



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0715361-9 B1



(22) Data do Depósito: 30/07/2007

(45) Data de Concessão: 07/01/2020

(54) Título: USO DE POLIETILENO GLICOL EM INFLAMAÇÃO RELACIONADA COM DOENÇAS OU DISTÚRBIOS TÓPICOS E CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTO

(51) Int.Cl.: A61K 31/765; A61P 17/02.

(30) Prioridade Unionista: 28/07/2006 GB 0615016.3.

(73) Titular(es): FLEN PHARMA N.V..

(72) Inventor(es): DAVE VAN DEN PLAS; KRIS DE SMET; PHILIPPE SOLLIE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2007006714 de 30/07/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/012107 de 31/01/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/01/2009

(57) Resumo: USO DE POLIETILENO GLICOL EM INFLAMAÇÃO RELACIONADA COM DOENÇAS OU DISTÚRBIOS TÓPICOS E CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTO. A presente invenção refere-se às composições de hidrogel ou soluções aquosas que compreendem uma ou mais formas de Polietileno Glicol, para uso como medicamentos, mais particularmente para aplicação tópica no tratamento de ferimentos, para o tratamento de doença de pele inflamatória e em particular para a prevenção de formação de cicatriz e/ou para realçar o reparo de pele ou mucosa danificada.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE POLIETILENO GLICOL EM INFLAMAÇÃO RELACIONADA COM DOENÇAS OU DISTÚRBIOS TÓPICOS E CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se às composições e ao seu uso como um produto cosmético, produto dietético, medicamento ou como um dispositivo médico para o tratamento tópico de ferimentos ou para reduzir ou ajudar a reduzir inflamação, para realçar o reparo de pele danificada, muco-
10 sa e/ou ferimentos e/ou para o alívio tópico de sintomas relacionados com inflamação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

 O polietileno glicol (PEG) é um componente bem conhecido como uma base para formulações farmacêuticas ou para modular a viscosidade de unguentos e cosméticos. É usado como realçador de penetração na
15 pele e como agente umectante para substâncias hidrofóbicas que facilitam a sua dispersão. PEG tem sido usado para a derivação de proteínas terapêuticas para aumentar sua solubilidade, sua estabilidade e tempo de circulação e/ou diminuir a imunogenicidade. Os polímeros com base em PEG com propriedades tensoativas são usados como emulsificantes, solubilizantes e a-
20 gentes umectantes em preparações dermatológicas e cosméticas, artigos de toalete, perfumes como também em aplicações industriais. Descobriu-se que as poliaminas ligadas por PEG aumentam a liberação transdérmica de fármacos terapêuticos tópicos.

 PEG também foi demonstrado ter um efeito neuroprotetor, que é
25 em parte com base em sua capacidade de salvar neurônios e seus axônios por reparo das membranas plasmáticas.

 A atividade farmacêutica potencial deste composto em aplicações dermatológicas foi amplamente negligenciada. Em geral, as concentrações variadas de PEG são usadas em formulações dermatológicas. Ao
30 mesmo tempo em que algumas destas formulações foram sugeridas para cicatrização de ferimento (Chapvil e outros (1991) J. Surg. Res. 51, 245-252), PEG propriamente dito não foi considerado como um ingrediente ativo

uma vez que o efeito direto de PEG propriamente dito não foi reconhecido.

As composições antimicrobianas que compreendem PEG foram descritas (Ambrose e outros, (1991) *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35, 1799-1803), com base em uma atividade pró-inflamatória de PEG. As concentrações de PEG usadas para obter o efeito pró-inflamatório alegado de PEG são acima de 15%.

A inflamação é a primeira resposta do sistema imune à infecção ou irritação e pode ser referida como cascata inata. A inflamação é caracterizada pelo seguinte quinteto: vermelhidão (rubor), alta temperatura (calor), inchaço (tumor), incômodo (dor) e disfunção orgânica dos órgãos envolvidos (*functio laesa*).

A inflamação tem dois componentes principais, um componente celular e um exsudativo. O componente exsudativo envolve o movimento de fluido, normalmente contendo muitas proteínas importantes tais como fibrina e imunoglobulinas (anticorpos). Os vasos sanguíneos são dilatados a montante de uma infecção (causando vermelhidão e calor) e restringidos a jusante ao mesmo tempo em que a permeabilidade capilar ao tecido afetado é aumentada, resultando em uma perda líquida de plasma sanguíneo no tecido - dando origem ao edema ou inchaço. O inchaço dilata os tecidos, comprime as terminações nervosas, e desse modo causa dor. O componente celular envolve o movimento de glóbulos brancos de vasos sanguíneos no tecido inflamado. Os glóbulos brancos, ou leucócitos, assumem um papel importante na inflamação; eles extravasam (filtram) dos vasos capilares no tecido, e agem como fagócitos, apanhando bactérias e detritos celulares. Eles também podem ajudar a enfraquecer uma infecção e prevenir sua expansão. Quando a inflamação do sítio afetado persiste, as citocinas liberadas IL-1 e TNF ativarão as células endoteliais para super-regular os receptores VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, e L-selectina para várias células imunes. A super-regulação do receptor aumenta o extravasamento de neutrófilos, monócitos, células T-auxiliares ativadas e T-citotóxicas, e células T e B de memória para o sítio infectado.

Os neutrófilos são característicos de inflamação nos estágios

iniciais - eles são as primeiras células a aparecer em uma área infectada, e qualquer seção de tecido recentemente inflamado (dentro de poucos dias mais ou menos) vista sob um microscópio aparecerá envolvida neles. Eles são identificados facilmente pelos seus núcleos com múltiplos lóbulos e citoplasma granular e realizam muitas funções importantes, incluindo fagocitose e a liberação de mensageiros químicos extracelulares. Os neutrófilos vivem somente durante poucos dias nestas áreas intersticiais, desse modo se a inflamação persiste por uma duração mais longa, então eles são substituídos gradualmente por monócitos vivos por mais tempo.

10 Vários leucócitos são envolvidos na iniciação e manutenção de inflamação. Estas células podem ser também estimuladas para manter inflamação pela ação de cascata adaptável por linfócitos: células T, células B, e anticorpos. Estas células de inflamação são mastócitos que liberam histamina e prostaglandina em resposta à ativação de receptores de estiramento e macrófagos que liberam TNF- α , IL-1 em resposta à ativação de receptores do tipo pedágio.

20 O resultado de inflamação em uma circunstância particular será determinado pelo tecido no qual a lesão ocorreu, e o agente prejudicial que está causando isto. Há quatro possíveis resultados para inflamação, isto é, resolução, cicatrização do tecido conjuntivo, formação de abscesso e inflamação contínua ou crônica. A resolução, ou a reconstituição completa de tecido danificado, normalmente não ocorre no corpo. Mais comumente, a inflamação requer a cicatrização do tecido conjuntivo. A resposta curativa começará cerca de 24 horas depois da primeira ocorrência de inflamação em um ferimento. Esta resposta envolve a formação de tecido conjuntivo para ligar o espaço causado pela lesão, e o processo de angiogênese, a formação de novos vasos sanguíneos, para fornecer nutrientes ao tecido recentemente formado. Frequentemente a cicatrização não pode ocorrer completamente e uma cicatriz se formará; por exemplo, após a dilaceração da pele, os resultados de cicatriz de tecido conjuntivo que não contêm nenhuma estrutura especializada tal como pelo ou glândulas de suor. Onde a inflamação é acompanhada por infecção com bactérias piogênicas, a forma-

ção de abscesso pode ocorrer. Finalmente, se o agente prejudicial persistir, a inflamação crônica resultará. Este processo, marcado por inflamação que dura muitos dias, meses ou até mesmo anos, pode levar à formação de um ferimento crônico. A inflamação crônica é caracterizada por uma presença dominante de macrófagos no tecido ferido, que extravasa pelos mesmos métodos descritos acima (ICAM-1 VCAM-1). Estas células são agentes defensivos poderosos do corpo, porém as toxinas que elas liberam (incluindo espécies de oxigênio reativo) são prejudiciais aos próprios tecidos do organismo como também agentes invasores. Isto é por que a inflamação crônica quase sempre é acompanhada por destruição de tecido. Um abscesso, ou uma coleta de pus, também pode se formar em inflamação crônica.

Além de ferimento, a inflamação da pele pode ser causada também por outros agentes que agem como fatores irritantes. As doenças de pele inflamatórias comuns incluem dermatite atópica, acne, sumagre venenoso, rosácea, e urticárias. A dermatite atópica é frequentemente referida como "eczema", que é um termo geral para muitos tipos de dermatite. A dermatite atópica é a mais comum dos muitos tipos de eczema incluindo eczema de contato (tal como a maioria das formas de dermatite ocupacional), eczema de contato alérgica, eczema seborréica, eczema nubular, neurodermatite, dermatite de estase e eczema disidrótica. A dermatite atópica afeta machos e fêmeas igualmente e é responsável por 10 a 20 por cento de todas as indicações para dermatologistas. Um percentual estimado de 10 por cento de crianças e jovens experimentam sintomas da doença. Aproximadamente 60 por cento destas crianças continuam a ter um ou mais sintomas de dermatite atópica na fase adulta. Isto significa que mais de 15 milhões de pessoas nos Estados Unidos têm sintomas da doença. Psoríase comum é uma doença de pele inflamatória crônica, a taxa de prevalência da qual é 2-3% em populações Caucasianas. A maioria dos casos de psoríase comum é esporádica. Os casos esporádicos são caracterizados por inflamação ativada por lesões de pele que mostram hiperproliferação de células epidérmicas, diferenciação anormal de ceratinócitos (por exemplo, hiperproliferação de ceratinócito), infiltração de células T-auxiliares ativadas e monóciti-

tos, e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Acne comum é uma doença inflamatória da pele, causada por mudanças nas unidades pilosebáceas (estruturas de pele que consistem em um folículo de cabelo e sua glândula sebácea associada). A condição é muito comum durante adolescência, afetando mais do que 85% de adolescentes, porém frequentemente continua na fase adulta.

Permanece uma necessidade de composições para aplicação à pele que possam ser usadas para aliviar sintomas de inflamação, cicatrização de ferimento e/ou promover regeneração de ferimento.

10 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção mostra que PEG e derivados deste, formulados como soluções aquosas ou como hidrogéis, ajudam a reduzir inflamação e/ou a aliviar os sintomas relacionados com a inflamação, promover e/ou facilitar a cicatrização de ferimento, promover reparo da pele e/ou mucosa e prevenir cicatriz quando aplicadas topicamente em uma certa faixa de concentração.

Um primeiro aspecto da presente invenção refere-se às composições que compreendem PEG ou um derivado deste em uma concentração entre 0,1 e 10%, particularmente entre 0,3 e 6% (peso/peso), mais particularmente entre 0,5 e 5% (peso/peso) e particularmente entre 0,5 e 2% (peso/peso), ou entre 1 e 3% (peso/peso). As modalidades particulares fornecem composições com concentrações de PEG de 0,5, 1, 1,5, 2, ou 2,5% ou qualquer valor nesta faixa. Mais particularmente, as composições da invenção são consideradas para uso como um medicamento, mais particularmente na redução e/ou prevenção de inflamação e/ou para promover reparo da pele e reduzir ou prevenir a formação de cicatriz. As modalidades particulares da invenção são composições para patologias relacionadas com inflamação tal como composições curativas de ferimento. Em modalidades alternativas, as composições de acordo com a invenção são consideradas para uso como produtos cosméticos, produtos dietéticos e/ou composições tópicas para aplicação à pele e/ou mucosa, com o objetivo de alimentar a pele, com base no aumento observado na produção de colágeno por PEG. Mais

particularmente as composições da invenção são formuladas como hidrogéis ou soluções aquosas, particularmente adequadas para aplicação tópica.

