

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

(22) Data de pedido: 2003.09.05	(73) Titular(es): DFB TECHNOLOGY HOLDINGS, LLC 318 MCCULLOUGH SAN ANTONIO, TX 78215US
(30) Prioridade(s): 2002.09.06 US 408565 P 2002.12.19 US 324257	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.06.29	(72) Inventor(es): THOMAS HUNZIKER CH ERIC ROLLAND FR BEATRICE MIS CH CHRISTOPHER RINSCH CH
(45) Data e BPI da concessão: 2011.11.30 045/2012	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA A UTILIZAÇÃO E COMPOSIÇÕES DE MATÉRIA DE FACTORES DE ANGIOGÉNICOS OU OUTROS FACTORES DE CRESCIMENTO/CITOQUINAS EXPRESSOS POR MISTURAS DE ESTIRPES OU LINHAGENS DE CÉLULAS HUMANAS ALOGENEICAS DE DIVERSOS TIPOS E ETAPAS DE DIFERENCIAÇÃO. A INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA PREPARAÇÕES NÃO ENCAPSULADAS (MISTURADAS COM OU APLICADAS A MATERIAIS DE MATRIZ EXTRACELULAR OU SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOCOMPATÍVEIS) PARA O PROPÓSITO DE APLICAÇÃO TEMPORÁRIA EM FERIDAS OU DEFEITOS NA PELE OU EM OUTROS TECIDOS PARA A RESTAURAÇÃO DE TECIDO CONJUNTIVO FORNECEDOR DE SANGUE PARA PERMITIR QUE CÉLULAS ESPECÍFICAS DE ÓRGÃOS RESTABELEÇAM A INTEGRIDADE DO ÓRGÃO, BEM COMO INIBIR UMA FORMAÇÃO EXCESSIVA DE CICATRIZ.

RESUMO**"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDOS"**

A presente invenção proporciona a utilização e composições de matéria de factores de angiogénicos ou outros factores de crescimento/citoquinas expressos por misturas de estirpes ou linhagens de células humanas alogeneicas de diversos tipos e etapas de diferenciação. A invenção também proporciona preparações não encapsuladas (misturadas com ou aplicadas a materiais de matriz extracelular ou substâncias sintéticas biocompatíveis) para o propósito de aplicação temporária em feridas ou defeitos na pele ou em outros tecidos para a restauração de tecido conjuntivo fornecedor de sangue para permitir que células específicas de órgãos restabeleçam a integridade do órgão, bem como inibir uma formação excessiva de cicatriz.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDOS"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção é definida nas reivindicações e diz respeito, de um modo geral, à regeneração de tecidos, v.g., o tratamento de feridas utilizando células que segregam factor de crescimento, citoquina ou factor angiogénico misturadas com uma matriz extracelular biológica ou sintética aplica à ferida.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As feridas (isto é, lacerações ou aberturas) em tecidos de mamíferos podem provocar a ruptura de tecidos e a coagulação de da microvasculatura na superfície da ferida. A reparação destes tecidos constitui uma resposta celular controlada de um modo ordeiro a uma lesão. Todas as feridas de tecidos moles, independentemente do seu tamanho, possuem um processo de cura idêntico. Os mecanismos de crescimento e reparação de tecidos são sistemas biológicos, nos quais ocorre uma proliferação e angiogénese celular na presença de um gradiente de oxigénio. As alterações morfológicas e estruturais sequenciais, as quais ocorrem durante a reparação de tecidos foi já caracterizada minuciosamente e foi, em alguns casos, quantificada. Veja-se Hunt, T- K, et al., "Coagulation and macrophage stimulation of angiogenesis and wound healing", em The surgical wound, págs. 1-18, ed. F. Dineen & G. Hildrick-Smith (Lea & Febiger, Philadelphia: 1981).

A regeneração de tecidos em diversos órgãos, tais como, *v.g.*, na pele ou no coração, depende de restaurar o fornecimento sanguíneo aos tecidos conjuntivos e permitir que células residuais específicas do órgão, tais como queratinócitos ou células de músculos, restabeleçam a integridade do órgão. Assim, uma função relevantes das células mesenquimais, isto é, os fibroblastos, ou, para além disso, as células endoteliais da vasculatura, é a secreção de factores que aumentem o processo de cura, *v.g.*, factores que promovem a formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese) ou factores que promovem a re-epitelialização por proliferação e migração de queratinócitos.

