República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0805852-0 B1

(22) Data do Depósito: 05/09/2008

(45) Data de Concessão: 11/02/2025

(54) Título: USO DE LAMININA POLIMERIZADA EM MEIO ÁCIDO PARA TRATAR LESÕES TISSULARES TRAUMÁTICAS, DEGENERATIVAS OU INFLAMATÓRIAS

(51) Int.Cl.: C07K 14/78; A61K 38/39; A61P 25/00; A61P 25/02; A61P 25/28.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO.

(72) Inventor(es): TATIANA LOBO COELHO DE SAMPAIO.

(66) Prioridade Interna: PI0704128-4 de 06/09/2007.

(57) Resumo: Polímeros Ácidos Protéicos, Processos de Produção, Uso de Polímeros Ácidos Protéicos, Composição Farmacêutica e Método de Tratamento. A presente invenção se refere a polímeros ácidos protéicos (pLNs) que possuem propriedades específicas para reduzir o dano tissular e melhorar a recuperação funcional após uma lesão; ao processo de produção dos ditos polímeros ácidos protéicos. Os ditos pLNs são obtidos preferencialmente com a utilização da proteína laminina diluída em um meio a pH ácido na presença de um cátion divalente. O uso dos ditos polímeros ácido protéicos para a produção de um medicamento, uma composição farmacêutica contendo tais pLNs e um método de tratamento de animais acometidos por lesões tissulares traumáticas, degenerativas ou inflamatórias nos tecidos nervoso, muscular, epitelial e conjuntivo, também são objetos desta invenção.

Relatório Descritivo

USO DE LAMININA POLIMERIZADA EM MEIO ÁCIDO PARA TRATAR LESÕES TISSULARES TRAUMÁTICAS, DEGENERATIVAS OU INFLAMATÓRIAS

[001] **Campo da Invenção**

[002] A presente invenção se refere a polímeros ácidos protéicos, ao processo de polimerização de uma proteína em meio ácido e ao uso do dito polímero protéico. Mais especificamente, a proteína polimerizada aqui descrita é a laminina polimerizada, extremamente efetiva como agente promotor da regeneração tissular em animais mamíferos humanos ou não humanos, devido a seu extraordinário efeito antiinflamatório.

[003] A invenção também se refere a uma composição farmacêutica contendo um polímero ácido protéico, voltado para o tratamento de animais mamíferos, humanos ou não humanos, acometidos por lesões tissulares traumáticas, degenerativas ou inflamatórias.

[004] O uso dos ditos polímeros ácidos protéicos para a produção de um medicamento voltado, principalmente, para o tratamento de lesões neurológicas, raquimedulares, o tratamento de distrofias musculares e de cardiopatias também é um alvo desta invenção.

[005] O uso dos ditos polímeros ácidos protéicos para a produção de um medicamento voltado, principalmente, para o tratamento de inflamações nos tecidos nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral, também é um alvo desta invenção.

[006] A invenção também se refere a um método de tratamento de animais mamíferos humanos ou não humanos, acometidos por lesões traumáticas, degenerativas ou inflamatórias no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral, baseado na administração de um medicamento contendo um polímero ácido protéico a um animal mamífero humano ou não humano, acometido de uma lesão no sistema nervoso. Finalmente, a invenção trata de um método de tratamento de doenças inflamatórias baseadas na administração de um medicamento contendo um polímero ácido protéico a um animal mamífero ou não mamífero.

Antecedentes da Invenção

[007] A laminina é uma proteína da matriz extracelular descrita originalmente na década de 70 e que possui uma estrutura trimérica, constituída por uma cadeia mais longa, a cadeia alfa e duas cadeias mais curtas, chamadas beta e gama. Estas três se associam através de interações “coiled-coil” dando origem a uma proteína de aproximadamente 800 KDa com a forma de uma cruz. Esta proteína foi inicialmente purificada de um extrato da massa tumoral de um tumor de camundongo denominado EHS, que produz um excesso de uma estrutura laminar conhecida como membrana basal (lâmina basal). Posteriormente descobriu-se que a proteína inicialmente descrita correspondia a uma isoforma de um conjunto ou família de proteínas relacionadas, que hoje conta com 15 membros. A proteína isolada de EHS passou a ser denominada laminina-1 (LN-1), e mais recentemente de LN111. A

LN-1 é expressa majoritariamente em tecidos embrionários, mas também está presente em animais adultos, porém não no tecido nervoso propriamente dito. A expressão de laminina no tecido nervoso adulto foi detalhadamente estudada em 1989. O aumento de sua expressão está relacionado nitidamente a processos regenerativos sejam em invertebrados, sejam em regiões do cérebro de mamíferos onde ocorre crescimento axonal durante a vida adulta.

[008] A patente americana US 4,829,000, de titularidade de The United States of América as represented by the Secretary of the Department of Health and Human Service e intitulada “Reconstituted basement membrane complex with biological activity”, descreve a produção e a utilização de um extrato de membrana basal de camundongos, denominado Matrigel, de onde se pode extrair a laminina.

[009] A patente americana US 6,632,790, de titularidade de University of Medicine and Dentistry of New Jersey e intitulado “Laminin 2 and methods for its use”, descreve a produção e os possíveis usos da laminina 2 recombinante humana, também chamada de LN-2, e mais recentemente de LN-211. Um ponto a ser ressaltado aqui é que a utilização desta proteína para o tratamento de lesões raquimedulares não foi prevista naquela patente. Além disso, não existe nenhuma sugestão de que a laminina 2 recombinante humana, assim como nenhuma outra isoforma da proteína, que pudesse ser polimerizada em pH ácido.

[0010] A patente Americana US 5,019,087, de titularidade de American Biomaterials Corporation e intitulada “Nerve regeneration conduit”, descreve próteses tubulares para a regeneração de nervos periféricos. As próteses são constituídas de colágeno I ou colágeno I mais laminina. É interessante que

como a solubilização do colágeno I demanda pH ácido, no momento da adição da laminina o pH já está ácido. Isto não feito te forma proposital, apenas circunstancial.

[0011] O pedido interncaional WO 03/035675, intitulado “Biologically active peptides and their use for repairing injured nerves” descreve pequenos peptídeos derivados da seqüência da laminina-1, contendo o tripeptideo KDI, que podem promover a recuperação dos movimentos após uma transecção da medula espinhal. Nessa patente emprega-se apenas um pequeno fragmento da proteína.