Uma modalidade particular da presente invenção refere-se aos hidrogéis ou soluções aquosas, compreendendo um ou mais PEG(s) ou derivados destes que têm um Mr entre 200 e 1500, mais particularmente entre 200 e 700. Alternativamente, as composições da presente invenção compreendem um ou mais PEG(s) ou derivados destes que têm um Mr de mais do que 1500, mais particularmente PEG(s), que são sólidos cerosos.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece composições, mais particularmente hidrogéis ou soluções aquosas, em que o um ou mais PEG(s) é o único ou principal componente farmacologicamente ativo da composição, hidrogel ou solução aquosa. Em modalidades particulares a composição não compreende agente de aquecimento de pele ou um protetor solar. Em modalidades particulares as composições compreendem, além de PEG como os ingredientes ativos principais, outros componentes tais como composições antimicrobianas (em concentrações de inibição de crescimento), tampões, solubilizantes etc.

Em modalidades particulares alternativas as composições compreendem, além de PEG, outros ingredientes farmacologicamente ativos, tais como antibióticos, agentes antifúngicos, protetores solares, etc.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece hidrogéis que compreendem uma ou mais formas de PEG em uma concentração entre 0,1 e 10%, particularmente entre 0,3 e 6% (peso/peso), mais particularmente entre 0,5 e 5% e particularmente entre 1 e 3% (peso/peso), em que o hidrogel é um hidrocolóide de poliacrilato com uma concentração entre 0,05 e 20%, mais particularmente entre 0,05 e 10%. As modalidades específicas da presente invenção fornecem hidrogéis, em que o hidrocolóide é somente parcialmente reticulado, completamente reticulado ou não é reticulado.

Outro aspecto da presente invenção fornece as composições como descrito acima, para uso como um medicamento. Mais particularmente, as composições são fornecidas para uso na prevenção e/ou tratamento (ou redução de incidência) de inflamação, mais particularmente no tratamen-

to de ferimentos, para a prevenção de formação de cicatriz, para reparar mucosa e/ou pele danificada, para o tratamento de doenças inflamatórias da pele e/ou mucosas tal como, porém não limitado à dermatite atópica, acne, rosácea, urticárias, sumagre venenoso, psoríase etc..

5 Em uma modalidade, a invenção fornece um método para reduzir ou ajudar a reduzir a inflamação na pele, mucosa (incluindo nariz e orelha) e em ferimentos, aplicando a dita pele, mucosa ou ferimento um hidrogel ou solução aquosa que compreende uma ou mais formas de PEG destas em
10 0,5 e 5% (peso/peso), mais particularmente entre 1 e 3% (peso/peso). Particularmente, os métodos da presente invenção referem-se ao cuidado tópico e tratamento de inflamação. As modalidades particulares da invenção referem-se aos métodos para curativos de ferimentos.

 Em uma modalidade, os métodos da presente invenção compreendem aplicação tópica de composições, mais particularmente, aplicação
15 tópica de composições tais como aquelas descritas aqui, à pele ou mucosa, particularmente aplicação tópica nas áreas danificadas de pele ou mucosa, para o tratamento de doenças inflamatórias de pele e/ou mucosas tais como porém não limitado a acne, rosácea, urticárias, sumagre venenoso, psoríase
20 etc..

 Conseqüentemente, a presente invenção também refere-se ao uso de um ou mais PEG(s) ou derivado(s) destes em uma concentração
(PEG total) entre 0,1 e 10%, particularmente entre 0,3 e 6% (peso/peso),
25 mais particularmente entre 0,5 e 5%, particularmente entre 1 e 3% (peso/peso) para a fabricação de hidrogel ou solução aquosa para uso tópico para reduzir ou ajudar a reduzir inflamação e/ou para promover reparo de pele e prevenir e/ou reduzir formação de cicatriz e/ou para promover cicatrização de ferimento.

 Em uma modalidade específica, PEG ou um derivado deste tem
30 um Mr de cerca de 200 a 1500 mais particularmente entre 200 e 700. Alternativamente, o PEG ou um derivado deste tem um Mr de mais do que 1500. Em modalidades particulares, o um ou mais PEG(s) é o único ou principal

componente farmacologicamente ativo do hidrogel ou solução aquosa. Em uma modalidade adicional, o um ou mais PEG(s) é o único componente anti-inflamatório das composições da presente invenção. Em modalidades alternativas, o hidrogel ou solução aquosa compreende outros ingredientes ativos, tais como, porém não limitados a, agentes antimicrobianos (antibiotico, antifúngico, antiviral), protetores solares, agentes hidratantes etc. Em modalidades adicionais, as composições compreendem, além do um ou mais PEG(s) outros agentes anti-inflamatórios.

Em modalidades particulares, o hidrogel é um hidrocolóide de poliacrilato com uma concentração entre 0,05-10%, mais particularmente um hidrocolóide que é pelo menos parcialmente reticulado (opcionalmente completamente reticulado). Em outras modalidades os hidrocolóides não são reticulados.

Em particular modalidade, o medicamento é para uso tópico, particularmente para uso na pele ou mucosa.

Ainda um outro aspecto da presente invenção refere-se ao uso das composições da presente invenção como cosmético ou, produtos dietéticos. Mais particularmente, os produtos são aplicados à pele para melhorar a textura de pele e reduzir a vermelhidão da pele.

20 LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1 mostra a toxicidade de concentração variada de PEG400 em células cultivadas (A: ceratinócitos; B: macrófagos; C: fibroblastos) de acordo com as modalidades particulares da presente invenção.

Figura 2 mostra a influência de concentrações variadas de PEG400 em expressão de metaloproteinase através de células cultivadas de acordo com modalidades particulares da presente invenção.

Figura 3 mostra a influência de concentrações variadas de PEG na expressão de VEGF através de células cultivadas de acordo com as modalidades particulares da presente invenção.

Figura 4 mostra a influência de derivado de PEG em expressão de proteína através de células cultivadas (A: expressão de VEGF através de fibroblastos; B: expressão de ProMMP9 através de macrófagos; C: IL-6 ex-

pressão através de macrófagos; D: TGF-beta1 através de macrófagos) de acordo com modalidades particulares da presente invenção.

Figura 5 mostra a influência de derivado de PEG em expressão de proteína através de células cultivadas (PBMC) (A: expressão de TNF-alfa; B: expressão de TGF-beta1) de acordo com modalidades particulares da presente invenção.

Figura 6 mostra a influência de PEG400 em uma formulação de hidrogel de alginato em secreção de proteína através de células cultivadas (A: fibroblastos; B: macrófagos) de acordo com modalidades particulares da presente invenção.

Figura 7 mostra a influência de PEG400 em uma formulação de hidrogel de poliacrilato em secreção de proteína através de células cultivadas de acordo com modalidades particulares da presente invenção.

Figura 8 mostra a influência de PEG em uma formulação de hidrogel de carboximetilcelulose em secreção de proteína através de células cultivadas de acordo com modalidades particulares da presente invenção.

Figura 9 mostra a influência de PEG400 na expressão de VEGF através de células endoteliais (SVEC) e células de fibroblasto (3T3) de acordo com modalidades particulares da invenção.

Figura 10 mostra a influência de PEG400 em combinação com outro umectante - propileno glicol - em expressão de VEGF através de células endoteliais (SVEC) de acordo com as modalidades particulares da invenção.

Figura 11 mostra a influência de PEG400 e outro umectante em expressão de colágeno III através de células de fibroblasto (3T3) de acordo com modalidades particulares da invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

O termo polietileno glicol (PEG, Macrogol), é aqui usado para se referir a um polímero de condensação de óxido de etileno (Mr 62) e água com fórmula geral $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$. Os membros de peso molecular baixo de $n=2$ a $n=4$ são dietileno glicol (Mr 106), trietileno glicol (Mr 150) e te-

traetileno glicol (Mr 194) respectivamente, são produzidos que como compostos puros. Onde apropriado, a abreviação (PEG) é usada em combinação com um sufixo numérico que indica o peso molecular médio de PEG. Formas diferentes de PEGs são identificadas de acordo com peso molecular (baixo: 200-1500; elevado: >1500). Alternativamente, PEGs podem ser divididos de acordo com sua viscosidade resultante, desse modo PEG 200-700 são líquidos viscosos. PEG 1500 são semi-sólidos com um toque gorduroso. PEG >1500 são sólidos com uma aparência tipo cerosa ou de parafina. As composições de PEG fluidas e semi-sólidas são higroscópicas (umectante), ao mesmo tempo em que as composições tipo cera são muito menos higroscópicas (Cooper & Gunn's Dispensing for Pharmaceutical Students, 12ª Edição, Editado por SJ Carter; Pitman medical Publishing Co Ltd.; Martindale, The extra Pharmacopoeia, 28ª edição, Editada por J. E. F. Reynolds, Pharmaceutical Press, Londres). Uma forma de PEG ou uma espécie de PEG é um PEG ou derivado de PEG com um peso molecular médio especificado.

O termo "derivado de PEG", como usado aqui, refere-se ao PEG R que é modificado pela adição de um ou mais grupos alquila C₁-C₆ de cadeia linear ou ramificada. Um PEG funcionalizado ou derivado de PEG é um PEG ou derivado de PEG (outro) substituído com um ou mais grupos selecionados do grupo que consiste em ácido (ácido carbônico, ácido sulfônico), aldeído, CN, OH, OU, SH, SR, NH₂ ou NHR, em que R = cadeia de C₁ a C₄.

O termo "alginatos", como usado aqui refere-se aos alginatos farmaceuticamente aceitáveis, tais como ácido algínico e alginatos catiônicos tais como alginatos de cálcio, sódio, potássio e amônio.

O termo "tópico" no contexto de métodos de aplicação e composições do presente pedido refere-se à aplicação (ou conveniência para aplicação) à superfície de uma parte do corpo, mais especificamente aplicação à pele, unhas ou cabelos, ou membranas mucosas tais como, porém não limitadas à, orelha, nariz, vagina, reto, garganta ou olho (por exemplo, retina), incluindo porções danificadas destas.

O termo "dérmico" como usado aqui no contexto de métodos de

aplicação ou composições refere-se à aplicação à pele.

O termo "hidrogel" é um termo geral relativo a um ou mais polímeros naturais ou sintéticos que são de modo coloidal dispersos em água (Martin e outros em *Physical Pharmacy*, 2^a ed. (1960), Lea & Febiger-
5 Philadelphia).

O termo "inflamação" como usado aqui geralmente refere-se ao acúmulo local de fluido, proteínas de plasma, e mastócitos, que é iniciado por lesão física, infecção, ou uma resposta imune local. Isto também é conhecido como uma resposta inflamatória. A inflamação aguda é o termo usado para descrever episódios iniciais e frequentemente transitórios, ao mesmo tempo em que a inflamação crônica ocorre, quando a infecção persiste ou durante a resposta auto-imune. Muitas formas diferentes de inflamação são vistas em doenças diferentes. As células que invadem tecidos que sofrem respostas inflamatórias são frequentemente chamadas células inflamatórias ou um infiltrado inflamatório [*ImmunoBiology, the immune system in health and disease*, Janeway & Travers, 3^a edição (1997), Churchill-Livingstone/Current Biology Limited/Garland Publishing Inc). A inflamação é tipicamente associada à produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α , IL-1, MMPs etc.
10
15

O termo "doença de pele inflamatória" como usado aqui refere-se a uma reação inflamatória na pele a um irritante frequentemente caracterizado internamente por acúmulo local de fluido, proteínas de plasma, e mastócitos e externamente por vermelhidão da pele, densidades e produção de calor. Os distúrbios inflamatórios da pele incluem porém não estão limitados a eczema, acne, rosácea e muitos outros incluindo psoríase, urticárias, dermatite de contato (tal como dermatite ocupacional) e sumagre venenoso.
20
25

O termo "cicatrização de ferimento" como usado aqui refere-se à redução em severidade e/ou tamanho de ferimentos superficiais (lesão somente para estrato córneo e/ou epiderme; por exemplo, queimadura de sol), ambos os ferimentos de espessuras parciais (lesão somente para a epiderme e derme superficial, sem dano para os vasos sanguíneos) e espessuras completas (perda de derme, vasos sanguíneos dérmicos afetados), como
30

também ferimentos internos.

