



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

(21) **PI0613227-8 A2**

(22) Data de Depósito: 26/04/2006
(43) Data da Publicação: 04/01/2011
(RPI 2087)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 21/04

(54) Título: **UMA COMPOSIÇÃO PARA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDA E USO DESTA**

(30) Prioridade Unionista: 09/06/2005 US 11/149,378,
24/02/2006 US 11/361,560

(73) Titular(es): Chiang, Chuan-Chi, Su, Hui-Pin, Sui, Guey-Yueh.,
Wu, Hua-Lin

(72) Inventor(es): Chiang, Chuan-Chi, Su, Hui-Pin, Sui, Guey-
Yueh., Wu, Hua-Lin

(74) Procurador(es): CRUZEIRO NEWMARC
PATENTES E MARCAS LTDA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006015662 de 26/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/135493 de 21/12/2006

(57) Resumo: UMA COMPOSIÇÃO PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDA E USO DESTA A invenção se refere a um método para tratamento de cicatrização de ferida, compreendendo a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade efetiva de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo EGF de trombomodulina. A invenção também se refere a uma composição para uso na aceleração de cicatrização de ferida, compreendendo um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo EGF de trombomodulina.

"UMA COMPOSIÇÃO PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDA E USO DESTA".

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

5 A invenção se refere a um método e uma composição para uso na aceleração de cicatrização de ferida.

Angiogênese e Trombomodulina

Embora várias moléculas sejam conhecidas na técnica como agentes terapêuticos úteis para o tratamento de
10 doenças e distúrbios tendo como um sintoma destes coagulação anormal em vasos sangüíneos críticos, existe uma necessidade na técnica de composições e métodos que sejam úteis para o tratamento destas doenças, assim como para o tratamento de doenças e distúrbios que têm como sintomas atividade angiogênica
15 anormalmente elevada ou anormalmente baixa. Estas doenças e condições incluem as seguintes: doenças e condições cardiovasculares tais como hipotensão, hipertensão e aterosclerose; condições trombóticas tais como AVC, ataque cardíaco e sondas pós-angioplastia; distúrbios angiogênicos;
20 doenças e condições respiratórias tais como fibrose pulmonar e asma; doenças e distúrbios relacionados com invasão de célula de tumor, angiogênese e metástase; distúrbios de cicatrização de ferida e coagulação, e distúrbios reprodutivos tais como contração uterina prematura e impotência.

25 Na atualidade, uma série de biomoléculas, que induzem ou promovem angiogênese em tecidos, foi identificada. As mais proeminentes destas são: fatores de crescimento tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de

crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento epidérmico (EFG), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs) e fatores de crescimento de transformação (TGFs). A ausência da trombomodulina reguladora de coagulação sanguínea causa mortalidade embriônica em camundongos antes do desenvolvimento de um sistema cardiovascular funcional. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92:850-854; e J. P. Cooke et al, Circulation 105 (2002) 2133). As abordagens atuais direcionadas para promoção de angiogênese no campo relacionado podem ser resumidas em três categorias principais: (i) provisão de fatores de crescimento angiogênicos usando plataformas poliméricas sintéticas e naturais; (ii) provisão de plasmídeos contendo DNA que codifica proteínas angiogênicas; e (iii) provisão combinada de moléculas angiogênicas e transplante de células endoteliais.

De acordo com as técnicas relacionados, um outro relatório (Shi CS et al., Evidence of Human Thrombomodulin domain as a Novel Angiogenic Factor. Circulation. 5 de abril de 2005; 111(13):1627-36) propôs a carga de sistemas de aplicação com moléculas de trombomodulina recombinante humana ao invés de fatores de crescimento. É proposto que a trombomodulina recombinante humana carregada pode ser liberada sob condições fisiológicas, promovendo, desta maneira, angiogênese rápida e localizada.

Trombomodulina é uma glicoproteína de membrana de célula endotelial anticoagulante. Proteínas de trombomodulina recombinante, TMD2 (contendo seis estruturas tipo EGF) e TMD23 (contendo TMD2 e um domínio rico em serina-treonina), exibem atividade mitogênica.

O estudo anterior (Shi SC et al., Evidence of Human Thrombomodulin domain as a Novel Angiogenic Factor. Circulation. 5 de abril de 2005; 111(13):1627-36) revelou os efeitos angiogênicos novos do domínio recombinante usando modelos *in vitro* e *in vivo*. Foi mostrado que TMD23 possui atividade mais elevada do que TMD2 na estimulação de síntese de DNA em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) cultivadas. Adicionalmente, TMD23 estimulou a motilidade quimiotática e a formação de tubo tipo capilar em HUVECs, um efeito mediado através da fosforilação de cinase regulada por sinal extracelular $\frac{1}{2}$ e cinase de proteína ativada por mitógeno p38 e a via da síntese de fosfatidilinositol-3 cinase/Akt/óxido nítrico endotelial. TMD23 também estimulou a expressão de célula endotelial de ativadores de matriz metaloproteinases e plasminogênio, que mediarão proteólise extracelular conduzindo a invasão e migração de célula endotelial durante angiogênese. Além do mais, implantes contendo TMD23 em córnea de rato induziram o crescimento de novos vasos sanguíneos do limbo. Usando o ensaio de angiogênese de murino, TMD23 não apenas induziu neovascularização co-injetada com Matrigel e heparina, mas também aumentou a angiogênese em células A2058 de melanoma contendo Matrigel em camundongos nude. Concluindo, o TMD23 de domínio de trombomodulina recombinante aumentou a resposta angiogênica *in vitro* e *in vivo*.

Cicatrização de ferida

O processo de cicatrização de ferida tem 3 fases. Elas são: a fase inflamatória, a fase proliferativa, e a fase de maturação.

A fase inflamatória é caracterizada por

hemostasia e inflamação. Colágeno exposto durante a formação da lesão ativa a cascata de coagulação (tanto as vias intrínsecas como as extrínsecas), iniciando a fase inflamatória. Após ocorrência dos danos ao tecido, as membranas da célula, danificadas pela formação da lesão, liberam tromboxano A₂ e prostaglandina 2-alfa, vasoconstritores potentes. Esta resposta inicial ajuda a limitar hemorragia. Após um curto período, ocorre vasodilatação capilar secundária à liberação de histamina local, e as células de inflamação são capazes de migrar para o leito da ferida.

Plaquetas, a primeira célula de resposta, libera múltiplas quimiocinas, incluindo fator de crescimento epidérmico (EGF), fibronectina, fibrinogênio, histamina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), serotonina, e fator von Willebrand. Estes fatores ajudam a estabilizar a ferida através da formação de coágulo. Estes mediadores agem para controlar sangramento e limitar a extensão do ferimento. A desgranulação de plaqueta também ativa a cascata de complemento, especificamente C5a, que é um quimioatrativo potente para neutrófilos.

A fase inflamatória continua, e mais células de resposta imunológica migram para a ferida. A segunda célula de resposta a migrar para a ferida, o neutrófilo, é responsável pela limpeza de fragmentos de tecido, opsonização mediada por complemento de bactérias, e destruição de bactérias via mecanismos de erupção oxidativa (isto é, formação de superóxido e peróxido de hidrogênio). Os neutrófilos matam bactérias e descontaminam a ferida de restos estranhos.

As próximas células presentes na ferida são os

leucócitos e os macrófagos (monócitos). O macrófago, referido aqui como o harmonizador, é essencial para cicatrização de ferida. Numerosas enzimas e citocinas são secretadas pelo macrófago. Estas incluem collagenases, que retiram os restos da ferida; interleucinas e fator de necrose de tumor (TNF), que estimulam fibroblastos (produzem colágeno) e promovem angiogênese; e fator de crescimento de transformação (TGF), que estimula ceratinócitos. Esta etapa marca a transição para o processo de reconstrução de tecido, isto é, a fase proliferativa.

O segundo estágio de cicatrização de ferida é a fase proliferativa. Epitelialização, angiogênese, formação de tecido de granulação, e deposição de colágeno são as etapas principais nesta porção anabólica de cicatrização de ferida. Epitelialização ocorre prematuramente no reparo da lesão. Se a membrana de base permanece intacta, as células epiteliais migram para cima no padrão normal. Isto é equivalente a uma queimadura de pele de primeiro grau. As células progenitoras epiteliais permanecem intactas embaixo da ferida, e as camadas normais de epiderme são recuperadas em 2-3 dias. Se a membrana de base foi destruída, similar a uma queimadura de segundo ou terceiro grau, então a ferida é re-epitelializada a partir de células normais na periferia e de apêndices de pele, se intactas (por exemplo, folículos de cabelo, glândulas de suor).

