



(11) *Número de Publicação:* PT 973872 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N005/08 A A61K038/18 B
A01N001/02 B

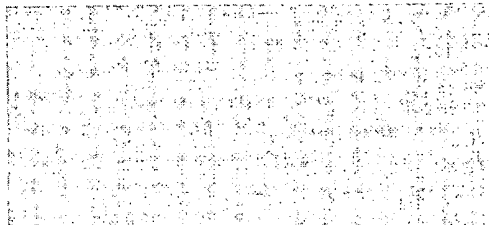
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

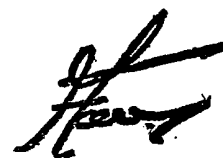
(22) <i>Data de depósito:</i> 1997.11.21	(73) <i>Títular(es):</i> ANABASIS S.R.L. VIA DELLE ROBINIE, 45 00172 ROMA IT
(30) <i>Prioridade:</i> 1997.04.24 IT RM970238	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 2000.01.26	(72) <i>Inventor(es):</i> ALESSANDRO LAMBIASE IT
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.07.11	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* UTILIZAÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO DE NERVOS PARA A ARMAZENAGEM CULTURA OU TRATAMENTO DA Córnea

(57) *Resumo:*

UTILIZAÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO DE NERVOS PARA A ARMAZENAGEM CULTURA OU TRATAMENTO DA Córnea





DESCRIÇÃO

"Utilização de factor de crescimento de nervos para a armazenagem, cultura ou tratamento da córnea"

A presente invenção refere-se à utilização de factor de crescimento de nervos para a armazenagem de córneas em cultura, à produção *in vitro* de tecidos corneanos e conjuntivos e ao tratamento de doenças da conjuntiva e da córnea. Mais particularmente, a invenção refere-se à utilização da neurotrofina denominada factor de crescimento de nervos (NGF) – conhecida pela sua capacidade de influenciar o desenvolvimento, a regeneração e a manutenção das funções biológicas dos neurónios – para o tratamento de tecidos corneanos e conjuntivos, tanto para manter adequadamente a sua funcionalidade *in vitro* como para a terapia de patologias da superfície ocular.

Como se conhece, o enxerto de córnea representa a única abordagem terapêutica a doenças corneanas distróficas, inflamatórias ou degenerativas no caso de as referidas doenças terem comprometido irreversivelmente a transparência ou a estrutura normal da córnea. Uma vez isoladas de cadáveres, as córneas são "armazenadas" até ao momento em que são transplantadas, por meio de métodos de armazenagem que empregam líquidos derivados de meios de cultura de células. De acordo com um dos métodos mais comuns, denominado "armazenagem de prazo curto/intermédio", a córnea é mantida a 4°C em meios de cultura tais como o meio de McCarey-Kaufman (MK), ou em diferentes líquidos comerciais (entre os quais Optisol-GS®), durante um período máximo de 7 dias. É possível uma armazenagem durante um período mais longo com um método igualmente comum, referido como "cultura de órgãos". Este método baseia-se em técnicas semelhantes à cultura de células, e permite armazenar as córneas explantadas, a temperaturas compreendidas entre 30 e 36°C, durante mais do que um mês.

Nenhum dos métodos anteriores produz um melhoramento das características biológicas dos tecidos corneanos com a armazenagem, sendo o melhor resultado conseguido manter inalterada a qualidade dos referidos tecidos durante a armazenagem. Isto opera cooperativamente tornando o evento ainda mais crítico na, já de si difícil, situação no campo do enxerto de córnea.



Actualmente, mais do que metade das córneas são rejeitadas após o explante, uma vez que o exame microscópico as mostra inadequadas para o transplante.

Outro problema principal é representado pela necessidade de ter disponíveis populações de células corneanas únicas, tais como células endoteliais, células epiteliais e queratócitos, de modo a ser possível utilizá-las para transplante. Em situações particulares que envolvem a destruição da superfície ocular devido a queimaduras físicas ou químicas, ou resultante de doenças auto-imunes sinequiantes (tais como penfigóide cicatricial, síndrome de Stevens-Johnson, etc.) ou de patologias pós-infecciosas, tem uma importância crítica ter disponíveis células epiteliais corneanas (incluindo mastócitos) para transplantar no lugar da superfície ocular danificada, e/ou ter disponível tecido conjuntivo epitelial para utilização na substituição da superfície sinequiada e retraída.