Uma "solução" como usado aqui refere-se a uma mistura de dois ou mais componentes que formam uma dispersão molecular homogênea, isto é, um sistema de uma fase (Martin e outros, em *Physical Pharmacy*, 2^a ed., página 144 Lea & Febiger - Filadélfia).

O termo "umectante" como usado aqui refere-se a uma substância higroscópica. Os exemplos desta são glicerol, propileno glicol e triacetato de glicerila. Outros tipos de umectante são polióis tais como sorbitol, xilitol e maltitol, e polióis poliméricos tais como polidextrose, e extratos naturais tais como quilaia, ácido lático e uréia. Ele inclui PEG, que como um resultado de suas propriedades higroscópicas é considerado um umectante.

A invenção fornece composições que compreendem concentrações baixas de uma ou mais formas de PEG deste que têm um efeito terapêutico e/ou benéfico, mais particularmente para o tratamento e/ou redução de inflamação. Mais particularmente, a invenção fornece composições para administração tópica, por meio da qual a presença de PEG em baixas concentrações reduz e/ou ajuda na redução de inflamação e/ou promove reparo de pele e previne e/ou reduz a formação de cicatriz, e/ou aumenta a cicatrização de ferimento e/ou promove o reparo de ferimento. Em modalidades particulares, a invenção fornece composições para a redução de inflamação ou para ajudar na redução de inflamação e/ou para a promoção de reparo de pele e para prevenir e/ou reduzir formação de cicatriz e/ou para o tratamento de ferimentos e/ou para a promoção de reparo de ferimento, em que PEG é um ingrediente ativo, mais particularmente o único ou o principal ingrediente farmacologicamente ativo na composição que tem uma atividade anti-inflamatória direta. Em modalidades alternativas, as composições da presente invenção contêm, além de PEG um ou mais outros ingredientes ativos, tais como, porém não limitados a ingredientes que têm um efeito de anti-inflamatório direto. No contexto da presente invenção, os ingredientes considerados como tendo um efeito anti-inflamatório direto são composições conhecidas como moléculas anti-inflamatórias tais como esteróides, mais particularmente glicocorticóides (que reduzem inflamação ligando-se aos recep-

tores de cortisol) ou fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (NSAIDs), que interagem com a enzima ciclooxigenase (COX), reduzindo a produção de prostaglandinas responsáveis pela inflamação (tal como ibuprofeno e naproxeno). Outros fármacos com propriedades anti-inflamatórias incluem he-

5 lenalina.

As composições da presente invenção são caracterizadas pelo fato de que as baixas concentrações de PEG presente garantem um efeito anti-inflamatório na pele ou mucosa. Tais composições podem também compreender outros ingredientes ativos tais como protetores solares (por

10 exemplo, compostos de absorção de UV com base em ácido benzóico, compostos de absorção de UV com base em ácido antranílico, compostos de absorção de UV com base em ácido salicílico, compostos de absorção de UV com base em ácido cinâmico, compostos de absorção de UV com base em benzofenona). Em algumas modalidades, a composição pode conter os

15 agentes de aquecimento (por exemplo, capsaicina ou mentol) ou ingredientes antimicrobianos (agentes antibióticos, antifúngicos ou antivirais). Em modalidades alternativas, PEG é o ingrediente ativo principal (tais composições podem também compreender agentes antimicrobianos de inibição de crescimento, etc.). Em outras modalidades alternativas, PEG é o único ingredien-

20 te ativo presente na composição, mais particularmente não compreende agentes de aquecimento e/ou outros ingredientes ativos.

O efeito terapêutico de PEG no tratamento de inflamação (tópico) ou cicatrização de ferimento, mais particularmente quando usado em baixas concentrações, não foi ainda reportado. Desse modo, a presente in-

25 venção refere-se ao uso de composições compreendendo baixas concentrações de PEG, em aplicações às quais eles não foram previamente considerados, mais particularmente para a redução ou ajuda na redução de inflamação e/ou para promover reparo de pele e reduzir a formação de cicatriz, e/ou para tratamento de ferimentos, por exemplo, na cicatrização de ferimento.

30 As composições da presente invenção que compreende PEG como um ingrediente ativo ou como essencialmente o único ingrediente ativo para o tratamento tópico de cicatrização de inflamação e/ou ferimento, pode

também opcionalmente conter ingredientes ativos que não diretamente afetam a cicatrização de inflamação ou ferimento. Adicionalmente ou alternativamente, as composições também podem conter aditivos tais como tampões, sais, preservativos, perfumes, lubrificantes e outros compostos usados na fabricação de cosméticas e unguentos. É demonstrado aqui que as composições que compreendem PEG (e, opcionalmente, nenhum outro composto anti-inflamatório) podem ser usadas para reduzir a inflamação e promover a cicatrização de ferimento. Alternativamente, PEG pode ser usado junto com outros agentes anti-inflamatórios para obter um efeito aditivo. Consequentemente, em modalidades particulares, as composições são fornecidas aqui as quais, além de PEG compreendem somente compostos ou aditivos que não têm nenhum efeito anti-inflamatório ou curativo de ferimento (ou que estão presentes em concentrações que são muito baixas (ou muito altas) para ter um efeito anti-inflamatório ou curativo de ferimento) para uso no tratamento de ferimentos e doenças inflamatórias de pele e/ou mucosas. Alternativamente, as composições são fornecidas as quais, além de PEG compreendem outros ingredientes ativos, tais como ingredientes anti-inflamatórios.

De acordo com modalidades particulares, a uma ou mais formas de PEG ou espécies de PEG que são usadas nos métodos e composições da presente invenção têm um peso molecular (Mr) variando de 200 a 1500, tal como, porém não limitado, PEG 200, 300, 400, 600, 800, 1000 e 1500. Os PEGs de Pm baixo são considerados devido às suas características físico-químicas que permitem manipulação fácil. Em modalidades particulares uma ou mais formas de PEG com um peso molecular dentro da faixa de 200 a 700 Pm são usadas.

Em outras modalidades de composições descritas aqui, uma ou mais formas de PEG de um peso molecular entre 1540 e 35000 são consideradas. Mais particularmente, devido a higroscopicidade limitada dos PEGs cerosos-sólidos, o efeito osmótico nas células é reduzido, resultando em toxicidade reduzida.

PEG em composições da presente invenção pode ser homogê-

neo (isto é, compreendendo somente uma forma de PEG) ou pode ser uma mistura de relações variadas de uma ou mais formas de PEGs. Tipicamente, de acordo com a presente invenção, a concentração total de todas as formas diferentes de PEG presente na composição está entre 0,1% a 10% (pe-
5 so/peso).

As concentrações de PEG consideradas nas composições e métodos da presente invenção variam de cerca de 0,1% a 10% (peso/peso), particularmente de 0,3% a 6% (peso/peso), mais particularmente de 1-5% (peso/peso), particularmente entre 1-3% (peso/peso). Em modalidades par-
10 ticulares a concentração (total) de PEG é 1, 2, 3, 4 ou 5% (peso/peso). Mais particularmente, a concentração de PEG considerada em hidrogéis de acordo com a invenção é mais baixa do que a concentração de PEG usada em PEG-hidrogéis, onde PEG age como agente umectante.

O PEG(s) considerado no contexto da presente invenção inclui
15 ambas as formas de PEG inalteradas que têm uma estrutura com a fórmula geral $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ como indicado acima. Adicionalmente ou alternativamente uma ou mais formas de PEG usadas em composições ou métodos da presente invenção podem compreender um ou mais derivados de PEG, mais particularmente PEG(s) substituído(s) em uma ou mais posições por
20 uma ou mais modificações que são substituintes de alquila e/ou substituintes funcionais. Uma lista não limitando exemplos destes compreende diácido de PEG 600, mono etiléter de PEG 250 (MME) e dimetiléter de PEG 350 (DME).

Um aspecto da invenção refere-se às composições farmacêuti-
25 cas que compreendem PEG em uma concentração de 0,1% a 10% (peso/peso), particularmente entre 0,3 e 6%, e mais particularmente entre 1 e 3% (peso/peso) formuladas em uma solução aquosa, um hidrogel ou composição compreendendo hidrogel. Tais composições são particularmente adequadas para administração tópica. As composições de hidrogel adequa-
30 das para administração tópica são conhecidas por pessoas versadas. Como indicado acima, os hidrogéis tipicamente contêm uma rede de cadeias de polímero naturais ou sintéticos dispersas em água. Os hidrogéis são geral-

mente usados para reter ou absorver umidade ou água. Os hidrogéis particularmente adequados no contexto da presente invenção são preparados com hidrocolóides tais como alginatos, carbômeros (ácidos poliacrílicos) (tais como, carbopol), celulose e derivados destes tais como celulose de carboximetila (CMC), etc..

5 Outro hidrocolóides adequados são alumina, betonita, amido, glicogênio, gelatina, pectina, quitosana, quitina, goma arábica, goma de feijão alfarreira, goma caraia, goma de tragacanto, goma de *ghatti*, ágar-ágar, carrageninas, goma de alfarroba, goma guár, goma xantam, polimetacrilato de glicerila, povidona, poloxâmero (IUPAC:2 - metiloxirano; oxirano);
10 silicatos de dióxido de silício/[Alumínio-Magnésio].

 De acordo com modalidades particulares, a viscosidade do hidrogel das composições é considerada ser apropriada para aplicação na pele. Descobriu-se que a concentração do hidrocolóide no hidrogel também
15 tem um efeito na atividade terapêutica curativa de ferimento. A viscosidade de um hidrogel difere dependendo fortemente do tipo de colóide usado. Os hidrogéis particularmente adequados para uso no contexto da presente invenção são hidrogéis que têm uma viscosidade entre 4 e 4.000.000 mPa.s (água = 1 mPa.s). Tipicamente, a viscosidade considerada é menor do que
20 450.000 mPa.s. Uma modalidade particular da invenção refere-se à hidrogéis que têm uma viscosidade dentre 2000 - 300.000 mPa.s. Dependendo da aplicação e da natureza do hidrocolóide, os hidrogéis com uma viscosidade diferente podem ser usados. Por exemplo, em sprays, um hidrogel com uma viscosidade entre 2000 - 6000, mais particularmente entre 3000 e 5500
25 é usado, ao mesmo tempo em que para géis para aplicação manual com base em, por exemplo, um hidrocolóide de carbopol, um hidrogel com uma viscosidade entre 20.000 e 50.000 é tipicamente usado.

 Em modalidades particulares da invenção, os hidrocolóides do hidrogel presentes em composições de acordo com a invenção são pelo
30 menos parcialmente reticulados, por exemplo, com éteres de alila de pentaeritritol (carbopol[®] 974P NF ou Carbopol[®] 980 NF). Em modalidades particulares os hidrocolóides não são reticulados entre si ou com uma matriz (por

exemplo, celulose ou algodão) no hidrogel.

Em modalidades particulares as composições que são consideradas são soluções aquosas que compreendem uma ou mais formas de PEG, mais particularmente PEG de Mr baixo em uma concentração de 0,1% a 10% (peso/peso), particularmente entre 0,3 e 6%. As soluções aquosas consideradas são soluções fisiológicas opcionalmente compreendendo um tampão.

