

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

(21) **PI0708785-3 A2**

(22) Data de Depósito: 12/03/2007
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/495 2006.01

(54) Título: **PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLEÍCOS E MEDICAMENTOS**

(30) Prioridade Unionista: 11/03/2006 GB 06 04938.1

(73) Titular(es): Renovo LTD

(72) Inventor(es): Emma Atkinson, Hugh Gerard Laverthy, Mark William James Ferguson, Nick Occleston, Phillip Mellor, Sharon O'Kane

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

(86) Pedido Internacional: PCT GB2007000833 de 12/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/104945 de 20/09/2007

(57) Resumo: PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLEÍCOS E MEDICAMENTOS. A presente invenção refere-se a TGF- β 3s, ou fragmentos ou derivados dos mesmos, em que domínio de formação alfa-hélice entre resíduos de aminoácidos (58) e (67) de TGF β 3 de tipo selvagem comprimento total compreende pelo menos uma substituição alfa-hélice estabilizante. A invenção também provê TGF- β 3s, ou fragmentos ou derivados dos mesmos, em que resíduo de glicina na posição (63) TGF- β 3 de tipo selvagem comprimento total é recolocado por Prolina. Ainda adicionalmente, a invenção provê TGF- β 3s, ou fragmentos ou derivados dos mesmos, compreendendo uma substituição do resíduo de ácido Glutâmico na posição (12) do TGF- β 3 de tipo selvagem comprimento total e/ou o resíduo de Arginina na posição (52) do TGF- β 3 de tipo selvagem comprimento total. A invenção também provê medicamentos e métodos de tratamento usando o TGF- β 3s.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLÉICOS E MEDICAMENTOS**".

A presente invenção refere-se às proteínas derivadas de TGF- β 3, para fragmentos biologicamente ativos de tais proteínas, e também para
5 ácidos nucleicos codificando tais proteínas. A invenção fornece também derivados de tais proteínas ou fragmentos biologicamente ativos. A invenção também fornece medicamentos compreendendo as proteínas, fragmentos, derivados ou ácidos nucleicos da invenção, bem como métodos de tratamento utilizando as proteínas, fragmentos, derivados ou ácidos nucleicos.

10 O fator de crescimento transformante beta (TGF- β s) é parte de uma superfamília de fatores de crescimento envolvidos na regulação de muitos processos celulares, incluindo proliferação, migração, apoptose, adesão, diferenciação, inflamação, imuno-supressão e expressão de proteínas extracelular.

15 Há três isoformas mamíferas de TGF- β denominadas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. TGF- β s são produzidos por uma ampla escala de tipos celulares incluindo epiteliais, endoteliais, hematopoiéticos, neuronais, células do tecido conectivo.

Os TGF- β s têm utilidade em diversos contextos terapêuticos, e a
20 isoforma TGF- β 3 isoforma, em particular, tem muitas vantagens terapêuticas. Como um resultado do potencial terapêutico do TGF- β 3s existe muito interesse em suas aplicações farmacêuticas. A sequência de aminoácidos de comprimento-total do tipo selvagem de TGF- β 3 é estabelecida na Sequência ID No.1, e de cDNA codificando este TGF- β 3 é definido na Sequência ID No. 2.
25

TGF- β 3 é conhecido a desempenhar β um papel crucial na regulação da resposta à cicatrização de feridas. A atividade de TGF- β 3 pode influenciar a taxa de cicatrização de feridas, bem como a extensão da cicatriz que ocorre como resultado de cicatrização.

30 TGF- β 3 também pode utilizado no tratamento de distúrbios fibróticos, fibrose pulmonar, cirrose hepática, esclerodermia, distúrbios angiogênicos, restenose, adesões, endometriose, distúrbios isquêmicos, indução de

cartilagens e osso, fertilização *in vitro*, mucosite oral, doença renal, prevenção, redução ou inibição da cicatriz, melhoramento neuronal de reconexão no sistema nervoso central e periférico, prevenir, reduzir ou inibir as complicações da cirurgia ocular (tal como cirurgia LASIK ou PRK) ou cicatrização na parte posterior do olho (tal como, Vitreorretinopatia proliferativa).

Os usos terapêuticos a que se prestam TGF- β 3 têm estabelecido uma bem reconhecida necessidade de fontes de proteínas TGF- β 3 biologicamente ativas e numerosas tentativas têm sido feitas para produzir esta valiosa proteína por métodos recombinantes. No entanto, os processos existentes para a produção de TGF- β 3 são severamente limitados devido à necessidade de redobrimento do complexo protéico a fim de alcançar moléculas biologicamente ativas.

TGF- β s existem naturalmente como proteínas homodiméricas compostas por duas subunidades de 112 aminoácidos. Cada uma destas subunidades TGF- β 3 contém uma alfa-hélice formando domínio entre o 58° e o 67° resíduos do fragmento de peptídeo ativo. Além da alfa-hélice entre os resíduos 58 e 67, cada subunidade TGF- β 3 contém também um número de ligações intra-subunidade incluindo pontes de sal e ligações dissulfeto.

TGF- β 3 é secretado como uma moléculas precursora inativa latente de 100 kDa (L TGF- β 3). A molécula de LTGF- β 3 consiste em:

- i) peptídeo sinal dímero C-terminal 25kDa (fragmento ativo); e
- ii) peptídeo latente-associado (LAP).

LTGF- β é ativado por dissociação do LAP do fragmento ativo. Clivagem da LTGF- β S pode ser mediada por ação de enzimas, tal como endopeptidases como furina, plasmina e trombina ou pela acidificação do espaço pericelular. O fragmento dimérico TGF- β ativo é estabilizado por interações hidrofóbicas e iônicas, em que são também reforçadas por uma inter-subunidade de ponte dissulfeto. Cada monômero compreende várias vertentes de filamentos beta intrelaçados por três das quatro ligações intradissulfeto e forma uma estrutura apertada conhecida como um "nódulo de cisteína".

Devido à complexidade de moléculas TGF- β 3 biologicamente ativas (em que são, como acima referido, proteínas homodiméricas com 8

ligações dissulfeto intracadeia e uma ligação dissulfeto intercadeia) foram inicialmente expressadas em organismos eucarióticos. No entanto, os níveis relativamente baixos de expressão que podem ser alcançados utilizando sistemas de expressão eucarióticos, em combinação com elevados custos de tais processos, significam que o uso de hospedeiros microbianos foi investigado, a fim de tentar melhorar a eficiência comercial da produção TGF- β 3.

A desvantagem de usar hospedeiros microbianos como *E.coli* para expressar moléculas recombinantes, tal como, TGF- β 3, que contém múltiplas ligações dissulfeto é que as proteínas produzidas são normalmente incorretamente dobradas, e, muitas vezes, formam corpos de inclusão insolúveis. Estes corpos de inclusão requerem solubilização seguida por renaturação para permitir à proteína redobrar dentro de sua conformação ativa biológica nativa. Para efetivamente renaturar homodímero TGF- β 3, ligações covalentes dissulfeto na orientação correta precisam ser regeneradas. A probabilidade de formar um correto homodímero TGF- β 3 do processo de formação aleatória de ligação dissulfeto é baixo, dado que existem nove ligações dissulfeto, permitindo 34.459.245 combinações possíveis de ligações dissulfeto. Portanto, não é surpreendente que o redobrimento de TGF- β 3 produzido recombinantemente pode severamente influir sobre sua fabricação, visto que o redobrimento pode levar até 144 horas, e tipicamente só alcança voltar eficiências de redobrimento na região de 20%.

É um objetivo da presente invenção evitar ou atenuar alguns dos problemas associados com a técnica anterior. É um objetivo de certos aspectos da presente invenção fornecer TGF- β 3s (ou fragmentos ou derivados destes) que tenham melhorado a eficiência de redobrimento em comparação com o tipo selvagem de TGF- β 3. É outro objetivo de certos aspectos da invenção fornecer agentes diferentes do tipo selvagem de TGF- β 3 que têm atividade TGF- β 3. Esses agentes podem fornecer valiosas alternativas a naturalmente ocorrência de TGF- β 3.

Em um primeiro aspecto da presente invenção é fornecido TGF- β 3 ou um fragmento ou derivado deste, onde o domínio de formação alfa-

hélice entre os resíduos de aminoácidos 58 e 67 de comprimento total do tipo selvagem de TGF- β 3 compreende pelo menos uma substituição alfa-hélice estabilizante. A invenção também fornece um ácido nucleico codificando um TGF- β 3, ou fragmento ou derivado destes, de acordo com o primeiro aspecto da invenção.

Os inventores têm surpreendentemente descoberto que o novo TGF- β 3s descrito no primeiro aspecto da invenção partilha a mesma atividade biológica como naturalmente ocorrência TGF- β 3, e tem eficiência de redobramento de proteína muito melhorada quando comparada com TGF- β 3 do tipo selvagem. Este aumento da eficiência de redobramento de proteína constitui uma vantagem marcada e importante visto que tanto simplifica as condições de redobramento que podem ser utilizadas para produzir TGF- β 3s biologicamente ativo e também aumenta consideravelmente o rendimento dessas proteínas (ou fragmentos ou derivados dessas proteínas) que podem ser produzidas utilizando sistemas de expressão de proteínas procarióticas.

Sem querer vincular por qualquer hipótese, os inventores acreditam que a introdução de substituições alfa-hélice estabilizantes dentro de domínios alfa-hélice formadores vantajosamente diminui a flexibilidade de alfa-hélice formada por esse domínio. Essa flexibilidade diminuída ajuda a promover o próprio redobramento do TGF- β 3s de acordo com o primeiro aspecto da invenção para produzir proteínas biologicamente ativas (ou fragmentos ou derivados destes). A flexibilidade diminuída transmitida pela estabilização da alfa-hélice através de substituições alfa-hélice estabilizantes é suficiente para aumentar rendimentos de redobramento de TGF- β 3 corretamente (particularmente TGF- β 3 dimérico redobrado), mas, surpreendentemente, os inventores descobriram que tais substituições não alteram a atividade biológica do TGF- β 3s em conformidade com o primeiro aspecto da invenção, e não retira sua eficácia terapêutica e biológica.

Exceto para o contexto em que exige o contrário, a numeração dos resíduos de aminoácido no presente relatório é baseada sob a sequência do aminoácido do peptídeo ativo das porções de TGF- β 3s. Por exemplo, as referências a "comprimento-total de TGF- β 3 do tipo selvagem" devem ge-

ralmente ser empregadas para referir a seqüência de aminoácido do peptídeo ativo mostrada na Seqüência ID No. 1, e as referências ao domínio alfa-hélice-formador entre resíduos de aminoácido 58 e 67 são para ser construídas em conformidade.

5 Uma substituição alfa-hélice estabilizante pode preferencialmente compreender uma substituição de resíduo de glicina na posição 63 de comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem. No entanto, substituições adequadas podem adicionalmente ou alternativamente compreender substituições de, por exemplo, uma ou ambas de Treoninas na posição 60 ou 67 de
10 comprimento-total de TGF- β 3 do tipo selvagem ou de Asparagina na posição 66 de comprimento-total TGF- β 3 de tipo selvagem. Deve ser preferido que substituições alfa-hélice estabilizantes para uso com a invenção não compreendam substituição da valina 61.

 Uma substituição "alfa-hélice estabilizante", de acordo com a
15 presente invenção deve ser entendida para ser uma substituição em que um determinado resíduo de aminoácido presente no TGF- β 3 do tipo selvagem é substituído por resíduo trocado tendo uma maior propensão para a formação de alfa-hélice. Assim, a troca do resíduo de aminoácido introduzido na substituição da alfa-hélice estabilizante não tem necessariamente que ser uma
20 em que sua predisposição à integração estável dentro da alfa-hélice, mas só precisa ter uma maior propensão para integração estável do que faz o aminoácido substituído. No entanto, pode geralmente ser preferido que uma troca introduzida do aminoácido como parte de uma substituição da alfa-hélice estabilizante seja um resíduo de aminoácido que não favoreça uma integração dentro da uma alfa-hélice.
25

 Os inventores descobriram resíduos de aminoácido de troca preferidos que podem ser introduzidos nas substituições alfa-hélice estabilizantes de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode ser qualquer um ou combinação de aminoácidos selecionados do grupo compreendendo: alani-
30 na, serina, treonina, valina, leucina, isoleucina, metionina e fenilalanina. Estes resíduos de aminoácido de troca preferidos são todos considerados como sendo adequados para uso em substituições alfa-hélice estabilizantes de

resíduos de Glicina na posição 63 do comprimento-total do TGF- β 3 de tipo selvagem. Dito isto, resíduos de aminoácido de troca selecionados a partir deste grupo pode ser substituído em qualquer posição do domínio alfa-hélice-formador entre os resíduos de aminoácidos 58 e 67 em que se podem
 5 fornecer uma substituição alfa-hélice estabilizante.

Apesar dos resíduos de aminoácido listados acima representam resíduos preferidos para uso nas substituições alfa-hélice estabilizantes, será apreciado um número de sistemas alternativos qualitativos e quantitativos em que a propensão de um resíduo de aminoácido para contribuir para a
 10 formação da alfa-hélice (e, deste modo, a adequação do resíduo para uso em uma substituição alfa-hélice estabilizante) pode ser medido, e que resíduos de aminoácido adequados para uso em substituições alfa-hélice estabilizantes poderão ser selecionados com referência a qualquer um desses sistemas, em combinação com o conhecimento da sequência de TGF- β 3.

15 A título de exemplo, um sistema qualitativo descrito por Chou e Fasman identifica cinco diferentes classificações de resíduos de aminoácidos com base em sua propensão para a formação de alfa-hélice. Em ordem, estes são:

Formadores de hélice forte; Formadores de
 20 hélice fraca; Formadores Indiferentes; Finalizadores de hélice fraca e Finalizadores de hélice forte.

Para efeitos do presente relatório, os resíduos de aminoácido do ácido glutâmico, histidina, triptofano, lisina, alanina, metionina, valina, isoleucina, leucina, Glutamina e fenilalanina podem ser considerados para serem
 25 formadores de hélice, com Glutamina, metionina, alanina e leucina constituindo formadores de hélice forte. Em contraste, asparagina, glicina e prolina podem ser consideradas para constituir finalizadores de hélice, com glicina e prolina sendo finalizadores de hélice forte.

30 Assim, se a propensão para a formação de alfa-hélice é avaliada com referência a esta escala qualitativa será reconhecido que, apesar de uma substituição alfa-hélice estabilizante pode preferencialmente ser um em

que um resíduo de aminoácido seja trocado por um formador de hélice, substituição alfa-hélice estabilizante adequado pode alternativamente fazer uso de formas indiferentes ou até mesmo de finalizadores de hélice dependendo da natureza do resíduo de aminoácido que está a ser trocado. Por exemplo, no caso em que a forma indiferente do resíduo de aminoácido está para ser o objeto de uma substituição alfa-hélice estabilizante, um resíduo de aminoácido substituto adequado pode ser um formador de hélice forte ou um formador de hélice fraco. No caso em que um finalizador de hélice forte está para ser o objeto da substituição alfa-hélice estabilizante o resíduo de aminoácido substituto pode ser um formador de hélice forte, um formador de hélice fraco, um aminoácido de forma indiferente ou finalizador de hélice fraco.

Assim, uma substituição alfa-hélice estabilizante de acordo com a presente invenção pode compreender a substituição de um finalizador de hélice forte com um finalizador de hélice fraco, ou um resíduo de aminoácido de forma indiferente, ou um formador de hélice fraco, ou um formador de hélice forte. Alternativamente ou adicionalmente, uma substituição alfa-hélice estabilizante adequada pode compreender a substituição de finalizador de hélice fraco com uma forma indiferente, um formador de hélice fraco ou um formador de hélice forte. Alternativamente ou adicionalmente, uma substituição alfa-hélice estabilizante adequada pode compreender a substituição de um resíduo de aminoácido de forma indiferente com um formador de hélice fraco ou um formador de hélice forte. Alternativamente ou adicionalmente, uma substituição alfa-hélice estabilizante adequada pode compreender a substituição de um formador de hélice fraco com um formador de hélice forte.

Uma alternativa de avaliação da propensão de um resíduo de aminoácido para formação de alfa-hélice, e, por conseguinte, a sua adequação para ser utilizada como parte de uma substituição alfa-hélice estabilizante pode ser baseada em quaisquer do número de escalas quantitativas conhecidas por aqueles qualificados na técnica.

Um exemplo deste tipo de escala quantitativa que pode ser utili-

zado para determinar um resíduo de aminoácido de adequação para o uso em uma substituição alfa-hélice estabilizante é estabelecido na Tabela 1. Esta tabela fornece valores, calibrado em kcal/mol, refletindo a propensão dos aminoácidos para contribuir para a formação da alfa-hélice. Um valor elevado na Tabela 1 está associado a uma baixa tendência para a formação da alfa-hélice.

Assim, quando a adequação de um resíduo de aminoácido para uso em uma substituição alfa-hélice estabilizante como requerido pelo primeiro aspecto da invenção é avaliada usando uma escala quantitativa, tal como a estabelecida na Tabela 1, uma substituição alfa-hélice estabilizante adequada é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido trocado que tem uma maior propensão à formação de hélice (indicados na Tabela 1 por um menor valor kcal/mol) do que o resíduo a ser substituído.

Substituições adequadas que podem ser utilizadas de acordo com a invenção incluem aquelas que introduzem aminoácidos de substituição artificial. Exemplos adequados de aminoácidos de substituições artificiais que podem ser utilizados para serem benéficamente usados para estabilizar alfa-hélices incluem resíduos de aminoácido tendo cadeias retas hidroxila e alquila.

Alanina representa particularmente um resíduo de aminoácido de substituição preferido adequado para uso em substituição alfa-hélice estabilizante. É mais preferido que um TGF- β 3 ou fragmento ou derivado deste, de acordo com o primeiro aspecto da invenção compreenda a substituição de glicina na posição 63 do comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem com alanina.

A sequência de aminoácidos de um TGF- β 3 preferido de acordo com o primeiro aspecto da invenção é estabelecida na Sequência ID No. 3 (Gly-63Ala), e DNA codificando TGF- β 3 é definido na sequência ID No. 4. Fragmentos ou derivados do TGF- β 3 de Sequência ID No. 3 contendo a substituição alanina na posição 63 do comprimento-total TGF- β 3 tipo selvagem representam fragmentos ou derivados TGF- β 3 preferidos de acordo

com o primeiro aspecto da invenção .

Uma substituição adequada pode ser uma em que um ou mais resíduos de aminoácidos situados entre 58 e 67 do comprimento total de TGF- β 3 do tipo selvagem são substituídos com um ou mais resíduos de aminoácidos naturais ou artificiais. A título de esclarecimento adicional, substituições adequadas podem envolver a substituição de um único resíduo de aminoácido com um ou mais resíduos substituídos, ou a substituição de mais do que um resíduo de aminoácido com um ou mais resíduos substituídos. Uma substituição preferida pode ser uma em que o número de resíduos de aminoácido é conservado, ou seja, uma em que o número de resíduos de aminoácido substituído é o mesmo que o número de substituições de resíduos de aminoácidos introduzidos.

Irá ainda ser apreciado que resíduo de aminoácido preferido (ou resíduos) para ser substituído pode ser selecionado com referência às escalas qualitativas ou quantitativas discutidas acima. Assim, um aminoácido adequado a ser objeto de uma substituição alfa-hélice estabilizante pode ser classificado como um finalizador de hélice ou preferencialmente um formador de hélice forte, com referência à escala qualitativa discutida acima. Com referência à escala quantitativa estabelecida na Tabela 1, um aminoácido adequado a ser objeto de uma alfa-hélice estabilizante pode preferencialmente ser um com um valor de propensão de hélice igual ou superior a 0,50, mais preferencialmente uma com valor de propensão de hélice maior ou igual a 0,60, e mais preferencialmente com um valor de propensão de hélice de 1,00.

Os inventores acreditam que TGF- β 3s ou fragmentos biologicamente ativos ou derivados destes, de acordo com o primeiro aspecto da invenção podem ser utilizados em todos os contextos em que se desejam fazer uso da atividade biológica do TGF- β 3 do tipo selvagem. Estes particularmente incluem, mas não estão limitados a, usos terapêuticos. Em harmonia com este uso terapêutico a invenção também fornece o uso de TGF- β 3 ou um fragmento ou derivado deste, de acordo com o primeiro aspecto da invenção como um medicamento.

Será apreciado que, embora possa ser preferível que um fragmento ou derivados de um TGF- β 3 de acordo com o primeiro aspecto da invenção compreenda o domínio formação alfa-hélice de comprimento total contendo substituição alfa-hélice estabilizante, este não tem que necessariamente ser o caso. Um fragmento ou derivado adequado pode compreender um domínio de formação alfa-hélice truncado, enquanto que este domínio de formação alfa-hélice truncado compreende pelo menos uma substituição alfa-hélice estabilizante.

Em um segundo aspecto da invenção é fornecido um TGF- β 3, ou um fragmento ou derivado deste, onde os resíduos de glicina na posição 63 de comprimento-tola TGF- β 3 do tipo selvagem são substituídos com prolina. A invenção fornece também uma molécula de ácidos nucleicos codificando um TGF- β 3 ou um fragmento ou derivado deste, de acordo com o segundo aspecto da invenção.

Os inventores têm surpreendentemente encontrado que proteínas, de acordo com o segundo aspecto da invenção (ou seus fragmentos ou derivados) têm atividade biológica comparável à TGF- β 3 do tipo selvagem. Esta constatação é inesperada, uma vez que pode ser pensado que a presença de prolina em uma região de TGF- β 3 normalmente associada com formação de alfa-hélice possa interferir com a estrutura secundária de tais proteínas e, assim, prejudicar a sua função biológica. Apesar da eficiência do redobramento do TGF- β 3s de acordo com o segundo aspecto da invenção é menor do que do TGF- β 3 tipo selvagem o defeito antecipado da função surpreendentemente não ocorre.

Assim, proteínas, de acordo com o segundo aspecto da invenção (ou seus fragmentos ou derivados) fornecem uma valiosa contribuição para a técnica, na medida em que expandem o repertório de compostos capazes de exercer atividade TGF- β 3 que estão à disposição de um versado. Tais compostos podem, por exemplo, ser utilizados nos contextos em que é desejado usar TGF- β 3 de atividade terapêutica.

A sequência de aminoácidos de um TGF- β 3 preferido de acordo com o segundo aspecto da invenção é estabelecida na Sequência ID No. 5

(Gly-63Pro), e DNA codificando este TGF- β 3 é estabelecido na Sequência ID No 6. Fragmentos ou derivados do TGF- β 3 de Sequência ID No. 5 contendo a substituição prolina na posição 63 do comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem representam fragmentos ou derivados TGF- β 3 preferidos, de acordo com o segundo aspecto da invenção.

Determinado que TGF- β 3s, ou fragmentos ou derivados destes, de acordo com o segundo aspecto da invenção podem ser usados em contextos em que é desejado utilizar a atividade biológica terapêutica do TGF- β 3 de tipo selvagem será apreciado que também existe fornecer o uso de TGF- β 3s, ou fragmentos ou derivados destes, de acordo com o segundo aspecto da invenção como medicamentos. Os inventores acreditam que tais medicamentos podem ser utilizados em todos os contextos clínicos em que seja conhecida para fazer uso da atividade biológica do TGF- β 3.

Em um terceiro aspecto da invenção é fornecido um TGF- β 3 ou um fragmento ou derivado deste compreendendo por uma substituição do resíduo de ácido glutâmico na posição 12 do comprimento-total do TGF- β 3 de tipo selvagem e/ou o resíduo de arginina na posição 52 do comprimento-total de TGF- β 3 tipo selvagem. A invenção fornece também uma molécula de ácidos nucleicos codificando TGF- β 3 ou um fragmento ou derivado deste, de acordo com o terceiro aspecto da invenção.

Será apreciado que o terceiro aspecto da invenção, então, engloba TGF- β 3s em que o ácido glutâmico na posição 12 do comprimento-total de TGF- β 3 tipo selvagem é substituído, mas a arginina na posição 52 do comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem é retido. O terceiro aspecto da invenção abrange também TGF- β 3s em que o ácido glutâmico na posição 12 do comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem é retido, mas a arginina na posição 52 do comprimento-total de TGF- β 3 tipo selvagem é substituída.

No entanto, é preferível que TGF- β 3s de acordo com o terceiro aspecto da invenção compreenda substituições de ambos os resíduos de ácido glutâmico na posição 12 do comprimento-total de TGF- β 3 tipo selvagem e os resíduos de arginina na posição 52 de comprimento-total TGF- β 3 do tipo selvagem.

Os inventores têm surpreendentemente descoberto que proteínas de acordo com o terceiro aspecto da invenção também têm atividade biológica comparável à do TGF- β 3 do tipo selvagem. Esta constatação é inesperada, uma vez que a substituição de um ou de ambos resíduo de ácido glutâmico na posição 12 do comprimento-total de TGF- β 3 tipo selvagem e/ou resíduo de Arginina na posição 52 de comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem interrompe a formação de uma subunidade-intra de pontes salinas normalmente encontradas em TGF- β 3 tipo selvagem. Esta falha para completar a própria formação de ponte salina pode ser esperada para a diminuição da atividade biológica do TGF- β 3s de acordo com o terceiro aspecto da invenção, uma vez que, a atividade biológica de proteínas, tal como, TGF- β 3s geralmente é acreditado para ser dependente da sua conformação.

Além disso, os inventores têm também encontrado que TGF- β 3s, de acordo com o segundo aspecto da invenção, exibem uma eficiência de êxito de redobramento de que é apenas mais elevada do que a observada para o TGF- β 3 de tipo selvagem. Esta constatação é extremamente surpreendente, uma vez que seria esperado pelos versados que a falta de formação de subunidade-intra de ponte salina que deve ter lugar no TGF- β 3s de acordo com o segundo aspecto da invenção poderia deletericamente influenciar nas incidências de redobramento e, conseqüentemente, diminuir o rendimento da atividade biológica do TGF- β 3.

