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

(21) **PI0806622-1 A2**

*BRPI0806622A2*

(22) Data de Depósito: 18/01/2008
**(43) Data da Publicação:** 13/09/2011
**(RPI 2123)**

***(51) Int.Cl.:***
**A61L 17/00**
**A61L 27/22**
**A61K 38/18**

**(54) Título:** MÉTODOS PARA MODIFICAR A LIBERAÇÃO E PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE UMA PROTEÍNA DE FATOR DE CRESCIMENTO-BETA TRANSFORMANTE, USO DE UM SELANTE DE FIBRINA, E, KIT PARA PREPARAR UM SELANTE DE FIBRINA

**(30) Prioridade Unionista:** 18/01/2007 US 60/881452, 13/06/2007 US 60/934457, 13/06/2007 US 60/934457, 18/01/2007 US 60/881452

**(73) Titular(es):** Baxter Healthcare S.A, Baxter International Inc.

**(72) Inventor(es):** Isabelle Catelas, Sam L. Helgerson

**(74) Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2008051528 de 18/01/2008

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/089466de 24/07/2008

**(57) Resumo:** MÉTODOS PARA MODIFICAR A LIBERAÇÃO E PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE UMA PROTEINA DE FATOR DE CRESCIMENTO-BETA TRANSFORMANTE, USO DE UM SELANTE DE FIBRINA, E, KIT PARA PREPARAR UM SELANTE DE FIBRINA. A presente invenção diz respeito, no geral, um selantes de fibrina, que contém fator-beta que transforma o crescimento (TGF-β) para liberação controlada in situ para aplicações terapêuticas, incluindo distúrbios muscoloesqueletais, tais como distúrbios ósseos e de cartilagem, distúrbios de tecido mole e doenças cardiovasculares.

PI0806622-1

"MÉTODOS PARA MODIFICAR A LIBERAÇÃO E PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE UMA PROTEÍNA DE FATOR DE CRESCIMENTO-BETA TRANSFORMANTE, USO DE UM SELANTE DE FIBRINA, E, KIT PARA PREPARAR UM SELANTE DE FIBRINA"

Este pedido de patente reivindica o benefício de prioridade do pedido de patente provisório dos Estados Unidos No. 60/881,452, depositado em 18 de janeiro de 2007 e pedido de patente provisório número 60/934.457, depositado em 13 de junho de 2007, aqui incorporado pela referência na sua íntegra.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção, no geral, diz respeito a selantes de fibrina, que contêm fator-beta que transforma o crescimento (TGF- β) para liberação controlada in situ para aplicações terapêuticas, incluindo doenças muscoloesqueletais e cardiovasculares.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Selantes de fibrina são um tipo de "cola" cirúrgica que é feita de proteínas que coagulam sangue humano, e que é tipicamente usado durante cirurgia para controlar o sangramento. Os ingredientes nestes selantes interagem durante aplicação para formar um coágulo estável composto de uma fibrina de proteína do sangue. Selantes de fibrina são atualmente usados durante cirurgia com vários propósitos diferentes: controlar o sangramento na área onde a cirurgia é operante, acelerar a cicatrização da ferida, selar órgãos do corpo ocos ou cobrir furos feitos por suturas padrão, fornecer distribuição de liberação lenta de medicações aos tecidos expostos durante a cirurgia.

Selantes de fibrina geralmente consistem em dois componentes derivados de plasma humano: (a) um complexo de fibrinogênio altamente concentrado (FC) composto principalmente de fibrinogênio e fibronectina junto com quantidades catalíticas de Fator XIII e plasminogênio e (b) uma trombina de alta potência. Selantes de fibrina também podem conter

aprotinina. Pela ação da trombina, fibrinogênio (solúvel) primeiramente é convertido em monômeros de fibrina que agregam espontaneamente e formam um então chamado coágulo de fibrina. Simultaneamente, o fator XIII (FXIII) presente na solução é ativado pela trombina na presença de íons cálcio para fator XIIIa. Os monômeros de fibrina agregados e qualquer fibronectina restante possivelmente presente são reticulados para formar um polímero superior pela formação de ligações de peptídeos inéditos. Por esta reação de reticulação, a resistência do coágulo formado é substancialmente maior. Geralmente, o coágulo adere bem à superfície da ferida e tecido, que leva ao efeito adesivo e hemostático. (patente US 7.241.603). Desta forma, adesivos de fibrina são frequentemente usados como adesivos de dois componentes que compreendem um componente do complexo de fibrinogênio (FC) junto com um componente de trombina que adicionalmente contém íons cálcio.

Uma vantagem particular de um selante de fibrina é que o adesivo/gel não permanece no seu sítio de aplicação como um corpo estranho, mas é completamente ressorvido como em cicatrização de ferida natural e é substituído por tecido recém formado. Várias células, por exemplo, macrófagos e, subsequentemente, fibroblastos migram no gel, lisam e ressorvem o material gel e formam tecido novo. Selantes de fibrina foram usados para formar géis de fibrina in situ, e estes géis de fibrina foram usados para distribuição de células e fatores de crescimento (Cox et al., Tissue Eng 10(5-6): 942-954, 2004; Wong et al., Thromb Haemost 89: 573-582, 2003).

Para o reparo do tecido, é desejável localizar fatores de crescimento e células em uma matriz, tal como um gel de fibrina. Por exemplo, matriz de fibrina foi usada para distribuição de TGF- β em várias misturas complexas incluindo soro bovino fetal, grânulos de coral, e lipossomas (Fortier et al., Am J Vet Res 58(1): 66-70, 1997; Arnaud et al., Chirurgie Plastique Esthetique 39(4): 491-498, 1994; Arnaud et al. Calcif Tissue Int 54: 493- 498, 1994; Giannoni et al., Biotechnology and

Bioengineering 83(1): 121-123, 2003). Meios alternativos de distribuir fatores de crescimento de géis de fibrina envolvem conjugados compreendendo substratos transglutaminase, anticorpos, e fragmentos VEGF ligados aos fatores de crescimento (Ver, por exemplo, patentes US Nos. 6.506.365; US 6.713.453 e pedido de patente US 2003/0012818, aqui incorporado pela referência na sua íntegra). Adicionalmente, géis de fibrina mostraram induzir o crescimento celular (por exemplo, célula tronco mesenquimal humana (HMSC)) e proliferação, bem como, até certo ponto, diferenciação osteogênica, dependendo das concentrações de FC e trombina na matriz (Catelas et al., Tissue Eng 12(8): 2385-2396, 2006).

A capacidade dos selantes de fibrina de distribuir fatores de crescimento a um sítio particular no corpo é benéfica, mas re-crescimento apropriado de tecido frequentemente requer um fornecimento contínuo/pronto de fator de crescimento ou citocina distribuído em uma taxa específica ao sítio, de maneira tal que o tratamento apropriado seja garantido. Isto é especialmente verdade se a proteína terapêutica tiver uma meia vida curta in vivo. Selantes de fibrina atualmente em uso fornecem alguma liberação atrasada do medicamento ou agente semeado, mas a capacidade de estender a vida do agente no selante pode melhorar o reparo do tecido a longo prazo in vivo.

Assim, permanece uma necessidade na técnica de desenvolver um meio efetivo para distribuir o fator de crescimento in vivo para tratamento de várias condições e distúrbios, para desenvolver melhores métodos para liberação controlada de fatores de crescimento de um gel de fibrina.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece composições de selante de fibrina compreendendo um fator-beta que transforma o crescimento (TGF- β) para liberação controlada do fator de crescimento in vitro e in vivo. A invenção também fornece um método de modificar a liberação de proteína TGF- β de

um selante de fibrina modificando o teor de componente do complexo de fibrinogênio usado para formular o selante. Para o tratamento de uma condição ou distúrbio, contempla-se que o TGF-β, uma vez liberado do selante de fibrina, retém sua atividade biológica, de maneira tal que o TGF-β possa mediar sua atividade biológica esperada in vitro ou in vivo.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para modificar a liberação de uma proteína fator-beta que transforma o crescimento (TGF-β), a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, de um selante de fibrina, em que o selante de fibrina é produzido pela mistura de um componente do complexo de fibrinogênio, um componente de trombina e um Componente TGF-β, o método compreendendo, a) determinar a quantidade de TGF-β liberado de um primeiro selante de fibrina tendo uma quantidade inicial conhecida de TGF -β e uma concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio, e b) modificar a concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio usada no primeiro selante de fibrina da etapa (a) para produzir um segundo selante de fibrina, em que o aumento da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante comparado à concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio no primeiro selante diminui a taxa de Liberação de TGF-β do segundo selante comparado à liberação de TGF-β do primeiro selante da etapa (a), e em que o segundo selante tem a mesma quantidade inicial de TGF-β que o primeiro selante na etapa (a).

Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para modificar a liberação de uma proteína TGF-β, a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF- β1, TGF-β2 e TGF-β3, de um selante de fibrina, em que o selante de fibrina é produzido pela mistura de um componente do complexo de fibrinogênio, um componente de trombina e um componente TGF-β, o método compreendendo, a) determinar a quantidade de TGF-β liberado de um primeiro selante de fibrina tendo uma quantidade

inicial conhecida de TGF -β e uma concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio, e b) modificar a concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio usada no primeiro selante de fibrina na etapa (a) para produzir um segundo selante de fibrina, em que a diminuição da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante comparada à concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio no primeiro selante aumenta a taxa de liberação de TGF-β do segundo selante da forma comparada à liberação de TGF-β do primeiro selante da etapa (a), e em que o segundo selante tem a mesma quantidade inicial de TGF-β como o primeiro selante na etapa (a).

Em uma modalidade, a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL. Em uma modalidade relacionada, a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 5 mg/mL a cerca de 75 mg/mL.

Em uma outra modalidade, contempla-se que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração de complexo de fibrinogênio final no segundo selante em cerca de 1 mg/mL a cerca de 149 mg/mL. Em uma modalidade adicional, a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante em cerca de 5 mg/mL a cerca de 75 mg/mL. Ainda uma outra modalidade, a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante em cerca de 10 mg/mL a cerca de 60 mg/mL.

Contempla-se que em algumas modalidades, a concentração final do componente de trombina no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 1 IU/mL a 250 IU/mL. Em uma outra modalidade, a concentração final de TGF-β no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1 mg/mL.

Em um outro aspecto, a invenção contempla um método para a liberação controlada de uma proteína TGF-β, a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF- β1, TGF-β2 e TGF-β3, em um paciente em necessidade do mesmo, compreendendo administrar ao dito paciente um selante de fibrina compreendendo TGF-β, em que pelo menos 25% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um método para a liberação controlada de uma proteína TGF-β, a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, em um paciente em necessidade do mesmo, compreendendo administrar ao dito paciente um selante de fibrina compreendendo TGF-β, em que pelo menos 20% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

Contempla-se que o TGF -β liberado do selante de fibrina é biologicamente ativo.

Em algumas modalidades, pelo menos 35% a 90% do TGF-β é retido por pelo menos 3 dias. Em uma modalidade relacionada, pelo menos 45% a 75% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias. Em uma modalidade adicional, pelo menos 60% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

Em uma outra modalidade, pelo menos 25% a 75% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias. Em uma modalidade relacionada, pelo menos 45% a 55% do dito TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

Em uma modalidade relacionada, contempla-se que o selante de fibrina pode ter cinéticas de liberação das faixas anteriores tanto por 3 dias quanto 10 dias.

Em uma modalidade, o selante de fibrina é produzido combinando um componente do complexo de fibrinogênio (FC) e um componente de trombina em mistura. Em uma outra modalidade, o TGF-β é

adicionado ao componente FC antes da mistura do componente FC com o componente de trombina. Em uma modalidade adicional, o TGF-β é adicionado ao componente de trombina. Ainda em uma modalidade adicional, TGF-β é adicionado à mistura de FC e trombina antes que os componentes formem o gel de fibrina.

Em uma modalidade relacionada, contempla-se que a liberação de TGF-β pode diminuir em uma quantidade regular cada dia. Por exemplo, a quantidade de TGF-β no selante de fibrina pode diminuir em cerca de 1% por dia, em cerca de 2% por dia, em cerca de 3% por dia, em cerca de 4% por dia, em cerca de 5% por dia, em cerca de 6% por dia, em cerca de 7% por dia, em cerca de 8% por dia, em cerca de 9% por dia ou em cerca de 10% por dia, ou a quantidade desejada de liberação pode ser ajustada com base na concentração do complexo de fibrinogênio ou concentração de trombina usada para formular o selante de fibrina.

A invenção contempla que a concentração final do componente do complexo de fibrinogênio no selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL. Também contempla-se que, em algumas modalidades, a concentração final do componente de trombina no selante é na faixa de cerca de 1 IU/mL a 250 IU/mL. Em uma modalidade, a concentração de complexo de fibrinogênio final é cerca de 5 mg/mL, cerca de 10 mg mL, cerca de 20 mg/mL ou cerca de 40 mg/mL, e a concentração final de trombina é cerca de 2 IU/mL.

Em uma modalidade, a concentração final de TGF-β no selante é de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1 mg/mL.

Em uma modalidade adicional, contempla-se que o TGF-β é TGF-β1. Em uma modalidade, quando o TGF-β é TGF-β1, pelo menos 60% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

Em uma modalidade relacionada, contempla-se que o TGF-β é TGF-β2. Em uma modalidade, quando o TGF-β é TGF-β2, pelo menos 25% do dito TGF-β2 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

Em uma outra modalidade, contempla-se que o TGF-β é TGF-β3. Em uma modalidade, quando o TGF-β é TGF-β3, pelo menos 55% do dito TGF-β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF-β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

Em um aspecto adicional, a invenção contempla um método para tratar um paciente que sofre de um distúrbio ou doença que pode ser benéfica da liberação controlada in situ de uma proteína beta do fator de crescimento transformante (TGF-β), a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, o dito método compreendendo administrar ao dito paciente um selante de fibrina compreendendo a proteína TGF-β, em que o selante de fibrina fornece uma liberação controlada do TGF-β em que pelo menos 25% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e o dito TGF-β é liberado em uma taxa efetiva para tratar o dito distúrbio ou doença.

Em um aspecto adicional, a invenção contempla um método para tratar um paciente que sofre de um distúrbio ou doença que pode beneficiar de liberação controlada in situ de uma proteína beta do fator de crescimento transformante (TGF-β) bioativa, a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, o dito método compreendendo administrar ao dito paciente um selante de fibrina compreendendo a proteína TGF- β, em que o selante de fibrina fornece uma liberação controlada do TGF-β em que pelo menos 20% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias e o dito TGF-β é liberado em uma taxa efetiva para tratar o dito distúrbio ou doença.

A invenção também fornece o uso de um selante de fibrina

compreendendo uma proteína TGF-β, selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, na fabricação de um medicamento para tratar um paciente que sofre de um distúrbio ou doença que pode beneficiar da liberação controlada in situ de uma proteína beta do fator de crescimento transformante (TGF-β), em que o selante de fibrina fornece uma liberação controlada do TGF-β conforme anteriormente.

A invenção contempla que as cinéticas de liberação descritas anteriormente são aplicáveis ao método para tratar um paciente que se beneficiaria da liberação controlada in situ de uma proteína TGF-β, ou pelo uso do selante de fibrina na fabricação de um medicamento para tratar o dito paciente.

Em um aspecto, o paciente sofre de uma doença que se beneficiaria da liberação controlada de TGF-β in vivo que seria evidente para um versado na técnica. Em uma modalidade, a doença ou distúrbio é selecionada do grupo que consiste em uma doença ou distúrbio muscoloesqueletal, uma doença ou distúrbio do tecido mole e uma doença cardiovascular. Em uma modalidade, o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença óssea ou um distúrbio ósseo. Em uma modalidade relacionada, o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença de cartilagem ou um distúrbio de cartilagem.

Em uma modalidade, o selante de fibrina é administrado a um paciente usando métodos bem conhecidos na técnica, tais como injeção, aspersão, administração endoscópica ou gel pré-formado, em si ou em combinação com outros materiais e outros métodos conhecidos por um versado na técnica.

A invenção também fornece um kit para preparar um selante de fibrina compreendendo uma proteína beta do fator de crescimento transformante (TGF-β) bioativa, a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, e o dito selante de fibrina tendo uma

taxa de liberação de TGF-β desejada, o kit compreendendo, a) um primeiro frasco ou primeiro recipiente de armazenamento contendo um componente do complexo de fibrinogênio, em que o frasco opcionalmente compreende um componente TGF-β, e b) um segundo frasco ou segundo recipiente de armazenamento tendo um componente de trombina, o dito kit opcionalmente contendo um terceiro frasco ou terceiro recipiente de armazenamento tendo um componente TGF-β quando o dito primeiro frasco ou primeiro recipiente de armazenamento não inclui um componente TGF-β, o dito kit adicionalmente contendo instruções para uso destes. O kit também pode compreender instrumentos para uso ou administração do selante de fibrina in vitro ou in vivo.

Outras características e vantagens da invenção ficarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada. Deve-se entender, entretanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indiquem modalidades específicas da invenção, são dados a título de ilustração somente, em virtude das alterações e modificações no espírito e escopo da invenção se tornarão evidentes para os versados na técnica a partir desta descrição detalhada.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

Figura 1 mostra os efeitos da quantidade de TGF-β1 na sua liberação diária de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ ([FC] = 25 mg/mL, [Trombina] = 2 IU/mL)

Figura 2 mostra os efeitos da quantidade de TGF-β1 na sua liberação cumulativa de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ ([FC] = 25 mg/mL, [Trombina] = 2 IU/mL)

Figura 3 mostra os efeitos da concentração de FC na liberação diária de TGF-β1 de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ ([Trombina] = 2 IU/mL)

Figura 4 mostra os efeitos da concentração de FC na liberação

cumulativa de TGF-β1 de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ ([Trombina] = 2 IU/mL).

