



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019026846-4 A2



(22) Data do Depósito: 15/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 30/06/2020

(54) **Título:** PROCESSO PARA PREPARAR UM LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS AGRUPADAS, LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS AGRUPADAS E SEU USO PARA TRATAR TRANSTORNOS NEUROLÓGICOS

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/19.

(30) **Prioridade Unionista:** 16/06/2017 EP 17305739.9.

(71) **Depositante(es):** INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE); CENTRE HOSPITALIER REGIONAL ET UNIVERSITAIRE DE LILLE (CHRU); UNIVERSITE DE LILLE; UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE; TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY.

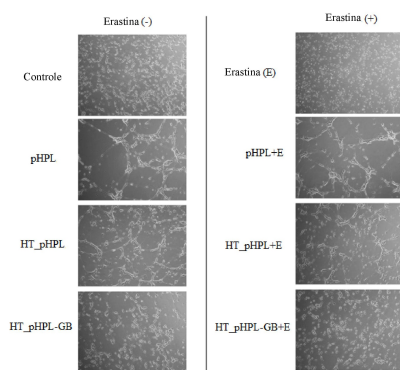
(72) **Inventor(es):** DAVID DEVOS; THIER-RY BURNOUF; JEAN-CHRISTOPHE DEVED-JIAN; MING-LI CHOU; FLORE GOUEL.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2018066020 de 15/06/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/229278 de 20/12/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 16/12/2019

(57) **Resumo:** Processo para preparar um lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente, o referido processo compreendendo as etapas de: a) Fornecer um lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL), b) Tratar termicamente o lisado de plaquetas humanas reunido a uma temperatura de 50 °C a 70 °C durante 20 a 40 minutos, c) Purificar o lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente da etapa b).



**PROCESSO PARA PREPARAR UM LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS
AGREGADAS, LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS AGREGADAS E SEU USO
PARA TRATAR TRANSTORNOS NEUROLÓGICOS**

[0001] A presente invenção se refere a um processo para a obtenção de um novo lisado de plaquetas humanas agregadas (*pooled*), o próprio lisado de plaquetas humanas agregadas e seu uso no tratamento de distúrbios neurológicos, tais como distúrbios neurodegenerativos, neuroinflamatórios, neurodesenvolvimentais e/ou neurovasculares (por exemplo, derrame), mas também as consequências de insultos cerebrais (lesão cerebral traumática, hipóxia, etc.).

[0002] É urgentemente necessário o desenvolvimento de uma “estratégia modificadora de doença” eficaz que forneça neuroproteção, neurorestauração e neurogênese para tratar distúrbios neurodegenerativos, tais como doença de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica (ELA) e doença de Alzheimer (DA), considerando os enormes impactos sociais e econômicos que esses distúrbios impõem aos pacientes e prestadores de cuidados.

[0003] Considerando-se a falta de tratamentos validados, também é amplamente esperado o desenvolvimento de tratamentos eficazes que forneçam neurorestauração e neurogênese, com o intuito de compensar a perda de neurônios e os insultos do sistema nervoso central, tais como hipóxia grave após parto ou parada cardíaca ou lesão cerebral traumática grave.

[0004] Existem evidências substanciais de que as neurotrofinas, como ativadoras e moduladoras das vias de sinalização neuronal, representam uma estratégia terapêutica

lógica para os distúrbios neurológicos¹. A aplicação de fatores de crescimento neurotróficos recombinantes únicos forneceu resultados encorajadores para proteção e reparo neuronal em modelos de células e animais.

[0005] O fator de crescimento derivado de plaquetas-CC (PDGF-CC) provou ser um potente fator neuroprotetor em vários modelos animais com lesão neuronal, enquanto o PDGF-BB e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), administrado por via intracerebroventricular (ICV), estimulou neurogênese². Além disso, a administração sistêmica de BDNF em um modelo fototrombótico de acidente vascular cerebral focal pode induzir neurogênese e melhorar a função sensório-motora. O fator de crescimento transformante β (TGF- β) poderia promover o desenvolvimento e a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos e a neuroproteção em modelos animais de parkinsonismo, além de aumentar o efeito trófico do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) em camundongos hemiparkinsonianos³.

[0006] Estudos pré-clínicos mostraram neuroproteção pelo fator de crescimento de fibroblástico básico (b-FGF) e fator de crescimento endotelial vascular β (VEGF- β) e promoção da neuroproteção e neurorestauração pelo GDNF⁴.

[0007] Infelizmente, todos os estudos clínicos aleatórios envolvendo a administração de fatores de crescimento únicos em altas doses e por ICV falharam em produzir efeitos clínicos positivos substanciais.

[0008] Atualmente, a administração de neurotrofinas únicas nessas patologias neurodegenerativas complexas e

multifacetadas é insuficiente para produzir resultados terapêuticos significativos.

[0009] Assim, é necessário desenvolver uma nova abordagem combinando várias neurotrofinas recombinantes, a qual provavelmente seria mais poderosa, mas isso é um desafio conceitual em particular para buscar aprovação regulatória, justificando estratégias mais pragmáticas inspiradas em outros campos da medicina regenerativa.

[0010] Os concentrados de plaquetas são um produto terapêutico bem estabelecido, integram a lista modelo de medicamentos essenciais da OMS, geralmente são usados na profilaxia e no tratamento de distúrbios hemorrágicos resultantes de trombocitopenia. Além de seu papel na hemostasia, as plaquetas exercem funções fisiológicas cruciais na cicatrização de feridas e reparo tecidual⁵.

[0011] A gama de aplicações em medicina regenerativa⁶ e terapia celular⁷ onde as plaquetas e lisados de plaquetas são avaliadas está em expansão. O benefício terapêutico das plaquetas na cicatrização tecidual é multifatorial e resulta da miríade de mediadores bioativos armazenados principalmente no grânulo α e atuando em sinergia. Isso inclui fatores de crescimento neurotróficos, tais como PDGF (isoformas -AA, -AB e -BB), BDNF, VEGF, TGF- β , bFGF ou fator de crescimento epitelial (EGF). Foi demonstrado recentemente que a distribuição intracraniana de lisados de plaquetas em modelos animais de AVC estimula a proliferação de células-tronco neurais endógenas (eNSC) e a angiogênese na zona subventricular e no córtex peri-lesão, levando a melhores

resultados funcionais, redução de lesões e sugerindo efeitos neuroprotetores.

[0012] O documento US 2014/0176602 propõe uma mistura biológica inativada viral e sua preparação. Particularmente, este documento descreve um método para preparação de um extrato de plaquetas isento de vírus, em que o método compreende as seguintes etapas: prover uma fração de plaquetas enriquecidas a partir de mais do que um doador; realizar um tratamento de inativação viral com detergente solvente (S/D); colocar o material tratado em contato com S/D com um polímero anfifílico não tóxico; remover o S/D e submeter o material a pelo menos mais um tratamento de inativação viral ortogonal. A inativação viral ortogonal pode ser uma pasteurização que é realizada a 60°C durante 10 horas na presença de estabilizadores, tais como sacarose e glicina.

[0013] O documento US 2012/0156306 descreve um extrato de plaquetas isento de vírus, em que referido extrato é não coagulável. Particularmente, este documento descreve um método para preparação de um extrato de plaquetas isento de vírus, em que o referido método compreende pelo menos dois tratamentos de inativação viral ortogonal, por exemplo, tratamento de inativação viral com detergente solvente (S/D) e inativação pelo calor. A inativação pelo calor é uma pasteurização que é realizada a 60°C durante 10 horas, a fim de destruir os vírus envoltos e não envoltos em lipídios. Sacarose e glicina foram adicionadas à solução para servir como estabilizadores durante a pasteurização.

[0014] Nos dois documentos citados acima, os extratos de plaquetas isentos de vírus resultantes exibem alto conteúdo de fibrinogênio graças à presença de estabilizadores durante a etapa de pasteurização. De fato, é conhecido através do documento US 5,116,950 que os estabilizadores, tais como sacarose ou glicina, exercem um efeito de fibrinogênio altamente estabilizante sobre aquecimento líquido. Particularmente, a Tabela 1 mostra que a adição de sacarose fornece um excelente efeito estabilizante.

[0015] O documento US 2016/0074481 se refere ao campo de derivados de plaquetas e, mais especificamente, ao campo de concentrados de fatores de crescimento que são obtidos a partir de plaquetas. Particularmente, é divulgado um método para preparar um concentrado coagulável de fatores de crescimento de plaquetas. O termo "coagulável" significa que o concentrado de fatores de crescimento de plaquetas compreende tanto o fibrinogênio quanto o fator de coagulação XIII. Especificamente, a concentração de fibrinogênio no concentrado coagulável dos fatores de crescimento de plaquetas é preferivelmente maior que 1 g/L, mais preferivelmente maior que 1,5 g/L e ainda mais preferivelmente maior que 2,5 g/L do concentrado.

