



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

(21) BR 112020006316-9 A2



(22) Data do Depósito: 27/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/09/2020

(54) **Título:** PROCESSO PARA PREPARAR UMA FRAÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS, FRAÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS E SEU USO PARA TRATAR TRANSTORNOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/19; A61P 25/28.

(30) **Prioridade Unionista:** 27/09/2017 EP 17306284.5.

(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.

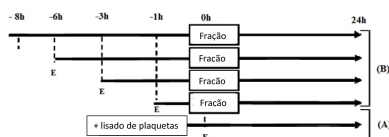
(72) **Inventor(es):** DAVID DEVOS; THIERRY BURNOUF; JEAN-CHRISTOPHE DEVEDJIAN; MING-LI CHOU; FLORE GOUEL.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2018076244 de 27/09/2018

(87) **Publicação PCT:** WO WO 2019/063683 de 04/04/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 27/03/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção se refere a um processo para preparar uma fração de lisado de plaquetas, o referido processo compreendendo as etapas de: 1) fornecer um lisado de plaquetas, 2) coletar o referido lisado de plaquetas em uma fração, em que os componentes exibem um peso molecular máximo de 100 kDa, em uma fração específica de lisado de plaquetas e seu uso como fármaco.



**PROCESSO PARA PREPARAR UMA FRACÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS,
FRAÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS E SEU USO PARA TRATAR
TRANSTORNOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Campo da Invenção

[001] A presente invenção se refere a um processo para obter uma fração de lisado de plaquetas, a própria fração de lisado de plaquetas e seu uso no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central, como distúrbios neurodegenerativos, neuroinflamatórios, neurodesenvolvimentais e / ou neurovasculares (ou seja, AVC), mas também as consequências de insultos cerebrais, como lesão cerebral traumática ou hipóxia.

Antecedentes da Invenção

[002] Desenvolver uma “estratégia modificadora de doença” eficaz que forneça neuroproteção, neurorestabelecimento e neurogênese para tratar distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica (ELA) e doença de Alzheimer (DA), é urgentemente necessária, considerando os enormes impactos sociais e econômicos que esses distúrbios impõem aos pacientes e prestadores de cuidados.

[003] Também é amplamente esperado o desenvolvimento de tratamentos eficazes que proporcionem neurorestoração e neurogênese, a fim de compensar a perda de neurônios e os insultos do sistema nervoso central, como hipóxia grave após o parto ou parada cardíaca ou lesão cerebral traumática grave, considerando a falta de tratamentos validados.

[004] Há evidências substanciais de que as

neurotrofinas, como ativadores e moduladores das vias de sinalização neuronal, representam uma estratégia terapêutica lógica para distúrbios neurológicos. A aplicação de fatores de crescimento neurotróficos recombinantes únicos forneceu resultados encorajadores para proteção e reparo neuronal em modelos de células e animais.

[005] O fator de crescimento derivado de plaquetas-CC (PDGF-CC) provou ser um fator neuroprotetor potente em vários modelos animais de lesão neuronal, enquanto o PDGF-BB e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), administrados por via intra-cerebro-ventricular (ICV), neurogênese estimulada. Além disso, a administração sistêmica de BDNF em um modelo fototrombótico de AVC focal pode induzir neurogênese e melhorar a função sensório-motora. O fator de crescimento transformador- β (TGF- β) poderia promover o desenvolvimento e a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos e a neuroproteção em modelos animais de parkinsonismo, além de aumentar o efeito trófico do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) em ratos hemiparkinsonianos¹.

[006] Estudos pré-clínicos mostraram neuroproteção pelo fator de crescimento de fibroblastos básicos (b-FGF) e fator de crescimento endotelial vascular β (VEGF- β), e promoção da neuroproteção e neurorestoração pelo GDNF. Infelizmente, todos os estudos clínicos randomizados que envolvem a administração de fatores de crescimento únicos em altas doses e ICV falharam em produzir efeitos clínicos positivos substanciais. Atualmente, a administração de neurotrofinas únicas nessas patologias neurodegenerativas

complexas e multifacetadas é insuficiente para produzir resultados terapêuticos significativos.

[007] Assim, é necessário desenvolver uma nova abordagem que provavelmente seria mais poderosa, segura de usar e fácil de produzir, mas é conceitualmente desafiador, em particular, buscar a aprovação regulatória, justificando assim estratégias mais pragmáticas inspiradas em outros campos da medicina regenerativa.

[008] Os concentrados de plaquetas são produtos terapêuticos bem estabelecidos, na lista modelo de medicamentos essenciais da OMS, geralmente 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 na reparação de tecidos.

[009] A gama de aplicações em medicina regenerativa³ e terapia celular⁴, em que as plaquetas e lisados de plaquetas são avaliadas está em expansão. O benefício terapêutico das plaquetas na cicatrização de tecidos é multifatorial e resulta da miríade de mediadores bioativos armazenados principalmente nos grânulos α e atuando em sinergia. Isso inclui fatores de crescimento neurotróficos, como PDGF (isoformas -AA, -AB e -BB), BDNF, VEGF, TGF- β , bFGF ou fator de crescimento do epitélio (EGF). Foi demonstrado recentemente que a administração 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-

lesional, levando a melhores resultados funcionais e redução de lesões e sugerindo efeitos neuroprotetores⁵.

[0010] Além disso, os lisados plaquetários contêm uma enorme quantidade de moléculas e compostos que não estão totalmente caracterizados, mas sabe-se que o lisado plaquetário contém fibrinogênio transmitido por plasma, uma proteína que desempenha um papel causador de distúrbios neurológicos como um potente indutor de inflamação e um inibidor de crescimento de neurites. Esta pode ser a razão pela qual a aplicação de lisado de plaquetas, ou um produto derivado de lisado de plaquetas, no campo de distúrbios do sistema nervoso central em humanos, como doença de Parkinson ou esclerose lateral amiotrófica, ainda não foi relatada.

Sumário da Invenção

[0011] Assim, é do crédito dos Requerentes ter sido capaz de descobrir um novo produto derivado de lisado de plaquetas, útil, em particular, no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central e exibindo propriedades que ainda não foram identificadas. Em particular, os Requerentes conseguiram obter diferentes frações de lisado de plaquetas que exibem um forte efeito neuroprotetor.

[0012] Em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a um processo para preparar uma fração de lisado de plaquetas, o referido processo compreendendo as etapas de:

- 1) fornecer um lisado de plaquetas,
- 2) coletar do referido lisado de plaquetas uma fração de lisado de plaquetas, em que os componentes exibem um peso molecular máximo de 100 kDa.

[0013] De acordo com a invenção, a primeira etapa do processo consiste em fornecer um lisado de plaquetas. Este lisado de plaquetas pode ser um lisado de grânulos de plaquetas (PPL) ou um lisado de plaquetas humano agrupado (pHPL). De preferência, o lisado de plaquetas é um lisado de plaquetas humano agrupado (pHPL).

[0014] Tanto o PPL quanto o pHPL podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos do concentrado de plaquetas (PC), que induzem a liberação de fatores de crescimento e outras moléculas ativas.

[0015] Em uma primeira concretização, o lisado de plaquetas fornecido na etapa 1) é um lisado de plaquetas (PPL). O PPL pode ser preparado como descrito no estado da técnica⁶. Pode, por exemplo, ser preparado da seguinte forma:

- i) Fornecer um concentrado de plaquetas (PC),
- ii) centrifugar o referido concentrado de plaquetas, de modo a obter um sedimento de plaquetas e um primeiro sobrenadante,
- iii) Remover o sobrenadante e suspensão do sedimento em tampão fisiológico,
- iv) Congelar-descongelar o referido grânulo suspenso,
- v) Centrifugar a suspensão obtida na etapa iv), de modo a obter um lisado de plaquetas e um segundo sobrenadante.

[0016] O concentrado de plaquetas fornecido na etapa i) pode ser obtido por métodos de coleta padrão adequados a partir de fontes plaquetárias autólogas ou alogênicas, em particular, a partir de sangue total ou por procedimentos de aférese, e suspensas no plasma, ou uma combinação de solução aditiva de plasma e plaquetas, ou apenas solução aditiva de

plaquetas⁷. Além disso, o concentrado de plaquetas pode ser reduzido de leucócitos.

[0017] Os tampões fisiológicos adequados utilizados na etapa iii) são, por exemplo, solução salina tampão fosfato (PBS), tampão HEPES, tampão Tris-HCl ou tampão acetato de sódio, ou solução salina fisiológica.

[0018] O lisado de grânulos de plaquetas (PPL) pode ser PPL fresco (PPLF) ou PPL expirado (PPLE), preferencialmente, PPLF. O termo PPL fresco refere-se ao lisado de grânulos de plaquetas preparado a partir de concentrados de plaquetas processados dentro de 5 dias após a coleta (não expirado). O termo PPL expirado se refere ao lisado de grânulos de plaquetas preparados a partir de concentrados de plaquetas processados durante 5 dias de armazenamento.

[0019] De acordo com uma segunda concretização, o lisado de plaquetas fornecido na etapa 1) é um lisado de plaquetas humano agrupado (pHPL). Por exemplo, o pHPL pode ser preparado pelo método que compreende as seguintes etapas:

- a) fornecer concentrados de plaquetas,
- b) lisar separadamente cada concentrado de plaquetas da etapa a), e
- c) misturar os lisados resultantes da etapa b) a fim de obter um lisado de plaquetas humano agrupado.

[0020] Os concentrados de plaquetas fornecidos na etapa a) podem ser provenientes de diferentes doadores e podem ser obtidos por métodos de coleta padrão adequados a partir de fontes plaquetárias alogênicas. Particularmente, o concentrado de plaquetas pode ser obtido do sangue total

usando a técnica de camada leuco-plaquetária ou plasma rico em plaquetas (PRP), ou pode ser coletado pela técnica de aférese. De preferência, o concentrado de plaquetas é produzido a partir de sangue total usando a técnica de camada leuco-plaquetária ou (PRP)⁸.

[0021] No "método PRP", o sangue total anticoagulado é centrifugado usando um giro suave sob condições validadas para segregar glóbulos vermelhos (RBC) da metade superior contendo uma mistura de plaquetas e plasma, chamada PRP. As plaquetas são então concentradas por centrifugação por centrifugação 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 ressuspenso no plasma. No método "camada leuco-plaquetária", o sangue total anticoagulado é centrifugado usando um giro rígido com curvas de aceleração e desaceleração validadas para separar o plasma "sem células" na camada superior, uma camada intermediária chamada camada leuco-plaquetária (BC) e glóbulos vermelhos na Camada inferior (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 a centrifugação por centrifugação leve com curvas de aceleração e desaceleração validadas. O sobrenadante de PRP é então colocado no armazenamento de plaquetas e pode ser armazenado a 22 +/- 2 ° C.

[0022] No método de aférese, os concentrados de plaquetas podem ser obtidos através de um dispositivo médico extracorpóreo usado na doação de sangue que separa as

plaquetas e devolve outras porções de sangue ao doador.

[0023] O plasma usado para suspender o concentrado no "método PRP", o plasma retornado à camada BC no método "camada leuco-plaquetária" 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, preferencialmente, por uma mistura entre plasma e PAS. A referida mistura entre plasma e PAS pode conter de cerca de 30% a 40% em peso de plasma e de cerca de 70% a 60% em peso de PAS.