Considerando as situações patológicas que podem afectar a unidade morfológica e funcional que consiste na córnea (*i.e.*, epitélio, queratócitos estromais e endotélio) e na conjuntiva, nota-se que existe uma vasta variedade de desordens que afectam esta região e que têm, até à data, uma difícil abordagem terapêutica, ou são totalmente órfãos em termos de validade de tratamento. Estas patologias ou situações que podem interferir com a normal integridade da superfície incluem todos os prejuízos das funções do filme lacrimal, afecções corneanas e/ou conjuntivas, congénitas ou adquiridas, tais como: queratite e/ou conjuntivite neurotrófica e neuroparlítica; queratite e/ou conjuntivite pós-traumática, pós-infecciosa ou pós-cirúrgica; queratite e/ou conjuntivite devidas a tratamento com *laser*, a queimaduras químicas, físicas ou por metais; queratite auto-imune, distrófica, degenerativa, pós-inflamatória. Estas doenças aparecem com alterações do epitélio corneano (espontaneamente nas formas neuroparlíticas primárias ou numa base física, infecciosa, imunitária ou tóxica nas formas secundárias) que podem terminar numa úlcera, conduzindo na maioria dos casos a perfuração corneana, quer espontaneamente quer após micro-traumatismos ou super-infeccções. O quadro clínico desta doença é caracterizado por uma lenta e difícil recuperação, por super-infeccções e pela frequente falha de qualquer terapia. O resultado final é frequentemente a opacificação da córnea, ou a sua perfuração espontânea.



As doenças anteriores são genericamente tratadas com recurso a ligaduras e à utilização de substâncias lubrificantes e antibióticos, tendo em vista evitar as complicações. A cobertura conjuntiva é necessária quando a perfuração está eminente ou já ocorreu, e tem como única finalidade preservar a integridade anatómica do globo ocular, enquanto a função visual é sacrificada. O enxerto corneano, por queratoplastia, tanto lamelar como perfurante, é absolutamente contra-indicado em face da frequente ocorrência de recidivas mesmo no enxerto transplantado, e em face do risco de super-infecções. Com base em estudos *in vitro* foi também proposto o tratamento médico tópico com preparações contendo fibronectina, plasmina, inibidores de collagenase, EGF (*i.e.*, factor de crescimento epidérmico), auto-soro. Nenhuma destas drogas se mostrou resolutive, ou capaz de bloquear ou reduzir a lesão corneana, ou de modificar o resultado final da patologia.

Em particular, obtiveram-se resultados bastante bons no tratamento de queimaduras corneanas com o transplante de conjuntiva marginal recolhida do olho contra-lateral. Quando a afecção é bilateral, pode-se recorrer à doação de conjuntiva por parentes próximos ou, quando isto não é possível, à excisão a partir de cadáveres. Contudo, este método não é resolutive na totalidade dos casos. No caso do autoenxerto, podem ocorrer recidivas da doença após anos, enquanto que no caso de hom enxertos é frequente a rejeição, e é absolutamente necessária uma terapia imunossupressora, com as consequências bem conhecidas devidas aos efeitos secundários.

Outro tipo de doenças corneano-conjuntivas cujo tratamento origina frequentemente resultados insatisfatórios são as infecções herpéticas. Após a resolução de uma primeira ocorrência patológica, as infecções herpéticas frequentemente originam recidivas, cuja prevenção e tratamento frequentemente não são bem sucedidos.

Também as doenças que afectam o endotélio corneano, tais como, *e.g.*, descompensação primária e secundária e endotelite, caracterizadas por uma perda no número e/ou na função de células endoteliais, representa um grupo de afecções a que presentemente falta um tratamento eficaz.

Portanto, é um objectivo principal da presente invenção proporcionar uma solução para os problemas atrás referidos - problemas estes que estão todos



relacionados com a fisiopatologia da unidade morfológica e funcional corneana e conjuntiva – por meio da utilização de um agente terapêutico que permite manter e restabelecer a actividade biológica correcta dos referidos tecidos.

A molécula conhecida como o factor de crescimento de nervos (NGF) é o primeiro componente de uma família complexa de neurotrofinas, e é bem conhecida quanto à sua acção trófica, trópica e de diferenciação sobre os neurónios colinérgicos do sistema nervoso central e sobre o sistema simpático periférico. O NGF é produzido em vários tecidos em mamíferos, incluindo o homem, e é libertado na corrente sanguínea em níveis mais elevados durante o crescimento e a diferenciação do sistema nervoso. Estudos biológicos, bioquímicos e moleculares realizados *in vitro* com sistemas de células evidenciaram uma homologia muito grande entre o NGF de murídeo e o NGF humano. No homem, tal como em outras espécies animais, o NGF está normalmente presente tanto no fluido cerebrospinal como na corrente sanguínea em níveis de cerca de 10-50 pg/ml. As referidas concentrações aumentam em algumas patologias inflamatórias (doenças auto-imunes, doenças alérgicas, etc.) e diminuem em outras patologias (diabetes).

O NGF foi identificado em 1951 pela Prof^a. Rita Levi-Montalcini, do *Zoology Institute of the Washington University of St. Louis* (veja-se Levi Montalcini R., *Harvey Lect.*, 60:217, 1966) e representou um avanço determinante no estudo dos mecanismos de crescimento e diferenciação da célula nervosa, uma vez que é capaz de influenciar o desenvolvimento e a manutenção das funções biológicas de neurónios e sua regeneração. Pela descoberta desta molécula, por ter caracterizado o seu papel biológico tanto no sistema nervoso periférico como no sistema nervoso central, a Prof^a. R. Levi-Montalcini foi galardoada em 1986 com o prémio Nobel para a Medicina e Fisiologia.