Figura 5 mostra os efeitos da concentração de FC na liberação diária de TGF-β1 de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH S/D™ ([Trombina] = 2 IU/mL).

Figura 6 mostra os efeitos da concentração de FC na liberação cumulativa de TGF-β1 de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH S/D™ ([Trombina] = 2 IU/mL).

Figura 7 mostra os efeitos de concentração de trombina na liberação diária de TGF-β1 de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ ([FC] = 25 mg/mL).

Figura 8 mostra os efeitos de concentração de trombina na liberação cumulativa de TGF-β1 de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ ([FC] = 25 mg/mL).

Figura 9 mostra os efeitos do número de lote de TISSEEL VH™ na liberação cumulativa de TGF-β1 de géis de fibrina ([FC] = 20 mg/mL, [Trombina] = 2 IU/mL).

Figura 10 mostra os efeitos do número de lote de TISSEEL VH™ na liberação cumulativa de TGF-β1 de géis de fibrina ([FC] = 20 mg/mL, [Trombina] = 2 IU/mL).

Figura 11 (atividade biológica de TGF-β1 liberado) mostra a proliferação de células tronco mesenquimais humanas (HMSC) cultivadas em monocamadas com sobrenadante do meio de géis de fibrina TISSEEL VH™ com ou sem TGF-β1 adicionado no dia 3 ou com meio recém preparado com mais 2 ng (1 ng/mL) de TGF-β1 (controle positivo). Os resultados foram normalizados no dia 1.

Figura 12 (atividade biológica de TGF-β1 liberado) mostra a atividade da fosfatase alcalina (ALP) em HMSC cultivado em sobrenadantes do meio de géis de fibrina TISSEEL VH™ com TGF-β1 adicionado (isto é,

em meio contendo TGF-β1 liberado), comparado à atividade ALP em HMSC cultivada em sobrenadantes do meio de géis de fibrina sem nenhum TGF-β1 adicionado, e à atividade ALP em HMSC cultivado em meio que continha TGF-β1 recém adicionado (controle positivo). Os resultados (primeiramente calculados em IU/mL) foram normalizados na proliferação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção fornece um gel de fibrina contendo TGF- β para liberação controlada in situ em aplicações terapêuticas, incluindo tratamento de doenças muscoloesqueletais, tais como distúrbios ósseos e de cartilagem, distúrbios de tecido mole, e doenças cardiovasculares. A invenção contempla que o TGF- β liberado do gel retém sua atividade biológica, de maneira tal que a liberação do selante de fibrina in vivo ou in vitro module a atividade biológica desejada. A invenção também fornece um método para determinar a concentração do componente FC ou componente de trombina usada na formulação do selante de fibrina para obter as cinéticas de liberação de TGF-β desejadas.

A menos que de outra forma definida, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados comumente entendidos por um versado na técnica à qual esta invenção pertence. As seguintes referências fornecem a uma habilidade com uma definição geral de muitos dos termos usados nesta invenção: Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2d ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5TH ED., R. Rieger, et al. (eds.), Springer Verlag (1991); e Hale and Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991).

Cada publicação, pedido de patente, patente e outras referências aqui citadas está aqui incorporado na sua íntegra até o ponto em que não é inconsistente com a presente descrição.

Observa-se aqui que da forma usada nesta especificação e nas reivindicações em anexo, as formas singulares "um," "uma," "o" e "a" incluem referência no plural a menos que o contexto claramente indique de outra maneira.

Da forma aqui usada, os seguintes termos têm os significados descritos para eles a menos que de outra forma especificado.

Da forma aqui usada os termos "selante de fibrina," "gel de fibrina," "adesivo de fibrina," "coágulo de fibrina" ou "matriz de fibrina" são usados indiferentemente e referem-se a uma rede tridimensional compreendendo pelo menos um componente do complexo de fibrinogênio (FC) e um componente de trombina, que age como uma plataforma para o crescimento celular e liberação de materiais bioativos com o tempo.

Da forma aqui usada os termos "liberação controlada" e "liberação atrasada" têm os mesmos significados e referem-se a retenção de um agente (por exemplo, fator de crescimento) em um gel de fibrina. Liberação controlada é devido não somente a secreção/liberação lenta e estável do fator de crescimento por difusão ou por dissociação do fator de crescimento ligado e sua subsequente difusão do gel, mas também é devido à desintegração e clivagem enzimática da matriz.

Da forma aqui usada, "formação in situ" refere-se tanto à formação em uma temperatura fisiológica e no sítio de injeção no corpo quanto à formação do selante de fibrina em condições in vitro apropriadas. Este termo é tipicamente usado para descrever a formação de ligações covalentes entre moléculas precursoras no selante de fibrina, que são substancialmente não reticulados antes e na hora da administração.

Da forma aqui usada, "componente do complexo de fibrinogênio" refere-se à solução fibrina/fibrinogênio que é misturada com trombina resultando em um selante de fibrina tipo coágulo. O complexo de fibrinogênio (FC) é composto principalmente de fibrinogênio e fibronectina, e

também pode conter quantidades catalíticas de FXIII e plasminogênio. O componente do complexo de fibrinogênio também pode ser referido como Proteína Seladora.

Da forma aqui usada, "componente de trombina" refere-se à solução de trombina que é misturada com componente do complexo de fibrinogênio que resulta em um selante de fibrina tipo coágulo.

Da forma aqui usada, "componente do fator de crescimento beta transformante" ou "componente TGF-β" refere-se à adição do fator de crescimento em solução à forma líquida do selante de fibrina. Cada um do componente TGF-β, o componente do complexo FC e o componente de trombina podem ser adicionados separadamente para formar o selante de fibrina compreendendo TGF-β. Opcionalmente, o componente TGF-β é adicionado ao componente do complexo FC líquido antes da mistura com o componente de trombina.

Da forma aqui usada, "TGF-β humano recombinante" refere-se o fator de crescimento -β transformante humano recombinante (rh TGF-β) obtido por meio de técnica de DNA recombinante. Ele pode ser produzido por qualquer método conhecido na técnica.

Da forma aqui usada o termo "bioativo" ou "biologicamente ativo" refere-se à propriedade biológica em que uma proteína, por exemplo, uma proteína TGF-β, em uma solução ou em um selante de fibrina apresenta a mesma atividade biológica ou similar quando comparada a ume proteína naturalmente expressa (isto é, quando expressa tanto recombinantemente quanto in vivo).

Da forma aqui usada uma "fração detectável," "marca detectável" ou "marca" refere-se a uma composição detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos ou químicos. Por exemplo, marcas usadas incluem $^{32}P$, $^{35}S$, corantes fluorescentes, reagentes densos em elétron, enzimas (por exemplo, da forma comumente

usada em um ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos e proteínas para as quais anti-soros ou anticorpos monoclonais são disponíveis, ou moléculas de ácido nucléico com uma complementariedade de sequência para um alvo. A fração detectável frequentemente gera um sinal mensurável, tais como um sinal radioativo, cromogênico ou fluorescente que pode ser usado para quantificar a quantidade de fração detectável ligada em uma amostra.

Selantes de fibrina

Muitas formas de fibrina são disponíveis para uso como um selante de fibrina. Géis de fibrina podem ser sintetizados de plasma autólogo, plasma crioprecipitado (por exemplo, kits de cola de fibrina, que são comercialmente disponíveis), fibrinogênio purificado de plasma, e fibrinogênio recombinante e fator XIIIa. Cada um destes materiais fornece uma matriz fundamentalmente similar, com pequenas variações nas composições bioquímicas. Sierra DH, J Biomater Appl, 7, 309-352 (1993). Similaridades entre estes materiais existes tanto em bioatividade enzimática específica quanto respostas de cicatrização gerais.

O gel de fibrina usado na invenção é formado de um selante de fibrina, que consiste em dois componentes principais: complexo de fibrinogênio (FC) e trombina. O FC é composto principalmente de fibrinogênio e fibronectina, e também pode conter quantidades catalíticas de FXIII e plasminogênio. Os componentes de FC e de trombina são geralmente derivados de plasma humano, mas também podem ser produzidos por técnicas de engenharia recombinante/genética. Exemplos de selantes de fibrina são descritos em US 5.716.645; US 5.962.405; US 6.579.537 e incluem TISSEEL VH™ e TISSEEL VH S/D™ (Baxter Healthcare, Deerfield, IL).

Para formar o gel de fibrina, o FC é primeiramente reconstituído, descongelado ou de outra forma preparado de acordo com as instruções da embalagem, adicionalmente diluído conforme a necessidade

usando tampões de diluição e agente terapêutico é adicionado ao FC líquido. Selantes de fibrina mais comercialmente disponíveis incluem um inibidor de lise de gel, tal como aprotinina, que pode ser adicionado ao FC na prudência do usuário. Uma descrição de aprotinina e outros inibidores de lise de gel é fornecida em WO 99/11301. O componente de trombina também é reconstituído na forma líquida usando solução de $CaCl_2$, adicionalmente diluída conforme a necessidade usando tampões de diluição. Contempla-se que o componente de trombina é misturado com o componente FC adicionalmente compreendendo um TGF-β para formar o gel de fibrina. Selantes de fibrina também foram projetados que não têm o ingrediente aprotinina (EVICEL™, Ethicon, Inc, Nova Jérsei).

Métodos adicionais para produzir preparações contendo fibrinogênio que podem ser usados como adesivos para tecidos incluem, produção de crioprecipitado, opcionalmente com etapas de lavagem e precipitação adicionais com etanol, sulfato de amônio, polietileno glicol, glicina ou beta-alanina, e produção de plasma no escopo dos métodos de fracionamento de plasma conhecidos, respectivamente (cf., por exemplo, "Methods of plasma protein fractionation", 1980, ed.: Curling, Academic Press, pp. 3-15, 33-36 e 57-74, ou Blomb ck B. e M., "Purification of human and bovine fibrinogen", Arkiv Kemi 10, 1959, p. 415 f.). Selante de fibrina também pode ser preparado usando plasma sanguíneo do próprio pacientes. Por exemplo, os sistemas de selante de fibrina CRYOSEAL® (Thermogenesis Corp., Rancho Cordova, CA) ou VIVOSTAT® (Vivolution A/S, Denmark) possibilita a produção de componentes de selante de fibrina autólogos do plasma sanguíneo de um paciente. Os componentes de selantes de fibrina são disponíveis na forma liofilizada, líquida congelada intensamente ou líquida.

Os componentes do gel de fibrina são adicionados em concentrações apropriadas para fornecer o tipo de liberação controlada

desejado. O componente FC pode ser adicionado em concentrações variadas incluindo, mas saem limitações 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL, 35 mg/mL, 40 mg/mL, 45 mg/mL, 50 mg/mL, até 150 mg/mL (concentrações finais nos géis), ou em concentrações intermediárias conforme necessário. Adicionalmente, a concentração de componente FC pode ser combinada com qualquer concentração apropriada de componente de trombina, incluindo, mas sem limitações 1 IU/mL, 2 IU/mL, 5 IU/mL, 7 IU/mL, 10 IU/mL, 15 IU/mL, 20 IU/mL, 25 IU/mL, 30 IU/mL, 35 IU/mL, 40 IU/mL, 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 120 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 175 IU/mL, 200 IU/mL, 225 IU/mL e 250 IU/mL.

Contempla-se que um segundo agente, tal como TGF- β é adicionado à composição de selante de fibrina de maneira a preparar um sistema de liberação controlada parar o agente terapêutico. O TGF- β t pode ser adicionado em qualquer concentração que forneça uma formulação de liberação atrasada adequada, em uma faixa de 1 ng/mL a 1 mg/mL de TGF-β. Concentrações exemplares de TGF-β no selante de fibrina incluem, mas sem limitações 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng ml, 100 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, 25 μg/mL , 50 μg/mL, 100 μg/mL, 250 μg/mL, 500 μg/mL, 750 μg/mL e 1 mg/mL.

Contempla-se que a concentração de FC ou trombina usada no selante de fibrina são, de maneira tal que o TGF-β adicionado no gel de fibrina seja liberado em uma quantidade terapeuticamente efetiva com o curso de vários dias a semanas. Em um aspecto, o TGF-β é liberado do gel de fibrina por 1 dia, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias , 8 dias, 9 dias, 10 dias, 11 dias, 12 dias, 13 dias, 14 dias, 15 dias, 16 dias, 17 dias 18 dias, 19 dias, 20 dias, ou mais.

O TGF-β é liberado do selante de fibrina de uma maneira de

liberação controlada ou atrasada, de maneira tal que o TGF-β seja disponível in situ por um período prolongado de tempo. Contempla-se que a liberação de TGF-β pode diminuir em uma quantidade regular cada dia, por exemplo, os níveis de TGF-β podem diminuir em cerca de 1% por dia, em cerca de 2% por dia, em cerca de 3% por dia, em cerca de 4% por dia, em cerca de 5% por dia, em cerca de 6% por dia, em cerca de 7% por dia, em cerca de 8% por dia, em cerca de 9% por dia ou em cerca de 10% por dia ou mais. Em uma modalidade relacionada, contempla-se que pelo menos 25% do TGF-β é retido no gel de fibrina por pelo menos 3 dias. Em uma modalidade adicional, pelo menos 35% a 90%, pelo menos 45% a 75%, ou pelo menos 60% do TGF-β é retido no gel de fibrina por pelo menos 3 dias. Adicionalmente contempla-se que pelo menos 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, ou 90% do TGF-β é retido no gel de fibrina por pelo menos 3 dias.

Em uma outra modalidade, pelo menos 20% do TGF-β é retido no gel de fibrina por pelo menos 10 dias. Em uma modalidade adicional, pelo menos 25% a 75% ou 45% a 55% do TGF-β é retido por pelo menos 10 dias. Adicionalmente contempla-se que pelo menos 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% ou 75% do TGF-β é retido no gel de fibrina por pelo menos 10 dias.

A invenção fornece um método de formular um selante de fibrina tendo cinéticas de liberação desejadas modificando a concentração dos

componentes dos selantes de fibrina. Em um aspecto, o método contempla a determinação da quantidade de TGF-β liberado de um primeiro selante de fibrina tendo uma quantidade inicial conhecida de TGF -β e uma concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio, modificando a concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio usada no primeiro selante de fibrina na etapa (a) para produzir um segundo selante de fibrina, em que o aumento ou a diminuição da concentração de complexo de fibrinogênio no segundo selante comparada à concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio no primeiro selante ajusta a taxa de Liberação de TGF-β do segundo selante da forma comparada à liberação de TGF-β do primeiro selante da etapa, e em que o segundo selante tem a mesma quantidade inicial de TGF-β como o primeiro selante na etapa.

Em uma modalidade, a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL. O método da reivindicação 1 ou 2 em que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro ou segundo selante é apresentado anteriormente. Em uma modalidade relacionada, a concentração de FC do primeiro selante de fibrina difere da concentração de FC final no segundo selante em cerca de 1 mg/mL a cerca de 149 mg/mL, em cerca de 5 mg/mL a cerca de 75 mg/mL, ou em cerca de 10 mg/mL a cerca de 60 mg/mL. Em uma modalidade adicional, a concentração de FC concentração de FC do primeiro selante de fibrina difere da concentração de FC final no segundo selante em cerca de 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL, 35 mg/mL 40 mg/mL, 45 mg/mL, 50 mg/mL, ou qualquer quantidade entre estas concentrações, até cerca de 149 mg/mL.

Contempla-se que o selante de fibrina usado na invenção pode ser combinado com materiais ou agentes adicionais para propósitos de uso in vitro ou in vivo. Tais agentes incluem agentes terapêuticos adicionais,

incluindo, mas sem limitações, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, um fator de coagulação sanguínea, uma enzima, uma quimiocina, um receptor de superfície celular solúvel, uma molécula de adesão celular, um anticorpo, um hormônio, uma proteína citoesquelética, uma proteína de matriz, uma proteína acompanhante, uma proteína estrutural, uma proteína metabólica, e outras conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Physicians Desk Reference, 6ª Edição, 2008, Thomson Healthcare , Montvale, NJ.

Materiais adicionais usados no selante de fibrina incluem materiais que podem ser combinados com o selante para doença óssea ou de cartilagem que pode ser materiais que carregam carga incluindo, mas sem limitações, polímeros, coral, cerâmicas, vidro, metais, materiais derivados de osso, hidroxiapatita, materiais de plataformas sintéticas, combinações destes materiais, e outros materiais conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Guehennec et al., (European Cells and Materials, 8:1-11, 2004), patente US 7.122.057 e patente US 6.696.073.

Em uma modalidade, os géis de fibrina podem ser usados como um sistema carreador para distribuir TGF- β biologicamente ativo depois da ligação reversa e de uma maneira controlada ajustando as concentrações de FC e trombina.

Em uma modalidade da invenção, quando os géis de fibrina são feitos de TISSEEL Vapor Heated (TISSEEL VH™) usando FC a 25 mg/mL e Trombina a 2 IU/mL (concentrações finais nos géis), pelo menos cerca de 80% do TGF-β1 adicionado é retido nos géis depois de 3 dias, e pelo menos cerca de 48% do TGF-β1 adicionado é retido nos géis depois de 10 dias. A quantidade de liberação de TGF-β é proporcional à quantidade de fator de crescimento adicionada nos géis.

Em uma outra modalidade da invenção, quando os géis de fibrina são feitos de TISSEEL VH™ usando FC a 5 mg/mL e Trombina a 2 IU/mL (concentrações finais nos géis), pelo menos cerca de 60% do TGF-β1

adicionado é retido nos géis depois de 3 dias, e pelo menos cerca de 25% do TGF-β1 adicionado é retido nos géis depois de 10 dias. Em uma outra modalidade da invenção, quando os géis de fibrina são feitos de TISSEEL Vapor Heated Solvente/Detergente (TISSEEL VH S/D™) usando FC a 5 mg/mL e Trombina a 2 IU/mL (concentrações finais nos géis), pelo menos cerca de 35% do TGF-β1 adicionado é retido nos géis depois de 3 dias, e menos que 7% é retido nos géis depois de 10 dias (isto é, quase completamente liberado). Desta forma, a retenção aumenta com maiores concentrações de FC usando géis de fibrina feitos tanto de TISSEEL VH™ quanto de TISSEEL VH S/D™.