O hidrogel ou composição aquosa que compreende PEG para o tratamento de cicatrização de ferimento de acordo com a presente invenção pode ser embalado como um tubo, garrafa ou um recipiente descartável. Alternativamente é considerado que as soluções aquosas ou composições de hidrogel são fornecidas em ou dentro de uma gaze ou tecido ou fornecidas em um tubo de jarro ou em recipiente spray para pulverizar o hidrogel ou solução aquosa na pele.

Aqui, na seção de Exemplos, é demonstrado que uma composição que compreende PEG, especialmente PEG de Mr baixo, isto é, de Mr 1500 ou menos, mais particularmente um Mr de 700 ou menos, quando presente em baixas concentrações, isto é, tipicamente abaixo de 10% (peso/peso) e particularmente entre 1 e 3% (peso/peso) tem uma influência na expressão de certas proteínas que são benéficas para a redução de inflamação e na cicatrização de ferimento. Conseqüentemente, a presente invenção fornece o uso de PEG como um ingrediente ativo de uma composição tópica para a redução ou ajuda na redução de inflamação e/ou para reduzir ou prevenir cicatriz. Mais particularmente, a invenção fornece o uso de PEG como um ingrediente ativo na fabricação de um medicamento tópico por tratar inflamação e/ou cicatrização de ferido. Conseqüentemente, as composições são fornecidas compreendendo 0,1-10% (peso/peso), particularmente 0,3 - 6% (peso/peso), e mais particularmente entre 1 e 3 (peso/peso) de PEG, correspondendo a uma ou mais formas de PEG dentre 200 e 700 Pm que são particularmente adequadas para o tratamento de distúrbios inflamatórios de pele e mucosas.

De acordo com modalidades particulares, as composições da

presente invenção são topicamente aplicadas à pele ou mucosa (incluindo nariz e orelha), que são afetados pela inflamação. A inflamação destes tecidos é caracterizada pelo seguinte quinteto: vermelhidão (rubor), alta temperatura (calor), inchaço (tumor), incômodo (dor) e quando aplicável, disfunção orgânica dos órgãos envolvidos (*functio laesa*).

Os distúrbios inflamatórios de pele típicos considerados no contexto da presente invenção são eczema, acne, rosácea e muitos outros incluindo psoríase, urticárias, dermatite de contato (tal como dermatite ocupacional) e sumagre venenoso. Eczema, também conhecido como dermatite atópica, faz com que a pele fique seca, sarnenta e inflamada. As doenças inflamatórias da mucosa incluem, porém não estão limitadas às doenças inflamatórias dos seios nasais e paranasais, doenças da orelha inflamatórias crônicas, tais como otite média crônica.

Como detalhado acima, as modalidades particulares da invenção consideram a combinação de PEG e outros ingredientes ativos, tais como protetores solares ou agentes de aquecimento. Em modalidades particulares, entretanto as composições não compreendem os agentes irritantes tais como aqueles tipicamente encontrados em medicamentos tópicos tais como materiais de aquecimento (por exemplo, capsaicina ou mentol) e/ou protetores solar (por exemplo, compostos de absorção de UV com base em ácido benzóico, compostos de absorção de UV com base em ácido antranílico, compostos de absorção de UV com base em ácido salicílico, compostos de absorção de UV com base em ácido cinâmico, compostos de absorção de UV com base em benzofenona). As composições de acordo com este aspecto da invenção evitam a irritação da pele durante a cura.

De acordo com modalidades particulares, a composição da presente invenção é topicamente aplicada a um ferimento. Os ferimentos típicos considerados na presente invenção são ambos ferimentos abertos e fechados, incluindo ferimentos crônicos tipo úlceras da perna crônicas, úlceras diabéticas, úlcera de decúbito, ferimentos agudos (tais como, cortes de faca, arranhadura), que se beneficiariam de promoção de cicatrização de ferimento, ferimentos que são difíceis de curar tal como, porém não limitadas aos

ferimentos infectados, ferimentos de queimadura (de graus diferentes) incluindo queimadura de sol, ferimentos pós-operativos, transplantes de pele e ferimentos traumatológicos.

A presente invenção fornece composições que compreendem
5 0,1-10%, particularmente 0,3-6% (peso/peso) de PEG, e mais particularmente entre 0,5 e 3% (peso/peso), particularmente entre 0,5 e 2% (peso/peso) e que são particularmente adequadas para uso durante o estágio inicial de cicatrização de ferimento quando uma redução na metaloproteinases de matriz (MMPs) pode prevenir a ruptura de matrizes recentemente geradas nos
10 ferimentos. As composições farmacêuticas da presente invenção também são adequadas para o tratamento de cicatrizes, onde a composição é aplicada nos estágios posteriores de cicatrização de ferimento.

Um aspecto adicional da presente invenção fornece métodos para o tratamento tópico de inflamação e/ou de ferimentos e/ou a promoção
15 de reparo de pele e/ou reparo de ferimento e/ou prevenção de formação de cicatriz e cura, cujos métodos compreendem a etapa de aplicar as composições da presente invenção que compreendem um ou mais PEGM em uma concentração de 0,3-10% topicamente, a um paciente em necessidade desta.

20 Como detalhado acima, o tratamento de tipos diferentes de ferimentos e distúrbios inflamatórios de pele ou mucosa são considerados para as composições da presente invenção. Os ferimentos são tipicamente caracterizados como qualquer ferimento necrótico seco, ferimentos fibrinosos macios (com escara) e ferimentos com granulação/epitelialização. Dependendo
25 da natureza do leito do ferimento, isto é, a quantidade de exsudato formado, da contaminação bacteriana etc., a frequência de aplicação das composições da presente invenção pode diferir. Similarmente, dependendo da natureza e severidade da condição inflamatória da pele ou mucosa, a frequência de aplicação das composições da presente invenção pode diferir.

30 A presente invenção considera aplicação repetida das composições da presente invenção onde apropriado, uma vez a cada 5 dias, mais particularmente entre uma vez a cada 24 h e uma vez a cada 72 h. Alternati-

vamente, a aplicação é considerada uma vez a cada 12 h, ou uma vez a cada 4 h, ou uma vez a cada 2 h. Alternativamente, as presentes composições podem ser consideradas para uso único. As composições da presente invenção podem ser embaladas em tubos de 10 g para uso único ou em tubos de, por exemplo, 30-500 g para uso múltiplo, ou em sprays para uso único ou múltiplo. Independente disto, tipos diferentes de embalagem são considerados incluindo tubos, sprays (boca, pele ou orelha), garrafas, dispositivos de rolo, bastões, supositórios ou dispositivos vaginais, gotas otológicas, colírio, etc.

10 Adicionalmente ou alternativamente, composições consideradas na presente invenção são aplicadas à área do ferimento e/ou à área da inflamação desse modo evitando ou reduzindo a probabilidade de formação de cicatriz.

15 As composições consideradas na presente invenção são tipicamente aplicadas como curativo de ferimento, mais particularmente como hidrogéis ou soluções aquosas.

Os hidrogéis ou hidrogel que compreendem as composições da presente invenção têm as seguintes vantagens no contexto de cicatrização de ferimento:

20 - eles criam um ambiente de ferimento úmido
 - eles não aderem agressivamente ao ferimento, são facilmente removidos.

 - eles têm uma atividade de purificação (promovendo-se debridamento autolítico)

25 - eles têm um efeito calmante pelo efeito refrescante da água no hidrogel

 - eles têm um efeito de absorção de umidade (pela dilatação do gel, que previne as bordas de pele saudável de tornarem-se moles devido ao encharcamento).

30 Os ferimentos curam melhor quando eles são mantidos úmidos. As células de pele que garantem o processo curativo crescem rapidamente e a cicatrizar é reduzida. Em alguns ferimentos de pele, a pele fica tão seca

que a curando estagna ou para. Isto pode fazer com que o ferimento se torne maior e/ou mais profundo. Adicionando-se umidade externamente, as células de pele podem recuperar sua atividade curativa.

5 As composições da presente invenção são opcionalmente cobertas por uma gaze ou fornecidas como uma gaze impregnada. A presença dos hidrogéis ou soluções aquosas da presente invenção reduz a frequência com que a gaze precisa ser mudada, e é benéfico ao usuário, desse modo facilitando o cuidado com o ferimento ou pele. A cicatrização melhorada beneficia o reparo de pele e/ou ferimento.

10 Um outro aspecto da presente invenção refere-se ao uso de composições que compreendem PEG como descrito aqui *in vitro* e *in vivo* na manipulação de preparações de pele artificial. Devido ao efeito de PEG em expressão de VEGF, colágeno e citocinas inflamatórias, as composições são úteis na produção para a geração e/ou manutenção de pele artificial *in vitro* e
15 no cuidado de enxertos de pele *in vivo*.

A presente invenção é ilustrada por, porém não pretendida ser limitada no escopo dos seguintes exemplos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Toxicidade de PEG em células cultivadas

20 As células foram crescidas em DMEM (fibroblastos de 3T3 e ceratinócitos de HaCat) ou em RPMI1640 (macrófagos J774). Ambos meios foram suplementados com 10% de Soro de Bezerro Fetal inativado por calor (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma) e antibióticos (Sigma). As células foram semeadas subconfluentes em placas de 96 cavidades e contatadas
25 durante cerca de 16 horas com compostos de teste de PEG que foram dissolvidos em meios de crescimento (expressos como peso/peso de concentrações finais). A sobrevivência da célula foi ensaiada pela conversão de sal de tetrazólio solúvel em um formazan de cor rosa e insolúvel (absorção medida em 570nm). PEG foram adquiridos de Sigma e são da Farmacopéia
30 Européia ou grau USP.

As células foram incubadas durante a noite com concentrações variadas de PEG 400 (0,31-10% peso/peso). De 5% em diante, PEG tem um

efeito citotóxico em células cultivadas *in vitro*, especialmente em ceratinócitos (figura 1A) e em macrófago (figura 1B), e em menor grau em fibroblastos (figura 1C). As concentrações abaixo de 5% não têm nenhum efeito prejudicial em quaisquer dos tipos de célula ensaiados.

5 **Exemplo 2: Influência de PEG em expressão de MMP**

As células de macrófago foram pré-condicionadas durante 30 minutos com concentrações variadas de PEG400 (0,31-10% em peso/peso) e em seguida desafiadas com as bactérias de *E. coli* inativadas por calor. Em seguida, as células foram também incubadas durante a noite. O sobrenadante de células foi analisado para proMMP-9 de acordo com as indicações do fabricante (R&D systems, Abingdon, UK).

Figura 2 mostra que a secreção de proMMP9 pela linhagem de célula de macrófago J774 foi significativamente reduzido com concentração de PEG 400 de cerca de até aproximadamente 1% (peso/peso).

MMPs (metaloproteinases de matriz) são proteinases extracelulares que rompem colágenos. Embora eles sejam necessários durante a cicatrização de ferimento de estágio tardio, uma quantidade aumentada de MMPs em ferimentos crônicos ou durante os estágios iniciais de cicatrização de ferimento é prejudicial, uma vez que eles rompem a matriz recentemente gerada. Consequentemente, a modulação de expressão de MMP é desejada especialmente na cicatrização de ferimento crônico.

20 **Exemplo 3: Influência de PEG em expressão de VEGF.**

As células de fibroblastos foram incubadas durante a noite com concentração variada de PEG 400 (0,31-10% em peso/peso). A expressão de VEGF foi ensaiada por ELISA (R&D Sytems, Abingdon, UK).

Figura 3 mostra que a expressão de VEGF aumenta em concentrações de PEG400 entre 2% e 10% com um máximo em 5%.

VEGF é um citocina com um papel importante durante a cicatrização de ferimento inicial, estimulando-se a angiogênese. Ao estimular com VEGF, os ferimentos produzem tecido de granulação mais facilmente. Consequentemente, a super-regulação de VEGF é desejável na cicatrização de ferimento.

Exemplo 4: Influência de derivados de PEG em expressão de citocina.

As células foram incubadas durante a noite com concentrações variadas de um derivado de PEG. Figura 4A mostra que a expressão de VEGF em células de fibroblasto não-inflamatórias 3T3 é influenciada por
5 quantidades crescentes de diácido de PEG 600 (0,078-0,625% em peso/peso). Figura 4B mostra que a expressão de pró-MMP9 em células de J774 (desafiadas bactérias de *E. coli* inativadas por calor após pré-incubação durante 30 minutos) é reduzida sob incubação com diácido de PEG600 ou PEG 250 DME. Como pode ser visto na figura, ambos os derivados de
10 PEG diminuem a expressão da proteína a pró-inflamatória pro-MMP9.

Figura 4C mostra a influência de derivados de PEG na expressão da IL-6 de citocina pró-inflamatória por células de macrófago J774 após estimulação por uma suspensão de bactéria de *E.coli* inativada por calor. As células foram cultivadas com ou sem PEG (diácido de PEG600). A expres-
15 são de IL-6 é reduzida em cerca de 30% quando PEG é adicionado.

Figura 4d mostra a influência de derivados de PEG (diácido de PEG 600, PEG350 MME e PEG250 DME) na expressão do citocina anti-inflamatória TGF-beta1.

Os derivados de PEG ligeiramente aumentam a expressão de
20 TGF-beta 1 em células de macrófago J774, em uma concentração dependente do modo. O efeito é moderado, porém fornece evidência que os derivados de PEG não diminuem a expressão de todas as citocinas em macrófago. A expressão diminuída do pro-MMP9 vista em experiências prévias não pode ser atribuída a uma diminuição geral na expressão de proteína sob
25 adição de PEG.

Exemplo 5: Influência de peso molecular de PEG e derivados de PEG em PBMCs humanos (células mononucleares do sangue periférico).

PBMCs foram isolados de camadas leucocitárias através de centrifugação de Ficoll-Paque de acordo com o protocolo dos fabricantes (Sigma). A seguir, as células foram lavadas duas vezes com PBS/1 mM de EDTA para remover plaquetas. Após incubação durante a noite a 37°C, 5% de CO₂, células não-aderentes foram removidas e as células foram permitidas
30

crescer durante um adicional de 21 dias em meio de crescimento (glicose elevada de DMEM, 10% de FCS, 4 mM de L-glutamina, antibióticos). Neste momento, as células ficam aderentes aos copos das cavidades e têm uma morfologia distinta.

5 PEG e derivados de PEG foram dissolvidos em meio de crescimento em concentrações indicadas (peso/peso). As células foram permitidas crescer durante 30 minutos em PEG compreendendo meio (pré-condicionamento) antes que 100 ng/ml de LPS (Lipopolissacarídeo) fossem adicionados. As células foram incubadas durante um adicional de 16 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e analisado quanto às citocinas indicadas (R&D Systems, Abingdon, UK). Os resultados são médias de duas experiências independentes e são indicados como porcentagem comparado ao controle.

10 O uso de 2,5% de PEG de tipos diferentes de PEG (Mr e derivados) reduziu a secreção de TNF alfa pró-inflamatória em PBMCs após estimulação com LPS (figura 5a). A citocina anti-inflamatória TGF beta 1 foi claramente super-régulada por PEGs e derivados de PEG.

Exemplo 6: Efeito de PEG400 em expressão de proteína na presença de excipientes farmacêuticos.

20 Os macrófagos de J774 foram pré-condicionados durante 30 minutos com os géis e foram então desafiados com 100 ng/ml de LPS. As células 3T3 não foram desafiadas com bactérias. Em seguida, as células de macrófago de murino J774 e de fibroblasto de murino 3T3 foram incubadas com os géis durante 16 horas a 37°C, 5% de CO₂. A seguir, o meio foi coletado, centrifugado em 14.000 rpm durante 20 minutos para remover o material particulado e foi ensaiado para as proteínas segregadas indicadas. Os resultados são a média de duas experiências independentes e são expressos como porcentagens da experiência de controle.

A: Gel de Na⁺-Ca⁺⁺ alginato

30 Um hidrogel foi feito dissolvendo 2 g de Kelset (Na⁺-Ca⁺⁺ alginato) e 5 g de PEG400 em um volume final de 100 ml de meio de crescimento [DMEM glicose elevada, 10% de FCS, 4 mM de L-Glutamina, antibióticos].

Esta mistura foi também diluída com um adicional de 100 ml de meio de crescimento para reduzir a viscosidade das soluções. A concentração final de PEG400 foi 2,5%.

Uma solução similar sem PEG400 foi usada como controle.

5 Figura 6A mostra que a expressão de IL-6 em células 3T3 foi diminuída, considerando que a expressão do VEGF de fator de crescimento foi ligeiramente aumentada pelo hidrogel que conteve 2,5% de PEG400.

Figura 6B mostra que a secreção tanto das citocinas pró-inflamatórias IL-6 quanto pró-MMP9 foi reduzida em células J774 por PEG.

10 B: Gel de poliacrilato

Um hidrogel foi feito dissolvendo-se 1g de Carbopol (poliacrilato), 5g de PEG400, 2,1g de Arginina e 3g de PCL (octanoato de cetearila) em um volume total de 100 ml de meio de crescimento [DMEM (glicose elevada), 10% de FCS, 4mM de L-glutamina, antibióticos]. Esta mistura foi também diluída com um adicional de 100 ml de meio de crescimento para reduzir a viscosidade das soluções. As culturas de macrófago de murino J774 foram usadas. A concentração final de PEG400 em contato com as células foi 2,5%. Uma solução similar sem PEG400 foi usada como controle.

20 Figura 7 mostra que a expressão tanto das pró-inflamatórias IL-6 quanto de pró-MMP9 foi reduzida após contatar as células com um hidrogel contendo PEG.

C: Gel de carboximetilcelulose

Um hidrogel foi feito dissolvendo-se 3g de CMC (Na⁺-carboximetilcelulose), e 5g de PEG400 em um volume final de 100 ml de meio de crescimento [DMEM (glicose elevada), 10% de FCS/4mM de L-glutamina, antibióticos]. Esta mistura foi também diluída com um adicional de 100 ml de meio de crescimento para reduzir a viscosidade das soluções. As culturas de macrófagos de murino J774 foram usadas. A concentração final de PEG400 foi 2,5%. Uma solução similar sem PEG400 foi usada como controle.

30 Figura 8 mostra que a expressão das citocinas IL-6 foi claramente reduzida após as células terem sido desafiadas com 100ng/ml de LPS, considerando que a expressão de pró-MMP9 foi menos reduzida após conta-

tar as células com um hidrogel contendo PEG.

A comparação dos resultados de B e C mostra que o "veículo" (carbopol versus CMC) também tem uma influência sobre as proteínas segregadas (expressadas) por células J774. Não obstante, em toda condição
5 PEG400 diminui a expressão das proteínas pró-inflamatórias.

Os exemplos acima demonstram que PEG400 modula a expressão de várias proteínas (em particular, MMP, citocinas inflamatórias) que têm um papel na cicatrização de ferimento. A redução dos níveis de metalo-
10 proteínases de matriz em ferimentos crônicos restabelece a deposição de colágeno e reduz a destruição de colágeno. Isto, por sua vez, promove a geração de um leito de granulação ideal. VEGF no leito de ferimento estimula as células endoteliais e aumenta a angiogênese, resultando em fluxo de sangue aumentado para o sítio do dano. Embora PEG400 seja citotóxico de
15 concentrações de cerca de 5% (peso/peso) em diante, há uma janela terapêutica (entre cerca de 0,3 e 6% de PEG (peso/peso)) e particularmente entre 1 e 3% (peso/peso) de PEG400 em que um efeito benéfico de PEG400 é notado.

Exemplo 7: Efeito de PEG400 em VEGF e expressão de proteína de Colágeno III.

20 VEGF

A expressão de VEGF em administração de PEG e/ou outros umectantes foi investigada em células endoteliais vasculares (SVEC) e em células de fibroblasto (3T3). O papel benéfico de expressão de VEGF na cicatrização de ferimentos isquêmicos é descrito em Corral e outros (1999)
25 Arch. Surg. **134**, 200-205.

A administração de 4% de PEG 400, 4% de propileno glicol e 4% de glicerol a estas células, mostra que a expressão mais elevada de VEGF foi obtida com PEG e que a diferença em expressão de VEGF entre células endoteliais e fibroblastos é mais proeminente com PEG400 (veja figura 9).

30 Figura 10 mostra que as formulações combinadas de PEG400 com propileno glicol têm um efeito menor em expressão de VEGF do que as composições que compreendem PEG400 somente.

Colágeno

A expressão tipo III de colágeno é aumentada durante a fase inicial de cicatrização de ferimento no tecido de granulação (Haukiporo e outros (1987) Ann. Surg. 206, 752-756). Os ferimentos crônicos são caracterizados por atividade de colagenase elevada e degradação de colágeno consequente. O uso de compostos de indução de colágeno é consequentemente benéfico tanto na cicatrização de ferimento inicial quanto no tratamento de ferimentos crônicos. Além disso, o aumento em componentes de tecido de granulação é benéfico para uma cicatrização mais rápida do ferimento, que reduz o risco de complicações que resultam em formação de cicatriz.

Em comparação da administração de 4% de PEG 400, 4% de propileno glicol e 4% de glicerol às células 3T3, descobriu-se que a expressão mais elevada de colágeno foi obtida com PEG400 (figura 11). Este aumento de expressão de colágeno III foi significativa comparada ao controle.

Exemplo 8: Aplicação *in vivo* de composições de PEG em ferimentos em um modelo de cicatrização de ferimento de camundongo.

A cicatrização de ferimento de composições que compreendem PEG é avaliada em um modelo de cicatrização de ferimento de camundongo.

O ensaio é realizado em camundongos tipo silvestre e em camundongos mutantes com uma mutação no receptor de leptina (BKS, Cg-m +/- Leps) (Jackson Laboratory, Maine, USA). Estes camundongos são diabéticos e têm cicatrização de ferimento prejudicada.

Procedimento: o pelo das costas dos camundongos é raspado, os camundongos são anestesiados e ferimentos de espessura completa são aplicados com um aparato de biópsia para furar a pele. 6 ferimentos são aplicados por animal. Após a aplicação, uma composição de hidrogel é aplicada consistindo em carbopol, arginina alcalinizante e 1% de PEG. Os camundongos são sacrificados no dia 0, 7, 14 e 21 após aplicação de PEG ou composição de controle nos ferimentos e a pele é avaliada visualmente e com métodos imunoistoquímicos.

Exemplo 9: Aplicação *in vivo* de um produto tópico compreendendo

PEG em pele humana.

5 A) Um menino de dois anos de idade sofreu arranhaduras em sua perna após uma queda na rua. Um hidrogel de carbopol que contém 1% de PEG400 foi aplicado duas vezes por dia no ferimento. Nenhum curativo secundário pôde ser aplicado visto que o menino continuou a arrancá-lo. O ferimento cicatrizou satisfatoriamente em 3 dias sem sinais de inchaço ou qualquer outra complicação inflamatória frequentemente encontrada em tais acidentes.

10 B) Um jogador de futebol profissional 28 anos de idade sofreu um arranhão relativamente grande por uma ação de deslizamento em um campo de futebol americano seco. O ferimento ficou coberto com lama e escombros. Após um enxágue breve, um hidrogel de carbopol que contém 1% de PEG400 foi aplicado no ferimento e foi coberto por um curativo secundário. O gel foi aplicado uma vez por dia. O jogador informou a cicatriza-
15 ção sem complicações inflamatórias em 3 dias, ao passo que da experiência levou 4-6 dias em intervenções prévias.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma ou mais formas de Polietileno Glicol (PEG) com um Mr abaixo de 1500 como o único componente anti-inflamatório caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para o tratamento de inflamação da pele ou mucosa na forma de um hidrogel ou uma
5 solução aquosa compreendendo as referidas uma ou mais formas de Polietileno Glicol (PEG) em uma concentração entre 0,5 e 5% (peso/peso).

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender as referidas uma ou mais formas de Polietileno Glicol (PEG)
10 no referido medicamento em uma concentração entre 0,5 e 3% (peso/peso).

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de compreender a referida uma ou mais formas de Polietileno Glicol (PEG) no referido medicamento em uma concentração entre 1 e 2,5% (peso/peso).

4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o referido medicamento não contém nenhum umectante além de PEG.
15

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais formas de PEG tem um Mr entre cerca de 200 e 700.
20

6. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o hidrogel é um hidrocolóide de poliacrilato com uma concentração entre 0,05-20%.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida inflamação ocorre em um ferimento ou doença inflamatória da pele ou mucosa.
25

8. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o medicamento ser para o tratamento de inflamação para prevenir a formação de cicatriz ou para reparar a pele ou mucosa danificada.

9. Composição de hidrogel ou solução aquosa, caracterizada pelo fato de compreender uma ou mais formas de PEG com um Mr abaixo de 1500 em uma concentração dentre 0,5 e 5% (peso/peso) como o único
30

componente anti-inflamatório para reduzir inflamação na pele ou mucosa.

10 Composição de ou solução aquosa, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a concentração da referida uma ou mais formas de Polietileno Glicol (PEG) é entre 0,5 e 3% (peso/peso).

5 11. Composição de hidrogel ou solução aquosa, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que a concentração da referida uma ou mais formas de Polietileno Glicol (PEG) é entre 1 e 2,5% (peso/peso).

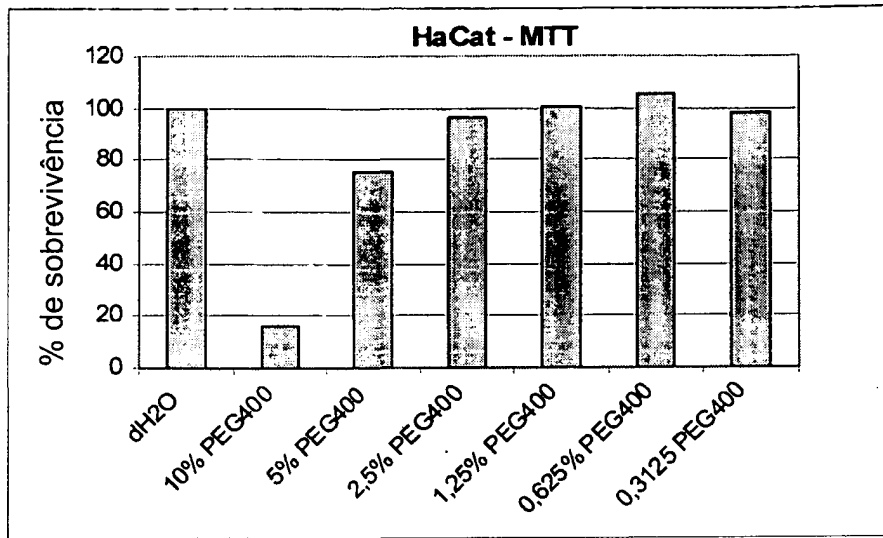
10 12. Composição de hidrogel ou solução aquosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizada pelo fato de que a redução na inflamação da pele ou mucosa promove a cicatrização de um ferimento e/ou previne a formação de cicatriz no tecido e/ou realça o reparo da pele.

15 13. Composição de hidrogel ou solução aquosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizada pelo fato de ser para a redução de inflamação da pele em uma doença inflamatória da pele.

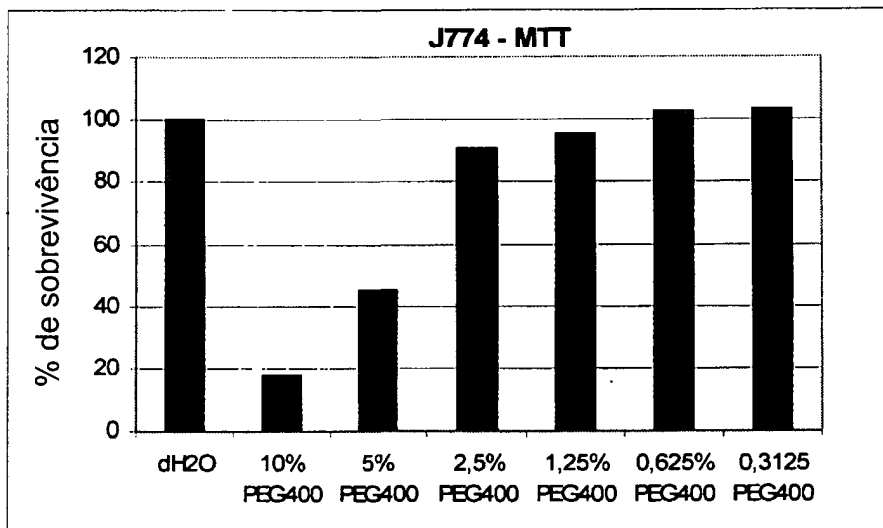
20 14. Composição de hidrogel ou solução aquosa, como definida em qualquer uma das reivindicações 9 a 13, caracterizada pelo fato de que a referida composição hidrogel ou solução aquosa não compreende um umectante além de PEG.

15. Composição de hidrogel ou solução aquosa de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o ferimento é um ferimento crônico.

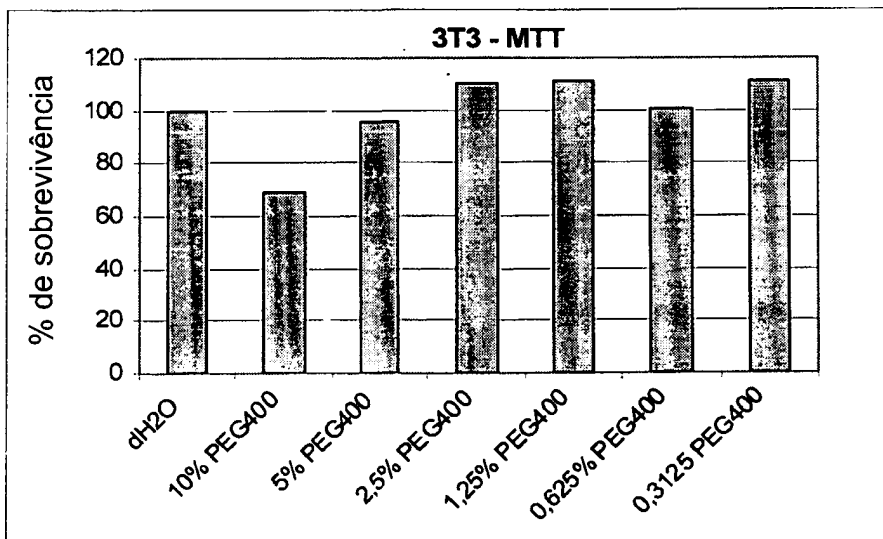
25 16. Composição de hidrogel ou solução aquosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 15, caracterizada pelo fato de que o hidrogel é um hidrocolóide de poliacrilato com uma concentração entre 0,05 e 20%.