Vários estudos experimentais, tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstraram a importância fisiopatológica do NGF na prevenção de lesão neuronal de natureza cirúrgica, química, mecânica e isquémica, tornando-o assim o candidato ideal para utilização na terapia de várias doenças do sistema nervoso central e periférico (Hefti F., *J. Neurobiol.*, 25:1418, 1994; J. Fricker, *Lancet*, 349:480, 1997). De facto, foram já iniciados há alguns anos ensaios clínicos em pacientes que sofrem de doença de Parkinson e de doença de Alzheimer. Os

referidos ensaios são realizados por administração intracerebral de NGF de murídeo (veja-se, *e.g.*, Olson L. *et al.*, *J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section*, 4: 79, 1992). Os resultados dos referidos estudos confirmaram as observações feitas em modelos animais e evidenciaram a ausência de muitos possíveis efeitos secundários da administração de NGF de murídeo. Esta característica foi mais recentemente confirmada em relação a NGF humano recombinante (Petty B.G. *et al.*, *Annals of Neurology*, 36:244-246, 1994).

Logo desde a sua identificação, os estudos do NGF, *i.e.* relativos à caracterização dos seus efeitos biológico, bioquímico, molecular, pré-clínico e clínico, têm sido realizados quase exclusivamente com NGF isolado das glândulas submaxilares de roedores adultos; assim, a grande quantidade de dados adquiridos até à data refere-se a NGF de murídeo. As propriedades bioquímicas deste último foram descritas, em particular, num trabalho que data a 1968 (Levi Montalcini R. e Angeletti P.U., *Physiological Reviews*, 48:534, 1968).

O NGF contido nas glândulas salivares de ratinhos é um complexo molecular de 140 quilodaltons, com coeficiente de sedimentação de 7S, que consiste em três subunidades, α , β e γ , em que a segunda representa a forma verdadeiramente activa. Esta subunidade, denominada β NGF, com coeficiente de sedimentação de 2,5S, é normalmente extraída e purificada de acordo com três métodos que não são muito diferentes uns dos outros (Bocchini V., Angeletti P.U., *Biochemistry*, 64: 787-793, 1969; Varon S. *et al.*, *Methods in Neurochemistry*, 203-229, 1972; Mobley W.C. *et al.*, *Molecular Brain Research*, 387: 53-62, 1986).

O β NGF obtido com estes métodos é por sua vez um dímero de cerca de 13 000 dalton, que consiste em duas cadeias idênticas de 118 aminoácidos. Cada cadeia simples é estabilizada por três pontes de dissulfureto, enquanto ligações não covalentes proporcionam a formação da estrutura dimérica. Esta molécula, sendo muito estável, pode-se dissolver em quase todos os solventes, tanto aquosos como oleosos, mantendo inalteradas as suas características bioquímicas e a sua actividade biológica. Pode-se encontrar informação adicional sobre a estrutura e as propriedades físicas e biológicas da molécula em Greene, L.A. e Shooter, E.M., *Ann. Rev. Neurosci.* 3:353, 1980.

Recentemente, a estrutura do β NGF foi adicionalmente elucidada por meio de uma análise cristalográfica. Esta última detectou a presença de três pares de cadeias antiparalelas, com uma estrutura secundária do tipo β , que operam cooperativamente na formação de uma superfície planar ao longo da qual as duas cadeias se associam para formar o dímero activo. Nas referidas cadeias do β NGF houve evidência da presença de quatro regiões de voltas contendo aminoácidos muito variáveis. A estes aminoácidos variáveis está ligada, muito provavelmente, a especificidade do reconhecimento pelo receptor.

O efeito biológico do NGF é mediado por dois receptores presentes na superfície das respectivas células alvo. Existem vários anticorpos que inibem selectivamente a acção biológica do NGF. A existência dos referidos anticorpos permitiu, e permite, caracterizar com precisão e modular a actividade do NGF, tanto em sistemas celulares como *in vivo*.

Mais recentemente tornou-se possível sintetizar NGF humano com técnicas de engenharia genética (Iwane, M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171:116, 1990), e foram colocadas no mercado pequenas quantidades de NGF humano. Contudo, a experimentação directa mostrou que a actividade biológica do NGF humano é bastante baixa em comparação com a actividade biológica do NGF de murídeo. Em adição, tem que se considerar que quase todos os dados presentemente disponíveis sobre os efeitos no homem, tanto *in vitro* como *in vivo*, foram obtidos utilizando NGF de murídeo, e que não foram detectados efeitos adversos que possam estar ligados à origem murídea do produto.

