



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

(11) PI 0915262-8 B1



(22) Data do Depósito: 11/11/2009

(45) Data de Concessão: 05/06/2018

(54) Título: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UM POLIPEPTÍDEO DE FATOR-9 DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO

(51) Int.Cl.: A61Q 7/00

(30) Prioridade Unionista: 12/11/2008 US 61/114,028

(73) Titular(es): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

(72) Inventor(es): GEORGE COTSARELIS; OHSANG KWON

**"COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UM POLIPEPTÍDEO DE FATOR-9 DE
CRESCEIMENTO DE FIBROBLASTO"**

DECLARAÇÃO DE INTERESSE GOVERNAMENTAL

Esta invenção foi realizada, no todo ou em parte,
5 com suporte governamental sob o Número de Concessão NIH/NIAMS
AR46837, concedido pelo *National Institutes of Health*. O Governo
dos Estados Unidos pode ter certos direitos sobre a invenção.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício de prioridade
10 do Pedido Provisório U.S. No. 61/114.028, depositado em 12 de
novembro de 2008, o qual é aqui incorporado por referência em sua
totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere a composições e a métodos
15 farmacêuticos para o tratamento de perda de cabelos e para a
regeneração de folículos pilosos. De maneira específica, a
invenção se refere a polipeptídeos de fator-9 de crescimento de
fibroblasto para o tratamento de perda de cabelos ou para a
regeneração de folículos pilosos.

20 **HISTÓRICO DA INVENÇÃO**

A neogênese folicular é definida como a geração
de novos folículos pilosos (HF) depois do nascimento. Os seres
humanos são paridos com um complemento total de HFs, que pode
mudar de características de tamanho e de crescimento, como na
25 calvície precoce, ou podem, finalmente, se degenerar e
desaparecer, nos estágios tardios da calvície ou nas alopecias
envolvendo cicatrizes (cicatriciais). Portanto, a geração de novos
HFs é desejável no tratamento da calvície comum, assim como nas
30 condições de perda de cabelos comuns, tais como lúpus eritematoso
discoide, hipotricose congênita, líquen planopilaris, e outras
alopecias envolvendo cicatrizes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece métodos de tratamento
de perda de cabelos, de tratamento, inibição ou supressão de um

distúrbio de pele degenerativo, e de tratamento de alopecia androgenética (AGA) em um paciente e de geração de novos folículos pilosos (HFs) e de aumento do tamanho dos HFs existentes, compreendendo o rompimento epidérmico ou administração de wnt, e
5 administração de um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ou de outro composto que regule à montante a sinalização de gene sonic hedgehog.

Assim, em uma modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de perda de cabelos em um
10 paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em uma modalidade, a perda de cabelos é devida à alopecia androgenética (AGA). Em uma modalidade, a AGA é calvície de padrão feminino, Em uma modalidade, a perda de cabelo é o resultado de uma lesão à pele. Em uma modalidade, a perda de cabelos é no couro cabeludo ou na sobrancelha do paciente. Em uma modalidade, a perda de cabelos é em tecido de pele cicatrizado do paciente. Em uma modalidade, a etapa de administração é realizada
20 3-12 dias depois da etapa de rompimento. Em uma modalidade, a etapa de administração é realizada por exposição da região da perda de cabelos a um estímulo mecânico, químico ou óptico. Em uma modalidade, o estímulo óptico é radiação. Em uma modalidade, a etapa de administração é via administração tópica. Em uma
25 modalidade, a etapa de administração é via administração subepidérmica.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para gerar um folículo piloso na derme de um paciente com perda de cabelos, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar o tamanho de um folículo piloso na derme de um paciente com perda de cabelos, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no

paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar a formação de folículos pilosos na pele de 5 um paciente com perda de cabelos, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece 10 um método para tratar, inibir ou suprimir um distúrbio de pele degenerativo, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região do distúrbio de pele degenerativo no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece 15 um método para tratar uma alopecia androgenética (AGA) em um couro cabeludo de um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da AGA no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de 20 crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de perda de cabelos em um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de 25 fibroblasto e de um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar o tamanho de um folículo piloso na derme de um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento 30 de fibroblasto e de um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar a formação de folículos pilosos na pele de um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento 35 de fibroblasto e de um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar, inibir ou suprimir um distúrbio de pele

degenerativo, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e de um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece
5 um método para tratar uma alopecia androgenética (AGA) em um couro cabeludo de um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e de um polipeptídeo de wnt ao paciente.

10 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar perda de cabelos em um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene
15 *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece
um método para gerar um folículo piloso na derme de um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição
20 compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece
um método para aumentar o tamanho de um folículo piloso na derme
25 de um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece
um método para aumentar a formação de folículos pilosos na pele de
30 um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece
35 um método para tratar, inibir ou suprimir um distúrbio de pele degenerativo, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b)

administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar uma alopecia androgenética (AGA) em um couro 5 cabeludo de um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Outras características e vantagens da presente 10 invenção tornar-se-ão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada, exemplos e figuras. Entretanto, deve ser entendido que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indicando modalidades preferidas da invenção são dadas somente por meio de ilustração, uma vez que várias mudanças e modificações dentro do 15 espírito e do escopo da invenção tornar-se-ão para os técnicos no assunto a partir desta descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. FGF9 é expresso durante o período 20 indutivo de regeneração de folículos pilosos no Dia 1 depois do descolamento do sangue coagulado (SD). É apresentada a razão de mARN de FGF9 comparada a q-PCR de expressão de mARN de controle de expressão de mARN de FGF9 em epiderme regenerada.

Figura 2. Imunotintimento de $\gamma\delta$ TCR de epiderme 25 regenerada (SD7, monte integral (*Wholmount*) (x200) e imunotintimento de FGF9 de amostra SD1 (seção congelada) (x400).

Figura 3. Imunotintimento de $\gamma\delta$ TCR & FGF9 de epiderme regenerada para amostra SD1.

Figura 4. Imunotintimento de $\gamma\delta$ TCR & FGF9 de pele embrionária de E14.

Figura 5. Especificidade de anticorpo de 30 neutralização anti-FGF9 para lisado integral embrionário de camundongo E14.5 (pistas 1 e 2) e para hFGF9(+) recombinante.

Figura 6. Experimento de neutralização anti-FGF9 35 em camundongos C57BL/6 de 3 semanas de idade. (A) Programa de tratamento, no qual 50 μ L de 10 μ g/mL de anti-FGF9 ou de controle de isotipo de IgG2a foram injetados subepidérmicamente no dia do

descolamento do sangue coagulado (SD)1-SD4, e tecido foi amostrado no SD5. (B) Números de folículos pilosos depois de injeções de anti-FGF9 ou de controle de IgG2a em camundongos usando o protocolo de tratamento descrito em (A). (C) Diagrama mostrando o 5 sítio de injeção.

Figura 7. Número de folículos pilosos em camundongos tratados como anti-FGF9 versus controles em vários estágios de desenvolvimento do folículo piloso, conforme descrito em Paus R, et al. J Invest Dermatol 1999).

Figura 8. Modelo mostrando como a contagem de 10 germes de cabelos foi conduzida por mm^2 em 3 diferentes campos por cada amostra.

Figura 9. Tratamento com rhFGF9 para três dias em cultura de explante de pele embrionária (E13.5). Culturas foram 15 tratadas com 10, 20 ou 40 ng/mL de rhFGF9 ou tampão de controle durante três dias, e o número de germes de cabelos/ mm^2 foi avaliada conforme descrito na Figura 8. Média \pm DP. *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, comparado ao controle. EDA-A1 (50 ng/mL) foi usado como um controle positivo para o número de germes de cabelos.

Figura 10. Tingimento por imuno-histoquímica 20 mostrando o tingimento com fosfatase alcalina da derme em explantes de pele de controle e embrionários tratados com rhFGF9 (10, 20, 40 ng/mL).

Figura 11. Tratamento com anticorpo de 25 neutralização anti-FGF9 durante três dias em cultura de explante de pele embrionário (E13.5). As culturas foram tratadas com 10, 20 ou 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticorpo de neutralização anti-FGF9 ou controle durante três dias, e o número de germes de cabelos/ mm^2 foi avaliada como descrito na Figura 8.

Figura 12. Tingimento por imuno-histoquímica 30 mostrando tingimento de K17 da epiderme em explantes de pele de controle e tratados com anti-FGF9 (10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Figura 13. Tingimento por imuno-histoquímica 35 mostrando Tingimento por imuno-histoquímica mostrando o tingimento por fosfatase alcalina da derme em explantes de pele de controle e embrionários tratados com anti-FGF9 (10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Figura 14. Efeito de tratamento de 24 h usando rhFGF9 (10, 20, 40 ng/mL) em marcadores de genes de desenvolvimento de folículos pilosos embrionários *sonic hedgehog* (Shh), Ptch1 e Ptch2 por qPCR.

Figura 15. Efeito de tratamento de 24 h usando rhFGF9 (10, 20, 40 ng/mL) em marcadores de genes de desenvolvimento de folículos pilosos embrionários Gli1 e Gli2 por qPCR.

Figura 16. Fgf9 é expresso durante a iniciação de HFN e é importante para HFN. (A) Fgf9 é altamente expresso em epiderme regenerada, antes da formação de folículos pilosos no Dia 1 e 3, depois de re-epitelização com descolamento de sangue coagulado (SD) e diminuiu para o nível basal de epiderme não ferida, Dia 0. *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, média ± desvio padrão. (B) Efeito de neutralização de FGF9 sobre HFN depois de ferimento em camundongos de 3 semanas de idade. O número de folículos pilosos regenerados foi diminuído de maneira significativa nos camundongos tratados com anticorpo de neutralização de anti-FGF9. **: $P < 0,05$. (C) Determinação de estágios de desenvolvimento de folículos pilosos. Folículos pilosos nos camundongos tratados com anti-FGF9 mostraram atraso na maturação de folículos pilosos. (D-E) Ensaio de neogênese de folículos pilosos de monte integral tingido para proteína KRT17 e (F-H) atividade de fosfatase alcalina em epiderme e derme separadas no Dia 5 depois de re-epitelização, respectivamente. A superexpressão de Fgf9 em camundongos *K14rtTA;TRE-Fgf9-IRES-eGfp* resultou em números aumentados de folículos pilosos no Dia 17 depois de ferimento. Barra de escala, 1 mm.

Figura 17. FGF9 é expresso por DETC ativado. (A) Imunotintimento duplo para FGF9 e $\gamma\delta$ TCR. A expressão de Fgf9 em DETCs positivos para $\gamma\delta$ TCR repovoados depois de re-epitelização. Linha tracejada, membrana de base. Barra de escala, 50 μ m. (B) Expressão de gene Fgf9 é altamente regulada à montante nos DETCs isolados depois de ativação com mIL-2 e anti-CD3.

Figura 18. Neogênese de folículos pilosos em camundongos TCRd-/- é severamente prejudicada. (A-D) Amostras epidérmicas e dérmicas de monte integral tratadas para detectar

proteína KRT17 e (E-H) atividade de fosfatase alcalina no Dia 5 depois de re-epitelização. A formação de folículos pilosos foi significativamente impedida em camundongos de 8 semanas e de 40 semanas de idade. Barra de escala, 1 mm. *: $P < 0,05$, média ± erro padrão.

Figura 19. Estágios de desenvolvimento de HFs em ferimentos de controle e tratados com anticorpo anti-fgf9.

Figura 20. A expressão FGF9 em camundongos *K14rtTA;TRE-Fgf9-IRES-eGfp* comparados com camundongos de controle durante 2 dias de tratamento com doxiciclina.

Figura 21. A expressão de FGF9 em DETCs. (A) FGF9 é altamente expressa em células dendríticas suprabasais. Imunotintimento duplo de monte integral de FGF9 e $\gamma\delta$ TCR de epiderme de orelha a partir de camundongo de tipo selvagem sem (B) ou com incubação com IL-2 (C).

Figura 22. A expressão em camundongos *FGF9^{flox/flox}; lck-cre* comparados a controle *FGF9^{flox/flox}*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA PRESENTE INVENÇÃO

A presente invenção se refere a composições e a métodos farmacêuticos para tratamento de perda de cabelos e para regeneração de folículos pilosos. Especificamente, a invenção se refere a polipeptídeos de fator-9 de crescimento de fibroblasto e à administração de um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto para tratamento de perda de cabelos ou para regeneração de folículos pilosos.

A presente invenção fornece métodos de tratamento de perda de cabelos, de tratamento, inibição ou supressão de um distúrbio de pele degenerativo, e de tratamento de alopecia androgenética (AGA) em um paciente e de geração de novos folículos pilosos (HFs) e de aumento do tamanho dos HFs existentes, compreendendo o rompimento epidérmico ou administração de wnt, e administração de um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ou de outro composto que regule à montante a sinalização de gene *sonic hedgehog*.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece métodos de tratamento de perda de cabelos, métodos para gerar um folículo piloso, métodos para aumentar o tamanho de um folículo

5 piloso, métodos para tratar uma alopecia androgenética (AGA), métodos para sustar alopecia, métodos de reversão de alopecia, e métodos de depilação compreendendo a administração de uma composição compreendendo um anticorpo de fator-9 de crescimento de fibroblasto de neutralização para um paciente.

10 Em outra modalidade, uma composição ou método da presente invenção são utilizados sobre a pele humana. Em outra modalidade, a composição ou método são utilizados sobre uma área de crescimento de cabelos não desejados. Em outra modalidade, a área é a face. Em outra modalidade, a área é a área de biquíni. Em outra modalidade, a área é a das pernas. Em outra modalidade, a área é dos braços. Em outra modalidade, a área é a do peito.

15 Em uma modalidade, os métodos da presente invenção incluem a colocação em contato de um paciente com um inibidor de FGF9, SHH, WNT, ou outras composições para uso na presente invenção. Um "inibidor", utilizado nos métodos e nas composições da presente invenção, é, em outra modalidade, um anticorpo que se liga à proteína ou fator biológico que seja o alvo do inibidor. Em outra modalidade, o inibidor é um inibidor 20 farmacológico. Em outra modalidade, o inibidor é qualquer outro tipo de inibidor conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

25 Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de perda de cabelos, compreendendo a etapa de administração de uma composição, compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto, a um paciente.

30 Em uma modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de perda de cabelos em um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

35 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de perda de cabelos em um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de perda de cabelos em um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição 5 compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar uma alopecia androgenética (AGA) em um couro cabeludo de um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento 10 da epiderme na região da AGA no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar uma alopecia androgenética (AGA) em um couro 15 cabeludo de um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar uma alopecia androgenética (AGA) em um couro 20 cabeludo de um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece 25 um método para gerar um folículo piloso na derme de um paciente com perda de cabelos, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece 30 um método para gerar um folículo piloso na derme de um sujeito, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece 35 um método para gerar um folículo piloso na derme de um sujeito, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da

perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece
5 um método para aumentar o tamanho de um folículo piloso na derme de um paciente com perda de cabelos, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

10 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar o tamanho de um folículo piloso na derme de um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e um polipeptídeo de wnt ao paciente.

15 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar o tamanho de um folículo piloso na derme de um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator 20 que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar a formação de folículos pilosos na pele de um paciente com perda de cabelos, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente e 25 (b) administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar a formação de folículos pilosos na pele de um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma 30 composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para aumentar a formação de folículos pilosos na pele de um paciente, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme 35 na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar, inibir ou suprimir um distúrbio de pele degenerativo, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme na região do distúrbio de pele degenerativo no paciente e (b) 5 administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar, inibir ou suprimir um distúrbio de pele degenerativo compreendendo a etapa de administração de uma 10 composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e um polipeptídeo de wnt ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar, inibir ou suprimir um distúrbio de pele degenerativo, compreendendo as etapas de (a) rompimento da epiderme 15 na região da perda de cabelos no paciente e (b) administração de uma composição compreendendo um composto ou fator que regule à montante gene *sonic hedgehog* (SHH) para o paciente.

Em uma modalidade, os métodos da presente 20 invenção tratam, inibem ou suprimem um distúrbio de pele degenerativo. Em uma modalidade, o distúrbio de pele degenerativo é hiperqueratose, hiperpigmentação, despigmentação, atrofia ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um distúrbio degenerativo de pele é calcinose, circunscrita; cútis; colóide 25 mílio; degeneração da pele; NOS de dermatose senil; ou calcificação subcutânea.

Em outra modalidade, um distúrbio degenerativo da pele é granuloma anular. Em uma modalidade, o distúrbio de pele degenerativo é granuloma anular localizado, que, em uma 30 modalidade, é a forma mais comum de granuloma anular, e, em outra modalidade, é caracterizada pela presença de caroços (nódulos ou pápulas) pequenos, firmes, vermelhos ou amarelos, que aparecem dispostos em um anel sobre a pele. Em uma modalidade, os tamanhos das lesões variam de um a cinco centímetros. Em uma modalidade, os locais mais comumente afetados incluem os pés, mãos e dedos. Em 35 outras modalidades, o distúrbio de pele degenerativo é granuloma anular generalizado ou disseminado, linear, perfurante ou subcutâneo. Em uma modalidade, as lesões associadas com granuloma

anular podem desaparecer sem tratamento (remissão espontânea) e reaparecer.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção são adequados para a profilaxia e tratamento de secura, 5 aspereza da pele, a formação de linhas secas, reidratação reduzida por glândulas sebáceas e uma suscetibilidade aumentada à estresse mecânica (tendência à rachaduras), para o tratamento de fotodermatose, os sintomas de xerose senil, fotoenvelhecimento e outras condições degenerativas que estejam associadas com a 10 decomposição do tecido conectivo (fibras de colágeno e de elastina e também glicosaminoglicanas/hialuronano) da pele. "Fotoenvelhecimento" denota o enrugamento, secura e diminuição de elasticidade da pele provocado por luz em uma radiação de UV particular.

15 Outros campos de aplicação das composições de acordo com a invenção são o tratamento e a prevenção de degeneração de colágeno induzida por envelhecimento e/ou UV e também a decomposição de elastina e de glicosaminoglicanas; de 20 condições de pele degenerativas, tais como perda de elasticidade e também atrofia das camadas celulares epidérmicas e dérmicas, de constituintes do tecido conectivo, de estacas de rede e vasos capilares) e/ou dos anexos da pele; de mudanças negativas desencadeadas ambientalmente na pele e nos anexos da pele, por exemplo, causadas por radiação ultravioleta, fumo, poluição, 25 espécies de oxigênio reativas, radicais livres e similares; de condições de pele deficitárias, sensíveis e hipoativas ou condições de anexos da pele deficitárias, sensíveis ou hipoativas; a redução na espessura da pele; de relaxamento da pele e/ou fadiga da pele; de mudanças na perda de água transepidermica e teor de 30 umidade normal da pele; de uma mudança no metabolismo de energia da pele saudável; de desvios da comunicação de célula para célula normal na pele, que podem se manifestar, por exemplo, em enrugamento; de mudanças na proliferação normal de fibroblastos e queratinócitos; de mudanças na diferenciação normal de 35 fibroblastos e queratinócitos; de actinodermatose polimórfica, vitílico; de distúrbios de cicatrização de ferimentos; distúrbios em relação à homeostase normal de colágeno, ácido hialurônico,

elastina e glicosaminoglicana; de ativação aumentada de enzimas proteolíticas na pele, tais como, por exemplo, metaloproteinases.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de perda de cabelos, de geração de um folículo piloso, de aumento do tamanho de um folículo piloso, de aumento de formação de folículos pilosos, de tratamento, de inibição ou de supressão de um distúrbio de pele degenerativo, de tratamento de alopecia androgenética (AGA), compreendendo qualquer combinação das seguintes etapas: (a) interrupção da epiderme na região da perda de cabelos no paciente; (b) administração de um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto; (c) administração de um polipeptídeo de wnt; e (d) administração de um composto ou fator que regule à montante os genes *sonic hedgehog* (SHH), Patched-1 (Ptchl), Patched-2 (Ptch2), Gli1, Gli2, ou combinações dos mesmos, ao paciente.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de depilação, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um anticorpo de neutralização de fator-9 de crescimento de fibroblasto a um paciente. Em uma modalidade, o anticorpo é administrado em uma concentração de 10 µg/mL. Em uma modalidade, a depilação é nas pernas, braços, axilas, área pélvica, costas, face, nariz ou orelhas do paciente. Em uma modalidade, o método compreende adicionalmente a etapa de rompimento da epiderme na região da depilação antes da etapa de administração. Em uma modalidade, a etapa de colocação em contato é realizada 3-12 dias depois da etapa de rompimento. Em uma modalidade, a etapa de rompimento é realizada por exposição da região da perda de cabelos a um estímulo mecânico, químico ou óptico. Em uma modalidade, o estímulo óptico é radiação. Em uma modalidade, a etapa de administração é via administração tópica. Em uma modalidade, a etapa de administração é via administração subcutânea.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de reversão de alopecia, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto a um paciente calvo ou se tornando calvo. Em outra modalidade, a presente invenção fornece

um método de sustação de alopecia compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto a um paciente calvo ou se tornando calvo.

5 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de um ferimento em um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto a um paciente calvo ou se tornando calvo. Em outra
10 modalidade, a presente invenção fornece um método de tratamento de uma lesão em um paciente, compreendendo a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto a um paciente calvo ou se tornando calvo.

15 $FGF9$

Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto, isoladamente ou em composição com um ou mais compostos adicionais. Em uma modalidade, $FGF9$ se refere a $Fgf-9$, $FGF-9$, fator 9 de crescimento de fibroblasto, GAF, fator de ativação de glia, precursor de fator de ativação de glia ou HBGF-9. Em uma modalidade, a proteína $FGF9$, dos métodos da presente invenção, apresenta a sequência:

25 IFPNGTIQGTRKDHSRGFILEFISIAVGLVSIRGVDSGLYLGMNEKGELYGSEKLTQECVFREQFE
ENWYNTYSSNLYKHVDTGRRYYVALNKDGTPREGTRTKRHQKFTHFLPRPVDPDKVPELYKDILSQ
S (Número de Acesso ao GenBank: BAA03572; SEQ ID No: 1). Em outra
modalidade, a proteína $FGF9$ apresenta uma sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank P31371, BAF83481,
30 NP_002001, CAC17692, EAX08316, AAI03980, AAI03979, AAT74624 ou
AAH69692. Em outra modalidade, a proteína $FGF9$ é codificada por uma molécula de ácido nucléico genômico apresentando uma sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank AL139378.15,
AY682094.1 ou CH471075.1, ou codificada por uma molécula de mARN
35 apresentando uma sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank AK290792.1, BC069692.1, BC103978.1, BC103979.1,
CR746503.1 ou D14838.1. Em outra modalidade, um fragmento

biologicamente ativo de uma proteína FGF9 é utilizado em um método da presente invenção. Em outra modalidade, um homólogo de uma proteína FGF9 é utilizado em um método da presente invenção. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente

5 invenção.

Em uma modalidade, a administração de FGF9 humana recombinante aumentou os níveis de expressão de gene *sonic hedgehog* (SHH) (Figura 14).

Em uma modalidade, os métodos da presente

10 invenção compreendem a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de *sonic hedgehog* (SHH), isoladamente ou em composição com um ou mais compostos adicionais. Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de administração de um composto ou fator que aumente a

15 expressão de SHH. Em uma modalidade, SHH se refere a TPT; HHG1; HLP3; HPE3; SMMC1; TPTPS ou MCOPCB5. Em uma modalidade, a proteína SHH dos métodos da presente invenção apresenta a sequência:

MLLLARCLLVLVSSLLVCSGLACGPGRGFGKRRHPKKLTPPLAYQFTPVNVAEKT

SRNSERFKELTPNYPDIIIFKDEENTGADRLMTQRCKDKLNALAI

SVMNQWPGVKLRVTEGWDEDG

20 HHSEESLHYEGRADVDTTSRDRSKYGMALARLAVEAGFDWVYYESKAHIHCSVKAENSVAAKSGGC

FPGSATVHLEQGGTKLVKDLSPGDRVLAADDQGRLLYSDFLTFLDRDDGAKKVFYVIETPRERL

LLTAAHLLFVAPHNDSATGEPEASSGSGPPSGGALGPRALFASRVPGQRVYVVAERDGDRLLPA

AVHSVTLSEEAGAYAPLTAQGTILINRVLASCYAVIEEHSWAHRAFAPFRLAHALLAALAPARTD

RGGDSGGGDRGGGGRVALTAPGAADAPGAGATAGIHWYSQLLYQIGTWLLDSEALHPLGMAVKSS

25 (Número de Acesso ao GenBank: Q15465.1; SEQ ID No: 2). Em outra modalidade, a proteína SHH apresenta uma sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank BAA34689.1; AAB67604.1; AAS01990.1; AAQ87879.1; EAL23913.1; EAX04543.1; AAA62179.1 ou AAI1

1926.1. Em outra modalidade, a proteína SHH é codificada por um

30 ácido nucléico apresentando uma sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank AB020410.1; AC002484.1 ; AC078834.5; AY422195.1; CH236954.1; CH471149.1; AY927450.1; L38518.1 ou BC111925.1. Em outra modalidade, um fragmento biologicamente ativo de uma proteína SHH é utilizado em um método da presente invenção.