Angiogênese, estimulada por TNF-alfa, é marcada por migração de célula endotelial e formação de capilar. Os novos capilares provêm nutrientes para a ferida e ajudam a manter o leito de tecido de granulação. A migração de capilares no leito da ferida é crítico para cicatrização apropriada da ferida. A fase de

granulação e deposição de tecido requer nutrientes supridos pelos capilares, e a falha na ocorrência disto resulta em uma ferida cronicamente não cicatrizada. Mecanismos para modificar a angiogênese estão sob estudo e têm potencial significativo para
5 melhorar o processo de cicatrização.

A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Fibroblastos diferenciam e produzem substância de fundo e, então, colágeno. A substância de fundo é depositada no leito da ferida; colágeno é, então, depositado
10 conforme a ferida passa pela fase final de reparo. Muitas citocinas diferentes estão envolvidas na fase proliferativa de reparo de ferida. As etapas e o mecanismo exato de controle não foram elucidados. Algumas das citocinas incluem PDGF, fator de crescimento tipo insulina (IGF), e EGF. Todos estes são
15 necessários para a formação de colágeno.

A fase final de cicatrização de ferida é a fase de maturação. A ferida sofre contração, resultando, em última instância, em uma quantidade menor de tecido de cicatriz aparente. O processo inteiro é uma massa contínua dinâmica com uma
20 sobreposição de cada fase e remodelação contínua. A ferida atinge sua resistência máxima em um ano, com uma resistência à tração que é 30% da pele normal. A deposição de colágeno continua por um período prolongado, mas a rede aumenta em platôs de deposição de colágeno após 21 dias.

25 Atualmente, citocinas possuem um papel limitado na prática clínica. O único produto comercial atualmente disponível que provou ser eficaz em estudos duplo-cegos, randomizados, é PDGF, disponível como PDGF-BB humano recombinante.

Em estudos múltiplos, PDGF-BB humano recombinante demonstrou reduzir o tempo de cicatrização e melhorar a incidência de cicatrização completa da ferida em úlceras de estágio III e IV. Muitas outras citocinas atualmente sob estudo *in vitro* incluem

5 TGF-beta, EGF, e IGF-1.

Cicatrização apropriada de ferida envolve uma interação complexa de células e citocinas trabalhando em conjunto. Nos últimos anos, mais mediadores químicos integrais a este processo foram identificados. As etapas sequenciais e processos

10 específicos não foram totalmente diferenciados. Ao examinar o processo de cicatrização de feridas, é necessário identificar as etapas principais e conhecer os mediadores importantes.

Queimadura e Cicatrização de Ferida

Queimadura é um ferimento resultante de exposição

15 ao calor, eletricidade, radiação (por exemplo, queimadura do sol e cirurgia a laser), ou produtos químicos cáusticos.

Três graus de queimaduras são comumente reconhecidos. Em queimaduras de primeiro grau, a camada externa da pele, denominada epiderme, se torna vermelha, sensível ao toque, e

20 frequentemente inchada. Atenção médica não é necessária, mas a aplicação de um ungüento pode aliviar a dor. Queimaduras de segundo grau são caracterizadas pela destruição variável da epiderme e pela formação de bolhas; terminações nervosas podem ser expostas. Os casos mais sérios devem ser observados por um médico

25 e deve se tomar cuidado para evitar infecção. Terapia local inclui a aplicação de um produto químico tal como nitrato de prata para produzir uma crosta macia, reduzir a ameaça de infecção, e aliviar a dor. Queimaduras de terceiro grau envolvem a destruição da

espessura total da pele e do tecido conectivo subjacente. Nos casos mais graves, ossos subjacentes são também parcialmente queimados. A área superficial envolvida é mais significativa que a profundidade da queimadura. O choque deve ser evitado ou contra-
5 atacado; transfusão sangüínea pode ser exigida para repor fluidos corporais perdidos. A invasão de várias bactérias deve ser evitada ou curada pela administração de antibióticos e outros medicamentos. Morfina pode ser empregada para aliviar a dor. Tratamento de longa duração pode incluir transplante de enxertos
10 de pele natural ou artificial.

Diabetes Mellitus e Cicatrização de Ferida

O diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por altos níveis de açúcar no sangue (glicose), que resultam de defeitos na secreção de insulina, ou
15 ação de insulina, ou ambos. Diabetes mellitus, comumente referida como diabetes, significa "urina doce". Níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia) conduzem a derramamento de glicose na urina, e assim o termo urina doce. Normalmente, níveis de glicose no sangue são estritamente controlados pela insulina, um hormônio
20 produzido pelo pâncreas. A insulina diminui o nível de glicose no sangue. Quando a glicose no sangue se eleva (por exemplo, após a ingestão de alimento), a insulina é liberada do pâncreas para normalizar o nível de glicose. Em pacientes com diabetes mellitus, a ausência ou produção insuficiente de insulina causa
25 hiperglicemia. Diabetes mellitus é uma condição médica crônica, significando que pode se estender pela vida toda.

O diabetes pode conduzir a várias complicações, incluindo doenças cardíacas e vasculares, cegueira, insuficiência

renal e úlceras nos pés.

Pessoas com diabetes se encontram sob risco de ferimentos nos pés devido à dormência causada por danos aos nervos (neuropatia diabética) e baixo fluxo sanguíneo para as pernas e 5 pés. O ferimento mais grave é uma úlcera no pé. Úlceras diabéticas no pé apresentam um alto risco de se tornarem infectadas, e algumas vezes elas não podem ser curadas. Úlceras nos pés não curáveis são uma causa freqüente de amputação em pessoas com diabetes.

10 A FDA liberou um produto de gel (becaplermina, ou Regranex Gel) que é usado como um tratamento para úlceras diabéticas no pé. Este produto contém fator de crescimento derivado de plaqueta geneticamente modificado, uma das proteínas que o corpo produz para encorajar o crescimento de tecido novo. 15 Estudos clínicos do produto indicaram que a probabilidade de fechamento completo da úlcera, após até 20 semanas de tratamento, foi maior quando becaplermina foi usada.

Um outro produto que ajuda no fechamento de feridas de úlceras de cicatrização lenta em pacientes com diabetes 20 é um substituto de pele denominado DERMAGRAFT®. Este é composto por células humanas conhecidas como fibroblastos que são colocados em um material de malha dissolúvel. Quando o material de malha é colocado na úlcera, ele gradualmente é absorvido e as células humanas crescem e substituem o tecido danificado na úlcera.

25 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção se refere a um método para tratamento de cicatrização de ferida, compreendendo a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade

efetiva de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo EGF de trombomodulina. A invenção também se refere a uma composição a ser usada na aceleração da cicatrização de ferida, compreendendo um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo EGF de trombomodulina.

Outros objetivos e características da presente invenção se tornarão aparentes a partir da descrição detalhada a seguir considerada em conjunto com os desenhos em anexo. Deve ser entendido, entretanto, que os desenhos são designados unicamente para fins ilustrativos e não como uma definição dos limites da invenção, para os quais deve se fazer referência às reivindicações em anexo. Deve ser entendido, ainda, que os desenhos não são necessariamente feitos em escala e que, a menos que indicado o contrário, eles objetivam meramente ilustrar conceitualmente as estruturas e procedimentos descritos aqui.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Nos desenhos:

A Figura 1 mostra o efeito de TMD23 em migração de célula epitelial HaCaT.

A Figura 2 é um período de tempo para o fechamento de ferida em camundongos CD-1 tratados com DMap ou CGS-21680 (na forma de solução) por aplicação tópica. Substância de teste e veículo foram, cada um, administrados topicamente uma vez ao dia durante 10 dias consecutivos. CGS-21680 (10µg/camundongo) como um controle positivo foi administrado topicamente no mesmo período de tempo. O fechamento da ferida (%) e o tempo de

fechamento de metade da ferida (CT50) foram determinados e ANOVA de uma via, seguido por teste de Dunnett, foi aplicada para comparação entre os grupos tratados e seus grupos de veículo correspondentes nos dias 3, 5, 7, 9 e 11.

5 A Figura 3 é um período de tempo de fechamento da ferida em camundongos CD-1 tratados com DMAc ou Regranex (na forma de gel) por aplicação tópica. Substâncias de teste foram, cada uma, administradas topicamente uma vez ao dia durante 10 dias consecutivos. O fechamento da ferida (%) e o tempo de fechamento de metade da ferida (CT50) foram determinados e ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, foram aplicados para comparação entre os grupos tratados e seus veículos correspondentes nos dias 3, 5, 7, 9 e 11.

