INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 615454 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61L024/00 A

(12) ***FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO***

(22) *Data de depósito:* 1993.09.30

(30) *Prioridade:* 1992.09.30 FR 9211643

(43) *Data de publicação do pedido:*
1994.09.21

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.01.17

(73) *Titular(es):*
INOTEB
LE GUERNOL F-56920 SAINT-GONNERY FR

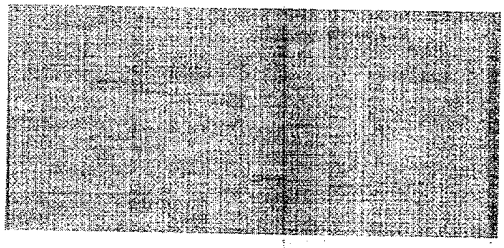
(72) *Inventor(es):*
JEAN-LOUIS PATAT FR
OLIVIER DELMAS FR
ROLAND SCHMITTHAEUSLER FR

(74) *Mandatário(s):*
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VITOR CORDON, Nº 14 - 3º 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA COLA BIOLÓGICA ENRIQUECIDA COM FACTORES PLAQUETÁRIOS E APLICAÇÃO

(57) *Resumo:*

PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA COLA BIOLÓGICA ENRIQUECIDA COM FACTORES PLAQUETÁRIOS E APLICAÇÃO



615454

Alberto Canelas

DESCRIÇÃO

"PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UMA COLA BIOLÓGICA ENRIQUECIDA COM FACTORES PLAQUETÁRIOS E APLICAÇÃO"

O invento tem como objectivo a obtenção de uma cola biológica contendo proteinas plasmáticas humanas coaguláveis. A cola biológica obtida de acordo com o invento contem nomeadamente factores de crescimento de origem plaquetária.

É sabido que concentrados de proteinas coaguláveis pela trombina, ou soluções de fibrinogénio, são utilizados na realização de um material colante premitindo nomeadamente reunir os tecidos vivos exercendo ao mesmo tempo uma acção hemostática; ver por exemplo a patente FR-2.448.900. Este material aderente é correntemente denominado "cola biológica" e é utilizado em cirurgia.

As colas biológicas permitem reproduzir, em condições fisiológicas, a fase final do processo da coagulação. Para este fim, mistura-se extemporâneamente, sobre o tecido vivo a tratar, uma solução contendo fibrinogénio e factor XIII com uma solução contendo trombina e iões cálcio. O fibrinogénio, na presença de trombina e de iões cálcio, é transformado em fibrina. Os monómeros de fibrina reunem-se para formar polímeros de fibrina e estes polímeros são reticulados pela acção do factor XIII activado. O factor XIII, activado sob a acção da trombina na presença de iões cálcio, é uma transamidase que estabelece ligações peptidicas entre as cadeias de fibrina com formação de uma rede.

No presente pedido, denominar-se-á "cola biológica" um concentrado de proteinas coaguláveis pela trombina, se bem que seja somente em presença de trombina e de sais de cálcio (ou após activação da protrombina que ele contem) que um tal concentrado constitui verdadeiramente uma cola.

A formação da rede de fibrina é responsável pela actividade hemostática da cola biológica. Por outro lado, a fibrina adere aos tecidos circundantes, nomeadamente por intermédio da fibronectina e do colagénio. Além disso, o factor XIII activado estabelece ligações peptídicas entre a fibrina e a fibronectina, o que reforça as propriedades adesivas.

É sabido que o coágulo de fibrina desaparece progressivamente, in vivo, sob a acção de um enzima proteolítico denominado plasmina, o que limita a duração da colagem. É contudo possível reforçar a duração da acção das colas biológicas adicionando-lhes por exemplo alfa 2-antiplasmina ou um inibidor das proteases tal como a aprotinina, ou ainda ácido épsilon-aminocaproico.

As aplicações das colas biológicas são numerosas, em particular em cirurgia para evitar hemorragias, para substituir os fios das suturas ou para reforçar estes.

Contudo, as colas biológicas não apresentam actividade particular própria para favorecer a cicatrização.

É sabido que a cicatrização é favorecida nomeadamente por certos factores de crescimento que actuam directamente sobre células alvo presentes ao nível de uma ferida. Estes factores de crescimento induzem a multiplicação ou a diferenciação, ou ainda a atracção celular (quimiotactismo). As plaquetas sanguíneas (ou trombocitos) constituem uma das fontes principais dos factores de crescimento no sangue.