Em uma outra modalidade da invenção, a liberação de TGF-β1 de géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ com 2, 10 e 50 IU/mL de Trombina (com 25 mg/mL de FC, concentrações finais nos géis) é similar, sugerindo que a concentração de trombina tenha um menor efeito que a concentração de FC na liberação de TGF-β1. A liberação de TGF-β1 é somente significativamente maior com a maior concentração de trombina (250 IU/mL, concentração final nos géis), sugerindo um efeito da estrutura de gel, com uma estrutura mais heterogênea.

Em uma outra modalidade da invenção, quando os géis de fibrina são feitos de TISSEEL VH™ de diferentes números de lote, usando FC a 20 mg/mL e Trombina a 2 IU/mL (concentrações finais nos géis), pelo menos 67% do TGF-β1 é retido nos géis de um lote depois de 10 dias, 39% de um outro lote e nenhum do terceiro lote. Uma diferença entre estes lotes é o teor de Fator XIII (42,2 U/mL, 33,9 U/mL e < 1 U/mL, respectivamente). Em uma outra modalidade da invenção, quando os géis de fibrina são feitos de TISSEEL VH S/D™ de diferentes números de lote, usando FC a 20 mg/mL e Trombina a 2 IU/mL (concentrações finais nos géis), pelo menos 20% do TGF-β1 é retido nos géis de um lote depois de 10 dias, e nenhum dos outros dois lotes. O teor do fator XIII destes lotes foram todos menores que 3 U/mL.

Em uma outra modalidade da invenção quando TGF-β2 é adicionado aos géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ usando FC a 5 mg/mL e Trombina a 2 IU/mL (concentrações finais nos géis), pelo menos cerca de 25% do TGF-β2 adicionado é retido nos géis depois de 3 dias. A retenção aumenta com a concentração de FC. Quando TGF-β3 é adicionado aos géis de fibrina feitos de TISSEEL VH™ usando FC a 5 mg/mL e Trombina a 2 IU/mL (concentrações finais nos géis), pelo menos 55% do TGF-β3 adicionado é retido nos géis depois de 3 dias e 25% depois de 10 dias.

Um versado na técnica perceberá que as modalidades apresentadas anteriormente são modalidades exemplares de liberação de TGF-β de um selante de fibrina comercialmente disponível e não se destina a limitar a invenção de nenhuma maneira.

Proteína TGF-β

TGF-beta existe em pelo menos cinco isoformas, conhecido como TGF-β1, TGF-β2, TGF- β3, TGF-β4, TGF-β5. Suas sequências de aminoácidos apresentam homologias na ordem de 70-80%. TGF-beta-1 é a forma prevalente e é encontrada quase em todos os lugares enquanto que outras isoformas são expressas em uma espectro mais limitado de células e tecidos. TGF-β1, TGF- β2 e TGF- β3 parece ter funções distintas na morfogênese do osso (Fagenholz et al., J Craniofacial Surg. 12:183-190, 2001). A estrutura tridimensional de TGF-β1 é descrita em Hinck et al., Biochemistry 35: 8517-8534, 1996. A estrutura tridimensional de TGF-β2 é descrita em Daopin et al., Science 257: 369-373, 1992. A estrutura tridimensional de TGF-β3 é descrita em Mittl et al., Protein Sci 5: 1261-1271, 1996.

Em uma outra modalidade da invenção, a atividade biológica do TGF-β1 liberado de géis de fibrina foi testada. A mudança da morfologia da célula tronco mesenquimal humana (HMSC) em uma forma mais quadrada

para poligonal depois da cultura em monocamadas em meios sobrenadantes de géis com TGF-β1 adicionado (isto é, em meio contendo TGF-β1 liberado) indica diferenciação celular, em paralelo a uma tendência de apresentar menor proliferação comparada às células cultivadas em meios sobrenadantes de géis sem nenhum TGF-β1 adicionado. Corante positivo Alcian blue das células cultivadas em meio sobrenadantes de géis com TGF-β1 adicionado (isto é em meio contendo TGF-β1 liberado) indica que HMSC começa a se submeter a condrogênese. Marcadores de diferenciação osteogênica precoce e tardia, isto é atividade de fosfatase alcalina (ALP) e corante Alizarin Red, respectivamente, permanecem negativos. Estas alterações na morfologia celular, proliferação e diferenciação condrogênica demonstram que TGF-β1 ainda é biologicamente ativo depois de sua liberação dos géis.

As moléculas de TGF-β usadas para a presente invenção incluem a proteína de cadeia completa, precursores da proteína, subunidades ou fragmentos da proteína, e derivados funcionais destes. Referência ao TGF-β se destina a incluir todas as formas potenciais de tais proteínas, incluindo preparações de proteína derivadas naturalmente.

De acordo com a presente invenção, o termo TGF- β recombinante não sustenta uma restrição específica e pode incluir qualquer TGF- β, heterólogo ou que ocorre naturalmente, obtido por meio de técnica de DNA recombinante, ou um derivado biologicamente ativo deste. Em certas modalidades, o termo engloba proteínas e ácidos nucléicos, por exemplo, gene, pré-RNAm, RNAm, e polipeptídeos, variantes polimórficas, alelos, mutantes, e homólogos interespécies que: (1) têm uma sequência de aminoácidos que tem mais que cerca de 60% de identidade de sequência de aminoácidos, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou mais de identidade de sequência de aminoácidos, sobre uma região de pelo menos cerca de 25, 50, 100, 200, 300, 400, ou mais aminoácidos, a um polipeptídeo TGF-β1, -β2 ou -β3 codificado por um ácido

nucléico ou uma sequência de aminoácidos referenciada aqui descrita; (2) especificamente se ligar a anticorpos, por exemplo, anticorpos policlonais, que surgem contra um imunógeno compreendendo uma sequência de aminoácidos referenciada da forma aqui descrita fragmentos imunogênicos destes, e variantes conservativamente modificados destes; (3) especificamente hibridizar em condições de hibridização severas a um ácido nucléico que codifica uma sequência de aminoácidos referenciada da maneira aqui descrita, e variantes conservativamente modificados destes; (4) ter uma sequência de ácidos nucléicos que tem mais que cerca de 95%, mais que cerca de 96%, 97%, 98%, 99%, ou maior identidade de sequência de nucleotídeos, sobre uma região de pelo menos cerca de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1.000, ou mais nucleotídeos (até a sequência de comprimento completo de 1.218 nucleotídeos da proteína madura), a uma sequência de ácidos nucléicos referência da maneira aqui descrita.

Uma sequência de polinucleotídeos ou polipeptídeos é tipicamente de um mamífero incluindo, mas sem limitações, primata, por exemplo, humano; roedor, por exemplo, rato, camundongo, hamster; vaca, porco, cavalo, ovelha ou qualquer outro mamífero. Os ácidos nucléicos e proteínas da invenção podem ser moléculas recombinantes (por exemplo, sequência heteróloga e que codifica a tipo selvagem ou uma variante deste, ou que ocorrem não naturalmente). Para a estrutura de TGF- β humano refere-se ao banco de dados Genbank mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI): TGF β-1 humano, Genbank No. de acesso NP_000651, TGF β-2 humano, Genbank No. de acesso NP_003229, TGF β-3 Genbank No. de acesso NP 003230.

A produção de TGF- β pode incluir qualquer método conhecido na técnica para (i) produção de DNA recombinante por engenharia genética, por exemplo, por meio de transcrição reversa de RNA e/ou amplificação de DNA, (ii) introdução de DNA recombinante em células

procarióticas ou eucarióticas por transfecção, por exemplo, por meio de eletroporação ou microinjeção, (iii) cultivo das ditas células transformadas, por exemplo, de uma maneira contínua ou em lotes, (iv) expressar TGF-β, por exemplo, constitutivamente e mediante indução, e (v) isolar o dito TGF-β, por exemplo, do meio de cultura ou coletar as células transformadas, de maneira a obter TGF-β purificado, por exemplo, por meio de cromatografia de troca aniônica ou cromatografia por afinidade.

O TGF-β pode ser produzido por expressão em um sistema de hospedeiro procariótico ou eucariótico adequado caracterizado pela produção de uma molécula de TGF-β farmacologicamente aceitável. Células hoepsdeiras comumente usadas incluem: células procarióticas, tais como bactérias gram negativa ou gram positivas, isto é, qualquer cepa de E. coli, Bacillus, Streptomyces, Saccharomyces, Salmonella, e similares. Exemplos de células eucarióticas são células de inseto, tais como D. Mel-2, Sf4, Sf 5, Sf9, e Sf21 e High 5; células de planta e várias células de levedura, tais como Saccharomyces e Pichia; células de mamífero, tais como células CHO (ovário de hamster chinês); células de rim de hamster bebê (BHK); células 293 de rim humano; células COS-7, HEK 293, SK-Hep, e HepG2, e outras conhecidas na técnica. Não existe limitação para os reagentes ou condições usados para produzir ou isolar TGF-β de acordo com a presente invenção, e qualquer sistema conhecido na técnica ou comercialmente disponível pode ser empregado. Em uma modalidade preferida da presente invenção, TGF-β é obtido por métodos descritos no estado da técnica.

Uma ampla variedade de vetores pode ser usada para a preparação do TGF-β e pode ser selecionado de vetores de expressão eucarióticos e procarióticos bem conhecidos na técnica. Exemplos de vetores para expressão procariótica incluem, mas sem limitações, plasmídeos, tais como pRSET, pET, pBAD, etc., em que os promotores usados nos vetores de expressão procariótica incluem lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Exemplos de

vetores para expressão eucariótica incluem, mas sem limitações: (i) expressão em levedura, vetores, tais como pAO, pPIC, pYES, pMET, usando promotores, tais como AOXl, GAP, GALl, AUGl, etc; (ii) para expressão em células de inseto, vetores, tais como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., usando promotores, tais como PH, plO, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., e (iii)ra expressão em células de mamífero, vetores, tais como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., e vetores derivados de sistemas virais, tais como vírus vaccínia, vírus associados a adeno, vírus herpes, retrovírus, etc., usando promotores, tais como CMV, SV40, EF-I, UbC, RSV, ADV, BPV, e β-actina.

Células hospedeiras contendo o DNA ou RNA que codifica o polipeptídeo são cultivadas em condições apropriadas para crescimento das células e expressão do DNA ou RNA. As células que expressam o polipeptídeo podem ser identificadas, usando métodos conhecidos, e a proteína recombinante isolada e purificada, usando métodos conhecidos; tanto com ou sem amplificação de produção de polipeptídeo. A identificação pode ser realizada, por exemplo, por meio de seleção de células de mamífero modificadas geneticamente que apresentam um fenótipo indicativo da presença de DNA ou RNA que codifica a proteína, tais como seleção de PCR, seleção por análise de Southern blot ou seleção para a expressão da proteína. A seleção das células tendo DNA que codifica proteína incorporada pode ser realizada incluindo um marcador selecionável na construção de DNA e cultivo de células transfectadas ou infectadas contendo um gene marcador selecionável em condições apropriadas para a sobrevivência somente das células que expressam o gene marcador selecionável. A amplificação adicional da construção de DNA introduzido pode ser afetada pelo cultivo de células geneticamente modificadas em condições apropriadas para amplificação (por exemplo, cultivo de células geneticamente modificadas contendo um gene de marcador amplificável na presença de uma

concentração de um medicamento na qual somente células contendo múltiplas cópias do gene de marcador amplificável podem sobreviver).

Métodos de determinar a concentração da proteína em uma amostra

Proteínas terapêuticas são frequentemente difíceis de detectar em amostras de soro devido a sua similaridade à proteína endogenamente produzida que ocorre naturalmente. Entretanto, é frequentemente benéfico determinar a quantidade de um polipeptídeo, fragmento, variante ou análogo destes terapêuticos que foi administrado para estimar se a proteína terapêutica apresenta as características desejadas, tais como maior solubilidade ou estabilidade, resistência à digestão enzimática, melhor meia vida biológica, e outras características conhecidas pelos versados na técnica. O método também permite a detecção de usos autorizados de proteínas terapêuticas que podem ser protegidas por direitos de propriedade intelectual.

A presente invenção fornece um método de detectar a liberação de TGF- β de um gel de fibrina contendo TGF-β e determinar as cinéticas de liberação da proteína. A comparação destas cinéticas de liberação de selantes de fibrina feita usando concentrações variadas do componente do complexo de fibrinogênio ajuda a determinar a taxa de liberação desejada para o propósito terapêutico. A capacidade de identificar a quantidade de proteína liberada do selante de fibrina com o tempo ajuda na determinação terapêutica ideal com base na meia vida, absorção, estabilidade, etc. O ensaio de detecção pode ser um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), um radioimunoensaio (RIA), um ensaio de proximidade de cintilação (SPA), ressonância de plasma de superfície (SPR), ou outros ensaios de ligação conhecidos na técnica.

No geral, para detectar a presença de TGF- β em uma amostra, o TGF- β é ligado a um agente de ligação de TGF-β, tais como um anticorpo, receptor solúvel ou outra proteína ou agente que liga TGF-β.

Para a etapa de detecção, a proteína TGF-β pode estar ligada a

uma fração detectável ou uma marca detectável. Fração ou marca detectável refere-se a uma composição detectável por meios espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, imunoquímico ou químico. A fração detectável frequentemente gera um sinal mensurável, tais como um sinal radioativo, cromogênico ou fluorescente, que pode ser usado para quantificar a quantidade de fração detectável ligada em uma amostra. A fração detectável pode ser incorporada ou anexada à proteína tanto covalentemente quanto por meio de ligações iônica, de van der Waals ou de hidrogênio, por exemplo, incorporação de nucleotídeos radioativos, ou nucleotídeos biotinilados que são reconhecidos por estreptavidina. A fração detectável pode ser direta ou indiretamente detectável. A detecção indireta pode envolver a ligação de uma segunda fração detectável direta ou indiretamente à fração detectável. Por exemplo, a fração detectável pode ser o ligante de um par de ligação, tal como biotina, que é um par ligante para estreptavidina. O par ligante pode em si ser diretamente detectável, por exemplo, um anticorpo pode ser marcado com uma molécula fluorescente. A seleção de um método de quantificação do sinal é alcançada, por exemplo, por contagem de cintilação, densitometria ou citometria de fluxo.

Exemplos de marcas adequadas para uso nos métodos de ensaio da invenção incluem, marcas radioativas, fluoróforos, reagentes densos em elétron, enzimas (por exemplo, da forma comumente usada em um ELISA), biotina, digoxigenina, ou haptenos, bem como proteínas que podem se tornar detectáveis, por exemplo, pela incorporação de uma radiomarca no hapteno ou peptídeo, ou usados para detectar anticorpos especificamente reativos com o hapteno ou peptídeo. Também contempladas são proteínas para as quais o antisoro ou anticorpos monoclonais são disponíveis, ou moléculas de ácido nucléico com uma complementariedade de sequência a um alvo, uma nanoetiqueta, uma conta de massa molecular, um agente magnético, uma nano ou microconta contendo um corante fluorescente, um

ponto quantum, uma conta de quantum, uma proteína fluorescente, dendrímeros com uma marca fluorescente, um microtranspondor, uma molécula doadora de elétron ou estrutura molecular ou uma partícula que reflete a luz.

Marcas adicionais contempladas para uso com a presente invenção incluem, mas sem limitações, corantes fluorescentes (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína, vermelho do Texas, rodamina e similares), radiomarcas (por exemplo, $^{3}H$, $^{125}I$, $^{35}S$, $^{14}C$, ou $^{32}P$), enzimas (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, fosfatases alcalinas e outras comumente usadas em um ELISA), e marcas colorimétricas, tais como ouro coloidal, vidro colorido ou contas de plástico (por exemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.), e marcas luminescentes ou quimioluminescentes (por exemplo, Europium (Eu), MSD Sulfo-Tag).

A marca pode ser acoplada direta ou indiretamente ao componente desejado do ensaio de acordo com métodos bem conhecidos na técnica. Em uma modalidades específica, a marca é covalentemente ligada ao componente usando um reagente de isocianato ou éster de N-hidroxisuccinimida para conjugação de um agente ativo de acordo com a invenção. Em um aspecto da invenção, reagentes de isocianato bifuncionais são usados para conjugar uma marca a um biopolímero para formar uma marca de biopolímero conjugada sem um agente ativo anexado a ele. A marca de biopolímero conjugada pode ser usada como um intermediário para a síntese de um conjugado marcado de acordo com a invenção ou pode ser usado para detectar o conjugado de biopolímero. Da forma indicada anteriormente, uma ampla variedade de marcas pode ser usada, com a escolha da marca dependendo da sensibilidade requerida, facilidade de conjugação com o componente desejado do ensaio, requerimentos de estabilidade, instrumentação disponível e condições de descarte. Marcas não radioativas são frequentemente anexadas por meios indiretos. No geral, uma molécula

ligante (por exemplo, biotina) é covalentemente ligada à molécula. O ligante então se liga a outras moléculas (por exemplo, estreptavidina), que é tanto inerentemente detectável quanto covalentemente ligado a um sistema de sinal, tais como uma enzima detectável, um composto fluorescente ou um composto quimioluminescente.

