conhecida, placebos perfeitamente compatíveis também foram preparados em to GMP da mesma maneira (ou seja, os excipientes continham placebo em concentrações equivalentes, porém não proteína TGF- β_3). Isto também permitiu a comparação dos placebos perfeitamente compatíveis para tratamento padrão separadamente, para demonstrar se os próprios excipientes apresentavam algum efeito colateral na cura.

O desenho de estudo era tal que 9 indivíduos em cada grupo de dose foram submetidos a duas biópsias incisionais em cada braço que foi tratado tanto com TGF- β_3 , placebo como tratamento padrão como descrito acima. Para cada braço do indivíduo os dois sítios de biópsia foram marcados sobre o aspecto interno e sob anestesia local com TGF- β_3 , placebo ou nada (tratamento-padrão) injetado de forma intradérmica no sítio. Uma biópsia incisional de espessura total de 3 mm foi então obtida de cada sítio marcado. Um dia depois de sofrer o ferimento os sítios foram então tratados novamente, como acima, com o mesmo tratamento, ou seja, TGF- β_3 , placebo ou nada (tratamento padrão) sob anestesia local. As feridas foram então excisadas tanto 3 como 7 dias após sofrer o ferimento para histologia, para permitir a análise dos efeitos de tratamento sobre a cura da ferida 3 e 7 dias após biópsias incisionais iniciais. Os indivíduos foram então acompanhados. Os dados de segurança e tolerância foram coletados durante o estudo.

As feridas foram excisadas, histologicamente processadas em blocos de cera de parafina, tecido cortado e então analisadas para reepitelização utilizando análise de imagem. Um total de 36 feridas foram geradas desta maneira em cada grupo de dose de modo que um total de 16 feridas foram tratadas com TGF- β_3 , 10 feridas com placebo e 10 feridas com tratamento padrão. Isto resultou nos seguintes números de ferida por tratamento em dois pontos de tempo diferentes após sofrer o ferimento para análise histológica:

8 feridas tratadas com TGF- β_3 , 5 feridas tratadas com placebo e 5 feridas tratadas com tratamento padrão excisadas 3 dias após sofrer o ferimento.

8 feridas tratadas com TGF- β_3 , 5 feridas tratadas com placebo e 5 feridas tratadas com tratamento padrão excisadas 7 dias após sofrer o ferimento.

A porcentagem de reepitelização em sítios de dano epidérmico foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de reepitelização} = \frac{(\text{diâmetro total da ferida} - \text{diâmetro de ferida não-epitelizada}) \times 100}{\text{diâmetro total da ferida}}$$

Resultados

Aceleração de Reepitelização em Feridas de Espessura Total em Humanos por TGF- β_3 .

Ilustra-se na figura 1 a progressão da regeneração epidérmica em feridas de espessura total, que inclui:

iii) Fotografias, tiradas em três pontos de tempo e sete dias pós-ferimento, que ilustra a aparência macroscópica das feridas de espessura total durante a regeneração epitelial;

iv) micrografias dos mesmos pontos de tempo que ilustram a histologia dos sítios feridos durante a regeneração epitelial.

A análise de cortes histológicos demonstra que a reepitelização equivalente das feridas ocorreu em placebo e o controle de cuidado-padrão tratou as feridas em ambos os pontos de tempo pós-ferimento e, como tal, estes grupos foram combinados para se compararem com as feridas tratadas com TGF- β_3 .

Pode-se ver a partir da figura 1 que o tratamento com TGF- β_3 de feridas de pele de espessura total é capaz de promover a regeneração epitelial, levando à reconstituição da epiderme mais cedo do que no caso de feridas não tratadas ou tratadas com placebo.

Os resultados do Exemplo 1 são mostrados na figura 2, que comparam a porcentagem reepitelização média em feridas tratadas com TGF- β_3 e não tratadas/tratadas com placebo em três e sete dias pós-lesão.