Quando de uma lesão celular in vivo, os trombocitos libertam factores de crescimento contidos nos grânulos, sob a acção de activadores dos trombocitos, de entre os quais a trombina. Os produtos flutuantes de plaquetas activadas encerram uma grande diversidade de moléculas, como por exemplo o factor de crescimento derivado das plaquetas, ou PDGF (Platelet-derived growth factor), o "Transforming growth factor bêta", o "Basic fibroblast growth factor", o "Platelet factor 4", o "Platelet-derived endothelial growth factor", o "Heparin-binding epidermal growth factor", o "Insulin-like growth factor 1", o "Connective-tissue activating peptide III", a beta-troboglobulina, o "Epidermal growth factor", o plasminogénio, o factor Von Willebrand, o fibrinogénio, a serotonina, a histamina, a adenosina di-et trifosfato, a fibronectina, a vitronectina, o factor XIII plaquetário, enzimas proteolíticos ou glicolíticos, os metabolitos do ácido araquidónico, etc....; ver nomeadamente H.L. Wong & S.M. Wahl, In "Peptide Growth Factors and their Receptors" Spron & Roberts Eds., Springer-Verlag, Berlin, p. 510;
R.A. Terkeltaub & M.H. Ginsberg, In "The Molecular and Cellular Biology of Wound repair", Clarck & Henson Eds, Plenum Press, New York, p. 38.

Os extractos plaquetários encerram uma actividade mitogénica elevada, e o seu efeito cicatrizante é conhecido; ver nomeadamente D. Knighton et al., Ann. Surg., 196, 379-388 (1982); D.M. Carter et al., In "Growth factors and other aspects in Wound Healing", Barbul. Oines, Cadwell Hunt Eds, Alan R. Liss Inc., New York 1988, p. 303-317; patente dos E.U.A. No. 4.760.131 e pedidos de patente PCT WO 86/03122, WO 88/03409 e WO 89/05656.

Descobriu-se actualmente que é possível obter uma cola biológica melhorada, favorecendo nomeadamente a cicatrização, graças a um processo permitindo reunir simultâneamente as proteinas coaguláveis pela trombina e factoes plaquetários.

Os modos de preparação dos concentrados de proteinas coaguláveis pela trombina são conhecidos. A matéria prima é constituida por plasma sanguíneo, ou seja o sangue do qual se tenha eliminado as células sanguíneas. Dito de outro modo, trata-se de um produto empobrecido em plaquetas. O processo consiste essencialmente em precipitar o fibrinogénio quer pelo etanol, de acordo com o método de Cohn, quer pela obtenção de crioprecipitado. É sabido que a preparação de um crioprecipitado consiste em congelar um plasma e em seguida em descongelá-lo a uma temperatura superior a 0 e inferior a 6° C, geralmente compreendida entre +1 e +4° C. A fracção sólida que permanece, e que contem nomeadamente o fibrinogénio e a fibronectina, é denominada crioprecipitado e pode ser separada da fracção líquida por centrifugação. O volume de crioprecipitado está geralmente compreendido entre 1/25 e 1/100 do volume do plasma de partida. As proteinas plasmáticas insolúveis nas condições de obtenção do crioprecipitado são portanto concentradas de um factor de 25 a 100 no decurso da crioprecipitação. Contudo as preparações assim obtidas são pobres em factores de crescimento. Em particular as colas biológicas preparadas de acordo com os processos industriais conhecidos não têm actividade mitogénica notável.

Foi actualmente descoberto que ao utilizar como produto de partida um plasma enriquecido em plaquetas, numerosos factores plaquetários, se bem que normalmente solúveis nas condições de obtenção do crioprecipitado, encontram-se retidos no referido crioprecipiatdo em proporções muito importantes, enquanto se deveria normalmente esperar uma repartição uniforme desses factores entre a fracção líquida e o crioprecipitado obtidos.

O processo do invento permite obter um produto combinando as propriedades hemostáticas e adesivas dos concentrados de proteinas coaguláveis

pela trombina e as actividades cicatrizantes dos extractos plaquetários, sem que seja necessário proceder a duas preparações distintas.

É assim que graças ao processo do invento, o factor de concentração do PDGF, no crioprecipitado, é geralmente superior a 10. O rendimento em PDGF é geralmente superior a 20 ng por milhão de plaquetas presentes no plasma de partida.

