



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

(11) PI 0821540-5 B1



(22) Data do Depósito: 17/12/2008

(45) Data de Concessão: 24/07/2018

(54) Título: USO DE TECIDO RENAL ENCAPSULADO EM UMA ESFERA DE POLÍMERO, IMPLANTE TERAPÊUTICO E MÉTODO PARA PRODUZIR O MESMO

(51) Int.Cl.: A61L 27/22; A61L 27/36

(30) Prioridade Unionista: 20/12/2007 US 61/015,328

(73) Titular(es): ETHICON, INC

(72) Inventor(es): CHARITO S. BUENSUCESO; DAVID C. COLTER; BRIAN C. KRAMER;
AGNIESZKA SEYDA

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/06/2010

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE TECIDO RENAL ENCAPSULADO EM UMA ESFERA DE POLÍMERO, IMPLANTE TERAPÊUTICO E MÉTODO PARA PRODUZIR O MESMO**".

Referência Cruzada a Pedidos de Patente Relacionados

[001] Este pedido de patente reivindica benefício do Pedido de Patente Provisório Norte-Americano No. 61/015.328, depositado em 30 de dezembro de 2007, cujos conteúdos estão aqui incorporados por referência em sua totalidade.

Campo da Invenção

[002] A presente invenção refere-se ao encapsulamento de tecido em polímero.

Antecedentes da Invenção

[003] O rim desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase fisiológica. Entre suas funções homeostáticas estão o equilíbrio ácido-base, regulação das concentrações de eletrólitos, pressão sanguínea e regulação do volume sanguíneo. Os rins realizam essas funções independentemente, assim como através de coordenação com outros sistemas de órgãos através das ações de hormônios e proteínas secretados na corrente sanguínea. Essas proteínas secretadas incluem eritropoietina (Epo), urodilatina, renina e vitamina D, assim como proteínas menos enfatizadas tais como adiponectina e leptina.

[004] Adiponectina (também conhecida como AdipoQ, Acrp30, apM1 e GBP28) é uma citocina derivada do adipócito que mostrou ter propriedades anti-inflamatórias. Em adição, ela funciona para regular níveis sanguíneos de glicose através de comunicação cruzada com o fígado. Concentrações sanguíneas normais de adiponectina são 5 - 30 µg/ml em seres humanos. Estudos anteriores mostraram que os níveis de circulação de adiponectina são elevados durante restrição calórica

crônica tanto em seres humanos quanto em camundongos. Ao contrário, baixos níveis de adiponectina no plasma humano se correlacionam com alta insulina, glicose e triglicerídeos, assim como obesidade aumentada. Foi mostrado que a superexpressão de adiponectina humana em camundongos transgênicos resultou em supressão do acúmulo de gordura e prevenção de morte prematura por uma dieta de alta caloria. Além disso, um local de suscetibilidade à diabetes foi mapeado para o cromossomo 3q27, a localização do gene da adiponectina humana. Aumentar os níveis sanguíneos de adiponectina poderia ter valor terapêutico no tratamento da diabetes e comorbidades relacionadas.

[005] Leptina é um hormônio de proteína com 16 quilodáltons que desempenha um papel fundamental na regulação da ingestão energética e gasto energético, diminuindo o apetite e aumentando o metabolismo. Recentemente, a leptina mostrou desempenhar um papel na proteção dos rins contra o dano renal em um modelo camundongo de nefropatia diabética. Em adição, a leptina promove angiogênese através da regulação para cima do fator de crescimento endotelial vascular.

[006] Por mais de trinta anos, a eritropoietina (Epo), uma proteína com 30,4 kDa sintetizada e secretada principalmente pelos rins, foi usada com sucesso para estimular a eritropoiese em pacientes que sofrem de anemia. Recentemente, tornou-se aparente que os efeitos benéficos da EPO vão além do estímulo da produção de células vermelhas do sangue. (Brines *et al.*, *Kidney Int.*, 2006; 70(2):246-250). Estudos anteriores por Chong *et al.* estabeleceram que Epo protege o endotélio vascular contra dano isquêmico. Chong *et al.*, *Circulation*, 2002; 106 (23):2973-9. outros confirmaram essas descobertas, demonstrando que a Epo tem um efeito protetor sobre células endoteliais em diversos modelos animais de doença vascular

(Santhanam *et al.*, *Stroke*, 2005; 36 (12):2731-7; Satoh *et al.*, *Circulation*, 2006; 113(11): 1442-50; Urao *et al.*, *Circulation Research*, 2006; 98(11):1405-13). Na falha renal crônica, pacientes desenvolvem anemia devido à produção inadequada de Epo pelos rins. Epo recombinante, administrada como uma terapia de reposição, restaura o hematócrito e as concentrações de hemoglobina no sangue, eliminando a necessidade de transfusões sanguíneas. Esse tratamento, entretanto, implica em injeções regulares de Epo, duas a quatro vezes por semana, dadas ou por via intravenosa ou subcutânea. A administração de EPO é complicada, resultando na não conformidade do paciente e, flutuações cíclicas frequentes nos valores do hematócrito e Epo no sangue.

[007] À luz de efeitos protetores da Epo sobre o sistema cardiovascular, assim como os desafios atuais associados ao tratamento com Epo recombinante, a implantação de um dispositivo de Epo-eluição pode ser uma alternativa eficaz para a modalidade de tratamento atual. Tal dispositivo implantável também pode melhor controlar os valores do hematócrito e potencialmente até proteger a microvasculatura dos órgãos de lesão.