15 A Figura 4 é um período de tempo de fechamento de ferida em camundongos diabéticos (*Lepr db*) tratados com DMAP ou CGS-21680 (na forma de solução) por aplicação tópica. Substância de teste e veículo foram, cada um, administrados topicamente uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos. CGS-21680 (10µg/camundongo) como um controle positivo foi administrado topicamente no mesmo período. O fechamento da ferida (%) e o tempo de fechamento de metade da ferida (CT50) foram determinados e ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, foram aplicados para comparação entre os grupos tratados e seus veículos correspondentes nos dias 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15.

25 A Figura 5 é um período de tempo de fechamento da ferida em camundongos diabéticos (*Lepr db*) tratados com DMAc ou Regranex (na forma de gel) por aplicação tópica. Substâncias de teste foram, cada um, administradas topicamente uma vez ao dia

durante 14 dias consecutivos. O fechamento da ferida (%) e o tempo de fechamento de metade da ferida (CT50) foram determinados e ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Dunnett, foram aplicados para comparação entre os grupos tratados e seus veículos correspondentes nos dias 3, 5, 7, 8, 11, 13 e 15.

A Figura 6 mostra que TMD23 reduz a taxa de evaporação da abertura da ferida.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Trombomodulina é uma glicoproteína anticoagulante, de membrana de célula endotelial. Um domínio de trombomodulina recombinante contendo seis estruturas tipo fator de crescimento epidérmico e domínio rico em serina-treonina exibe atividade mitogênica.

No relatório anterior (pedido Nº: US 11/149.378) foi demonstrado que TMD23 poderia induzir migração e proliferação de célula endotelial (HUVEC).

Na presente invenção, foi revelado que TMD23 poderia, efetivamente, aumentar a migração de ceratinócitos (HaCaT), o tipo de célula principal na epiderme e o anticorpo contra TMD23 poderiam, especificamente, inibir migração de ceratinócito. Portanto, foi demonstrado pela primeira vez que TMD23 poderia aumentar o processo de cicatrização de ferida pela estimulação de migração de ceratinócito.

Além do mais, os experimentos com animais mostraram que TMD23 poderia aumentar a migração e extensão da epiderme na área da ferida, portanto acelerando o fechamento da ferida. Por outro lado, a taxa de evaporação de água a partir da abertura da ferida foi efetivamente reduzida também.

Concluindo, TM pode, efetivamente, aumentar a taxa de cicatrização de feridas.

A presente invenção se refere a um método para tratamento de cicatrização de ferida, compreendendo a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade efetiva de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo EGF de trombomodulina. Na configuração preferida, o polipeptídeo compreende adicionalmente um polipeptídeo ligado operacionalmente, compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa de domínio rico em serina-treonina de trombomodulina.

O método da invenção pode ser aplicado para acelerar cicatrização de feridas, onde a ferida é selecionada do grupo consistindo de incisões, lacerações, abrasões, feridas de perfuração, bolhas, rasgos na pele, locais de doação ou enxerto, acnes, contusões, hematoma, lesões por esmagamento e ferimentos causados por abrasão dérmica ou remoção a laser.

O método da invenção pode ser usado em pacientes com diabetes mellitus. Em uma configuração preferida, o paciente sofre de úlceras de diabetes.

O método da invenção pode, também, ser aplicado quando a ferida é uma queimadura resultante de fogo, calor, radiação, eletricidade ou cirurgia dermatológica.

O método pode ser aplicado à cirurgia reconstrutora.

Em uma configuração preferida, o método é aplicado a um produto para aplicação à pele selecionado do grupo

consistindo de formulação de gel, creme, pasta, loção, pulverização, suspensão, solução, pomada de dispersão, hidrogel e unguento. Em uma configuração mais preferida, o produto de aplicação na pele é administrado ao paciente em necessidade deste
5 tratamento por aplicação à pele, por injeção ou eletroporação.

A presente invenção também se refere a um método para tratamento de cicatrização de ferida, compreendendo a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade efetiva de plasmídeo consistindo de DNA codificando
10 um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo EGF de trombomodulina. Em uma configuração preferida, a administração é feita por meios de vacina de plasmídeo. Em uma configuração mais preferida, a administração é feita por via intravenosa (iv),
15 subcutânea (sc), intraperitoneal (ip), ou intramuscular (im).

A presente invenção se refere ainda a uma composição para uso na aceleração de cicatrização de ferida, compreendendo um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo
20 EGF de trombomodulina. Na configuração preferida, o polipeptídeo compreende ainda um polipeptídeo operacionalmente ligado compreendendo uma seqüência de aminoácido ou uma variante conservativa de domínio rico em serina-treonina de trombomodulina.

A composição da invenção pode ser aplicada na
25 aceleração de cicatrização de ferida, onde a ferida é selecionada do grupo consistindo de incisões, lacerações, abrasões, feridas de perfuração, bolhas, rasgos da pele, locais de doador ou enxerto, acnes, contusões, hematoma, lesões por esmagamento e ferimentos

causados por abrasão dérmica ou remoção a laser.

A composição da invenção pode ser usada em pacientes com diabetes mellitus. Em uma configuração preferida, o paciente sofre de úlceras diabéticas.

5 A composição da invenção pode também ser aplicada quando a ferida é uma queimadura resultante de fogo, calor, radiação, eletricidade ou cirurgia dermatológica.

Em uma configuração preferida, a composição pode ser aplicada à cirurgia reconstrutora.

10 Em uma configuração preferida, o método é aplicado a um produto para aplicação à pele selecionado do grupo consistindo de formulação de gel, creme, pasta, loção, pulverização, suspensão, solução, pomada de dispersão, hidrogel e ungüento. Em uma configuração mais preferida, o produto para
15 aplicação à pele é administrado ao paciente em necessidade deste tratamento por aplicação na pele, injeção ou eletroporação.

DEFINIÇÃO DE TERMOS

As definições a seguir são oferecidas para fins ilustrativos e não limitativos, de modo a auxiliar na compreensão
20 da discussão que se segue.

De acordo com a presente invenção, podem ser empregadas biologia molecular, microbiologia, e técnicas de DNA recombinante convencionais do conhecimento de pessoas especializadas na técnica. Estas técnicas são explicadas em sua
25 totalidade na literatura.

"Feridas" podem ser caracterizadas como feridas abertas e feridas fechadas. Feridas abertas podem ser classificadas em uma série de tipos diferentes, incluindo incisões

(causadas por um objeto limpo, de borda afiada tal como uma faca ou uma lâmina), lacerações (feridas grosseiras, irregulares causadas por forças de esmagamento ou dilaceração), abrasões ou escoriações (uma ferida superficial na qual as camadas superficiais da pele são raspadas, frequentemente causadas por uma queda com deslizamento sobre uma superfície áspera), e ferimentos de perfuração (causadas por um objeto que perfura a pele, tal como um prego ou uma agulha). Feridas fechadas possuem bem menos categorias, mas são tão perigosas como feridas abertas. Estas são contusões ou pancadas (causadas por trauma de força obtusa que danificam tecidos sob a pele), hematoma (causado por danos a um vaso sangüíneo, que por sua vez faz que sangue se acumule sob a pele) e ferimentos por esmagamento (causados por uma quantidade grande ou extrema de força aplicada durante um período de tempo longo).

O processo de "cicatrização da ferida" possui 3 fases. Elas são: a fase inflamatória, a fase proliferativa, e a fase de maturação.

A fase inflamatória é caracterizada por hemostasia e inflamação. Colágeno exposto durante a formação da ferida ativa a cascata de coagulação (tanto as vias intrínsecas como as extrínsecas), iniciando a fase inflamatória. Após ocorrer ferimento do tecido, as membranas de célula, danificadas pela formação da ferida, liberam tromboxano A₂ e prostaglandina 2-alfa, vasoconstritores potentes. Esta resposta inicial ajuda a limitar hemorragia. Após um período curto, vasodilatação capilar ocorre em seqüência à liberação local de histamina, e as células de inflamação são capazes de migrar para o leito da ferida. A fase

inflamatória continua, e mais células de resposta imunológica migram para a ferida. A segunda célula de resposta a migrar para a ferida, o neutrófilo, é responsável pela limpeza de restos, opsonização mediada por complemento de bactérias, e destruição de bactérias via mecanismos de queima oxidativa (isto é, formação de superóxido e peróxido de hidrogênio). Os neutrófilos matam bactérias e descontaminam a ferida de restos estranhos.