O invento tem pois como objectivo um processo de preparação de uma cola biológica contendo um concentrado de proteinas coaguláveis pela trombina., caracterizada pelo facto dela conter pelo menos um factor de crescimento de origem plaquetária.

O referido factor de crescimento é nomeadamente PDGF.

A cola biológica obtida de acordo com o invento contem geralmente pelo menos 20 ng/ml, e mais frequentemente pelo menos 50 ng/ml de PDGF. Geralmente, ela pode conter de 20 a 600 ng/ml de PDGF.

A cola biológica contem outros produtos presentes normalmente nos extractos plaquetários, e em particular a beta tromboglobulina, o inibidorde tipo 1 do activador do plasminogénio (PAI-1) e o factor XIII plaquetário (Factor XIII-A). Ela contem por exemplo pelo menos 10 µg/ml, e em particular de 10 a 300 µg/ml, de beta-tromboglobulina, pelo menos 1 µg/ml de PAI-1 e em particular de 5 a 40 µg/ml, de PAI-1. A proporção de factor XIII-A em relação ao Factor XIII-S é de pelo menos 1,2 vezes mais elevada que a proporção desses factores num plasma normal, e em particular de 1, 2 a 4 vezes mais elevada.

A cola biológica do invento contem por exemplo :

- proteinas : 60 - 200 g/l,
- fibrinogénio : 30 - 150 g/l, em particular 50-100 g/l,
- fibronectina : 6 - 14 g/l, nomeadamente 8 - 12 g/l,
- factor XIII : 10 - 60 unidades de plasma equivalente,
- albumina : 10 - 38 g/l, em particular 18-30 g/l.

A unidade de plasma equivalente corresponde à concentração plasmática normal em factor XIII presente num lote de plasmas.

A concentração em proteinas é determinada pelo método de Biuret. A concentração em fibrinogénio é determinada pelo método ponderal, a concentração em fibronectina e em PAI-1 por um teste ELISA (Stago), de acordo com as instruções do fabricante, a actividade em factor XIII por um teste de libertação de amoníaco provocada pela incorporação de éster etílico de glicina sobre um substrato peptidico (Réactifs Berichrom F XIII; Behring), de acordo com as recomendações do fabricante, o factor XIII-A e XIII-S pelo método de Laurell utilizando antisoros específicos (Stago). A concentração em albumina é determinada por electroforese sobre Acetato de Celulose (Sebia), de acordo com as recomendações do fabricante. O teor em proteina da banda de electroforese da albumina é determinado por densitometria.

A cola biológica contem os factores da coagulação em quantidade suficiente para lhe conferir a propriedade de coagular activando quer a via intrinseca da coagulação, quer a via extrinseca da coagulação. A cola biológica contem por exemplo entre 0,5 e 1,5 vezes a concentração plasmática normal em protrombina, determinada quer pelo método de Laurell utilizando um antisoro específico (Stago), quer pelo método cronométrico (Stago déficient II, Stago), de acordo com as recomendações do fabricante.

Uma diluição a 1/2 num tampão fisiológico da cola biológica apresenta um tempo de Quick equivalente ao de um plasma normal diluido entre 1/2 e 1/6. O tempo de Quick explora a capacidade para activar a via extrinseca da coagulação. Ele é determinado com a ajuda do reagente de marca "Neoplastine" (Stago), contendo tromoboplastina, de acordo com as recomendações do fabricante.

Uma diluição a 1/2 num tampão fisiológico da cola biológica apresenta um tempo de caulino equivalente ao de um plasma normal diluido entre 1:1 e 1:4. O tempo de caulino explora a capacidade de activação da via intrinseca da coagulação. Ele é determinado com a ajuda dos reagentes C.K. PREST (Stago), de acordo com as recomendações do fabricante, exceptuando o facto da cefalina ser omitida quando da realização do teste.

O processo de preparação da cola biológica de acordo com o invento contem factores plaquetários em quantidade suficiente para lhe conferir propriedades mitogénicas, podendo ser posto em evidencia de acordo com os métodos clássicos.

A actividade mitogénica da cola biológica de acordo com o invento é por exemplo tal que diluida a 1/4000e (e mesmo, geralmente, a 1/5000e), ela possui uma actividade mitogénica pelo menos igual à de uma solução contendo 0,1 ng/ml de PDGF num teste de medição da incorporação de timidina tritiada por células 3T3 estimuladas numa fase de interrupção de crescimento.