[0024] O concentrado de plaquetas fornecido na etapa a) 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.

[0025] O concentrado de plaquetas fornecido na etapa a) pode ser submetido a uma etapa do tratamento de inativação viral / patógeno antes da lise. O tratamento de inativação viral / patógeno aplicado ao concentrado de plaquetas pode ser selecionado no sistema Intercept® Blood (da Cerus Corporation), no sistema Mirasol® PRT (da Terumo BCT) ou no THERAFLEX-UV (da Macopharma). Esses procedimentos são bem conhecidos por um técnico versado no assunto e alvo, com ou sem a adição de um agente fotoativador, a alteração de ácidos nucleicos.

[0026] O concentrado de plaquetas também pode ser submetido a um tratamento de leucodepleção e a um tratamento de inativação de vírus / patógeno. De preferência, o tratamento de leucodepleção é realizado antes do tratamento

de inativação viral / patógeno.

[0027] A etapa b) de lisar separadamente cada concentrado de plaquetas pode ser alcançada por qualquer método conhecido no estado da técnica. Por exemplo, a lise plaquetária pode ser alcançada por um ou mais ciclos de congelamento / descongelamento, pela ativação plaquetária induzida pela adição de trombina ou CaCl_2 , por sonicação ou por tratamento com solvente / detergente (S / D). De preferência, a etapa b) da lise é alcançada por um ou mais ciclos de congelamento / descongelamento e, mais preferencialmente, por pelo menos três ciclos. Quando a lise é alcançada por um dos métodos anteriores, também pode ser realizada uma etapa de centrifugação e filtração para remover os resíduos celulares.

[0028] Em seguida, a etapa c) consiste em misturar os lisados para obter um lisado de plaquetas humano reunido, também chamado pHPL. Assim, o conjunto de HPL é obtido misturando os concentrados de plaquetas lisados de pelo menos 2 lisados de plaquetas de diferentes doadores. De preferência, o conjunto de HPL é obtido misturando 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 lisados de plaquetas diferentes coletados de diferentes doadores.

[0029] Um lisado de plaquetas humano agrupado adequado (pHPL) para o processo da invenção pode ser qualquer lisado de plaquetas humanos agrupado de estabelecimentos de sangue ou de fornecedores comerciais. Por exemplo, o lisado

de plaquetas humano agrupado pode ser obtido da Macopharma (Tourcoing, França; lisado de plaquetas humano MultiPL'30®), da Cook-Regentec (Indianápolis, EUA; lisado de plaquetas humanos Stemulate ®), da Stemcell Technologies (Grenoble, França); Lisado de plaquetas humanas) ou também da Sigma-Aldrich (Lisado de plaquetas humanos PLTMax®).

[0030] De acordo com esta segunda concretização, o pHPL pode ser submetido a um tratamento que induz uma ativação da cascata de coagulação. Por exemplo, o pHPL pode ser misturado com contas de vidro (GB) e CaCl_2 sob agitação ou usando CaCl_2 sozinho. Este tratamento leva a uma formação de coágulo que é removida após a centrifugação e o pHPL resultante é, portanto, livre de fibrinogênio. Sem querer estar vinculado a nenhuma teoria, os inventores acreditam que este tratamento contribui para diminuir a toxicidade e melhorar o efeito neuroprotetor da fração de lisado de plaquetas obtida de acordo com a invenção.

[0031] A segunda etapa do processo consiste em coletar uma fração de lisado de plaquetas em que os componentes exibem um peso molecular máximo de 100 kDa. Portanto, a fração de lisado de plaquetas tratado termicamente coletada não pode conter componentes com um peso molecular superior a 100 kDa.

[0032] No significado da presente invenção, uma fração de lisado de plaquetas em que os componentes exibem um peso molecular máximo de X kDa é denominada "fração de lisado de plaquetas X fração de kDa" ou também "fração X kDa", por exemplo, "fração de lisado de plaquetas 100 kDa" ou "Fração de 100 kDa".

[0033] Particularmente, a etapa de coleta é realizada para obter uma fração de lisado de plaquetas, em que os componentes exibem um peso molecular máximo de 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 80 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa, de 30 kDa, de 20 kDa, de 10 kDa, de 5 kDa, de 3 kDa ou de 1 kDa. Em outros termos, a fração de lisado de plaquetas não pode conter componentes com peso molecular superior a 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 10 kDa, 5 kDa , 3 kDa ou superior a 1 kDa.

[0034] De acordo com este segundo passo, as frações assim obtidas são preferencialmente a fração de lisado de plaquetas de 50 kDa, a fração de lisado de plaquetas 30 kDa, a fração de lisado de plaquetas 20 kDa, a fração de lisado de plaquetas 10 kDa e a fração de lisado de plaquetas 10 kDa e a fração de lisado de plaquetas 3 kDa, de preferência a fracção de 10 kDa de lisado de plaquetas e a fracção de 3 kDa de lisado de plaquetas, e ainda mais preferencialmente a fracção de 3 kDa de lisado de plaquetas.

[0035] Surpreendentemente e inesperadamente, os inventores descobriram que a fração de lisado de plaquetas, de acordo com a invenção exibe uma forte atividade neuroprotetora, embora o lisado de plaquetas tenha sido submetido a uma etapa de coleta para remover componentes. De fato, as frações, assim obtidas ainda exercem um efeito neuroprotetor, enquanto se esperava que a remoção de alguns componentes de acordo com seu peso molecular levasse à perda do referido efeito. Ainda surpreendentemente, a atividade neuroprotetora é obtida para as menores frações para as quais se acreditava que a falta de componentes com alto peso

molecular teria sido prejudicial para a atividade neuroprotetora.

[0036] Assim, a presente invenção representa um grande avanço para fornecer um tratamento alternativo dos distúrbios do sistema nervoso central.

[0037] A etapa de coleta pode ser realizada por qualquer método conhecido no estado da técnica que leve à separação e / ou concentração de componentes contidos em um líquido de acordo com seu peso molecular.

[0038] Em uma concretização, a etapa de coleta pode consistir no fracionamento do sobrenadante obtido por centrifugação do lisado de plaquetas, a fim de coletar a chamada fração de 100 kDa do lisado de plaquetas. Nesta modalidade, o fracionamento pode ser realizado por ultrafiltração. De acordo com este método de ultrafiltração, pode ser usado um filtro centrífugo com membrana vertical com um limite de 100 kDa. O filtro centrífugo é assim cheio com o sobrenadante obtido após o terceiro passo e é sujeito à centrifugação. O rotor angular, a velocidade de rotação e o tempo de rotação podem ser determinados por um técnico versado no assunto. Além disso, um técnico versado no assunto pode adaptar o ponto de corte utilizado para obter a fração desejada de lisado de plaquetas de acordo com a invenção.

[0039] A fração de lisado de plaquetas da invenção tem um teor reduzido de proteínas. Pela expressão "teor reduzido de proteínas", significa que a referida fração contém menos que 1,5 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ de proteínas, preferencialmente menos que 1,0 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ e mais preferencialmente menos que 0,70 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. O teor de proteína pode ser determinado por

qualquer método conhecido na técnica e, por exemplo, pelo teste de proteína Lowry ou por ELISA.

[0040] Especificamente, a fração de 3 kDa do lisado de plaquetas pode apresentar um conteúdo de proteína de cerca de 0,05 µg / µL a cerca de 0,30 µg / µL, particularmente de cerca de 0,05 µg / µL a cerca de 0,30 µg / µL, e mais particularmente um conteúdo de proteína de cerca de 0,05 µg / µL a cerca de 0,1 µg / µL. Além disso, a fração de 3 kDa do lisado de plaquetas é preferencialmente livre de fibrinogênio e livre de fatores de crescimento. O processo da invenção pode compreender uma etapa adicional de armazenamento da fração de lisado de plaquetas tratado termicamente a -80 ° C para uso posterior.

[0041] Em uma concretização preferida, antes da etapa de coleta, o processo da invenção também pode compreender uma etapa de tratamento térmico do lisado de plaquetas a uma temperatura de cerca de 50 ° C a cerca de 70 ° C durante 15 minutos a 45 minutos, e uma etapa de centrifugar o referido lisado de plaquetas tratado termicamente e manter o sobrenadante.

[0042] A etapa de tratamento térmico é, preferencialmente, realizada sem adição de estabilizadores que são usados classicamente para manter a atividade biológica da proteína. Tais estabilizadores são, por exemplo, sacarose, sorbitol, manitol ou aminoácidos, tais como arginina ou lisina.

[0043] Crê-se que a etapa de tratamento térmico induz a precipitação de algumas proteínas que são assim removidas após a etapa de centrifugação. Um conteúdo reduzido em

proteínas pode ser mais vantajoso para algumas aplicações, por exemplo, no tratamento de um distúrbio do sistema nervoso central através de uma administração intranasal.

[0044] A etapa de tratamento térmico pode ser realizada a uma temperatura de cerca de 50 ° C a cerca de 70 ° C, preferencialmente, a uma temperatura de cerca de 50 ° C a cerca de 60 ° C, e mais preferencialmente a uma temperatura de cerca de 54 ° C a 58 ° C. A etapa do tratamento térmico é realizado, por exemplo, a 56 ° C.

[0045] A duração da etapa de tratamento térmico pode ser de 15 a 45 minutos, preferencialmente, de 20 a 40 minutos e mais preferencialmente de 25 a 35 minutos. Por exemplo, a etapa de tratamento térmico é realizada por 30 minutos.

[0046] A centrifugação pode vantajosamente ser realizada a uma temperatura de cerca de 2 ° C a 6 ° C. A duração deste passo de centrifugação é de pelo menos 10 minutos e a velocidade pode ser de cerca de 8000 x g a cerca de 12000 x g, preferencialmente de cerca de 9000 x g a cerca de 11000 x g, e mais preferencialmente cerca de 10000 x g. O sobrenadante é recuperado e utilizado na etapa de coleta do processo.

[0047] De acordo com esta concretização, a fração de lisado de plaquetas resultante após a etapa de coleta é uma fração de lisado de plaquetas tratada termicamente.

[0048] Foi surpreendente e inesperadamente encontrado que as frações de lisado de plaquetas tratadas termicamente de acordo com esta modalidade exibem um forte efeito em termos de neuroproteção, embora o lisado de plaquetas tenha sido submetido a uma etapa de tratamento

térmico e a uma etapa de coleta.

[0049] Além disso, os ensaios *in vitro* mostraram que as frações preparadas de acordo com o processo da invenção, com ou sem uma etapa de tratamento térmico, protegem as células dopaminérgicas da morte induzida por uma neurotoxina. Sem querer ficar vinculado a nenhuma teoria, os inventores acreditam que a atividade neuroprotetora aprimorada das frações é resultado do conteúdo reduzido de proteínas, como o conteúdo de fibrinogênio, e o resultado da concentração de compostos com peso molecular não superior a 100 kDa e, em particular, não superior a 50 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 10 kDa ou 3 kDa. Os resultados obtidos *in vitro* foram confirmados com ensaios *in vivo* em um modelo bem conhecido de esclerose lateral amiotrófica (ELA), que é um camundongo transgênico que superexpressa formas mutantes do gene da superóxido dismutase de cobre / zinco.