[008] Recentes estudos focados no desenvolvimento de sistemas de distribuição alternativos de Epo estão em andamento. Os investigadores demonstraram a viabilidade de encapsular Epo recombinante em diferentes tipos de polímeros bioabsorvíveis (Veja, por exemplo, Yeh *et al.*, *J. Microencapsulation*, 2007; 24(1):82-93; Pistel *et al.*, *J. of Controlled Release*, 1999; 59(3):309-325; Bittner *et al.*, *European Journal of Pharmaceutics an Biopharmaceutics*, 1998; 45:295-305; Morlock *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 1998; 56:105-115). Apesar do encapsulamento de peptídeos e pequenas moléculas em envelopes biodegradáveis poder ser alcançado através de várias técnicas, o encapsulamento de proteínas tem desafios associados. Por exemplo, tem sido difícil obter perfis de liberação contínua de Epo com

o estouro inicial mínimo, bem como o carregamento de proteína suficiente nas microesferas. O desenvolvimento de um dispositivo implantável carregado com EPO recombinante pode exigir recarregamento frequente de fármacos ou substituição do dispositivo para garantir a administração em longo prazo de doenças resistentes.

[009] Outros investigadores colocaram menos ênfase na Epo recombinante e estão buscando uma abordagem de engenharia genética e terapia celular. Naffakah *et al.* examinaram se a secreção de Epo a partir de células geneticamente modificadas poderia representar uma alternativa às repetidas injeções para tratar anemia crônica. Naffakah *et al.*, *Human Gene Therapy*, 1996; 7(1):11-21. Nesse estudo, fibroblastos da pele do rato primário foram transduzidos com um vetor retroviral no qual o DNA da Epo de murino foi expresso sob o controle do promotor da fosfoglicerato quinase de murino. Estes "Neo-órgãos" contendo os fibroblastos geneticamente modificados incorporados em géis de colágeno foram implantados na cavidade peritoneal de camundongos, resultando em um aumento do hematócrito e da concentração sérica de Epo após um período de observação de 10 meses. O implante de fibroblastos Epo-secretores representa um método potencial para a permanente liberação da Epo *in vivo*.

[0010] De modo similar, Orive *et al.* investigaram a funcionalidade em longo prazo de uma abordagem de terapia genética *ex vivo*. Orive G *et al.*, *Molecular Therapy*, 2005; 12(2):283-9. Microcápsulas de polímero carregadas com mioblastos Epo-secretores foram implantadas no peritônio e tecido subcutâneo de camundongos singênicos e alógénicos. Níveis altos e constantes do hematócrito foram mantidos por mais de 100 dias em todos os camundongos implantados. De maneira interessante, a funcionalidade das cápsulas implantadas nos camundongos alógénicos persistiu até o dia 210 após o implante. Esses resultados demonstram a viabilidade da tecnologia de encapsulamento

de células para a liberação em longo prazo de Epo em um modelo alogênico.

[0011] Em adição, muitas empresas também estão desenvolvendo a tecnologia de encapsulamento de células. StemCells (CytoTherapeutics) está desenvolvendo cápsulas celulares que podem ser cirurgicamente implantadas e liberar substâncias que cruzam a barreira sangue-cérebro para aplicações neurológicas. Novocell Inc. (San Diego, CA) está desenvolvendo células de ilhotas encapsuladas para diabetes insulino-dependente. Islet Technology, Inc. (St. Paul, Minnesota) também está desenvolvendo tecnologia de microencapsulamento de ilhotas e demonstrou a persistência em longo prazo de seus implantes em um cão diabético por mais de três anos. Amcyte Inc. (Santa Monica, CA) está desenvolvendo células de ilhotas para formar um pâncreas artificial usando cápsula de alginato ou polietileno glicol foto-reticulável. Finalmente, MicroIslet Inc. (San Diego, CA) está desenvolvendo uma suspensão de ilhotas porcinas microencapsuladas para injeção na cavidade abdominal usando um alginato altamente biocompatível.

[0012] De fato, existem diversos esforços na tentativa de explorar o encapsulamento de células e proteínas como um meio para liberar agentes terapêuticos. No total, o estado da técnica tem gerado muitos dados atrativos e úteis, e esses esforços têm demonstrado a utilidade do encapsulamento como um método para a liberação controlada em longo prazo de Epo *in vivo*. No entanto, existem consideráveis questões de segurança que devem ser resolvidas antes que o encapsulamento de células geneticamente modificadas possa ser utilizado para fins terapêuticos.

[0013] Há ainda a necessidade de dispositivos implantáveis que superem os problemas tradicionais associados à implantação terapêutica.

Sumário da Invenção

[0014] São proporcionados implantes terapêuticos compreendendo tecido renal encapsulado em uma esfera de polímero. Também são descritos métodos para tratar um estado de doença em um indivíduo que compreende implantar no dito indivíduo um implante terapêutico compreendendo tecido renal encapsulado em uma esfera de polímero.

[0015] Também são proporcionados métodos para fazer um implante terapêutico compreendendo: proporcionar tecido renal; misturar o tecido renal com uma solução compreendendo um polímero, assim formando uma suspensão de tecido-polímero; extrudar a suspensão de tecido-polímero em uma solução formadora de esferas, assim formando um implante terapêutico compreendendo esferas do dito polímero nas quais o tecido renal está encapsulado.

Breve Descrição dos Desenhos

[0016] A figura 1 ilustra os resultados de uma avaliação da viabilidade tecidual relativa do rim de rato picado encapsulado e não encapsulado.

[0017] A figura 2 ilustra a quantidade de Epo liberada no meio de cultura, conforme determinado no dia 4 após o encapsulamento por ELISA; os dados estão incluídos para esferas desprovidas de tecido (esferas apenas), tecido renal de rato picado, não encapsulado (tecido apenas), e tecido renal de rato picado, encapsulado, (esferas com tecido).

[0018] A figura 3 ilustra os dados de um estudo em que a quantidade média de diversas proteínas secretadas no meio foi medida após quatro dias de cultura.

Descrição Detalhada de Modalidades Ilustrativas

[0019] Apesar do interesse crescente no encapsulamento de células como um método para liberar agentes terapêuticos, quase nenhuma atenção tem sido dada ao encapsulamento de fragmentos de

tecido integral. Descobriu-se recentemente que o encapsulamento de tecido renal picado proporciona uma oportunidade para liberar Epo natural e outros agentes benéficos a partir de células endógenas, embora proporcionando uma barreira imunológica para prevenir a rejeição de tecido. Conforme descoberto aqui, o transplante de um dispositivo implantável secretando agente benéfico composto de tecido de rim pode aliviar drasticamente as atuais questões financeiras, de segurança e médicas em torno dos agentes que estimulam a eritropoiese. A tecnologia de encapsulamento do tecido renal também pode possibilitar o desenvolvimento de outras tecnologias terapêuticas para o tratamento de diversos estados de doenças.

[0020] São proporcionados implantes terapêuticos compreendendo tecido renal encapsulado em uma esfera de polímero. Os presentes implantes são adequados para introdução *in vivo* e para proporcionar efeitos terapêuticos após implante. O tecido renal para uso nos implantes em questão pode ser tecido autólogo, tecido alogênico, tecido xenogênico, ou qualquer combinação dos mesmos. O tecido renal pode ser transformado em tamanho para uso nos implantes em questão, por exemplo, picando uma fonte de tecido renal em fragmentos. Esses fragmentos podem ter um tamanho de menos do que cerca de 1 mm, ou eles podem ser maiores. O tamanho dos fragmentos é de preferência medido em termos da maior dimensão do mesmo, por exemplo, longitudinalmente se os fragmentos têm uma razão de aspecto superior a 1:1, através do comprimento de um lado, se os fragmentos são aproximadamente cúbicos, ou pelo diâmetro se os fragmentos são aproximadamente esféricos, etc. Além de picar, os fragmentos podem ser transformados em tamanho para reduzir as dimensões do tecido. Por exemplo, os fragmentos podem ser adicionalmente picados de modo que o tamanho de todos os fragmentos seja de menos do que cerca de 300 μm , menos do que cerca de 150 μm , menos do que cerca

de 100 µm ou menos do que cerca de 50 mm. A quantidade total de tecido renal em um implante da presente invenção pode ser de pelo menos cerca de 100 mg, pelo menos cerca de 50 mg, pelo menos cerca de 30 mg, ou pelo menos cerca de 10 mg. Vários fatores, tais como a área superficial total desejada do tecido renal, o tipo de terapia, o tipo de tecido renal, as características do indivíduo submetido à terapia, o tipo e estágio do estado de doença contra a qual a terapia é desejada, a quantidade e o tipo de materiais secretados pelo tecido, e outros fatores que serão apreciados por aqueles versados na técnica, podem ser usados para determinar a quantidade de tecido renal no implante, o tamanho dos fragmentos de tecido individuais, ou ambos.

[0021] A esfera de polímero preferivelmente compreende um polímero biocompatível, tal como um biopolímero sinteticamente derivado ou de ocorrência natural. A esfera de polímero pode compreender tais polímeros como alginato, ácido hialurônico, carboximetilcelulose, polietileno glicol, dextrano, agarose, poli-L-lisina, carragenina, pectina, goma tragacanto, goma xantano, goma guar, goma arábica, colágeno tipo I, laminina, fibronectina, fibrina ou qualquer combinação dos mesmos. Uma combinação preferida de polímeros compreende alginato e poli-L-lisina. Tais polímeros estão prontamente comercialmente disponíveis.

[0022] O termo "esfera" quando usado em referência ao polímero se destina a transmitir que a composição de polímero geralmente assume uma forma aproximadamente esférica, mas também pode ser oval ou retangular. A forma precisa da esfera de polímero não é essencial para a presente invenção; qualquer forma que permita que o tecido renal seja substancialmente envelopado no polímero é aceitável. Quando medido de acordo com sua dimensão maior, uma esfera de polímero pode ter um diâmetro de cerca de 0,5 mm a cerca de 10 mm, e tem preferivelmente cerca de 3 mm a cerca de 6 mm. O tamanho da

esfera de polímero pode ser medido de acordo com as características da esfera antes do implante ou após o implante. Visto que esferas de polímero podem brotar espontaneamente, o tamanho da esfera de polímero pode ser medido com relação a uma esfera não brotada ou com relação a uma esfera que resulta da brotação.

[0023] As características da esfera de polímero permitem que os implantes em questão secretem agentes benéficos da esfera para o meio ambiente em que a esfera está implantada ou de outra forma contida. Em outras palavras, a esfera de polímero é permeável a substâncias que são secretadas pelo tecido renal que está encapsulado na esfera. O tecido renal pode ser endógeno, tecido de ocorrência natural ou pode incluir células que contêm alterações genéticas, tais como inserções de genes ou porções de genes que não estão naturalmente presentes. O tecido renal que inclui alterações ou inserções genéticas pode ser fisicamente capaz de secretar substâncias que o tecido endógeno ou de ocorrência natural não pode. O tecido renal e, portanto, por sua vez, o implante da presente invenção pode secretar qualquer composto que o tecido renal, seja endógeno ou modificado (por exemplo, geneticamente modificado), é fisicamente capaz de produzir. Por exemplo, o tecido renal pode secretar um ou mais hormônios, pró-hormônios, proteínas, fatores de crescimento, fatores trópicos ou qualquer combinação dos mesmos. Como exemplos adicionais, e como outros descritos aqui, o tecido pode secretar um ou mais dentre eritropoietina, MCP-1, adiponectina, leptina e MMP-2. Os compostos que o tecido renal geneticamente modificado pode secretar teoricamente são praticamente ilimitados.

[0024] Também proporcionados são métodos para tratar um estado de doença em um indivíduo que compreende implantar no indivíduo um implante terapêutico compreendendo tecido renal encapsulado em uma esfera de polímero. Visto que os implantes em questão são capazes de

secretar um número de agentes benéficos, os métodos inventivos podem ser usados para tratar uma ampla variedade de estados de doenças. Como usado aqui, "tratamento" pode se referir a terapia profilática ou alívio de qualquer fenótipo patológico. O estado de doença para o qual o tratamento é proporcionado pela presente invenção pode ser anemia, derrame, doença cardiovascular ou qualquer doença renal, ou seja, qualquer patologia que está diretamente ou indiretamente associada com o funcionamento inadequado dos rins, por exemplo, que resulta em função inadequada dos rins, ou que seja causada pelo menos em parte pela função inadequada dos rins. Doença renal pode hereditária, congênita ou adquirida. Exemplos não limitantes de doença renal incluem doença do rim policístico, síndrome de Alport, nefrite hereditária, hiperoxaluria primária, cistinúria, nefrite, síndrome nefrítica, hipertensão, diabetes, doença aguda dos rins, doença crônica dos rins (proteinúria persistente), acidose tubular renal, doenças glomerulares e síndrome de Goodpasture. Os benefícios do tratamento com Epo, por exemplo, foi amplamente documentado com relação a um número de patologias, e podem ser prontamente apreciados por aqueles versados na técnica. As características das esferas de polímero e tecido renal para uso nos presentes métodos podem ser conforme anteriormente descrito com relação aos implantes terapêuticos inventivos.

[0025] A presente invenção também está direcionada a métodos para fazer um implante terapêutico. Os métodos para fazer um implante terapêutico com sucesso resultam na fabricação de composições terapêuticas que podem ser usadas de acordo com a presente descrição. Os presentes métodos compreendem proporcionar tecido renal; misturar o tecido renal com uma solução compreendendo um polímero, assim formando uma suspensão de tecido-polímero; extrudar a suspensão de tecido-polímero em uma solução formadora de esferas, assim formando um implante terapêutico que compreende esferas do

polímero nas quais o tecido renal está encapsulado.

[0026] O tecido renal pode ser preparado de acordo com as técnicas anteriormente descritas, incluindo selecionar um tipo de tecido e transformação de tamanho. A solução de polímero com a qual o tecido renal é misturado de acordo com a presente invenção pode compreender uma combinação de um polímero e um meio de crescimento. As características do polímero podem ser determinadas conforme descrito acima. Qualquer meio de cultura aceitável, caldo de nutriente ou similar pode ser usado para o meio de crescimento em questão; as características de um meio de crescimento apropriado, que pode compreender uma mistura de meios, são prontamente determinadas por aqueles versados na técnica. Meios de crescimento podem variar em pH, concentração de glicose, fatores de crescimento, e a presença de outros componentes nutrientes, porém o meio de crescimento deve preencher pelo menos algumas das exigências nutricionais do tecido renal, e preferivelmente preencher a maior parte ou todas as exigências nutricionais, e deve possuir pH e outras características químicas necessárias para sustentar e nutrir o tecido renal. Um exemplo de um meio de crescimento adequado é DULBECCO'S MODIFIED EAGLES MEDIUM (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA). Meios de crescimento estão comercialmente disponíveis e meios adequados são prontamente reconhecidos por aqueles versados na técnica. Para prevenir infecções, antibióticos, tais como penicilina, estreptomicina e similares, podem ser adicionados ao meio de crescimento. Soro, tal como soro bovino fetal, também pode ser adicionado o meio de crescimento.

[0027] A mistura do tecido renal e da solução de polímero pode ser alcançada através de qualquer meio que seja adequado para formar uma suspensão, ou seja, uma mistura em que o tecido renal está substancialmente suspenso de maneira uniforme na solução de

polímero, tal como agitação, movimento ou derramamento. Por exemplo, a mistura pode ser alcançada carregando o tecido renal e a solução de polímero em um primeiro recipiente, tal como uma seringa, transferindo a solução para outro recipiente, tal como expelindo os conteúdos de uma seringa em uma segunda seringa, transferindo a solução de volta ao primeiro recipiente, e então repetindo esse ciclo conforme necessário até que uma suspensão é alcançada.

[0028] Depois que uma suspensão é formada, a suspensão é extrudada em solução formadora de esferas a fim de formar esferas de polímero nas quais o tecido renal está encapsulado. A extrusão pode compreender ejetar a suspensão a partir de uma seringa, ou de outra forma transferir a suspensão a partir de um recipiente para outro em que a solução formadora de esferas está contida, ou de modo alternativo, transferir a solução formadora de esferas para um recipiente em que a suspensão está mantida. A solução formadora de esferas pode ser iônica, pode ser uma solução de reticulação ou ambas. Em uma modalidade, a solução formadora de esferas compreende CaCl_2 . As esferas de polímero com tecido renal encapsulado podem se formar espontaneamente quando combinadas com a solução formadora de esferas. O processo de formação de esferas pode ser adicionalmente assistido, por exemplo, por agitação da mistura da suspensão e da solução formadora de esferas, modificando a temperatura da mistura (por exemplo, elevando a temperatura), ou ambos.

[0029] Após a formação das esferas de polímero, reticulação química das esferas pode ser alcançada colocando as esferas em uma solução de reticulação. Para reticulação, as esferas podem ser transferidas para uma solução diluída de polímero, preferivelmente um polímero diferente do principal componente polimérico das esferas. Por exemplo, se o principal componente das esferas de polímero compreende alginato, uma solução de diluição de poli-L-lisina pode ser

usada para reticular as esferas de alginato. Opcionalmente, uma camada de polímero adicional pode ser adicionada às esferas de polímero após sua "produção" na solução formadora de esferas, ou após a reticulação. De preferência, a camada de polímero adicional compreende o mesmo polímero que constitui o maior componente das esferas de polímero. Por exemplo, uma camada de alginato adicional pode ser adicionada a uma esfera da qual o principal componente é alginato. A adição de outra camada de polímero às esferas de polímero pode ser realizada colocando as esferas em uma solução de polímero diluída compreendendo o polímero do qual a camada extra pode ser feita.

Exemplo 1 - Formação de Implantes Terapêuticos

[0030] Quatro rins de ratos fêmeas Long Evans (oito semanas de idade) foram cirurgicamente removidos, enxaguados em solução salina tamponada de fosfato gelada com Ca^{2+} e Mg^{2+} (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) e então, usando um bisturi, foram picados em pequenos pedaços (1 - 5 mm^3). Uma peneira de aço de 300 μM (Sigma, St. Louis, MO) foi então usada para adicionalmente picar os fragmentos de tecido. O tecido picado foi então lavado três vezes com 30 - 50 mL de Meio de Crescimento contendo Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Invitrogen) contendo penicilina / estreptomicina a 1% (Invitrogen) e soro bovino fetal a 1% (FBS) (Hyclone, Logan, UT). A lavagem final foi completamente removida e os fragmentos de tecido foram carregados para uma seringa de 1-mililitro de um sistema de mistura com duas seringas. Uma solução de alginato a 1,8% (p/v) (Sigma) foi preparada em Meio de Crescimento e foi carregada à segunda seringa de 1 mililitro. As duas soluções foram então misturadas empurrando os conteúdos para trás e para frente através de ambas seringas. A suspensão de tecido picado-gel foi então extrudada em uma solução de CaCl_2 a 100 mM. As esferas de tecido encapsuladas resultantes foram

então incubadas à temperatura ambiente em CaCl_2 com lenta agitação por 5 minutos. As esferas foram então quimicamente reticuladas transferindo poli-L-lisina a 0,05% (p/v), peso molecular 24.000 (Sigma) contendo FBS a 1% por 5 minutos e então revestidas com outra camada de solução de alginato a 0,1% (p/v) contendo FBS a 1% por 5 minutos. Quatro a dez esferas foram então transferidas para poços individuais de um prato de cultura de tecido de baixo cluster com 24 poços contendo 0,5 mL de Meio de Crescimento, ou Meio de Crescimento contendo 100 ng/mL de ácido poli-D-glutâmico (pDGA) (Sigma), e cultivadas a 37°C por quatro dias sob condições atmosféricas normóxicas ou hipóxicas (Oxigênio a 5%). As esferas foram visualmente examinadas e fotografadas usando uma câmera digital e microscópico Eclipse TE2000-U (Nikon, Japão).

[0031] Exame visual de esferas de tecido encapsulado com alginato mostrou que a extrusão manual através do sistema de seringa de dois modos foi eficaz na geração de esferas contendo tecido esférico. Fragmentos de tecido nas esferas de alginato também foram visíveis, demonstrando uma distribuição uniforme por todo gel de alginato.

Exemplo 2 - Medições do Diâmetro das Esferas

[0032] Quatorze esferas individuais contendo tecido foram colocadas em uma chapa de cultura de tecido limpa e fotografadas usando um microscópio de dissecação Nikon equipado com uma câmera digital. O diâmetro de cada esfera foi então medido utilizando software IMAGE PRO PLUS.

[0033] Exame visual de esferas de tecido encapsulado com alginato mostrou que a extrusão manual através do sistema de seringa de dois modos foi eficaz na geração de esferas contendo tecido esférico. Fragmentos de tecido nas esferas de alginato também foram visíveis, demonstrando uma distribuição uniforme por todo gel de alginato. Cento e quinze esferas foram geradas de 3,72 g de tecido de rim fragmentado

em aproximadamente 32 mg de tecido por esfera. A Tabela 1 mostra a distribuição de diâmetro das esferas.

TABELA 1

| Esfera | Diâmetro (mm) |
|--------|---------------|
| 1 | 4,84 |
| 2 | 4,26 |
| 3 | 4,66 |
| 4 | 4,13 |
| 5 | 4,37 |
| 6 | 4,13 |
| 7 | 4,83 |
| 8 | 4,59 |
| 9 | 4,36 |
| 10 | 4,42 |
| 11 | 4,34 |
| 12 | 5,90 |
| 13 | 4,55 |
| 14 | 4,51 |
| Média | 4,56 |
| Padrão | 0,44 |

O diâmetro médio de quatorze esferas individuais foi verificado ser de 4,56 +/- 0,44 mm.

Exemplo 3 - Avaliação da Viabilidade Celular

[0034] A viabilidade do tecido renal picado foi avaliada usando ALAMAR BLUE (Invitrogen), um indicador colorimétrico REDOX que é reduzido em resposta à atividade metabólica. Após quatro dias em cultura, Meio de Crescimento gasto foi removido das amostras de tecido renal não encapsulado, tecido renal encapsulado, tecido renal fixo com isopropanol e Meio de Crescimento apenas. Um mililitro de Meio de

Crescimento, contendo ALAMAR BLUE a 10%, foi adicionado às amostras e adicionalmente incubado por 2 - 4 horas a 37°C, CO₂ a 5% com balanço suave. Os meios gastos foram então analisados por espectrofotometria (SPECTRAMAX-190, Molecular devices, Sunnyvale, CA) a 570nm e 600nm. Os meios de cada amostra foram analisados em triplicata. O percentual de redução por Alamar Blue foi determinado seguindo as instruções do fabricante e é uma medida indireta da viabilidade celular.

[0035] Após quatro dias de cultura, a viabilidade tecidual foi avaliada. Em comparação a tecido não encapsulado, o encapsulamento manteve maior viabilidade tecidual (figura 1). Tecido renal não encapsulado, cultivado sob ou normoxia ou hipoxia, mostrou viabilidades médias relativas similares de 20,9% +/- 3,4% e 21,0% +/- 1,9%, respectivamente. Entretanto, tecido renal encapsulado, cultivado sob condições normóxicas mostrou um aumento na viabilidade tecidual relativa média. Tecido encapsulado mostrou uma viabilidade tecidual relativa média de 83,5% +/- 4,5%. Tecido renal encapsulado, cultivado sob condições hipóxicas, resultou em viabilidade tecidual reduzida de 31,3% +/- 3,4%. Conforme esperado, a fixação do tecido resultou em uma diminuição significante na viabilidade tecidual para 5,0% +/- 0,084%.

Exemplo 4 - Análise da Secreção da Epo

[0036] Após quatro dias de cultura, meios gastos foram coletados e a quantidade de Epo liberada no meio de cultura foi determinada usando um conjunto Quantikine Mouse/Rat Erythropoietin ELISA (R&D systems, MN). A chapa ELISA foi testada por espectrofotometria (SPECTRAMAX-190, Molecular devices, Sunnyvale, CA) a 540nm. Os dados foram analisados comparando valores de absorvância de amostras conhecidas à regressão de uma curva padrão.

[0037] A quantidade de Epo liberada no meio de cultura foi

determinada no dia 4 após encapsulamento por ELISA. Os dados foram normalizados para valores de absorbância obtidos com Meio de Crescimento apenas (Média Corrigida). Cada medição foi conduzida em meios gastos obtidos de 8 - 10 esferas. Erro padrão da média (SEM) também foi calculado. Os dados mostrados na Tabela 2 abaixo estão representados em forma gráfica na figura 2.

TABELA 2

| GRUPO DE TRATAMENTO | MÉDIA (pg/mL) | SEM (pg/mL) | MÉDIA NOR- MALIZADA (pg/mL) |
|---------------------------------------|------------------|----------------|-----------------------------------|
| Meio de Crescimento apenas (anterior) | -26,79 | 3,73 | 0,00 |
| Esferas apenas | -32,85 | 2,10 | -6,06 |
| Tecido apenas | 19,04 | 3,34 | 45,83 |
| Esferas com tecido | 52,52 | 28,59 | 79,31 |
| Esferas com tecido e pDGA | 34,12 | 10,50 | 60,91 |

[0038] Na figura 2, barras de dados representam a média das medições triplicadas, e barras de erro representam SEM. Cada medição foi realizada em meios gastos obtidos de 8 - 10 esferas.

[0039] Os resultados mostraram que o tecido renal picado produziu $45,8 \pm 3,3$ pg/mL de Epo nos meios de cultura circundantes. Da mesma maneira, o encapsulamento com alginato não impediu a liberação da Epo do tecido picado, produzindo $79,3 \pm 28,6$ pg/mL de Epo. A fim de determinar se a produção de Epo poderia ser quimicamente aumentada, esferas foram preparadas e cultivadas em pDGA. Os resultados mostraram que o tratamento com pDGA não efetuou produção de Epo, gerando $60,9 \pm 10,5$ pg/mL de Epo. Como um controle negativo, a produção de Epo a partir de esferas desprovidas de tecido foi determinada. Conforme esperado, nenhuma Epo mensurável foi detectada a partir dessas amostras.

Exemplo 5 - Análise da Secreção do Fator Trópico

[0040] Após quatro dias de cultura, meio de cultura gasto foi colhido

das esferas. Restos celulares foram removidos do meio de cultura gasto por centrifugação e o meio de cultura foi armazenado a -80°C. No momento da análise, meio de cultura gasto foi analisado por ELISA com relação aos fatores de proteína a seguir: interleucina-4 (IL-4), proteína-1 quimiotática de monócito (MCP-1), RANTES, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GMCSF), interleucina-10 (IL-10), adiponectina, leptina, metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2) com Searchlight Proteome Arrays (Pierce Biotechnology Inc.).

[0041] Em comparação com o meio de cultura gasto derivado de esferas sem encapsulamento de tecidos, esferas contendo fragmentos de tecido renal secretaram quantidades elevadas de MCP-1 (50,6 + / - 8,9 pg / mL), adiponectina (132.060,6 + / - 11.226,7 pg / mL), leptina (10,3 + / - 2,6 pg / mL) e MMP-2 (945,2 + / - 13,3 pg / mL) e quantidades baixas a indetectáveis de IL-4, RANTES, GMCSF e IL-10. Como mostrado na Tabela 3, a seguir, cada grupo de tratamento continha três amostras (1, 2, 3).

TABELA 3

| | IL4 | MCP1 | RANTE S | GMCSF | IL10 | Adiponectin a | Leptina | MMP2 |
|--------------------------|-------|-------|------------|-------|-------|------------------|---------|--------|
| Esferas com tecido | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml |
| 1 | 39,8 | 68,4 | 7,6 | 105,8 | 20,6 | 113137,8 | 14,6 | 1160,0 |
| 2 | 1,6 | 77,0 | 10,4 | 69,8 | 1,6 | 136667,8 | 19,6 | 1184,6 |
| 3 | 24,2 | 47,2 | 1,6 | 78,2 | 1,6 | 151719,0 | 10,6 | 1138,6 |
| | | | | | | | | |
| AVG | 21,9 | 64,2 | 6,5 | 84,6 | 7,9 | 133841,5 | 14,9 | 1161,1 |
| STD | 19,2 | 15,3 | 4,5 | 18,8 | 11,0 | 19445,3 | 4,5 | 23,0 |
| SEM | 11,1 | 8,9 | 2,6 | 10,9 | 6,3 | 11226,7 | 2,6 | 13,3 |

| | IL4 | MCP1 | RANTE S | GMCSF | IL10 | Adiponectin a | Leptina | MMP2 |
|--------------------------|-------|-------|------------|-------|-------|------------------|---------|-------|
| Esferas sem tecido | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml |
| 1 | 32,0 | 14,4 | 1,6 | 63,8 | 13,4 | 1827,2 | 7,0 | 616,4 |
| 2 | 32,8 | 13,8 | 3,0 | 130,4 | 17,6 | 1655,2 | 5,1 | 15,6 |
| 3 | 32,6 | 12,6 | 1,8 | 118,2 | 18,8 | 1860,4 | 1,8 | 15,6 |
| AVG | 32,5 | 13,6 | 2,1 | 104,1 | 16,6 | 1780,9 | 4,6 | 215,9 |
| STD | 0,4 | 0,9 | 0,8 | 35,5 | 2,8 | 110,1 | 2,6 | 346,9 |
| SEM | 0,2 | 0,5 | 0,4 | 20,5 | 1,6 | 63,6 | 1,5 | 200,3 |

| | IL4 | MCP1 | RANTE S | GMCSF | IL10 | Adiponectin a | Leptina | MMP2 |
|----------------|-------|-------|------------|-------|-------|------------------|---------|-------|
| Meio apenas | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml | pg/ml |
| 1 | 29,0 | 3,1 | 1,6 | 98,8 | 20,4 | 939,2 | 5,1 | 15,6 |
| 2 | 30,2 | 22,6 | 1,6 | 91,2 | 16,6 | 1159,0 | 5,1 | 15,6 |
| 3 | 34,8 | 16,8 | 1,6 | 85,0 | 15,0 | 1436,4 | 2,0 | 441,8 |
| AVG | 31,3 | 14,2 | 1,6 | 91,7 | 17,3 | 1178,2 | 4,1 | 157,7 |
| STD | 3,1 | 10,0 | 0,0 | 6,9 | 2,8 | 249,2 | 1,8 | 246,1 |
| SEM | 1,8 | 5,8 | 0,0 | 4,0 | 1,6 | 143,8 | 1,0 | 142,1 |

STD = desvio padrão, SEM = erro padrão da média. Os dados apresentados aqui estão representados em forma gráfica na figura 3, em que barras de dados representam a quantidade média de proteína secretada no meio após quatro dias de cultura. Medições anteriores obtidas a partir de esferas sem tecido foram subtraídas dos dados apresentados. As barras de erro representam SEM.

Exemplo 6 - Avaliação da Atividade Estimulante da Eritropoiese

[0042] Células CD34+ eritroides de rato (Lonza, Walkersville MD) são ressuspensas a 15.000 células/cm² em IMDM com FBS a 10%. Meio condicionado de esfera é então adicionado ao meio de ensaio

formador de colônia de metilcelulose (MethoCult GF H4534, StemCell Technologies, Vancouver BC). As células são adicionadas à metilcelulose e plaqueadas com subsequente incubação a 37°C, em um incubador de CO₂ a 5% por 12 - 14 dias. Colônias contendo mais de 50 células são contadas por microscopia por contraste de fase.

[0043] Meios condicionados derivados de tecido renal de rato encapsulado anteriormente demonstraram conter Epo. Meios condicionados logo mostraram ter atividade estimulante da eritropoiese (ESA), conforme medido pela atividade BFU-E.

Exemplo 7 - Avaliação dos Efeitos Renoprotetores dos Fragmentos de Tecido Renal Encapsulado

[0044] O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos renoprotetores de fragmentos de tecido renal de rato encapsulado com alginato em um modelo rato de doença renal. Ratos Sprague Dawley (diabéticos ou não diabéticos) com um peso inicial de 200 - 250 g são utilizados para esses experimentos. Os ratos são anestesiados com uma injeção intraperitoneal (5 mg/kg) de uma solução 4:1 de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina. A insuficiência renal é induzida por um procedimento de nefrectomia em duas fases. As partes superior e inferior do rim esquerdo (dois terços de um rim) são amputadas utilizando ligadura de seda, preservando a cápsula renal. Dez dias depois, o rim direito é removido, deixando cerca de 1/6 da massa renal total (nefrectomia 5/6). A aplicação de uma pressão suave com metilcelulose para o sangramento, e o peritônio e a pele são fechados em camadas com suturas absorvíveis 4-O Vicryl.

[0045] Cinco semanas após o procedimento de nefrectomia 5/6, esferas são transplantadas sob a cápsula como um controle, ratos 5/6 nefrectomizados são injetados com matriz de fibrina apenas. Amostras de soro são obtidas no dia 0 (antes da nefrectomia 5/6) e no dia 1 (dia do transplante celular), dias 7, 14, 21, 28 e 35 (dia da necropsia).

Nitrogênio de ureia e creatinina do sangue são quantificados utilizando um VETACE CHEMISTRY ANALYZER (Alpha Wassermann Diagnostic Technologies, LLC, West Caldwell, NJ).

[0046] Os animais em todos os grupos são sacrificados cinco semanas após o transplante de células por asfixia com dióxido de carbono. Os rins são removidos para exame histológico e análise transcrional. Metade de cada rim é rapidamente congelado em nitrogênio líquido para análise de RT-PCR. O RNA mensageiro é isolado do tecido renal congelado pelo coordenador do estudo e submetidos à análise da transcrição utilizando cartões de microensaio de baixa densidade contendo genes pró-fibróticos e inflamatórios. A seção de rim de córnea remanescente é fixada em formalina tamponada neutra a 10% para análise histológica a jusante.

[0047] Tecido renal fixado para histologia será histologicamente processado, seccionado (5 μm de espessura) e tingido com hematoxilina / eosina. O ferimento tubular é avaliado e pontuado por uma patologia veterinária.

[0048] Neste estudo, o transplante subcapsular de fragmentos de tecido renal encapsulado com alginato irá retardar a progressão da lesão renal em roedores 5/6 nefrectomizados ou em modelos roedores de nefropatia diabética. Ambos os valores de creatinina sérica e nitrogênio de ureia do sangue são significativamente reduzidos nos animais tratados por hUTC em comparação aos animais de controle. Além disso, a esfera reduz os níveis de glicose no sangue em modelos roedores de nefropatia diabética. Avaliação da lesão histológica revela uma redução na necrose tubular e dilatação tubular nos animais tratados.

[0049] As descrições de cada patente, pedido de patente e publicação citados ou descritos nesse documento são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Implante terapêutico, caracterizado pelo fato de que compreende fragmentos picados de tecido renal integral encapsulado em uma esfera de polímero permeável a hormônios, pró-hormônios, proteínas, fatores de crescimento, ou qualquer combinação dos mesmos secretada pelo tecido renal,

em que a referida esfera de polímero compreende poli-L-lisina ou alginato e poli-L-lisina,

em que a referida esfera de polímero possui um diâmetro de 0,5 mm a 10 mm, e

em que o referido implante terapêutico libera eritropoietina.

2. Implante terapêutico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os ditos fragmentos têm um tamanho de menos do que 1 mm.

3. Implante terapêutico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os ditos fragmentos têm um tamanho de menos do que 300 μm .

4. Implante terapêutico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos 30 mg de tecido renal.

5. Implante terapêutico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita esfera de polímero compreende poli-L-lisina.

6. Implante terapêutico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita esfera de polímero compreende alginato e poli-L-lisina.

7. Implante terapêutico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita esfera de polímero tem um diâmetro de 3 mm a 6 mm.

8. Implante terapêutico, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que o referido tecido secreta MCP-1, adiponectina, leptina, MMP-2, ou qualquer combinação dos mesmos.

9. Uso de fragmentos de tecido renal integral encapsulado em uma esfera de polímero, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um implante terapêutico para tratar um estado de doença em um paciente, em que o referido estado de doença é anemia, derrame, doença cardiovascular ou doença renal.

10. Método para fazer um implante terapêutico, caracterizado pelo fato de que compreende:

proporcionar fragmentos picados de tecido renal integral;

misturar o dito tecido renal com uma solução compreendendo um polímero, assim formando uma suspensão de tecido-polímero;

extrudar a dita suspensão de tecido-polímero em uma solução formadora de esferas, assim formando um implante terapêutico compreendendo esferas do dito polímero em que o dito tecido renal está encapsulado,

em que a referida solução formadora de esferas é uma solução de reticulação, uma solução iônica, uma solução compreendendo CaCl_2 , ou qualquer combinação das mesmas;

em que o polímero permeável a hormônios, pró-hormônios, proteínas, fatores de crescimento, ou qualquer combinação dos mesmos secretada pelo tecido renal,

em que o referido implante terapêutico compreende poli-L-lisina ou alginato e poli-L-lisina,

em que o referido implante terapêutico possui um diâmetro de 0,5 mm a 10 mm, e

em que o referido implante terapêutico libera eritropoietina.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado

pelo fato de que a referida solução compreendendo um polímero compreende: poli-L-lisina, ou agarose e poli-L-lisina; e
um meio capaz de sustentar e nutrir o tecido renal.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita solução formadora de esferas compreende uma solução de reticulação.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a referida solução formadora de esferas compreende CaCl_2 .

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende revestir as ditas esferas com uma camada de polímero.

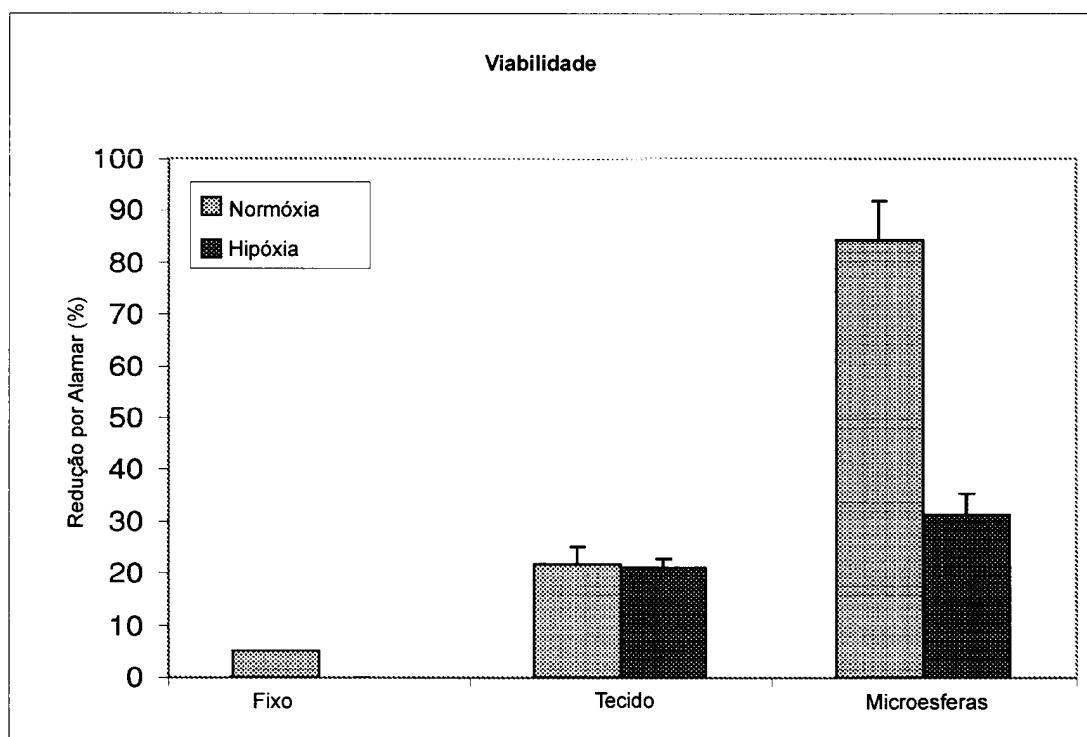
FIG. 1

FIG. 2

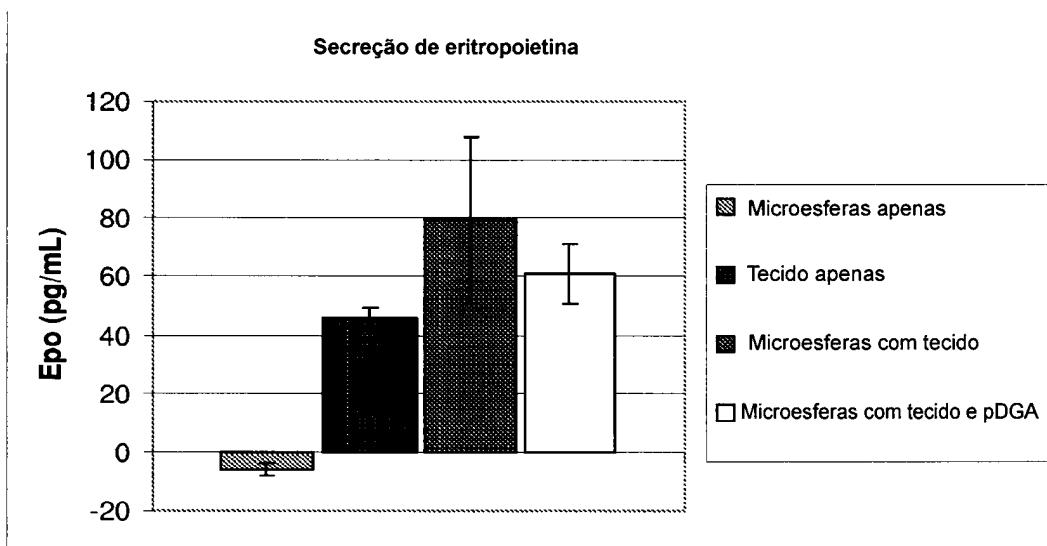


FIG. 3