[0012] Em 2000, Freire e Coelho-Sampaio demonstraram que na temperatura de 35°C a LN-1 em baixas concentrações (entre 5nM a 60nM) é capaz de se auto-polimerizar, caso a solução em que ela esteja contida seja ácida, e de forma mais efetiva, apresente pH de 4,0. Neste experimento era fundamental que houvesse o pré-tratamento das cubetas de quartzo, nas quais a laminina ficava contida, com material antiaderente, no caso, o silano. Este tratamento com silano foi essencial para se manter a laminina polimerizada em seu estado solúvel e não aderido às paredes da cubeta de quartzo.

[0013] Em 2002, Freire *et al,* demonstraram que polímeros produzidos a partir da adsorção em uma superfície de vidro da laminina em pH ácido (matriz de laminina ácida) desempenhavam um papel na diferenciação e migração de neurônios embrionários em cultura de células ou de explantes de tecido cortical, ou seja, *in vitro*. Este trabalho não apresenta nenhum ensaio *in vivo* e não faz qualquer demonstração de outros possíveis papeis de tais polímeros de laminina, como por exemplo, a regeneração neural.

[0014] Dessa forma, a presente invenção visa preencher todas as lacunas deixadas no estado da técnica, descrevendo um novo processo, mais eficiente para produção da laminina polimerizada em meio ácido e o emprego desta proteína polimerizada no tratamento de lesões raquimedulares em modelo animal.

[0015] Sumário da Invenção

[0016] É um objeto da invenção, um polímero ácido protéico que possui propriedades regenerativas e antiinflamatórias de lesões traumáticas, degenerativas ou inflamatórias no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral; que na presença de meio de pH ácido e de um cátion divalente se polimeriza de modo independente da presença da membrana de celular e do meio extracelular.

[0017] É um objeto adicional da presente invenção um processo de produção de polímeros protéicos produzidos em uma solução contendo pH ácido, a partir de uma proteína com concentração compreendida entre 80 nM e 1μM, sendo realizado a temperatura entre 10 a 35ºC, em meio ácido, na presença de um cátion divalente, durante um período de tempo máximo de 12 horas e ocorrer no interior de recipientes produzidos com material inerte, livre de contaminantes e sem pré-tratamento com substâncias anti-aderentes.

[0018] Um outro objeto da presente invenção trata de uma composição farmacêutica que contém uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um polímero ácido protéico e componentes não ativos, que sejam farmaceuticamente aceitáveis.

[0019] É ainda um objeto da presente invenção, o uso dos ditos polímeros ácidos protéicos para a produção de um medicamento útil no tratamento de lesões traumáticas, degenerativas ou inflamatórias no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, tecido músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo e epitélio-conjuntivo de modo geral, tais como o tratamento de lesões raquimedulares, pulmonares, distrofias musculares e cardiopatias em geral, baseado na aplicação de uma quantidade terapeuticamente eficaz dos polímeros protéicos, sobre a região lesada de um animal mamífero humano ou não humano, portador de uma lesão.

[0020] É ainda um objeto da presente invenção, o uso dos ditos polímeros ácidos protéicos para a produção de um medicamento útil no tratamento de inflamações no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, tecido músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo e epitélio-conjuntivo de modo geral, baseado na aplicação de uma quantidade terapeuticamente eficaz dos polímeros protéicos em um animal mamífero humano ou não humano, portador de uma lesão.

[0021] Um outro objeto desta invenção se trata de um método de tratamento de lesões traumáticas, degenerativas ou inflamatórias do grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral , baseado na administração de um medicamento contendo um polímero ácido protéico a um animal mamífero humano ou não humano, acometido de uma lesão no sistema nervoso.

[0022] O último objeto desta invenção se trata de um método de tratamento de inflamações grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral, baseado na administração de um medicamento contendo um polímero ácido protéico a um animal mamífero humano ou não humano.

[0023] Descrição das Figuras

[0024] A Figura 1 mostra um gráfico de BBB score *versus* semanas após a lesão, comprovando a eficácia do polímero ácido de laminina na melhora da performance no teste de locomoção em campo aberto (BBB) após lesão medular por compressão. São mostrados perfis de recuperação funcional observados após o tratamento com o pLN(■), comparado aos controles não efetivos: laminina diluída em pH 7,0 (●), tampão ácido sem proteína(▼), tampão neutro sem proteína(▲).

[0025] A Figura 2 mostra a recuperação do tecido nervoso onde a lesão medular por compressão foi induzida, após a aplicação do polímero ácido de laminina. Em A controle tratado com tampão ácido somente, em B animal tratado com o polímero ácido de laminina, ambos analisados 8 semanas após a lesão.

[0026] A Figura 3 mostra o efeito de inibição da proteína GFAP promovido pelo tratamento com polímero ácido de laminina. Em A pode-se observar a área da cavidade cística formada 8 semanas após a lesão no animal controle tratado com tampão ácido somente. Observa-se também uma elevada expressão de GFAP. Em B observa-se a diminuição da área da

cavidade nos animais tratados com o polímero ácido de laminina, bem como a diminuição da expressão de GFAP. Ambos animais analisados em 8 semanas após a lesão.

[0027] A Figura 4 mostra a expressão da proteína indicadora da regeneração neuronal, GAP-43 8 semanas após a lesão. Em A, animais controle tratados com tampão ácido somente; em B animais tratados com o polímero ácido de laminina .

[0028] A Figura 5 mostra a marcação para macrófagos (anticorpo ED1), 8 semanas após a lesão. Em A, animais controle tratados com tampão ácido somente; em B, animais tratados com o polímero ácido de laminina. O resultado indica que o efeito do tratamento com o polímero ácido de laminina inclua uma redução da inflamação através da inibição da infiltração de macrófagos na região da lesão.

[0029] A Figura 6 mostra os níveis séricos de proteína C reativa uma semana após a lesão. A análise dos valores obtidos em cada condição revela que o tratamento com o polímero ácido de laminina promove uma diminuição da inflamação sistêmica, corroborando a hipótese de que a melhora funcional observada nos animais tratados envolva um efeito anti-inflamatório do polímero.