[0050] Particularmente, acredita-se também que a etapa de coleta e, opcionalmente, o tratamento térmico, resulte em redução ou depleção de fibrinogênio e enzimas proteolíticas (como trombina ou fatores de coagulação do tipo trombina ou geradores de trombina) e, particularmente, que a etapa de tratamento térmico precipita e / ou inativa proteínas potencialmente instáveis ao calor e modifica favoravelmente o equilíbrio de proteínas e fatores de crescimento na fração resultante, bem como a coleção que modifica o equilíbrio de peso molecular do componente e potencializa o efeito neuroprotetor. Assim, a fração de lisado de plaquetas resultante pode evitar o risco biológico de formação de fibrina, que é tóxico para o cérebro.

[0051] Portanto, a fração de lisado de plaquetas obtida, de acordo com a invenção oferece uma margem de segurança substancialmente mais alta que os lisados de plaquetas humanos padrão suspensos no plasma e é mais adequada e mais eficiente para uso em bioterapia, especialmente através da administração cerebral. Como estabelecido acima, as frações de lisado de plaquetas obtidas pelo processo da invenção fornecem atividade neuroprotetora melhorada.

[0052] Num segundo aspecto, a invenção refere-se a uma fração de lisado de plaquetas. A fração de lisado de plaquetas pode ser obtida de acordo com o método descrito acima. Portanto, a fração de lisado de plaquetas de acordo com a invenção é especificamente uma fração de plaquetas em que os componentes exibem um peso molecular máximo de 100 kDa.

[0053] Particularmente, a fração de lisado de plaquetas de acordo com a invenção é uma fração de lisado de plaquetas de 50 kDa, uma fração de lisado de plaquetas 30 kDa, uma fração de lisado de plaquetas 20 kDa, uma fração de lisado de plaquetas 20 kDa, uma fração de lisado de plaquetas 10 kDa ou uma fração de lisado de plaquetas 10 kDa. Mais preferencialmente, a fracção de acordo com a invenção é uma fracção de 10 kDa de lisado de plaquetas ou uma fracção de 3 kDa de lisado de plaquetas, e ainda mais preferencialmente uma fracção de 3 kDa de lisado de plaquetas tratado termicamente.

[0054] A fração de lisado de plaquetas da invenção tem um conteúdo reduzido em proteínas. Por expressão

"conteúdo reduzido", entende-se que a referida fração contém menos de 1,5 µg / µL de proteínas, preferencialmente menos que 1,0 µg / µL e mais preferencialmente menos que 0,70 µg / µL.

[0055] Especificamente, a fração de 3 kDa do lisado de plaquetas pode apresentar um conteúdo de proteína de cerca de 0,05 µg / µL a cerca de 0,30 µg / µL, particularmente de cerca de 0,05 µg / µL a cerca de 0,30 µg / µL, e mais particularmente um conteúdo de proteína de cerca de 0,05 µg / µL a cerca de 0,1 µg / µL. Além disso, a fração de 3 kDa do lisado de plaquetas tratado termicamente é preferencialmente livre de fibrinogênio.

[0056] A fração de lisado de plaquetas pode ser obtida pelo processo descrito acima.

[0057] As frações de lisado de plaquetas de acordo com a invenção exibem uma forte atividade neuroprotetora e são particularmente vantajosas para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso central. Mais particularmente, as menores frações de lisado de plaquetas, isto é, a fração de lisado de plaquetas de 10 kDa e a fração de lisado de plaquetas de 3 kDa podem passar mais facilmente através da cavidade nasal, a fim de penetrar no cérebro e exercer o efeito neuroprotetor.

[0058] Em um terceiro aspecto, a invenção se refere à fração de lisado de plaquetas de acordo com a invenção para uso como uma droga biológica ou "bioterapia".

[0059] De fato, graças à sua atividade neuroprotetora aprimorada e sua maior segurança, a fração de lisado de plaquetas pode ser usada no tratamento e / ou

prevenção de um distúrbio do sistema nervoso central. Em outros termos, a invenção também se refere a um método de tratamento e / ou prevenção de distúrbios do sistema nervoso central, compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz da fração de lisado de plaquetas da invenção, a um paciente em necessidade. Preferencialmente, o paciente é um animal de sangue quente, mais preferencialmente, um humano.

[0060] Os distúrbios do sistema nervoso central, na acepção da presente invenção, incluem, entre outros, distúrbios neurodegenerativos, distúrbios neurovasculares, distúrbios neuroinflamatórios, distúrbios do desenvolvimento neurológico, como autismo e esquizofrenia, insulto cerebral, como hipóxia grave após parto ou parada cardíaca ou traumatismo craniano grave. / lesão cerebral traumática, ou seja, insultos graves, resultando em uma perda significativa de neurônios levando a deficiências.

[0061] Em uma concretização preferida, o distúrbio do sistema nervoso central é um distúrbio neurodegenerativo. Os distúrbios neurodegenerativos dentro do significado da presente invenção incluem, entre outros, esclerose múltipla (EM), doença de Parkinson (DP), doença de Huntington (HD), 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. De preferência, o distúrbio neurodegenerativo é selecionado da doença de Alzheimer,

doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica, mais preferencialmente, da doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica.

[0062] Em outra concretização, o distúrbio do sistema nervoso central é um insulto cerebral do sistema nervoso central, como hipóxia grave após o parto ou parada cardíaca ou traumatismo craniano grave, ou seja, insultos graves, resultando em uma perda significativa de neurônios levando a desvantagens. O tratamento precoce, com a fração de lisado de plaquetas, após o insulto, pode melhorar as habilidades fisiológicas de neurorestabelecimento e neurogênese.

[0063] A fração de lisado de plaquetas pode ser administrada como tal, ser encapsulada em nanopartículas naturais ou sintéticas⁹ ou micropartículas ou estar compreendida 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.

[0064] A via de administração e o regime de dosagem dependem naturalmente da gravidade da doença, idade, peso e sexo do paciente, etc. A fração de lisado de plaquetas da invenção pode ser usada para o tratamento de qualquer paciente, especialmente um paciente quente. animal sangrado, como um mamífero e, de preferência, um humano.

[0065] Vantajosamente, a fração de lisado de

plaquetas de acordo com a invenção é adequada para a administração no sistema nervoso central. Especificamente, a referida fração de lisado de plaquetas é adaptada para administração intranasal (por exemplo, doença de Parkinson, que é uma patologia da substância negra, estriado e bulbo olfativo próximo às cavidades nasais) ou intra-tecal (por exemplo, para esclerose lateral amiotrófica que é uma patologia da medula espinhal) ou administração intra-cerebroventricular (ICV), preferencialmente, fechada ao forame intraventricular, de modo que a fração de lisado de plaquetas possa ser administrada no terceiro ventrículo.

[0066] Como as menores frações de lisado de plaquetas ainda exibem uma atividade neuroprotetora, elas são particularmente eficazes para uma administração intranasal.

[0067] De fato, graças aos seus componentes de baixo peso molecular, essas frações podem facilmente penetrar no cérebro através da cavidade nasal, o que é vantajoso para os fins da invenção, a fim de tratar distúrbios do sistema nervoso central. Além disso, em termos de segurança, é mais vantajoso para o paciente se beneficiar do efeito neuroprotetor com um lisado de plaquetas que contém menos componentes.

[0068] A administração ao sistema nervoso central pode ser conseguida pelo método conhecido na técnica. Por exemplo, a administração pode ser realizada com um sistema de administração de medicamentos, como uma bomba de medicação programável.

[0069] A administração da fração de lisado de plaquetas da invenção também pode ser realizada por qualquer

outro método conhecido pelo técnico versado no assunto, como por exemplo, administração intravenosa, intraperitoneal, intramuscular ou intra-ocular, ou perfusão ou infusão de um órgão (isto é, infusão direta de uma parte do tecido cerebral).

[0070] 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

[0071] A definição e explicações abaixo são para os termos usados em todo o relatório descritivo, incluindo o relatório e quadro reivindicatório.

[0072] 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, que não são afetadas pela neurotoxina. A neuroproteção visa prevenir ou retardar a progressão da doença e lesões secundárias, interrompendo ou pelo menos diminuindo a perda de neurônios. Por exemplo, refere-se 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. Por "neurorestoration" entende-se compensação de alterações existentes e estimulação da restauração estrutural e funcional da atividade nervosa lesada.

[0073] O termo "paciente" refere-se a um animal de

sangue quente, mais preferencialmente um humano, que / que está aguardando ou recebendo cuidados médicos ou é ou será o objeto de um procedimento médico.

[0074] O termo "humano" refere-se a sujeitos de ambos os sexos e em qualquer estágio do desenvolvimento (ou seja, recém-nascido, lactente, juvenil, adolescente, adulto). Em uma concretização, o humano é um adolescente ou adulto, de preferência um adulto.

[0075] Os termos "tratar", "tratando" e "tratamento", como aqui utilizados, destinam-se a aliviar ou revogar uma condição ou doença e / ou seus sintomas associados.

[0076] Os termos "impedir", "prevenir" e "prevenção", conforme aqui utilizados, referem-se a um método de retardar ou impedir o aparecimento de uma condição ou doença e / ou de seus sintomas associados, impedindo o paciente de adquirir uma condição ou doença, ou reduzir o risco de um paciente adquirir uma condição ou doença.

[0077] O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" (ou mais simplesmente uma "quantidade eficaz") como aqui utilizado significa a quantidade de fração de lisado de plaquetas da invenção que é suficiente para alcançar o efeito terapêutico ou profilático desejado no indivíduo ao qual é administrado.

[0078] O termo "administração", ou uma variante do mesmo (por exemplo, "administração"), significa fornecer a fração de lisado de plaquetas da invenção, isoladamente ou como parte de uma solução farmacologicamente aceitável, ao paciente em quem / qual a condição, sintoma, ou distúrbio

deve ser tratado ou prevenido.

[0079] A presente invenção será melhor compreendida com referência aos seguintes exemplos e figuras. Estes exemplos pretendem ser representativos de modalidades específicas da invenção e não pretendem limitar o escopo da proteção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0080] A Figura 1 mostra a duração do tratamento com lisado de plaquetas e frações de lisado de plaquetas. Lisado de plaquetas (controle) e frações foram adicionados 1 hora antes da erastina (A) ou 1h, 3h, 6h e 8h após a erastina (B).

[0081] A Figura 2 mostra o efeito neuroprotetor medido por citometria de frações de 50kDa, H-50kDa, 30kDa, H-30kDa, 10kDa, H-10kDa, 3kDa e H-3kDa. A viabilidade foi medida pelo teste de iodeto de propídio e normalizada para o controle (células não tratadas) +/- SEM (n = 1 para 50 kDa, 30kDa, 10kDa e n = 2 para 3kDa).

[0082] A Figura 3 mostra o efeito neuroprotetor das frações de 50kDa, H-50kDa, 30kDa, H-30kDa, 10kDa e H-10kDa medidas pela resazurina. Tratamento 1 hora antes da erastina (E). A viabilidade foi medida e normalizada para o controle (células não tratadas) n = 1.

[0083] A Figura 4 mostra a via envolvida e efeito neuroprotetor das frações 3kDa e H-3kDa medidas pela resazurina. Tratamento 1 hora antes da erastina (E). iAkt: Inibidor da Akt, E: Erastina. A viabilidade foi medida e normalizada para o controle (células não tratadas) +/- SEM (n = 4).

[0084] A Figura 5 mostra o efeito neuroprotetor das frações de 3kDa e H-3kDa medidas pela resazurina. Tratamento das células LUHMES 1h, 3h, 6h ou 8h após Erastin (E).