[0016] O documento US 2013/0143810 se refere a extratos de plaquetas humanas ricas em fatores de crescimento para cicatrização de feridas e expansão de células-tronco. Este documento se refere a um lisado de plaquetas contendo fatores de crescimento inativado por vírus, empobrecido em PDGF e VEGF, que é preferivelmente enriquecido em TGF, IGF

e EGF. Na Tabela 1 é descrito que as composições de concentrado de plaquetas tratadas com S/D após extração com óleo (S/D-PC-O) e após tratamento com carvão vegetal (S/D-PC-OC) exibem uma concentração de fibrinogênio de $4,5 \pm 0,3$ mg/mL e $2,65 \pm 0,7$ mg/mL, respectivamente.

[0017] Copland *et al.* ("*The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy*") Biomaterials 34 (2013) 7840-7850) investigou o lisado de plaquetas empobrecido em fibrinogênio como um produto para expandir as CTM humanas para uso na terapia de imunomodulação. A Figura 2c é uma comparação do conteúdo de fibrinogênio a partir de preparações de lisado de plaquetas empobrecido em fibrinogênio. Cada lote descrito por Copland exibe um teor de fibrinogênio de pelo menos 4 mg/mL.

[0018] O documento WO 2013/003356 descreve composições compreendendo lisados de plaquetas empobrecidos em fibrinogênio, sendo as referidas composições usadas como meio de cultura celular. O empobrecimento em fibrinogênio a partir de lisado de plaquetas é realizado usando heparina e sais metálicos. Além disso, as referidas composições empobrecidas em fibrinogênio têm uma concentração de fibrinogênio de cerca de 2 µg/mL ou 4 µg/mL.

[0019] No entanto, os lisados de plaquetas contêm fibrinogênio transmitido pelo plasma, uma proteína que desempenha um papel causador de distúrbios neurológicos como um potente indutor de inflamação e um inibidor do crescimento de neurites⁹. Esta pode ser uma razão pela qual a aplicação de lisados de plaquetas no campo de distúrbios

neurodegenerativos em humanos, tal como a Doença de Parkinson, ainda não foi relatada.

[0020] A invenção baseia-se em descobertas inesperadas de que, quando o lisado de plaquetas agrupadas (pHPL) é tratado sob condições específicas, ele é capaz de potencializar o tratamento de distúrbios neurológicos, induzindo um melhor efeito neuroprotetor, bem como a restauração neurológica.

[0021] Um lisado de plaquetas humanas agrupadas de acordo com a invenção é um lisado de plaquetas humanas obtido a partir de pelo menos dois lisados de plaquetas oriundas de diferentes doadores. Preferivelmente, o lisado de plaquetas humanas agrupadas é obtido a partir de pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 100, pelo menos 100, pelo menos 140, pelo menos 180, pelo menos 200 e mais particularmente, a partir de pelo menos 240 lisados de plaquetas diferente recolhidas a partir de diferentes doadores.

[0022] Em particular, os inventores descobriram que o tratamento térmico de pHPL reduz o conteúdo total de proteínas do lisado e promove um potencial melhorado neuroprotetor e de neurorestauração.

[0023] Assim, em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a um processo para a preparação de um lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente, o referido processo compreendendo as etapas de:

(a) fornecer um lisado de plaquetas humanas agregadas (pHPL);

(b) tratamento térmico do lisado de plaquetas humanas agregadas a uma temperatura de 55°C a 65°C durante 20 a 40 minutos; e

(c) purificação do lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente da etapa (b).

[0024] O processo da invenção fornece um lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente (HT_pHPL) com um teor de fibrinogênio que é inferior a 5%, inferior a 4%, inferior a 3%, inferior a 2, inferior a 1% e, preferivelmente inferior a 0,1%, em peso, do teor de fibrinogênio do pHPL não tratado termicamente. A concentração de fibrinogênio do pHPL tratado termicamente é inferior a 50 ng/mL, inferior a 40 ng/mL, inferior a 30 ng/mL, inferior a 20 ng/mL e mais preferivelmente inferior a 15 ng/mL.

[0025] Particularmente, o pHPL tratado termicamente é livre de fibrinogênio. Com a expressão "livre de fibrinogênio", entende-se que a concentração de fibrinogênio no HT_pHPL não excede 15 ng/mL, particularmente não excede 10 ng/mL e, mais particularmente, não excede 5 ng/mL.

[0026] De acordo com a invenção, a primeira etapa do processo consiste em fornecer um lisado de plaquetas humanas agregadas (pHPL). Este pHPL pode ser preparado de acordo com métodos bem conhecidos de concentrado de plaquetas (PC), os quais induzem a liberação de fatores de crescimento e outras moléculas ativas. Por exemplo, o pHPL pode ser preparado através do método que compreende as seguintes etapas:

(i) prover concentrados de plaquetas;

(ii) lise de forma separada de cada um dos concentrados de plaquetas de etapa (i); e

(iii) misturar os lisados resultantes da etapa (ii) com o intuito de obter um lisado de plaquetas humanas agregadas.

[0027] Os concentrados de plaquetas fornecidos na etapa (i) podem ser provenientes de diferentes doadores e podem ser obtidos a partir de fontes de plaquetas alogênicas através de métodos padrão adequados de coleta. Particularmente, o concentrado de plaquetas pode ser obtido a partir de sangue total usando a técnica de *buffy coat* ou plasma rico em plaquetas (PRP), ou pode ser coletado através da técnica de aférese. Preferivelmente, o concentrado de plaquetas é produzido a partir de sangue total usando a técnica *buffy coat* ou (PRP)¹⁰.

[0028] No "método PRP", sangue total anticoagulado é centrifugado usando rotação suave sob condições validadas para separar as células vermelhas do sangue (RBC) a partir da metade superior contendo uma mistura de plaquetas e plasma, os chamados PRP. As plaquetas são, então, concentradas por centrifugação de giro forte com curvas de aceleração e desaceleração validadas. O saco de concentrado de plaquetas é deixado estacionário à temperatura ambiente e, em seguida, o concentrado é resuspenso no plasma. No método "*buffy coat*", o sangue total anticoagulado é centrifugado usando um giro forte com curvas de aceleração e desaceleração validadas para separar o plasma "sem células" na camada superior, uma camada intermediária chamada *buffy coat* (BC) e uma camada inferior de glóbulos vermelhos (RBC). A camada BC é transferida para uma bolsa de satélite. Uma

pequena quantidade de plasma é retornada à camada BC e suavemente misturada antes de ser novamente submetida à centrifugação leve com curvas de aceleração e desaceleração validadas. O sobrenadante de PRP é então colocado em armazenamento de plaquetas e pode ser armazenado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

[0029] No método de aférese, os concentrados de plaquetas podem ser obtidos por meio de um dispositivo médico extracorporal utilizado em doação de sangue que separa as plaquetas e retorna outras porções do sangue ao doador.

[0030] O plasma usado para suspender o concentrado no "método PRP", o plasma retornado à camada BC no método "buffy coat" ou o plasma coletado com plaquetas por aférese, pode ser substituído por uma solução aditiva de plaquetas (PAS) ou por uma mistura entre plasma e PAS, e preferivelmente por uma mistura entre plasma e PAS. A dita mistura entre plasma e PAS pode conter cerca de 30% a 40% em peso de plasma e cerca de 70% a 60% em peso de PAS.

[0031] O concentrado de plaquetas fornecido na etapa (i) pode ser submetido a um tratamento de leucodepleção. Este tratamento leva à depleção de leucócitos e pode ser alcançado por filtração em um filtro de leucoredução ou durante a coleta de plaquetas por aférese.

[0032] O concentrado de plaquetas fornecido na etapa (i) pode ser submetido a uma etapa do tratamento de inativação viral/patogênica antes da lise. O tratamento de inativação viral/patogênica antes da lise aplicado ao concentrado de plaquetas pode ser selecionado a partir do sistema Intercept® Blood (Cerus Corporation), sistema Mirasol® PRT (Terumo BCT), ou THERAFLEX-UV (Macopharma).

Estes procedimentos são bem conhecidos por um técnico na arte e têm como objetivo, com ou sem a adição de um agente fotoativador, a alteração dos ácidos nucleicos.

[0033] Em uma modalidade, o concentrado de plaquetas é submetido a um tratamento de leucodepleção e a um tratamento de inativação viral/patogênica. Preferivelmente, o tratamento de leucodepleção é realizado antes do tratamento de inativação viral/patogênica.

[0034] A etapa (ii) de lise separada de cada concentrado de plaquetas pode ser alcançada através de qualquer método conhecido na arte. Por exemplo, a lise de plaquetas pode ser alcançada através de um ou mais ciclos de congelamento/descongelamento, através da ativação de plaquetas induzida pela adição de trombina ou CaCl_2 , através de sonicação ou através de tratamento com solvente/detergente (S/D). Preferivelmente, a etapa (ii) de lise dos concentrados de plaquetas é conseguida através de um ou mais de ciclos de congelamento/descongelamento, e mais preferivelmente através de pelo menos três ciclos. Quando a lise é alcançada através de um dos métodos anteriores, uma etapa de centrifugação e filtração também pode ser executada para remover os detritos celulares.