O segundo estágio de cicatrização da ferida é a fase proliferativa. Epitelialização, angiogênese, formação de tecido de granulação, e deposição de colágeno são as etapas principais nesta porção anabólica de cicatrização de ferida. A epitelialização ocorre cedo no reparo da ferida. Se a membrana de base permanecer intacta, as células epiteliais migram para cima no padrão normal. Isto é equivalente a uma queimadura de primeiro grau. As células progenitoras epiteliais permanecem intactas abaixo da ferida, e as camadas normais de epiderme são recuperadas em 2-3 dias. Se a membrana de base foi destruída, similar a uma queimadura de segundo ou terceiro grau, então a ferida é re-epitelializada a partir de células normais na periferia e a partir de apêndices de pele, se intactos (por exemplo, folículos de cabelo, glândulas sudoríferas). A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Fibroblastos diferenciam e produzem substância de fundo e então colágeno. A substância de fundo é depositada no leito da ferida; colágeno é, então, depositado conforme a ferida passa pela fase final de reparo. Muitas citocinas diferentes estão envolvidas na fase proliferativa de reparo de ferida. As etapas e o mecanismo exato de controle não foram elucidados. Algumas das citocinas incluem

PDGF, fator de crescimento tipo insulina (IGF), e EGF. Todas são necessárias para a formação de colágeno.

A fase final de cicatrização de ferida é a fase de maturação. A ferida sofre contração, resultando em última
5 instância em uma quantidade menor de tecido de cicatriz aparente. O processo inteiro é um processo contínuo dinâmico com uma sobreposição de cada fase e remodelação contínua. A ferida atinge a resistência máxima dentro de um ano, com uma resistência à tração que é 30% da pele normal. A deposição de colágeno continua
10 durante um período prolongado, mas a rede aumenta nos platôs de deposição de colágeno após 21 dias.

"Angiogênese" é geralmente considerada como sendo amplamente regulada por fatores de crescimento e outros ligantes. A angiogênese, e o desenvolvimento e regeneração simultâneos de
15 tecido, dependem dos processos estritamente controlados de proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de célula endotelial. Ambos os ligantes estimuladores e inibidores parecem interagir, diretamente ou indiretamente, com receptores celulares durante estes processos. A angiogênese começa com a erosão da
20 membrana de base por enzimas liberadas por células endoteliais e leucócitos. As células endoteliais, que alinham o lúmen de vasos sangüíneos, então se projetam através da membrana de base. Estimuladores angiogênicos induzem células endoteliais a migrarem através da membrana de base erodida. As células migrantes formam,
25 então, um "broto" a partir do vaso sangüíneo mãe, onde as células endoteliais sofrem mitose e proliferam. Os brotos endoteliais se combinam entre si para formar alças capilares, criando o novo vaso sangüíneo.

Conforme aqui utilizado , o termo "queimadura" é o ferimento resultante de exposição ao calor, eletricidade, radiação (por exemplo, queimadura de sol e cirurgia a laser), ou produtos químicos cáusticos.

5 "Diabetes mellitus" é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por altos níveis de açúcar no sangue (glicose), que resultam de defeitos na secreção ou ação de insulina,, ou de ambos. Diabetes mellitus, comumente referida como diabetes, significa "urina doce". Níveis elevados de glicose no
10 sangue (hiperglicemia) conduzem a derramamento de glicose na urina, assim o termo urina doce. Normalmente, níveis de glicose no sangue são rigorosamente controlados pela insulina, um hormônio produzido pelo pâncreas. A insulina diminui o nível de glicose no sangue. Quando a glicose no sangue se eleva (por exemplo, após
15 ingestão de alimento), a insulina é liberada do pâncreas para normalizar o nível de glicose. Em pacientes com diabetes mellitus, a ausência ou produção insuficiente de insulina causa hiperglicemia. Diabetes mellitus é uma condição médica crônica, significando que ela pode se estender por toda a vida.

20 Diabetes pode, algumas vezes, conduzir a neuropatia periférica que, especificamente quando combinada com vasos sangüíneos danificados, pode conduzir a úlceras nos pés, e possivelmente progredindo para necrose, infecção e gangrena, algumas vezes exigindo a amputação do membro.

25 Um "ácido nucléico" ou "seqüência de nucleotídeo" se refere à forma polimérica de éster de fosfato de ribonucleosídeos (adenosina, guanosina, uridina ou citidina; "moléculas de RNA") ou desoxirribonucleosídeos (desoxiadenosina,

desoxiguanosina, desoxitimidina, ou desoxicitidina; "moléculas de DNA") tanto na forma de fita única como em uma hélice de fita dupla. Hélices de DNA-DNA, DNA-RNA e RNA-RNA de fita dupla são possíveis. O termo ácido nucléico, e em especial, moléculas de DNA ou RNA, se refere apenas às estruturas primária e secundária da molécula, e não limita esta a quaisquer formas terciárias ou quaternárias específicas. Dessa maneira, este termo inclui DNA de fita dupla encontrado, entre outros, em moléculas de DNA lineares ou circulares (por exemplo, fragmentos de restrição), plasmídeos, e cromossomos. Na discussão da estrutura de moléculas de DNA de fita dupla específicas, seqüências podem ser descrita aqui de acordo com a convenção normal de prover apenas a seqüência na direção 5' para 3'' ao longo da fita não transcrita de DNA (isto é, a fita tendo uma seqüência homóloga à mRNA). Um "DNA recombinante" é uma molécula de DNA que sofreu uma manipulação biológica molecular.

"Ligado operacionalmente", quando se referindo a segmentos de DNA, indica que os segmentos são arranjados de modo que eles funcionam em conjunto, por exemplo, o processo de transcrição ocorre por meio de ligação de polimerase de RNA ao segmento promotor e prosseguindo com a transcrição através do segmento de codificação até a polimerase parar quando ela encontra um segmento de término de transcrição.

Conforme aqui utilizado, o termo "fragmento de ácido nucléico" objetiva indicar qualquer molécula de ácido nucléico de cDNA, DNA genômico, DNA sintético ou origem de RNA. O termo "fragmento" visa indicar um segmento de ácido nucléico que pode ser de fita única ou dupla, e que pode ser baseado em uma

seqüência de nucleotídeo de ocorrência natural completa ou parcial codificando um polipeptídeo de interesse. O fragmento pode, opcionalmente, conter outros segmentos de ácido nucléico.

O fragmento de ácido nucléico da invenção
5 codificando o polipeptídeo da invenção pode, adequadamente, ser de origem genômica ou cDNA, por exemplo obtido pela preparação de uma biblioteca genômica ou cDNA e exploração de seqüências de DNA codificando todo ou parte do polipeptídeo por hibridização usando sondas de oligonucleotídeos sintéticas de acordo com técnicas
10 padrão.

Os polipeptídeos podem ser detectados usando métodos conhecidos na técnica que são específicos para os polipeptídeos. Estes métodos de detecção podem incluir o uso de anticorpos, formação de um produto de enzima, ou desaparecimento
15 de um substrato de enzima. Por exemplo, uma análise de enzima pode ser usada para determinar a atividade do polipeptídeo.

Os polipeptídeos da presente invenção podem ser purificados por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica, incluindo, entre outros, a cromatografia (por exemplo,
20 troca iônica, afinidade, hidrofóbica, cromatofocalização, e exclusão por tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, foco isoelétrico preparativo (IEF)), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação de sulfato de amônio), ou extração.

Conforme aqui utilizado, o termo "vacinas de
25 plasmídeo" é definido como preparações purificadas de DNA de plasmídeo designadas de forma a conterem um gene ou genes para o antígeno da vacina pretendida, assim como genes incorporados no construto para permitir a produção em um sistema hospedeiro

adequado.

EXEMPLOS

Os exemplos abaixo são não limitativos e são meramente representativos de vários aspectos e características da presente invenção.

Exemplo 1: Efeito de TMD23 na migração de célula epitelial HaCaT

O efeito de TMD23 na migração de células HaCaT foi avaliado usando a câmara de Boyden com filtros de polycarbonato de 6,5 mm de diâmetro (8- μ m de tamanho de poro). A superfície inferior do filtro foi revestida com colágeno tipo IV. TMD23 (100 ng/ml) ou TMD23 (100 ng/ml) mais anticorpo anti-TM (1 μ g/ml) foi adicionado no DMEM nos poços inferiores. A suspensão de célula (50 μ L) contendo 1×10^4 células foi carregada em cada poço superior. O número das células que migraram através da membrana em oito horas foi contado sob microscópio após serem fixadas com metanol e manchadas com GIEMSA a 10%. Conforme mostrado na Figura 1, TMD23 induziu de forma expressiva a migração quimiotática em células HaCaT.