35 Em outra modalidade, um homólogo de uma proteína SHH é utilizado em um método da presente invenção. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, SHH se liga a um receptor remendado (PTC), que funciona em associação com *Smoothened* (SMO), para ativar a transcrição de genes alvo. Na ausência de SHH, PTC reprime a atividade de sinalização constitutiva de SMO. Em outra 5 modalidade, SHH também regula o oncogene gli. Em outra modalidade, SHH é um sinal intercelular essencial para uma variedade de eventos de cópia a partir de um modelo durante o desenvolvimento: o sinal produzido pela notocorda, que induz o destino das células ventrais no tubo neural e somitas, e o sinal de polarização para 10 cópias a partir de um modelo do eixo anterior-posterior do botão de membro em desenvolvimento. Em outra modalidade, SHH exibe atividade de indução tanto de placa de piso quanto de neurônios motores.

Em outra modalidade, a administração de FGF9 15 humana recombinante aumentou os níveis de homólogo 1 *patched* (*Drosophila*), (PTCH1; Figura 14), que, em uma modalidade, é um gene humano. Em uma modalidade, Ptch1 codifica um membro da família de genes *patched*. Em uma modalidade, Ptch1 é o receptor para *sonic hedgehog* (SHH), que, em uma modalidade, é uma molécula 20 secretada implicada na formação de estruturas embrionárias e na gênese de tumor. Em uma modalidade, Ptch1 funciona como um supressor de tumor. Em uma modalidade, mutações de Ptch1 têm sido associadas com síndrome de carcinoma de células basais nevóides, carcinoma de células escamosas esofageanas, tricoepiteliomas, 25 carcinomas de células transicionais da bexiga, assim como holoprosencefalia. Em uma modalidade, a junção alternada de Ptch1 resulta em múltiplas variantes de transcritos que codificam diferentes isoformas.

PTCH1

30 Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo Patched-1 (PTCH1), isoladamente ou em composição com um ou mais compostos adicionais. Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de 35 administração de um composto ou fator que aumente a expressão de PTCH1. Em uma modalidade, PTCH1 se refere PTC; BCNS; HPE7; PTC1; PTCH; NBCCS; PTCH11; FLJ26746 ou FLJ42602. Em uma modalidade, a

proteína PTCH1 dos métodos da presente invenção apresenta a sequência:

MASAGNAAEPQDRGGGGSGCIGAPGRPAGGRRRTGGLRRAAPDRDYLHRPSYCDAFALEQIS
 KGKATGRKAPLWLRKFQRLLFKLGYIQKNCGKFLVVGLLIFGAFAVGLKAANLETNVEELWEV
 5 GGRVSRELYNTRQKIGEEAMFNPQLMIQTPKEEGANVLTEALLQHLDSDLQASRVHVYMYNRQWK
 LEHLCYKGELITETGYMDQIIEYLYPCLIITPLDCFWEAKLQSGTAYLLGKPPLRWTNFDPLEF
 LEELKKINYQVDSWEEMLNKAEVGHGYMDRPCLNPADPDCPATAPNKNSTKPLDMALVLNGGCHGL
 SRKYMHWQEELIVGGTVKNSTGKLVSASHALQTMFQLMTPKQMYEHFKGYEVSHINWNEDKAAAIL
 EAWQRTYVEVVHQSVAQNSTQKVLSFTTTLDDILKSFSDVSVIRVASGYLLMLAYACLTMLRWDC
 10 SKSQGAVGLAGVLLVALSVAAGLGLCSLIGISFNAATTQVLPFLALGVGVDDVFLLAHAFSETGQN
 KRIPFEDRTGECLKRTGASVALTSISNVTAFFMAALIPIPALRAFSLQAAVVVFNFAMVLLIFPA
 ILSMDLYRREDRRLDIFCCFTSPCVSRVIQVEPQAYTDTHDNTRYSPPPPSSHSFAETQITMQS
 TVQLRTEYDPHTHVYYTTAEPRSEISVQPVTVTQDTLSCQSPESTSSTRDLLSQFSDSSLHCLEPP
 CTKWTLSSFAEKHYAPFLLKPKAKVVVIFLFLGLLGVSLYGTTRVRDGLDLTDIVPRETREYDFIA
 15 AQFKYFSFYNYIYTQKADYPNIQHLLYDLHRSFSNVKYVMLEENQLPKMWLHYFRDWLQGLQDA
 FDSDWETGKIMPNNYKNGSDDGVLAYKLLVQTGSRDKPIDISQLTKQRLVDADGIINPSAFIYILT
 AWVSNDPVAYAASQANIRPHRPEWVHDKADYMPETRLRIPAAEPIEYAQFPFYLNGLRDTSDFVEA
 IEKVRTICSNYTSGLSSYPNGYPFLFWEQYIGLRHLLLFI SVVLA CTF LVCAVFLNPWTAGII
 VMVLALMTVELFGMMGLIGIKLSAVPVVILIASVGIGVEFTVHALAFLT AIGDKNRRAVLALEM
 20 FAPVLDGAVSTLLGVMLAGSEFDIFIVRYFFAVLAILTILGVNLGVLLPVLLSFFGPYPEVSPAN
 GLNRLPTPSPEPPPSVVRFAMPPGHTHSGSDSSDSEYSSQTTVGLSEELRHYEAOQQGAGGPAHQV
 IVEATENPVFAHSTVVHPESRHHPPSNPRQQPHLDGSLPPGRQQPQRDPREGLWPPPYRP
 DAFEISTEGHSGPSNRARWPGRGARSHNPRNPASTAMGSSVPGYCOPITT
 VASVTVAHVPPVPGPGRNPRGGLCGPYPETDHGLFEDPHVPFHRCERRDSKVEVIELQDVECEERPRGSSSN
 25 (Número de Acesso ao GenBank: Q13635.2; SEQ ID No: 3). Em outra modalidade, a proteína PTCH1 apresente uma sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank: CAH73817.1; CAH73818.1 ; CAH73819.1; AAR21238.1; AAR21239.1; AAR21240.1; EAW92631.1; EAW92632.1; BAD74184.1; BAD74185.1; BAD74186.1; BAD74187.1;
 30 BAD74188.1; BAD92732.1; BAF47711.1; BAE45300.1; BAE45302.1; BAE45304.1; BAF47712.1; BAC85893.1; AAH43542.1; AAC50496.1; AAC50550.1 ou AAI52920.1. Em outra modalidade, a proteína PTCH1 é codificada por um ácido nucléico apresentando uma sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank: AL161729.27; AY395758.1; AY395768.1; AY395772.1; CH471174.1; AB189436.1; AB189437.1; AB189438.1; AB189439.1; AB189440.1; AB209495.1; AB212827.1; AB212828.1; AB214500.1; AB233422.1; AB233424.1;

AB239329.1; AI358880.1; AI494442.1; AK124593.1; AK130256.1;
 BC043542.1; BF195352.1; BM974119.1; BX117041.1; CR744004.1;
 DB093644.1; U43148.1; U59464.1 ou BC152919.1. Em outra modalidade,
 5 um fragmento biologicamente ativo de uma proteína PTCH1 é
 utilizado em um método da presente invenção. Em outra modalidade,
 um homólogo de uma proteína PTCH1 é utilizado em um método da
 presente invenção. Cada possibilidade representa uma modalidade
 separada da presente invenção.

Em outra modalidade, a administração de uma FGF9
 10 humana recombinante aumentou níveis de homólogo 2 *patched*
 (*Drosophila*), (PTCH; Figura 14).

PTCH2

Em uma modalidade, os métodos da presente
 15 invenção compreendem a etapa de administração de uma composição
 compreendendo um polipeptídeo Patched-2 (PTCH2), isoladamente ou
 em composição com um ou mais compostos adicionais. Em outra
 modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de
 20 administração de um composto ou fator que aumente a expressão de
 PTCH2. Em uma modalidade, *ptch2* codifica um membro da família de
 genes *patched*. Em uma modalidade, a proteína *patched* é o receptor
 para *sonic hedgehog*, uma molécula secretada implicada na formação
 de estruturas embrionárias e na gênese de tumor. Em uma
 25 modalidade, *ptch2* está mutado em um meduloblastoma e em carcinoma
 de células basais, sugerindo que ele desempenha um papel no
 desenvolvimento de alguns tumores. Variantes de transcritos
 alternados têm sido descritas, mas sua função biológica não foi
 determinada. Em uma modalidade, o polipeptídeo de PTCH2, para uso
 30 nos métodos da presente invenção, apresenta a sequência:
 FDFIVRYFFAALTVLTLGLLHGLVLLPVLLSILGPPPEVIQMYKESPEILSPPAPQGGGLRVGSL

30 QVNISYWKEELLWCQDLRPEEI (Número de Acesso ao GenBank: Q5JR97; SEQ ID
 No: 4). Em outra modalidade, a proteína PTCH2 apresenta uma
 sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank:
 CAI23127.1; CAI13000.1; AAR05447.1; EAX07017.1; AAD25953.1;
 AAC79847.1; AAD17260.1 ; AAQ88919.1; AAQ89375.1 ou AAI52912.1. Em
 35 outra modalidade, a proteína PTCH2 é codificada por um ácido
 nucléico apresentando uma sequência conforme mostrada no Número de
 Acesso ao GenBank: AL136380.22; AL592166.16; AY438664.1;

CH471059.2; AF087651.1; AF091501.1; AF119569.1; AK307168.1; AY358555.1; AY359016.1 ou BC 152911.1. Em outra modalidade, um fragmento biologicamente ativo de uma proteína PTCH2 é utilizado em um método da presente invenção. Em outra modalidade, um homólogo de uma proteína PTCH2 é utilizado em um método da presente invenção. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

GLI1

Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de homólogo 1 de oncogene associado à glioma (proteína de dedo de zinco) (*GLI1*), isoladamente ou em composição com um ou mais compostos adicionais. Em uma modalidade, *glil* codifica uma proteína, que é um membro da família Kruppel de proteínas de dedo de zinco. Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de administração de um composto ou de um fator que aumente a expressão de *GLI1*. Em uma modalidade, o polipeptídeo de *GLI1*, para uso nos métodos da presente invenção, apresenta a sequência:

MFNSMTPPISSYGEPCCLRPLPSQGAPSVGTEGLSGPPFCHQANLMSGPHSYGPARETNSCTEGP
 LFSSPRSAVKLTKKRALSISPLSDASLDLQTIVRTSPSSLVAFINSRCTSPGSYGHLSIGTMSPS
 LGFPAQMNHQKGPSPSFGVQPCGPHDSARGGMIPHQSRGPFPTCQLKSELDMLVGKCREEPLEGD
 MSSPNSTGIQDPPLLGMGDREDLEREKEREPESVYETDCRDGCSQEFDSQEQLVHHINSEHIHGE
 RKEFVCHWGGCSRELRFKAQYMLVVHMRRHTGEKPHKCTFEGCRKSYSRLENLKTHLRSHTEKP
 YMCEHEGCSKAFSNASDRAKHQNRTHSNEKPYVCKLPGCTKRYTDPSSLRKHVKTVHGPDAHVTKR
 HRGDGPLPRAPISTVEPKREREGGPIREESRLTVPEGAMKPQPSPGAQSSCSSDHSPAGSAANTD
 SGVEMTGNAGGSTEDLSSLDEGPCIAGTGLSTLRRLENLRLDQLHQLRPIGTRGLKLPSLSHTGTT
 VSRRVGPPVSLERRSSSSSISSAYTVSRRSSLASPFFPGSPPENGASSLPGLMPAQHYLLARYA
 SARGGGTSPAASSLDRIGGLPMPPWRSRAEYPGYNPNAGVTRRASDPAQAADRPAPARVQRFKSL
 GCVHTPPTVAGGGQNFDPYLPTSVYSPQPPSITENAAMDARGLQEEPEVGTSMVGSGLNPyMDFPP
 TDTLGYYGGPEGAAAEPYGARGPGSLPLGPGPPTNYGPNPCPQQASYPDPTQETWGEFPSHGLYPG
 PKALGGTYSQCPRLEHYGQVQVKPEQGCPVGSNSTGLAPCLNAHPSEGPPHPQPLFSSHYPQPSPPQ
 YLQSGPYTQPPPDLPSEPRPCLDFDSPTHSTGQLKAQLVCNYVQSQQELLWEGGGREDAPAQEPR
 YQSPKFLLGSQVSPSRAKAVNITYGPGFGPNLPNHKGSGSYPTPSPCHENFVVGANRASHRAAAPR
 LLPPLPTCYGPLKVGGTNPSCGHPEVGRGGPALYPPPEGQVCNPLDSLDDNTQLDFVAILDEP
 QGLSPPPSHDQRGSSGHTPPSGPPNMAVGNMSVLLRSLPGETEFLNSSA (Número de
 Acesso ao GenBank: P08151; SEQ ID No: 5). Em outra modalidade, a

proteína GLI1 apresenta uma sequência conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank: AAM13391.1; EAW97013.1; BAG60219.1; AAH1 3000.1 ou CAA30297.1. Em outra modalidade, a proteína GLI1 é codificada por um ácido nucléico apresentando uma sequência 5 conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank: AC022506.38; AF316573.1; CH471054.1 ; AK297899.1; BC013000.2 ou X07384.1. Em outra modalidade, um fragmento biologicamente ativo de uma proteína GLI1 é utilizado em um método da presente invenção. Em outra modalidade, um homólogo de uma proteína GLI1 é utilizado em 10 um método da presente invenção. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

GLI2

Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de administração de uma composição 15 compreendendo um polipeptídeo de homólogo 2 de oncogene associado à glioma (proteína de dedo de zinco) (GLI2), isoladamente ou em composição com um ou mais compostos adicionais. Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de administração de um composto ou de um fator que aumente a 20 expressão de GLI2. Em uma modalidade, à GLI2 pode-se referir como HPE9; THP1 ou THP2. Em uma modalidade, *gli2* codifica uma proteína, que pertence à subclasse de proteínas de dedo de zinco do tipo C2H2 da família Gli. Membros dessa subclasse são caracterizados como fatores de transcrição, que se ligam a ADN através de motivos 25 de dedo de zinco. Esses motivos contêm ligações H-C conservadas. As proteínas de dedo de zinco da família Gli são mediadores de sinalização de *sonic hedgehog* (Shh) e elas estão implicadas como potentes oncogenes na célula de carcinoma embrionário. A proteína codificada por esse gene se localiza no citoplasma e ativa a 30 expressão de gene de homólogo de *Drosophila patched* (PTCH). Pensa-se também que ela desempenha um papel durante a embriogênese. A proteína codificada está associada com vários fenótipos de síndrome de cefalopolissindactilia de Greig, de síndrome de Pallister-Hall, de tipo IV de polidactilia preaxial, de tipos A1 35 e B de polidactilia posaxial. Em uma modalidade, o polipeptídeo GLI2 para uso nos métodos da presente invenção apresenta a sequência:

MALTSINATPTQLSSSNCLSDTNQNQKQSSEAVSSTVNPVAIHKRSKVKTPEGLRPASPLALTQ
 GQVLDTAHGVVPFPSPQEQLADLKEDLDRDDCKQEAEVVIYETNCHWEDCTKEYDTQEQLVHHINN
 EHIHGEKKEFVCRWQACTREQKPFKAQYMLVVMRRHTGEKPHKCTFEGCSKAYSRLENLKTHLRS
 HTGEKPYVCEHEGCNKAFSNASDRAKHQNRTHSNEKPYICKIPGCTKRYTDPSSLRKHVKTVHGPD
 5 AHVTKKQRNDVHLRTPLLKENGDSEAGTEPGGPESTEASSTSQAEDCLHVRAIKTESSGLCQSSP
 GAQSSCSSEPSPLGSAPNNDSGVEMPGTGPGLGDLTALDDTPPGADTSALAAPSAGGLQLRKHM
 TMHRFEQLKEKLKSLKDSCSWAGPTPHTRNTKLPPGLPGSILENFSGGGGGPAGLLPNPRLSE
 LSASEVTMQLQERRDSTSSTVSSAYTVSRRSSGISPYFSSRRSSEASPLGAGRPHNASSADSYD
 PISTDASRRSSEASQCSGGSGLLNLTAPAQQYSLRAKYAAATGGPPPTPLPGLERMSL
 10 RTRLALLDAEGLTPAGCPRPLGPRRGSDGPTYGHGHAGAAPAFPHEAPGGTRRASDPVRRPDAL
 SLPRVQRFHSTHNVPGLPPCADRRGLRLQSHPSTDGGLARGAYSPPRPSISENVAMEAVAAGVD
 GAGPEADLGLPEDDLVLPDDVVQYIKAHASGALDEGTGQVYPTESTGFSDNPRLPSPGLHGQRRMV
 AADSNVGPSAPMLGGCQLGFGAPSSLNNMPVQWNEVSSGTVDLSLASQVKPPPFPQGNLAVVQQK
 PAFGQYPGYSPQGLQASPGLDSTQPHLQPRSGAPSQGIPRVNMQQLRQPVAGSQCPGMTTMSP
 15 HACYGQVHPQLSPSTISGALNQFPQSCSNMPAKPGHLGHPQQTEVAPDPTTMGRNRHRELGVPN
 AGVPPPHVQSYQPQSHHLAASMSQEGYHQVPSLLPARQPGFMEPQTGPMGVATAGFGLVQPRPPL
 EPSPTGRHRGVRAVQQQLAYARATGHAMAAMPSSQETAEEAVPKGAMGNMGSVPPQPPPQDAGGAPD
 HSMLYYYGQIHMYEQDGGLNLGSCQVMRSQPPQPQACQDSIQPQPLPSGVNQVSSTVDSQLLEA
 PQIDFDAIMDDGDHSSLFSGALSPSLLHSLSQNSSLTTPRNSLTLPSIPAGISNMAVGDMSSMLT
 20 SLAEESKFLNMMT (Número de Acesso ao GenBank: P10070; SEQ ID No: 6).
 Em outra modalidade, a proteína GLI2 apresenta uma sequência
 conforme mostrada no Número de Acesso ao GenBank: AAA35898.1;
 BAA25665.1; BAA25666.1; BAA25667.1; BAA25668.1; BAD92591.1;
 BAG61875.1; AAS72889.1; AAS72890.1; AAS72891.1; AAI1 1411.1;
 25 BAA03568.1; BAA03569.1; AAY58315.1; AAY58316.1; AAY58317.1 ou
 AAY87165.1. Em outra modalidade, a proteína GLI2 é codificada por
 um ácido nucléico apresentando uma sequência conforme mostrada no
 Número de Acesso ao GenBank: AC016764.8; AC017033.5
 (60664..181887); M20672.1; M20673.1; AB007295.1; AB007296.1;
 30 AB007297.1; AB007298.1; AB209354.1; AJ707583.1; AK300071.1;
 AY493737.1; AY493738.1; AY493739.1; BC111410.1; D14827.1;
 D14828.1; DQ004396.1; DQ004397.1; DQ004398.1 ou DQ086814.1. Em
 outra modalidade, um fragmento biologicamente ativo de uma
 proteína GLI2 é utilizado em um método da presente invenção. Em
 35 outra modalidade, um homólogo de uma proteína GLI2 é utilizado em
 um método da presente invenção. Cada possibilidade representa uma
 modalidade separada da presente invenção.

WNT

Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a etapa de administração de uma composição compreendendo um polipeptídeo de Wnt. O polipeptídeo de Wnt, dos 5 métodos e das composições da presente invenção, apresenta, em outra modalidade, a sequência:

MNRKARRCLGHLFLSLGMVYL*Ri*GGFSSVALGASIIICNKIPGLAPRQRAICQSRPDAAIVIGEGS
QMGLDECQFQFRNGRWNCSALGERTVFGKELKVGREAFTYAIIAAGVAHAITAAC_TQGNLSDCG
CDKEKQGQYHRDEGWKGCGSADIRYGIGFAKVFDAREIKQNARTLMNLHNNEAGRKILEENMKL
10 ECKCHGVSGSCTTKTCWTTLQPQFRELGYVLKYNEAVHVEPVVRASRNKRPTFLKIKKPLSYRKPM
DTDLVYIEKSPNYCEEDPVTGSVGTQGRACNKTAPQASGCDLMCCGRGYNTHQYARVWQCNCFKHW
CCYVKCNTCSEREMYTCK (Número de Acesso ao GenBank: BC008811; SEQ ID
No: 7). Em outra modalidade, o polipeptídeo de Wnt apresenta uma
15 sequência selecionada a partir das sequências mostradas nas
entradas ao GenBank: NM_004625, D83175, U53476 e NP_004616. Em
outra modalidade, o polipeptídeo Wnt é um proteína Wnt7. Em outra
modalidade, o polipeptídeo Wnt é uma proteína Wnt7a. Em outra
modalidade, o polipeptídeo Wnt é proteína Wnt1. Em outra
20 modalidade, o polipeptídeo Wnt é um polipeptídeo Wnt3. Em outra
modalidade, o polipeptídeo Wnt é um polipeptídeo Wnt3a. Em outra
modalidade, o polipeptídeo Wnt é um polipeptídeo Wnt10. Em outra
modalidade, o polipeptídeo Wnt é uma proteína Wnt10a. Em outra
25 modalidade, o polipeptídeo Wnt é um polipeptídeo Wnt10b. Em outra
modalidade, o polipeptídeo Wnt é codificado por um ácido nucléico
apresentando uma sequência mostrada em uma das entradas ao GenBank
acima. Em outra modalidade, um fragmento biologicamente ativo de
um polipeptídeo Wnt é utilizado em um método da presente invenção.
Em outra modalidade, um fragmento biologicamente ativo de uma
30 proteína Wnt7 é utilizado em um método da presente invenção. Em
outra modalidade, um fragmento biologicamente ativo de um
polipeptídeo Wnt é utilizado em um método da presente invenção. Em
outra modalidade, um fragmento biologicamente ativo de um
polipeptídeo Wnt7a é utilizado em um método da presente invenção.
Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente
35 invenção.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção estimulam um ou mais membros da via de sinalização de

SHH, que, em uma modalidade, é N-Shh (produto de clivagem), N-Shh-Chol, que, em uma modalidade, inibe Patched-1 e Patched-2, que, em uma modalidade, inibem Smoothened, que, em uma modalidade, estimula GLI-1, que, em uma modalidade, estimula a transcrição de outros genes (em uma modalidade, GLI-1, PTC1, HNF3 β) e GLI-2, e GLI-3, que, em uma modalidade, inibem a transcrição de outros genes. Assim, em uma modalidade, a estimulação de FGF9 e o aumento resultante em SHH, aliviarão a inibição tônica de proteínas Patched na proteína Smoothened e aumentarão os níveis de GLI-1, conduzindo à intensificação de transcrição de genes.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção estimulam um ou mais membros da via de sinalização de WNT, que, em uma modalidade, é Frizzled, SFRP, Dishevelled (Dsh), TCF, LRP, APC, β -catenina, Axina, Dickkopf, GSK3, Naked, Porcupina ou FRAT/GBP.

Em outra modalidade, a via de wnt é estimulada antes da via de hedgehog. Em outra modalidade, as duas vias são estimuladas de uma maneira de sobreposição. Em outra modalidade, as duas vias são estimuladas simultaneamente. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, homólogos e variantes de transcritos e proteínas da presente invenção são administrados em métodos da presente invenção. Em outra modalidade, homólogos e variantes de transcritos e proteínas da presente invenção são alvos em métodos da presente invenção. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Os termos "homologia", "homólogo", etc., quando em referência a qualquer proteína ou peptídeo, se referem, em uma modalidade, à percentagem de resíduos de aminoácidos na sequência candidata que são idênticos aos resíduos de um polipeptídeo nativo correspondente, depois de alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para se alcançar a homologia percentual máxima, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequências. Métodos e programas de computador para o alinhamento são bem conhecidos na técnica.

Em outra modalidade, o termo "homologia", quando em referência a qualquer sequência de ácidos nucléicos, similarmente indica uma percentagem de nucleotídeos em uma sequência candidata, que sejam idênticos aos nucleotídeos de uma 5 sequência de ácidos nucléicos nativa correspondente.

Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 70%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 75%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 80%. Em outra 10 modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 82%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 85%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 87%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 90%. Em outra modalidade, "homologia" se refere 15 à identidade de mais do que 92%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 95%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 97%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de mais do que 98%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade 20 de mais do que 99%. Em outra modalidade, "homologia" se refere à identidade de 100%.

Homologia de proteínas e/ou de peptídeos, para qualquer sequência de aminoácidos listada aqui, é determinada, em uma modalidade, por métodos bem descritos na técnica, incluindo 25 análise por *immunoblot*, ou, via análise com algoritmos de computador de sequências de aminoácidos, utilizando qualquer um de inúmeros pacotes de software disponíveis, via métodos estabelecidos. Alguns desses pacotes podem incluir os pacotes FASTA, BLAST, MPsrch ou Scamps, e podem empregar o uso dos 30 algoritmos de Smith e Waterman, e/ou alinhamentos globais/locais ou BLOCKS para análise, por exemplo. Cada métodos de determinação de homologia representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, o termo "peptídeo" inclui 35 peptídeos nativos (ou produtos de degradação, peptídeos sintetizados sinteticamente ou peptídeos recombinantes) e peptidomiméticos (tipicamente, peptídeos sintetizados

sinteticamente), tais como peptóides e semipeptóides, que análogos de peptídeos, que podem apresentar, por exemplo, modificações que tornem os peptídeos mais estáveis enquanto em um corpo ou mais capazes de penetrar em células bacterianas. Tais modificações 5 incluem, mas não estão limitadas a, modificação do terminal N, modificação do terminal C, modificação da ligação peptídica, incluindo, mas não limitada a, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH ou CF=CH, modificações da cadeia 10 principal, e modificação de resíduo. Métodos para preparação de compostos peptidomiméticos são bem conhecidos na técnica e são especificados, por exemplo, em *Quantitative Drug Design*, CA. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), o qual é aqui incorporado por referência como se completamente mostrado aqui.