Os compostos usados no método da invenção também podem ser conjugados diretamente aos compostos que geram sinal, por exemplo, por conjugação com uma enzima ou fluoróforo. Enzimas adequadas para uso como marcas incluem, mas sem limitações, hidrolases, particularmente fosfatases, esterases e glicosidases, ou oxidotases, particularmente peroxidases. Compostos fluorescentes adequados para uso como marcas incluem, mas sem limitações, os listados anteriormente, bem como derivados de fluoresceína, rodamina e seus derivados, dansila, umbelliferona, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarelo de acridina, lissamina rodamina, eritrosceína de cloreto de sulfonila B, rutênio (tris, bipiridínio), európio, Texas Red, nicotinamida adenina dinucleotídeo, flavina adenina dinucleotídeo, etc. Compostos quimioluminescentes adequados para uso como marcas incluem, mas sem limitações, MSD Sulfa- TAG, Európio (Eu), Samário (Sm), luciferina e 2,3-diidroftalazinodionas, por exemplo, luminol. Para uma revisão de vários sistemas que produzem marca ou sinal que podem ser usados nos métodos da presente invenção, ver patente U.S. No. 4.391.904.

Meios para detectar marcas são bem conhecidos pelos versados na técnica e são impostos pelo tipo de marca a ser detectada. Assim, por exemplo, onde a marca é radioativa, meios para detecção incluem um contador de cintilação (por exemplo, radioimunoensaio, ensaio de proximidade de cintilação) (Pitas et al., Drug Metab Dispos. 34:906-12, 2006) ou filme fotográfico, como em autorradiografia. Onde a marca é uma marca fluorescente, ela pode ser detectada excitando o fluorocromo com o comprimento de onda apropriado de luz e detectando a fluorescência

resultante (por exemplo, ELISA, citometria de fluxo, ou outros métodos conhecidos na técnica). A fluorescência pode ser visualmente detectada, pelo uso de detectores eletrônicos, tais como dispositivos acoplados à carga (CCDs) ou fotomultiplicadores e similares. Similarmente, marcas enzimáticas podem ser detectadas fornecendo os substratos apropriados para a enzima e detectando o produto de reação resultante. Marcas colorimétricas ou quimioluminescentes podem ser detectadas simplesmente observando a cor associada à marca. Outros sistemas de marcação ou detecção adequados para uso nos métodos da presente invenção serão prontamente evidentes pelos versados na técnica. Tais moduladores e ligantes marcados podem ser usados na diagnose de uma doença ou condição de saúde.

O método opcionalmente inclui pelo menos uma ou mais etapas de lavagem, em que a composição de TGF-β ligado é lavada antes de medir a ligação da proteína para reduzir medições de fundo causadas por polipeptídeos não ligados. A lavagem do TGF-β depois da incubação da composição de polipeptídeo e antes da detecção de TGF-β é realizada em tampão apropriado mais detergente. Detergentes adequados incluem, mas sem limitações, óxidos de alquildimetilamina, alquil glucosídeos, alquil maltosídeos, alquil sulfatos (tal como dodecil sulfato de sódio (SDS)), NP-40, alquil tioglucosídeos, betaínas, ácidos biliares, série de CHAP, digitonina, glucamidas, lecitinas/lisolecitinas, detergentes a base de polioxietileno não iônicos, incluindo TRITON-X, polissorbatos, tais como TWEEN® 20 e TWEEN® 80, BRIJ®, GENAPOL® e THESIT®, compostos de amônio quaternários e similares. Ver também Current Protocols in Protein Science, Appendix IB, Suppl. 11, 1998, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. Detergentes adequados podem ser determinados usando experimentação de rotina (ver Neugebauer, J., A Guide to the Properties and Use of Detergents in Biology and Biochemistry, Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, Calif., 1988).

Métodos para administrar o selante de fibrina

Contempla-se que o selante de fibrina usado na invenção é administrado a um sujeito usando técnicas bem conhecidas na técnica, por exemplo, por injeção ou aspersão no sítio desejado, endoscopicamente, usando um carreador tipo esponja, selante preparado ou outros métodos conhecidos na técnica. Em uma modalidade, o selante é injetado ou aspergido e forma naturalmente um gel in situ.

Estes selantes de fibrina são contemplados para a administração aos sujeitos que se beneficiariam da liberação prolongada/ controlada de TGF-β in vivo, conforme evidente para um versado na técnica incluindo, mas sem limitações as condições apresentadas a seguir. Em uma modalidade, o paciente sofre de uma doença muscoloesquelética, incluindo, mas sem limitações, doenças dos músculos, ligamentos associados, outros tecidos conectivos, e dos ossos e cartilagem; uma doença ou distúrbio do tecido mole incluindo, mas sem limitações, distúrbios que afetam os músculos, tecido fibroso, gordura, vasos sanguíneos e tecidos sinoviais ou uma doença cardiovascular.

Em uma modalidade, os selantes de fibrina servem como uma substituição para enxertos ósseos, e assim podem ser aplicados em muitas das mesmas indicações incluindo, mas sem limitações, gaiolas de fusão espinhal, cicatrização de defeitos de não união, aumento ósseo, aceleração do reparo da fratura óssea, reconstrução do tecido ósseo e regeneração dentária. Adicionalmente, em uma outra modalidade, os selantes podem ser usados na integração de implante. Na integração de implanta, implantes podem ser revestidos com um selante de fibrina que induz a área óssea vizinha a crescer na superfície do implante e prevenir a perda e outros problemas associados. Em uma outra modalidade, matrizes enriquecidas com fator de crescimento podem ser usadas para cicatrizar feridas crônicas na pele.

Distúrbios ou condições ósseos ou de cartilagem adicionais

incluem, mas sem limitações, osteoartrite, osteoporose, osteodistrofia, raquitismo, osteomalácia, síndrome de McCune-Albright, doença de Albers-Schonberg, doença de Paget, artrite reumatóide, osteoartrite, lesão da cartilagem, osteólise periprostética, osteogênese imperfeita, doença óssea metastática, osteocondroma, osteogênese, osteomielite, osteopatia, osteopetrose, osteosclerose, policondrite, injúrias de cartilagem articular, condrocalcinose, condrodisplasias, condromalácia da patela, condrossarcoma, costocondrite, encondroma, hálux rígido, injúrias do menisco, lágrima labral de depressão, osteocondrite dissecans (ocd), policondrite reincidente ou qualquer condição que se beneficia do estímulo da formação óssea ou da cartilagem.

Distúrbios do tecido conectivo adicionais incluem, mas sem limitações, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, escleroderma, cutis laxa, doença de Dupuytren, escleroderma limitada, doença do tecido conectivo mista, síndrome de Stickler e outras doenças do tecido conectivo.

O selante de fibrina compreendendo uma proteína TGF também é usada para tratar doenças ou condições do tecido mole incluindo, mas sem limitações, tendonite, bursite, síndrome miofascial, doenças reumáticas que afetam o tecido mole, síndrome de Tietze, costocondrite, fasciite, entesite, distúrbios estruturais, sarcoma e outras condições que afetam o tecido mole.

O selante de fibrina compreendendo uma proteína TGF também é usada para tratar doenças ou condições cardiovasculares incluindo, mas sem limitações, isquemia/reperfusão, infarte do miocárdio, falha cardíaca congestiva, aterosclerose, hipertensão, restenose, inflamação arterial, doença da artéria coronária (CAD), acidente vascular, calcificação do vaso ou do coração, trombose, doença vascular periférica, remodelamento da parede vascular, remodelamento ventricular, ritmo ventricular rápido, microembolismo coronário, taquicardia, bradicardia, sobrecarga de pressão,

dobramento aórtico, ligação da artéria coronária, doença cardíaca vascular, doença valvular incluindo, mas sem limitações, degeneração valvular causada por calcificação, doença cardíaca reumática, endocardite, ou complicações das válvulas artificiais; fibrilação atrial, síndrome de QT longo, disfunção do nodo do sinus, angina, falha cardíaca, hipertensão, fibrilação atrial, palpitação atrial, doença pericardial incluindo, mas sem limitações, efusão pericardial e pericardite; cardiomiopatias cardíacas de hipertrofia ou distúrbios de desenvolvimento cardiovascular.

Kits

Kits também são contemplados no escopo da invenção. Um kit típico pode compreender um selante de fibrina compreendendo um FC e um componente de trombina. Em uma modalidade o kit adicionalmente compreende uma proteína TGF- β para incorporação no selante de fibrina. Em um aspecto, cada componente pode ser incluído no seu próprio recipiente, frasco ou vaso de armazenamento separado. Em um aspecto relacionado, o TGF-β pode ser em mistura com o componente FC e o componente de trombina pode ser em um recipiente de armazenamento separado. Em uma modalidade relacionada, o recipiente de armazenamento é um frasco, uma garrafa, um saco, um reservatório, tubo, ampola, bolsa, adesivo ou similares. Um ou mais dos constituintes da formulação podem ser liofilizados, secos por congelamento, secos por congelamento por aspersão ou em qualquer outra forma reconstituível. Vários meios de reconstituição podem adicionalmente ser fornecidos se desejado.

Os componentes do kit podem ser tanto na forma congelada, líquida ou liofilizada. Adicionalmente contempla-se que o kit contém dispositivos adequados para administrar o gel de fibrina a um sujeito. Em uma modalidade adicional, o kit também contém instruções para preparar e administrar o selante de fibrina.

Aspectos e detalhes adicionais da invenção ficarão evidentes a

partir dos seguintes exemplos, que se destinam a ser ilustrativos em vez de limitantes.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Materiais e Métodos

Oito formulações diferentes de géis de fibrina (TISSEEL VH™ ou VH S/D™) (S/D sendo uma etapa de inativação de vírus adicionada para fornecer segurança adicionada), Baxter AG, Vienna, Áustria) foram preparadas usando diferentes concentrações de FC e Trombina, de 5-40 mg/mL e 2-250 IU/mL, respectivamente (concentrações finais nos géis). Géis de fibrina (0,3 mL total) foram preparados em placas de cultura de 24 poços. O componente FC continha aprotinina, um inibidor de fibrinólise, a 3.000 KIU/mL.

TGF-β 1 recombinante humano (rh) (R&D Systems) a 5 a 40 ng/0,3 mL de gel, ou rhTGF-β2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) a 15 ng/0,3 mL de gel, ou rhTGF-β3 (R&D Systems) a 15 ng/0,3 mL de gel, foi adicionado no componente FC no tempo de preparação do gel. Todos os géis foram incubados a 37 °C em 5% de $CO_2$ por até 10 dias com meio de crescimento HMSC padrão (Lonza Walkersville Inc, formerly Cambrex Bio Science Walkersville Inc., Walkersville, MD). O meio foi alterado todo dia. Amostras do meio foram congeladas até que testadas para a quantidade de TGF-β por ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) (R&D Systems). De maneira a verificar a recuperação completa do TGF-β1 inicialmente adicionado, alguns géis foram dissolvidos usando uroquinase depois dos 10 dias de incubação e sobrenadantes também foram testados por ELISA.

Diferentes cinéticas de liberação foram conduzidos:

1. Os efeitos da quantidade de TGF-β1 na cinética de liberação foram analisados usando uma formulação de gel de fibrina única

(concentração FC de 25 mg/mL e concentração de Trombina 2 IU/mL, concentrações finais no gel) feita de TISSEEL VH™.

2. Os efeitos da concentração de FC com uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL, concentração final nos géis) na cinética de liberação de TGF-β1 foram analisados usando quatro diferentes concentrações de FC de TISSEEL VH™.

3. Os efeitos da concentração de FC com uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL, concentração final nos géis) na cinética de liberação de TGF-β1 foram analisados usando quatro diferentes concentrações de FC de TISSEEL VH S/D™.

4. Os efeitos da concentração de trombina com uma concentração fixa de FC (25 mg/mL, concentração final nos géis) na cinética de liberação de TGF-β1 foram analisados usando quatro diferentes concentrações de trombina de TISSEEL VH™.

5. Os efeitos de vários números de lote de TISSEEL VH™ ou TISSEEL VH S/D™ na cinética de liberação de TGF-β1 foram analisados usando uma formulação de gel de fibrina única (concentração de FC de 20 mg/mL e concentração de trombina de 2 IU/mL, concentrações finais nos géis).

6. Os efeitos da concentração de FC com uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL, concentração final nos géis) nas cinéticas de liberação de TGF-β2 foram analisados usando quatro diferentes concentrações de FC de TISSEEL VH™.

7. Os efeitos da concentração de FC com uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL, concentração final nos géis) nas cinéticas de liberação de TGF-β3 foram analisados usando quatro diferentes concentrações de FC de TISSEEL VH™.

Os efeitos de TGF-β1 (15 ng/0,3 mL de gel) adicionado em géis de fibrina em HMSC semeado na superfície do gel foram analisados por

microscopia fluorescente. Géis sem TGF-β1 adicionado em FC foram usados como controle. Cerca de 10.000 HMSC (Lonza Walkersville Inc.) foram semeados no topo dos géis preparados em placas de 24 poços, com uma concentração de FC de 5-40 mg/mL e uma concentração de trombina de 2-250 IU/mL (concentrações finais nos géis). Géis com células foram corados com corante calceína/brometo de etídio nos dias 1, 4, 7 e 10 de maneira a observar a morfologia e migração das células na presença ou ausência de TGF-β1 adicionado nos géis.

De maneira a testar a atividade biológica do TGF-β1 liberado, meios sobrenadante de géis no dia 3 (inicialmente não contendo nenhum TGF-β1 adicionado (controle) ou uma adição de 15 ng de TGF-β1/0,3 mL de gel, preparado com 20 mg/mL de FC e 2 IU/mL de trombina (concentrações finais nos géis)) foram usados como meio de cultura para monocamadas de HMSC. Células cultivadas em meio contendo TGF-β1 recém preparado adicionadas serviram como controle positivo. Mudanças na morfologia da célula em até 7 dias foram analisados por luz e microscopia fluorescente depois da coloração com corante calceína. A proliferação celular também foi analisada depois da coloração com corante calceína medindo a intensidade de fluorescência geral (medida por densidade ótica) nas monocamadas celulares. Os resultados foram normalizados no dia 1. A diferenciação celular foi analisada por coloração Alcian Blue, usada para mostrar a presença de glicoaminoglicanas (para condrogênese), e atividade de fosfatase alcalina (ALP), bem como coloração Alizarin Red (para osteogênese). Os resultados da atividade ALP (primeiramente calculados em IU/mL) foram normalizados na proliferação. Alguns dos géis foram preparados sem nenhum TGF-β1 adicionado para amostras de controle de maneira a garantir que qualquer mudança observada com meios sobrenadante de géis com TGF-β1 adicionado fossem de fato induzidas pelo TGF-β1 liberado e não por algum outro componente bioativo que pode ser liberado dos géis em si.

Finalmente, de maneira a analisar os efeitos de TGF-β1 no comportamento de HMSC semeado em géis de fibrina e células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVEC, Lonza Walkersville Inc.) semeadas na superfície do gel, géis contendo 10 mg/mL de FC e 2 IU/mL de trombina (concentrações finais nos géis) foram preparados com células de cultura única (HMSC ou HUVEC) ou células de co-cultura em uma razão de HMSC:HUVEC de 4:1. TGF-β1 humano recombinante (5 ng/0,3 mL de gel, R&D Systems) foi adicionado no FC na metade dos géis de co-cultura na hora da preparação do gel. Géis foram incubados a 37 °C em 5% de $CO_2$ por até 21 dias usando um meio de cultura de crescimento de célula endotelial padrão (Lonza Walkersville Inc.) com um suplemento de soro. A análise da morfologia e proliferação celular, bem como diferenciação osteogênica, foi realizada nos dias 1, 7, 14 e 21. A morfologia celular incluindo a reorganização de HUVEC em redes célula-célula interconectadas (eventos precoces de diferenciação angiogênica) foi observada por microscopia fluorescente depois da coloração com corante calceína. A proliferação celular foi medida pela intensidade fluorescente das suspensões celulares depois de dissolver os géis de fibrina em uma solução de tripsina bovina concentrada purificada. Finalmente, a atividade ALP foi medida como um marcador precoce da diferenciação osteogênica. Análise estatística foi realizada usando o teste ANOVA com 5% como o nível de significância.

EXEMPLO 2 - Cinéticas de liberação de TGF-β1 adicionado em diferentes quantidades em géis de fibrina

Os efeitos da quantidade de TGF-β1 na suas cinéticas de liberação de géis de fibrina foram analisados usando uma formulação de gel de fibrina única (concentração de FC de 25 mg/mL e concentração de trombina de 2 IU/mL, concentração final nos géis) feita de TISSEEL VH™. Análise dos efeitos da quantidade de TGF-β1 na liberação de TGF-β1 diária (Figura 1) e cumulativa (Figura 2) dos géis mostrou que o nível de liberação

de TGF-β1 foi proporcional à quantidade de fator de crescimento inicialmente adicionada ao componente FC. No geral, os resultados com esta formulação de gel de fibrina mostraram que somente cerca de 45% a 52% do TGF-β1 inicialmente adicionado foi liberado depois de 10 dias (Figura 2). Em outras palavras, cerca de 48% a 55% do TGF-β1 inicialmente adicionado foi retido nos géis de fibrina depois de 10 dias. Considerando-se a liberação cumulativa de TGF-β1 depois de somente 3 dias, a retenção mínima foi cerca de 80%.

EXEMPLO 3 - Cinéticas de liberação de TGF-β1 de géis de fibrina com concentrações variadas de FC ou trombina

Efeitos da concentração de FC com uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL) (TISSEEL VH) nas cinéticas de liberação de TGF-β1:

Para determinar os efeitos da concentração de FC nas cinéticas de liberação de TGF-β1 usando Selante de fibrina TISSEEL VH™, liberação foi analisada usando géis tendo uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL) sobre quatro diferentes concentrações de FC (5, 10, 20 e 40 mg/mL, concentrações finais nos géis) de TISSEEL VH.