A figura 2 ilustra claramente que o tratamento com TGF- β_3 em uma concentração de 50ng/100 μ L acelerou, de forma significativa, a reepitelização quando comparada com a reepitelização que ocorre em feridas de

controle. A promoção da regeneração epitelial em feridas tratadas com fármaco versus controle também foram observada em indivíduos que receberam TGF- β_3 até (50ng/100 μ L).

Exemplo 2

5 Efeitos de TGF- β_3 na Reepitelização de Feridas Humanas de Espessura Parcial/Sítios Doadores de Enxerto de Pele

Um estudo-piloto (não cego) foi realizado sob a aprovação do Comitê Ético local para investigar os efeitos de aplicações intradérmicas e tópicas de TGF- β_3 quando aplicadas para dividir os sítios doadores de enxerto de pelo em dois indivíduos humanos voluntários Caucasianos do sexo masculino com idade entre 18 e 45 anos. A concentração de TGF- β_3 usada foi de 50ng/100 μ L e a taxa de regeneração epitelial alcançada foi comparada com um placebo perfeitamente combinado com TGF- β_3 na concentração equivalente. Conforme descrito acima, ou o TGF- β_3 , ou placebo foram preparados em GMP.

Os sítios doadores foram primeiramente identificados e marcados em cada lateral da linha intermediária na parte traseira inferior, cada um medindo 1,5 por 2 cm e, então, infiltrados com anestésico local contendo 1 em 200.000 de adrenalina. Cada sítio recebeu depois uma injeção intradérmica, de modo que uma lateral receba TGF- β_3 em uma dose de 50ng/cm² e a outra lateral receba placebo perfeitamente combinado. Depois, os indivíduos repousaram de barriga para baixo por 30 minutos antes um enxerto de pele de espessura grossa dividida de aproximadamente 0,55 mm foi coletado a partir de cada um dos sítios marcados, sendo que a hemostasia é alcançada com pressão moderada. Seguindo imediatamente a coleta de enxerto, foi administrado a cada sítio doador uma aplicação tópica, ou de TGF- β_3 , ou de placebo, depois foram feitos curativos nas feridas e os indivíduos foram liberados. Os indivíduos retornaram no próximo dia e receberam uma nova aplicação tópica, ou de TGF- β_3 , ou de placebo, de modo que em todos os estágios cada ferida receba o mesmo tratamento, isto é, três aplicações de TGF- β_3 ou três aplicações de placebo. Os indivíduos então examinados em uma base diária por um período de duas semanas e depois em 21 dias,

com acompanhamento subsequente.

Resultados:

Aceleração de Reepitelialização de Feridas de Espessura Parcial/Sítios Doadores de Enxerto de Pele em Humanos por TGF- β_3 .

5 A análise macroscópica, avaliada utilizando fotografias dos sítios danificados, demonstrou que TGF- β_3 acelerou notoriamente a promoção de regeneração epidérmica, aumentando a taxa de reepitelialização em sítios doadores de enxerto de pele de espessura parcial, como comparada com a taxa ocorrente em controles tratados com placebo, até 8 dias após sofrer o
10 ferimento.

 A figura 3 mostra fotografias que ilustram a aparência macroscópica, e dessa forma, o progresso de regeneração epitelial, em feridas de pele de espessura parcial durante 21 dias do momento da lesão. As fotografias que mostram a promoção de regeneração epitelial são marcadas com um asterisco (*) na figura 3.
15

 Pode ser observado que 15 dias e 21 dias após sofrer o ferimento a diferença entre ferida tratada com TGF- β_3 e não-tratada/tratada com placebo é menos visível macroscopicamente. Este efeito é explicado pelo fato de que os sítios tratados com TGF- β_3 são totalmente reepitelializados em ou antes de 8 dias, enquanto os sítios tratados com placebo apenas atingem o mesmo grau de reepitelialização em torno de 15 dias.
20

Conclusões (Exemplos 1 & 2).