[0035] Em seguida, a etapa (iii) consiste em misturar os lisados com o intuito de obter um agregado (*pool*) de HPL, também chamado de pHPL. Assim, o agregado de HPL é obtido através de mistura do lisado de plaquetas concentradas a partir de pelo menos 2 lisados de plaquetas oriundos de diferentes doadores. Preferivelmente, o agregado de HPL é obtido misturando-se pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos

20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 100, pelo menos 100, pelo menos 140, pelo menos 180, pelo menos 200 e mais particularmente, pelo menos 240 diferentes lisados de plaquetas coletados a partir de diferentes doadores.

[0036] Um lisado de plaquetas humanas agregadas (pHPL) adequado para o processo da invenção pode ser qualquer lisado de plaquetas humanas agregadas a partir de sangue estabelecido ou a partir de fornecedores comerciais. Por exemplo, o lisado de plaquetas humanas agregadas pode ser obtido a partir da Macopharma (Tourcoing, França; lisado de plaquetas humanas MultiPL³⁰®), a partir da Cook-Regentec (Indianapolis, EUA; lisado de plaquetas humanas Stemulate®), a partir da Stemcell Technologies (Grenoble, França) ou também a partir da Sigma-Aldrich (lisado de plaquetas humanas PLTMax®).

[0037] A segunda etapa do processo da invenção consiste no tratamento térmico do pHPL. Esta etapa é preferivelmente realizada sem adição de estabilizadores que são classicamente usados para manter a atividade biológica das proteínas. Tais estabilizadores são, por exemplo, sacarose, sorbitol, manitol ou aminoácidos, tais como arginina ou lisina. O tratamento térmico pode, preferivelmente, ser realizado a uma temperatura de cerca de 50°C a 70°C, preferivelmente de cerca de 52°C a 60°C, e mais preferivelmente a uma temperatura de cerca de 56°C. De fato, os resultados mais promissores em termos de reprodutibilidade da neuroproteção e neurorestauração foram obtidos para pHPL tratado a cerca de 56°C.

[0038] Em uma modalidade preferencial, a duração do tratamento térmico é de cerca de 20 a 40 minutos, preferivelmente cerca de 30 minutos.

[0039] Além disso, após o tratamento térmico, o pHPL pode ser arrefecido durante pelo menos 5 minutos, preferivelmente a uma temperatura de cerca de 2°C a 5°C, antes da purificação na etapa (c).

[0040] Vantajosamente, o pHPL tratado termicamente fornecido na etapa (a) pode ser submetido, antes da etapa (b), a um tratamento que induz a ativação da cascata de coagulação. Por exemplo, o pHPL tratado termicamente pode ser misturado com esferas de vidro (GB) e CaCl_2 , sob agitação, ou usando CaCl_2 sozinho. Este tratamento leva a uma formação de coágulo, o qual é removido após a centrifugação e o pHPL resultante fica livre de fibrinogênio. Sem querer ficar vinculado a nenhuma teoria, os inventores acreditam que este tratamento contribui para diminuir a toxicidade e melhorar o efeito neuroprotetor do pHPL de acordo com a invenção.

[0041] A terceira etapa do processo da invenção consiste em purificar o lisado de plaquetas humanas tratado termicamente. Esta etapa de purificação pode ser realizada através de qualquer método conhecido na arte, tal como, por exemplo, centrifugação ou filtração.

[0042] A centrifugação pode ser vantajosamente realizada a uma temperatura de cerca de 2°C a 6°C, por exemplo, durante pelo menos 10 minutos, de 9.000 x g a 11.000 x g.

[0043] Quando a filtração é usada, o pHPL tratado termicamente é vantajosamente passado através de um filtro com um tamanho de poro de 5 µm a 0,2 µm, preferivelmente é usada uma sequência de dois ou mais filtros sucessivos com tamanhos de poros decrescentes possuindo um tamanho de poro respectivo de 5 µm a 0,2 µm.

[0044] Vantajosamente, a purificação do lisado de pHPL tratado termicamente na etapa (c) é realizada através de centrifugação. Sem o intuito de estar vinculada a nenhuma teoria, os inventores acreditam que a centrifugação com baixas temperaturas, tal como descrito acima, pode contribuir para a remoção adicional de componentes insolúveis que precipitam no frio, tal como o fibrinogênio.

[0045] O processo da presente invenção pode adicionalmente compreender uma etapa de congelamento e armazenamento do pHPL tratado termicamente obtido na etapa (c) a uma faixa de temperatura de -20°C a -85°C, preferivelmente de -25°C a -50°C e mais preferivelmente em torno de -30°C. Alternativamente, o pHPL tratado termicamente pode ser liofilizado antes do armazenamento.

[0046] Em uma modalidade, o processo da invenção adicionalmente compreende, após a etapa (b) e antes do congelamento ou congelamento/secagem opcional, uma etapa de inativação viral, remoção de vírus e/ou remoção do príon. Os métodos adequados de inativação viral ou remoção de vírus incluem, entre outros, tratamento com solvente/detergente (tratamento S/D), apenas com detergente, pasteurização, tratamento a vapor ou tratamento com vapor d'água, tratamento UV, irradiação gama, tratamento com pH baixo, tratamento com

ácido caprílico e nanofiltração. Por exemplo, o tratamento S/D pode ser realizado usando 1% de fosfato de tributila e 1% de Triton X-100 a 31°C durante 1 hora. O tratamento de pasteurização pode ser realizado através de um tratamento térmico a 60°C durante 10 horas na presença de estabilizadores. A nanofiltração pode ser realizada usando filtros de vírus dedicados de 15 nm, 20 nm ou 35 nm, ou filtros de remoção de patógenos equivalentes conhecidos na arte.

[0047] Assim, nesta modalidade, o pHPL tratado termicamente obtido é isento de vírus. O termo "inativação viral" se refere a uma situação em que os vírus são mantidos no lisado de plaquetas humanas, mas são inviáveis, por exemplo, dissolvendo-se sua camada lipídica ou destruindo-se sua estrutura de vírions. O termo "remoção de vírus" se refere a uma situação em que os vírus, que possuem estruturas rígidas de grande tamanho, são removidos do lisado de plaquetas humanas através de retenção em um nanofiltro enquanto os componentes do lisado de plaquetas humanas passam por esse filtro de remoção de vírus e são recuperados para processamento posterior.

[0048] Vantajosamente, o processo de acordo com a invenção é adequado para a produção em escala industrial de grande quantidade de um pHPL padronizado tratado termicamente (HT_pHPL). Na verdade, utilizando-se um lisado de plaquetas humanas agrupadas como material de partida, especialmente um pHPL a partir de fornecedores industriais, o processo permite produzir um HT_pHPL que provê elevado nível de normalização e consistência, e que também está em

conformidade com os princípios das GMPs. O HT_pHPL obtido pode assim ser padronizado, o que é particularmente vantajoso quando se pretende que o HT_pHPL seja utilizado em bioterapia, nomeadamente através da administração cerebral.

[0049] De forma surpreendente e inesperada, o processo de acordo com a invenção conduz a um pHPL tratado termicamente, o qual fornece uma melhor neuroproteção em comparação ao pHPL não tratados termicamente. Ensaaios *in vitro* têm demonstrado que o pHPL preparado de acordo com a presente invenção protege células dopaminérgicas da morte induzida por neurotoxinas, sem induzir alteração morfológica. Sem o intuito de ficar vinculado a nenhuma teoria, os inventores acreditam que a atividade neuroprotetora melhorada do HT_pHPL da invenção é resultado de seu conteúdo total reduzido de proteína, como o conteúdo de fibrinogênio. De fato, acredita-se que o tratamento térmico a uma temperatura de 50°C a 70°C induz a precipitação de proteínas, fornecendo - após a etapa (c), em que se acredita que as proteínas precipitados são removidas - para um teor de proteína total no HT_pHPL de acordo com a invenção significativamente mais baixo do que no pHPL inicial.

[0050] Particularmente, também se acredita que o tratamento com calor resulta em uma redução ou depleção significativa de fibrinogênios e enzimas proteolíticas, tais como trombina, ou semelhantes à trombina, ou fatores de coagulação geradoras de trombina no pHPL, e que a etapa de tratamento com calor precipita e/ou inativa as proteínas instáveis em calor potencialmente tóxicas e, de forma favorável, modifica o equilíbrio da proteína e do fator de

crescimento no pHPL. Assim, o pHPL tratado termicamente, contrariamente ao pHPL, pode evitar o risco biológico de formação de fibrina, a qual é tóxica para o cérebro. Portanto, o pHPL tratado termicamente obtido de acordo com a invenção oferece uma margem de segurança substancialmente maior do que os lisados de plaquetas humanas padrão em suspensão no plasma. Assim, o pHPL tratado termicamente da invenção é mais adequado e mais eficiente para uso em bioterapia, especialmente através da administração cerebral.

[0051] Tal como estabelecido acima, o lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente (HT_pHPL) da invenção fornece uma atividade neuroprotetora e de neurorestauração melhorada.