[0085] A Figura 6 mostra o efeito neuroprotetor medido pelo ensaio citométrico da fração H-3kDa. Tratamento 1h antes de Erastin (E). A viabilidade foi medida e normalizada para o controle (células não tratadas) +/- SEM (n = 4 para pHPL, H-pHPL, H-pHPL-GB e n = 2 para H-3kDa

[0086] A Figura 7A mostra a evolução do peso corporal de ratos machos tratados por veículo e preparação diluída de H-PPL. WT masculino: Tipo selvagem masculino, Tg masculino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R), Veh: Veículo.

[0087] Figura 7B mostra a evolução do peso corporal de camundongos fêmeas tratadas por veículo e preparação diluída de H-PPL. Feminino WT: Feminino tipo selvagem, Feminino Tg: Feminino FVB-Tg (Sod1 * G86R), Veh: Veículo.

[0088] A Figura 8 mostra a curva de sobrevivência de ratos machos e fêmeas tratados por veículo e preparação diluída de H-PPL. Tg masculino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R), Tg feminino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R).

[0089] A Figura 9A mostra a evolução do peso corporal de ratos machos tratados três vezes por semana por veículo e preparação de H-3kDa. WT masculino: Tipo selvagem masculino, Tg masculino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R), Veh: Veículo.

[0090] A Figura 9B mostra a evolução do peso corporal de camundongos fêmeas tratadas três vezes por semana por veículo e preparação de H-3kDa. Feminino WT: Feminino tipo selvagem, Feminino Tg: Feminino FVB-Tg (Sod1 * G86R), Veh:

Veículo.

[0091] A Figura 10 mostra a curva de sobrevivência de camundongos machos e fêmeas tratados três vezes por semana por veículo e preparação de H-3kDa. Tg masculino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R), Tg feminino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R).

[0092] A Figura 11A mostra a evolução do peso corporal de ratos machos tratados seis vezes por semana por veículo e preparação de H-3kDa. WT masculino: Tipo selvagem masculino, Tg masculino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R), Veh: Veículo.

[0093] Figura 11B mostra a evolução do peso corporal de camundongos fêmeas tratadas seis vezes por semana por veículo e preparação de H-3kDa. Feminino WT: Feminino tipo selvagem, Feminino Tg: Feminino FVB-Tg (Sod1 * G86R), Veh: Veículo.

[0094] Figura 12 mostra a curva de sobrevivência de camundongos machos e fêmeas tratados seis vezes por semana por veículo e preparação de H-3kDa. Tg masculino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R), Tg feminino: FVB-Tg masculino (Sod1 * G86R).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

EXEMPLOS

[0095] As seguintes abreviações são usadas em toda o relatório descritivo, figuras e reivindicações:

[0096] Fração 10kDa: lisado de plaquetas de fração 10 kDa

[0097] Fração 30kDa: lisado de plaquetas de fração 30 kDa

[0098] Fração 3kDa: lisado de plaquetas de fração 3 kDa

[0099] Fração de 50kDa: lisado de plaquetas de fração de 50 kDa

[00100] Fração H-10kDa: lisado de plaquetas tratado termicamente; fração de 10 kDa

[00101] Fração H-30kDa: lisado de plaquetas tratado termicamente fração de 30 kDa

[00102] Fração H-3kDa: lisado de plaquetas tratado termicamente; fração de 3 kDa

[00103] Fração H-50kDa: lisado de plaquetas tratado termicamente fração de 50 kDa

[00104] H-pHPL: lisado de plaquetas humano tratado termicamente.

[00105] H-pHPL-GB: lisado de plaquetas humano agrupado, misturado com contas de vidro (GB) e submetido a tratamento térmico

[00106] HPL: lisado de plaquetas humano

[00107] H-PPL: Lisado de grânulos de plaquetas tratado termicamente

[00108] VCI: intra-cerebro-ventricular

[00109] PAS: solução aditiva de plaquetas

[00110] PBS: solução salina tampão fosfato

[00111] PC: concentrado de plaquetas

[00112] pHPL: lisado de plaquetas humano reunido

[00113] PL: lisado de plaquetas

[00114] PPL: lisado de grânulos plaquetários

[00115] PPLe: lisado de grânulos de plaquetas de PC expirado

[00116] PPLF: lisado de grânulos de plaquetas de PC não expirado

[00117] PRP: plasma rico em plaquetas

[00118] Hemácias: glóbulos vermelhos

EXEMPLO 1 - Experimentos com lisado de plaquetas (PPL) como material inicial de lisado de plaquetas

Materiais e métodos

1. Preparação do lisado de plaquetas e frações de lisado de plaquetas

[00119] Os lisados de plaquetas foram obtidos de concentrados de plaquetas (Etablissement Français du Sang, Lille, França). Após centrifugação a 4600 x g durante 20 minutos à temperatura ambiente, os grânulos de plaquetas foram lavados duas vezes e ressuspensos em PBS em 1/10 do volume inicial. Em seguida, os grânulos de plaquetas foram congelados (nitrogênio) e descongelados (37 ° C) três vezes e centrifugados a 4600 x g por 20 minutos em temperatura ambiente.

[00120] O sobrenadante, chamado "Lisado de grânulos de plaquetas" (PPL), foi coletado, dividido em alíquotas e armazenado a -80 ° C.

[00121] Uma parte do PPL foi tratada termicamente a 56 ° C por 30 minutos, depois centrifugada a 10000 xg por 15 minutos a 4 ° C e o sobrenadante, chamado "Lisado de pelotas de plaquetas tratado termicamente" (H-PPL), foi aliquoteado e armazenado a -80 ° C.

[00122] As frações de lisado de plaquetas foram obtidas de PPL e H-PPL, realizando a etapa de fracionamento usando tubos de ultrafiltração Amicon Ultra -0,5, incluindo

diferentes pontos de corte (Amicon Ultra-0.5 Filter Devices centrífugos, Millipore).

[00123] Resumidamente, 500 µL de PPL ou H-PPL são adicionados ao dispositivo de filtro inserido no tubo de coleta e centrifugados a 14000 x g por 30 minutos a 4 ° C com um rotor de ângulo fixo a 40 °. De acordo com o ponto de corte utilizado, o filtrado ou a fração de lisado de plaquetas, que é a parte inferior mais baixa do que o ponto de corte, é denominada fração de 50 kDa, fração de 30 kDa, fração de 10 kDa e fração de 3 kDa, quando obtida de PPL, e denominada H- Fração 50kDa, fração H-30kDa, fração H-10kDa e fração H-3kDa, quando obtidas do H-PPL. As diferentes frações de lisado de plaquetas foram então divididas em alíquotas e armazenadas a -80 ° C para outras experiências.

2. *Manutenção e diferenciação de células LUHMES*

[00124] As células LUHMES foram obtidas no laboratório do Dr. Scholz (Universidade de Konstanz, Alemanha) e cultivadas conforme descrito¹⁰.

[00125] Resumidamente, as células LUHMES indiferenciadas foram propagadas usando frascos de cultura de células plásticas Nunclon™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) e placas de vários poços pré-revestidos com 50 µg / mL de poli-L-orнитina e 1 µg / mL de fibronectina (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em água por 3h a 37 ° C. Após remoção da solução de revestimento, os frascos de cultura foram lavados com água destilada estéril e secos ao ar.

[00126] As células foram cultivadas a 37 ° C em uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂. O meio de

proliferação foi o meio Eagle modificado da Advanced Dulbecco (Advanced DMEM) / F12 contendo 1 × N-2 suplemento (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), L-glutamina 2 mM (Gibco, Rockville, MD, EUA) e 40 ng / mL recombinante bFGF (Sistemas de P&D). 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 3x10⁶ células / balão.

[00127] Para induzir células intoneuronais de diferenciação, 2 x 10⁶ LUHMES foram semeadas e crescidas em um balão T75 em meio de proliferação por 48 h, depois em Advanced DMEM / F12 contendo 1 × N-2 suplemento, 2 mM de L-glutamina (Gibco), 1 mM de dibutiril cAMP (Sigma-Aldrich), 1 µg / 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 outras experiências no sexto dia.

3. Tratamento de células LUHMES

[00128] Todas as preparações de lisado de plaquetas foram usadas a 5% v / v e foram testadas contra a morte celular induzida por Erastin a 1,25 µM. Resumidamente, LUHMES são utilizados como descrito anteriormente e as diferentes frações de lisado de plaquetas foram adicionadas ao meio 1 h antes do tratamento com erastina (E) ou 1, 3 6 e 8 h após Erastin (Figura 1).

4. Teste de viabilidade

[00129] A fim de quantificar a capacidade neuroprotetora das diferentes frações de lisado de

plaquetas, a viabilidade das células LHUMES foi avaliada pelo teste de citometria em 24 poços usando incorporação de iodeto de propídio (Figura 2) e comparada ao controle ou aos diferentes lisados de plaquetas. O citômetro usado para as experiências é o modelo CyAn™ com um laser de 488 nm (Beckman Coulter).

[00130] A viabilidade também foi medida por um ensaio de resazurina realizado em 96 poços aos 7 dias de diferenciação e 24h após tratamentos com frações de 50kDa, H-50kDa, 30kDa, H-30kDa, 10kDa e H-10kDa. O ensaio é realizado na cultura de células sem trissinitação (Figura 3).

[00131] A fração H-3kDa do lisado de plaquetas foi avaliada separadamente pelo ensaio de resazurina, a fim de determinar se a menor fração produzida a partir do lisado de pelotas de plaquetas induz a via de sinalização de Akt (Figura 4). Assim, foi realizada uma experiência com inibidor de Akt e o inibidor MK-2206 foi adicionado ao meio a 5 μ M 1 h antes da exposição a frações de lisado de plaquetas. O tratamento com a fração H-3kDa do lisado de plaquetas foi realizado 1h antes da exposição ao Erastin e 1h, 3h, 6h e 8h após a exposição ao Erastin

5. Dosagem de proteína

[00132] A concentração de proteína foi medida em diferentes amostras por um ensaio de proteína Lowry. Para cada amostra, as medições foram feitas em duplicado e as concentrações são expressas em μ g / μ L.

6. Análises estatísticas

[00133] Os resultados são expressos como a média \pm

desvio padrão da média (MEV). 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 de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

[00134] 1. Dosagem de proteína

	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Número	Desvio padrão	SEM
PPL	17.08	12	4.20	1.21
H-PPL	7.92	14	2.30	0.61
Fração de 50 kDa	0.52	3	0.21	0.12
Fração de H- 50 kDa	0.65	3	0.20	0.11
Fração de 30 kDa	0.36	2	0.16	0.12
Fração de H- 30 kDa	0.56	2	0.12	0.09
Fração de 10 kDa	0.41	2	0.22	0.16
Fração de H- 10 kDa	0.55	3	0.26	0.15
Fração de 3 kDa	0.36	7	0.09	0.04
Fração de H- 3kDa	0.40	13	0.10	0.03

2. Capacidade de proteção dos neurônios dopaminérgicos

- Ensaio citométrico

[00135] Como mostrado na Figura 2, a viabilidade das células LUHMES tratadas com Erastin diminuiu para aproximadamente 30%. Assim, Erastin mata as células de controle e isso não foi observado quando as células LUHMES foram tratadas concomitantemente por qualquer uma das frações de lisado de plaquetas.