[0030] A Figura 7 mostra os espectros de espalhamento de luz de amostras do polímero ácido formado pela LN-2 recombinante humana (linha contínua) ou controle em pH 7 (linha tracejada).

[0031] A Figura 8 mostra um gráfico de BBB score *versus* semanas após a lesão de transecção. São mostrados os perfis de recuperação funcional observados: animais tratados com pLN-1 (▲), polímeros de laminina purificada

de placenta humana (■) e pLN-2 (●). Como controle é mostrada a recuperação obtida na ausência de laminina(▼).

[0032] A figura 9 mostra o efeito anti-inflamatório geral do pLN no organismo, apresentando o número total de células presentes no lavado broncoalveolar de camundongos submetidos à inalação de LPS.

[0033] Descrição detalhada da Invenção

[0034] A presente invenção descreve polímeros ácidos protéicos que apresentam atividade regenerativa e antiinflamatória em lesões traumáticas, degenerativas ou inflamatórias tissulares ocorridas no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral; sendo formados pela polimerização de uma determinada proteína na presença de meio de pH ácido, de um cátion divalente e temperatura adequados; de modo independente da presença da membrana celular, da membrana basal e do meio extracelular, sendo formados *in vitro*, dentro de recipientes produzidos em qualquer material inerte, livre de contaminantes e sem pré-tratamento com substâncias anti-aderentes.

[0035] Os polímeros ácidos protéicos objeto desta invenção são formados preferencialmente pela interação entre os braços curtos de cada molécula de laminina, sem que ocorra a ligação cruzada entre braços longos e curtos da molécula de laminina.

[0036] Nesta invenção, entende-se por região lesionada, qualquer órgão animal formado pelos tecidos tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-

conjuntivo de modo geral; incluindo órgãos tais como cérebro, medula raquidiana, músculos, coração, glândulas e pulmão.

[0037] Na natureza, também é verificada a existência de polímeros de laminina, que formam uma matriz protéica. A formação desta matriz ocorre sem que haja interações cruzadas entre braços longos e curtos da laminina. O impedimento de tais interações é conseguido em condições naturais quando os braços longos das moléculas de laminina interagem com os receptores específicos da membrana celular. Portanto, é essencial que na natureza ocorra à ancoragem dos braços longos da laminina aos receptores localizados na membrana celular para que não ocorra a interação cruzada entre os braços longos e curtos de moléculas de laminina adjacentes.

[0038] No caso dos polímeros de laminina objeto desta invenção que são formados *in vitro*, a inibição das reações cruzadas entre as cadeias longas e curtas das moléculas de laminina adjacentes ocorre devido à acidificação do meio em que tais polímeros foram formados. Desta forma a acidificação do meio mimetiza a ação dos ditos receptores de membrana celular, que estão ausentes no objeto desta invenção.

[0039] Nos testes realizados, foi verificado que a atividade regenerativa tecidual mediada pelos polímeros ácidos protéicos desenvolvidos por esta invenção é aumentada quando ocorre a aplicação dos ditos polímeros ácidos protéicos sobre a região lesionada em um curto período de tempo após a lesão.

[0040] A maior efetividade dos polímeros ácidos protéicos, quando aplicados sobre a lesão em um período curto de tempo após o acontecimento da lesão traumáticas, degenerativas ou inflamatórias ocorre devido à

capacidade antiinflamatória promovida pelos polímeros ácidos desta invenção. Esta capacidade antiinflamatória ocorre, pois tais polímeros ácidos protéicos atuam na manutenção dos níveis séricos basais de proteína C reativa (Figura 6) e, na promoção da redução da mobilização de macrófagos para a região lesionada (Figura 5).

[0041] Em tecidos, como o tecido nervoso, esta preservação é percebida pela redução da formação de uma cavidade cística (Figura 2 e 3), pela diminuição da expressão de GFAP e também do número de astrócitos ativados na região do dano (Figura 3).

[0042] Outro determinante desta preservação tissular é a redução do processo inflamatório natural que ocorre no local da lesão, demonstrado pela redução do infiltrado de macrófagos (Figura 5) e manutenção dos níveis séricos basais de proteína C reativa (Figura 6). Esses últimos efeitos induzidos pelo polímero ácido protéico desta invenção **conferem uma capacidade anti-inflamatória**, que torna o ambiente no local da lesão mais permissivo para a ocorrência regeneração, como por exemplo, a regeneração axonal e broncoalveolar.

[0043] Além disto, também foi verificado que os polímeros ácidos protéicos alvo desta invenção, são capazes de promover a regeneração, no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral, devido à ativação das rotas celulares de produção da proteína associada ao crescimento-43 (GAP43) (Figura 4). Sabidamente, no tecido nervoso, esta proteína desempenha um importante papel na formação, regeneração e plasticidade dos neuritos.

[0044] Devido aos mecanismos de ação desempenhados pelos polímeros ácidos protéicos alvo desta invenção, tais polímeros possuem um papel efetivo, e nunca dantes demonstrado na promoção da regeneração de lesões traumáticas, degenerativas ou inflamatórias tissulares em animais mamíferos humanos e não humanos.

[0045] Os polímeros ácidos protéicos alvo desta invenção podem ser úteis no tratamento de lesões traumáticas, degenerativas ou inflamatórias no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral. Preferencialmente, o uso dos ditos polímero ácido protéico não se restringem somente ao tratamento de lesões raquimedulares e inflamações pulmonares (Figura 9).

[0046] Pois além de tais polímeros induzirem a neuroproteção e regeneração de fibras nervosas, podendo ser empregados no tratamento de outras lesões traumáticas ou degenerativas do sistema nervoso central e periférico, onde ocorra perda do tecido nervoso, bem como no tratamento de distrofias musculares e cardiopatias.

[0047] Uma vantagem dos polímeros ácidos protéicos aqui descritos, é a sua capacidade de se auto-polimerizar desde que sejam envolvidas em um meio regulado com o pH ácido adequado. Além disso, foi demonstrado que os polímeros ácidos protéicos formados, devido a sua capacidade regenerativa e antiinflamatória, são capazes de devolver a explantes de córtex cerebral de animais nascidos a plasticidade neuronal perdida durante o desenvolvimento, além de promover a regeneração morfológica do tecido nervoso, bem como a

recuperação funcional dos animais mamíferos portadores de uma lesão raquimedular.