[0052] Em um segundo aspecto, a invenção se refere a um lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente (HT_pHPL) com um conteúdo de fibrinogênio inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3%, inferior a 2, inferior a 1% e mais preferivelmente inferior a 0,1 % em peso do teor de fibrinogênio do pHPL não tratado termicamente. A concentração de fibrinogênio do pHPL tratado termicamente é inferior a 50 ng/mL, inferior a 40 ng/mL, inferior a 30 ng/mL, inferior a 20 ng/mL e, mais preferivelmente, inferior a 15 ng/mL. Tal como mostrado na seção de exemplos, o lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente de acordo com a invenção é neuroprotetor.

[0053] Particularmente, o pHPL tratado termicamente é livre de fibrinogênio. Com a expressão "livre de fibrinogênio", entende-se que a concentração de fibrinogênio

no HT_pHPL não excede 15 ng/mL, particularmente não excede 10 ng/mL e, mais particularmente, não excede 5 ng/mL. O pHPL tratado termicamente de acordo com a invenção pode ser obtido pelo processo descrito aqui anteriormente.

[0054] Em um terceiro aspecto, a invenção se refere ao lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente de acordo com a invenção para uso como um fármaco biológico ou como "bioterapia".

[0055] De fato, graças à sua atividade neuroprotetora aprimorada e à sua segurança mais elevada, o lisado de plaquetas humanas agrupadas pode ser usado no tratamento e/ou prevenção de um distúrbio neurológico e, preferivelmente, um distúrbio neurodegenerativo. Assim, os lisados de plaquetas humanas agregadas tratados termicamente exibem uma forte atividade neuroprotetora e são particularmente vantajosos no tratamento de distúrbios em que é observada uma perda de neurônio.

[0056] Em outras palavras, a invenção também se refere a um método de tratamento e/ou prevenção de distúrbios neurológicos, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do pHPL tratado termicamente da invenção a um paciente em necessidade. Preferivelmente, o paciente é um animal de sangue quente, mais preferivelmente um humano.

[0057] Distúrbios neurológicos dentro do significado da presente invenção incluem, mas não estão limitados a doenças neurodegenerativas, distúrbios neurovasculares, distúrbios neuroinflamatórios, distúrbios do neurodesenvolvimento, tais como autismo, insulto cerebral,

tal como a hipoxia grave após parto ou parada cardíaca e/ou lesão cerebral traumática grave/traumatismo craniano, ou seja, insultos graves que resultam em uma perda significativa de neurônios levando a deficiências.

[0058] Os distúrbios neurodegenerativos dentro do significado da presente invenção incluem, entre outros, esclerose múltipla (EM), doença de Parkinson (DP), doença de Huntington (DH), esclerose lateral amiotrófica (ELA), acidente vascular cerebral, degeneração macular relacionada à idade (DMRI), doenças degenerativas da retina e demência, as últimas incluindo, sem limitação, doença de Alzheimer (DA), demência vascular, demência frontotemporal, demência semântica e demência com corpos de Lewy. As doenças neurodegenerativas preferenciais são esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica.

[0059] Em uma modalidade preferencial, o distúrbio neurodegenerativo é selecionado a partir do grupo que compreende doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Alzheimer. Em uma modalidade particularmente preferencial, o distúrbio neurodegenerativo é a doença de Parkinson. Em outra modalidade preferencial, o distúrbio neurodegenerativo é a esclerose lateral amiotrófica.

[0060] Outros distúrbios neurológicos preferenciais incluem insultos do sistema nervoso central, tais como hipóxia grave após parto ou parada cardíaca ou traumatismo craniano grave, isto é, insultos graves, resultando em uma perda significativa de neurônios levando a deficiências. O

tratamento precoce com o pHPL tratado termicamente, após o insulto, poderia melhorar as habilidades fisiológicas de neurorestauração e neurogênese.

[0061] O pHPL tratado termicamente pode ser administrado como tal, pode ser encapsulado em nanopartículas naturais ou sintéticas¹¹ ou micropartículas, ou estar compreendido em uma solução farmacêutica compreendendo ainda pelo menos um veículo, diluente, excipiente e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. A solução farmacêutica pode ainda compreender complexos, moléculas, peptídeos, sais, vetores ou qualquer outro composto que possa melhorar ou ser benéfico no tratamento de distúrbios neurológicos.

[0062] A via de administração e o regime de dosagem dependem naturalmente da gravidade da doença, idade, peso, sexo do paciente, etc.

[0063] O pHPL tratado termicamente da invenção pode ser utilizado para o tratamento de qualquer paciente, especialmente um animal de sangue quente, tal como um mamífero e, preferivelmente, um humano.

[0064] Vantajosamente, o pHPL tratado termicamente de acordo com a invenção é adequado para administração cerebral. Especificamente, o referido pHPL tratado termicamente é adaptado para administração intratecal (por exemplo, para esclerose lateral amiotrófica que é uma patologia da medula espinhal) ou intracerebroventricular (ICV), por exemplo, no ventrículo lateral direito, preferivelmente fechado ao forame intraventricular para que o pHPL tratado termicamente possa ser administrado no

terceiro ventrículo. A administração cerebral pode ser alcançada pelos métodos conhecidos na arte. Por exemplo, a administração cerebral pode ser realizada com um sistema de administração de medicamentos, tal como uma bomba de medicação programável.

[0065] A administração do pHPL tratado termicamente da presente invenção também pode ser realizada através de qualquer outro método conhecido pelo técnico na arte, tal como por exemplo, administração intranasal, intramuscular ou intraocular, ou perfusão ou infusão de um órgão (isto é, infusão direta de uma parte do tecido cerebral).

[0066] A dosagem de exposição utilizada para a administração pode ser adaptada em função de vários parâmetros, e em particular em função do modo de administração utilizado, da patologia relevante ou da duração desejada do tratamento.

DEFINIÇÕES

[0067] As definições e explicações abaixo são para os termos usados em todo o pedido, incluindo o relatório descritivo e as reivindicações.

[0068] Por "atividade neuroprotetora" ou "neuroproteção" entende-se: preservação da estrutura neuronal e/ou função das células neuronais afetadas pela neurotoxina em comparação com as células neuronais as quais não são afetadas pela neurotoxina. A neuroproteção visa prevenir ou retardar a progressão da doença e de lesões secundárias, interrompendo, ou pelo menos diminuindo, a perda de neurônios. Por exemplo, se refere à preservação do número de neurônios no estriado e/ou na substância negra

pars compacta de pacientes afetados pela doença de Parkinson em comparação com pacientes que não são afetados pela doença de Parkinson.

[0069] Por "neurorestauração" entende-se: compensação de alterações existentes e estimulação da restauração estrutural e funcional da atividade nervosa lesada.

[0070] O termo "paciente" se refere a um animal de sangue quente, mais preferivelmente um humano, o qual está aguardando ou recebendo cuidados médicos ou é/será objeto de um procedimento médico.

[0071] O termo "humano" se refere aos indivíduos de ambos os sexos e em qualquer fase de desenvolvimento (isto é, recém-nascido, infantil, juvenil, adolescente, adulto). Em uma modalidade, o humano é um adolescente ou adulto, preferivelmente um adulto.

[0072] Os termos "tratar", "tratando" e "tratamento", conforme usados neste documento, são destinados a incluir os termos "aliviar" ou "inibir" uma condição ou doença e/ou os seus sintomas concomitantes.

[0073] Os termos "impedir", "prevenir" e "prevenção", conforme usados neste documento, referem-se a um método de retardar ou impedir o aparecimento de uma condição ou doença e/ou de seus sintomas associados, impedindo que o paciente adquira uma condição ou doença, ou reduzindo o risco de um paciente adquirir uma condição ou doença.

[0074] O termo "quantidade terapêuticamente eficaz" (ou mais simplesmente "quantidade eficaz"), conforme usado

neste documento, significa a quantidade de pHPL tratado termicamente da presente invenção, que é suficiente para conseguir o efeito terapêutico ou profilático desejado no indivíduo a ser administrado.

[0075] O termo "administração", ou uma variante do mesmo (por exemplo, "administrando") significa fornecer o pHPL tratado termicamente da invenção, isoladamente ou como parte de uma solução farmacologicamente aceitável, ao paciente no qual a condição, sintoma ou distúrbio deve ser tratado ou prevenido.

[0076] A presente invenção será mais bem compreendida com referência aos seguintes exemplos e figuras. Estes exemplos destinam-se a representar modalidades específicas da invenção e não pretendem limitar o escopo da invenção.

FIGURAS

[0077] **Figura 1: Observação morfológica das células LUHMES tratadas.** Imagens representativas de células LUHMES (x10) após o tratamento com pHPL, HT_pHPL e HT_pHPL-GB sem exposição à erastina (coluna da esquerda) ou com exposição à erastina (coluna da direita).

- pHPL : lisado de plaquetas humanas agrupadas.
- HT_pHPL: lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente.
- HT_pHPL-GB: lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente após tratamento com esferas de vidro e CaCl_2 .

[0078] **Figura 2: Ensaio de citometria de fluxo.** Viabilidade medida pelo teste de iodeto de propídio e

normalizada para o controle (células não tratadas) \pm erro padrão da média (EPM) (n = 4).

[0079] **Figura 3: Ensaio de resazurina.** Viabilidade medida pelo teste de resazurina e normalizada para o controle (células não tratadas) \pm EPM (n = 3).