[00136] De fato, nenhuma das frações de lisado de

plaquetas teve um efeito tóxico para as células LUHMES. Portanto, as frações de lisado de plaquetas protegem as células LUHMES da morte induzida por Erastin e exibem forte efeito neuroprotetor.

– Ensaio de resazurina

[00137] Os resultados obtidos pelo teste citométrico foram confirmados pela resazurina.

[00138] Como mostra a Figura 3 e Figura 4, a Erastina mata eficientemente as células LUHMES e um tratamento com frações de lisado de plaquetas de acordo com a invenção 1 h antes da exposição a Erastin protege as células LUHMES da morte. Assim, as frações de lisado de plaquetas são capazes de impedir o efeito tóxico de Erastin e exibem efeito neuroprotetor significativo.

[00139] Além disso, a Figura 4 também mostrou que a fração H-3kDa do lisado de plaquetas envolve a via de sinalização de Akt.

[00140] O efeito neuroprotetor também foi testado quando a fração 3H-kDa do lisado de plaquetas foi adicionada após a exposição a Erastina e o resultado foi mostrado (Figura 5) de que um tratamento com fração H-3kDa do lisado de plaquetas 1h a 8h antes da exposição a Erastina ainda protege a célula LUHMES de morte.

3. Conclusão

[00141] As frações de lisado de plaquetas, de acordo com a invenção preparadas com lisado de plaquetas como material de partida são capazes de proteger as células contra a morte induzida por um neurotóxico e exibem um efeito neuroprotetor eficaz. Este resultado foi validado com dois

ensaios diferentes.

EXEMPLO 2 - Experimentos com o lisado de plaquetas humano agrupado (pHPL) como material inicial de lisado de plaquetas.

1. Preparação das frações de lisado de plaquetas humanas reunidas (pHPL) e de lisado de plaquetas

[00142] O lisado de plaquetas humano agrupado (pHPL) é obtido da Macopharma (Tourcoing, França) sob o nome de lisado de plaquetas humano MultiPL'30®, referência BC0190020.

[00143] Uma parte do pHPL foi submetida a tratamento térmico a 56 ° C por 30 min e foi purificada por centrifugação (15 minutos, 10000 x g, 4 ° C) para obter o chamado HT-pHPL. Outra parte do pHPL foi misturada com 0,5 g / mL de contas de vidro (BEAD-002-1kg de 2 mm de diâmetro, da Labbox) e CaCl₂ (concentração final de 23 mM; C4901 pó anidro de cloreto de cálcio, da Sigma-Aldrich) sob agitação durante 1 h. Isso levou a uma formação de coágulo que foi removida após a centrifugação (6000 x g por 30 minutos a 22 ° C). O sobrenadante foi aquecido a 56 ° C por 30 minutos e centrifugado (10000 x g por 15 minutos a 4 ° C) antes das alíquotas serem feitas e armazenadas a -80 ° C para uso posterior. Este lisado de plaquetas assim obtido é chamado H-pHPL-GB.

[00144] A fração 3kDa do lisado de plaquetas tratada termicamente foi obtida a partir de H-pHPL-GB usando tubos de ultrafiltração Amicon Ultra -0,5, incluindo diferentes pontos de corte (Amicon Ultra-0.5 Filter Devices centrífugos, Millipore).

[00145] Resumidamente, 500 µL de H-pHPL-GB são

adicionados ao dispositivo de filtro inserido no tubo de coleta e centrifugados a 14000 x g por 30 minutos a 4 ° C com um rotor de ângulo fixo a 40 °. De acordo com o ponto de corte utilizado, o filtrado ou a fração de lisado de plaquetas tratado termicamente, que é a parte inferior mais baixa que o ponto de corte, é chamado H-3kDa porque foi obtido a partir de um lisado de plaquetas tratado termicamente.

[00146] As frações de lisado de plaquetas foram então divididas em alíquotas e armazenadas a -80 ° C para outras experiências.

2. Manutenção e diferenciação de células LUHMES

[00147] As células LUHMES foram obtidas e preparadas como descrito no exemplo 1.

3. Tratamento de células LUHMES

[00148] A fração H-3kDa foi utilizada a 5% v / v e foi testada contra a morte celular induzida por Erastin. Resumidamente, LUHMES são usados como descrito anteriormente e a fração H-3kDa foi adicionada ao meio 1 h antes do tratamento com Erastin (E).

4. Teste de viabilidade

[00149] A fim de quantificar a capacidade neuroprotetora da fração 3kDa do lisado de plaquetas tratado termicamente, a viabilidade das células LUHMES foi avaliada pelo teste de citometria em 24 poços usando incorporação de iodeto de propídio e comparada ao controle ou aos diferentes lisados de plaquetas. O citômetro usado para as experiências é o modelo CyAn [™] com um laser de 488 nm (Beckman Coulter).

5. Dosagem de proteína

[00150] A concentração de proteína foi medida em diferentes amostras por um ensaio de proteína Lowry. Para cada amostra, as medições foram feitas em duplicado e as concentrações são expressas em $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.

6. Resultados

- Dosagem de proteínas

	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Número de amostra	Desvio padrão	SEM
pHPL	19.08	2	2.47	1.75
H-pHPL	18.51	2	1.20	0.85
pHPL-GB	18.65	2	0.62	0.44
H-pHPL-GB	17.31	2	1.58	1.12
H-3 kDa	0.09	2	0.02	0.02

- Capacidade de proteção dos neurônios dopaminérgicos

[00151] Como mostrado na Figura 6, a viabilidade das células LUHMES tratadas com Erastin diminui para aproximadamente 50%. Assim, Erastin mata efetivamente as células de controle e isso não foi observado quando as células LUHMES foram tratadas concomitantemente com a fração H-3kDa.

[00152] Portanto, a fração H-3kDa protege as células LUHMES da morte por ferroptose e apresenta forte efeito neuroprotetor.

[00153] Este exemplo exhibe o potencial da fração 3kDa de lisado de plaquetas tratado termicamente de acordo com a invenção. Além disso, esta fração foi obtida a partir de um lisado de plaquetas humano reunido que oferece uma margem de segurança substancialmente mais elevada do que os lisados de plaquetas humanos normais suspensos no plasma. Assim, essa fração de H-3kDa é mais adequada e mais eficiente para uso em bioterapia, especialmente através da administração do

cérebro.

EXEMPLO 3 – Testes *In Vivo*

[00154] 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 da União Europeia sobre experimentação em animais (Diretiva do Conselho das Comunidades Europeias 86 / 609).

[00155] Os camundongos inscritos foram camundongos FVB-Tg (Sod1 * G86R) M1Jwg / J dos laboratórios JAX. Os animais foram alojados em grupo (10 por gaiola) em uma sala com temperatura controlada (22 ± 2 ° C) com um ciclo de 12/12 horas de claro / escuro. Comida e água foram fornecidas ad libitum. Após a recepção, os animais tiveram um período de habituação de 7 dias sem manipulação. A criação foi realizada nas instalações da SOPF e a genotipagem é realizada por qPCR (da biópsia da cauda). Os animais são identificados com brincos.

1. Protocolo experimental

[00156] Os ratos foram tratados e pesados aos 60 dias de idade e foram avaliados duas vezes por semana (isto é, peso corporal e neurocore) desde os 67 dias até a morte.

a. Neuroscore

- caminhar (0 = ok, 1 = uma única alteração nas patas traseiras, 2 = alteração em duas patas traseiras),

- teste de suspensão da cauda (0 = ok, 1 = uma única retração das patas traseiras, 2 = retração de duas patas traseiras)

- paralisia (0 = não, 1 = sim)

- Cifose (0 = não, 1 = sim)

Escore máximo = 6 (escore moribundo)

b. Tratamento

[00157] Dos 75 dias até a morte, administrações diferentes de lisado de plaquetas versus veículo são administradas três vezes por semana (preparações 1 e 2) e seis vezes por semana (somente preparação 2) em homens e mulheres com SOD1m-FVB e WT-FVB. Os camundongos SOD1m-FVB são camundongos transgênicos que superexpressam formas mutantes do gene da superóxido dismutase de cobre / zinco. A dose de preparação administrada foi de 20 µL intra-nasal (i.n.).

c. Lisado de plaquetas testado

[00158] Três preparações de lisado de plaquetas foram testadas e são descritas a seguir.

[00159] Preparação 1: H-PPL como descrito no exemplo 1, seção 1 e diluído a 50% em PBS (H-PPL diluído).

[00160] Preparação 2: fração 3kDa de lisado de plaquetas tratado termicamente (fração H-3kDa) preparada a partir de H-PPL como descrito no exemplo 1, seção 1.

d. Grupos experimentais

[00161] Oito grupos foram constituídos da seguinte forma:

- Machos WT-FVB + veículo
- Preparações para homens WT-FVB + (H-PPL, H-PPL diluído ou fração H-3kDa)
- Machos SOD1m-FVB + veículo
- Machos SOD1m-FVB + Preparação (H-PPL, H-PPL diluído ou fração H-3kDa)

- Fêmea WT-FVB + veículo
- Fêmea WT-FVB + Preparação (H-PPL, H-PPL diluído ou fração H-3kDa)
- Fêmea SOD1m-FVB + veículo
- Fêmea SOD1m-FVB + preparação (H-PPL, H-PPL diluído ou fração H-3kDa)

2. Resultados

a. Preparação 1: H-PPL diluído

- Peso corporal

[00162] Como mostrado nas Figuras 7A e 7B, os tratamentos com H-PPL diluído não tiveram efeito nos machos e nas fêmeas WT.

[00163] Em relação ao declínio do peso corporal, não foi observada diferença nos homens Tg. No entanto, em mulheres Tg, o tratamento diluído com H-PPL mantém o peso corporal no nível inicial até o dia 95, com quase 10 dias de diferença com o grupo do veículo e também atrasa o peso corporal pré-morte de 10 dias (D102-D112).

- Curva de sobrevivência

[00164] De acordo com o peso corporal, em Tg, as fêmeas tratadas com H-PPL diluído tiveram uma sobrevivência prolongada de D105 a D116 (11 dias mais). Esta diferença não foi observada nos ratos Tg machos entre o veículo e o grupo tratado. (Figura 8)

b. Preparação 2: Fração H-3kDa

[00165] Administração três vezes por semana:

- Peso corporal

[00166] Como mostrado na Figura 9A, nos camundongos WT, a fração H-3kDa não teve efeito no peso corporal

masculino. Ao contrário dos machos, nas fêmeas uma ligeira diminuição é observada logo após o início do tratamento (D81) e durante toda a sua duração.

[00167] Em homens e mulheres Tg, nenhuma melhora é observada no início da perda de peso corporal (compare com camundongos Tg com veículo), mas a fração H-3kDa induziu um atraso importante no peso corporal pré-morte de 21 dias para camundongos fêmeas (de D105 a D126) e de 7 dias para ratos machos (de D112 a D119) (Figura 9B).

- Curva de sobrevivência

[00170] Como mostra a Figura 10 e de acordo com o atraso observado no peso corporal post-morte, um tratamento com fração H-3kDa estendeu o tempo de sobrevivência em até 21 dias para as mulheres Tg (D109 a D130) e em até 7 dias para os homens Tg (D116 a D123).