Assim, proteínas, de acordo com o terceiro aspecto da invenção servem para expandir o repertório de compostos capazes de exercer atividade TGF- β 3 que estão à disposição dos versados. Tal como referido acima, a disponibilidade de tais compostos é importante em contextos, tais como, aqueles em que se deseja usar a atividade terapêutica TGF- β 3.

Os inventores descobriram que uma ou outra do ácido glutâmico na posição 12 do comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem ou a Arginina na posição 52 comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem pode ser substituída por qualquer um resíduo de aminoácido (ou qualquer combinação de resíduos de aminoácidos) selecionados a partir do grupo composto em serina, alanina, treonina, valina, isoleucina, metionina, fenilalanina e leucina.

É preferível que serina seja usada como um resíduo de aminoácido substituto em TGF- β 3s ou fragmentos ou derivados destes, de acordo com o terceiro aspecto da invenção. Serina pode ser utilizada como um substituto para o ácido glutâmico na posição 12 do comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem ou a Arginina na posição 52 do comprimento-total de TGF- β 3 tipo selvagem. A maior parte preferencialmente de serina é usada para substituir tanto o ácido glutâmico na posição 12 do comprimento-total TGF- β 3 tipo selvagem e a arginina na posição 52 de comprimento-total do TGF- β 3 tipo selvagem.

Um primeiro exemplo de um TGF- β 3 preferido de acordo com o terceiro aspecto da invenção é estabelecido na Seqüência ID No. 7. A invenção abrange fragmentos ou derivados biologicamente ativos de Seqüência ID No. 7 compreendendo a substituição Glu12-Ser. cDNA codificando este TGF- β 3 preferido é estabelecido na Seqüência ID No. 8.

Um segundo exemplo de um TGF- β 3 preferido de acordo com o terceiro aspecto da invenção é estabelecido na Seqüência ID No. 9. Fragmentos ou derivados biologicamente ativos da Seqüência ID No. 9 compreendendo a substituição Arg52-Ser constituem também fragmentos ou derivados preferidos, de acordo com a invenção. cDNA codificando este TGF- β 3 preferido é estabelecido na Seqüência ID No. 10.

Um terceiro exemplo de um TGF- β 3 preferido, de acordo com o terceiro aspecto da invenção é estabelecido na Seqüência ID No. 11 fragmentos ou derivados biologicamente ativo de Seqüência ID No. 11 que compreendem tanto a substituição Glu12-Ser e a substituição Arg52-Ser constituem também fragmentos ou derivados preferidos, de acordo com a invenção. cDNA codificando este TGF- β 3 preferido é estabelecido na Seqüência ID No. 12.

Os inventores acreditam que TGF- β 3s ou fragmentos ou derivados destes biologicamente ativos, de acordo com o terceiro aspecto da invenção podem ser utilizados em todos os contextos em que se podem fazer uso da atividade biológica do TGF- β 3 tipo selvagem. Estes incluem, mas não estão limitados a, usos terapêuticos do TGF- β 3. Desta forma, a invenção

também fornece a utilização de um TGF- β 3 ou fragmento ou derivado destes, de acordo com o terceiro aspecto da invenção como um medicamento.

TGF- β 3s da invenção ou fragmentos ou derivados destes biologicamente ativos podem ser utilizados no tratamento de feridas (incluindo
5 feridas crônicas, tais como, úlceras). Eles podem, particularmente, ser utilizados para promover a cicatrização acelerada da ferida com prevenção, redução ou inibição da cicatriz, e/ou para promover a reepitelialização de feridas. TGF- β 3s da invenção pode também ser utilizado para efeitos de prevenção ou tratamento de distúrbios fibróticos, em que pode ser selecionado
10 independentemente do grupo compreendendo fibrose pulmonar, cirrose hepática, esclerodermia e glomerulonefrite, fibrose pulmonar, fibrose hepática, fibrose da pele, fibrose muscular, fibrose por radiação, fibrose renal, Vitreorretinopatia proliferante e fibrose uterina.

TGF- β 3s da invenção pode ser utilizado no tratamento da esclerodermia, distúrbios de angiogênese, restenose, adesões, endometriose,
15 doença isquêmica, indução de cartilagens e osso indução, fertilização *in vitro*, mucosite oral e doença renal. A título de exemplo, a aplicação tópica do dimérico TGF- β 3, tipo selvagem tem sido demonstrado, em modelos animais e clínicos, para acelerar a taxa de cicatrização crônica de úlceras por pressão não cicatrizantes; reduz a incidência, severidade e duração da fase oral
20 da mucosite e reduz os efeitos laterais adversos da radiação da síndrome gastrointestinal resultante dos danos às células-tronco causados pela radioterapia e quimioterapia durante o tratamento do câncer. Os inventores acreditam que TGF- β 3s da invenção ou fragmentos ou seus derivados, benéficamente podem ser utilizados em todas estas indicações.
25

TGF- β 3s da invenção podem ser usados da mesma forma como TGF- β 3 de ocorrência naturalmente, por exemplo, para o tratamento de condições em que podem, por exemplo, ser selecionados independentemente do grupo compreendendo distúrbios fibróticos, esclerodermia, distúrbios de
30 angiogênese, restenose, adesões, endometriose, doença isquêmica, indução de cartilagens e osso, fertilização *in vitro*, mucosite oral, doença renal, prevenção, redução ou inibição da cicatriz, melhoramento da reconexão neu-

ronal no sistema nervoso central e periférico e para prevenir, reduzir ou inibir as complicações da cirurgia ocular (tal como cirurgia de LASIK ou PRK). TGF- β 3s da invenção podem ser utilizados no tratamento de fissura de lábio e palato (por exemplo, em conjugação com a reparação cirúrgica de tais condições) e, na redução ou inibição da cicatriz e cicatrização acelerada de tendões. As formas mutantes de TGF- β 3 descritas na presente invenção são capazes de promover a cicatrização acelerada e/ou evitar, reduzir ou inibir a formação da cicatriz da mesma maneira como TGF- β 3 de ocorrência natural. Eles também são capazes de promover a regeneração epitelial em locais de dano epitelial.

O " TGF- β 3 da invenção" e para ser empregado para englobar qualquer TGF- β 3 mutante, de acordo com qualquer um dos primeiro, segundo ou terceiro aspectos da presente invenção. Será apreciado que TGF- β 3s da invenção não engloba TGF- β ou TGF- β 2. A identidade de um TGF- β 3 pode ser determinada com referência à sua seqüência ou, preferencialmente com referência à sua atividade biológica. Assim, um TGF- β 3 pode ser diferenciado de um TGF- β 1 ou um TGF- β 2 na base de que é capaz de reduzir a formação da cicatriz em uma ferida em que o TGF- β 3 é administrado. TGF- β 3s, de acordo com a presente invenção pode preferencialmente ser TGF- β 3s não natural.

Um TGF- β 3, de acordo com qualquer aspecto da invenção pode ser utilizado na preparação de um medicamento para o tratamento de qualquer condição em que pode ser desejado a utilizar TGF- β 3. Tais usos incluem, mas não se limitando a, tratamento de uma das condições consideradas no presente relatório. Pode ser preferível que TGF- β 3, de acordo com a presente invenção sejam utilizados na preparação de medicamentos para promover a cicatrização acelerada das feridas e/ou a prevenção, redução ou inibição da cicatriz. Essas cicatrizes podem ser associadas com feridas e/ou com distúrbios fibróticos. Medicamentos fabricados com TGF- β 3s da invenção podem preferencialmente ser para uso na pele ou nos olhos (por exemplo, na aceleração da cicatrização da pele ou olhos, ou para a prevenção, redução ou inibição da cicatriz na pele ou olho).

TGF- β 3s, de acordo com a invenção podem ser tanto TGF- β 3s ativo ou latente (ou seja, quer com, ou sem, o peptídeo associado à latência).

Salvo para onde o contexto exigir outra forma todas as referências ao TGF- β 3s, de acordo com a invenção também devem ser tomadas de forma a abranger fragmentos ou derivados de tais TGF- β 3s, onde esses fragmentos ou derivados são caracterizados em que eles compreendem substituições (de acordo com primeiro, segundo ou terceiro aspectos da invenção conforme o caso) que diferenciá-los a partir de fragmentos ou derivados produzidos a partir do TGF- β 3 tipo selvagem (as seqüências de aminoácidos da qual é tido para o presente propósito para ser representada pela Seqüência ID No. 1). Fragmentos ou derivados adequados de TGF- β 3s de acordo com o primeiro, segundo ou terceiro aspecto da invenção podem ser compostos, de pelo menos, 10 resíduos de aminoácidos, preferencialmente, pelo menos, 40 resíduos de aminoácidos, mais preferencialmente, pelo menos, 70 resíduos de aminoácidos, e mais preferencialmente ainda, pelo menos, 100 resíduos de aminoácidos.

Referências no presente relatório para TGF- β 3s e fragmentos de TGF- β 3s também englobam derivados de tais proteínas ou fragmentos, exceto para onde o contexto requerer outra forma.

Sem limitações, exemplos adequados de formas adequadas de derivados podem ser selecionados do grupo consistindo em: derivados de peptídeo terapeuticamente eficaz do TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); fragmentos ou derivados terapeuticamente eficaz compreendendo ou baseados no farmacóforo de TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); derivados peptídeos terapeuticamente eficaz de TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); derivados de D-aminoácido terapeuticamente eficaz de TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); peptidomiméticos terapeuticamente eficaz baseado no TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); análogos pépticos terapeuticamente eficaz de TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); pseudopeptídeos terapeuticamente eficaz baseado no TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); peptídeos retro-inverso terapeuticamente

eficaz baseado no TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); derivativos depsi-peptídeo terapeuticamente eficaz baseados no TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos); derivados P-peptídeo terapeuticamente eficazes baseados no TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos), e derivados retro-peptídeos terapeuticamente eficaz baseados no TGF- β 3s da invenção (ou seus fragmentos).

Será apreciado que, para efeitos da presente invenção "um TGF- β 3" pode ser empregado para englobar tanto as formas monoméricas e diméricas de TGF- β 3. Os inventores têm surpreendentemente encontrado que TGF- β 3s de acordo com a presente invenção são capazes de exercer os seus efeitos biológicos, em ambos as formas monoméricas e diméricas. Isto contrasta surpreendentemente com o que foi previamente relatado no estado da técnica, onde é geralmente considerado que TGF- β s, tal como, TGF- β 3 podem apenas exercer a atividade biológica, quando em sua forma dimérica. Os inventores concluíram que TGF- β 3s, de acordo com a presente invenção, podem ser utilizados na forma monomérica que proporciona grandes vantagens na medida em que tais formas monoméricas podem ser geradas através de técnicas de dobramento relativamente simples (exemplos de que são discutidos mais adiante) deste modo, aumentando a velocidade com a qual as moléculas biologicamente ativas podem ser geradas, ao mesmo tempo, reduzindo os custos associados com a produção de tais moléculas.

Pode ser preferível que um TGF- β 3 monomérico da invenção é um TGF- β 3, tal como estabelecido no Seqüência ID N^{os} 3, 5, 7, 9 ou 11, ou um fragmento ou derivado deste.

Um "medicamento da invenção" é para ser empregado para compreender qualquer medicamento que compreenda um TGF- β 3, de acordo com a invenção. Um medicamento da invenção pode, adicionalmente ou alternativamente ser um medicamento que compreenda um ácido nucléico codificando um TGF- β 3, de acordo com a invenção. Este engloba ambos os medicamentos *per se* (ou seja, independentemente da utilização em que o medicamento é para ser posto), e medicamentos para uso em aplicações

terapêuticas específicas (por exemplo, no tratamento ou melhoria das condições consideradas no presente relatório). É também entendido que medicamentos da invenção devem ser entendidos para abranger medicamentos que compõem derivados ou fragmentos TGF- β 3s adequados da invenção, ou ácidos nucleicos codificando tais fragmentos ou derivados.

Um "método de tratamento da invenção" (ou "método da invenção") é para ser empregado para compreender qualquer método de tratamento que utiliza uma quantidade terapeuticamente eficaz de TGF- β 3, de acordo com a invenção, ou um ácido nucleico codificando tal TGF- β 3. É para ser entendido que os métodos de tratamento da invenção devem ser entendidos para abranger métodos de tratamento que utilizam adequados fragmentos ou derivado de TGF- β 3s da invenção, ou ácidos nucleicos codificando tais fragmentos ou derivado.

Medicamentos compreendendo TGF- β 3s da invenção ou fragmentos ou derivados biologicamente ativos destes, podem ser utilizados no tratamento de feridas (incluindo as feridas crônicas, tais como, úlceras). Eles podem particularmente ser usados para promover a cicatrização acelerada da ferida com a prevenção redução ou inibição da cicatriz e/ou para promover o reepitelialização de feridas. TGF- β 3s da invenção podem também ser utilizados para efeitos de prevenção ou tratamento de distúrbios fibróticos, tais como, fibrose pulmonar, cirrose e fibrose hepática, esclerodermia, glomerulonefrite, fibrose de pele, fibrose por radiação, fibrose renal, Vitreoretinopatia proliferativa ou fibrose uterina.

TGF- β 3s da invenção podem ser utilizados no tratamento de condições selecionadas independentemente do grupo constituído em: esclerodermia, distúrbios de angiogênese, restenose, adesões, endometriose, doença isquêmica, indução de cartilagem e osso, fertilização *in vitro*, mucosite oral, doença renal, Fibrose pulmonar, cirrose e fibrose hepática, glomerulonefrite, fibrose de pele, fibrose por radiação, fibrose renal e fibrose uterina. A título de exemplo, a aplicação tópica de TGF- β 3 dimérico, tipo selvagem tem sido demonstrada, em modelos animais e clínicos para acelerar a taxa de cicatrização de úlceras por pressão não cicatrizante crônicas; reduzir a

incidência, severidade e duração da mucosite oral e reduzir os efeitos laterais adversos da radiação da síndrome gastrointestinal resultante de danos às células tronco causados pela radioterapia e quimioterapia durante o tratamento do câncer. Os inventores acreditam que TGF- β 3s da invenção ou
5 fragmentos ou derivados destes podem ser benéficamente utilizados em todas destas indicações.

A atividade biológica a ser exibida pelo TGF- β 3 ou fragmento ou derivado deste, de acordo com a presente invenção pode preferencialmente ser atividade anticicatrizante de TGF- β 3 e esta atividade pode preferencial-
10 mente ser investigada *in vivo*.

Uma quantidade efetiva terapeuticamente de TGF- β 3 ou um fragmento ou derivado deste, de acordo com a presente invenção é uma quantidade suficiente para causar uma exigida

- i) aceleração na cura da ferida e/ou inibição de cicatrização; ou
- 15 ii) promoção da regeneração epitelial; ou
- iii) prevenção e/ou tratamento de um distúrbio fibrótico.

A extensão da aceleração da cura da ferida e/ou inibição da cicatriz ou regeneração epitelial que pode ser exigida será aparente, e certamente pode prontamente ser determinada por um clínico responsável para o
20 cuidado do paciente. Uma avaliação adequada da extensão da aceleração da cura da ferida e/ou inibição da cicatriz ou promoção da regeneração epitelial pode ser determinada pelo clínico e pode ser com referência aos métodos de medição sugeridos descritos aqui.

TGF- β 3s adequados de acordo com a invenção, bem como
25 fragmentos ou derivados de tal TGF- β 3s podem ser selecionados com referência a qualquer ou todas as considerações descritas aqui.

A habilidade de TGF- β 3s da invenção para acelerar a cura da ferida pode ser rapidamente apreciada e/ou medida com referência a propriedades exibidas pela feridas tratadas. Para o presente propósito uma "ferida
30 tratada" pode ser considerada ser uma ferida exposta a uma quantidade terapeuticamente eficaz do medicamento da invenção ou em que tenha recebido tratamento de acordo com os métodos da invenção.

A aceleração da cicatrização de feridas tratadas pode ser ilustrada por uma taxa aumentada de epitelialização em comparação às feridas de controle. Assim os métodos e medicamentos da invenção promovem uma reconstituição mais rápida de uma camada epitelial funcional sobre uma área ferida do que, de outra maneira, seria o caso.

Alternativa ou adicionalmente, a cicatrização acelerada de feridas tratadas pode ser ilustrada pela largura diminuída comparada às feridas de controle em pontos de tempo comparáveis. Será apreciado que esta redução na largura da ferida assegura que haja uma taxa relativamente mais rápida de fechamento da ferida (uma vez que há menos largura da ferida a estar fechada) e esteja indicativo da capacidade de tais medicamentos de acelerar a resposta de cicatrização. Feridas mais estreitas podem resultar em cicatrizes mais estreitas que sejam esteticamente preferíveis a cicatrizes mais largas.

Conseqüentemente, a cura da ferida acelerada no contexto da presente invenção deve ser tomada para abranger todo o aumento na taxa de cicatrização de uma ferida tratada em comparação à taxa de cicatrização que ocorre em feridas de controle tratadas ou não tratadas. Preferivelmente a aceleração da cura da ferida pode ser avaliada em relação à comparação da taxa de reepitelialização alcançada em feridas tratadas e de controle, ou à comparação da largura relativa de feridas tratadas e de controle em pontos de tempo comparáveis. Mais preferivelmente a cicatrização acelerada da ferida pode ser definida como compreendendo ambas uma taxa aumentada de repitelialização e uma redução de largura de ferida comparada a feridas de controle em pontos de tempo comparáveis.

Preferivelmente, a promoção da cicatrização acelerada da ferida pode causar uma taxa de cura da ferida que é de pelo menos 5%, 10%, 20% ou 30% maior do que a taxa de cicatrização que ocorre em uma ferida de controle ou não tratada. Mais preferivelmente a promoção da cicatrização acelerada da ferida pode causar uma taxa de cicatrização que é de pelo menos 40%, 50% ou 60% maior do que a cicatrização em uma ferida de controle. É ainda mais preferível que a promoção da cicatrização acelerada da fe-

rida pode causar uma taxa de cicatrização que é de pelo menos 70%, 80%, ou 90% maior do que aquela que ocorre em feridas de controle, e mais preferivelmente a promoção da cicatrização acelerada da ferida pode causar uma taxa de cicatrização que é de pelo menos 100% maior do que a taxa que ocorre em feridas de controle.

Existe uma larga escala de distúrbios de cicatrização de ferida que são caracterizados, ou pelo menos caracterizados parcialmente, por falha, pelo atraso ou retardo inapropriado da resposta de cura da ferida normal. A capacidade de determinados métodos e medicamentos da invenção de promover a cicatrização acelerada da ferida é, assim, de utilidade na prevenção ou tratamento de tais distúrbios.

Uma vez que determinados métodos e medicamentos da invenção são capazes de causar a aceleração da cura da ferida através da promoção de uma resposta de reepitelialização estimulada (que aumenta, desse modo, a taxa na qual a ferida se fecha) se apreciado que estes métodos e medicamentos da invenção são particularmente vantajosos para tratamento das feridas de pacientes que podem, de outra maneira, tender para reepitelialização defeituosa, atrasada ou, de outra maneira, prejudicada. Por exemplo, é bem-conhecido que feridas cutâneas na velhice exibem uma resposta de reepitelialização menos vigorosa do que aquelas de indivíduos jovens. Há também muitas outras circunstâncias ou distúrbios em que a cura da ferida é associada à reepitelialização atrasada ou de outra maneira prejudicada. Por exemplo, pacientes que sofrem de diabetes, pacientes com polifármaco (por exemplo, em consequência da idade avançada), mulheres com pós-menopausa, pacientes suscetíveis a danos de pressão (por exemplo, paraplégicos), pacientes com doença venosa, pacientes clinicamente obesos, pacientes que recebem quimioterapia, pacientes que recebem radioterapia, pacientes que recebem o tratamento esteróide ou pacientes imunocomprometidos podem todos sofrer de cicatrização de ferida com reepitalização prejudicada. Em muitos casos a falta de uma resposta de reepitalialização apropriada contribui para o desenvolvimento de infecções no local da ferida, que pode, por sua vez, contribuir para a formação de feridas crônicas, tais

como úlceras. Conseqüentemente, será apreciado que tais pacientes são particularmente prováveis de serem beneficiados de métodos ou medicamentos adequados da invenção.

5 Feridas crônicas são talvez o exemplo mais importante de distúrbios associados com uma resposta atrasada de cura da ferida. Uma ferida pode ser definida como crônica se não mostra nenhuma tendência de cicatrização dentro de oito semanas a partir da formação quando sujeita a tratamento terapêutico (convencional) apropriado. Exemplos bem-conhecidos de feridas crônicas incluem úlceras venosas, úlceras diabéticas e úlceras decu-
10 bitus, porém as feridas crônicas podem surgir de outros danos agudos normais a qualquer hora. Feridas tipicamente crônicas podem surgir como resultado de infecção do local da ferida, tratamento inadequado da ferida, ou como um segmento de transtorno de tecido progressivo causado por doença vascular metabólica, arterial ou venosa, pressão, dano de radiação, ou tu-
15 mor.

Será apreciado que métodos e medicamentos da invenção capazes de acelerar a cura da ferida podem ser utilizados no tratamento de feridas crônicas existentes a fim de promover sua cicatrização. Tais métodos e medicamentos podem promover a reepitelização de feridas crônicas, des-
20 se modo, causando cicatrização e fechamento do distúrbio. Métodos e medicamentos preferidos da invenção (tais como aqueles utilizando TGF- β 3s compreendendo seqüências ID N^{os} 3,5,7,9 e 11) podem também inibir a cicatriz associada com cura da ferida. A prevenção da cicatriz em tais contextos pode ser particularmente vantajosa, uma vez que feridas crônicas tipica-
25 mente se estendem sobre porções relativamente grandes do corpo do paciente.

Além disso, ou alternativamente, para seu uso no tratamento de feridas crônicas existentes, métodos e medicamentos adequados da invenção podem ser usados para prevenir feridas agudas de pacientes pré-
30 dispostos para a cicatrização de ferida enfraquecida desenvolvendo-se em feridas crônicas. Uma vez que métodos e medicamentos adequados da invenção são capazes de promover cobertura epitelial do local danificado, eles

são capazes de reduzir a probabilidade de uma ferida tratada se tornar infectada. Similarmente, esta promoção de reepitalização pode beneficiar o tratamento de feridas crônicas que surgem como resultado de outras condições tais como diabetes ou doença venosa.

5 Um grupo adicional de pacientes que podem derivar benefício particular dos métodos e medicamentos da invenção é aqueles em que o sistema imunológico é comprometido (por exemplo, pacientes que se submetem à quimioterapia ou à radioterapia, ou aqueles que sofrem de infecção por HIV). É bem-reconhecido que feridas de pacientes imunocomprometidos,
10 que podem não ser capazes de montar uma resposta inflamatória normal após ferimento, tendem a ser associados com resultados de cicatrização fracos. Tais pacientes podem tirar proveito do tratamento com métodos e medicamentos adequados da invenção.

A capacidade de TGF- β 3 da invenção tal como aquela compre-
15 endendo as seqüências ID Nº 3, 5, 7, 9 ou 11 para promover a cicatrização acelerada de ferida, enquanto prevenindo, reduzindo ou inibindo a cicatriz é também de uso em mais contextos clínicos gerais. Os exemplos destes benefícios adicionais podem ser considerados com referência à cicatrização de feridas pela intenção primária, secundária ou terciária, como descrita abaixo.

20 Para as finalidades da presente invenção, cicatrização pela intenção primária pode ser considerada para envolver o fechamento por meios cirúrgicos (tais como suturas, tiras ou grampos adesivos) de bordas opostas de uma ferida. Cicatrização pela intenção primária é empregada tipicamente no tratamento de incisões cirúrgicas ou em outras feridas limpas, e é associ-
25 ada com níveis mínimos de perda de tecido. A pessoa versada reconhecerá que uma vez que TGF- β 3, de acordo com a invenção (tal como, aqueles compreendendo a seqüência ID Nº 3, 5, 7, 9 ou 11) são capazes de reduzir a largura da ferida, eles também facilitam a junção de bordas opostas da ferida, e assim pode ser benéfico na cicatrização de ferida pela intenção
30 primária. Além disso, tais métodos ou medicamento podem (como descrito mais abaixo) resultar na prevenção, redução ou inibição de cicatriz que pode de outra maneira ocorrer em tal cicatrização. Os inventores acreditam que o

tratamento, desse modo, pode ter um impacto tanto na aparência macroscópica e microscópica das cicatrizes formadas das feridas tratadas; macroscopicamente as cicatrizes podem ser menos visíveis e misturam-se com a pele circunvizinha, microscopicamente as cicatrizes podem exibir uma regeneração de uma estrutura de pele mais normal.

Para os propósitos da presente invenção, cicatrização pela intenção secundária pode ser considerada para constituir o fechamento das feridas pelo processo de cura da ferida, sem intervenção cirúrgica direta. As feridas a serem cicatrizadas pela intenção secundária podem ser sujeitas a cuidado contínuo (por exemplo, o curativo e o recurativo da ferida assim como a aplicação de medicamentos adequados), mas são os processos naturais de formação do tecido de granulação e reepitelialização que causam o fechamento da ferida. Será apreciado que, uma vez que, os TGF- β 3s da invenção (tais como, aqueles que utilizam compreendem seqüência ID N^{os} 3, 5, 7, 9 ou 11) são capazes de aumentar a taxa de reepitalização quando comparados àquelas que ocorrem em feridas de controle, eles têm utilidade na promoção de cicatrização de ferida por intenção secundária.

Cicatrização pela intenção terciária pode ser considerada para compreender o fechamento cirúrgico de uma ferida que foi deixada previamente aberta para permitir pelo menos a formação parcial do tecido de granulação e reepitelialização. As propriedades de métodos e medicamentos preferidos da invenção que os fazem adequados para uso na cicatrização pela intenção primária ou secundária são também benéficos no contexto de promover a cura da ferida pela intenção terciária.

O uso de TGF- β 3s da invenção utilizando tais como seqüência ID N^o 3, 5, 7, 9 ou 11 para estimular reepitelialização (como parte de sua promoção de cicatrização acelerada de ferida) enquanto inibindo a cicatriz é também particularmente eficaz no tratamento de feridas associadas a procedimentos de enxerto. O tratamento usando tais métodos e medicamentos da invenção é benéfico para tanto no local doador de enxerto (onde pode ajudar no restabelecimento de uma camada epitelial funcional ao prevenir, reduzir ou inibir a formação de cicatriz), e também em locais de destinos de enxerto

(onde os efeitos da anticicatriz do tratamento inibem a formação de cicatriz, enquanto a cicatrização acelerada promove integração do tecido enxertado). Os inventores acreditam que os métodos e os medicamentos da invenção conferem vantagens nos contextos de pele que utilizam enxerto, pele artificial, ou substitutos da pele.