Exemplo 2: Materiais

DMAp foi 100 μ g da proteína purificada TMD23 recombinante (SEQ ID Nº 1) em 20 μ l de solução CMC/PBS a 0,5%. O CMC (carboximetilcelulose) / PBS (Solução salina de fosfato tamponada) a um pH de 7,4 foi usado como o veículo na forma de solução para DMAp e CGS-21680. Cloridrato de (2-p-[2-carboxietil]fenetilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina) CGS-21680 era um ativador de proteína G e foi adquirido da sigma-Aldrich.

Gel DMAc era 100 µg da proteína purificada TMD23 recombinante (SEQ ID Nº 1) em 20 mg de gel base. O gel base foi usado como um controle negativo de gel DMAc e gel Regranex. O gel base era composto de carboximetilcelulose de sódio, cloreto de sódio, triidrato de acetato de sódio, ácido acético glacial, metilparaben, propil paraben, cloridrato de m_Cresol 1-lisina, álcool benzílico, metilcloroisotiazolina, metilisotiazolinina, copolímero de acriloidimetiltaurato de amônio/VP e água para injeção. Gel Regranex foi adquirido da Johnson & Johnson.

Para os produtos químicos usados nos exemplos, solução de formalina neutra tamponada a 10% (Shiyak Kogyo, Japão), carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich, EUA), cloridrato de GCS-21680 (Tocris, EUA), hexobarbital (Sigma-Aldrich, EUA), solução salina tamponada de fosfato (PBS pH 7,4, Sigma-Aldrich, EUA) e cloreto de sódio (Wako, Japão) foram usados.

Quanto aos equipamentos usados nos exemplos, gaiola para animal (Allentown, EUA), Image - ProPlus (Media Cybernetics, Versão 4.5.29), pipeta (Gilson, Alemanha) e perfurador afiado, diâmetro interno de 12 mm (Sinter, R. O. C.) foram usados.

Exemplo 3: Animais

Camundongos derivados de CD-1 machos (Cr1.) pesando 24 ± 2 g foram providos pela BioLasco Taiwan (sob Licença do Charles River Laboratories Technology). A alocação de espaço para 10 animais era de 29 x 18 x 13 cm. Todos os animais foram mantidos em um ambiente de temperatura (22° a 24°C) e umidade (50% - 60%) controladas com ciclos de luz/escuridão de 12 horas por pelo menos uma semana no MDS Pharma Services - Taiwan Laboratory

antes do uso. Acesso livre a ração de laboratório padrão para camundongos [MF-18 (Oriental Yeast Co., Ltd., Japão)] e água RO foi provido. Todos os aspectos deste trabalho incluindo alojamento, experimentação e descarte dos animais foram executados de acordo com o Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (National Academy Press, Washington, D. C., 1996).

Camundongos machos (NIDDM) com diabetes mellitus não dependentes de insulina (C57BLKS/J-m+/+*Lepr db*), pesando 50 ± 5 g (9 semanas de idade), providos pelo Instituto para Reprodução Animal (IAR, Japão), foram usados. Estes animais exibem hiperinsulinemia, hiperglicemia e atrofia de ilhota. Os animais foram alojados em prateleiras com Gaiolas Ventiladas Individualmente (IVC Racks, 36 sistemas Mini Isoladores) sob condição Livre de Patógeno Específico (SPF) durante todo o experimento. Cada gaiola APEC (em cm, 26,7 de comprimento x 20,7 de largura x 14,0 de altura) foi esterilizada por autoclave e continham 7 camundongos, e os animais foram, então, mantidos em um ambiente higiênico sob temperatura (22° a 24°C) e umidade (50%-60%) controladas com ciclos de luz/escuridão de 12 horas. Foi permitido aos animais acesso livre à ração de laboratório esterilizada e água destilada esterilizada *adlibitum*. Todos os aspectos deste trabalho, isto é, alojamento, experimentação e descarte de animais, são executados de acordo com o Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (National Academy Press, Washington, D. C., 1996).

Exemplo 4: TMD23 acelera o fechamento de ferida em camundongos

Grupos de 5 camundongos machos derivados de CD-1

(Crl.), cada um pesando 24 ± 2 g foram usados. Durante o período de teste, os animais foram usados sozinhos em gaiolas individuais. Sob anestesia com hexobarbital (90 mg/kg, IP), o ombro e a região das costas de cada animal tiveram a pelagem raspada. Uma punção afiada (DI de 12 mm) foi aplicada para remover a pele incluindo *panniculus carnosus* e tecidos aderentes. DMAc, Regranex e gel de BAs e a 20 mg/camundongo e DMAp a 100 µg/camundongo, assim como o veículo (0,5% CMC/PBS pH 7,4, 20 µl/camundongo) e CGS-21680 a 10 µg/camundongo como o controle positivo foram, cada um, administrados topicamente (TOP) imediatamente após o ferimento cutâneo uma vez ao dia durante 10 dias consecutivos. A área da ferida, traçada em folhas plásticas transparentes foi medida pelo uso de um Image - ProPlus (Media Cybernetics, Versão 4.5.29) nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 11. O percentual de fechamento da ferida (%) foi calculado, e o tempo de fechamento de metade da ferida (CT50) foi analisado por regressão linear usando Graph-Prism (Graph Software EUA). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett foram aplicados para comparação entre os grupos tratados e seus grupos de veículo correspondentes em cada ponto avaliado (timepoint) de medição. Diferenças são consideradas estatisticamente significativas a $P < 0,05$. CGS-21680 (10 µg/camundongo x 10) como o padrão positivo exibiu aumento significativo ($P < 0,05$) no fechamento de ferida (nos dias 3, 5, 7, 9 e 11) com CT50 diminuída em relação aos valores de controle de veículo correspondentes. Os resultados são resumidos na Figura 2 (na fase de solução), Figura 3 (na fase de gel) e Tabela 1 abaixo:

Tratamento	Via	Dose	O Fechamento da Ferida (%)					CT ₅₀	
				Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 11	(Dias)
Veículo	TOP	20 µg /	X	21,1	37,5	49,3	64,1	66,8	7,5
		camundongo 10	x SEM	5,6	4,6	3,6	1,8	1,2	0,4
DMap	TOP	100 µg /	X	37,9	53,0	65,4	74,8	80,5*	5,7*
		camundongo 10	x SEM	* 1,6	* 2,2	* 2,5	* 2,0	2,0	0,2
CGS- 21680	TOP	10 µg /	X	38,5	52,2	65,5	76,9	86,1*	5,6*
		camundongo 10	x SEM	* 4,4	* 2,7	* 2,7	* 1,3	3,6	0,3
Gel Base	TOP	20 mg /	X	35,1	39,8	54,5	63,2	70,3	7,0
		camundongo 10	x SEM	2,1	3,0	4,2	2,4	2,6	0,3
DMac	TOP	20 mg /	X	27,0	47,8	64,0	71,7	79,0*	6,2
		camundongo 10	x SEM	3,8	2,8	2,4	* 2,3	2,1	0,2
Regranex	TOP	20 mg /	X	34,3	51,5	61,9	72,7	76,6	6,1
		camundongo 10	x SEM	3,9	4,3	2,7	* 2,5	2,1	0,3

O fechamento da ferida (%) e o tempo de

fechamento de metade da ferida (CT₅₀) foram determinados e ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett foram usados para comparação entre o grupo tratado e seus grupos de veículo correspondentes.

* P<0,05, vs. controle de veículo.

Tabela 1: O efeito de artigos de teste no

fechamento de ferida e tempo de fechamento de metade da ferida em camundongos CD-1.

É concluído que DMAP (100 µg/camundongo) demonstrou um efeito mais persistente na cicatrização de ferida durante todo o estudo com uma redução significativa no valor CT50; DMAP e Regranex tenderam a promover cicatrização de ferida, porém sem efeito significativo na CT50; o gel de base não apresentou qualquer efeito no modelo de ferida cutânea dos camundongos.