Estudos realizados a partir dos anos noventa em modelos animais sugeriram um possível envolvimento do NGF em patologias oculares. Contudo, estes estudos referiam-se quase exclusivamente à utilização de NGF em afecções retiniais, *i.e.* no tecido nervoso, enquanto nada está presente na literatura acerca de um efeito desta neurotrofina sobre a superfície ocular (*i.e.*, córnea e conjuntiva), nem existem quaisquer trabalhos científicos que proponham a utilização do NGF para o tratamento de doenças que afectam a córnea e/ou a conjuntiva. Em particular, foram realizados alguns estudos em animais com a finalidade de determinar o efeito da administração tópica de NGF no tratamento de patologias retiniais, por exemplo, no tratamento de isquemia retinal aguda (Siliprandi R. *et al.*, *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34:3232, 1993),



na transecção do nervo óptico (Carmignoto G. *et al.*, *J. Neurosci.*, 9:1263, 1989) e no tratamento de retinite pigmentosa (Lambiase A. e Aloe L., *Grafe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 234: S96-S100, 1996). Os resultados demonstraram que a administração tópica de NGF pode evitar, ou pelo menos retardar, a morte das células dos gânglios retinais e dos fotorreceptores durante as patologias anteriores. Nenhum destes estudos evidenciou efeitos secundários em animais.

Por outro lado, com referência às doenças dos tecidos corneanos que são o objecto de interesse da presente invenção, vários Autores consideraram que para estas indicações era possível empregar o factor de crescimento epidérmico (EGF), partindo do pressuposto de que alterações do epitélio corneano representam a chave patogénica para o desenvolvimento de outras afecções corneanas, tais como úlceras e queratites.

O EGF é um polipéptido de 53 aminoácidos identificado e caracterizado no início dos anos sessenta (Cohen S., *J. Biol. Chem.*, 237:1555-1562; 1962), possuindo um peso molecular de cerca de 6 000 dalton. A referida molécula é produzida pela glândula salivar do ratinho adulto, mas está presente em pequenas quantidades em muitos tecidos humanos. O EGF exerce uma acção trófica, proliferativa e de diferenciação bem caracterizada sobre as células epiteliais obtidas de vários tecidos animais e humanos, e a sua eficácia *in vitro* sobre culturas de células corneanas epiteliais, bem como a sua capacidade para induzir a proliferação e a diferenciação destas células estão descritos em alguns trabalhos experimentais.

Contudo, os estudos clínicos de doenças corneanas que foram realizados com base nos dados experimentais anteriores originaram resultados contraditórios, e apresentaram, em geral, uma ineficácia substancial do EGF neste tipo de doenças humanas (Kandrakis A.S. *et al.*, *Am. J. Ophthalmol.*, 98:411, 1984). A referida ineficácia pode ser atribuída, provavelmente, a uma diferente expressão do receptor de EGF *in vitro* e *in vivo* ou, mais provavelmente, ao facto de alterações epiteliais em doenças corneanas apenas representarem um epifenómeno da própria doença corneana.

Em EP-A-O 312 208 (Ethicon) revelam-se formulações em gel para utilização no tratamento de lesões epiteliais e patologias epiteliais em geral,



incluindo lesões e patologias da superfície ocular. As referidas formulações contêm um ingrediente activo que pode ser seleccionado indiscriminadamente de entre as várias moléculas cujo nome contenha a expressão "factor de crescimento". Embora a descrição se refira exclusivamente ao EGF como o ingrediente activo preferido, e embora os dados de actividade (*in vitro*) e exemplos de formulação, sejam dados apenas para o EGF, são também mencionados outros factores de crescimento, tais como o FGF (factor de crescimento de fibroblastos), o PDGF (factor de crescimento derivado de plaquetas), o TGF- α (factor de crescimento de transformação) ou o próprio NGF. Os referidos factores de crescimento são aparentemente apresentados como uma família de moléculas possuindo as mesmas características e a mesma actividade biológica que o EGF. Na realidade, no actual estado do conhecimento, o perito está a par de que os referidos factores de crescimento têm diferentes alvos específicos e que frequentemente têm efeitos conflituosos, e não consideram os referidos factores de crescimento como biologicamente equivalentes uns aos outros. Além do mais, no que diz respeito especificamente ao campo oftalmológico, o documento anterior descreve os referidos factores de crescimento como exclusivamente activos no epitélio corneano, reduzindo assim a indicação proposta para uma indicação como factores re-epitelizantes, úteis, na prática, apenas em afecções traumáticas.

Ao contrário, os estudos que conduziram à presente invenção partiram do conceito de córnea como uma unidade morfológica e funcional, em que as camadas individuais (*i.e.* o epitélio, o estroma e o endotélio) todas desempenham uma função de igual importância na conservação da integridade dos tecidos e nos mecanismos de recuperação. Nesta perspectiva, um papel chave é desempenhado pelo suporte trófico oferecido pela enervação sensorial corneana, cuja lesão origina uma lesão em toda a unidade morfológica e funcional.

Tendo em conta o facto de que não existia evidência na arte anterior de um efeito do NGF (*i.e.*, um dos muitos mediadores libertados pelas extremidades sensoriais em outras regiões do corpo) na superfície ocular, a questão foi inicialmente colocada como se uma tal neurotrofina podia desempenhar uma acção trófico-reparadora no tecido corneano de derivação neuroectodérmica embrionária, uma vez que vários alvos da referida neurotrofina apresentam uma derivação embriogenética semelhante. Assim, a



córnea e a conjuntiva foram analisadas quanto à presença do NGF e do receptor de alta afinidade do NGF (TrkA, tirosina-quinase A), utilizando um anticorpo monoclonal (anticorpo-TrkA; Santa Cruz, EUA) com técnicas imuno-histoquímicas (Bhattacharyya A. *et al.*, *J. Neurosci.* 17:7007, 1997). De facto, a presença do receptor específico é um requisito chave para a actividade da molécula em examinação.