Os inventores descobriram que os métodos e medicamentos da invenção que utilizam TGF- β 3s compreendendo seqüência ID N^{os} 3, 5, 7, 9 ou 11 são capazes de promover a cicatrização acelerada da ferida com inibição da cicatriz quando administrados tanto antes do ferimento ou uma vez que uma ferida já tenha sido formada.

Os inventores descobriram que métodos ou medicamentos da invenção que utilizam TGF- β 3s, tais como aqueles que compreendem seqüências ID N^{os} 3, 5, 7, 9 e 11 são capazes de promover a regeneração epitelial. A promoção da regeneração epitelial dentro do contexto da presente invenção pode ser compreendida para abranger qualquer aumento na taxa da regeneração epitelial em comparação à regeneração que ocorre em um epitélio de controle tratado ou não tratado.

A taxa de regeneração epitelial fixada usando métodos ou medicamentos adequados de acordo com a invenção pode prontamente ser comparada com àquela que ocorre no epitélio de controle tratado ou não tratado usando qualquer modelo adequado de regeneração epitelial conhecido na técnica. Por exemplo, a taxa na qual os locais de dano epitelial experimental tendo regeneração de áreas conhecidas podem ser comparados usando modelos *in vivo* bem-conhecidos em camundondos, ratos, coelhos ou porcos, tais como, aqueles descritos em Tomlinson e Ferguson (2003), Davidson e outros (1991) e Paddock e outros (2003).

Sem desejar limitar-se por qualquer hipótese, os inventores acreditam que a promoção da regeneração epitelial alcançada por TGF- β 3s da invenção é mediada por sua promoção da migração celular epitelial. As células epiteliais (a migração de que foi promovida) são desse modo capazes de repovoar e regenerar mais rapidamente o epitélio danificado do que ocorre na ausência de tratamento.

Será apreciado que a promoção de regeneração epitelial usando TGF- β 3s da invenção pode ser de uso para induzir reepitelialização eficaz nos contextos em que a resposta de reepitelialização é prejudicada, inibida, retardada ou de outra maneira, defeituosa. A promoção de regeneração epitelial pode também ser efetuada para acelerar a taxa de respostas de regeneração epitelial defeituosa ou normal em pacientes que sofrem de dano epitelial.

Há muitos contextos em que a resposta de reepitelialização do corpo pode ser defeituosa. Por exemplo, reepitelialização defeituosa na pele é associada com condições tais como pênfigo, doença de Hailey-Hailey (pênfigo benigno familiar), necrólise epidérmica tóxica (TEN)/síndrome de Lyell, epidermólise bolhosa, leishmaniose cutânea e ceratose actínica. Reepitelialização defeituosa dos pulmões pode ser associada com fibrose pulmonar idiopática (IPF) ou doença de pulmão intersticial. Reepitelialização defeituosa do olho pode ser associada com condições tais como deficiência de célula de tronco limbal parcial ou erosões córneas. Reepitelialização defeituosa do cólon ou trato gastrointestinal pode ser associada com condições tais como fissura anal crônica (fissura *in ano*), colite ulcerosa ou doença de Crohn, e outros distúrbios inflamatórios de intestino.

Como foi exposto acima, TGF- β 3s da presente invenção podem prevenir, reduzir ou, de outra maneira, inibir a cicatriz. Esta inibição da cicatriz pode ser efetuada em qualquer local do corpo e em qualquer tecido ou órgão, incluindo a pele, o olho, os nervos, os tendões, os ligamentos, o músculo, e a cavidade oral (incluindo os lábios e o palato), assim como órgãos internos (tais como o fígado, o coração, o cérebro, a cavidade abdominal, a cavidade pélvica, a cavidade torácica, os intestinos e o tecido reprodutivo). Na pele, o tratamento pode melhorar a aparência macroscópica e microscópica de cicatrizes; macroscopicamente as cicatrizes podem ser menos visíveis e misturam-se com a pele circunvizinha, microscopicamente as fibras de colágeno dentro da cicatriz podem ter a morfologia e a organização que é mais similar àsquelas na pele circunvizinha. A prevenção, redução ou inibição de cicatrização dentro do contexto da presente invenção deve ser compreendi-

da para abranger qualquer grau de prevenção, redução ou inibição em cicatrização em comparação ao nível de cicatrização que ocorre em uma ferida de controle tratada ou não tratada (como definido em outra parte no relatório descritivo). Exceto onde o contexto exige, de outra maneira, referências à

5 "prevenção", "redução" ou "inibição" de cicatrização podem ser tomadas para serem mecanismos equivalentes que são todos manifestados em atividade anticicatrização.

A prevenção, redução ou inibição da cicatriz cutânea usando métodos e medicamentos da invenção pode ser avaliada e/ou medida com

10 referência à aparência microscópica ou, preferivelmente, macroscópica de uma cicatriz tratada em comparação à aparência de uma cicatriz não tratada. Mais preferivelmente a prevenção, redução ou inibição de cicatrização pode ser avaliada com referência à aparência macroscópica e microscópica de uma cicatriz tratada. Para as presentes finalidades uma "cicatriz tratada"

15 pode ser definida como uma cicatriz formada na cicatrização de uma ferida tratada, visto que uma "cicatrização não tratada" pode ser definida como a cicatriz formada na cicatrização de uma ferida não tratada, ou uma ferida tratada com placebo ou cuidado-padrão. Cicatrizes de comparação adequadas podem preferivelmente ser combinadas com cicatriz tratada com referência à idade, local, tamanho e paciente da cicatriz.

20

Em consideração à aparência macroscópica de uma cicatriz resultando de uma ferida tratada, a extensão de cicatrização, e então a magnitude de qualquer prevenção, inibição ou redução na cicatriz alcançada, pode ser avaliada com referência a qualquer de vários parâmetros.

25 Parâmetros adequados para a avaliação macroscópica de cicatrizes podem incluir:

i) Cor da cicatriz. Como notado acima, as cicatrizes podem tipicamente ser hipopigmentada ou hiperpigmentada no que refere-se à pele circunvizinha. A inibição ou a redução de cicatrização pode ser demonstrada

30 quando a pigmentação de uma cicatriz tratada se aproxima mais daquela da pele não cicatrizada do que a pigmentação de uma cicatriz não tratada. Similarmemente, as cicatrizes podem ser mais vermelhas do que a pele circunvizi-

nha. Neste caso a inibição ou a redução de cicatrização pode ser demonstrada quando a vermelhidão de uma cicatriz tratada se desvanece mais cedo, ou mais completamente, ou assemelha-se mais proximamente à aparência da pele circunvizinha, comparada a uma cicatriz não tratada.

5 ii) Altura da cicatriz. As cicatrizes podem tipicamente ser altas ou baixas em comparação à pele circunvizinha. A inibição ou a redução de cicatrização pode ser demonstrada quando a altura de uma cicatriz tratada se aproxima mais daquela da pele não cicatrizada (isto é nem está mais alta nem mais baixa) do que a altura de uma cicatriz não tratada.

10 iii) Textura de superfície da cicatriz. As cicatrizes podem ter superfícies que são relativamente mais lisas do que a pele circunvizinha (que causa uma cicatriz com uma aparência "lustrada") ou que são mais ásperas do que a pele circunvizinha. A inibição ou a redução de cicatrização pode ser demonstrada quando a textura de superfície de uma cicatriz tratada se apro-
15 xima mais daquela da pele não cicatrizada do que a textura de superfície de uma cicatriz não tratada.

 iv) Rigidez da cicatriz. A composição e a estrutura anormais das cicatrizes significam que é normalmente mais dura do que a pele não danificada que cerca a cicatriz. Neste caso, a inibição ou a redução de cicatriza-
20 ção pode ser demonstrada quando a rigidez de uma cicatriz tratada se aproxima mais daquela da pele não cicatrizada do que a rigidez de uma cicatriz não tratada.

 Uma cicatriz tratada demonstrará preferivelmente prevenção, inibição ou redução da cicatriz como avaliada com referência a pelo menos
25 um dos parâmetros para avaliação macroscópica exposta acima. Mais preferivelmente uma cicatriz tratada pode demonstrar cicatriz prevenida, inibida ou reduzida com referência a pelo menos dois dos parâmetros, mais preferivelmente a pelo menos três dos parâmetros, e mais preferivelmente todos os quatro destes parâmetros. Uma avaliação total de cicatrização pode ser feita
30 usando, por exemplo, uma Escala Analógica Visual ou uma escala de avaliação digital.

 Parâmetros adequados para avaliação microscópica de cicatri-

zes podem incluir:

- 5 i) Espessura de fibras de matriz extracelular (ECM). Cicatrizes tipicamente contêm fibras mais finas de ECM do que são encontradas na pele circunvizinha. Esta propriedade é ainda mais pronunciada no caso de quelóide e de cicatrizes hipertróficas. A inibição ou a redução de cicatrização pode ser demonstrada quando a espessura de fibras de ECM em uma cicatriz tratada se aproxima mais da espessura de fibras de ECM encontradas na pele não cicatrizada do que a espessura de fibras encontradas em uma cicatriz não tratada.
- 10 ii) Orientação de fibras de ECM. Fibras de ECM encontradas em cicatrizes tendem a exibir um maior grau de alinhamento uma com as outras do que aquelas encontradas na pele não tratada (que têm uma orientação aleatória denominada freqüentemente como "cesta de basquete"). A ECM de cicatrizes patológicas tais como quelóides e de cicatrizes hipertróficas pode
15 exibir orientações ainda mais anômalas, formando freqüentemente grandes "redemoinhos" ou "cápsulas" de moléculas de ECM. Conseqüentemente, a inibição ou a redução de cicatrização pode ser demonstrada quando a orientação de fibras de ECM em uma cicatriz tratada se aproxima mais da orientação de fibras de ECM encontradas na pele não cicatrizada do que a orientação de tais fibras encontradas em uma cicatriz não tratada.
20
- iii) Composição de ECM da cicatriz. A composição de moléculas de ECM presentes em cicatrizes mostra diferenças daquela encontrada na pele normal, com uma redução na quantidade de elastina presente em ECM de cicatrizes. Assim a inibição ou a redução de cicatrização pode ser demonstrada quando a composição de fibras de ECM na derme de uma cicatriz tratada se aproxima mais da composição de tais fibras encontradas na pele não tratada do que a composição encontrada em uma cicatriz não tratada.
25
- iv) Celularidade da cicatriz. As cicatrizes tendem a conter relativamente menos células do que a pele não cicatrizada. Conseqüentemente,
30 será apreciado que a inibição ou a redução de cicatrização pode ser demonstrada quando a celularidade de uma cicatriz tratada se aproxima mais

da celularidade da pele não cicatrizada do que a celularidade de uma cicatriz não tratada.

Uma cicatriz tratada demonstrará preferivelmente prevenção, redução ou inibição da cicatriz como avaliada com referência a pelo menos um dos parâmetros para avaliação microscópica exposto acima. Mais preferivelmente uma cicatriz tratada, pode demonstrar prevenção, redução ou inibição da cicatriz com referência a pelo menos dois dos parâmetros, mais preferivelmente pelo menos três dos parâmetros, e mais preferivelmente todos os quatro destes parâmetros.

Prevenção, redução ou inibição da cicatriz de uma ferida tratada pode adicionalmente ser avaliada com referência a parâmetros adequados usados no:

- i) Avaliação clínica macroscópica de cicatrizes, particularmente avaliação de cicatrizes sobre um sujeito;
- ii) Avaliação de imagens fotográficas de cicatrizes;
- iii) Avaliação de moldes de silicone ou de moldes de gesso positivo feitos de moldes de silicone de cicatrizes; e
- iv) Avaliação microscópica de cicatrizes, por exemplo, por análise histológica da estrutura microscópica de cicatrizes.

Será apreciado que prevenção, redução ou inibição da cicatriz de uma ferida tratada pode ser indicada pela melhoria de um ou mais de tais parâmetros adequados, e que no caso de prevenção, redução ou inibição como avaliado com referência a um número de parâmetros que estes parâmetros podem ser combinados de esquemas diferentes de avaliação (por exemplo, redução, inibição ou melhoria em pelo menos um parâmetro usado na avaliação macroscópica e em pelo menos um parâmetro usado na avaliação microscópica).

Prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser demonstrada por uma melhoria em um ou mais parâmetros que indicam que uma cicatriz tratada se aproxima mais da pele não cicatrizada com referência aos parâmetros selecionados do que uma cicatriz não tratada ou de controle.

Parâmetros adequados para a medição e avaliação clínicas de

cicatrizes podem ser selecionados baseados em uma variedade de medições ou avaliações que incluem aquelas descritas por Beausang e outros (1998) e Van Zuijlen e outros (2002).

Tipicamente, parâmetros adequados podem incluir:

- 5 1. *Avaliação com relação à classificação de cicatriz da Escala Analógica Visual (VAS).*

Prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser demonstrada por uma redução na classificação de VAS de uma cicatriz tratada quando comparada a uma cicatriz de controle. Uma VAS adequada para o uso na
10 avaliação de cicatrizes pode ser baseada no método descrito por Beausang e outros (1998).

2. *Altura de cicatriz, largura de cicatriz, perímetro de cicatriz, área de cicatriz ou volume de cicatriz.*

A altura e a largura de cicatrizes podem ser medidas diretamente sobre o sujeito, por exemplo, por uso de dispositivos de medição manuais
15 tais como compassos de calibre. Largura de cicatriz, perímetro e área podem ser medidos sobre o sujeito ou por análise da imagem de fotografias da cicatriz. A pessoa versada também estará ciente de métodos e dispositivos não invasivos adicionais que podem ser usados para investigar parâmetros
20 adequados, incluindo molde de silicone, ultra-som, profilimetria tridimensional óptica e Imagem de Ressonância Magnética de alta resolução.

Prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser demonstrada por uma redução na altura, largura, área ou volume, ou qualquer combinação dos mesmos, de uma cicatriz tratada em comparação a uma cicatriz
25 não tratada.

3. *Aparência e/ou cor de cicatriz comparada à pele não cicatrizada circunvizinha.*

Aparência ou cor de uma cicatriz tratada pode ser comparada àquela da pele não cicatrizada circunvizinha, e as diferenças (eventualmente) comparadas com a diferença entre a aparência e cor de cicatrizes não
30 tratadas e pele não cicatrizadas. Tal comparação pode ser feita com base em uma avaliação visual das respectivas cicatrizes e pele não cicatrizada. A

aparência de uma cicatriz pode ser comparada com a pele não cicatrizada com referência a se a cicatriz é mais clara ou mais cicatrização do que a pele não cicatrizada. As respectivas cores das cicatrizes e da pele podem perfeitamente ser combinadas a uma outra, ligeiramente descombinada, obviamente descombinada ou rudemente descombinada.

Alternativa ou adicionalmente para avaliação visual, há um número de dispositivos colorimétricos não invasivos que podem fornecer dados com relação à pigmentação de cicatrizes e pele não cicatrizada, assim como a vermelhidão da pele (que pode ser um indicador do grau de vascularidade presente na cicatriz ou na pele). Exemplos de tais dispositivos incluem o Minolta Chromameter CR-200/300; Labscan 600; Dr. Lange Micro Color; Espectrômetro Derma; Medidor de fluxo de laser Doppler; e espaço de Análise intracutânea Espectrofotométrica (SIA).

Prevenção, redução ou inibição de cicatriz pode ser demonstrada por uma magnitude menor de diferença entre a aparência ou cor de cicatrizes tratadas e pele não cicatrizada do que entre cicatrizes não tratadas e pele não cicatrizadas.

4. *Distorção de cicatriz e desempenho mecânico*

Distorção de cicatriz pode ser avaliada pela comparação visual de uma cicatriz e de uma pele não cicatrizada. Uma comparação adequada pode classificar uma cicatriz selecionada como a causa de nenhuma distorção, distorção suave, distorção moderada ou distorção severa.

O desempenho mecânico de cicatrizes pode ser avaliado usando um número de métodos e dispositivos não invasivos baseados em sucção, pressão, torção, tensão e acústica. Exemplos adequados incluídos nos dispositivos conhecidos capazes de uso na avaliação do desempenho mecânico de cicatrizes incluem Indentômetro, Cutômetro, Reviscômetro, análise Viscoelástica de pele, Dermaflex, Durômetro, Medidor de Torque Dérmico, Elastômetro.

Prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser demonstrada por uma redução na distorção causada por cicatrizes tratadas em comparação àquela causada por cicatrizes não tratadas. Será apreciado também

que prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser demonstrada pelo desempenho mecânico da pele não tratada que é mais similar àquele de cicatrizes tratadas do que de cicatrizes não tratadas.

5. Contorno de cicatriz e textura de cicatriz.

5 Contorno de cicatriz pode ser investigado por meios de avaliação visual. Parâmetros adequados para considerar em tal avaliação incluem se uma cicatriz é ou não nivelada com a pele circunvizinha, ligeiramente presumida, ligeiramente penetrada, hipertrófica ou quelóide. A textura de uma cicatriz pode ser avaliada com referência à aparência de cicatriz, e esta
10 pode também ser comprometida por uma avaliação visual se a cicatriz for, por exemplo, opaca ou brilhante ou tem uma aparência áspera ou lisa em comparação à pele não cicatrizada.

 A textura de cicatriz pode adicionalmente ser avaliada com referência a se a cicatriz tem a mesma textura que a pele não cicatrizada (textura normal), é apenas palpável, firme ou dura comparada à pele não cicatrizada. A textura de cicatrizes pode também ser avaliada com referência à
15 escala de Hamilton (descrita em Crowe e outros, 1998).

 Além das técnicas expostas acima, há um número de dispositivos profilométricos não invasivos que usam métodos óticos ou mecânicos
20 para avaliação do contorno da cicatriz e/ou textura. Tais avaliações podem ser realizadas no corpo do sujeito ou, por exemplo, em impressões de molde de silicone de cicatrizes, ou moldes de gesso positivo feitos de tais impressões.

 Prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser demonstrada em eventos que cicatrizes tratadas tiverem perfis e texturas de cicatriz
25 mais comparáveis à pele não cicatrizada do que cicatrizes não tratadas.

Avaliações Fotográficas.

Painel de Posição Independente.

 Avaliação fotográfica de cicatrizes tratadas e não tratadas pode
30 ser executada por um painel de configuração independente de assessores que usam fotografias calibradas e padronizadas das cicatrizes. As cicatrizes podem ser avaliadas por um painel de configuração independente para for-

- necer dados categóricos de classificação (por exemplo, que uma dada cicatriz tratada é "melhor", "pior" ou "indiferente" quando comparada a uma cicatriz não tratada) e aos dados quantitativos usando uma escala de Analógica Visual (VAS) baseada no método descrito por Beausang e outros (1998). A
- 5 captação destes dados pode preparar o uso de software adequado e/ou sistemas eletrônicos como descritos no pedido de patente co-pendente do requerente.

Painel de Perito

- Avaliação fotográfica de cicatrizes tratadas e não tratadas pode
- 10 alternativa ou adicionalmente ser executada por um painel dos assessores de perito que usam fotografias calibradas e padronizadas das cicatrizes a serem avaliadas. O painel de peritos pode preferivelmente consistir nos indivíduos adequados versados na técnica tal como cirurgiões plásticos e cientistas de fundamentos adequados.

- 15 Tal avaliação pode fornecer dados categóricos, como descritos acima ou com relação à comparação de um curso de tempo de imagens de cicatrizes tratadas e não tratadas selecionadas.

Avaliações adequadas a serem feitas podem incluir:

- Identificação da melhor cicatriz, que para as finalidades da presente invenção pode ser considerada a cicatriz que mais se assemelha à
- 20 pele circunvizinha. Mais uma vez a melhor cicatriz foi identificada, a magnitude da diferença entre cicatrizes pode ser considerada, por exemplo, é a diferença entre cicatrizes pequenas ou óbvias. Parâmetros adicionais que podem ser considerados incluem o tempo mais anterior depois que a formação da cicatriz em que uma diferença entre cicatrizes pode ser detectada,
- 25 o tempo após formação em que a diferença entre cicatrizes é a mais óbvia (ou alternativamente a descoberta que a diferença continua após o último ponto de tempo avaliado), assim como considerar se a melhor cicatriz permanece ou não consistentemente melhor.

- 30 A consideração pode também ser dada se uma cicatriz for consistentemente mais vermelha do que a outra, e se a vermelhidão se desvanece sobre os pontos de tempo considerados (ou continua após o último

ponto de tempo) e se, assim, em qual tempo após a formação da cicatriz. Um painel de perito pode também considerar em qual tempo após formação qualquer diferença na vermelhidão se torna detectável, assim como após formação do tempo em que a diferença na vermelhidão é mais óbvia.

5 Um painel de perito pode também considerar se uma de uma cicatriz tratada ou não tratada é ou não consistentemente mais branca do que a outra, ou mais branca do que a pele não cicatrizada. Caso uma diferença na brancura seja detectável a consideração pode ser dada ao tempo após a formação da cicatriz em que a diferença pode ser detectada, ao tempo em que a diferença é mais óbvia, e ao tempo em que a diferença desaparece.

10 Um parâmetro adicional que pode ser avaliado por um painel de perito é a textura de cicatrizes tratadas e não tratadas. Na comparação de cicatrizes tratadas e não tratadas o painel de perito pode considerar qual das cicatrizes tem a melhor textura de pele, o tempo mais anterior após a formação da cicatriz em que qualquer diferença presente pode ser detectada, o tempo após formação em que qualquer diferença é mais óbvia, e o tempo em que qualquer diferença desaparece.

15 Comparação de cicatrizes tratadas e não tratadas pode adicionalmente avaliar qual das cicatrizes é a mais estreita, e qual das cicatrizes é a mais curta. A consideração pode também ser dada à forma da cicatriz e à proporção da margem da cicatriz que é distingüível da pele circunvizinha. Como anteriormente descrito as avaliações visuais e avaliações de cor, a presença, grau e localização de hiperpigmentação podem também ser considerados.

25 Como notado acima, uma das maneiras em que a qualidade de cicatrizes tratadas e não tratadas pode ser comparada é por avaliação microscópica. A avaliação microscópica da qualidade da cicatriz pode tipicamente ser realizada usando seções histológicas de cicatrizes. O processo microscopicamente avalia e mede cicatrizes que podem levar em consideração dados categóricos baseados nos seguintes parâmetros adequados:

30 1. Restituição epidérmica. Atenção particular pode ser dada ao

grau de restauração de cadeias de rede, e à espessura da epiderme restaurada.

2. Angiogênese e Inflamação. Consideração pode ser dada ao número de vasos sangüíneos presentes, ao tamanho dos vasos sangüíneos presentes e à evidência de inflamação, incluindo uma avaliação de qualquer nível de inflamação presente.

3. Organização do colágeno. Na avaliação à referência de organização do colágeno pode ser feita à orientação das fibras de colágeno presentes na cicatriz, à densidade de tais fibras e à espessura da fibra de colágeno na derme de papila e reticular.

4. A avaliação da escala analógica visual (VAS) da organização de colágeno para a derme de papila e para a derme reticular pode também fornecer um índice útil de qualidade da cicatriz.

5. Outras características que podem ser levadas em consideração ao avaliar a qualidade microscópica das cicatrizes incluem elevação ou depressão da cicatriz relativa à pele não cicatrizada circunvizinha, e a proeminência ou visibilidade da cicatriz na interface cutânea normal.

6. Será visto que as avaliações descritas acima permitem a geração de dados de classificação de cicatriz que podem não fornecer uma indicação se uma cicatriz tratada é melhor, pior ou indiferente comparada a uma cicatriz de controle, não tratada ou a outra cicatriz para comparação adequada.

Além dos dados categóricos, dados quantitativos (preferivelmente em relação aos parâmetros acima) podem ser gerados usando análise de imagem em combinação com técnicas adequadas de visualização. Exemplos de técnicas adequadas de visualização que podem ser empregadas para avaliar a qualidade da cicatriz são manchas histológicas específicas ou de imunorrotulagem, onde o grau da mancha ou rotulagem presente pode ser quantitativamente determinado por análise de imagem.

Dados quantitativos podem ser úteis e prontamente produzidos com relação aos seguintes parâmetros:

1. Largura, altura, elevação, volume e área de cicatriz.

2. Espessura e cobertura epitelial (por exemplo, a área da epiderme presente em uma cicatriz ou a proporção de uma ferida com cobertura epidérmica).

3. Número, tamanho, área, (isto é, seção transversal) e localização de vasos sangüíneos.

4. Grau de inflamação, número, localização e populações / tipos de células inflamatórias presentes.

5. Organização de colágeno, espessura da fibra de colágeno, densidade da fibra de colágeno.

Prevenção, redução ou inibição de cicatrização pode ser demonstrada por uma mudança em quaisquer dos parâmetros considerados acima, tal que, uma cicatriz tratada se assemelha mais à pele não cicatrizada do que uma cicatriz de controle ou não tratada (ou outro comparador adequado).

As avaliações e os parâmetros discutidos são adequados para comparações dos efeitos de peptídeos ou medicamentos da invenção em comparação a controlar, placebo ou tratamento de cuidado-padrão em animais ou seres humanos. Testes estatísticos adequados podem ser usados para analisar conjuntos de dados gerados de tratamentos diferentes a fim de investigar o significado dos resultados.

Preferivelmente prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser demonstrada com referência a mais de um parâmetro. Mais preferivelmente prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser demonstrada com referência, (isto é, observado no sujeito) a um parâmetro clínico e a um parâmetro fotográfico. Ainda mais preferivelmente prevenção, redução ou inibição de cicatrização pode ser demonstrada com referência a um parâmetro clínico, a um parâmetro fotográfico, e também a um parâmetro de avaliação microscópica (por exemplo, um parâmetro histológico). Mais preferivelmente prevenção, redução ou inibição de cicatrização pode ser demonstrada com referência a uma classificação clínica de VAS, contagem e classificação de VAS de painel de configuração externa (a partir de imagens fotográficas) e contagem de VAS microscópica da derme reticular.