Um tal teste é descrito por exemplo por HART C.E. et al., Biochemistry vol. 29, 166-172 (1990).

A célula 3T3 é uma célula de embrião de ratinho Swiss (linhagem

ATCC CCL 92). Uma linhagem proveniente de uma sub-clonagem encontra-se igualmente disponível (NIH/3T3 : ATCC CRL 1658).

A cola biológica pode ser constituida essencialmente por um crioprecipitado proveniente de um plasma enriquecido em plaquetas, e o invento relaciona-se com um processo de preparação de uma cola biológica na qual se prepara e se recolhe um crioprecipitado a partir de um plasma congelado, caracterizado pelo facto de se utilizar como plasma de partida um plasma enriquecido em plaquetas.

Dito de outro modo, o processo do invento é caracterizado pelo facto de antes de se preparar o crioprecipitado, se preparar um plasma enriquecido em plaquetas. A operação de enriquecimento do plasma em plaquetas é efectuada de acordo com os métodos usuais, nomeadamente por centrifugação do sangue colhido.

O plasma enriquecido em plaquetas contem geralmente pelo menos 50 milhões de plaquetas por ml, nomeadamente cerca de 100 milhões a 1 milhar de milhões de plaquetas por ml, e por exemplo cerca de 100 milhões a 500 milhões por ml.

As condições de obtenção do crioprecipitado são as condições clássicas. Por exemplo congela-se a uma temperatura não superior a -15° C, por exemplo compreendida entre -15 e -60° C. Mantem-se o produto a esta temperatura durante pelo menos um período de tempo suficiente para permitir um equilíbrio térmico na massa do produto. Este tempo é, por exemplo, da ordem das 12 horas a 72 horas.

O plasma é em seguida descongelado a uma temperatura superior a

0° C mas inferior à temperatura à qual o conjunto do produto congelado se liquefaz. Opera-se geralmente entre +1 e +6° C, e em particular a cerca de +4° C. A duração da incubação à temperatura de descongelação é suficiente para permitir realizar um equilíbrio térmico; esta duração está compreendida, por exemplo, entre 12 e 24 horas.

Pode.se, em seguida, separar o crioprecipitado da fracção líquida. Com esta finalidade, centrifuga-se o plasma descongelado a uma temperatura suficientemente elevada para não o recongelar, e suficientemente baixa para evitar a liquefacção do crioprecipitado, e em seguida elimina-se o produto flutuante de acordo com métodos conhecidos, e recolhe-se o crioprecipitado que constitui o coágulo de centrifugação. O volume do crioprecipitado representa geralmente 1/25 a 1/100 do volume de plasma inicial.

Geralmente a centrifugação é efectuada a uma temperatura compreendida entre +1 e +6° C.

No caso em que não se deseja utilizar imediatamente a cola biológica constituida pelo crioprecipitado obtido, ela poderá ser recongelada, por exemplo a -20° C.

Quando a cola biológica se destina a ser utilizada imediatamente, convem liquefaze-la por aquecimento a uma temperatura suficiente, habitualmente compreendida entre 32 e 38° C.

A simplicidade do processo de obtenção da cola biológica enriquecida em factores plaquetários de acordo com o invento permite aplicar este processo à reealização de uma cola biológica autóloga, ou seja obtida a partir do plasma proveniente de um único dador, tendo em vista a utilização nesse

doador. Uma das vantagens deste processo consiste no facto de todas as operações, incluindo o enriquecimento do plasma em plaquetas, poderem ser efectuadas no sistema de bolsas utilizado para a colheita de sangue de um doador.

Evidentemente pode-se preparar a cola biológica a partir do plasma proveniente de vários dadores identificados.

O produto de partida do processo do invento é um plasma enriquecido em plaquetas. A preparação de um tal plasma enriquecido em plaquetas é conhecido por si mesmo. Ela pode ser realizada, por exemplo, de acordo com o método que se segue. Sangue total, recolhido quando de uma doação de sangue, num sistema com bolsa tripla (Maco-pharma por exemplo), é centrifugado num aparelho de centrifugação Jouan K110 a 3.000 x g durante 4 minutos. O plasma flutuante, rico em plaquetas, é transvasado para a bolsa de transferência 3 do sistema de bolsa tripla, com a ajuda de um extractor de plasma. A bolsa 3 é separada do resto do sistema por soldadura da tubuladura. É esta bolsa que será utilizada para o fabrico, de acordo com o invento, do concentrado de proteinas coaguláveis pela trombina.

