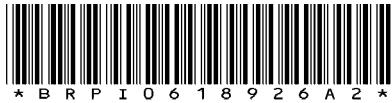




República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0618926-1 A2



* B R P I 0 6 1 8 9 2 6 A 2 *

(22) Data de Depósito: 24/11/2006
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)

(51) Int.CI.:
A61K 36/47
A61K 31/22
A61P 17/02

(54) Título: USO DE UM COMPOSTO DE INGENOL
OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO
MESMO

(30) Prioridade Unionista: 25/11/2005 AU 2005906601

(73) Titular(es): Peplin Research Pty Ltd

(72) Inventor(es): David Thomas, Ryan Moseley, Steven Martin
Ogbourne

(74) Procurador(es): MOMSEN LEONARDOS & CIA

(86) Pedido Internacional: PCT AU2006001781 de
24/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/059584de
31/05/2007

(57) Resumo: USO DE UM COMPOSTO DE INGENOL OU UM
SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO A presente
invenção refere-se genericamente a métodos e composições para
promover a cura de ferimento em um indivíduo. Em particular, a
invenção refere-se ao uso de compostos de ingenol, particularmente
angelatos de ingenol, em cura de ferimento, e a composições para
eles, que contêm tais compostos.

“USO DE UM COMPOSTO DE INGENOL OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se genericamente a métodos e composições para promover cura de ferimento em um indivíduo. Em particular, a invenção refere-se ao uso de compostos de ingenol, particularmente angelatos de ingenol, em cura de ferimento, e a composições para eles, que contêm tais compostos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Detalhes bibliográficos das publicações referidas pelo autor neste relatório são reunidos no final da descrição.

A referência neste relatório a qualquer publicação anterior (ou informação derivada dela) ou a qualquer matéria que seja conhecida, não é e não deve ser interpretada como um reconhecimento ou admissão ou qualquer forma de sugestão de que aquela publicação anterior (ou informação derivada dela) ou matéria conhecida faça parte do conhecimento geral comum no campo do esforço a que este relatório pertence.

Os ferimentos são lesões externas ou internas, causadas por, *inter alia*, meios mecânicos, químicos, térmicos ou patogênicos, que resultem no rompimento físico da integridade do tecido estrutural.

A cura do ferimento, isto é, a restauração da integridade do tecido (particularmente tecido cutâneo), é orquestrada por vários fatores de crescimento e citocinas que regulam o crescimento celular, migração celular, diferenciação celular e proliferação celular (Werner e Grose, 2003; Bryan et al., 2005). Pode convenientemente ser descrito como ocorrendo em três fases:

(i) inflamação, (ii) proliferação e (iii) maturação, cada uma das quais pode ser ainda subcategorizada em estágios mais específicos; contudo nenhuma destas fases corresponde a um período precisamente definido de tempo e pode sobrepor-se em alguma extensão (Baum e Arpey, 2005). Numerosos fatores 5 estão envolvidos no processo complexo de cura de ferimento em seguida a lesão e as citocinas são consideradas representarem um papel chave na regulação do inteiro processo (Hubner e Werner, 1996).

(i) Inflamatório (0 – 6 dias)

O primeiro estágio imediatamente em seguida à infiltração do ferimento, tal como ferimento cutâneo, é referido como hemostase, por meio do que a vasoconstrição e coagulação, mediados pela fibrina e plaquetas, são iniciadas para controlar o sangramento. O coágulo serve ainda como uma matriz provisória para os fibroblastos e células inflamatórias entrantes para o ferimento e como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento.

Em seguida à hemostase, as células inflamatórias penetram no ferimento e perpetuam o processo inflamatório (manifestado por eritema, calor, inchação e dor). As primeiras destas são células polimorfonucleares (PMNs), que são atraídas pelos fatores de crescimento, e citocinas tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-8. IL-8 é um principal quimio-atraente para PMNs (Werner e Grose, 2003) e sua rápida e transitória expressão é crítica para o processo inflamatório. AS PMNs começam a limpar o ferimento pela remoção dos detritos celulares, partículas estranhas e bactérias e ficam residentes no ferimento por um período relativamente curto (1 – 2 dias). Por sua vez, as PMNs são uma fonte principal de citocinas, tais como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Em cerca de 3 dias pós lesão, as PMNs são substituídas pelos monócitos, que transformam-se em macrófagos, que também atuam como limpadores de ferimento e uma outra fonte de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α , porém tendem a permanecer no sítio do ferimento por um período mais longo. A expressão das IL-1 β , IL-6 e

TNF- α é fortemente supra-regulada durante a fase inflamatória (Grellner et al., 2000; Grose et al., Hubner et al., 1996) e sua expressão de coordenada é provável ser importante para reparo normal (Hubner et al., 1996). Os fibrócitos representam um papel importante no processo inflamatório e são especificamente envolvidos na produção do colágeno e da citocina, em parte sendo regulados por IL-1 β e TNF- α .

5 (ii) Proliferação (3 dias – diversas semanas)

A granulação é uma importante fase de formação de ponte da inflamação para a proliferação. A formação do tecido por granulação começa 10 3 – 4 dias após a lesão e principalmente contém fibroblastos e macrófagos. Os fibroblastos migradores produzem uma permanente matriz extra-cellular (ECM) baseada em colágeno e os macrófagos produzem uma variedade de fatores de crescimento e citocinas tais como IL-1 e TNF- α , que, por sua vez, estimulam a produção dos fatores de crescimento.

15 Foi demonstrado que o fenótipo do fibroblasto tem uma influência significativa sobre tanto as respostas de cura de ferimento como os resultados clínicos (Stephens et al., 1996, 2001, 2004). Os estudos mostraram que os fibroblastos dos tecidos que exibem cura de ferimento preferencial in vivo (isto é, tecido mucoso oral) exibem distintas respostas de fenotípicas in 20 vitro (al-Khateeb et al., 1997). Além disso, as matriz metaloproteinases e serina proteinases representam um papel importante na regulação da migração celular e remodelagem em seguida a lesão e foi demonstrado que a reorganização de ECM diminuída e a cura de ferimento (isto é, ferimentos crônicos) são associados com a diminuída produção e ativação de MMP do 25 fibroblasto (Cook et al., 2000). Os fibroblastos de pele mucosa e fetal demonstram aumentada reorganização e contração de treliça de colágeno tipo I, associadas com as superiores capacidades destes tipos de célula migrarem através da ECM e repopular modelos de ferimento experimentais in vitro, em comparação com fibroblastos normais de pele (Stephens et al., 1996; al-

Khateeb et al., 1997; Enoch, 2006). Ao contrário, os fibroblastos de ferimentos crônicos são associados com diminuídas reorganização e contração da treliça de colágeno tipo I, associadas com migração ECM celular retardada ou deteriorada e capacidade de repopulação de ferimento in vitro, em comparação com fibroblastos de pele normal (Cook et al., 2000; Stephens et al., 2003; Wall, 2006). Aumentados níveis e atividade de MMP-2 são associados com sítios de ferimento da mucosa oral e pele fetal, enquanto os fibroblastos de ferimento crônico têm diminuídos níveis e atividade de MMP-2.

A re-epitelização é o evento chave a seguir no processo de cura do ferimento e é iniciado principalmente pela migração dos queratinócitos. A re-epitelização é conseguida via a proliferação de queratinócitos estimulados pelo fator de crescimento e citocina, que migram através do tecido de granulação. Estas células parecem sofrer numerosas mudanças fenotípicas durante a migração, expressando proteínas associadas com a diferenciação do fenótipo celular. À medida que a migração prossegue, os queratinócitos adquirem um fenótipo proteolítico, produzindo serina proteinases e MMPs. Os queratinócitos continuam a migrar para dentro do espaço do ferimento até término, quando os queratinócitos mitoticamente ativos sofrem mais alteração fenotípica, de modo que diferenciação e estratificação do epitélio e reformação da membrana de base ocorrem, para completar o processo de re-epitelização.

A fixação ECM celular, degradação ECM por proteinases e a regulação total destes processos pelas quitocinas e fatores de crescimento são outros aspectos chave de remodelação e cura de ferimento, que coordenam a função celular, tal como migração celular e contração de ferimento, via interações de integrina celular-ECM. Tais interações regulam a reorganização citoesquelética e novas interações integrina-ECM, via a família Rho e proteínas de ligação da actina, enquanto as proteinases removem as existentes

interações da integrina, permitindo desadesão traseira e migração celular (Martin, 1997; Stephens e Thomas, 2002; Kirsch et al., 2004). A contratilidade celular na ausência de desadesão traseira resulta em reorganização dérmica, como quantificado experimentalmente por reorganização/contração de malha de colágeno.

IL-6 é considerada ser crucial para “iniciar o estímulo” deste aspecto da resposta de cura (Werner & Grosse, 2003; Galluci et al., 2000) via seus efeitos mitogênicos sobre os queratinócitos da borda do ferimento e seu efeito quimio-atrativo sobre os neutrófilos. Pensa-se que expressão transitória de IL-6 seja crítica para a formação de ferimento sem cicatriz (Liechty et al., 2000).

(iii) Maturação (4 dias, semanas ou meses)

A maturação do ferimento (ou remodelagem) pode ocorrer tão pouco quanto dias ou semanas, porém o processo completo pode durar até diversos anos. Durante esta contração de fase, são observados vermelhidão diminuída, espessura diminuída, endurecimento diminuído e aumentada resistência do ferimento. O ferimento contrai-se sob a influência dos miofibroblastos, a produção de colágeno no tecido de granulação diminui e os vasos sanguíneos diminuem. A cura do ferimento está então completada por mais re-epitelização (Werner e Grose, 2003; Baum e Arpey, 2005).

Dependendo da natureza da lesão e do tecido, o rompimento da integridade do tecido pode tornar um indivíduo vulnerável a infecção, perda de sangue, perda da função do tecido ou formação de cicatriz.

Cura eficiente e completa de um ferimento é portanto vital para a continuada saúde e bem-estar do indivíduo. Muitos fatores podem adversamente afetar o processo de cura do ferimento, resultando em ferimentos de cura crônica ou lenta e/ou formação de cicatriz, e incluem a idade e saúde geral do indivíduo lesionado, desnutrição, doenças, pressão aplicada, circulação deteriorada, medicação (tal como tratamentos anti-câncer

e esteróides), infecção, a presença de tecido estranho ou necrótico, bem como o tipo de ferimento.

Além disso, mesmo uma vez um ferimento tenha curado, o tecido da cicatriz com freqüência permanece. O tecido da cicatriz é tanto 5 funcional como cosmeticamente inferior à pele não-lesionada norma. Esta inferioridade acredita-se ser uma conseqüência do arranjo de feixes de colágeno dentro da neoderme gerada durante a formação do novo tecido. Os feixes de colágeno dentro do tecido normal são dispostos em um arranjo de tecido tridimensional complexo (com freqüência denominado uma “tecedura 10 de cesta”), que provê altos níveis de elasticidade e resiliência à pele avariada. Os feixes de colágeno dentro do tecido de cicatriz são dispostos em uma maneira mais plana, com feixes orientados paralelos à superfície da pele. A perda de tecido tridimensional e sua recolocação com um sistema paralelo 15 de feixes de colágeno acredita-se ser responsável pela perda de cosmese nos sítios de cicatrização de tecido.

A promoção da cura de ferimento permanece o foco de intensas pesquisa e estudo e há atualmente numerosos métodos e composições disponíveis para tratar ferimentos e promover a cura do ferimento, incluindo 20 uma miríade de curativos e bandagens passivos e ativos e medicamentos tópicos, bem como debridamento físico e químico do tecido necrótico. A cura do ferimento poderia também envolver necrose, apoptose e alteração do crescimento celular do tecido não-transformado.

Apesar disto, os resultados têm sido um tanto inconsistentes e 25 o tratamento de ferimentos de cura crônica ou lenta continua a propor um sério desafio para a fraternidade médica. Portanto, permanece a necessidade de outros agentes e métodos para tratar ferimentos e a promoção de cura de ferimento. Além disso, esperar-se-ia que os agentes capazes de modular o processo de reparo de tecido, de modo a promover o desenvolvimento de uma arquitetura de colágeno, mais normal, melhorassem a qualidade do tecido de

cicatrização.

A família Euphorbiaceae das plantas cobre uma larga variedade de plantas, incluindo sementes de *Euphorbia* species. É largamente informado que uma variedade de ingenanos, particularmente compostos de ingenol, são isoláveis destas espécies. Uma espécie intensivamente estudada deste grupo é *Ruphorbia pilulifera* L (sinônimo *E. hirta* L., *E. capitata* Lam.), cujos nomes comuns incluem *pill-bearing spurge*, bistorta, cabelo de gato, 5 erva daninha *Queensland asthma* e *flowery-headed spurge*. A planta é largamente distribuída nos países trópicos, incluindo Índia, e na Austrália 10 setentrional, incluindo Queensland. A *Euphorbia peplus* é outra espécie de que angelatos de ingenol, com propriedades anti-câncer, foram isolados (vide Patentes U.S. Nos. 6.432.452, 6.787.161 e 6.844.013). O ingenol-3-angelato é 15 um angelato de ingenol extraído e purificado de *E. peplus* e é útil, *inter alia*, no tratamento de ceratoses actínicas e câncer de pele sem-melanoma (NMSC) por administração tópica de curto termo. A citotoxicidade do ingenol-3-angelato foi mostrada para muitas linhas de células *in vitro* e sua eficácia *in vivo* tem sido clinicamente estabelecida.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Por toda esta especificação e as reivindicações que seguem, a 20 menos que o contexto requeira de outro modo, a palavra “compreendem” e variações como “compreende” e “compreendendo” serão entendidas implicarem na inclusão de um inteiro ou etapa ou grupo de inteiros ou etapas citados, porém não a exclusão de qualquer outro inteiro ou etapa ou grupo de inteiros ou etapas.

Dados os papéis críticos realizados pelos fatores de crescimento e citocinas, bem como fibroblastos e queratinócitos no processo 25 de cura de ferimento, agentes que podem respectivamente modular sua produção ou a resposta fenotípica pode ser útil no tratamento de ferimentos promovendo, estimulando, iniciando, aumentando ou de outro modo

progredindo o processo de cura do ferimento e/ou reduzindo ou minimizando a formação de cicatriz, isto é, melhorando a cosmese. Foi agora mostrado que um composto de ingenol pode modular a atividade imunoestimulativa em célula mononuclear sanguínea periférica (PBMCs) e pode supra-regular a expressão ou produção de certas citocinas que representam um papel na cura do ferimento. Foi também mostrado que as respostas de cura de ferimento fenotípicas e pivotais dos fibroblastos e queratinócitos dérmicos podem ser moduladas utilizando tal composto. Tais alterações moduladas podem ser benéficas para resultados de cura de ferimento, particularmente para ferimentos cutâneos. Vantajosamente, isto pode também resultar em resultados de cura de ferimento com reduzida formação de cicatriz. A presente invenção agora fornece novos métodos para modular a produção de citocina e da resposta fenotípica dos fibroblastos e queratinócitos envolvidos na cura do ferimento. Assim, estimulando-se a resposta inflamatória aguda, tal como aumentando-se PMN e a migração macrófaga e aumentando-se os níveis de citocina pró-inflamatória, a cura do ferimento pode ser promovida. Assim, a invenção fornece métodos para curar ferimento e tratar ferimentos. A invenção também fornece agentes que promovem o desenvolvimento de uma arquitetura de colágeno mais normal e, assim, pode vantajosamente melhorar a qualidade do tecido da cicatriz do ferimento curado.