[0048] Foi demonstrado ainda, que a capacidade antiinflamatória dos ditos polímeros ácidos protéicos desta invenção é sistêmico e não meramente localizada, pois ocorre em diferentes tecidos do organismo, tais como; tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo e epitélio-conjuntivo de modo geral.

[0049] Os polímeros ácidos protéicos que são objeto desta invenção são preferencialmente, os agentes terapêuticos mais efetivos já descritos até hoje para impedir a degeneração e induzir a regeneração do tecido medular e, consequentemente, permitir a recuperação da locomoção e sensibilidade dos animais tratados.

[0050] Ainda preferencialmente, os ditos polímeros ácidos protéicos desta invenção são agentes terapêuticos efetivos no combate a lesões inflamatórias órgãos dos sistemas respiratório e nervoso.

[0051] Preferencialmente os polímeros ácidos protéicos objeto desta invenção são polímeros de laminina, podendo ser utilizadas para produção destes polímeros de laminina, tanto a LN-1 extraída do tumor murino EHS, a LN-2 recombinante humana ou a LN humana extraída de placenta.

[0052] Doravante, os polímeros ácidos protéicos serão simplesmente chamados de pLN, entretanto, devemos ressalvar que tal abreviatura não deve significar em nenhuma hipótese a limitação da natureza de taís polímeros somente às proteínas da classe das lamininas.

[0053] O processo de produção dos pLNs aqui descritos, tem início com a adição de uma elevada concentração de uma determinada proteína a ser

polimerizada, em meio contendo pH ácido contendo um cátion divalente, devendo ser realizado a temperatura superior a 10°C e inferior a 35ºC, não requerendo o pré-tratamento do recipiente onde ocorrerá a polimerização com substâncias anti-aderentes.

[0054] Além da vantagem de dispensar o pré-tratamento do recipiente onde ocorrerá a produção dos pLNs com substâncias anti-aderentes, tais como o silano; o processo de produção dos ditos pLNs objeto desta invenção é efetivo em promover a polimerização de uma elevada concentração da proteína que após ser polimerizada, produzirá o referido pLN. As concentrações de proteína empregadas neste processo variam entre 80 nM a 1μM, preferencialmente, o processo é capaz de proporcionar a polimerização de uma proteína na concentração entre 90nM a 900nM; mais preferencialmente ainda, entre 95nM a 300nM.

[0055] Um outro fator que diferencia o processo de produção dos pLNs objeto desta invenção, com os processos de polimerização de proteína em meio ácido descritos anteriormente, é o fato de o mesmo ocorrer na temperatura ambiente, ou seja, aproximadamente 25 °C, e ser efetivo em pH compreendido entre 3,0 e 6,0, ocorrendo preferencialmente em pH entre 4,5 a 5,5. A solução ácida empregada neste processo, é qualquer solução ácida empregada usualmente em bioquímica, ou biologia celular, cultura de células ou tecidos celulares ou em animais *in vivo.*

[0056] O cátion divalente necessário para que a polimerização ocorra é preferencialmente o cálcio e, todo o processo de polimerização ocorre em um período máximo de 12 horas, sendo que preferencialmente o tempo necessário

para ocorrer à polimerização é de no máximo 2 horas. Mais preferencialmente ainda, o processo ocorre em um período máximo de 10 minutos.

[0057] O recipiente necessário para a realização do processo de polimerização objeto desta invenção, é um recipiente produzido em qualquer material inerte, livre de contaminantes e sem pré-tratamento com substâncias anti-aderentes, como o silano.

[0058] O recipiente pode ser produzido em um formato qualquer, dentre as formas normalmente empregadas na produção de recipientes químicos, clínicos e farmacêuticos, sendo os materiais preferivelmente empregados o plástico ou, o vidro.

[0059] A composição farmacêutica alvo objeto desta invenção contém uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um pLN, objeto desta invenção, e agentes não ativos, tais como adjuvantes, estabilizantes, diluentes e lubrificantes. Preferencialmente a dita composição farmacêutica contém uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um pLN descrito por esta invenção.

[0060] Nesta invenção, entende-se por quantidade farmaceuticamente eficaz, o quantitativo de pNLs capaz de desencadear um efeito desejável em um animal mamífero humano ou não humano.

[0061] Portanto, os pLNs alvo desta invenção podem ser utilizados na produção de um medicamento voltado para o tratamento de lesões tissulares traumáticas, degenerativas ou inflamatórias, tais como, lesões no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral; preferivelmente, dentre as lesões que podem ser tratadas pelo medicamento contendo os pLNs, temos a lesão raquimedular, distrofias

musculares, cardiopatias e lesões pulmonares de animais mamíferos, humano ou não humano.

[0062] Os pNLs também podem ser utilizados na produção de um medicamento voltado, principalmente, para o tratamento de inflamações nos tecido**s** nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral.

[0063] Os medicamentos descritos nesta invenção podem ser encontrados nas formas farmacêuticas conhecidas pelo homem da arte, desde que sejam aquelas que possibilitem a aplicação do dito medicamento diretamente sobre a área lesionada.

[0064] O método de tratamento objeto desta invenção pode ser empregado no tratamento de lesões tissulares traumáticas, degenerativas ou inflamatórias no grupo de tecidos compreendendo o tecido nervoso, músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, epitélio de revestimento, tecido adiposo, epitélio-conjuntivo de modo geral.

[0065] Dentre as lesões às quais o método de tratamento alvo desta invenção é eficaz, citamos como exemplo a lesão raquimedular, distrofias musculares, cardiopatias e lesões pulmonares de um animal mamífero humano ou não humano.

[0066] De acordo com o método de tratamento desta invenção, devem ser aplicado entre 0,1 ng/kg a 1 μg/kg de um pLN diretamente sobre o local da lesão raquimedular, em um período de tempo inferior a 30 dias após a ocorrência da lesão.

[0067] Preferencialmente, deve ser aplicado entre 0,5 a 500ng/kg de um pLN diretamente sobre a região lesionada de um animal mamífero; e mais

preferencialmente ainda, o método de tratamento alvo desta invenção requer a aplicação diretamente sobre a região lesionada em mamíferos portadores de um lesão traumáticas, degenerativas ou inflamatórias de uma quantidade entre 1 a 250 ng/kg de um pLN, em um período de tempo inferior a 15 dias do acontecimento da lesão.