O invento tem igualmente como objectivo a utilização diferente de utilização num método de tratamento terapêutico ou cirúrgico do corpo humano ou animal da cola biológica que pode ser obtida de acordo com o processo acima mencionado.

Esta uitilização pode ser efectuada de acordo com os métodos conhecidos por sí mesmos. O principio dessa utilização consiste em provocar a formação de fibrina por transformação do fibrinogénio. Esta transformação é realizada pela acção da trombina. A trombina poderá ser trombina exógena adicionada, de acordo com os métodos conhecidos por si mesmos: para isso,

mistura-se a cola biológica obtida tal como foi descrita anteriormente com uma solução aquosa contendo trombina e iões cálcio afim de desencadear a reacção de coagulação por transformação do fibrinogénio em fibrina.

Pode-se utilizar nomeadamente uma solução aquosa contendo de 0,5 a 500 U NIH/ml de trombina e uma concentração em iões cálcio (nomeadamente sob a forma de cloreto de cálcio) compreendida, por exemplo, entre 5 e 100 mM, em particular entre 20 e 60 mM.

A mistura com a solução de trombina é efectuada de preferênciaa in situ, sobre os tecidos a tratar.

Geralmente, mistura-se o crioprecipitado liquefeito e a solução aquosa de trombina nas proporções volumétricas de 5:1 a 1:2.

Se desejado, adiciona-se à cola final, ou a um dos seus constituintes antes da sua mistura, um inibidor da plasmina ou análogo (alfa 2-antiplasmina, aprotinina, ácido épsilon-aminocaproico, ácido tranexâmico, por exemplo).

Poderá também ser vantajosa a presença de protrombina e de outros factores de coagulação na cola biológica do invento, e activar quer a via extrínseca, quer a via intrinseca da coagulação.

O invento tem pois nomeadamente como objectivo a utilização da cola biológica obtida tal como foi anteriormente indicado, sendo esta utilização caracterizada pelo facto de se adicionar à referida cola biológica pelo menos um agente que favoreça a activação da protrombina endógena. Desencadeia-se também o fenómeno de coagulação, operando de preferência a uma temperatura de cerca de 37° C.

Com esta finalidade, é suficiente adicionar à cola biológica uma solução aquosa contendo iões cálcio (por exemplo 5-100 mM, em particular 20 - 60 mM).

Se se desejar esta coagulação, poder-se-á operar tal como é indicado aqui a seguir, com a ajuda de activadores.

Para activar a via intrínseca, pode-se misturar a cola biológica com uma solução aquosa contendo iões cálcio (por exemplo 5 - 100 mM, em particular 20 - 60 mM), e colocá-la em contacto com pelo menos um activador conhecido do Factor XII da coagulação, e de um modo mais geral com superfícies ou compostos sólidos, por exemplo sob a forma de pó, insolúvel na cola biológica e apresentando cargas negativas, como silicatos, (nomeadamente o caulino (caolino), o silício, o vidro de silício, cristais de carbonato de cálcio, como por exemplo a aragonite, proveniente por exemplo de esqueletos (carcaças) de coral, cristais de dicitrato de tri-cálcio. Ao fim de um período de tempo suficiente, o qual pode ser determinado por meio de simples experiências de rotina, separa-se a cola biológica dos referidos compostos insolúveis por filtração. Pode-se operar por exemplo numa coluna munida de um filtro.

Para activar a via extrínseca da coagulação, pode-se misturar a cola biológica com uma solução aquosa contendo iões cálcio 5 - 100 mM (em particular 20 - 60 mM) e tromboplastina tecidular, por exemplo de origem animal, ou tromboplastina produzida por engenharia genética.

Uma das vantagens importantes da cola biológica obtida de acordo com o invento consiste no facto de ela conter protrombina em quantidade

suficiente para permitir desencadear a coagulação da cola sem adição de trombina exógena, o que reduz os riscos de contaminação acidental. O processo do invento está pois particularmente adaptado às necessidades actuais de utilização de produtos autólogos.

A cola biológica pode ser utilizada nomeadamente no tratamento das feridas traumáticas ou cirúrgicas, na colocação e manutenção dos enxertos (nomeadamente enxertos de pele, de osso, etc...). Ela pode igualmente ser utilizada para fixar peças de protese, incluindo proteses ósseas, peças de osteosíntese e proteses dentárias, e também para fixar e manter reunidos materiais de enchimento ósseo, nomeadamente materiais de enchimento reabsorvíveis à base de carbonato de cálcio (por exemplo à base de esqueleto de coral ou de concha de Pinctada margaritifera), hidroxiapatite ou polímeros biodegradáveis tais como o poli (ácido láctico).