Análise da liberação diária de TGF-β1 por ELISA mostrou uma liberação aumentada no dia 1 e uma diminuição na liberação até o dia 10 para todas as concentrações de FC analisadas (Figura 3). A liberação foi significativamente maior com géis contendo menores concentrações de FC, indicando um efeito da concentração de FC na cinética de liberação, e uma afinidade de ligação potencial de TGF-β1 com as proteínas do componente FC dos géis de fibrina. A liberação cumulativa de TGF-β1 no dia 10 também foi menor que a quantidade inicial adicionada do fator de crescimento (15 ng), com uma porcentagem máxima de liberação cumulativa de cerca de 75% (com 5 mg/mL de FC), e um mínimo de cerca de 25% (com 40 mg/mL de FC) (Figura 4). Desta forma, estes resultados mostraram uma retenção mínima de cerca de 25% (com 5 mg/mL de FC) e uma retenção máxima de cerca de 75% (com 40 mg/mL de FC) depois de 10 dias. Considerando-se a

liberação cumulativa de TGF-β1 depois de somente 3 dias, a retenção mínima foi cerca de 60% (com 5 mg/mL de FC) e a retenção máxima de cerca de 90% (com 40 mg/mL de FC).

Efeitos da concentração de FC com uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL)) (TISSEEL VH S/D™) nas cinéticas de liberação de TGF-β1: Para determinar os efeitos da concentração de FC nas cinéticas de liberação de TGF-β1 usando Selante de fibrina TISSEEL VH S/D™, a liberação foi analisada usando géis tendo uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL) sobre quatro diferentes concentrações de FC (5, 10, 20 e 40 mg/mL, concentrações finais nos géis) de TISSEEL VH S/D™.

Análise da liberação diária de TGF-β1 por ELISA mostrou uma liberação aumentada no dia 1 e uma diminuição na liberação até o dia 10 para todas as concentrações de FC analisadas (Figura 5). A liberação foi significativamente maior com géis contendo menores concentrações de FC, indicando um efeito da concentração de FC nas cinéticas de liberação, e uma afinidade de ligação potencial de TGF-β1 com as proteínas do componente FC dos géis de fibrina. A liberação cumulativa de TGF-β1 no dia 10 alcançou cerca de 70% (com 40 mg/mL de FC) a quase 100% (mais que 93%) com as duas menores concentrações de FC (5 mg/mL e 10 mg/mL, concentrações finais nos géis) (Figura 6). Desta forma, a retenção máxima foi cerca de 30% (com 40 mg/mL de FC) depois de 10 dias. Considerando-se a liberação cumulativa de TGF-β1 depois de somente 3 dias, a retenção mínima foi cerca de 35% (com 5 mg/mL de FC) e a retenção máxima de cerca de 75% (com 40 mg/mL de FC).

Efeitos da concentração de trombina com uma concentração fixa de FC (25 mg/mL) na liberação de TGF-β1 (TISSEEL VH™): Para determinar os efeitos da concentração de trombina nas cinéticas de liberação de TGF-β1, liberação foi analisada usando géis tendo uma concentração fixa de FC (25 mg/mL) sobre quatro diferentes concentrações de trombina (2, 10,

50, 250 IU/mL, concentrações finais nos géis) de TISSEEL VH.

Análise da liberação diária de TGF-β1 por ELISA mostrou uma liberação aumentada no dia 1 e uma diminuição na liberação até o dia 10 para todas as concentrações de trombina analisadas (Figura 7). A liberação foi similar com 2, 10 e 50 IU/mL de trombina (cerca de 15% de liberação (isto é 85% de retenção) depois de 3 dias, e cerca de 35% de liberação (isto é 65% de retenção) depois de 10 dias), sugerindo que a concentração de trombina tem um menor efeito que a concentração de FC na liberação de TGF-β1. A liberação de TGF-β1 foi somente significativamente maior com a maior concentração de trombina ( 250 IU/mL) mais provavelmente em virtude de uma estrutura mais heterogênea dos géis com uma concentração de trombina alta como esta. Similar aos efeitos de FC, a liberação cumulativa de TGF-β1 no dia 10 foi menor que a quantidade inicial adicionada do fator de crescimento (Figura 8).

Efeitos da variação dos números de lote de TISSEEL VH™ ou TISSEEL VH S/D™ na liberação de TGF-β1: Os efeitos da variação dos números de lote de TISSEEL VH™ ou TISSEEL VH S/D™ nas cinéticas de liberação de TGF-β1 foram analisados usando uma formulação de gel de fibrina única (concentração de FC de 20 mg/mL e concentração de trombina de 2 IU/mL, concentrações finais nos géis).

Análise dos efeitos da variação do número de lote de FC de TISSEEL VH™ mostrou uma liberação cumulativa de cerca de 32% a liberação completa dependendo do número de lote, depois de 10 dias (Figura 9). Em outras palavras, resultados mostraram retenção insignificante a uma retenção máxima de 68% dependendo do número do lote, depois de 10 dias. Estes resultados corroboraram com o teor de fator XIII nestes diferentes lotes, a menor% de liberação (isto é maior retenção) sendo obtida com o número de lote contendo a maior quantidade do fator XIII (lote 1 continha < 1 U/mL do fator XIII, lote 2 continha 33,9 U/mL e lote 3 continha 42,2 U/mL).

Considerando-se a liberação cumulativa de TGF-β1 depois de somente 3 dias, a retenção mínima foi cerca de 43% (com lote 1) e a retenção máxima de cerca de 85% (com lote 3).

Análise dos efeitos da variação do número de lote de FC de TISSEEL VH S/D™ mostrou uma liberação cumulativa de cerca de 80% a liberação completa dependendo do número de lote, depois de 10 dias (Figura 10). Desta forma, os resultados mostraram uma retenção insignificante a uma retenção máxima de 20% dependendo do número deo lote, depois de 10 dias. O teor do fator XIII nestes lotes foi menor que 3 U/mL. Considerando-se a liberação cumulativa de TGF-β1 depois de somente 3 dias, a retenção mínima foi cerca de 57% (com lote 1) e a retenção máxima de cerca de 67% (com lote 3).

EXEMPLO 4 -Cinéticas de liberação de outras isoformas de TGF-β (TGF-β2 e TGF- β3)

Cinéticas de liberação de TGF-β2: Os efeitos da concentração de FC nas cinéticas de liberação de TGF-β2 de Selante de fibrina TISSEEL VH™ foram analisados usando géis tendo uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL) sobre quatro diferentes concentrações de FC (5, 10, 20 e 40 mg/mL, concentrações finais nos géis) of TISSEEL VH™.

Resultados de ELISA mostraram que a liberação cumulativa de TGF- β2 foi significativamente maior com géis contendo menores concentrações de FC, pelo menos em pontos de tempo precoces, indicando um efeito da concentração de FC nas cinéticas de liberação de TGF-β2, e uma afinidade de ligação potencial de TGF-β2 com as proteínas do componente FC dos géis de fibrina. No dia 10, a liberação atingiu 85% (com 40 mg/mL de FC) a 100% de com as outras formulações contendo menores concentrações de FC. Em outras palavras, estes resultados mostraram uma retenção máxima de cerca de 15% (com 40 mg/mL de FC) depois de 10 dias. Considerando-se a liberação cumulativa de TGF-β2 depois de somente 3 dias, a retenção

mínima foi cerca de 25% (com 5 mg/mL de FC) e a retenção máxima de cerca de 70% (com 40 mg/mL de FC).

Cinéticas de liberação de TGF-β3: Os efeitos da concentração de FC nas cinéticas de liberação de TGF-β3 de Selante de fibrina TISSEEL VH™ foram analisados usando géis tendo uma concentração fixa de trombina (2 IU/mL) sobre quatro diferentes concentrações de FC (5, 10, 20 e 40 mg/mL, concentrações finais nos géis) de TISSEEL VH™.

Resultados de ELISA mostraram que a liberação cumulativa de TGF- β3 foi significativamente maior com géis contendo menores concentrações de FC, indicando um efeito da concentração de FC nas cinéticas de liberação de TGF-β3, e uma afinidade de ligação potencial de TGF-β3 com as proteínas do componente FC dos géis de fibrina. A liberação cumulativa de TGF-β3 no dia 10 também foi menor que a quantidade inicial adicionada do fator de crescimento, com uma porcentagem máxima de liberação cumulativa de cerca de 75% (com 5 mg/mL de FC), e um mínimo de cerca de 30% (com 40 mg/mL de FC). Em outras palavras, estes resultados mostraram uma retenção mínima de cerca de 25% (com 5 mg/mL de FC) e uma retenção máxima de cerca de 70% (com 40 mg/mL de FC) depois de 10 dias. Considerando-se a liberação cumulativa de TGF-β3 depois de somente 3 dias, a retenção mínima foi cerca de 55% (com 5 mg/mL de FC) e a retenção máxima de cerca de 90% (com 40 mg/mL de FC).

EXEMPLO 5 – Efeitos de TGF-β1 na HMSC semeado na superfície dos géis de fibrina:

Células tronco mesenquimais humanas (HMSC) são células progenitoras pluripotentes que podem se diferenciar em tipos de célula de tecido especializado diferente incluindo condrócitos, osteoblastos, adipócitos e miócitos (Caplan AI, J Orthop Res 9: 641- 650, 1991). O comprometimento e diferenciação destas células são modulados por uma variedade de fatores, incluindo interações celulares, mas também fatores de crescimento

específicos. Membros da família TGF- β de fatores de crescimento foram identificados como reguladores da maturação de MSC. Em particular, TGF-β1 está envolvido no desenvolvimento de cartilagem e osso, mais provavelmente induzindo a diferenciação de MSC na linhagem condrogênica ou osteogênica (Centrella et al., Endocrine Rev, 15: 27-39, 1994). Além do mais, TGF-β1 é um importante fator angiogênico envolvido nos diferentes aspectos de angiogênese, um processo crítico durante o crescimento ósseo. Muitos estudos foram reportados na importância do caminho de sinalização de TGF- β na angiogênese e remodelamento vascular (Bertolino et al., Chest 128: 6, 2005). Finalmente, TGF-β mostrou exercer um papel importante na morfogênese capilar e na manutenção da integridade da parede do vaso (Pepper MS. Cytokine & Growth Factor Reviews 8(1): 21-43, 1997).

Os efeitos de TGF-β1 (15 ng/0,3 mL de gel) adicionado em géis de fibrina em HMSC semeadas na superfície do gel foram analisados por microscopia fluorescente. Géis sem TGF-β1 adicionado em FC foram usados como controles. Cerca de 10.000 HMSC (Lonza Walkersville Inc.) foram semeadas no topo dos géis preparados em placas de 24 poços, com uma concentração de FC de 5-40 mg/mL e uma concentração de trombina de 2-250 IU/mL (concentrações finais nos géis). Géis com células foram corados com corante calceína/brometo de etídio nos dias 1, 4, 7 e 10 de maneira a observar a morfologia e migração das células na presença ou ausência de TGF-β1 adicionado nos géis.

Análise de microscopia fluorescente dos géis com HMSC semeadas na superfície do gel mostrou que HMSC proliferou bem e formou uma monocamada em até 7, para todas as formulações de gel analisadas, com ou sem a adição de TGF-β1 nos géis. Os resultados também mostraram que TGF-β1 adicionado nos géis de fibrina influenciou a morfologia e migração de HMSC nos géis quando cultivados na superfície do gel. De fato, células apresentaram uma forma alongada nos géis preparados sem nenhum TGF-β1

adicionado, mas tinham uma forma mais quadrada a poligonal quando semeadas na superfície dos géis preparados com TGF-β1 adicionado. A forma mais quadrada a poligonal do MSC na presença de TGF-β1 adicionado nos géis indica sua diferenciação no fenótipo osteogênico e/ou condrogênico. Também, algumas células migraram para dentro dos géis preparados sem nenhum TGF-β1 adicionado, enquanto que elas permaneceram a maioria na superfície dos géis preparados com TGF-β1 adicionado.

A ausência de migração celular dentro dos géis preparados com TGF-β1 adicionado indica a capacidade dos géis de fibrina de distribuir TGF-β1 às células semeadas nos géis. Por meio de um gel de fibrina da invenção, TGF-β1 pode ser distribuído para as células na área ao redor em um cenário in vivo.

EXEMPLO 6 - Atividade biológica de TGF-β1 liberado em monocamadas de HMSC in vitro

De maneira a testar a atividade biológica do TGF-β1 liberado, meio sobrenadantes de géis no dia 3 (inicialmente não contendo nenhum TGF-β1 adicionado (controle) ou uma adição de 15 ng de TGF-β1/0,3 mL de gel preparado com 20 mg/mL de FC e 2 IU/mL de trombina, concentrações finais nos géis) foram usados como meio de cultura para monocamadas de HMSC. Células cultivadas em meio contendo TGF-β1 recém preparado adicionado serviram como controle positivo. Mudanças na morfologia da célula em até 7 dias foram analisados por luz e microscopia fluorescente depois de coloração com corante calceína. A proliferação celular também foi analisada depois da coloração com corante calceína medindo a intensidade fluorescente geral (medida por densidade ótica) das monocamadas de célula. Os resultados foram normalizados no dia 1. A diferenciação celular foi analisada por coloração Alcian Blue, usada para mostrar a presença de glicoaminoglicanas (para condrogênese), e atividade de fosfatase alcalina (ALP), bem como coloração Alizarin Red (para osteogênese). Os resultados

da atividade ALP (primeiramente calculada em IU/mL) foram normalizados em proliferação. Alguns dos géis foram preparados sem nenhum TGF-β1 adicionado para amostras de controle de maneira a garantir que quaisquer mudanças observadas com meios sobrenadantes de géis com TGF-β1 adicionado foram de fato induzidas pelo TGF-β1 liberado e não por algum outro componente bioativo que pode ser liberado dos géis em si.

Monocamadas de HMSC cultivadas em meios sobrenadantes de géis com TGF-β1 adicionado (isto é em meio contendo TGF-β1 liberado) no dia 3 mostraram uma mudança na morfologia até no dia 4 e ainda mais pronunciado no dia 7. Elas tinham uma forma mais quadrada a poligonal que as cultivadas em meios sobrenadantes de géis sem nenhum TGF-β1 adicionado, e uma forma similar às cultivadas em meio contendo TGF-β1 recém preparado adicionado (controle positivo).

A proliferação celular nos dias 4 e 7 foi normalizada na proliferação no dia 1 (linha de base). A proliferação das células cultivadas em meios sobrenadantes de géis com TGF-β1 adicionado (isto é em meio contendo TGF-β1 liberado) tendeu a ser menor que a das células cultivadas em meios sobrenadantes de géis sem nenhum TGF-β1 adicionado, e similar a uma das células cultivadas em meio com TGF-β1 recém preparado adicionado (Figura 11).

A mudança da morfologia de HMSC em uma forma mais quadrada para poligonal depois da cultura em monocamadas em meios sobrenadantes de géis com TGF-β1 adicionado (isto é, em meio contendo TGF-β1 liberado) indica diferenciação celular, em paralelo a uma tendência a apresentar menor proliferação comparada a células cultivadas em meios sobrenadantes de géis sem nenhum TGF-β1 adicionado.

Diferenciação celular nos fenótipos condrogênicos ou osteogênicos foi acessada por coloração com Alcian blue (para condrogênese) e atividade ALP, bem como Alizarin Red (para osteogênese). Coloração

Alcian blue aumentou com o tempo em HMSC cultivadas em meios sobrenadantes de géis com TGF-β1 adicionado (isto é em meio contendo TGF-β1 liberado), e no dia 7, a quantidade de coloração foi significativamente maior que a em HMSC cultivadas em meio sobrenadantes de géis sem nenhum TGF-β1 adicionado e similar a um em HMSC cultivadas em meio com TGF-β1 recém preparado adicionado. Coloração Alizarin Red permaneceu negativa em todas as amostras. A atividade ALP diminuiu entre os dias 4 e 7 nas HMSC cultivadas em meios sobrenadantes de géis com TGF-β1 adicionado (Figura 12). Ele foi significativamente menor que o nível detectado em HMSC cultivados em meios sobrenadantes de géis sem nenhum TGF-β1 adicionado até no dia 4 (p=0,005 no dia 4 e p=3E-06 no dia 7), e em nível similar a um em HMSC cultivados em meio com TGF-β1 recém preparado adicionado.

Mudanças na morfologia, proliferação e diferenciação condrogênica celular demonstram que o TGF-β1 ainda é biologicamente ativo depois de sua liberação dos géis.

EXEMPLO 7 – Efeitos de TGF-β1 em HMSC semeadas dentro de géis de fibrina e HUVEC semeadas na superfície de géis de fibrina

De maneira a analisar os efeitos de TGF-β1 no comportamento de HMSC semeadas em géis de fibrina e células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVEC, Lonza Walkersville Inc.) semeadas na superfície do gel, géis contendo 10 mg/mL de FC e 2 IU/mL de trombina (concentrações finais nos géis) foram preparadas com células de cultura únicas (HMSC ou HUVEC) ou células de co-cultura em uma razão de HMSC:HUVEC de 4:1. TGF-β1 recombinante (5 ng/0,3 mL de gel) foi adicionado no FC em metade dos géis de co-cultura na hora da preparação do gel. Géis foram incubados a 37 °C em 5% de $CO_2$ por até 21 dias usando um meio de crescimento de célula endotelial padrão (Lonza Walkersville Inc,) com um suplemento de soro. Análise da morfologia e proliferação celular,

bem como diferenciação osteogênica, foi realizada nos dias 1, 7, 14 e 21. Morfologia celular incluindo a reorganização de HUVEC em redes célula-célula interconectadas (eventos precoces de diferenciação angiogênica) foi observada por microscopia fluorescente depois da coloração com corante calceína. A proliferação celular foi medida pela intensidade de fluorescência das suspensões celulares depois de dissolver os géis de fibrina em uma solução de tripsina bovina concentrada purificada. Finalmente, um ensaio de fosfatase alcalina padrão (ALP) foi realizado como um marcador precoce de diferenciação osteogênica.