O uso de métodos e medicamentos adequados da invenção é capaz de ocasionar uma melhora rápida na aparência cosmética de uma área ferida então tratada. Considerações cosméticas são importantes em vários contextos clínicos, particularmente quando as feridas são formadas em locais proeminentes do corpo tais como a face, o pescoço e as mãos. Conseqüentemente a inibição de cicatrização (que pode preferivelmente ser em combinação com a cicatrização de ferida acelerada) em tais locais onde se deseja melhorar a aparência cosmética da cicatriz formada representa uma modalidade preferida da invenção.

Além de seu impacto cosmético, a cicatriz da pele é responsável por um número de efeitos deletérios que afligem aqueles que sofrem de tal cicatriz. Por exemplo, a cicatriz da pele pode ser associada com a redução da função física e mecânica, particularmente no caso de cicatrizes contráteis (tais como, cicatrizes hipertróficas) e/ou situações em que as cicatrizes são formadas através das junções. Nestes casos as propriedades mecânicas alteradas da pele cicatrizada, ao contrário da pele não cicatrizada, e os efeitos da contração da cicatriz podem levar ao movimento dramaticamente restrito de uma junção (articulação) assim que efetuado. Conseqüentemente, é uma modalidade preferida que os medicamentos e métodos adequados da invenção sejam usados para prevenir, reduzir ou inibir cicatriz de junções de cobertura de feridas do corpo (preferivelmente também acelerando a cicatrização de tais feridas). Em outra modalidade preferida os medicamentos e métodos adequados da invenção podem ser usados para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz de feridas em maior risco de formar uma cicatriz contrátil.

A extensão de formação da cicatriz, e então a extensão de prejuízo cosmético ou outro prejuízo que pode ser causado pela cicatriz, pode também ser influenciada por fatores, tais como, a tensão do local em que a ferida é formada. Por exemplo, sabe-se que a pele sob tensão relativamente elevada (tal como, aquela que se estende sobre o peito, ou associada com as linhas de tensão) pode ser inclinada para formação de cicatrizes mais severas do que em outros locais do corpo. Assim em uma modalidade prefe-

rida medicamentos e métodos adequados da invenção podem ser usados para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou para prevenir, reduzir ou inibir cicatriz de feridas situadas em locais de tensão elevada da pele. Há muitos procedimentos cirúrgicos que podem ser usados na revisão da cicatriz para permitir o realinhamento de feridas e cicatrização tal que elas são sujeitas à tensão reduzida. Provavelmente o mais conhecido destes é "Z-plastia" em duas abas de pele em forma de V são transpostas para permitir rotação de uma linha de tensão. Assim em uma modalidade mais preferida tais medicamentos e métodos da invenção são usados para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir cicatrização de feridas durante a revisão cirúrgica de cicatrizes desfiguradas.

Cicatriz patológica pode ter mais efeitos prejudiciais pronunciados do que os que surgem mesmo em consequência de cicatriz normal relativamente severa. Exemplos comuns de cicatrizes patológicas incluem quelóides e cicatrizes hipertróficas. É reconhecido que determinados tipos de ferida, ou determinados indivíduos podem ser predispostos à formação de cicatriz patológica. Por exemplo, indivíduos de heranças afro-caribenhas, japonesa ou mongolóides, ou daquelas que têm uma história familiar de cicatriz patológica podem ser considerados para estar em maior risco de formação de quelóide ou cicatriz hipertrófica. Feridas em crianças, e particularmente feridas de queimadura em crianças, são associadas também com formação de cicatriz hipertrófica aumentada. Conseqüentemente é uma modalidade preferida da invenção que medicamentos e métodos adequados sejam usados para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir cicatriz de feridas em que há um risco aumentado de formação de cicatriz patológica.

Embora indivíduos já sujeitos à cicatriz patológica sofram de uma predisposição à formação de cicatriz excessiva adicional é freqüente a necessidade clínica de revisar cirurgicamente quelóides ou cicatrizes hipertróficas, com um risco presente de conseqüente formação de cicatriz patológica. Assim é uma modalidade preferida adicional da invenção que os medicamentos e métodos adequados sejam usados para promover a cicatrização

acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir cicatriz de feridas produzida por revisão cirúrgica de cicatrizes patológicas.

É reconhecido que feridas resultantes de ferimentos de queimaduras (que para as finalidades da presente invenção podem ser tomados
5 também para abranger ferimentos de queimadura que envolvem líquidos ou gases quentes) podem se estender sobre grandes áreas de um indivíduo então afligido. Conseqüentemente, as queimaduras podem causar a formação de cicatriz cobrindo uma grande proporção do corpo de um paciente, desse modo, aumentando o risco que a cicatriz formada cobrirá áreas de
10 importância cosmética elevada (tais como a face, o pescoço, os braços ou as mãos) ou de importância mecânica (particularmente as regiões cobrindo ou que cercam junções). Os ferimentos de queimaduras causados por líquidos quentes freqüentemente são sofridos por crianças (por exemplo, como resultado de frigideiras derramadas, chaleiras ou semelhantes) e, devido ao
15 tamanho do corpo relativamente menor das crianças, são particularmente prováveis de causar dano extensivo sobre uma proporção elevada da área do corpo. É uma modalidade preferida adicional da invenção que os medicamentos e métodos adequados sejam usados para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir cicatriz de feridas produzi-
20 da por ferimentos de queimaduras.

Como notado acima, a cura da ferida em resposta aos ferimentos de queimaduras é associada freqüentemente aos resultados de cicatrização adversos, tais como a formação de cicatrizes hipertróficas. Uma con-
seqüência adicional do tamanho relativamente grande dos ferimentos de
25 queimaduras é que são particularmente suscetíveis a complicações tais como infecção e dessecação que surgem devido à falta de uma camada epitelial funcional. Tendo em vista o que precede será apreciado que os métodos e medicamentos adequados da invenção podem ser usados no tratamento de ferimentos de queimadura para reduzir o nível de cicatrização isso ocorre
30 em conseqüência de ferida e/ou aceleração da reconstituição de uma barreira epitelial funcional.

Os inventores descobriram que métodos e medicamentos da

invenção que utilizam TGF- β 3s da invenção são capazes de promover a re-epitalização. Conseqüentemente tais métodos e medicamentos são particularmente efetivos no tratamento de todos os ferimentos envolvendo dano à camada epitelial. Tais ferimentos são exemplificados, mas não limitados a, ferimentos na pele, em que a epiderme é danificada. Será, entretanto, apre-

5 ciado que tais métodos e medicamentos da invenção são também aplicáveis a outros tipos de feridas em que o epitélio é danificado, tais como ferimentos envolvendo o epitélio respiratório, epitélio digestivo, ou epitélio envolvendo tecidos ou órgãos internos (tal como, o epitélio do peritônio).

10 A cicatrização de feridas que envolve o peritônio (a cobertura epitelial dos órgãos internos, e/ou o interior da cavidade do corpo) pode frequentemente causar adesões. Tais adesões são uma conclusão comum da cirurgia envolvendo tecidos ginecológicos ou intestinais. Os inventores acreditam que a capacidade dos métodos e medicamentos da invenção (utilizando como aqueles que compreendem TGF- β 3s estabelecidos na seqüência

15 ID Nº 3, 5, 7, 9 ou 11) para acelerar a regeneração do peritônio enquanto reduzindo a cicatriz pode reduzir a incidência de anexos impróprios de porções de um peritônio a outro, e desse modo, reduzir a ocorrência de adesões. Conseqüentemente, o uso de tais métodos e medicamentos da inven-

20 ção para prevenir a formação de adesões intestinais ou ginecológicas representa uma modalidade preferida da invenção. Certamente o uso de tais métodos ou medicamentos da invenção na cicatrização de todas as feridas que envolvem o peritônio é uma modalidade preferida.

Os métodos ou medicamentos da invenção podem ser usados

25 profilaticamente, por exemplo, nos locais onde nenhuma ferida existe, mas onde uma ferida que, de outra maneira, daria surgimento a uma cicatriz ou ferida crônica deve ser formada. Como exemplo, os medicamentos de acordo com a invenção podem ser administrados aos locais que estão sob ferimento como um resultado de procedimentos eletivos (tais como cirurgia), ou

30 aos locais que se acredita estarem sob risco elevado de ferimento. Pode ser preferido que os medicamentos da invenção sejam administrados ao local aproximadamente na época do ferimento, ou imediatamente antes da forma-

ção de uma ferida (por exemplo, no período até seis horas antes de se ferir) ou os medicamentos podem ser administrados em uma hora anterior ao ferimento (por exemplo, até 48 horas antes que uma ferida seja formada). A pessoa versada apreciará com o tempo que os mais preferidos de administração antes da formação de uma ferida serão determinados com referência a um número de fatores, incluindo a formulação e a rota de administração do medicamento selecionado, a dosagem do medicamento a ser administrado, o tamanho e a natureza da ferida a ser formados, e o status biológico do paciente (que pode ser determinado com referência aos fatores tais como a idade, saúde, e predisposição do paciente às complicações de cicatrização ou cicatrização adversa). O uso profilático de métodos e medicamentos de acordo com a invenção é uma modalidade preferida da invenção, e é particularmente preferido na promoção da cicatrização e/ou prevenção acelerada da ferida, a redução ou a inibição de cicatriz no contexto de feridas cirúrgicas.

Os métodos e medicamentos da invenção também são capazes de promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou cicatriz inibida se administrados depois que uma ferida foi formada. É preferido que tal administração deva ocorrer o mais cedo possível após a formação da ferida, mas os agentes da invenção são capazes de promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz a qualquer hora acima até que o processo de cicatrização esteja terminado, (isto é, mesmo em caso de uma ferida já parcialmente cicatrizada, os métodos e medicamentos da invenção podem ser usados para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou para prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz em relação à porção não cicatrizada restante). Será apreciado que a "janela" na qual os métodos e medicamentos da invenção podem ser usados para promover a cicatrização acelerada e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz da ferida é dependente da natureza da ferida em questão (que inclui o grau de dano que ocorreu, e o tamanho da área ferida). Assim, no caso de uma grande ferida, os métodos e medicamentos da invenção podem ser administrados relativamente tarde, na resposta de cicatrização ainda podem promover a cicatrização acelerada

e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz da ferida. Os métodos e medicamentos da invenção podem, por exemplo, preferivelmente ser administrados dentro das primeiras 24 horas depois que uma ferida é formada, mas podem ainda promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir cicatrização se administrados até dez, ou mais dias após o ferimento.

Os métodos e medicamentos da invenção podem ser administrados em uma ou mais ocasiões como necessário a fim de promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz. Por exemplo, terapeuticamente as quantidades eficazes dos medicamentos podem ser administradas a uma ferida tão freqüentemente quanto necessário até que o processo de cicatrização esteja terminado. Como exemplo, os medicamentos da invenção podem ser administrados diariamente ou duas vezes por dia a uma ferida por pelo menos os primeiros três dias que seguem à formação da ferida.

Mais preferivelmente, os métodos ou medicamentos da invenção podem ser ambos administrados antes e depois da formação de uma ferida. Os inventores descobriram que a administração de medicamentos da invenção imediatamente antes da formação de uma ferida, seguida pela administração diária de tais agentes nos dias que seguem o ferimento, são particularmente eficazes em promover a cura acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz.

Para as finalidades do presente relatório descritivo "agente" ou "agente da invenção" significa TGF- β 3 biológico ou terapeuticamente ativo da invenção; e/ou fragmentos TGF- β 3 biológico ou terapeuticamente ativo; e/ou derivados TGF- β 3 biológico ou terapeuticamente ativo da invenção. Agentes da invenção podem também incluir ácidos nucleicos codificando TGF- β 3s da invenção (ou fragmentos ou derivados destes). Será apreciado que todos tais agentes podem ser incorporados em medicamentos de acordo com a invenção e podem ser usados em métodos ou usos da invenção.

Será apreciado que a quantidade de um medicamento da invenção que deve ser aplicada a uma ferida depende de vários fatores tais como a atividade biológica e a biodisponibilidade do agente presente no medica-

mento, que depende, por sua vez, entre outros fatores, da natureza do agente e do modo de administração do medicamento. Outros fatores para determinar uma quantidade terapêutica adequada de um medicamento podem incluir:

- 5 A) A meia-vida do agente no sujeito sendo tratado.
 B) A condição específica a ser tratada (por exemplo, ferida aguda ou feridas crônicas).
 C) A idade do sujeito.

 A frequência da administração será influenciada também pelos
10 fatores acima mencionados e particularmente pela meia-vida do agente escolhido dentro do sujeito sendo tratado.

 Geralmente quando medicamentos de acordo com a invenção são usados para tratar feridas existentes o medicamento deve ser administrado assim que a ferida ocorrer (ou no caso de feridas que não são imediatamente aparentes como aquelas em local interno no corpo, assim que a
15 ferida for diagnosticada). A terapia com métodos ou medicamentos de acordo com a invenção deve continuar até que o processo de cicatrização esteja acelerado, e/ou cicatriz prevenida, reduzida ou inibida, a uma satisfação do clínico.

20 Frequência de administração dependerá da meia-vida biológica do agente usado. Tipicamente um creme ou uma pomada contendo um agente da invenção deve ser administrado a um tecido-alvo, tal que, a concentração do agente em uma ferida seja mantida em nível adequado para ter um efeito terapêutico. Isto pode exigir administração diária ou mesmo diversas
25 vezes ao dia.

 Medicamentos da invenção podem ser administrados por qualquer via adequada capaz de alcançar o efeito desejado de promover a cura da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz, mas é preferido que os medicamentos sejam administrados localmente em um local da ferida.

30 Os inventores descobriram que a promoção da cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenção, redução ou inibição da cicatriz pode ser efetuada pela administração de um agente da invenção por injeção no local

da ferida. Por exemplo, no caso das feridas cutâneas, os agentes da invenção podem ser administrados por meio de injeção intradérmica. Assim um medicamento preferido de acordo com a invenção compreende uma solução injetável de um agente da invenção (por exemplo, para injeção em torno das

5 margens de um local de dano epitelial ou de um local que provavelmente deve ser danificado). Formulações adequadas para o uso nesta modalidade da invenção são consideradas abaixo.

Alternativamente ou adicionalmente, os medicamentos da invenção podem também ser administrados em uma forma tópica para promover

10 a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz. Tal administração pode ser efetuada como parte do cuidado inicial e/ou de continuação para a área ferida.

Os inventores descobriram que a promoção da cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenção, redução ou inibição da cicatriz é particular-

15 mente melhorada pelo tratamento tópico de um agente da invenção para uma ferida (ou, no caso de aplicação profilática, a um tecido ou local onde uma ferida deve ser formada).

Composições ou medicamentos contendo agentes da invenção podem tomar um número de formas diferentes dependendo, em particular da

20 maneira em que devem ser usadas. Assim, por exemplo, pode ser sob a forma de um líquido, pomada, creme, gel, hidrogel, pó ou aerossol. Todas tais composições são adequadas para o tratamento tópico a uma ferida, que são meios preferidos de administrar agentes da invenção a um sujeito (pessoa ou animal) necessitando de tratamento.

Os agentes da invenção podem ser fornecidos em uma atadura

25 ou curativo estéril, que possam ser usados para cobrir uma ferida ou outro local de dano epitelial a ser tratado.

Será apreciado que o veículo de uma composição compreendendo agentes da invenção deve ser um que seja bem-tolerado pelo paciente e permita a liberação do agente à ferida. Tal veículo é preferivelmente bi-

30 odegradável, biossolúvel, biorreabsorvível e/ou não inflamatório.

Medicamentos e composições compreendendo agentes da in-

venção podem ser usados de várias maneiras. Assim, por exemplo, uma composição pode ser aplicada na e/ou em volta de uma ferida a fim de promover a cura acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir a cicatriz. Se a composição é para ser aplicada a uma ferida "existente", então o veículo farmacologicamente aceitável será um que seja relativamente "suave", isto é, um veículo que seja biocompatível, biodegradável, bioabsorvível e não inflamatório.

Um agente da invenção, ou um ácido nucléico codificando tal agente (como considerado mais abaixo), pode ser incorporado dentro de um dispositivo de liberação lento ou prolongado. Tais dispositivos podem, por exemplo, ser colocados sobre ou introduzidos sob a pele e o agente ou ácido nucléico pode ser liberado durante dias, semanas ou mesmo meses. Tal dispositivo pode ser particularmente útil para pacientes (tais como aqueles que sofrem de feridas crônicas) que requerem promoção em longo prazo da cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenção, redução ou inibição de cicatrização. Os dispositivos podem ser particularmente vantajosos quando usados para a administração de um agente ou de um ácido nucléico que normalmente exigiria administração freqüente (por exemplo, pelo menos administração diária por outras vias).

As doses diárias de um agente da invenção podem ser dadas como uma única administração (por exemplo, uma aplicação diária de uma formulação tópica ou de uma injeção diária). Alternativamente, o agente da invenção pode exigir a administração duas ou mais vezes durante um dia. Em uma alternativa adicional, um dispositivo de liberação lento pode ser usado para fornecer doses ideais de um agente da invenção a um paciente sem a necessidade de administrar doses repetidas.

Em uma modalidade um veículo farmacêutico para administração de um agente da invenção pode ser um líquido e uma composição farmacologicamente adequada, seria sob a forma de uma solução. Em outra modalidade, o veículo farmacologicamente aceitável é um sólido e uma composição adequada é sob a forma de um pó ou comprimidos. Em uma modalidade adicional o agente da invenção pode ser formulado como uma parte

de um emplastro transdérmico farmaceuticamente aceitável.

Um veículo sólido pode incluir uma ou mais substâncias que podem também atuar como agentes flavorizantes, lubrificantes, solubilizadores, agentes de suspensão, preenchedores, agentes deslizantes, bandagem de compressão, aglutinantes ou agentes de desintegração em comprimido; pode também ser um material de encapsulação. Em pós, o veículo é um sólido finamente dividido que está misturado com o agente finamente dividido da invenção. Em comprimidos, o agente da invenção é misturado com um veículo tendo as propriedades necessárias de compressão em proporções adequadas, e comprimido na forma e no tamanho desejados. Os pós e comprimidos contêm preferivelmente até 99% do agente da invenção. Veículos sólidos adequados incluem, por exemplo, fosfato de cálcio, estearato de magnésio, talco, açúcares, lactose, dextrina, amido, gelatina, celulose, polivinilpirrolidina, ceras de baixa fusão e resinas de troca iônica.

Veículos líquidos podem ser usados para preparar soluções, suspensões, emulsões, xaropes, elixires e composições pressurizadas. O agente da invenção pode ser dissolvido ou suspenso em um veículo líquido farmaceuticamente aceitável, tal como, água, um solvente orgânico, uma mistura de ambos ou óleos ou gorduras farmaceuticamente aceitáveis. O veículo líquido pode conter outros aditivos farmaceuticamente adequados tais como solubilizantes, emulsificantes, tampões, conservantes, adoçantes, agentes aromatizantes, agentes de suspensão, agentes de espessamento, cores, reguladores de viscosidade, estabilizantes ou osmo-reguladores. Exemplos adequados de veículos líquidos para administração oral e parenteral incluem água (que contêm parcialmente aditivos como acima, por exemplo, derivados da celulose, preferivelmente solução carboximetil celulose de sódio), álcoois (incluindo álcoois monohídricos e álcoois polihídricos, por exemplo, glicóis) e seus derivados, e óleos (por exemplo, óleo de coco fracionado e óleo de amendoim). Para administração parenteral, o veículo pode também ser um éster oleoso tal como oleato de etila e miristato de isopropila. Veículos líquidos estéreis são úteis em composições em forma líquida estéril para administração parenteral. O veículo líquido para composições

pressurizadas pode ser hidrocarboneto halogenado ou outro propelente farmacêuticamente aceitável.

Composições farmacêuticas líquidas que são soluções estéreis ou suspensões podem ser utilizadas por, por exemplo, injeção intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intradérmica, intrastromal (córnea) ou a subcutânea. Soluções estéreis podem também ser administradas intravenosamente. O agente da invenção pode ser preparado como uma composição sólida estéril que pode ser dissolvida ou suspensa na hora da administração usando a água estéril, solução salina, ou o outro meio injetável estéril adequado. Pretende-se incluir aos veículos aglutinantes inertes e necessários, agentes de suspensão, lubrificantes e conservantes.

Na situação em que se deseja administrar um agente da invenção por meio da ingestão oral, será apreciado que o agente escolhido será preferivelmente um agente tendo um grau elevado de resistência à degradação. Por exemplo, o agente da invenção pode ser protegido (por exemplo, usando as técnicas descritas acima) de modo que sua taxa de degradação no trato digestivo seja reduzida.

Composições de agentes da invenção são adequadas para serem usadas para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou inibir a cicatriz na córnea. Feridas de córneas podem resultar do trauma ao olho que surge como resultado de ferimento acidental (como considerado acima) ou como resultado de operações cirúrgicas (por exemplo, cirurgia à laser na córnea). Neste caso um medicamento preferido da invenção pode ser sob a forma de um colírio.

Agentes da invenção podem ser usados em uma escala de feridas "internas" (isto é, feridas que ocorrem dentro do corpo, em vez de em uma superfície externa). Assim, por exemplo, os medicamentos de acordo com a invenção podem ser formulados para inalação para uso em feridas que surgem nos pulmões ou em outro epitélio respiratório.

Procedimentos conhecidos, tais como, aqueles empregados convencionalmente pela indústria farmacêutica (por exemplo, experimentos *in vivo*, ensaios clínicos etc.), podem ser usados para estabelecer formula-

ções específicas de composições compreendendo agentes da invenção e para dietas terapêuticas precisas para administração de tais composições (tais como doses diárias do agente ativo e a frequência da administração).

Uma dose diária adequada de um agente de acordo com a invenção capaz de promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, 5 reduzir ou inibir cicatrização depende de uma escala de fatores que incluem (mas não limitados a) a natureza do tecido ferido, área e/ou profundidade da ferida a ser tratada, a severidade da ferida, e a presença ou a ausência de fatores que predispostos à cicatriz patológica ou à formação crônica da ferida. 10

Como exemplo, a quantidade de um agente ativo que pode ser administrado a uma ferida ou local de dano epitelial em uma única incidência de tratamento pode preferivelmente estar na região de 50ng/100 (μ L por centímetro linear da ferida ou dano epitelial. Tal dose pode ser determinada 15 uma vez ao dia por até 3 dias, deste modo fornecendo uma dose total de 150ng/centímetro linear de ferida ou dano epitelial.

No caso de aplicação tópica às feridas ou locais agudos de dano epitelial, uma quantidade adequada de um agente ativo pode preferivelmente estar na região de 100ng/cm². Tal dose pode ser dada uma vez por dia 20 por até 3 dias, desse modo, fornecendo uma dose total de 300ng/ cm² de ferida ou de dano epitelial.

Como exemplo, a quantidade preferida de um agente ativo que pode ser administrado diariamente à ferida ou local de dano epitelial em uma incidência única do tratamento pode ser na região de 50ng/cm² de ferida ou 25 dano epitelial ou 100ng/cm² de ferida ou dano epitelial (se administrado topicamente).

Como outro exemplo, a quantidade de um agente ativo que pode ser administrado à ferida ou local de dano epitelial em uma incidência única do tratamento pode preferencialmente ser na região de 50-200ng/centímetro 30 linear de ferida ou dano epitelial ou 100-300ng/cm² de ferida ou dano epitelial (se administrado topicamente).

A quantidade de um agente, de acordo com a invenção, exigida

para o tratamento de feridas ou outros locais de dano epitelial estarão tipicamente dentro da escala de 1pg a 1mg do agente administrado por centímetro linear de ferida ou dano epitelial por 24 horas, embora esta figura possa ser modificada para cima ou para baixo em resposta aos fatores esboçados acima. O agente pode preferivelmente ser fornecido sob a forma de uma solução de 1pg/100 μ L-1mg/100 μ L do agente, e 100 μ L de tal solução administrada por centímetro linear de ferida ou dano epitelial durante um período de 24 horas.

O agente pode mais preferivelmente ser administrado como uma solução de 10pg/100 μ L-100 μ L/100 μ L com 100 μ L de tal solução administrada por centímetro linear de ferida ou dano epitelial durante um período de 24 horas.

Mais preferivelmente o agente pode ser administrado como uma solução de 1ng/100 μ L-1000ng/100 μ L com 100 μ L de tal solução administrada por centímetro linear de ferida ou dano epitelial durante um período de 24 horas.

Geralmente, as composições compreendendo agentes da invenção devem ser formuladas, tal que, quando administradas a uma ferida uma concentração do agente entre 0,79pM e 0,79mM por centímetro linear de ferida ou dano epitelial seja alcançada. Preferivelmente o agente pode ser fornecido em concentrações entre 7,9pM e 0,079mM por centímetro linear.

Um agente da invenção (tal como, o peptídeo da seqüência ID Nº 3 a 8) pode ser administrado em uma concentração entre 0,79pM e 0,79mM. Preferivelmente um agente da invenção pode ser administrado em uma concentração entre 7,9pM e 0,079mM. Mais preferivelmente um agente da invenção pode ser administrado em uma concentração entre 0,79nM e 0,79 μ M.

Puramente como exemplo, uma solução injetável contendo entre 10pg/100 μ L e 100 μ g/100 μ L de um agente da invenção (tal como, um TGF- β 3 de seqüência ID Nº⁹⁵ 3, 5, 7, 9 ou 11) é adequada para que a aplicação promova a cicatrização acelerada da ferida da derme e/ou inibição de cicatriz quando administrada como uma injeção intradérmica e dosada com

100µL por cm linear de margem de ferida.

No caso de um TGF-β3 de sequência ID Nº 3, dosagens preferidas para administração a uma ferida podem ser na região de 1ng/100µL-1000ng/100µL, e 100µL de tal solução administrada por cm linear de margem de ferida.