15 Ligações peptídicas (-CO-NH-) dentro do peptídeo podem estar substituídas, por exemplo, por ligações N-metiladas (-N(CH₃)-CO-), ligações éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), ligações cetometilênicas (-CO-CH₂-), ligações α-aza (-NH-N(R)-CO-), sendo que R é qualquer alquila, por exemplo, metila, ligações carba (-CH₂-NH-), ligações hidróxi-etilênicas (-CH(OH)-CH₂-), ligações 20 tioamida (-CS-NH-), ligações duplas olefínicas (-CH=CH-), ligações retroamida (-NH-CO-), derivados de peptídeo (-N(R)-CH₂-CO-), sendo que R é a cadeia lateral "normal", naturalmente presente na cadeia de carbono.

25 Essas modificações podem ocorrer em qualquer das ligações ao longo da cadeia de peptídeo e mesmo em várias (2-3) ao mesmo tempo.

Aminoácidos aromáticos naturais, Trp, Tyr e Phe, podem estar substituídos por ácidos não naturais sintéticos, tais 30 como TIC, naftilelanina (Nol), derivados metilados no anel de Phe, derivados halogenados de Phe ou o-metil-Tyr.

Em adição ao acima, os peptídeos da presente invenção também podem incluir um ou mais aminoácidos modificados ou um ou mais monômeros de não aminoácido (por exemplo, ácidos 35 graxos, carboidratos complexos, etc.).

Conforme usado aqui no relatório descritivo e na seção das reivindicações abaixo, o termo "aminoácido" ou

"aminoácidos" é entendido a incluir os 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente; aqueles aminoácidos frequentemente modificados pós-traducionalmente *in vivo*, incluindo, por exemplo, hidróxi-prolina, fosfo-serina e fosfo-treonina; e outros aminoácidos não usuais, 5 incluindo, mas não limitados a, ácido 2-amino-adípico, hidróxi-lisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina e ornitina. Além disso, o termo "aminoácido" inclui aminoácidos tanto D quanto L.

Em outra modalidade, aminoácidos que ocorrem naturalmente e aminoácidos não convencionais ou modificados, 10 conforme sejam conhecidos na técnica, podem ser usados com a presente invenção.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece um kit, compreendendo uma ferramenta e/ou um composto adequado para a realização de um método da presente invenção.

15 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um dispositivo, compreendendo uma ferramenta adequada para o rompimento epidérmico e um meio de entrega de um composto ou fator que regule à montante a expressão de SHH.

Deve ser entendido que, incluídos na presente 20 invenção, estão métodos compreendendo a etapa de administração de um ácido nucléico isolado, em uma modalidade, de um vetor ou plasmídeo, que codifique um polipeptídeo da presente invenção, que, em uma modalidades, é um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto, shh, wnt, ptch1, ptch2, gli1 ou gli2, 25 ou uma composição compreendendo um tal vetor.

Em uma modalidade, é fornecido um ácido nucléico isolado, que codifica um polipeptídeo da presente invenção, para uso nos métodos da presente invenção.

30 Em uma modalidade, um "ácido nucléico isolado" se refere a um segmento ou fragmento de ácido nucléico, que tenha sido separado a partir de sequências que o flanqueiem em um estado que ocorra naturalmente, por exemplo, um fragmento de ADN que tenha sido removido das sequências que estejam normalmente adjacentes ao fragmento, por exemplo, as sequências adjacentes ao 35 fragmento em um genoma, em que ele ocorra naturalmente. O termo também se aplica a ácidos nucléicos que tenham sido substancialmente purificados a partir de outros componentes, que

naturalmente acompanhem o ácido nucléico, por exemplo, ARN ou ADN ou proteínas, que naturalmente o acompanhem na célula. Portanto, o termo inclui, por exemplo, um ADN recombinante, que esteja incorporado em um vetor, em um plasmídeo ou vírus que se replique de maneira autônoma, ou no ADN genômico de um procariônte ou eucariônte, ou que exista como uma molécula separada (por exemplo, como um cADN ou um fragmento genômico ou de cADN produzido por PCR ou por digestão com enzimas de restrição), independente de outras sequências. Ele também inclui um ADN recombinante, que seja parte de um gene híbrido que codifique sequência de polipeptídeo adicional.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece uma célula compreendendo um ácido nucléico ou vetor isolado da presente invenção.

Em uma modalidade, dois polinucleotídeos da presente invenção estão ligados de maneira operativa. Por exemplo, em uma modalidade, polinucleotídeos que codifiquem FGF9 e WNT, podem estar ligados de maneira operativa. Em uma modalidades, "ligado(s) de maneira operativa" indica que uma porção de ácido nucleico, de fita única ou de fita dupla, compreende os dois polinucleotídeos dispostos dentro da porção de ácido nucléico, de uma maneira tal que eles sejam expressos em conjunto. Por meio de exemplo, um promotor ligado de maneira operativa à região codificante de um gene é capaz de promover a transcrição da região codificante.

Em uma modalidade, um polinucleotídeo de presente invenção compreende uma sequência promotora/reguladora, que, em uma modalidade, o promotor/regulador esteja posicionado na extremidade 5' da sequência codificante de proteína desejada, tal que ela conduza a expressão da proteína desejada em uma célula. Em conjunto, o ácido nucléico que codifica a proteína desejada e sua sequência promotora/reguladora compreendem um "transgene".

Em uma modalidade, o termo "sequência promotora/reguladora" se refere a uma sequência de ácido nucléico, que seja exigido para expressão de um produto de gene ligado de maneira operativa à sequência promotora/reguladora. Em alguns casos, essa sequência pode ser a sequência promotora de núcleo e,

em outros casos, esta sequência também pode incluir uma sequência intensificadora e outros elementos reguladores, que são exigidos para expressão do produto de gene. A sequência promotora/reguladora pode, por exemplo, ser uma que expresse o produto de gene de uma maneira específica ao tecido. Em uma modalidade, um promotor usado na presente invenção pode ser constitutivo ou indutível. Em outra modalidade, um promotor para uso nos métodos da presente invenção pode ser específico ao tecido. Tais promotores são bem conhecidos na técnica.

10 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um veículo de entrega para administração de um polipeptídeo da presente invenção. Exemplos de tais veículos de entrega são conhecidos na técnica e podem incluir vírus ou bactérias recombinantes engenheirados para exprimir o polipeptídeo. Em uma modalidade, os vírus ou bactérias estão atenuados. Em uma modalidade, vírus para uso nos métodos da presente invenção podem incluir retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados, etc. Em uma modalidade, o vírus pode ser de qualquer serotipo ou subgrupo conhecido.

20 Em uma modalidade, qualquer um de inúmeros diferentes vetores podem ser usados nos métodos da presente invenção, tais como vetores virais, vetores de plasmídeo, ADN linear, etc, conforme conhecido na técnica, para introduzir um fragmento de ácido nucléico exógeno que codifica um agente terapêutico em células e/ou tecido alvos. Esses vetores podem ser inseridos, por exemplo, usando infecção, transdução, transfecção, transfecção mediada por cálcio-fosfato, transfecção mediada por DEAE-dextrana, eletroporação, transfecção mediada por lipossoma, entrega de biológico, entrega de gene lipossomial usando lipossomas fusogênicos e aniônicos (que são uma alternativa ao uso de lipossomas catiônicos), injeção direta, absorção mediada por receptor, magnetoporação, ultrassom ou qualquer combinação dos mesmos, assim como outras técnicas conhecidas na técnica (para detalhes adicionais, ver, por exemplo, "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F. M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989) e em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda

edição, Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), ou outros manuais de laboratório padrão). Os segmentos de polinucleotídeos, que codificam sequências de interesse, podem ser ligados em um sistema de vetor de expressão adequado para 5 transdução de células de mamíferos e para direcionamento da expressão de produtos recombinantes dentro das células transduzidas. A introdução do fragmento de ácido nucléico exógeno é realizada por introdução do vetor nas vizinhanças do micro-organismo. Uma vez que o fragmento de ácido nucléico exógeno tenha 10 sido incorporado nas células usando qualquer das técnicas descritas acima ou conhecidas na técnica, a taxa de produção e/ou de secreção do agente terapêutico codificado pelo fragmento de ácido nucléico pode ser quantificada. Em uma modalidade, o termo "exógeno" se refere a uma substância que se originou do lado de 15 fora, por exemplo, um ácido nucléico que se originou do lado de fora de uma célula ou tecido.

Em uma modalidade, um vetor para uso nos métodos da presente invenção é um agente de transferência de gene não imunogênico, tal como um vetor não viral (por exemplo, plasmídeos 20 de ADN ou ADN de minicírculo), um vetor viral "sem tripas", isto é, sem genes endógenos (o quê, em uma modalidade, é devido a uma eliminação, enquanto que, em outra modalidade, é devido a uma inserção, substituição ou eliminação em um gene, que impeça a expressão de gene), um vetor de adenovírus dependente de 25 auxiliador (HDAd), ou vírus adeno-associado AAV (que, em uma modalidade, é de fita única e, em outra modalidade, é de fita dupla). Em uma outra modalidade, a formulação é escolhida de maneira tal que a expressão de gene recombinante resulte em carência de toxicidade ou rejeição imune-mediada do produto de 30 gene pelo tecido. Em uma modalidade, o vetor é derivado viralmente, e, em outra modalidade, o vetor é um plasmídeo. Em uma modalidade, o vetor derivado viralmente é derivado a partir de adenovírus, que, em uma modalidade, é adenovírus dependente de auxiliador, enquanto que, em outra modalidade, o vetor derivado 35 viralmente é derivado a partir de vetor associado a adenovírus.

Em uma modalidade, o termo "vetor" ou "vetor de expressão" se referem a uma molécula de veículo, na qual possa ser

inserida uma sequência de ácidos nucléicos para introdução em uma célula, onde ela possa ser replicada. Em uma modalidade, as moléculas de ácidos nucléicos são transcritas em ARN, que, em alguns casos, são, então, traduzidas em uma proteína, polipeptídeo 5 ou peptídeo. Em outros casos, sequências de ARN não são traduzidas, por exemplo, na produção de moléculas sem sentido ou ribozimas. Em uma modalidade, vetores de expressão podem conter uma variedade de "sequências de controle", que se referem a sequências de ácidos nucléicos necessárias para a transcrição e, 10 possivelmente, à tradução de uma sequência codificante ligada de maneira operativa em uma célula de hospedeiro em particular. Em outra modalidade, um vetor inclui adicionalmente uma origem de replicação. Em uma modalidade, o vetor pode ser um vetor de veículo de transporte, que, em uma modalidade, pode se propagar 15 tanto em células procarióticas quanto em células eucarióticas, ou, em outra modalidade, o vetor pode ser construído para facilitar sua integração dentro do genoma de um organismo de escolha. O vetor, em outras modalidades, pode ser, por exemplo, um plasmídeo, 20 um bacmídeo, um fagomídeo, um cosmídeo, um fago, um vírus ou um cromossoma artificial. Em uma modalidade, o vetor é um vetor viral, que, em uma modalidade, pode ser um bacteriófago, vírus 25 mamífero, ou vírus vegetal.

Em outras modalidades, o vetor viral é derivado a partir de um vírus, vírus da varíola, lentivírus, vírus da pólio, 25 vírus da hepatite, vírus do papiloma, citomegalovírus, vírus símio ou vírus do *herpes simplex*.

Em certas modalidades da invenção, o vetor compreendendo uma sequência de ácidos nucléicos pode compreender ADN recombinante nu ou plasmídeos. A transferência do construto 30 pode ser realizada por qualquer método, que permeabilize fisicamente ou quimicamente a membrana da célula. Em uma modalidade, o vetor é um ADN de minicírculo, que, em uma modalidade, é uma molécula de ADN superespiralada para transferência de gene não viral, que não tenha uma origem de 35 replicação bacteriana nem um marcador de resistência a antibiótico.

A construção de vetores usando técnicas recombinantes padrão é bem conhecida na técnica (ver, por exemplo, Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, 1990) e Ausubel, et al., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, 1996), ambos aqui incorporados por referência).

Em uma modalidade, composições da presente invenção compreendem o agente indicado, enquanto, em outra modalidade, composições da presente invenção consistem essencialmente no agente indicado, enquanto, em outra modalidade, composições da presente invenção no agente indicado. Em algumas modalidades, o termo "compreende" se refere à inclusão do agente ativo indicado, tal como polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto humano, shh, wnt, etc., assim como inclusão de outros agentes ativos e veículos, excipientes, emolientes, estabilizadores, etc., farmaceuticamente aceitáveis, como são bem conhecidos na indústria farmacêutica. Em algumas modalidades, o termo "consistindo essencialmente em" se refere a uma composição, cujo único ingrediente ativo é o ingrediente ativo indicado, entretanto, outros compostos podem ser incluídos, que sejam para estabilização, preservação, etc., a formulação, mas não estão envolvidos diretamente no efeito terapêutico do ingrediente ativo indicado. Em algumas modalidades, o termo "consistindo essencialmente em" pode ser referir a componentes que facilitem a liberação do ingrediente ativo. Em algumas modalidades, o termo "consistindo" se refere a uma composição, que contenha o ingrediente ativo e um veículo ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

Em uma modalidade, métodos da presente invenção tratam, inibem ou suprimem a perda de cabelos. Em uma modalidade, métodos da presente invenção deram folículos pilosos ou aumentam o tamanho dos folículos pilosos, em uma modalidade, em um paciente com perda de cabelos. Em uma modalidade, a perda de cabelos é devida à alopecia androgenética (AGA). Em uma modalidade, a perda de cabelos é devida à calvície padrão masculina. Em outra modalidade, a perda de cabelos é devida à calvície padrão

feminina. Em outra modalidade, a perda de cabelos é o resultado de uma lesão à pele.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção tratam, inibem ou suprimem uma doença ou distúrbio em um paciente. Em uma modalidade, o paciente apresenta uma doença ou distúrbio compreendendo calvície. Em outra modalidade, o paciente não apresenta uma doença ou distúrbio compreendendo calvície. Em outra modalidade, a doença ou distúrbio é alopecia androgenética (AGA). Em outra modalidade, a doença ou distúrbio é calvície padrão masculina. Em outra modalidade, a doença ou distúrbio é calvície padrão feminina. Em outra modalidade, a doença ou distúrbio é um lúpus eritematoso discoide. Em outra modalidade, a doença ou distúrbio é uma hipertricose congênita. Em outra modalidade, a doença ou distúrbio é líquen planopilaris.

Em outra modalidade, a doença ou distúrbio é uma alopecia envolvendo cicatrizes (ou, em outra concretização, cicatricial), que, em uma modalidade, é perda de cabelos devida à cicatrização da área do couro cabeludo. Em uma modalidade, alopecia envolvendo cicatrizes tipicamente envolve o topo do couro cabeludo e ocorre predominantemente em mulheres. A condição frequentemente ocorre em mulheres afro-americanas e acredita-se esteja associada com entrancamento apertado persistente ou "enfileiramento de milho" do couro cabeludo. Uma forma de alopecia envolvendo cicatrizes também pode ocorrer em mulheres pós-menopausa, associada com inflamação dos folículos pilosos e subsequente formação de cicatrizes. Em outra modalidade, a doença ou distúrbio é qualquer outra doença ou distúrbio compreendendo calvície conhecido na técnica.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para tratar alopecia areata, que, em uma modalidade, é um distúrbio autoimune que causa perda de cabelos irregular, que pode variar de afinamento difuso a extensas áreas de calvície com "ilhas" de cabelos retidos.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para tratamento de tricotilomania, que, em uma modalidade, é o puxar compulsivo dos cabelos. A perda de cabelos devida a

tricotilomania é tipicamente irregular, já que os puxadores de cabelos tendem a concentrar o puxamento em áreas selecionadas.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para tratar alopecia triangular, que, em uma modalidade, é 5 uma perda de cabelos nas áreas temporais, que, algumas vezes, começa na infância. A perda de cabelos pode ser completa, ou alguns fios de cabelos finos, de pequeno diâmetro, podem permanecer.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece 10 métodos para tratar eflúvio telógeno, que, em uma modalidade, é um tipo comum de perda de cabelos causada quando uma grande percentagem dos cabelos do couro cabeludo são deslocados para fase de "perda por queda". As causas do eflúvio telógeno podem ser hormonais, nutricionais, associadas a drogas ou associadas ao 15 estresse.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para tratar síndrome de anágeno frouxa, que, em uma modalidade, é uma condição que ocorre principalmente em pessoas muito cabeludas, nas quais o couro cabeludo se assenta frouxamente 20 em folículos pilosos e é facilmente extraído por combinação ou puxamento. Em uma modalidade, a condição pode aparecer na infância.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para tratar *Tinea capitis* (verme anular do couro 25 cabeludo), que, em uma modalidade, é causado por uma infecção fúngica, e, em uma modalidade, é caracterizado por remendos de descamação que podem se espalhar e resultar em cabelos quebrados, vermelhidão, intumescimento e exsudante sobre o couro cabeludo.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece 30 métodos para tratar perda de cabelos associada com condições particulares, que, em uma modalidade, são câncer, doença da tireóide, dieta inadequada em proteínas, baixos níveis séricos em ferro, ou associadas com estímulos ambientais particulares, que, em uma modalidade, são quimioterapia, ou, em outra modalidade, são 35 radioterapia.

Em outras modalidades, a presente invenção fornece um método de tratamento de qualquer doença, distúrbio ou

sintoma associados com calvície. Em outras modalidades, a presente invenção fornece um método de tratamento de qualquer doença, distúrbio ou sintoma, associados com distúrbio de pele degenerativo. Em outras modalidades, a presente invenção fornece 5 um método de tratamento de qualquer doença, distúrbio ou sintoma, associados com alopecia. Cada doença, distúrbio ou sintoma representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, "tratar" se refere ou ao tratamento terapêutico ou às medidas preventivas profiláticas, 10 sendo que o objeto é prevenir ou diminuir a condição ou distúrbio patológico alvo, conforme anteriormente descrito acima. Assim, em uma modalidade, tratar pode incluir afetar diretamente ou curar, suprimir, inibir, prevenir, reduzir a severidade de, retardar o início de, reduzir os sintomas associados com a doença, distúrbio 15 ou condição, ou uma combinação dos mesmos. Assim, em uma modalidade, "tratar" se refere, *inter alia*, ao retardamento da progressão, aceleração da remissão, indução da remissão, aumento da remissão, aceleração da recuperação, aumento da eficácia de ou diminuição da resistência a terapêutica alternativa, ou uma 20 combinação dos mesmos. Em uma modalidade, "prevenir" se refere, *inter alia*, ao retardar do início dos sintomas, prevenção da reicidiva, diminuição do número ou da frequência de episódios de reicidiva, aumento de latência entre episódios sintomáticos, ou uma 25 combinação dos mesmos. Em uma modalidade, "suprimir" ou "inibir" se referem, *inter alia*, à redução da severidade dos sintomas, redução da severidade do episódio corrente, redução do número de sintomas, redução da incidência dos sintomas, redução da latência dos sintomas, melhoria dos sintomas, redução dos sintomas secundários, redução das infecções secundárias, ou uma 30 combinação dos mesmos.

Em uma modalidade, sintomas são primários, enquanto que, em outra modalidade, sintomas são secundários. Em uma modalidade, "primário(s)" se refere a um sintoma que seja um resultado direto da alopecia, enquanto que, em outra modalidade, 35 "secundário(s)" se refere a um sintoma que seja derivado de ou consequência de uma causa primária. Em uma modalidade, as composições e esforços para uso na presente invenção tratam

sintomas primários ou secundários ou complicações secundárias relacionadas à alopecia, em uma modalidade, dermatite seborreica.

Em outra modalidade, "sintomas" podem ser qualquer manifestação de alopecia, compreendendo perda de cabelos, 5 calvície, perda de cabelos temporária, perda de cabelos irregular, distúrbios de pele degenerativos ou uma combinação dos mesmos.

Métodos de determinação da presença e da severidade de alopecia e/ou de distúrbios de pele degenerativos, tais como aqueles aqui descritos, são bem conhecidos na técnica. 10 Cada método representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, os métodos da presente invenção são para tratar um paciente com perda de cabelos. Em uma modalidade, a perda de cabelos ocorre no couro cabeludo do 15 paciente. Em outra modalidade, a perda de cabelos ocorre na sobrancelha do paciente. Em outra modalidade, a perda de cabelos ocorre em tecido de pele cicatrizado do paciente, que, em uma modalidade, pode ser couro cabeludo, sobrancelha, braço ou perna do paciente. Em outra modalidade, qualquer outra área ou região da 20 pele suportando cabelos são tratadas por um método da presente invenção. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, métodos da presente invenção compreendem a etapa de rompimento da epiderme na região da perda de cabelos, antes da etapa de administração. Em outra modalidade, o epitélio é rompido. 25

Em outra modalidade de métodos e composições da presente invenção, a primeira etapa (por exemplo, rompimento epidérmico) é realizada 3-12 dias antes da segunda etapa (por 30 exemplo, adição de um composto ativo, fator, célula, etc.). Em outra modalidade, o intervalo é de 4-12 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 5-12 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 4-11 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 6-11 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 6-10 dias. Em outra modalidade, 35 o intervalo é de 6-9 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 6-8 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 7-8 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 5-11 dias. Em outra modalidade, o

intervalo é de 5-10 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 7-10 dias. Em outra modalidade, o intervalo é de 1 semana. Em outra modalidade, as composições para uso nos métodos da presente invenção são aplicadas conforme a crosta de sangue coagulado comece a cicatrizar, que, em uma modalidade, é de 3-12 dias depois do rompimento epidérmico. Em uma modalidade, as composições para uso nos métodos da presente invenção são aplicadas um dia depois do descolamento do sangue coagulado, em outra modalidade, dois dias depois do descolamento do sangue coagulado, em outra modalidade, três dias depois do descolamento do sangue coagulado, em outra modalidade, quatro dias depois do descolamento do sangue coagulado, em outra modalidade, cinco dias depois do descolamento do sangue coagulado, em outra modalidade, seis dias depois do descolamento do sangue coagulado, em outra modalidade, sete dias ou mais depois do descolamento do sangue coagulado. Em outra modalidade, as composições para uso na presente invenção são administradas nos dias 1-4 depois do descolamento do sangue coagulado. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, a etapa de rompimento é realizada por exposição da região da perda de cabelos a um estímulo mecânico, químico ou óptico. Em uma modalidade, o estímulo óptico é radiação.

A etapa de rompimento da epiderme em métodos da presente invenção é realizada, em outra modalidade, por abradamento da região da pele de interesse. Em outra modalidade, o termo "abradamento" se refere a um ato de criar uma abrasão. Em outra modalidade, "abradamento" se refere a esfregamento. Em outra modalidade, "abradamento" de refere a desgaste por atrito. Em uma modalidade, a abrasão epidérmica causa, sob as condições aqui utilizadas, a nova neogênese de HFs. Em outra modalidade, a camada epidérmica é rompida.

Em uma modalidade, "abrasão" se refere a um ferimento consistindo em lesão superficial à pele. Em outra modalidade, "abrasão" se refere a uma área do couro cabeludo ou da pele, a partir da qual a epiderme seja removida. Em outra modalidade, "abrasão" se refere a uma área do couro cabeludo ou da

pele, a partir da qual a epiderme e a derme sejam removidas. Cada definição de "abradamento" e de "abrasão" representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, o rompimento epidérmico por um 5 método da presente invenção converte a região da pele de interesse de volta a um estado semelhante ao embrionário, no qual o folículo se regenera. Em outra modalidade, é criada uma janela de oportunidade subsequente, durante a qual o número e o tamanho de novos HFs na região da pele de interesse podem ser manipulados. Em 10 outra modalidade, a administração de um composto ou fator, que promovam uma diferenciação de uma célula epidérmica não especializada em uma célula de HF durante essa janela, provocam a regeneração de HFs maiores e mais numerosos. Em uma modalidade, a morfologia de HFs na pele abradada é similar àquela de HFs 15 embrionários, e os marcadores expressos são também similares.

Em outra modalidade, os ferimentos excisionais dos métodos da presente invenção são criados usando uma ferramenta cirúrgica. Em uma modalidade, a ferramenta cirúrgica é um perfurador circular para biópsia dérmica. Em outra modalidade, os 20 ferimentos excisionais são induzidos por congelamento ou criolesão. O uso de congelamento ou criolesão é bem conhecido na técnica e é usado, por exemplo, por dermatologistas para lesionar a pele. Em uma modalidade, o congelamento ou criolesão resulta em uma bolha. Em outra modalidade, a bolha é usada como uma "câmara" 25 para introduzir drogas e/ou células na área re-epitelizada. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, o rompimento epidérmico nos 30 métodos da presente invenção remove adicionalmente tecido dérmico da região da pele de interesse. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico não remove tecido dérmico da região da pele de interesse. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

"Rompimento" de uma epiderme ou de uma camada 35 epidérmica se refere, em outra modalidade, à remoção de parte da epiderme ou da camada epidérmica. Em outra modalidade, o termo se refere à perturbação da incolumidade da epiderme ou da camada

epidérmica. Em outra modalidade, o termo se refere à perfuração da epiderme ou da camada epidérmica. Em outra modalidade, somente parte da camada epidérmica necessita ser removida. Em outra modalidade, a camada epidérmica inteira é removida. Em outra 5 modalidade, o termo se refere ao abradamento da epiderme ou da camada epidérmica. Em outra modalidade, o termo se refere ao ferimento da epiderme ou da camada epidérmica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, o rompimento epidérmico é 10 realizado com uma ferramenta que compreende uma lixa. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico é realizado com um laser. Em outra modalidade, o laser é um laser Fraxel. Em outra modalidade, o laser é um laser de CO₂. Em outra modalidade, o laser é um laser excimer. Em outra modalidade, o laser é qualquer outro tipo de 15 laser capaz de induzir lesão transepitelial. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico é realizado com uma roda politriz. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico é realizado com uma ferramenta cirúrgica. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico é realizado com qualquer outra ferramenta na técnica que seja 20 capaz de rompimento epidérmico. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende o uso de um dispositivo de micro-dermabrasão. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende um tratamento de queimadura.

