



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

(21) BR 102014011432-7 A2

(22) Data do Depósito: 12/05/2014

(43) Data da Publicação: 08/12/2015
(RPI 2344)



(54) **Título:** ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA CÉLULAS TRONCO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO MESMO E SEU USO

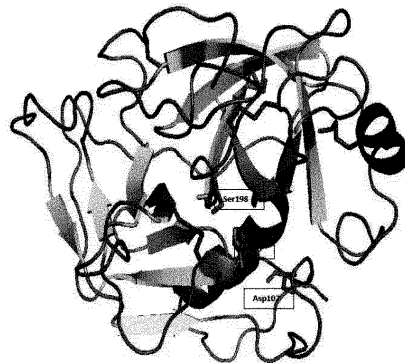
(51) **Int. Cl.:** A61K 35/58; A61K 38/36; A61K 38/37; A61K 33/06; A61L 24/10; (...)

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** RUI SEABRA FERREIRA JUNIOR, BENEDITO BARRAVIEIRA

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA CÉLULAS TRONCO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO MESMO E SEU USO. A presente invenção descreve um arcabouço (scaffold) tridimensional biodegradável de fibrina, formado por uma serinoprotease extraída a partir de veneno de serpente, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos, o diluente cloreto de cálcio e uma solução de uma população de células tronco. O arcabouço é apropriado para suportar uma população de 10⁶ células por mL de fibrina por um período prolongado de tempo, em que as células tronco são mesenquimais, de tecido umbilical e células tronco mononucleares. A invenção descreve, ainda, o processo de obtenção do arcabouço, cujos componentes são providos separadamente e polimerizam-se in situ após mistura. O arcabouço descrito apresenta inúmeras aplicações médicas, podendo aumentar a vascularização, a quimiotaxia celular, a regeneração nervosa e / ou a cicatrização de feridas no local da administração. Devido à sua origem animal, não há o risco de transmitir doenças infecciosas.



ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA CÉLULAS TRONCO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO MESMO E SEU USO

Campo da invenção:

[1] A presente invenção se insere no campo médico, mais precisamente no que diz respeito à reparação tecidual a partir da utilização de células tronco, e descreve um arcabouço tridimensional para células tronco, cujo objetivo é suportar tais células por um período prolongado de tempo.

[2] O arcabouço ora descrito é formado por uma serinoprotease extraída a partir do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos, o diluente cloreto de cálcio e uma solução de uma população de células tronco.

[3] A invenção ainda ensina o processo de obtenção do arcabouço, cujos componentes são providos separadamente e polimerizam-se *in situ* após a mistura.

[4] O arcabouço tridimensional para células tronco descrito apresenta inúmeras aplicações médicas na terapia celular e não há o risco de transmitir doenças infecciosas.

Fundamentos da invenção:

[5] Células Tronco (CT) estão amplamente distribuídas pelo organismo e são capazes de diferenciar-se em linhagens muito específicas ou apenas em fenótipos únicos.

[6] Encontrar uma forma adequada de aplicação de CTs para a utilização na engenharia de tecidos é o requerimento essencial para o sucesso da terapia celular.

[7] As células mais amplamente usadas na engenharia de tecidos são as células tronco mesenquimais (CTMs), as quais residem na medula óssea, em torno dos vasos sanguíneos (como pericitos), na pele, na gordura, no músculo e em outros locais.

[8] Por sua vez, a engenharia de tecidos necessita de um arcabouço no qual as células possam se proliferar e diferenciar-se em uma nova geração de tecidos.

[9] Este arcabouço deve ter características ideais, tal como a capacidade de promover a adesão celular, ser biodegradável e fornecer suporte mecânico suficiente para as forças *in vivo*.

[10] Biopolímeros naturais, como a fibrina humana, são atraentes para os engenheiros de tecidos: a fibrina é biocompatível, reabsorvível e essencial na cicatrização tecidual.

[11] Uma matriz de fibrina é um biopolímero utilizado para hemostasia e selagem de tecidos e é conhecida por ser importante no processo de cicatrização de feridas normal.

[12] A fibrina tem sido utilizada também como métodos de entrega de células e fatores de crescimentos exógenos, podendo ser usada como arcabouço biológico. Seu uso como arcabouço tem grande potencial para diversos procedimentos terapêuticos inovadores, como tecido ósseo, cartilaginoso, nervoso, cutâneo, entre outros.

[13] Um arcabouço de fibrina pode suportar o crescimento, a migração e a diferenciação de vários tipos de células, dentre elas, as endoteliais, os fibroblastos, células de queratinócitos, miofibroblastos e células tronco mesenquimais.

[14] As CTs semeadas em arcabouços de fibrina, quando implantadas, têm a capacidade de criar uma ampla rede de vasos sanguíneos, fibroblastos e células nervosas.

[15] A fibrina é fabricada para uso clínico como um sistema de dois componentes, constituído por trombina e fibrinogênio crioprecipitado do plasma a partir do sangue humano.

[16] Sendo assim, esta invenção propõe um arcabouço tridimensional de fibrina, que mimetiza a etapa final da cascata da coagulação, para suportar células tronco.

[17] Para tal fim, utiliza-se um crioprecipitado rico em fibrinogênio e uma enzima trombina símile, também

conhecida como serinoprotease (SPase), extraída do veneno de uma serpente.

[18] O crioprecipitado consiste na fração insolúvel, precipitada a frio, do plasma fresco congelado. Contém fibrinogênio, fator VIII (F VIII), fator de von Willebrand (F vW), fator XIII (F XIII) e fibronectina.

[19] As principais indicações do crioprecipitado são na reposição de fibrinogênio em pacientes com hemorragias e déficits isolados congênicos ou adquiridos de fibrinogênio, na reposição de fibrinogênio em pacientes com coagulação intravascular disseminada e com graves hipofibrinogenemias, na reposição de fatores XIII e de von Willebrand quando não se dispuser do concentrado industrial e, por fim, na composição da fórmula de selantes de fibrina autólogos ou heterólogos para uso tópico ou sistêmico.

[20] As SPases atuam sobre o sistema hemostático, convertendo a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina. Na presença do cálcio, estas se polimerizam e adquirem uma capacidade selante e adesiva pela formação de um coágulo estável.

[21] O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* é extraído e processado de acordo com a dosagem proteica, seguido de liofilização.

[22] Posteriormente, o veneno é submetido às técnicas de fracionamento por intermédio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e, por fim, é avaliada a pureza da serinoprotease de interesse por técnicas de sequenciamento e espectrometria de massas, a fim de se obter uma serinoprotease pura, segura e isenta de substâncias indesejáveis para o organismo humano.

[23] A composição do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* é complexa e constituída de enzimas, toxinas e peptídeos.

[24] O fracionamento em coluna de resina revela as

enzimas 5-nucleotidases, fosfodiesterases, enzima tipo trombina, l-aminoxidases, enzimas com atividade calicreina tecidual e hidrolase do NAD.

[25] As demais frações presentes são: crotamina, crotapotina, fosfolipase A2, convulxina e giroxina. Esta última pertence ao grupo das enzimas trombina símile e, também, a um grupo maior de enzimas serinoproteases, que se caracterizam por apresentar um sítio catalítico comum por meio de um mecanismo que envolve um aminoácido ativo serina altamente reativo e presente na posição 195.

[26] A modelagem teórica da serinoprotease de *Crotalus durissus terrificus* é mostrada na Figura 1. A estrutura globular monomérica apresenta duas estruturas alfa-hélice (em vermelho), contendo os resíduos 146-152 e 215-227; duas estruturas β -barris formada por seis folhas antiparalelas (em amarelo) e loops (em verde); cinco pontes dissulfeto (em azul) e a tríade catalítica (em laranja).

[27] Esta SPase não é alterada por congelamento e descongelamento ou tratamento térmico a 40 °C durante 15 minutos. Devido sua atividade enzimática semelhante à trombina, atua sobre o fibrinogênio humano e animal clivando a cadeia alfa próxima ao N-terminal.

[28] Os monômeros de fibrina resultantes polimerizam-se em uma rede tridimensional intensa e estável, que difere da produzida tradicionalmente pela trombina.

[29] Como aplicação na engenharia celular e de tecidos, o arcabouço tridimensional para células tronco ora proposto não apresenta risco de transmissão de doenças infecciosas. No âmbito da mutagenicidade, por sua vez, os testes realizados indicaram ausência de atividade mutagênica.

[30] Estudos realizados demonstraram a manutenção da viabilidade celular deste arcabouço por pelo menos 30 dias após a aplicação.

Estado da técnica:

[31] Documentos disponíveis no estado da técnica descrevem diferentes arcabouços tridimensionais de fibrina, os quais são utilizados em procedimentos cirúrgicos e feridas crônicas.

[32] No documento EP 0.592.242 B1, faz-se referência a uma composição de fibrina compreendendo qualquer forma de monômero de fibrina que possa ser convertida em polímero. Ainda, o monômero não deve se polimerizar por pelo menos 1,5 minutos após o preparo da composição.

[33] O documento de anterioridade WO 2012/020412 A2 propõe um arcabouço a base de fibrina compreendendo células-tronco mesenquimais ou células de tecido umbilical, em que o arcabouço ou *scaffold* é formado por um componente de fibrinogênio em uma concentração superior a 17,5 mg/ml.

[34] Nenhum dos documentos citados propõe um arcabouço tridimensional de fibrina tal como o descrito na presente invenção. Ainda, o arcabouço de fibrina descrito apresenta inúmeras aplicações na engenharia celular e de tecidos e não há o risco de transmitir doenças infecciosas.

Breve descrição da invenção:

[35] A invenção descreve um a arcabouço tridimensional para células tronco, o qual compreende uma serinoprotease extraída a partir do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos, o diluente cloreto de cálcio e uma solução de uma população de células tronco.

[36] A invenção ainda ensina o processo de obtenção do referido arcabouço, cujos componentes são providos separadamente e polimerizam-se *in situ* após mistura.

[37] O arcabouço de fibrina é capaz de suportar, pelo menos, uma população de 10^6 células tronco por mL de fibrina, em que as células tronco podem ser mesenquimais, de tecido umbilical e / ou mononucleares, por um período

prolongado de tempo.

Breve descrição da figura:

[38] A Figura 1 representa a estrutura teórica da serinoprotease proveniente do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Descrição detalhada da invenção:

[39] A invenção descreve um arcabouço tridimensional de fibrina para células tronco, o qual compreende uma serinoprotease extraída a partir do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos, o diluente cloreto de cálcio e uma solução de uma população de células tronco, na proporção de 0,3 mL : 0,5 mL : 0,5 mL : 10^6 células.

[40] O arcabouço tridimensional é formado *in situ*, pela polimerização dos componentes após mistura.

[41] Ainda, é objeto desta invenção o processo de obtenção do arcabouço de fibrina.

[42] Os componentes são providos individualmente, em frascos separados, e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o seu uso. Os frascos deverão ser retirados do freezer e mantidos a temperatura ambiente (entre $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 10 a 20 minutos para descongelamento.

[43] A serinoprotease é extraída a partir do veneno de uma serpente e está presente em uma concentração que varia entre 4 e 5 mg/mL. Em uma modalidade preferida da invenção, a serpente é a *Crotalus durissus terrificus*.

[44] O crioprecipitado é extraído do sangue (plasma) de grandes animais, preferencialmente bubalinos.

[45] O crioprecipitado desta invenção compreende:

- fibrinogênio em concentração entre 0,7 e 1,4 mg/mL;
- fator V em concentração entre 70 e 200 UI/dL;
- fator VIII em concentração entre 100 e 700 UI/dL; e
- fator de von Willebrand em concentração entre 50 e 500 UI/dL.

[46] O diluente utilizado é o cloreto de cálcio em concentração entre 20 e 30 mM, preferencialmente 25 mM.

[47] A solução de manutenção (10 mL) de uma população contendo pelo menos 10^6 células tronco é centrifugada até a formação de um pélete. O sobrenadante é, então, descartado e o pélete é ressuspendido na solução diluente.

[48] O conteúdo do diluente, associado às células tronco, é injetado no frasco contendo a serinoprotease, agitado e reservado em seguida.

[49] Por último, deve-se aspirar todo o conteúdo do crioprecipitado e, concomitantemente, realiza-se a aplicação diretamente no local de interesse.

[50] A aplicação no local de interesse após a adição do crioprecipitado deve ocorrer em, no máximo, 60 segundos, pois logo após observa-se a formação de um gel translúcido, que corresponde ao arcabouço de fibrina contendo as células peletizadas em seu interior.

[51] A fibrina pode ser desnaturada após contato com soluções contendo álcool, iodo ou metais pesados (tais como uma solução antisséptica). Logo, estas devem ser removidas antes da aplicação do produto.

Crioprecipitado:

[52] Para assegurar de que o crioprecipitado é seguro e isento de qualquer substância estranha ou indesejável ao organismo humano, faz-se necessário selecionar e certificar a sanidade dos animais doadores.

[53] Logo, o manejo sanitário (vacinas e vermifugação, testes sorológicos diagnósticos e de tuberculinização, além de exames clínicos) devem ser realizados com frequência.

Toxicologia e mutagenicidade:

[54] A fim de analisar a viabilidade do arcabouço tridimensional para células tronco desta invenção, foram realizados testes de toxicidade e de mutagenicidade.

- Toxicologia:

[55] Para analisar a toxicologia do arcabouço desta invenção, foram realizados os testes de determinação da DL₅₀ oral em ratos com a serinoprotease e determinação da sensibilidade dérmica em cobaias com a serinoprotease e o crioprecipitado.

[56] Para ambos os experimentos realizados, não houve sensibilização a levar ao quadro de choque nos animais experimentados.

- Mutagenicidade:

[57] Para avaliar a mutagenicidade do arcabouço aqui descrito, foi realizado o teste de AMES *et al.*, que utiliza linhagens de *Salmonella typhimurium* capazes de detectar produtos químicos que causam mutações gênicas por deslocamento do quadro de leitura ou por substituição dos pares de base de DNA.

[58] Para isto, foram usadas linhagens de *Salmonella* deficientes em histidina, além de mutações que aumentam a sensibilidade em detectar mutágenos, tais como mutação *rfa*, deleção *uvrB* e plasmídio *pkM101*.

[59] Os resultados mostraram que a frequência normal de mutações reversas, típica da linhagem de *Salmonella*, não sofreu alterações quando em presença da serinoprotease, nem em presença do crioprecipitado, um indicativo de que os componentes do arcabouço tridimensional não apresentam atividade mutagênica.

[60] Os resultados obtidos mostram que o arcabouço tridimensional para células tronco da presente invenção é seguro e eficaz, favorece sobremaneira a hemostasia, tem bom desempenho como adesivo, é biocompatível e bioabsorvível, é menos alergênico que a sutura convencional e não altera a reparação tecidual, bem como não ocasionou eventos adversos decorrentes do uso, nem toxicidade local ou sistêmica.

- Viabilidade celular:

[61] Estudos em animais de experimentação demonstraram que as células permanecem viáveis após 60 dias de sua aplicação.

REIVINDICAÇÕES

1. Arcabouço tridimensional para células tronco **caracterizado** por ser biodegradável e por compreender uma serinoprotease, um crioprecipitado rico em fibrinogênio, um diluente e uma solução de uma população de células tronco, na proporção de 0,3 mL : 0,5 mL : 0,5 mL : 10^6 células.

2. Arcabouço tridimensional, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a serinoprotease ser extraída a partir do veneno de uma serpente e estar presente em uma concentração que varia entre 4 e 5 mg/mL.

3. Arcabouço tridimensional, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato da serpente ser a *Crotalus durissus terrificus*.

4. Arcabouço tridimensional, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o crioprecipitado ser extraído do sangue de grandes animais, preferencialmente bubalinos.

5. Arcabouço tridimensional, de acordo com as reivindicações 1 ou 4, **caracterizado** pelo fato de o crioprecipitado compreender:

- fibrinogênio em concentração entre 0,7 e 1,4 mg/mL;
- fator V em concentração entre 70 e 200 UI/dL;
- fator VIII em concentração entre 100 e 700 UI/dL; e
- fator de von Willebrand em concentração entre 50 e 500 UI/dL.

6. Arcabouço tridimensional, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o diluente ser o cloreto de cálcio em concentração entre 20 e 30 mM, preferencialmente 25 mM.

7. Arcabouço tridimensional, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a solução de uma população de células tronco conter pelo menos 10^6 células tronco.

8. Arcabouço tridimensional, de acordo com as reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de os componentes serem providos individualmente e polimerizarem-se *in situ* após mistura.

9. Processo de obtenção do arcabouço tridimensional para células tronco conforme definido nas reivindicações 1 a 8, **caracterizado** por compreender as etapas de:

a) descongelamento dos componentes em temperatura entre 15 e 25 °C durante 10 a 20 minutos;

b) injeção do diluente na serinoprotease, seguida de agitação e reserva;

c) centrifugação da solução de uma população de células tronco até formar um pélete e descarte do sobrenadante;

d) diluição do pélete na solução de diluente contendo a serinoprotease;

e) adição da solução de crioprecipitado e aplicação imediata (até 60 segundos) no local de interesse; e

f) formação do arcabouço tridimensional.

10. Uso do arcabouço tridimensional para células tronco conforme definido nas reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por ser no preparo de um arcabouço para ser na terapia celular e na regeneração tecidual.

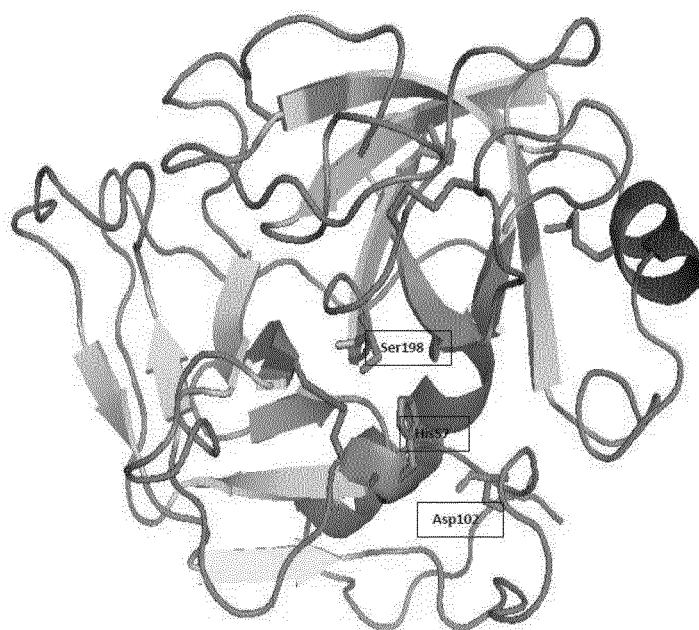


FIGURA 1

Resumo**ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA CÉLULAS TRONCO, PROCESSO DE
OBTENÇÃO DO MESMO E SEU USO**

A presente invenção descreve um arcabouço (*scaffold*) tridimensional biodegradável de fibrina, formado por uma serinoprotease extraída a partir de veneno de serpente, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos, o diluente cloreto de cálcio e uma solução de uma população de células tronco. O arcabouço é apropriado para suportar uma população de 10^6 células por mL de fibrina por um período prolongado de tempo, em que as células tronco são mesenquimais, de tecido umbilical e células tronco mononucleares. A invenção descreve, ainda, o processo de obtenção do arcabouço, cujos componentes são providos separadamente e polimerizam-se *in situ* após mistura. O arcabouço descrito apresenta inúmeras aplicações médicas, podendo aumentar a vascularização, a quimiotaxia celular, a regeneração nervosa e / ou a cicatrização de feridas no local da administração. Devido à sua origem animal, não há o risco de transmitir doenças infecciosas.