



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

(21) BR 10 2013 007447-0 A2



* B R 1 0 2 0 1 3 0 0 7 4 4 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 28/03/2013
(43) Data da Publicação: 11/11/2014
(RPI 2288)

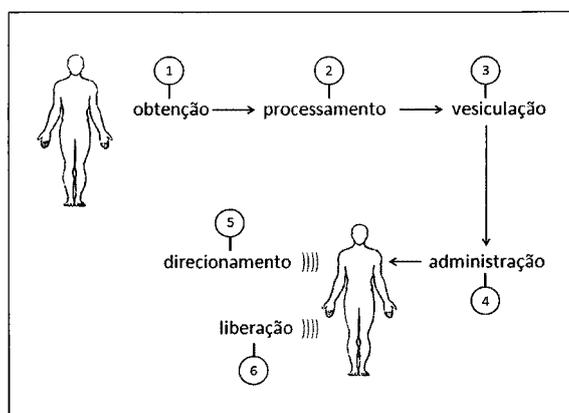
(51) Int.Cl.:
A61K 35/14

(54) Título: MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUSBTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Marcos Emílio dos Santos Frizzo, Nádia Pesce da Silveira

(57) Resumo: MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUSBTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS. Esta invenção descreve método de obtenção, o uso e produtos derivados de plaquetas íntegras ou de estruturas membranosas obtidas das mesmas, para uso no transporte de substâncias ou materiais bioativos, bem como aumentar a biodisponibilidade destes mesmos materiais. A presente invenção ainda é capaz de proteger e estabilizar diferentes fármacos, a saber, antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos, etc. Esta tecnologia pode ser ainda utilizada para a dispersão controlada, via endovenosa, de estruturas obtidas por nanotecnologia ou de reguladores da expressão gênica. Em suma, a presente invenção descreve método e produtos da funcionalização de plaquetas ou de estruturas membranosas para transporte e liberação controlada de materiais bioativos via endovenosa.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO
PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES
BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS

5 CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção descreve método de obtenção, o uso e produtos derivados de plaquetas íntegras ou de estruturas membranosas obtidas das mesmas, para uso no transporte de substâncias ou materiais bioativos, bem como aumentar a biodisponibilidade destes mesmos materiais. A presente invenção ainda é capaz de proteger e estabilizar diferentes fármacos, a saber, antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos, etc. Esta tecnologia pode ser ainda utilizada para a dispersão controlada, via endovenosa, de estruturas obtidas por nanotecnologia ou de reguladores da expressão gênica. Em suma, a presente invenção descreve método e produtos da funcionalização de plaquetas íntegras ou de estruturas membranosas para transporte e liberação controlada de materiais bioativos via endovenosa.

ESTADO DA TÉCNICA

Os tratamentos envolvendo sistemas entregadores de drogas (*Drug delivery systems*) podem ser do tipo passivo ou ativo. Na categoria passiva o agente terapêutico é incorporado dentro de uma estrutura (macromolécula ou nanopartícula), que circula na corrente sanguínea e acumula dentro do tumor (por exemplo). Para que estas estruturas possam permanecer o tempo suficiente dentro do organismo elas devem ser biocompatíveis, ou seja, elas não podem ser reconhecidas como um “corpo estranho”. O revestimento com polietileno glicol é uma das técnicas mais utilizadas para aumentar o tempo de circulação das mesmas no corpo (PEGilação). Nosso invento trata-se de um sistema de entrega de drogas diferenciado dos já existentes no estado da técnica. Neste caso, a inovação é a utilização de estruturas membranosas obtidas de plaquetas humanas para a veiculação de fármacos, e que, também, poderia conter produtos de nanotecnologia e/ou reguladores da expressão gênica. Potencialmente esta ferramenta pode biodisponibilizar de forma

controlada agentes empregados no tratamento de diversas patologias (ex. câncer e arteriosclerose) sem provocar respostas imunológicas durante o tratamento do paciente. O invento também tem grande possibilidade de aplicação na pesquisa científica para experimentação de novos fármacos, produtos nanotecnológicos e/ou reguladores da expressão gênica.

Mesmo após a PEGlação, a maioria das nanopartículas utilizadas na quimioterapia é degradada pelo sistema retículo endotelial do fígado depois de serem administradas. Uma alternativa recente para tentar resolver este problema, propõe a eliminação transitória das células hepáticas responsáveis por esta degradação com o objetivo de aumentar o tempo de permanência das estruturas membranosas (lipossomas) carregadas com o medicamento (**Ohara et al., 2012. Int J Cancer. 131(10):2402-2410**).

Plaquetas são utilizadas rotineiramente em hospitais para transfusões homólogas (de indivíduos diferentes) ou autólogas (do próprio indivíduo), existindo uma vasta literatura científica sobre o tema. A utilização de estruturas membranosas obtidas de plaquetas para a distribuição de produtos terapêuticos reduziria de forma significativa o risco eliminação de estruturas portadoras de fármacos administradas via endovenosa.