[00171] Administração seis vezes por semana:

- Peso corporal

[00172] Como mostrado nas Figuras 11A e 11B, nos camundongos WT, a fração H-3kDa não teve efeito no peso corporal masculino e feminino.

[00173] Em homens e mulheres Tg, nenhuma melhora é observada no início da perda de peso corporal (compare com camundongos Tg com veículo), mas a fração H-3kDa induziu um atraso no peso corporal pré-morte de 11 dias para camundongos machos (de D119 a D130). Este efeito não é observado em Tg Female.

- Curva de sobrevivência

[00174] Como mostra a Figura 12, e de acordo com o atraso observado no peso corporal post-morte, um tratamento

com fração H-3kDa estendeu o tempo de sobrevivência em até 21 dias para as fêmeas Tg (D109 a D130) e em até 7 dias para a Tg machos (D116 a D123).

3. Conclusão

[00175] Não foi observada irritação nos tratamentos com H-PPL diluído e H-3kDa.

[00176] Em relação às curvas de sobrevivência obtidas com diferentes preparações, pode-se observar que o efeito depende do gênero animal.

[00177] Porém, a principal conclusão desse teste in vivo é que o H-3kDa possui um excelente perfil de segurança e uma grande eficácia com um efeito clássico relacionado à dose sexual. De fato, o tratamento com H-3kDa prolongou a sobrevida em 7 dias em camundongos Tg machos e proporcionou um aumento de cerca de 21 dias em camundongos Tg fêmeas (90% de melhoria em comparação com os controles) e de cerca de 10 dias em camundongos Tg machos (48% melhoria em comparação com os controles). Esses resultados mostram o potencial da fração 3kDa do lisado de plaquetas tratado termicamente de acordo com a invenção, a fim de induzir a capacidade neuroprotetora.

Referências

[00178] 1. Gonzalez-Aparicio R, Flores JA, 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.

[00179] 2. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond.

Blood Rev 2014.

[00180] 3. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, et al. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. Blood Rev 2013;27: 77-89.

[00181] 4. 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.

[00182] 5. Hayon Y, Dashevsky O, Shai E, et al. Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke. Thromb Haemost 2013;110: 323-30.

[00183] 6. Yael Hayon; Olga Dashevsky; Ela Shai; David Varon; Ronen R. Leker Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke. Thromb Haemost 2013; 110: 323-330.

[00184] 7. Shih DTB, Burnouf T. Human blood platelet growth factors supplements for ex vivo stem cell expansion (invited review). New Biotechnology, 2015;32; 199-211.

[00185] 8. 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, number 1.

[00186] 9. Victor E. Santo, Manuela E.Gomes, Joao F. Mano and Rui L; Reis. Chitosanchondroitin 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.

[00187] 10. 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 preparar a fração de lisado de plaquetas, o referido processo **caracterizado pelo** fato de que compreende as etapas de:

- 1) fornecer um lisado de plaquetas,
- 2) coletar por ultrafiltração a referida fração de lisado de plaquetas, em que os componentes exibem um peso molecular máximo de 100 kDa.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o lisado de plaquetas fornecido na etapa 1) é um lisado de grânulos de plaquetas ou um lisado de plaquetas humano agrupado.

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato de que a etapa de coleta é um fracionamento realizado por ultrafiltração.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de que as seguintes etapas são executadas após a etapa 1) e antes da etapa 2):

- uma etapa de tratamento térmico do lisado de plaquetas a uma temperatura de cerca de 50° C a cerca de 70° C durante 15 minutos a 45 minutos,
- uma etapa de centrifugação do referido lisado de plaquetas tratado termicamente e mantendo o sobrenadante para a etapa de coleta.

5. Fração de lisado de plaquetas **caracterizada pelo** fato de que os componentes nela contidos exibirem um peso molecular máximo de 20 kDa.

6. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a

reivindicação 5, **caracterizada pelo** fato de que os componentes nela contidos exibem um peso molecular máximo de 10 kDa ou de 3 kDa e, de preferência, um peso molecular máximo de 3 kDa.

7. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizada pelo** fato de que possui um conteúdo de proteína inferior a 1,5 µg / µL, preferencialmente, inferior a 1,0 µg / µL e mais preferencialmente, inferior a 0,70 µg / µL.

8. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada pelo** fato de que o conteúdo de proteína é de cerca de 0,05 µg / µL a cerca de 0,30 µg / µL, e, mais particularmente, de cerca de 0,05 µg / µL a cerca de 0,1 µg / µL.

9. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que a referida fração está livre de fibrinogênio.

10. Fração de lisado de plaquetas, conforme definido por qualquer uma das reivindicações 5 a 9, ou preparada conforme o processo definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que é para uso como um medicamento.

11. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado pelo** fato de que é no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central.

12. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada pelo** fato de que os distúrbios do sistema nervoso central são selecionados dentre distúrbios neurodegenerativos, distúrbios

neurovasculares, distúrbios neuroinflamatórios, distúrbios do desenvolvimento neurológico e insultos cerebrais.

13. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada pelo** fato de que os distúrbios do sistema nervoso central são um distúrbio neurodegenerativo selecionado entre esclerose múltipla (EM), doença de Parkinson (DP), 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 e de preferência selecionados da doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica.

14. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada pelo** fato de que os distúrbios neurodegenerativos são selecionados da doença de Parkinson.

15. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada pelo** fato de que o distúrbio é um insulto cerebral selecionado a partir de hipóxia ou lesão cerebral traumática.

16. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 15, **caracterizada pelo** fato de que a fração de lisado de plaquetas é administrada por via intranasal, intratecal, intra-ocular ou intra-cerebroventricular.

17. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada pelo** fato de que a fração de lisado de plaquetas é administrada por via intra-

cerebroventricular, preferencialmente, fechada ao forame intraventricular e, mais preferencialmente, no terceiro ventrículo.

18. Fração de lisado de plaquetas, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizada pelo** fato de que a referida fração de lisado de plaquetas é adaptada para ser administrada com uma bomba.