No caso de um TGF-β3 de sequência ID Nº 5, dosagens preferidas para administração a uma ferida podem ser na região de 1ng/100µL-1000ng/100µL, e 100µL de tal solução administrada por cm linear de margem de ferida.

No caso de um TGF-β3 de sequência ID Nº 7, dosagens preferidas para administração a uma ferida podem ser na região de 1ng/100µL-1000ng/100µL, e 100µL de tal solução administrada por cm linear de margem de ferida.

No caso de um TGF-β3 de sequência ID Nº 9, dosagens preferidas para administração a uma ferida podem ser na região de 1ng/100µL-1000ng/100µL, e 100µL de tal solução administrada por cm linear de margem de ferida.

No caso de um TGF-β3 de sequência ID Nº 11, dosagens preferidas para administração a uma ferida podem ser na região de 1ng/100µL-1000ng/100µL, e 100µL de tal solução administrada por cm linear de margem de ferida.

Os agentes da invenção podem ser usados para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenir, reduzir ou inibir cicatrização como uma monoterapia (por exemplo, com o uso dos medicamentos da invenção sozinho). Alternativamente, os métodos ou medicamentos da invenção podem ser usados em combinação com outros compostos ou tratamentos para a promoção da cura da ferida ou inibição da cicatriz. Tratamentos adequados que podem ser usados como parte de tais terapia de combinação serão conhecidos por aqueles versados na técnica.

Os inventores descobriram que TGF-β3 de acordo com a presente invenção podem vantajosamente ser formulados na presença de um açúcar. Este açúcar pode ser um açúcar de redução ou não redução e/ou

um fosfato ou do fosfonate derivado do mesmo. Exemplos de tais açúcares podem ser selecionados de, mas não são limitados a, grupo consistindo em maltose, manose, trehalose, arabinose, mainitol, sacarina, frutose, dextrose e glicose. Os açúcares preferidos podem ser selecionados do grupo consistindo em maltose e trehalose.

Será apreciado que peptídeos contendo TGF- β 3 da invenção podem representar agentes favoráveis a ser administrados pelas técnicas que envolvem expressão celular de seqüências de ácido nucléico que codificam tais moléculas. Tais métodos de expressão celular são particularmente adequados para uso médico em que os efeitos terapêuticos dos peptídeos são exigidos durante um período prolongado, por exemplo, nos contextos onde é desejável aumentar durante um período de tempo uma resposta de cicatrização de ferida de outra maneira defeituosa. É particularmente preferido que TGF- β 3 para ser adminstrado via expressão celular compreende aqueles peptídeos definidos pela seqüência ID N^os 3, 5, 7, 9 ou 11 ou fragmentos ou derivados destes. Ácidos nucléicos codificando esses peptídeos são definidos na seqüência ID Nos 4, 6, 8, 10 ou 12.

Muitos métodos conhecidos de administrar agentes de peptídeo da invenção aos tecidos tais como feridas têm a desvantagem que pode ser difícil alcançar níveis sustentados de agente da invenção no local do tratamento durante o curso mesmo de alguns dias porque os agentes de peptídeo podem ter meia-vida curta *in vivo*. As meias-vidas dos agentes podem ser curtas por várias razões que incluem:

- (i) Degradação por proteases e semelhantes.
- (ii) Liberação por proteínas de ligação.
- (iii) Ligação e inibição de atividade de agente por moléculas de matriz extracelular.

Além disso, agentes usados para promover a cicatrização acelerada da ferida e/ou prevenção, redução ou inibição de cicatriz precisam ser administrados em um veículo adequado e são freqüentemente fornecidos como uma composição que compreende o agente e o veículo. Como discutido, tais veículos são preferivelmente não inflamatórios, biocompatíveis, bior-

reabsorvíveis e não devem degradar ou inativar o agente (no armazenamento ou no uso). Entretanto, pode freqüentemente ser difícil fornecer um veículo satisfatório para entregar agentes a um tecido com uma ferida a ser tratada.

5 Uma maneira conveniente em que estes problemas podem ser prevenidos ou mitigados é fornecer uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente da invenção em uma área a ser tratada por meio da terapia gênica.

10 De acordo com um quarto aspecto da presente invenção é fornecido um sistema de distribuição para o uso em uma técnica de terapia gênica, o dito sistema de distribuição compreendendo uma molécula de DNA codificando um peptídeo selecionado do grupo constituído por aqueles definidos pela Seqüência ID No. 3, Seqüência ID N^o 5, Seqüência ID No. 7, Seqüência ID No. 9 e Seqüência ID No. 11, a dita molécula de DNA sendo capaz de ser transcrita para levar à expressão do peptídeo escolhido.

15 De acordo com um quinto aspecto da presente invenção é fornecido o uso de um sistema de distribuição, tal como definido no parágrafo anterior, para uso na fabricação de um medicamento para uso na promoção da cura acelerada da ferida e/ou prevenção, redução ou inibição da cicatriz.

20 No sexto aspecto da presente invenção é fornecido o uso de um sistema de distribuição, tal como definido acima, para uso na fabricação de um medicamento para uso na promoção da regeneração epitelial.

25 De acordo com um sétimo aspecto da presente invenção é fornecido um método de promover a cura acelerada da ferida e/ou prevenção, redução ou inibição da cicatriz, o método compreende administrar a um paciente com necessidade de tal tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sistema de distribuição, tal como definido pelo nono aspecto da invenção.

30 De acordo com um oitavo aspecto da presente invenção é fornecido um método de promover a regeneração epitelial, o método compreende administrar a um paciente com necessidade de tal tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de um sistema de distribuição, tal como definido

pelo nono aspecto da invenção.

Devido à degeneração do código genético, é claro que as seqüências de ácido nucléico que codificam os agentes adequados para o uso de acordo com a invenção podem ser variadas ou mudadas sem substancialmente afetar a seqüência do produto codificado, desse modo, fornecendo
5 uma variação funcional da mesma. As seqüências de ácidos nucléicos possíveis que podem ser usadas para codificar peptídeos definidos pela seqüência ID N^{os} 3, 5, 7, 9 ou 11 serão prontamente aparentes à pessoa versada, e a pessoa versada será capaz de fazer referência aos exemplos fornecidos como seqüência ID N^o 4, 6, 8, 10 ou 12, respectivamente.
10

Sistemas de distribuição de acordo com a invenção são altamente adequados para alcançar níveis sustentados de um agente da invenção em uma ferida durante um período mais longo de tempo do que é possível para a maioria dos sistemas de distribuição convencionais. Os agentes da
15 invenção adequados para promover a cura acelerada da ferida e/ou cicatriz inibida podem continuamente ser expressos de células em um local da ferida que foi transformado com a molécula de DNA descrita no quarto aspecto da invenção. Conseqüentemente, mesmo se o agente da invenção tivesse uma meia-vida muito curta *in vivo*, quantidades terapeuticamente eficazes do agente podem continuamente ser expressas do tecido tratado.
20

Além disso, os sistemas de distribuição da invenção podem ser usados para fornecer a molécula de DNA (e desse modo, o agente da invenção) sem a necessidade de usar veículos farmacêuticamente convencionais, tais como, aqueles requeridos em pomadas ou cremes que entram em con-
25 tato com a ferida.

Um sistema de distribuição da presente invenção é preferivelmente, tal que, a molécula de DNA é capaz de ser expressa (quando o sistema de distribuição é administrado a um paciente) para produzir um peptídeo definido pelo grupo consistindo na seqüência ID N^o 3, 5, 7, 9 ou 11 ou
30 um fragmento ou derivado de tal peptídeo. A molécula de DNA pode estar contida dentro de um vetor adequado para formar um vetor recombinante. O vetor pode, por exemplo, ser um plasmídeo, cosmídeo ou fago. Tais vetores

recombinantes são altamente úteis em sistemas de distribuição da invenção para células de transformação com moléculas de DNA adequadas.

Vetores recombinantes podem também incluir outros elementos funcionais. Por exemplo, os vetores recombinantes podem ser projetados, tal
5 que, o vetor autonomamente replica no núcleo da célula. Neste caso, os elementos que induzem a replicação do DNA podem ser requeridos no vetor recombinante. Alternativamente o vetor recombinante pode ser projetado, tal que, o vetor e a molécula de DNA recombinante integram no genoma de uma célula. Neste caso as seqüências de DNA que favorecem a integração
10 alvo (por exemplo, por recombinação homóloga) são desejáveis. Os vetores recombinantes podem também ter codificação de DNA para genes que podem ser usados como marcadores selecionáveis no processo de clonagem.

O vetor recombinante pode também adicionalmente compreender um promotor ou regulador para controlar a expressão do gene conforme
15 exigido.

A molécula de DNA pode (mas não necessariamente) ser uma que se torne incorporada no DNA de células do sujeito sendo tratado. Células não diferenciadas podem ser estavelmente transformadas levando à produção de células filhas geneticamente modificadas. Quando este for o caso,
20 regulação de expressão no sujeito pode ser exigida, por exemplo, com fatores de transcrição específicos, ativadores de gene ou mais preferivelmente com promotores induzíveis que transcrevem o gene em resposta a um sinal especificamente encontrado em uma ferida. Alternativamente, o sistema de distribuição pode ser projetado para favorecer a transformação instável ou
25 transiente de células diferenciadas no sujeito que está sendo tratado. Neste exemplo, a regulação de expressão pode ser menos importante porque a expressão da molécula de DNA parará quando as células transformadas morrerem ou pararem de expressar a proteína (idealmente quando a promoção da cura acelerada da ferida com a formação da cicatriz reduzida for efetuada).
30

O sistema de entrega pode fornecer a molécula de DNA a um sujeito sem ele ser incorporado em um vetor. Por exemplo, a molécula de

DNA pode ser incorporada dentro de uma partícula de lipossoma ou vírus. Alternativamente, a molécula de DNA "nu" pode ser introduzida em uma célula do sujeito por meios adequados, por exemplo, percepção endocitótica direta.

5 A molécula de DNA pode ser transferida às células de um sujeito a ser tratado por transfecção, infecção, microinjeção, fusão de célula, fusão de protoplasta ou bombardeio balístico. Por exemplo, transferência pode ser por transfecção balística com partículas de ouro revestidas, lipossomas con-
10 tendo a molécula de DNA, vetores virais (por exemplo, adenovírus) e meios de fornecer percepção de DNA direta (por exemplo, endocitose) por aplicação de DNA de plasmídeo diretamente a uma ferida tópica ou por injeção.

 A expressão celular do agente da invenção pode ser por células na borda da área não danificada que cerca a ferida, ou pode alternativamente ser por células introduzidas terapeuticamente na ferida (por exemplo, cé-
15 lulas cultivadas endógenas ou exógenas envolvidas na resposta de cura da ferida).

 Será apreciado que células que devem ser introduzidas terapeuticamente para promover a cura acelerada da ferida e/ou prevenção, redução ou inibição da cicatriz podem ser manipuladas *ex vivo*, tal que, expres-
20 sem os níveis aumentados de um agente da invenção, e então introduzidas na área da ferida. Tais células podem preferivelmente ser células cultivadas *ex vivo* para uso na preparação ou fabricação de pele artificial ou de substituição de pele para ser usada na promoção da cura da ferida. As células podem mais preferivelmente ser células autólogas, embora será apreciado que
25 todas as células adequadas podem ser usadas.

 Conseqüentemente, em um nono aspecto da invenção, é fornecido um medicamento que compreende células induzidas para expressar um agente da presente invenção.

 A indução de expressão celular de um agente da invenção pode
30 ser efetuada por meios de incorporação nas células de ácidos nucleicos causando a expressão de agentes adequados para uso de acordo com a invenção.

A invenção será agora adicionalmente descrita como exemplo com referência aos seguintes protocolos e estudos experimentais e acompanhados das figuras nas quais:

5 Tabela 1 apresenta valores indicativos de resíduos de aminoácido à propensão para envolvimento na formação de alfa-hélice;

Tabela 2 define detalhes de nomenclatura utilizada em referência ao TGF- β 3s mutante da invenção;

Tabela 3 define a eficiência do redobramento do tipo-selvagem de TGF- β 3 e TGF- β 3s da invenção;

10 Tabela 4 compara a atividade biológica do tipo selvagem de TGF- β 3 e Gly63-Ala (uma proteína TGF- β 3 da invenção), como avaliada pelo ensaio da inibição do crescimento celular;

Tabela 5 define as concentrações dos reagentes utilizados em estudos *in vivo* de cura da ferida;

15 Tabela 6 define as concentrações de reagentes utilizados em estudos *in vivo* de cura da ferida;

figura 1 mostra um cromatograma de TGF-Beta 3 "tipo selvagem" em uma coluna Fenil-Sefarose;

20 figura 2 mostra um cromatograma de TGF-Beta 3 monomérico e Dimérico "tipo selvagem" na coluna UNO-S1;

figura 3 mostra uma comparação de proteínas mutante de TGF-Beta 3 e TGF-Beta 3 "tipo selvagem" por SDS-PAGE corado com Coomassie Blue (observe que a troca de tampão de Gly63-Ala e proteínas mutante Gly63-Pro resultou em algumas amostras perdidas, por conseguinte, a concentração real adicionada ao gel particularmente menos do que 3 μ g declarado);

25

figura 4 mostra o modelo utilizado para ferimento excisional;

figura 5 mostra média de 3 dias para a classificação da avaliação macroscópica para feridas incisionais (A e B) tratadas com TGF-Beta 3 tipo selvagem ou TGF- β 3s da invenção, onde "***" indica aumento significativo da cura em comparação a feridas ingênuas ($p < 0,05$);

30

figura 6 média microscopia de 3 dias da largura de feridas exci-

sionais (C, D) tratada com proteínas TGF-Beta3 'tipo selvagem' e mutantes;

figura 7 mostra o modelo utilizado para ferimento incisional;

figura 8 ilustra classificação macroscópica da cicatriz (dia 70) para os ferimentos tratados com TGF-Beta 3 'tipo selvagem', Gly63-Ala e Gly63-Pro;

figura 9 ilustra imagens macroscópicas de cicatriz (dia 70) para os ferimentos tratados com TGF-Beta 3 'tipo selvagem', Gly63-Ala e Gly63-Pro;

figura 10 ilustra classificação macroscópica da cicatriz (dia 70) para os ferimentos tratados com TGF-Beta 3 'tipo selvagem', Glu12-Ser e mutante de dupla Serina (Glu12-Ser & Arg52-ser), onde "+" indica diminuição significativa das cicatrizes comparada às feridas tratadas com placebo ($p < 0,05$);

figura 11 ilustra imagens macroscópicas da cicatriz (dia 70) para os ferimentos tratados com TGF-Beta 3 'tipo selvagem', Glu12-Ser e mutante de dupla Serina (Glu12-Ser & Arg52-Ser);

figura 12 ilustra imagens microscópicas da cicatriz representativa de ferimentos tratados com TGF-Beta 3 'tipo selvagem', Gly63-Pro e proteína mutante Gly63-Ala (70 dias de Pós-Ferimento); e

figura 13 ilustra imagens microscópicas da cicatriz representativa de ferimentos tratados com Glu12-Ser e mutante de dupla serina (Glu12-Ser e Arg 52-Ser) após 70 dias de pós-ferimento.

Detalhes das seqüências de interesse particular são fornecidos na seção "Informações de Seqüência".

Protocolos Experimentais e Resultados

1. Geração, produção, redobramento e purificação de TGF- β 3 de acordo com os primeiro e segundo aspectos da invenção.

1.1 Geração de cDNA

O RNA total de uma ferida incisional humana (tomada no dia 5 após o ferimento) foi tratado com DNA-livre (Ambion) para remover qualquer contaminação de DNA. Usando o RNA total como um modelo, cDNA TGFbeta-3 foi gerado por Reação em Cadeia por Polimerase-Transcriptase reversa

(RT-PCR). A mistura principal de RT-PCR foi preparada do kit de reagente QRT-PCR core da Brilliant®, 1 etapa (Stratagene). Um micrograma de RNA foi adicionado a 50µL de uma solução contendo: Um tampão QRT-PCR da etapa-um, 0,2mM de dNTPs, 3,5mM de MgCl₂, 1µL de transcriptase reversa
 5 Stratascript, 2,5 unidades de tagpolimerase, 0,4µM iniciador senso (5' GAT ATA CCA TGG CTT TGG ACA CCA ATT ACT ACT GC 3'), 0,4µM de iniciador senso (5'-CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT ACA TTT ACA AGA C 3'). A reação foi colocada em um circulador térmico (Hybaid PCR Express) e realizada sob as seguintes condições: 30 min. a 45°C, 10 min. a 95°C, então
 10 40 ciclos de 95°C por 30s, 65°C por 1 min. e 72°C por 1 min. A etapa final de 72°C por 10 min. Amostras PCR foram corridas em 2% (p/v) de gel de agarose para verificar o tamanho da banda e purificadas usando Kit de Prep. PCR Wizard (Promega).

1.2 Construção de Plasmídeo

15 O vetor pET-3d é derivado do vetor pBR322 e contém um promotor T7 sob controle de LacUV5 e um gene marcador resistente à ampicilina. O fragmento cDNA de TGF-beta 3 (gerado na Seção 3.2) foi subclonado dentro de pET-3d nos locais HI Bam e Nco I (5'-3' respectivamente). A ligação resultante foi então transformada dentro de células XL10 Gold (Stratagene) e análise de colônia PCR foi realizada para localizar clones contendo
 20 uma inserção. O clone final foi crescido e DNA plasmídico extraído na água usando Kit Qiaprep®Spin Miniprep (Qiagen). O plasmídeo foi seqüenciado e verificado usando iniciador promotor T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') e iniciador terminal T7 (5'-GTC AGT TAT TGC TCA GCG G-3').

25 1.3 Mutagênese direcionada a local

O constructo TGF-Beta 3 'tipo selvagem' da Seção 1.2 submeteu-se à mutagênese direcionada a local para gerar dois constructos mutantes codificantes para proteínas mutantes TGF-Beta 3. A nomenclatura mutante/constructo e mudança de seqüência nucleotídica estão resumidas na
 30 Tabela 2. As posições nucleotídicas que submeteram-se à mutagênese são mostradas na seção Informação de Seqüência.

A metodologia de mutagênese direcionada a local *in-vitro* foi ba-

seada no kit direcionado a mutagênese de Stratagene's Quick Change® Site. 100ng de plasmídeo (da Seção 1.2) foram adicionados a uma solução contendo: 2.5µL 10 x tampão de multirreação Quick Change®, solução Quick, 100ng de iniciador Mutagênico Primer, 1mL de mistura de dNTP, Pfu Turbo DNA polimerase (Stratagene), feito até um volume final de 2,5 ml com o dobro de água destilada. A reação foi colocada em um ciclador térmico (Hybaid PCR Expresses) e executada sob as seguintes condições: 1min a 95°C, 30 ciclos de 1min a 95°C, 55°C por 1 min e uma etapa final de 65°C por 2 min. Uma vez que a ciclagem térmica foi completada as reações foram colocadas no gelo por 2 min para reduzir a temperatura abaixo de 37°C. 1µL de enzima de restrição DpnI (10 U/µL) foi adicionado a cada reação e cuidadosamente misturada. A mistura de reação foi centrifugada (1min 10.000 rpm em um Sorvall Biofuge) e depois incubada a 37°C para digerir os ds-DNA parenteral. 1-5µL de DpnI-tratados de DNA de cada mutagênica reação foram adicionados 45µL de *E.coli* XLI-Blue ressuscitado (Stratagene) e 2µL mistura de β-ME (Stratagene). A suspensão foi misturada e incubada em gelo durante 30 minutos. A suspensão foi aquecida a 42°C num banho de água por 30 segundos. A mistura foi incubada em gelo por mais 2min. 0,5 ml caldo NZY⁺ preaquecido (42°C) foi adicionado em cada célula em suspensão. O caldo de transformação foi incubado durante 1 hora com agitação a 225-250rpm. 1µL, 10µL e 100µL do caldo de transformação de cada reação de mutagênese foram espalhados sobre placas ágar LB contendo 100µg/mL de Ampicilina (Sigma), 80µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida (X-gal, Stratagene), 20mM de isopropil β-D-Tiogalactopiranosida (IPTG, Sigma) e incubados durante 18 horas a 37°C. As colônias azuis continham o plasmídeo mutante. Uma única colônia de cada tipo mutante foi selecionada do ágar e usada para inocular 10mL do meio LB contendo 100µg/mL de Ampicilina. O plasmídeo foi isolado utilizando QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). Os plasmídeos foram sequenciados e verificados para a mutação correta utilizando iniciadores pQE for e pQE Rev.

1.4 Transformação e Clonagem

10µL (50 ng por µL) de DNA plasmídeo (da Seção 1.2 e 1.3) foram adicionados a 1mL de células de *E.coli* BL21 competentes frias (4°C) (DE3) Singles® pLysS (Novagen). Após 20 min as células foram aquecidas chocadas por incubação por 30 s a 42°C em banho de água. 100µL de meio Psi foram adicionados à mistura de célula/plasmídeo e agitados a 37°C por 90 min. Alíquotas de 50µL e 100µL foram plaqueadas em placas ágar LB contendo 100 µg/mL de ampicilina (Sigma) e incubadas por 18 horas a 37°C. Colônias únicas foram cultivadas e estoques de células congeladas geradas e armazenadas a -80°C. DNA plasmídeo foi analisado a partir de estoques de células para verificar transformação correta.

1.5 Expressão

Uma Ampola de células de *E.coli* transformadas congeladas (da Seção 1.4) foram recuperadas e inoculadas em frascos de Erlenmeyer com defletores, contendo 100mL de meio LB e 100µg/mL de ampicilina. Os frascos foram incubados com agitação, durante a noite a 37°C. 5mL desta cultura noturna foram adicionados a um frasco de Erlenmeyer de 2 litros (500mL de meio LB/100µg/ml)) e incubados com agitação a 37°C. 2mL de amostras de caldo foram tomados de hora em hora para rastrear o crescimento e a expressão de proteína mutante e tipo selvagem de TGF-Beta 3. O crescimento foi determinado medindo a absorbância em um espectrofômetro, em um comprimento de onda de 600nm. Quando a absorbância mediu 0,6 Abs as células foram induzidas para expressar proteína TGF-Beta 3 mutante e tipo selvagem pela adição de isopropil β-D-Tiogalctopiranosida (IPTG, Sigma) para uma concentração final de 1 mM. As culturas foram incubadas por umas 4 horas adicionais. 0,5mL de amostras de caldo foram peletizados por centrifugação (10min 10,000 rpm em um Sorvall Biofuge) e o sobrenadante descarregado. O pélete foi ressuspenso em 50uL de tampão de amostra de dodecil sulfato de sódio (SDS) - poliacrilamida gel-electroforese (PAGE) e aquecido por 10 minutos em banho de água a 95°C. Amostras de 10µL foram carregadas em SDS-PAGE. SDS-PAGE e coloração de Coomassie Blue foram realizados (como descrito em A.T Andrews, 1986) usando um Hoefer®Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster (Amersham). Os géis eram de

1mm de espessura e continham 15% (v/v) de gel de poliacrilamida.

1.6 Colheita da célula e isolamento de corpos de inclusão

As células da seção 1.5 foram peletizadas pela centrifugação em 5000g por 10 min uma centrífugada Hettich Rotina 46R com um Rotor 4315.

- 5 O rompimento da célula e a recuperação do insolúvel (corpos de inclusão) de proteínas TGF-Beta 3 foram realizados a 4°C. As células foram suspensas em 50mL de 100mM Tris/HCl (Sigma), 10mM EDTA (Sigma) pH 8,3 e foram interrompidas por sonicação usando um Sanjo Soniprep 150. 0,2% (p/p) de Triton X-100 (Sigma) foi adicionado à suspensão e agitado por uma
- 10 hora. A suspensão foi centrifugada em 15.000g por 40 min. Os péletes foram ressuspensos em 50mL de 100mM Tris/HCl, 10mM EDTA pH 8,3 à temperatura ambiente antes de ser centrifugada por 40 min em 12.000g.

1.7 Solubilização de Corpos de Inclusão

- O sedimento da seção 1.6 foi ressuspense em 40mL de 8M de
- 15 Uréia 1% (p/p) DL-Ditioteitol (DTT) e interrompido em um homogenizador Heidolph Diax 900. A suspensão foi coberta e deixada em agitação por 1 hora para solubilizar os corpos de inclusão e reduzir proteínas TGF-Beta 3 mutantes e tipo selvagem a suas formas monoméricas. A suspensão foi então centrifugada em 15.000g por 30 min. O sobrenadante foi dialisado para
- 20 trocar o tampão de 8M de Uréia (ICN biomédica) para 10% (v/v) de ácido acético. As proteínas de *E.coli* que ficaram solúveis em 8M de uréia se precipitaram da solução quando o tampão foi trocado para ácido acético 10% (v/v). 1% (p/v) DTT (Sigma) foi adicionado à suspensão, coberto e deixado em agitação por 30 min para reduzir qualquer ligação de dissulfeto que possa
- 25 ter se formado entre monômeros TGF-β3 durante a troca de tampão. A suspensão foi centrifugada a 12.000g por 40 min para separar as proteínas solúveis e não solúveis. Amostras foram tomadas da solubilização da uréia e etapas de troca de tampão (material solúvel e não solúvel de ácido acético), e então analisadas usando SDS-PAGE.

30 1.8 Ultrafiltração

O material de ácido acético 10% (v/v) da seção 1.7 se submeteu à ultrafiltração com uma membrana 10kDa em um Vivoflow50 (Vivascience).

A finalidade disto era reduzir o volume de suspensão de ácido acético 10% (v/v) para 3mL e remover as proteínas de baixo peso molecular.

1.9 Gel filtração

5 A amostra da Seção 1.7 cromatografada em uma coluna de alta resolução Hiprep 26/60 Sephacryl S-100 (Amersham, 320mL) em 10% (v/v) de ácido acético a uma razão de fluxo de 1.5mL/min. Frações contendo TGF-Beta 3 monomérico desnaturado (que eluído entre 100 min e 140 min), foram agregadas.

1.10 Liofilização

10 As frações agregadas contendo TGF-Beta 3 monomérico desnaturado foram liofilizadas usando um secador de congelamento TEC Lyoprep-3000 para retirar o ácido acético e água da amostra.