Uma conseqüência esperada com a utilização deste invento seria uma maior biodisponibilidade de fármacos contidos no interior de estruturas membranosas, em decorrência de um aumento no tempo de permanência destes invólucros na corrente sanguínea. Desta forma, existe a expectativa de obtenção de uma maior eficiência nos tratamentos onde os medicamentos já são veiculados em lipossomas e a perspectiva de oferecer um meio de administração otimizado para outros onde esta tecnologia ainda não é empregada. Com o aumento da eficiência do tratamento, um resultado adicional que poderia ser obtido seria a diminuição dos efeitos secundários da quimioterapia. Esta vantagem também pode ser estendida para os casos em que é necessária a dispersão de produtos de nanotecnologia ou reguladores da expressão gênica na circulação sanguínea.

A utilização de vesículas membranosas artificiais (lipossomas) para transportar agentes bioativos já é utilizada para fins terapêuticos. Estas estruturas membranosas podem ser utilizadas para transportar drogas hidrofílicas no seu núcleo hidrofílico ou drogas hidrofóbicas em sua camada fosfolipídica. Uma formação lipossomal contendo o agente terapêutico doxorubicina (Doxil) foi a primeira droga baseada em nanopartículas (tamanho inferior a 100 nm) a ter sido aprovada pela FDA para tratamento da AIDS e sarcoma de Kaposi. Para aumentar a biocompatibilidade usualmente são revestidas com polietileno glicol. Entretanto, este procedimento não impede o ataque de células fagocitárias (mais frequentemente as hepáticas) que removem os lipossomas da corrente sanguínea. Desta forma, a rápida degradação dos lipossomas carregados com fármacos provoca o metabolismo da droga e a excreção dos medicamentos, constituindo uma limitação à utilização desta tecnologia.

A utilização de invólucros membranosos obtidos de plaquetas pode evitar a resposta imunológica que desencadeia a degradação dos lipossomas, aumentando a biodisponibilidade dos fármacos. O resultado esperado é uma otimização da ação do medicamento (ou do produto contido no invólucro) e/ou a possibilidade de obtenção de uma ferramenta para novas abordagens terapêuticas.

Existem vários tipos de nanopartículas utilizadas em terapias químicas, tais como nanopartículas inorgânicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanocristais, nanotubos de carbono, dendrímeros e lipossomas. Todos os produtos utilizados até o momento são baseados em componentes artificiais ou contém alguns elementos químicos presentes na membrana celular com o objetivo de mimetizar esta estrutura. Existem vários problemas tecnológicos associados com a utilização destas nanopartículas e talvez o principal esteja associado à antigenicidade (desencadeamento de resposta imunológica) e a remoção destas estruturas por células fagocitárias. O uso de componentes biológicos (membrana

plaquetária) para transportar agentes bioativos deve aumentar a biocompatibilidade, reduzindo a eliminação destes elementos circulantes.

A idéia de introduzir materiais em células sanguíneas com objetivo terapêutico já foi concebida no passado. Vários inventos foram baseados no propósito de otimizar a principal função dos eritrócitos, ou seja, o transporte de oxigênio. Para tanto, foram desenvolvidas técnicas com a finalidade de introduzir efetores alostéricos da hemoglobina. Os métodos concebidos para encapsular materiais nestas células são o pulso osmótico (**U.S. Pat. Nos. 4.478.824 e 4.931.276**), liofilização seguida de reconstituição (**U.S. Pat. Nos. 4.874.690 e 5.043.261**), lise controlada e re-selagem (**U.S. Pat. Nos. 4.752.586 e 4.652.449**), incorporação de lipossomas (**U.S. Pat. Nos. 4.192.869, 4.321.259 e 4.473.563**) e electroporação (**Mouneimne et al., 1990. FEBS 275(1,2): 117-120 e Holaday et al., Pub. No. US 2005/0019311 A1**).

Na descrição do invento “método e câmara de electroporação de fluxo” (**Pub. No. US 2005/0019311 A1**), **Holaday et al.** propôs que o método e o aparelho para encapsular substâncias em eritrócitos também poderia ser utilizado para permeabilizar materiais em plaquetas com finalidade terapêutica. Cabe salientar que ao descrever o invento, **Holaday et al.** enfatiza repetidamente que o mesmo atende a necessidade encapsular materiais em escala comercial. Desta forma, o invento descreve um método/aparelho para encapsular substâncias bioativas em fluxo contínuo. A partir da descrição do invento depreende-se a necessidade da utilização de volumes consideráveis de sangue, sendo mencionada a necessidade de um hematócrito entre 30 e 80, preferencialmente 40. Ainda na descrição do método/aparelho é mencionada a possibilidade de utilização em plaquetas, entretanto, o detalhamento técnico é baseado no uso de eritrócitos, não sendo descrita nenhuma alteração específica para o uso de plaquetas. Num eventual uso nestas células, permanecem questões essenciais não respondidas. Entre as principais poderia ser mencionada: a) a impossibilidade de determinar com precisão a concentração do material (fármaco) incorporado, uma vez que parte-se de uma densidade de plaquetas desconhecida e b) na descrição do método é

relacionado o uso de CaCl_2 (2 mM). No caso de plaquetas, sabe-se que a presença de Ca^{2+} desencadeia a agregação, fato que comprometeria ou até inviabilizaria a permeabilização destas células.

Até o presente momento não foi encontrado no estado da técnica
5 nenhuma tecnologia que proponha a utilização controlada de plaquetas ou estruturas derivadas destas células para a veiculação de agentes bioativos. Todas as tecnologias descritas atualmente (lipossomas e diferentes tipos de nanopartículas, com ou sem PEGilação) apresentam limitações relacionadas com uma maior ou menor probabilidade de desencadear uma resposta
10 imunológica. Uma consequência direta desta antigenicidade é a rápida remoção das mesmas por células fagocitárias (principalmente na passagem pelo fígado). Outra limitação das tecnologias atuais é relacionada com a estabilidade do material transportado. O extravasamento precoce do agente pode aumentar sua metabolização e/ou eliminação e diminuir a eficácia do
15 tratamento, exigindo doses maiores do medicamento e potencializando seus efeitos secundários. A presente invenção propõe a utilização de plaquetas ou membranas plaquetárias como invólucro para a dispersão de agentes bioativos. A invenção baseia-se na utilização de pequenos volumes de sangue para obtenção destas células ou estruturas celulares. Devido à natureza
20 biológica dos componentes membranosos é esperada uma significativa redução na probabilidade de desencadear antigenicidade. Adicionalmente, tendo em vista as características da metodologia descrita na presente invenção, existe a possibilidade de tratamento autólogo, onde seriam utilizadas plaquetas do próprio indivíduo. Este recurso potencialmente eliminaria o risco
25 de ativação do sistema imunológico durante o tratamento, possivelmente diminuindo as doses de medicamento administradas durante o mesmo.

A presente invenção fundamenta-se na utilização controlada de plaquetas ou de estruturas membranosas derivadas destas células. Este procedimento implica na possibilidade de manipular pequenos volumes e
30 densidades conhecidas de células, aumentando a probabilidade de sucesso no encapsulamento dos produtos. Estas características diferem essencialmente da

proposta de **Holaday et al.** que descreve o uso de um equipamento de fluxo contínuo para encapsular materiais em escala comercial. Outra diferença relevante entre o presente invento e a descrição de **Holaday et al. (não detalhada para plaquetas)** é o reduzido volume necessário para manter a suspensão celular e a ausência de Ca^{2+} (desencadeador de agregação plaquetária) neste meio.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção descreve o uso de plaquetas íntegras ou de estruturas membranosas obtidas das mesmas para uso no transporte de substâncias ou materiais bioativos. A obtenção das plaquetas pode ser a partir do sangue de um doador (homóloga) ou do próprio paciente (autóloga). Uma vez que o material biológico a ser utilizado como veículo é obtido de um volume de sangue reduzido, não há limitação de uma determinada faixa de hematócrito para obtenção das plaquetas. Este fato é de fundamental importância para casos de origem autóloga onde o hematócrito do paciente estaria significativamente baixo.

Na descrição deste invento, a utilização controlada de plaquetas ou de estruturas membranosas derivadas destas células implica no uso de um volume conhecido e de uma densidade celular previamente estabelecida. Desta forma é possível precisar a concentração do fármaco/material a ser incubado com as células, permitindo um maior controle da encapsulação do mesmo. Durante todo o processo, desde a venopunção até a obtenção final do produto, o cátion Ca^{2+} é removido do meio de incubação para que seja evitada a formação de agregados plaquetários.

Este invento pode ser utilizado para transportar e potencializar a biodisponibilidade de diversos agentes bioativos (fármacos, reguladores gênicos ou nanodispositivos).

Outra aplicação da presente invenção pode ser a proteção e a estabilização de diferentes fármacos (antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos, etc.), contribuindo para o favorecimento das propriedades fármaco-cinéticas dos mesmos.

Outra possibilidade de uso é a introdução de ferramentas de silenciamento gênico (siRNAs ou microRNAs) ou de material genético modificado nos invólucros obtidos de plaquetas com a finalidade de afetar seletivamente a biologia de determinadas células (uso de vacinas específicas, anti-viral e anti-câncer por exemplo).

Esta tecnologia pode ser ainda utilizada para a dispersão controlada, via endovenosa, de estruturas obtidas por nanotecnologia.

Outra aplicação da invenção pode ser o direcionamento das estruturas membranosas (plaquetas ou fragmentos plaquetários) contendo os materiais bioativos para determinadas áreas do corpo. Este processo pode ser obtido com a introdução de elementos magnéticos/paramagnéticos nas estruturas membranosas, permitindo direcioná-las na corrente sanguínea com auxílio de campos magnéticos até a região de interesse.