Análise de microscopia fluorescente mostrou que HMSC foram mais eventualmente dispersas e tiveram uma forma mais alongada quando semeadas em géis de cultura únicos ou em géis de co-cultura com TGF-β1 adicionado. HSMC foram menores e tenderam a migrar para a base dos géis de co-cultura sem TGF-β1 adicionado. A reorganização de HUVEC em redes célula-célula interconectadas (eventos precoces de diferenciação angiogênica) começou antes e aconteceu até um ponto em géis de cultura únicos e géis de co-cultura contendo TGF-β1 comparado aos géis de co-cultura sem TGF-β1 adicionado.

A proliferação celular aumentou com o tempo. Nenhuma diferença significativa foi observada entre géis com e sem TGF-β1 adicionado. A atividade ALP para todas as condições contendo HMSC aumentou com o tempo. Seu nível tendeu a ser maior em géis com TGF-β1 adicionado comparado ao do em géis sem nenhum TGF-β1 adicionado, exceto no dia 7. Isto indicou um aumento na diferenciação osteogênica precoce depois de 14 dias em géis com TGF-β1 adicionado, mas também pode refletir um número possivelmente maior de HMSC na presença de TGF-β1. Em virtude de o ensaio de proliferação realizado não diferenciar entre os dois tipos celulares, o nível de atividade ALP pode não ser diretamente relacionado ao número geral de HMSC.

Versados na técnica esperam que as inúmeras modificações e variações da invenção apresentadas nos exemplos ilustrativos anteriores ocorram. Consequentemente somente tais limitações como aparecem nas reivindicações em anexo devem ser colocadas na invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para modificar a liberação de uma proteína de fator de crescimento-beta transformante (TGF-β), em que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF- β2 e TGF- β3, de um selante de fibrina, em que o selante de fibrina é produzido por mistura de um componente do complexo de fibrinogênio, um componente de trombina e um componente TGF-β, caracterizado pelo fato de compreender,

a) determinar a quantidade de TGF-β liberado de um primeiro selante de fibrina tendo uma quantidade inicial conhecida de TGF -β e uma concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio e

b) modificar a concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio usada no primeiro selante de fibrina da etapa (a) para produzir um segundo selante de fibrina, em que o aumento da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante comparada à concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio no primeiro selante diminui a taxa de liberação de TGF-β do segundo selante da forma comparada à liberação de TGF-β do primeiro selante da etapa (a), e em que o segundo selante tem a mesma quantidade inicial de TGF-β que o primeiro selante na etapa (a).

2. Método para modificar a liberação de uma proteína de fator de crescimento-beta transformante (TGF-β), caracterizado pelo fato de que a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF- β2 e TGF-β3, de um selante de fibrina, em que o selante de fibrina é produzido por mistura de um componente do complexo de fibrinogênio, um componente de trombina e um componente TGF-β, o método compreendendo,

a) determinar a quantidade de TGF-β liberado de um primeiro selante de fibrina tendo uma quantidade inicial conhecida de TGF -β e uma concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio,

b) modificar a concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio usada no primeiro selante de fibrina na etapa (a) para produzir

um segundo selante de fibrina, em que a diminuição da concentração de complexo de fibrinogênio no segundo selante comparada à concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio no primeiro selante aumenta a taxa de liberação de TGF-β do segundo selante da forma comparada à liberação de TGF-β do primeiro selante da etapa (a), e em que o segundo selante tem a mesma quantidade inicial de TGF-β que o primeiro selante na etapa (a).

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 5 mg/mL a cerca de 75 mg/mL.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração de complexo de fibrinogênio final no segundo selante em cerca de 1 mg/mL a cerca de 149 mg/mL.

6. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante em cerca de 5 mg/mL a cerca de 75 mg/mL.

7. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante em cerca de 10 mg/mL a cerca de 60 mg/mL.

8. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração final do componente de trombina no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 1 IU/mL a 250 IU/mL.

9. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração final de TGF- β é na faixa de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1 mg/mL.

10. Método para a liberação controlada de uma proteína de fator de crescimento-beta transformante (TGF-β), caracterizado pelo fato de que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF- β2 e TGF- β3, em um paciente em necessidade do mesmo, compreendendo administrar ao dito paciente um selante de fibrina compreendendo TGF-β, em que pelo menos 25% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o selante de fibrina é produzido combinando um componente do complexo de fibrinogênio (FC) e um componente de trombina em mistura.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é adicionado ao componente FC antes da mistura do componente FC com o componente de trombina.

13. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que pelo menos 35% a 90% do TGF- β é retido por pelo menos 3 dias.

14. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que pelo menos 45% a 75% do TGF- β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

15. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60% do TGF- β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

16. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que o TGF- β liberado é biologicamente ativo.

17. Método para a liberação controlada de uma proteína do fator de crescimento-beta (TGF-β) transformante, caracterizado pelo fato de

que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF- β2 e TGF- β3, em um paciente em necessidade do mesmo, compreendendo administrar ao dito paciente um selante de fibrina compreendendo TGF-β, em que pelo menos 20% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o selante de fibrina é produzido combinando um componente do complexo de fibrinogênio (FC) e um componente de trombina em mistura.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o TGF -β é adicionado ao componente FC antes da mistura do componente FC com o componente de trombina.

20. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que pelo menos 25% a 75% do TGF-β é retido por pelo menos 10 dias.

21. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que pelo menos 45% a 55% do dito TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

22. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o TGF-β liberado é biologicamente ativo.

23. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 18, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL.

24. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 18, caracterizado pelo fato de que a concentração final de trombina no selante é na faixa de cerca de 1 IU/mL a 250 IU/mL.

25. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 18, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final é 40 mg/mL e a concentração final de trombina é cerca de 2 IU/mL.

26. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17,

caracterizado pelo fato de que a concentração final de TGF- β no selante é de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1 mg/mL.

27. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que o TGF- β é TGF- β1.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

29. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é TGF-β2.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que pelo menos 25% do dito TGF-β2 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

31. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que o TGF- β é TGF- β3.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55% do dito TGF-β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF- β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

33. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de uma doença selecionada do grupo que consiste em uma doença ou distúrbio muscoloesqueletal, uma doença ou distúrbio do tecido mole e uma doença cardiovascular.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença óssea ou um distúrbio ósseo.

35. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença de cartilagem ou um distúrbio de cartilagem.

36. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de uma doença cardiovascular.

37. Método para tratar um paciente que sofre de um distúrbio ou doença que pode beneficiar da liberação controlada in situ de uma proteína do fator de crescimento-beta (TGF-β) transformante, a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito paciente um selante de fibrina compreendendo a proteína TGF-β, em que o selante de fibrina fornece uma liberação controlada do TGF-β em que pelo menos 25% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias, ou em que pelo menos 20% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias, e o dito TGF-β é liberado em uma taxa efetiva para tratar o dito distúrbio ou doença.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o selante de fibrina é produzido combinando um componente do complexo de fibrinogênio (FC) e um componente de trombina em mistura.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é adicionado ao componente FC antes da mistura do componente FC com o componente de trombina.

40. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 35% a 90% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

41. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 45% a 75% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

42. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

43. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38,

caracterizado pelo fato de que pelo menos 20% do dito TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

44. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 25% a 75% do TGF-β é retido por pelo menos 10 dias.

45. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 45% a 55% do dito TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

46. Método de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que o TGF-β liberado é biologicamente ativo.

47. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a concentração de FC final no selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL.

48. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a concentração final de trombina no selante é na faixa de cerca de 1 IU/mL a 250 IU/mL.

49. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final é cerca de 40 mg/mL e a concentração final de trombina é cerca de 2 IU/mL.

50. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a concentração final de TGF-β no selante é de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1 mg/mL.

51. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é TGF-β1.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

53. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado

pelo fato de que o TGF-β é TGF-β2.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que pelo menos 25% do dito TGF-β2 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

55. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é TGF-β3.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55% do dito TGF-β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF- β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

57. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de uma doença selecionada do grupo que consiste em uma doença ou distúrbio muscoloesqueletal, um distúrbio do tecido mole e uma doença cardiovascular.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença óssea ou um distúrbio ósseo.

59. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença de cartilagem ou um distúrbio de cartilagem.

60. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de uma doença cardiovascular.

61. Kit para preparar um selante de fibrina, caracterizado pelo fato de que compreende um fator-beta que transforma a proteína do crescimento (TGF-β), a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, e o dito selante de fibrina tendo uma taxa de liberação de TGF-β desejada, o kit compreendendo,

a) um primeiro frasco ou primeiro recipiente de armazenamento contendo um componente do complexo de fibrinogênio, em

que o frasco opcionalmente compreende um componente TGF-β, e b) um segundo frasco ou segundo recipiente de armazenamento tendo um componente de trombina, o dito kit opcionalmente contendo um terceiro frasco ou terceiro recipiente de armazenamento tendo um componente TGF-β quando o dito primeiro frasco ou primeiro recipiente de armazenamento não inclui um componente TGF-β, o dito kit adicionalmente contendo instruções para uso do mesmo.

**Figura 1**

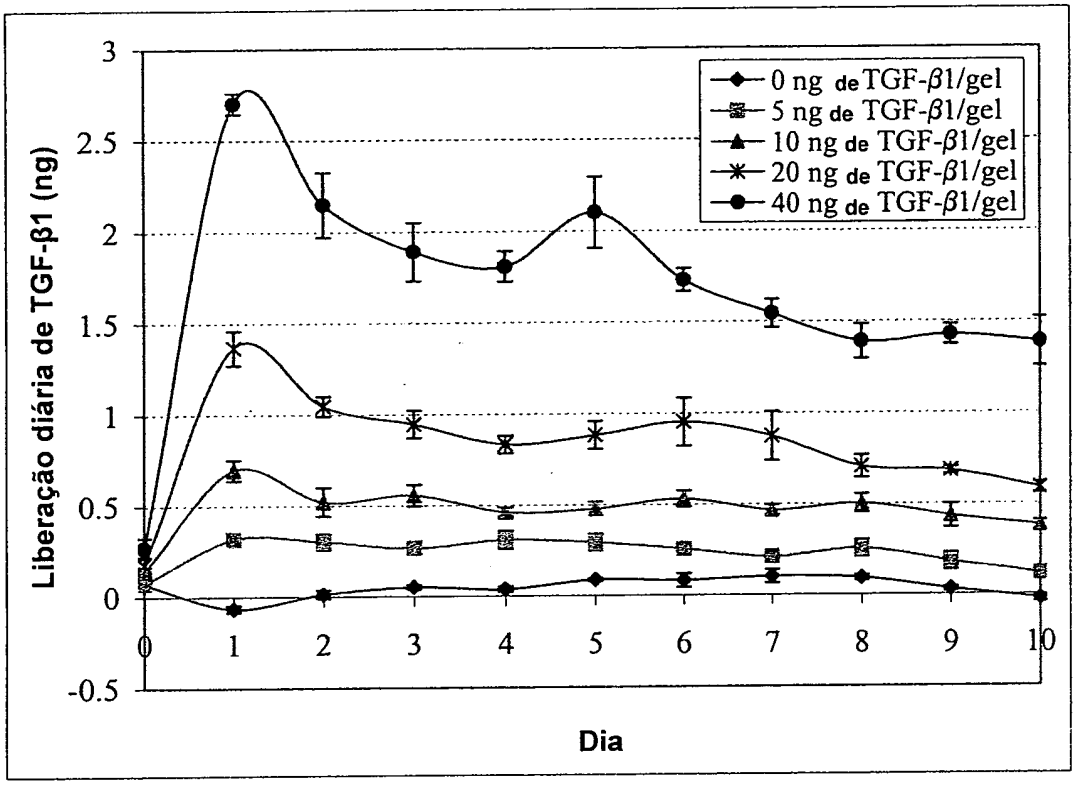

Liberação diária de TGF-β1 (ng)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Dia
0 ng de TGF-β1/gel
5 ng de TGF-β1/gel
10 ng de TGF-β1/gel
20 ng de TGF-β1/gel
40 ng de TGF-β1/gel

**Figura 2**

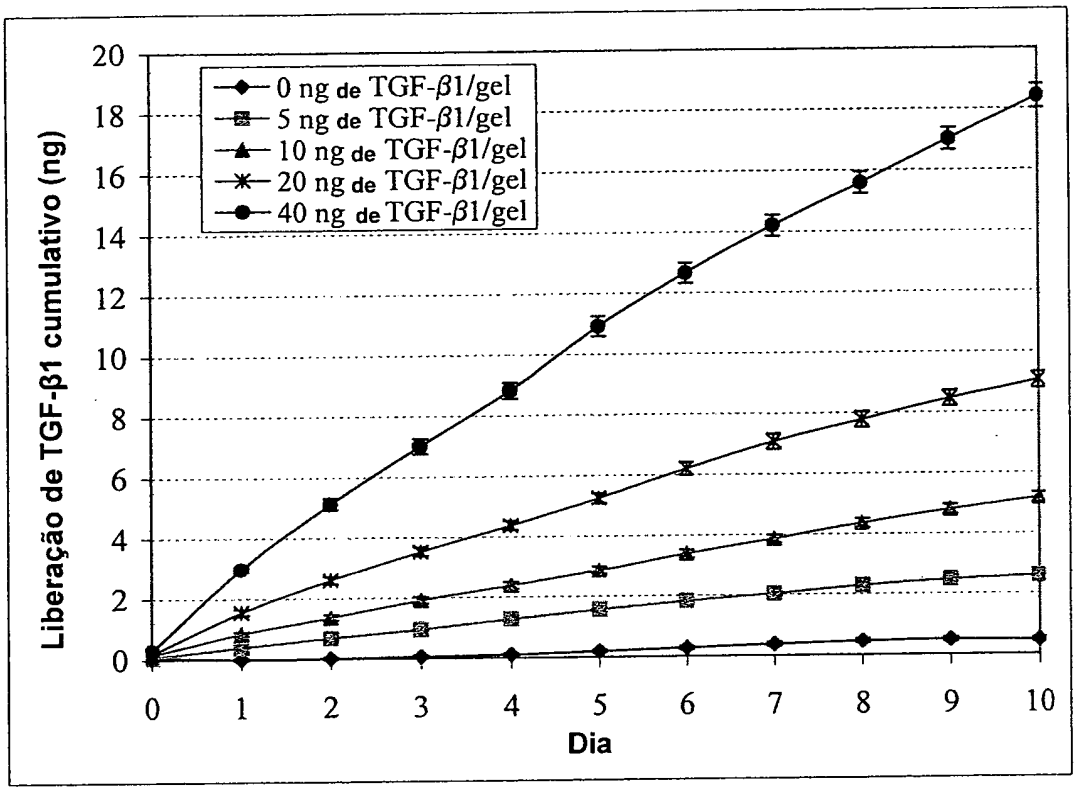

Liberação de TGF-β1 cumulativo (ng)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0 ng de TGF-β1/gel
5 ng de TGF-β1/gel
10 ng de TGF-β1/gel
20 ng de TGF-β1/gel
40 ng de TGF-β1/gel
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Dia

**Figura 3**

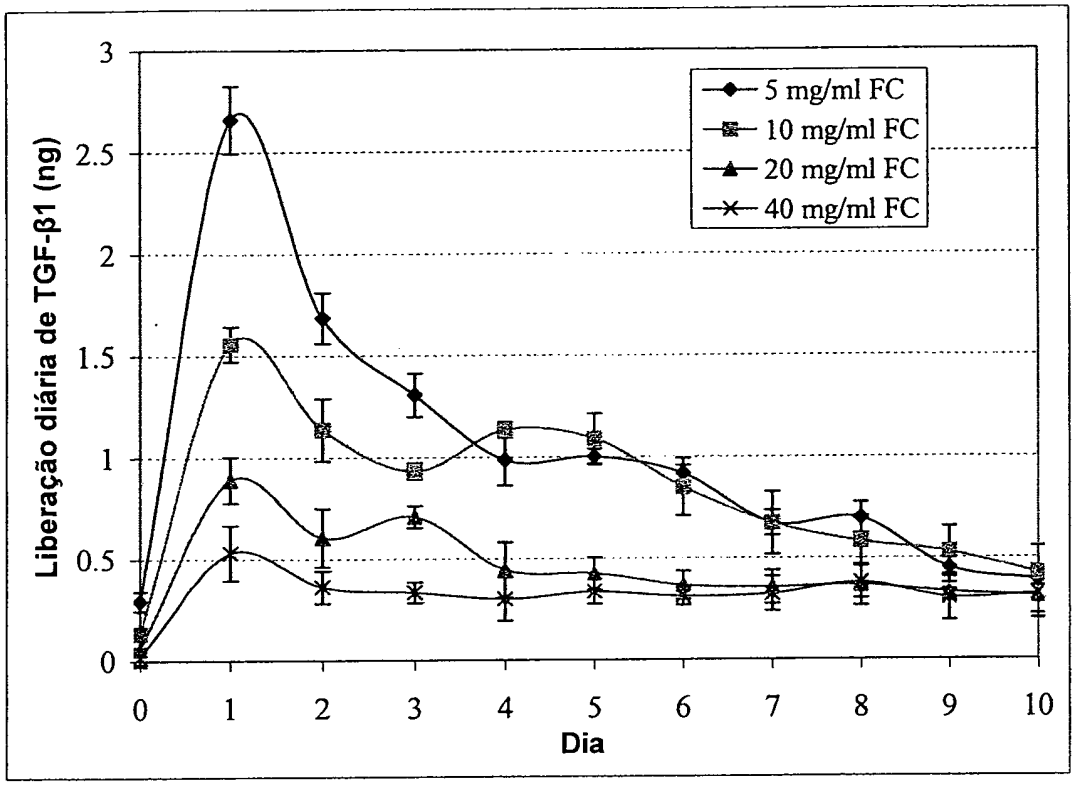

Liberação diária de TGF-β1 (ng)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Dia
5 mg/ml FC
10 mg/ml FC
20 mg/ml FC
40 mg/ml FC