Verificou-se deste modo que todas as células corneanas (*i.e.*, células epiteliais, células endoteliais e queratócitos) expressam TrkA e que, ao mesmo tempo, a enervação somatosensorial corneana é capaz de libertar NGF. Esta verificação permite colocar a hipótese de que, por um lado, o NGF, provavelmente libertado pelas extremidades dos nervos, deverá desempenhar um papel fisiopatológico em todos os mecanismos reparadores corneanos (tanto à superfície como a um nível mais profundo) e que, por outro lado, várias doenças da superfície corneana acompanhadas de lesão primária à enervação (tais como queratite neurotrófica ou distrófica e recorrências de infecções herpéticas) ou de lesão secundária à enervação (tais como queimaduras química ou física e lesões pós-infecciosa, auto-imune, pós-cirúrgica, ou lesões resultantes de tratamento com *laser*) deverão admitir como um passo etiológico fundamental a falta de libertação de NGF.

A mesma verificação permite também colocar a hipótese de que o NGF seria essencial à manutenção do tecido corneano completo em cultura, *i.e.* em todas as condições em que a córnea, como um todo, entendida como uma unidade morfológica e funcional compreendendo o epitélio, o estroma e o endotélio, ou algumas das suas células, estão desprovidas do suporte trófico proporcionado pela libertação do NGF pelas extremidades do nervo corneano.

Em adição, como os efeitos que foram observados após a administração de NGF exógeno ocorrem em concentrações próximas do nível fisiológico, pode-se colocar a hipótese de que um possível mecanismo fisiopatogénico nas afecções corneanas aqui consideradas consiste numa redução dos níveis locais do NGF abaixo do limiar capaz de assegurar a integridade corneana e/ou conjuntiva.

Em acordo, a presente invenção proporciona especificamente, de acordo com um seu primeiro aspecto, a utilização do factor de crescimento de nervos



para a armazenagem de córneas em cultura e para a armazenagem e a produção *in vitro* de tecidos corneanos e conjuntivos, e de populações de células corneanas ou conjuntivas individuais.

Preferivelmente, o NGF é adicionado a um meio de cultura do tipo adequado para a armazenagem de córneas, ou para a cultura *in vitro* de células ou tecidos corneanos ou conjuntivos, em quantidades compreendidas entre 100 pg/ml e 200 ng/ml, opcionalmente em conjunto com outros nutrientes e outros agentes biologicamente activos. O NGF a utilizar para esse objectivo pode ser de origem murídea ou humana, incluindo NGF recombinante, e pode ser utilizado na forma liofilizada, dissolvido em solução, num meio de cultura ou em qualquer outro solvente disponível, de modo a obter uma concentração final compreendida na gama atrás especificada.

Os métodos adequados para a extracção e purificação do NGF estão reportados na literatura atrás mencionada. Com a finalidade de experimentar a presente invenção, adoptou-se a técnica de Bocchini e Angeletti (atrás citada), sendo a última sinteticamente apresentada adiante. As glândulas submaxilares de ratinhos macho adultos são explantadas em condições estéreis e os tecidos são homogeneizados, centrifugados e dialisados; depois a suspensão é passada através de colunas de celulose subsequentes, separando assim o NGF por adsorção. O NGF é então eluído da coluna por meio de um tampão contendo cloreto de sódio 0,4 M. As amostras assim obtidas são analisadas por espectrofotometria a um comprimento de onda de 280 nm para identificar as fracções que contêm NGF. Estas últimas são dialisadas, e o NGF assim obtido é liofilizado sob condições estéreis e mantido no frigorífico a -20°C .

Numa avaliação dos efeitos de uma adição de NGF a vários meios de cultura para córneas explantadas (tanto a 4°C como a $30-36^{\circ}\text{C}$), obteve-se um melhoramento geral das características biológicas do tecido corneano com quantidades de NGF compreendidas entre 100 pg/ml e 200 ng/ml. A resposta óptima foi obtida com uma concentração de cerca de 100 ng/ml. Especificamente, após 7 dias de cultura os melhoramentos obtidos foram um aumento da densidade das células endoteliais (aumento de 10 a 25%), uma redução da mortalidade das células endoteliais (ausência de células endoteliais positivas ao azul de tripano), uma melhor morfologia endotelial (*i.e.*, quantitativamente, um trofismo de 3/3 vs. um trofismo de 2/3 nos controlos



sem adição de NGF), uma superior viabilidade dos queratócitos e uma notavelmente melhor aparência do epitélio. Em adição, algumas córneas que antes de serem colocadas em cultura eram consideradas não adequadas para transplante tornaram-se adequadas após estarem em cultura durante 7 dias na presença de NGF.