[0080] **Figura 4: Evolução do peso corporal de camundongos fêmeas e machos tratados com Riluzol.** Machos WT: machos do tipo selvagem; Machos Tg: machos FVB-Tg (Sod1*G86R), Fêmeas WT: fêmeas do tipo selvagem; Fêmeas Tg: fêmeas FVB-Tg (Sod1*G86R).

[0081] **Figura 5: Evolução do peso corporal de camundongos machos tratados por veículo e HT_pHPL.** Veh: veículo; Machos WT: machos do tipo selvagem, Machos Tg: machos FVB-Tg (Sod1*G86R), HT_pHPL: lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente.

[0082] **Figura 6: Curva de sobrevivência de camundongos machos tratados por veículo, Riluzol e HT_pHPL.** Veh: veículo; Machos Tg: machos FVB-Tg (Sod1*G86R); HT_pHPL: lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente.

EXEMPLOS

Materiais e métodos

1. Preparação de lisado de plaquetas

[0083] pHPL: O lisado de plaquetas humanas agrupadas foi obtido a partir da Macopharma (Tourcoing, França) sob o nome de lisado de plaquetas humanas MultiPL'30®, referência BC0190020.

[0084] HT_pHPL: pHPL submetido a tratamento térmico a 56°C durante 30 minutos e purificado através de centrifugação (15 minutos, 10.000 g, 4°C).

[0085] HT_pHPL-GB: pHPL foi misturado com 0,5 g/L de esferas de vidro (BEAD-002-1kg de 2 mm de diâmetro, a partir da Labbox) e CaCl_2 (30 $\mu\text{g/mL}$ e concentração final de 23mM; C4901 cloreto de cálcio anidro em pó, da Sigma-Aldrich), sob agitação durante 1 hora.

[0086] Observou-se, dentro de 30 minutos, uma formação de coágulos que foram removidos após centrifugação (6.000 g, 30 minutos, 22°C). O sobrenadante foi aquecido a 56°C durante 30 minutos e centrifugado antes das alíquotas serem produzidas, e armazenadas a -80°C para uso posterior.

2. Manutenção e diferenciação de células LUHMES

[0087] As células LUHMES foram obtidas a partir no laboratório do Dr. Scholz (Universidade de Konstanz, Alemanha) e cultivadas conforme descrito¹².

[0088] Resumidamente, as células LUHMES não diferenciadas foram propagadas usando frascos plásticos de cultura celular Nunclon™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) e placas de múltiplos poços pré-revestidas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de poli-L-ornitina e 1 $\mu\text{g/mL}$ de fibronectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água destilada durante 3 horas a 37°C. Após remoção da solução de revestimento, os frascos de cultura foram lavados com água destilada estéril e secos ao ar.

[0089] As células foram cultivadas a 37°C em uma incubadora com atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO_2 . O meio de proliferação foi o meio Eagle da Advanced Dulbecco (Advanced DMEM)/F12 contendo suplemento 1 × N-2 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), 2 mM de L-glutamina (Gibco, Rockville, MD, EUA) e 40 ng/mL de bFGF recombinante

(P&D Systems). Ao atingir aproximadamente 80% de confluência, as células foram dissociadas com uma solução de tripsina a 0,025% (Gibco, Rockville, MD, EUA) e passadas a 3×10^6 células/frasco.

[0090] Para induzir a diferenciação em células neuronais, 2×10^6 de células LUHMES foram semeados e cultivados em balão T75 em meio de proliferação durante 48 horas, depois em Advanced DMEM/F12 contendo suplemento 1 \times N-2, 2 mM de L-glutamina (Gibco), 1 mM de dibutiril cAMP (Sigma-Aldrich), 1 μ g/mL de tetraciclina (Sigma-Aldrich) e 2 ng/mL de GDNF humano recombinante (R&D Systems). Após dois dias de cultura em condição de diferenciação, LUHMES foram cultivadas em placas de 24 poços para outros experimentos no sexto dia.

3. Avaliação da toxicidade e capacidade de proteção em neurônios dopaminérgicos dos diferentes lisados de plaquetas (PL).

[0091] A toxicidade e a capacidade protetora dos três lisados de plaquetas (pHPL, HT_pHPL, HT_pHPL-GB) foram avaliadas na linha celular dopaminérgica chamada LUHMES (após 6 dias de diferenciação).

[0092] Nos estudos neuroprotetores, os diferentes PL foram testados contra a morte celular induzida por erastina, ou seja, um indutor muito poderoso da morte celular em neurônios dopaminérgicos.

[0093] LUHMES foram diferenciados por 6 dias e os diferentes PL foram adicionados (a 5% em volume) ao meio, 1 hora antes do tratamento com erastina.

[0094] Em cada um dos estudos, a viabilidade foi avaliada por citometria de fluxo (iodeto de propídio) em placas de 24 poços ou por ensaio de resazurina em placas de 96 poços no sétimo 7 dia de diferenciação (24 horas após o tratamento com PL).

- Ensaio de citometria de fluxo

[0095] Experimentos foram realizados para quantificar a toxicidade e a capacidade neuroprotetora dos diferentes PL por incorporação de iodeto de propídio. LUHMES foram cultivadas em placas de 24 poços.

[0096] A citometria de fluxo usada para os experimentos é o modelo CyAn™ com um laser de 488 nm (Beckman Coulter).

- Ensaio de resazurina

[0097] Para confirmar os resultados obtidos pelo ensaio de citometria de fluxo, a viabilidade de LUHMES foi também medida através de um ensaio colorimétrico, o ensaio de resazurina (realizado em placas de 96 poços). Isso é concretizado diretamente na cultura celular, sem tripsinização (e a coleta das células), o que parecia interessante à luz dos experimentos realizados com a citometria de fluxo.

4. Medição de pH

[0098] Para medir o pH nos diferentes lisados de plaquetas, foram utilizadas tiras de teste de pH a partir da Macherey-Nagel (pH fixo 6,0 a 10,0, referência 921 22).

5. Dosagem de fibrinogênio

[0099] A concentração de fibrinogênio foi medida em diferentes concentrados de plaquetas (pHPL, HT_pHPL e

HT_pHPL-GB) por ELISA (R&D Systems). Para cada concentrado de plaquetas, as medições foram feitas em duplicado. As concentrações são expressas em ng/mL.

6. Análise estatística

[0100] Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA *one-way* após verificação da distribuição normal dos dados. Testes não paramétricos de Wilcoxon e Kruskal-Wallis foram realizados em caso de distribuição não normal. Um valor- $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Observação morfológica das células LUHMES tratadas

[0101] Tal como mostrado na Figura 1, sem exposição à erastina, a forma típica das células LUHMES no sétimo dia de diferenciação foi observada no controle. Foram observadas importantes alterações na morfologia celular na presença de pHPL, HT_pHPL, com uma propensão para "agrupamentos (*cluster*)" de células. Este aspecto não foi observado quando se utilizou HT_pHPL-GB.

[0102] Sob exposição à erastina, a forma típica das células perto da morte só é observada sem qualquer tratamento pelos lisados de plaquetas. Isso parecia indicar que HT_pHPL e HT_pHPL-GB foram capazes de prover neuroproteção. Células agrupadas ainda apareceram na presença de pHPL, mas não foram observadas quando as células foram tratadas com lisados de plaquetas submetidas a GB e tratamentos térmicos. Sem o intuito de ficar vinculado a nenhuma teoria, os inventores acreditam que isso confirma um possível papel negativo da

presença de fibrinogênio no pHPL na formação desses aglomerados.

Ensaio de citometria de fluxo

[0103] A adição de pHPL induziu uma aparente gelificação do meio. Isto não foi observado com outras preparações de lisado. Além disso, a análise por ensaio de citometria de fluxo requer a obtenção de células separadas (por tripsinização). Essa etapa foi muito difícil de alcançar quando as células foram tratadas com pHPL. No entanto, estudos de viabilidade foram possíveis com todos os tratamentos (Figura 2).

[0104] Nenhuma preparação de lisado teve um efeito tóxico. Somente o pHPL sozinho diminuiu ligeiramente a viabilidade ($\pm 85\%$) em comparação com o controle e outras preparações. Mas isso pode ser devido à dificuldade de separar as células.

[0105] Erastina matou eficientemente as células de controle, mas a morte celular não foi observada quando células LUHMES foram tratadas com HT_pHPL e HT_pHPL-GB. Portanto, concluímos que o lisado de plaquetas humanas agregadas de acordo com a invenção exibe forte capacidade de proteção nas células LUHMES.

Ensaio de resazurina

[0106] Em primeiro lugar, os valores de viabilidade celular apresentados sem exposição à erastina confirmaram que o lisado de plaquetas humanas tratado termicamente de acordo com a invenção parecia inofensivo para as células LUHMES.

[0107] Os resultados com pHPL foram possíveis devidos a um artefato no experimento. Na verdade, a gelificação do meio (provavelmente devido ao fibrinogênio presente em pHPL) parece inibir a mistura de resazurina ao meio, prevenindo a penetração de resazurina nas células e, portanto, conduzindo a uma falta de detecção (a perda de viabilidade de aproximadamente 15% não corresponde à observação microscópica, mostrando que quase todas as células nestes poços apresentaram as morfologias esperadas de células vivas).

