



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1006076-6 B1



(22) Data do Depósito: 12/01/2010

(45) Data de Concessão: 06/10/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

(51) Int.Cl.: A61K 9/06; A61K 47/36; A61K 9/00; A61K 38/00.

(30) Prioridade Unionista: 13/01/2009 SE 0900031-6.

(73) Titular(es): PERGAMUM AB.

(72) Inventor(es): MARGIT MAHLAPUU; MATTIAS MÜNNICH; VERONIKA SJÖSTRAND.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010050284 de 12/01/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/081800 de 22/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 06/07/2011

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS. A presente invenção refere-se a composições farmacêuticas que intensificam o efeito terapêutico de peptídeos biologicamente ativos, especialmente peptídeos derivados de lactoferrina humana. As composições são úteis para o tratamento e/ou prevenção de feridas, cicatrizes e aderências pós-cirúrgicas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS".

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a composições farmacêuticas que intensificam o efeito terapêutico de peptídeos biologicamente ativos, especialmente peptídeos derivados de lactoferrina humana. As composições são úteis para o tratamento e/ou prevenção de feridas, cicatrizes e aderências pós-cirúrgicas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] As aderências peritoneais são conexões de tecidos fibrosos entre estruturas abdominais depois de traumatismo cirúrgico ou outros tipos de lesões. A cirurgia abdominal total, vascular, ginecológica, urológica e ortopédica pode levar à formação de aderências em até 95% dos pacientes (Ellis *et al.*, "Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study", *Lancet* 353:1476-1480 (1999)). As aderência pós-cirúrgicas são consideradas a principal causa de obstrução do intestino delgado (Menzies *et al.*, "Small bowel obstruction due to postoperative adhesions: treatment patterns and associated costs in 110 hospital admissions", *Ann. R.Coll. surg. Engl.* 83:40-46 (2001)), uma etiologia bem- conhecida de infertilidade secundária em mulheres (Marana *et al.*, "Correlation between the American Fertility Society classifications of adnexal adhesions and distal tubal occlusion, salpingoscopy and reproductive outcome in tubal surgery", *Fertil. Steril.* 64:924-929 (1995)), bem como uma possível causa de dor pós-operatória (Paajanen *et al.*, "Laparoscopy in chronic abdominal pain: a prospective nonrandomized long-term follow-up study", *J. Clin. Gastroenterol.* 39:110- 114 (2005)). Mais do que 30% dos indivíduos que se submetem a uma cirurgia abdominal inferior são readmitidos no hospital por causa de distúrbios direta ou possivelmente relacionados

à formação de aderências em algum período da sua vida (Lower *et al.*, "The impact of adhesions on hospital readmissions over ten years after 8849 open gynaecological operations: an assessment from Surgical and Clinical Adhesions Research Study", *Bjog* 107:855-862 (2000)). Há muitas décadas, têm sido feitas tentativas para reduzir aderências pós-cirúrgicas reduzindo traumatismos cirúrgicos (evitando, dissecação, manuseio cuidadoso de tecidos, hemostasia meticulosa) e contaminação da cavidade abdominal com materiais estranhos (usando luvas sem amido, gaze sem fiapos e suturas absorvíveis) (Holmdahl *et al.*, "Adhesions: pathogenesis and prevention-panel discussion and summary", *Eur. J. Surg. Suppl.* 56-62 (1997)). O importante é que as técnicas laparoscópicas não são suficientes para superar o problema de formação de aderências pós-operatórias (Duron *et al.*, "Prevalence and mechanisms of small intestine obstruction following laparoscopic abdominal surgery: a retrospective multicenter study", Associação Francesa para Pesquisa Cirúrgica, *Arch. Surg.* 135:208-212 (2000)). Assim sendo, as aderências intraperitoneais permanecem sendo um problema clínico importante e acredita-se agora que futuros aperfeiçoamentos podem ser influenciados apenas marginalmente através de técnica cirúrgica aprimorada. Ao invés disso, o foco é desenvolver produtos dedicados à prevenção da formação de aderências, que são administrados em conexão com intervenção cirúrgica.

[0003] A maioria das estratégias terapêuticas testadas são produtos em dispositivos médicos. Diferentes tipos de barreiras físicas foram avaliados, nos quais películas biodegradáveis aplicadas durante a intervenção são usadas para manter as superfícies abdominais lesionadas separadas durante o período crítico de cicatrização abdominal. As duas barreiras redutoras de aderências mais amplamente utilizadas são Interceed (Johnson & Johnson Medical,

Inc., Arlington, TX, EUA) e Seprafilm™ (Genzyme, Cambridge, MA, EUA). Seprafilm™, constituído de hialuronato de sódio e carbóxi-metil-celulose (CMC), forma um gel viscoso aproximadamente 24-48 horas depois da colocação, que é ressorvido lentamente dentro de 1 semana (Diamond, "Reduction of adhesions after uterine myomectomy by Seprafilm membrane (HAL-F): a blinded, prospective, randomized, multicenter clinical study", Separfilm Adhesion Study Group, *Fertil. Steril.* 66:904-910 (1996); Beck, "The role of Seprafilm biosorbable membrane in adhesion prevention", *Eur. J. Surg. Suppl.* 49-55 (1997)). Seprafilm™ demonstrou reduzir aderência pós-cirúrgica em situação clínica (Vrijland *et al.*, "Fewer intraperitoneal adhesions with use of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose membrane: a randomized clinical trial", *Ann. Surg.* 235:193-199 (2002); Beck *et al.*, "A prospective, randomizes, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine", *dis. Colon Rectum* 46:1310-1319 (2003); Tang *et al.*, "Bioresorbable adhesion barrier facilitates early closure of the defunctioning ileostomy after rectal excision: a prospective randomized trial", *Dis. Colon Rectum* 46:1200-1207 (2003); entretanto, o dispositivo é difícil de aplicar, pois ele adere às luvas e órgãos e é quebradiço (DeCherney & diZerega, "Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers", *Surg. Clin. North Am.* 77: 671-688 (1997)). Adicionalmente, Seprafilm™ aumenta o risco de sequelas associadas ao vazamento anastomótico e não é compatível com procedimentos laparoscópicos (diZerega *et al.*, "A randomizes, controlled pilot study of the safety and efficacy of 4% icodextrin solution in the reduction of adhesions following laparoscopic gynaecological surgery", *Hum. Reprod.* 17:1031-1038)). Interceed, constituído de celulose regenerada oxidada, é transformado em uma massa gelatinosa que cobre o

peritônio lesionado e demonstrou eficácia na prevenção de aderências em vários estudos clínicos (Mais *et al.*, "Prevention of de-novo adhesion formation after laparoscopic myomectomy: a randomized trial to evaluate the effectiveness of an oxidized regenerated cellulose absorbable barrier", *Hum. Reprod.* 10:3133-3135 (1995); Mais *et al.*, "Reduction of adhesion reformation after laparoscopic endometriosis surgery: a randomized trial with an oxidized regenerated cellulose absorbable barrier", *Obstet. Gynecol.* 86:512-515 (1995); Wallwiener *et al.*, "Adhesion formation of the parietal and visceral peritoneum: an explanation for the controversy on the use of autologous and alloplastic barriers?", *Fertil. Steril.* 69:132-137 (1998)). Entretanto, a aplicação de Interceed requer hemostasia completa, pois mesmo pequenas quantidades de sangramento intraperitoneal nega qualquer efeito benéfico desta barreira (DeCherney & diZerega, *supra*, 1997). Uma limitação genérica para usar as barreiras físicas é a especificidade localizada do produto, requerendo que o cirurgião preveja onde as aderências ocorrerão e onde elas mais possivelmente causarão problemas clínicos. Como uma alternativa às barreiras, diferentes fluidos para instilação intra-abdominal tais como icodextrina (Adept, Baxter Healthcare Corporation, IL, EUA) ou solução de Ringer lactada, foram administradas depois de cirurgia em volumes suficientes para permitir a flutuação das estruturas abdominais, e assim sendo, prevenindo que as superfícies lesionadas se aproximem (Yaacobi *et al.*, "Effect of Ringer's lactate irrigation on the formation of postoperative abdominal adhesions", *J. Invest. Surg.* 4:31-36 (1991); Cavallari *et al.*, "Inability of University of Wisconsin solution to reduce postoperative peritoneal adhesions in rats", *Eur. J. Surg.* 166:650-653; diZerega *et al.*, *supra*). Entretanto, a gravidade causa problemas por impedir uma distribuição uniforme do fluido no abdome. Além disso, as soluções são absorvidas mais rapidamente pela cavidade

abdominal do que o tempo necessário para a cicatrização peritoneal.

[0004] Um número limitado de compostos farmacologicamente ativos foi testado na prevenção de aderências pós-cirúrgicas. Como alguns exemplos, o componente inflamatório e a proliferação de fibroblastos da cascata de cicatrização de feridas foram um alvo de farmacoterapia usando fármacos esteroides e fármacos citotóxicos, respectivamente. Entretanto, estes agentes demonstraram eficácia ambígua e efeitos colaterais potencialmente sérios (LeGrand *et al.*, "Comparative efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and anti-thromboxane agents in a rabbit adhesion-prevention model", *J. Invest. Surg.* 8:187-194 (1995); Li *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of a cross-linked hyaluronan-mitomycin C hydrogel", *Biomacromolecules* 5:895-902 (2004)).

[0005] Devido à eficácia limitada e manuseio difícil das terapias testadas, a vasta maioria das intervenções cirúrgicas realizadas na cavidade abdominal atualmente não aplica quaisquer produtos para prevenir a formação de aderências, e as aderências pós-operatórias continuam a causar sofrimento para os pacientes e apresentam o maior custo para a sociedade (Ray *et al.*, "Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994", *J. Am. Coll. Surg.* 186:1-9 (1998); 2005)).

[0006] O objetivo da presente invenção é fornecer um meio que tem a capacidade de prevenir a formação de aderência pós-operatória sem ter os efeitos colaterais indesejados das composições farmacêuticas, dispositivos e procedimentos correntemente disponíveis.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0007] A presente invenção refere-se a uma abordagem inusitada para prevenir a formação de aderências intra-abdominais usando peptídeos biologicamente ativos derivados de lactoferrina humana

formulados em uma composição farmacêutica que intensifica o efeito terapêutico dos peptídeos. Os peptídeos biologicamente ativos apresentam um efeito inibitório sobre as características mais importantes da formação de cicatrizes: reduzir o risco de infecções, impedir inflamação e promover fibrinólise. Os peptídeos são formulados em conjunto com o polímero hidrofílico ácido hialurônico de ocorrência natural, que confere propriedades de liberação lenta do fármaco e contribui para os resultados finais por efeito físico de barreira. Usando um modelo de abrasão do ceco com defeito na parede lateral em ratos, aceito genericamente como um prognóstico não clínico adequado da eficácia clínica de fármacos antiaderentes, demonstra-se que os peptídeos biologicamente ativos derivados de lactoferrina humana formulados em ácido hialurônico reduzem significativamente as aderências intra-abdominais pós-cirúrgicas. O efeito aprimorado dos peptídeos quando formulados em ácido hialurônico é inesperado, e significativamente sinérgico, em comparação com o efeito dos peptídeos e os efeitos de ácido hialurônico dados independentemente.

[0008] Consequentemente, a presente invenção refere-se a composições farmacêuticas que intensificam o efeito biológico de peptídeos biologicamente ativos, especialmente os peptídeos derivados de lactoferrina humana.

[0009] Um aspecto da presente invenção fornece uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou prevenção de feridas, cicatrizes, e aderências pós-cirúrgicas, compreendendo (i) um ou mais peptídeos biologicamente ativos derivados de lactoferrina humana, e (ii) um ácido hialurônico de alto peso molecular.

[00010] Outro aspecto da presente invenção fornece o uso de (i) um ou mais peptídeos biologicamente ativos derivados de lactoferrina humana, e (ii) um ácido hialurônico de alto peso molecular, para a

fabricação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou prevenção de feridas, cicatrizes, e aderências pós-cirúrgicas.

[00011] Ainda outro aspecto da presente invenção fornece um método para o tratamento, profilaxia e/ou prevenção de feridas, cicatrizes, e aderências pós-cirúrgicas, compreendendo a administração de uma composição farmacêutica que compreende (i) um ou mais peptídeos biologicamente ativos derivados de lactoferrina humana, e (ii) um ácido hialurônico de alto peso molecular, a um indivíduo que necessita deste tratamento.

[00012] O termo "um peptídeo biologicamente ativo derivado de lactoferrina humana" significa um peptídeo biologicamente ativo que compreende pelo menos um modelo de sequência que é em parte ou completamente derivado da sequência de lactoferrina humana, onde este modelo de sequência pode compreender uma ou mais substituições de aminoácidos.

[00013] O termo peptídeo "biologicamente ativo" significa peptídeos que têm uma ou mais atividades, tais como atividade anti-inflamatória, atividade imunomoduladora, atividade fibrinolítica, atividade antiangiogênica, e atividade antimicrobiana, tal como atividade antibacteriana, atividade antiviral ou atividade antifúngica.

[00014] Os peptídeos biologicamente ativos apropriados para uso de acordo com a presente invenção estão descritos, por exemplo, nos documentos n^{os} PCT/EP2008/064062, PCT/EP2008/065186, WO 00/01730, o correspondente EP 1095061 e US 7.253.143, que são aqui incorporados como referência.

[00015] O peptídeo biologicamente ativo pode ser selecionado entre os peptídeos que compreendem a sequência de aminoácidos

[00016] Phe-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO: 1)

onde o aminoácido X1 é Gln ou Ala, o aminoácido X2 é Trp ou Leu, o aminoácido X3 é Gln, Ala, Orn, Nle ou Lys, o aminoácido X4

é Arg, Ala ou Lys, o aminoácido X5 é Asn, Ala, Orn ou Nle, o aminoácido X6 é Met, Ala ou Leu, o aminoácido X7 é Arg, Ala ou Lys.

[00017] De preferência, o peptídeo biologicamente ativo pode ser selecionado entre os peptídeos de acordo com a fórmula (I) e peptídeos de acordo com a fórmula (II)

[00018] R1-Cys-Phe- X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-Lys-Val-Arg-R2
Fórmula (I)

onde R1 é nenhum aminoácido, Lys ou uma sequência de peptídeo selecionada entre Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys ... (SEQ I NO: 2), e seus fragmentos truncados no terminal N, incluindo

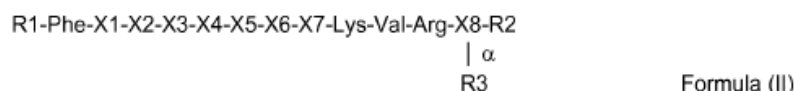
Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,

Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Pro-Glu-Ala-Thr-Lys,
Glu-Ala-Thr-Lys,
Ala-Thr-Lys,
Thr-Lys;

e onde R2 é nenhum aminoácido, Gly ou uma sequência de peptídeo selecionada entre Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO: 3)

e seus fragmentos truncados no terminal N, incluindo

Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys,
 Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile,
 Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys,
 Gly-Pro-Pro-Val-Ser,
 Gly-Pro-Pro-Val,
 Gly-Pro-Pro,e
 Gly-Pro.



onde o aminoácido X8 é Gly, Lys, Glu ou Asp;

quando X8 é Gly, então R3 é Ser-(Arg)_n-X9 e a ligação α é uma ligação peptídica entre o grupo carboxila de Gly e o grupo amino de Ser;

quando X8 é Lys, então R3 é X9-(Arg)_n-Ser e a ligação α é uma ligação amida entre o grupo ϵ -amino em Lys e o grupo carboxila em Ser; e

quando X8 é Glu ou Asp, então R3 é Ser-(Arg)_n-X9 e a ligação α é uma ligação amida entre o grupo γ -carboxila de Glu ou o grupo β -carboxila de Asp e o grupo amino de Ser;

o aminoácido X9 é nenhum aminoácido ou Gly;

e n é um número inteiro entre 1 e 10, de preferência um número inteiro entre 2 e 6, de preferência um número inteiro entre 4 e 6, ou ainda mais preferivelmente, um número inteiro entre 3 e 4;

e onde R1 é nenhum aminoácido, Cys ou uma sequência de peptídeo selecionada entre

Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys
 (SEQ ID NO: 48)

e seus fragmentos truncados no terminal N, incluindo

Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Glu-Ala-Thr-Lys-Cys,
 Ala-Thr-Lys-Cys,
 Thr-Lys-Cys,

e

Lys-Cys,

e onde R2 é nenhum aminoácido, Pro ou uma sequência de peptídeo selecionada entre

Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:49)

e seus fragmentos truncados no terminal C, incluindo

Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys,

Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile,

Pro-Pro-Val-Ser-Cys,

Pro-Pro-Val-Ser,

Pro-Pro-Val, e

Pro-Pro;

[00019] Ainda mais preferivelmente, o peptídeo biologicamente ativo pode ser selecionado entre os peptídeos

Ac-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg-NH₂ (SEQ ID NO:4)

Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:5)

Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:6)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:7)

Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:8)

Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:9)

Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:10)

Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:11)

Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:12)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:13)

Cys-Phe-Ala-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:14)

Cys-Phe-Gln-Trp-Ala-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:15)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Ala-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:16)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:17)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Ala-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:18)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Ala-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:19)

Cys-Phe-Gln-Leu-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:20)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Lys-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:21)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Leu-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:22)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Arg-Val-Arg (SEQ ID NO:23)

Cys-Phe-Gln-Trp-Orn-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:24)

Cys-Phe-Gln-Trp-Nle-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:25)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Orn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:26)

Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Nle-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:27)

Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:28)

Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:29)

Cys-Phe-Ala-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:30)

Cys-Phe-Ala-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:31)

Cys-Phe-Gln-Leu-Gln-Lys-Asn-Met-Lys-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:32)

Cys-Phe-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Met-Lys-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO:33)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:34)

Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:35)

Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:36)

Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:37)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys (SEQ ID NO:38)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile (SEQ ID NO:39)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys (SEQ ID NO:40)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:41)

Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:42)

Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:43)

Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg (SEQ ID NO:44)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys (SEQ ID NO:45)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile (SEQ ID NO:46)

Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys (SEQ ID NO:47),e

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Ac-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Ac-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH₂
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH₂
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH₂
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH₂
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg-NH₂
 |
 Ac-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Lys-NH₂
 |
 Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser;

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH₂
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-Pro-Pro-Val-Ser-CysM-Ile-Lys-Arg
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH₂
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Glu-NH₂
 |
 Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;
 (SEQ ID NO: 50)

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;
 (SEQ ID NO: 51)

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;
 (SEQ ID NO: 52)

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;
 (SEQ ID NO: 53)

Ac-Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;
 (SEQ ID NO: 54)

Ala-Thr-Lys-CysM-
 -Phe-Gln-Trp-Lys-Arg-Ala-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;
 (SEQ ID NO: 55)

[00020] Com a maior preferência, o peptídeo biologicamente ativo é selecionado entre os peptídeos

Ac-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg-NH₂ (SEQ ID NO:4)

e

Ac-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Ser-Arg-Arg-Arg-Gly-NH₂;
(SEQ ID NO: 50)

[00021] Os peptídeos que compreendem dois resíduos de cisteína podem estar na forma de uma estrutura peptídica cíclica, onde as duas cisteínas formam uma ponte de cisteína.

[00022] Consequentemente, um peptídeo biologicamente ativo preferido é o peptídeo

Ac-Glu-Ala-Thr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg
|
H₂N-Arg-Lys-Ile-Cys-Ser-Val-Pro-Pro-Gly-Arg-Val-Lys (SEQ ID NO:56)

[00023] Quando presente, pode ser vantajoso substituir o aminoácido Cys por uma acetamidometil-cisteína (indicada como CysM), para evitar que o peptídeo forme uma ponte dissulfeto com outro peptídeo que compreende uma cisteína.

[00024] De acordo com um aspecto preferido da invenção, a extremidade do terminal carboxila do peptídeo foi capeada, isto é, o grupo NH₂ livre na extremidade do terminal carboxila foi transformado, por exemplo, por acetilação, na amida CH₃CONH- (indicada como Ac-).

[00025] De acordo com ainda outro aspecto da invenção, as extremidades do terminal carboxila e do terminal amino do peptídeo foram capeadas.

[00026] No caso em que um peptídeo de acordo com a invenção está descrito como sendo nãocapeado na extremidade do terminal carboxila e/ou na extremidade do terminal amino, é possível também, de acordo com a invenção, usar o peptídeo nãocapeado correspondente.

[00027] A vantagem das versões capeadas é que os aminoácidos dos terminais N e C destes peptídeos são neutros e sem carga elétrica, e assim sendo, tem propriedades eletrostáticas alteradas. Supondo que os receptores se ligam às sequências correspondentes

de lactoferrina humana, onde não há cargas dos terminais C e N, os peptídeos capeados devem se ligar melhor, pois eles neste aspecto se assemelham mais à proteína nativa do que os peptídeos nãocapeados.

[00028] De preferência, o peptídeo biologicamente ativo está presente na composição farmacêutica em uma concentração entre 0,1 mg/mL e 100 mg/mL, mais preferivelmente, entre 0,5 mg/mL e 25 mg/mL.

[00029] O peptídeo biologicamente ativo pode estar presente na forma de um sal farmaceuticamente aceitável.

[00030] De preferência, o ácido hialurônico de alto peso molecular tem um peso molecular mais alto do que 300.000 Da, mais preferivelmente, mais alto do que 800.000 Da.

[00031] De preferência, o ácido hialurônico de alto peso molecular está presente na composição farmacêutica em uma concentração entre 0,1 e 10% em peso (p/p), mais preferivelmente, entre 0,5 e 2,5% em peso (p/p).

[00032] O ácido hialurônico de alto peso molecular pode estar presente na forma de um sal farmaceuticamente aceitável.

[00033] As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser usadas para prevenir a formação de cicatrizes, aderências, queloides pós-cirúrgicos em conexão com procedimentos cirúrgicos em vários tecidos tais como pele, músculos, tendões, tecido nervoso, vasos sanguíneos, e em diferentes locais do corpo tais como olhos, ouvidos, corda vocal, mão, cordão espinhal, cavidade intra-abdominal, cavidade intratorácica, cavidade intranasal, cavidade oral, procedimentos ginecológicos, endometriose, fimose.

[00034] Os presentes inventores descobriram inesperadamente que o efeito biológico dos peptídeos derivados de lactoferina humana pode ser intensificado significativamente caso os peptídeos sejam

administrados em uma composição farmacêutica que compreende o peptídeo junto com um ácido hialurônico de alto peso molecular.

[00035] Esta intensificação não pode ser explicada apenas por um possível efeito do ácido hialurônico em si, mas se deve a um efeito sinérgico inesperado.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00036] A figura 1 representa os comportamentos de géis de hialuronato de sódio carregados com PXL01 a 37 °C. A concentração de PXL01 é 6 mg/mL em solução de hialuronato de sódio a 1,5%. O fármaco liberado cumulativo foi expresso como a % de fármaco liberado no tempo t. Os dados estão indicados como média $\pm$ SDV de três preparações independentes do produto com a linha de tendência da média móvel adicionada.

[00037] A figura 2 representa que PXL01 impede a formação de aderências em modelo murino de cirurgia abdominal. (A) A incidência da formação de aderências entre os locais lesionados da parede abdominal e ceco, apresentada como porcentagem de animais que desenvolveram aderência de parede a parede conectando estas lesões em cada grupo. (B) A escala de pontuação de aderência ilustrando o número total de aderências encontradas na cavidade abdominal apresentada como média $\pm$ SEM. (C) As pontuações da aderência de acordo com a escala de Nair apresentadas como média $\pm$ SEM (critérios de pontuação listados nos exemplos). (D) Porcentagem de animais sem qualquer formação de aderência na cavidade abdominal em cada grupo. (E) Mudança de peso durante os 6 dias de sobrevivência depois de cirurgia apresentada como porcentagem do peso inicial; n (controle) = 20, n (1 administração de 0,5 mL de PXL01 (6 mg/mL em dH₂O) = 10, n (3 administrações de 0,5 mL de PXL01 (2 mg/mL) em dH₂O em conexão com a operação e 24 e 48 h após a cirurgia) = 18, n (1 administração hialuronato de sódio a 1,5%)

= 20, n (1 administração de 1 mL de PXL01(1,5 mg/mL) em hialuronato de sódio a 1,5%) = 10. A significância estatística foi estimada pelo teste exato de Fisher (A, D) ou pelo teste não-paramétrico de Mann Whitney (B, C) *, $p < 0,01$ indicam diferença estatística em comparação como grupo de animais do controle cirúrgico. Adm = administração; SH = hialuronato de sódio; dH₂O = água destilada.

EXEMPLOS

Experimentais

Peptídeo

[00038] O peptídeo PXL01 (SEQ ID NO: 56) foi usado nos experimentos.

[00039] Preparação de PXL01 em hidrogéis de hialuronato de sódio

[00040] PXL01 dissolvido em solução de cloreto de sódio foi adicionado a uma solução de hialuronato de sódio a 2,5% em uma razão volumétrica de 2/5 de solução de PXL01 e 3/5 de solução de hialuronato de sódio, para obter 1,5 ou 6 mg/mL de PXL01 em hialuronato de sódio a 1,5%, As soluções foram homogeneizadas sugando as misturas várias vezes através de agulhas com diâmetro de 2,1 mm.

Caracterização do Produto Formulado

[00041] A concentração de PXL01 e a homogeneidade em hialuronato de sódio foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho com detector de UV (Agilent modelo 1100) a 220 nm. A coluna analítica usada foi uma Vydac 218TP (C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm). As fases móveis usadas (0,1% de TFA em água contendo 1% de acetonitrila (solvente A) e 0,1% de TFA em acetonitrila (solvente B)) foram operadas em um gradiente com uma vazão de 1,0 mL/min. Padrões de PXL01 diluídos foram aplicados para criar curvas de calibração.

[00042] As amostras foram preparadas adicionando a solução de

hialuronidase (hialuronidase a partir de *Streptomyces hyalurolyticus*, Sigma-aldrich, St. Louis, MO) com uma atividade enzimática de 500 unidades/mL para soluções de amostras. As misturas foram agitadas por 2 h à temperatura ambiente e as amostras foram diluídas conforme necessário com TFA em água, e em seguida, misturação adicional. As amostras foram centrifugadas a 7.000 rpm por 5 min antes da injeção na coluna.

Instalação do Sistema de Liberação *in vitro*

[00043] 0,25 mL do produto formulado foi colocado dentro do poço da placa de cultura de tecidos (Placa de Cultura de Tecidos com 24 Poços Planos; Techno Plastic Products AG), resultando em uma película fina de aproximadamente 1,3 mm. As placas foram colocadas dentro do termostato (37 °C) por 1h para permitir que o produto atinja a temperatura de 37 °C. 0,5 mL do meio de liberação (PBS, pH 7,4) reequilibrado a 37 °C foi acamado cuidadosamente sobre a superfície do gel e as placas de cultura de tecidos foram transferidas para dentro de uma bateadeira termostática (60 rpm, 37 °C). Em intervalos de tempo predeterminados, frações de 10 micromols da solução aquosa foram retiradas do meio de liberação. A concentração do PXL01 liberada foi monitorada no comprimento de onda de 230 nm, usando uma medição espectrofotométrica. Devido ao fato de que a medição da absorvância a 230 nm pôde detectar o peptídeo bem como o hialuroanto de sódio dissolvido no meio de liberação, foi usado um meio de liberação que tem a mesma quantidade de hialuronato de sódio sem qualquer PXL01 como aquele de hialuronato de sódio com fármaco.

Modelos Animais para Avaliação da Prevenção de Aderências pós-Cirúrgicas

[00044] Ratos Sprague-Dawley fêmeos (200-250 g, Charles River Laboratories, Sulzfeldt, Alemanha) foram mantidos em um ciclo de

iluminação/escurecimento de 12 horas e foram cuidados de acordo com os regulamentos para a proteção de cobaias. O estudo foi realizado depois da aprovação prévia por parte do comitê ético local.