Uma avaliação experimental semelhante dos efeitos do NGF como aditivo no meio de cultura de células corneanas (*i.e.*, células epiteliais, células endoteliais e queratócitos) mostrou que a adição de NGF de murídeo em quantidades compreendidas entre 100 pg/ml e 200 ng/ml (com uma resposta óptima com uma concentração de cerca de 100 ng/ml) induz a proliferação e a diferenciação das várias populações de células, e, além disso, auxilia o estabelecimento das referidas populações de células em vários tecidos de suporte (tais como lamelas de estroma corneano, membrana amniótica, etc.). Adicionalmente, esta adição favorece a interacção entre os diferentes tipos de células em culturas mistas de células. Assim, a invenção pode também ser empregue para a cultura de linhas células corneanas mistas de modo a obter uma córnea artificial útil para transplante.

Também as culturas de células conjuntivas epiteliais apresentaram um aumento de proliferação e diferenciação, bem como um aumento no número de células *goblet*, quando em cultura na presença de NGF de murídeo nas mesmas concentrações que se especificaram atrás. O enxerto de tecido epitelial conjuntivo assim obtido é extremamente vantajoso para substituir a conjuntiva de pacientes que sofrem de querato-conjuntivite seca (síndrome do olho seco), tanto primária como secundária a outras patologias.

De acordo com outro aspecto da invenção, proporciona-se, portanto, um meio de cultura para a armazenagem de córneas ou para a armazenagem e a produção *in vitro* de tecidos corneano e/ou conjuntivo, ou de populações de células corneanas ou conjuntivas individuais, caracterizado por conter uma quantidade eficaz de NGF, preferivelmente compreendida entre 100 pg/ml e 200 ng/ml, mais preferivelmente de cerca de 100 ng/ml.

Como atrás estabelecido, de acordo com um aspecto adicional da invenção proporciona-se a utilização do factor de crescimento de nervos no



fabricao de um medicamento para a terapia e/ou a profilaxia de doenças corneanas e/ou conjuntivas.

Especificamente, a invenção é útil para a produção de produtos medicamentosos adequados para o tratamento e/ou a profilaxia de doenças corneanas e/ou conjuntivas, congénitas e/ou adquiridas, seleccionadas de entre o grupo que consiste em: queratite e/ou conjuntivite neurotrófica e neuromiasténica; queratite e/ou conjuntivite herpética; queratite e/ou conjuntivite pós-traumática, pós-infecciosa, pós-cirúrgica; queratite e/ou conjuntivite devidas a deterioração das funções do filme lacrimal, a queimaduras por tratamento com *laser*, a queimaduras químicas, físicas ou por metais; queratite auto-imune, distrófica, degenerativa e pós-inflamatória.

Preferivelmente, um produto medicamentoso de acordo com a invenção adequado para administração tópica contém, sozinho ou em combinação com um ou mais outros ingredientes activos, de 10 a 500 µg de NGF por ml, sendo uma concentração óptima de cerca de 250 µg de NGF por ml. Um tal produto pode estar na forma de uma solução oftálmica para gotas oculares, ou na forma de um gel, um unguento, um creme ou um pó, ou pode ser adicionado a uma ligadura local ou a lentes de contacto medicamentosas.

De acordo com outra concretização da invenção, o produto farmacêutico para o fabrico do qual se propõe o NGF é um medicamento indicado para a terapia e/ou a profilaxia de patologias oftálmicas endoteliais, primárias ou secundárias. Para esta utilização, as formulações preferidas contêm (também neste caso opcionalmente em combinação com outros ingredientes activos) de 1 a 250 µg de NGF por ml, e a administração é realizada por introdução na câmara anterior do olho.

Estudos *in vivo* em animais relativamente ao tratamento de desordens do endotélio corneano foram realizados por administração na câmara anterior do olho de soluções aquosas contendo NGF em concentrações compreendidas entre 1 e 250 µg/ml. Em particular, em coelhos em que a lesão endotelial tinha sido introduzida por meio de uma crio-sonda obteve-se um restabelecimento completo da densidade endotelial após 15 dias de tratamento com NGF. Demonstrou-se que a administração de NGF em patologias endoteliais tanto de natureza distrófica como adquirida, ambas com perda do número de células



endoteliais e com perda da sua funcionalidade, restabelecia uma função endotelial correcta.

Numa série de estudos no homem para determinar a eficiência do tratamento com NGF no tratamento tópico de afecções corneanas e/ou conjuntivas, seleccionaram-se várias patologias com base num envolvimento primário ou secundário do plexo do nervo somato-sensorial corneano. Utilizou-se neste estudos NGF de murídeo (2,5S), obtido com o método de purificação resumido atrás. O NGF foi topicamente administrado numa concentração de cerca de 250 mg/ml, diluído em solução salina equilibrada.

A tabela apresentada adiante resume os resultados obtidos num estudo em 5 pacientes afectados por úlcera corneana tórpida devida a queratite neurodistrófica (2 olhos), ou após queratoplastia (2 olhos) ou devido a queimadura por álcali (2 olhos). O programa terapêutico consistiu na instilação de uma-duas gotas da preparação da invenção com uma frequência diária dividida como se segue: de 2 em 2 horas nos primeiros 2 dias, 6 vezes por dia até ao 2º dia após a re-epitelização completa da córnea e duas vezes por dia nos 15 dias seguintes.