1.11 Redobramento

15 O TGF-Beta 3 monomérico, liofilizado, da Seção 1.10 foi solubilizado em uréia 8M contendo 10mM de DTT até a concentração final de TGF-Beta 3 de 10mg/mL foi alcançado. A solução de TGF-Beta 3 foi adicionada lentamente, enquanto agitando a solução de redobramento (1M sulfonato 3-(Piidino)-1-propano (NDSB-201), 20% (v/v) sulfóxido de demitila (DMSO, Sigma), 2% (p/v) 3-(3-colamidopropil)dimetilamônio-1-propanossulfonato (CHAPS), 1M NaCl (Sigma), 1% (p/v) glutathione reduzida (GSH, Sigma), 20 0.05M @ Trizma Base (Sigma) pH 9,3), até uma concentração final de 0.2mg/mL de TGF-Beta 3 seja alcançada. É importante que o pH seja mantido dentro de um intervalo de 9,2-9,4 utilizando concentrado de NaOH/HCl. A solução foi coberta com Parafilme, em que foi perfurada para permitir a oxidação do TGF-Beta 3 monomérico e colocada sob agitação em 8°C. Após 25 144 horas, a solução foi centrifugada a 15.000g por 40 minutos para remover o precipitado formado e o pH foi ajustado para pH 3,5 com ácido acético glacial. O sobrenadante continha TGF-Beta 3 dimérico ligado a dissulfeto, o qual foi determinado por SDS-PAGE (não-reduzido) e Western Blotting. O 30 SDS-PAGE foi realizado conforme descrito na Seção 2.1.

Para o Western Blotting, amostras foram carregadas sob 1mm de espessura, 15% (v/v) de gel de poliacrilamida. Uma vez que a eletrofore-

se foi concluída, as proteínas dentro do gel foram eletroforéticamente então transferidas para o papel de nitrocelulose (Sigma), utilizando o aparelho de Western Blotting TE22 (Pharmacia), conforme descritas no manual de instruções. Locais de ligações não-específicos sobre a nitrocelulose foram então bloqueados com tampão de bloqueio (5% (p/v) de leite desnatado em pó, 1% (v/v) de monolaurato de Polioxietilenossorbitano (Tween 20, Sigma), em solução salina tamponada com fosfato (Invitrogen)). A nitrocelulose foi, em seguida, lavada em tampão de lavagem (PBS, 0,1% Tween 20). A nitrocelulose foi, em seguida, incubada durante 1 h com o anticorpo primário (MAB643 (P & D sistemas)) diluído a 1:500 com 0,1% (v/v) Tween 20, em PBS. A nitrocelulose foi novamente lavada antes de incubação por 1 hora com o anticorpo secundário de anticorpo de cabra anticamundongo (abcam) diluído a 1:3000 com 0,1% (v/v) Tween 20, em PBS. A nitrocelulose recebeu uma última lavagem antes da adição do reagente de ECL (Amersham) para visualizar os complexos antígeno-anticorpo. Em um quarto escuro o filme de raio-X foi exposto à nitrocelulose antes de ser imerso em soluções desenvolvedoras, fixas e de parada. A nitrocelulose foi então deixada secar. O redobrimento das proteínas monoméricas de TGF-Beta 3 tipo-selvagem' e mutante mostraram níveis variados de formação de dímeros. A porcentagem de recuperação corretamente do redobrimento dimérico de outros redobramentos incorretos ou proteínas TGF-Beta 3 não diméricas são apresentados na Tabela 3.

Curiosamente as substituições de aminoácidos dentro da alfa hélice de proteínas TGF-Beta 3 que causou maior impacto sobre o rendimento de redobrimento (formação do dímero). Estabilização do alfa hélice pela substituição de Glicina com Arginina aumentou os rendimentos de redobrimento de 20% para 50%). Inversamente a ruptura da alfa hélice pela substituição de Glicina com prolina resultou em uma porcentagem muito mais baixa de formação de dímero. Isto indica que a hélice alfa desempenha um papel importante na mudança do dobramento na correta molécula de TGF-Beta 3. Substituição dos aminoácidos envolvidos na formação da "ponte salina" não produz efeito de rendimentos de redobrimento.

1.12 Cromatografia de interação hidrofóbica

A solução de renaturação da Seção 1.11 foi concentrada a 50mL por ultrafiltração com um 10kDa de membrana (peso molecular isolado) no Vivoflow50 (Vivascience). A solução de renaturação foi diluída a 1:1 com uma solução de sulfato de amônio 2 M (Sigma) e 10% (v/v) de ácido acético. Uma coluna Biorad 2ml preenchida com Fenil-Sefarose de fluxo rápido (Amersham) foi equilibrada com tampão A (1,0M de sulfato de amônio e 10% (v/v) de ácido acético). 20mL da solução de renaturação diluída foram aplicados a esta coluna a uma razão de fluxo 1mL/min (essa razão de fluxo foi utilizada durante todo o procedimento). A coluna foi então lavada em tampão até a leitura de absorbância em 280nm atingida a nível basal (10mL). 100% do tampão B (10% (v/v) de ácido acético 30% (v/v) de isopropanol) foram aplicados à coluna. O primeiro pico, que contém proteínas TGF-Beta 3 tanto nas formas monoméricas e diméricas, foi agrupado (vide figura 1).

1.13 Cromatografia de troca catiônica

Cromatografia de troca catiônica foi usada para isolar as proteínas TGF-Beta 3 diméricas das monoméricas. Uma coluna 2 UNO-SI 2mL (Biorad) foi equilibrada com um tampão contendo 10% (v/v) de ácido acético, 30% (v/v) de isopropanol). As frações agrupadas da Seção 3.12 foram aplicadas em uma razão de fluxo de 1mL/min sobre a coluna UNO-S1. A coluna foi então lavada em tampão A até a leitura de absorbância em 280nm tenha atingida nível basal (5 min). Um gradiente linear foi executado durante 5 minutos finalizando com uma mistura de 60% de tampão A e 40% de tampão B (10% (v/v) em ácido acético, 30% (v/v) de isopropanol e 1M NaCl). A aplicação desta mistura tampão foi mantida por mais um 15 minutos. TGF Beta-3 monomérico foi eluído da coluna após 10min seguinte a injeção da amostra. Um segundo gradiente linear foi aplicado durante 5 minutos finalizando com 100% de tampão B e mantido por 10 minutos. TGF-Beta 3 dimérico foi eluído da coluna 30 minutos após a injeção da amostra (vide figura 2).

1.14 Ultrafiltração/diafiltração

As frações contendo moléculas TGF-Beta 3 monoméricas e diméricas purificadas da Seção 1.13 foram submetidas à ultrafiltra-

ção/diafiltração para trocar o tampão a 20mM em ácido acético, 20% (v/v) de isopropanol e concentrado a amostra a ~ 10mg/mL (concentração de TGF-Beta 3 foi determinada por espectrometria UV). Um Vivoflow50 (Vivascience) com uma 10kDa isolado foi usado na troca de tampão e concentrado as amostras.

2. Caracterização *in vitro* de TGF- β 3s da invenção.

2.1. Análise SDS-PAGE de TGF- β 3s purificados da invenção.

Proteínas mutantes TGF-Beta 3 purificadas (da Seção 1.14) foram avaliadas por SDS-PAGE para determinar a pureza e peso molecular. Devido ao baixo pH nas amostras mutantes TGF-Beta 3 das Seções 3.14 foi trocado o tampão utilizando colunas rotativas de salinização protéica (Pierce) em amostra tampão SDS-PAGE. 3/xg de proteínas TGF-Beta 3 mutante purificadas (amostras reduzida e não-reduzida), 3 μ g de controle positivo de TGF-Beta 3 tipo selvagem (reduzida e não reduzido) e 10/iL de filamentos de peso molecular Mark 12 foram carregados sobre gel de poliacrilamida (10% - 20% (v/v) de gradiente de acrilamida). Uma vez que a eletroforese tenha sido completada o gel foi corado com Coomassie Blue.

Tal como esperado o TGF-Beta 3 "tipo selvagem" e a proteína mutante Gly63-Ala correram para posições idênticas sobre o gel (amostras de~ 13kDa para reduzida e 25kDa para não-reduzida). Curiosamente nenhuma banda de proteína mutante Gly63-Pro foi detectada sobre o gel não reduzido, mas foi detectada no gel reduzido. Como a eficiência do redobramento da Gly63-Pro foi muito baixa (<1%) é provável que várias espécies redobradas foram produzidas, os quais foram a níveis inferiores aos detectáveis por Coomassie (> μ g). No entanto, quando estas espécies foram reduzidas à concentração de monômero Gly63-Pro reduzido foi acima de 1 μ g no limite de detecção da coloração por Coomassie e, por conseguinte, Gly63-Pro pode ser visto no gel reduzido. A posição da banda de proteína Gly63-Pro reduzida foi ligeiramente mais elevada do que a banda de TGF-Beta 3 "tipo selvagem". Como era de se prever a substituição de Glicina 63 para uma prolina feita a proteína mutante Gly63-Pro uma molécula maior do que TGF-Beta 3 do "tipo selvagem" (vide figura 3).

2.2 Ensaio de Inibição do crescimento celular para comparar a atividade biológica do TGF- β 3s da invenção com o TGF- β 3 de tipo selvagem

Ensaio de inibição do crescimento celular (A Meager, 1991), é um teste para a atividade biológica *in-vitro* para moléculas TGF-Beta. O ensaio colorimétrico é baseado no efeito inibitório de moléculas TGF-Beta no crescimento das células epiteliais Pulmão Mink (MLEC). 100 μ L de suspensão celular contendo: 1×10^4 MLEC células/mL e meio completo (DMEM (Invitrogen), 0.01M tampão Hepes (Invitrogen), 2mM de L-Glutamina (Invitrogen), L-Arginina (Invitrogen), L-asparagina (Invitrogen), 100 unidades/mL de penicilina (Invitrogen), 50 μ g/mL de estreptomicina (Invitrogen) e 5% soro fetal de vitelo (Invitrogen)) foram adicionados a cada cavidade das 96 cavidades da placa de cultura de tecido. Após incubação a noite toda a 37°C, 5% de CO₂, 100 μ L serialmente diluídos (10pg/mL a 500pg/mL) de amostras mutantes TGF-Beta 3 diméricas (Seção 3.14) foram adicionados à placa. Cavidades de controle receberam 200 μ L de médio completo e 10% (v/v) 0,25 M maltose. As placas foram incubadas por mais 120h e 50 μ L de 2mg/mL, de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazonil-2-il]-2,5-difeniltetrazolio: tiazolila azul (MTT; Sigma) foi adicionado a cada cavidade. As placas foram incubadas por mais 4 horas e o meio foi então removido. 100 μ L de 0.05M de HCl (BDH), isopropanol absoluto (BDH) foi adicionado a cada cavidade e o resultante solubilizado formado foi quantificado em 570 nm usando um leitor de microplacas (Victor² 1420).

Gly63-Ala, um TGF- β 3 da invenção, teve um efeito inibidor sobre células MLEC durante um intervalo de concentração de 0-500pg/mL. Como se pode ver na Tabela 4, proteína mutante Gly63-Ala tinha uma IC₅₀ de 34pg/mL comparado ao TGF-Beta 3 "tipo selvagem" com uma IC₅₀ de 26 pg/mL.

2.3 Análise de sequência de Aminoácidos

Cinquenta microlitros de amostras TGF-Beta 3 mutantes e tipo selvagem purificados da Seção 3.14 foram secos sob vácuo e, em seguida, ressuspensos em 20 μ L de uma solução contendo 50mM de NH₄HCO₃ e 10% (v/v) de acetonitrila. 20 μ g de Tripsina de grau de seqüenciamento

(Promega) foram ressuspensos em lOuL do kit fornecido do tampão de res-suspensão (Promega) para dar uma concentração de tripsina $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esta foi, então, diluída em 50mM. 50mM de NH_4HCO_3 e 10% (v/v) de acetonitrila para dar uma concentração de tripsina final de $0.2\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A digestão foi reali-
 5 zada durante a noite toda pela adição de tripsina em uma razão 1:20 (p/p) com proteínas TGF-Beta 3 mutantes e "tipo selvagem". A digestão foi finali-
 zada pela adição de ácido fórmico (Fluka), para uma concentração final de 0,1% (v/v). As amostras foram então diluídas para lpmol/UL. Os peptídeos foram então analisados por um processo de nano-fluxo RPLC-MS (Ultimate
 10 System, Dionex online to a Q-ToF2, Micromass). A cromatografia foi realiza-
 da em uma coluna $75\mu\text{m}$ C18 (LC packings) utilizam um gradiente de 45 min 5% (v/v) de acetonitrila a 55% (v/v) de acetonitrila. A análise MS teve para os dados de análise dependente onde o instrumento da medida m/z dos íons peptídicos eluídos do LC e selecionamento adequado de íons para análise
 15 MS-MS onde a decomposição induzida colisionalmente foi empregada para fragmentar íons de peptídeo para tornar informação da seqüência.

3. Caracterização in vivo de TGF- β 3 da invenção

Os efeitos biológicos de proteínas TGF-Beta 3 mutantes e tipo selvagem ativas redobradas foram investigados em cura de feridas excisio-
 20 nal e incisional (3 dias de pós-ferimento) e cicatriz (70 dias de pós-ferimento), em ratos machos adultos.

3.1 Comparação dos efeitos de TGF- β 3 tipo selvagem e TGF- β 3s da invenção na cura de feridas

Ratos machos (Sprague Dawley) são anestesiados com halota-
 25 no e suas costas raspadas. Posições dos ferimentos foram marcadas utilizando um modelo padrão com tinta de marcação de pele como mostrado na figura 4. Amostras foram diluídas em tampão de veículo estéril contendo 0.25M de maltose (Sigma), 0,002% (v/v) de ácido acético e 0,33% (v/v) de álcool isopropílico a concentrações descritas na Tabela 4. Todas as amos-
 30 tras foram esterilizadas a filtro e livre de endotoxina. Quatro ratos foram usados para cada grupo de tratamento. 100/uL da amostra de cada grupo (Tabela 4) foram injetados intradermicamente nas posições de feridas marcadas

A e B (exceto os ratos que não recebem tratamento (naive)). Nas posições de feridas A e B uma punção de biópsia foi feita. Todos os animais estavam em gaiolas em separado. Após 24 horas os animais receberam uma segunda dose da amostra. Depois de 3 dias as feridas foram fotografadas e analisadas através de um sistema de Contagem Analógica Visual (modificado de Beausang, E et al 1998). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando testes Mann Whitney U/Student T. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.2 Avaliação das feridas incisional de 3 dias tratadas com TGF- β 3 tipo selvagem ou TGF- β 3s da invenção na cura de feridas utilizando uma escala analógica visual macroscópica

Feridas incisoriais foram examinadas após 3 dias usando uma escala macroscópica visual analógica (VAS). Na escala de 10 pontos, uma pontuação 0 representa uma ferida bem curada e uma pontuação de 10 representa uma ferida muito mal curada. Os dados mostram que:

O tratamento com 50ng/100 μ L ou 100ng/100 μ L do tipo-selvagem de TGF-Beta 3 diminui a pontuação VAS (ou seja, melhora a aparência macroscópica da ferida) em comparação com nenhum tratamento (controle naive). O tratamento com dose de 100ng/100 μ L melhorou significativamente ($p < 0,05$) a aparência de feridas comparadas a nenhum tratamento (controle naive) isto é, cura acelerada.

O tratamento com 50ng/100 μ L ou 100ng/100 μ L de Gly63-Ala mutante diminui a pontuação VAS, em comparação com nenhum tratamento (controle naive), e são comparáveis aos ferimentos tratados com TGF-Beta 3 do "tipo selvagem" ou seja, não atrapalhou a cura.

O tratamento com 50ng/100 μ L ou 100ng/100 μ L do Gly63 ~ Pro mutante diminui a pontuação VAS, em comparação com nenhum tratamento (controle naive), e é comparável aos ferimentos tratados com TGF-Beta 3 do tipo selvagem, isto é, não prejudicou a cura.

3.3 Avaliação Microscópica da largura da Ferida para o 3 dia de ferida excisional tratado com proteínas TGF-Beta 3 mutante e "tipo selvagem"

Largura de ferida excisional foi avaliada microscopicamente a-

pós 3 dias. Todas as feridas tratadas com proteínas TGF-Beta 3 "tipo selvagem" e mutante mostraram largura de ferida comparável ao placebo e controles de nenhum tratamento (naive), confirmando que proteínas TGF-Beta 3 mutante não têm efeitos adversos na cura (figura 6).

5 **3.4 Efeitos de proteínas TGF-Beta 3 "tipo selvagem" e mutante na Cicatriz (Dia 70 de ferimento).**

Ratos machos (Sprague Dawley) são anestesiados com halotano e suas costas raspadas. As posições dos ferimentos foram marcadas utilizando um modelo padrão com uma tinta de marcação de pele como mostrado na figura 7. As amostras foram diluídas em tampão de veículo estéril contendo 0.25M maltose (Sigma), 0,002% (v/v) de ácido acético e 0,33% (v/v) de álcool isopropílico a concentrações descritas na Tabela 5. Todas as amostras foram esterilizadas, livre de endotoxina e livre de pirogênios. Quatro ratos foram usados para cada grupo de tratamento. 100 μ L da amostra de cada grupo de tratamento (Tabela 6) foram injetados intradermicamente nas posições A e B de feridas marcadas (exceto ratos que não receberam tratamento (naive)). Nas posições de feridas A e B de espessura total de 1 centímetro, as incisões foram feitas com uma lâmina de bisturi nº 11. Todos os animais estavam em gaiolas em separado. Após 24 horas os animais receberam uma segunda dose da amostra. Após 70 dias as cicatrizes foram fotografadas e analisadas utilizando um sistema macroscópico de contagem analógica visual (modificado de Beausang, E et al 1998). As feridas foram excisadas e colocadas em solução salina tamponada com 10% antes de ser processada em um bloco de cera. Os blocos foram cortados em cera seções serial de 5 μ M e colocados em lâminas. As lâminas foram coradas com Massons Trichrome e analisados. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando testes Mann Whitney U/ Students T. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

30 **3.5 Avaliação de feridas incisionais de 70 dias usando macroscópica VAS.**

Feridas incisionais foram examinadas após 70 dias usando um sistema macroscópico VAS. Uma pontuação de 10 indica uma má cicatriz e

uma pontuação de 0 é a pele normal (figura 8). Análise por VAS de feridas do dia 70 mostra que:

TGF-Beta 3 "tipo selvagem" (em doses de 50ng/100µL e 100ng/100µL) reduziu a cicatriz em comparação com o placebo tratado e ferida naíve. Para ambas as doses esta redução é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação com feridas tratadas com placebo.

Gly63-Ala mutante (em doses de 50ng/100µL e 100ng / 100µL) reduziu a cicatriz em comparação com o placebo tratado e ferida naíve. Para dose de 50ng/100µL esta redução é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação com as feridas tratadas com placebo.

Gly63 Pro-mutante (em doses de 50ng/100µL e 100ng/100µL) reduziu a cicatriz em comparação com o placebo tratado e ferida naíve.

Glul2-Ser mutante (em doses de 50ng/100µL e 100ng/100µL doses) reduziu a cicatriz em comparação com o placebo tratado e ferida naíve. Para a dose de 50ng/100µL esta redução é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação com feridas tratadas com placebo.

Mutante de dupla serina (Glul2-Ser & Arg52-SER) em doses de 50ng/100µL e 100ng/100µL reduziram a cicatriz em comparação com o placebo tratado e ferida naíve.

3.6 Análise microscópica do dia 70 de feridas incisional.

Os efeitos macroscópicos notados utilizando o sistema de escore VAS foram confirmados por análise histológica. Exemplos representativos de lâminas histológicas são mostrados nas figuras 12 e 13. As fotomicrografias histológicas mostram que adição de proteínas TGF-β3 de acordo com a invenção induz uma melhoria semelhante à observada com TGF-β3 do "tipo selvagem". As proteínas da invenção induzem as fibras de colágeno dentro da cicatriz a ter morfologia semelhante àquelas em torno da pele normal.

4 Conclusões

A flexibilidade da alfa hélice (entre resíduos de aminoácido 58-67) influencia sobre a formação TGF-Beta 3 dimérica redobrada corretamente funcional durante o redobrimento. Estabilização da alfa hélice pela substituição de Glicina63 com alamina aumenta significativamente a eficiência de

redobramento como desestabilizando a alfa hélice pela substituição de Glicina63 com prolina tem o efeito oposto.

Substituindo a Glicina 63 com Alanina ou Prolina não altera a cura de feridas, em comparação com TGF-Beta 3. "tipo selvagem"

5 Gly63-Ala e Gly63-Pro reduziram as cicatrizes comparadas às feridas tratadas e não-tratadas com placebo.

A criação da "ponte salina" (entre Arg52 e Glul2) não altera a eficácia do redobramento de TGF-Beta 3.

10 Glul2-Ser e o Mutante de dupla Serina reduzem a cicatriz comparada às feridas tratadas e não tratadas com placebo.

5. Protocolos preferidos para a produção de TGF- β 3s monoméricos e diméricos de acordo com a presente invenção.

Condições preferidas para a geração de TGF-Beta 3s monoméricos corretamente redobrados de acordo com a presente invenção, são as
15 seguintes:

0,7M de ácido 2-(ciclohexilamino) etanossulfônico (CHES), 2mM de glutathione reduzida (GSH), 0,4mM glutathione oxidada (GSSG), 0,12mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

20 30mM de Taurodeoxicolato, 0,7M de CHES, 2mM de GSH, 0,4mM de GSSG, 0,12mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

1M de NDSB-201, 2mM de glutathione reduzida (GSH), 2mM de glutathione oxidada (GSSG), 0,12mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

0,7M de CHES, 2mM de glutathione reduzida (GSH), 2mM de glutathione oxidada (GSSG), 0,12mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

25 30mM de Taurodeoxicolato mais 1M NDSB-221, 2mM de glutathione reduzida (GSH), 2mM de glutathione oxidada(GSSG), 0,12mg/mL deTGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

30 30mM de Taurodeoxicolato mais 0,7M CHES, 2mM de glutathione reduzida (GSH), 2mM de glutathione oxidada (GSSG), 0,12mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

30mM de Taurodeoxicolato, 0,7M de CHES, 2mM de GSH, 2mM de GSSG, 0,12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

Em geral um TGF- β 3, de acordo com a presente invenção pode ser dobrado em uma forma biologicamente ativa, dimérica através de um método compreendendo a adição de TGF- β 3 monomérico desdobrado solubilizado a uma solução contendo:

5 (i) ácido 2-(cilcohexilamino)-etlanossulfônico (CHES) ou um análogo funcional deste; e

(ii) um sistema redox sulfidril/dissulfeto de baixo peso molecular; e incubando o fator de crescimento na solução até TGF- β 3 dimérico biologicamente ativo seja formado .

10 Condições preferidas para a geração de TGF-Beta 3s diméricos corretamente redobrados de acordo com a presente invenção, são as seguintes:

0,7M de ácido 2-(cilcohexilamino) etanossulfônico (CHES), 2mM de glutathione reduzida (GSH), 0,4mM de glutathione oxidada (GSSG),
15 0,12mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

30mM de Taurodeoxicolato, 0,7M de CHES, 2mM de GSH, 0,4mM de GSSG, 0,12mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8 ° C.

30mM de Taurodeoxicolato, 0,7M de CHES, 2mM de GSH, 2mM de GSSG, 0,12mg/mL de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

20 **CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PREFERIDAS:**

5.1 VETOR DE CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULA HOSPEDEIRA.

O vetor PET-24d é derivado do vetor pBR322 e contém um promotor T7 sob controle de *LacUVS* e um gene marcador de resistência à canamicina.
25

DNA codificando TGF- β 3s da invenção pode ser digerido com o 0,75 μ L de NcoI (New England Biolabs) e 0,75 μ L de BamH1 (New England Biolabs) com tampão 1 X BamH1 (New England Biolabs) em uma reação de 15 μ L (Nuclease Free Water, Novagen) a 37°C por 4 horas. Um microlitro de
30 plasmídeo pET-24d (Novagen) pode ser digerido da mesma maneira. O cDNA digerido e o grande fragmento de plasmídeo são purificados e recuperados em gel de garose usando o Kit de extração de DNA SpinPrep Gel (No-

vagen).

Os fragmentos de plasmídeo e cDNA purificado foram ligados usando o Kit de ligase T4 (Novagen). O cDNA / plasmídeo ligado foi transformado em HMS174 (DE3) (kit de transformação Novagen HMS174 (DE3)).

- 5 Os transformantes foram selecionados por plaqueamento nas placas ágar de caldo de Luria (LB) contendo 50µg/mL de Canamicina (Invitrogen). Clones adequados foram selecionados para restrição de digestão e/ou expressão.

5.2 Seleção de Clone para Produto de Expressão

- 10 Os clones foram crescidos em culturas de frasco de agitação de "Caldo Terrific" de meia resistência (6g/L de fitona petona (Becton Dickinson), 12g/L de extrato de fermento (Becton Dickinson), 2g/L de glicerol (JT Baker), 1,16g/L de fosfato de potássio monobásico (JT Baker), 6,25g/L de fosfato de potássio dibásico (JT Baker), QS para 1 litro com água destilada) e induzidos na fase exponencial em OD₆₀₀ entre 0,65 e 0,85 com 1mM de
- 15 isopropil beta-D-tiogalactopiranosida (IPTG). As amostras de pós-indução foram tomadas 3 horas após a adição de IPTG e analisadas por eletroforese de gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) para indução e expressão de produto. As amostra de clones adequados foram funcionaliza-
- 20 dos sobre gel NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris, 1,0mm (Invitrogen) por aproximadamente 40-50 minutos em 120milliAmps e 200 volts e então corados com Coomassie Blue. Expressão de TGF-β3s de acordo com a invenção pode então ser induzida nessas culturas.