Portanto, em um primeiro aspecto, é provido um Método para modular a produção de uma ou mais citocinas em um indivíduo em necessidade delas, compreendendo administrar a dito indivíduo uma quantidade eficaz moduladora de um composto de ingenol ou um seu sal ou pró-droga farmaceuticamente aceitável.

Em outro aspecto, a invenção fornece um Método para modular a produção de uma ou mais citocinas em um sítio de ferimento de um indivíduo em necessidade delas, compreendendo administrar a dito indivíduo uma quantidade eficaz modulador de um composto de ingenol ou um seu sal

ou pró-droga farmaceuticamente aceitável. Em uma forma de realização, a administração envolve a aplicação tópica do composto de ingenol ou um seu sal ou pró-droga farmaceuticamente aceitável ao sítio do ferimento.

Em uma forma de realização, a modulação envolve aumentar a
5 produção da citocina.

Em outra forma de realização, a uma ou mais citocinas são selecionadas do grupo IL-1 β , IL-2, IL6, IL-8 e TNF- α .

Em outro aspecto, é provido um Método para modular a resposta fenotípica dos fibroblastos dérmicos e/ou queratinócitos em um
10 indivíduo em necessidade dela, compreendendo administrar a dito indivíduo uma quantidade eficaz moduladora de um composto de ingenol ou um seu sal ou pró-droga farmaceuticamente aceitável.

Em outro aspecto a invenção fornece um Método para modular a resposta fenotípica dos fibroblastos e/ou queratinócitos dérmicos em um
15 sítio de ferimento de um indivíduo em necessidade dela, compreendendo administrar a dito indivíduo uma quantidade eficaz moduladora de um composto de ingenol ou um seu sal ou pró-droga farmaceuticamente aceitável. Em uma forma de realização, a administração envolve a aplicação tópica do composto de ingenol ou um seu sal ou pró-droga farmaceuticamente
20 aceitável ao sítio do ferimento.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece um Método para promover a cura de ferimento em um indivíduo em necessidade dela, compreendendo administrar a dito indivíduo uma quantidade eficaz de cura de ferimento de um composto de ingenol ou um seu sal ou pró-droga
25 farmaceuticamente aceitável.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar um ferimento pela promoção da cura do ferimento em um indivíduo em necessidade dele, compreendendo topicalmente aplicar uma quantidade eficaz de cura de ferimento de um composto de ingenol ou um seu sal ou pró-droga

farmaceuticamente aceitável ao ferimento.

Em uma forma de realização, o ferimento é um ferimento cutâneo, tal como um ferimento dérmico ou epidérmico.

Em algumas formas de realização, o composto de ingenol é selecionado de ingenol-3-angelato, 20-O-acetil-ingenol-3-angelato e 20-deóxi-ingenol-3-angelato e seus sais e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis.

Os compostos contemplados pela invenção podem desejavelmente auxiliar na restauração, desenvolvimento ou promoção da arquitetura de colágeno normal e podem, portanto, fornecer um método de reduzir ou minimizar a formação de cicatriz ou de outro modo melhorar o resultado cosmético ou funcional, tal como melhorada resistência ou elasticidade ou reduzidas vermelhidão, espessura, endurecimento ou hipo ou hiper-pigmentação de um ferimento. Ao assim fazer, os compostos podem fornecer uma melhorada ou acelerada taxa para obter isto, particularmente para ferimentos crônicos, por meio dos quais a resposta inflamatória pode ser “iniciada” para promover a cura.

Portanto, em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método para reduzir ou minimizar o tecido de cicatrização ou melhorar a cosmese ou resultado funcional em um ferimento, compreendendo administrar ao ferimento de um indivíduo em necessidade uma quantidade redutora ou minimizante de cicatriz ou uma quantidade de melhoria cosmética ou funcional de um composto de angelato de ingenol ou um seu sal ou pró-droga farmaceuticamente aceitável.

25 **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 representa graficamente dados tensiométricos médios obtidos em ferimentos incisionais agudos (cirúrgicos) de doença total de rato a (A) 4 semanas e (B) 12 semanas em seguida à aplicação de 0,01%, 0,028%, 0,05% de PEP005, em comparação com DMSO/veículo isopropanol

(controle) e grupos de controle de ferimento não tratados. N-NT = PEP005. “não-afetados”, não tratados; N-V = PEP005-“não tratados”, tratado com veículo; V = PEP005-exposto, tratado com veículo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 Antes de descrever a presente invenção em detalhes, deve ser entendido que, a menos que de outro modo indicado, a invenção assunto não é limitada a formulações específicas de componentes, métodos de manufatura, regimes de dosagem ou similares, como tais podem variar. Deve também ser entendido que a terminologia usada aqui é para fins de descrever somente 10 formas de realização particulares e não se pretende que seja limitadora.

As formas singulares “um”, “uma”, “o”, “a” incluem aspectos plurais, a menos que o contexto claramente dite de outro modo. Assim, por exemplo, referência a “um ingenano substituído por angeloíla” ou “um angelato de ingenol” inclui um único composto, bem como dois ou mais 15 compostos, como apropriado.

Como aqui usado, um “ferimento” refere-se a rompimento físico da continuidade ou integridade da estrutura do tecido. “Cura de ferimento” refere-se à restauração da integridade do tecido. Deve ser entendido que isto pode referir-se a uma restauração parcial ou total da 20 integridade do tecido. O tratamento de um ferimento refere-se, assim, à promoção, melhoria, progressão, aceleração ou por outro lado avanço de um ou mais estágios ou processos associados com o processo de cura do ferimento.

O ferimento pode ser agudo ou crônico. Ferimentos crônicos, 25 incluindo machucados de urgência, úlceras venosas das pernas e úlceras diabéticas dos pés, podem simplesmente ser descritas como ferimentos que não são curados. Embora a exata patogênese molecular dos ferimentos crônicos não seja totalmente entendido, é reconhecido ser multi-fatorial. Como as respostas normais das células residentes e migratórias durante a

lesão aguda tornam-se prejudicadas, estes ferimentos são caracterizados por uma prolongada resposta inflamatória, remodelação da matriz extracelular (ECM) de ferimento defeituosa e uma falha de re-epitelização.

O ferimento pode ser qualquer ferimento interno, p. ex., onde a integridade estrutural externa da pele é mantida, tal como em contusão ou 5 ulceração interna ou ferimentos externos, particularmente ferimentos cutâneos e, conseqüentemente, o tecido pode ser qualquer tecido corporal interno ou externo. Em uma forma de realização, o tecido é pele (tal como pele humana), isto é, o ferimento é um ferimento cutâneo, tal como um ferimento dérmico 10 ou epidérmico.

A pele humana é composta de duas distintas camadas, a epiderme e a derme, abaixo das quais situa-se o tecido subcutâneo. As funções primárias da pele são fornecer proteção aos órgãos e tecidos internos de trauma externo e infecção patogênica, sensação e termorregulação.

15 A camada mais externa da pele, a epiderme, tem aproximadamente a espessura de 0,04 mm, é avascular, consiste de quatro tipos de célula (queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel) e é estratificada em diversas camadas de células epiteliais. A camada epitelial mais interna da epiderme é a membrana basal, que fica em 20 contato direto com e ancora a epiderme na derme. Toda divisão celular epitelial ocorrendo na pele ocorre na membrana basal. Após a divisão celular, as células epiteliais migram para a superfície externa da epiderme. Durante esta migração, as células sofrem um processo conhecido como queratinização, por meio do qual os núcleos são perdidos e as células são transformadas em 25 células não vivas duras, planas e resistentes. A migração é completada quando as células alcançam a estrutura epidérmica mais externa, o estrato córneo, uma camada de células escamosa a prova d'água seca que ajuda a evitar dessecção do tecido subjacente. Esta camada de células epiteliais mortas está continuamente sendo desprendida e substituída por células queratinizadas,

movendo-se para a superfície a partir da membrana basal. Em razão de a epitélio epidérmico ser avascular, a membrana basal é dependente da derme quanto a seu suprimento de nutriente.

A derme é uma camada de tecido altamente vascularizada 5 suprindo nutrientes à epiderme. Além disso, a derme contém terminações nervosas, linfáticos, proteína de colágeno e tecido conectivo. A derme tem aproximadamente a espessura de 0,5 mm e é composta predominantemente de fibroblastos e macrófagos. Estes tipos de célula são largamente responsáveis pela produção e manutenção do colágeno, a proteína encontrada em todo 10 tecido conectivo animal, incluindo a pele. O colágeno é principalmente responsável pela natureza resiliente, elástica da pele. O tecido subcutâneo, encontrado embaixo da derme rica em colágeno, fornece mobilidade de pele, isolamento, armazenamento de caloria e sangue para os tecidos acima dele.

Os ferimentos podem ser classificados em uma de duas 15 categorias gerais, ferimentos de espessura parcial ou ferimentos de espessura total. Uma ferimento de espessura parcial é limitado à epiderme e derme superficial sem avaria aos vasos sanguíneos dérmicos. Um ferimento de espessura total envolve rompimento da derme e estende-se para as camadas mais profundas do tecido, envolvendo rompimento dos vasos sanguíneos 20 dérmicos. A cura do ferimento de espessura parcial ocorre por simples regeneração do tecido epitelial. A cura de ferimento em ferimentos de espessura total é mais complexa. Os ferimentos cutâneos contemplados pela invenção podem ser ferimentos de espessura parcial ou espessura total.

Os ferimentos contemplados pela invenção incluem cortes e 25 lacerações, incisões cirúrgicas ou ferimentos, perfurações, esfoladuras, arranhões, ferimentos por compressão, abrasões, ferimentos por fricção (p. ex., exantema espumosa, bolhas de fricção), úlceras de decúbito (p. ex., feridas de compressão ou leito); ferimentos de efeito térmico (queimaduras de fontes de frio e calor, diretamente ou através da condução, convecção ou

radiação e fontes elétricas), ferimentos químicos (p. ex., queimaduras por ácido ou álcali) ou infecções patogênicas (p. ex., viral, bacteriana ou fúngica), incluindo furúnculos abertos ou intactos, erupções de pele, manchas e acne, úlceras, ferimentos crônicos (incluindo ferimentos associados com diabético, 5 tais como úlceras da perna inferior e pé, úlceras de perna venosas e ferimentos por compressão), sítios de enxerto de pele/doador e recebedor de transplante, condições de resposta imune, p. ex., psoríase e eczema, estômago ou úlceras intestinais, ferimentos orais, incluindo uma úlcera da boca, cartilagem ou osso danificado, ferimentos de amputação e lesões corneanas.

Referência a um “ingenol” inclui compostos tendo o esqueleto C3, C4, C5-trióxi *trans* biciclo [4.4.1]-udecano ingenano. Tais compostos são extensamente informados e conhecidos na literatura e podem ser isolados de plantas tais como de uma espécie da família Euphorbiaceae, bem como quimicamente sintetizados (vide, por exemplo, Winkler et al. 2002 e Tanino 10 et al., 2003). Os compostos são geralmente encontrados em extratos das plantas Euphorbiaceae. Um extrato pode compreender, portanto, material de seiva ou líquido ou semi-líquido, exsudado das ou presentes nas folhas, caule, flores, sementes, casca ou entre a casca e o caule. Muitíssimo preferivelmente, o extrato é de seiva. Além disso, o extrato pode compreender 15 material líquido ou semi-líquido, localizado em frações extraídas de seiva, folhas, caules, flores, casca ou outro material de planta da planta Euphorbiaceae. Por exemplo, o material vegetal pode ser sujeito a manipulação física para romper as fibras vegetais e o material da matriz extracelular e inter- e intra-tecido extraído para dentro de um solvente, 20 incluindo um meio aquoso. Todas tais fontes de compostos são abrangidas pela presente invenção, incluindo compostos obtidos por rotas quimicamente 25 sintéticas.

Referência aqui a um membro da família Euphorbiaceae inclui referência a espécies dos gêneros *Acalypha*, *Acidoton*, *Actinostemon*, *Adelia*,

Adenocline, Adenocrepis, Adenophaedra, Adisca, Agrostistachys, Alchornea,
Alchorneopsis, Alcinaeanthus, Alcoceria, Aleurites, Amanoa, Andrachne,
Angostyles, Anisophyllum, Antidesma, Aphora, Aporosa, Aporosella,
Argythamnia, Astrococcus, Astrogyne, Baccanrea, Baliospermum, Bernardia,
 5 *Beyeriopsis, Bischofia, Blachia, Blumeodondron, Bonania, Bradleia, Breynia,*
Breyniopsis, Briedelia, Buraeavia, Caperonia, Caryodendron, Celianella,
Cephalocroton, Chaenotheca, Chaetocarpus, Chamaesyce, Cheilosa,
Chiropetalum, Choriophyllum, Cicca, Chaoxylon, Cleidon, Cleistanthus,
Cluytia, Cnesmone, Cnidoscolus, Coccoceras, Codiaeum, Coelodiscus,
 10 *Conami, Conceveiba, Conceveibastrum, Conceveibum, Corythea, Croizatia,*
Croton, Crotonopsis, Crozophora, Cubanthus, Cunuria, Dactylostemon,
Dalechampia, Dendrocousinsia, Diaspersus, Didymocistus, Dimorphocalyx,
Discocarpus, Ditaxis, Dodecastingma, Drypetes, Dysopsis, Elateriospermum,
Endadenium, Endospermum, Erismanthus, Erythrocarius, Erythrocilus,
 15 *Eumecanthus, Euphorbia, Euphorbiadendron, Excoecaria, Flueggea,*
Calearia, Garcia, Gavarretia, Gelonium, Giara, Givotia, Glochidion,
Clochidionopsis, Glycydendron, Gymnanthes, Gymnosparia,
Haematospermum, Hendecandra, Hevea, Hieronima, Hieronyma,
Hippocreandra, Homalanthus, Hymenocardia, Janipha, Jatropha,
 20 *Julocroton, Lasiocroton, Leiocarpus, Leonardia, Lepidanthus, Leucocroton,*
Mabea, Macaranga, Mallotus, Manihot, Mappa, Maprounea, Melanthesa,
Mercurialis, Mettenia, Micrandra, Microdesmis, Microelus, Microstachy,
Maacroton, Monadenium, Mozinna, Neoscortechinia, Omalanthus,
Omphalea, Ophellantha, Orbicular! a, Ostodes, Oxydectes, Palenga,
 25 *Pantadenia, Paradrypeptes, Pausandra, Pedilanthes, Pera, Peridium,*
Petalostigma, Phyllanthus, Picrodendro, Pierardia, Pilinophytum,
Pimeleodendron, Piranhea, Platygyna, Plukenetia, Podocalyx, Poinsettia,
Poraresia, Prosartema, Pseudanthus, Pycnocoma, Quadrasia, Reverchonia,
Richeria, Richeriella, Ricinella, Ri cino carpus, Rottlera, Sagotia, Sanwitia,

5 *Sapium, Savia, Sclerocroton, Sebastiania, Securinega, Senefeldera, Senefflderopsis, Serophyton, Siphonia, Spatiostemon, Spixia, Stillingia, Strophioblachia, Synadenium, Tetracoccus, Tetraplandra, Tetrorchidium, Thyrsanthera, Tithymalus, Trageia, Trewia, Trigonostemon, Tyria e Xylophylla.*