O tratamento tópico com o NGF foi iniciado após 15 dias de tratamento com auto-soro, na ausência de sinais de melhoria do quadro clínico. Todos os pacientes tratados apresentaram claros sinais de recuperação em 2 semanas a partir do início do tratamento com NGF, e nenhum deles evidenciou qualquer ocorrência de efeitos secundários locais ou sistémicos durante o tratamento ou no período que se seguiu. Uma vez suspensa, a terapia deve ser imediatamente restabelecida no caso de surgirem os primeiros sinais ou sintomas de qualquer recidiva da patologia epitelial.

Os 5 casos em questão são discutidos em detalhe adiante e os dados principais estão resumidos na tabela que se segue.

1º Caso – Um indivíduo do sexo feminino de 9 anos de idade, afectada de anoftalmia congénita, apresentava no outro olho uma úlcera corneana há mais de 20 dias. A referida úlcera, tratada topicamente com antibióticos e esteróides, não apresentou qualquer tendência para sarar. A úlcera tinha cerca de 7 mm de diâmetro e mais de 2/3 do estroma corneano em profundidade. O



exame clínico mostrou anestesia corneana, com base na qual se diagnosticou uma queratite neurotrófica. Após 15 dias de tratamento com auto-soro, tendo – se determinado um agravamento progressivo do quadro clínico, foi iniciado o tratamento tópico com NGF.

Após 4 dias a úlcera corneana foi reduzida para cerca de 3,5 mm de diâmetro, e após 12 dias a córnea sarou completamente e o tratamento com o NGF foi interrompido. A paciente apresentava um leucoma central com alguns neo-vasos e, embora reduzida, estava presente sensibilidade corneana, enquanto esta estava completamente ausente antes do tratamento. Após um seguimento de 8 meses, a paciente apresentou 5/10 de acuidade visual e estava ainda presente sensibilidade corneana.

2º Caso – Uma mulher de 26 anos de idade, afectada por sindactilia e défice do VIII par de nervos cranianos, apresentava há cerca de 2 meses uma úlcera corneana que progressivamente se tornou mais profunda até atingir uma extensão de 7 mm e uma profundidade até à membrana de Descemet. O exame clínico mostrou uma completa anestesia corneana.

Após 2 semanas de terapia com o NGF estavam presentes sinais aparentes de recuperação, com uma redução na profundidade da úlcera. Após 6 semanas de terapia a córnea estava completamente re-epitelizada, embora deixasse um leucoma central com alguns neo-vasos. Em adição, foi recuperada alguma sensibilidade corneana, embora reduzida.

3º Caso – Um homem de 25 anos de idade, que tinha sofrido enucleação do olho esquerdo após o surgimento de uma úlcera corneana após uma queratoplastia perfurante para um enxerto corneano, apresentava há cerca de 1 mês uma úlcera corneana no olho direito. A úlcera corneana tinha cerca de 5 mm de diâmetro e a sua profundidade era de 1/2 do estroma corneano. Estava também presente anestesia corneana.

Após 2 semanas de tratamento com NGF o processo de cura corneana era evidente, com redução da extensão e profundidade da úlcera. Após 4 semanas de tratamento com NGF a úlcera estava completamente sarada e foi deixado um leucoma central com alguns neo-vasos. Estava ainda presente uma marcada hipoestesia corneana.



4º Caso – Um homem de 56 anos de idade apresentava uma úlcera corneana bilateral devida a uma queimadura com álcali. O olho direito, após ter sido submetido a cirurgia por queratoplastia perfurante, tinha sido enucleado após o surgimento de uma úlcera. O olho esquerdo, após sofrer queratoplastia lamelar, desenvolveu uma úlcera tórpida de cerca de 7 mm de diâmetro, que não apresentou qualquer sinal de cura.

Após 2 semanas de tratamento com NGF era evidente o início de um processo de recuperação, e o referido processo ficou completo após 5 semanas.

5º Caso – Um homem de 56 anos de idade apresentava uma úlcera corneana bilateral devida a uma queimadura com ácido clorídrico. No olho direito estava presente uma úlcera de cerca de 4 mm de diâmetro, enquanto no olho esquerdo a úlcera era maior (mais de 8 mm de diâmetro) e mais profunda. O paciente apresentava uma marcada hipoestesia corneana.

Após 2 semanas de tratamento com NGF o olho direito estava completamente sarado, com um leucoma central residual, enquanto a úlcera no olho esquerdo estava reduzida tanto em extensão como em profundidade, embora estivesse presente um pano de neo-vasos. Após 3 semanas de tratamento ambas as córneas estavam completamente re-epitelizadas, tinham deixado um leucoma central e estava presente sensibilidade corneana, embora reduzida. Após um seguimento de 2 meses ambas as córneas permaneciam re-epitelizadas, e a acuidade visual do olho direito era de 3/10, enquanto a do olho esquerdo era de 1/10. Em adição, estava ainda presente sensibilidade corneana em ambos os olhos.