EXEMPLO 1

Foi preparado um plasma humano enriquecido em plaquetas, tal como foi anteriormente descrito.

O plasma enriquecido assim obtido contem 154 milhões de plaquetas por ml.

A bolsa de transferência encerrando 230 ml do referido plasma enriquecido em plaquetas é colocada numa câmara fria a -40° C durante 72 horas. A bolsa de plasma é em seguida colocada num frigorífico a uma temperatura de 4° C durante 20 horas. A bolsa de plasma é em seguida centrifugada durante 20 minutos a 3.000 rotações por minuto, sempre à temperatura de +4° C. Após

centrifugação, a bolsa é colocada horizontalmente, é colocada uma tubuladora de colheita e o produto flutuante líquido é transfegado por aspiração.

O resíduo sólido contido na bolsa constitui o crioprecipitado que pode ser conservado por recongelação a uma temperatura de -20° C até à sua utilização.

Quando se deseja utilizar imediatamente o crioprecipitado, coloca-se a bolsa em banho-maria, por exemplo a uma temperatura de 37° C. Após 15 minutos de incubação a solução residual é colhida. O seu volume é de cerca de 3 ml.

Análise do produto obtido : ver quadro 1 aqui a seguir.

EXEMPLO 2

Opera-se de um modo análogo ao descrito no exemplo 1. O volume de plasma tratado é de 250 ml. O plasma continha à partida, 256 mulhões de plaquetas por ml. O volume da solução final recuperada, proveniente da liquefacção do crioprecipitado, é de 5 ml.

Análise : ver quadro 1.

O teor em PDGF do produto flutuante obtido após centrifugação do plasma descongelado é de apenas 5,9 ng/ml.

Observa-se (por comparação com o Quadro I) que a quase totalidade de PDGF se encontra no crioprecipitado.

 Alberto Canelas

QUADRO 1

		Exemplo 1	Exemplo 2
Proteinas (1),	(mg/ml)	61	89,6
PDGF (2),	(ng/ml)	282	310
Beta-Tromboglobulina (3)	(µg/ml)	127	130
Coagulável pela trombina (4)		SIM	SIM
Actividade mitogénica (5) (actividade específica)		104	não medido

(1) Determinado pelo método de Bradford (Réactif Biorad referência 500-0006)

(2) PDGF : factor de crescimento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor), medido por um teste "ELISA"

(3) Medido por um teste "ELISA" (Stago, France, referência 0419)

(4) Determinado misturando um volume de crioprecipitado liquefeito a um volume de uma solução de trombina a 500 U.N.I.H. e de cloreto de cálcio 50 mM. Após 1 minuto, observa-se a formação de um coágulo.

(5) A actividade específica é determinada de acordo com o protocolo aqui a seguir descrito. A radioactividade obtida com a testemunha é de 2.000 cpm. A 4.000 cpm, a concentração em proteinas é de 0,0096 mg/ml no exemplo 1. A título indicativo, a actividade específica do Tissucol (marca comercial designando uma cola biológica vendida por IMMUNO) medida pelo mesmo método, é de 0,22.

O protocolo de medição da actividade mitogénica foi o seguinte:

Células de fibroblastos são isoladas a partir do prepúcio de uma criança com a idade de 6 meses.

As células são colocadas em suspensão num meio DMEM (Gibco) encerrando 10% de soro de vitelo fetal. Semeia-se cada recipiente de uma placa de microtitulação com 96 recipientes com 200 µl da suspensão a 40.000 células/ml. Após 3 dias de incubação a 37° C, numa atmosfera a 5% de CO_2, o meio de cultura é substituido por um meio DMEM (Gibco) a 8% de soro de vitelo recém nascido.

Após 3 dias de incubação suplementar, são adicionados 50 µl de uma solução de proteinas coaguláveis pela trombina (amostra). Cada amostra é testada com diferentes diluições em DMEM, e triplamente. 50 µl de DMEM são inoculados em recipientes testemunhas. A microplaca é incubada nas mesmas condições durante 24 horas. Seis horas antes do fim da incubação, 50 µl de uma solução de timidina tritiada a 10 µCi/ml são adicionados em cada recipiente. Após a incubação, os recipientes são lavados por uma solução fisiológica. As células são então descoladas dos recipientes por uma solução de tripsina a 0,25%, em presença de etileno-diamina-tetra-acetato (solução Gibco). As células são então recolhidas num filtro, graças a um colector de células do tipo "Skatron". Os filtros são então secos e a radioactividade é medida na presença de um líquido de cintilação.