 Os resultados estabelecidos acima mostram surpreendentemente que um elemento específico da família TGF- β , TGF- β_3 , é capaz de promover regeneração epitelial. Esta descoberta está em contraste direto com aquela que o versado na técnica poderia esperar à luz da técnica anterior, uma vez que relatórios anteriores sugeriram que os elementos da família de TGF- β_3 inibem a regeneração da epiderme em feridas de pele, com a isoforma de TGF- β_3 sendo o inibidor mais potente deste processo. A promoção de regeneração epitelial ocorrida por tratamento com TGF- β_3 é atingida tanto em feridas de espessura total como feridas de espessura parcial (que podem, por exemplo, servir como sítios doadores de enxerto de pele). Os efei-
25
30

tos terapêuticos em seres humanos são observados em tratamento com TGF- β_3 utilizando doses de até 500ng/100 μ L do agente ativo.

Apêndice

Formulações.

- 5 Detalhes das formulações usadas em estudos clínicos para estabelecer a capacidade de agentes que possuem atividade de TGF- β_3 para promover a regeneração epitelial são proporcionados sob os seguintes títulos.

10 A substância de fármaco TGF- β_3 usada nos estudos foi fornecida em uma concentração de 9,1mg/mL em 20 mM de ácido acético e 20% de álcool de isopropila. Este material foi diluído em série para produzir seringas que contêm TGF- β_3 nas concentrações estabelecidas nos dados exemplares. Será avaliado pelo versado na técnica que, independente dos diluentes adicionais usados para produzir as soluções finais, níveis traço de ácido acético e álcool de isopropila serão conduzidos por diluição serial.

15 *A1. Formulações usadas em tratamento de biópsia incisional (feridas dérmicas de espessura total)*

20 Para estudos de biópsia incisional/ferida de espessura total a substância de fármaco foi diluída em PBS que contém 5% p/v de manitol, e ajustada para pH 3,8 utilizando ácido acético. Esta formulação foi considerada eficaz na promoção de regeneração epitelial. A guisa de uma alternativa para a formulação baseada em manitol descrita acima, uma formulação baseada em maltose (descrita de forma mais completa abaixo) também foi preparada. Esta formulação de agentes de acordo com a invenção em combinação com maltose foi surpreendentemente considerada para reduzir de forma dramática a dor associada com injeção da composição. Os estudos realizados pelos inventores mostraram clinicamente que a dor associada com injeção de formulação baseada em manitol no estudo de biópsia incisional foi aliviada quando agentes de acordo com a invenção foram formula-

25 dos na presença de açúcares, e em particular na presença de concentrações isotônicas de maltose.

30

As análises *in vitro* da eficácia das formulações baseadas em

maltose e baseadas em manitol revelaram uma vantagem surpreendente adicional das composições que compreendem agentes ativos de acordo com a invenção em combinação com maltose. A investigação utilizando um ensaio ELISA e um ensaio Mink Lung Epitelial Cell para comparar a formulação de PBS/manitol com a formulação de 0,25M de maltose mostra que a formulação de maltose resulta em um aumento de aproximadamente 4 dobras em atividade de TGF- β_3 .

A2. Formulações usadas no tratamento de sítios doadores de enxerto de pele de espessura dividida:

10 Para este estudo TGF- β_3 foi formulado em 0,25 M de maltose (ou seja, 90 g de maltose por litro de água para injeção, equivalente a 9% (p/v) de maltose em água para injeção.

Esta formulação foi aplicada tanto de forma intradérmica como tópica para promover a regeneração epitelial.

15 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um agente que possui atividade TGF- β_3 , caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para a promoção de regeneração epitelial.
- 5 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente é TGF- β_3 .
3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente é um fragmento, derivado ou variante de TGF- β_3 .
- 10 4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente é uma substância capaz de promover e/ou imitar a atividade biológica de TGF- β_3 .
5. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a regeneração epitelial está em um local de um ferimento agudo.
- 15 6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a regeneração epitelial é de um paciente jovem e/ou saudável.
7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a regeneração epitelial que será promovida é um epitélio escamoso estratificado.
- 20 8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o epitélio é a epiderme.
9. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o epitélio é o epitélio corneano.
- 25 10. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o epitélio é um epitélio respiratório.
11. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o epitélio é o epitélio da região das cavidades do abdômen, torácicas ou pélvicas.
- 30 12. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o medicamento serve para a promoção de regeneração epitelial após lesão.

13. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o medicamento serve para a promoção de regeneração epitelial após cirurgia.

5 14. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a cirurgia compreende enxerto epitelial.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a cirurgia compreende:

- i) remoção de enxerto epitelial;
- ii) opcionalmente emaranhamento do enxerto epitelial; e
- 10 iii) aplicação do enxerto em um sítio receptor.

16. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o medicamento serve para administração no sítio doador de enxerto.

15 17. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o medicamento serve para administração no sítio receptor de enxerto.

18. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o medicamento serve para administração no enxerto.

20 19. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 18, caracterizado pelo fato de que a cirurgia compreende enxerto de pele.

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o enxerto de pele é um enxerto de pele de espessura total.

21. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o enxerto de pele é um enxerto de pele de espessura parcial.

25 22. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o medicamento serve para a promoção de regeneração epitelial após lesão por queimadura.

23. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que o medicamento é para aplicação tópica.

30 24. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o medicamento é para injeção local.

25. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23,

caracterizado pelo fato de que o medicamento é um creme ou pomada.

26. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que a promoção de regeneração epitelial é promoção profilática.

5 27. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou 7 a 26, caracterizado pelo fato de ser para a promoção de um medicamento para promover regeneração epitelial comprometida, inibida, atrasada ou de outra maneira defeituosa.

10 28. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para acelerar a regeneração epitelial normal.

29. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de ser a preparação de um medicamento para promover regeneração epitelial em idosos.

15 30. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o agente é formulado na presença de maltose.

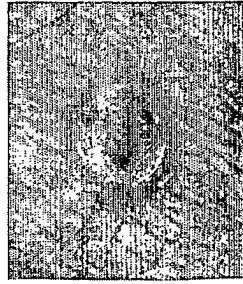
20 31. Uso de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a maltose está presente em uma concentração entre 0,1 M e 0,4 M de maltose.

32. Uso de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a maltose está presente em uma concentração de 0,25 M de maltose.

Fig.1 (parte 1)

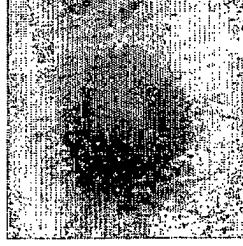
Exemplos de imagens macroscópica e histológica de feridas tratadas com 50 ng / 100 ml de TGF B3, placebo ou tratamento

Rn1001 ferida tratada
dia 3 macroscópica



A

Ferida tratada com placebo
dia 3 macroscópica



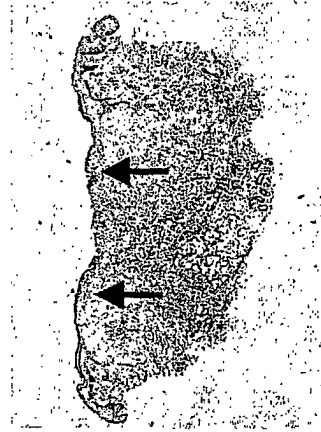
C

Ferida tratada com tratamento padrão
dia 3 macroscópica



E

Rn1001 ferida tratada
dia 3 histológica



B

Ferida tratada com placebo
dia 3 histológica



D

Ferida tratada com tratamento padrão
dia 3 histológica



F

54% de repitelização

20% de repitelização

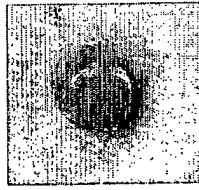
19% de repitelização

Nota: as setas nas imagens histológicas indicam a primeira camada do epitélio

Fig.1 (parte 2)

Exemplos de imagens macroscópica e histológica de feridas tratadas com 50 ng / 100 ml de TGF B3, placebo ou tratamento em 7 dias aós sofrer ferimento

Rn1001 ferida tratada
dia 7 macroscópica

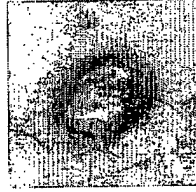


Rn1001 ferida tratada
dia 7 histológica



100% de repitelização

Ferida tratada com placebo
dia 7 macroscópica



Ferida tratada com placebo
dia 7 histológica



100% de repitelização

Ferida tratada com tratamento padrão
dia 7 macroscópica



Ferida tratada com tratamento padrão
dia 7 histológica



100% de repitelização

Re-epitelização de feridas tratadas com 50ng / 100ml de TGF B3 , placebo ou tratamento padrão em 3 e 7 dias após sofrer a lesão por análise de imagens de cortes histológicos

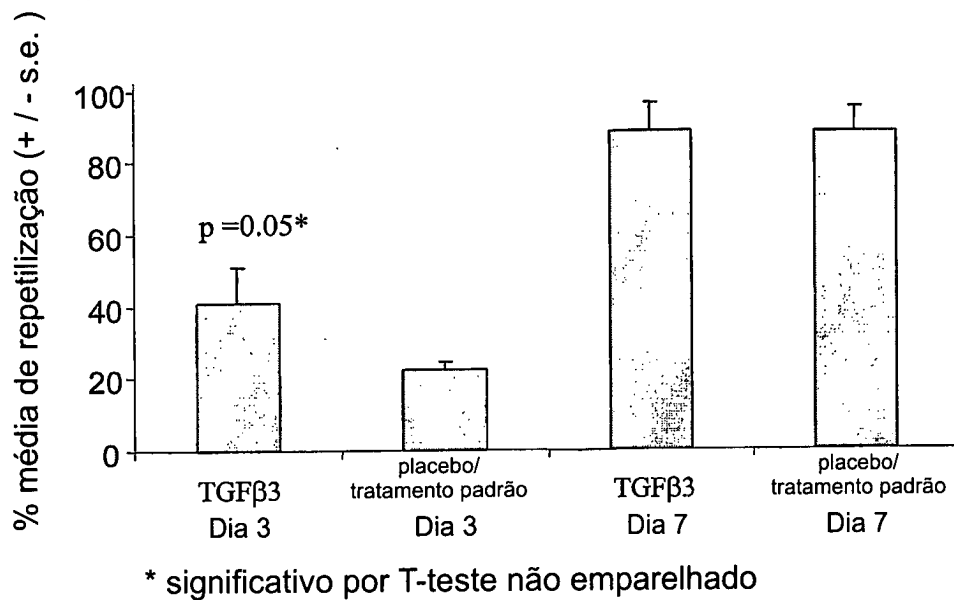


Fig.2

Fig.3 (parte 1)

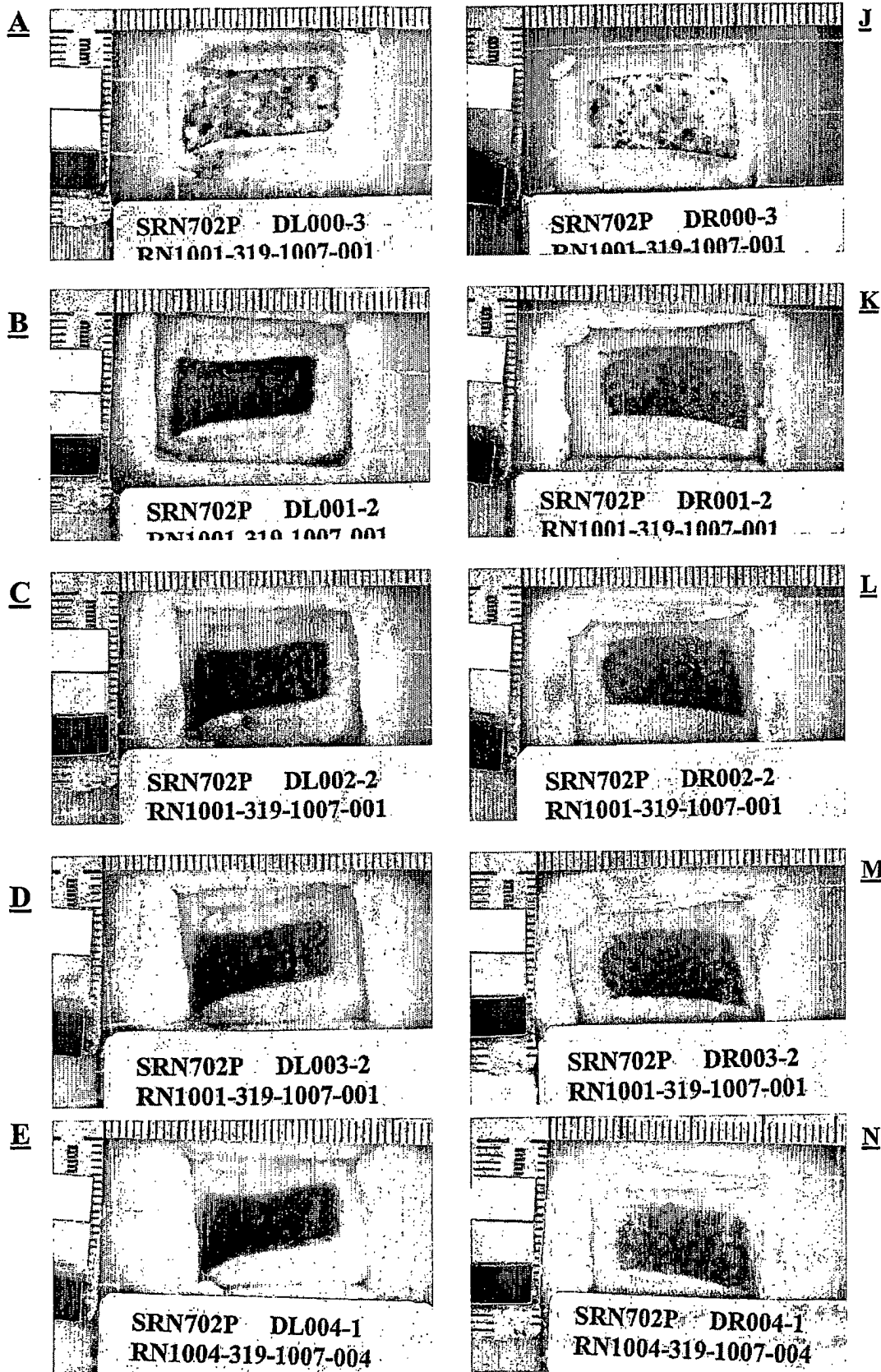
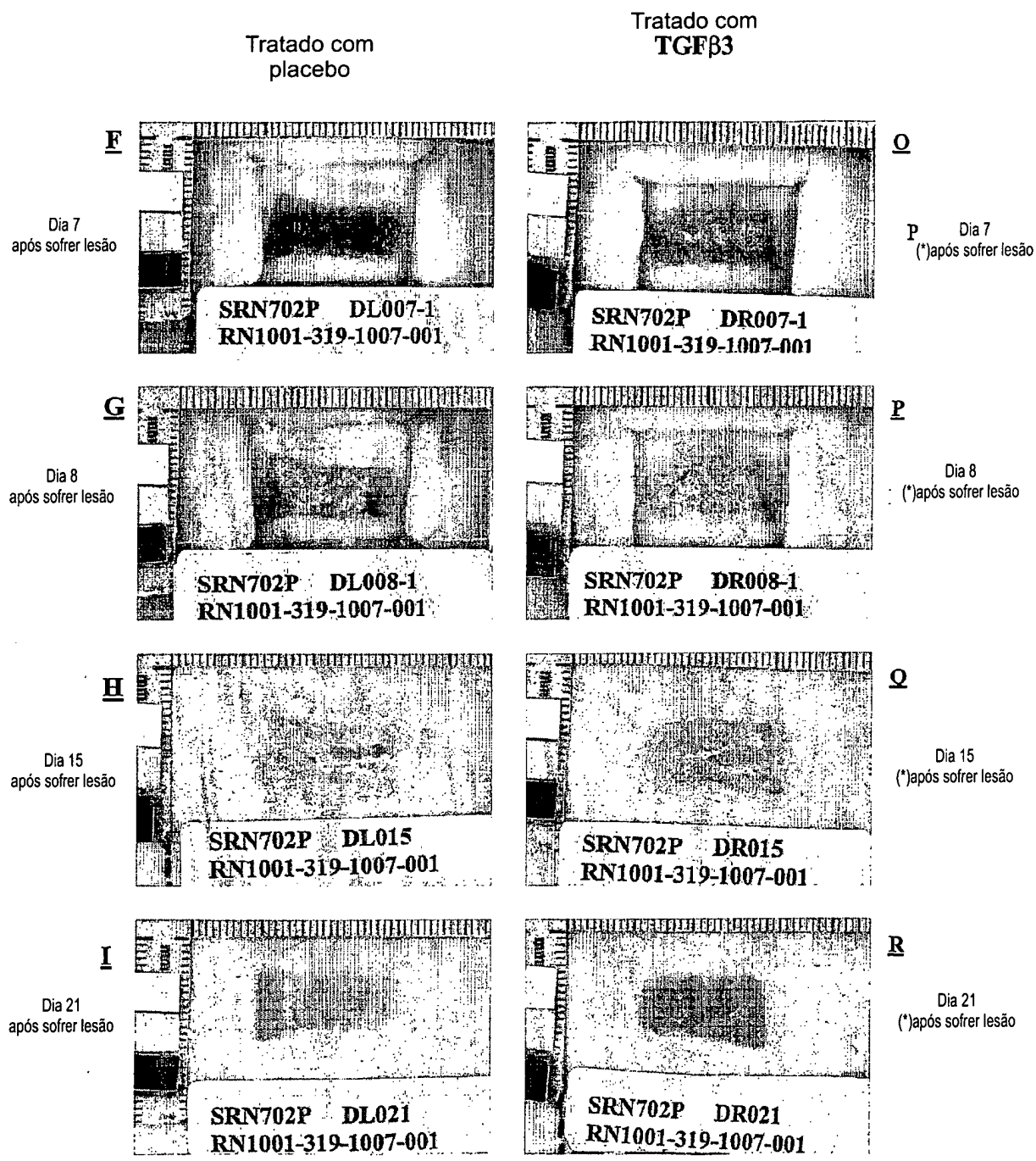


Fig.3 (parte 2)



RESUMO

Patente de Invenção: **"USO DE UM AGENTE QUE POSSUI ATIVIDADE TGF- β_3 "**.

5 A presente invenção refere-se ao uso de TGF- β_3 , ou agentes que possuem atividade TGF- β_3 , para promover regeneração epitelial. Métodos para fabricar medicamentos, e métodos para promover regeneração epitelial são proporcionados. Em particular, os medicamentos e métodos de tratamento da invenção são aplicáveis para a promoção de regeneração epitelial em pacientes saudáveis, e/ou em ferimentos agudos.