Exemplo 5: TMD23 acelera fechamento de ferida em camundongos com diabetes

Grupos de 5 camundongos machos C57BLKS/J-M+/+Lepr^{db} pesando 50 ± 5 g foram usados. Durante o período de teste, os animais foram alojados sozinhos em prateleiras de Gaiolas Ventiladas Individualmente (IVC Racks, 36 Sistemas Mini Isoladores). Sob anestesia de hexobarbital (90 mg/kg, IP), o ombro e a região das costas de cada animal tiveram a pelagem raspada. Uma punção afiada (DI de 12 mm) foi aplicada para remover a pele incluindo *panniculus carnosus* e tecidos aderentes. A área da ferida, traçada em folhas plásticas transparentes foi medida nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 11, 13 e 15 pelo uso de um analisador de imagem (ProPlus, Media Cybernetics, Versão 4.5.29). As substâncias de teste na forma de solução ou gel e veículo, controle positivo CGS-21680 ou Regranex foram, cada uma, aplicadas topicamente iniciando no dia 1, imediatamente após a formação da ferida, uma vez ao dia durante um total de 14 dias consecutivos. Foram usadas substâncias de teste DMAP (100 µg/camundongo), veículo (0,5% CMC/PBS pH 7,4) e CGS-21680 (10 µg/camundongo) na forma de solução e volume de dosagem a 20 µl/camundongo. Enquanto isso, DMAP,

Tratamento	Via	Dose	O Fechamento da Ferida (%)								CT ₅₀
				Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 11	Dia 13	Dia 15	(Dias)
Veículo (0,5% CMC)	TOP	20 µl / camundongo x 14	X SEM	0,2 2,0	5,5 1,9	20,0 1,2	35,8 2,7	47,7 1,7	69,1 1,6	79,8 0,8	10,8 0,2
DMAp	TOP	100 µg / camundongo x 14	X SEM	11,7 * 1,5	18,9 * 2,2	33,9 * 2,6	46,7 * 2,8	61,0 * 2,5	80,4 * 2,7	91,1 * 2,3	9,1* 0,2
CGS-	TOP	10 µg / camundongo x 14	X SEM	13,7 * 1,5	24,5 * 2,2	31,7 * 2,6	44,3 * 2,8	58,5 * 2,5	79,8 * 2,7	90,7 * 2,3	9,1* 0,2

21680		camundongo x SEM	*	*	*	*	*	*	*	0,2
		14		3,9	1,9	2,6	0,9	2,2	1,7	2,7
Gel Base	TOP	20 mg / X	-4,4	3,7	15,3	32,7	48,6	68,7	78,3	11,1
		camundongo x SEM	5,3	4,1	3,0	1,3	1,4	2,3	1,3	0,1
		14								
DMAC	TOP	20 mg / X	5,9	11,8	29,0	44,5	61,8	81,0	89,9	9,4*
		camundongo x SEM	4,3	3,6	*	*	*	*	*	0,3
		14			4,0	3,0	3,2	2,4	2,8	
Regranex	TOP	20 mg / X	12,8	26,3	39,1	54,1	65,8	78,5	89,7	8,6*
		camundongo x SEM	*	*	*	*	*	*	*	0,2
		14	2,2	1,8	2,5	2,4	3,1	1,4	1,0	

O fechamento da ferida (%) e o tempo de fechamento de metade da ferida (CT₅₀) foram determinados e ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett foram usados para comparação entre o grupo tratado e seus grupos de veículo correspondentes.

5 * P<0,05, vs. controle de veículo.

Conclui-se que DMAP (100 µg/camundongo), DMAC e Regranex (cada um 20 mg/camundongo), e CGS-21680 (10 µg/camundongo) demonstraram efeito crescente persistente na cicatrização da ferida durante todo o estudo com uma redução significativa no valor CT₅₀. Na fase inicial, Veículo de gel base pareceu ter um atraso pequeno na cicatrização da ferida se comparado com veículo de 0,5% CMC/PBS pH 7,4.

10

Exemplo 6: TMD23 reduz a taxa de evaporação da abertura da ferida

15 Para medir a taxa de epitelialização, a taxa de evaporação de água da área da ferida foi medida usando o TM210 Tewameter (COURAGE + KHAZAKA Electronic Co., Colônia, Alemanha). Nível menor de taxa de evaporação é representativo de nível maior

de epitelialização ou ceratinização. Os resultados (Figura 6) mostraram que TMD23 poderia, efetivamente, aumentar a taxa de epitelialização da ferida.

Alguém com especialização na técnica, observa
5 prontamente que a presente invenção está bem adaptada para executar os objetivos e obter os resultados e vantagens mencionados, assim como aquelas inerentes a eles. As linhas de célula, animais, processos e métodos para produzir estes são representativos de configurações preferidas, são exemplificativos,
10 e não objetivam limitar o escopo da invenção. Modificações à esta e outros usos ocorrerão àqueles especializados na técnica. Estas modificações são abrangidas dentro do espírito da invenção e são definidas pelo escopo das reivindicações.

Ficará imediatamente aparente a uma pessoa
15 especializada na técnica que várias substituições e modificações podem ser feitas à invenção apresentada aqui sem se afastar do escopo e espírito da invenção.

Todas as patentes e publicações mencionadas na especificação são indicativas dos níveis daqueles com
20 especialização ordinária na técnica à qual a invenção pertence. Todas as patentes e publicações são incorporadas aqui por referência na mesma extensão como se cada publicação individual tivesse sido específica e individualmente indicada como incorporada por referência.

25 A invenção ilustrativamente descrita aqui pode ser, adequadamente, praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, que não sejam especificamente revelados aqui. Os termos e expressões que foram empregados são

usados como termos de descrição e não de limitação, e não existe a intenção de que no uso destes termos e expressão sejam excluídos quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou de porções destas, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Dessa maneira, deve ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente revelada pelas configurações preferidas e características opcionais, modificação e variação dos conceitos aqui revelados podem ser utilizadas por aqueles especializados na técnica, e que estas modificações e variações são consideradas inclusas no escopo desta invenção conforme definido pelas reivindicações em anexo.

Outras configurações são apresentadas dentro das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratamento de cicatrização de ferida, caracterizado pelo fato de que compreende a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade
5 efetiva de um polipeptídeo compreendendo uma seqüência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo EGF de trombomodulina.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo compreende ainda um
10 polipeptídeo operacionalmente ligado compreendendo uma seqüência de aminoácido ou uma variante conservativa de domínio rico em serina-treonina de trombomodulina.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a ferida é selecionada do grupo
15 consistindo de incisões, lacerações, abrasões, feridas por perfuração, bolhas, rasgos na pele, locais de doação ou enxerto, acnes, contusões, hematoma, lesões por esmagamento e lesões causadas por abrasão dérmica ou remoção a laser.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é usado em pacientes com diabetes
20 mellitus.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de úlceras de diabetes.

25 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a ferida é uma queimadura resultante de fogo, calor, radiação, eletricidade ou cirurgia dermatológica.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pode ser aplicado à cirurgia reconstrutora.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é aplicado a produto para aplicação à pele, selecionado do grupo consistindo de formulação de gel, creme, pasta, loção, pulverização, suspensão, solução, pomada de dispersão, hidrogel e ungüento.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o produto de aplicação à pele é administrado ao paciente em necessidade deste tratamento pela aplicação na pele, injeção ou eletroporação.

10. Método para tratamento de cicatrização de ferida, caracterizado pelo fato de que compreende a administração, a um paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade efetiva de plasmídeo consistindo de DNA codificando um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa desta, tendo domínio tipo EGF de trombomodulina.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a administração é feita por meio de vacina de plasmídeo.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a administração é feita por via intravenosa (iv), subcutânea (sc), intraperitoneal (ip), ou intramuscular (im).

13. Composição, para uso na cicatrização de ferida, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo

compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo EGF de trombomodulina.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende ainda um
5 polipeptídeo operacionalmente ligado compreendendo uma sequência de aminoácido ou uma variante conservativa desta de domínio rico em serina-treonina de trombomodulina.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a ferida é selecionada do grupo
10 consistindo de incisões, lacerações, abrasões, feridas de perfuração, bolhas, rasgos na pele, locais de doação ou enxerto, acnes, contusões, hematoma, lesões por esmagamento e lesões causadas por abrasão dérmica ou remoção a laser.

16. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que é usada em pacientes com diabetes
15 mellitus.

17. Composição, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o paciente sofre de úlceras de diabetes.

20 18. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a ferida é uma queimadura resultante de fogo, calor, radiação, eletricidade ou cirurgia dermatológica.