A invenção também pode ser utilizada para controlar a liberação localizada dos agentes bioativos transportados. Neste caso, podem ser incluídos traçadores (ouro coloidal, por exemplo) no interior das estruturas membranosas portadoras dos produtos e que possam desencadear aumento localizado de temperatura e consequente liberação dos mesmos frente à exposição do paciente à forte campo eletromagnético. Neste caso, uma das aplicações da inclusão de nanopartículas de ouro em vesículas obtidas de plaquetas poderia ser a exploração do fenômeno plasmon (Jain et al., 2007. *Nano Today* 2(1):18-29).

DESCRIÇÃO DA FIGURA

Detalhamento da figura 1:

(1) Obtenção da amostra de sangue do paciente (autóloga) ou de um doador (homóloga) a partir de um pequeno volume de sangue ou da separação direta por aférese.

(2) O processamento da suspensão de plaquetas inclui lavagem das células. Nesta etapa também é possível obter estruturas membranosas estabilizadas com a utilização de ultrassom.

(3) Na vesiculação do material a ser transportado poderão ser utilizados diferentes protocolos (detergentes, electroporação, ultrassom, toxinas bacterianas formadoras de poros, etc).

5 (4) Os invólucros membranosos contendo o material serão administrados via endovenosa para dispersão sistêmica ou em vasos de determinada área para distribuição mais localizada.

(5) O direcionamento das estruturas membranosas para uma determinada área (ou a retenção dos mesmos em uma região específica) poderá ser obtido com a inclusão de partículas magnéticas/paramagnéticas e o uso de forças
10 magnéticas.

(6) A liberação do conteúdo das estruturas membranosas (contendo ouro coloidal) poderá ocorrer de forma controlada através do uso da ressonância plasmon, desencadeada por forte campo eletromagnético.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 Embora a presente invenção tenha sido descrita com alguns detalhes específicos para realização da mesma, não se pretende que esses detalhes sejam considerados como limitações ao âmbito da invenção. O presente invento pode ser compreendido mais facilmente pela descrição detalhada a seguir.

20 A presente invenção trata-se de um sistema de entrega de materiais de ação biológica que utiliza a via endovenosa. A principal realização do invento caracteriza-se pela possibilidade de proteger e controlar a distribuição e liberação de materiais. Desta forma, a invenção trata-se de uma categoria de sistema ativo de entrega de produtos terapêuticos.

25 A presente invenção descreve o método para a obtenção de estruturas celulares íntegras ou a partir de fragmentos de plaquetas humanas, transformando-os em produtos de transporte controlado e liberação localizada de agentes bioativos (fármacos, reguladores gênicos ou nanodispositivos).

30 O método de liberação controlada de agentes bioativos descrito na presente invenção envolve a retirada de um pequeno volume de sangue para a obtenção de plaquetas humanas e sua subsequente manipulação *in vitro*. O

resultado deste procedimento é a realização de um invólucro biológico obtido de plaquetas integras ou de estruturas membranosas provenientes destas células que servirá como meio recipiente para a introdução do material a ser encapsulado. As condições de preparação do produto (invólucro plaquetário contendo o agente bioativo) dependerão da natureza do material a ser transportado (fármacos, produtos de nanotecnologia ou de engenharia genética). A coleta da amostra de sangue para obtenção das plaquetas pode ser a partir de um doador ou do próprio paciente.

Na presente invenção, ao introduzir materiais terapêuticos no interior de membranas biológicas será produzido um veículo totalmente biocompatível capaz de transportar agentes bioativos sem desencadear respostas imunológicas. Como resultado deste processo é esperado ausência de antigenicidade e de ações enzimáticas durante o percurso das estruturas na corrente sanguínea. O resultado direto desta condição será um aumento da biodisponibilidade do agente terapêutico, Assim, outra realização da presente invenção é a proteção e a garantia de estabilidade do material transportado, ao evitar a remoção precoce das estruturas por células fagocitárias e/ou o extravasamento do agente e sua consequente metabolização e/ou eliminação. Com o aumento da biodisponibilidade do agente terapêutico é esperada uma maior eficácia do tratamento, exigindo doses menores do medicamento e a redução de seus efeitos secundários.

Outra realização desta invenção é a possibilidade de co-localizar, no interior dos invólucros membranosos, materiais com propriedades magnéticas/paramagnéticas e os produtos de finalidade terapêutica. Desta forma, também é objeto da presente invenção a possibilidade de direcionar as estruturas membranosas portadoras dos agentes bioativos para determinada região de interesse (tumor, área inflamada, etc), mantendo-as no local com o uso de forças magnéticas.

Outra finalidade da presente invenção é ser capaz de utilizar o fenômeno de ressonância plasmon para gerar hipertermia e liberar o agente terapêutico contido nos invólucros membranosos de forma controlada. Segundo esta

propriedade, o sistema de transporte será do tipo ativo e permitirá a liberação controlada em determinada área alvo.

A obtenção destas plaquetas ou estruturas membranosas, por sua vez envolve a seguinte metodologia:

5 **A) Obtenção e lavagem das plaquetas:**

1. Obtenção de um determinado volume de sangue em tubos a vácuo (EDTA-K3), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo.

10 2. Os tubos são centrifugados para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).

3. A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para mini tubos.

15 4. Os mini tubos são centrifugados. O sobrenadante dos tubos é descartado.

5. O PRP é re-suspendido em solução tampão sacarose, adiciona-se mais certa quantidade do mesmo tampão. Procedimento idêntico é realizado no outro mini tubo.

20 6. Os mini tubos são centrifugados. O sobrenadante dos dois mini tubos é descartado.

7. O *pellet* resultante (obtido do PRP) de cada mini tubo é re-suspendido em 1/5 do volume inicial de PRP obtido em tampão sacarose.

25 8. O volume dos mini tubos são reunidos. Acrescenta-se certa quantidade de solução tampão Tris-citrato.

B) Vesiculação do material em plaquetas (íntegras ou em estruturas membranosas):

30 1. O agente bioativo poderá ser introduzido em plaquetas íntegras ou em estruturas membranosas obtidas de plaquetas (reduzidas e estabilizadas previamente antes da introdução do agente).

2. Nesta invenção, a técnica para introdução do material a ser veiculado deverá ser escolhida de acordo com a natureza e as características do produto a ser permeabilizado, a saber: uso de detergentes (saponina ou digitonina), electroporação, toxinas bacterianas formadoras de poros, ultrassom, entre outras.

Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos, são apresentados abaixo exemplos, não limitantes.

EXEMPLO 1: Obtenção e lavagem das plaquetas:

1. Obtenção de 8 mL de sangue (doador ou paciente) em 2 tubos a vácuo (EDTA-K3), segundo protocolo de venopunção padrão. Imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo (10 vezes).
2. A quantidade e o volume médio das plaquetas da amostra são determinados no sangue total através do analisador hematológico (ABX Micros). Na determinação dos parâmetros experimentais foram utilizadas densidades entre 150 e 300×10^3 células. mm^{-3} . Entretanto, o método não exclui o uso de um número maior ou menor destas células.
3. Os tubos são centrifugados (1400 rpm por 5 min à 4°C) para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).
4. A fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para mini tubos.
5. Os mini tubos são centrifugados (8400 rpm por 10 min à 4°C). O sobrenadante dos dois tubos é descartado.
6. O PRP é re-suspendido em 0,5 mL de tampão sacarose (0,32 M, pH 7,4). É adicionado mais 0,5 mL do mesmo tampão (4°C). Procedimento idêntico é realizado no outro mini-tubo.
7. Os mini tubos são centrifugados (8400 rpm por 5 min à 4°C). O sobrenadante dos dois mini tubos é descartado.
8. O *pellet* resultante (obtido do PRP) de cada mini-tubo é re-suspendido em 1/5 do volume inicial de PRP obtido (centrifugação descrita no item 3) em tampão sacarose (320 mM, pH 7,4) à 4°C.

9. O volume dos 2 mini tubos são reunidos. É acrescentado 160% de tampão Tris-citrato pH 6,5 à 4°C (referente ao volume total da suspensão celular obtida nesta etapa), sendo esperado um volume de suspensão celular entre 250 e 300 µL. Cabe salientar que a obtenção de um volume maior ou menor da suspensão celular não constitui um fator limitante.

Tampão sacarose (composição em mM):

Sacarose (320); NaCl (137); KCl (2,7); KH₂PO₄ (1,5); NaH₂PO₄ (8,1).

Tampão Tris-citrato (composição em mM):

NaCl (112,8); KCl (4,5); MgSO₄ (1,1); KH₂PO₄ (1,1); Tris-HCl (25); Citrato-Na (11); D-glicose (10,2).

Observação: Na futura utilização do invento podem ser empregadas outras formas de obtenção de plaquetas (por exemplo, obtenção por aférese), assim como poderiam ser utilizados outros tampões para manutenção das células.

Nas condições descritas acima foram realizados testes de viabilidade das plaquetas íntegras por períodos de até 12 dias após a obtenção das células.

EXEMPLO 2: Vesiculação do material em plaquetas (íntegras ou em estruturas membranosas):

O agente bioativo poderá ser introduzido em plaquetas íntegras ou em estruturas membranosas obtidas de plaquetas (reduzidas e estabilizadas previamente antes da introdução do agente). Para as duas situações a origem das plaquetas pode ser a partir do próprio indivíduo (autóloga) ou proveniente de doadores (homóloga).

Métodos de permeabilização de plaquetas têm sido empregados a mais de 20 anos para estudar o papel de várias moléculas intracelulares na função plaquetária. Estes métodos também são empregados para introduzir nestas células proteínas recombinantes, anticorpos inibitórios e peptídeos (Robert Flaumenhaft From: **Methods in Molecular Biology**, vol. 273: **Platelets and Megakaryocytes**, Vol. 2 (2004): **Perspectives and Techniques** Edited by: J. M. Gibbins and M. P. Mahaut-Smith © Humana Press Inc., Totowa, NJ). Existem várias técnicas disponíveis para permeabilizar produtos, tais como:

uso de detergentes (saponina ou digitonina), electroporação, toxinas bacterianas formadoras de poros, ultrassom, entre outras. Nesta invenção, a técnica para introdução do material a ser veiculado deverá ser escolhida de acordo com a natureza e as características do produto a ser permeabilizado.

5 Seguem abaixo alguns exemplos, não limitantes.

A. Uso de detergente permeabilizador

Exemplo de método de permeabilização com digitonina:

1. O mini-tubo contendo o PRP é centrifugado (8400 rpm por 5 min à 4°C) e o sobrenadante é descartado.
- 10 2. O *pellet* resultante é re-suspendido em volume equivalente de tampão (pH 7,0) contendo digitonina (30 µM), gluconato de potássio (140 mM), EGTA (1 mM) MgCl₂ (1 mM), glicose (6 mM) e K-PIPES (20 mM).
3. Após incubação (temperatura ambiente) por 10 min com o produto a ser permeabilizado, o mini-tubo é centrifugado (8400 rpm por 5 min à 4°C) e o
15 sobrenadante é descartado.
4. O PRP é re-suspendido em volume equivalente de tampão Tris-citrato pH 6,5 à 4°C.
5. Manter a suspensão celular por 15 min em temperatura ambiente.

B. Uso de electroporação

Exemplo de método para introdução de siRNA:

1. O mini-tubo contendo o PRP é centrifugado (8400 rpm por 5 min à 4°C) e o sobrenadante é descartado.
2. O *pellet* resultante é re-suspendido em volume equivalente de tampão hiposmótico de electroporação.
- 25 3. A densidade de células é ajustada para 6×10^6 células.mL⁻¹.

4. Adicionar em uma cubeta de electroporação de 4 mm, 20 μL do siRNA duplex e 300 μL do tampão hiposmótico de electroporação (incubar em gelo).
5. Adicionar na cubeta, 500 μL da suspensão celular (3×10^6 células. mL^{-1} , sem bolhas de ar).
6. Incubar por 10 min em gelo.
7. Realizar a electroporação (utilizando, por exemplo, Multiporator Eppendorf). Selecionar modo eucariota, voltagem 1200 V, constante de tempo 40 μs e número de pulsos 1.
- 10 8. Após o pulso deixar a suspensão celular na cubeta por 10 min a temperatura ambiente.

Exemplo de método para introdução de plasmídeo:

1. O mini-tubo contendo o PRP é centrifugado (8400 rpm por 5 min à 4°C) e o sobrenadante é descartado.
- 15 2. O *pellet* resultante é re-suspendido em volume equivalente de tampão hiposmótico de electroporação.
3. A densidade de células é ajustada para 1×10^6 células. mL^{-1} .
4. Adicionar 5-20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ do DNA plasmídeo.
5. Transferir 400 μL da suspensão para uma cubeta de electroporação de 2
20 mm (sem bolhas de ar).
6. Realizar a electroporação (utilizando, por exemplo, Multiporator Eppendorf). Selecionar modo eucariota, voltagem 400 V, constante de tempo 100 μs e número de pulsos 1.
7. Após o pulso deixar a suspensão celular na cubeta por 5-10 min a
25 temperatura ambiente.

Exemplo de método para introdução de fármaco hidrofílico:

1. O mini-tubo contendo o PRP é centrifugado (8400 rpm por 5 min à 4°C) e o sobrenadante é descartado.
2. O *pellet* resultante é re-suspendido em volume equivalente de tampão hiposmótico de electroporação.
- 5 3. Ajustar a densidade de células para 6×10^6 células.mL⁻¹.
4. Adicionar em uma cubeta de electroporação de 4 mm 20 µL do fármaco a ser permeabilizado e 300 µL do tampão hiposmótico de electroporação (incubar em gelo).
5. Adicionar na cubeta, 500 µL da suspensão celular (3×10^6 células.mL⁻¹, sem
10 bolhas de ar).
6. Incubar por 10 min em gelo.
7. Realizar a electroporação (utilizando, por exemplo, Multiporator Eppendorf). Selecionar modo eucariota, voltagem 1200 V, constante de tempo 40 µs e número de pulsos 1.
- 15 8. Após o pulso deixar a suspensão celular na cubeta por 10 min a temperatura ambiente.

C. Uso de toxinas bacterianas como agentes permeabilizadores

A proteína formadora de poro α -toxina é uma proteína monomérica solúvel em água que forma um poro transmembrana heptamérico tipo β -barril quando inserida na membrana plasmática. A permeabilização de plaquetas com esta toxina produz poros entre 0,6 e 1 nm que permite o fluxo de íons e nucleotídeos, mas não de proteínas grandes. Permite a formação de poros estáveis e reproduzíveis sem perda de proteínas intracelulares. A proteína monomérica *streptolysin-O* (SL-O) é solúvel em água e forma poros após a
20 inserção em membranas. O número de monômeros que contribuem para formar o poro é variável e é dependente, em parte, da concentração de SL-O utilizada. A utilização desta toxina permite a obtenção de poros estáveis e com diâmetro variável. A proteína SL-O contém um resíduo cisteína que pode ser
25

espontaneamente oxidado com oxigênio atmosférico, resultando na perda da atividade de permeabilização. A proteína recupera a atividade após redução e por isso, a permeabilização deve ser realizada na presença de um agente redutor. A permeabilização de plaquetas com SL-O permite a introdução de íons, nucleotídeos, peptídeos, proteínas recombinantes, purificadas e anticorpos. Entretanto, existe a perda de algumas proteínas citosólicas da plaqueta durante a permeabilização. As proteínas α -toxina e SL-O ficam restritas a membrana da plaqueta e membranas conectadas (membrana plasmática e o sistema canalicular aberto) e não permeabilizam membranas intracelulares (Bhakdi et al., 1996. Arch Microbiol 165:73–79).

Exemplo de permeabilização com uso de proteínas bacterianas:

1. Após obtenção do PRP (exemplo 1) 18 μ L da suspensão de plaquetas são adicionados em um mini-tubo, seguido da adição de 1 μ L de 100 mM de MgATP (concentração final de 5 mM). A adição do material a ser permeabilizado (por exemplo, anticorpos, peptídeos ou proteínas recombinantes) deve ser realizada antes da adição da toxina bacteriana.
 - 1.1. Na permeabilização com α -toxina é adicionado na suspensão de plaquetas 1 μ L de 2500 U.mL⁻¹ de α -toxina (concentração final de 125 U.mL⁻¹).
 - 1.2. Na permeabilização com SL-O é adicionado na suspensão de plaquetas 1 μ L de 10.000 U.mL⁻¹ de SL-O (concentração final de 500 U.mL⁻¹). O processo requer a presença do agente redutor ditioneitol (DTT) na concentração de 5 mM.
2. O pH é ajustado para 6,9 usando 100 mM de NaOH (~ 0,8 μ L).
3. Manter a suspensão celular por 15 min em temperatura ambiente.

D. Uso de ultrassom

A energia do ultrassom pode aumentar a permeabilização de drogas, genes e outros agentes terapêuticos sem comprometer a viabilidade das

células (Crowder et al., 2005. *Ultrasound in Med. & Biol.* 31(12): 1693–1700).

Exemplo de permeabilização com ultrassom:

1. O PRP é obtido (exemplo 1) e mantido em tampão Tris-citrato pH 6,5 à 4°C.

5 2. Adição do produto a ser permeabilizado.

3. Aplicação de ultrassom (exemplo: Acuson Sequoia, Siemens): ângulo do transdutor de 30°, força 1,9; frequência de 2 MHz; zona focal de 60 mm e tempo de exposição de 5 min.

4. A suspensão celular deve permanecer por 15 min a temperatura ambiente.

10 **Observação:** Após a realização do protocolo de permeabilização deverá ser realizado procedimento para remoção do material não incorporado.

1. O mini-tubo é centrifugado (8400 rpm por 5 min à 4°C) e o sobrenadante é descartado.

15 2. O *pellet* resultante é re-suspendido em volume equivalente de tampão Tris-citrato pH 6,5 à 4°C.

Após o procedimento de lavagem das células, a eficiência da incorporação (quantificação do produto incorporado) poderá ser determinada em uma alíquota do PRP, através de diferentes métodos, dependendo do produto permeabilizado.

Reivindicações

1. MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS, **caracterizado** por compreender a obtenção de plaquetas a partir de fontes homólogas ou autólogas utilizando pequenas quantidades de sangue.
2. MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS, de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pela obtenção das plaquetas ou estruturas membranosas compreender:
- A) obtenção das plaquetas;
 - B) vesiculação do material em plaquetas (íntegras ou em estruturas mebranosas).
3. MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS, de acordo com a reivindicação 2 subitem A **caracterizado** pelas seguintes sub etapas:
- i. obtenção de um determinado volume de sangue em tubos a vácuo (EDTA-K3), segundo protocolo de venopunção padrão; imediatamente após a retirada de cada tubo o conteúdo é homogeneizado com repetidas inversões do mesmo;
 - ii. os tubos são centrifugados para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP);
 - iii. a fração de PRP de cada tubo é coletada e transferida para mini tubos;

- iv. os mini tubos são centrifugados; o sobrenadante dos tubos é descartado;
- v. o PRP é re-suspendido em solução tampão sacarose, adiciona-se mais certa quantidade do mesmo tampão; procedimento idêntico é realizado no outro mini tubo;
- vi. os mini tubos são centrifugados; o sobrenadante dos dois mini tubos é descartado;
- vii. o *pellet* resultante (obtido do PRP) de cada mini tubo é re-suspendido em 1/5 do volume inicial de PRP obtido em tampão sacarose;
- viii. o volume dos mini tubos são reunidos; acrescenta-se certa quantidade de solução tampão Tris-citrato.

4. MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS, de acordo com a reivindicação 2 subitem B **caracterizado** pelas seguintes sub etapas:

- i. O agente bioativo poderá ser introduzido em plaquetas íntegras ou em estruturas membranosas obtidas de plaquetas (reduzidas e estabilizadas previamente antes da introdução do agente).
- ii. Nesta invenção, a técnica para introdução do material a ser veiculado deverá ser escolhida de acordo com a natureza e as características do produto a ser permeabilizado, a saber: uso de detergentes (saponina ou digitonina), electroporação, toxinas bacterianas formadoras de poros, ultrassom, entre outras.

5. MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS, de acordo com as reivindicações 1 – 4 **caracterizado** por ser para transportar e potencializar a biodisponibilidade de diversos agentes

bioativos tais como, fármacos, reguladores gênicos ou nanodispositivos; proteção e estabilização de diferentes fármacos tais como, antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos; introdução de ferramentas de silenciamento gênico ou material genético modificado a saber, vacinas específicas, anti virais, anti câncer; dispersão controlada, via endovenosa de nanoestruturas; direcionamento das estruturas mebranosas para determinadas áreas do corpo seja pela introdução de elementos magnéticos/paramagnéticos nas respectivas estruturas; controlar a liberação localizada dos agentes transportadores, inclusão de traçadores.

FIGURA

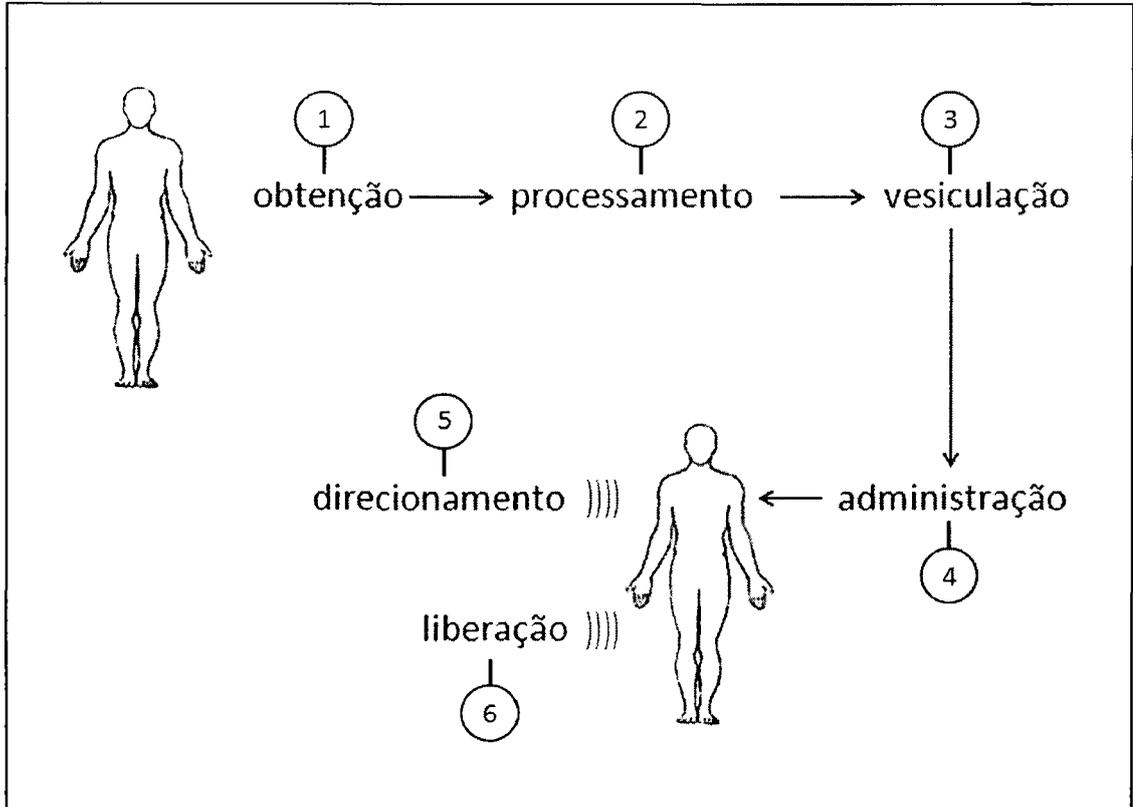


Figura 1

Resumo

MÉTODO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ENVOLVENDO PLAQUETAS INTEGRAS OU ESTRUTURAS MEMBRANOSAS COMO RECIPIENTES BIOLÓGICOS PARA TRANSPORTAR MATERIAIS BIOATIVOS E PRODUTOS

5 Esta invenção descreve método de obtenção, o uso e produtos
derivados de plaquetas íntegras ou de estruturas membranosas obtidas das
mesmas, para uso no transporte de substâncias ou materiais bioativos, bem
como aumentar a biodisponibilidade destes mesmos materiais. A presente
invenção ainda é capaz de proteger e estabilizar diferentes fármacos, a saber,
10 antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-carcinogênicos, etc. Esta tecnologia pode
ser ainda utilizada para a dispersão controlada, via endovenosa, de estruturas
obtidas por nanotecnologia ou de reguladores da expressão gênica. Em suma,
a presente invenção descreve método e produtos da funcionalização de
plaquetas íntegras ou de estruturas membranosas para transporte e liberação
15 controlada de materiais bioativos via endovenosa.