[0068] Os exemplos a seguir são referentes aos testes realizados para se comprovar a eficiência tanto dos próprios pLNs descritos, como do processo de produção do pLNs alvo desta invenção, assim como, da utilidade clínica terapêutica dos ditos pLNs, sendo meramente ilustrativos e, não devendo ser utilizados na delimitação dos direitos desta invenção.

[0069] Os testes foram divididos em três etapas, como descrito abaixo, durante as quais foram utilizadas dois tipos de pLNs distintos: o pLN-1 correspondente ao polímero obtido pela polimerização da proteína extraída de um tumor murino EHS; e o pLN-2 - correspondente ao polímero obtido da laminina recombinante humana expressa em célula de mamíferos.

[0070] Exemplo 1: **<u>produção dos pLNs</u>**

[0071] A primeira etapa da descrição da invenção é a polimerização da laminina em pH ácido. A proteína a ser utilizada pode ser a LN-1 extraída do tumor murino EHS ou a LN-2 recombinante humana. A polimerização foi feita diluindo-se a proteína em tampão Tris-acetato na concentração de 20 mM, pH entre 4, contendo 1 mM de cloreto de cálcio, sendo o cálcio indispensável para o processo de polimerização. A proteína, previamente aliquotada em volumes suficientes para o tratamento do animal, é retirada do freezer a -20^{o}C, e conservada em gelo até o momento da injeção no animal, o que ocorre após a lesão, preferencialmente entre 20 e 60 minutos após a lesão. O tampão acetato

previamente é mantido a temperatura ambiente (25°C) é adicionado à alíquota de laminina contida em um tubo plástico (do tipo eppendorf), e a mistura homogeneizada suavemente com a própria ponteira da pipeta.

[0072] A concentração final de laminina varia entre 50 e 200 μg/ml. Entre 5 e 10 μl desta suspensão são injetados no animal preferencialmente entre 20 e 60 minutos após a lesão. Em um teste utilizou-se a LN-1 a 100 μg/ml, em tampão pH 4,5, sendo 5 μl injetados na medula do animal 30 minutos após a lesão, e em outro teste foi utilizado a LN-2 recombinante na concentração de 120 μg/ml, em tampão pH 4,5, sendo injetados 10 μl da suspensão.

[0073] **Exemplo 2: <u>Realização dos testes</u>**

[0074] No exemplo aqui relatado foi utilizada uma lesão por compressão entre a oitava e a nona vértebras torácicas (T8-T9), gerada quando um cateter posicionado entre a medula e a vértebra é inflado. O catéter foi do tipo Fogarty 2F e o volume de solução salina utilizado para inflá-lo foi de 15μl. Nesse caso, o animal não tratado perde o funcionamento correto das patas traseiras, o que é parcialmente recuperado ao longo de 8 semanas, sendo que permanece uma lesão cística no interior da medula, mesmo após o animal ter atingido sua melhor capacidade de locomoção ao final da oitava semana (BBB = 18).

[0075] A cirurgia para a introdução do cateter foi realizada anestesiando-se o animal com um coquetel de xilasina, acepromazina e cetamina ao que se segue uma laminectomia ao nível da sétima vértebra torácica (T7). Após a lesão por compressão foram feitas as injeções de LN-1 ácida (pLN-1), pLN-2 ácida (pLN-2), veículos (tampão acetato pH 4 ou tampão tris pH 7). As injeções foram feitas localmente (injeções intramedulares) conforme descrito acima.

[0076] Após o tratamento, injetou-se ainda 10 ml de solução Ringer para reposição hídrica e iônica. Posteriormente, os animais foram tratados com antibiótico (sulfato de gentamicina), para reduzir a probabilidade de infecções, principalmente urinária, e analgésicos, para minimizar a sensação de dor devida à cirurgia.

[0077] O acompanhamento da função locomotora destes animais através da escala BBB (Basso, Beatie e Bresnahan) revelou que os animais tratados com pLN apresentavam uma recuperação funcional muito mais rápida do que aqueles tratados com veículo. A Figura 1 mostra que já em 6 semanas os animais tratados receberam uma nota média do BBB de 20, o que corresponde a uma locomoção quase normal, enquanto os animais não tratados chegam a uma nota máxima de 17 após 8 semanas. A análise morfológica da recuperação tecidual revela que enquanto os animais controle (não tratados com pLN) apresentaram uma extensa cavidade cística no local da lesão, os animais tratados tiveram um tecido morfologicamente mais organizado, como pode ser observado na figura 2.

[0078] Os resultados documentados nesta invenção foram obtidos com LN-1 extraída e purificada do tumor EHS de camundongo. Como o uso de uma proteína obtida de fonte animal pode levar à transmissão e adaptação de vírus animais, foi proposto que a laminina humana fosse empregada em terapias com pacientes humanos. Resultados semelhantes àqueles aqui apresentados foram obtidos com a LN-2 recombinante humana e são mostrados na figura 8.

[0079] **Exemplo 3: <u>Aplicação da laminina</u>**

[0080] A aplicação da laminina foi realizada por intermédio de uma injeção controlada manualmente, de forma que aproximadamente 1μl

penetrasse no tecido a cada minuto. O local foi exatamente no sítio da compressão ou na região proximal da medula em relação à lesão, no caso de transecção. A seringa de injeção foi do tipo Hamilton 80330 para 10μl.

[0081] A presente invenção é uma solução para o tratamento das lesões raquimedulares, sendo inovadora porque basicamente não existem estratégias terapêuticas para esse tipo de lesão. O tratamento convencional disponível atualmente visa frear a progressão do dano inicial, ou seja, tenta reduzir a reação inflamatória e o dano tecidual secundário. Este tratamento consiste na estabilização cirúrgica da coluna vertebral e tratamento com metilprednisolona e não resulta em benefício consistente para o paciente. A laminina polimerizada em pH ácido aqui proposta consegue induzir a regeneração do tecido nervoso lesado em uma compressão, contusão ou transecção da medula espinhal.