5.3 Estoque de Célula Congelada

- 25 Os clones são crescidos em frascos de agitação em Caldo Terrific de meia resistência para um OD₆₀₀ de aproximadamente 1 e armazenados como estoques de glicerol pela adição de glicerol a 20% (v/v). 1,2mL de caldo foi dosado em criovias de 12 x 2mL (que continham 0,3mL de glicerol) e então armazenado a -70°C.

5.4 Confirmação de Seqüência de Gene de TGF-Beta 3

- 30 As amostras das culturas usadas para estoques de célula congelada foram tomadas antes da adição de glicerol e usadas para o isolamento de plasmídeo usando um Qiagen MiniPrep Kit. O plasmídeo isolado foi

seqüenciado e verificado usando um iniciador promotor T7 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') e um iniciador terminal T7 (5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3').

5.5 Cultura Semeada

- 5 Um clone adequado selecionado é inoculado dentro de um frasco de Erlenmeyer com defletores de 2 Litros, contendo 500mL de meio Hy-Soy (12g/L Hy-Soy (Quest International), 24g/L de extrato de levedura (Becton Dickinson), 10g/L de NaCl (Sigma), 10g/L de glicerol (Sigma) e 50µg/mL de canamicina. O frasco foi incubado com agitação a 37°C e 200rpm e a-
- 10 mostrado periodicamente para medir OD₅₅₀. Quando o OD da cultura alcançou 3,21 U/mL (após 7 horas) o caldo de célula foi usado para semear um fermentador 150L (100 litros de volume de funcionamento).

5.6 Fermentação

- Novecentos mililitros de caldo celular (da seção 3.6) foram usa-
- 15 dos para inocular 150L de fermentador (WHE) contendo 90L de Meios de Cultura em Batelada (0,6g/L K₂HPO₄, 0,4g/L KH₂HPO₄, 1,25g/L NH₄SO₄, 12g/L HY-Soy, 24g/L de extrato de levedura, 10g/L de glicerol). Os parâmetros de funcionamento de fermentação foram controlados como segue: ponto de ajuste de temperatura, 37°C; ponto de ajuste de pH, 7,0 (mantidos usando 4N de hidróxido de amônio e 4N de ácido fosfórico), e; oxigênio dissolvido
- 20 (DO) inicialmente calibrado a 100%. A pressão da cabeça do vaso era 0,4914 kgf/cm² (7 psi), e a agitação e o fluxo de ar eram 200-400rpm com um volume de ar por volume de meio por minuto (vvm ou slpm), respectivamente. DO foi mantido acima de 20% ajustando os parâmetros do ponto de
- 25 ajuste de fermentação na seguinte prioridade: Agitação (máximo de 400rpm), aeração (máximo de 1,5 vvm), suplemento de oxigênio (máximo 33,3 lpm), e contrapressão (máximo de 0,8424 kgf/cm² (12 psi)). Espumação foi controlada com Pluronic L-61 (25% v/v). Quando o OD da cultura alcançou 10U/mL uma alimentação de glicerol (50% v/v) foi iniciada em uma taxa
- 30 de fluxo de 45mL/min. Quando o OD alcançou 40 U/mL, as células foram induzidas com a adição de IPTG à concentração final de 0,2mM.

5.7 Colheita

Após 4 horas de pós-indução, o fermentador foi refrigerado a 10°C e o fluxo de ar e a agitação foram reduzidos a 0,3vvm e 100rpm respectivamente. A espuma e os controles de pH foram terminados e a contra-pressão foi ajustada a 127 kPa (3psi). A cultura foi colhida por centrifugação contínua com um centrifugador contínuo Westfalia CSA 8 a 10°C. O centrifugador foi operado em 15,000 rpm e uma taxa de fluxo de 3 litros por minuto e pastas fluidas celulares colhidas.

5.8 Lise de célula e Recuperação de IB

A pasta celular de fermentação (da seção 5.7) foi diluída em 1:5 com Tampão de lise (6,1g/L de TrizmaBase (Tris), 3,7g/L de ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), 58,44L de NaCl e 10g/L de Triton X-100, pH 8,0) e ressuspensa usando um homogeneizador manual. A pasta celular ressuspensa foi passada duas vezes através de um homogeneizador de alta pressão (parâmetros: pressão, 60 Mpa (10.000psig); taxa de fluxo, 450mL/min; e temperatura, 15°C). O lisato celular homogeneizado foi então centrifugado (centrifugador de cubeta, rotor de ângulo fixo) em 5,000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descarregado deixando o TGF-β3 (corpos de inclusão) insolúvel. O pélete do corpo de inclusão (IB) foi ressuspenso em Tampão de lavagem (6,1g/L Tris e 3,72g/L EDTA, pH 8,0) usando um homogeneizador manual e centrifugado (5,000 xg por 20 minutos a 4°C).

5.9 Solubilização de Corpo de Inclusão

O sedimento da seção 5.8 foi diluído em 1:10 com Tampão de Solubilização (6,1g/L Tris, 15,4g/L DL-ditiotreitol (DTT) e Uréia 360,4g/L, pH 8,0) e ressuspenso usando um homogeneizador manual. A suspensão foi coberta e deixada em agitação por 60-75 minutos, na temperatura ambiente para solubilizar os corpos de inclusão e reduzir TGF-β3 para sua forma monomérica. O pH do pélete ressuspenso foi ajustado ao pH 9,4-9,6 com NaOH/ácido acético antes da incubação por uma segunda vez por 60-75 minutos.

5.10 Clarificação/Ultrafiltração e Diafiltração

O material Solubilizado da seção 5.9 foi clarificado, concentrado e diafiltrado em um sistema de Filtração de Fluxo Tangencial (TFF) (millipo-

re). Clarificação e concentração iniciais foram alcançadas com uma membrana TFF de clarificação pré-condicionada (peneira V Millipore Pellicon 1000kDa, Regenerated Cellulose). O TGF- β 3 clarificado foi coletado no permeado. Comutando a uma membrana de Ultrafiltração/Diafiltração (UF/DF) (peneira C Millipore Pellicon 5kDa, Regenerated Cellulose), o TGF- β 3 foi então lavado em 6 diavolumes de Tampão de Solubilização (6,1g/L Tris, 15,4g/L DTT e 360,4g/L de uréia, pH 9,5).

5.11 Ultrafiltração/Cromatografia Interações hidrofóbicas.

A solução de redobramento selecionada é concentrada em 5 dobras por ultrafiltração (a membrana pode ser uma folha plana-Millipore Pellicon 5kDa, 0,1m.2, celulose regenerada, tela). O pH do concentrado do material redobrado é então ajustado a um pH de 2,5-2,8 utilizando ácido acético glacial antes de ser diluído 1:1 em tampões de diluição (2,72g / L de acetato de sódio, 264,28g/L de sulfato de amônio, 100g / L de ácido acético, e 210.7g / L de cloridrato de arginina pH 3,3). Uma coluna de fluxo Rápido butil Sefarose 4 (Amersham, 16 cm Bed Altura) é equilibrada com quatro volumes de coluna de Tampão A (2,72g / L de acetato de sódio, 132,14g / L de sulfato de amônio e 100g / L de ácido acético pH 3.3). O material redobrado é filtrado através de 0,22/ μ M de membrana (Millipore Millipark Filter) antes sendo carregada sobre coluna de Butil Sefarose em razão de fluxo de 100cm/h (esta razão de fluxo foi usada durante todo o processo). A coluna é então lavada em tampão A por quatrovolumes de coluna. As proteínas TGF-Beta 3 são eluídas da coluna usando tampão B (2,72g/L de acetato de sódio, 100g/L de ácido acético e 300g/L de etanol pH 3,3) P primeiro pico, no qual continha proteínas TGF- β 3 tanto nas formas monoméricas e diméricas é agrupado, antes a separação das proteínas monoméricas e diméricas.

Seqüência de informação

TGF- β 3 (Seqüência ID No. 1)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKCKCS

Mutante TGF- β 3 "Gly63-Ala" (Seqüência ID No. 3)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
 THSTVLALYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS

Mutante TGF- β 3 "Gly63-Pro" (Seqüência D3 No. 5)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
 THSTVLPLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS

Mutante TGF- β 3 "Glu2-Ser" (Seqüência ID No. 7)

ALDTNYCFRNLSENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS

Mutante TGF- β 3 "Arg52-Ser" (Seqüência ID No. 9)

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLSSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS

5 Mutante TGF-0 3 "Glu2-Ser/Arg52-Ser" (Seqüência e ID No. 11)

ALDTNYCFRNLSENCCVRPLYIDFRQDLGWKVVHEPKGYIANFCSGPCPYLSSADT
 THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSCCKCS

Seqüência ID No. 2 - DNA codificando TGF-/S3 humno tipo selvagem

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG GAG GAG AAC TGC TGT GTG CGC
 CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG GGC TGG AAG TGG GTC CAT GAA CCT
 AAG GGC TAC TAT GCC AAC TTC TGC TCA GGC CCT TGC CCA TAC CTC CGC AGT GCA
 GAC ACA ACC CAC AGC ACG GTG CTG GGA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT GAA GCA
 TCT GCC TCG CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG CCC CTG ACC ATC CTG TAC
 TAT GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG AAG TCT
 TGT AAA TGT AGC

Seqüência ID No. 4 - DNA codificando Gly63-Ala mutante

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG GAG GAG AAC TGC TGT GTG CGC
 CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG GGC TGG AAG TGG GTC CAT GAA CCT
 AAG GGC TAC TAT GCC AAC TTC TGC TCA GGC CCT TGC CCA TAC CTC CGC AGT GCA
 GAC ACA ACC CAC AGC ACG GTG CTG GCA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT GAA GCA
 TCT GCC TCG CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG CCC CTG ACC ATC CTG TAC
 TAT GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG AAG TCT
 TGT AAA TGT AGC

Seqüência ID No. 6 - DNA codificando Gly63-Pro mutante

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG GAG GAG AAC TGC TGT GTG CGC
 CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG GGC TGG AAG TGG GTC CAT GAA CCT
 AAG GGC TAC TAT GCC AAC TTC TGC TCA GGC CCT TGC CCA TAC CTC CGC AGT GCA
 GAC ACA ACC CAC AGC ACG GTG CTG CCA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT GAA GCA
 TCT GCC TCG CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG CCC CTG ACC ATC CTG TAC
 TAT GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG AAG TCT
 TGT AAA TGT AGC

Seqüência ID No. 8 - DNA codificando Glu2-Ser mutante

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG TCG GAG AAC TGC TGT GTG CGC
 CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG GGC TGG AAG TGG GTC CAT GAA CCT
 AAG GGC TAC TAT GCC AAC TTC TGC TCA GGC CCT TGC CCA TAC CTC CGC AGT GCA
 GAC ACA ACC CAC AGC ACG GTG CTG GGA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT GAA GCA
 TCT GCC TCG CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG CCC CTG ACC ATC CTG TAC
 TAT GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG AAG TCT
 TGT AAA TGT AGC

Sequência ID No. 10 - DNA codificando Arg52-Ser mutante

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG GAG GAG AAC TGC TGT GTG CGC
 CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG GGC TGG AAG TGG GTC CAT GAA CCT
 AAG GGC TAC TAT GCC AAC TTC TGC TCA GGC CCT TGC CCA TAC CTC AGC AGT GCA
 GAC ACA ACC CAC AGC ACG GTG CTG GGA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT GAA GCA
 TCT GCC TCG CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG CCC CTG ACC ATC CTG TAC
 TAT GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG AAG TCT
 TGT AAA TGT AGC

Sequência ID No. 12 - DNA codificando Glu12-Ser/Arg52-Ser mutante

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG TCG GAG AAC TGC TGT GTG CGC
 CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG GGC TGG AAG TGG GTC CAT GAA CCT
 AAG GGC TAC TAT GCC AAC TTC TGC TCA GGC CCT TGC CCA TAC CTC AGC AGT GCA
 GAC ACA ACC CAC AGC ACG GTG CTG GGA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT GAA GCA
 TCT GCC TCG CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG CCC CTG ACC ATC CTG TAC
 TAT GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG AAG TCT
 TGT AAA TGT AGC

Tabela 1 Escala de propensão à hélice baseada em estudos de experimentos de proteínas e peptídeos

Aminoácido	Propensão à hélice (kcal/mol)
Ala	0,00
Glu ^o	0,16
Leu	0,21
Met	0,24
Arg ⁺	0,21
Lys ⁺	0,26
Gln	0,39
Glu	0,40
He	0,41
Asp ^o	0,43
Ser	0,50
Trp	0,49
Tyr	0,53
Phe	0,54
Val	0,61
Tlir	0,66
His ^o	0,56

Aminoácido	Propensão à hélice (kcal/mol)
His ⁺	0,66
Cys	0,68
Asn	0,65
Asp"	0,69
Gly	1,00
Pro	3,16

Tabela 2

Nomenclatura mutante	Aminoácido Substituído	Efeito na estrutura
Gly63-Ala	Glicina 63 substituída com Alanina	estabiliza Alfa hélice
Gly63-Pro	Glicina 63 substituída com Prolina	Desestabiliza Alfa hélice
Glul2-Ser	ácidoGlutâmico 12 substituído com Serina	Impede formação de ponte salina
Arg52-Ser	Arginina 52 substituída com Serina	Impede formação de ponte salina
Glul2-Ser e Arg52-Ser	Dupla substituição em que ácido Glutâmico 12 é substituído com Serina e Arginina 52 também é substituído com Serina	Impede formação de ponte salina

Tabela 3

Eficiência de redobramento do TGF- β 3 tipo selvagem e TGF- β 3s da invenção.

TGF-Beta 3 Mutante	Porcentagem de dímero corretamente dobrado
Gly63-Ala	50
TGF-Beta 3 "tipo selvagem"	20
Gly63-Pro	1
Glul2-Ser	20
Glul2-Ser & Arg52-Ser	20

Tabela 4

Atividade Biológica de TGF- β 3 tipo selvagem e Gly63-Ala (uma proteína TGF- β 3 da invenção) Avaliada pelo Ensaio de Inibição do Crescimento Celular

Proteína	IC ₅₀
TGF-Beta 3 "tipo selvagem"	26pg/mL
Gly63-Ala	34pg/mL

5

Tabela 5 Tratamento no local da ferida.

Grupo	Tratamento/amostra	Concentração(ng/100 μ L)
A	TGF-Beta 3 "tipo selvagem"	50
B	TGF-Beta 3 "tipo selvagem"	100
C	Gly63-Ala	50
D	Gly63-Ala	100
E	Gly63-Pro	50
F	Gly63-Pro	100
G	0,25 M Maltose (Placebo Controle)	N/A
H	Sem tratamento (Naive controle)	N/A

Tabela 6 Tratamento no local da ferida.

Grupo	Tratamento/amostra	Concentração (ng/100 μ L)
A	TGF-Beta 3 "tipo selvagem"	50
B	TGF-Beta 3 "tipo selvagem"	100
C	Gly63-Ala	50
D	Gly63-Ala	100
E	Gly63-Pro	50
F	Gly63-Pro	100
G	Glul2-Ser	50
H	Glul2-Ser	100
I	Glul2-Ser& Arg52-Ser	50
J	Glul2-Ser& Arg52-Ser	100
K	0,25 M Maltose (Placebo)	N/A
L	Naive	N/A

REIVINDICAÇÕES

1. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, em que o domínio de formação alfa-hélice entre resíduos de aminoácidos 58 e 67 de TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total compreende pelo menos uma substituição de alfa-hélice estabilizante.

2. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, em que o resíduo de glicina na posição 63 do TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total é recolocado com um resíduo de aminoácido alfa-hélice estabilizante.

3. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a substituição de alfa-hélice estabilizante compreende introdução de um resíduo selecionado do grupo consistindo em Alanina, Serina, Treonina, Valina, Leucina, Isoleucina; Metionina e Fenilalanina.

4. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com a reivindicação 3, em que o resíduo de glicina na posição 63 do TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total é recolocado com alanina.

5. TGF- β 3, de acordo com a reivindicação 4 compreende Sequência de ID Nº 3, ou fragmento ou derivado do mesmo.

6. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que não compreende uma substituição do resíduo de Valina na posição 61 de TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total.

7. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, em que o resíduo de glicina na posição 63 do TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total é recolocado com Prolina.

8. TGF- β 3, de acordo com a reivindicação 7, compreende Sequência de ID Nº 5, ou fragmento ou derivado do mesmo.

9. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, compreendendo uma substituição do resíduo de ácido Glutâmico na posição 12 do TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total e/ou resíduo de Arginina na posição 52 do TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total.

10. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com a reivindicação 9, em que a substituição ou substituições, é com resíduo de aminoácido selecionado do grupo consistindo em: Serina; Alanina; Treonina; Valina; Isoleucina; Metionina; Fenilalanina e Leucina.

5 11. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com a reivindicação 9 ou reivindicação 10, em que o resíduo do ácido Glutâmico na posição 12 do TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total é substituído por Serina.

10 12. TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, em que o resíduo de Arginina na posição 52 do TGF- β 3 de tipo selvagem de comprimento total é substituído por Serina.

15 13. TGF- β 3 selecionado do grupo consistindo em Seqüência de ID Nº 7, Seqüência de ID Nº 9 e Seqüência de ID Nº 11, ou fragmento ou derivado do mesmo.

14. TGF- β 3 monomérico, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

15. TGF- β 3 dimérico, ou fragmento ou derivado do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

20 16. Uso de um TGF- β 3, ou fragmento de TGF- β 3, ou um derivado de TGF- β 3, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, como um medicamento.

25 17. Uso de um TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, na preparação de um medicamento para uso na aceleração de cura de ferida e/ou prevenção, redução ou inibição de cicatriz.

30 18. Uso de um TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, na preparação de um medicamento para uso na preparação de um medicamento de regeneração epitelial.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 17 ou reivindicação 18, em que o medicamento é para uso na pele.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 17 ou reivindicação 18, em que o medicamento é para uso no olho.

21. Uso de um TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, na preparação de um medicamento para uso na prevenção e/ou tratamento de distúrbios fibróticos.

22. Uso de acordo com a reivindicação 21, em que o distúrbio fibrótico é selecionado do grupo consistindo em fibrose pulmonar, fibrose de fígado, escleroderma, fibrose de pele, fibrose muscular, fibrose de radiação, fibrose de rim, vitreorretinopatia proliferativa e fibrose uterina.

23. Uso de um TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, na preparação de um medicamento para o tratamento de distúrbios angiogênicos, restenose, adesões, endometriose, doença isquêmica, mucosite oral e doença renal.

24. Uso de um TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, na preparação de um medicamento para uso na indução de osso e cartilagem, ou fertilização *in vitro*.

25. Ácido nucléico codificando um TGF- β 3, ou fragmento ou derivado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

26. Método de aceleração de cura de ferida, e/ou prevenção, redução ou inibição de cicatriz, o método compreendendo prover uma quantidade terapeuticamente eficaz de um TGF- β 3, ou um fragmento ou derivado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, a um paciente necessitado do mesmo.

27. Método de prevenção e/ou tratamento de um distúrbio fibrótico, o método compreendendo prover uma quantidade terapeuticamente eficaz de um TGF- β 3, ou um fragmento ou derivado do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, a um paciente necessitado de tal prevenção e/ou tratamento.

28. Método de acordo com a reivindicação 26 ou reivindicação

27, em que TGF- β 3, ou um fragmento ou derivado do mesmo, é provido para a pele do paciente.

29. Método de acordo com a reivindicação 26 ou reivindicação 27, em que TGF- β 3, ou um fragmento ou derivado do mesmo, é provido para o olho do paciente.

Fig. 1. Cromatograma de TGF-Beta 3 de "Tipo Selvagem" em uma Coluna de Fenil-Sefarose

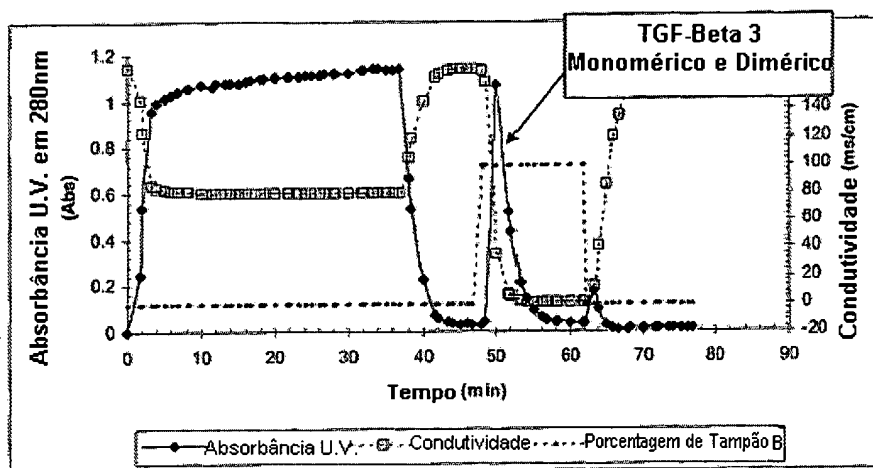


Fig. 2. Cromatograma de Monômero e Dímero de TGF-Beta 3 de "tipo Selvagem " sobre Coluna UNO-S1

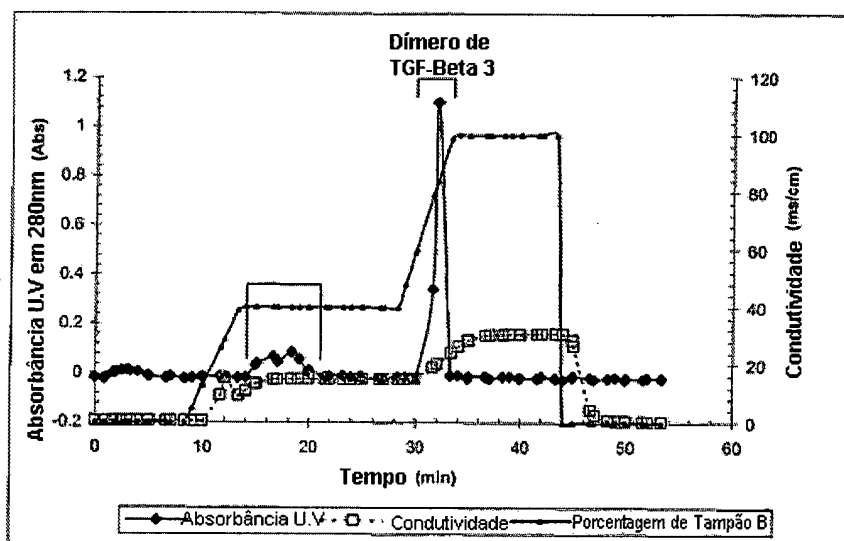


Fig. 3. Comparação de Proteínas Mutantes de TGF-Beta 3 e TGF-Beta 3 de "Tipo Selvagem" por SDS-PAGE (colorido por Coomassie Blue)

Trilha	Amostra	Concentração carregada por trilha
1	TGF-Beta 3 de "Tipo Selvagem"	3 μ g
2	Gly63-Ala	3 μ g*
3	Gly63-Pro	3 μ g*
4	Padrões de peso molecular Invitrogen Mark 12	10 μ l

* A Troca de tampão de proteínas mutantes Gly63-Ala e Gly63-Pro resultaram em algumas amostras perdidas, então a concentração real adicionada ao gel será menor do que 3 μ g declarado.

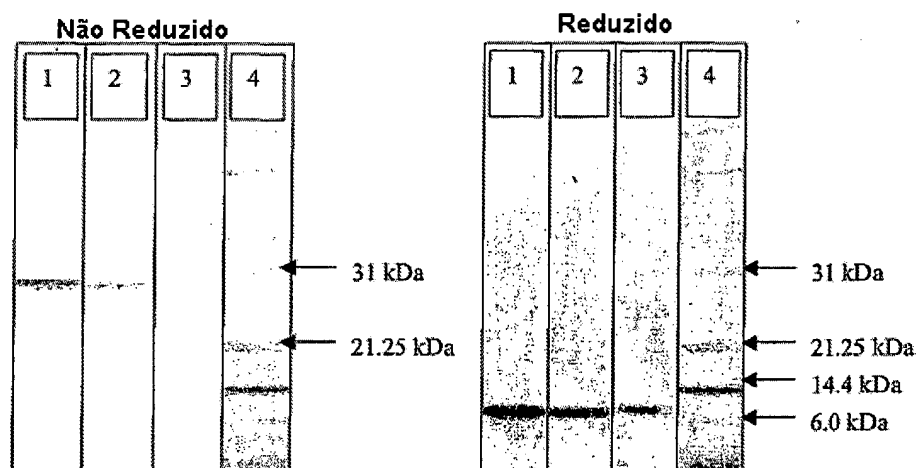


Fig. 4. Modelo para Feridas Excisionais

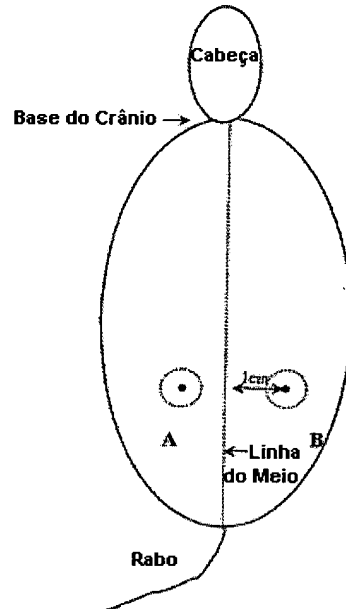
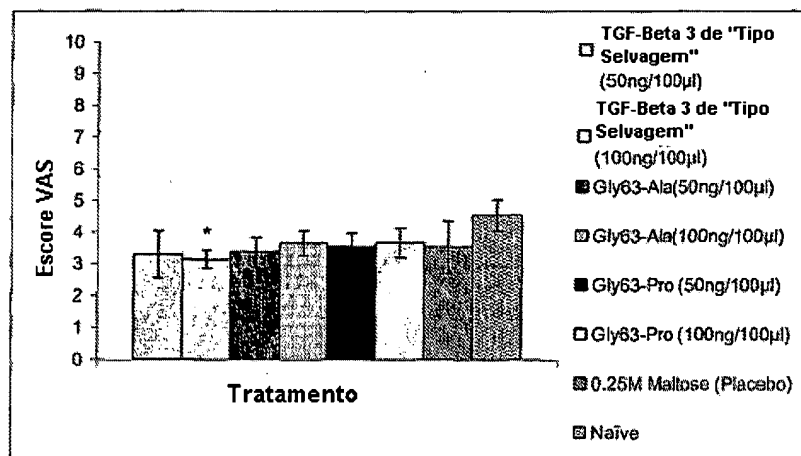


Fig. 5. Macroscore médio para feridas incisionais (A e B) tratadas com Proteínas Mutantes e TGF-Beta 3 de "Tipo Selvagem" no dia 3.



