



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

(21) BR 102013031169-3 A2



(22) Data do Depósito: 04/12/2013

(43) Data da Publicação: 03/11/2015

(RPI 2339)

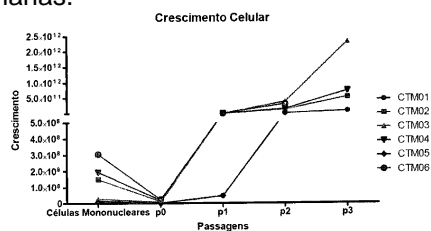
(54) **Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE HEPARINA

(51) **Int. Cl.:** C12N 5/02; C12N 5/078

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS

(72) **Inventor(es):** LUCIA MARIANO DA ROCHA SILLA, DENNIS RUSSOWSKY, JESSICA CARDOSO DA SILVA, MARCELO GONÇALVES MONTES D'OCA

(57) **Resumo:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE HEPARINA. O presente invento envolve a produção de um suplemento para cultura celular, que é produzido através do uso de bolsas de plaquetas humanas oriundas de doadores de banco de sangue. Este método compreende diversas etapas até a obtenção do produto final, sendo que este é utilizado como um suplemento em meio para cultivo celular. O lisado de plaquetas substitui suplementos de origem animal para expansão de células humanas.



PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE
HEPARINA

Campo da Invenção

O presente invento envolve a produção de um suplemento para cultura
5 celular, que é produzido através do uso de bolsas de plaquetas humanas
oriundas de doadores de banco de sangue. Este método compreende diversas
etapas até a obtenção do produto final, sendo que este é utilizado como um
suplemento em meio para cultivo celular. O lisado de plaquetas substitui
suplementos de origem animal para expansão de células humanas. As células
10 cultivadas com o lisado de plaquetas podem ser utilizadas em ensaios clínicos
de terapia celular na área da medicina.

Antecedentes da Invenção

Atualmente, os lisados de plaquetas descritos utilizam uma
15 concentração menor de heparina o que confere ao meio de cultura, uma
consistência gelatinosa, impossibilitando seu uso. Muitos laboratórios que
trabalham com cultura de células humanas ainda acrescentam ao meio de
cultivo um suplemento de origem animal, visto que os lisados de plaquetas
descritos na literatura e em outros documentos de patente não são
20 reprodutíveis.

Este método de produção do lisado de plaquetas difere dos demais pela
maior concentração de heparina que é adicionado ao final do processo. Esse

aumento da concentração faz que ele nunca fique gelatinoso e torna sempre possível a reprodução do protocolo.

O pedido de patente WO2008/034803 A1 com o título "PLASMA-FREE PLATELET LYSATE FOR USE AS A SUPPLEMENT IN CELL CULTURES AND FOR THE PREPARATION OF THERAPEUTICS". Apresenta um invento parecido com o presente invento, mas nele não é mencionado a adição de heparina ao final da produção do lisado de plaquetas. Quando o lisado de plaquetas é feito sem heparina e é adicionado ao meio de cultura deixa esse meio gelatinoso e impossibilita o uso nas culturas celulares. Esse pedido de patente também não menciona a possibilidade de juntar bolsas de diferentes doadores, isso faz com que a produção do suplemento seja muito baixa. No presente invento pode-se juntar bolsas de diferentes doadores, sem alteração no produto final do lisado de plaquetas.

O pedido de patente EP 1 972 685 A1 denominado "Culture medium for gingival fibroblasts" cita o lisado de plaquetas na composição do meio, mas esse pedido é sobre o meio de cultura completo ideal para o cultivo de fibroblastos gengivais e não é um pedido específico de patente do lisado de plaquetas.

O pedido de patente WO 2010/033605 A2 denominada "COMPOSITIONS CONTAINING PLATELET CONTENTS". Apresenta um lisado de plaquetas parecido com o do presente invento. A concentração de heparina no lisado de plaquetas que foi apresentado é de 2UI/mL enquanto o lisado de plaquetas do presente invento utiliza uma concentração de 500

UI/mL. A concentração menor mostrada no invento não foi reprodutível em diversos testes, pois o meio ficou gelatinoso ao misturar ao meio de cultura.

O pedido de número WO2011/076414 A1 intitulado “Expansion medium for CD34-negative stem cells” descreve um meio de cultura ideal para
5 expansão de um tipo de células humanas, nesse meio é utilizado lisado de plaquetas, porém esse lisado de plaquetas também utiliza uma baixa concentração de heparina, que varia de 0 UI/mL a 10 UI/mL, essa concentração é bem inferior a do presente invento e na maioria das vezes torna o meio gelatinoso e impossibilita o seu uso.

10 O invento com número WO2011/053860 A2 denominado “MESENCHYMAL STROMAL CELL POPULATIONS AND METHODS OF USING SAME” relata a produção de células estromais mesenquimais cultivadas em meio suplementado com lisado de plaquetas e os métodos de uso dessas células para o tratamento a doenças neurológicas e renais. A
15 obtenção do lisado de plaquetas é brevemente citado nessa invenção, mas utiliza uma baixa concentração de heparina (5 UI/mL) no lisado de plaquetas e como já foi testado, na maioria das vezes torna o meio gelatinoso e impossibilita o seu uso.

O pedido US 2013/0143810 A1 com título “VIRALLY-INACTIVATED
20 GROWTH FACTORS-CONTAINING PLATELET LYSATE DEPLETED OF PDGF AND VEGF AND PREPARATION METHOD THEREOF”, apresenta um método de inativação viral de um lisado de plaquetas com fatores de crescimentos depletados. A metodologia de preparo utiliza solvente/detergente

e não mostra a utilização de heparina. O lisado de plaquetas do presente invento não utiliza nenhum tipo de solvente/detergente e assim não há a depleção de nenhum fator de crescimento e como já citado anteriormente a concentração de heparina é essencial para a reprodução do lisado de
5 plaquetas.

Sumário da Invenção

A presente invenção apresenta um método para o preparo de lisado plaquetário com maior concentração de heparina utilizando suplemento de origem humana. O lisado com concentração de heparina aumentado faz com
10 que o lisado plaquetário desenvolvido mantenha o meio de cultura líquido e dessa forma possa ser sempre reproduzível.

O lisado de plaquetas proposto se destina ao cultivo de células para serem empregadas em terapia celular.

É um objeto da presente invenção o preparo de lisado plaquetário obtido
15 a partir de plaquetas humanas, com maior concentração de heparina.

É um objeto da presente invenção o preparo de lisado plaquetário para ser utilizado em terapia celular.

Descrição Detalhada da Invenção

Para o preparo do Lisado de Plaquetas utilizam-se bolsas de plaquetas
20 de doadores de sangue. Essas bolsas podem ser advindas de doação de sangue total ou de plaquetaférese

Quando essas bolsas são de doadores de sangue total, após a coleta, as bolsas são centrifugadas e as hemácias separadas do plasma. Este plasma

rico em plaquetas é novamente centrifugado obtendo-se assim o concentrado plaquetário. Nas bolsas obtidas por plaquetaférese, o sangue total do doador é fracionado em plaquetas por máquina de aférese. Estes procedimentos são de rotina bancos de sangue.

5 O procedimento de preparo descrito a seguir deve ser feito em ambiente estéril.

As bolsas devem preferencialmente ser congeladas à -80°C e descongeladas em banho-maria à 37°C . O congelamento pode variar de -20°C a -196°C e o descongelamento pode ser também à temperatura ambiente. De
10 preferência essas bolsas devem ser congeladas e descongeladas cinco vezes, mas pode-se também obter o lisado plaquetário após um, dois, três ou quatro procedimentos de congelamento e descongelamento. Após o último congelamento, o conteúdo da bolsa é colocado em tubos para centrifugação com tampa e são centrifugados de preferência a 3220g, mas essa
15 centrifugação pode variar de 200g a 10.000g. O tempo de centrifugação é de 30 minutos, podendo variar de 5 minutos a 60 minutos. A velocidade de centrifugação e o tempo devem, obrigatoriamente, serem combinados de forma que os restos plaquetários sedimentem.

Após a centrifugação, os sobrenadantes são transferidos para outros
20 tubos e centrifugados novamente. Preferencialmente devem ser realizadas quatro centrifugações dos sobrenadantes, mas pode ser realizada uma centrifugação, desde que os restos plaquetários sedimentem, também pode ser feito mais centrifugações, caso o executor ache necessário.

Após centrifugar, o sobrenadante devem ser filtrados em filtros de 0,22 micrômetros, a fim de esterilizar o Lisado de Plaquetas. Pode ser feita uma pré-filtração em filtros de tamanhos aleatórios, esse procedimento de pré-filtração é apenas para facilitar a filtração em filtro de 0,22 micrometros, visto que esse
 5 filtro satura muito rápido com o Lisado de Plaquetas. Assim, a pré-filtração não é um procedimento obrigatório na produção.

Após a filtração em filtros de 0,22 micrômetros deve-se verificar o volume exato que se adquiriu de Lisado de Plaquetas. Assim é possível calcular quanto de heparina será acrescentado. A heparina deve ficar em uma concentração
 10 final de 500UI/ml no Lisado de Plaquetas, podendo variar de 500 a 2000UI/ml. O Lisado de Plaquetas pode ser utilizado na hora ou congelado de -20° a -80°C até o uso.

Quando descongelado para o uso, o Lisado de Plaquetas deve ser aquecido em banho-maria à 37°C ou em temperatura ambiente.

15 O Lisado de Plaquetas obtido com a metodologia descrita acima permite o estabelecimento de culturas celulares sem turvação do meio de cultura. Em um procedimento em que comparamos o crescimento das culturas de células-tronco mesenquimais de medula óssea com o soro animal ou Lisado de Plaquetas. As culturas que continham o Lisado de Plaquetas como suplemento,
 20 apresentaram uma expansão 3.75 maior que as que continham o soro fetal bovino. (p=0.005). (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre a expansão das células cultivadas com Lisado de Plaquetas e Soro Fetal Bovino em sete dias de cultura

Suplemento	Lisado de	Soro Fetal	p
------------	-----------	------------	---

	plaquetas	Bovino	
Média de expansão (Erro Padrão)	11.88 (4.08)	2.5 (1.06)	0.005*

No mesmo procedimento, quando utilizado em uma concentração de 10% com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) as culturas apresentaram um crescimento exponencial a partir da primeira passagem (p1) (figura 1). Cada passagem teve o período de uma semana, pois nesse período as culturas atingiram a confluência de 80%, e é nessa confluência que deve-se realizar a tripsinização.

O crescimento anterior foi demonstrado suplementando o meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com 10% de Lisado de Plaquetas. O meio de cultura também pode ser suplementado em concentrações menores, como por exemplo, 5% de Lisado de Plaquetas.

O Lisado de Plaquetas foi testado em protocolos de criopreservação de células, também para substituir o soro fetal bovino. Os resultados foram satisfatórios, visto que as células após o descongelamento apresentaram viabilidade de aproximadamente 95%. Para o descongelamento das células também foi utilizado Lisado de Plaquetas no lugar de soro fetal bovino. As concentrações de Lisado de Plaquetas, no congelamento e descongelamento, devem ser as mesmas utilizadas nos protocolos que utilizam soro fetal bovino, apenas deve ser trocado o suplemento.

Em cultura de células que crescem aderidas aos frascos de cultura e que utilizam a enzima tripsina para desaderi-las, utiliza-se o soro fetal bovino

para inativar a tripsina. A substituição do soro fetal bovino pelo Lisado de plaquetas por nós descrito é igualmente eficiente na inativação da tripsina quando utilizado na mesma concentração dos protocolos que utilizam o soro fetal bovino.

- 5 Assim, o Lisado de Plaquetas substitui o soro fetal bovino integralmente quando utilizado em cultura celular e criopreservação de células, aumentando a segurança em terapia celular, pois evita a xenorração. Além da maior segurança, é mais eficaz na produção de células quando comparado com suplemento de origem animal.