Determinação da actividade específoica:

Regista-se num gráfico, em abcissa, a concentração em proteinas da amostra nos recipientes (expresso em mg/ml) e em ordenada a radioactividade correspondente. Determina-se graficamente, por interpolação, a concentração em proteinas da amostra dando origem a uma taxa de radioactividade duas vezes superior à das taxas dos recipientes testemunhas. O inverso desta concentração é denominado a actividade específica da amostra.

EXEMPLO 3:

Opera-se de um modo análogo ao do exemplo 1. Os resultados das análises (médias de várias experiências) são registados no quadro II

QUADRO II

	No. exp.	Média	Val. min.	Val. max.
Concentração em plaquetas no plasma de partida				
10^6/ml	15	350	221	552
Proteinas g/l	15	120	95	160
Fibrinogénio g/l	15	69	52	93
Fibronectina g/l	9	7,8	6	13
Factor XIII UEP*	15	28	15	57
F XIII-A/F XIII-S	4	2,9	2,14	3,7
PDGF ng/ml	4	400	300	600
beta-tromboglobulina µg/ml	9	200	184	250
Albumina g/l	6	25,1	19,8	35,9
PAI-1 µg/ml	5	19	14	24

* UEP : Unidade de plasma equivalente

EXEMPLO 4

Prepara-se uma cola biológica de um modo análogo ao descrito no exemplo 1. Num tubo, mistura-se sucessivamente 150 µl de cola biológica, 150

µl de soro fisiológico, 300 µl de uma solução aquosa de cloreto de cálcio a 25 mM e, quer 300 µl de uma suspensão de caulino, quer 300 µl de uma suspensão de pó de coral, quer 300 µl de soro fisiológico. O tubo é incubado a 37° C em banho-maria. Segue-se o aparecimento de um coágulo no tubo.

Na presença de caulino, o coágulo forma-se após 4 minutos de incubação. Na presença de pó de coral em vez de caulino, o coágulo forma-se em 7 minutos. A preparação sem caulino nem coral (obtida por simples adição de soro fisiológico coagula ao fim de 9 minutos.

Lisboa, 20 de Março de 2001

Alberto Canelas

ALBERTO CANELAS
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA

Albert Canet

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de preparação de uma cola biológica no qual se prepara e se recolhe um crioprecipitado, constituindo a referida cola, a partir de um plasma congelado, caracterizado pelo facto de se utilizar como plasma de partida um plasma enriquecido em plaquetas.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto do referido plasma enriquecido conter pelo menos 50 milhões de plaquetas por ml.

3. Processo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado pelo facto do referido plasma de partida conter de 100 milhões a 1 milhar de milhões, e em particular de 100 milhões a 500 milhões de plaquetas por ml.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de se aquecer o referido crioprecipitado para se obter a referida cola sob forma líquida.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo facto de na separação de sangue colhido, se preparar primeiro um plasma enriquecido em plaquetas.

6. Processo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado pelo facto do referido plasma ser proveniente de um único dador, e pelo facto de se efectuar o conjunto das operações do referido processo num sistema de bolsas que servem para colher o sangue.

7. Utilização diferente de utilização num método de tratamento terapêutico ou cirúrgico do corpo humano ou animal da cola biológica obtida de acordo com o processo de qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo facto de se adicionar à referida cola um agente que favoreça a activação da protrombina endógena.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo facto do referido agente ser uma solução aquosa contendo iões cálcio.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo facto do referido agente ser a tromboplastina, na presença de iões cálcio.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo facto do referido agente ser um activador do Factor XII da coagulação, na presença de iões cálcio.

11. Utilização de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada pelo facto do referido activador ser escolhido de entre os compostos sólidos insolúveis na cola biológica e apresentando cargas negativas.

12. Utilização de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada pelo facto do referido composto sólido ser escolhido de entre os silicatos, o vidro de sílica, carbonato de cálcio ou dicitrato de tri-cálcio.

Lisboa, 20 de Março de 2001

ALBERTO CANELAS
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA