

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

(21) **PI0615974-5 A2**

(22) Data de Depósito: 27/07/2006
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)



(51) *Int.Cl.:*
A61F 2/00 2006.01

(54) Título: **USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OCULAR EM UM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA RECRUTAR UMA CÉLULA-TRONCO PARA UM TECIDO OCULAR DE UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DA MESMA, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU UM DISTÚRBIO OCULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REGENERAR A RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REPARAR OS DANOS AO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR A DEGENERAÇÃO MACULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR, KIT E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE AUMENTA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR**

(57) Resumo: USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OCULAR EM UM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA RECRUTAR UMA CÉLULA-TRONCO PARA UM TECIDO OCULAR DE UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DA MESMA, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU UM DISTÚRBIO OCULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REGENERAR A RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REPARAR OS DANOS AO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR A DEGENERAÇÃO MACULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR, KIT E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE AUMENTA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR A invenção apresenta de maneira geral métodos para recrutar células-tronco para um tecido ocular. Os métodos envolvem a indução de choque térmico no tecido ocular utilizando um laser sublimar e/ou um agente. Em algumas realizações, o choque térmico é induzido depois da administração de um agente que mobiliza HSCs.

(30) Prioridade Unionista: 27/07/2005 US 60/703,068,
21/10/2005 US 60/729,182, 21/10/2005 US 60/729,182

(73) Titular(es): University of Florida Research Foundation, Inc.,

(72) Inventor(es): Maria G. Grant, Shalesh Kaushal

(74) Procurador(es): David do Nascimento Advogados
Associados

(86) Pedido Internacional: PCT US06029392 de 27/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/014323 de 01/02/2007

USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OCULAR EM UM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA RECRUTAR UMA CÉLULA-TRONCO PARA UM TECIDO OCULAR DE UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DA MESMA, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU UM DISTÚRBIO OCULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REGENERAR A RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REPARAR OS DANOS AO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR A DEGENERAÇÃO MACULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR, KIT E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE AUMENTA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) é a causa mais comum de cegueira no mundo ocidental. Conseqüentemente, a DMRI é importante um problema de saúde pública. Aproximadamente 85 a 90% dos pacientes têm a forma não-exsudativa (seca) de DMRI. Isto consiste na atrofia do epitélio pigmentar da retina (RPE), despigmentação e perda do epitélio pigmentar da retina. A DMRI seca afeta a população idosa, comprometendo seriamente a qualidade de suas vidas. As opções de tratamento são limitadas. Excetuando os suplementos nutricionais e vitamínicos, não há nenhum tratamento específico eficaz para a forma da doença. As abordagens terapêuticas atuais para o tratamento da DMRI são ineficazes. Desse modo, métodos terapêuticos aperfeiçoados são urgentemente requeridos.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Conforme descrito abaixo, a presente invenção apresenta métodos para o tratamento de uma doença ocular

através da indução de uma resposta ao choque térmico que recruta células-tronco para o olho para reparar o tecido danificado.

Em um primeiro aspecto, a invenção apresenta um
5 método para eliminar uma doença ocular em um indivíduo. O método envolve a indução de choque térmico em pelo menos uma célula de um tecido ocular; e o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular, eliminando desse modo o distúrbio ocular. Em uma realização, o choque térmico é
10 induzido no tecido ocular utilizando a estimulação a laser visível sublimiar (SVL, sigla em inglês). Em uma outra realização, o choque térmico é induzido utilizando um composto pequeno selecionado do grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-
15 demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8 e H-71. Contudo, em uma outra realização, o choque térmico é induzido utilizando um polipeptídeo de choque térmico ou um vetor de expressão que contém um polinucleotídeo que codifica um
20 polipeptídeo de choque térmico (por exemplo, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp40). Contudo, em um outro aspecto, o polipeptídeo de choque térmico é Hsp70 ou Hsp90. Contudo, em uma outra realização, a célula-tronco é uma célula derivada da medula óssea, tal como uma célula-tronco hematopoiética.
25 Contudo, em uma outra realização, o método reduz pelo menos um sintoma da doença ou do distúrbio ocular. Em realizações adicionais, a doença ou o distúrbio ocular é qualquer um ou mais dentre retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma retinite pigmentosa, degeneração macular
30 relacionada à idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, drusas autossômicas dominantes e distrofia macular de Best, edema macular cistóide, descolamento da retina, danos fóticos, retinopatias

isquêmicas, doença degenerativa da retina induzida por inflamação, retinosquise juvenil ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML), e distrofia retiniana em favo de mel de Doyne.

5 Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um método para o recrutamento de uma célula-tronco para um tecido ocular de um indivíduo com necessidade da mesma. O método envolve a estimulação do tecido ocular com um laser sublimiar, em que o nível de estimulação é suficiente para
10 recrutar pelo menos uma célula-tronco para o tecido. Em várias realizações, o tratamento a laser caracteriza um ciclo de operação utilizado de 10% ou 15%; o laser sublimiar tem um comprimento de onda de pelo menos aproximadamente 100 nm a 2000 nm (por exemplo, 100, 200, 250, 300, 500, 750, 1000,
15 1250, 1500, 1750, 2000). Contudo, em outras realizações, a potência do laser sublimiar é de aproximadamente 5 mW a 200 mW (por exemplo, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 mW) e é administrada em um micropulso que tem uma duração de aproximadamente 0,001 milissegundo a 1,0 milissegundo (por
20 exemplo, 0,001, 0,005, 0,01, 0,025, 0,5, 0,75 ou 1,0 milissegundo). Em outras realizações, a energia do laser fica compreendida entre aproximadamente 10 mW a 100 mW, e a duração do micropulso é de 0,1 milissegundo. Além disso, em outras realizações, a estimulação aumenta a expressão ou a
25 atividade biológica de uma proteína de choque térmico selecionada do grupo que consiste em Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp40. Em outras realizações, o aumento é de pelo menos aproximadamente 5, 10, 20, 25, 50, 75 ou 100%, ou mais. Além disso, em outras realizações, a estimulação altera a
30 expressão ou a atividade de uma proteína selecionada do grupo que consiste em SDF-1, VEGF, HIF-1 α , cristalina, fator de transcrição induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) e CXCR-4. Além disso, em outras realizações, o método aumenta a

expressão de um polipeptídeo de Hsp70 ou de Hsp90 em pelo menos 10 vezes, 20 vezes, 40 vezes, 50 vezes, ou mais.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um método para o recrutamento de uma célula-tronco para um tecido ocular de um indivíduo com necessidade da mesma. O método envolve a administração de um agente a um indivíduo em uma quantidade suficiente para induzir choque térmico em um tecido ocular; e o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um método para a eliminação de uma doença ou um distúrbio ocular em um indivíduo com necessidade do mesmo. O método envolve a administração de um agente a um indivíduo em uma quantidade suficiente para induzir choque térmico em um tecido ocular; e o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular, desse modo eliminando a doença ou o distúrbio ocular.

Em um aspecto correlacionado, a invenção apresenta um método para a regeneração da retina em um indivíduo com necessidade do mesmo. O método envolve a administração de um agente a um indivíduo em uma quantidade suficiente para induzir choque térmico em um tecido ocular; e o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular, regenerando desse modo a retina.

Em um outro aspecto correlacionado, a invenção apresenta um método para reparar danos do epitélio pigmentar da retina em um indivíduo com necessidade do mesmo. O método envolve a administração de um agente a um indivíduo em uma quantidade suficiente para induzir choque térmico em um tecido ocular; e o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular, reparando desse modo o epitélio do pigmento da retina.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta

um método para a melhora de uma doença ou um distúrbio ocular em um indivíduo com necessidade do mesmo. O método envolve a administração ao indivíduo de um agente que mobiliza uma célula-tronco derivada da medula óssea no indivíduo; a
5 indução de choque térmico em um tecido ocular; e o recrutamento da célula-tronco para o tecido ocular, desse modo melhorando a doença ou o distúrbio ocular.

Em um aspecto correlacionado, a invenção apresenta um método para melhorar a degeneração macular em um indivíduo
10 com necessidade do mesmo. O método envolve a administração ao indivíduo de GM-CSF e/ou Fator de Células-tronco, em que a administração mobiliza uma célula-tronco derivada da medula óssea no indivíduo; a indução de choque térmico em um tecido ocular por meio da administração de um tratamento de laser
15 sublimar ou um agente farmacológico; e recrutamento de células-tronco derivada da medula óssea para o tecido ocular, melhorando desse modo a degeneração macular.

Em um outro aspecto, a invenção apresenta uma composição farmacêutica para o recrutamento de células-
20 tronco, sendo que a composição contém uma quantidade eficaz de um composto pequeno selecionado do grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilageranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8 e H-71,
25 formulado em um excipiente farmacêuticamente aceitável para a aplicação ocular.

Em um outro aspecto, a invenção apresenta uma composição farmacêutica para o recrutamento de células-tronco em um tecido ocular, sendo que a composição contém um vetor
30 de expressão que contém um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de choque térmico (por exemplo, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp40) formulado em um excipiente farmacêuticamente aceitável para a aplicação ocular.

Em um outro aspecto, a invenção apresenta uma composição farmacêutica para o recrutamento de células-tronco em um tecido ocular, sendo que a composição contém um polipeptídeo (por exemplo, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 ou
5 Hsp40) formulado em um excipiente farmacêuticamente aceitável para a aplicação ocular.

Contudo, em um outro aspecto, o kit contém uma quantidade eficaz de um agente (por exemplo, um polipeptídeo, um polinucleotídeo ou um composto pequeno) que induz uma
10 resposta ao choque térmico em um tecido ocular e instruções para o uso do kit para aumentar o recrutamento de células-tronco. Em várias realizações, o polipeptídeo é Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp40. Contudo, em outras realizações, o polinucleotídeo codifica Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e
15 Hsp40. Além disso, em outras realizações, o composto pequeno é selecionado do grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8 e H-71.

Em um outro aspecto, a invenção caracteriza um
20 método para a identificação de um agente que aumenta o recrutamento de células-tronco em um tecido ocular, sendo que o método envolve a colocação de uma célula ocular em contato com um composto de teste; a identificação de um aumento na
25 expressão ou na atividade de um polipeptídeo de choque térmico em relação a uma célula ocular não-tratada, identificando desse modo um composto que aumenta o recrutamento de células-tronco.

Em um outro aspecto, a invenção apresenta um método
30 para a identificação de um agente que aumenta o recrutamento de células-tronco em um tecido ocular, sendo que o método envolve a colocação de uma célula ocular em contato com um composto do teste; e a identificação de um aumento no número

de célula-tronco no tecido.

Em várias realizações de qualquer um dos aspectos acima, o indivíduo tem uma doença ou distúrbio ocular selecionado do grupo que consiste em retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma, retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada à idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, drusas autossômicas dominantes e distrofia macular de Best, edema macular cistóide, descolamento da retina, danos fóticos, retinopatias isquêmicas, doença degenerativa da retina induzida por inflamação, retinosquise juvenil ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML) e distrofia retiniana em favo de mel de Doyme. Em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o agente aumenta a expressão ou a atividade biológica de uma proteína de choque térmico selecionada do grupo que consiste em Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp40. Contudo, em outras realizações, o agente altera a expressão ou a atividade de qualquer uma ou mais das seguintes proteínas: SDF-1, VEGF, HIF-1 α , cristalina, fator de transcrição induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) e CXCR-4. Além disso, em outras realizações dos aspectos acima, o método aumenta a expressão de um polipeptídeo de Hsp70 ou de Hsp90 em pelo menos aproximadamente 10 vezes ou pelo menos 40 vezes. Contudo, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, um agente que aumenta a mobilização das células-tronco hematopoiéticas (por exemplo, GM-CSF e/ou SCF) é administrado ao indivíduo antes da indução da resposta ao choque térmico. Além disso, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o método envolve adicionalmente a administração de um agente antiinflamatório ou de um agente antiangiogênico. Além disso, em outras realizações, o método envolve adicionalmente a administração de um agente que suporta a sobrevivência, a proliferação ou a

transdiferenciação de uma célula-tronco hematopoiética. Além disso, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o método envolve adicionalmente a administração de qualquer ácido trans-retinóico para intensificar a transdiferenciação da célula-tronco em uma célula epitelial pigmentar da retina. Além disso, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o agente que mobiliza a célula-tronco é um fator estimulante de colônias de macrófagos de granulócitos ou um fator de células-tronco. Contudo, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o choque térmico é induzido utilizando um tratamento de laser sublimar ou utilizando um agente que é um composto pequeno, um polipeptídeo ou uma molécula de ácido nucléico posicionada para a expressão em uma célula. Contudo, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o polipeptídeo é um polipeptídeo de choque térmico. Contudo, em outras realizações, a molécula de ácido nucléico codifica um polipeptídeo de choque térmico (por exemplo, Hsp70, Hsp90) ou codifica um polipeptídeo terapêutico (por exemplo, um polipeptídeo antiinflamatório ou um modulador de angiogênese). Além disso, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o agente farmacológico é selecionado do grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8 e H-71. Em várias realizações de qualquer um dos aspectos acima, o agente é administrado por meio de injeção intravital ou retro-orbital. Além disso, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, a administração induz o reparo celular da camada do RPE. Além disso, em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o método envolve adicionalmente a administração de um vetor que codifica um polipeptídeo terapêutico. Além disso, em outras realizações,

o método envolve adicionalmente a administração de uma célula-tronco substancialmente purificada (por exemplo, uma célula derivada de medula óssea ou célula-tronco hematopoiética ao indivíduo). Contudo, em outras realizações
5 de qualquer um dos aspectos acima, a célula-tronco é administrada localmente por meio de injeção intravital ou retro-orbital, ou sistemicamente.

A invenção apresenta métodos para o tratamento de várias doenças oculares. Outras características e vantagens
10 da invenção ficarão evidentes a partir da descrição detalhada e das reivindicações.

Por "agente" entenda-se qualquer composto químico de molécula pequena, anticorpo, molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo, ou fragmentos químicos dos mesmos.

15 Por "alteração" entenda-se uma mudança (aumento ou diminuição) nos níveis de expressão de um gene ou de um polipeptídeo tal como detectado pelos métodos conhecidos no estado da técnica tais como aqueles descritos acima. Tal como utilizado na presente invenção, uma alteração inclui uma
20 mudança de 10% nos níveis de expressão, preferencialmente uma mudança de 25%, mais preferencialmente uma mudança de 40%, e mais preferencialmente ainda 50% ou uma mudança maior de 10% nos níveis de expressão.

Por "melhorar" entenda-se a diminuição, a
25 supressão, a atenuação, o decréscimo, a manutenção ou a estabilização do desenvolvimento ou da progressão de uma doença.

Por "análogo" entenda-se uma molécula de polipeptídeo ou de ácido nucléico estruturalmente relacionada
30 que tem a função de uma molécula de polipeptídeo ou de ácido nucléico de referência.

Por "atividade biológica de uma proteína de choque térmico" entenda-se uma atividade protetora ou atividade de

recrutamento de células-tronco.

Por "composto" entenda-se qualquer composto químico de molécula pequena, anticorpo, molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo, ou fragmentos químicos dos mesmos.

5 Nesta descrição, "compreende", "que compreende", "que contém" e "que tem", e outros do gênero, podem ter o significado atribuído a eles na Lei de Patentes dos Estados Unidos e pode significar "inclui" "que inclui" e outros do gênero; "que consiste essencialmente em" ou "consiste
10 essencialmente" tem do mesmo modo o significado atribuído na Lei de Patentes dos Estados Unidos e o termo é "open-ended", permitindo a presença de mais do que aquilo que é recitado, contanto que as características básicas ou novas daquilo que é recitado não seja alterado pela presença de mais do que
15 aquilo que é recitado, mas exclui realizações do estado da técnica.

 Por "etiqueta detectável" entenda-se uma composição que, quando ligada a uma molécula de interesse, resulta no "latter detectable", através de meios espectroscópicos,
20 fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos ou químicos. Por exemplo, as etiquetas úteis incluem isótopos radioativos, grânulos magnéticos, grânulos metálicos, partículas coloidais, tinturas fluorescentes, reagentes densos de elétrons, enzimas (por exemplo, tal como utilizado geralmente
25 em um ensaio ELISA), biotina, digoxigenina ou haptenos.

 Um "ácido nucléico ou polipeptídeo etiquetado" é aquele que é ligado, tanto covalentemente, através de um ligante ou de uma ligação química, quanto não-covalentemente, através de ligações iônicas, forças de van der Waals,
30 atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio, a uma etiqueta de modo que a presença do ácido nucléico ou da sonda possa ser detectada pela detecção da presença da etiqueta ligada ao ácido nucléico ou à sonda.

Por "vetor de expressão" entenda-se um construto de ácido nucléico, gerado de modo recombinante ou sintético, que carrega uma série de elementos de ácidos nucléicos especificados que permitem a transcrição de um gene particular em uma célula hospedeira. Tipicamente, a expressão do gene é colocada sob o controle de determinados elementos reguladores, que incluem promotores constitutivos ou indutíveis, elementos reguladores de tecido preferidos e intensificadores.

Por "fragmento" entenda-se uma porção de uma molécula de polipeptídeo ou de ácido nucléico. Essa porção contém, preferencialmente, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% do comprimento inteiro da molécula de ácido nucléico ou do polipeptídeo de referência. Um fragmento pode conter 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ou 1.000 nucleotídeos ou aminoácidos.

Por "choque térmico" entenda-se qualquer resposta celular à resistência térmica. Tipicamente, as células respondem ao choque térmico aumentando a transcrição ou a tradução de um polipeptídeo de choque térmico (por exemplo, Hsp70 ou 90).

Por "polipeptídeo de choque térmico" entenda-se qualquer polipeptídeo expresso em uma célula em resposta à resistência térmica. Exemplos de polipeptídeos de choque térmico incluem, mas sem ficar a eles limitados, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp40. Exemplos de uma sequência de aminoácidos de Hsp70 é fornecida no Acesso N°. AAA02807 do GenBank. Um exemplo da sequência de aminoácidos Hsp90 é fornecida nos Acessos N°. 08238, NP 005339, NP 001017963 e P07900 do GenBank.

Por "ativador da resposta ao choque térmico" entenda-se um composto que aumenta a atividade protetora ou a

expressão de um componente do trajeto de choque térmico. Os componentes do trajeto de choque térmico incluem, mas sem ficar a eles limitados, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e membros pequenos da família Hsp. Agentes ou tratamentos que
5 induzem o choque térmico tipicamente aumentam a expressão ou a atividade de pelo menos um entre Hsp70 e Hsp90.

Por "célula-tronco hematopoiética" entenda-se uma célula derivada de medula óssea capaz fazer surgir uma ou mais células diferenciadas da linhagem hematopoiética.

10 Por "mobilização das células-tronco hematopoiéticas" entenda-se o aumento do número de células-tronco derivadas da medula óssea disponíveis para o recrutamento para um órgão ou para um tecido com necessidade do mesmo.

15 Por "doença ou distúrbio ocular" entenda-se uma patologia que afeta a função normal do olho.

Por "ligado de modo operável" entenda-se que um primeiro polinucleotídeo é posicionado de modo adjacente a um segundo polinucleotídeo que dirige a transcrição do primeiro
20 polinucleotídeo quando as moléculas apropriadas (por exemplo, as proteínas transcrpcionais ativadoras) são ligadas ao segundo polinucleotídeo.

Por "polipeptídeo" entenda-se qualquer cadeia de aminoácidos, não obstante o comprimento ou a modificação pós-
25 translacional.

Por "posicionado para a expressão" entenda-se que o polinucleotídeo da invenção (por exemplo, uma molécula de DNA) é posicionado de modo adjacente a uma sequência de DNA que dirige a transcrição e a tradução da sequência (isto é,
30 facilita a produção de, por exemplo, um polipeptídeo recombinante da invenção ou uma molécula de RNA).

Por "promotor" entenda-se um polinucleotídeo suficiente para dirigir a transcrição. Exemplos de promotores

incluem seqüências de ácido nucléico com comprimentos de 100, 250, 300, 400, 500, 750, 900, 1.000, 1.250 e 1.500 nucleotídeos que ficam a montante (por exemplo, imediatamente a montante) do sítio de início da tradução.

5 Por "recrutar" entenda-se atrair para a incorporação em um tecido.

Por "reduzir" ou "aumentar" entenda-se uma alteração negativa ou positiva, respectivamente, de pelo menos 10%, 25%, 50%, 75% ou 100%.

10 Por "regeneração da retina" entenda-se o aumento do número, da sobrevivência ou da proliferação das células na retina ou no epitélio pigmentado da retina.

Por "reparação de danos do epitélio pigmentar da retina" entenda-se a melhoria da lesão ao epitélio pigmentar, danos ou a morte celular.

15 Por "célula-tronco" entenda-se uma célula progenitora capaz de gerar um ou mais tipos de células diferenciadas.

Por "indivíduo" entenda-se um mamífero, incluindo, mas sem ficar a eles limitado, um ser humano ou um mamífero não-humano, tal como um bovino, eqüino, canino, ovino ou felino.

Por "laser sublimiar" entenda-se uma terapia a laser que induz uma lesão que é indetectável ou mal-detectável na retina durante ou depois do tratamento. Uma lesão é "indetectável" onde pouca ou nenhuma reação visível intra-operativa do tecido está presente ou onde pouca ou nenhuma morte celular (por exemplo, menos de 10%, 5%, 2,5%, 1% das células no tecido tratado morrem ou sofrem apoptose) devido ao tratamento a laser.

30 Tal como utilizado na presente invenção, os termos "tratar" "que trata", "tratamento" e outros do gênero referem-se à redução ou à melhora de um distúrbio e/ou dos

sintomas associados com o mesmo. Deve ser apreciado, embora não impossibilitado, que o tratamento de um distúrbio ou de uma condição não requer que o distúrbio, a condição ou os sintomas associados com o mesmo sejam completamente
5 eliminados.

Tal como utilizado na presente invenção, os termos "previne" "que previne" "prevenção", "tratamento profilático" e outros do gênero referem-se à redução da probabilidade de desenvolver um distúrbio ou uma condição em um indivíduo, que
10 não tenha, mas esteja em risco ou suscetível de desenvolver um distúrbio ou uma condição.

Por "referência" entenda-se uma condição padrão ou de controle.

Por "transdiferenciação" entenda-se a alteração da
15 célula, de modo que expresse pelo menos um polipeptídeo expresso caracteristicamente por uma célula de um tipo diferente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra uma série de montagens de tecido
20 ocular. As regiões escuras na Figura 1 representam as células de proteína verde fluorescente (GFP⁺, sigla em inglês) que foram incorporadas na camada do RPE nas áreas que receberam a radiação laser. A fluorescência de fundo, tal como determinada pelo olho contralateral (não-afetado), foi
25 removida. Do lado direito da Figura 1 corresponde a um ciclo de operação de 5%, e o lado esquerdo corresponde a um ciclo de operação de 10%.

A Figura 2 é um gráfico de incorporação de células-tronco hematopoiéticas (HSC, sigla em inglês) quantitativo no
30 epitélio pigmentar da retina (RPE).

A Figura 3 é uma série de painéis que mostram as montagens de tecido ocular extraídas de camundongos que receberam injeção sub-orbital de GFP⁺HSC em combinação com

choque térmico farmacologicamente induzido utilizando derivados de geldanamicina D28 ou H71 que receberam a injeção do polipeptídeo Hsp70.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 A invenção apresenta de maneira geral composições e métodos que são úteis para o tratamento ou a prevenção de uma doença ocular. A invenção é baseada, pelo menos em parte, na constatação de que o laser ou a indução farmacológica de
10 choque térmico na camada e coróide do epitélio pigmentar da retina (RPE) faz com que as células-tronco hematopoiéticas sejam recrutadas para o RPE, onde se transdiferenciam em células que expressam marcadores específicos às células do epitélio pigmentar da retina. Sem desejar se limitar pela teoria, esta resposta residente se deve pelo menos em parte à
15 ativação da resposta ao choque térmico.

Conforme relatado mais detalhadamente a seguir, a estimulação do laser sublimiar visível do epitélio pigmentar da retina e coróide foi utilizada para recrutar as HSC para a camada do RPE. A transferência adotiva de HSC etiquetadas por
20 GFP e de animais quiméricos de GFP foi utilizada para demonstrar que as células-tronco hematopoiéticas podem migrar à camada do RPE. O SVL induz a expressão de proteínas de choque térmico e a subsequente expressão do fator-1 derivado do estroma celular (SDF-1, sigla em inglês) dos
25 quimioatrativos de HSC e de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, sigla em inglês). O efeito induzido pelo laser poderia ser retomado por meio da administração intravital dos compostos que induzem quimicamente a resposta ao choque térmico. As HSC recrutadas adquiriram as
30 características morfológicas de células do RPE maduras e também expressaram as proteínas específicas do RPE. Desse modo, a presente invenção apresenta métodos para o tratamento de indivíduos que têm uma doença ocular, tais como

retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma
retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada à idade,
glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de
Stargardt, drusas autossômicas dominantes e distrofia macular
5 de Best, edema macular cistóide, descolamento da retina,
danos fóticos, retinopatias isquêmicas, doença degenerativa
da retina induzida por inflamação, retinosquise juvenil
ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML) e distrofia
retiniana em favo de mel de Doyne.

10 Células-tronco hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas são as células
derivadas da medula óssea que representam uma fonte endógena
conhecida por seu potencial reparador bem como pela sua
plasticidade. As células-tronco hematopoiéticas derivadas da
15 medula óssea (HSC) podem reparar tecidos danificados,
incluindo o coração, o fígado, o cérebro, os músculos e os
rins. Conforme relatado na presente invenção, as células-
tronco hematopoiéticas também podem ser utilizadas para
reparar a retina. A estimulação do laser sublimiar (STL,
20 sigla em inglês) da retina induz o recrutamento de HSC que se
transdiferenciam subsequente em células similares ao
RPE. Sem desejar se limitar pela teoria, esse processo é
mediado, pelo menos em parte, pelas interações moleculares
que envolvem quimiocinas, tais como o fator de crescimento
25 derivado estromal 1 (SDF-1) e receptores de quimiocina, tal
como o receptor SDF-1 (CXCR-4) que é ativado pelo laser
sublimiar.

As células-tronco são recrutadas para as áreas de
lesão para efetuar o reparo do tecido lesado. Caso desejado,
30 o número das células-tronco hematopoiéticas presentes na
circulação de um indivíduo pode ser aumentado antes, durante
ou após a indução de choque térmico. Em uma realização, esse
aumento no número das células-tronco hematopoiéticas é

realizado pelas células-tronco hematopoiéticas mobilizadoras presentes na medula óssea do indivíduo ao administrar um ou mais fatores estimulantes de colônias de macrófagos granulócitos (MG-CSF), fator de células-tronco (SCF), IL-8, SDF-1 (fator derivado estromal), interleucina-1 (IL-1), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), interleucina-11 (IL-11), interleucina-12 (IL-12) e NIP-1 α , fator de células-tronco (SCF), tirosina-quinase-3 FMS-similar (flt-3, sigla em inglês), fator- β de crescimento transformador (TGF- β , sigla em inglês), um fator hematopoiético ativo anterior, descrito, por exemplo, no pedido de patente WO 91/05795, e trombopoietina (TPO), ligante de FLK-2, ligante de FLT-2, EPO, Oncostatina M e MCSF. SDF-1 é uma citocina potente que induz o recrutamento de células-tronco. O SDF-1 é expresso por células do RPE durante o esforço. A administração de G-CSF e/ou SDF-1 irá aumentar o número de HSC no sangue periférico e intensificará provavelmente o recrutamento subsequente de HSC à retina e à camada do RPE. Preferencialmente, as células-tronco hematopoiéticas da invenção não expressam ou então expressam níveis reduzidos de qualquer um ou mais de um dos seguintes marcadores: Lin⁻, CD2⁻, CD3⁻, CD7⁻, CD8⁻, CD10⁻, CD14⁻, CD15⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD20⁻, CD33⁻, CD38⁻, CD71⁻, HLA-DR⁻ e glicoforina A⁻.

25 Lasers oftálmicos

Os lasers oftálmicos constituem uma ferramenta importante para o tratamento de vários distúrbios da retina onde têm sido utilizados tipicamente para gerar queimaduras fotoquímicas induzidas por laser. Por outro lado, acredita-se que o laser de diodo de 810 nanômetros cause menos danos à retina neuro-sensora porque a energia é absorvida pelo RPE. A presente invenção apresenta métodos que utilizam uma aplicação de laser sub-visível para mobilizar as células-

tronco hematopoiéticas e recrutar as mesmas para a camada do epitélio pigmentar da retina. No presente método, um laser infravermelho (810 nm) é utilizado no modo de micropulso para o tratamento de distúrbios da retina. O uso de pulsos de laser breves e repetitivos durante uma única exposição limita a quantidade de condução de calor e os danos subseqüentes ao RPE. Em uma abordagem, a administração do laser é controlada para reduzir ou eliminar os danos fototérmicos. Por exemplo, o tratamento a laser é controlado para reduzir ou eliminar a reação intraoperativa do tecido visível (por exemplo, necrose por fotocoagulação) e/ou a morte celular posterior (apoptose). Em outros exemplos, o limiar da lesão térmica não-letal é controlado de modo que a reação intraoperativa do tecido visível seja reduzida ou ausente, a morte celular posterior seja reduzida ou ausente e o recrutamento consistente positivo de HSC esteja presente. Preferencialmente, os danos fototérmicos são reduzidos em pelo menos 10%, 25% ou 30% em relação a um paciente tratado com a terapia a laser convencional; mais preferencialmente, os danos fototérmicos são reduzidos em pelo menos 50%, 75%, 85%, 95% ou 100%. Mais preferencialmente, a acuidade visual do paciente é substancialmente preservada (por exemplo, é preservada ou mantida próxima ao nível atual de acuidade visual do paciente).

Os métodos para induzir choque térmico utilizando um laser sublimiar incluem, por exemplo, a administração de um padrão de grade de 40-50 cavidades espaçadas com laser de 810 nm com um diâmetro de 5 μ m, 10 μ m, 25 μ m, 35 μ m ou 50 μ m. As modalidades de intensidade e de aplicação podem ser variadas para reduzir ou eliminar os danos fototérmicos. Por exemplo, um modo de aplicação de onda contínua (cw); um modo de aplicação de micropulso (mP) (por exemplo, utilizando ciclo de operação de 20%, 15%, 10% e 5%); ou um modo de

aplicação de pulso longo, podem ser utilizados.

Em realizações particulares, os presentes métodos caracterizam o uso de um laser sublimiar que tem um comprimento de onda de pelo menos aproximadamente 100 nm até
5 2.000 nm, em que a potência do laser sublimiar é pelo menos de aproximadamente 10 mW a 100 mW (por exemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100). O laser é aplicado por um período de pelo menos 0,001, 0,005, 0,1, 0,2 ou 1,0 milissegundo. Em outras realizações, 10 mW são administrados
10 em um pulso de 0,1 milissegundo ou 100 mW são administrados em um pulso de 0,1 milissegundo.

Os tecidos oculares tratáveis pelo tratamento a laser incluem a coróide, o epitélio pigmentar da retina ou qualquer outro tecido ocular onde o reparo aos danos de
15 tecido às células-tronco seja desejável.

Embora os exemplos específicos descritos na presente invenção estejam relacionados ao uso dos lasers para induzir choque térmico, o elemento versado na técnica irá apreciar que a invenção não fica limitada aos mesmos.
20 Virtualmente qualquer método de aplicação de energia com capacidade de induzir a resposta ao choque térmico em pelo menos uma célula de um tecido ocular pode ser utilizado. Tais métodos incluem, por exemplo, a estimulação utilizando radiação, termografia transpupilar ou qualquer outra forma de
25 energia, tal como a energia de luz, em uma quantidade suficiente para estimular o recrutamento de células-tronco, podem ser utilizados. Em várias realizações, a estimulação do laser suficiente para recrutar células-tronco refere-se a um feixe luminoso ou fótons que têm um comprimento de onda de
30 aproximadamente 100 nm até 2.000 nm. Geralmente, o comprimento de onda fica compreendido entre aproximadamente 500 nm e aproximadamente 900 nm.

Ativadores de resposta ao choque térmico

Os ativadores de resposta ao choque térmico incluem agentes (por exemplo, composto pequeno, polipeptídeo e moléculas de ácido nucléico) que induzem uma resposta ao choque térmico em uma célula. Tais agentes aumentam, por exemplo, a expressão da atividade biológica de uma proteína de choque térmico, tal como Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e membros pequenos da família Hsp. Mais preferencialmente, o agente aumenta a expressão ou a atividade biológica de Hsp90 ou Hsp70. A proteína de choque térmico 90 (Hsp90) é um protetor envolvido na sinalização, proliferação e sobrevivência de células e é essencial para a estabilidade conformacional e a função de uma série de proteínas. Os moduladores Hsp90 são úteis nos métodos da invenção, e tais moduladores aumentam a expressão ou a atividade biológica de Hsp90. Os moduladores Hsp90 incluem antibióticos de ansamicina de benzoquinona, tais como a geldanamicina e 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG), que se ligam especificamente a Hsp90 e alteram a sua função. Outros moduladores Hsp90 incluem, mas sem ficar a eles limitados, radicicol, novobiocina e qualquer inibidor Hsp90 que se liga à cavidade de ATP/ADP de Hsp90.

Outros agentes que induzem choque térmico incluem, mas sem ficar a eles limitados, geldanamicina, (InvivoGen, San Diego, Califórnia; Chang et al., J Cell Biochem 2006 1° de janeiro; 97(1):156-65), celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, InvivoGen, San Diego, Califórnia), EC102, radicicol (Chang et al., J Cell Biochem 2006 1° de janeiro; 97(1):156-65), geranilageranilacetona (Eisai, Tóquio, Japão), paeoniflorina (Axxora, San Diego, CA), PU-DZ8 e H-71 (H-71 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), bem como análogos ou miméticos de qualquer um destes compostos. O celastrol, um triterpeno quinona-metideo, ativa a resposta humana ao choque térmico. O celastrol e outros

ativadores da resposta ao choque térmico são úteis para o tratamento da doença ocular. Os ativadores da resposta ao choque térmico incluem, mas sem ficar a eles limitados, celastrol, metil éster celastrol, diacetato de diidrocelastrol, butil éster celastrol, diidrocelastrol, e sais ou análogos dos mesmos.

Doença Ocular

A invenção pode ser utilizada para o tratamento das doenças oculares que incluem a retinopatia pré-proliferativa, retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma, retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada à idade, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, drusas autossômicas dominantes e distrofia macular de Best.

Particularmente, a invenção apresenta o tratamento da neovascularização relacionada à retinopatia diabética proliferativa e à neovascularização coroidal. A diabetes tipo I é associada com um risco elevado para retinopatia diabética proliferativa. (Jacobsen, N. et al. 2003 *Ugeskr Laeger* 165:2953-6). A exposição crônica ao meio diabético conduz tipicamente à retinopatia pré-proliferativa. A retinopatia pré-proliferativa é associada com as áreas de isquemia focal. Aceita-se extensamente que a neovascularização esteja associada com a expressão aumentada de fatores pró-angiogênicos tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), juntamente com a expressão reduzida de fatores antiangiogênicos, tais como a endostatina e o fator de pigmento derivado do epitélio, PEDF (Funatsu, H., et al. 2003 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1042-7; Noma, H., et al. 2002 *Arch Ophthalmol* 120:1075-80; Dawson, D. W. et al 1999 *Science* 285:245-8; Spranger, J., et al. 2001 *Diabetes* 50:2641-5; Holekamp, N.M. et al 2002 *Am J Ophthalmol* 134:220-7; Boehm, B.O., et al. 2003 *Horm Metab Res* 35:382-6). A mudança no equilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e

antiangiogênicos evoca a neovascularização e induz o vazamento capilar (Funatsu, H., et al. 2002 *Am J Ophthalmol* 133:70-7; Caldwell, R. B., et al. 2003 *Diabetes Metab Res Rev* 19:442-55; Antcliff, R. J. et al. 1999 *Semin Ophthalmol* 14:223-32). Após vários anos, os pacientes que têm retinopatia pré-proliferativa experimentam a patologia da retina caracterizada pela perda extensiva de capilares da retina e de exsudatos algodonosos múltiplos, seguida pelo desenvolvimento de vasos novos que crescem a partir da retina para o vítreo normalmente avascular. Os vasos novos e frágeis são propensos ao vazamento, causando edema macular e visão borrada. Suscetíveis a rompimento, a ruptura desses vasos anormais pode resultar em perda imediata da visão.

Se permitido o crescimento, a neovascularização pode formar membranas fibrovasculares cegantes, causando o descolamento da retina. Sob os protocolos de tratamento presentemente disponíveis, a retinopatia diabética proliferativa é tratada no estágio proliferativo da condição ao colocar uma malha de queimaduras a laser sobre a retina. O tratamento destrutivo resulta na perda substancial da visão. Após um período de vinte anos de diabetes, 33% dos adultos mais jovens receberam tais tratamentos a laser, com uma diminuição associada na acuidade visual e no ângulo visual (Kokkonen, J. et al. 1994 *Acta Paediatr* 83:273-8; Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group 1991 *Ophthalmology* 98:766-85; Davies, N. 1999 *Eye* 13 (Pt4):531-6; Dosso, A.A. et al. 2000 *Diabetes Care* 23:1855).

Uma outra condição que pode ser tratada com os métodos da invenção é a neovascularização coroidal. A neovascularização coroidal é responsável pela perda significativa da visão associada com a degeneração macular relacionada à idade (DMRI), por exemplo. Na neovascularização coroidal anormal, os vasos novos crescem a partir da coróide

para o espaço sub-retiniano. As retinas com risco elevado para a neovascularização coroidal são identificadas pela presença de drusas múltiplas ou grandes e moles, drusas reticulares e/ou mudanças pigmentares (Macular Photocoagulation Study Group 1997, *Arch Ophthalmol* 115:741-7; Arnold, J.J. et al. 1995 *Retina* 15:183-91). VEGF, uma proteína regulada pela hipoxia, é associada com a neovascularização coroidal (Frank, R.N., et al. 1996 *Am J Ophthalmol* 122:393-403; Ishibashi, T. et al. 1997 *Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:159-67; Kwak, N. et al. 2000 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3158-64).

A degeneração da retina é uma outra condição tratável pelo tratamento ao utilizar os métodos da invenção. As doenças degenerativas da retina incluem aquelas doenças caracterizadas por lesão do neurônio da retina ou pela morte de células neuronais da retina. Os neurônios retinianos incluem, mas sem ficar a eles limitados, fotorreceptores e células ganglionares retinianas. As doenças degenerativas da retina incluem doenças degenerativas da retina herdadas, adquiridas e induzidas por inflamação. As doenças degenerativas da retina herdadas incluem, por exemplo, todas as formas de degeneração macular (por exemplo, degeneração macular relacionada à idade seca e exsudativa), mal de Stargardt, mal de Best, glaucoma, retinite pigmentosa, e degeneração do nervo óptico. As doenças degenerativas da retina adquiridas incluem aquelas associadas com o edema macular cistóide, o descolamento da retina, danos fóticos, retinopatias isquêmicas devido à oclusão venosa ou arterial ou outros distúrbios vasculares, retinopatias devido a trauma, cirurgia ou lesões penetrantes do olho, e vitreorretinopatia periférica. As doenças degenerativas da retina induzidas por inflamação incluem aquelas associadas com a degeneração da retina viral, bacteriana e induzida por

toxina e/ou uveíte, bem como aquelas que resultam em neurite óptica.

Outros doenças e distúrbios suscetíveis ao tratamento utilizando os métodos da invenção incluem
5 retinosquise juvenil ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML) e distrofia da retina e colméia de Doyme (DHRD, sigla em inglês), e distrofias corneais.

A presente invenção também apresenta métodos para a prevenção de danos celulares nos neurônios retinianos,
10 incluindo os danos associados com o trauma e as complicações pós-cirúrgicas por exposição subsequente à luz brilhante prejudicial em uma modalidade protetora.

Ensaaios de Seleção

Tal como discutido na presente invenção, os
15 compostos que induzem o choque térmico ou o recrutamento de células-tronco ao epitélio pigmentar da retina são úteis nos métodos da invenção. Qualquer número de métodos está disponível para a realização dos ensaios de seleção para identificar tais compostos. Em uma abordagem, a expressão de
20 um polipeptídeo Hsp ou de uma molécula de ácido nucléico é monitorada em uma célula (por exemplo, uma célula ocular, tal como uma célula da coróide ou do epitélio pigmentar da retina *in vitro* ou *in vivo*); a célula entra em contato com um composto candidato; e o efeito do composto na expressão de um
25 polipeptídeo Hsp ou da molécula de ácido nucléico é testado utilizando qualquer método conhecido no estado da técnica ou descrito na presente invenção. Um composto que aumenta a expressão de polipeptídeo Hsp ou de uma molécula de ácido nucléico na célula que entrou em contato em relação a uma
30 célula do controle que não entrou em contato com o composto é considerado útil nos métodos da invenção. Alternativamente, os compostos são selecionados para identificar aqueles que aumentam o recrutamento de células-tronco para a retina. Em

uma realização, o recrutamento de células-tronco é testado em um camundongo quimérico injetado local ou sistemicamente com células-tronco que expressam GFP⁺. A presença de células GFP⁺ é testada, por exemplo, ao examinar montagens lisas da retina
5 utilizando microscopia de fluorescência. Os compostos que o número de células-tronco recrutou para a retina são úteis nos métodos da invenção. Em outras realizações, a sobrevivência ou a diferenciação de tais células é testada utilizando marcadores específicos de célula. Em uma abordagem
10 relacionada, a seleção é realizada na presença de 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou de um análogo ou derivado dos mesmos. Os compostos úteis aumentam o número das células-tronco recrutadas para a retina em pelo menos 10%, 15% ou 20% ou preferencialmente em 25%, 50% ou 75%; ou mais
15 preferencialmente em pelo menos 100%.

Caso desejado, a eficácia do composto identificado é testada em um modelo animal que tem uma doença ocular (por exemplo, um modelo animal de retinite pigmentosa) ou que tem diabetes.

20 Compostos de Teste e Extratos

De maneira geral, os compostos com capacidade de induzir uma resposta ao choque térmico em uma célula ou de aumentar o recrutamento de células-tronco para um tecido ocular são identificados a partir de grandes bibliotecas de
25 produtos naturais ou de extratos sintéticos (ou semi-sintéticos) ou a partir de bibliotecas químicas de acordo com os métodos conhecidos no estado da técnica. Os técnicos no assunto da descoberta e do desenvolvimento de drogas irão compreender que a fonte precisa dos extratos ou compostos de
30 teste não é essencial ao(s) procedimento(s) de seleção da invenção. Conseqüentemente, virtualmente qualquer número de extratos ou compostos químicos pode ser selecionado utilizando os métodos descritos na presente invenção. Os

exemplos de tais extratos ou compostos incluem, mas sem ficar a eles limitados, extratos a base de plantas, fungos, procarióticos ou animais, caldos de fermentados e compostos sintéticos, bem como a modificação de compostos existentes.

5 Numerosos métodos também estão disponíveis para gerar a síntese aleatória ou dirigida (por exemplo, semi-síntese ou síntese total) de qualquer número de compostos químicos, incluindo, mas sem ficar a eles limitado, compostos a base de sacarídeos, lipídeos, peptídeos e ácidos nucléico. As
10 bibliotecas de compostos sintéticos estão comercialmente disponíveis junto a Brandon Associates (Merrimack, N. H.) e Aldrich Chemical (Milwaukee, Wis.). Alternativamente, as bibliotecas de compostos naturais na forma de extratos bacterianos, fúngicos, de plantas e de animais estão
15 comercialmente disponíveis junto a uma série de fontes, incluindo Biotics (Sussex, Reino Unido), Xenova (Slough, Reino Unido), Harbor Branch Oceanographics Institute (Ft. Pierce, Fla.) e PharmaMar, EUA (Cambridge, Mass.). Além disso, as bibliotecas produzidas natural ou sinteticamente
20 são produzidas, caso desejado, de acordo com os métodos conhecidos no estado da técnica, por exemplo, por meio dos métodos padrão de extração e de fracionamento. Além disso, caso desejado, qualquer biblioteca ou composto é facilmente modificado utilizando métodos químicos, físicos ou
25 bioquímicos padrão.

Além disso, técnicos no assunto de descoberta e desenvolvimento de drogas compreendem facilmente que os métodos para a desreplicação (por exemplo, desreplicação taxonômica, desreplicação biológica e desreplicação química
30 ou qualquer combinação das mesmas) ou a eliminação das réplicas ou repetições dos materiais já conhecidos por sua atividade no recrutamento de células-tronco ou na indução de choque térmico devem ser empregados sempre que possível.

Quando se verifica que um extrato bruto recruta células-tronco ou induz um choque térmico, um fracionamento adicional do extrato de ligação positivo é necessário para isolar os constituintes químicos responsáveis pelo efeito observado. Desse modo, o objetivo da extração, do fracionamento e do processo de purificação é a caracterização cuidadosa e identificação de uma entidade química dentro do extrato bruto que induz o choque térmico ou o recrutamento de células-tronco. Os métodos de fracionamento e de purificação de tais extratos heterogênicos são conhecidos no estado da técnica. Caso desejado, os compostos mostrados como sendo agentes úteis para o tratamento de qualquer patologia relacionada a uma doença ocular que requeira o reparo ou a regeneração de um tecido ocular são modificados quimicamente de acordo com os métodos conhecidos no estado da técnica.

Composições Farmacêuticas

A presente invenção caracteriza preparações farmacêuticas que compreendem agentes com capacidade de induzir ou de replicar o choque térmico (por exemplo, ao aumentar a expressão ou a atividade de Hsp70 ou de Hsp90) em um tecido ocular juntamente com veículos farmacêuticamente aceitáveis. Tais preparações que compreendem polipeptídeos, polinucleotídeos ou compostos pequenos têm aplicações terapêuticas e profiláticas. Os agentes úteis nos métodos descritos na presente invenção incluem aqueles que aumentam a expressão ou a atividade biológica de um polipeptídeo Hsp90 ou Hsp70 ou que induzem de alguma outra maneira uma resposta ao choque térmico em um tecido ocular que recruta desse modo uma célula-tronco para o tecido. Caso desejado, as composições da invenção são formuladas juntamente com os agentes que aumentam o número das células-tronco hematopoiéticas presentes na circulação de um indivíduo, por exemplo, ao mobilizar as células-tronco hematopoiéticas

presentes na medula óssea do indivíduo.

Os agentes que aumentam a mobilização ou o recrutamento de células-tronco incluem, mas sem ficar a eles limitados, drogas antitumorais e G-CSF ou GM-CSF, interleucina-1 (IL-1), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), interleucina-7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), interleucina-11 (IL-11), interleucina-12 (IL-12) e NIP-1 α , fator de células-tronco (SCF), tirosina-quinase-3 FMS-similar (flt-3), fator- β de crescimento transformador (TGF- β), um fator hematopoiético ativo anterior, descrito, por exemplo no pedido de patente WO 91/05795 e trombopoietina (TPO), ligante de FLK-2, ligante de FLT-2, Epo, Oncostatina M e MCSF.

Caso desejado, as composições da invenção podem ser formuladas juntamente com compostos que intensificam a transdiferenciação de uma célula-tronco hematopoiética em uma célula epitelial pigmentar da retina. Tais compostos incluem o ácido trans-retinóico, a 11-cis-daretinal ou a 9-cis-retinal.

Os compostos da invenção podem ser administrados como parte de uma composição farmacêutica. As composições devem ser estéreis e conter uma quantidade terapeuticamente eficaz dos agentes da invenção em uma unidade de peso ou de volume apropriada para a administração a um indivíduo. As composições e as combinações da invenção podem fazer parte de um pacote farmacêutico, onde cada um dos compostos está presente em quantidades de dosagem individuais.

As composições farmacêuticas da invenção a serem utilizadas para a administração profilática ou terapêutica devem ser estéreis. A esterilidade é facilmente obtida por meio de filtração através das membranas de filtração estéreis (por exemplo, membranas com 0,2 μ m), por irradiação gama ou por quaisquer outros meios apropriados conhecidos por um

técnico no assunto. As composições terapêuticas de polipeptídeo são colocadas geralmente em um recipiente que tem uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa que tem um bloqueador
5 perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica. Essas composições serão armazenadas comumente em recipientes de doses unitários ou de doses múltiplas, por exemplo, ampolas ou frascos vedados, como uma solução aquosa ou como uma formulação liofilizada para reconstituição.

10 Os compostos podem ser combinados, opcionalmente, com um excipiente farmacologicamente aceitável. O termo "excipiente farmacologicamente aceitável" tal como utilizado na presente invenção significa uma ou mais cargas sólidas ou líquidas compatíveis, diluentes ou substâncias de
15 encapsulação que são apropriadas para a administração a um ser humano. O excipiente contém preferencialmente quantidades menores de aditivos tais como as substâncias que intensificam a isotonicidade e a estabilidade química. Tais materiais são atóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações
20 empregadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato, succinato, acetato, lactato, tartarato e outros ácidos orgânicos ou seus sais; tris-hidróximetilamino metano (TRIS), bicarbonato, carbonato e outras bases orgânicas e seus sais; antioxidantes, tal como o ácido ascórbico; polipeptídeos com
25 baixo peso molecular (por exemplo, menos de aproximadamente dez resíduos), por exemplo, poliarginina, polilisina, poliglutamato e poliaspartato; proteínas, tais como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como a polivinil pirrolidona (PVP), polipropileno
30 glicóis (PPGs) e polietileno glicóis (PEGs); aminoácidos, tais como a glicina, o ácido glutâmico, o ácido aspártico, a histidina, a lisina ou a arginina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos que incluem a celulose ou

seus derivados, glicose, manose, sacarose, dextrinas ou derivados sulfatados de carboidrato, tais como a heparina, o sulfato de condroitina ou o sulfato de dextrano; íons de metais polivalentes, tais como íons de metais divalentes que
5 incluem íons de cálcio, íons de magnésio e íons de manganês; agentes quelantes, tal como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); álcoois de açúcar, tais como o manitol ou o sorbitol; contra-íons, tais como o sódio ou o amônio; e/ou tensoativos não-iônicos, tais como os polissorbatos ou poloxâmeros.
10 Outros aditivos também podem ser incluídos, tais como estabilizantes, antimicrobianos, gases inertes, reabastecedores de fluidos e de nutrientes (isto é, dextrose de Ringer), reabastecedores de eletrólitos, e outros do gênero, que podem estar presentes em quantidades
15 convencionais.

As composições, tal como descritas acima, podem ser administradas em quantidades eficazes. Uma quantidade eficaz irá depender do modo de administração, da condição particular que está sendo tratada e do resultado desejado. Também pode
20 depender do estágio da condição, da idade e da condição física do indivíduo, da natureza da terapia simultânea, se tal existir, e de fatores similares conhecidos pelo profissional médico. Para aplicações terapêuticas, essa é a quantidade suficiente para atingir um resultado medicamente
25 desejável.

Com respeito a um indivíduo que tem uma doença ou um distúrbio ocular, uma quantidade eficaz é suficiente para induzir choque térmico em pelo menos uma célula de um tecido ocular; suficiente para atrair pelo menos uma célula-tronco
30 ao tecido; ou suficiente para estabilizar, retardar ou reduzir um sintoma associado a uma patologia ocular. Geralmente, as doses dos compostos da presente invenção devem ser de aproximadamente 0,01 mg/kg por dia a aproximadamente

1.000 mg/kg por dia. Espera-se que doses que variam de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg/kg sejam apropriadas. Doses mais baixas irão resultar de determinadas formas de administração, tal como a administração intravenosa. Caso uma resposta em um indivíduo seja insuficiente nas doses iniciais aplicadas, doses mais elevadas (ou doses eficazmente mais elevadas por uma via de aplicação mais localizada e diferente) podem ser empregadas até o ponto em que a tolerância do paciente permitir.

10 Contempla-se que doses múltiplas por dia atingem os níveis sistêmicos apropriados de uma composição da presente invenção.

Uma variedade de vias de administração é disponível. Os métodos da invenção, falando de maneira geral, podem ser praticados utilizando qualquer modo de administração que seja medicamente aceitável, significando qualquer modo que produza níveis eficazes dos compostos ativos sem causar efeitos clinicamente adversos inaceitáveis. Em uma realização preferida, uma composição da invenção é administrada intra-ocularmente. Outros modos de administração incluem as vias oral, retal, tópica, intraocular, bucal, intravaginal, intracisternal, intracerebroventricular, intratraqueal, nasal, transdermal, implantes dentro/sobre, ou via parenteral. O termo "parenteral" inclui subcutâneo, intratecal, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal ou infusão. As composições que compreendem uma composição da invenção podem ser adicionadas a um fluido fisiológico, tal como o humor intravital. A administração oral pode ser preferida para o tratamento profilático por causa da

30 conveniência ao paciente bem como pela programação de dosagem.

As composições farmacêuticas da invenção podem opcionalmente conter adicionalmente uma ou mais proteínas

adicionais tal como desejado. As proteínas ou o material biológico apropriado podem ser obtidos a partir do plasma humano ou de mamífero por meio de qualquer um dos métodos de purificação conhecidos e disponíveis a um técnico no assunto; 5 a partir de sobrenadantes, extratos ou lisatos de cultura de tecido recombinante, vírus, levedura, bactérias ou similares que contêm um gene que expressa uma proteína humana ou de mamífero que é introduzida de acordo com técnicas padrão de DNA recombinante; ou a partir de líquidos biológicos humanos 10 (por exemplo, sangue, leite, linfa, urina ou similares) ou a partir de animais transgênicos que contêm um gene que expresse uma proteína humana que é introduzida de acordo com as técnicas transgênicas padrão.

As composições farmacêuticas da invenção podem 15 compreender um ou mais compostos de tamponamento do pH para manter o pH da formulação em um nível predeterminado que reflita o pH fisiológico, tal como na faixa de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. O composto de tamponamento do pH utilizado na formulação líquida aquosa 20 pode ser um aminoácido ou uma mistura de aminoácidos, tal como a histidina ou uma mistura de aminoácidos tais como a histidina e a glicina. Alternativamente, o composto de tamponamento do pH é preferencialmente um agente que mantém o pH da formulação em um nível predeterminado, tal como na 25 faixa de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0 e que não quelata íons de cálcio. Os exemplos ilustrativos de tais compostos de tamponamento do pH incluem, mas sem ficar a eles limitados, íons de imidazol e de acetato. O composto de tamponamento do pH pode estar presente em qualquer quantidade 30 apropriada para manter o pH da formulação em um nível predeterminado.

As composições farmacêuticas da invenção também podem conter um ou mais agentes de modulação osmótica, isto

é, um composto que modula as propriedades osmóticas (por exemplo, tonicidade, osmolalidade e/ou pressão osmótica) da formulação a um nível que seja aceitável à corrente sanguínea e às células sanguíneas de indivíduos receptores. O agente de modulação osmótica pode ser um agente que não quelata íons de cálcio. O agente de modulação osmótica pode ser qualquer composto conhecido ou disponível a um técnico no assunto para modular as propriedades osmóticas da formulação. O técnico no assunto pode determinar empiricamente a adequabilidade de um determinado agente de modulação osmótica para o uso na formulação da invenção. Os exemplos ilustrativos de tipos apropriados de agentes de modulação osmótica incluem, mas sem ficar a eles limitados: sais, tais como o cloreto de sódio e o acetato de sódio; açúcares, tais como a sacarose, a dextrose e o manitol; aminoácidos, tal como a glicina; e as misturas de um ou de mais desses agentes e/ou tipos de agentes. O(s) agente(s) de modulação osmótica pode(m) estar presente(s) em qualquer concentração suficiente para modular as propriedades osmóticas da formulação.

As composições que compreendem um composto da presente invenção podem conter íons de metais multivalentes, tais como íons de cálcio, íons magnésio e/ou íons de manganês. Qualquer íon de metal multivalente que ajuda a estabilizar a composição e que não afeta adversamente dois indivíduos receptores pode ser utilizado. O elemento versado na técnica, com base nestes dois critérios, pode determinar os íons de metal apropriados empiricamente, e as fontes apropriadas de tais íons de metal são conhecidas, e incluem os sais inorgânicos e orgânicos.

As composições farmacêuticas da invenção também podem ser uma formulação líquida não-aquosa. Qualquer líquido não-aquoso apropriado pode ser empregado, contanto que propicie estabilidade aos agentes ativos contidos no mesmo.

Preferencialmente, o líquido não-aquoso é um líquido hidrofílico. Os exemplos ilustrativos de líquidos não-aquosos apropriados incluem: glicerol; sulfóxido de dimetila (DMSO); polidimetil siloxano (PMS); etileno glicóis, tais como
5 etileno glicol, dietileno glicol, trietileno glicol, polietileno glicol ("PEG") 200, PEG 300 e PEG 400; e propileno glicóis, tais como o dipropileno glicol, o tripropileno glicol, polipropileno glicol ("PPG") 425, PPG 725, PPG 1000, PPG 2000, PPG 3000 e PPG 4000.

10 As composições farmacêuticas da invenção também podem ser uma formulação líquida misturada aquosa/não-aquosa. Qualquer formulação líquida não-aquosa apropriada, tais como aquelas descritas acima, pode ser empregada juntamente com qualquer formulação líquida aquosa, tais como aquelas
15 descritas acima, contanto que a formulação líquida misturada aquosa/não-aquosa propicie estabilidade ao composto contido na mesma. Preferencialmente, o líquido não-aquoso em tal formulação é um líquido hidrofílico. Os exemplos ilustrativos de líquidos não-aquosos apropriados incluem: glicerol; DMSO;
20 PMS; etileno glicóis, tais como PEG 200, PEG 300 e PEG 400; e propileno glicóis, tais como PPG 425, PPG 725, PPG 1000, PPG 2000, PPG 3000 e PPG 4000.

As formulações estáveis apropriadas podem permitir a armazenagem dos agentes ativos em um estado líquido
25 congelado ou descongelado. As formulações líquidas estáveis podem ser armazenadas a uma temperatura de pelo menos -70°C , mas também podem ser armazenadas a temperaturas mais elevadas de pelo menos 0°C ou entre aproximadamente 0°C e aproximadamente 42°C , dependendo das propriedades da
30 composição. Um técnico no assunto geralmente sabe que as proteínas e os polipeptídeos são sensíveis às mudanças de pH, temperatura e uma multiplicidade de outros fatores que podem afetar a eficácia terapêutica.

Outros sistemas de aplicação podem incluir sistemas de aplicação de liberação controlada, de liberação retardada ou de liberação prolongada. Tais sistemas podem evitar administrações repetidas das composições da invenção, aumentando a conveniência ao indivíduo e ao médico. Muitos tipos de sistemas de aplicação de liberação são disponíveis e conhecidos por um técnico no assunto. Eles incluem sistemas a base de polímero tais como polilactídeos (Patente U.S. N°. 3.773.919; Patente Européia N°. 58.481), poli(lactídeo-glicolídeo), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácidos poli-hidróxi butíricos, tais como o ácido poli-D-(-)-3-hidróxi butírico (Patente Européia N°. 133.988), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (Sidman, K. R. et al., Biopolymers 22:547-556), poli (metacrilato de 2-hidroxietila) ou etileno vinil acetato (Langer, R. et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 267-277; Langer, R. Chem. Tech. 12: 98-105) e polianidridos.

Outros exemplos de composições de liberação prolongada incluem matrizes de polímero semi-permeáveis na forma de artigos moldados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Os sistemas de aplicação também incluem sistemas de não-polímeros que incluem: lipídeos que incluem esteróis tais como o colesterol, ésteres de colesterol e ácidos graxos ou gorduras neutras tais como di- mono- e triglicerídeos; sistemas de liberação de hidrogel tais como o hidrogel bio-reabsorvível derivado biologicamente (isto é, hidrogéis de quitina ou hidrogéis de quitosana); sistemas silásticos; sistemas a base de peptídeo; revestimentos de cera; tabletas comprimidos que utilizam aglutinantes e excipientes convencionais; implantes parcialmente fundidos; e outros do gênero. Os exemplos específicos incluem, mas sem ficar a eles limitados: (a) sistemas erosionais em que o

agente é contido em uma forma dentro de uma matriz tal como aquelas descritas nas Patentes U.S. N°. 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 e 5.239.660 e (b) sistemas difusionais em que um componente ativo permeia a uma taxa controlada a partir de um
5 polímero tal como descrito nas Patentes U.S. N°. 3.832.253 e 3.854.480.

Um outro tipo de sistema de aplicação que pode ser utilizado com os métodos e as composições da invenção é um sistema de dispersão coloidal. Os sistemas de dispersão
10 coloidal incluem sistemas a base de lipídeo que incluem emulsões de óleo-em-água, micelas, micelas misturadas e lipossomos. Os lipossomos são vasos artificiais da membrana, que são úteis como um vetor de aplicação *in vivo* ou *in vitro*. Os vasos unilamelares grandes (LUV, sigla em inglês), que
15 variam no tamanho de 0,2 - 4,0 μm , podem encapsular macromoléculas grandes dentro do interior aquoso e podem ser aplicados às células em uma forma biologicamente ativa (Fraley, R. e Papahadjopoulos, D., Trends Biochem. Sci 6: 77-80).

20 Os lipossomos podem ser alvejados a um tecido particular ao acoplar o lipossomo a um ligante específico tal como um anticorpo, um açúcar, um glicolipídeo ou uma proteína monoclonal. Os lipossomos estão comercialmente disponíveis junto à Gibco BRL, por exemplo, como LIPOFECTINTM e
25 LIPOFECTACETM, que são formados de lipídeos catiônicos tais como cloreto de N-[1-(2,3-dioleilóxi)-propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA) e brometo de dimetildioctadecilamônio (DDAB). Os métodos para a elaboração de lipossomos são bem conhecidos no estado da técnica e foram descritos em muitas
30 publicações, por exemplo, na patente DE 3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 77:4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Pedido

de Patente Japonês 83-118008; Patente U.S. N°. 4.485,045 e 4.544.545; e EP 102.324. Os lipossomos também foram revistos por Gregoriadis, G., Trends Biotechnol., 3:235-241).

Um outro tipo de veículo é uma micropartícula ou um
5 implante biocompatível que é apropriado para o implantação no receptor mamífero. Os implantes bioerodíveis exemplificadores que são úteis de acordo com este método são descritos no Pedido Internacional PCT N°. PCT/US/03307 (Publicação WO N°. 95/24929, intitulada "Polymeric Gene Delivery System"). O
10 documento PCT/US/0307 descreve matrizes poliméricas biocompatíveis, preferencialmente biodegradáveis para conter um gene exógeno sob o controle de um promotor apropriado. As matrizes poliméricas podem ser utilizadas para obter a liberação prolongada do gene ou do produto exógeno do gene no
15 indivíduo.

A matriz polimérica está preferencialmente na forma de uma micropartícula, tal como uma microesfera (em que um agente é disperso em toda uma matriz polimérica sólida) ou uma microcápsula (em que um agente é armazenado no núcleo de
20 um escudo polimérico). As microcápsulas dos polímeros antecedentes que contêm drogas são descritas, por exemplo, na Patente U.S. N°. 5.075.109. Outras formas de matriz polimérica para conter um agente incluem películas, revestimentos, géis, implantes e stents. O tamanho e a
25 composição do dispositivo da matriz polimérica são selecionados para resultar em cinética de liberação favorável no tecido em que a matriz é introduzida. O tamanho da matriz polimérica adicional é selecionado de acordo com o método de aplicação que deve ser utilizado. Preferencialmente, quando
30 uma via em aerossol é utilizada, a matriz polimérica e a composição são englobadas em um veículo tensoativo. A composição da matriz polimérica pode ser selecionada para que tenha ambas as taxas de degradação favoráveis e também que

seja formada de um material que seja bioaderente, para aumentar adicionalmente a eficácia de transferência. A composição da matriz também pode ser selecionada para não se degradar, mas em vez disso, para ser liberada por meio de difusão durante um período de tempo prolongado. O sistema de aplicação também pode ser uma microesfera biocompatível que seja apropriada para aplicação local específica de sítio. Tais microesferas são descritas em Chickering, D. E., et al., Biotechnol. Bioeng., 52:96-101; Mathiowitz, E., et al., Nature 386: 410-414.

Ambas as matrizes poliméricas biodegradáveis e não-biodegradáveis podem ser utilizadas para aplicar as composições da invenção ao indivíduo. Tais polímeros podem ser polímeros naturais ou sintéticos. O polímero é selecionado com base no período de tempo em que a liberação é desejada, geralmente da ordem de algumas horas a um ano ou mais. Tipicamente, a liberação durante um período que varia entre algumas horas e três a doze meses é a mais desejável. O polímero está opcionalmente na forma de um hidrogel que pode absorver até aproximadamente 90% de seu peso em água e, adicionalmente, é opcionalmente reticulado com íons multivalentes ou outros polímeros.

Exemplos de polímeros sintéticos que podem ser utilizados para formar o sistema de aplicação biodegradável incluem: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquileno glicóis, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, álcoois polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, haletos polivinílicos, polivinil pirrolidona, poliglicolídeos, polissiloxanos, poliuretanos e co-polímeros dos mesmos, alquil celulose, hidróxialquil celulose, éteres de celulose, ésteres de celulose, nitrocelulose, polímeros de ésteres acrílicos e metacrílicos, metil celulose, etil celulose, hidróxipropil

celulose, hidróxipropilmetil celulose, hidróxibutilmetil
 celulose, acetato de celulose, propionato de celulose,
 acetato de butirato de celulose, acetato de ftalato de
 celulose, carbóxietyl celulose, triacetato de celulose, sal
 5 de sulfato de sódio de celulose, poli(metacrilato de metila),
 poli(metacrilato de etila), poli(metacrilato de hexila),
 poli(metacrilato de isobutila), poli(metacrilato de hexila),
 poli(metacrilato de isodecila), poli(metacrilato de laurila),
 poli(metacrilato de fenila), poli(acrilato de metila),
 10 poli(acrilato de isopropila), poli(acrilato de isobutila),
 poli(acrilato de octadecila), polietileno, polipropileno,
 poli(etileno glicol), óxido de poli(etileno), tereftalato de
 poli(etileno), álcoois poli(vinílicos), acetato de
 polivinila, cloreto de polivinila, poliestireno, polivinil
 15 pirrolidona e polímeros de ácido láctico e de ácido
 glicólico, polianidridos, poli(orto)éster, ácido
 poli(bútico), ácido poli(valérico) e poli(lactídeo-
 cocaprolactona) e polímeros naturais tais como o alginato e
 outros polissacarídeos que incluem o dextrano e a celulose,
 20 colágeno, derivados químicos dos mesmos (substituições,
 adições de grupos químicos, por exemplo, alquila, alquilenos,
 hidroxilações, oxidações e outras modificações feitas
 rotineiramente por um técnico no assunto), albumina e outras
 proteínas hidrofílicas, zeína e outras prolaminas e proteínas
 25 hidrofóbicas, copolímeros e misturas dos mesmos. Em geral,
 estes materiais se degradam pela hidrólise enzimática ou pela
 exposição à água *in vivo*, pela erosão da superfície ou em
 massa.

Métodos de Aplicação Ocular

30 As composições da invenção são aplicadas
 tipicamente ao olho para o tratamento de uma doença ocular
 (por exemplo, a retinopatia diabética, neovascularização
 coroidal, glaucoma, retinite pigmentosa, degeneração macular

relacionada à idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, drusas autossômicas dominantes e distrofia macular de Best, edema macular cistóide, descolamento da retina, danos fóticos, retinopatias isquêmicas, doença degenerativa da retina induzida por inflamação, retinosquise juvenil ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML) e distrofia retiniana em favo de mel de Doyme). Em uma realização, uma composição da invenção é administrada através de um dispositivo ocular apropriado para o implante direto no vítreo do olho. As composições da invenção podem ser fornecidas em composições de liberação prolongada, tais como aquelas descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. N°. 5.672.659 e 5.595.760. Foi verificado que tais dispositivos propiciam uma liberação controlada e prolongada de várias composições para tratar o olho sem risco de efeitos colaterais locais e sistêmicos prejudiciais. Um objeto do presente método ocular de aplicação é a maximização da quantidade de droga contida em um dispositivo ou em um implante intraocular ao minimizar seu tamanho a fim de prolongar a duração do implante. Vide, por exemplo, as Patentes U.S. N°. 5.378.475; 6.375.972 e 6.756.058 e as Publicações U.S. 20050096290 e 200501269448. Tais implantes podem ser implantes biocompatíveis e/ou biodegradáveis ou podem ser implantes não-biodegradáveis. Os implantes oculares biodegradáveis são descritos, por exemplo, na Publicação de Patente U.S. N°. 20050048099. Os implantes podem ser permeáveis ou impermeáveis ao agente ativo e podem ser introduzidos em uma câmara do olho, tal como as câmaras anterior ou posterior ou podem ser implantados na esclera, no espaço transcoroidal ou na região avascularizada externa ao vítreo. Alternativamente, uma lente de contato que aja como um depósito para composições da invenção também pode ser utilizada para a aplicação da droga.

Em uma realização preferida, o implante pode ser posicionado sobre uma região avascular, tal como na esclera, para permitir a difusão transcleral da droga ao sítio de tratamento desejado, por exemplo, o espaço e a mácula intraocular do olho. A aplicação transcleral minimamente invasiva pode ser utilizada para aplicar uma quantidade eficaz dos compostos ativos à retina com absorção sistêmica insignificante. A aplicação transcleral utiliza a área de superfície grande e acessível da esclera, o grau elevado de hidratação que a torna condutora às substâncias solúveis em água, hipocelularidade com uma escassez correspondente de enzimas proteolíticas e do sítio de ligação de proteína e a permeabilidade que não declina apreciavelmente com a idade. Uma bomba osmótica carregada com os compostos ativos pode ser implantada em um indivíduo de modo que os compostos ativos sejam aplicados transcleralmente à retina em um modo de liberação retardada. (Ambati, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41: 1186-91 (2000)). Além disso, o sítio de difusão transcleral fica preferencialmente nas proximidades da mácula. Os exemplos de implantes para a aplicação de uma composição incluem, mas sem ficar a eles limitados, os dispositivos descritos nas Patentes U.S N°. 3.416.530; 3.828.777; 4.014.335; 4.300.557; 4.327.725; 4.853.224; 4.946.450; 4.997.652; 5.147.647; 5.164.188; 5.178.635; 5.300.114; 5.322.691; 5.403.901; 5.443.505; 5.466.466; 5.476.511; 5.516.522; 5.632.984; 5.679.666; 5.710.165; 5.725.493; 5.743.274; 5.766.242; 5.766.619; 5.770.592; 5.773.019; 5.824.072; 5.824.073; 5.830.173; 5.836.935; 5.869.079; 5.902.598; 5.904.144; 5.916.584; 6.001.386; 6.074.661; 6.110.485; 6.126.687; 6.146.366; 6.251.090; e 6.299.895 e no pedido de patente WO 01/30323 e no pedido de patente WO 01/28474, os quais são incorporados na presente invenção a título de referência.

Os exemplos incluem, mas sem ficar a eles limitados, os seguintes: um sistema de aplicação de droga de liberação prolongada que compreende um reservatório interno que compreende uma quantidade eficaz de um agente eficaz na
5 obtenção de um efeito fisiológico ou farmacológico local ou sistêmico desejado, um tubo interno impermeável à passagem do agente, sendo que o tubo interno tem uma primeira e uma segunda extremidades e cobre pelo menos uma porção do reservatório interno, sendo que o tubo interno é feito sob
10 medida e é formado de um material de modo que o tubo interno possa suportar o seu próprio peso, um elemento impermeável posicionado na primeira extremidade do tubo interno, sendo que o elemento impermeável previne a passagem do agente fora do reservatório através da primeira extremidade do tubo
15 interno e um elemento permeável posicionado na segunda extremidade externa do tubo interno, sendo que o elemento permeável permite a difusão do agente fora do reservatório através da segunda extremidade do tubo interno; um método para a administração de um composto da invenção a um segmento
20 de um olho, sendo que o método compreende a etapa de implantar um dispositivo de liberação prolongada para aplicação do composto da invenção no vítreo do olho ou um dispositivo implantável de liberação prolongada para a administração de um composto da invenção a um segmento de um
25 olho; um dispositivo de liberação prolongada de droga que compreende: a) um núcleo da droga que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um primeiro agente eficaz na obtenção de um efeito diagnóstico ou eficaz na obtenção de um efeito desejado fisiológico ou
30 farmacológico local ou sistêmico; b) pelo menos um "copo" unitário essencialmente impermeável à passagem do agente que circunda e define um compartimento interno para aceitar o núcleo da droga, sendo que o "copo" unitário compreende uma

extremidade superior aberta com pelo menos um sulco embutido em torno de pelo menos uma porção da extremidade superior aberta do "copo" unitário; c) um plugue permeável que é permeável à passagem do agente, sendo que o plugue permeável é posicionado na extremidade superior aberta do "copo" unitário, sendo que o sulco interage com o plugue permeável mantendo o mesmo na posição e fechando a extremidade superior aberta, o plugue permeável permite a passagem do agente fora do núcleo da droga, através do plugue permeável e para fora da extremidade superior aberta do "copo" unitário; e d) pelo menos um segundo agente eficaz na obtenção de um efeito diagnóstico ou eficaz na obtenção de um efeito fisiológico ou farmacológico local ou sistêmico desejado; ou um dispositivo de liberação prolongada de droga que compreende: um núcleo interno que compreende uma quantidade eficaz de um agente que tem uma solubilidade desejada e uma camada de revestimento de polímero, sendo que a camada do polímero é permeável ao agente, em que a camada de revestimento de polímero cobre completamente o núcleo interno.

Outras abordagens para a aplicação ocular incluem o uso de lipossomos para alvejar um composto da presente invenção ao olho e preferencialmente às células epiteliais pigmentares da retina, células coroidais e/ou membrana de Bruch. Por exemplo, o composto pode ser complexado com os lipossomos na maneira descrita acima e esse complexo de composto/lipossomo é injetado em pacientes com uma doença ocular, utilizando a injeção intravenosa para dirigir o composto ao tecido ou à célula ocular desejada. A injeção direta do complexo do lipossomo em proximidade às células epiteliais pigmentares da retina ou à membrana de Bruch também pode propiciar o alvejamento do complexo. Em uma realização específica, o composto é administrado através de aplicação intraocular prolongada (tal como VITRASERT ou

ENVISION). Em uma realização específica, o composto é aplicado por meio de injeção subcutânea posterior. Em uma outra realização específica, as partículas de microemulsão que contêm as composições da invenção são aplicadas ao tecido
5 ocular para a extração de lipídeos da membrana de Bruch, das células epiteliais do pigmento da retina, ou de ambas.

As nanopartículas consistem em um sistema de veículo coloidal que demonstraram melhorar a eficácia da droga encapsulada ao prolongar a vida média do soro. As
10 nanopartículas de polialquilcianoacrilatos (PACA) são um sistema polimérico coloidal de aplicação de droga que está em desenvolvimento clínico, tal como descrito por Stella et al., J. Pharm. Sci., 2000. 89: páginas 1452-1464; Brigger et al., Int. J. Pharm., 2001. 214: páginas 37-42; Calvo et al.,
15 Pharm. Res., 2001. 18: páginas 1157-1166; e Li et al., Biol. Pharm. Bull., 2001. 24: páginas 662-665. Os poli-hidróxi ácidos biodegradáveis, tais como os copolímeros de ácido polilático (PLA) e de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) estão sendo utilizados extensivamente em aplicações
20 biomédicas e receberam a aprovação do FDA para determinadas aplicações clínicas. Além disso, as nanopartículas de PEG-PLGA têm muitas características de veículo desejáveis incluindo (i) que o agente a ser encapsulado compreende uma fração razoavelmente elevada de peso (carregamento) do
25 sistema de veículo total; (ii) que a quantidade de agente utilizada na primeira etapa do processo de encapsulação é incorporada no veículo final (a eficiência de captura) em um nível razoavelmente elevado; (iii) que o veículo pode ser congelado a seco e ser reconstituído na solução sem
30 agregação; (iv) que o veículo é biodegradável; (v) que o sistema de veículo é de tamanho pequeno; e (vi) que o veículo intensifica a persistência das partículas.

As nanopartículas são sintetizadas utilizando

virtualmente qualquer escudo biodegradável conhecido no estado da técnica. Em uma realização, um polímero, tal como ácido poliláctico (PLA) ou ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) é utilizado. Tais polímeros são biocompatíveis e biodegradáveis e estão sujeitos às modificações que aumentam 5 desejavelmente a eficácia fotoquímica e o período de circulação da nanopartícula. Em uma realização, o polímero é modificado com um grupo terminal de ácido carboxílico (COOH) que aumenta a carga negativa da partícula e limita desse modo a interação com aptâmeros de ácido nucléico carregados 10 negativamente. As nanopartículas também são modificadas com polietileno glicol (PEG), que também aumenta a vida média e a estabilidade das partículas em circulação. Alternativamente, o grupo COOH é convertido em um éster de N-hidróxi succinimida (NHS) para a conjugação covalente aos aptâmeros 15 modificados por amina.

Os polímeros biocompatíveis úteis na composição e nos métodos da invenção incluem, mas sem ficar a eles limitados, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, 20 polialquileno glicóis, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, álcoois polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, haletos polivinílicos, polivinil pirrolidona, poliglicolídeos, polissiloxanos, poliuretanos e copolímeros dos mesmos, alquil celulose, 25 hidróxialquil celulose, éteres de celulose, ésteres de celulose, nitrocelulose, polímeros de ésteres acrílicos e metacrílicos, metil celulose, etil celulose, hidróxipropil celulose, hidróxipropilmetil celulose, hidróxibutilmetil celulose, acetato de celulose, propionato de celulose, 30 butirato de acetato de celulose, ftalato de acetato de celulose, carbóxi etil celulose, triacetato de celulose, sal de sulfato de sódio de celulose, poli(metacrilato de metila), poli(metacrilato de etila), poli(metacrilato de butila),

poli(metacrilato de isobutila), poli(metacrilato de hexila),
poli(metacrilato de isodecila), poli(metacrilato de laurila),
poli(metacrilato de fenila), poli(acrilato de metila),
poli(acrilato de isopropila), poli(acrilato de isobutila),
5 poli(acrilato de octadecila), polietileno, polipropileno,
poli(etileno glicol), óxido de poli(etileno), tereftalato de
poli(etileno), álcoois poli(vinílicos), acetato
poli(vinílico), cloreto polivinílico, poliestireno, polivinil
pirrolidona, ácidos poliialurônicos, caseína, gelatina,
10 glutina, polianidridos, ácido poliacrílico, alginato,
quitosana, poli(metacrilato de metila), poli(metacrilato de
etila), poli(metacrilato de butila), poli(metacrilato de
isobutila), poli(metacrilato de hexila), poli(metacrilato de
isodecila), poli(metacrilato de laurila), poli(metacrilato de
15 fenila), poli(acrilato de metila), poli(acrilato de
isopropila), poli(acrilato de isobutila), poli(acrilato de
octadecila), e as combinações de qualquer um destes. Em uma
realização, as nanopartículas da invenção incluem polímeros
de PEG-PLGA.

20 As composições da invenção também podem ser
aplicadas topicamente. Para a aplicação tópica, as
composições são fornecidas em qualquer excipiente
farmaceuticamente aceitável que seja aprovado para a
aplicação ocular. Preferencialmente, a composição é aplicada
25 na forma de gotas à superfície do olho. Para algumas
aplicações, a aplicação da composição é baseada na difusão
dos compostos através da córnea ao interior do olho.

Técnicos no assunto irão reconhecer que os melhores
regimes de tratamento para o uso dos compostos da presente
30 invenção para o tratamento de uma doença ocular podem ser
diretamente determinados. Esta não é uma questão de
experimentação, mas sim de otimização, que é conduzida
rotineiramente nas artes médicas. Estudos *in vivo* em

camundongos nús freqüentemente fornecem um ponto de partida a partir do qual se começa a otimizar os regimes de dosagem e de aplicação. A freqüência das injeções será inicialmente uma vez por semana, tal como foi feito em alguns estudos com camundongos. No entanto, essa freqüência pode ser favoravelmente ajustada de um dia ou quinzenalmente ou até um mês, dependendo dos resultados obtidos a partir das experimentações clínicas iniciais e das necessidades de um paciente particular.

As quantidades de dosagem humana podem ser inicialmente determinadas ao extrapolar a quantidade de composto utilizada nos camundongos, tal como um técnico no assunto reconhece que é rotina no estado da técnica a modificação da dosagem para os seres humanos em comparação aos modelos animais. Em determinadas realizações previstas a dosagem pode variar entre aproximadamente 1 mg de composto/kg de peso corpóreo a aproximadamente 5.000 mg/kg de peso corpóreo; ou de aproximadamente 5 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 4.000 mg/Kg de peso corpóreo ou de aproximadamente 10 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 3.000 mg/Kg de peso corpóreo; ou de aproximadamente 50 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 2.000 mg/Kg de peso corpóreo; ou de aproximadamente 100 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 1.000 mg/Kg de peso corpóreo; ou de aproximadamente 150 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 500 mg/Kg de peso corpóreo. Em outras realizações, essa dose pode ser de aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.050, 1.100, 1.150, 1.200, 1.250, 1.300, 1.350, 1.400, 1.450, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500 e 5.000 mg/kg de peso corpóreo. Em outras realizações, contempla-se que doses mais elevadas podem ser utilizadas, sendo que tais

doses podem estar na faixa de aproximadamente 5 mg de composto/kg corpo a aproximadamente 20 mg de composto/kg corpo. Em outras realizações, as doses podem ser de aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16 ou 18 mg/Kg de peso corpóreo. Naturalmente que essa quantidade de dosagem pode ser ajustada para cima ou para baixo, tal como é feito rotineiramente em tais protocolos de tratamento, dependendo dos resultados das experimentações clínicas iniciais e das necessidades de um paciente particular.

10 Terapias de Combinação

As composições e os métodos da invenção podem ser administrados em combinação com qualquer terapia padrão conhecida no estado da técnica. Caso desejado, um agente que induz choque térmico em um tecido ocular ou um regime de laser sublimiar (descrito na presente invenção) é administrado juntamente com um agente que promove o recrutamento, a sobrevivência, a proliferação ou a transdiferenciação de uma célula-tronco (por exemplo, uma célula-tronco hematopoiética). Tais agentes incluem colágenos, fibronectinas, lamininas, integrinas, fatores angiogênicos, fatores antiinflamatórios, glicosaminoglicanos, vitrogênio, anticorpos e fragmentos dos mesmos, equivalentes funcionais destes agentes, e as combinações dos mesmos.

Em outras realizações, um agente que induz o choque térmico em um tecido ocular ou um regime de laser sublimiar (descrito na presente invenção) da invenção é administrado em combinação com um composto antiinflamatório que é administrado convencionalmente para o tratamento de uma doença ocular. Tais compostos antiinflamatórios incluem, mas sem ficar a eles limitados, qualquer um ou mais de compostos esteroidais e não esteroidais e os exemplos incluem: Alclofenaco; Dipropionato de Alclometasona; Algestona acetonida; Alfa Amilase; Ancinafal; Ancinafida; Anfenaco

sódico ; hidrocloreidrato de Amiprilose; Anakinra; Aniolaco;
 Anitrazafeno; Apazona; Balsalazida Dissódica; Bendazaco;
 Benoxapofeno; hidrocloreidrato de Benzidamina; Bromelaínas;
 Broperamol; Budesonida; Carprofeno; Cicloprofeno; Cintazona;
 5 Cliprofeno; Propionato de Clobetasol; Butirato de
 Clobetasona; Clopiraco; Propionato de Cloticasona; Acetato de
 Cormetasona; Cortodoxona; Deflazacorte; Desonida;
 Desoximetasona; Dipropionato de Dexametasona; Diclofenaco
 potássico; Diclofenaco sódico; Diacetato de Diflorasona;
 10 Diflumidona sódica; Diflunisal; Difluprednato; Diftalona;
 Dimetilsulfóxido; Drocinonida; Endrisona; Enlimomab; Enolican
 sódico; Epirizol; Etodolaco; Etofenamato; Felbinaco; Fenamol;
 Fenbufeno; Fenclofenaco; Fencloraco; Fendosal; Fempipalona;
 Fentiazaco; Flazalona; Fluazacorte; Ácido Flufenâmico;
 15 Flumizol; Acetato de Flunisolidina; Flunixinina; Meglumina
 Flunixinina; Fluocortina de Butila; Acetato de Fluorometolona;
 Fluquazona; Flurbiprofeno; Fluretofenato; Propionato de
 Fluticasona; Furaprofeno; Furobufeno; Halcinonida; Propionato
 de Halobetasol; Acetato de Halopredona; Ibufenaco;
 20 Ibuprofeno; Ibuprofeno de Alumínio; Ibuprofeno de Piconol;
 Ilonidape; Indometacina; Indometacina sódica; Indoprofeno;
 Indoxol; Intrazol; Acetato de Isoflupredona; Isoxepaco;
 Isoxicam; Cetoprofeno; hidrocloreidrato de Lofemizol;
 Lornoxicam; Etabonato de Loteprednol; Meclofenamato de Sódio;
 25 Ácido Meclofenâmico; Dibutirato de Meclorisona; Ácido
 Mefenâmico; Mesalamina; Meseclazona; Suleptanato de
 Metilprednisolona; Morniflumato; Nabumetona; Naproxeno;
 Naproxeno Sódico; Naproxol; Nimazona; Olsalazina Sódica;
 Orgoteína; Orpanoxina; Oxaprozina; Oxifenbutazona;
 30 hidrocloreidrato de Paranilina; Polissulfato de Pentosana
 sódico; Glicerato sódico de Fenbutazona; Pirfenidona;
 Piroxicam; Cinamato de Piroxicam; Piroxicam Olamina;
 Pirprofeno; Prednazato; Prifelona; Ácido Prodólico;

Proquazona; Proxazol; Citrato de Proxazol; Rimexolona; Romazarite; Salcolex; Salnacedina; Salsalato; Cloreto de Sanguinarina; Seclazona; Sermetacina; Sudoxicam; Sulindaco; Suprofeno; Talmetacina; Talniflumato; Talosalato; Tebufelona; 5 Tenidape; Tenidape sódico; Tenoxicam; Tesicam; Tesimida; Tetridamina; Tiopinaco; Pivalato de Tixocortol; Tolmetina; Tolmetina sódica; Triclonida; Triflumidato; Zidometacina; ou Zomepiraco sódico.

Além disso, em outras realizações, um agente que 10 induz o choque térmico em um tecido ocular ou em um regime de laser sublimar da invenção é administrado em combinação com um agente que aumenta ou diminui a angiogênese em um tecido ocular. Tais agentes têm a capacidade de modular a expressão ou a atividade de um fator angiogênico, tal como o fator de 15 crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), bFGF-2, leptinas, ativadores de plasminogênio (tPA, uPA), angiopoietinas, lipoproteína A, fator de crescimento transformador β , bradiquinina, 20 oligossacarídeos angiogênicos (por exemplo, hialuronana, sulfato de heparana), trombospondina, fator de crescimento de hepatócitos (também conhecido como fator de dispersão) e membros da família do receptor de quimiocina CXCR.

Em outras realizações, os agentes e os métodos são 25 administrados conjuntamente com os agentes quimioterápicos que intensificam a mobilização de células-tronco derivadas da medula óssea, incluindo citoxano, ciclofosfamida, VP-16 e citocinas tais como GM-CSF, G-CSF ou combinações dos mesmos.

As combinações da invenção podem ser administradas 30 simultaneamente ou dentro de algumas horas, dias ou semanas umas das outras. Em uma abordagem, um agente que induz o choque térmico em um tecido ocular ou um regime de laser sublimar (descrito na presente invenção) é administrado

antes, simultaneamente com ou depois da administração de uma terapêutica convencional descrita na presente invenção. Em algumas realizações, pode ser desejável a mobilização de uma célula derivada da medula óssea antes da indução de choque 5 térmico, onde tal mobilização aumenta o número das células-tronco recrutadas para o tecido ocular. Em outras realizações, pode ser preferível a administração do agente que mobiliza uma célula derivada da medula óssea simultaneamente com ou após (por exemplo, dentro de uma, 10 duas, três, cinco ou dez horas) a indução do choque térmico.

Métodos para Aumentar o Recrutamento de Células-tronco em um Tecido Ocular

Conforme relatado na presente invenção, a indução de choque térmico em um tecido ocular recruta eficazmente 15 células-tronco (por exemplo, células-tronco hematopoiéticas) para esse tecido, onde melhoram uma doença ou um distúrbio ocular. Caso desejado, as células-tronco substancialmente purificadas (ou seu precursor ou outras células progenitoras) são administradas ao paciente conjuntamente com um agente ou 20 regime de tratamento (por exemplo, tratamento com laser sublimiar) que induz o choque térmico em um tecido ocular para facilitar o reparo de um tecido ocular. Tais métodos podem ser utilizados para intensificar o reparo de um tecido ocular ao aumentar o recrutamento de células-tronco nesse 25 tecido.

Os métodos de isolamento de células-tronco hematopoiéticas são conhecidos no estado da técnica. Em uma realização, as células-tronco hematopoiéticas são isoladas do sangue utilizando a aferese. A aferese para leucócitos totais 30 começa quando a contagem de leucócitos totais é de aproximadamente 500-2.000 células/ μ l e a contagem de plaquetas é de aproximadamente 50.000/ μ l. As amostras podem

ser monitoradas para a presença de células CD34⁺ e/ou Thy-1⁺ para determinar o pico de mobilização de células-tronco e, desse modo, o momento mais favorável para colher as células-tronco sangüíneas periféricas. Várias técnicas podem ser empregadas para separar as células ao inicialmente remover as células de linhagem dedicada (células "empenhadas na linhagem"), caso desejado. Os anticorpos monoclonais são particularmente úteis para identificar os marcadores associados com as linhagens de células particulares e/ou estágios de diferenciação. Os anticorpos podem ser unidos a um suporte sólido para permitir a separação bruta. As técnicas de separação empregadas devem maximizar a viabilidade da fração a ser coletada.

O uso de técnicas de separação inclui aquelas baseadas nas diferenças nas propriedades físicas (por exemplo, densidade do gradiente de centrifugação e purificação centrífuga de contrafluxo), nas propriedades de superfície das células (afinidade da lectina e do anticorpo) e nas propriedades de tingimento vitais (tingimento de ligação de mitocôndrias Rodamina 123 e tingimento de ligação de DNA Hoechst 33342). Outros procedimentos para a separação que pode ser utilizada incluem a separação magnética, utilizando grânulos magnéticos revestidos por anticorpos, a cromatografia de afinidade, agentes citotóxicos unidos a um anticorpo monoclonal ou utilizados conjuntamente com um anticorpo monoclonal, incluindo complemento e citotoxinas, e "fritar" com o anticorpo unido a uma matriz sólida, ou qualquer outra técnica conveniente. As técnicas que propiciam a separação exata incluem a citometria de fluxo (por exemplo, a citometria de fluxo que utiliza uma pluralidade de canais de cores, canais de detecção de ângulo baixo e de difusão de luz obtusa, canais de impedância).

Uma grande proporção de células diferenciadas pode

ser removida de uma amostra utilizando uma separação relativamente bruta, onde as linhagens principais da população de células do sistema hematopoiético, tais como as linfocíticas e mielomonocíticas, são removidas, bem como as populações linfocíticas, tais como as células megacariocíticas, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Geralmente, pelo menos aproximadamente 70 a 90 por cento das células hematopoiéticas são removidos.

Concomitante ou subsequente a uma separação bruta que resulta em uma seleção positiva, por exemplo, utilizando o marcador CD34, uma seleção negativa pode ser executada, na qual os anticorpos para os marcadores específicos de linhagem presentes nas células dedicadas são empregados. Em sua maior parte, esses marcadores incluem CD2⁻, CD3⁻, CD7⁻, CD8⁻, CD10⁻, CD14⁻, CD15⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD20⁻, CD33⁻, CD38⁻, CD71⁻, HLA-DR⁻ e glicoforina A; incluindo preferencialmente pelo menos CD2⁻, CD14⁻, CD15⁻, CD16⁻, CD19⁻ e glicoforina A; e normalmente incluindo pelo menos CD14⁻ e CD15⁻. Tal como utilizado na presente invenção, Lin⁻ refere-se a uma população de células que não tem pelo menos um marcador específico de linhagem.

As células-tronco purificadas têm perfis de dispersão lateral baixo e perfis de baixo a médio de dispersão frontal pela análise de FACS. As preparações de Citospina mostram que as células-tronco enriquecidas têm um tamanho entre as células linfóides maduras e os granulócitos maduros. As células podem ser selecionadas com base nas propriedades de dispersão da luz bem como a sua expressão de vários antígenos de superfície da célula.

Preferencialmente, as células são separadas inicialmente por uma separação grosseira, seguida por uma separação fina, com a seleção positiva de um marcador associado com as células-tronco e a seleção negativa para os

marcadores associados com as células empenhadas na linhagem. As composições altamente enriquecidas em células-tronco podem ser obtidas dessa maneira.

5 As células-tronco purificadas ou parcialmente purificadas são então administradas ao paciente. A administração pode ser local (por exemplo, por meio da administração direta ao humor vítreo ou a um vaso fornecedor de um tecido ocular de interesse), ou pode ser sistêmica.

Terapia de Polinucleotídeos para Induzir o Choque

10 térmico

A terapia de polinucleotídeos que caracteriza um polinucleotídeo que codifica uma proteína, variante de Hsp ou fragmento do mesmo ou uma proteína com capacidade de ativar o choque térmico é uma outra abordagem terapêutica para o

15 tratamento de uma doença ocular. Alternativamente, os polinucleotídeos codificam os polipeptídeos terapêuticos que intensificam o recrutamento, a sobrevivência, a proliferação ou a diferenciação de células-tronco ou então melhoram um sintoma associado com a doença ocular (por exemplo, reduzem a

20 inflamação, a angiogênese ou a morte de células). Caso desejado, uma célula-tronco da invenção é modificada geneticamente para expressar uma molécula bioativa ou a proteína heteróloga ou para superexpressar uma proteína endógena. A célula pode carregar as informações genéticas

25 requeridas para a sobrevivência da célula, do tecido ou do órgão a longo prazo ou para detectar ou monitorar as células. Em um exemplo, a célula é modificada geneticamente para expressar uma molécula bioativa que promove a angiogênese. Em um outro exemplo, as células são modificadas geneticamente

30 para expressar um marcador de proteína fluorescente. Exemplos de marcadores incluem GFP, EGFP, BFP, CFP, YFP e RFP. Tais polinucleotídeos podem ser aplicados às células de um indivíduo que tem uma doença ocular onde a expressão das

proteínas recombinantes tem um efeito terapêutico. Por exemplo, as moléculas de ácido nucléico que codificam os polipeptídeos terapêuticos são aplicadas às células-tronco, tais como as células-tronco derivadas da medula óssea, 5 células-tronco hematopoiéticas, seus precursores ou progenitores. Em outras abordagens, as moléculas de ácido nucléico são aplicadas às células de um tecido ocular, tais como a retina, o epitélio pigmentar ou a coróide da retina. As moléculas de ácido nucléico devem ser aplicadas às células 10 de um indivíduo de maneira possam ser extraídas para que níveis terapeuticamente eficazes de polipeptídeos terapêuticos (por exemplo, proteína Hsp, tal como Hsp 70, Hsp 90) ou fragmentos das mesmas possam ser produzidos.

Existe uma variedade de sistemas de expressão para 15 a produção dos polipeptídeos da invenção. Os vetores de expressão úteis para a produção de tais polipeptídeos incluem, sem limitação, vetores cromossomais, episomais e derivados de vírus, por exemplo, vetores derivados de plasmídeos bacterianos, bacteriófagos, transposons, episomos 20 de levedura, elementos de inserção, elementos cromossomais de levedura, vírus tais como os baculovírus, Papova vírus, tais como SV40, vírus da varíola bovina, adenovírus, vírus da varíola aviária, vírus e retrovírus da pseudorraiva, e vetores derivados das combinações dos mesmos.

25 Um sistema de expressão bacteriano particular para a produção do polipeptídeo é o sistema de expressão de pET de *E. coli* (por exemplo, pET-28) (Novagen, Inc., Madison, Wis). De acordo com este sistema de expressão, o DNA que codifica um polipeptídeo é introduzido em um vetor de pET em uma 30 orientação projetada para permitir a expressão. Uma vez que o gene que codifica tal polipeptídeo está sob o controle dos sinais T7 reguladores, a expressão do polipeptídeo é atingida pela indução da expressão de T7RNA polimerase na célula

hospedeira. Isto é conseguido tipicamente ao utilizar as cepas do hospedeiro que expressam a T7RNA polimerase em resposta à indução de IPTG. Uma vez produzido, o polipeptídeo recombinante é então isolado de acordo com os métodos padrão conhecidos no estado da técnica, por exemplo, aqueles descritos na presente invenção.

Um outro sistema de expressão bacteriana para a produção de polipeptídeo é o sistema de expressão de pGEX (Pharmacia). Esse sistema emprega um sistema de fusão do gene de GST que é projetado para a expressão de alto nível dos genes ou dos fragmentos de genes como proteínas de fusão com rápida purificação e recuperação rápida de produtos de genes funcionais. A proteína de interesse é fundida ao terminal carboxila da proteína de glutathione S-transferase a partir de *Schistosoma japonicum* e é purificada facilmente a partir dos lisatos bacterianos por meio de cromatografia de afinidade utilizando Glutathione Sefarose 4B. As proteínas de fusão podem ser recuperadas sob condições amenas pela eluição com a glutathione. A clivagem do domínio de glutathione S-transferase da proteína de fusão é facilitada pela presença de sítios de reconhecimento para as proteases de sítio específico a montante deste domínio. Por exemplo, as proteínas expressas nos plasmídeos de pGEX-2T podem ser clivadas com trombina; e aquelas expressas em pGEX-3X podem ser clivadas com o fator Xa.

Alternativamente, os polipeptídeos recombinantes da invenção são expressos em *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica. A *Pichia* tem a capacidade de metabolizar o metanol como fonte única de carbono. A primeira etapa no metabolismo do metanol é a oxidação do metanol em formaldeído pela enzima, álcool oxidase. A expressão dessa enzima, que é codificada pelo gene AOX1, é induzida pelo metanol. O promotor AOX1 pode ser utilizado para a expressão de

polipeptídeo induzível ou o promotor de GAP para a expressão constitutiva de um gene de interesse.

Uma vez que o polipeptídeo recombinante da invenção é expresso, ele é isolado, por exemplo, utilizando a cromatografia de afinidade. Em um exemplo, um anticorpo (por exemplo, produzido tal como descrito na presente invenção) criado versus um polipeptídeo da invenção pode ser unido a uma coluna e ser utilizado para isolar o polipeptídeo recombinante. A lise e o fracionamento do polipeptídeo que abriga as células antes da cromatografia de afinidade podem ser executados por meio de métodos padrão (vide, por exemplo, Ausubel et al., supra). Alternativamente, o polipeptídeo é isolado utilizando uma sequência de Tag, tal como um Tag de hexahistidina, que se liga à coluna de níquel.

Uma vez isolada, a proteína recombinante pode, caso desejado, ser adicionalmente purificada, por exemplo, por meio de cromatografia líquida de alto desempenho (vide, por exemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980). Os polipeptídeos da invenção, particularmente os fragmentos de peptídeo curtos, também podem ser produzidos por meio de síntese química (por exemplo, pelos métodos descritos em Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill). Essas técnicas gerais de expressão e de purificação de polipeptídeo também podem ser utilizadas para produzir e isolar fragmentos ou análogos de peptídeo úteis (descritos na presente invenção).

Caso desejado, um vetor que expressa os fatores de recrutamento de células-tronco é administrado a um tecido ocular, tal como a camada epitelial pigmentar da retina. SDF-1 (também chamado de PBSF) (Campbell et al. (1998) *Science* 279(5349): 381-4), 6-C-cina (também chamada de Exodus-2) e MIP-3 β (também chamado de ELC ou Exodus-3) induzem a

aderência da maioria dos linfócitos circulantes, incluindo a maioria das células CD4⁺T; e MIP-3 α (também chamado de LARC ou Exodus-1) provocaram a aderência das células CD4⁺T de memória, mas inexperientes. Tangemann et al. (1998) *J. Immunol.* 161:6330-7 descrevem o papel da quimiocina de tecido linfóide secundário (SLC), uma quimiocina associada ao vênulo endotelial elevado (HEV), com a localização dos linfócitos nos órgãos linfóides secundários. Campbell et al. (1998) *J. Cell Biol* 141(4): 1053-9 descrevem o receptor para SLC como CCR7 e que seu ligante, SLC, pode provocar a interrupção rápida de integrina dependente dos linfócitos que rolam sob o cisalhamento fisiológico.

Em outras abordagens, os vetores que expressam polipeptídeos antiangiogênicos são administrados para reduzir a neovascularização em um tecido ocular. Tais polipeptídeos antiangiogênicos incluem, mas sem ficar a eles limitados, interferon- α e interferon- β .

Além disso, em outras abordagens, um vetor que codifica um polipeptídeo caracteristicamente expresso em uma célula ocular é introduzido em uma célula-tronco da invenção. Os polipeptídeos expressos em células endoteliais da retina incluem o marcador do epitélio dependente pigmentar da retina, RPE 65 e os marcadores de tecido endotelial, tais como RPCA-1. Caso desejado, as células-tronco expressam constitutivamente os marcadores específicos para o endotélio do SNC (tal como P-glicoproteína, GLUT-1 e o receptor de transferrina). As células-tronco transformadas com estes vetores exibem preferencialmente as características morfológicas e características de expressão de antígeno das células epiteliais pigmentares da retina (por exemplo, a morfologia de pavimento e expressão de RET-PE2 e de citoqueratinas). Exemplos de proteínas da retina específicas,

que incluem SAGE Tags conhecidos, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1

SAGE tags específicos/enriquecidos retinianos		
SAGE tag	Gene	Doença Retiniana
TGTGCTGAAC	Transferrina	—
GTAGGAGCTG	HRG4	—
TACGTGAATT	Gama transducina	—
AGAAGGCCTG	ROM1	ADRP
GCCCTGTGCT	Recoverina	—
GTGGGTAGCA	Gama fosfodiesterase	—
GAAAAATAAA	1. ABCR 2. isoenzima piruvato quinase desidrogenase	Stargardt, CDR, ARRP
TAACACATTC	1. proteína hipotética 2. Hs.151710 3. trocado de sódio e cálcio	—
CGGGGTAGCA	Gama fosfodiesterase	—
GATTTGGATG	Hs.35493	—
AGAGCGCAGC	alfa A -cristalina	(catarata)
GACAATAAAT	MT-protocaderina	—
CTCACCAACA	rodopsina	ADRP, ARRP, cSNB
CAGATGGTTT	Hs.21299	—
CACCCTCAGC	arrestina	Oguchi, ARRP
AGAAAATAAA	1. proteína de membrana secretora transportadora 1 2. fosducina 3. Hs.58033	—
TTGCTTTTAT	1. Hormônio somatomotropina coriônica 2 2. Hs.256635	—
ATCTTTTAA	1. MAGUK p55 membro da subfamília 4 2. citocromo b-5	—
GTACATTAGT	clusterina-similar 1 (retiniana)	—
GGCCCCAGTT	rodopsina	ADRP, ARRP, cSNB
CTAACTGCGA	Hs. 13768	—
CTTTCTCCTT	beta transducina	—
ATGGGTCTGG	Hs. 145068	—
AGAGCACAGC	alfa A - cristalina	(catarata)
GACCACAAAA	CACNA1F	CSNB
ACGTGCGCCA	1. alfa transducina 2. família do soluto transportador 21	CSNB
CTCAGGAATT	Beta fosfodiesterase	CSNB
TATACCATTT	membro 4 da superfamília de imunoglobulina	—
GATGGAGGAC	1. proteína RNA-ligante S1 2. canal beta	ARRP
ACTAGCACGC	NRL	ADRP
GGAGCCCTCT	NR2E3	ESCS
TAACAAAACC	1. proteína ligante de cálcio 5/3 2. Hs.57898 3. Hs. 5801	—
ACAATGTTGT	proteína celular ligante de ácido retinóico 1	—
AAGTCTGTTG	Hs. 300880	—
AGGTCTGCCT	Opsina verde/vermelha	Daltonismo
TACATCATAT	canal alfa	ARRP
TGATCACGCC	enolase 2	—
TTAACTGTAC	Hs. 66803	—

ACCCAAGCAT	domínio 2 EF hand ligante de cálcio proteína fosfatase (rdgC homólogo)	—
TAGTAGGCAC	RAB4	—
CTGTTACCAG	proteínas "frizzled" relacionadas	—
TTTCAAAGGG	Hs.98927	—
TACAGTAGTC	Hs.239444	—
GTAAGTTTAA	Hs.261526	—
GAAAATGAGA	inibidor de serina-proteinase, clado B, membro 6	—
TGGTTGCTGG	Hs. 33792	—
AGGCCGCTAG	X-arrestina	—
TAAATGCAG	1. neuroD 2. Hs.271341	—
CAAGGGGTTT	canal alfa	ARRP
TATATACACA	1. IRBP 2. Spindlin	—
TTTTTGTGTT	1. 127019 2. Hs.50340	—
GGCTGCAATC	1. fosfoglicerato mutase 1 2. UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosiltransferase	—
TATGTATCCT	proteína-similar 2 do domínio SH3 ligante de ác. glutâmico enriquecido	—
TGCCTGCTAA	Hs.98881	—
CTTGTTTTGT	1. proteína retiniana homeobox 2. Hs.12799	—
TCTACCTATG	1. glutationa peroxidase 3 2. calpaína 9	—
AGCCGGAGGT	Fosfatase de dupla especificidade 6	—
ATTTTCAGTT	Hs.250591	—
TTGGGCAGGC	Hs.213731	—
AACTTCAAGG	Hs.154131	—
TGGTAAATGT	ativador de guanilato ciclase 1C	—
GGGGACCCTT	HT017	—
CTCTTCTGGA	ativador de guanilato ciclase 1 ^a	—
GGAAGGAAAA	1. Membro D transportador de H ⁺ /ATPase 2. Hs.43112	—
TCCAAACTAA	gama PDE	—
GGGTGGGGGA	1. proteína da membrana associada a vesícula 2. Hs.220656 3.340046	—
TGCTTCTTCT	membro 4 da família NDRG	—
TGTCAGTCTT	Hs.310689	—
AAGTTTGGCC	Transferrina	—
TCCCTGGTGC	1. sinaptogirina 1 2. Hs.279307	—
TTTTATTGCA	Neurobeachin	—
ATACTCATTG	Hs.122245	—
AGAGACCCTC	Hs.113689	—

Os vetores virais transducentes (por exemplo, retrovirais, adenovirais e virais adeno-associados) podem ser utilizados para a terapia de genes de células somáticas, especialmente por causa de sua eficiência elevada de

5 infecção, e de integração e de expressão estáveis (vide, por

exemplo, Cayouette et al., Human Gene Therapy 8: 423-430, 1997; Kido et al., Current Eye Research 15: 833-844, 1996; Bloomer et al., Journal of Virology 71: 6641-6649, 1997; Naldini et al., Science 272: 263-267, 1996; e Miyoshi et al.,
5 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 10319, 1997). Por exemplo, um polinucleotídeo que codifica uma proteína Hsp, variante ou um fragmento da mesma, pode ser clonado em um vetor retroviral e a expressão pode ser dirigida de seu promotor endógeno, da repetição terminal longa retroviral ou de um
10 promotor específico para um tecido ou uma célula de interesse (por exemplo, um tecido ocular, tal como o coróide ou a camada epitelial pigmentar da retina). Outros vetores virais que podem ser utilizados incluem, por exemplo, um vírus de varíola, um papiloma vírus bovino ou um vírus de herpes, tal
15 como o vírus Epstein-Barr (vide também, por exemplo, os vetores de Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244: 1275-1281, 1989; Eglitis et al., BioTechniques 6: 608-614, 1988; Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1: 55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337: 1277-
20 1278, 1991; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36: 311-322, 1987; Anderson, Science 226: 401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17: 407-416, 1991; Miller et al., Biotechnology 7: 980-990, 1989; Le Gal La Salle et al., Science 259: 988-990, 1993; e Johnson, Chest 107: 77S-83S,
25 1995). Os vetores retrovirais são particularmente bem desenvolvidos e têm sido utilizados em ambientes clínicos (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323: 370, 1990; Anderson et al., Patente U.S. N°. 5.399.346). Com a máxima preferência, um vetor viral é utilizado para a administração
30 de um polinucleotídeo de Hsp ao olho.

As abordagens não-virais também podem ser empregadas para a introdução de uma terapêutica a uma célula de um paciente (por exemplo, uma célula ou um tecido ocular).

Por exemplo, uma molécula de ácido nucléico pode ser introduzida em uma célula ao administrar o ácido nucléico na presença de lipofecção (Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Letters 5 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983), conjugação de asialoorosomucóide-polilisina (Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989) ou por meio 10 de microinjeção sob condições cirúrgicas (Wolff et al., Science 247:1465, 1990). Os ácidos nucléicos são administrados preferencialmente em combinação com um lipossomo e uma protamina.

A transferência de genes também pode ser conseguida 15 ao empregar meios não-virais que envolvem a transfecção *in vitro*. Tais métodos incluem o uso de fosfato de cálcio, dextrano de DEAE, eletroporação e fusão de protoplasto. Os lipossomos também podem ser potencialmente benéficos para a aplicação de DNA em uma célula. O transplante de genes 20 normais nos tecidos afetados de um paciente também pode ser realizado ao transferir um ácido nucléico normal em um tipo de célula cultivável *ex vivo* (por exemplo, uma célula primária autóloga ou heteróloga ou progênie da mesma), depois de a célula (ou seus descendentes) ser injetada em um tecido 25 alvejado.

A expressão do cDNA para o uso nos métodos de terapia de polinucleotídeo pode ser dirigida a partir de qualquer promotor apropriado (por exemplo, o citomegalovírus humano (CMV), vírus símio 40 (SV40) ou promotores de 30 metalotioneína) e ser regulada por qualquer elemento regulatório apropriado de mamífero. Exemplos de promotores constitutivos incluem os promotores para os seguintes genes que codificam determinadas funções constitutivas ou "de

tarefas domésticas": hipoxantina fosforibosila transferase (HPRT), diidrofolato reductase (DHFR) (Scharfmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88:4626-4630 (1991)), adenosina deaminase, fosfoglicerol cinase (PGK), piruvato cinase, fosfoglicerol mutase fosfoglicerol, promotor de actina (Lai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86:10006-10010 (1989)) e outros promotores constitutivos conhecidos por um técnico no assunto. Além disso, muitos promotores virais funcionam constitutivamente nas células eucarióticas. Estes incluem: os promotores iniciais e finais de SV40; as repetições de terminal longo (LTR) do Vírus da Leucemia Moloney e outros retrovírus; e o promotor de cinase de timidina do Vírus do Herpes Simplex, entre muitos outros. Conseqüentemente, qualquer um dos promotores constitutivos referidos acima pode ser utilizado para controlar a transcrição de uma inserção de gene heterólogo.

Os genes que estão sob o controle de promotores indutíveis são expressos somente ou a um grau maior, na presença de um agente de indução, (por exemplo, a transcrição sob o controle do promotor de metalotioneína é aumentada intensamente na presença de determinados íons de metal). Os promotores induzíveis incluem os elementos responsivos (REs) que estimulam a transcrição quando seus fatores de indução são limitados. Por exemplo, há REs para fatores de soro, hormônios esteróides, ácido retinóico e AMP cíclico. Os promotores que contêm um RE particular podem ser escolhidos a fim de obter uma resposta induzível e, em alguns casos, o próprio RE pode ser unido a um promotor diferente, conferindo desse modo induzimento ao gene recombinante. Desse modo, ao selecionar o promotor apropriado (constitutivo versus induzível; forte versus fraco), é possível controlar a existência e o nível da expressão de um agente terapêutico nas células-tronco e/ou nas células da retina geneticamente

modificadas. A seleção e a otimização destes fatores para a aplicação de uma dose terapeuticamente eficaz de um agente terapêutico particular são consideradas como enquadradas dentro do escopo de um técnico no assunto sem experimentação indevida, levando em consideração os fatores descritos acima e o perfil clínico do paciente.

Adicionalmente a pelo menos um promotor e pelo menos um ácido nucléico heterólogo que codifica o agente terapêutico, o vetor de expressão inclui preferencialmente um gene de seleção, por exemplo, um gene de resistência à neomicina, para facilitar a seleção das células-tronco que foram transfectadas ou transduzidas com o vetor de expressão.

Caso desejado, os intensificadores conhecidos para direcionar preferencialmente a expressão de genes em tipos específicos de células podem ser utilizados para dirigir a expressão de um ácido nucléico. Os intensificadores utilizados podem incluir, sem limitação, aqueles que são caracterizados como intensificadores de tecido ou específicos de células. Alternativamente, se um clone genômico for utilizado como um construto terapêutico, a regulação pode ser mediada pelas seqüências regulatórias cognatas ou, caso desejado, pelas seqüências regulatórias derivadas de uma fonte heteróloga, que inclui qualquer um dos promotores ou dos elementos regulatórios descritos acima.

Uma outra abordagem terapêutica incluída na invenção envolve a administração de uma terapêutica recombinante, tal como uma proteína Hsp recombinante, variante ou fragmento da mesma, diretamente ao sítio de um tecido afetado por uma doença real ou potencial, ou sistemicamente (por exemplo, por meio de qualquer técnica recombinante convencional de administração de proteínas). A dosagem da proteína administrada depende de uma série de fatores, incluindo o tamanho e a saúde de cada paciente. Para

qualquer indivíduo particular, regimes de dosagem específicos devem ser ajustados com o tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa que administra ou que supervisiona a administração das
5 composições.

A via ocular é a via de inoculação preferida de drogas de residência induzida de células-tronco e/ou de vetores aos tecidos oculares. No entanto, esta designação como a via de inoculação preferida não se presta a
10 impossibilitar nenhuma outra via de administração. As vias de inoculação de vetor preferidas são feitas através das vias intravitral ou sub-retinal. A via ocular inclui, mas sem ficar a elas limitada, a injeção subconjuntival, gotas de superfície, um dispositivo de liberação retardada tal como um
15 escudo de colágeno, uma lente de contato de hidrogel ou um ALZA "Ocusert". A vacinação subconjuntival é feita utilizando proparacaína como anestesia antes da injeção de 0,2-0,5 ml do vetor, em uma dose de 10-1.000 µg/inoculação, aplicada em uma seringa de insulina e em uma agulha de pequeno calibre. A
20 injeção é aplicada no *cul-de-sac* inferior ao assegurar que o material vacinal permaneça de modo subconjuntival e não vaze para fora.

A inoculação com gotas de superfície envolve a colocação do vetor com ou sem adjuvante e/ou droga de trafico
25 de células-tronco no *cul-de-sac* conjuntival e então a fricção do olho delicadamente por trinta segundos enquanto fechado. O procedimento pode ser repetido duas ou três vezes por dia durante cinco dias para prolongar a exposição, o que tudo compreende uma vacinação única. Para uma retenção melhor, os
30 dutos de drenagem de lágrima podem ser temporariamente bloqueados utilizando colágeno ou outros dispositivos. Alternativamente, o vetor e/ou o DNA puro podem ser encapsulados em uma microcápsula e então ser implantados no

olho para facilitar a liberação contínua.

Kits

A invenção apresenta kits para o tratamento ou a prevenção de uma doença, de um distúrbio ou de sintomas
5 oculares dos mesmos. Em uma realização, o kit inclui um pacote farmacêutico que compreende uma quantidade eficaz de um modulador protetor de Hsp90 (por exemplo, Geldanamicina) ou um ativador de resposta ao choque térmico (por exemplo, Celastrol). Preferencialmente, as composições estão presentes
10 na forma de dosagem unitária. Em algumas realizações, o kit compreende um recipiente estéril que contém uma composição terapêutica ou profilática; tais recipientes podem ser caixas, ampolas, garrafas, frascos, tubos, saquinhos, bolsas, blísteres ou outras formas apropriadas de recipientes
15 conhecidas no estado da técnica. Tais recipientes podem ser feitos de plástico, vidro, papel laminado, folha de metal ou de outros materiais apropriados para conter medicamentos.

Caso desejado, as composições da invenção ou as combinações das mesmas são fornecidas juntamente com
20 instruções para administração a um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver uma doença ou um distúrbio ocular, tal como a retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada à idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de
25 Stargardt, drusas autossômicas dominantes e distrofia macular de Best. As instruções irão incluir geralmente as informações sobre o uso dos compostos para o tratamento ou a prevenção de uma doença ou de um distúrbio ocular. Em outras realizações, as instruções incluem pelo menos um dos seguintes: descrição
30 do composto ou da combinação de compostos; programação e administração de dosagem para o tratamento de um distúrbio ocular ou dos sintomas do mesmo, precauções; avisos; indicações; contra-indicações; informações sobre

superdosagem; reações adversas; farmacologia animal; estudos clínicos; e/ou referências. As instruções podem ser impressas diretamente no recipiente (quando presente) ou como uma etiqueta aplicada ao recipiente ou como uma folha, um
5 panfleto, um cartão ou uma pasta separada fornecida dentro ou com o recipiente.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Recrutamento de Células-tronco por Laser

Camundongos quiméricos foram construídos com
10 células-tronco GFP⁺ que foram transplantadas em cinco camundongos que haviam sido submetidos à irradiação quase letal. Os camundongos quiméricos foram feitos com as células-tronco hematopoiéticas GFP expressoras de doadores GFP homozigotos transgênicos. Essas células foram transplantadas
15 nos receptores que haviam sido submetidos à irradiação quase letal. Esses camundongos GFP quiméricos (C57B16.gfp) foram utilizados em todos os estudos subsequentes com laser. Utilizando o laser de diodo de 810 nm com um diâmetro de ponto de 75 µm, vários níveis de energia foram aplicados à
20 retina incluindo a energia de 5 mJ (50 mW, 0,1 milissegundo) que não produziu reação visível do laser no tecido na retina (irradiância do laser de 1130 W/cm²). Este foi considerado o limiar sub-visível. Três semanas após o laser, os animais foram submetidos à eutanásia e os olhos foram colhidos. Os
25 "copos" do olho foram preparados e a retina neuro-sensora foi removida.

Os olhos que receberam a energia de laser sublimiar demonstraram um recrutamento resistente de células-tronco hematopoiéticas (HSC) para a camada epitelial pigmentar da
30 retina em um teste padrão difuso. Essas mudanças ocorreram dentro de um período de duas semanas. O laser sublimiar induz as células-tronco de adulto a migrarem e a repararem o epitélio pigmentar da retina tal como mostrado nas Figuras 1

e 2. A Figura 1 demonstra a localização dependente de ciclo de operação das células GFP⁺ no nível do RPE. As regiões escuras na Figura 1 representam as células GFP⁺ que foram incorporadas na camada do RPE nas áreas que receberam o laser. A fluorescência de fundo, tal como determinado pelos olhos contralaterais (não-afetados) foi removida desta imagem. A Figura 2 é um gráfico que quantifica a incorporação de células-tronco (HSC) humanas no RPE.

Exemplo 2: As HSC Recrutadas Para a Retina Expressam um Marcador de Retina Específico

10

Pela microscopia de imunofluorescência confocal, também foi mostrado que as células GFP positivas foram co-localizadas com RPE65, uma proteína específica para o RPE, sugerindo que as células-tronco hematopoiéticas recrutadas adquiriram características do RPE. Esses olhos também demonstraram o recrutamento de células endoteliais difusas. Os olhos que receberam o laser com energia elevada com notável opacificação da retina (150 mW, 0,1 segundo) mostraram o recrutamento focal das GFP⁺HSC para a região da cicatriz juntamente com as células endoteliais. O laser sublimiar induziu as HSC a migrarem e serem incorporadas no RPE. O grau de incorporação é correlacionado com o ciclo de operação do laser. O ciclo de operação de 15% resultou no maior grau de incorporação de HSC.

20

Exemplo 3: Laser limiar sub-visível hsp70, hsp90 e Indução da Resposta ao Choque térmico Resultou na Liberação de SDF-1 e

25

VEGF

30

Os lasers oftálmicos constituem uma ferramenta importante para o tratamento de vários distúrbios da retina. Na maioria dos exemplos, o efeito foi atribuído às mudanças visíveis na retina (isto é, queimaduras fotoquímicas induzidas por laser). Acredita-se que o laser de diodo de 810 nm cause menos danos à retina neuro-sensora porque a energia

do laser é absorvida pelo RPE. A Figura 2 demonstrou a localização dependente do ciclo de operação das células GFP⁺ no nível do RPE. Há uma resposta máxima de 10% ciclo de operação. Isto foi confirmado separadamente utilizando os métodos de transferência adotiva, uma técnica que se assemelha intimamente à terapia celular. A transferência adotiva envolve a administração sistêmica de HSC e resulta na residência rápida destas células às áreas que produzem os quimioatrativos.

10 O laser de micropulso foi desenvolvido clinicamente para minimizar os danos fotodestrutivos à retina. O laser infravermelho (810 nm) utilizado no modo de micropulso é uma modalidade relativamente nova para o tratamento potencial de distúrbios da retina. O uso de pulsos de laser repetitivos e breves durante uma única exposição limita a quantidade de condução de calor e os danos subseqüentes ao RPE. Ele vem ganhando recentemente aceitação clínica por esta razão. A resposta ao choque térmico é considerada uma resposta citoprotetora com base na capacidade de união das proteínas de choque térmico para limitar o desdobramento incorreto da proteína.

25 Para determinar se o uso de laser de micropulso agiu através dos efeitos térmicos que induzem a resposta ao choque térmico e/ou a indução de citocina e dos fatores de crescimento que atraem as HSC ao olho, um laser infravermelho com ciclo de operação variável foi utilizado para examinar o tempo de curso de expressão do mRNA de hsp70, de hsp90 e de cristalinas na retina neuro-sensora e no "copo" posterior que contém o RPE e o complexo coróide. Um aumento de pico em hsp70 foi observado duas horas após o laser na retina neural e quatro horas após o laser no "copo" posterior do olho. O mRNA para hsp90 atingiu o seu pico drasticamente na retina neural e no "copo" posterior do olho em duas horas. A

expressão induzida por laser de SDF-1 e de seu receptor CXCR-4 no "copo" posterior do olho também foi observada. O exame a duas horas após o laser sugeriu que um tratamento breve com laser afetou a maquinaria transcricional da célula do RPE e reprogramou a célula do RPE a produzir uma série de fatores que são capazes de recrutar HSC à retina. Quatro horas após o laser, foi observado um aumento na expressão de SDF-1 e CXCR-4. Uma vez que SDF-1 e VEGF são conhecidos por serem responsivos a hipoxia, o efeito do laser na retina nos níveis do HIF-1 α mRNA de foram examinados. A mRNA para HIF-1 α foi reduzido em duas horas e aumentado em quatro horas no "copo" posterior do olho.

Esses estudos suportam a regulação autócrina e parácrina do RPE por SDF-1 e VEGF. Sem desejar se limitar pela teoria, é provável que o laser sub-visível ative o ambiente extracelular do RPE - as camadas fotorreceptoras - e crie um ambiente receptivo para recrutamento de HSC. Evidências crescentes indicam que hsp70 extracelular é um agente neuroprotetor. Sem desejar se limitar pela teoria, hsp70 pode agir como um fator neuroprotetor na retina, facilitando o recrutamento de HSC para a retina para propiciar o reparo do RPE. As proteínas de choque térmico provavelmente funcionam no recrutamento de HSC à retina. Isto pode ser realizado *in vivo* pelo recrutamento de HSC seguindo a produção local de proteínas quimioatrativas.

Exemplo 4: Aumento dos níveis de Hsp70 mRNA depois do choque térmico de culturas de RPE primárias

Para determinar se o RPE poderia ser uma fonte de resposta à citocina *in vivo* observada, as culturas de RPE e ARPE19 (célula de RPE imortalizada) humanas primárias foram submetidas a choque térmico. Duas horas após o choque térmico, a supressão dos mRNA das proteínas de choque

térmico, HIF-1 α bem como SDF-1 e VEGF, foi observada. Em culturas de RPE, um aumento drástico de quarenta vezes nos níveis do hsp90 mRNA foi observado. Os resultados de hsp90 *in vitro* paralelizaram os resultados *in vivo*. De um modo
 5 impressionante, um aumento de cinqüenta vezes nos níveis do hsp70 mRNA de foi observado nas culturas de RPE primárias, que indicaram que as células de RPE residentes liberaram este agente neuroprotetor putativo. Com base nestes dados *in vivo* e sem desejar ser limitado pela teoria, é provável que as
 10 células de RPE sejam a fonte dos fatores quimiotáticos que facilitaram o recrutamento de HSC à retina. Isto não elimina a possibilidade de que outros tipos de células participem na resposta de recrutamento.

Resumidamente, esses resultados indicaram pela
 15 primeira vez que as HSC podem ser localmente recrutadas para a retina, incluindo a camada do RPE por meio de indução a laser ou farmacológica. Isto foi obtido com a indução de SVL de resposta ao choque térmico. A resposta ao choque térmico induzida por laser foi associada temporalmente com a
 20 liberação de HIF-1 α e então dos quimioatrativos SDF-1 e VEGF de HSC. Os presentes resultados não produziram nenhuma queimadura ou cicatriz com laser clinicamente visível. Esta falta de danos distingue os presentes métodos dos métodos que induzem o laser retinodestrutivo visível.

25 Exemplo 5: O Choque térmico Quimicamente Induzido Recruta HSC

Para o RPE

Essas observações foram estendidas quimicamente ao induzir a resposta ao choque térmico em células do RPE humanas primárias. Quatro horas após a exposição ao laser,
 30 havia um aumento exuberante nos níveis de hsp70 e um aumento moderado nos níveis do mRNA de hsp90, de hsp32 e do cristalina. A expressão de SDF-1 também foi observada. O

curso de tempo para esta expressão espelhou aquele observado durante a indução de choque térmico clássica.

Além disso, o choque térmico quimicamente induzido recrutou as HSC para o RPE tal como mostrado na Figura 3. A
5 indução farmacológica com indutores de molécula pequena de resposta ao choque térmico foi induzida por meio de injeção intravital de geldanamicina ou separadamente ao expor as células do RPE resultantes da indução idêntica de SDF-1 e VEGF. Essas experiências fornecem evidências conclusivas de
10 que a indução de choque térmico por indução a laser ou indução farmacológica resulta diretamente na produção de HIF-1 α e de HSC quimiocinas essenciais, SDF-1 e VEGF. Além disso, elas sugerem que a manipulação farmacológica conduz eficazmente ao recrutamento de HSC para a camada e à
15 diferenciação do RPE.

Os estudos clínicos mostraram que pacientes idosos reduziram os níveis de HSC em sua circulação. Essas células podem ser mobilizadas da medula óssea para incorporar a circulação sistêmica para o recrutamento para a retina.
20 Atualmente, a forma seca comum de DMRI não tem nenhum tratamento eficaz. A presente invenção apresenta o laser e métodos farmacológicos para o tratamento da DMRI. Os presentes métodos apresentam adicionalmente a terapia de células-tronco hematopoiéticas para a DMRI. Os presentes
25 estudos sugerem que os defeitos de reparos relacionados com a idade podem contribuir com o desenvolvimento da DMRI e adicionalmente indicar que a DMRI pode ser tratada ao intensificar a função de reparo utilizando uma combinação de laser e de abordagens farmacológicas. Em particular, a
30 invenção apresenta métodos para o tratamento de pacientes com DMRI com um agente que mobiliza HSC, tal como GM-CSF, seguido pelo laser sub-visível ou pela injeção intravital dos compostos que podem induzir a resposta ao choque térmico que

deve iniciar o reparo celular da camada do RPE.

Os resultados descritos acima foram obtidos utilizando os seguintes métodos e materiais.

Eletrorretinografia (ERG)

5 A função retinal dos olhos tratados e não-tratados é avaliada por ERG (uma técnica não-invasiva utilizada para determinar a função fotorreceptora) em uma base periódica (por exemplo, mensalmente) para determinar o efeito do laser ou da terapia do agente farmacológico. A eletrorretinografia
10 é uma técnica não-invasiva em que a resposta elétrica corneal à luz é medida em animais anestesiados. Os camundongos são anestesiados com injeções intraperitoneais de uma mistura de 80-100 mg/kg de cetamina e 5-10 mg/kg de xilazina para anestesia (Phoenix Pharmaceuticals, St. Joseph, MO). As
15 córneas dos camundongos são anestesiadas com uma gota com 0,5% de HCl proparacaína (Akorn, Buffalo Grove, IL) e dilatadas com uma gota com 2,5% de HCl de fenilefrina (Akorn). Os eletrodos de medição dotados de pontas de fios de ouro são colocados em cima de ambas as córneas com uma gota
20 com 2,5% de hipromelose (Akorn) para manter o contato do eletrodo e a hidratação corneal. Um eletrodo de referência é colocado subcutaneamente no centro do couro cabeludo inferior do camundongo e um eletrodo de ligação à terra é colocado subcutaneamente na pata traseira. O camundongo foi apoiado em
25 uma plataforma deslizante caseira que manteve o animal a uma temperatura constante de 37°C. O animal é posicionado de modo que sua cabeça inteira descanse dentro da abóbada de iluminação de Ganzfeld (campo cheio) de um UTAS-E 2000 Visual Electrodiagnostic System (LKC Technologies, Inc.,
30 Gaithersburg, MD). As ERGs escotópicas de campo cheio são medidas por flashes de 10 milissegundos em uma intensidade de 0,9 e 1,9 log cd m⁻² a intervalos de um minuto.

As respostas são amplificadas a um ganho de 4.000,

filtradas entre 0,3 e 500 Hz e digitalizadas a uma taxa de 2.000 hertz em dois canais. A média de cinco respostas em cada intensidade é calculada. Os traços de ondas são analisados utilizando o pacote de software UTAS-E 2000 (LKC Technologies, Inc.). Ondas-A são medidas a partir da linha de base ao pico na direção negativa da córnea; ondas-B são medidas a partir do pico negativo da córnea ao pico positivo da córnea principal.

Os animais recebem uma pomada antibiótica tripla (Vetropolycin) em seus olhos para manter a umidade após o procedimento e são levados a voltar à consciência em uma bandeja aquecida a 37 graus antes de serem retornados ao viveiro. Os animais que recebem a anestesia de Cetamina/Xilazina também irão receber 0,01-0,02 ml/g de peso corpóreo de LRS SQ morno.

Fundoscopia

O exame da retina dos olhos tratados e não-tratados é avaliada pela examinação fundoscópica. A fundoscopia é uma técnica não-invasiva em que fotografias da retina são tiradas de animais anestesiados. Os camundongos são anestesiados e as suas córneas são anestesiadas e dilatadas tal como descrito acima para a análise de ERG. A fotografia de fundo é executada com uma câmera e lente especializada, uma câmera de fundo portátil Kowa Genesis (Kowa Company, Ltd., Tóquio, Japão) focalizadas através de uma Volk Super 66 Stereo Fundus Lens (Keeler, Berkshire, Inglaterra). Duas fotografias de cada olho são geralmente tiradas para assegurar uma imagem corretamente focalizada. Os animais recebem uma pomada antibiótica tripla (Vetropolycin) em seus olhos para manter a umidade após o procedimento e são levados a recuperar a consciência em uma bandeja aquecida a 37°C antes de serem retornados ao viveiro. Os animais que recebem a anestesia de Cetamina/Xilazina também irão receber 0,01-0,02 ml/g de peso

corpóreo de LRS SQ morno.

Tratamento a Laser

A preparação pré-cirúrgica dos animais envolve a certificação que eles são fisicamente ativos e podem ser submetidos à anestesia. Os camundongos precisam estar sem nenhuma evidência de descarga ocular ou evidência de catarata para tornar possível a visualização da retina para executar o tratamento de queimadura a laser. Antes do tratamento a laser, os animais são anestesiados com injeção intraperitoneal com uma mistura de 80-100 mg/kg de cetamina e de 5-10 mg/kg de xilazina. Nenhuma formação de edema corneal ou de catarata é atribuída ao uso desses anestésicos. O nível de anestesia é monitorado por uma espetada na pata e a taxa de respiração. A falta de resposta reflexa à espetada na pata indica que o animal foi anestesiado corretamente. Nenhuma pomada ocular é aplicada antes ou durante o tratamento a laser porque isto deve impedir o tratamento a laser eficaz. Uma pomada antibiótica é aplicada para proteger o olho não-tratado. Se nenhuma resposta for demonstrada após a espetada na pata, então o tratamento a laser será prosseguido.

Dor, aflição ou desconforto são sugeridos pela movimentação do animal durante o tempo requerido para o tratamento a laser. Se o animal mostrar movimentação aumentada pouco antes ou durante a cirurgia a laser, então a anestesia é suplementada ao expor o animal ao isoflurano por dez segundos. Aproximadamente 1 ml de isoflurano é embebido em um Kimwipe enrolado em espiral colocado no fundo de um tubo centrífugador plástico de 50 ml e o tubo é tampado. Caso necessário, a extremidade aberta deste tubo pode ser mantida momentaneamente perto do nariz do animal. Esse procedimento é executado em uma coifa a vapor. Depois disso, a taxa de respiração do animal continuará a ser monitorada e a resposta à dor do animal será monitorada pela espetada na pata. Se

nenhuma movimentação for demonstrada após a espetada na pata, então a cirurgia a laser será prosseguida. O tratamento a laser dura aproximadamente 30 segundos por camundongo. Uma injeção intraperitoneal de yohimbine (2 mg/kg de peso corpóreo) é utilizada para inverter o efeito da cetamina/xilazina. Isto irá reduzir a quantidade de tempo que os olhos estão em risco devido à perda de reflexo de piscamento sob anestesia. Nenhum comportamento anormal é esperado após a cirurgia.

Dor, aflição e desconforto podem ocorrer após o tratamento a laser. A literatura indica que a recuperação humana após o tratamento a laser é auxiliada pela aplicação de cetorolaco à córnea ao final do procedimento (Kosrirukvongs et al, Topical ketorolac tromethamine in the reduction of adverse effects of laser in situ keratomileusis, J. Med Assoc Thai, 2001; 84: 804-810, e Price, et al, Pain reduction after laser in situ keratomileusis with ketorolac tromethamine ophthalmic solution 0.5%: a randomized, double-masked, placebo-controlled trail, J. Refract Surg, 2002; 18: 140-144). Portanto, após o tratamento a laser, gotas de uma solução de cetorolaco (0,5% de OP) serão aplicadas aos olhos dos camundongos por 48 horas após o tratamento, e por mais tempo caso necessário. O nome comercial dessa solução é Acular PF Solution. Essa duração de tratamento com Acular PF não tem nenhum efeito adverso nos camundongos e não tem nenhum efeito na neovascularização tal como evidenciado pela análise dos animais injetados com veículo. Os animais serão mantidos em suas gaiolas e mantidos à temperatura ambiente (18-26°C) ou em uma bandeja aquecida a 37°C e serão monitorados visualmente continuamente até que mostrem sinais de recuperação da anestesia. A recuperação completa da anestesia ocorre somente quando o animal está inteiramente alerta e

perambula pela gaiola.

Cultura de Medula Óssea:

Os camundongos doadores foram submetidos à eutanásia "humana" antes da cultura de medula óssea, uma vez
5 que esse procedimento não é uma cirurgia com sobrevida. Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de injeção com uma dose excessiva de cetamina (60 mg de Xilazina/Kg, 30 mg de Cetamina/Kg) administrada IP. Depois que a perda da dor profunda foi atingida, tal como determinado pela falha em
10 responder à espetada no dedo/pata, um deslocamento cervical foi executado para confirmar a morte.

Para cultivar as células-tronco derivadas de medula óssea do camundongo, os fêmures foram assepticamente dissecados de camundongos transgênicos com quatro a oito
15 semanas de vida que expressam a proteína de fluorescência verde intensificada (GFP). Ambas as extremidades dos fêmures foram cortadas e o tutano foi extraído com 5 ml do meio Eagle Modificado da Dulbecco (DMEM; Nissui Co., Tóquio, Japão) contendo 10% de soro fetal de bovino (FBS), 2 mM de L-
20 glutamina, 100 unidades/ml de penicilina G e 10% de heparina, utilizando uma seringa de 2,5 ml com agulha de calibre 21. A análise de FACS foi utilizada para confirmar o fenótipo apropriado das BMSCs.

Injeções Intraperitoneais

25 O procedimento para a injeção intraperitoneal é tal como segue: O indivíduo é escolhido pela nuca bem perto das orelhas. A cauda do camundongo será presa pelos dedos pequenos da mesma mão. Utilizando uma agulha hipodérmica estéril de calibre 26, a pele e o músculo abdominal serão
30 perfurados e o conteúdo da agulha será injetado na cavidade peritoneal com cuidado para evitar o diafragma e outros órgãos internos.

Injeções Intravitreais

Os camundongos são anestesiados tal como descrito acima. 0,5% de cloridreto de proparacaína (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) é utilizado para anestesia tópica adicional. HCl de fenilefrina e/ou sulfato de atropina é aplicado à superfície ocular antes da injeção a fim de obter a dilatação da íris para minimizar os danos relacionados ao procedimento e uma pomada oftálmica antibiótica tripla (Vetropolycin) é aplicada após a injeção, para impedir a infecção. Uma agulha de calibre 30 é utilizada para fazer uma incisão perfuradora 0,5 mm posterior ao limbus temporal, e a agulha microinjetora é introduzida através da incisão, até aproximadamente 1,5 mm de profundidade, angularmente em direção ao nervo óptico até que a ponta da agulha seja visualizada no centro do vítreo. Todas as injeções são visualizadas com o auxílio de um microscópio de dissecação, Nikon SM2800 (Nikon, Melville, NY) com a iluminação fornecida por uma fonte e luz de fibra óptica de 150 watts da Southern Micro Instruments com braços de fibra óptica da Schott Fostec (Southern Micron Instruments, Marietta, GA). Até 2 microlitros da suspensão da droga são então introduzidos lentamente no vítreo e a agulha é retirada com cuidado.

Após este procedimento, os camundongos são colocados para se recuperar em gaiolas limpas em uma bandeja aquecida. Os animais são observados até que estejam inteiramente recuperados do procedimento, depois do que são retornados ao viveiro.

Injeções Retro-orbitais

Para a aplicação local de células-tronco, as injeções retro-orbitais funcionam muito bem nos transplantes de células-tronco como uma alternativa às injeções intravenosas na veia da cauda. Os camundongos são anestesiados com cetamina/xilazina tal como descrito acima ou

através do uso de isoflurano administrado através de um vaporizador de precisão. A pele acima do olho é delicadamente retraída, de um modo similar a um procedimento de sangramento. As injeções são executadas utilizando uma
5 seringa de 1 cc e uma agulha de calibre 27 ou 30, com o chanfrado virado para fora e são introduzidas em um ângulo de 45° no centro da área do sinus retro-orbital. A ponta da agulha é avançada com cuidado para penetrar o sinus retro-orbital; isto é feito cuidadosamente para se ter certeza de
10 que a agulha esteja aproximadamente na metade do sinus. Até 200 µl da suspensão de células são injetados lentamente. A suspensão de células é filtrada antes da injeção de modo que não contenha nenhuma pelota. Após a injeção, a agulha é removida com cuidado, mantendo o chanfro virado para fora
15 para proteger o olho do camundongo contra riscos.

Para injeções múltiplas, há intervalos de pelo menos dois dias entre as injeções. Os olhos são alternados para injeções subseqüentes, com um máximo de duas injeções por olho por camundongo. O anestésico tópico de proparacaína
20 é administrado um minuto antes da injeção.

A injeção retro-orbital é significativamente menos traumática do que o sangramento do olho no mesmo sítio. O sítio é inspecionado ou observado após o procedimento para se assegurar que não haja nenhum trauma ao olho. Após cada
25 injeção e assim que qualquer sangramento tenha parado totalmente, a pomada oftálmica antibiótica será aplicada e espalhada uniformemente no olho para impedir infecção. Após o procedimento, o animal é monitorado quanto a sinais de dor (blefaroespasma, entortar os olhos) dentro das 24-48 horas
30 seguintes e dados analgésicos conforme necessário.

Depois da anestesia, o(s) animal(is) é(são) observado(s) até que estejam conscientes e caminhando, depois do que será/serão retornado(s) a sua(s) gaiola(s) para as

prateleiras de gaiolas.

Outras Realizações

A partir da descrição antecedente, ficará evidente que variações e modificações podem ser feitas na invenção descrita na presente invenção para que sejam adotadas nos
5 vários usos e condições. Tais realizações também estão dentro do âmbito das reivindicações seguintes.

A relação de uma lista de elementos em qualquer definição de uma variável na presente invenção inclui
10 definições dessa variável como qualquer elemento ou combinação única (ou sub-combinação) dos elementos relacionados. A relação de uma realização na presente invenção inclui essa realização como qualquer realização única ou em combinação com quaisquer outras realizações ou
15 partes da mesma.

Todas as patentes e publicações mencionadas neste relatório descritivo são incorporadas na presente invenção a título de referência até a mesma extensão tal como se cada patente e publicação independente fosse indicada específica e
20 individualmente para ser incorporada a título de referência.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OCULAR EM UM INDIVÍDUO, caracterizado pelo fato de compreender:

5 (a) a indução de choque térmico em pelo menos uma célula de um tecido ocular; e

(b) o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular, melhorando desse modo o distúrbio ocular.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido no
10 tecido ocular utilizando laser limiar sub-visível (SVL).

3. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido utilizando um composto pequeno selecionado do grupo que
15 consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8, e H-71.

4. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido
20 utilizando um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, e HSP40.

5. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido utilizando um vetor de expressão que compreende um
25 polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de choque térmico.

6. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que o dito uso aumenta a expressão ou a atividade de uma proteína de choque
30 térmico selecionada do grupo que consiste em HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, e HSP40.

7. USO, de acordo com a reivindicação 4 ou 5,

caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de choque térmico é HSP70 ou HSP90.

8. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco é uma célula-tronco hematopoiética.

9. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito uso reduz pelo menos um sintoma da doença ou distúrbio ocular.

10. USO, de acordo com a reivindicação 1, em que a doença ou distúrbio ocular é selecionado do grupo que consiste em retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada a idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, drusas autossômicas dominantes, e distrofia macular de Best, edema macular cistóide, descolamento da retina, danos fóticos, retinopatias isquêmicas, doença degenerativa retinal induzida por inflamação, retinosquise juvenil ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML) e distrofia retiniana em favos de mel de Doyme.

11. MÉTODO PARA RECRUTAR UMA CÉLULA-TRONCO PARA UM TECIDO OCULAR DE UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DA MESMA, sendo que o método é caracterizado pelo fato de compreender a estimulação do tecido ocular com um laser sublimiar, em que o nível de estimulação é suficiente para recrutar pelo menos uma célula-tronco para o tecido.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que é utilizado um ciclo de operação de 10% ou 15%.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o laser sublimiar tem um comprimento de onda de pelo menos aproximadamente 100 nm a

2.000 nm.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a energia do laser sublimiar é de aproximadamente 5 mW a 200 mW.

5 15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a energia do laser sublimiar é de 10 mW a 100 mW.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o laser é administrado em um
10 micropulso.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a duração do micropulso é de aproximadamente 0,001 milissegundo a 1,0 milissegundo.

18. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 17,
15 caracterizado pelo fato de que a duração do micropulso é de 0,1 milissegundo.

19. MÉTODO, de acordo qualquer uma das reivindicações 14 a 18, caracterizado pelo fato de que a energia do laser sublimiar fica compreendida entre 10 mW e
20 100 mW e é administrada em um pulso de 0,1 milissegundo.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a estimulação aumenta a expressão ou a atividade biológica de uma proteína de choque térmico selecionada do grupo que consiste em HSP100, HSP90,
25 HSP70, HSP60, e HSP40.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a estimulação altera a expressão ou a atividade de uma proteína selecionada do grupo que consiste em SDF-1, VEGF, HIF-1 α , cristalina, fator de
30 transcrição induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1a), e CXCR-4.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o método aumenta a expressão

de um polipeptídeo HSP70 ou HSP90 em pelo menos dez vezes.

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o método aumenta a expressão ou a atividade de um polipeptídeo HSP70 ou HSP90 em pelo
5 menos quarenta vezes.

24. MÉTODO PARA RECRUTAR UMA CÉLULA-TRONCO PARA UM TECIDO OCULAR DE UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DA MESMA, sendo que o método é caracterizado pelo fato de compreender:

(a) a administração de um agente a um indivíduo em
10 uma quantidade suficiente para induzir choque térmico em um tecido ocular; e

(b) o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular.

25. USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA
15 OU UM DISTÚRPIO OCULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, sendo que o dito uso é caracterizado pelo fato de compreender:

(a) administração de um agente a um indivíduo em uma quantidade suficiente para induzir choque térmico em um
20 tecido ocular; e

(b) o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular, desse modo melhorando a doença ou o distúrbio ocular.

26. USO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a doença ou o distúrbio ocular é selecionado do grupo que consiste em retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada a idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, drusas autossômicas
30 dominantes, e distrofia macular de Best, edema macular cistóide, descolamento da retina, danos fóticos, retinopatias isquêmicas, doença degenerativa retinal induzida por

inflamação, retinosquise juvenil ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML) e distrofia retiniana em favos de mel de Doyne.

27. USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REGENERAR A RETINA
5 EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, sendo que o dito uso é caracterizado pelo fato de compreender:

(a) a administração de um agente a um indivíduo em uma quantidade suficiente para induzir choque térmico em um tecido ocular; e

10 (b) o recrutamento de uma célula-tronco para o tecido ocular, regenerando desse modo a retina.

28. USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REPARAR OS DANOS AO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, sendo que o método é caracterizado pelo fato de
15 compreender:

(a) a administração de um agente a um indivíduo em uma quantidade suficiente para induzir choque térmico em um tecido ocular; e

(b) o recrutamento de uma célula-tronco para o
20 tecido ocular, reparando desse modo o epitélio do pigmento retinal.

29. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido utilizando um composto pequeno.

25 30. USO, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de o composto pequeno é selecionado do grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8, e H-71.

30 31. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido utilizando um polipeptídeo.

32. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido utilizando um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de choque térmico.

33. USO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo de choque térmico é selecionado do grupo que consiste em HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, e HSP40.

34. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que o agente aumenta a expressão ou a atividade biológica de uma proteína de choque térmico selecionada do grupo que consiste em HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, e HSP40.

35. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que o agente altera a expressão ou a atividade de uma proteína selecionada do grupo que consiste em SDF-1, VEGF, HIF-1 α , cristalina, fator induzível por hipóxia 1-alfa (HIF-1 α), e CXCR-4.

36. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que aumenta a expressão de um polipeptídeo HSP70 ou HSP90 em pelo menos dez vezes.

37. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 28, caracterizado pelo fato de que aumenta a expressão ou a atividade de um polipeptídeo HSP70 ou HSP90 em pelo menos quarenta vezes.

38. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que um agente que aumenta a mobilização da célula-tronco hematopoiética é administrado ao indivíduo antes da indução

da resposta ao choque térmico.

39. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a administração de um agente anti-inflamatório ou um agente anti-angiogênico.

40. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que o método compreende adicionalmente a administração de um agente que suporta a sobrevivência, a proliferação, ou a transdiferenciação de uma célula-tronco hematopoiética.

41. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem uma doença ou um distúrbio ocular selecionado do grupo que consiste em retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada a idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, drusas autossômicas dominantes, e distrofia macular de Best, edema macular cistóide, descolamento da retina, danos fóticos, retinopatias isquêmicas, doença degenerativa retinal induzida por inflamação, retinosquise juvenil ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML) e distrofia retiniana em favos de mel de Doyne.

42. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que o método compreende adicionalmente a administração de todo ácido trans-retinóico para intensificar a transdiferenciação da célula-tronco a uma célula epitelial pigmentar da retina.

43. USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU UM DISTÚRBIO OCULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, sendo que o dito uso é caracterizado pelo fato de compreender:

(a) a administração ao indivíduo de um agente que mobiliza uma célula-tronco derivada da medula óssea no indivíduo;

5 (b) a indução de choque térmico em um tecido ocular; e

(c) o recrutamento da célula-tronco para o tecido ocular, desse modo melhorando a doença ou o distúrbio ocular.

44. USO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o agente é um fator
10 estimulante de colônia de macrófagos de granulócitos ou um fator de células-tronco.

45. USO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido utilizando um tratamento de laser sublimiar.

15 46. USO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o choque térmico é induzido utilizando um agente que é um composto pequeno, um polipeptídeo, ou uma molécula de ácido nucléico.

47. USO, de acordo com a reivindicação 46,
20 caracterizado pelo fato de que o composto pequeno é selecionado do grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8, e H-71.

25 48. USO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a doença ou o distúrbio ocular é selecionado do grupo que consiste em retinopatia diabética, neovascularização coroidal, glaucoma retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada a idade, glaucoma, distrofias
30 corneais, retinosquise, mal de Stargardt, drusas autossômicas dominantes, e distrofia macular de Best, edema macular cistóide, descolamento da retina, danos fóticos, retinopatias

isquêmicas, doença degenerativa retinal induzida por inflamação, retinosquise juvenil ligada ao X, glaucoma, Malattia Leventinese (ML) e distrofia retiniana em favos de mel de Doyne.

5 49. USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR A DEGENERÇÃO MACULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, sendo que o dito uso é caracterizado pelo fato de compreender:

 (a) a administração ao indivíduo de GM-CSF e/ou
10 Fator de Célula-tronco, em que a administração mobiliza uma célula-tronco derivada da medula óssea no indivíduo;

 (b) a indução de choque térmico em um tecido ocular mediante a administração de um tratamento ou agente de laser sublimiar ; e

15 (c) o recrutamento da célula-tronco derivada da medula óssea para o tecido ocular, melhorando desse modo a degeneração macular.

 50. USO, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o agente é selecionado do
20 grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8, e H-71.

 51. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 49, caracterizado pelo fato de que o
25 agente é administrado por meio de injeção intravitreal ou retro-orbital.

 52. USO, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que a administração induz o reparo celular da camada de RPE.

30 53. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 49, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a administração de um vetor que

codifica um polipeptídeo terapêutico.

54. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 49, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a administração de uma célula-tronco substancialmente purificada ao indivíduo.

55. USO OU MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 49, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco é administrada localmente por meio de infecção intravitral ou retro-orbital.

56. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO, sendo que a composição é caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz de um composto pequeno selecionado do grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102, radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8, e H-71 em um excipiente farmacêuticamente aceitável, e a composição é formulada para aplicação ocular.

57. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR, sendo que a composição é caracterizada pelo fato de compreender um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de choque térmico em um excipiente farmacêuticamente aceitável, e a composição é formulada para a aplicação ocular.

58. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de choque térmico é selecionado do grupo que consiste em HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, e HSP40.

59. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR, sendo que a composição é caracterizada pelo fato de compreender um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em HSP100, HSP90, HSP70,

HSP60, e HsSP0 em um excipiente farmacêuticamente aceitável.

60. KIT, caracterizado pelo fato de compreender uma quantidade eficaz de um agente que induz uma resposta de choque térmico em um tecido ocular, e instruções para
5 utilizar o kit para aumentar o recrutamento de células-tronco.

61. KIT, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que o agente é um polipeptídeo, um polinucleotídeo, ou um composto pequeno.

10 62. KIT, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, e HSP40.

63. KIT, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo codifica
15 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, e HSP40.

64. KIT, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o composto pequeno é selecionado do grupo que consiste em geldanamicina, celastrol, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, EC102,
20 radicicol, geranilgeranilacetona, paeoniflorina, PU-DZ8, e H-71.

65. MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE AUMENTA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR, sendo que o método é caracterizado pelo fato de compreender:

25 (a) a colocação de uma célula ocular em contato com um composto de teste;

(b) a identificação de um aumento na expressão ou na atividade de um polipeptídeo de choque térmico em relação a uma célula ocular não-tratada, identificando desse modo um
30 composto que aumenta o recrutamento de células-tronco.

66. MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE AUMENTA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR, sendo

que o método é caracterizado pelo fato de compreender:

(a) a colocação de uma célula ocular em contato com um composto de teste;

(b) a identificação de um aumento no número de
5 células-tronco no tecido.

1/2

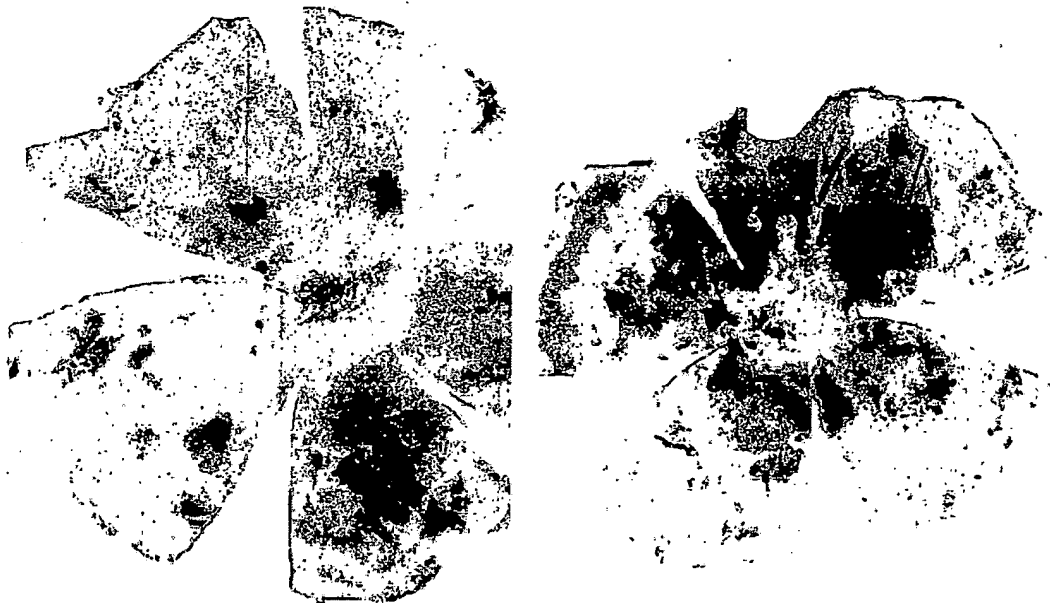


FIG. 1

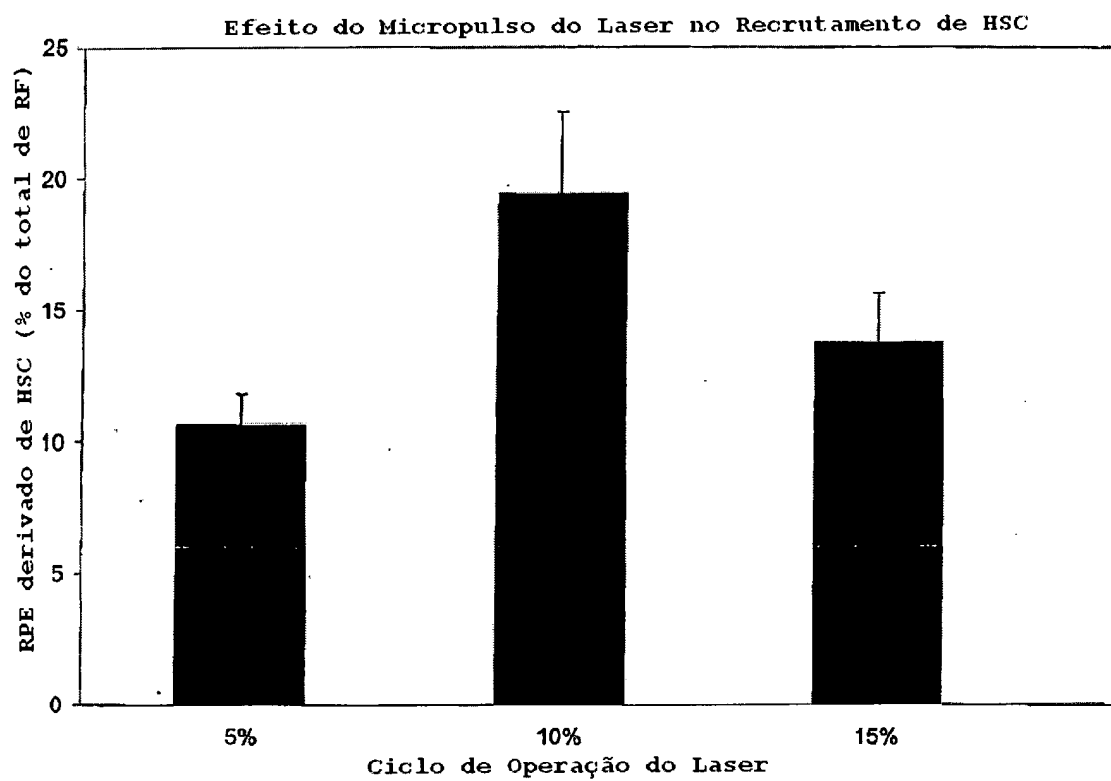


FIG. 2

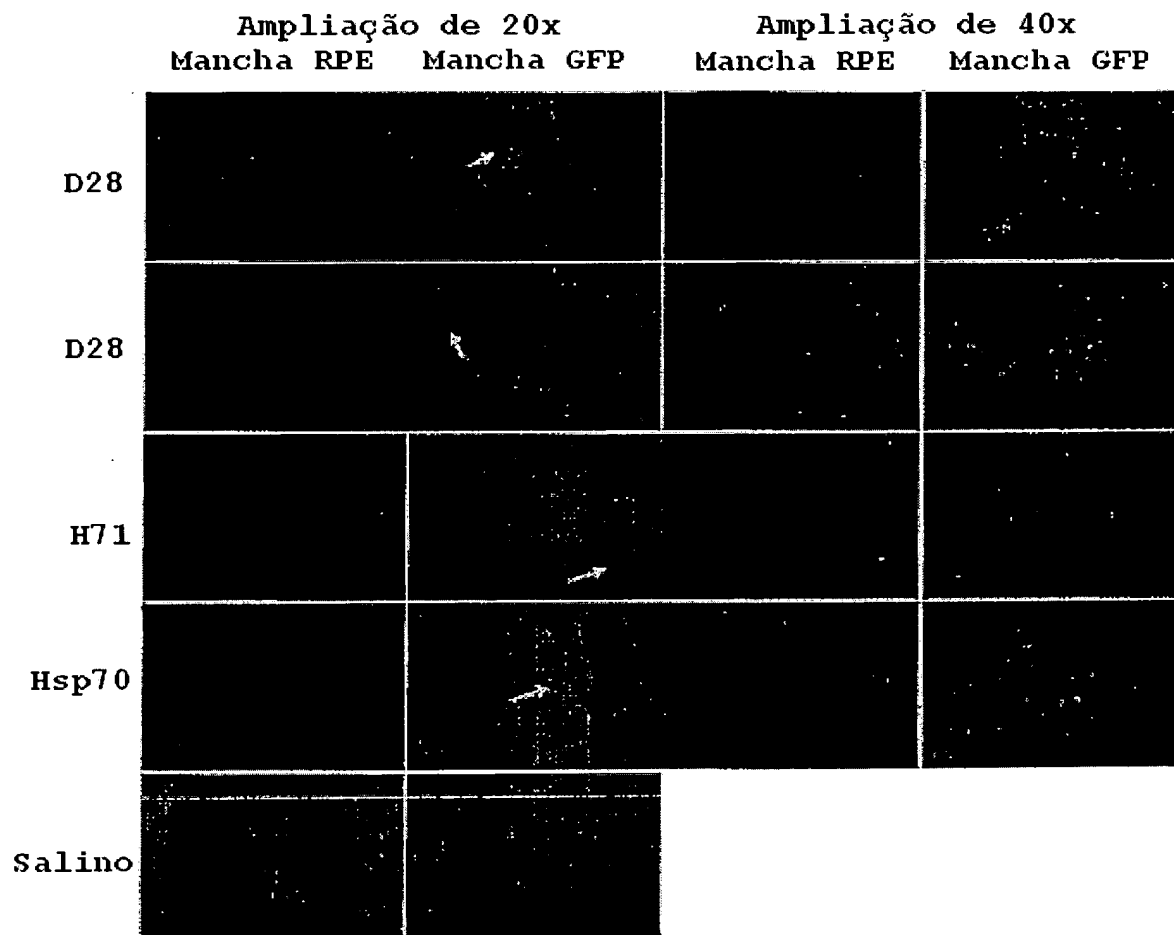


FIG 3

RESUMO

USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OCULAR EM UM INDIVÍDUO, MÉTODO PARA RECRUTAR UMA CÉLULA-TRONCO PARA UM TECIDO OCULAR DE UM INDIVÍDUO COM
5 NECESSIDADE DA MESMA, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR UMA DOENÇA OU UM DISTÚRBIO OCULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA REGENERAR A RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE
10 CHOQUE TÉRMICO PARA REPARAR OS DANOS AO EPITÉLIO PIGMENTAR DA RETINA EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, USO DE CHOQUE TÉRMICO PARA TRATAR A DEGENERAÇÃO MACULAR EM UM INDIVÍDUO COM NECESSIDADE DO MESMO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM
15 TECIDO OCULAR, KIT E MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE AUMENTA O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EM UM TECIDO OCULAR

A invenção apresenta de maneira geral métodos para recrutar células-tronco para um tecido ocular. Os
20 métodos envolvem a indução de choque térmico no tecido ocular utilizando um laser sublimar e/ou um agente. Em algumas realizações, o choque térmico é induzido depois da administração de um agente que mobiliza HSCs.