Reivindicações

1. Uso da proteína laminina polimerizada em solução ácida pH entre 4,0 e 5,5 contendo 1 mM de íons cálcio, ***caracterizado por*** ser para preparar um medicamento para tratar lesões tissulares traumáticas, degenerativas ou inflamatórias que afetam a medula espinhal, cérebro ou pulmão em um animal mamífero humano ou não humano.

2. Uso da proteína laminina polimerizada em solução ácida pH entre 4,0 e 5,5 contendo 1 mM de íons cálcio, ***caracterizado por*** ser para preparar um medicamento para tratar inflamações pulmonares em um animal mamífero humano ou não humano.

Figura 1

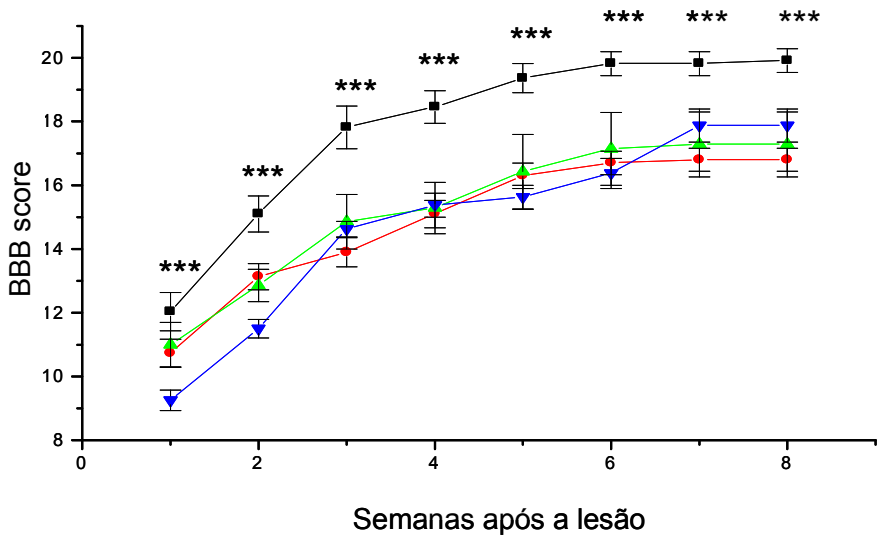