[0108] Erastina matou eficientemente as células LUHMES nas duas doses testadas e o lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente foi capaz de impedir o seu efeito tóxico (uma vez mais, o problema de absorção de resazurina pelas células, devido ao tratamento com pHPL é observável).

Teor de fibrinogênio

[0109] Os resultados da concentração de fibrinogênio para cada concentrado de plaquetas são apresentados na Tabela 1 abaixo:

| | Concentração (ng/mL) |
|------------|----------------------|
| pHPL | 503810 |
| HT_pHPL | 14 |
| HT_pHPL-GB | 11 |

Tabela 1

[0110] Os resultados exibem que a etapa de tratamento térmico de acordo com a invenção leva a uma redução drástica da concentração de fibrinogênio no pHPL. De fato, mais de 99,9% do fibrinogênio foi removido. Pelo menos, a combinação dos dois tratamentos é capaz de reduzir a concentração de

fibrinogênio no pHPL em grau maior do que a etapa de tratamento térmico sozinha.

[0111] Assim, através da etapa de tratamento térmico, o lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente obtido, ao contrário do pHPL, pode ser considerado livre de fibrinogênio. Como o lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente deve ser usado para administração cerebral, essa característica é particularmente vantajosa porque o líquido cefalorraquidiano contém menos de 1 mg/mL de proteínas. Assim, quanto menor é a concentração de fibrinogênio no pHPL, melhor é a prevenção da sobrecarga de proteína.

pH do meio

[0112] As tiras ofereceram os seguintes resultados:

- pH entre 7 e 7,3 para pHPL;
- pH 7 para HT_pHPL; e
- pH 6 para HT_pHPL-GB.

[0113] A diminuição do pH em HT_pHPL-GB pode ser causada pelo CaCl_2 usado no protocolo.

[0114] No entanto, não foi observada modificação do pH após o tratamento com os lisados de plaquetas (mostrados pelo indicador vermelho de fenol).

Toxicidade e capacidade de proteção em neurônios dopaminérgicos

[0115] Estes resultados mostram, por um lado, que os lisados de plaquetas humanas agrupadas tratados termicamente (HT_pHPL e HT_pHPL-GB) não induzem toxicidade em células LUHMES.

[0116] Além disso, quando as células são tratadas com erastina, HT_pHPL e HT_pHPL-GB de acordo com a invenção protegem as células da morte por ferroptose. Este resultado foi validado com dois ensaios diferentes.

[0117] Em conjunto, estes resultados mostram que HT_pHPL e HT_pHPL-GB são preparações muito boas, as quais protegem as células dopaminérgicas da morte induzida por uma neurotoxina potente e sem induzir modificações morfológicas. Além disso, o pHPL tratado termicamente deve ser usado em bioterapia, especialmente através da administração cerebral. Assim, o fato de o pHPL tratado termicamente estar livre de fibrinogênio, bem como de enzimas proteolíticas, demonstra o potencial do pHPL tratado termicamente para esse fim.

EXEMPLO 2: Experimento *in vivo*

[0118] Este experimento *in vivo* é realizada com o intuito de demonstrar o efeito neuroprotetor do lisado de plaquetas humanas agregadas tratado termicamente de acordo com a invenção. O efeito é comparado com o efeito obtido com o medicamento Riluzol, ou seja, o único tratamento eficaz conhecido contra ELA.

[0119] Todos os experimentos foram realizados de acordo com os "Princípios do Cuidado com Animais de Laboratório" (publicação NIH 86-23, revisada em 1985) e com o atual quadro legislativo e regulamentar da França e União Europeia no que tange experimentos com animais (Diretiva do Conselho das Comunidades Europeias 86/609).

[0120] Os camundongos envolvidos foram camundongos FVB-Tg (Sod1*G86R) M1Jwg/J a partir de laboratórios JAX. Os animais foram alojados em grupos (10 por gaiola) em uma sala

com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) com um ciclo de 12/12 horas de claro/escuro. Comida e água foram fornecidas *ad libitum*. Após recepção, os animais tiveram um período de habituação de 7 dias sem manipulação. A criação foi realizada (desde 2013 de maio) nas instalações da SOPF e a genotipagem é realizada por qPCR (a partir da biópsia da cauda). Os animais são identificados com brincos.

Materiais e Métodos

Injeção ICV intermitente e administração de Riluzol

[0121] Os camundongos foram manuseados e pesados aos 60 dias de idade. O implante de cânula intracerebroventricular (ICV) por estereotaxia começa nesta data e os camundongos são acostumados durante 1 semana.

[0122] O medicamento Riluzol foi misturado em uma dieta definida e formulado em pellets. Riluzol foi administrado *per os*. (Gurney e outros, *Neurology*, 1998). Em seguida, foram avaliados duas vezes por semana (peso corporal e neurocore) a partir do dia 67 até a morte.

Tratamento em machos SOD1m-FVB e WT-FVB:

[0123] Dois tratamentos diferentes são realizados desde o dia 75 até a morte:

- HT_pHPL preparado como descrito no exemplo 1 e a 1g/L, pH 7,4 *versus* veículo. A dose de HT_pHPL administrado por ICV intermitente foi de 4 μL , três vezes por semana a uma taxa de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Tempo de injeção: 8 minutos;

- O medicamento Riluzol foi administrado por via oral (44 mg/kg/dia).

Grupos experimentais:

Machos WT-FVB + veículo

Machos WT-FVB + HT_pHPL

Machos WT-FVB + Riluzol

Machos SOD1m-FVB + veículo

Machos SOD1m-FVB + HT_pHPL

Machos SOD1m-FVB + Riluzol

Fêmeas WT-FVB + Riluzol

Fêmeas SOD1m-FVB + Riluzol

Resultados

1. Peso corporal - Riluzol

[0124] Tal como mostrado na Figura 4, ingestão restrita de alimentos não tem efeito na evolução do peso corporal em camundongos WT. Em camundongos Tg, podemos observar uma diminuição do peso corporal no dia 88 para machos e fêmeas.

2. Peso Corporal - HT_pHPL

[0125] Tal como mostrado na Figura 5, o tratamento com HT_pHPL não teve efeito em camundongos TP. Uma diminuição do peso corporal é observado no dia 88 em camundongos Tg tratados com HT_pHPL, o referido tratamento também induz um atraso importante no peso corporal *pre-morte* nos machos a partir do dia 124.

3. Curva de sobrevivência

[0126] Tal como mostrado na Figura 6, o fármaco Riluzol tem um efeito na morte iniciado em machos Tg (a partir do dia 91 até o dia 102), mas não têm efeito na duração de sobrevivência.

[0127] De acordo com o atraso no peso corporal *pre-morte*, o tratamento com HT_pHPL atrasou o início da morte em 14 dias (dia 91 para dia 105) e prolongou a duração de

sobrevivência em até 48 dias para machos Tg (dia 123 para dia 171).

[0128] Em conclusão, experiências *in vivo* demonstram que o lisado de plaquetas humanas tratado termicamente de acordo com a invenção exibe um efeito neuroprotetor. Estes resultados obtidos na esclerose lateral amiotrófica podem ser aplicados a outros distúrbios em que também é observada uma perda de neurônios.

REFERÊNCIAS

1. Huang E. J., Reichardt L. F.: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:677-736.

2. Mohapel P., Frielingsdorf H., Haggblad J., *et al.*: Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induce striatal neurogenesis in adult rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neuroscience* 2005;132:767-76.

3. Gonzalez-Aparicio R., Flores J. A., Fernandez-Espejo E.: Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor beta 1 is enhanced after co-infusion in rats. *Experimental Neurology* 2010;226:136-47.

4. Kirik D., Georgievska B., Bjorklund A.: Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2004;7:105-10.

5. Golebiewska E. M., Poole A. W.: Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 2014.

6. Burnouf T., Goubran H. A., Chen T. M., et al.: Blood-derived biomaterials and, platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev* 2013;27:77-89.

7. Burnouf T., Strunk D., Koh M., et al.: Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 2016;76:371-87.

8. Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., et al.: Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke. *Thromb Haemost* 2013;110:323-30.

9. Ryu J. K., Davalos D. e Akassoglou K.: Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *Journal of thrombosis and heamostasis*. 2009; Vol. 7, issue supplement s1, 151-154.

10. Tsu-Bi Shih D., Burnouf T.:Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *New Biotechnology* 2015; Vol. 32, No. 1.

11. Victor E. Santo, Manuela E. Gomes, Joao F. Mano e Rui L. Reis.: Chitosan-chondrotin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. December 2012, vol.6, issue S3, pages s47-s59.

12. Scholz D., Poltl D., Genewsky A., et al.: Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *J Neurochem* 2011;119:957-71.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de um lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente, **caracterizado pelo fato** de que o referido processo compreende as etapas de:

a) Fornecer um lisado de plaquetas humanas agrupado (pHPL),

b) Tratar termicamente o lisado de plaquetas humanas agrupadas a uma temperatura de 50 °C a 70 °C durante 20 a 40 minutos,

c) Purificar o lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente da etapa b).

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de que a purificação da etapa c) é realizada por centrifugação ou filtração.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo fato** de que compreende ainda após a etapa b) uma etapa de inativação viral ou remoção de vírus.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado pelo fato** de que a etapa de inativação viral ou remoção de vírus é realizada por tratamento com detergente solvente (tratamento S/D), somente tratamento com detergente, pasteurização, tratamento a vapor ou tratamento por vaporização, tratamento com baixo pH, tratamento com ácido caprílico e nanofiltração.

5. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo fato** de que compreende ainda antes da etapa b) de tratamento térmico, uma etapa de tratamento que induz uma ativação da cascata de coagulação.

6. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo fato** de que o lisado de plaquetas humanas agrupadas é obtido de pelo menos dois lisados de plaquetas diferentes coletados de diferentes doadores.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo fato** de que o lisado de plaquetas humanas agrupadas é obtido de pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 100, pelo menos 140, pelo menos 180, pelo menos 200 ou de pelo menos 240 lisados de plaquetas diferentes coletados de diferentes doadores.

8. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 7, **caracterizado pelo fato** de que o lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL) fornecido na etapa a) é preparado pelo método que compreende as seguintes etapas de:

- iv) fornecer concentrados de plaquetas,
- v) lisar separadamente cada concentrado de plaquetas da etapa i), e
- vi) misturar os lisados resultantes do passo ii) para obter um lisado de plaquetas humanas agrupadas.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo fato** de que o concentrado de plaquetas fornecido na etapa i) é submetido a um tratamento de leucodepleção e/ou a um tratamento de inativação viral/patógeno.

10. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente **caracterizado pelo fato** de ter um teor de fibrinogênio inferior a 5%, preferencialmente inferior a 3 e mais preferencialmente inferior a 1% em peso do teor de

fibrinogênio do pHPL não tratado termicamente e com um teor de fibrinogênio inferior a 50 ng/mL, preferencialmente inferior a 30 ng/mL e mais preferencialmente inferior a 15 ng/mL.

11. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente, de acordo com a reivindicação 10, ou preparado de acordo com o processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado pelo fato** de ser para uso como um medicamento.

12. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente para uso, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo fato** de ser no tratamento de doenças neurológicas.

13. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente para uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo fato** de que os distúrbios neurológicos são selecionados a partir de distúrbios neurodegenerativos, distúrbios neuroinflamatórios, distúrbios do neurodesenvolvimento, distúrbios neurovasculares e insultos cerebrais.

14. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente para uso, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo fato** de que os distúrbios neurológicos são distúrbios neurodegenerativos selecionados a partir de esclerose múltipla (EM), doença de Parkinson (PD), doença de Huntington (HD), esclerose lateral amiotrófica (ELA), acidente vascular cerebral, degeneração macular relacionada à idade (DMRI), doença de Alzheimer (DA), demência vascular,

demência frontotemporal, demência semântica e demência com corpos de Lewy.

15. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente para uso, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo fato** de que os distúrbios neurodegenerativos são selecionados a partir da doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, degeneração macular relacionada à idade e doença de Alzheimer.

16. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente para uso, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo fato** de que o distúrbio neurológico é um insulto cerebral selecionado a partir de hipóxia ou lesão cerebral traumática.

17. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, **caracterizado pelo fato** de que o pHPL é administrado por via intratecal, intraocular, intranasal ou intra-cerebroventricular.

18. Lisado de plaquetas humanas combinado tratado termicamente para uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo fato** de que o pHPL é administrado por via intra-cerebroventricular, mais especificamente no ventrículo lateral direito, de preferência fechado ao forame intraventricular e mais preferencialmente no terceiro ventrículo.

19. Lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente para uso, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado pelo fato** de que o referido pHPL é adaptado para ser administrado com uma bomba de medicação programável.

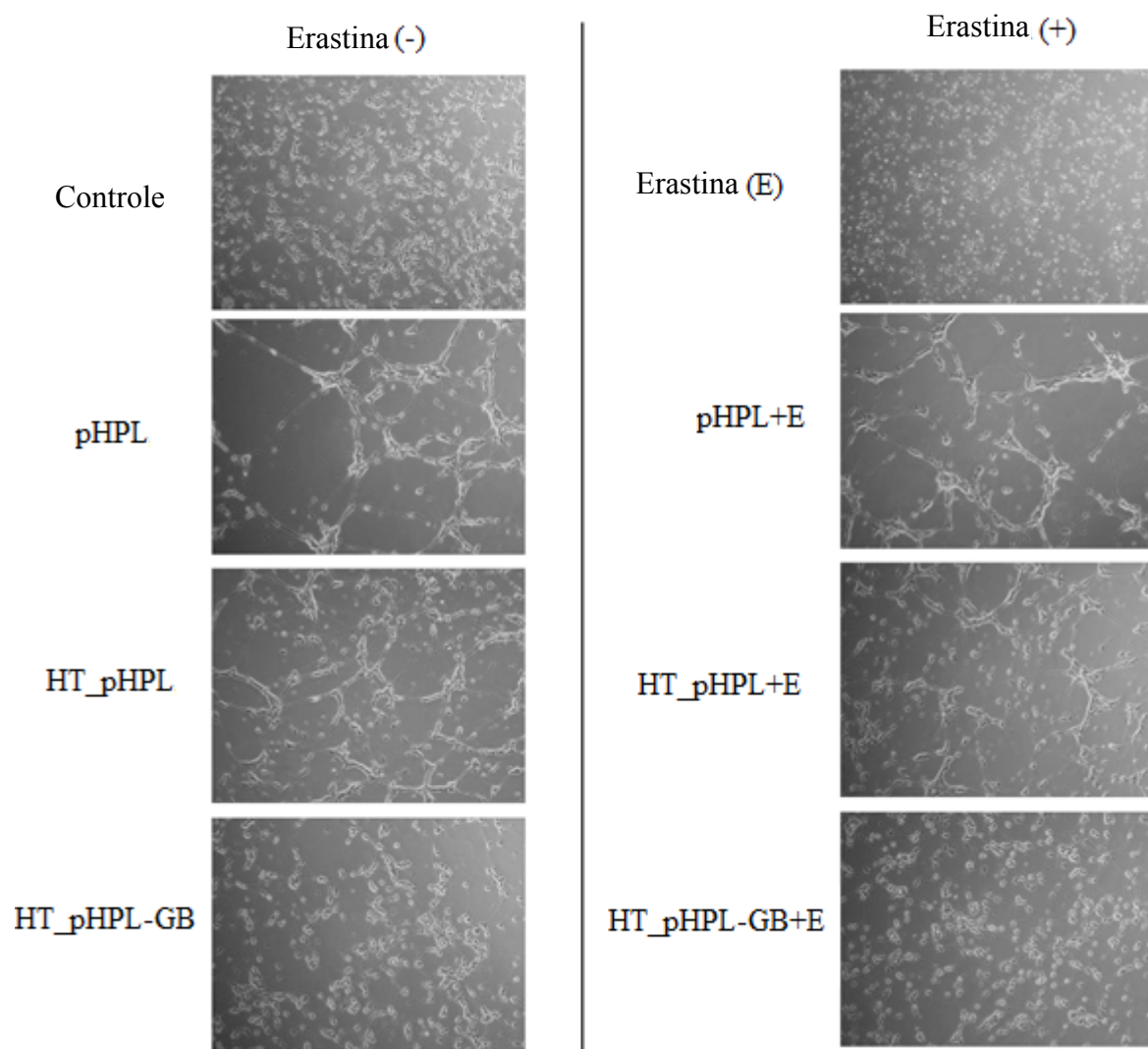
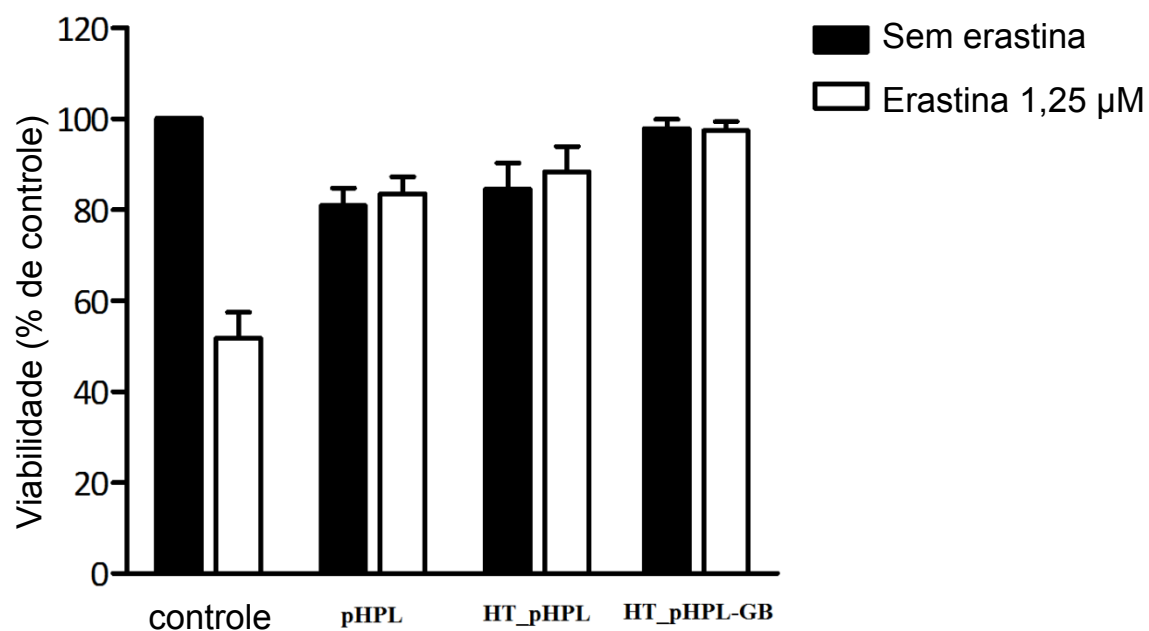