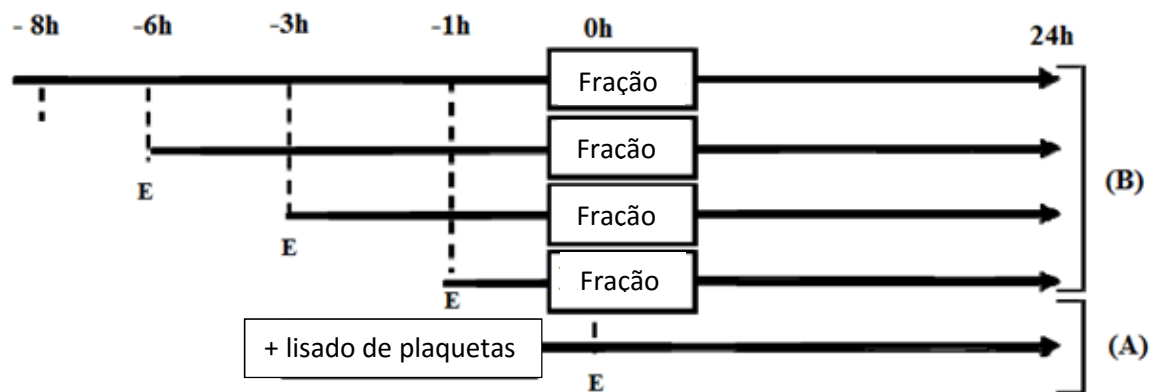


FIGURA 1

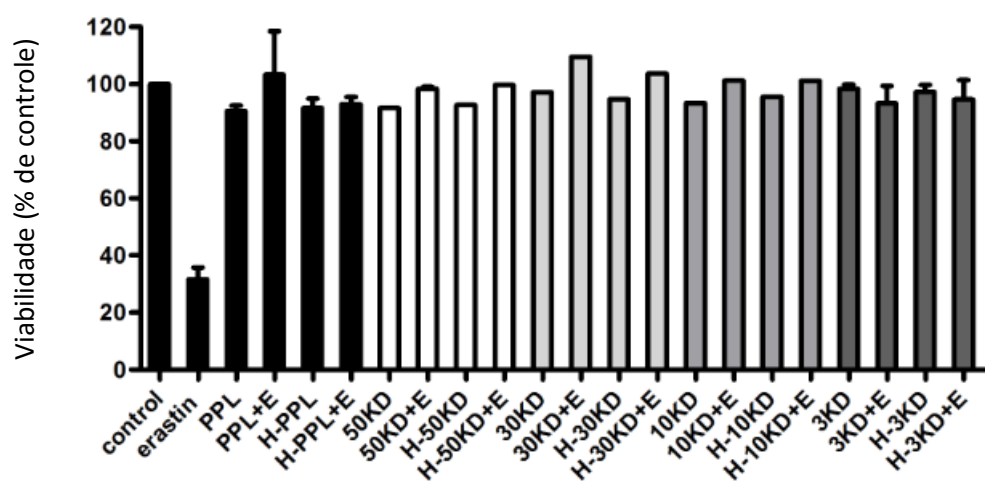


FIGURA 2

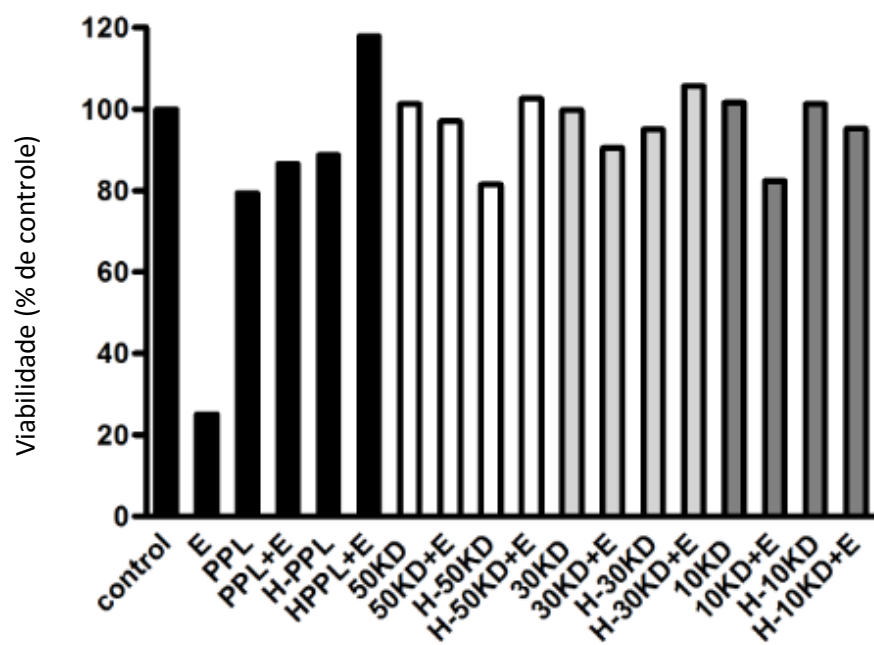


FIGURA 3

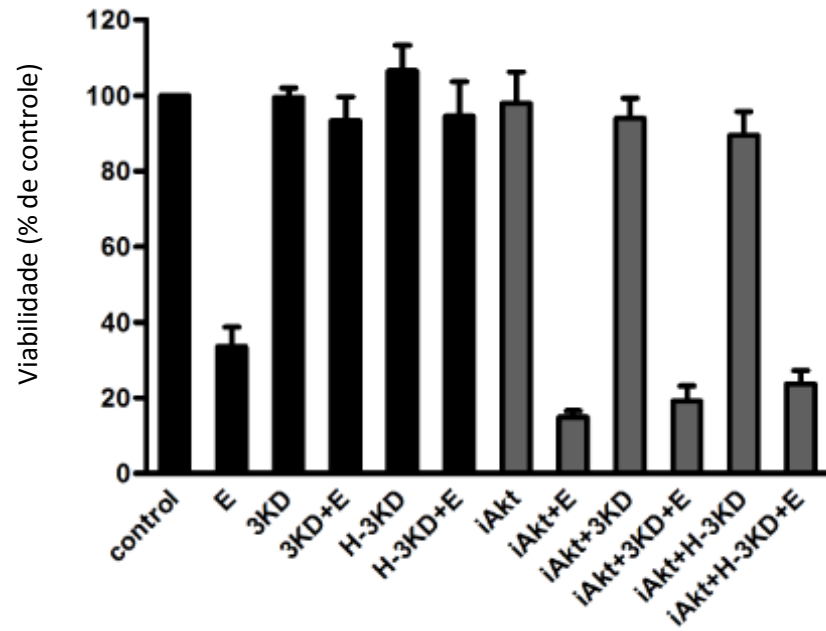


FIGURA 4

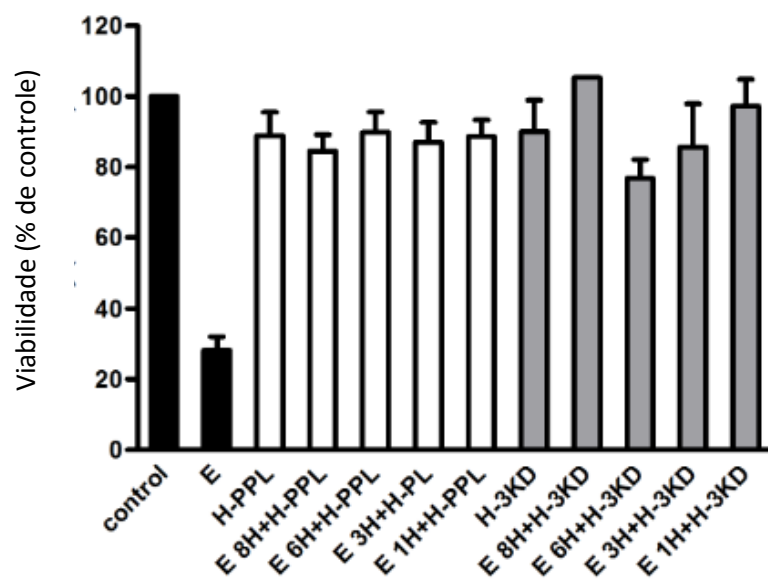


FIGURA 5

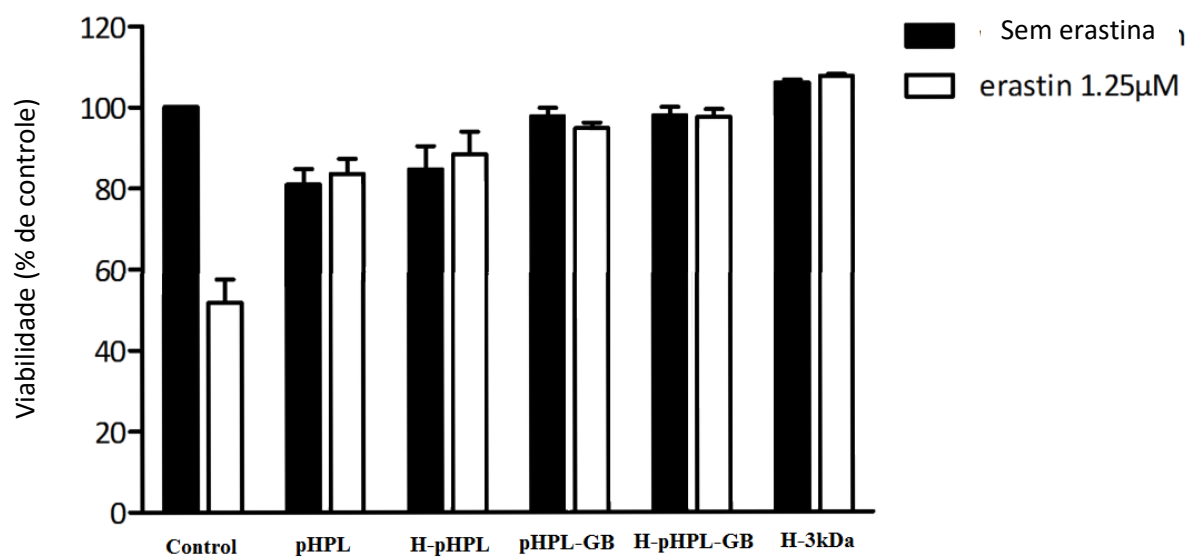


FIGURA 6

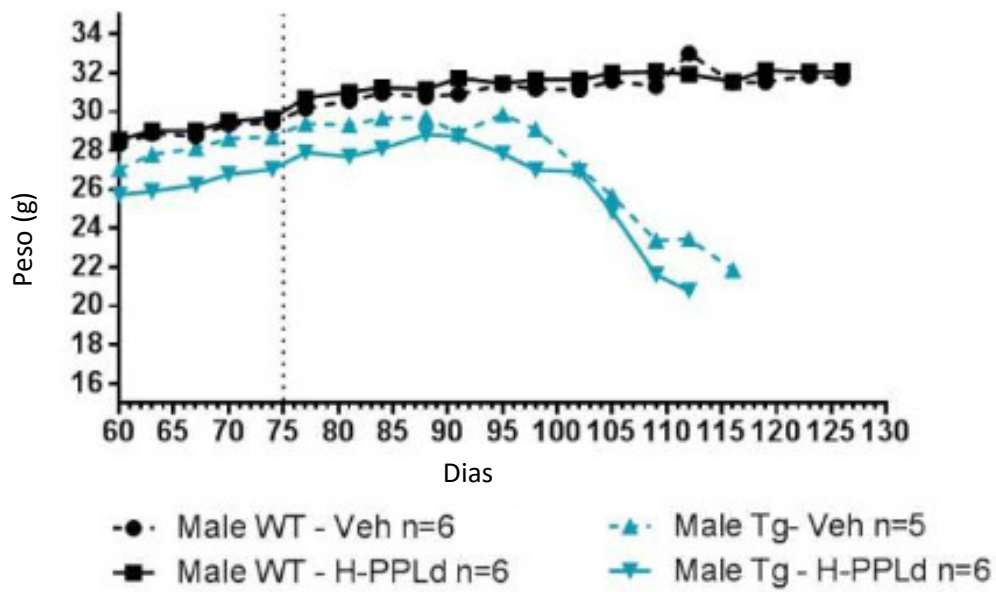


FIGURA 7A

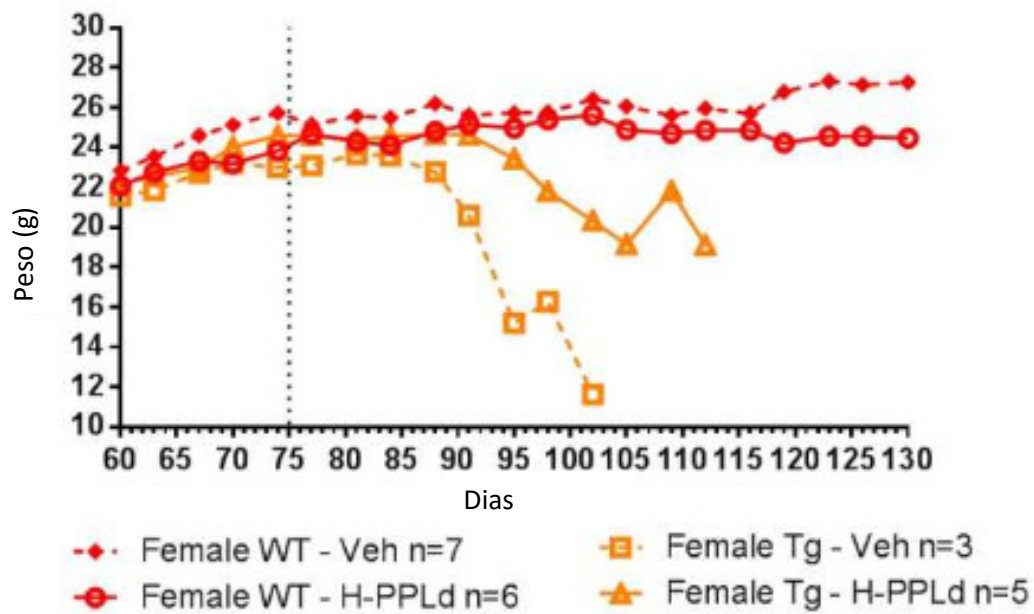


FIGURA 7B

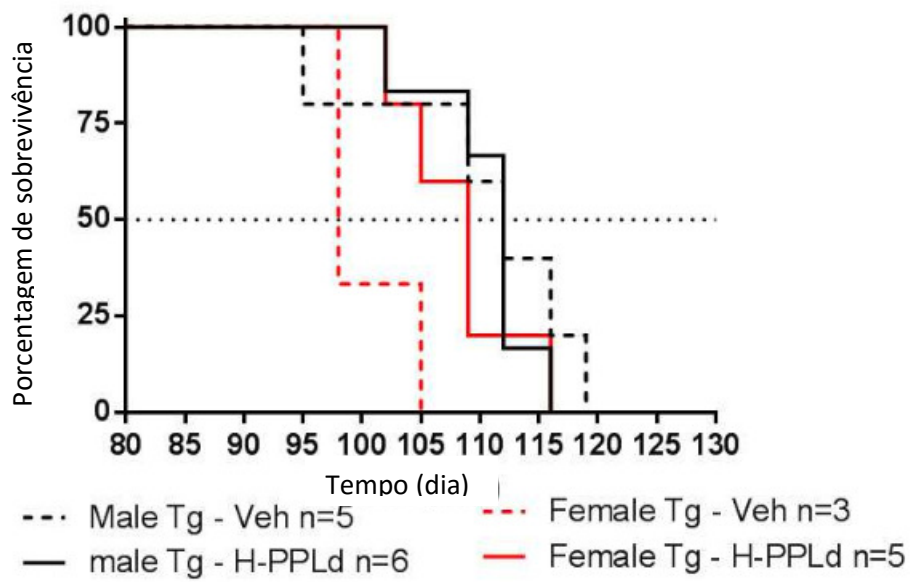


FIGURA 8

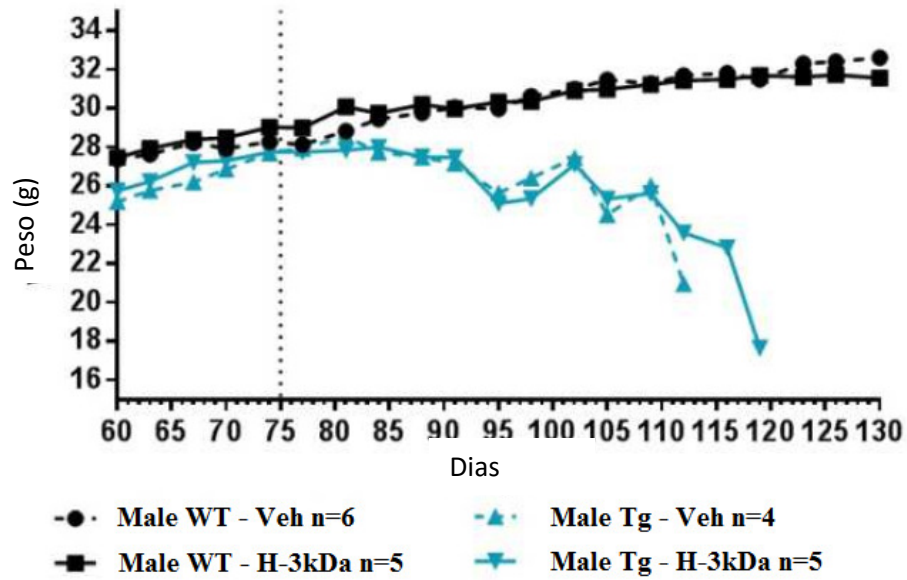


FIGURA 9A

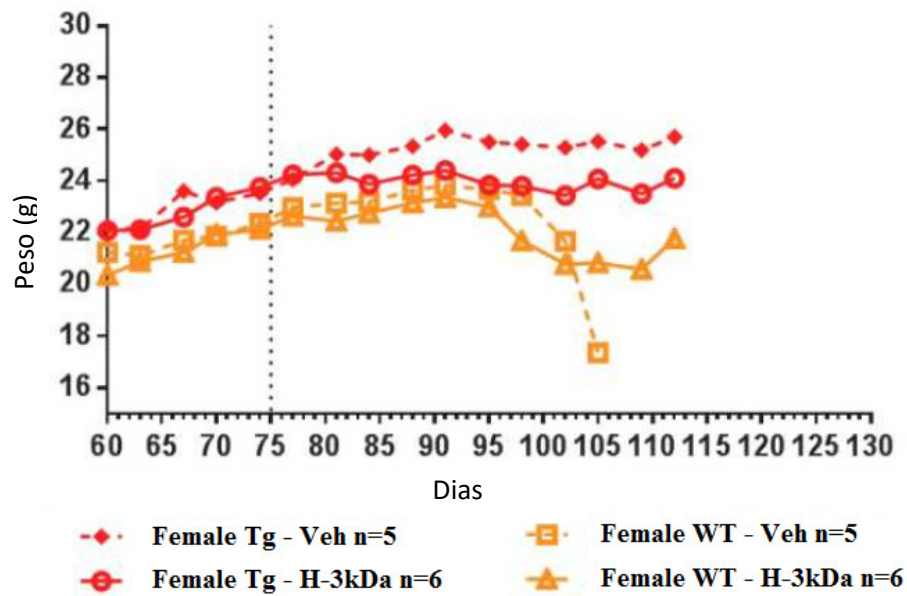


FIGURA 9B

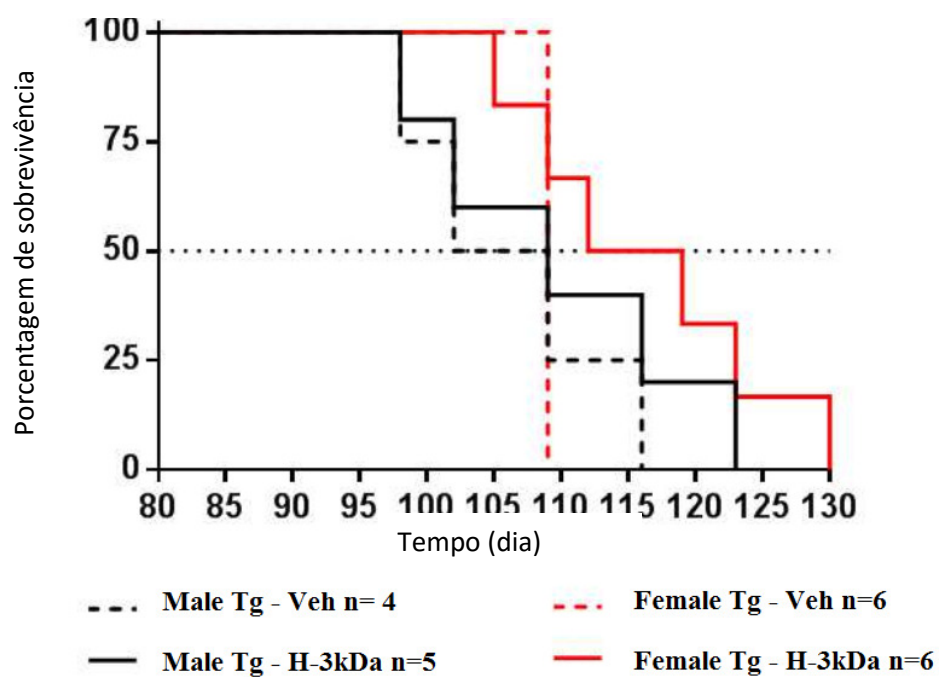


FIGURA 10

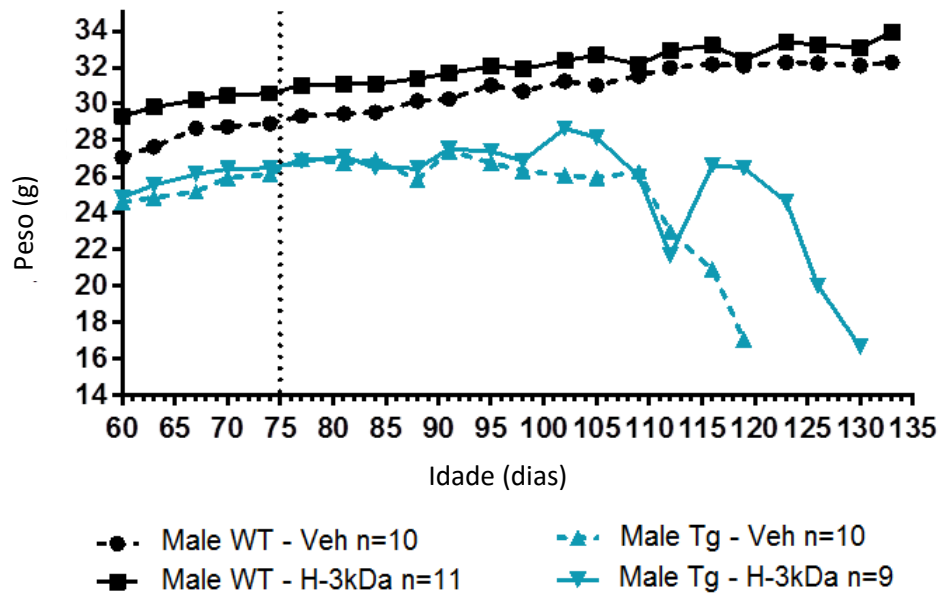


FIGURA 11A