Figura 4

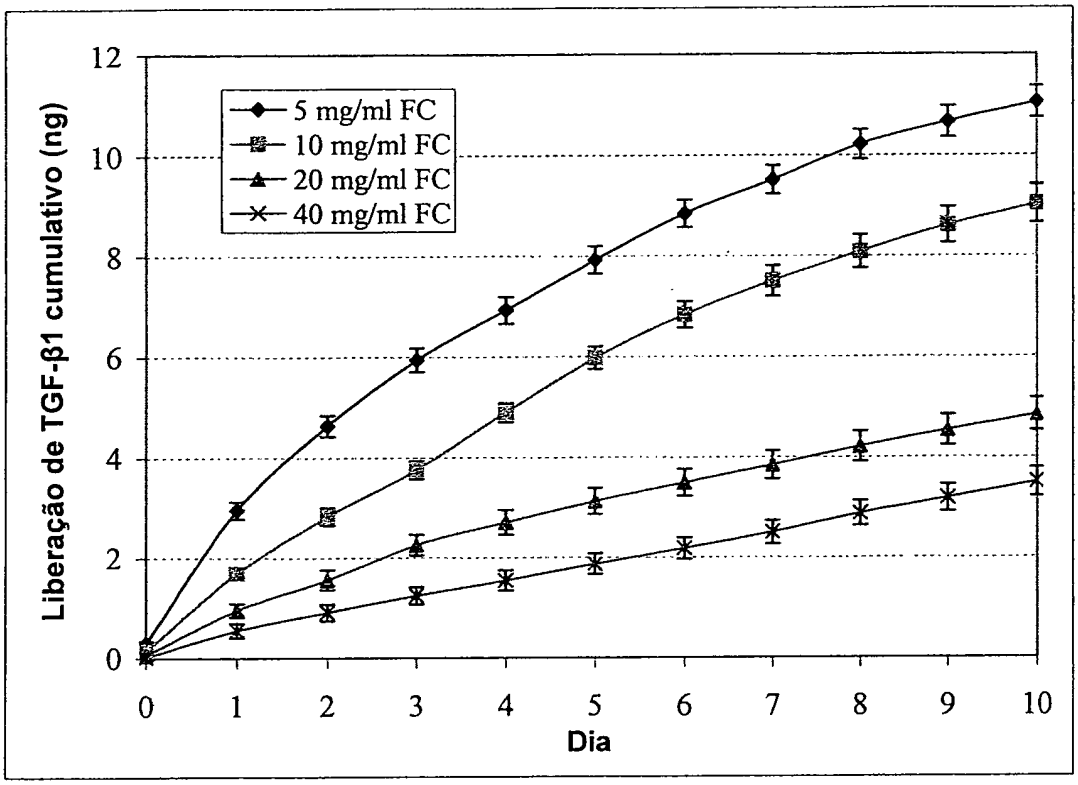

Liberação de TGF-β1 cumulativo (ng)
12
10
8
6
4
2
0
5 mg/ml FC
10 mg/ml FC
20 mg/ml FC
40 mg/ml FC
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Dia

**Figura 5**

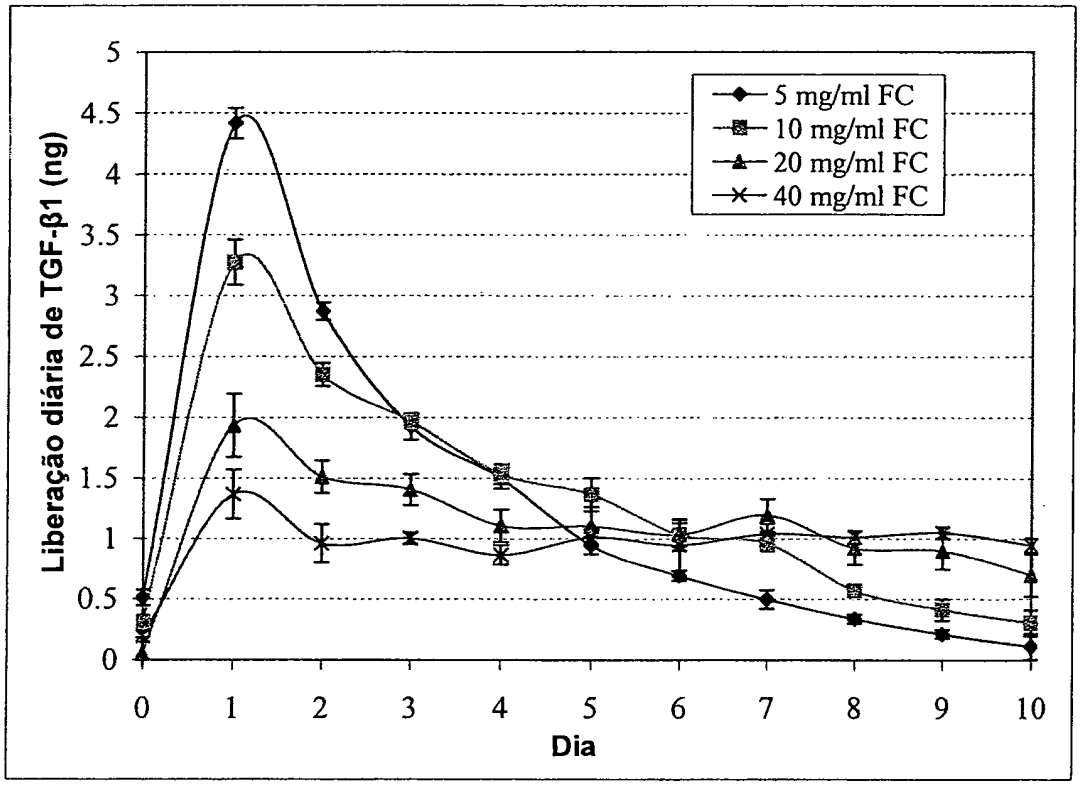

Liberação diária de TGF-β1 (ng)
Dia
5 mg/ml FC
10 mg/ml FC
20 mg/ml FC
40 mg/ml FC
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

**Figura 6**

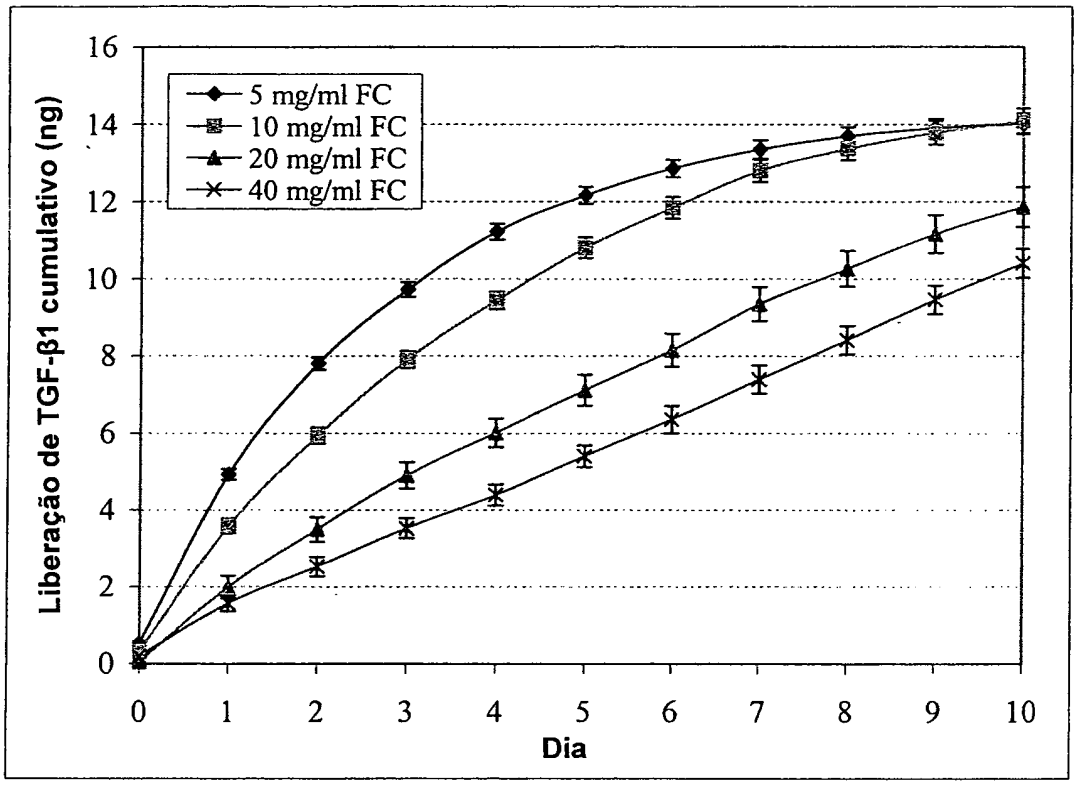

Liberação de TGF-β1 cumulativo (ng)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Dia
5 mg/ml FC
10 mg/ml FC
20 mg/ml FC
40 mg/ml FC

Figura 7

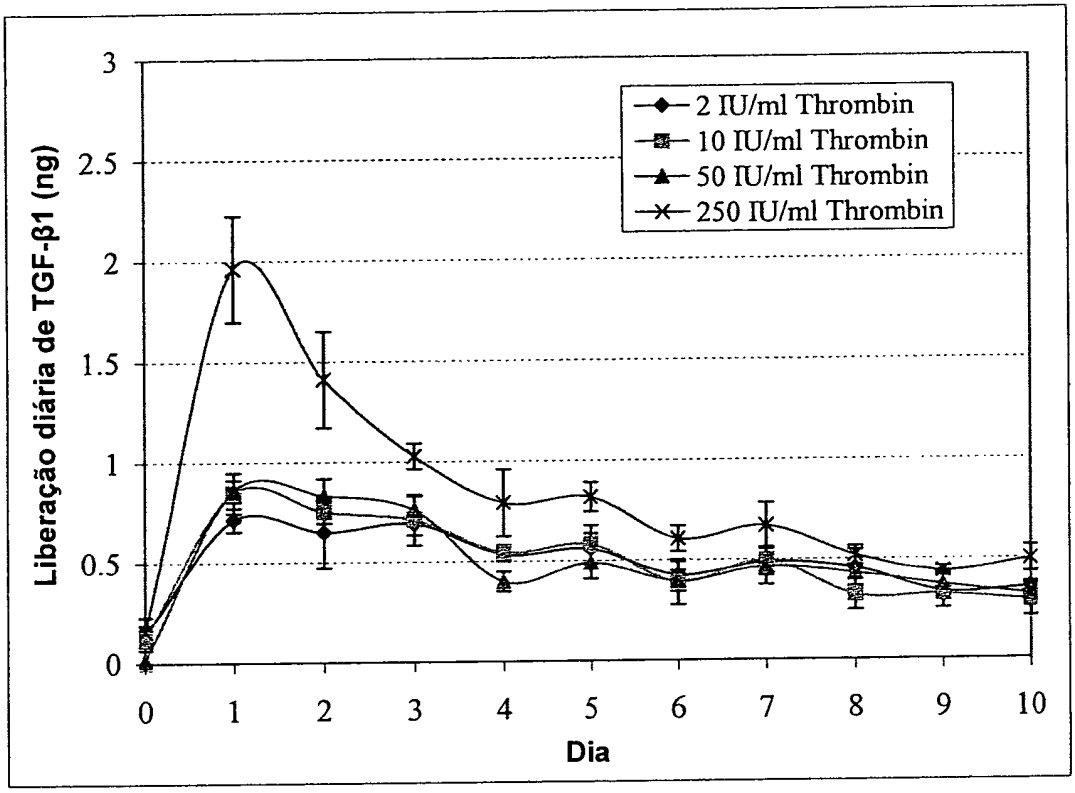

Liberação diária de TGF-β1 (ng)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Dia
2 IU/ml Thrombin
10 IU/ml Thrombin
50 IU/ml Thrombin
250 IU/ml Thrombin

**Figura 8**

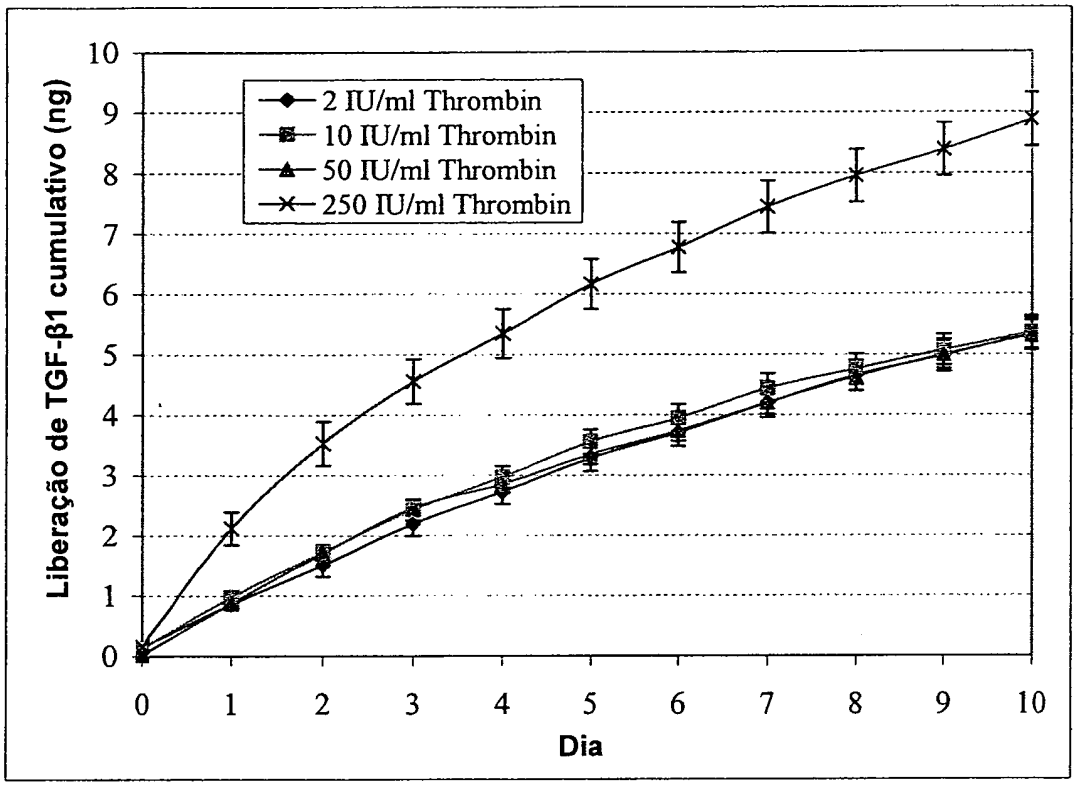

Liberação de TGF-β1 cumulativo (ng)
Dia
2 IU/ml Thrombin
10 IU/ml Thrombin
50 IU/ml Thrombin
250 IU/ml Thrombin
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Figura 9

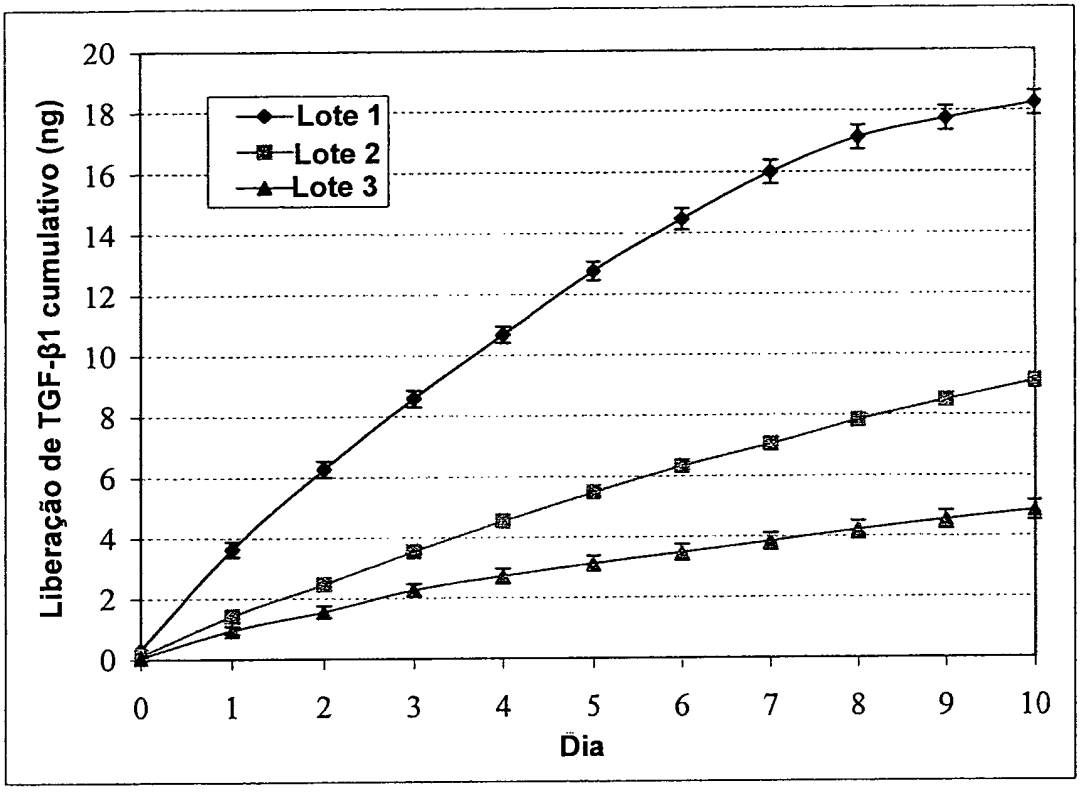

Liberação de TGF-β1 cumulativo (ng)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Lote 1
Lote 2
Lote 3
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Dia