A



B



C

FIG. 1

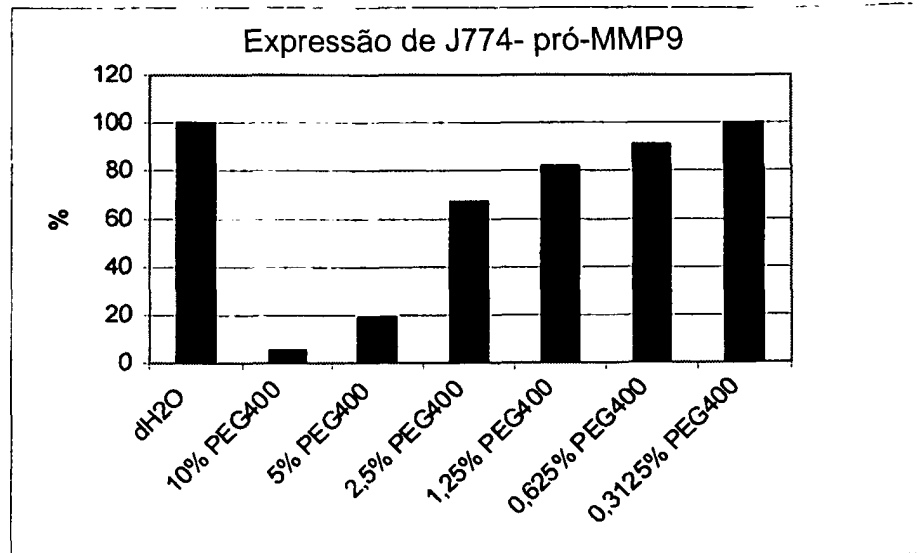


FIG. 2

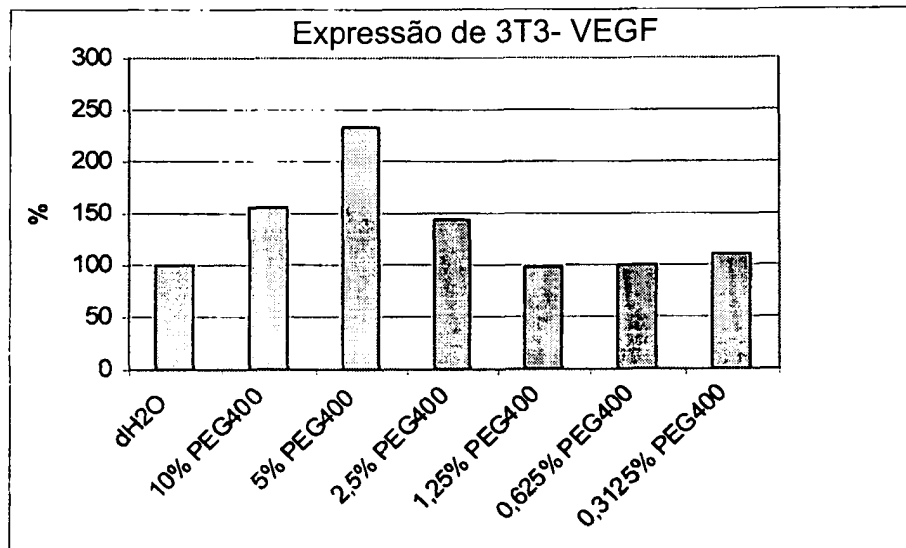


FIG. 3

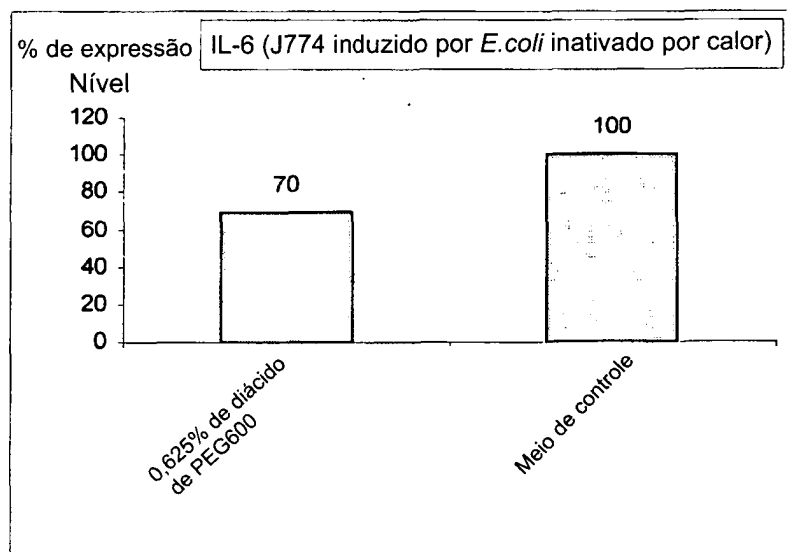
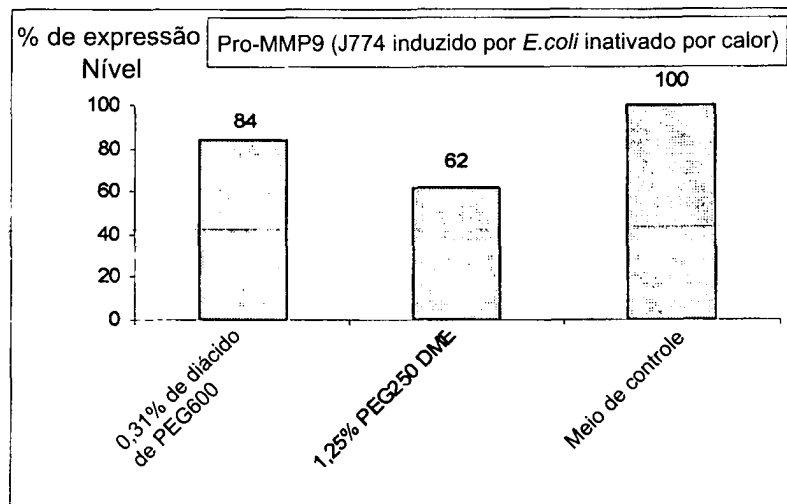
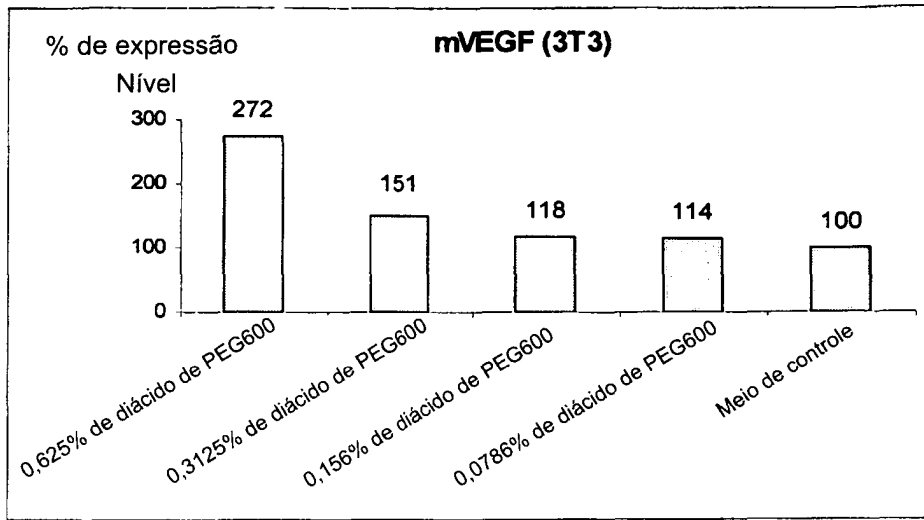
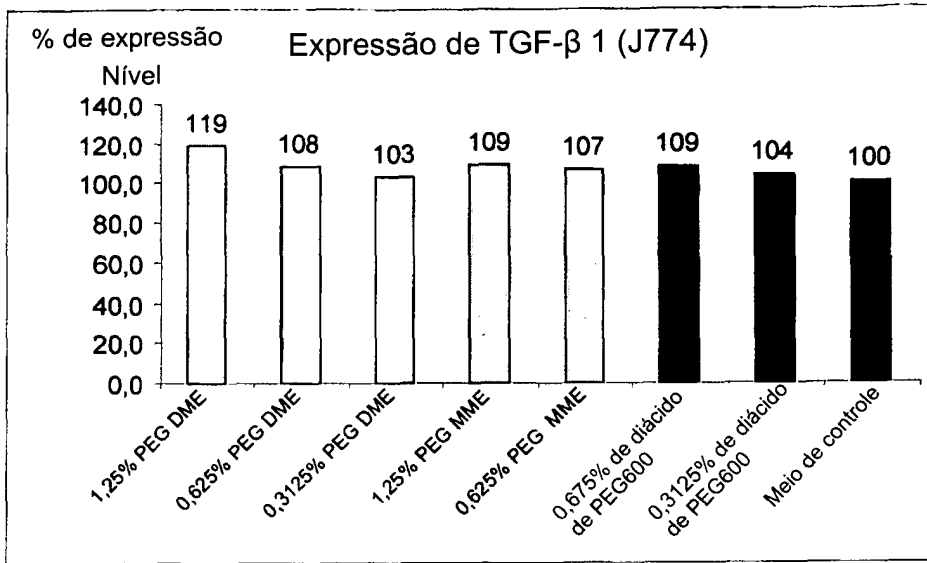
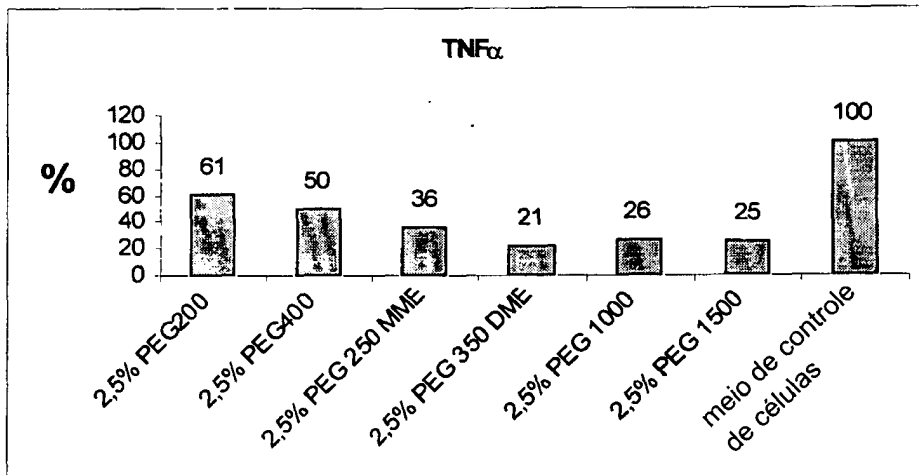


FIG. 4

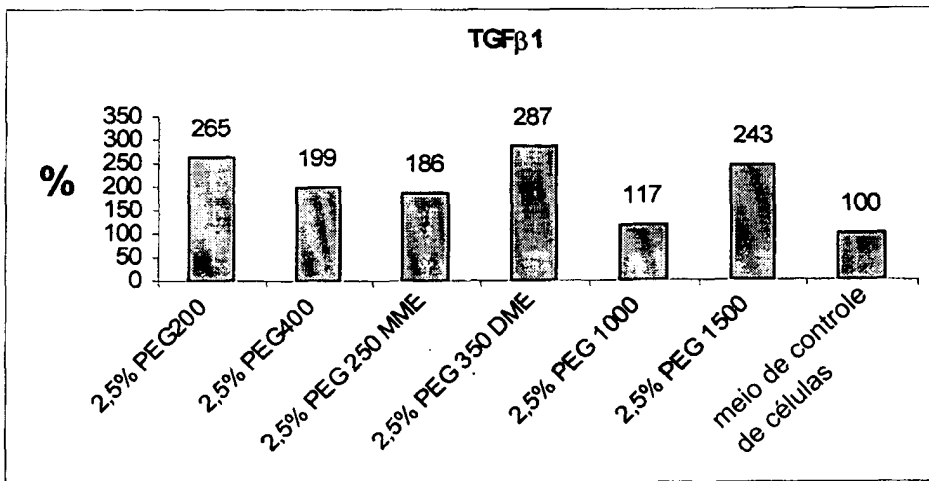


D

FIG. 4 (Continuação)



A



B

FIG. 5

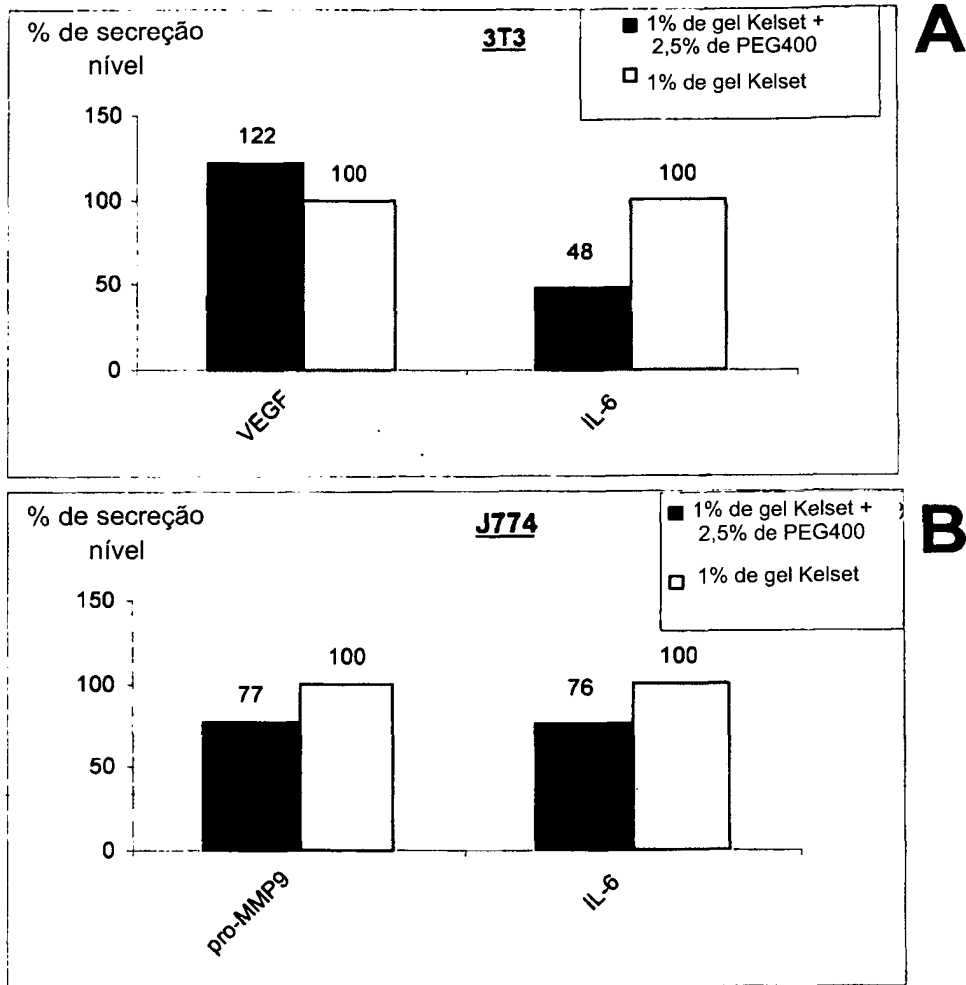


FIG. 6

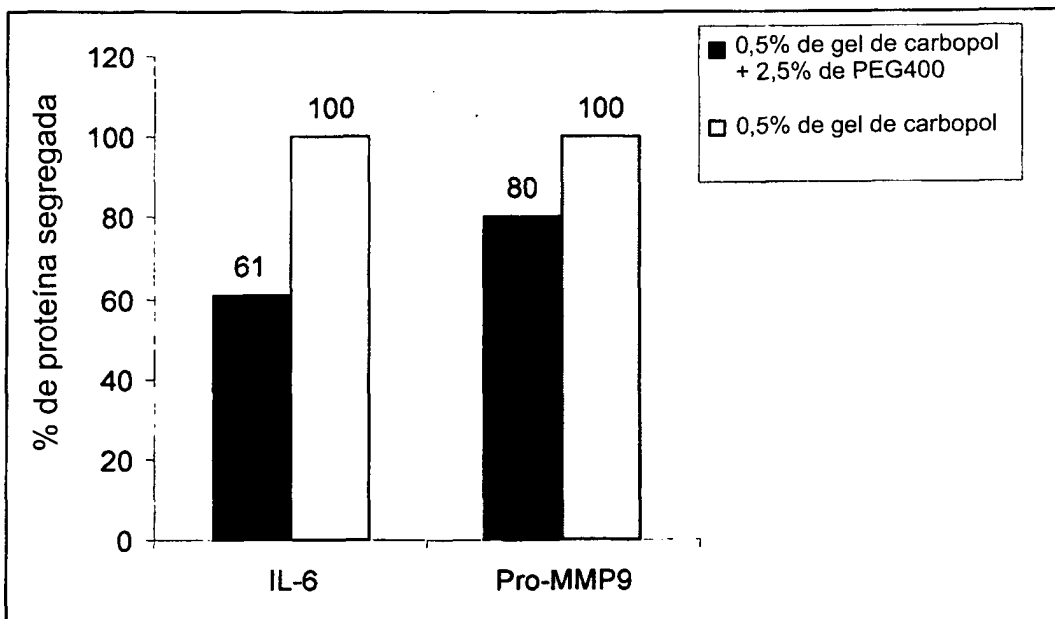


FIG. 7

6/7.