FIGURA 1

*FIGURA 2*

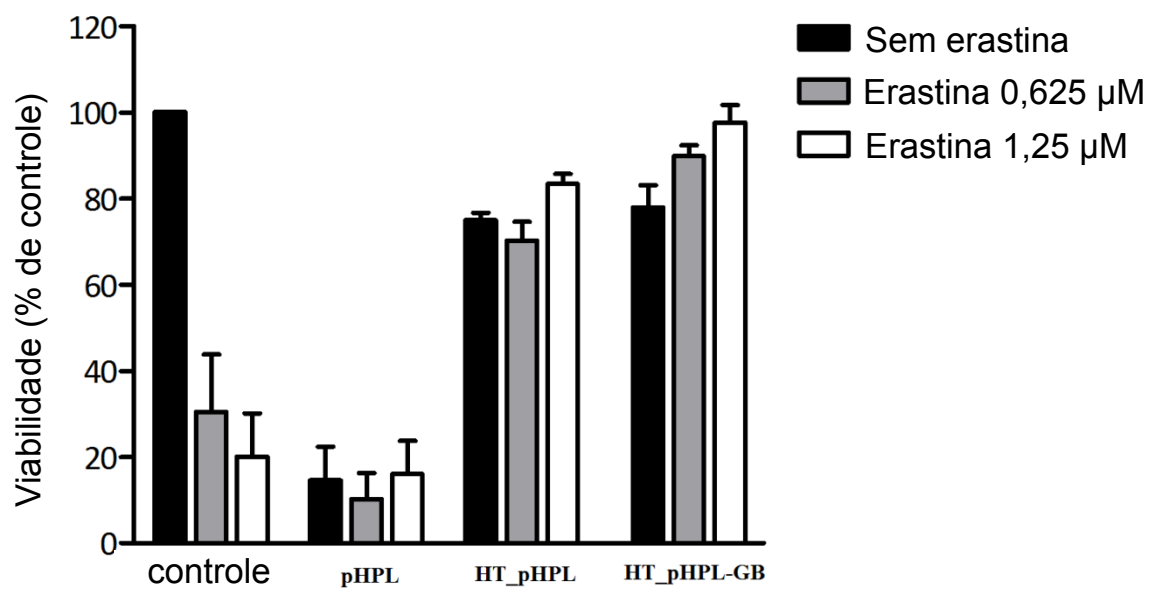


FIGURA 3

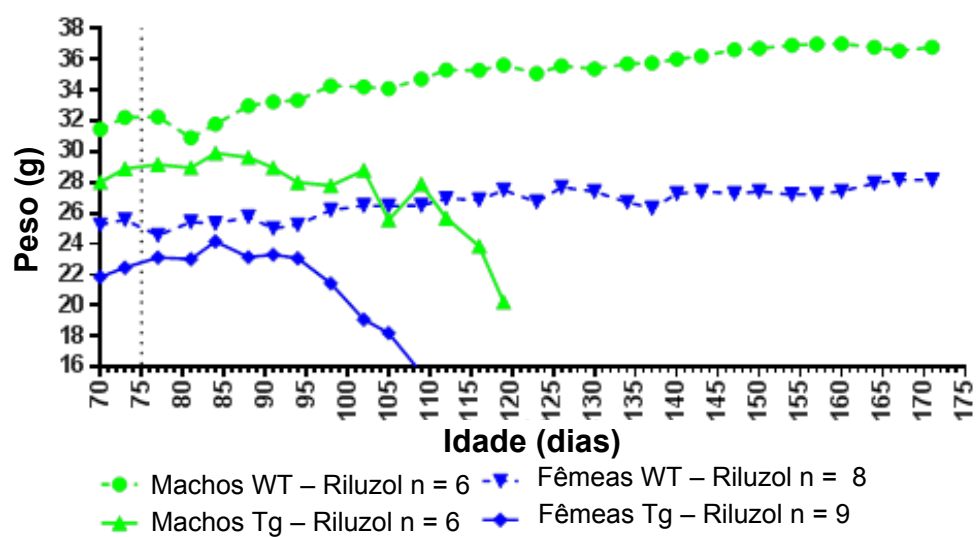


FIGURA 4

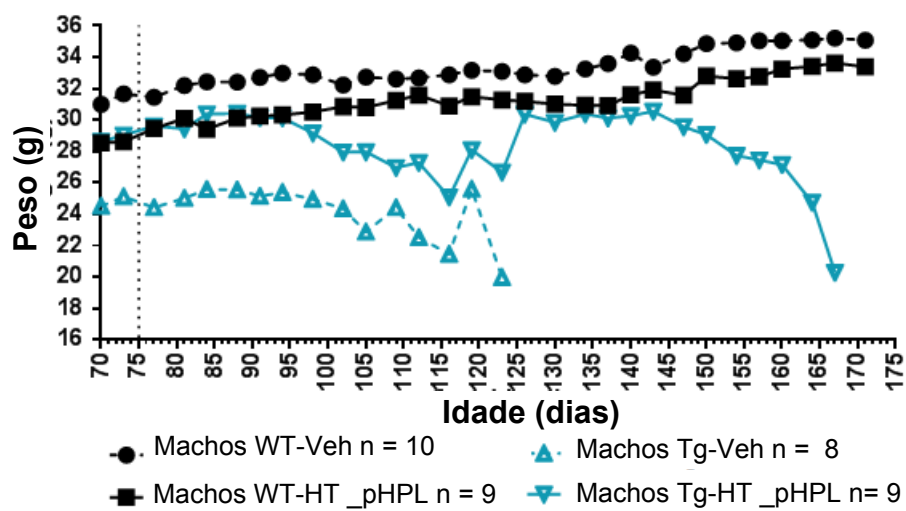


FIGURA 5

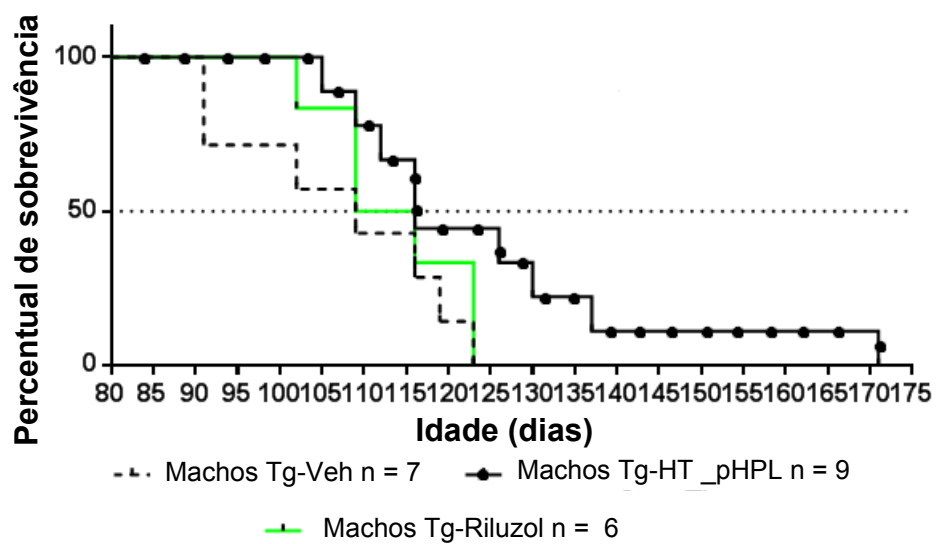


FIGURA 6

RESUMO

**"PROCESSO PARA PREPARAR UM LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS
AGRUPADAS, LISADO DE PLAQUETAS HUMANAS AGRUPADAS E SEU USO
PARA TRATAR TRANSTORNOS NEUROLÓGICOS"**

Processo para preparar um lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente, o referido processo compreendendo as etapas de:

- a) Fornecer um lisado de plaquetas humanas agrupadas (pHPL),
- b) Tratar termicamente o lisado de plaquetas humanas reunido a uma temperatura de 50 °C a 70 °C durante 20 a 40 minutos,
- c) Purificar o lisado de plaquetas humanas agrupadas tratado termicamente da etapa b).