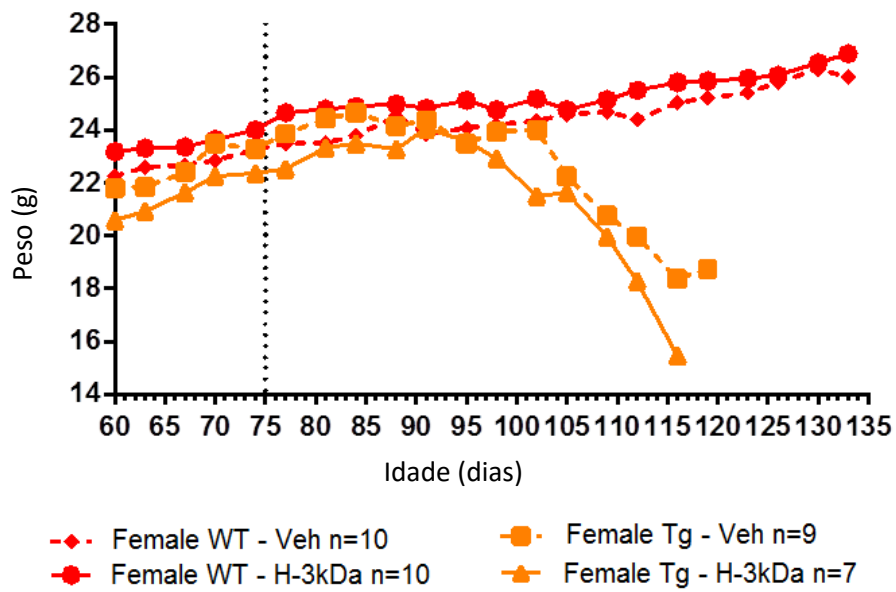


FIGURA 11B

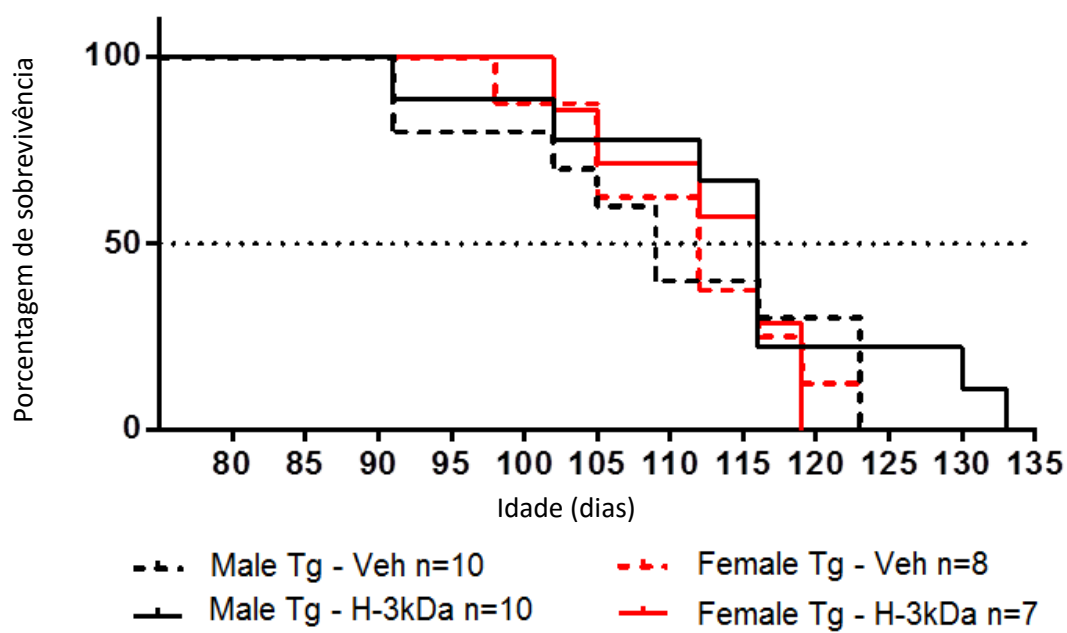


FIGURA 12

RESUMO

**PROCESSO PARA PREPARAR UMA FRACÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS,
FRAÇÃO DE LISADO DE PLAQUETAS E SEU USO PARA TRATAR
TRANSTORNOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

A presente invenção se refere a um processo para preparar uma fração de lisado de plaquetas, o referido processo compreendendo as etapas de: 1) fornecer um lisado de plaquetas, 2) coletar o referido lisado de plaquetas em uma fração, em que os componentes exibem um peso molecular máximo de 100 kDa, em uma fração específica de lisado de plaquetas e seu uso como fármaco.