Em outra modalidade, o rompimento epidérmico 25 compreende um rompimento de um folículo da epiderme e um rompimento de uma região interfolicular da epiderme. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende um rompimento de um folículo da epiderme e não compreende um rompimento de uma região interfolicular da epiderme. Cada possibilidade representa uma 30 modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende um método à base de luz. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende irradiação com luz visível. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende irradiação 35 com luz infravermelha. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende irradiação de ortovoltagem. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende irradiação com

raios X. Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende qualquer outro tipo de irradiação conhecido na técnica.

Em outra modalidade, o rompimento epidérmico é realizado por meio mecânico. Em outra modalidade, "meio mecânico" se refere a abradamento. Em outra modalidade, o termo se refere a ferimento. Em outra modalidade, o termo se refere a ultrassom. Em outra modalidade, o termo se refere à radiofrequência. Em outra modalidade, o termo se refere à eletroporação. Em outra modalidade, o termo se refere à excisão. Em outra modalidade, o termo se refere à remoção com fita. Em outra modalidade, o termo se refere à micro-dermabrasão. Em outra modalidade, o termo se refere ao uso de micrótomas. Em outra modalidade, o termo se refere a qualquer outro tipo de meio mecânico conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, o rompimento epidérmico compreende tratamento químico. Em outra modalidade, o ente químico é fenol. Em outra modalidade, o ente químico é ácido tricloroacético. Em outra modalidade, o ente químico é ácido ascórbico. Em outra modalidade, o ente químico é outro ente químico capaz de rompimento epidérmico, que seja conhecido na técnica.

Em outra modalidade, o trauma epidérmico é utilizado em um método da presente invenção.

Cada método ou tipo de rompimento, abrasão e trauma epidérmico representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, "WIHN" se refere à neogênese de HFs induzida por rompimento da camada epitelial. Em outra modalidade, o termo se refere à neogênese de HFs induzida por abrasão. Em outra modalidade, o termo se refere à neogênese de HFs induzida por ferimento. Em outra modalidade, o termo se refere à neogênese de HFs induzida por rompimento da camada epitelial, seguida por administração de um composto ou fator que promova uma diferenciação de uma célula epidérmica não especializada em uma célula de HF. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, o rompimento epidérmico dos métodos da presente invenção cria uma abrasão de pelo menos 1-1,5 centímetros (cm) de largura. Em outra modalidades, a abrasão é de pelo menos cerca de 1 cm de largura. Em outra modalidades, a abrasão é de pelo menos cerca de 1,5 cm de largura. Em outra modalidades, a abrasão é de pelo menos cerca de 2 cm de largura. Cada tipo de abrasão representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, os ferimentos excisionais dos métodos da presente invenção não são fechados cirurgicamente. Em outra modalidade, os ferimentos excisionais são deixados cicatrizar por intenção secundária. Em outra modalidade, a região da pele de interesse não é colocada em contato com uma bandagem ou atadura seguindo o rompimento epidérmico. Em outra modalidade, a região da pele de interesse não é colocada em contato com uma pomada seguindo o rompimento epidérmico. Em outra modalidade, a região da pele de interesse é deixada cicatrizar durante um período de tempo sem ser colocada em contato com qualquer substância, dispositivo, pomada, etc., que sejam ordinariamente administrados a uma abrasão ou ferimento para facilitar a cicatrização. Em outra modalidade, a região da pele de interesse é deixada cicatrizar durante um período de tempo sem ser colocada em contato com qualquer substância, dispositivo, pomada, etc., que sejam ordinariamente administrados a uma abrasão ou ferimento para evitar infecção. Em outra modalidade, o "período de tempo" é o tempo que o rompimento epidérmico leva para cicatrizar. Em outra modalidade, o período de tempo é qualquer tempo ou faixa de tempo entre 2 dias e 3 semanas. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, "seguindo" se refere a um período de tempo de cerca de 2 dias. Em uma modalidade, "seguindo" se refere a um período de tempo de cerca de 3 dias. Em uma modalidade, "seguindo" se refere a um período de tempo de cerca de 4 dias. Em uma modalidade, "seguindo" se refere a um período de tempo de cerca de 5 dias. Em uma modalidade, "seguindo" se refere a um período de tempo de cerca de 7 dias. Em uma modalidade, "seguindo" se refere a um período de tempo de cerca de 10 dias. Em

uma modalidade, "seguindo" se refere a um período de tempo de cerca de 2 semanas. Em uma modalidade, "seguindo" se refere a um período de tempo de cerca de 3 semanas. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

5 Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de depilação da pele na região na qual o crescimento de cabelos ou a formação de folículos sejam desejados. Em uma modalidade, a etapa de depilação é realizada antes da etapa de rompimento epidérmico.

10 Em outra modalidade, a depilação é epilação. Em outra modalidade, a depilação compreende a etapa de aplicação de cera. Em outra modalidade, a depilação compreende a etapa de puxão. Em outra modalidade, a depilação compreende o uso de um material abrasivo. Em outra modalidade, a depilação compreende o uso de laser. Em outra modalidade, a depilação compreende o uso de eletrólise. Em outra modalidade, a depilação compreende o uso de um dispositivo mecânico. Em outra modalidade, a depilação compreende o uso de ácido tioglicólico. Em outra modalidade, a depilação compreende o uso de qualquer outro método de depilação ou epilação conhecida na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

15 Em outra modalidade, a etapa adicional (depilação ou administração de um retinóide) é realizada antes da etapa de rompimento da epiderme. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada seguindo a etapa de rompimento da epiderme, mas antes da adição do composto ou fator da presente invenção. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada concorrentemente com a adição do composto ou fator promotor da diferenciação. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada seguindo a adição do composto ou fator promotor da diferenciação. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

20 Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de administração de um retinóide tópico à região da pele de interesse. Em outra modalidade, o retinóide tópico induz os HFs em repouso (telógeno) na região da pele de interesse a entrarem em anágeno. Cada

possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada entre cerca de dois dias e cerca de três semanas antes da etapa de abradamento. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada cerca de três dias antes da etapa de abradamento. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada cerca de quatro dias antes da etapa de abradamento. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada cerca de uma semana antes da etapa de abradamento. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada cerca de dez dias antes da etapa de abradamento. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada cerca de duas semanas antes da etapa de abradamento. Em outra modalidade, a etapa adicional é realizada cerca de três semanas antes da etapa de abradamento. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de um antagonista de um androgênio ou de um antagonista de um receptor de androgênio. Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de um inibidor de 5-alfa-redutase tipo 2.

Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação de contato da região da pele de interesse com um composto anti-androgênio. Em uma modalidade, o composto anti-androgênio é finasterida. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio é Fluridil®. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio é dutasterida. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio é espironolactona. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio é acetato de ciproterona. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio bicalutamida. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio é flutamida. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio nilutamida. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio é um inibidor de um receptor de androgênio. Em outra modalidade, o composto anti-androgênio é qualquer outro composto anti-androgênio conhecido na

técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um composto de estrogênio. Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um agonista de receptor de estrogênio. Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um análogo de estrogênio. Em uma modalidade, o análogo de estrogênio é estradiol. Em uma modalidade, o análogo de estrogênio é 17-beta-estradiol. Em uma modalidade, o análogo de estrogênio é 17-alfa-estradiol. Em uma modalidade, o análogo de estrogênio é ZYC3. Em uma modalidade, o composto de estrogênio, o agonista de receptor de estrogênio ou o análogo de estrogênio é qualquer outro composto de estrogênio, agonista de receptor de estrogênio ou análogo de estrogênio conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um inibidor de uma proteína EGF. Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um inibidor de um EGFR. Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um composto que reduza uma expressão de uma proteína EGF ou de um EGFR. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, o inibidor de EGF ou de um receptor de EGF é panitumumab. Em outra modalidade, o inibidor é AG1478. Em outra modalidade, o inibidor é nimotuzumab. Em outra modalidade, o inibidor é um anticorpo que se liga a EGF ou EGFR. Em outra modalidade, o inibidor é HuMax-EGFR® (Genmab, Copenhague, Dinamarca). Em outra modalidade, o inibidor é cetuximab. Em outra

modalidade, o inibidor é IMC 11F8. Em outra modalidade, o inibidor é matuzumab. Em outra modalidade, o inibidor é SC 100. Em outra modalidade, o inibidor é ALT 110. Em outra modalidade, o inibidor é PX 1032. Em outra modalidade, o inibidor é BMS 599626. Em outra 5 modalidade, o inibidor é MDX 214. Em outra modalidade, o inibidor é PX 1041. Em outra modalidade, o inibidor é qualquer outro inibidor de uma EGF ou de um receptor de EGF conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

10 Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um inibidor de uma atividade de tirosina quinase de um receptor de EGF. Em outra modalidade, o inibidor é gefitinib. Em outra modalidade, o inibidor é erlotinib. 15 Em outra modalidade, o inibidor é canertinib. Em outra modalidade, o inibidor é leflunomida. Em outra modalidade, o inibidor é A77 1726. Em outra modalidade, o inibidor é pelitinib. Em outra modalidade, o inibidor é ZD 1839. Em outra modalidade, o inibidor é CL 387785. Em outra modalidade, o inibidor é EKI 785. Em outra 20 modalidade, o inibidor é vandetanib. Em outra modalidade, o inibidor é qualquer inibidor de uma atividade de tirosina quinase de um receptor de EGF conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, um método da presente 25 invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um antagonista de EGF ou de EGFR. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é um inibidor de carbóxi-peptidase a partir de proteína de batata (PCI) ou de um homólogo, fragmento ou mimético da mesma. Em outra 30 modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é uma proteína germinada ou um homólogo, fragmento ou mimético da mesma. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é uma proteína Argos ou um homólogo, fragmento ou mimético da mesma. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é uma proteína canhota 35 ou um homólogo, fragmento ou mimético da mesma. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é um anticorpo que reconheça EGF ou EGFR ou um fragmento ou mimético da mesma. Em

outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é um inibidor de molécula pequena, que se ligue e reduza a atividade de EGF ou de EGFR. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é CRM197. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é

5 IMC-C225 (ImClone Systems, New York, NY, EUA). Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é qualquer outro antagonista de EGF ou de EGFR conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

10 Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é um inibidor de carbóxi-peptidase a partir de proteína de batata (PCI) ou de um homólogo, fragmento ou mimético da mesma. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é uma proteína germinada ou um homólogo, fragmento ou mimético da mesma. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é uma proteína Argos ou um homólogo, fragmento ou mimético da mesma. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é uma proteína canhota ou um homólogo, fragmento ou mimético da mesma. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é um anticorpo que reconheça EGF ou EGFR ou um fragmento ou mimético da mesma. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é um inibidor de molécula pequena, que se ligue e reduza a atividade de EGF ou de EGFR. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é CRM197. Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é

15 IMC-C225 (ImClone Systems, New York, NY, EUA). Em outra modalidade, o antagonista de EGF ou de EGFR é qualquer outro antagonista de EGF ou de EGFR conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

20

25 30 O EGFR dos métodos e composições da presente invenção apresenta, em outra modalidade, a sequência:

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVKQGTSNKLTLQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLE
ITYVQRNYDLSFLKTIQEVA^GYVLIALNTVERIPLLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGL
KELPMRNLQEILHGAVRFSSNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGS
35 CWGAGEENCQKLT^KIICAQQCSGR^RGKSPSDCC^HNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDT^C
PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADS^YEMEEDGVRKCKCE
GPCRKVCNGIGIGEFKD^SL^SINATNIKFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILK

TVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSGLRSLKEISDGDI
 ISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN
 VSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIOCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKT
 CPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIAATGMVGALLLLVV
 5 ALIGIGLFMRRRHIVRKRTLRLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTV
 YKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQL
 MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGL
 AKLLGAEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEIS
 SILEKGERLPQPPiCTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLP
 10 SPTDSNFYRALMDEEDMDVVADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNGLQ
 SCPIKEDSFLQRYSQDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPGSVQNPVYHNQPLNPAPS RD
 PHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPAHLAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFK
 GSTAENAELRVAPQSSEFIGA (Número de Acesso ao GenBank: NM_005228;
 SEQ ID No: 8). Em outra modalidade, o EGFR apresenta a sequência
 15 selecionada a partir das sequências mostradas nas entradas ao
 GenBank: NM_201282, NM_201283, NM_201284, BC094761, AF288738,
 AY588246, AY573061, X17054, AF125253, U48722, K03193 e AY698024.
 Em outra modalidade, o EGFR é codificado por uma molécula de ácido
 nucléico apresentando um sequência mostrada em uma das entradas ao
 20 GenBank acima. Em outra modalidade, um fragmento biologicamente
 ativo de um EGFR é utilizado em um método da presente invenção.
 Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente
 invenção.

A EGF dos métodos e composições da presente
 25 invenção apresenta, em outra modalidade, a sequência:

MLLTLIILLPVVSKFSVSL SAPQHWSCPEGTLAGNGNSTCVGPAPFLIFSHGNSIFRIDTEGTNY
 EQLVVDAGVSVIMDFHYNEKRIYWVDLERQLLQRVFLNGSRQERVNCIEKNVSGMAINWINEEVIW
 SNQQEGnTVTDMKGNNSHILLSALKYPANVADPVERFIFWSSEVAGSLYRADLDGVGVKALLETS
 EKITAVSLVLDKRLF WIQYNREGSNSLICSCDYDGGSVHISKHPTQHNLFAMSLFGDRIFYSTWK
 30 MKTIWIANKHTGKDMVRINLHSSFVPLGELKVVHPLAQPKAEDDTWEPEQKLCKLRKGNCSSTVCG
 QDLQSHLCMCAEGYALS RDRKYCEDVNECAFWNHGCTLGCKNTPGSYYCTCPVGFVLLPDGKRCHQ
 LVSCPRNVSEC SHDCVLTSEGPLCFPEGSVLERDGKTC SGSSPDNGGSQLCVP LSPV SWECDC
 FPGYDLQLDEKSCAASGPQPFLFANSQDIRHMFDGTDYGTLLSQQMGMVYALDHDPVENKIYFA
 HTALKWIERANMDGSQRERLIEEGVDVPEGLA DWIGRRFYWTDRGKSLIGRSIDLNGKRSKIITKE
 35 NISQPRGIAVHPMAKRLFW TDTGINPRIESSSLQGLGRLVIASSDLIWPSGITIDFLTDKLYWCDA
 KQSVIEMANLDGSKRRRLTQNDVGHFAVAVFEDYVWFSDWAMPSVIRVNKRTGKDRVRLQGSMLK
 PSSLVVVHPLAKPGADPCLYQNGGCEHICKKRLGTAWCSCREGFMKASDGKTCLALDGHQLLAGGE

VDLKNQVTPLDILSKTRVSEDNITESQHMLVAEIMVSDQDDCAPVGCSMYARCISEGEDATCQCLK
GFAGDGKLCSDIDECEMGVPVCPPASSKCINTEGGYVCRCSEGYQGDGIHCLDIDECQLGVHSCGE
NASCTNTTEGGYTCMCAGRLSEPGLICPDSTPPPHLREDDHHYSVRNSDSECPLSHDGYCLHDGVCM
YIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELRHAGHGQQQKVIVVAVCVVVVLVMLLLLSLWGAHYY
5 RTQKLLSKNPKNPYEESSRDVRSRRPADTEDGMSSCPQPWFVVIKEHQDLKNGGQPVAGEDGQAAD
GSMQPTSWRQEPLCGMGTEQGCWIPVSSDKGSCPQVMERSFHMPSYGTQLEGGVEKPHSLLSAN
PLWQQRALDPPHQMLETQ (Número de Acesso ao GenBank: NM_001963; SEQ ID
No: 9). Em outra modalidade, a EGF apresenta uma sequência
selecionada a partir das sequências mostradas nas entradas ao
10 GenBank: BC093731, AY548762 e X04571. Em outra modalidade, a EGF é
codificada por uma molécula de ácido nucléico apresentando um
sequência mostrada em uma das entradas ao GenBank acima. Em outra
modalidade, um fragmento biologicamente ativo de uma EGF é
utilizado em um método da presente invenção. Cada possibilidade
15 representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com uma proteína *hedgehog*. Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende
20 adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um nucleotídeo que codifique uma proteína *hedgehog*. Em outra modalidade, um método da presente invenção compreende adicionalmente a etapa de colocação em contato da região da pele de interesse com um ativador de uma proteína
25 *hedgehog*. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de um inibidor de 5-alfa-redutase de tipo 2, que, em uma modalidade, é
30 finasterida, ou, em outra modalidade, turosterida.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de um inibidor de redutase, que, em uma modalidade, é inibidor duplo de FCE, que, em uma modalidade, é FCE 28260; FCE 28175 ou FCE 27837;
35 em outra modalidade é um inibidor de MK, que, em uma modalidade, é MK 0434, MK 0963 ou MK 386; em outra modalidade, é um inibidor não esteroidal de FK, que, em uma modalidade, é FK 143; e, em outra

modalidade, é um inibidor não esteroidal de LY, que, em uma modalidade, é LY 191704; e, em outra modalidade, é um inibidor SK&F, que, em uma modalidade, é SK&F 105657.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de uma composição adicional. Em uma modalidade, a composição é dutasterida (Avodart®, GI198745), finasterida (Propecia®, Proscar®), turosterida, ácido azeláico, sulfato de zinco, CS 891, ou uma combinação dos mesmos.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de um anti-androgênio, que, em uma modalidade, é espironolactona (Aldactone®), flutamida (Euflex®, Eulexin®), casodex, inocoterona, um anti-androgênio de RU, TZP-4238, Win 49596, fluridil (Eucapil®), ou uma combinação dos mesmos.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de um abridor de canais de K⁺, que, em uma modalidade, é minoxidil (Rogaine®), diazóxido, cromakalim, pinacidil, ou uma combinação dos mesmos.

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de um vasodilatador, que, em uma modalidade, é minoxidil (Rogaine®).

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem adicionalmente a etapa de administração de um bloqueador de estrogênio, que, em uma modalidade, é um bloqueador de estrogênio ICI.

O paciente dos métodos da presente invenção é, em outra modalidade, um ser humano. Em outra modalidade, o paciente é um roedor, em uma modalidade, um camundongo, em uma modalidade, um rato. Em outra modalidade, o paciente é um mamífero. Em outra modalidade, o paciente é um vertebrado. Em outra modalidade, o paciente é felino, canino, ovino ou bovino. Em outra modalidade, o paciente é um macho. Em outra modalidade, o paciente é uma fêmea. Em outra modalidade, o paciente é qualquer outro paciente conhecido. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, o paciente é um adulto. Em uma modalidade, "adulto" se refere a uma idade maior do que cerca de 18 anos. Em outra modalidade, "adulto" se refere a uma idade maior do que cerca de 20 anos. Em outra modalidade, "adulto" se refere a uma idade maior do que cerca de 25 anos. Em outra modalidade, "adulto" se refere a uma idade maior do que cerca de 30 anos. Em outra modalidade, "adulto" se refere a uma idade maior do que cerca de 35 anos. Em outra modalidade, "adulto" se refere a uma idade maior do que cerca de 40 anos. Em outra modalidade, "adulto" se refere a uma idade maior do que cerca de 45 anos.

Em outra modalidade, o paciente é idoso. Em uma modalidade, "idoso" se refere a uma idade maior do que cerca de 45 anos. Em outra modalidade, "idoso" se refere a uma idade maior do que cerca de 50 anos. Em outra modalidade, "idoso" se refere a uma idade maior do que cerca de 55 anos. Em outra modalidade, "idoso" se refere a uma idade maior do que cerca de 60 anos. Em outra modalidade, "idoso" se refere a uma idade maior do que cerca de 65 anos. Em outra modalidade, "idoso" se refere a uma idade maior do que cerca de 70 anos.

Em outra modalidade, o primeiro paciente ou, quando aplicável, tanto o primeiro paciente quanto o segundo paciente, é um animal de laboratório. Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) camundongo(s). Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) rato(s). Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) rato(s)-do-deserto. Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) hâmster(s). Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) porquinho(s)-da-índia. Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) coelho(s). Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) porco(s). Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) cão(es). Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) gato(s). Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) primata(s). Em outra modalidade, o(s) pacientes(s) é(são) qualquer outro animal de laboratório conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, o paciente é colocado em contato com FGF9, ou, em outra modalidade, com uma composição

compreendendo FGF9. Em outra modalidade, FGF9 ou uma composição compreendendo FGF9 é administrada a um paciente.

"Colocação em contato", conforme usado aqui, se refere, em outra modalidade, a levar a pele, em uma modalidade, 5 couro cabeludo, sobrancelha, etc, ao contato com um composto, fator, célula, etc. Em outra modalidade, o termo se refere a incrustar o composto, fator, célula, etc, na região da pele de interesse. Em outra modalidade, o termo se refere à injeção do composto, fator, célula, etc na região da pele de interesse. Em 10 outra modalidade, o termo se refere a qualquer outro tipo de colocação em contato conhecido na técnica. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em outra modalidade, a etapa de colocação em contato, nos métodos da presente invenção, comprehende colocação em contato diretamente a região da pele de interesse com o composto, ARN, proteína, etc. Em outra modalidade, a etapa de colocação em contato comprehende a colocação em contato indiretamente a região da pele de interesse via colocação em contato outro local ou tecido do paciente, depois do quê o composto, ARN ou proteína é 20 transportado para a região da pele de interesse por um processo biológico; por exemplo, difusão, transporte ativo ou circulação em um fluido, tal como o sangue, linfa, fluido intersticial, etc. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

25 Em uma modalidade, outros fatores de crescimento de fibroblastos podem ser usados nos métodos da presente invenção. Em uma modalidade, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, ou uma combinação dos mesmos pode ser usada nos métodos da presente invenção. Em uma modalidade, todos de FGF1 até 30 FGF10 se ligam a receptores de fator de crescimento de fibroblasto (FGFRs). Em uma modalidade, FGF1 é conhecido como fator de crescimento de fibroblasto ácido, e FGF2 é também conhecido como fator de crescimento de fibroblasto básico.

35 Em outra modalidade, FGF11, FGF12, FGF13 ou FGF14 pode ser usada nos métodos da presente invenção. Em uma modalidade, FGF11, FGF12, FGF13 e FGF14 são conhecidos como fatores homólogos de FGF 1-4 (FHF1-FHF4), e, em outra modalidade,

apresentam diferenças funcionais distintas comparados aos FGFs. Em uma modalidade, esses fatores possuem homologia de sequência notavelmente similar, em uma modalidade, eles não se ligam a FGFRs e estão envolvidos em processos intracelulares não relacionados ao 5 FGFs. Em uma modalidade, esse grupo é também conhecido como "iFGF".

Em outra modalidade, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22 ou FGF23 podem ser usados nos métodos da 10 presente invenção. Em uma modalidade, FGF15/FGF19, FGF21 e FGF23 apresentam efeitos sistêmicos ao invés de locais.

Composições Farmacêuticas

Em outra modalidade, os métodos da presente invenção compreendem a administração de uma composição farmacêutica compreendendo FGF9 ou de um regulador à montante de 15 SHH e/ou seus análogo, derivado, isômero, metabólito, sal farmaceuticamente aceitável, produto farmacêutico, hidrato, N-óxido, ou qualquer combinação dos mesmos; e um veículo farmaceuticamente aceitável. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

As composições farmacêuticas contendo FGF9 ou um 20 regulador à montante de SHH, em uma modalidade, podem ser administrada a um paciente ou qualquer método conhecido por um técnico no assunto, tal como, topicalmente, parenteralmente, paracanceralmente, transmucosalmente, transdermicamente, 25 intramuscularmente, intravenosamente, intradermicamente, subcutaneamente, subepidermicamente, intraperitonealmente, intraventricularmente, intra-arteriolamente, intravascularmente, intracranialmente, intravaginalmente, intrarretalmente ou intratumoralmente. Cada possibilidade representa uma modalidade 30 separada da presente invenção. Em uma modalidade, o regime de dosagem será determinado por clínicos especializados, com base em fatores, tais como a natureza exata da condição sendo tratada, a severidade da condição, a idade e a condição física geral do paciente, o peso corporal e a resposta do paciente individual, 35 etc.

Em outra modalidade, as composições farmacêuticas são administradas oralmente, e são, assim, formuladas em uma forma

adequada para administração oral, isto é, como uma preparação sólida ou como uma preparação líquida. Formulações orais sólidas adequadas incluem tabletas, cápsulas, pílulas, grânulos, pelotas e os similares. Formulações orais líquidas adequadas incluem
5 soluções, suspensões, dispersões, emulsões, óleos e as similares. Em uma modalidade da presente invenção, o FGF9, ou outro polipeptídeo como composição aqui fornecida, é formulado em uma cápsula. Em outra modalidade, as composições da presente invenção compreendem, em adição a FGF9, ou outro polipeptídeo como
10 fornecido aqui, um veículo ou diluente inertes, ou uma cápsula de gelatina dura.