* Cura significativamente aumentada comparada a feridas naïve ($p < 0,05$).

Fig. 6. Largura de Ferida Média Microscópica para feridas excisionais (C e D) tratadas com proteínas de TGF-Beta 3 Mutantes e de "Tipo Selvagem" no dia 3.

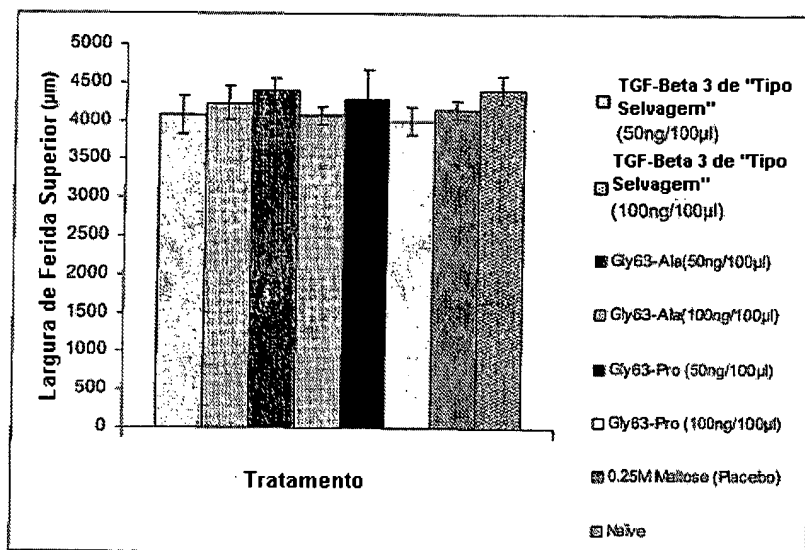


Fig. 7 Modelo para Ferida Incisional

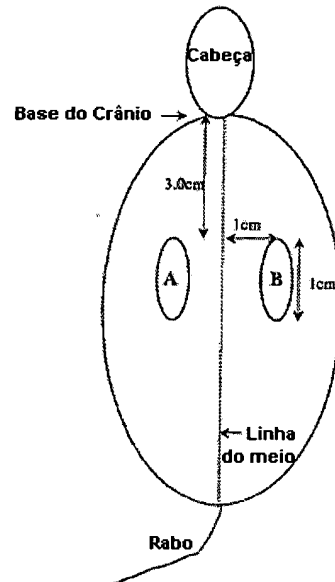
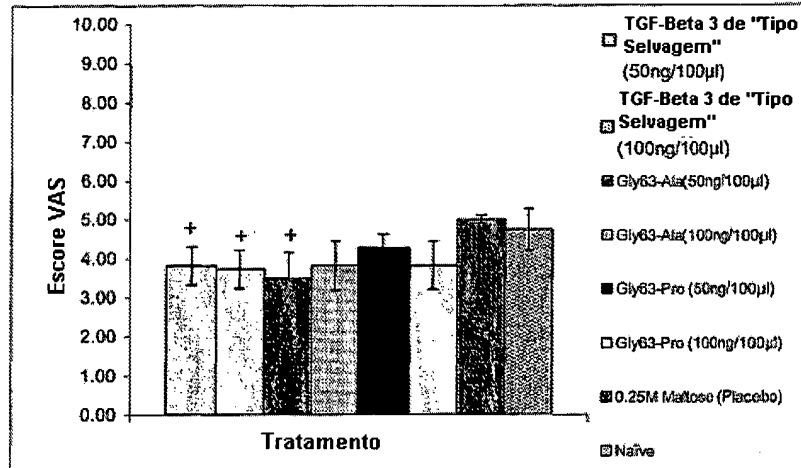


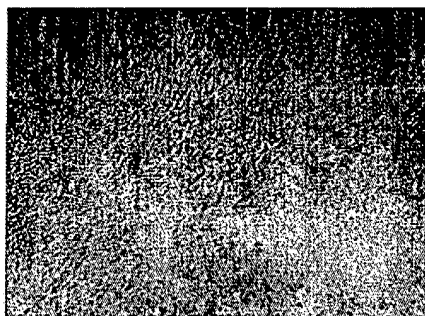
Fig. 8. Macrospore Médio para feridas incisionais (A e B) tratadas com Proteínas de TGBeta 3 Mutantes e de "Tipo Selvagem" no dia 70.



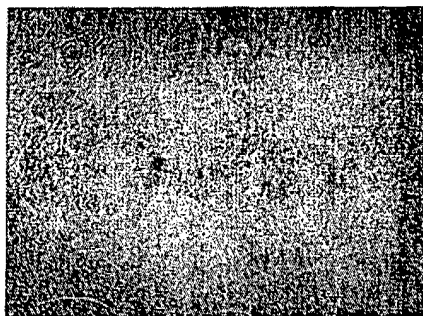
*Cicatriz significativamente diminuída comparada a feridas tratadas com placebo ($p < 0,05$)

Fig. 9. Imagens de Cicatriz Macroscópica Representativas (70 dias após ferida)

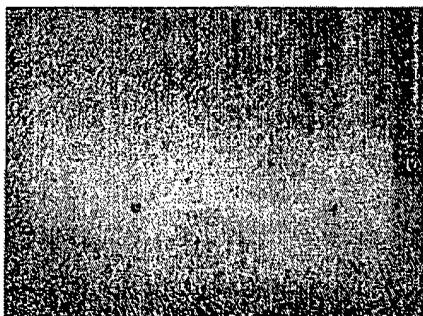
TGF-B 3 de "Tipo Selvagem"
(50ng/100 μ L)



TGF-Beta 3 de "Tipo Selvagem"
(100ng/100 μ L)



TGF-Beta 3 Gly63-Ala
(50ng/100 μ L)



TGF-Beta 3 Gly63-Ala
(100ng/100 μ L)

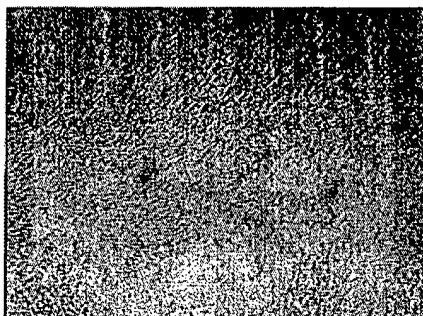
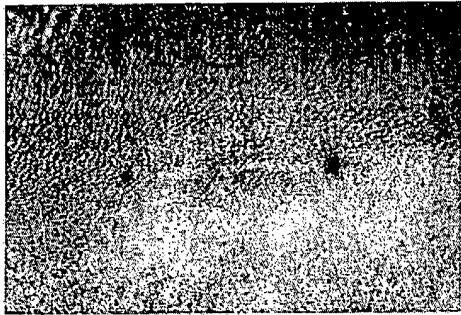
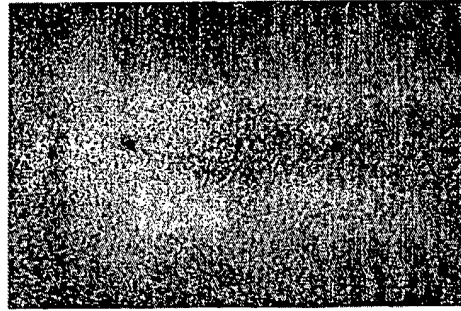


Fig. 9. Imagens de Cicatriz Macroscópica Representativas (70 dias após ferida)

**Gly63-Pro
(50ng/100 μ L)**



**Gly63-Pro
(100ng/100 μ L)**



**Placebo (0.25M
Maltose)**



Naïve

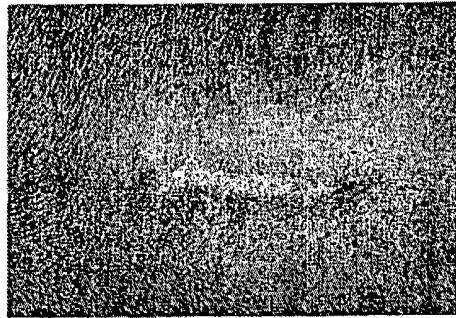
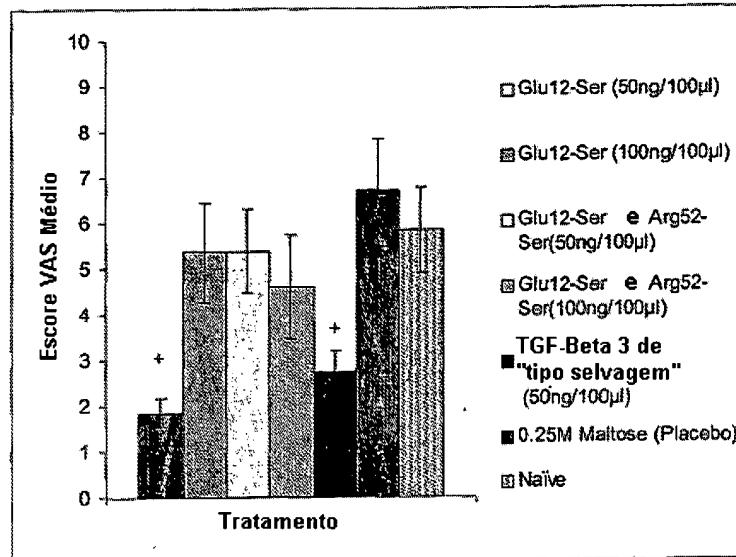


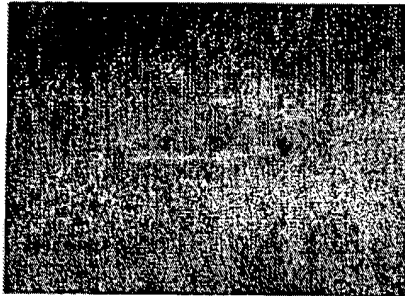
Fig. 10. Macroscore médio de feridas incisionais (A e B) tratadas com proteínas de TGF-Beta 3 mutantes e de "Tipo Selvagem" no dia 70



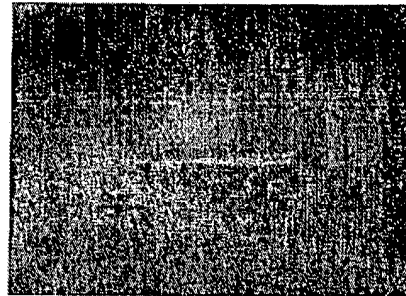
+ Cicatriz significativamente diminuída comparada a feridas tratadas com placebo

Fig. 11. Imagens de Cicatriz Macroscópica Representativas (70 dias após ferida)

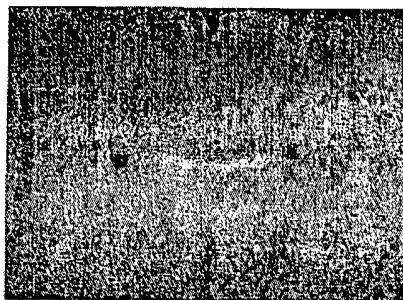
Glu12-Ser (50ng/100 μ L)



Glu12-Ser (100ng/100 μ L)



**Glu12-Ser & Arg52-Ser
(50ng/100 μ L)**



**Glu12-Ser & Arg52-Ser
(100ng/100 μ L)**

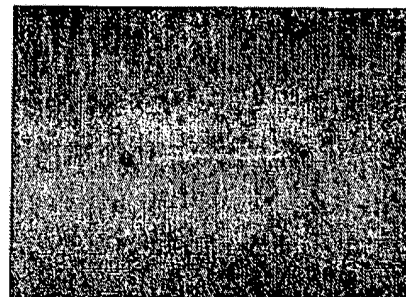
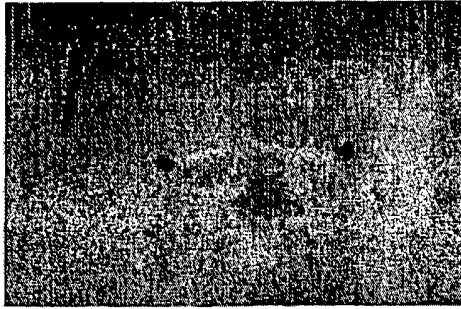
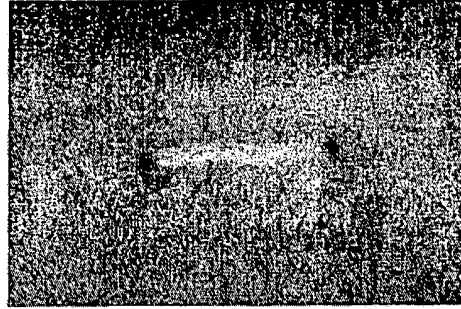


Fig. 11. Imagens de Cicatriz Macroscópica Representativas (70 dias após ferida)

TGF-Beta 3 de "tipo selvagem"
(50ng/100 μ L)



Controle de Placebo (0.25M Maltose)



Naïve (controle)

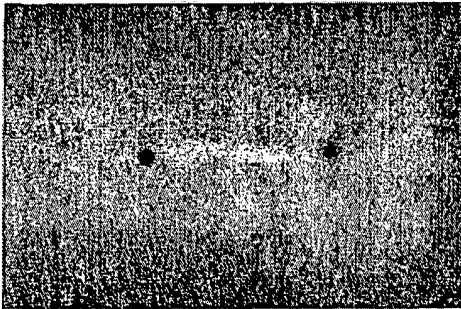


Fig. 12. Imagens de Cicatriz Microscópica Representativas de feridas tratadas com Proteínas Mutantes de Gly63-Pro e Gly63-Ala, e TGF-Beta 3 de "tipo selvagem" (70 dias após ferida)

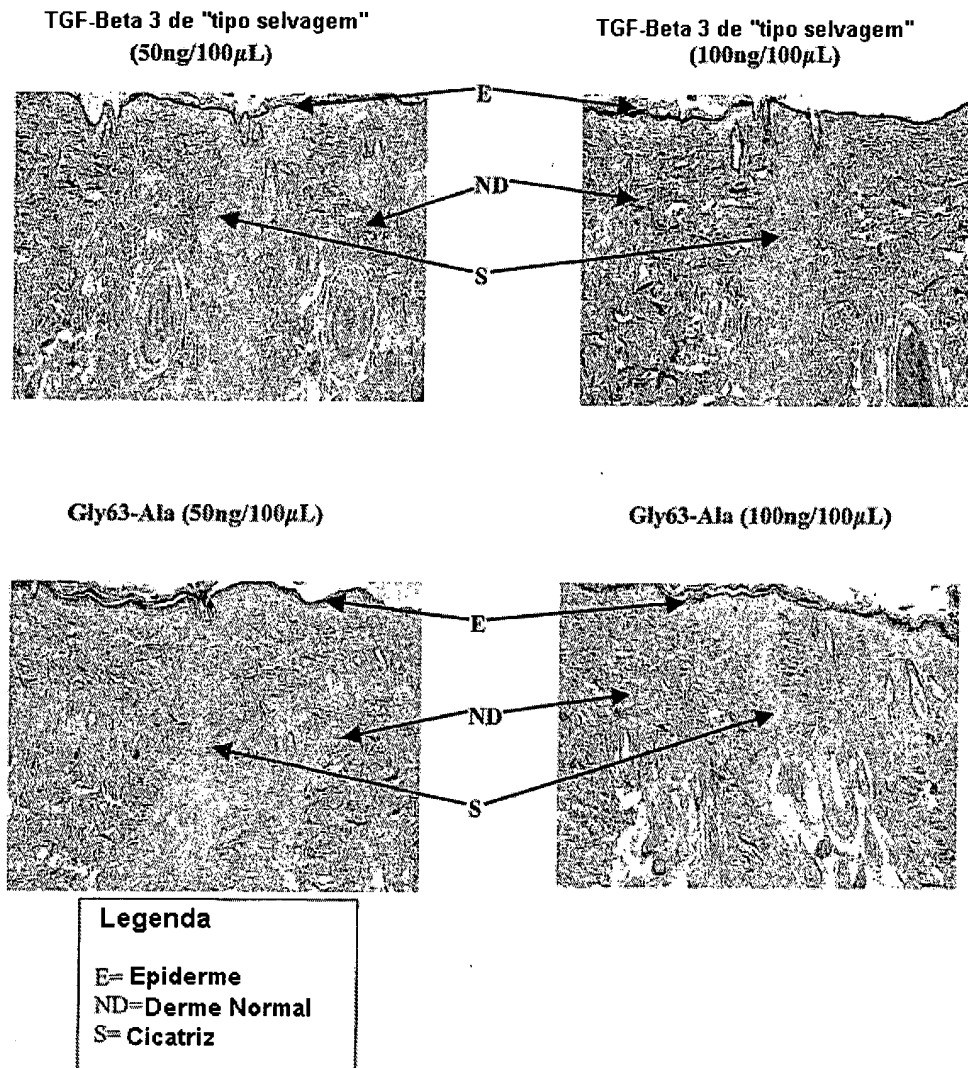


Fig. 12. Imagens de Cicatriz Microscópica Representativas de feridas tratadas com Proteínas Mutantes de Gly63-Pro e Gly63-Ala, e TGF-Beta 3 de "tipo selvagem" (70 dias após ferida)

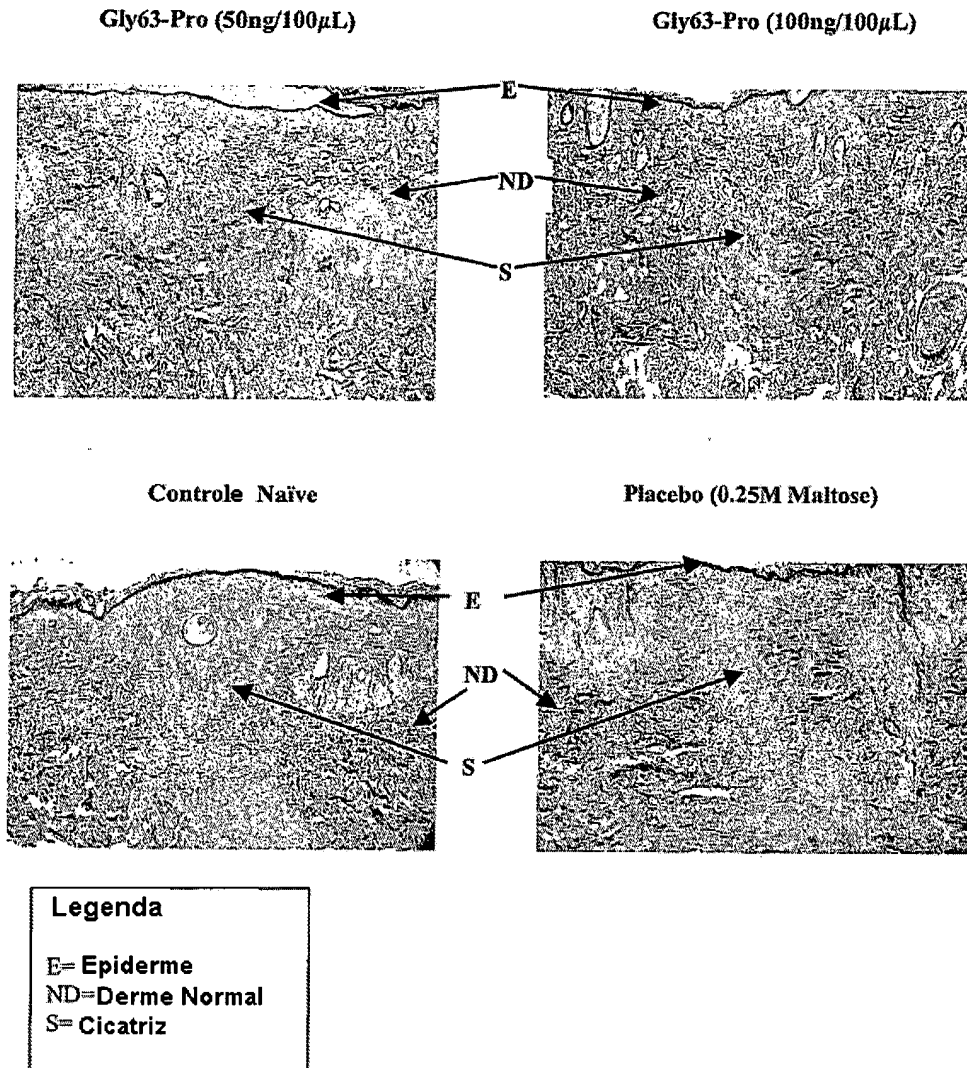


Fig. 13. Imagens de Cicatriz Microscópica Representativas de Feridas Tratadas com Glu-12-Ser e Serina Dupla mutante (Glu12-Ser e Arg 52-Ser) após 70 dias pós-ferida).

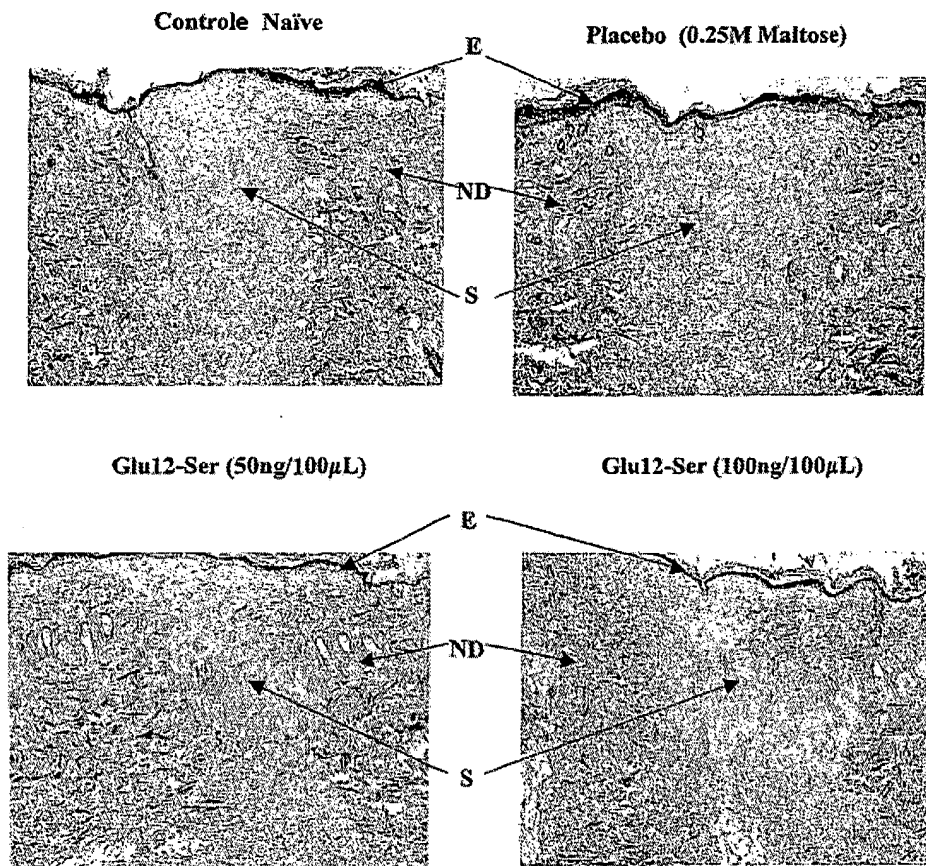
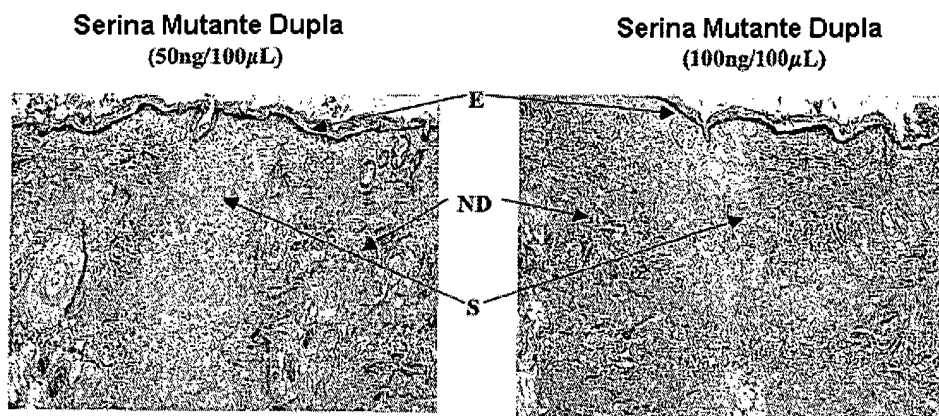


Fig. 13. Imagens de Cicatriz Microscópica Representativas de Feridas Tratadas com Glu-12-Ser e Serina Dupla mutante (Glu12-Ser e Arg 52-Ser) após 70 dias pós-ferida). Continuação



Legenda

E= Epiderme
ND=Derme Normal
S= Cicatriz

RESUMO

Patente de Invenção: "PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLEÍCOS E MEDICAMENTOS".

A presente invenção refere-se a TGF- β 3s, ou fragmentos ou derivados dos mesmos, em que domínio de formação alfa-hélice entre resíduos de aminoácidos (58) e (67) de TGF- β 3 de tipo selvagem comprimento total compreende pelo menos uma substituição alfa-hélice estabilizante. A invenção também provê TGF- β 3s, ou fragmentos ou derivados dos mesmos, em que resíduo de glicina na posição (63) de TGF- β 3 de tipo selvagem comprimento total é recolocado por Prolina. Ainda adicionalmente, a invenção provê TGF- β 3s, ou fragmentos ou derivados dos mesmos, compreendendo uma substituição do resíduo de ácido Glutâmico na posição (12) do TGF- β 3 de tipo selvagem comprimento total e/ou o resíduo de Arginina na posição (52) do TGF- β 3 de tipo selvagem comprimento total. A invenção também provê medicamentos e métodos de tratamento usando o TGF- β 3s.