Figura 2

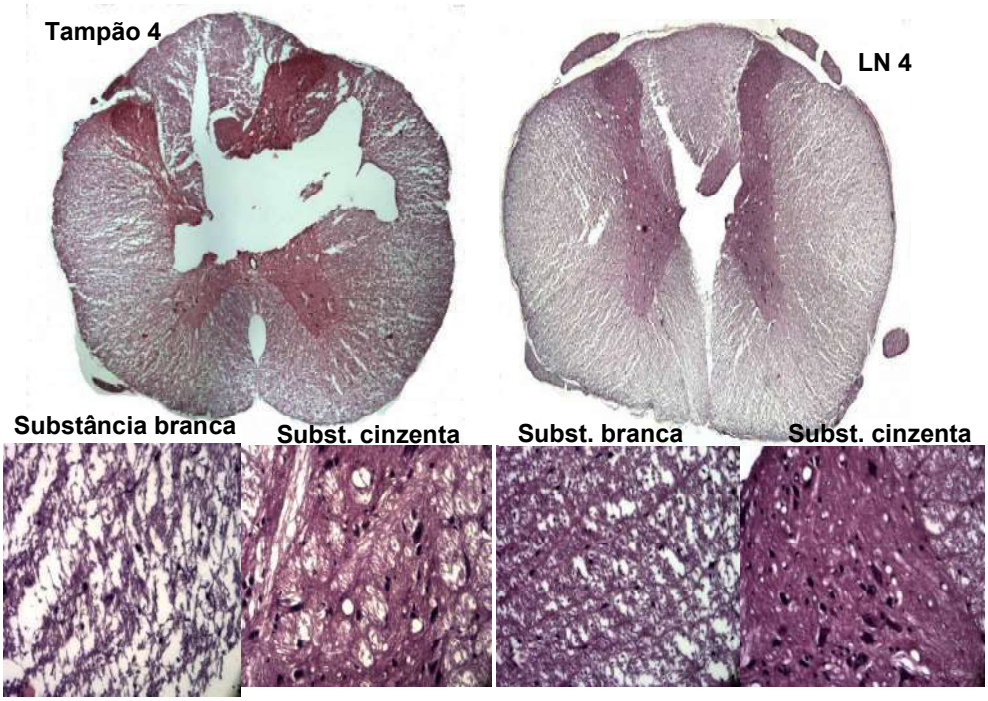

Tampão 4
LN 4
Substância branca
Subst. cinzenta
Subst. branca
Subst. cinzenta

Figura 3

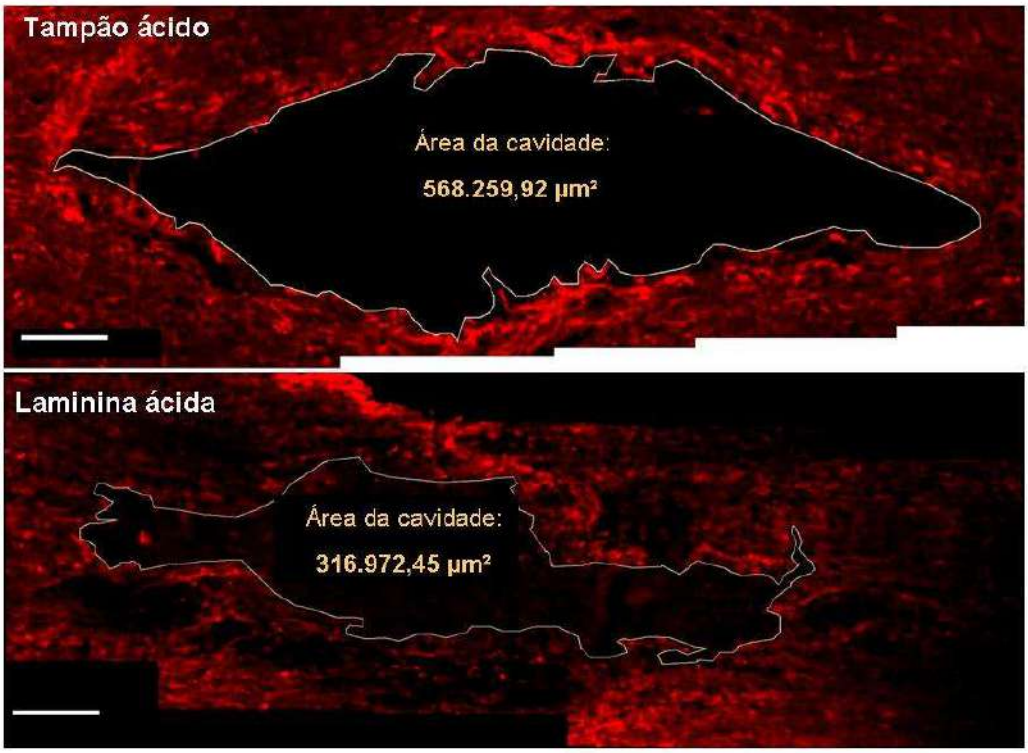

Tampão ácido
Área da cavidade:
568.259,92 µm²
Laminina ácida
Área da cavidade:
316.972,45 µm²

Figura 4

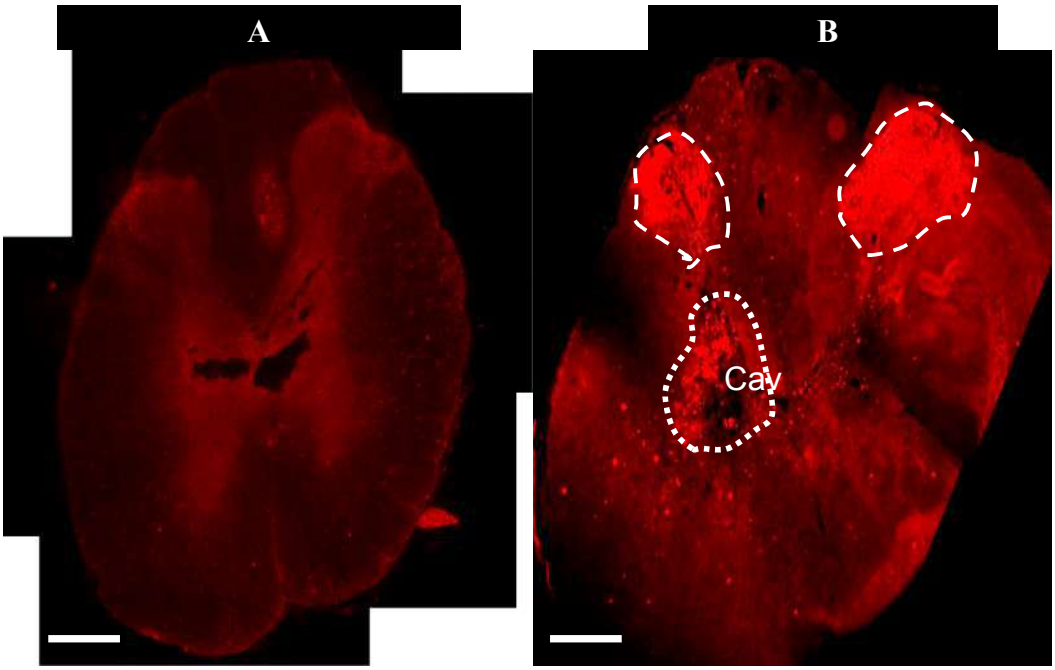


Figura 5

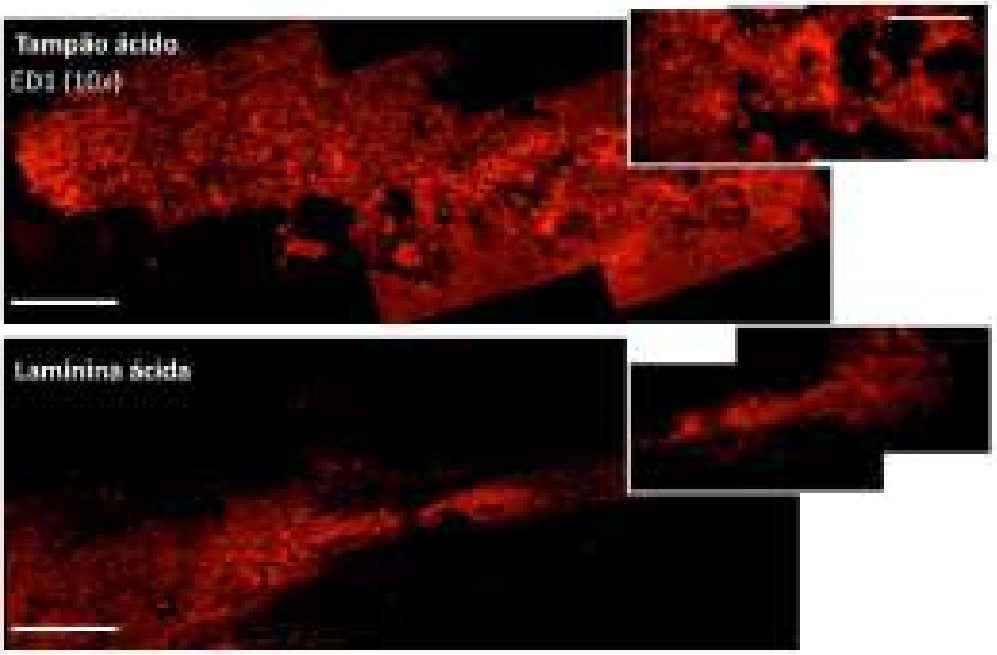


Figura 6

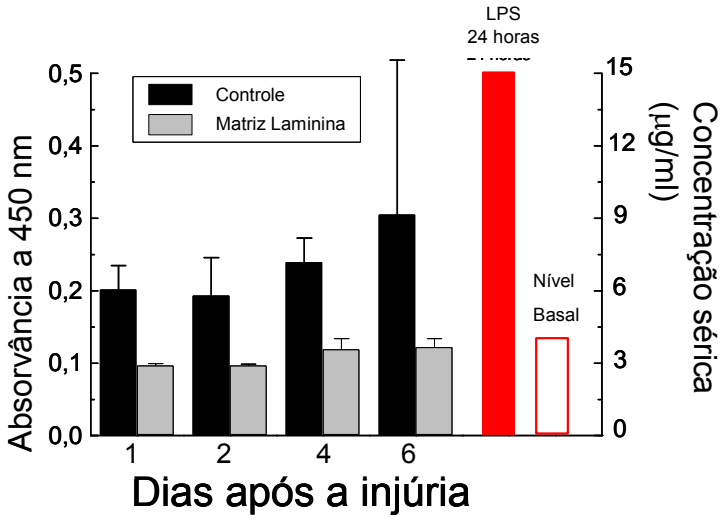

LPS
24 horas
Controle
Matriz Laminina
Nível
Basal
Absorvância a 450 nm
Concentração sérica
(µg/ml)
0,0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0
3
6
9
12
15
1
2
4
6
Dias após a injúria