TABELA 1: Tratamento *in vivo* com Fator de Crescimento de Nervos

Paciente No.	Patologia	Idade (anos) sexo	Tempo desde o surgimento	Sensibilidade inicial	Terapia anterior	Tratamento com NGF	Resultado	Sensibilidade final	Visão	Seguimento
1	úlcera neurotrófica	9, F	20 dias	Anestesia	antibióticos, esteróides, auto-soro	12 dias	recuperação	normal/ hipoestesia	melhorada	8 meses
2	úlcera neurotrófica	26, F	2 meses	Anestesia	antibióticos, esteróides, auto-soro	6 semanas	recuperação	normal/ hipoestesia	melhorada	4 meses
3	úlcera neurotrófica em QP ^{a)}	25, M	1 mês	Anestesia	antibióticos, auto-soro	4 semanas	recuperação	anestesia	melhorada	2 meses
4	úlcera após queimadura com álcali em QL ^{b)}	56, M	2 meses	Anestesia	antibióticos, auto-soro	5 semanas	recuperação	normal/ hipoestesia	melhorada	4 meses
5 (OD)	úlcera após queimadura com ácido	56, M	1 mês	anestesia/ hipoestesia	antibióticos, auto-soro	2 semanas	recuperação	normal/ hipoestesia	melhorada	3 meses
5 (OE)	úlcera após queimadura com ácido	56, M	1 mês	anestesia/ hipoestesia	antibióticos, auto-soro	3 semanas	recuperação	normal/ hipoestesia	melhorada	3 meses

a) QP: enxerto corneano por queratoplastia perfurante

b) QL: enxerto corneano por queratoplastia lamelar

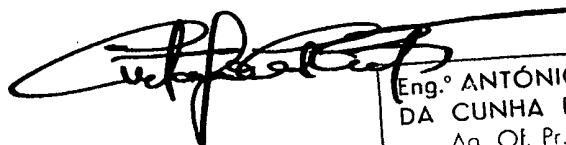
Os dados anteriores mostram claramente a eficácia da utilização do NGF não apenas para armazenar e para produzir *in vitro*, tecido corneano e/ou conjuntivo, como um todo ou parcialmente, ou para armazenar e produzir *in vitro* os tipos de células individuais nos quais consistem os referidos tecidos, mas também para tratar e prevenir doenças humanas ou animais que afectam a unidade corneana morfológica e funcional ou a conjuntiva, doenças estas que não têm até hoje qualquer terapia eficaz.

A presente invenção foi descrita com particular referência a suas concretizações específicas, mas deve entender-se que podem ser feitas modificações e alterações pelos peritos na arte sem afastamento ao âmbito da invenção tal como definido nas reivindicações anexas.

Lisboa, 11. OUT. 2001

Por ANABASIS s.r.l.

- O AGENTE OFICIAL -



Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200-195 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Utilização do factor de crescimento de nervos (NGF) para a armazenagem de córneas em cultura e para a armazenagem e a produção *in vitro* de tecidos corneanos e conjuntivos, e de populações de células corneanas ou conjuntivas individuais.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o NGF é adicionado a um meio de cultura para a armazenagem de córneas, ou a um meio de cultura para a armazenagem e a produção de células ou tecidos corneanos ou conjuntivos, numa concentração entre 100 pg/ml e 200 ng/ml.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a referida concentração é de cerca de 100 ng/ml.

4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido meio de cultura contém também nutrientes e/ou agentes biologicamente activos adicionais.

5. Utilização do factor de crescimento de nervos (NGF) no fabrico de um medicamento para a terapia e/ou a profilaxia de doenças corneanas e/ou conjuntivas.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o referido medicamento é indicado para o tratamento e/ou a profilaxia de doenças corneanas e/ou conjuntivas, congénitas e/ou adquiridas, seleccionadas de entre o grupo que consiste em: queratite e/ou conjuntivite neurotrófica e neuroparlítica; queratite e/ou conjuntivite herpética; queratite e/ou conjuntivite pós-traumática, pós infecciosa, pós-cirúrgica; queratite e/ou conjuntivite devidas a deterioração das funções do filme lacrimal, a tratamento com *laser*, a queimaduras químicas, físicas ou por metais; queratite auto-imune, distrófica, degenerativa e pós-inflamatória.

7. Utilização de acordo com as reivindicações 5 ou 6, em que o referido medicamento é para administração tópica, e contém de 10 a 500 µg de NGF por ml.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o referido medicamento contém cerca de 250 µg de NGF por ml.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 5, em que o referido medicamento é indicado para a terapia e/ou a profilaxia de patologias oftálmicas endoteliais primárias e secundárias.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 9, em que o referido medicamento é para administração por introdução na câmara anterior do olho, e contém de 1 a 250 µg de NGF por ml.

11. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-10, em que o NGF está em combinação, no referido medicamento, com um ou mais outros ingredientes activos.

12. Utilização e meio de cultura de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido NGF é de origem murídea ou humana, ou é NGF humano recombinante.

Lisboa, 11 OUT 2001

Por ANABASIS s.r.l.
- O AGENTE OFICIAL -



Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200-195 LISBOA