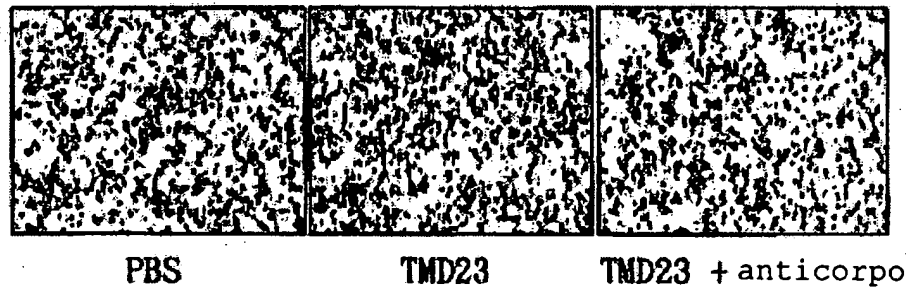
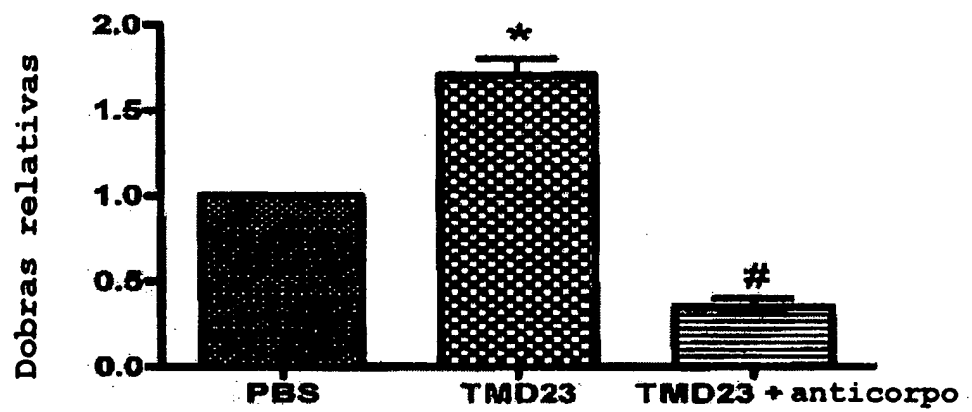
25 19. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que pode ser aplicada à cirurgia reconstrutora.

20. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que é aplicada a um produto para

aplicação à pele, selecionado do grupo consistindo formulação de gel, creme, pasta, loção, pulverização, suspensão, solução, pomada de dispersão, hidrogel e ungüento.

21. Composição, de acordo com a reivindicação 20,
5 caracterizada pelo fato de que o produto de aplicação à pele é administrado ao paciente em necessidade deste tratamento pela aplicação à pele, injeção ou eletroporação.

FIGURA 1



n=3), *p < 0,005 vs. controle; #p < 0,05 vs. TMD23)