Em outra modalidade, as composições farmacêuticas são administradas topicamente às superfícies do corpo e são, assim, formuladas em uma forma adequada para administração tópica.
15 Formulações tópicas adequadas incluem géis, pomadas, cremes, loções, gotas, géis; pastas; pós; sprays de aerossol; xaropes ou pomadas em esponjas ou aplicadores de algodão; e soluções ou suspensões em um líquido aquoso, líquido não aquoso, emulsão de óleo em água ou emulsão líquida de água em óleo, e as similares.
20 Por causa de sua facilidade de administração, um creme, loção ou pomada representam as formas unitárias de dosagem tópica mais vantajosa, em cujos casos veículos farmacêuticos líquidos podem ser empregados na composição. Esses cremes, loções ou pomadas podem ser preparados como produtos de remoção por enxágue ou para
25 se deixar no local, assim como produtos de tratamento em dois estágios para uso com outras composições de limpeza ou de gerenciamento da pele. Em uma modalidade preferida, as composições são administradas como um produto de remoção por enxágue em uma forma de concentração mais elevada, tal como um gel, e, então, um
30 produto para se deixar no local em uma concentração mais baixa, para evitar a irritação da pele. Cada uma dessas formas é bem entendida pelos técnicos no assunto, tal que dosagens possam ser facilmente preparadas para incorporarem a composição farmacêutica da invenção. Em uma modalidade, um emplastro de liberação
35 retardada pode ser usado para administração de FGF9. Para administração tópica, a composição de FGF9, ou seus derivados fisiologicamente tolerados, tais como sais, ésteres, N-óxidos, e

os similares, são preparados e aplicados como soluções, suspensões ou emulsões em um diluente fisiologicamente aceitável, com ou sem um veículo farmacêutico.

Preparações de pomada podem ser classificadas grosseiramente em pomadas do tipo gordura/óleo, pomadas emulsificadas, pomadas solúveis em água e pomadas suspensas, de acordo com o tipo de base (veículo) usado para ela. Uma pomada pode compreender, por exemplo, gorduras, óleos graxos, lanolina, vaselina, parafinas, ceras, resinas, plásticos, glicóis, álcoois superiores, glicerol, água, emulsificantes, agentes de suspensão ou outros aditivos apropriados como um diluente, excipiente ou veículo. A fabricação de uma pomada compreende, por exemplo, a adição do composto da presente invenção aos aditivos, diluentes, excipientes ou veículos apropriados, seguida por misturação para tornar a mistura homogênea.

Para aplicação parenteral, são particularmente adequadas soluções estéreis injetáveis, de preferência soluções oleosas ou aquosas, assim como suspensões, emulsões ou implantes, incluindo supositórios e enemas. Ampolas são dosagens unitárias convenientes. Um tal supositório pode compreender qualquer agente descrito aqui.

Para aplicação por inalação, soluções ou suspensões dos compostos misturados e aerossolizados ou nebulizados na presença do apropriado veículo adequado. Um tal aerossol pode compreender qualquer agente descrito aqui.

Para aplicação enteral, são particularmente adequados tabletes, drágeas, líquidos, gotas ou cápsulas. Em uma modalidade, um veículo adocicado é empregado quando for usado um xarope, elixir ou similar, para aplicação enteral.

Para formulações líquidas, veículos farmaceuticamente aceitáveis, em outra modalidade, são soluções aquosas e não aquosas, suspensões, emulsões ou óleos. Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. Veículos aquosos incluem, em outra modalidade, água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões, suspensões, incluindo salina e meios tamponados. Exemplos de óleos são aqueles de origem a partir do

petróleo, animal, vegetal ou sintética, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de oliva, óleo de girassol e óleo de fígado de bacalhau.

Em outra modalidade, as composições farmacêuticas 5 são administradas por implantação subcutânea de um pelota. Em outra modalidade, a pelota fornece liberação controlada do FGF9 durante um período de tempo.

Em uma modalidade, as composições farmacêuticas 10 são composições de liberação controlada, isto é, composições, nas quais a composição de FGF9 é liberada durante um período de tempo depois da administração. Composições de liberação controlada ou sustentada incluem, em outra modalidade, formulação em depósitos de lipofílicos (por exemplo, ácidos graxos, ceras, óleos). Em outra modalidade, a composição é uma composição de liberação 15 imediata, isto é, uma composição, na qual toda a composição de FGF9 é liberada imediatamente depois da administração. As composições de liberação sustentada ou dirigida podem ser formuladas, por exemplo, lipossomas ou aquelas, nas quais o composto ativo é protegido com revestimentos degradáveis de 20 maneira diferencial, por exemplo, por microencapsulação, revestimentos múltiplos, etc. É também possível liofilizar os novos compostos e usar os liofilizados obtidos, por exemplo, para a preparação de produtos para injeção.

Em uma modalidade, as composições desta invenção 25 são farmaceuticamente aceitáveis. Em uma modalidade, o termo "farmaceuticamente aceitável(is)" se refere a qualquer formulação, que seja segura e que forneça a entrega apropriada para a rota de administração desejada de uma quantidade eficaz de pelo menos um composto para uso na presente invenção. Esse termo também se 30 refere ao uso das formulações tamponadas, sendo que o pH é mantido em um valor desejado em particular, variando desde pH 4,0 a pH 9,0, de acordo com a estabilidade dos compostos e rota de administração.

Em uma modalidade, FGF9 ou reguladores à montante 35 de SHH, usados nos métodos desta invenção podem ser administrados isoladamente ou dentro de uma composição. Em outra modalidade, podem ser usadas composições compreendendo FGF9 ou reguladores à

montante de SHH em adição sob misturação com excipientes convencionais, isto é, substâncias de veículo orgânicas ou inorgânicas farmaceuticamente aceitáveis, adequadas para aplicação parenteral, enteral (por exemplo, oral) ou tópica, que não reajam de maneira deletéria com os compostos ativos. Em uma modalidade, veículos farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, água, soluções salinas, álcoois, goma arábica, óleos vegetais, álcoois benzílicos, polietileno glicóis, gelatina, carboidratos, tais como lactose, amilose ou amido, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, parafina branca, glicerol, alginatos, ácido hialurônico, colágeno, óleos para perfume, monoglicerídeos e diglicerídeos de ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos de pentaeritritol, hidróxi-metilcelulose, poli(vinil-pirrolidona), etc. Em outra modalidade, as preparações farmacêuticas podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, preservantes, estabilizadores, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, substâncias corantes, flavorizantes e/ou aromáticas, e os similares, que não reajam de maneira deletéria com os compostos ativos. Em outra modalidade, eles também podem ser combinados, quando desejado, com outros agentes ativos, por exemplo, vitaminas.

Em uma modalidade, as composições terapêuticas da presente invenção compreendem uma composição de FGF9 e um ou mais compostos adicionais eficazes na prevenção ou no tratamento de condições dermatológicas, tais como alopecia. Em uma modalidade, o composto adicional é um hidratante ou um emoliente, que, em uma modalidade, é petrolato, petrolato branco, óleo vegetal hidrogenado, petrolato hidrofílico, pantenol, óleo de primula, óleos de peixe com ômega-3, óleos de peixe com ômega-6, ácido linoléico, óleo de semente de linho, ceramida, óleo de borragem (ácido linoléico), tocoferol (vitamina E), linoleato de tocoferol, dimeticona, glicerina ou uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, hidratantes melhoram a capacidade da pele em absorver outros compostos administrados, incluindo, entre outros, os compostos para uso na presente invenção. Em outra modalidade, agentes hidratantes minimizam ou evitam que a pele se seque ou se

rache, por meio do que diminui a suscetibilidade da pele a fatores ambientais, que geram radicais livres, por meio disto evitando dano adicional à pele.

Em outra modalidade, o compostos adicional é um esteroide tópico, que, em uma modalidade, é hidrocortisona, em uma modalidade, 1% de hidrocortisona, triamcinolona, fluocinolona acetonida, halcinonida, propionato de halobetasol, propionato de clobetasol, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona e triamcinolona acetonida, ou uma combinação dos mesmos; esteroides orais; imunomoduladores tópicos, incluindo, entre outros, tacrolimo, pimecrolimo, ascomicina, ciclosporina, ou uma combinação dos mesmos; anti-histamínicos, que, em uma modalidade, é hidroxizina ou cloridrato de difenidramina, cetotifen, doxepin; entes biológicos, que, em uma modalidade, compreende amevive (alefacept), enbrel, humira, raptiva, remicade, ou uma combinação dos mesmos; ou uma combinação dos mesmos. Em outra modalidade, o composto adicional é um antibiótico, que, em uma modalidade, compreende tetraciclina, doxiclina, minociclina, cloxacilina, cefalexina, penicilina, clindamicina ou uma combinação dos mesmos. Em outra modalidade, o composto adicional é metotrexato, alcatrão, alcatrão de hulha, antralina, dovonex, ácido salicílico, tazorac, hidratantes, aloé vera, soriatane, acutane, hidrea, micofenolato de mofetila, saulfasalazina, 6-tioguanida, ou uma combinação dos mesmos. Em outra modalidade, compostos adicionais compreendem aciclovir, que, em uma modalidade, é particularmente eficaz em pacientes com eczema herpético. Em uma modalidade, compostos adicionais para tratar dermatite seborreica compreendem pitiona de zinco, sulfeto de selênio, enxofre, xampu de alcatrão, solução de flucinolona acetonida, loção de triamcinolona acetonida, creme de cetoconazol, outros imidazóis, ou uma combinação dos mesmos.

Em outra modalidade, o composto adicional é um agente anti-inflamatório, que, em uma modalidade, compreende aspirina, ibuprofeno, cetoprofen, naproxen, ou uma combinação dos mesmos. Em outra modalidade, o composto adicional é uma prostaglandina ou inibidor de prostaglandina, que, em uma modalidade, é um inibidor de PGD2.

Em outra modalidade, o composto adicional é um exfoliante, que, em uma modalidade, compreende um exfoliante enzimático ou um mono- ou poli-hidróxi-ácido. Em uma modalidade, o exfoliante é um alfa-hidróxi-ácido, beta-hidróxi-ácido, ácido tântico, ácido glicólico, ácido lático, ácido cítrico, ácido salicílico, ou uma combinação dos mesmos. Em outra modalidade, o composto adicional é um analgésico, ou anestésico, enquanto que, em outra modalidade, ele é gel de aloé vera, aloé vera, extrato de alcaçuz, celandina, raiz de salgueiro canadense, zinco, alantoína, ou uma combinação dos mesmos. Em outra modalidade, o composto adicional é um anti-oxidante.

Em uma modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração de 10 ng/mL. Em outra modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração de 20 ng/mL. Em outra modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração de 40 ng/mL. Em outra modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração de 80 ng/mL. Em outra modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração de 5 ng/mL. Em outra modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração de 3 ng/mL. Em outra modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração de 1 ng/mL. Em outra modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração entre 1 e 50 ng/mL. Em outra modalidade, a proteína de fator-9 de crescimento de fibroblasto é administrada em uma concentração entre 1 e 15 ng/mL.

Cada dose representa uma modalidade separada.

Em geral, as doses utilizadas para as finalidades descritas acima variarão, mas serão uma quantidade eficaz para exercer o efeito desejado. Conforme usado aqui, o termo "quantidade farmaceuticamente eficaz" se refere a uma quantidade de uma FGF9 ou de outra composição para uso na presente invenção, que produzirá o alívio desejado nos sintomas ou outro fenótipo desejado de um paciente. As doses utilizadas para qualquer das

finalidades acima descritas, de maneira geral, serão de 1 a cerca de 1.000 miligramas por quilograma de peso do corpo (mg/Kg), administradas uma a quatro vezes por dia, ou por infusão IV contínua. Em uma modalidade, uma faixa de dose diária tópica, em 5 doses únicas ou divididas, para as condições descritas aqui é de cerca de 1 mg a 20.000 mg, mais preferivelmente, de cerca de 2.000 mg a cerca de 16.000 mg, e, muitíssimo preferivelmente, de cerca de 6.000 mg a 10.000 mg dos componentes ativos (isto é, excluindo excipientes e veículos). Quando as composições forem dosadas 10 topicalmente ou intraocularmente, de maneira geral, elas estarão em uma faixa de concentração de 0,1 a cerca de 10% p/v, administradas 1-4 vezes por dia. Em uma modalidade, as composições para uso nos métodos da presente invenção são administradas topicalmente duas 15 vezes ao dia.

15 Em uma modalidade da invenção, as concentrações dos compostos dependerão de vários fatores, incluindo a natureza da condição a ser tratada, a condição do paciente, a rota de administração e a tolerabilidade individual da composição.

20 Em uma modalidade, a etapa de administração é via administração tópica. Em outra modalidade, a etapa de administração é via administração subcutânea.

25 Em uma modalidade, o composto administrado como parte dos métodos da presente invenção é administrado sistemicamente. Em outra modalidade, o composto é administrado topicalmente. Em outra modalidade, o composto é administrado subepidermicamente. Em outra modalidade, o composto é administrado subcutaneamente. Em outra modalidade, o composto é administrado transdermicamente. Em outra modalidade, o composto é administrado ao local da abrasão. Em outra modalidade, o composto é 30 administrado ao local da indução do ferimento. Em outra modalidade, o composto é administrado ao local da depilação. Em outra modalidade, o composto é administrado durante a cicatrização do ferimento. Em outra modalidade, o composto é administrado antes da neogênese de HFs. Em outra modalidade, o composto é 35 administrado durante a neogênese de HFs. Cada possibilidade representa uma modalidade separada da presente invenção.

Em uma modalidade, a rota de administração pode ser dirigida a um órgão ou sistema que seja afetado por alopecia. Por exemplo, os compostos podem ser administrados topicalmente para tratar condições dermatológicas, tal como alopecia. Em outra 5 modalidade, a rota de administração pode ser dirigida a um órgão ou sistema diferente, daquele que é afetado por condições dermatológicas, tal como alopecia. Por exemplo, compostos podem ser administrados parenteralmente para tratar condições dermatológicas, tal como alopecia. Portanto, a presente invenção 10 para uso de FGF9 ou outra composição para uso na presente invenção em várias formas de dosagem adequadas para administração usando qualquer das rotas listadas aqui acima.

Em uma modalidade, os métodos da presente invenção de testagem de um composto são repetidos usando uma 15 pluralidade de pacientes, até que tenha sido testada uma amostra estatisticamente significativa.

Em uma modalidade, FGF9 aumenta a formação de germes capilares em tecido embrionário, mas não é essencial para a formação de germes capilares. Em uma modalidade, FGF9 é necessária 20 para a formação e/ou dimensionamento de folículos pilosos em tecido adulto depois de rompimento epidérmico.

Em uma modalidade, as vias de sinalização para formação de germes capilares embrionários e para a neogênese de folículos pilosos induzida por ferimento compartilham um ou mais 25 componentes. Em outra modalidade, as vias de sinalização para formação de germes capilares embrionários e para a neogênese de folículos pilosos induzida por ferimento não são idênticas. Portanto, em uma modalidade, FGF9 é essencial para a formação de folículos pilosos em WIHF, mas não durante ED13.5.

30 Em outra modalidade, a via de sinalização para sinais de crescimento dos cabelos difere em partes diferentes do corpo. Assim, em uma modalidade, a formação de germes de cabelos embrionários e a neogênese de folículos pilosos induzida por ferimento diferem em suas dependências de FGF9 devido às 35 diferenças em seus respectivos estágios de desenvolvimento e diferenças de localização no corpo.

Em uma modalidade, a combinação de FGF9 e a cicatrização de ferimentos aumenta a sua eficácia como um promotor de crescimento dos cabelos. Em uma modalidade, a aplicação de FGF9 isoladamente provoca espessamento epidérmico.

5 Em outra modalidade, a invenção fornece um método de tratamento de perda dos cabelos ou a regeneração de folículos pilosos em um paciente, compreendendo a etapa de rompimento da epiderme na região da perda de cabelos no paciente. Em algumas modalidades, o método compreende adicionalmente a etapa de
10 recrutamento das células gama-delta T para a epiderme ferida. Em uma modalidade exemplificativa, o método compreende adicionalmente a etapa de recrutamento das células gama-delta T para a epiderme ferida através de citocinas.

EXEMPLOS

15 DETALHES EXPERIMENTAIS

Depilação e abrasão epidérmica

Camundongos foram anestesiados com uma injeção de pentobarbital sódico antes que os cabelos no dorso fossem grampeados e depilados com Nair (Carter-Wallace, New York, NY), então, epiderme foi removida usando uma roda politriz rotativa, conforme descrito por Argyris T, J Invest Dermatol, 75: 360-362, 1980). Depois de esfregar com etanol à 70% e secar sob uma lâmpada incandescente, as camadas basal e supranasal em uma área de (1,5 cm²) da epiderme interfolicular foram removidas por cuidadosa abrasão com uma roda politriz montada em uma ferramenta Dremel Moto (Racine, WI). Depois de abrasão, a pele estava brilante e lisa, e não havia sangue. Um dia depois, a área abradada foi recoberta por uma crosta de fibrina, que caiu depois de 3-7 dias, expondo a epiderme recém-regenerada. Um grupo de camundongos de controle foi sacrificado imediatamente depois de abrasão, para confirmar microscopicamente a remoção completa da epiderme interfolicular.

Ferimento por perfuração e indução de ferimento excisional

Os dorsos de camundongos de 21 dias de idade foram depilados conforme descrito para o Exempli 1 e esterilizados com álcool, seguido por solução de iodo à 1%. Ferimentos por

perfuração, de 4 mm de diâmetro, foram induzidos usando um perfurador circular para biópsia dérmica, para baixo, mas não através, do músculo da fascia. Ferimentos excisionais foram de espessura completa e de 1 cm de diâmetro; pele e panículo carnoso 5 foram excisados usando tesouras cirúrgicas finas.

Imuno-histoquímica

Amostras de pele foram fixadas em formalina à 10% tamponada com PBS. Seções de parafina de seis micra de espessura foram cortadas e tingidas, onde aplicável, com anticorpos.

10 Montagem inteira e imunofluorescência

Montes inteiros de HFs foram obtidos por incubação de pele fresca com EDTA (20 mM em PBS) à 37°C, durante uma noite, então, separando a epiderme e a derme. Epiderme foi, então, fixada em formalina à 10% durante 10 minutos, temperatura ambiente (TA). A derme foi fixada em acetona durante uma noite, RT. 15

Depois de enxágue com PBS, montes inteiros foram tingidos com anticorpos para imuno-histoquímica (retratada esquematicamente na Figura 12) e tiveram suas imagens formadas 20 usando microscópio confocal Leica.

Estatística

Os números de folículos pilosos são expressos como média ± d.p. A função de teste t de duas caudas de Student em Excel foi usada para calcular os valores de P.

25 Protocolo de cultura de pele de camundongo embrionário

Os seguintes materiais foram usados: pratos de poço central (Fisher 08-772-12); grades de metal (Goodfellow 688-485-21); filtros de nitrocelulose (Millipore AABP04700); Media: DMEM + 5% FBS + IX Pen/Strep.

30 Foram encomendadas mães prenhas de tempo determinado de dia gestacional 13,5 (Charles River). Os pratos de poço central foram ajustados com 2 mL de meio/placa. A grade de metal foi colocada no poço central. Os pratos foram armazenados em uma incubadora, se modo que os meios de aquecessem para 37°C. Os 35 filtros de nitrocelulose foram cortados em retângulos e colocados

em um bécher de dH₂O sobre uma placa aquecida. Água foi deixada ferver e, então, os filtros foram fervidos durante 10 minutos.

Foram preparadas duas placas de Petri com PBS estéril. As mães foram submetidas à eutanásia e os embriões foram removidos por dissecação no saco. Os embriões foram colocados em uma placa de Petri. Os embriões foram removidos por dissecação do saco e colocados em uma segunda placa de Petri com PBS estéril. As placas de embriões foram colocadas sobre gelo. A pele dorsal foi dissecada a partir do embrião sob um escópio de dissecação, em uma placa de Petri limpa contendo PBS estéril.

O comprimento coroa-traseiro do embrião foi verificado com uma régua para assegurar que ele está no estágio E13,5 (~ 10 - 10,3 mm). A cabeça do embrião foi removida com tesouras de micro dissecação. Um par menor de tesouras de micro dissecação foi usado para fazer incisões ao longo de ambos os lados da traseira, acima dos membros. Uma terceira incisão foi feita através da cauda em direção à cabeça. A pele foi disposta por sobre o lado negro do filtro de microcelulose, tão aplinada quanto possível. O filtro de microcelulose foi colocado por sobre a grade de metal, de modo que a pele estivesse na interface líquido-ar. O prato foi incubado à 37°C. Quando todas as peles estavam dissecadas, os compostos foram adicionados aos meios de cultura (se necessário), e retornados à incubadora. As peles foram cultivadas durante até 3 dias. Placódeos começaram a se desenvolver em E14.5.

EXEMPLO 1

FGF9 EXPRESSA EM PERÍODO PREMATURO DE FORMAÇÃO DE GERMES DE CABELOS

A expressão de mARN de FGF9 foi avaliada em epiderme regenerada por PCR em tempo real quantitativa. FGF9 foi expressa em níveis mais elevados antes dos estágios mais precoces da regeneração dos folículos pilosos no Dia 1, depois do descolamento de sangue coagulado (SD; que ocorre em re-epitelização) comparado ao Dia 5 depois de descolamento de sangue coagulado, quando os folículos se formaram (Figura 1). Células γδ-T da pele (detectadas por imunotintimento usando anticorpos contra

receptor de $\gamma\delta$ TC) repovoam a epiderme re-epitelizada em SD7 (Figura 2, painel esquerdo) e estas células expressam proteína FGF9 em SD1 (célula dendrítica vermelha na epiderme, Figura 2, painel direito, Figura 3).

5 Assim, FGF9 foi expressa de maneira seletiva antes da formação de germes de cabelos (durante o período não diferenciado), ao invés de durante a diferenciação. Células $\gamma\delta$ -T da pele pareceram ser a fonte de FGF9, o que sugere que células inflamatória podem ter um papel na neogênese de folículos pilosos
10 induzida por ferimento (WIHN).

EXEMPLO 2

FGF9 EXPRESSA EM PELE DE DIA 14 EMBRIONÁRIO (E14)

FGF9 (tingimento vermelho) é expressa por $\gamma\delta$ TC em pele de dia 14 embrionário (E14) (Figura 4).

15 **EXEMPLO 3**

FGF9 DESEMPENHA UM PAPEL NA NEOGÊNESE DE FOLÍCULOS PILOSOS INDUZIDA POR FERIMENTO (WIHN)

Experimento de neutralização anti-FGF9 em camundongos adultos

Camundongos C57BL/6 de 3 semanas de idade
20 (adultos) foram submetidos ao modelo de ferimento conforme descrito aqui acima. Os camundongos receberam, então, injeções subepidérmicas de 50 μ L de anti-FGF9 à 10 μ g/mL ou de controle de isotipo IgG2a nos dias SD1-SD4. Amostras de tecido foram tomadas e analisadas em SD5.

25 *Immunoblots* foram usados para verificar a especificidade do anticorpo de neutralização anti-FGF9. FGF9 de camundongo apresenta 198 pb e mais do que 99% de homologia com FGF9 humana (com diferença de somente um aminoácido). FGF9 existe nas formas tanto de monômero (25-27 KD) quanto de dímero. Os 30 *immunoblots* demonstraram a presença das formas tanto de monômero de 26 KD quanto de dímero de 52 KD em lisados de células inteiras embrionárias de camundongo de E14.5, assim como em amostras de controle contendo hFGF9 recombinante (Figura 5).

Os camundongos recebendo anticorpo anti-FGF9
35 apresentavam números de folículos pilosos significativamente mais

baixos em SD5 do que os controles de IgG2a (Figura 6). Assim, FGF9 desempenha um papel em neogênese de folículos pilosos induzida por ferimento.

Os estágios de desenvolvimento dos folículos pilosos foram quantificados conforme descrito em Paus R et al., J Invest Dermatol 1999. Houve uma diminuição de folículos pilosos maduros e um aumento de folículos pilosos imaturos no grupo tratado com anti-FGF9 (Figura 7).

EXEMPLO 4

10 FGF9 DESEMPEENHA UM PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DE PELE EMBRIONÁRIO

Camundongos C57BL/6 prenhas programadas foram sacrificadas em E13.5, e a pele do dorso integral embrionária foi dissecada. A pele de E13.5 foi cultivada durante três dias flutuando sobre papel de filtro com grade de metal.

Para determinar o papel de FGF-9 em neogênese de folículos pilosos em pele embrionária, culturas de explante de pele embrionária foram tratadas durante três dias com (rh)FGF9 humana recombinante (controle, 20, 20 ou 40 ng/mL) ou com anticorpo de neutralização anti-FGF9 (controle, 10, 20 ou 40 µg/mL) ou controle de isotipo de IgG2a (controle, 10, 20 ou 40 µg/mL). Fosfatase alcalina (AP) para imunotintingimento da derme (Figura 10) e K17 foi usado para imunotintingimento da epiderme (Figura 12).

A contagem de germes de cabelos foi realizada em três campos separados por amostra e foi avaliada por mm² (Figura 8). q-PCR para Shh, Ptch1, Ptch2, Gli1 e Gli2 foi realizada depois de 24 h de tratamento com rhFGF9.

Protocolo de PCR em tempo real

Foram usados os seguintes materiais: mini kit de tecido fibroso RNeasy® (Qiagen, 74704); kit de transcrição reversa com cADN de elevada capacidade (Applied Biosystems, P/N 4368814); mistura mestra para PCR universal Taqman® Fast (2X) (Applied Biosystems, P/N 4352042); sistema para PCR em tempo real Applied Biosystems StepOneTM; (Applied Biosystems, P/N 4376373); filme adesivo óptico com 48 poços Micro AmpTM (Applied Biosystems, P/N

4375928); placa para reação com 48 poços MicroAmp™ (Applied Biosystems, P/N 4375816).