10 **Descrição detalhada da figura**

FIGURA 1 - Crescimento celular de acordo com as passagens de cultura

Reivindicações

- 1) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE HEPARINA que após a coleta do material tem as bolsas centrifugadas e as hemácias separadas do plasma, este plasma rico em plaquetas é novamente centrifugado obtendo-se assim o concentrado plaquetário, **caracterizado pelo** processo apresentar as seguintes etapas:
- 5
- a) Sequência de congelamento descongelamento;
 - b) Centrifugação;
 - 10 c) Filtração;
- 2) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE HEPARINA de acordo com a etapa (a) da reivindicação 1, **caracterizado pelas** bolsas serem preferencialmente congeladas à -80°C e descongeladas em banho-maria à 37°C podendo variar de -20°C a -196°C e o descongelamento pode ser também à temperatura ambiente; preferencialmente esse ciclo de congelamento descongelamento deve ser repetido cinco vezes.
- 15
- 3) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE HEPARINA de acordo com a etapa (b) da reivindicação 1, **caracterizado pela** centrifugação ocorrer de preferência a 3220g, mas essa centrifugação pode variar de 200g a 10.000g com tempo centrifugação de 30 minutos, podendo variar de 5 minutos a 60 minutos.
- 20

4) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE HEPARINA de acordo com a etapa (c) da reivindicação 1, **caracterizado pela** filtração ocorrer em filtros de 0,22 micrômetros, a fim de esterilizar o Lisado de Plaquetas.

5) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE HEPARINA de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** opcionalmente ser feita uma pré-filtração em filtros de tamanhos aleatórios.

6) PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE HEPARINA de acordo com as reivindicações 1-5, **caracterizado pelo** Lisado de Plaquetas poder ser utilizado na hora ou congelado de -20° a -80°C até o uso e quando descongelado para o uso, o Lisado de Plaquetas poder ser aquecido em banho-maria à 37°C ou em temperatura ambiente.

Figura

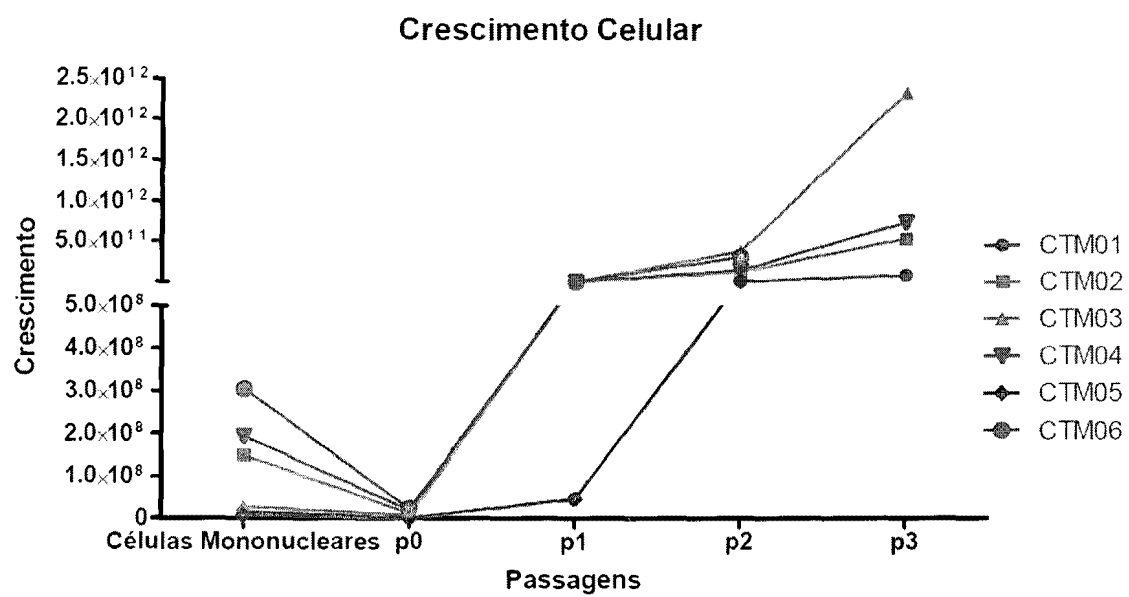


FIGURA 1

Resumo**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS COM MAIOR CONCENTRAÇÃO DE
HEPARINA**

O presente invento envolve a produção de um suplemento para cultura
5 celular, que é produzido através do uso de bolsas de plaquetas humanas
oriundas de doadores de banco de sangue. Este método compreende diversas
etapas até a obtenção do produto final, sendo que este é utilizado como um
suplemento em meio para cultivo celular. O lisado de plaquetas substitui
suplementos de origem animal para expansão de células humanas.