FIGURA 2

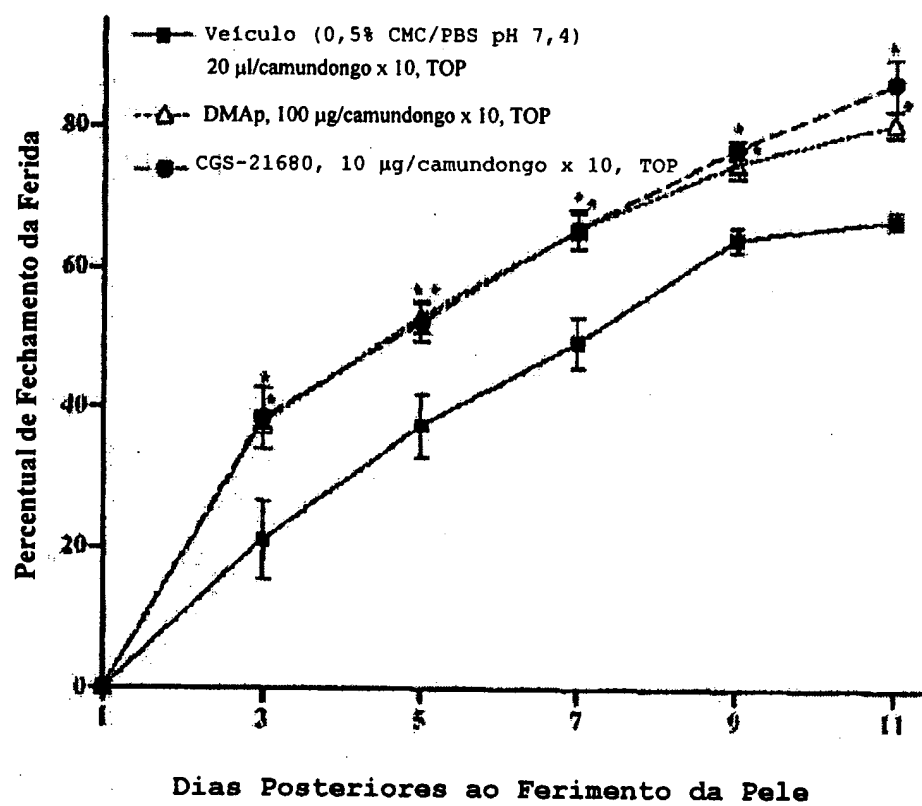


FIGURA 3

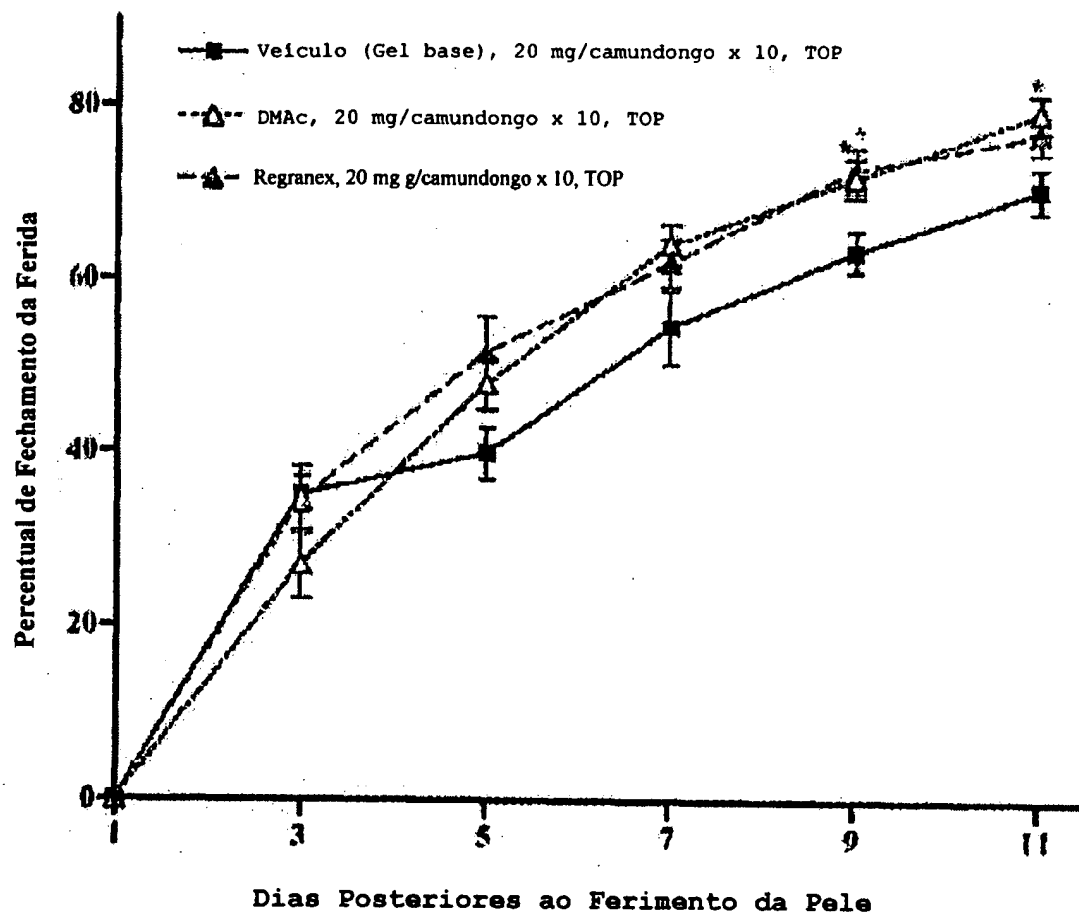


FIGURA 4

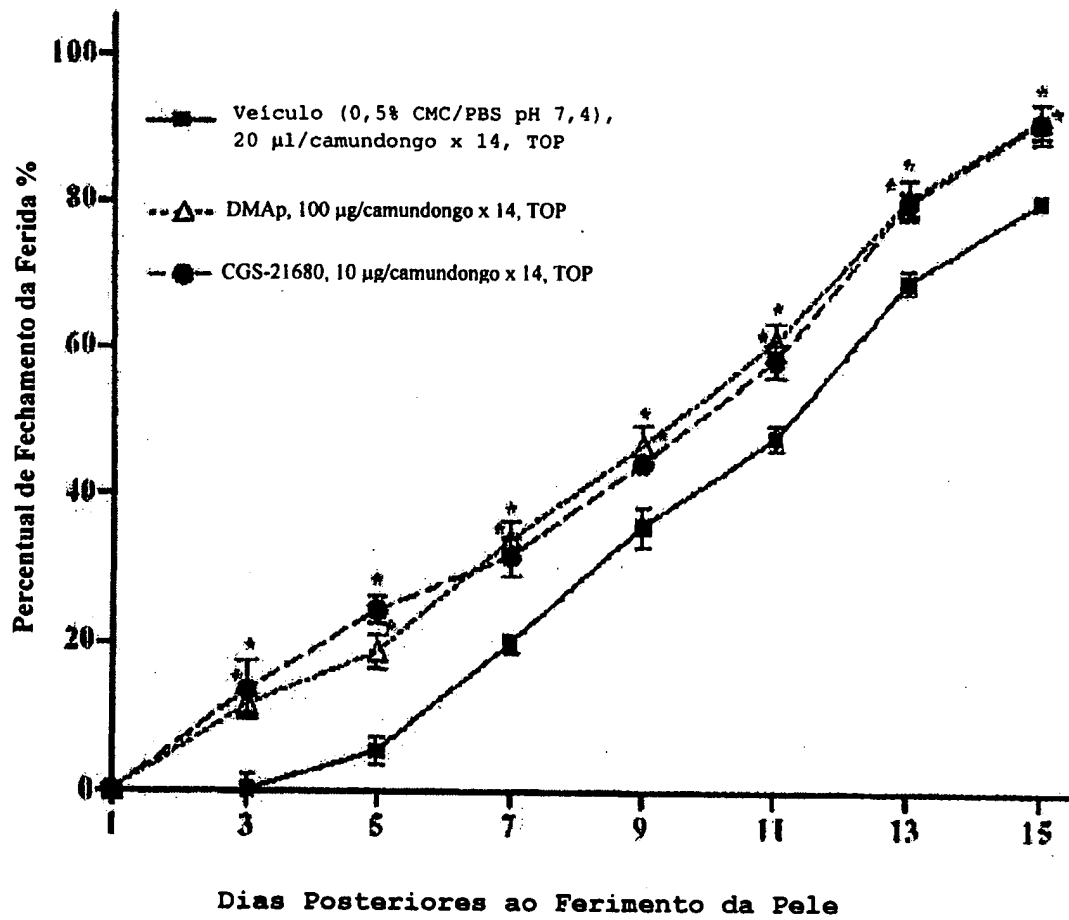


FIGURA 5

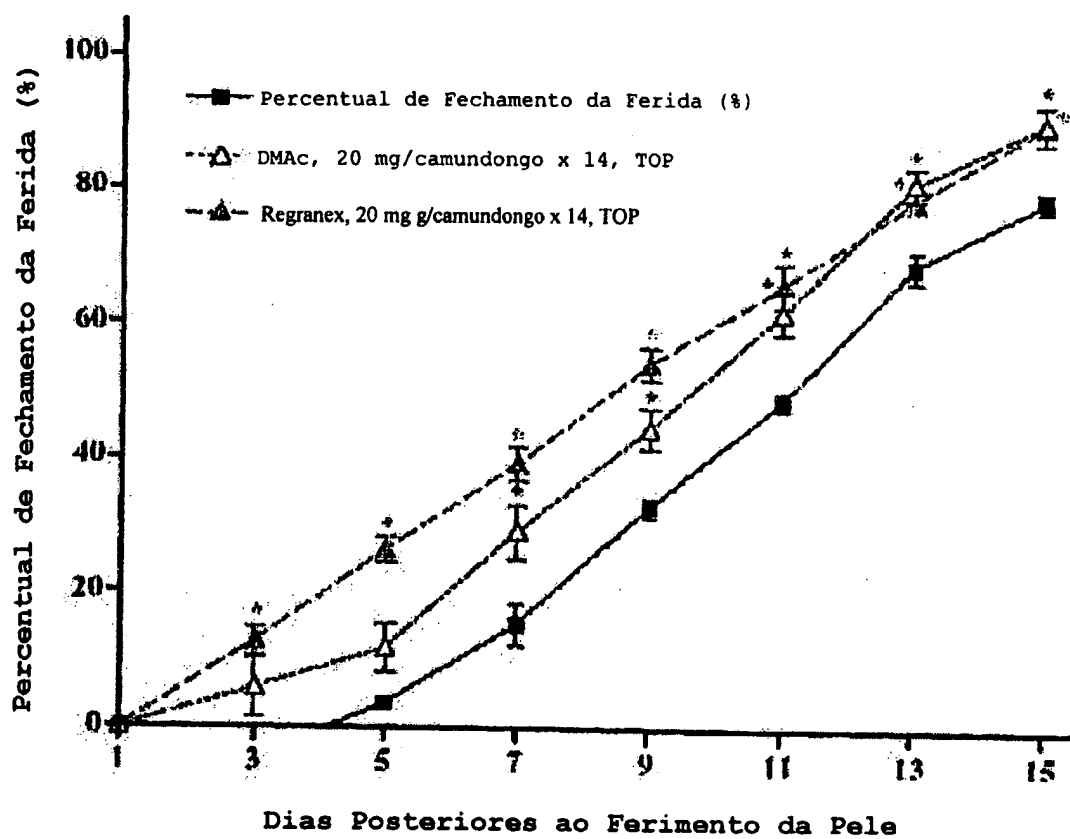
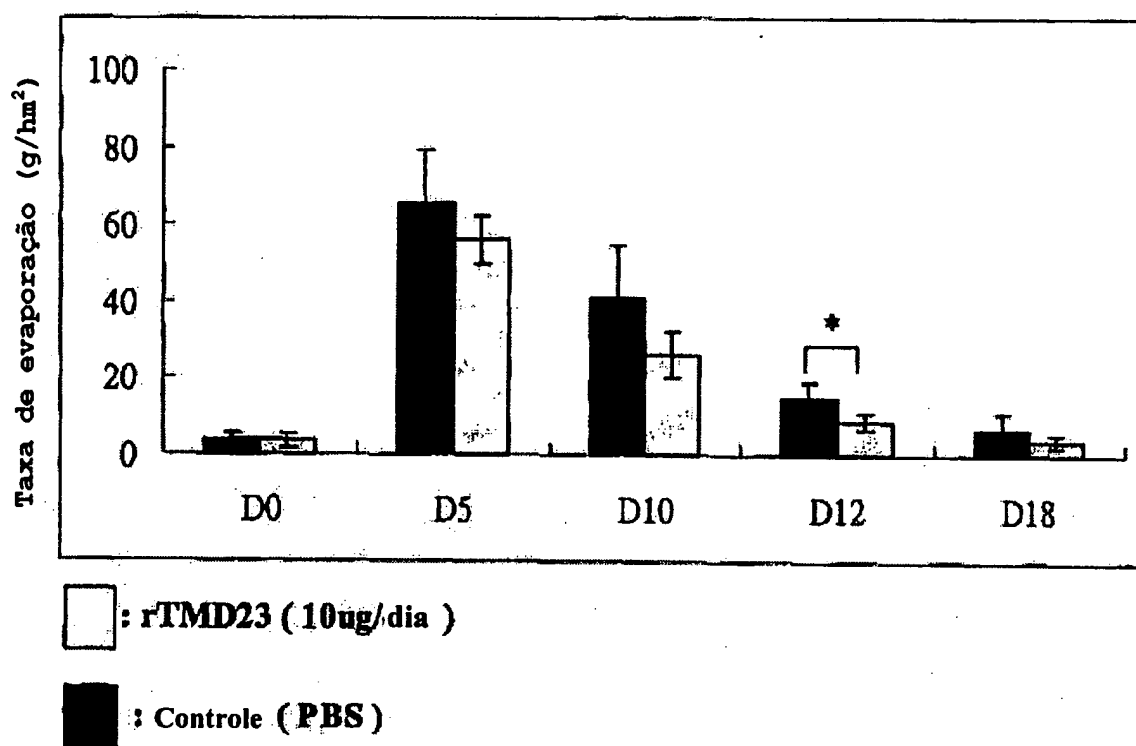


FIGURA 6



RESUMO

P20613227-8

"UMA COMPOSIÇÃO PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDA E USO

DESTA"

A invenção se refere a um método para tratamento
5 de cicatrização de ferida, compreendendo a administração, a um
paciente em necessidade deste tratamento, de uma quantidade
efetiva de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de
aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo
EGF de trombomodulina. A invenção também se refere a uma
10 composição para uso na aceleração de cicatrização de ferida,
compreendendo um polipeptídeo compreendendo uma sequência de
aminoácido ou uma variante conservativa desta tendo domínio tipo
EGF de trombomodulina.