Figura 7

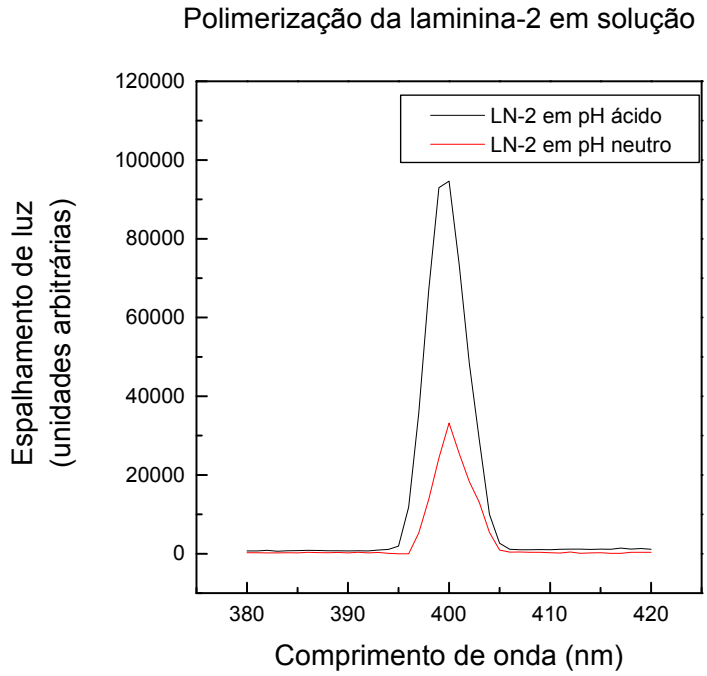

Polimerização da laminina-2 em solução
Espalhamento de luz
(unidades arbitrárias)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
380
390
400
410
420
Comprimento de onda (nm)
LN-2 em pH ácido
LN-2 em pH neutro

Figura 8

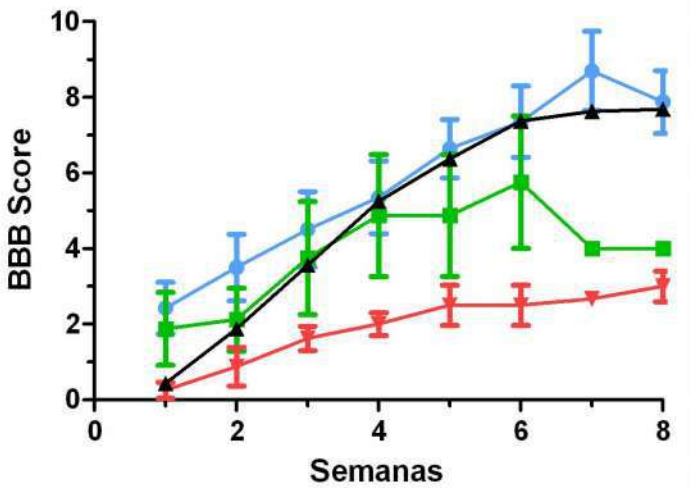
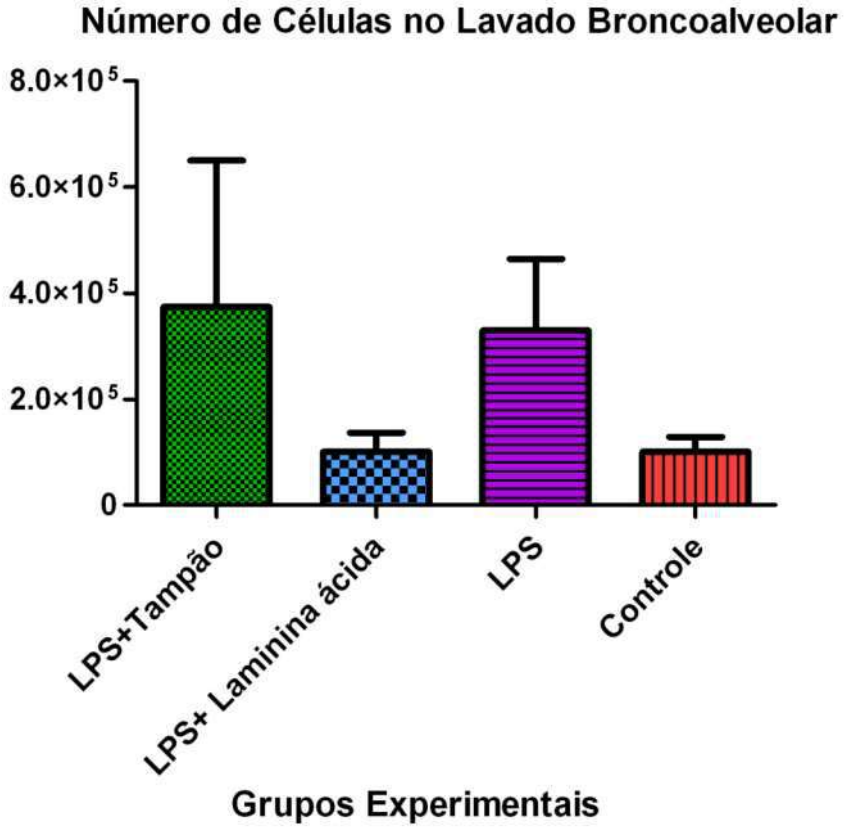


Figura 9


Número de Células no Lavado Broncoalveolar
8.0×10⁵
6.0×10⁵
4.0×10⁵
2.0×10⁵
0
LPS+Tampão
LPS+ Laminina ácida
LPS
Controle
Grupos Experimentais