Um gênero preferido e particularmente adequado para a prática da presente invenção é o gênero *Euphorbia*. Espécies particularmente úteis deste gênero incluem *Euphorbia aaron-rossii*, *Euphorbia abbreviata*, *Euphorbia acuta*, *Euphorbia alatocaulis*, *Euphorbia albicaulis*, *Euphorbia algomargmata*, *Euphorbia aliceae*, *Euphorbia alta*, *Euphorbia anacamptseros*, *Euphorbia andromedae*, *Euphorbia angusta*, *Euphorbia anthonyi*, *Euphorbia antiquensis*, *Euphorbia apocynifolia*, *Euphorbia arabica*, *Euphorbia ariensis*, *Euphorbia arizonica*, *Euphorbia arkansana*, *Euphorbia arteagae*, *Euphorbia arundeliana*, *Euphorbia astroites*, *Euphorbia atrococca*, *Euphorbia baselicis*, *Euphorbia batabanensis*, *Euphorbia bergeri*, *Euphorbia bermudiana*, *Euphorbia bicolor*, *Euphorbia biformis*, *Euphorbia bifurcata*, *Euphorbia bilobata*, *Euphorbia biramensis*, *Euphorbia biuncialis*, *Euphorbia blepharostipula*, *Euphorbia blodgettii*, *Euphorbia boerhaaviaoides*, *Euphorbia boliviano*, *Euphorbia bracei*, *Euphorbia brachiata*, *Euphorbia brachycera*, *Euphorbia brandegee*, *Euphorbia brittonii*, *Euphorbia caesia*, *Euphorbia calcicola*, *Euphorbia campestris*, *Euphorbia candelabrum*, *Euphorbia capitellata*, *Euphorbia carmenensis*, *Euphorbia carunculata*, *Euphorbia cayensis*, *Euphorbia celastroides*, *Euphorbia chalicophila*, *Euphorbia chamaerrhodos*, *Euphorbia chamaesula*, *Euphorbia chiapensis*, *Euphorbia chiogenoides*, *Euphorbia cinerascens*, *Euphorbia clarionensis*, *Euphorbia colimae*, *Euphorbia colorata*, *Euphorbia commutata*, *Euphorbia consoquitiae*, *Euphorbia convolvuloides*, *Euphorbia corallifera*, *Euphorbia creberrima*, *Euphorbia crenulata*, *Euphorbia cubensis*, *Euphorbia cuspidata*, *Euphorbia cymbiformis*, *Euphorbia darlingtonii*, *Euphorbia defoliata*,

Euphorbia degeneri, Euphorbia deltoidea, Euphorbia dentata, Euphorbia depressa, Euphorbia dictyosperma, Euphorbia dictyosperma, Euphorbia dioeca, Euphorbia discoidalis, Euphorbia dorsiventralis, Euphorbia drumondii, Euphorbia duclouxii, Euphorbia dussii, Euphorbia eanophylla,
 5 *Euphorbia eggersii, Euphorbia eglandulosa, Euphorbia elata, Euphorbia enalla, Euphorbia eriogonoides, Euphorbia eriophylla, Euphorbia esculaeformis, Euphorbia espirituensis, Euphorbia esula, Euphorbia excisa, Euphorbia exclusa, Euphorbia exstipitata, Euphorbia exstipulata, Euphorbia fendleri, Euphorbia filicaulis, Euphorbia fliformis, Euphorbia florida,*
 10 *Euphorbia fruticulpsa, Euphorbia garber, Euphorbia gamnerii, Euphorbia gerardiana, Euphorbia geyeri, Euphorbia glyptosperma, Euphorbia gorgonis, Euphorbia gracilior, Euphorbia gracillima, Euphorbia gradyi, Euphorbia graminea, Euphorbia graminiea, Euphorbia grisea, Euphorbia guadalajarana, Euphorbia guanarensis, Euphorbia gymnadenia, Euphorbia haematantha, Euphorbia hedyotoides, Euphorbia heldrichii, Euphorbia helenae, Euphorbia helleri, Euphorbia helwigii, Euphorbia henricksonii,*
 15 *Euphorbia heterophylla, Euphorbia hexagona, Euphorbia hexagonoides, Euphorbia hinkleyorum, Euphorbia hintonii, Euphorbia hirtula, Euphorbia hirta, Euphorbia hooveri, Euphorbia humistrata, Euphorbia hypericifolia,*
 20 *Euphorbia inundata, Euphorbia involuta, Euphorbia jaliscensis, Euphorbia jejuna, Euphorbia Johnston, Euphorbia juttae, Euphorbia knutii, Euphorbia lasiocarpa, Euphorbia lata, Euphorbia latazi, Euphorbia latericolor, Euphorbia laxiflora, Euphorbia lecheoides, Euphorbia ledienii, Euphorbia leucophylla, Euphorbia lineata, Euphorbia linguiformis, Euphorbia longecornuta, Euphorbia longepetiolata, Euphorbia longeramosa, Euphorbia longinsulicola, Euphorbia longipila, Euphorbia lupulina, Euphorbia lurida,*
 25 *Euphorbia lycioides, Euphorbia macropodoides, macvaughiana, Euphorbia manca, Euphorbia mandoniana, Euphorbia mangleti, Euphorbia mango, Euphorbia marylandica, Euphorbia mayana, Euphorbia melanadenia,*

Euphorbia melanocarpa, *Euphorbia meridensis*, *Euphorbia mertonii*,
Euphorbia mexiae, *Euphorbia microcephala*, *Euphorbia microclada*,
Euphorbia micromera, *Euphorbia misella*, *Euphorbia missurica*, *Euphorbia*
5 *montana*, *Euphorbia montereyana*, *Euphorbia multicaulis*, *Euphorbia*
multiformis, *Euphorbia multinodis*, *Euphorbia multiseta*, *Euphorbia*
muscicola, *Euphorbia neomexicana*, *Euphorbia nephradenia*, *Euphorbia*
niqueroana, *Euphorbia oaxacana*, *Euphorbia occidentalis*, *Euphorbia*
10 *odontodenia*, *Euphorbia olivacea*, *Euphorbia olowaluana*, *Euphorbia*
ophthalmica, *Euphorbia ovata*, *Euphorbia pachypoda*, *Euphorbia pachyrhiza*,
Euphorbia padifolia, *Euphorbia palmeri*, *Euphorbia paludicola*, *Euphorbia*
parciflora, *Euphorbia parishii*, *Euphorbia parryi*, *Euphorbia paxiana*,
Euphorbia pediculifera, *Euphorbia peplidion*, *Euphorbia peploides*,
15 *Euphorbia peplus*, *Euphorbia pergamenta*, *Euphorbia perlignea*, *Euphorbia*
petaloidea, *Euphorbia petaloidea*, *Euphorbia petrina*, *Euphorbia picachensis*,
Euphorbia pilosula, *Euphorbia pilulifera*, *Euphorbia pinariona*, *Euphorbia*
pinetorum, *Euphorbia pionosperma*, *Euphorbia platysperma*, *Euphorbia*
20 *plicata*, *Euphorbia poeppigii*, *Euphorbia poliosperma*, *Euphorbia polycarpa*,
Euphorbia polycnemoides, *Euphorbia polyphylla*, *Euphorbia portoricensis*,
Euphorbia portulacoides *Euphorbia portulana*, *Euphorbia presliae*. *Euphorbia*
prostrata, *Euphorbia pteroneura*, *Euphorbia pycnanthema*, *Euphorbia*
25 *ramosa*, *Euphorbia rapulum*, *Euphorbia remyi*, *Euphorbia retroscabra*,
Euphorbia revoluta, *Euphorbia rivularis*, *Euphorbia robusta*, *Euphorbia*
romosa, *Euphorbia rubida*, *Euphorbia rubrosperma*, *Euphorbia rupicola*,
Euphorbia sanmartensis, *Euphorbia saxatilis* M. Bieb, *Euphorbia schizoloba*,
30 *Euphorbia sclerocyatum*, *Euphorbia scopulorum*, *Euphorbia senilis*,
Euphorbia serpyllifolia, *Euphorbia serrula*, *Euphorbia setiloba* Engelm,
Euphorbia sonorae, *Euphorbia soobyi*, *Euphorbia sparsiflora*, *Euphorbia*
sphaerosperma, *Euphorbia syphilitica*, *Euphorbia spruceana*, *Euphorbia*
subcoerulea, *Euphorbia stellata*, *Euphorbia submammilaris*, *Euphorbia*

subpeltata, *Euphorbia subpubens*, *Euphorbia subreniforme*, *Euphorbia subtrifoliata*, *Euphorbia succedanea*, *Euphorbia tamaulipasana*, *Euphorbia telephiooides*, *Euphorbia tenuissima*, *Euphorbia tetrapora*, *Euphorbia tirucalli*, *Euphorbia tomentella*, *Euphorbia tomentosa*, *Euphorbia torralbasii*,
 5 *Euphorbia tovariensis*, *Euphorbia trachysperma*, *Euphorbia tricolor*,
Euphorbia troyana, *Euphorbia tuerckheimii*, *Euphorbia turczaninowii*,
Euphorbia umbellulata, *Euphorbia undulata*, *Euphorbia vermiformis*,
Euphorbia versicolor, *Euphorbia villifera*, *Euphorbia violacea*, *Euphorbia whitei*, *Euphorbia xanti Engelm*, *Euphorbia xylopoda Greenm.*, *Euphorbia
 10 yayalesia Urb.*, *Euphorbia yungasensis*, *Euphorbia zeravschanica and*
Euphorbia zinniiflora.

Espécies particularmente preferidas do gênero *Synadenium* incluem *Synadenium grantii* e *Synadenium compactum*.

Espécies particularmente preferidas do gênero *Monadenium*
 15 incluem *Monadenium lugardae* e *Monadenium guentheri*.

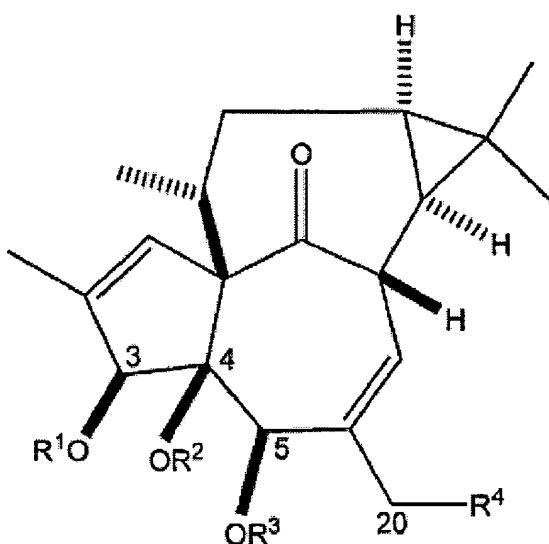
Uma espécie preferida do gênero *Endadenium* é *Endadenium gossweilreni*.

Euphorbia peplus é particularmente útil na prática da presente invenção em termos de fornecer uma fonte de angelatos de ingenol.
 20 Referência aqui a “*Euphorbia peplus*” ou sua abreviação “*E. peplus*”, inclui várias variedades, cepas, linhagens, híbridos ou derivativos desta planta, bem como seus parentes botânicos ou horticulturais. Além disso, a presente invenção pode ser praticada usando-se uma planta Euphorbiaceae integral ou partes dela incluindo seiva ou sementes ou outro material reprodutivo 25 podendo ser usado. Geralmente, para sementes ou material reprodutivo serem usados, uma planta ou plantinha é primeiro necessário que seja propagada.

Referência aqui a uma planta Euphorbiaceae, uma *Euphorbia species* ou *E. peplus* engloba ainda plantas geneticamente modificadas. As plantas geneticamente modificadas incluem plantas transgênicas ou plantas

em que uma traço foi removido ou onde uma seqüência genética endógena foi regulada descendentemente, mutada ou de outro modo alterada, incluindo a alteração ou introdução de material genético que exiba um efeito regulador sobre um gene particular. Conseqüentemente, uma planta que exiba um caráter não naturalmente presente em uma planta Euphorbiaceae ou uma espécie de *Euphorbia* ou em *E. peplus* é contudo abrangida pela presente invenção e é incluída dentro do escopo dos termos acima mencionados.

Em uma forma de realização da invenção, o composto de ingenol tem a fórmula:



em que

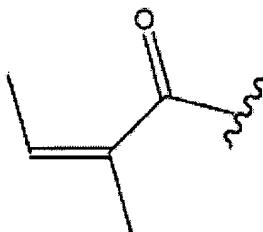
R^1-R^3 são independentemente selecionados de hidrogênio, alquila opcionalmente substituída, alquenila opcionalmente substituída, alquinila opcionalmente substituída, acila opcionalmente substituída, arilalquila opcionalmente substituída, $S(O)_2R'$, $S(O)_2OR^1$, $P(O)(OR')_2$ (em que R' é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, acila, arila, ou arilalquila) e glicosila; e

R^4 é selecionado de hidrogênio, hidróxi, opcionalmente substituído alcóxi, opcionalmente substituído alquenóxi, opcionalmente substituído alquinóxi, opcionalmente substituído acilóxi, opcionalmente substituído arilalcóxi, $OS(O)_2R'$, $OS(O)_2OR'$, $OP(O)(OR')_2$ (em que R' é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, acila, arila, ou arilalquila) e glicóxi.

Em uma forma de realização da invenção, pelo menos um de R'-R⁴ não é hidrogênio. Em uma sua forma preferida, R¹ não é hidrogênio.

Em uma forma de realização particular da invenção, R¹ é um grupo acila C(O)-R opcionalmente substituído. Em outras suas formas de realização, R é opcionalmente substituída alquila, alquenila ou alquinila. Em uma sua mais preferida forma de realização, R pode ser de cadeia reta ou ramificada e pode ter até 6 ou até 10 átomos de carbono. Em uma sua forma de realização, R é ramificado.

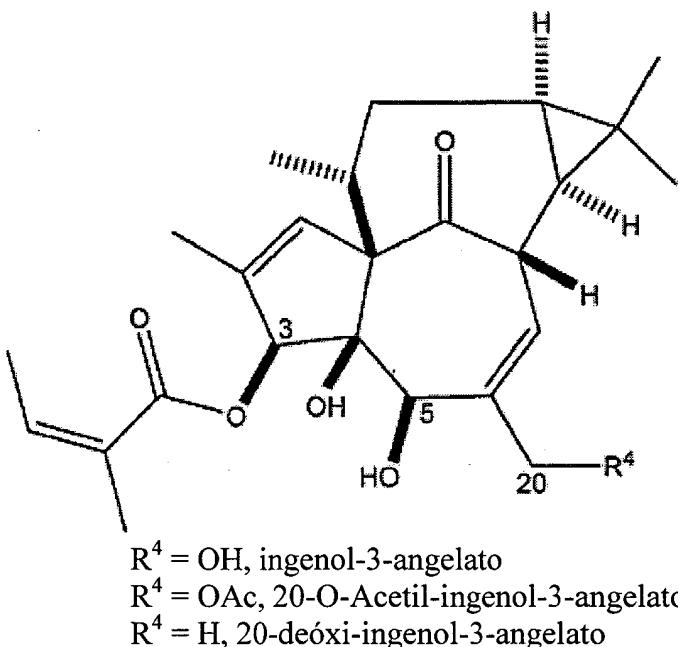
Em certas formas de realização da invenção, um de R¹-R³ é um grupo angeloíla, como representado pela fórmula abaixo, ou R⁴ é um grupo angeloíla. Tais compostos são referidos aqui como angelatos de ingenol. Em uma forma de realização particularmente referida da invenção, R¹ é um grupo angeloíla.