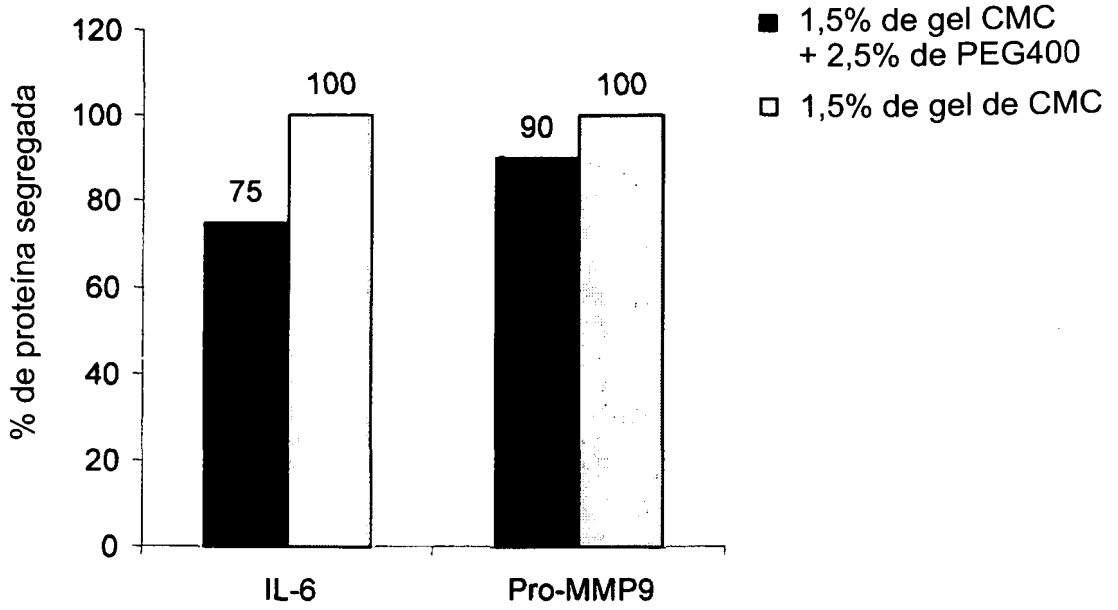


FIG. 8

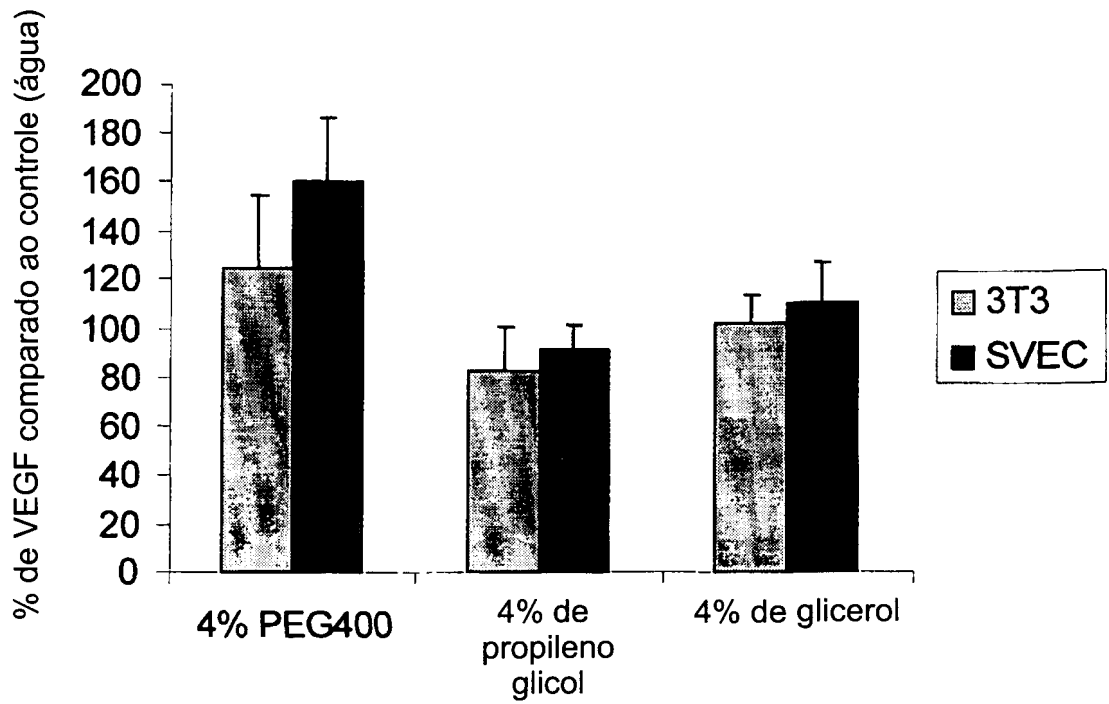


FIG. 9

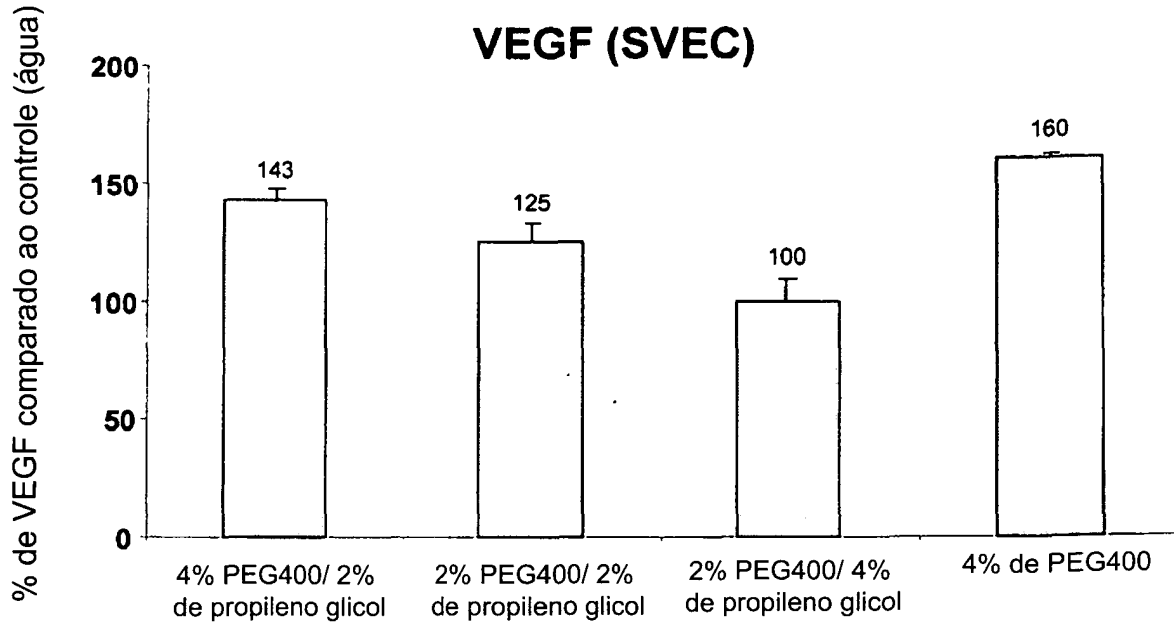


FIG. 10

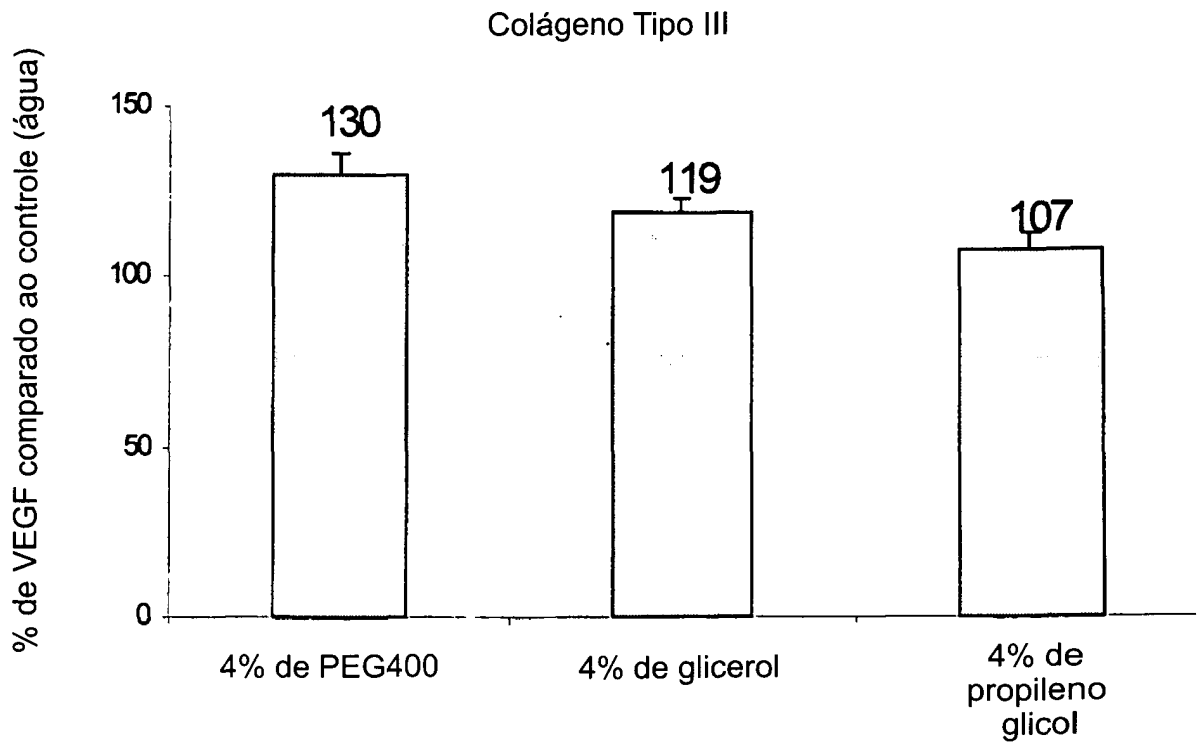


FIG. 11