Foram usados os seguintes iniciadores para PCR (ensaio de expressão de genes Taqman®, Applied Biosystems):

5

Tabela 1

Gene alvo	Nome do gene	ID de iniciador do ensaio	Sequência de referência
Fgf9	Fator 9 de crescimento de fibroblasto	Mm00442795_m1	NM_013518.3
Shh	Sonic hedgehog	Mm00436527_m1	NM_009170.3
Ptch1	Homólogo 1 patched	Mm00436026_m1	NM_008957.2
Ptch2	Homólogo 2 patched	Mm00436047_m1	NM_008958.2
Gli1	Membro GLI1 da família GLI-Kruppel	Mm00494645_m1	NM_010296.2
Gli2	Membro GLI2 da família GLI-Kruppel	Mm01293116_m1	NM_001081125.1
ACTB (controle endógeno)	Actina, beta	P/N 4352933E	NM_007393.1

Protocolo para q-PCR com amostras de pele embrionária cultivadas

Cultura de pele embrionária: Camundongos fêmeas B57BL/6 (Charles River) prenhas em tempo determinado E13.5 foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Os embriões foram dissecados e colocados em PBD frio estéril sobre gelo.

Preparação: membrana de nitrocelulose Millipore (0,5 x 1,0 cm²); grades de metal de autoclave; placas de cultura (placa de cultura de órgãos de poço central Falcon, 35-3037); FBS-DMEM à 5% (1 x penicilina/estreptomicina, não necessário inativar o FBS).

2,5 mL de meios de cultura foram adicionados e malha de metal e membrana de nitrocelulose foram ajustados nas placas de cultura individuais. Pele dorsal embrionária foi dissecada. A área da cabeça e das nádegas foram cortadas. A dissecção foi através do flanco em uma direção caudo-craniana. A pele dorsal dissecada foi carregada sobre membrana Millipore (lado dérmico para baixo). As amostras foram preparadas em triplicata por necessário para cada concentração. Amostras de pele foram cultivadas durante 24 horas à 37°C em CO₂ à 5%.

25 Isolamento de ARN & preparação de cADN

Amostras de pele foram incubadas em EDTA 20 mM durante 10 minutos. Epiderme e derme foram separadas com pinças de pontas finas sob um microscópio de dissecação, respectivamente.

As amostras foram rompidas com um homogenizador e 5 ARN total extraído com mini kit de tecido fibroso RNeasy® (Qiagen, 74704) seguindo as informações do fabricante.

A concentração de ARN foi medida por espectrofotômetro e, então, convertida em µg de ARN total em relação ao cADN usando kit de transcrição reversa com cADN de 10 elevada capacidade (Applied Biosystems, P/N 4368814) com programa no ciclizador térmico.

PCR em tempo real

P programa de execução de PCR foi ajustado e dispôs o layout da placa de reação com software StepOne fornecido 15 no método CT ($\Delta\Delta CT$) comparativo. A mistura de reação do gene alvo e do controle endógeno de β -actina foram preparadas em conjunto em triplicata. O molde de cADN foi diluído a partir do estoque para a quantidade de cADN total final de 30 - 50 ng em 2 µL.

Componentes da mistura de reação:

Componente	Volume (µL) para 1 injeção
Mistura mestra para PCR universal Taqman® Fast	10,0
Iniciadores de PCR (ensaio de expressão de gene Taqman®)	1,0
H ₂ O	7,0
Molde de cADN	2,0
Volume total	20,0

20 2. Preparar a placa de reação: Um volume de reação de 20 µL/poço é adicionado sobre placa de reação de 48 poços. A placa é selada hermeticamente com filme adesivo óptico.

3. Carregar a placa ao instrumento StepOne e iniciar a reação programada.

25 4. Analisar os resultados com o software StepOne e obter os dados de quantificação relativos de expressão de gene.

O efeito de tratamento com rhFGF9, durante três dias, na derme de cultura de explante de pele embrionária (E13.5), era dependente de dose, com 10 ng/mL e 20 ng/mL, resultando em um

aumento de número de germes de cabelos/mm², enquanto que uma dose de 40 ng/mL resultou em número de germes de cabelos/mm² diminuído (Figuras 9-10). Por outro lado, não houve efeito discernível de tratamento com anticorpo de neutralização anti-FGF9, durante três 5 dias, na epiderme ou na derme de cultura de explante de pele embrionária (E13.5; Figuras 11-13).

Tratamento de 24 horas de cultura de explante de pele embrionária com 10 ng/mL de rhFGF9 resultou em aumentos de marcadores de desenvolvimento de folículos pilosos embrionários, 10 incluindo *sonic hedgehog* (Shh), Ptch1, Ptch2 e Gli1, particularmente na epiderme (Figuras 14-15).

O fator 9 de crescimento de fibroblasto aumenta a formação de folículos pilosos quando injetado no ferimento depois de cicatrização. Isso é logo antes a ou durante o instante quando 15 novos folículos pilosos forem se formando. FGF9 também aumenta a formação de folículos pilosos durante o desenvolvimento de folículos pilosos por uso de pele de camundongo embrionária explantada em cultura. Essas constatações suportam a noção de que o ferimento converte a epiderme a um estado "receptivo", no qual 20 ela responda a fatores exógenos.

EXEMPLO 5

SUPEREXPRESSÃO DE FGF9 EM QUERATINÓCITOS BASAIS

O ganho de mutante de função *TRE-fgf9-IRES-eGfp;K5-rtTA* (*xPtch1-LacZ reporter*) (White et al., Development 25 133, 1507-1517, 2006; Diamond, et al. (2000) J. Invest. Dermatol. 115, 788 -794, ambos aqui incorporados por referência) é usado para validar que a expressão de FGF9 prematura no estágio de neogênese de cabelos intensificaria o desenvolvimento de folículos pilosos e para confirmar que FGF9 é à montante de sinalização de Shh.

30

EXEMPLO 6

ELIMINAÇÃO DE EXPRESSÃO DE FGF9 EM CÉLULAS $\gamma\delta T$

A eliminação de expressão de FGF9 em células $\gamma\delta T$ é realizada usando o mutante de perda de função *FGF9flox/flox; lck-cre* para eliminar de maneira seletiva FGF9 usando célula T tendo 35 por alvo promotor lck-cre. O Lck-Cre usa o promotor proximal do

gene Lck (tirosina quinase de proteína de linfócito), o qual é expresso primeiramente de maneira precoce no desenvolvimento de timócitos no estágio negativo duplo. Depois que as células T amadureçam completamente, o nível de expressão deste transgene diminui em aproximadamente 10 vezes. Este gene de camundongo em particular mostra um elevado grau de expressão do transgene no timo e constatou-se a provocar a eliminação seletiva de genes flanqueados por sequências que têm por alvo loxP em quase todos os timócitos precoces. Portanto, ele é usado para eliminar um gene específico na linhagem de células T começando no estágio negativo duplo. Uma vez que cepas de camundongos Lck-Cre homozigotas são cruzadas com uma cepa contendo um FGF9 floxed e são obtidos descendentes com FGF9 eliminado na linhagem de células T. Animais de controle são obtidos na mesma ninhada por tipagem em relação à presença ou a ausência do gene floxed em amostras de cauda de ADN genômico. Esse sistema é descrito em mais detalhes em Lee et al., *Immunity* Nov 2001;15(5)763-74, o qual é aqui incorporado por referência.

EXEMPLO 7

20 CAMUNDONGOS REPÓRTER K17-EGFP

Camundongos repórter K17-eGFP (Bianchi et al., *Mol Cell Biol.*, 2005 August; 26(16):7249-7259, aqui incorporado por referência) são usados para confirmar a acumulação de células $\gamma\delta$ T produtoras de FGF9 em torno de germes de cabelos em recém-desenvolvimento.

EXEMPLO 8

FGF9 MEDIA NEOGÊNESE DE FOLÍCULOS PILOSOS ATARVÉS DE CÉLULAS $\gamma\delta$ T EPIDÉRMICAS

O entendimento do mecanismo molecular responsável para a regeneração de folículos pilosos durante a cicatrização de ferimento faz surgir a oportunidade de desenvolver novos tratamentos para perda de cabelos e outros distúrbios de pele. Aqui, está claramente mostrado que o Fator 9 de Crescimento de Fibroblasto (Fgf9) modula a formação de folículos pilosos seguindo o ferimento de camundongos adultos. A superexpressão forçada de

Fgf9 na epiderme ferida recém-formada resulta em um aumento de 2-3 vezes no número de folículos pilosos neogênicos. Notavelmente, durante a cicatrização do ferimento em camundongos normais, células $\gamma\delta T$, que residem na epiderme, servem como uma fonte primária para Fgf9. A eliminação específica do gene Fgf9 em células T usando camundongos transgênicos Lck-Cre; floxed *fgf9* em uma redução marcante de neogênese de folículos pilosos seguindo o ferimento. Similarmente, camundongos carecendo de células $\gamma\delta T$ demonstram severo prejuízo de neogênese folicular. Acima de tudo, essas constatações explicam a robustez de regeneração de folículos pilosos em camundongo comparada a seres humanos e destacam o importante relacionamento entre o sistema humano e a regeneração de tecidos.

Materiais e Métodos:

Camundongos e ferimento. Excisão de espessura completa (FTE) de pele foi realizada sobre o dorso de camundongos C57BL/6J (Jackson Laboratory) sob anestesia com quetamina/zilazina, conforme previamente descrito (1). Camundongos com três anos de idade foram usados para todos os experimentos com um FTE de 1 x 1 cm², exceto como indicado. Camundongos fêmeas C57BL/6 prenhas de tempo determinado de dia gestacional 13.5 (Charles River) foram utilizados para cultura de explante de pele embrionária. Camundongos *K14-rtTA* abrigando o transativador sensível à doxiciclina foram acasalados com camundongos *TRE-Fgf9-IRES-eGfp*. Camundongos tanto *K14-rtTA* quanto *TRE-Fgf9-IRES-eGfp* foram alimentados com ração contendo Dox (Bio-Serv) durante 4 dias, depois de re-epitelização completa. A eliminação de expressão de FGF9 em células $\gamma\delta T$ foi realizada usando camundongos *Fgf9 flox/flox* acasalados com camundongos *lck-cre* (Jackson Laboratory) com promotor proximal tendo por alvo células T da tirosina quinase de proteína de linfócito (*lck*). Camundongos desprovidos de células $\gamma\delta T$ (*Tcrd^{-/-}*) foram comprados a partir de Jackson Laboratory. Todos os protocolos com animais foram aprovados pela Universidade da Pensilvânia IACUC.

Ensaio de neogênese de folículos pilosos de monte inteiro. Pele cicatrizada foi tomada no dia 5 depois de re-

epitelização. Ensaios de neogênese de folículos pilosos de monte completo para imunotintimento de KRT17 epidérmico (1:5.000, a partir de P. Coulombe) e incubação com NBT/BCIP dérmico foram realizados para identificar novos germes de cabelos e papilas dérmicas foliculares em área de ferimento conforme previamente descrito.

PCR em tempo real. Peles dorsais eram como amostras de dia 0 ou a pele ferida no dia 1, 3 e 5 depois de descolamento de sangue coagulado depois de re-epitelização (SD), respectivamente. A epiderme foi separada da derme por incubação com dispase à 4°C, durante uma noite ou EDTA 20 mM durante 30 minutos à 37°C. ARN foi isolado usando mini kit RNeasy (Qiagen) e, então, 1 µg de ARN total foi convertida a cADN com um kit com cADN de elevada capacidade (Applied Biosystems). Todos os conjuntos de iniciadores incluindo fgf9 de ensaio de expressão de gene Taqman foram comprados a partir de Applied Biosystems. As reações foram realizadas em triplicata e níveis de expressão relativa foram padronizados usando β-actina como um controle interno. Os resultados foram analisados usando programa StepOne.

Imunotintimento. Pele re-epitelizada depois de ferimento foi colocada cada uma congelada em OCT (Tissue-Tek). O tingimento para FGF9 (1:200; R&D Systems) e γδTCR (1:100; BD Bioscience) foi realizado em seção congelada de 8 µm. Imuno-histoquímica com anticorpos contra BrdU (1:500; Harlan-Seralab) foi feita conforme previamente descrito. Para experimentos de pulso-caça, BrdU (Sigma) foi administrado 2 horas antes da preparação da amostra.

Isolamento de DETCs e ativação das células. A suspensão de células epidérmicas foi preparada a partir de camundongos C57BL/6 e foi incubada durante uma noite à 37°C em DMEM completo contendo 20 U/mL de IL-2 de camundongo recombinante (mIL-2), para permitir a re-expressão de receptor de superfície conforme descrito. DETCs foram isolados por classificação com FACS PE-γδTCR (GL3, Abcam) e tingimento com aloficocianina-Thy1.2 (BD Bioscience). As DTECs isoladas foram cultivadas em meio RPMI-1640

suplementado com FCS à 10%, HEPES 25 mM, 100 U de penicilina, 100 µg de estreptomicina, glutamina 2 mM, aminoácidos não essenciais 100 µM, piruvato de sódio 1 mM, 2-mercaptopo-etanol 50 µM e 20 U/mL de mIL-2. Para estimulação celular as células foram coletadas 5 durante 4 horas nos meios livres de fator de crescimento excluindo FCS e mIL-2 e, então, incubadas nos meios acima descritos suplementados com anti-CD3ε (10 µg/mL, eBioscience) à 37°C durante 4, 24 e 48 horas. A estimulação foi impedida pela adição de PBS gelado e as amostras foram colocadas sobre gelo. Os sobrenadantes 10 foram removidos e as células foram coletadas com tampão de lise. O isolamento de ARN e subsequente geração de cADN foram realizadas com células de expressão de gene para kit Ct (Applied Biosystems).

Tingimento de células γδT epidérmicas de monte integral. Orelhas foram cortadas de camundongos C%&BL/6J de 8 semanas de idade e 15 folhas epidérmicas foram separadas conforme previamente descrito. Folhas epidérmicas foram incubadas durante uma noite nos meios livres de fator de crescimento descritos acima ou meios completos com 20 U/mL de mIL-2 à 37°C. A epiderme foi, então, lavada em PBS e fixada em acetona gelada durante 20 minutos à -20°C. Anticorpos 20 primários de FGF9 e γδTCR mencionados acima foram incubados durante uma noite à 4°C. Na manhã seguinte, as folhas foram incubadas com anticorpos secundários durante 1 hora e montadas sobre lâminas revestidas com silano.

Cultura de pele embrionária in vitro. Embriões em 25 E13.5 foram removidos por dissecação do saco e o comprimento coroa-traseiro foi verificado para assegurar idade de desenvolvimento exata. A pele dorsal foi dissecada e, então, cultivados durante até 3 dias conforme previamente descrito. FGF-9 humana recombinante (0-20 ng/mL, R&D Systems) ou EDA1 (50 ng/mL, 30 R&D Systems) como um controle positivo foram adicionados em meios de cultura. Em adição, o experimento de neutralização de FGF9 foi paralelizado com incubação com anticorpo anti-FGF9 (0-40 µg/mL; MAB273, R&D Systems). Separações epidérmica-dérmica foram realizadas por incubação de amostras de pele em EDTA 20 mM à 37°C 35 durante 5 minutos. Os tecidos foram homogenizados em relação a ARN

isolado ou coletados para ensaio de mante integral conforme descrito acima. O número de folículos pilosos foi contado por mm^2 em 3 campos diferentes de cada amostra e o valor médio foi calculado.

5 ***Experimento de neutralização em camundongos adultos.*** A re-epitelização de epiderme, indicada por descolamento de sangue coagulado, era completa 10-12 dias depois de FTE. Um dia depois de re-epitelização completa, 50 μL de anticorpo de neutralização anti-FGF9 ou controle de isotipo IgG (MAB 003) em 10 $\mu\text{g/mL}$ foram injetados diariamente logo abaixo da epiderme durante 4 dias consecutivos. Depois, então, os tecidos foram coletados no dia 5, epiderme e derme foram separados usando solução de EDTA 20 mM e processadas para imunotintingimento de KRT17 e a detecção de atividade de fosfatase alcalina, respectivamente. O número de folículos pilosos regenerados foi caracterizado com respeito à sua densidade do lado de dentro da epiderme. O estágio de desenvolvimento dos folículos pilosos foram quantificados conforme previamente descrito.

20 ***Microscopia confocal in vivo.*** O processo dinâmico de caça de neogênese de folículos pilosos, as mudanças de número de folículos pilosos recém-formados foi quantificada usando microscópio confocal *in vivo* (Vivascope 1500, Lucid). De maneira breve, a área circundante de pele cicatrizada foi grampeada e janela adesiva (Lucid) e gel de transmissão ultrassônica (Parker 25 Laboratory) foram aplicados sob anestesia quetamina/zilazina. Novos folículos pilosos poderiam ser visualizados e contados no nível subjacente à junção epidérmica-dérmica. O número foi medido no dia 2 depois de re-epitelização e, então, a cada 3 dias durante 2 semanas.

30 **Resultados**

Expressão de FGF9 aumenta significativamente depois de ferimento antes da neogênese de folículos pilosos: Para definir eventos moleculares responsáveis por neogênese de folículos pilosos seguindo o ferimento, os inventores compararam a expressão de genes em epiderme ferida logo depois de re-epitelização (1 e 3 dias depois de descolamento de sangue

coagulado "SD") à iniciação de neogênese de folículos pilosos (SD5). Análises de microensaio mostraram que fator 9 de crescimento de fibroblasto (Fgf9) era regulada de maneira significativa à montante (4,2 vezes) antes da formação de germes de folículos pilosos. Os inventores analisaram adicionalmente mudanças de expressão de gene Fgf9 em epiderme re-epitelizada em torno do momento da neogênese de folículos pilosos por RTPCR quantitativa (Figura 16A). A expressão de gene Fgf9 aumentou de maneira significativa depois de re-epitelização até os estágios iniciais de neogênese de folículos pilosos quando a expressão diminui dramaticamente. Esses resultados mostram que Fgf9 é regulada à montante na epiderme recém-formada logo antes da neogênese de folículos pilosos presumivelmente no momento quando estiverem se especializando em linhagem de folículos pilosos.

15 **Inibição de Fgf9 diminui a neogênese de folículos pilosos.** FGF9 é um ligante secretado com um papel conhecido no desenvolvimento dos pulmões, rins e gônadas, mas não tinha sido previamente implicado no desenvolvimento ou regeneração de folículos pilosos. Entretanto, o receptor principal para Fgf9 na pele, FGR3b, é expresso na epiderme e é regulada à montante em pele regenerada depois de ferimento. Para abordar a importância de Fgf9 na neogênese de folículos pilosos seguindo o ferimento, os inventores injetaram anticorpo de neutralização de Fgf9 na pele re-epitelizada diariamente durante quatro dias (Figura 16b, Tabela 2). Ferimentos tratados com anticorpos anti-Fgf9 mostraram uma redução significativa de formação de novos folículos pilosos quando comparados com controles. Os folículos pilosos que se formaram em ferimentos tratados com anti-Fgf9 estavam em estágios imaturos de desenvolvimento (Figura 19).

30 *Superexpressão* forçada de *Fgf9* na nova epiderme aumenta a formação de folículos pilosos. Uma vez que o bloqueio Fgf9 inibiu a neogênese de folículos pilosos, os inventores questionaram se níveis crescentes de Fgf9 no ferimento promoveria a neogênese de folículos pilosos seguindo o ferimento. Os 35 inventores usaram um camundongo transgênico indutível por doxiciclina (K14rtTAX TER-Fgf9-IRES-eGfp) para ter como alvo de

- maneira indutiva a expressão de Fgf9 para a epiderme seguindo a re-epitelização de ferimento. A administração de doxiciclina de SD1 a SD4 aumentou a expressão de Fgf9 em 150 vezes (Figura 20) comparado aos camundongos de controle tratados com doxiciclina.
- 5 Essa superexpressão dirigida de Fgf9 para a epiderme, durante quatro dias depois de re-epitelização, conduziu a um aumento marcante no número de folículos pilosos comparado aos controles (Figura 16c, Tabela 2).

Tabela 2. Ensaio de neogênese de folículos pilosos. O número de novos folículos pilosos foi contado no Dia 5 depois de re-epitelização. NS: não significativo.

Experimento	Camundongos	Número de folículos pilosos (média ± DP)	Número de camundongos	Faixa	Valor P
Eliminação de FGF9 em células T	Lck-cre; Fgf9 ^{fl/fl}	9,1 ± 16,7	11	0 - 49	< 0,05
	Fgf9 ^{fl/fl} , Fgf9 ^{fl/+} (Controle)	30,7 ± 34,0	15	1 - 131	
Superexpressão de FGF9	K14rtTA transgênicos duplos; TRE-Fgf9-IRES-eGfp	168,2 ± 117,1	12	2 - 189	< 0,05
	K14rtTA transgênicos simples; TRE-Fgf9-IRES-eGfp (Controle)	64,8 ± 50,3	21	26 - 431	
Ausência de Células γδT	Tipo selvagem com 8 semanas de idade (ferimento de 1,5 x 1,5 cm ²)	43,4 ± 31,7	8	1 - 87	NS
	Tipo selvagem com 24-40 semanas de idade (ferimento de 1,5 x 1,5 cm ²)	36,7 ± 24,5	6	1 - 76	
	Camundongos desprovidos de células γδT com 8 semanas de idade (ferimento de 1,5 x 1,5 cm ²)	9,8 ± 10,1	13	0 - 27	< 0,01
	Camundongos desprovidos de células γδT com 24-40 semanas de idade (ferimento de 1,5 x 1,5 cm ²)	7,8 ± 13,7	8	0 - 39	

Expressão de Fgf9 se localiza em células γδT.

Para identificar a fonte de Fgf9 em pele re-epitelizada de camundongos normais, os inventores imunotintingiram seções de pele de pele cicatrizada antes de HFN. De maneira surpreendente, eles constataram que células T epidérmicas suportando receptores de células γδT (DETC), que repovoam a epiderme, expressam Fgf9. DETCs parecem ser a fonte primária de Fgf9 na epiderme, com pouca ou nenhuma contribuição de queratinócitos ou de outros residentes epiteliais (Figura 17A). Dados prévios de expressão de genes a partir de queratinócitos basais (alfa-6-integrina-positivos)

isolados por FACS mostraram uma ausência de expressão de Fgf9 (papel NAT BIOTech). Para confirmar adicionalmente a origem do Fgf9, os inventores trataram epiderme de orelha não tratada com mIL-2 e analisaram preparações de monte integral para expressão de Fgf9 5 por imunofluorescência. IL-2 induziu DETCs tingidas fortemente com anticorpos anti-FGF9, enquanto que queratinócitos adjacentes exibiram tingimento de base (Figura 21).

Para determinar de FGF9 é expresso de maneira constitutiva por DTECs na pele ou regulados à montante seguindo a estimulação, DETCs foram isoladas a partir de pelo por classificação de células e foram cultivadas *in vitro* com anti-CD3 e IL-2, conforme previamente descrito (havrem ref.). Níveis de mARN de Fgf9 aumentaram em mais do que 10 vezes dentro de 4 horas, seguido por diminuição aos níveis de linha de base dentro de 24 10 horas, (Figura 17B). Essa rápida regulação à montante contrasta com o período de indução de 48 horas muito mais longo, necessário para a expressão de FGF7 e FGF10, dois fatores conhecidos a serem secretados por DETCs durante o reparo de ferimento, e indica 15 mecanismos reguladores transcricionais distintos.

20 DETCs são essenciais para neogênese de folículos pilosos. Uma vez que Fgf9 media a neogênese de folículos pilosos e DETCs parecem ser a fonte primária de Fgf9 em epiderme re-epitelizada, os inventores formularam a hipótese de que DETCs ativos repovoam o ferimento durante a re-epitelização e secretam 25 FGF9 para induzir neogênese de folículos pilosos. Para melhor definir o papel de DETCs na neogênese de folículos pilosos, os inventores estudaram camundongos Tcrg-/- que falharam em desenvolver essas células.

Os inventores feriram camundongos de tipo 30 selvagem pareados por idade e camundongos Tcrd-/- em 8 ou 24-40 semanas e quantificaram a neogênese de folículos pilosos. Conforme relatado previamente, camundongos TCRd-/- mostraram leves demoras no fechamento de ferimentos (dados não mostrados), mas a neogênese de folículos pilosos foi marcantemente diminuída. A quantificação 35 de níveis de Fgf9 indicaram que Fgf9 eram consistentemente desprezíveis nos camundongos Tcrd-/-.

Conforme mostrado na Figura 18, camundongos -/- de 8 semanas e 40 semanas exibiram defeitos profundos em HFN, com reduções de > 80% em números de HF's comparados com camundongos wt (18A,B, Tabela 2). Assim, números reduzidos de HF's em camundongos -/- refletem um verdadeiro defeito na neogênese de folículos pilosos ao invés de cinética de resposta demorada.

As constatações acima suportaram a hipótese de que a ativação de DETCs seguindo o ferimento conduz à produção de FGF9 e subsequente neogênese de folículos pilosos. Entretanto, para abordar a questão de que DETCs pode ter um papel na neogênese de folículos pilosos diferente da produção de FGF9, camundongos mutantes (*lck-cre x Fgf9^{flox/flox}*) portando uma eliminação do gene FGF9, especificamente em células T, incluindo DETCs, foram analisados para a neogênese de folículos pilosos seguindo ferimento. Análises de rtPCR quantitativas mostraram que esses camundongos expressam baixos níveis constitutivos de FGF9 na pele (Figura 22). Estudos de ferimento mostraram que esses camundongos mutantes (*lck-cre x Fgf9^{flox/flox}*) exibiram uma dramática redução de números de folículos pilosos pós-ferimento comparável àqueles observados em animais TCRd-/- (Figura 18E, Tabela 2).

Tomados em conjunto os resultados descritos acima mostram que DETCs são contribuintes imunológicos essenciais para neogênese de HF's através da produção de FGF9.

Em resumo, os inventores constataram que DETCs são a fonte de FGF9. Além disso, as constatações indicam que eventos celulares e moleculares mais divergentes poderiam estar implicados em HFN depois de ferimento, não exatamente a recapitulação de desenvolvimento embrionário, e fornecem evidência adicional que sistema imune adquirido incluindo DETCs teria um papel na regeneração de tecido.

FGF9 e DETCs são críticas para HFN depois de ferimento. A superexpressão de FGF9 em epiderme re-epitelizada resultou em aumento de formação de folículos pilosos. Esses resultados mostram que a manipulação de expressão de FGF9 durante a cicatrização de ferimento ou depois de re-epitelização poderia ser uma abordagem útil para desenvolver um novo tratamento para perda de cabelos.

Embora a presente invenção tenha sido descrita com referência a modalidades particulares, deve ser entendido que essas modalidades são meramente ilustrativas dos princípios e aplicações da presente invenção. Portanto, deve ser entendido que 5 inúmeras modificações podem ser realizadas em relação às modalidades ilustrativas e que outras disposições podem ser vislumbradas, sem de desviar do espírito e do escopo da presente invenção, conforme definidos pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto caracterizado por ser para uso no tratamento de perda de cabelo em um paciente ao administrar a composição a um paciente depois que a epiderme do paciente foi rompida na região de perda de cabelo.

5 2. Composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto caracterizado por ser para uso no tratamento, inibição ou supressão de um distúrbio de pele degenerativo em um paciente depois que a epiderme do paciente foi rompida na região do distúrbio.

10 3. Composição compreendendo um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de fibroblasto e um polipeptídeo wnt caracterizada por ser para uso no tratamento de perda de cabelo em um paciente.

15 4. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, para uso como definido na reivindicação 1 ou 3, caracterizada pelo fato de que a perda de cabelo é devida à alopecia androgenética (AGA).

20 5. Composição, de acordo com a reivindicação 4, para uso como definido na reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a AGA é calvície padrão masculina.

25 6. Composição, de acordo com a reivindicação 4, para uso como definido na reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a AGA é calvície padrão feminina.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, para uso como definido na reivindicação 1 ou 3, caracterizada pelo fato de que a perda de cabelo é o resultado de uma lesão de pele.

30 8. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, para uso como definido na reivindicação 1 ou 3, caracterizada pelo fato de que a perda de cabelo ocorre no couro cabeludo ou sobrancelha do paciente.

35 9. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, para uso como definido na reivindicação 1 ou 3, caracterizada pelo fato de que a perda de cabelo ocorre no tecido da pele com cicatriz do paciente.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de que a etapa de administração é realizada 3-12 dias após a etapa de rompimento.

5 11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, para uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizada** pelo fato de que a etapa de rompimento é realizada expondo-se a região da perda de cabelo a um estímulo mecânico ou químico.

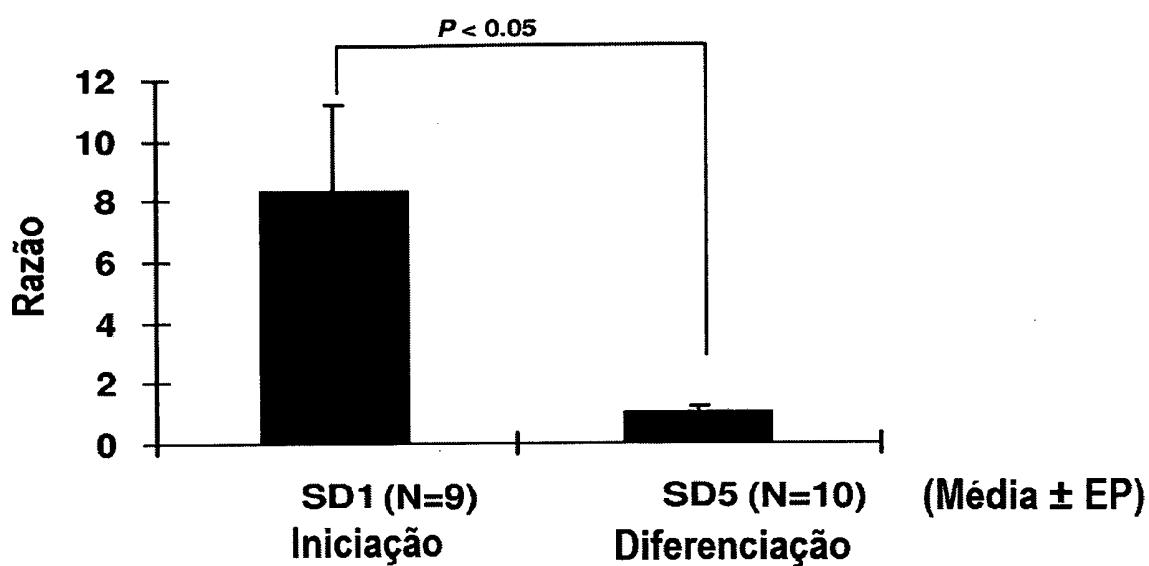
10 12. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, para uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizada** pelo fato de que a etapa de rompimento é realizada expondo-se a região da perda de cabelo à radiação.

15 13. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, para uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada** pelo fato de que a etapa de administração é através de administração tópica.

20 14. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, para uso como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizada** pelo fato de que a etapa de administração é através de administração subepidérmica.

25 15. Composição, de acordo com a reivindicação 2, para uso como definido na reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o distúrbio de pele degenerativo é hiperqueratose, hiperpigmentação, despigmentação, atrofia, calcinose, circunscrita, cútis, colóide mílio, degeneração da pele, NOS de dermatose senil, calcificação subcutânea, ou granuloma anular.

30 16. Composição, de acordo com a reivindicação 3, para uso como definido na reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que o polipeptídeo wnt é um polipeptídeo wnt7.

**Figura 1**

Imunotintimento de $\gamma\delta$ TCR de epiderme regenerada (SD7, monte integral)



$\times 200$

Imunotintimento de FGF9 de amostra SD1 (seção congelada)



$\times 400$

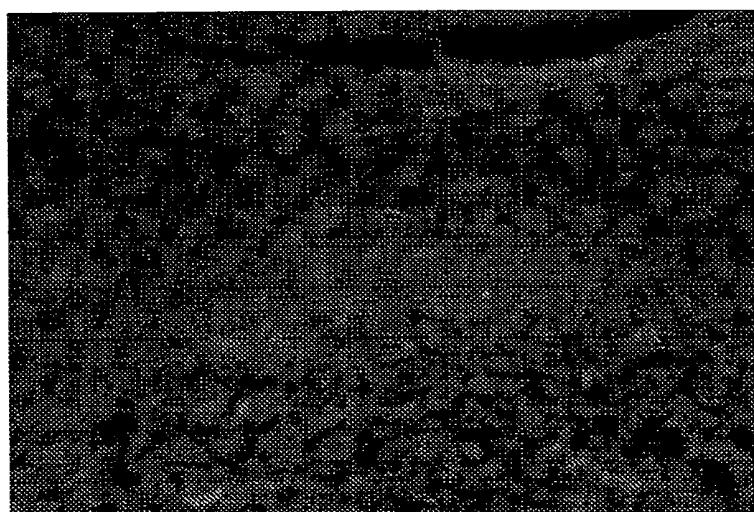
Figura 2

$\gamma\delta$ TCR & FGF9 para amostra SD1

$\gamma\delta$ TCR



FGF9



$\gamma\delta$ TCR & FGF9

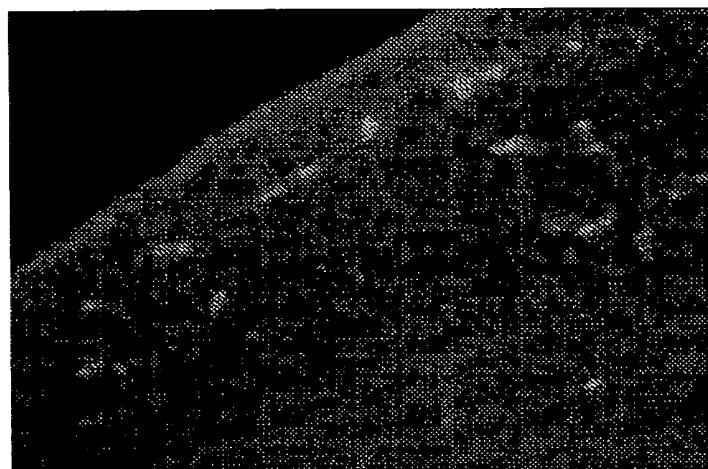


Figura 3

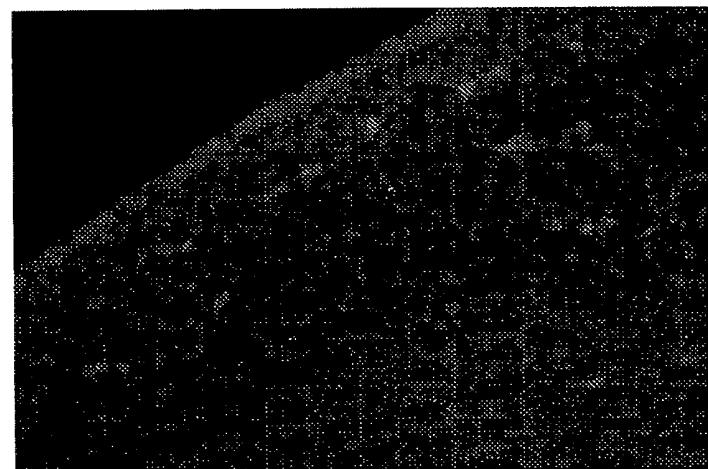
$\gamma\delta$ TCR & FGF9 para pele embrionária E14



$\gamma\delta$ TCR



FGF9



$\gamma\delta$ TCR & FGF9

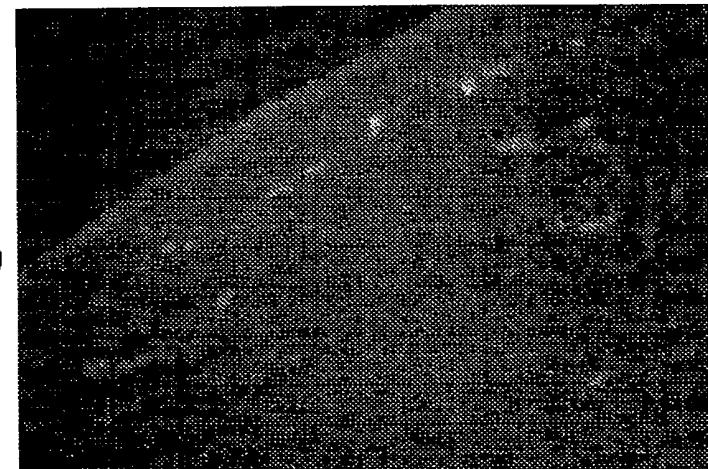
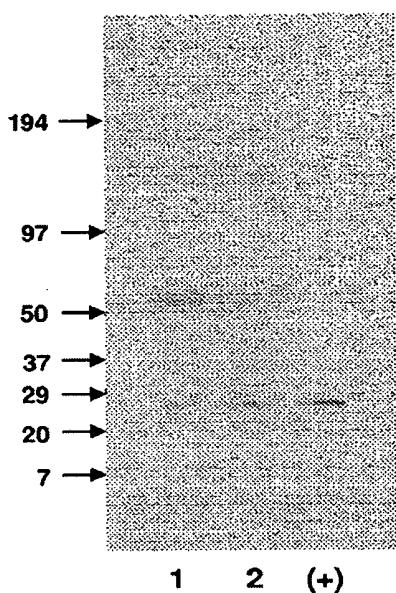
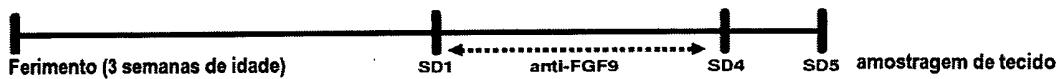
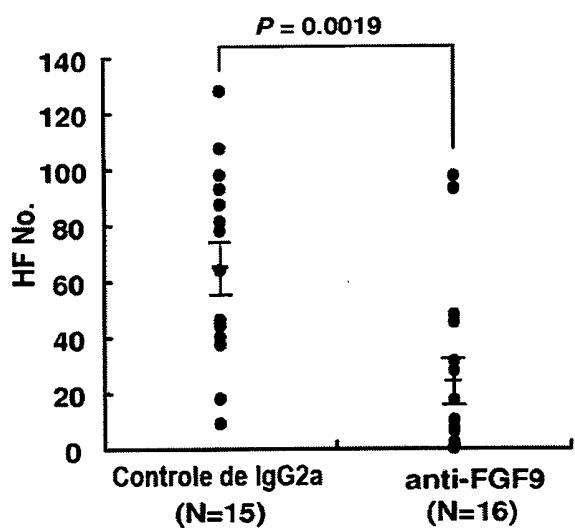
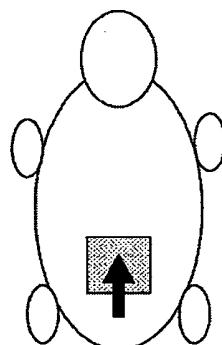


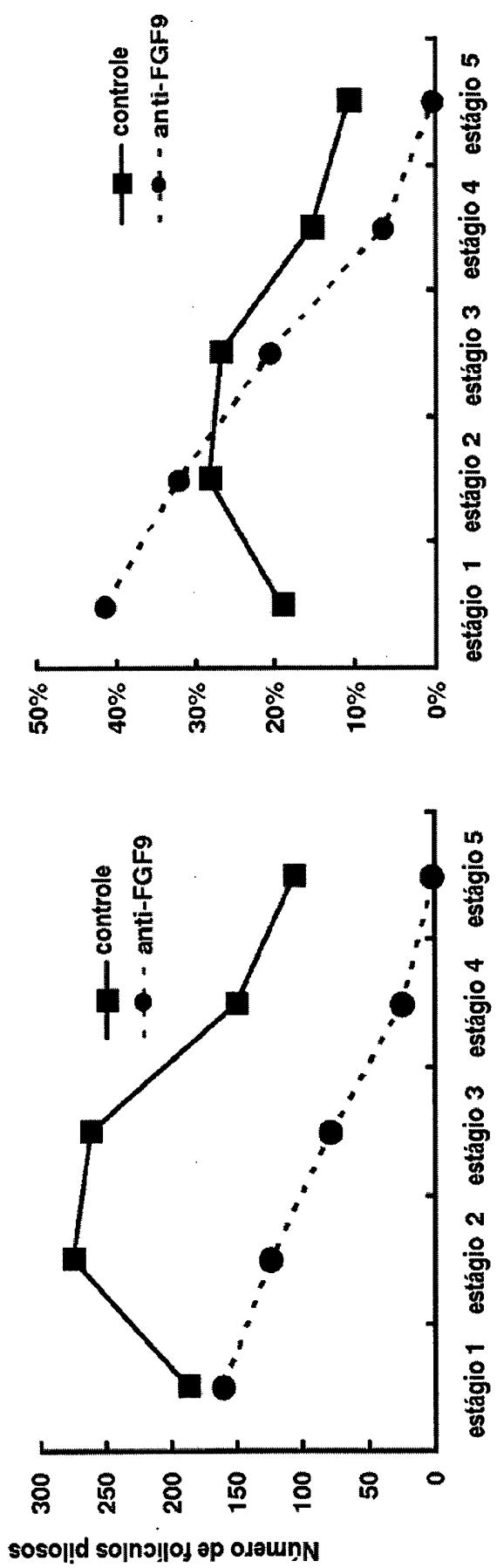
Figura 4

**Figura 5****A.**

- Programa de tratamento com camundongos C57BL/6 de 3 semanas de idade
- injeção subepidérmica: 50 μ L de anti-FGF9 10 mg/mL ou de controle de isótipo de IgG2a
- SD1 – SD4, amostragem de tecido à SD5

**B.****C.****Figura 6**

Determinação de estágios de desenvolvimento de HF



Guia abrangente para reconhecimento & classificação de estágios distintos de morfogênese de HF murinos
(Paus R, et al. J Invest Dermatol 1999)

Figura 7

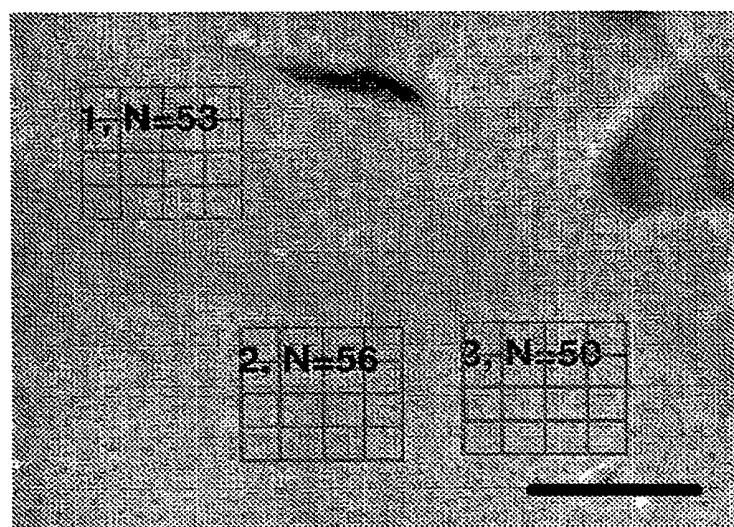


Figura 8

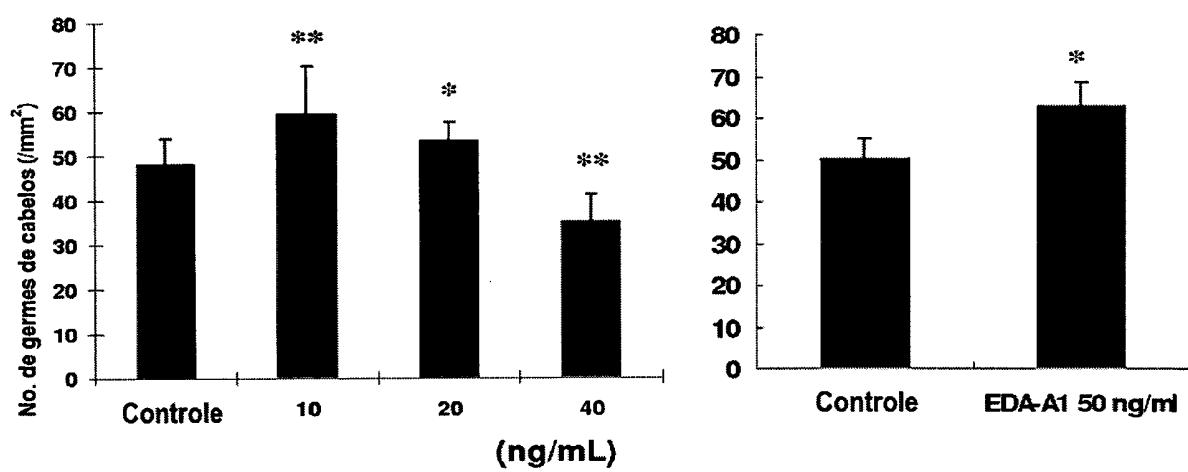


Figura 9

Derme: Tingimento com fosfatase alcalina

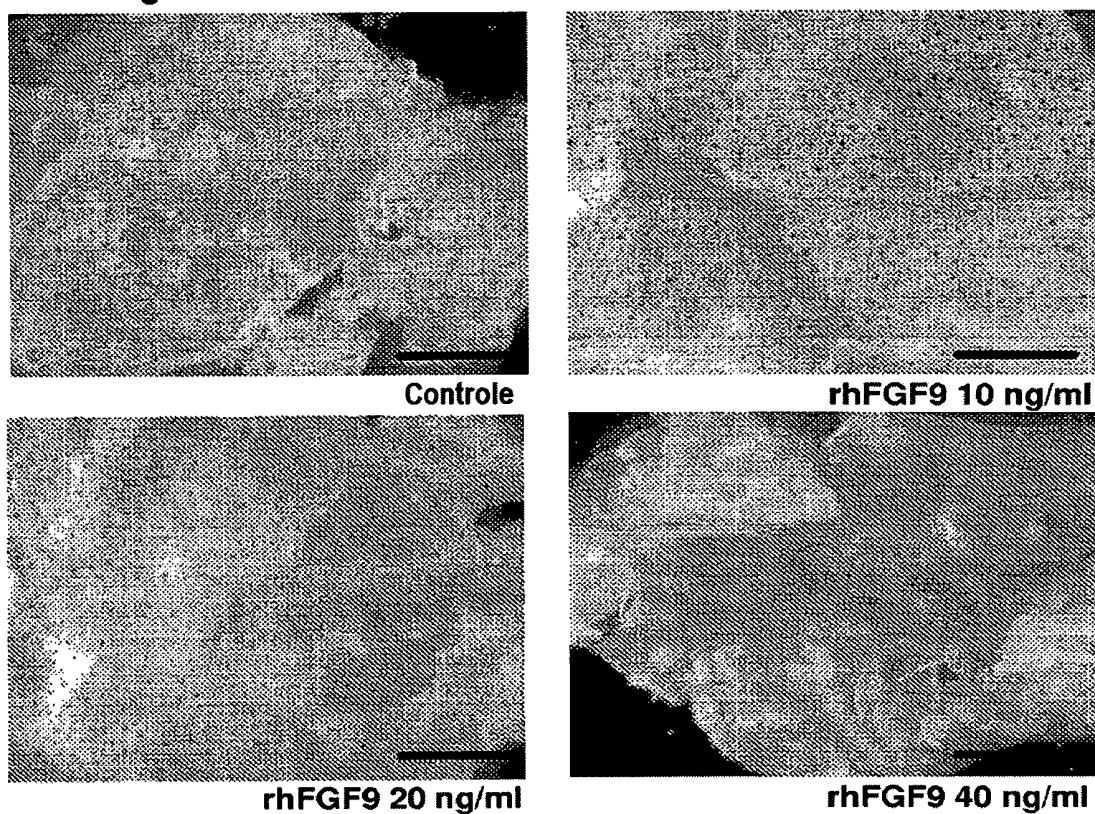


Figura 10

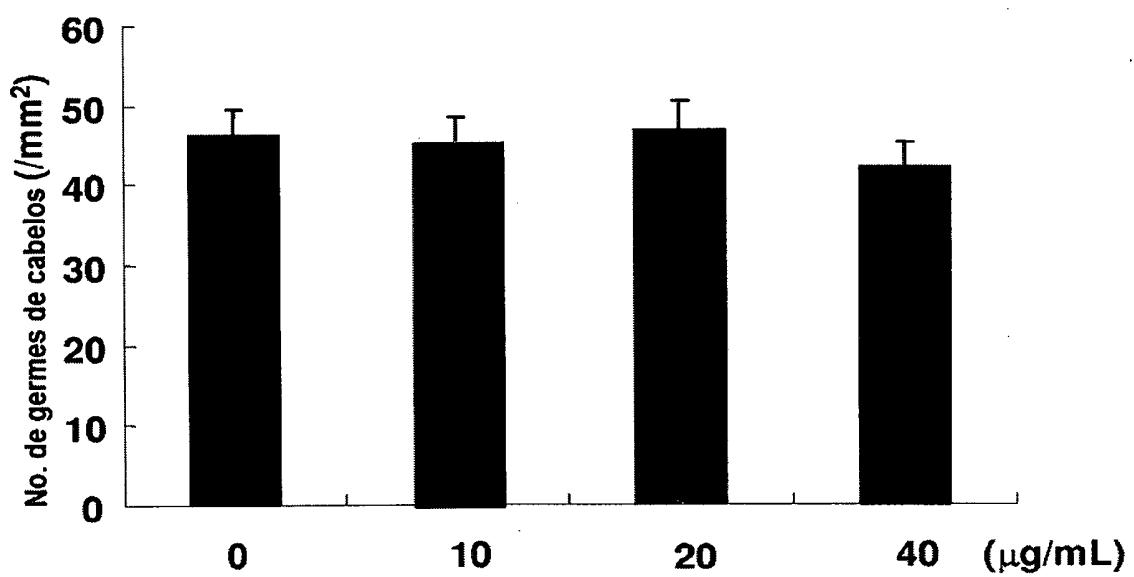
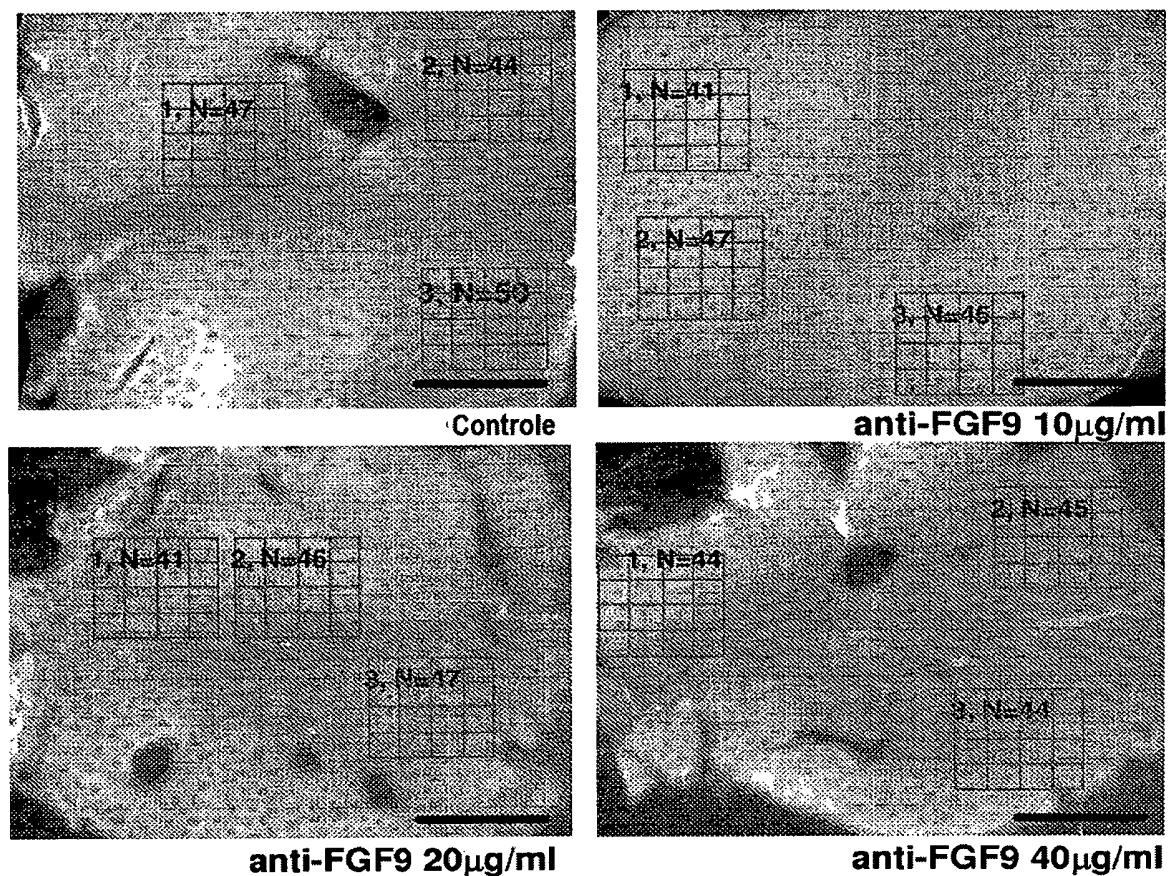
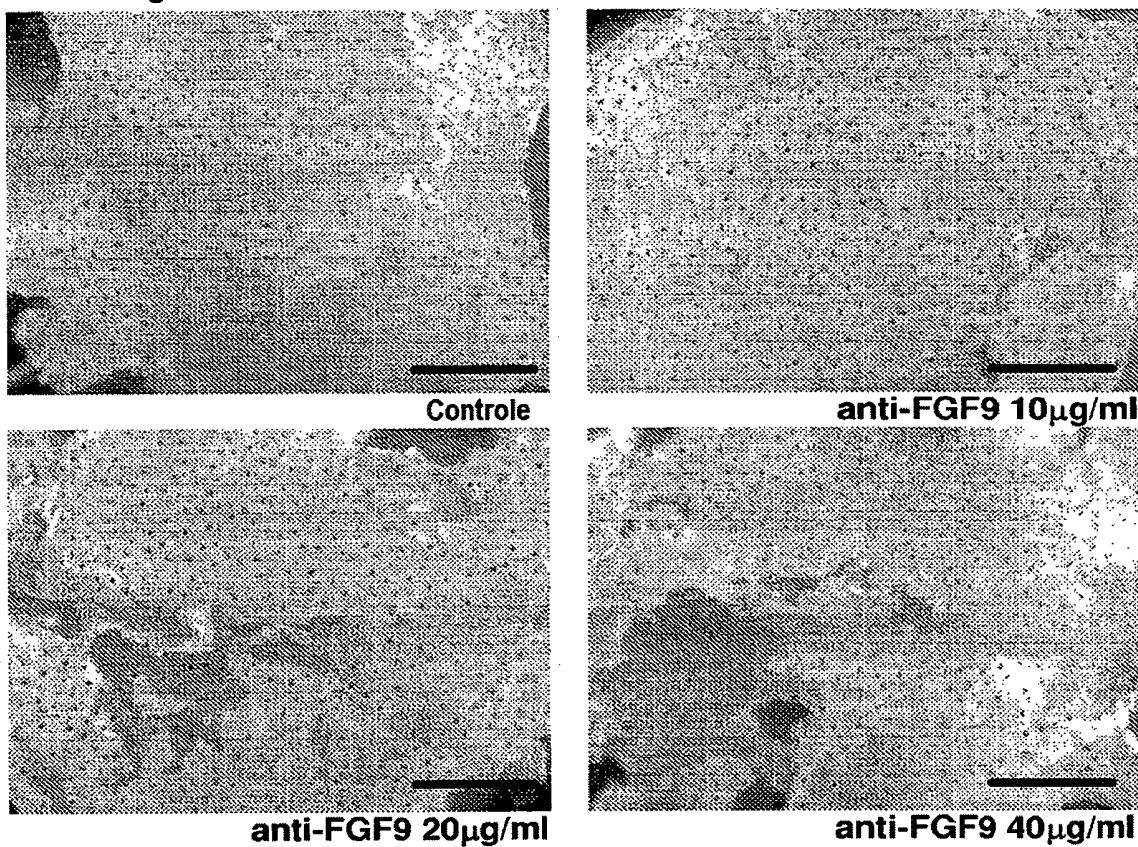


Figura 11

Epiderme: Tingimento com K17**Figura 12**

Derme: Tingimento com fosfatase alcalina**Figura 13**

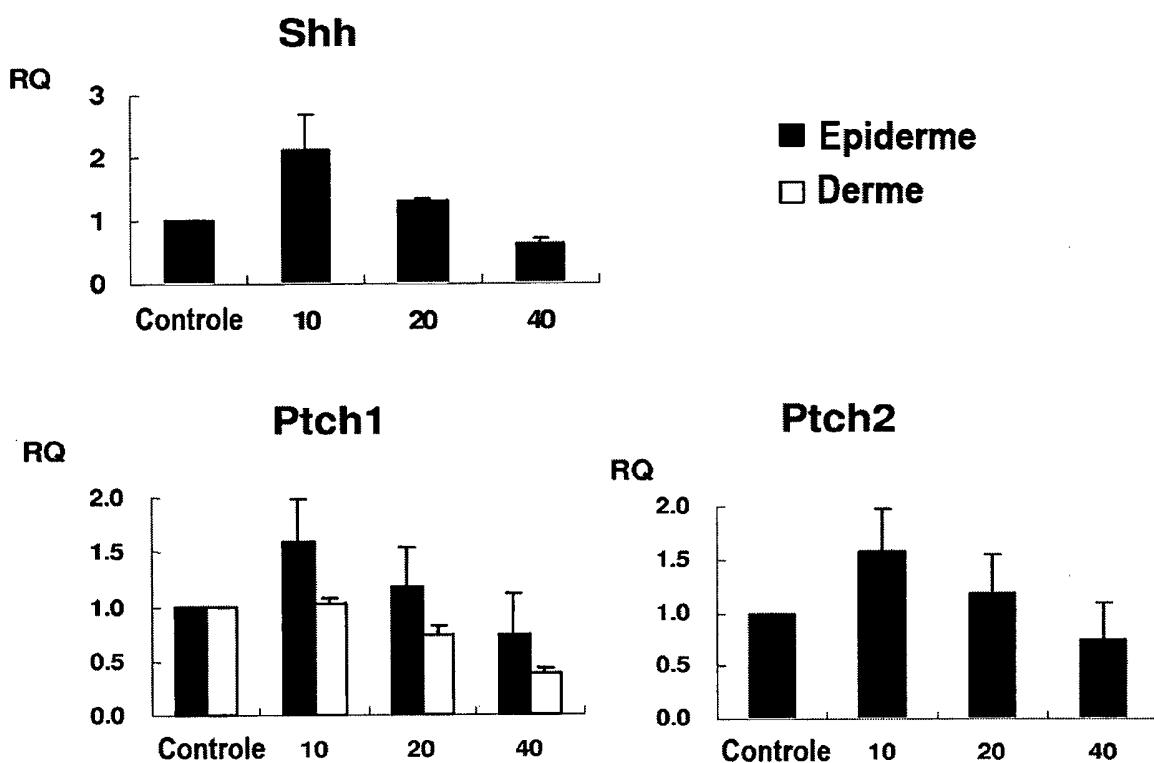


Figura 14

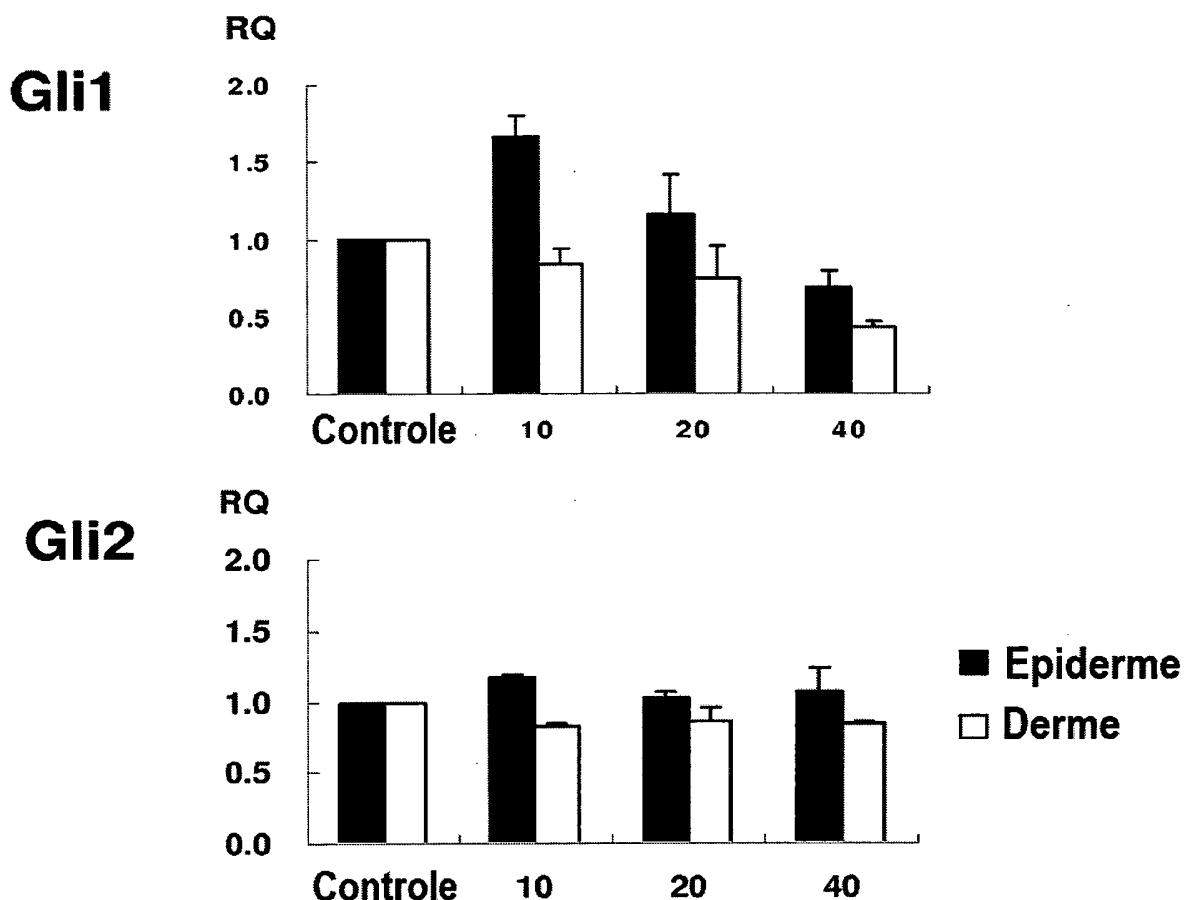


Figura 15

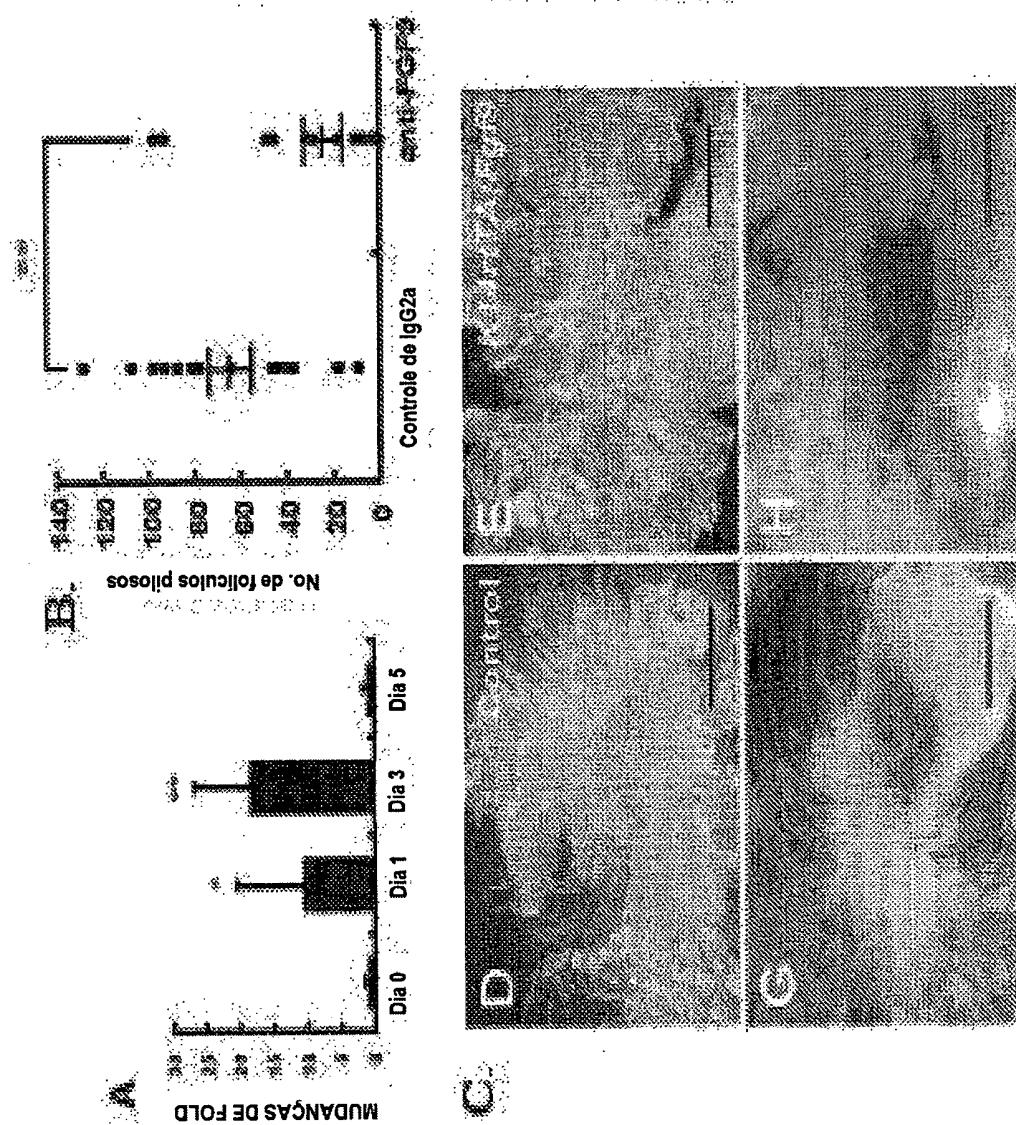


Figura 16

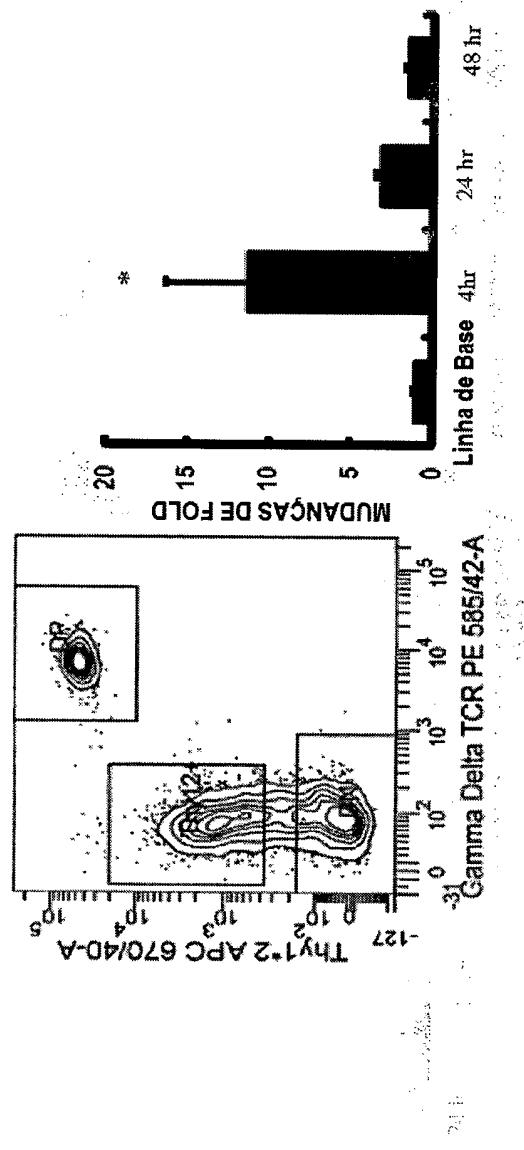
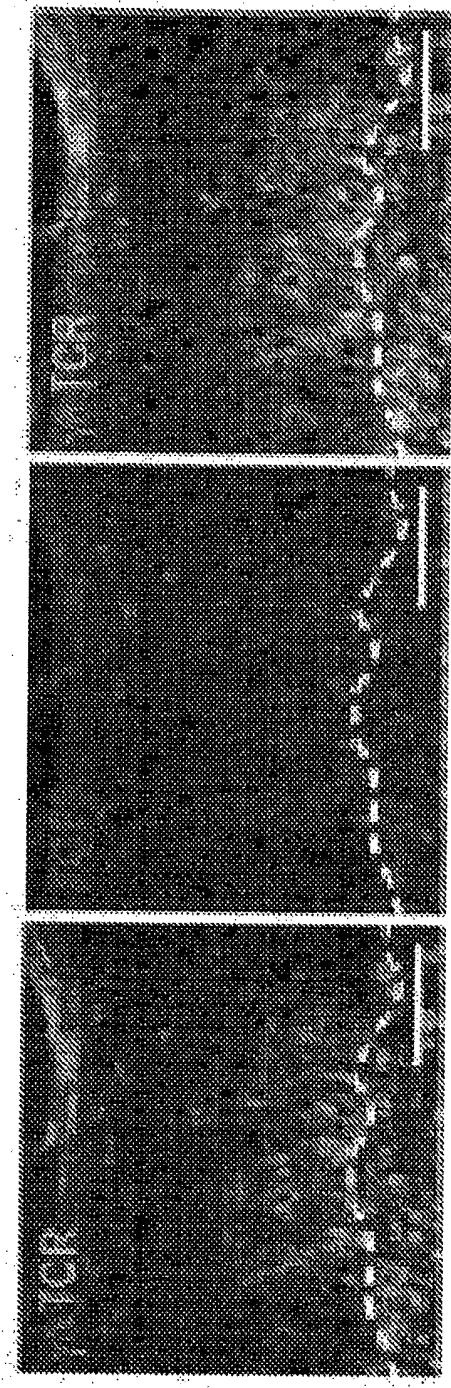
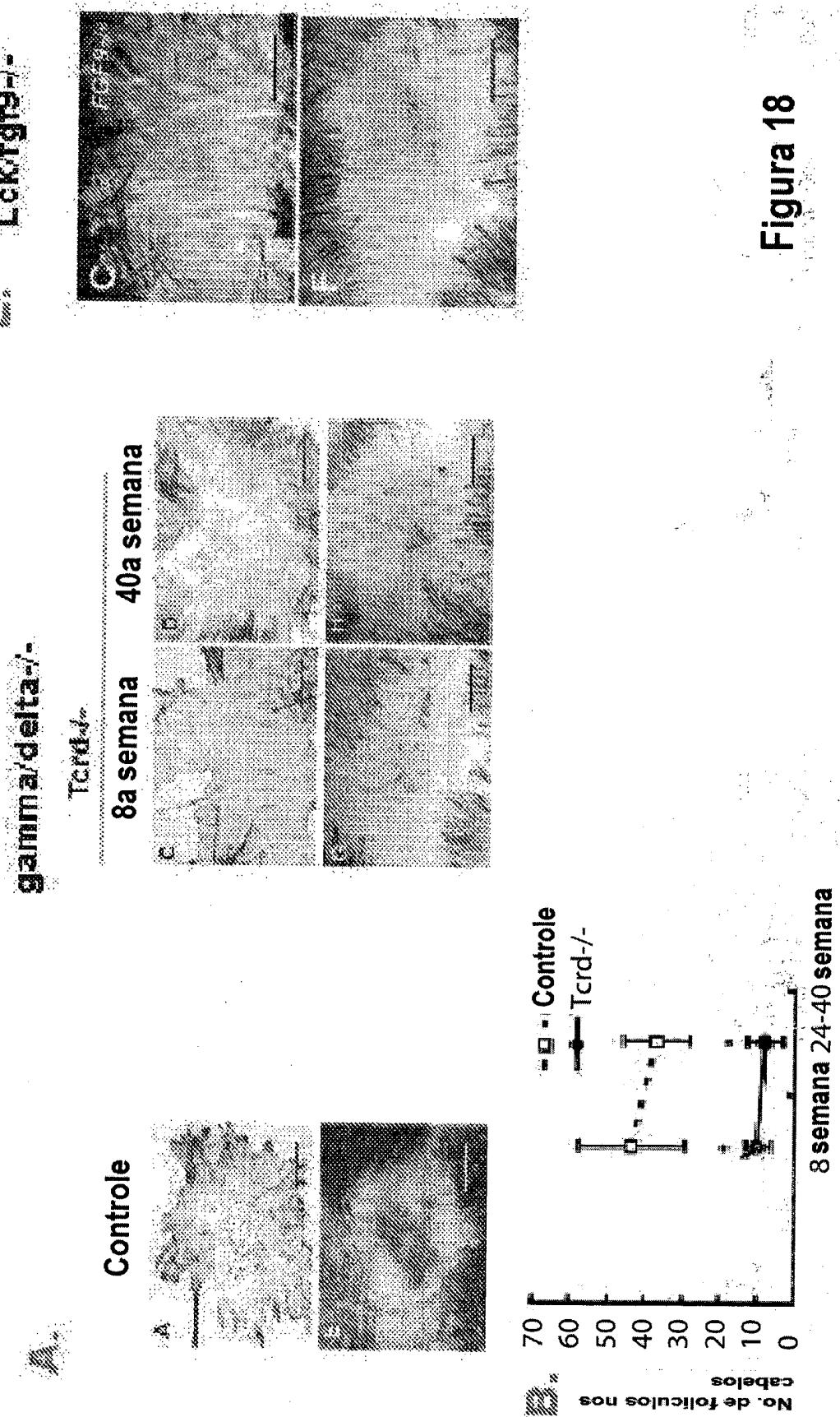


Figura 17



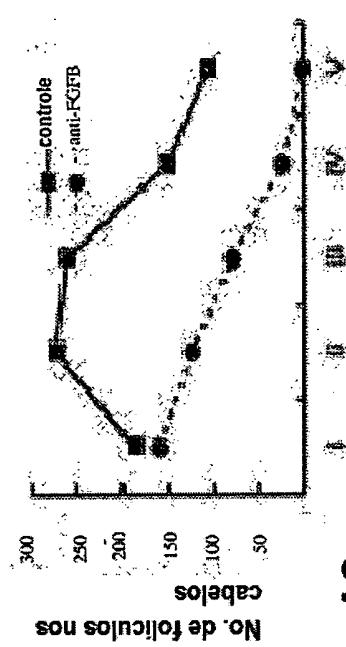


Figura 19

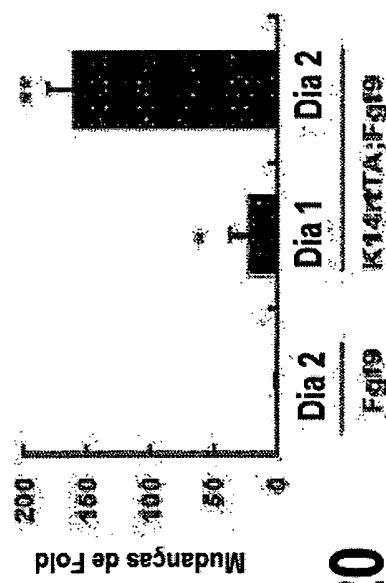


Figura 20



Figura 21

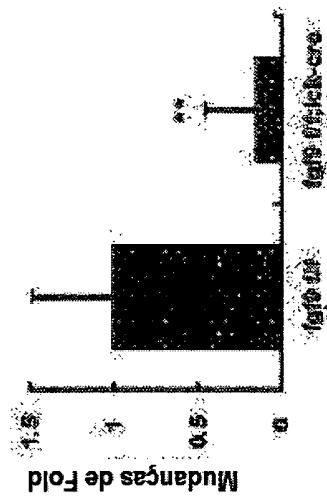


Figura 22

RESUMO

**"COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UM POLIPEPTÍDEO DE FATOR-9 DE
CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO"**

A presente invenção fornece métodos para tratar
5 perda de cabelos, tratar, inibir ou suprimir um distúrbio de pele
degenerativo, tratar alopecia androgenética (AGA), gerar novos
folículos pilosos (HF) e aumentar o tamanho de HF existentes. Os
métodos compreendem rompimento epidérmico ou administração de wnt,
e administração de um polipeptídeo de fator-9 de crescimento de
10 fibroblasto ou de outro composto que regule à montante a
sinalização de gene *sonic hedgehog*.