Em certas formas de realização da invenção, um ou ambos de R² e R³ são hidrogênio. R² e R³ podem também formar um grupo dióxi metileno ou etileno.

Em certas formas de realização da invenção, R⁴ é hidrogênio, hidróxi ou acilóxi, tal como acetóxi.

Em certas formas de realização da invenção, os compostos para uso nos métodos descritos são ingenol-3-angelato, 20-O-acetil-ingenol-3-angelato e 20-deóxi-ingenol-3-angelato e seus sais e pró-drogas farmaceuticamente aceitáveis.



Em uma forma de realização particular da presente invenção, o composto é ingenol-3-angelato (também referido aqui como "PEP005"). Referência aqui a "ingenol-3-angelato" ou "PEP005" inclui formas naturalmente ocorrentes, bem como quimicamente sintéticas.

5 A alquilação, alquenilação, alquinilação, arilalquilação ou acilação podem ser realizadas nos compostos de ingenol empregando-se métodos conhecidos na técnica de química sintética para alquilação, alquenilação, alquinilação, arilalquilação ou acilação de grupos hidróxi livres (vide, por exemplo, Greene e Wutz, 1999; março, 5^a Edição; Larock, 1999;
10 cujo inteiro conteúdo é incorporado aqui por referência). Por exemplo, os grupos hidróxi podem ser alquilados (ou arilalquilados) utilizando-se halogenos de alquila (ou arilalquila), tais como iodeto de metila (ou brometo de benzila) ou dialquil sulfatos, tais como dimetil ou dietil sulfato. A acilação pode ser realizada por tratamento com apropriados ácidos carboxílicos, halogenos ácidos
15 e anidridos ácidos, na presença de uma base ou um agente de acoplamento. A formação glicosídica pode ser realizada quimicamente, por exemplo, reagindo-se o composto de ingenol com um composto de açúcar protegido, em que C-1 foi ativado por halogenação para acoplar com os grupos hidroxila ou carboxila e os grupos hidróxi de açúcar foram bloqueados por grupos de

proteção. Alternativamente, a formação de glicosídeo pode ser realizada enzimaticamente empregando-se uma apropriada glicosiltransferase, tal como galactociltransferase dependente de galactose-UDP e glicotransferase dependente de glicose-UDP. Sacarídeos ligados por C-1 preferidos são furanose ou substituinte de sacarídeo (açúcar) de piranose, que é ligado à estrutura do angelato de ingenol através de C-1 do sacarídeo (numeração convencional) para formar uma ligação acetila. Grupos de sacarídeo exemplificativos incluem açúcares redutores, tais como glicose, ribose, arabinose, xilose, manose e galactoses, cada um sendo ligado a um átomo de oxigênio do composto de ingenol.

Grupos sulfato, sulfonato e fosfato podem ser preparados pelo método conhecido na técnica. Exemplos de R' incluem hidrogênio, C₁-C₆ alquila, fenila e benzila.

Como aqui usado, o termo “alquila” indica alquila ramificada ou cíclica, de cadeira reta ou ramificada, preferivelmente C₁-C₂₀ alquila, p. ex., C₁-C₁₀ ou C₁-C₆. Exemplos de alquila de cadeia reta e ramificada incluem metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, sec-butila, t-butila, n-pentila, 1,2-dimetilpropila, 1,1-dimetil-propila, hexila, 4-metilpentila, 1-metilpentila, 2-metilpentila, 3-metilpentila, 1,1-dimetilbutila, 2,2-dimetilbutila, 3,3-dimetilbutila, 1,2-dimetilbutila, 1,3-dimetilbutila, 1,2,2,-trimetilpropila, 1,1,2-trimetilpropila, heptila, 5-metilexila, 1-metilexila, 2,2-dimetilpentila, 3,3-dimetilpentila, 4,4-dimetilpentila, 1,2-dimetilpentila, 1,3-dimetilpentila, 1,4-dimetil-pentila, 1,2,3-trimetilbutila, 1,1,2-trimetilbutila, 1,1,3-trimetilbutila, octila, 6-metileptila, 1-metileptila, 1,1,3,3-tetrametilbutila, nonila, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- ou 7-metil-octila, 1-, 2-, 3-, 4- ou 5-etileptila, 1-, 2- ou 3-propilexila, decila, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- e 8-metilnonila, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- ou 6-etiloctila, 1-, 2-, 3- ou 4-propileptila, undecila, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- ou 9-metildecila, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- ou 7-etylnonila, 1-, 2-, 3-, 4- ou 5-propiloctila, 1-, 2- ou 3-butileptila, 1-pentilexila, dodecila, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- ou

10-metilundecila, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- ou 8-etildecila, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- ou 6-propilnonila, 1-, 2-, 3- ou 4-butiloctila, 1-2-pentileptila e similares. Exemplos de alquila cíclica (também referidos como “cicloalquila”) incluem grupos alquila mono ou policíclicos, tais como ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, 5 cicloexila, cicloheptila, ciclooctila, ciclononila, ciclodecila e similares. Onde um grupo alquila for referido genericamente como “propila”, “butila” etc., deve ser entendido que isto pode referir-se a qualquer um de isômeros retos, ramificados e cílicos, onde apropriado. Um grupo alquila pode ser opcionalmente substituído por um ou mais substituintes opcionais como aqui 10 definido.

O termo “alquenila”, como aqui usado, indica grupos formados de resíduos de hidrocarbonetos de cadeia reta, ramificada ou cíclica, contendo pelo menos uma dupla ligação de carbono com carbono, incluindo grupos alquila ou cicloalquila etilenicamente mono, di ou poli-insaturados, 15 como anteriormente definido, preferivelmente C₂-C₂₀ alquenila (p. ex., C₂-C₁₀ ou C₂-C₆). Exemplos de alquenila incluem vinila, alila, 1-metilvinila, butenila, iso-butenila, 3-metil-2-butenila, 1-pentenila, ciclopentenila, 1-metil-ciclopentenila, 1-hexenila, 3-hexenila, cicloexenila, 1-heptenila, 3-heptenila, 1-octenila, ciclooctenila, 1-nonenila, 2-nonenila, 3-nonenila, 1-decenila, 3-20 decenila, 1,3-butadienila, 1-4,pentadienila, 1,3-ciclopentadienila, 1,3-hexadienila, 1,4-hexadienila, 1,3-cicloexadienila, 1,4-cicloexadienila, 1,3-cicloheptadienila, 1,3,5-cicloheptatrienila e 1,3,5,7-ciclooctatetraenila. Um grupo alquenila pode ser opcionalmente substituído por um ou mais substituintes opcionais, como aqui definido.

25 Como aqui usado, o termo “alquinila” indica grupos formados de resíduos de hidrocarboneto de cadeia reta, ramificada ou cíclica, contendo pelo menos uma tripla ligação carbono-carbono, incluindo grupos alquila ou cicloalquila etilenicamente mono, di ou poli-insaturados, como anteriormente definido. A menos que o número de átomos de carbono seja especificado, o

termo preferivelmente refere-se a C₂-C₂₀ alquinila (p. ex., C₂-C₁₀ ou C₂-C₆). Exemplos incluem isômeros etinila, 1-propinila, 2-propinila e butinila, e isômeros pentinila. Um grupo alquinila pode ser opcionalmente substituído por um ou mais substituintes opcionais como aqui definido

O termo “arila” indica qualquer um de resíduos únicos, polinucleares, conjugados e fundidos de sistemas de anéis de hidrocarboneto aromático. Exemplos de arila incluem fenila, bifenila, terfenila, quaterfenila, naftila, tetraidronaftila, antracenila, diidroantracenila, benzantracenila, dibenzantracenila, fenantrenila, fluorenila, pirenila, idenila, azulenila, crisenila. Anila preferida inclui fenila e naftila. Um grupo arila pode ser opcionalmente substituído por um ou mais substituintes opcionais como aqui definido.

O termo “acila” indica um grupo C(O)-R, em que R é um resíduo hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, arilalquila ou arila. Exemplos de acila incluem formila, alcanoíla de cadeia reta ou ramificada (p. ex., C₁-C₂₀), tal como acetila, propanoíla, butanoíla, 2-metilpropanoíla, pentanoíla, 2,2-dimetilpropanoíla, hexanoíla, heptanoíla, octanoíla, nonanoíla, decanoíla, undecanoíla, dodecanoíla, tridecanoíla, tetradecanoíla, pentadecanoíla, hexadecanoíla, heptadecanoíla, octadecanoíla, nonadecanoíla e icosanoíla; cicloalquilcarbonila tal como ciclopropilcarbonila ciclobutilcarbonila, ciclopentilcarbonila e cicloexilcarbonila; alquenoíla de cadeia reta ou ramificada (p. ex., C₂-C₂₀) tal como angeloíla; e aroíla tal como benzoíla, tolusoíla e naftoíla. O resíduo R pode ser opcionalmente substituído como descrito aqui.

Um grupo arilalquila é um grupo alquila como definido aqui, substituído por um grupo arila como definido aqui. Em uma forma de realização, o grupo alquila é terminalmente substituído pelo grupo arila. Exemplos de arilalquila incluem fenilC₁-C₂₀alquila, tal como benzila, feniletila, fenilpropila, fenilbutila, fenilpentila e fenilexila. Um ou ambos dos

grupos alquila e arila podem ser opcionalmente substituídos por um ou mais substituintes opcionais como aqui descrito.

Substituintes opcionais para alquila, alquenila, alquinila, arilalquila, arila, e assim acila, incluem: halo (cloro, bromo, iodo e fluoro), hidróxi, C₁-C₆ alcóxi, C₁-C₆alquila, fenila, nitro, halometila (e.g. tribromometila, triclorometila, trifluorometila), halometóxi (e.g. trifluorometóxi, tribromometóxi), C(O)C₁-C₆alquila, amino (NH₂), C₁-C₆alquilamino, (e.g. metilamino, etilamino e propilamino) diC₁-C₆ alquilamino (e.g. dimetilamino, dietilamino e dipropilamino), CO₂H, CO₂C₁-C₆ alquila, tio (SH) e C₁-C₆alquiltio. Um substituinte opcional também inclui a substituição de um grupo CH₂ por um grupo carbonila (C=O) ou pode ser um grupo dióxi metíleno ou etíleno.

Será reconhecido que, durante os processos sintéticos ou semi-sintéticos, para a preparação de compostos de ingenol contemplados pela presente invenção, pode ser necessário ou desejável protegerem-se outros grupos funcionais que possam ser reativos ou sensíveis às condições de reação ou transformação adotadas. Grupos de proteção adequados para tais grupos funcionais são conhecidos na técnica e podem ser usados de acordo com a prática padrão. Como aqui usado, o termo “grupo de proteção” refere-se a uma funcionalidade introduzida, que temporariamente torna um grupo funcional particular ativo. Tais grupos de proteção e métodos para sua instalação e subsequente remoção em um apropriado estágio são bem conhecidos (Greene e Wutz, 1999).

A presente invenção também refere-se a pró-drogas de compostos de ingenol. Qualquer composto que seja uma pró-droga de um composto de ingenol está dentro do escopo e espírito da invenção. O termo “pró-droga” é usado em seu mais amplo sentido e abrange aqueles derivativos que são convertidos *in vivo*, enzimática ou hidroliticamente, nos compostos da invenção. Tais derivativos ocorreriam prontamente para aqueles hábeis na

técnica e incluem, por exemplo, compostos em que um grupo hidróxi livre é convertido em um éster ou anidrido. Procedimentos para acilar os compostos da presente invenção, por exemplo, para preparar pró-drogas de éster, são bem conhecidos na técnica e podem incluir tratamento do composto com um 5 apropriado ácido, anidrido ou cloreto carboxílico, na presença de um catalisador ou base adequado. Outros procedimentos convencionais para a seleção e preparação de pró-drogas adequadas são conhecidas na técnica e são descrito, por exemplo, no WO 00/23419, Design of Prodrugs, Hans Bundgaard, Ed., Elsevier Science Publishers, 1985, e The Organic Chemistry 10 of Drug Design e Drug Action, Capítulo 8, pp 352-401, Academic press, Inc., 1992, cujos conteúdos são incorporados aqui por referência.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis adequados dos compostos incluem mas não são limitados a sais de ácidos inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis, tais como ácido clorídrico, sulfúrico, fosfórico, 15 nítrico, carbônico, bórico, sulfâmico e bromídrico, ou sais dos ácidos orgânicos farmaceuticamente aceitáveis, tais como ácidos acético, propiônico, butírico, tartárico, maleíco, hidroximaléico, fumárico, maléico, cítrico, lático, mágico, glicônico, benzóico, succínico, oxálico, fenilacético, metanossulfônico, toluenossulfônico, benzenossulfônico, salicílico, 20 sulfanílico, aspártico, glutâmico, edético, esteárico, palmítico, oléico, láurico, pantotênico, tânio, ascórbico e valérico. Os sais de base incluem mas não são limitados àqueles formados com cátions farmaceuticamente aceitáveis, tais como sódio, potássio, lítio, cálcio, magnésio, amônio e alquilamônio. Os 25 grupos contendo nitrogênio básico podem ser quaternizados com tais agentes como haleto de alquila inferior, tais como cloretos, brometos e iodetos de metila, etila, propila e butila; dialquil sulfatos como dimetil e dietil sulfato; e outros.

Os compostos da presente invenção podem ser em forma cristalina, como os compostos livres ou como solvatos (por exemplo, de água,

isto é, hidratos, ou de solventes orgânicos comuns, tais como álcoois) e pretende-se que ambas as formas situem-se dentro do escopo da presente invenção. Métodos de solvação são geralmente conhecidos na técnica.

Em uma ou mais formas de realização da invenção, o uso de compostos de ingenol em cura de ferimento pode vantajosamente promover ou melhorar a taxa, grau, extensão ou tempo de uma ou mais das fases de cura. Os compostos de ingenol podem também ser úteis na obtenção de resultados cosméticos melhorados em cura de ferimentos, p. ex., uma redução do nível ou extensão da cicatrização, vermelhidão, marcação da pele ou pigmentação (hiper ou hipo pigmentação), que poderiam de outro modo ser associados com a cura de um ferimento. Em certas formas de realização, os compostos de ingenol podem ser úteis em um sentido profilático, p. ex., como um tratamento anti-ruga.

Os indivíduos que podem ser tratados de acordo com a presente invenção incluem indivíduos mamíferos: humanos, primatas, animais de criação (incluindo vacas, cavalos, carneiros, porcos e cabras), animais de companhia (incluindo cães, gatos, coelhos, porquinhos da índia) e animais selvagens cativos. Animais de laboratório, tais como coelhos, camundongos, ratos, porquinhos da índia e hamsters são também contemplados, visto que eles podem fornecer um conveniente sistema de teste. Espécies não-mamíferas, tais como pássaros, anfíbios e peixe podem também ser contemplados em certas formas de realização da invenção. Um indivíduo pode ser referido aqui como um paciente, animal ou receptor.

Como aqui usado, “modular”, quando usado com referência à produção de citocina, refere-se, quando apropriado, a um aumento ou diminuição na produção da citocina. Em uma forma de realização preferida isto refere-se a uma expressão ou produção de citocina aumentada, supra-regulada ou intensificada. Quando usado com referência a fibroblastos e/ou queratinócitos dérmicos, “modular” refere-se a uma alteração (aumento ou

diminuição, como apropriado) em uma ou mais respostas fenotípicas, tais como viabilidade e proliferação celular, fixação da matriz celular, reorganização ECM, produção MMP, diferenciação de fibroblasto, morfologia celular e migração celular.

5 Uma quantidade eficaz moduladora é uma quantidade quando aplicada ou administrada de acordo com um regime de dosagem desejado, que é suficiente para modular, preferivelmente supra-regular, a produção das citocinas a um nível desejado.

10 Uma quantidade eficaz de melhoria do resultado da cura de ferimento, cosmese ou funcional de um composto de ingenol é uma quantidade que, quando administrada ou aplicada de acordo com o desejado regime de dosagem, é suficiente para iniciar, estimular, intensificar, aumentar, acelerar ou de outro modo promover um ou mais estágios ou processos para cura de ferimento na extensão desejada ou obter o desejado efeito cosmético 15 ou resultado funcional. O tratamento de um ferimento refere-se à realização da iniciação, estimulação, intensificação, aumento, aceleração ou promoção de um ou mais estágios ou processos para curar um ferimento obter o desejado resultado.

20 Quantidades eficazes adequadas (dosagem) e regimes de dosagem podem ser determinadas pelo médico atendente e pode depender do tipo de tecido particular e ferimento sendo tratado, da natureza e severidade do ferimento, isto é, se de espessura parcial ou total, crônico ou agudo, bem como da idade geral e saúde do indivíduo. Os compostos de ingenol podem ser administrados em um tempo julgado apropriado durante o processo de 25 cura do ferimento. Assim, os compostos de ingenol podem ser administrados imediatamente ou logo após o ferimento ter ocorrido e/ou em qualquer estágio subsequente do processo de cura do ferimento, para promover a cura e/ou reduzir a formação de cicatriz e/ou melhorar a cosmese. Os compostos podem também ser administrados aos tecidos de cicatriz existentes, para minimizar

ou reduzir, *inter alia*, a cicatrização, vermelhidão, espessura e/ou hiper ou hipo-pigmentação.

O ingrediente ativo pode ser administrado em uma única dose ou uma série de doses. Embora seja possível que o ingrediente ativo seja administrado sozinho, é preferível apresentá-lo como uma composição, preferivelmente como uma composição farmacêutica, com um ou mais adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis. Assim, a presente invenção também refere-se ao uso de um composto de ingenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou sua pró-droga, na manufatura de um medicamento para modular a produção da citocina, modular a resposta fenotípica dos fibroblastos dérmicos e/ou queratinócitos, promover a cura do ferimento ou reduzir ou minimizar tecido de cicatriz ou melhorar a cosmese ou resultado funcional de um ferimento.

Os medicamentos ou composições de cura de ferimento podem conter o composto de angelato de ingenol em uma quantidade de cerca de 0,0001 % até 100 % em peso. Em formas de realização preferidas, a composição contém o composto de ingenol em uma quantidade de cerca de 0,0001% até cerca de 10% em peso, por exemplo, cerca de 0,0005, 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,125, 0,15, 0,2, 0,25 ou 0,5 % a cerca de 0,5, 1,0, 2,5 ou 5,0 %. Em uma forma de realização da invenção, o composto de ingenol é ingenol-3-angelato presente em uma quantidade de cerca de 0,001 a 1%.

Os compostos de ingenol podem ser administrados em qualquer forma adequada, localmente, p. ex., por aplicação tópica ao ferimento ou por injeção dentro do ferimento ou, sistematicamente, tal como administração oral, parenteral (incluindo subcutânea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), nasal, inalação, retal ou vaginal.

Em uma forma de realização preferida da invenção, os compostos de ingenol são administrados, isto é, aplicados, topicalmente no e

opcionalmente em torno do sítio do ferimento. Os compostos de ingenol podem ser topicalmente aplicados em qualquer forma adequada, incluindo soluções, emulsões (óleo-em-água, água-em-óleo, aerossóis ou espumas), pomadas, pastas, loções, pós, géis, hidrogéis, hidrocolóides e cremes.

5 Veículos ou aditivos adequados incluem óleo mineral, propileno glicol, polioxietíleno, polioxipropileno, cera emulsificante, monoestearato de sorbitano, polissorbato 60, cera de cetil ésteres, cetearil álcool, 2-octildodecanol, ciclodextrina, isopropil álcool, etanol, benzil álcool e água. Alternativamente, os compostos de ingenol podem ser apresentados na forma

10 de um curativo oclusivo ativo, isto é, em que o composto de ingenol é impregnado ou revestido em um curativo, tal como bandagens, gazes, fitas, redes, emplastro adesivo, películas, membranas ou emplastros.

Em uma forma de realização da invenção, o composto de ingenol é topicalmente aplicado na forma de um gel baseado em isopropil álcool.

A formulação das composições e curativos contemplados aqui é bem conhecida daqueles hábeis na técnica, vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição, Mack Publishing, 1990. As composições podem conter quaisquer veículos, diluentes ou excipientes adequados. Estes incluem todos os solventes convencionais, meios de dispersão, cargas, veículos sólidos, revestimentos, agentes antifúngicos e antibacterianos, agentes de penetração dérmica, tensoativos, agentes isotônicos e de absorção e similares. O veículo para as composições contempladas pela presente invenção deve ser farmaceuticamente aceitável no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da composição e não prejudiciais ao indivíduo. As composições podem convenientemente ser apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. Tais métodos incluem a etapa de trazer em associação o ingrediente ativo com o veículo que

constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as composições são preparadas trazendo-se em associação uniforme e intimamente o ingrediente ativo com os veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos e então, se necessário, conformando-se o produto.

5 Deve ser entendido que a invenção pode também ser praticada em conjunto com o uso de outros agentes biológica ou fisiologicamente ativos suplementares. Assim, os métodos e composições aqui descritos podem ser usados em conjunto com outros agentes biológica ou fisiologicamente ativos, talis como agentes antivirais, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, 10 vitaminas, talis como A, C, D e E e seus ésteres e/ou agentes de cura de ferimento adicionais, incluindo fatores de crescimento e citocinas, talis como aquelas descritas aqui. Estes agentes adicionais podem ser formulados em uma composição ou curativo junto como composto de ingenol ou administrados separadamente.

15 Os compostos de ingenol podem também estar presentes como implantes que compreendem um composto biocompatível, polimérico, revestido, impregnado ou de outro modo contendo o ingenol.

Os compostos de ingenol podem ser administrados em uma forma de liberação sustentada (isto é, controlada) ou lenta. Uma preparação 20 de liberação sustentada é uma em que o ingrediente ativo é lentamente liberado dentro do corpo do indivíduo uma vez administrado e mantém a desejada concentração de medicamento durante um período de tempo mínimo. A preparação das formulações de liberação sustentada é bem entendida pelas pessoas hábeis na técnica.

25 As composições da presente invenção, adequadas para administração oral, podem ser apresentadas como unidades distintas, talis como cápsulas, sachês ou tabletes, cada uma contendo uma quantidade predeterminada do ingrediente ativo; como um pó ou grânulos; como uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou não-aquoso (p. ex.,

colutório); gel, pomada ou como uma emulsão líquida de óleo-em-água ou uma emulsão líquida de água em óleo.

Um tablete pode ser produzido por compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Os tabletes comprimidos podem ser preparados por compressão em uma máquina adequada do ingrediente ativo em uma forma de fluxo livre, tal como um pó ou grânulos, opcionalmente misturados com um aglutinante (p. ex., diluente inerte), conservativo, desintegrante (p. ex., glicolado de amido sódico, polivinil pirrolidona reticulada, carboximetil celulose sódica reticulada), tensoativo ou agente dispersante. Os tabletes moldados podem ser produzidos por moldagem em uma máquina adequada de uma mistura do composto em pó umedecido com um diluente líquido inerte. Os tabletes podem opcionalmente ser revestidos ou entalhados e podem ser formulados a fim de prover liberação lenta ou controlada do ingrediente ativo deles, empregando-se, por exemplo, hidroxipropil metilcelulose em proporções variáveis, para fornecer o desejado perfil de liberação. Os tabletes podem opcionalmente ser providos com um revestimento entérico, para fornecer liberação em partes do intestino exceto o estômago.

As composições para administração retal podem ser apresentadas como um supositório com uma base adequada, compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau, glicerina, gelatina ou polietileno glicol.

As composições adequadas para administração vaginal podem ser apresentadas como pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações de spray contendo, além do ingrediente ativo, tais veículos que são sabidos na técnica serem apropriados.

As composições adequadas para administração parenteral incluem soluções de injeção estéreis, aquosas e não-aquosas, isotônicas, que podem conter anti-oxidantes, tampões, bactericidas e solutos, que tornam a composição isotônica com o sangue do receptor pretendido; e suspensões

aquosas e não aquosas estéreis, que podem incluir agentes de suspensão e agentes de espessamento. As composições podem ser apresentadas em recipientes selados de dose unitária ou multi-doses, por exemplo, ampolas e frascos, e podem ser armazenadas em uma condição secada por congelamento 5 (lioofilizada), requerendo somente a adição do veículo líquido estéril, por exemplo, água para injeções, imediatamente antes do uso. Soluções e suspensões de injeção extemporâneas podem ser preparadas de pós, grânulos e tabletas estéreis da espécie anteriormente descrita.

Composições de dosagem unitária preferidas são aquelas 10 contendo uma dose ou unidade diária, sub-dose diária, como aqui acima descrito, ou uma sua fração apropriada, do ingrediente ativo.

Deve ser entendido que, além dos ingredientes ativos particularmente mencionados acima, as composições desta invenção podem incluir outros agentes convencionais na técnica com respeito ao tipo de 15 composição em questão, por exemplo, aglutinantes, adoçantes, espessantes, agentes aromatizantes, agentes desintegrantes, agentes de revestimento, conservativos, lubrificantes, tampões, anti-oxidantes e/ou agente de retardo de tempo.

Os compostos da invenção podem também ser apresentados 20 para uso em composições veterinárias. Estes podem ser preparados por qualquer meio adequado conhecido na técnica. Exemplos de tais composições incluem aquelas adaptadas para:

- (a) administração oral, aplicação externa (p. ex., porções, incluindo soluções ou suspensões aquosas e não aquosas), tabletas, bolos, pós, grânulos, pelotas para mistura com forragens, pastas para aplicação 25 na língua;
- (b) administração parenteral, p. ex., injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa, como uma solução ou suspensão estéril;
- (c) aplicação tópica, p. ex., cremes, pomadas, géis, loções etc., como

descrito acima.

A invenção será agora descrita com referência aos seguintes Exemplos, que são fornecidos para fins de ilustrar certas formas de realização da invenção e não são destinados a limitar a generalidade aqui antes descrita.

5 EXEMPLOS

EXEMPLO 1: EFEITO DE PEP005 NA PRODUÇÃO DE CITOCINA

Exemplo 1.1

Produção de citocina por células humanas tratadas com PEP005

Culturas confluentes de células Me10538, queratinócitos, fibroblastos e neutrófilos foram incubadas por 6 h na ausência ou presença de PEP005 (1 – 100 ng/ml). Os sobrenadantes foram colhidos e analisados quanto à presença das seguintes citocinas; TNF- α , IL-6 e IL-8, empregando-se um kit de detecção multiplex (Biosource International, Nivelles, Bélgica). Os resultados são representados na tabela 1. As unidades de proteínas detectadas são pg/ml.

10

15

Tabela 1.1 Indução de citocinas pró-inflamatórias em células humanas *in vitro*. As células foram incubadas com a concentração indicada de PEP005 por 6 h e os sobrenadantes analisados quanto às citocinas indicadas (ND – não detectável. nt – não testado). Unidades de proteínas detectadas são pg/ml.

PEP005 ng/ml	Queratinocitos			Fibroblastos			Melanoma			Neutrofílos		
	IL-8	TNF α	IL-6	IL-8	TNF α	IL-6	IL-8	TNF α	IL-6	IL-8	TNF α	IL-6
0	995+48	8±1	ND	20±1	ND	76±6	4±0,3	ND	ND	644+271	ND	ND
1	3910±148	510+26	ND	79±3	ND	81+4	<2	ND	ND	7089+1293	ND	ND
5	4775+178	847±37	ND	160+14	ND	85±4	210+6	ND	ND	nt	ND	ND
10	3895+198	498+29	ND	215+12	ND	141±6	737+26	ND	ND	2241±684	ND	ND
100	2950+108	335+21	ND	239+9	ND	205±5	390+18	ND	ND	617+52	ND	ND

Exemplo 1.2

Um gel de isopropil álcool, contendo 0,05% de PEP005 ou um gel placebo foi topicalmente aplicado em pacientes com lesões de ceratose actínica. Antes de e três meses após aplicação do gel (ativo ou placebo) a 5 textura da pele dos pacientes foi clinicamente avaliada. Três meses após a aplicação do gel (ativo ou placebo) as marcações da pele dos pacientes, hiperpigmentação da pele e hipopigmentação da pele foram clinicamente 10 avaliadas. Os resultados são apresentados nas Tabelas 1.2 e 13, que indicam o número ou percentagem de pacientes que apresentaram melhoria, piora ou nenhuma mudança na textura da pele ou presença ou ausência de marcação, 15 hiperpigmentação ou hipopigmentação da pele. Os dados indicaram que a aplicação de 0,05 % de gel de PEP005 (em comparação com placebo) melhorou a textura da pele. Os dados também indicaram que a aplicação de 0,05% de gel PEP005 (em comparação com placebo) reduziu o número de pacientes com marcações na pele, três meses após aplicação do medicamento. Além disso, os dados indicaram que a aplicação de 0,05% de gel PEP005 (em comparação com placebo) não resultou em hiper ou hipo-pigmentação da pele, três meses após a aplicação do medicamento.

Tabela 1.2. Cura de ferimento e efeito cosmético de 0,05 % de Gel Tópico PEP005 em um experimento clínico de Fase IIa em ceratose actínica (números de pacientes).

		Textura da pele		Marcação da pele		Formação de Cicatriz		Hipopigmentação		Hiperpigmentação	
		Melhorado	Piorado	Nenhuma	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Gel placebo		5	0	7	1	11	12	0	12	0	0
0,05% Gel Tópico PEP005		10	0	5	6	9	15	0	13	0	15

Tabela 1.3. Cura de ferimento e efeito cosmético de 0,05% Gel Tópico PEP005 em um experimento clínico de Fase IIa em ceratose actínica (percentagem de pacientes)

		Textura da pele		Marcação da pele		Formação de Cicatriz		Hipopigmentação		Hiperpigmentação	
		Melhorado	Piorado	Nenhuma	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
Gel placebo		41,7%	0,0%	58,3%	8,3%	91,7%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
0,05% Gel Tópico PEP005		66,7%	0,0%	33,3%	40,0%	60,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%

Exemplo 1.3**Material e Métodos****Compostos**

PEP005 foi provido como um pó seco. Uma solução estoque
5 de 23,55 mM foi preparada em DMSO e alíquotas foram armazenadas a -20 °C. Uma alíquota da solução estoque foi descongelada no dia de uso e armazenada em temperatura ambiente antes da e durante a dosagem. As etapas de diluição intermediárias foram realizadas utilizando-se meio de cultura de células DMDM.

10 Isolamento de PBMC

Para o isolamento de PBMC, foi usado sangue humano recentemente retirado, tratado com Li-Heparina como um anti-coagulante. As células foram diluídas com três volumes de Tampão PBS/EDTA CliniMACS (Miltenyi, Bergisch Gladbach), cuidadosamente revestido sobre FicollPaque (Amersham Biosciences, Freiburg) em um tubo cônicoo e centrifugadas a 400 xg por 40 minutos a 20 °C em um rotor de cesta oscilante sem freio. A camada superior foi aspirada, deixando a camada celular mononuclear não perturbada na interfase. As células de interfase (linfócitos, monócitos e trombócitos) foram cuidadosamente transferidas para dentro de um novo tubo cônicoo. O tubo cônicoo 15 foi enchido com Tampão CliniMACS PBS/EDTA e centrifugado a 300 xg por 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi completamente removido. Para remoção de plaquetas, a pelota de célula foi ressuspensa em 50 ml de Tampão e centrifugada a 200 xg por 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi completamente removido e a 20 última etapa de lavagem foi repetida. As células foram ressuspensas em meio DMEM (Invitrogen, Karlsruhe) e contadas em um hemocitômetro-Nebauer.

Estimulação de PBMC

Para a estimulação de PBMC 250.000 células por poço foram semeadas em uma placa de 96-poços. As PBMC de três diferentes doadores saudáveis foram estimuladas com PEP005 em três diferentes concentrações

(1, 10 e 100 nM) ou LPS 1 µg/ml (Linares, Wertheim-Bettingen), PMA 10 ng/ml (Signa, Deisenhofen) e Ionomicina 1 µg/ml (Signa, Deisenhofen), respectivamente. As células foram incubadas a 37 °C e 5% CO² em uma atmosfera umidificada por 24 h.

5 Ensaios de Suspensão de Contas

Em um típico Ensaio de Suspensão de Contas, uma citocina é capturada de um sobrenadante com anticorpos ligados por conta. A citocina é quantificada com um anticorpo secundário para completar um imunoensaio sanduíche. As concentrações de citocina são calculadas com o auxílio de uma curva padrão para cada citocina.

As citocinas IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF-α foram quantitativamente medidas no sobrenadante das PBMC com um BioRad BioPlex System, de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram medidas em duplicata. Todas as unidades de proteínas detectadas são pg/ml.

Verificação da Viabilidade das PBMC

Após remoção do sobrenadante contendo citocina as PBMC foram testadas quanto a viabilidade por citometria de fluxo. Solução de Tingimento de Iodeto de Propídio (0,1 µg/teste de 1 x 10⁶ células) foi usada para determinar a quantidade de células mortas. As PBMC não estimuladas foram usadas para um controle negativo.

Resultados

Produção de Citocina

Para investigar os efeitos da imunoestimulação de PEP005, PBMCs de três diferentes doadores saudáveis foram expostos por 24 h a PEP005, em concentrações de 1, 10 e 100 nM. A secreção de IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF-α para dentro do sobrenadante foi quantitativamente medida por citometria de fluxo com os Ensaios de Suspensão de Contas. Os resultados são representados nas Tabelas 1.4 – 1.8.

Tabela 1.4. Produção IL-1 β de PBMCs de doadores GK, AW e HL, após incubação com PEP005 por 24 h, em concentrações de 1, 10 e 100 nM. As unidades de IL-1 β detectada são pg/ml.

	Controle veículo	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
Doador: GK	0	94,49	61,62	0
Doador: AW	0	314,73	173,33	10,92
Doador: HL	0	125,17	98,04	11,76

Tabela 1.5. Produção de IL-2 das PBMCs de doadores GK, AW e HL, após incubação com PEP005B por 24 h em concentrações de 1, 10 e 100 nM. As unidades de IL-2 detectada são em pg/ml.

	Controle veículo	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
Doador: GK	0	82,68	60,3	10,56
Doador: AW	0	54,61	31,53	2
Doador: HL	0	17,86	19,47	12,84

Um aumento dos níveis de IL-2 de aproximadamente 20 a 80 vezes (média aproximadamente 50-vezes) no sobrenadante de PBMCs dos três doadores foi observado a 1 nM PEP005.

Tabela 1.6. Produção de IL-6 por PBMCs de doadores GK, AW e HL, após incubação com PEP005B por 24 h, nas concentrações de 1, 10 e 100 nM. As unidades de IL-6 detectado são pg/ml.

	Controle veículo	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
Doador: GK	68,69	320,61	216,09	0
Doador: AW	30,71	131,46	61,66	0
Doador: HL	11,88	69,48	73,97	95,43

PEP005 a 1 nM causou um aumento de níveis de IL-6 de aproximadamente 4 a 6 vezes nos sobrenadantes de PBMC (níveis de IL-6 quase 9-vezes elevados em sobrenadante de PBMC)

Tabela 1.7. Produção de IL-8 por PBMCs de doadores GK, AW e HL, após incubação com PEP005 por 24 h em concentrações de 1, 10 e 100 nM. As unidades de IL-8 detectadas são pg/ml.

	Controle veículo	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
Doador: GK	4834,48	13652,6	9418,94	52,77
Doador: AW	7642,56	28029,68	11438,34	205,36
Doador: HL	2535,39	12148,42	18220,74	217,52

Tabela 1.8. Produção de TNF- α por PBMCs de doadores GK, AW e HL, após incubação com PEP005 por 24 h em concentrações de 1, 10 e 100 nM.

	Controle veículo	PEP005 (1 nM)	PEP005 (10 nM)	PEP005 (100 nM)
Doador: GK	0	148,42	76,14	19,44
Doador: AW	0	130,99	73,48	12,93
Doador: HL	0	90,72	71,6	35,75

Altos níveis de citocina TNF- α foram detectados nos sobrenadantes de PBMCs de todos três doadores, em seguida à incubação com PEP005. Os níveis de TNF- α variaram de aproximadamente 120 nM (estimulação com PEP005 a 1 nM) a 70 nM (PEP005 a 10 nM) a 20 nM (PEP005 a 100 nm). Níveis não significativos de TNF- α foram detectados no sobrenadante das PBMCs expostas somente ao veículo.

EXEMPLO 2: EFEITO DE PEP005 SOBRE A MODULAÇÃO DO FENÓTIPO E RESPOSTAS DE CURA DE FERIMENTO DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS DÉRMICOS

Materiais e Métodos

Cultura de Células de Fibroblasto Dérmico

Uma biópsia de pele de adulto normal (6 mm) foi obtida ($n = 15$ 1), com consentimento informado, de um indivíduo a serviço da Oral Surgery Clinic, School of Dentistry, Wales College of Medicine, Cardiff. Em seguida à aplicação de um anestésico local, a biópsia dérmica foi coletada e culturas de fibroblasto dérmico de adulto estabelecidas pela técnica de suspensão de célula única, em seguida à degradação enzímica do espécime. Esta técnica foi anteriormente usada confiavelmente para estabelecer culturas primárias viáveis de fibroblastos tanto orais como dérmicos *in vitro* (Cook et al., 2000; Stephens et al., 2001; 2003). Os fibroblastos dérmicos foram cultivados em Meio Contendo Soro-Fibroblasto, contendo Meio de Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM), suplementado com L-glutamina (2 mM), antibióticos (100 U/ml penicilina G sódio, 100 mg/ml sulfato de estreptomicina e 0,25 μ g/ml de anfotericina B) e 10% de soro de bezerro fetal (todos comprados da 20 25

Invitrogen Ltd., Paisley, U.K.). As culturas de fibroblasto dérmico foram mantidas a 37 °C, em uma atmosfera de 5% CO₂/95% ar, com o meio de cultura sendo trocado cada 2 – 3 dias. Os fibroblastos dérmicos foram usados entre a passagem 7 – 17, para todos os experimentos.

5 **Cultura de Células de Queratinócitos**

Queratinócitos humanos, adultos, epidérmicos, foram comprados crioconservados da Cascade Biologics Inc., Nottinghamshire, U.K. Estas células (≥ 500.000 células viáveis/frasco) foram testadas para serem $> 70\%$ viáveis, com a capacidade de proliferar por pelo menos 16 duplicatas de população. Os queratinócitos epidérmicos foram cultivados em EpiLife® Medium, livre de soro (Cascade Biologics Inc.), suplementados com antibióticos (100 U/ml penicilina G sódio, 100 mg/ml sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B) e EpiLife® Defined Growth Supplement (EDGS, consistindo de albumina de soro bovino purificada, transferrina bovina purificada, hidrocortisona, fator de crescimento semelhante à insulina humana recombinante tipo 1, prostaglandina E2 e fator de crescimento epidérmico humano recombinante, Cascade Biologics Inc.). As culturas de queratinócitos epidérmicos foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera de 5% CO₂/95% de ar, com o meio de cultura sendo trocado a cada 2 – 3 dias. Queratinócitos epidérmicos foram usados entre 4 – 6 passagens, para todos os experimentos.

Preparação de PEP005

PEP005 foi suprido por Peplin Limited, Brisbane, Austrália, em bateladas de 20 mg e armazenado a 4 °C. Quando necessário, o PEP005 foi solubilizado em dimetil sulfóxido (DMSO, > 99,9%, Sigma Chemical Co., Dorset, U.K.), em uma concentração de 10 mg/ml. A solução foi misturada pro 5 min ou até a solução ficar transparente e a solução estoque de PEP005/DMSO armazenada a 4 °C, onde estável por diversos meses.

Antes do uso, a solução estoque de PEP005/DMSO foi

removida da armazenagem de 4 °C e aquecida à temperatura ambiente. Os volumes requeridos de PEP005/DMSO foram aliquotados dentro de um vaso de poli-propileno e PEP005/DMSO diluído na concentração necessária (tipicamente 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml e 100 µg/ml) em Meio Contendo Soro-Fibroblasto (para culturas de fibroblasto dérmico) ou EpiLife® Medium livre de soro (para culturas de queratinócitos epidérmicos), com soluções frescas de PEP005/meio de cultura sendo preparadas diariamente, nas várias concentrações acima, devido à estabilidade da solução. Antes de descartar soluções de PEP005/meio de cultura, pelo menos dois volumes de 0,1% de hidróxido de sódio (Sigma Chemical Co.) em 95% de etanol/5% metanol (ambos da Fisher Scientific, Leicestershire, U.K.), foram adicionados a cada solução, para descontaminar.

Avaliação da Viabilidade e Proliferação de Fibroblastos / Queratinócitos Dérmicos

O ensaio de redução de corante MTT brometo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio foi empregado para a avaliação da viabilidade e proliferação celular de fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico, de acordo com Cook et al. (2000). Em seguida a tripzinização, fibroblasto dérmico ou queratinócito epidérmico foram semeados em placas de microtípulo de 96-poços (VWR International Ltda., leicestershire, U.K.) em uma densidade de célula de $2,5 \times 10^3$ célula/poço e 5×10^3 célula / poço, respectivamente. Em seguida à semeação celular por 24 h e 48 h, respectivamente, o meio de cultura de fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico foi substituído por meio de cultura (100 µl/poço), contendo 0, 0,1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml ou 100 µg/ml de PEP005 (seis poços de cultura por concentração de PEP005). As culturas de fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico foram mantidas a 37 °C, em uma atmosfera de 5% CO₂/95% AR, POR 7 e 3 dias respectivamente, com os respectivos meios de cultura contendo PEP005 sendo trocados cada dois dias. Vários controles

(seis poços de cultura por controle) foram também estabelecidos nas placas de microtítulo de 96-poços em cada ponto do tempo, incluindo (i) meio de cultura de fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico somente (livre de células), (ii) fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico em meio de cultura, contendo 1% DMSO, (iii) fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico em meio de cultura, contendo 0,1% DMSO, (iv) fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico em meio de cultura, contendo 0,01 % de DMSO e (v) fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico em meio de cultura, contendo 0,001% de DMSO.

Nos dias 1, 3, 5 e 7, MTT estéril (25 µl de uma solução de 5 mg/ml MTT em PBS, Sigma Chemical Co.) foi adicionado ao meio de cultura correspondente de cada poço e as placas de microtítulo de 96-poços mantidas a 37 °C, em uma atmosfera de 5% CO₂/95% de ar, por 4 h. Tampão de extração (100 µl), consistindo de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma Chemical Co.) em 0,5 M N,N-dimetilformamida (Sigma Chemical Co.), foi adicionado a cada poço e as placas de microtítulo de 96 poços mantidas a 37 °C, em uma atmosfera de 5% CO₂/95% de ar, por 4 horas. Os valores de absorvência de cada poço foram lidos espectrofotometricamente, usando-se um Bio-Tek Instruments Microplate Autoreader EL311 (Fisher Scientific) a 540 nm. Cada experimento foi realizado em três ocasiões separadas.

Avaliação da Fixação do Fibroblasto Dérmico / Matriz Extracelular de queratinócito

A fixação celular do fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico no colágeno tipo I e na fibronectina foi realizada de acordo com Cook *et al* (2000) e Stephens *et al* (2004). Os poços de placas de microtítulo de 96-poços foram incubados a 4 °C durante a noite com 40 µg/ml de colágeno tipo I de tendão da cauda de rato (Sigma Chemical Co.) ou 40 µg/ml de fibronectina de plasma (Sigma Chemical Co.). A ligação não-específica foi

bloqueada por incubação com 1 % de albumina de soro bovino (Sigma Chemical Co.), a 4 °C por 4 h. Em seguida à tripsinização, as suspensões de células (100 µl) do fibroblasto dérmico ou queratinócito epidérmico em meio de cultura livre de soro, contendo 0, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml ou 100 µg/ml PEP005 (seis poços de cultura por concentração de PEP005), foram ambas semeadas dentro de poços de placa de microtípulo de 96-poços, em uma densidade celular de $2,5 \times 10^4$ célula/poço. As placas de microtípulo de 96-poços foram mantidas a 37 °C, em uma atmosfera 5 % CO₂/95 % ar, por 1 h ou 3 h, seguido pela remoção de células não-adherentes por aspiração.

Os restantes queratinócitos epidérmicos ou fibroblastos dérmicos aderentes foram lavados (x2) com PBS (100 µl), fixados em 70 % etanol (100 µl, Fisher Scientific) por 15 min e tingidos com 0,1 % de solução violeta cristal (Sigma Chemical Co.), por 25 min. O excesso de violeta cristal foi removido por lavagem (5x) em água duplamente destilada, com a mancha restante sendo solubilizada em solução 0,2 % Triton X-100 (25 µl, Sigma Chemical Co.). Vários controles (seis poços de cultura por controle) foram também estabelecidos nas placas de microtípulo de 96-poços em cada ponto do tempo, incluindo (i) meio de cultura de fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico apenas (livre de célula), na presença de colágeno tipo I ou fibronectina, (ii) meio de cultura de fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico apenas (livre de célula), na presença de albumina de soro bovino, (iii) meio de cultura de fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico apenas (livre de célula), na presença de colágeno tipo I / albumina de soro bovino ou fibronectina / albumina de soro bovino, (iv) fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico em meio de cultura, na presença de albumina do soro bovino, (v) fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico em meio de cultura, contendo 1 % DMSO, na presença e ausência de colágeno tipo I ou fibronectina, e (vi) fibroblasto dérmico e queratinócito epidérmico em meio de cultura, contendo 0,1 % DMSO, na presença e ausência de colágeno tipo I

ou fibronectina. Os valores de absorvência de cada poço foram lidos espectrofotometricamente, usando-se um Bio-Tek Instruments Microplate Autoreader EL311, a 540 nm. Cada experimento foi realizado em três ocasiões separadas, com os valores de absorvência sendo obtidos expressos em uma média para cada grupo de amostras.

Avaliação da Reorganização de Matriz Extracelular do Fibroblasto Dérmico e Produção da Matriz de Metaloproteinase

A capacidade dos fibroblastos dérmicos de remodelar/reorganizar seu meio-ambiente ECM, na presença de PEP005 foi analisada por treliças de colágeno povoadas de fibroblastos (FPCLs), de acordo com Cook *et al* (2000). Em seguida à tripsinização, fibroblastos dérmicos foram suspensos em Meio contendo Soro-Fibroblasto, contendo 10 % soro de bezerro fetal livre de gelatina (preparado usando-se uma coluna de Sefarose de gelatina-A, GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, U.K.), para remover a atividade MMP-2 e MMP-9 endógena. Os fibroblastos dérmicos (5×10^5 células/750 µl de Meio contendo Soro-Fibroblasto livre de gelatinase) foram adicionados a pratos de cultura de grau bacteriológico de 53 mm (VWR International Ltd.), contendo 3 ml 2x DMEM, soro de bezerro fetal livre de gelatinase (750 µl), hidróxido de sódio 0,1 M (750 µl), 1,7 mg/ml de colágeno do tipo I do tendão da cauda de rato (225 0µl, preparado de acordo com Rowling *et al*, 1990) e PEP005 (0, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml ou 100 µg/ml PEP005), em um volume total de 7,5 ml (3 FPCLs por concentração de PEP005). Vários controles (três FPCLs por controle) também foram estabelecidos, incluindo (i) Meio contendo apenas soro de fibroblasto (livre de célula), e (ii) Meio contendo Soro de Fibroblasto em células, contendo 1 % DMSO. As FPCLs foram mantidas a 37 °C, em uma atmosfera 5 % CO₂/95 % ar, por 1 h, para ocorrer polimerização de colágeno e a FPCLs separadas das bordas da placa e re-suspensas em 2 ml de PEP005 livre, Meio contendo Soro-Fibroblasto, contendo 10 % de soro de bezerro fetal livre de

gelatinase. As FPCLs foram mantidas a 37 °C, em uma atmosfera 5 % CO₂/95 % ar, por 14 dias, com o meio de cultura sendo mudado todo dia. O grau de reorganização ECM/contração de treliça, foi quantificado por três medições de diâmetro de treliça separados, realizados em cada uma das três amostras replicadas nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 e 14, após a fabricação inicial. O meio condicionado FPCL circundando as treliças também foi coletado de cada FPCL individual, na presença de 0, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml ou 100 µg/ml PEP005, para análise de produção e atividade de MMP nestes pontos do tempo.

Para determinar as quantidades relativas das espécies de MMP pro- e ativas produzidas pelas células nos sistemas FPCL, foi empregada zimografia de gelatina, de acordo com Cook *et al* (2000). Volumes iguais (15 µl) de meio condicionado de FPCL foram submetidos a eletroforese de gel de dodecil sulfato-poliacrilamida de sódio (SDS-PAGE), em géis de zimografia 10 % de gelatina pré-moldadas (Ready Gel 10 % Gelatin Zymogram Gels, Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire, U. K.), incorporadas dentro de um Mini-Protean 3 Gel Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories Ltd.), a 15 mA por 4-5 h. SDS foi removido dos géis encharcando-se em solução 2,5 % Triton X-100 (Sigma Chemical Co.), à temperatura ambiente, por 1 h. MMPs 15 foram ativados incubando-se em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, contendo 5 mM cloreto de cálcio (Sigma Chemical Co.), 25 mM cloreto de sódio (Fisher Scientific) e 5 % Brij 35 (Sigma Chemical Co.), a 37 °C, durante a noite. Os géis foram tingidos com Coomassie Blue (0,05 % Coomassie Blue, Sigma Chemical Co., em 12 % ácido acético e 54 % metanol, ambos Fisher Scientific), destingido em 7,5 % ácido acético e 5 % metanol e as imagens de gel capturadas, empregando-se um Densitômetro de imagem GS-690 e Software de Análise de Imagem (Bio-Rad Laboratories Ltd.). A identificação de MMP foi confirmada pela aparência das bandas transparentes de pesos moleculares comparáveis a um padrão de MMP-2 (Cook *et al*, 2000).

Cada experimento foi realizado em duas ocasiões separadas, com as reduções % na contração da treliça e os valores densitométricos de MMP obtidos sendo expressos como uma média para cada grupo de amostras.

Avaliação da Diferenciação de Fibroblasto Dérmico

Os efeitos de PEP005 na diferenciação de fibroblasto dérmico para miofibroblastos foram examinados pela extensão da expressão da actina num músculo α -liso pelos fibroblastos dérmicos diferenciados, seguido-se estimulação com TGF- β . Em seguida a tripsinização, os fibroblastos dérmicos foram suspensos em Meio contendo Soro-Fibroblasto, contendo 10 % soro de bezerro fetal, em uma densidade celular de $2,5 \times 10^4$. Aliquotas (250 μ l/poço) de suspensão celular de fibroblasto dérmico foram semeadas dentro das lâminas da câmera de 8-poços (VWR International Ltd.) e mantidas a 37 °C, em uma atmosfera 5 % CO₂/95 % ar, até aproximadamente 30-40 % confluente. Neste estágio, o Meio contendo Soro-Fibroblasto foi substituído por meio de cultura (250 μ l/poço), contendo 10 ng/ml TGF- β 1 e 0, 0,01 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml ou 100 μ g/ml PEP005 (três poços de lâmina de câmera por concentração de PEP005). Vários controles (três lâminas de câmera por controle) também foram estabelecidos, incluindo (i) Meio contendo Soro-Fibroblasto apenas, (ii) Meio contendo Soro-Fibroblasto em células (1º controle Ab citoqueratina ou vimentina), (iii) Meio contendo Soro-Fibroblasto em células, contendo 10 ng/ml TGF- β e 1 % DMSO, e (iv) Meio contendo Soro-Fibroblasto em células, contendo 1 % DMSO.

As lâminas de câmera foram mantidas a 37 °C, em uma atmosfera 5 % CO₂/95 % ar, por 3 dias, em cujo tempo as células alcançaram aproximadamente 75 % de confluência. As lâminas da câmera foram fixadas em gelo frio, acetona:metanol 1:1 (300 μ l/poço) por 20 min e bloqueadas em 1% BSA em PBS, a 4 °C, por 1 h. As lâminas da câmera foram lavadas (2x) em 0,1 % BSA em PBS, e incubadas com um dos seguintes (i) anticorpo primário de actina do músculo α -liso anti-humano de camundongo

monoclonal (1:30 em tampão de lavagem, 250 µl/poço, Sigma Chemical Co.), (ii) anticorpo primário IgG1 de citoqueratina anti-humano de camundongo monoclonal (1:30 em tampão de lavagem, 250 µl/poço, DakoCytomation Ltd., U.K.), ou (iii) anticorpo primário IgG1 de vimentina anti-humano de camundongo monoclonal (1:30 em tampão de lavagem, 250 µl/poço, DakoCytomation Ltd., Cambridgeshire U.K.). As lâminas de câmara foram incubadas em anticorpo primário à temperatura ambiente, por 2 horas, lavadas (3x) em 0,1 % BSA em PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado FITC, de IgG anti-camundongo de coelho policlonal (1:50 em tampão de lavagem, 250 µl/poço, DakoCytomation Ltd.), em temperatura ambiente, por 1 h, evitando luz. As lâminas de câmara foram lavadas (3x) em 0,1 % BSA em PBS, e as câmaras removidas para montagem de lâmina com Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories Ltd., Cambridgeshire, U.K.) e observadas por microscópio fluorescente (Leica Leitz Dialux 20EB fluorescent microscope, Leica Microsystems U.K. Ltd., Buckinghamshire, U.K.), com imagem digital sendo capturada em uma magnificação de 250x. Cada experimento foi realizado em duas ocasiões separadas.

Resultados

Avaliação da Viabilidade e Proliferação das células de Fibroblasto/ Queratinócito Dérmico

Os valores médios obtidos para incapacidade/proliferação da célula de fibroblasto dérmica demonstrou que PEP005 tem um efeito citotóxico sobre queratinócitos de fibroblastos dérmicos em concentrações de 100 µg/ml, comparado aos controles de fibroblasto não tratados.

Entretanto, em concentrações de 10 µg/ml, PEP005 pareceu ter um efeito estimulatório nos dias 1, 3 e 5. Adicionalmente, no dia 7, concentrações de 0,01 µg/ml e 0,1 µg/ml pareceram estimular a viabilidade/proliferação celular.

Avaliação da Fixação do Fibroblasto Dérmico / Matriz Extracelular de

queratinócito

A fixação de queratinócito epidérmico de colágeno do tipo I e fibronectina de plasma demonstrou que PEP005 exibia uma significante estimulação dose-dependente de fixação celular a colágeno do tipo I, em concentrações de 0,01-10 µg/ml. Uma tendência similar em direção a uma possível estimulação de fixação de queratinócito epidérmico à fibronectina de plasma também foi evidente em 1-10 µg/ml.

Avaliação da Reorganização de Matriz Extracelular do Fibroblasto Dérmico e Produção da Matriz Metaloproteinase

A contração de treliça de colágeno tipo I foi显著mente aumentada a 0,1 µg/ml PEP005. Os níveis de MMP-2 pró e ativos foram observados aumentar em concentrações de PEP005 de 0,01-0,1 µg/ml.

Avaliação da Diferenciação de Fibroblasto Dérmico

Os fibroblastos dérmicos, na ausência de TGF-β1, porém na presença de 1 µg/ml e 10 µg/ml PEP005, apresentaram microfilamentos de actina do músculo α-liso detectável.

EXEMPLO 3: AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE PEP005 NOS PARÂMETROS DE CURA DE FERIMENTO

Métodos e Materiais

20 Preparação de PEP005

PEP005 foi fornecido por Peplin Limited, Brisbane, Austrália, como preparações 0,01 % (100 µg/ml), 0,028 % (280 µg/ml) e 0,05 % (500 µg/ml) em um gel baseado em DMSO/isopropanol. Gel de veículo baseado em DMSO/isopropanol PEP005-livre também foi fornecido para servir como um controle de veículo. O PEP005 e géis de veículo foram estocados a 4 °C, onde estavam disponíveis por diversos meses.

Modelo de Cura de Ferimento de Incisão de Rato

A fim de examinar os efeitos de PEP005 no reparo dos ferimentos incisionais (cirúrgicos) agudos, envolvendo mínima geração de

tecido novo, o modelo de cura de ferimento incisional de espessura total de rato foi empregado.

Economia Animal

Ratos adultos machos Sprague Dawley (Harlan U.K. Ltd., Oxfordshire, U.K.), aproximadamente 8-10 semanas de idade e pesando entre 250-300 g, foram usados neste estudo. Os animais foram inicialmente alojados em grupos de até quatro por gaiola (dimensões da gaiola 40x25x20 cm, com forragem de serragem, trocada duas vezes semanalmente), de acordo com regulamentos do Ministério dos Negócios Interiores, em um meio ambiente mantido em uma temperatura ambiente de 23 °C com ciclos de 12 horas iluminação/escuridão. Os animais foram providos de alimento (Standard Rodent Diet) e água à vontade. A fim de aclimatar os animais a seus arredores antes da experimentação, os animais foram alojados por um mínimo de uma semana sem perturbação, que não renovar sua forração e reabastecer suas provisões de comida e água. Em seguida ao ferimento, os animais foram monitorados sob condições de alojamento individual até recuperarem-se completamente do procedimento. Os animais foram em seguida mantidos individualmente por um período de 2 semanas (isto é, até seus ferimentos terem-se re-epitelizado completamente). Após este período inicial de 2 semanas, os animais foram mantidos em grupos de até quatro, pelo resto do estudo. Todos os procedimentos animais foram realizados pelo estabelecimento licenciado pelo Ministério dos Negócios Interiores, sob Licenças do Ministério dos Negócios Interiores U.K. (PPL:40/2650; PIL: 70/4934 e PIL: 60/7661).

25 Criação de Ferimentos Incisionais de Espessura total

Estudos anteriores anti-cicatriz (investigando inibidores de citocina e neutralizando anticorpos para citocinas) tenderam a empregar ferimentos (incisionais) de múltiplos em um único animal, cada ferimento recebendo um tratamento diferente. Devido a seu uso e aceitação no passado,

este modelo de ferimento multi-incisional foi selecionado como o modelo de escolha para avaliar os efeitos de PEP005 na cura de ferimento incisional de espessura total, com os tratamentos sendo alternados entre os animais, a fim de permitir as diferenças caudo-cranianas conhecidas em roedores.

Os animais foram anestesiados usando-se inalação de Halotano e ar, e o dorso de cada rato raspado e lavado com o bactericida clorexidina gliconato (0,05 % aquoso). Quatro ferimentos incisionais de espessura total (1 cm de comprimento, incluindo o panículo carnoso e a hipoderme) foram criados nas costas de cada animal. Os ferimentos permaneceram não suturados (permitidos abrir-se muito), a fim de permitir formar tecido de granulação dentro dos ferimentos. Em seguida ao ferimento (dia 0), uma das quatro concentrações de PEP005 (veículo de gel DMSO/isopropanol PEP005-livre, 0,01 %, 0,028 % ou 0,05 % PEP005) foi aplicada a cada ferimento, enquanto os controles de ferimento não-tratados permaneceram não tratados.

Cada grupo de animal foi mantido durante cada respectivo período experimental/colheita, de acordo com a Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Grupos experimentais estabelecidos por 4 semanas e 12 semanas (para análise de resistência à tração e avaliação da qualidade do tecido de cicatriz)

Grupo	Tratamento	Nome Grupo	Número de Ferimentos Réplica	
			Semana 4	Semana 12
1	PEP005-não afetado, Tratado-Veículo	N-V	10	12
2	PEP005-não afetado, Sem Tratamento	N-NT	10	12
3	PEP005-Exposto, Tratado-Veículo	Veículo	10	10
4	PEP005 [0,01%]	PEP-0,01	10	10
5	PEP005 [0,028%]	PEP-0,028	10	10
6	PEP005 [0,05%]	PEP-0,05	10	10

Aplicação de PEP005 e Veículo em Sítios de Ferimento Incisional

Imediatamente após lesão, tratamentos únicos de 0,01%, 0,028% de PEP005 ou géis veículo DMSO/isopropanol, foram aplicados em volumes de 10 µl por 100 mm² (1 µg/10 µl, 2,8 µg/10 µl e 5 µg/ 10 µl

PEP005, respectivamente) à pele marginal circundando cada ferimento, com uma área total de 600 mm² de tratamento de recebimento de pele marginal. Os géis foram aplicados utilizando-se uma pipeta de deslocamento positivo e espalhados uniformemente sobre a área de tratamento, empregando-se uma 5 espátula estéril, sendo tomado cuidado para não introduzir diretamente as preparações dentro dos ferimentos. Os géis foram permitidos secar por um período de 10 min, em seguida à aplicação. A fim de evitar que os animais interferissem com seus ferimentos, cada ferimento foi tratado utilizando-se gaze estéril seca (Release®, Johnson & Johnson Wound Management Ltd., 10 North Yorkshire, U.K.) e presa com fita Millipore™ (3M UK plc, Berkshire, U.K.). Cada animal foi também equipado com um Elizabethan Collar, a fim de evitar remoção do curativo. Os curativos permaneceram em posição por um período de três dias pós-ferimento. Os ratos foram mantidos em seus respectivos grupos experimentais por 1, 4 e 12 semanas, quando os animais de 15 cada grupo foram eutanasiados e a condição do ferimento e tecidos peri-ferimento (em termos de viabilidade, eritema, edema etc.) monitorada em todos os pontos de avaliação, de acordo com a Tabela 2.1. Os animais foram também pesados durante o curso do Estudo, para determinar se a exposição a PEP005 teve quaisquer efeitos adversos sobre a saúde/condição geral dos 20 animais experimentais.

Eutanásia, Colheita e Processamento de Tecido/Amostra

Colheita (Semanas 4 e 12)

O tecido do ferimento e pele marginal normal foram excisados e uma única tira de 3 mm incorporando o ferimento/cicatriz removida de cada 25 ferimento, utilizando-se um instrumento de dupla lâmina. As tiras de tecido foram então armazenadas em gaze cirúrgica umedecida com solução salina (Topper™, Johnson & Johnson Wound Management), a 4°C antes da análise tensiométrica. O tecido de ferimento restante foi fixado em 10% de formalina, processado e embutido em cera de parafina. Seções transversais (6 µm) foram

retiradas e tingidas com tanto Hematoxilina como Eosina (para avaliação histológica de rotina) e tinta de Mallory (para análise de orientação da matriz).

Avaliação Tensiométrica da Resistência do Ferimento (Semana 4 e 12)

5 Os aumentos de resistência do ferimento com o tempo, após lesão, é consequentemente uma medida da maturidade do ferimento. A resistência de ruptura do ferimento foi quantificada usando-se um Instron Tensiometer (Instron Ltd., Buckinghamshire, U.K.), pré-calibrado para fornecer leituras de escala total de 5,0 kg força (kgf) para a análise tensiométrica dos ferimentos da semana 4 e 50,0 kg força (kgf) para análise tensiométrica de ferimentos da semana 12. Tiras de tecido (3 mm) de cada 10 0,01%, 0,028 %, 0,05 % PEP005, gel veículo DMSO/isopropanol e grupo de controle de ferimento não tratado foram fixadas dentro das garras do Tensiômetro, começando-se a puxar as margens do ferimento separando-as 15 em uma “velocidade de cruzeta” de 50 mm/min. A resistência de ruptura foi medida como a força máxima necessária para provocar a separação das margens do ferimento.

Avaliação da Qualidade do Tecido da Cicatriz (Semanas 4 e 12)

A orientação da matriz foi determinada em espécimes 20 histológicos de cada 0,01%, 0,028%, 0,05% PEP005, gel veículo DMSO/isopropanol e grupo de controle de ferimento não tratado, colocando-se as seções em um estágio de microscópio e orientando-se/girando-se as seções a fim de permitir que fossem feitas fotomicrografias paralelas à superfície da pele. Imagens digitais de cada cicatriz foram então capturadas 25 nas regiões de cicatriz superior e média. Áreas representativas de interesse dentro de cada região de cicatriz foram selecionadas e a orientação dos componentes de matriz dentro de cada área medida utilizando-se software de orientação de imagem escrita sob medida (CICA-MOS, Versão 1.0), que gerou dados descrevendo a direcionalidade dos feixes de colágeno dentro das

imagens de espécime histológico, fornecendo uma saída descrevendo a orientação em segmentos de $12 \times 15^\circ$. Tipicamente, tecido de pele normal possuiria direcionalidade horizontal limitada, com picos de direcionalidade a aproximadamente 45° e 105° . Ao contrário, o tecido de cicatriz teria uma proporção significativa de feixes de colágeno orientados próximo à horizontal, com um nível muito elevado de direcionalidade a $0 - 180^\circ$ (isto é, planar, paralelo à superfície da pele), porém direcionalidade muito mínima entre 45 e 120° . Tecido de cicatriz menos severo possuiria mais feixes de colágeno orientados em direções que não a $0 - 180^\circ$.

O presente Estudo investigou dois níveis de orientação de tecido, (i) tecidos de cicatriz de cada 0,01 %, 0,028 %, 0,05 % PEP005, gel veículo DMSO/isopropanol e grupo de controle não tratado foram comparados em termos das quantidades de matriz, orientados paralelos à horizontal $\pm 7,5^\circ$ e (ii) a fim de considerar possíveis erros na orientação da seção, antes da captura da imagem, o possível impacto dos organelos cutâneos locais (p. ex., folículos capilares) e ondulações/irregularidades na superfície da pele, o tecido de cicatriz de cada grupo foi também comparado em termos das quantidades de matriz, orientados paralelos à horizontal em $\pm 22,5^\circ$. Finalmente, quanto maior a direcionalidade planar/vertical do feixe de colágeno, mais severa a formação de cicatriz.

Resultados

Avaliação Tensiométrica da Resistência do Ferimento

Os valores da resistência de tração tensiométrica média, obtidos para as tiras de tecido (3 mm) de cada 0,01 %, 0,028%, 0,05% PEP005, gel veículo DMSO/isopropanol e grupo de controle de ferimento não tratado, a 4 semanas e 12 semanas, são mostrados na Figura 1. Os valores de resistência à tração médios obtidos na semana 4 (Figura 1A) demonstraram uma tendência dependente da dose, com resistência à tração aumentada com exposição a PEP005.

Os valores de resistência de tração médios obtidos na semana 12 (Figura 1B) demonstraram aumentados valores de resistência à tração para todos os grupos experimentais, em comparação com a semana 4, com uma tendência bifásica em seguida ao tratamento com PEP005, aumentando a 0,01 %, declinando a 0,028% dos níveis de controle, seguido por outro aumento em concentrações de 0,05% de PEP005.

Avaliação da Qualidade do Tecido da Cicatriz

Tratamento tópico com 0,028 % de PEP005 reduziu a percentagem de feixes de colágeno que se alinharam a $\pm 7,5^\circ$ ou $\pm 22,5^\circ$, em comparação com os três grupos de controle.

A Tabela 3.1 abaixo fornece dados médios de análise de orientação de matriz de cicatriz dos dados do ferimento médio exibindo dados de direção a $\pm 7,5^\circ$ em relação à horizontal e $\pm 22,5^\circ$ em relação à horizontal, em ferimentos incisionais de espessura total de rato, agudos (cirúrgicos), em seguida à aplicação de 0,028% PEP005, comparados com o veículo de DMSO/isopropanol (controle) e grupos de controle de ferimento não-tratados a 12 semanas. N-NT = PEP005-“não-afetados”, não-tratados, N-V = PEP005= “não-afetados”, tratado por veículo; V = exposto-PEP005, tratado por veículo.

Tabela 3.1

	N-NT	N-V	V	0,028% PEP005
$\pm 7,50$	10,55%	946%	9,01%	6,99%
$\pm 22,5^\circ$	30,32%	26,84%	26,03%	21,81%

BIBLIOGRAFIA

- al-Khateeb, T, Stefens, P, Sheferd, JP, Thomas, DW. An investigation of preferential fibroblast wound repopulation using a novel in vitro wound model. *J Periodontal* 1997; 68: 1063-1069.
- 5 Baum, C. L., Arpey, C. J., Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular e Molecular Events, *Dermatol Surg* 31 :674-686 (2005).
- Brian, D., Walker, K. B., Ferguson, M., Torpe, R., Cytokine gene expression in a murine wound healing model, *Cytokine* 31:429-438
- 10 (2005).
- Cook H, Stefens P, Davies J, Harding, KG, Tomas, DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-I, TIMP-2, e MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 225-33.
- 15 De Felici, M, Dolci, S. In vitro adhesion of mouse fetal germ cells to extracellular matrix components. *Cell Differ Dev* 1989; 26: 87-96.
- Enoch, S. Phenotypic and genotypic characterisation of oral mucosal and patient-matched skin fibroblasts. PhD Thesis 2006; Wound Biology Group, Dept. Oral Surgery, Medicine & Pathology, Cardiff University.
- 20 Greene, T. W., e Wutz, P.G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley InterScience, New Iork (1999).
- Grellner, W., Georg, T., Wilske, J., Quantitative analysis of pro-inflammatory citokines (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds, *Forensic Sci Int* 113:251-264 (2000).
- 25 Grose, R., Werner S., Kessler, D., Tuckermann, J., Durka, S., Huggel, K., Reichardt, H., Werner, S. A role for endogenous glucocorticoids in wound repair, *EMBO Reports* 3:575-582 (2002).
- Hübner, G., Brauchle, M., Smola, H., Madlener, M., Fassler,

R., Werner, S., Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice, *Citokine* 8:548-556 (1996).

Kirfel, G, Rigort, A, Borm, B, Herzog, V., Cell migration: 5 Mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks, *Eur J Cell Biol* 2004; 83: 717-724.

Larock, R. E., *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1999).

Liechty, K. W., Adzick, N. S. and Crombleholme, T. M., 10 Diminished interleukin 6(IL-6) production during scarless human fetal wound repair, *Citokine* 12:671-676 (2000).

March, J., *Advanced Organic Chemistry*, 5a. Edição, Wiley InterScience, New Iork.

Martin, P., Wound healing -aiming for perfect skin 15 regeneration, *Science* 1997; 276: 75-81.

Puschel, HU, Chang, J, Muller PK, Brinckmann, J., Attachment of intrinsically e extrinsically aged fibroblasts on collagen and fibronectin, *J Photochem Photobiol* 1995; 27: 39-46.

Stephens, P, Cook, H, Hilton, J, Jones, CJ, Haughton, MF, 20 Wyllie, FS, Skinner, JW, Harding, KG, Kipling, D, Thomas, DW., An analysis of replicative senescence in dermal fibroblasts derived from chronic leg wounds predicts that telomerase therapy would fail to reverse their disease specific cellular e proteolytic phenotype, *Exp Cell Res* 2003; 283: 22-35.

Stephens, P, Davies, KJ, al-Khateeb, T, Shepherd, JP, Tomas, 25 DW., A comparison of the ability of intra-oral and extra-oral fibroblasts to stimulate extracellular matrix reorganization in a model of wound contraction, *J Dent Res* 1996; 75: 1358-1364. Stephens, P, Davies, KJ, Occleston, N, Pleass, RD, Kon, C, Daniels, J, Khaw, PT, Thomas, DW., Skin and oral fibroblasts exhibit fenotypic differences in extracellular matrix reorganization

- e matrix metalloproteinase activity, Br J Dermatol 2001; 144: 229-237.
- Stephens, P, Grenard, P, Aesclimann, P, Langley, M, Blain, E, Errington, R, Kipling, D, Thomas, DW, Aesclimann, D., Crosslinking e G-protein functions of transglutaminase 2 contribute differentially to fibroblast wound healing responses, J Cell Sci 2004; 117: 3389-3403.
- Stephens P, Thomas DW., The cellular proliferative phase of wound healing, J Wound Care 2002; 11 : 253-261.
- Wall, IB., A cellular and molecular analysis of chronic wound e normal dermal fibroblasts, PhD Thesis 2006; Wound Biology Group, Dept. Oral Surgery, Medicine & Pathology, Cardiff University.
- Werner, S., Grose, R., Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Citokines, Physiol Rev 83:835-870 (2003).

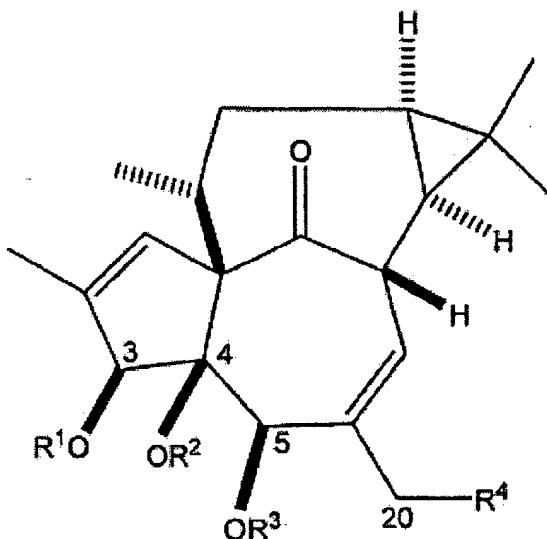
REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um composto de ingenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para promover cura de ferimento em um indivíduo em necessidade da mesma.
5
2. Uso de um composto de ingenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para reduzir ou minimizar tecido de cicatriz ou melhorar a cosmese ou resultado funcional em um ferimento.
10
3. Uso de um composto de ingenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para modular a resposta fenotípica de fibroblastos e/ou queratinócitos dérmicos em um indivíduo em necessidade da mesma.
15
4. Uso de um composto de ingenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para modular a resposta fenotípica de fibroblastos e/ou queratinócitos dérmicos em um sítio de ferimento de um indivíduo em necessidade da mesma.
20
5. Uso de um composto de ingenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para modular a produção de uma ou mais citocinas em um indivíduo em necessidade da mesma.
25
6. Uso de um composto de ingenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de um medicamento para modular a produção de uma ou mais citocinas em um sítio de ferimento de um indivíduo em necessidade da mesma.
7. Uso de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado

pelo fato de uma ou mais citocinas serem selecionadas do grupo consistindo de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α .

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de o composto de ingenol ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ser aplicado topicalmente no ferimento.

9. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de o composto de ingenol ter a fórmula:



em que

R¹-R³ são independentemente selecionados de hidrogênio, 10 alquila opcionalmente substituída, alquenila opcionalmente substituída, alquinila opcionalmente substituída, acila opcionalmente substituída, arilalquila opcionalmente substituída, S(O)₂R', S(O)₂OR', P(O)(OR')₂ (em que R' é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, acila, arila, ou arilalquila) e glicosila; e

15 R⁴ é selecionado de hidrogênio, hidróxi, opcionalmente substituído alcóxi, opcionalmente substituído alquenóxi, opcionalmente substituído alquinóxi, opcionalmente substituído acilóxi, opcionalmente substituído arilalcóxi, OS(O)₂R', OS(O)₂OR', OP(O)(OR')₂ (em que R' é hidrogênio, alquila, alquenila, alquinila, acila, arila, ou arilalquila) e glicóxi.

20 10. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de o composto ser selecionado de ingenol-3-angelato, 20-O-acetil-

ingenol-3-angelato e 20-deóxi-ingenol-3-angelato e sais farmaceuticamente aceitáveis do mesmo.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de o composto ser ingenol-3-angelato.

5 12. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de o ferimento ser selecionado do grupo consistindo de cortes e lacerações, incisões cirúrgicas, perfurações, esfoladuras, arranhões, ferimentos por compressão, abrasões, ferimentos por fricção, úlceras, ferimentos de efeito térmico, ferimentos químicos, ferimentos resultantes de infecções patogênicas, sítios de enxerto de pele/doador e 10 recebedor de transplante, condições de resposta imune, ferimentos orais, ferimentos do estômago ou intestinais, cartilagem ou osso danificado, sítios de amputação e lesões corneanas.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo 15 fato de o ferimento ser um ferimento cutâneo.

14. Uso de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de o ferimento ser um ferimento crônico.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de o ferimento ser um ferimento associado com diabetes.

RESUMO

“USO DE UM COMPOSTO DE INGENOL OU UM SAL FARMACEUTICAMENTE ACEITÁVEL DO MESMO”

A presente invenção refere-se genericamente a métodos e composições para promover a cura de ferimento em um indivíduo. Em particular, a invenção refere-se ao uso de compostos de ingenol, particularmente angelatos de ingenol, em cura de ferimento, e a composições para eles, que contêm tais compostos.