Figura 10

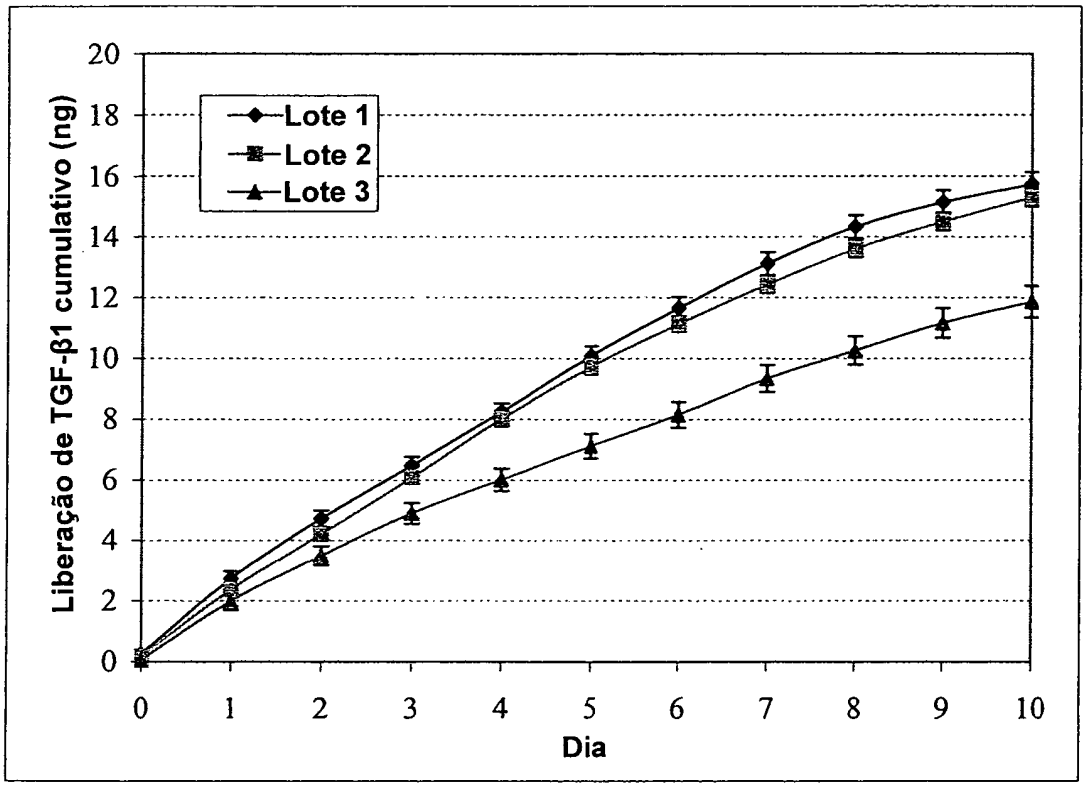

Liberação de TGF-β1 cumulativo (ng)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Lote 1
Lote 2
Lote 3
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Dia

Figura 11

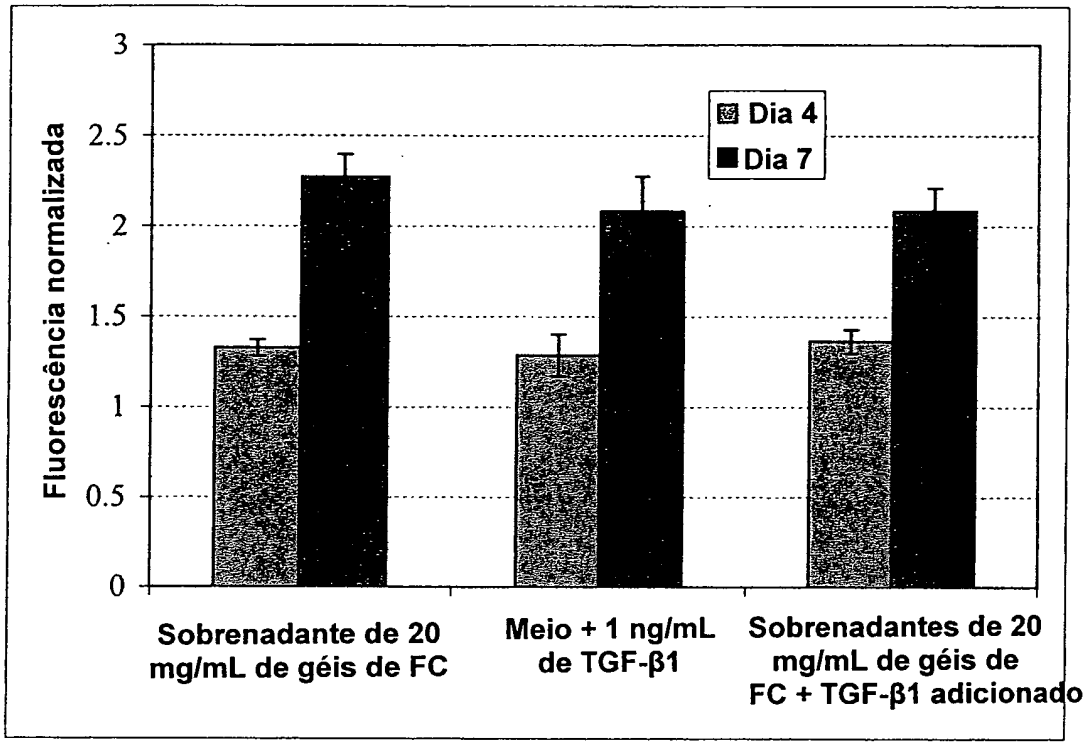
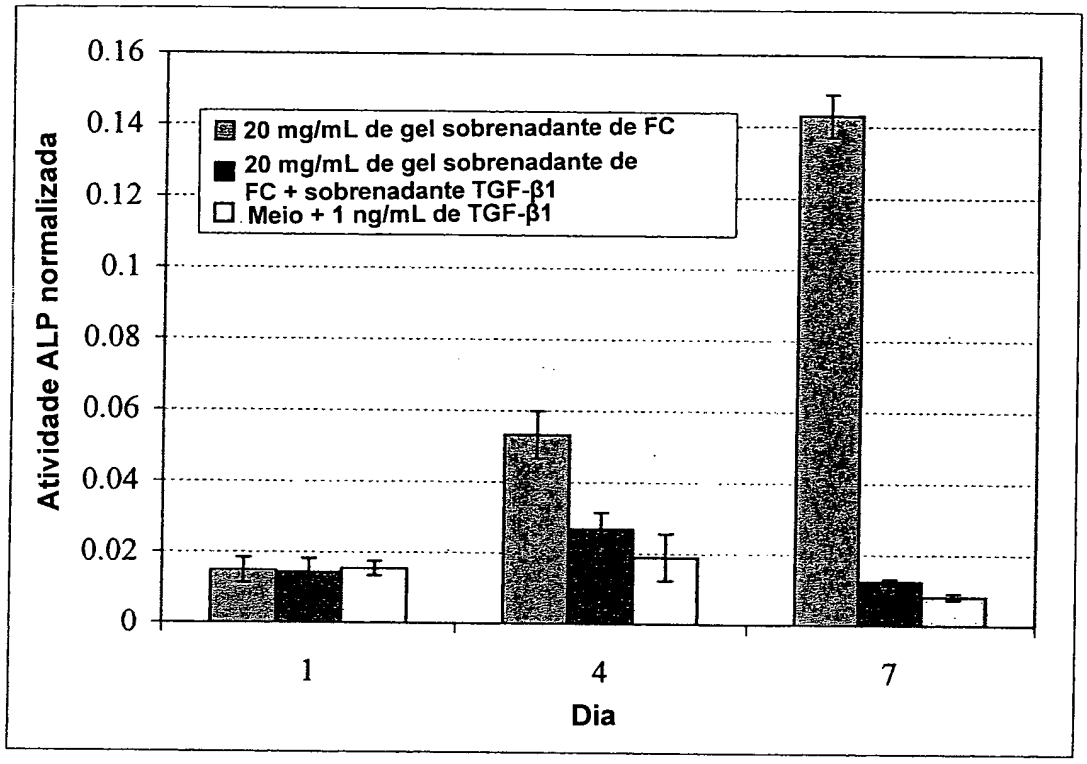

Fluorescência normalizada
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Dia 4
Dia 7
Sobrenadante de 20 mg/mL de géis de FC
Meio + 1 ng/mL de TGF-β1
Sobrenadantes de 20 mg/mL de géis de FC + TGF-β1 adicionado

**Figura 12**


0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
Atividade ALP normalizada
20 mg/mL de gel sobrenadante de FC
20 mg/mL de gel sobrenadante de FC + sobrenadante TGF-β1
Meio + 1 ng/mL de TGF-β1
1
4
7
Dia

RESUMO

"MÉTODOS PARA MODIFICAR A LIBERAÇÃO E PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE UMA PROTEÍNA DE FATOR DE CRESCIMENTO-BETA TRANSFORMANTE, USO DE UM SELANTE DE FIBRINA, E, KIT PARA PREPARAR UM SELANTE DE FIBRINA"

A presente invenção diz respeito, no geral, um selantes de fibrina, que contêm fator-beta que transforma o crescimento (TGF-β) para liberação controlada in situ para aplicações terapêuticas, incluindo distúrbios muscoloesqueletais, tais como distúrbios ósseos e de cartilagem, distúrbios de tecido mole e doenças cardiovasculares.

A requerente apresenta novas vias das reivindicações para melhor esclarecer e definir o presente pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para modificar a liberação de uma proteína de fator de crescimento-beta transformante (TGF-β), em que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF- β2 e TGF- β3, de um selante de fibrina, em que o selante de fibrina é produzido por mistura de um componente do complexo de fibrinogênio, um componente de trombina e um componente TGF-β, caracterizado pelo fato de compreender,

a) determinar a quantidade de TGF-β liberado de um primeiro selante de fibrina tendo uma quantidade inicial conhecida de TGF -β e uma concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio e

b) modificar a concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio usada no primeiro selante de fibrina da etapa (a) para produzir um segundo selante de fibrina, em que o aumento da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante comparada à concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio no primeiro selante diminui a taxa de liberação de TGF-β do segundo selante da forma comparada à liberação de TGF-β do primeiro selante da etapa (a), e em que o segundo selante tem a mesma quantidade inicial de TGF-β que o primeiro selante na etapa (a).

2. Método para modificar a liberação de uma proteína de fator de crescimento-beta transformante (TGF-β), caracterizado pelo fato de que a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF- β2 e TGF-β3, de um selante de fibrina, em que o selante de fibrina é produzido por mistura de um componente do complexo de fibrinogênio, um componente de trombina e um componente TGF-β, o método compreendendo,

a) determinar a quantidade de TGF-β liberado de um primeiro selante de fibrina tendo uma quantidade inicial conhecida de TGF -β e uma concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio,

b) modificar a concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio usada no primeiro selante de fibrina na etapa (a) para produzir

um segundo selante de fibrina, em que a diminuição da concentração de complexo de fibrinogênio no segundo selante comparada à concentração final conhecida de complexo de fibrinogênio no primeiro selante aumenta a taxa de liberação de TGF-β do segundo selante da forma comparada à liberação de TGF-β do primeiro selante da etapa (a), e em que o segundo selante tem a mesma quantidade inicial de TGF-β que o primeiro selante na etapa (a).

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 5 mg/mL a cerca de 75 mg/mL.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração de complexo de fibrinogênio final no segundo selante em cerca de 1 mg/mL a cerca de 149 mg/mL.

6. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante em cerca de 5 mg/mL a cerca de 75 mg/mL.

7. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no primeiro selante de fibrina difere da concentração do complexo de fibrinogênio no segundo selante em cerca de 10 mg/mL a cerca de 60 mg/mL.

8. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração final do componente de trombina no primeiro ou segundo selante é na faixa de cerca de 1 IU/mL a 250 IU/mL.

9. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado

pelo fato de que a concentração final de TGF- β é na faixa de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1 mg/mL.

10. Método para a liberação controlada de uma proteína de fator de crescimento-beta transformante (TGF-β), caracterizado pelo fato de que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF- β2 e TGF- β3, em um paciente em necessidade do mesmo, compreendendo administrar ao dito paciente um selante de fibrina compreendendo TGF-β, em que pelo menos 25% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o selante de fibrina é produzido combinando um componente do complexo de fibrinogênio (FC) e um componente de trombina em mistura.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é adicionado ao componente FC antes da mistura do componente FC com o componente de trombina.

13. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que pelo menos 35% a 90% do TGF- β é retido por pelo menos 3 dias.

14. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que pelo menos 45% a 75% do TGF- β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

15. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60% do TGF- β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

16. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que o TGF- β liberado é biologicamente ativo.

17. Método para a liberação controlada de uma proteína do fator de crescimento-beta (TGF-β) transformante, caracterizado pelo fato de que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF- β2 e TGF- β3, em que pelo menos 20% do TGF-β é retido no selante de fibrina

por pelo menos 10 dias.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o selante de fibrina é produzido combinando um componente do complexo de fibrinogênio (FC) e um componente de trombina em mistura.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o TGF -β é adicionado ao componente FC antes da mistura do componente FC com o componente de trombina.

20. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que pelo menos 25% a 75% do TGF-β é retido por pelo menos 10 dias.

21. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que pelo menos 45% a 55% do dito TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

22. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o TGF-β liberado é biologicamente ativo.

23. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 18, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final no selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL.

24. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 18, caracterizado pelo fato de que a concentração final de trombina no selante é na faixa de cerca de 1 IU/mL a 250 IU/mL.

25. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 18, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final é 40 mg/mL e a concentração final de trombina é cerca de 2 IU/mL.

26. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que a concentração final de TGF- β no selante é de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1 mg/mL.

27. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que o TGF- β é TGF- β1.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

29. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é TGF-β2.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que pelo menos 25% do dito TGF-β2 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

31. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que o TGF- β é TGF- β3.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55% do dito TGF-β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF- β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

33. Método de acordo com a reivindicação 10 ou 17, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de uma doença selecionada do grupo que consiste em uma doença ou distúrbio muscoloesqueletal, uma doença ou distúrbio do tecido mole e uma doença cardiovascular.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença óssea ou um distúrbio ósseo.

35. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença de cartilagem ou um distúrbio de cartilagem.

36. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de uma doença cardiovascular.

37. Uso de um selante de fibrina, caracterizado pelo fato de ser na produção de um medicamento para tratamento de um distúrbio ou doença

que pode beneficiar da liberação controlada in situ de uma proteína do fator de crescimento-beta (TGF-β) transformante, a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, em que um selante de fibrina compreendendo a proteína TGF-β, em que o selante de fibrina fornece uma liberação controlada do TGF-β em que pelo menos 25% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias, ou em que pelo menos 20% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias, e o dito TGF-β é liberado em uma taxa efetiva para tratar o dito distúrbio ou doença.

38. Uso de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o selante de fibrina é produzido combinando um componente do complexo de fibrinogênio (FC) e um componente de trombina em mistura.

39. Uso de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é adicionado ao componente FC antes da mistura do componente FC com o componente de trombina.

40. Uso de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 35% a 90% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

41. Uso de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 45% a 75% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

42. Uso de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60% do TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

43. Uso de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 20% do dito TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

44. Uso de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que pelo menos 25% a 75% do TGF-β é retido por pelo menos 10 dias.

45. Uso de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado

pelo fato de que pelo menos 45% a 55% do dito TGF-β é retido no selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

46. Uso de acordo com a reivindicação 37 ou 38, caracterizado pelo fato de que o TGF-β liberado é biologicamente ativo.

47. Uso de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a concentração de FC final no selante é na faixa de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL.

48. Uso de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a concentração final de trombina no selante é na faixa de cerca de 1 IU/mL a 250 IU/mL.

49. Uso de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a concentração de complexo de fibrinogênio final é cerca de 40 mg/mL e a concentração final de trombina é cerca de 2 IU/mL.

50. Uso de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a concentração final de TGF-β no selante é de cerca de 1 ng/mL a cerca de 1 mg/mL.

51. Uso de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é TGF-β1.

52. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que pelo menos 60% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF-β1 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

53. Uso de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é TGF-β2.

54. Uso de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que pelo menos 25% do dito TGF-β2 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias.

55. Uso de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o TGF-β é TGF-β3.

56. Uso de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que pelo menos 55% do dito TGF-β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 3 dias, e em que pelo menos 25% do dito TGF- β3 é retido no dito selante de fibrina por pelo menos 10 dias.

57. Uso de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de uma doença selecionada do grupo que consiste em uma doença ou distúrbio muscoloesqueletal, um distúrbio do tecido mole e uma doença cardiovascular.

58. Uso de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença óssea ou um distúrbio ósseo.

59. Uso de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o distúrbio muscoloesqueletal é uma doença de cartilagem ou um distúrbio de cartilagem.

60. Uso de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de uma doença cardiovascular.

61. Kit para preparar um selante de fibrina, caracterizado pelo fato de que compreende um fator-beta que transforma a proteína do crescimento (TGF-β), a dita proteína selecionada do grupo que consiste em TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3, e o dito selante de fibrina tendo uma taxa de liberação de TGF-β desejada, o kit compreendendo,

a) um primeiro frasco ou primeiro recipiente de armazenamento contendo um componente do complexo de fibrinogênio, em que o frasco opcionalmente compreende um componente TGF-β, e b) um segundo frasco ou segundo recipiente de armazenamento tendo um componente de trombina, o dito kit opcionalmente contendo um terceiro frasco ou terceiro recipiente de armazenamento tendo um componente TGF-β quando o dito primeiro frasco ou primeiro recipiente de armazenamento não inclui um componente TGF-β, o dito kit adicionalmente contendo instruções para uso do mesmo.