[00045] A abrasão e a excisão do ceco da parede abdominal foram realizadas para induzir aderências recorrentes como descrito anteriormente (Harris *et al.*, "Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents", *Surgery* 117:663-669 (1995)). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com isoflurano (Isoba®vet, Shering-Plough, Animal Health, Farum, Dinamarca), e buprenorfina (48 µg/kg, Temgesic, Shering-Plough, Bruxelas, Bélgica) foi dada como analgésico pós-operatório. Uma incisão com 5cm de comprimento na linha mediana do abdome foi realizada e uma lesão retangular na profundidade inteira (5 mm x 25 mm) foi feita sobre a parede peritoneal através do peritônio parietal e da fáscia muscular. Além disso, uma área da membrana serosa sobre ambos lados do ceco, de aproximadamente 10 mm x 15 mm, foi esfregada suavemente usando gaze de algodão até aparecerem hemorragias petequiais. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente no grupo de controle não tratado e grupos tratados. O excesso de sangue na lesão foi removido e a substância em teste foi aplicada sobre as áreas que sofreram abrasão, usando uma seringa. A ferida da laparotomia foi fechada com uma sutura contínua e a pele foi fechada com cliques metálicos (Appose ULC35W, TycoHealthcare Group LP, Norwalk, CT, EUA). Os animais foram sacrificados 6 dias depois da cirurgia com uma overdose de pentobarbital sódico (Pentobarbital vet, APL, Estocolmo, Suécia). O abdome foi aberto e as aderências foram pontuadas por um avaliador desconhecido quanto ao tratamento. A incidência de aderências entre a incisão abdominal e o ceco que sofreu abrasão foi quantificada como uma porcentagem de animais que desenvolveram aderência de

parede a parede conectando estas lesões, em cada grupo. Adicionalmente, para avaliar de forma abrangente o número total de aderências formadas na cavidade abdominal, incluindo aderências longe do traumatismo cirúrgico, dois diferentes esquemas de graduação foram usados. A escala de pontuação cumulativa descrita por Bothin (Bothin *et al.*, "The intestinal flora influences adhesion formation around surgical anastomoses", *Br. J. Surg.* 88:143-145 (2001)) designa o número total de aderências presentes na cavidade abdominal: um ponto é dado para cada aderência observada e os pontos são somados para formar a pontuação. A escala de pontuação de aderências de acordo com Nair (Nair *et al.*, "Role of proteolytica enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions", *Arch. Surg.* 108:849-85 (1974)) incorpora o número total de aderências e também a incidência de aderências entre órgãos-alvo, enquanto que uma graduação mais alta é dada para esta última (0, nenhuma aderência; 1, uma única banda de aderências a partir das vísceras até o órgão-alvo; 2, duas bandas de aderências a partir das vísceras até o órgão-alvo; 3, mais do que duas bandas de aderências a partir das vísceras até o órgão-alvo; 4, vísceras diretamente aderentes à parede abdominal, independentemente do número e extensão de bandas de aderências). Finalmente, a porcentagem de ratos sem qualquer aderência abdominal foi avaliada em cada grupo. Quaisquer sinais possíveis de inflamação peritoneal (eritema e/ou edema) ou cicatrização de ferida rebentada foram registrados com relação às necropsias. Como um marcador genérico para bem-estar, os pesos corporais dos animais antes e 6 dias depois da cirurgia foram comparados.

[00046] Modelo de Anastomose do Intestino Grosso no Rato

[00047] Ratos Sprague-Dawley fêmeos (200-250 g, Charles River Laboratories, Sulzfeldt, Alemanha) foram mantidos em um ciclo de

iluminação/escurecimento de 12 horas e foram cuidados de acordo com os regulamentos para a proteção de cobaias. O estudo foi realizado depois da aprovação prévia por parte do comitê ético local. A anestesia foi induzida com isoflurano (Isoba®vet, Shering-Plough, Animal Healthy, Farum, Dinamarca), e os ratos receberam buprenorfina (48 µg/kg, Temgesic, Shering-Plough, Bruxelas, Bélgica) por via intramuscular para aliviar a dor pós-operatória, e Bimotrim (80 mg/kg; Bimeda, Reino Unido) por via subcutânea antes da cirurgia.

[00048] A parede abdominal foi raspada e uma laparotomia na linha mediana com aproximadamente 3 cm foi realizada. O cólon foi exposto e sofreu transeção 2 cm longe do ceco. Uma anastomose seromuscular de uma extremidade à outra foi realizada com 8 suturas interrompidas usando filamento de monocryl 6/0 (Y432H, Ethicon Inc., St-Stevens Woluwe, Bélgica). Um tubo foi colocado no cólon na anastomose como sonda durante a sutura. Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos que receberam PXL01 (6 mg/mL) em hialuronato de sódio a 1,5% cobrindo a anastomose e circundando o peritônio (n= 8). O abdome foi fechado com uma sutura contínua (monocryl 4-0, Y3100H, Ethicon Inc.) na camada muscular e com grampos na pele. 2mL de solução salina isotônica foram administrados por via subcutânea para impedir desidratação.

[00049] Os animais receberam doses adicionais de buprenorfina (24 µg/kg; Temgesic, Shering-Plough, Bruxelas) por via subcutânea duas vezes ao dia por dois dias depois da cirurgia. Os animais foram sacrificados 7 dias depois da cirurgia com uma overdose de pentobarbital sódico (Pentobarbital vet, APL, Estocolmo, Suécia). O abdome foi aberto e um segmento intestinal com 4 cm de comprimento foi ressecado com a área da anastomose localizada no meio. Um tubo conectado a um monitor de pressão foi inserido dentro de um lado do segmento intestinal e o outro lado foi ligado na extremidade.

O segmento intestinal foi colocado imediatamente sob cloreto de sódio isotônico, solução salina corada foi infundida através do tubo para dentro do segmento intestinal, e a pressão intraluminal foi monitorada usando um gravador Grass (Grass Instruments Co., Ohio, EUA). A pressão máxima antes da explosão anastomótica foi registrada como a pressão de explosão. O aparecimento da solução salina corada ao redor da anastomose indicou o ponto no tempo para a explosão. O avaliador desconhecia qual tratamento cada animal recebeu.

RESULTADOS

Comportamento da Liberação de PXL01 em Hialuronato de Sódio

[00050] PXL01 dissolvido em solução de cloreto de sódio foi misturado com a solução de hialuronato de sódio, resultando em um hidrogel homogêneo que contém PXL01. Os experimentos *in vitro* da liberação revelaram uma liberação explosiva de PXL01 a partir da formulação de gel de hialuronato de sódio com aproximadamente 70% de PXL01 liberados dentro de 1 hora (figura 1). O comportamento da liberação caracterizado por uma explosão inicial já está demonstrado para outros compostos solúveis formulados em hialuronato de sódio (Sherwood *et al.*, "Controlled antibody delivery systems", *Biotechnology* (NY) 10:1446-1449 (1992)). Isto pode ter um uso funcional em produzir uma dose inicial durante a distribuição do fármaco, minimizando qualquer período de retardo. O importante é que os perfis de liberação de PXL01 a partir dos produtos formulados preparados em três ocasiões independentes eram largamente sobrepostos, indicando que a preparação de géis de hialuronato de sódio carregados com PXL01 é altamente reprodutível.

Prevenção de Aderências Peritoneais por PXL01

[00051] O modelo de abrasão do ceco causando defeito na parede lateral em ratos (Arnold *et al.*, supra) foi usado para elucidar o efeito antiaderências de PXL01. Este modelo produz aderências confiáveis

e consistentes entre as duas superfícies lesionadas, caso nenhum tratamento seja dado, sendo que 85% dos ratos no grupo de controle desenvolvem aderências diretas da parede peritoneal do ceco (figura 2A). Nenhuma redução significativa na formação de aderências foi observada quando 3 mg de PXL01 em solução aquosa foram administrados como dose única com relação à cirurgia (figuras 2A-D). Entretanto, os animais tratados com 3 doses de 1 mg de PXL01 em solução aquosa demonstraram redução acentuada na formação de aderências em comparação com o grupo de ratos do controle (figuras 2A, C). Estes resultados indicam que uma liberação lenta de PXL01 na área cirúrgica é benéfica, em comparação com o tratamento único com a solução aquosa do peptídeo.

[00052] Hialuronato de sódio foi escolhido como veículo para conseguir liberação controlada de PXL01. PXL01 parece facilmente solúvel e suficientemente estável em hialuronato de sódio, e também o hidrogel de hialuronato de sódio carregado que contém PXL01 é bioaderente e fácil de aplicar à área cirúrgica usando uma seringa. Quando PXL01 foi aplicado na formulação de hialuronato de sódio de alto peso molecular a 1,5%, a formação de aderências abdominais foi reduzida significativamente, em comparação com o grupo de controle. Houve uma redução de 4 vezes de acordo com a escala de pontuação cumulativa de aderências (figura 2B) e uma redução de mais de 3 vezes da pontuação de aderências de acordo com Nair (figura 2C). 60% dos animais tratados com 6 mg/mL de PXL01 em hialuronato de sódio estavam completamente livres de aderências em comparação com 5% dos animais no grupo de controle e 20% dos animais no grupo tratado com hialuronato de sódio (figura 2D). Por várias escalas de pontuação, o hialuronato de sódio *per se* demonstrou reduzir a formação de aderências, presumivelmente devido ao efeito de barreira física (Burns *et al.*, "Prevention of tissue injury and postsurgical

adhesions by precoating tissues with hyaluronic acid solutions", *J. Surg. Res.* 59:644-652 (1995)).

[00053] Nenhum efeito adverso relacionado ao tratamento foi registrado durante o estudo quanto à cicatrização de feridas ou inflamação peritoneal avaliado durante necropsias. Além disso, o peso corporal médio dos ratos nos grupos de tratamento foi aumentado em comparação com seus pesos antes da cirurgia, embora a diferença comparada com o grupo de controle não atingisse significância estatística (figura 2E). O importante é que PXL01 em hialuronato de sódio administrado ao redor da anastomose intestinal não reduziu o potencial de cicatrização estimado pela pressão de explosão da anastomose medida 7 dias depois da cirurgia (pressão de explosão para o grupo de tratamento ($n = 8$) de $206,3 \pm 14,3$ mm de Hg versus $197,4 \pm 9,6$ mm de Hg no grupo simulado ($n = 8$)).

[00054] A capacidade de PXL01 para prevenir aderências foi limitada em solução aquosa (figuras 2A–D), possivelmente devido ao fato de que o peptídeo é eliminado rapidamente a partir do peritônio. Entretanto, o peptídeo foi altamente eficaz formulado em hialuronato de sódio (figuras 2A–D), causando redução significativa de aderências de acordo com diferentes escalas de graduação que englobam as aderências formadas entre as duas superfícies lesionadas bem c nas áreas abdominais longe do local de aplicação. O hialuronato de sódio, um componente natural da matriz extracelular, e catabolizado localmente ou transportado para os nodos linfáticos ou para a circulação geral, de onde ele é depurado pelas células endoteliais do fígado (Fraser *et al.*, "Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue", *Biochem. J.* 256:153-158 (1988); Laurent & Fraser, "Hyaluronan", *Faseb J.* 6 2397-2404 (1992)). O hialuronato de sódio possivelmente intensifica o efeito de PXL01 por manter concentrações locais do fármaco através de liberação controlada. Experimentos *in*

vitro indicam um período relativamente breve da liberação de PXL01 a partir do hialuronato de sódio (figura 1), sugerindo que a duração da liberação do fármaco necessária para a prevenção de aderências *in vivo* pode ser um tanto limitada. Isto está em linha com as evidências anteriores que os episódios críticos na formação de aderências na cavidade abdominal ocorrem nas primeiras 36 horas (Harris *et al.*, "Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents", *Surgery* 117:663-669 (1995)). Anteriormente, vários sistemas veículos baseados em micropartículas demonstraram induzir aderências ou causar inflamação (Hockel *et al.*, "Prevention of peritoneal adhesions in the rat with sustained intraperitoneal dexamethasone delivered by a novel therapeutic system", *Ann. Chir. Gynaecol.* 76:306-313 (1987); Kohane *et al.*, "Biodegradable polymeric microspheres and nanospheres for drug delivery in the peritoneum", *J. Biomed. Mater. Res. A* 77:351-361)). Nenhum episódio adverso óbvio tal como frouxidão, inflamação peritoneal, ou inibição da cicatrização de feridas foi observado nos animais tratados com PXL01 em qualquer concentração. Na hora do sacrifício, todos os grupos de tratamento tinham mantido ou excedido seus pesos de antes da cirurgia (figura 2E). O importante é que o PXL01 em hialuronato de sódio administrado ao redor da anastomose intestinal não interferiu com o potencial de cicatrização da anastomose.

[00055] Resumindo, os presentes inventores descrevem uma observação inesperada que o efeito biológico dos peptídeos derivados de lactoferrina humana sobre a prevenção da formação de aderências pós-cirúrgicas pode ser intensificado significativamente caso os peptídeos sejam administrados em uma composição farmacêutica que compreende o peptídeo junto com um ácido hialurônico de alto peso molecular. O efeito é significativamente sinérgico em comparação

com o efeito do peptídeo e o efeito do ácido hialurônico, dados independentemente. Anteriormente, vários sistemas veículos baseados em micropartículas demonstraram induzir aderências ou causar inflamação (Hockel *et al.*, 1887, *supra*; Kohane *et al.*, 2006, *supra*). Além disso, aplicações de barreiras físicas para a prevenção de aderências demonstraram levar a efeitos adversos tais como vazamento da anastomose, devido à interferência com o processo de cicatrização de feridas (diZerega *et al.*, 2002, *supra*). No presente estudo, o hialuronato de sódio demonstrou não aumentar aderências, mas ao invés disso, atua de forma sinérgica com peptídeos de lactoferrina na prevenção de aderências. O importante é que a administração dos peptídeos em hialuronato de sódio não foi associada a qualquer preocupação de segurança quanto à cicatrização de anastomose, e assim sendo, o produto demonstrou o perfil de segurança superior em comparação com os agentes contra aderências descritos anteriormente. O gelo de hialuronato de sódio carregado com peptídeo é fácil de manusear e administrar e é compatível com laparotomia ou laparoscopia. Em conjunto, espera-se que o produto proporcione um esquema abrangente de prevenção de aderências prevenindo não apenas as aderências que se formam em locais de procedimentos operatórios, mas também as aderências recorrentes que se forma em locais não envolvidos diretamente em cirurgia devido à lesão tecidual involuntária durante a manipulação cirúrgica, sem causar quaisquer efeitos adversos sobre a cicatrização.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) um ou mais peptídeos biologicamente ativos que compreendem a sequência de aminoácidos Phe-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-Lys-Val-Arg (SEQ ID NO: 1),

em que o aminoácido X1 é Gln ou Ala, o aminoácido X2 é Trp ou Leu, o aminoácido X3 é Gln, Ala, Orn, Nle ou Lys, o aminoácido X4 é Arg, Ala ou Lys, o aminoácido X5 é Asn, Ala, Orn ou Nle, o aminoácido X6 é Met, Ala ou Leu, o aminoácido X7 é Arg, Ala ou Lys, e

(ii) um ácido hialurônico de alto peso molecular ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que o referido ácido hialurônico de alto peso molecular tem um peso molecular médio mais alto do que 300.000 Da.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peptídeo biologicamente ativo é um peptídeo que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peptídeo biologicamente ativo é um peptídeo que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 56.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peptídeo biologicamente ativo é um peptídeo que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 50.

5. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o ácido hialurônico de alto peso molecular tem um peso molecular médio mais

alto do que 800.000 Da.

6. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o peptídeo está presente em uma concentração entre 0,1 mg/mL e 100 mg/mL.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o peptídeo está presente em uma concentração entre 0,5 mg/mL e 25 mg/mL.

8. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o ácido hialurônico está presente em uma concentração entre 0,1 e 10% em peso.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o ácido hialurônico está presente em uma concentração entre 0,5 e 2,5% em peso.

10. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que é para uso na prevenção da formação de cicatrizes pós-cirúrgicas relacionadas a procedimentos cirúrgicos.

11. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que é para uso na prevenção da formação de aderências pós-cirúrgicas relacionadas a procedimentos cirúrgicos.

12. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que é para uso na prevenção da formação de queloides pós-cirúrgicos relacionados a procedimentos cirúrgicos.

FIG. 1

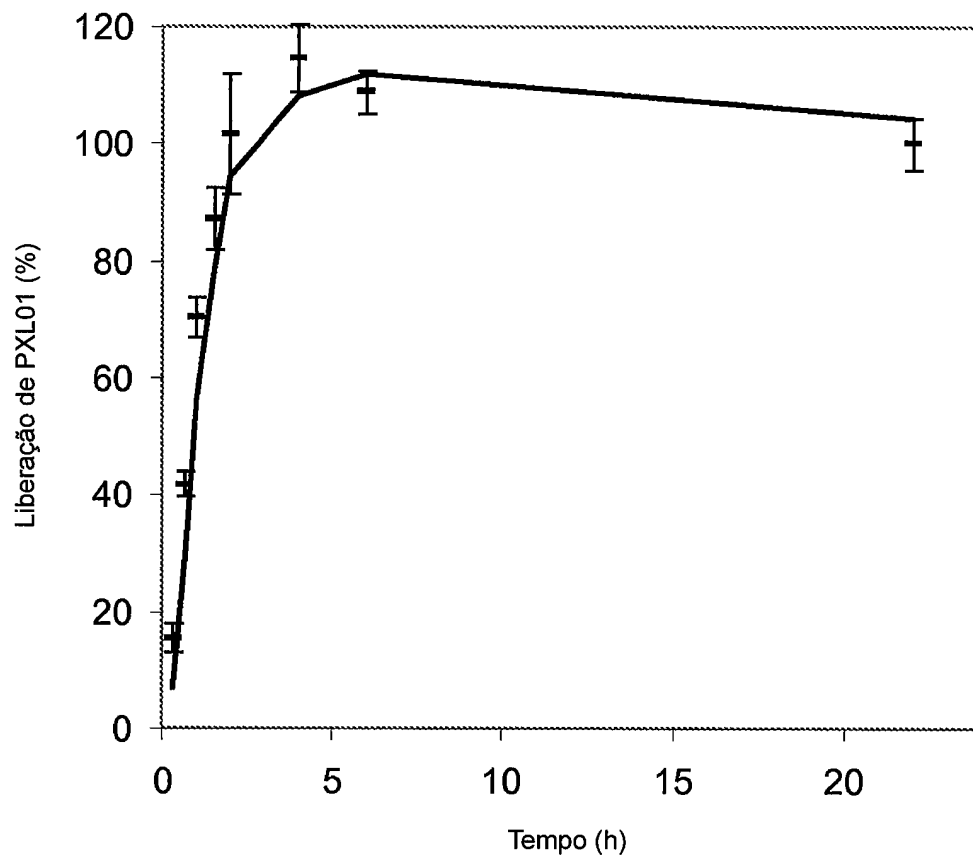


FIG. 2

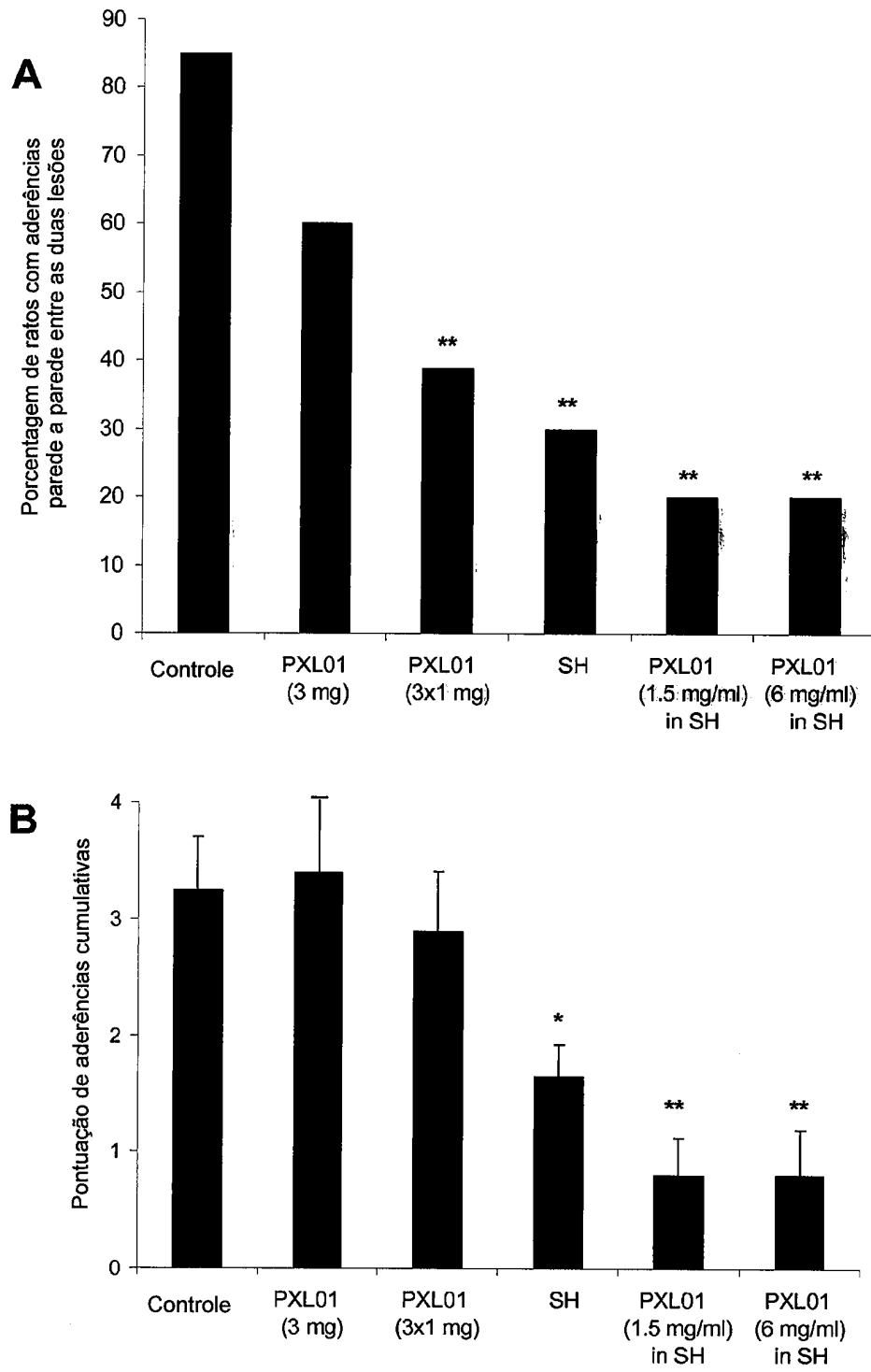


FIG. 2 continuação

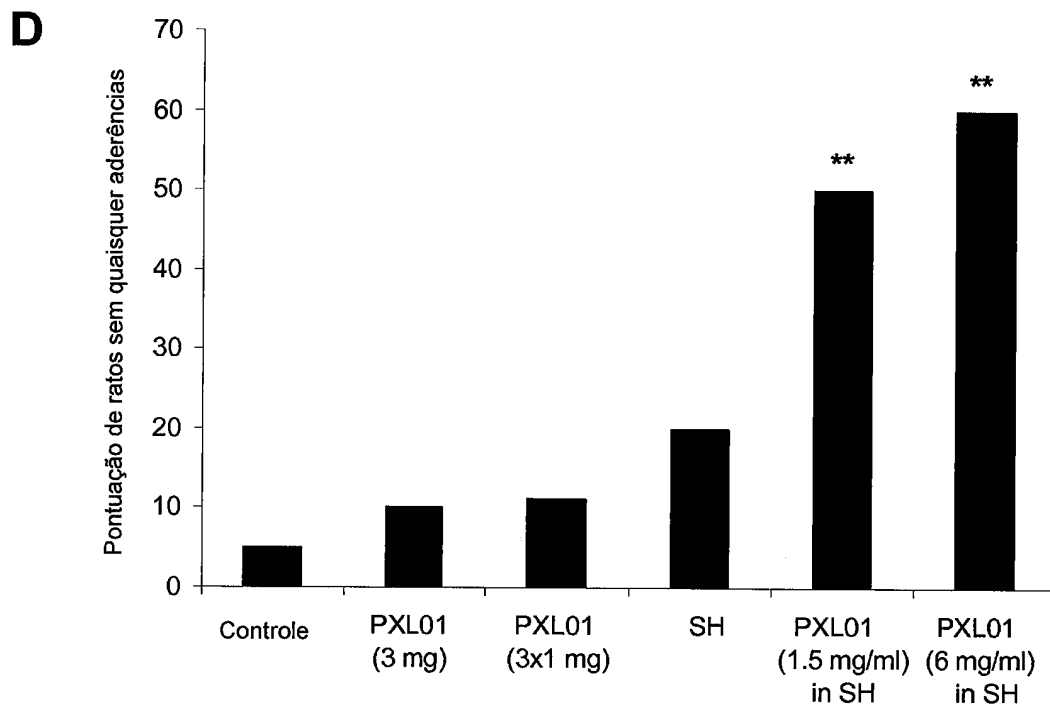
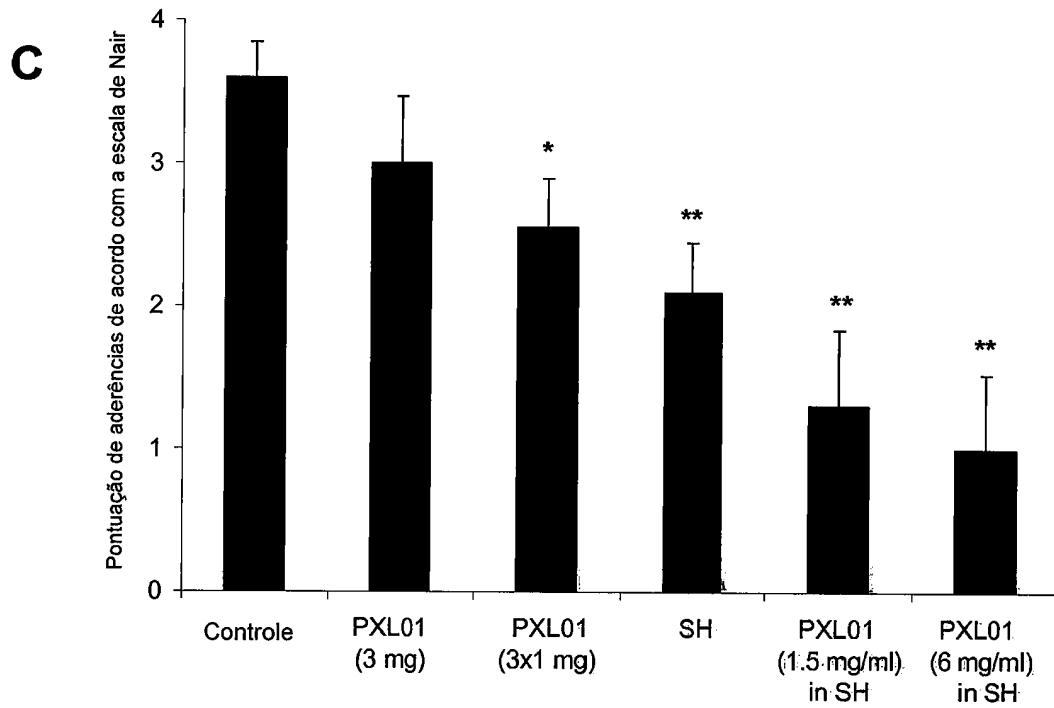


FIG. 2 continuação

E