A morfologia celular de uma ferida é constituída por três zonas distintas. O espaço da ferida vascular central é deficiente em oxigénio, acidótico e hipercárbico e possui níveis elevados de lactato. Adjacente ao espaço de ferida encontra-se uma zona gradiente de isquemia local, a qual é populada por fibroblastos de divisão. Para além desta última zona encontra-se uma área de síntese activa de colagénio caracterizada por fibroblastos maduros e diversos capilares recém-formados (isto é, neovascularização). Embora o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogénese) seja necessário para a cura do tecido lesionado, os agentes angiogénicos não são normalmente capazes de satisfazer a necessidade sentida à bastante tempo de proporcionar os efeitos biossintéticos suplementares de reparação de tecidos. Apesar da necessidade de um processo de cura mais rápido de feridas (isto é, queimaduras graves, incisões cirúrgicas, lacerações e outros traumas), até à data, apenas foi

alcançado um sucesso limitado na aceleração do processo de cura de feridas através de agentes farmacêuticos.

O objectivo principal no tratamento de feridas é alcançar o fecho da ferida. As feridas cutâneas abertas constituem uma categoria principal de feridas. Esta categoria compreende feridas cirúrgicas agudas e traumáticas, *v.g.*, úlceras crónicas, feridas de queimaduras, bem como feridas crónicas, tais como úlceras neuropáticas, escaras por pressão, úlceras arteriais e venosas (estase) ou úlceras mistas arterio-venosas, e úlceras diabéticas. As feridas cutâneas abertas são normalmente curadas por meio de um processo que compreende seis componentes principais: i) inflamação, ii) proliferação de fibroblastos, iii) proliferação de vasos sanguíneos, iv) síntese de tecido conjuntivo, v) epitelialização e vi) contracção da ferida. A cura de feridas é prejudicada quando estes componentes, individualmente ou em um conjunto, não funcionam adequadamente. Há diversos factores que podem afectar o processo de cura de feridas, incluindo a má nutrição, infecção, agentes farmacológicos (*v.g.*, fármacos citotóxicos e costicosteróides), diabetes e idade avançada. Veja-se Hunt *et al.*, em *Current Surgical Diagnosis & Treatment* (Way; Appleton & Lange), págs. 86-98 (1988).

As feridas na pele que não são facilmente curáveis podem provocar ao sujeito stress físico, emocional e social considerável, bem como elevadas despesas financeiras. Veja-se, *e.g.*, Richey *et al.*, *Annals of Plastic Surgery* 23(2): 159-65 (1989). Assim, as feridas que não são curadas de um modo adequado podem necessitar de um tratamento cirúrgico mais ou menos agressivo, *v.g.*, enxerto de pele autólogo.

Têm vindo a ser desenvolvidas diversas modalidades de tratamento à medida em que o conhecimento básico dos cientistas sobre feridas e sobre os mecanismos de cura de feridas progride.

A modalidade convencional mais utilizada para auxiliar a cura de feridas cutâneas implica a utilização de revestimentos de feridas. Nos anos 60, foi dado um grande passo nos cuidados de feridas quando se concluiu que a cura de feridas com um revestimento oclusivo húmido era, de um modo geral, mais eficaz do que a utilização de revestimentos não oclusivos secos. Veja-se Winter, *Nature* 193: 293-94 (1962). Nos dias de hoje, são normalmente utilizados diversos tipos de revestimentos, incluindo películas (v.g., películas de poliuretano), hidrocolóides partículas coloidais hidrofílicas ligadas a espuma de poliuretano), hidrogeles (polímeros reticulados que contêm pelo menos cerca de 60% de água), espumas (hidrofílicas ou hidrofóbicas), alginatos de cálcio (compósitos não tecidos de fibras de alginato de cálcio) e celofane (celulose com um plastificante). Veja-se Kennon *et al.*, *Dermatol. Surg.* 21: 583-590 (1995); Davies, *Burns* 10: 94 (1983). Infelizmente, há determinados tipos de feridas (v.g., úlceras diabéticas, escaras de pressão) e as feridas de determinados sujeitos (v.g., receptores de corticosteróides exógenos) que não curam de um modo adequado em termos de tempo (ou mesmo não curam) recorrendo à utilização de tais revestimentos.

Também têm vindo a ser utilizadas diversas modalidades farmacêuticas na tentativa de melhorar a cura de feridas. Por exemplo, regimes de tratamento que envolvem sulfato de zinco foram já utilizados por alguns médicos. No entanto, a

eficácia desses regimes foi principalmente atribuída à sua inversão dos efeitos de níveis de zinco no soro sub-normais (v.g., resistência do hospedeiro diminuída e actividade bactericida intracelular alterada). Veja-se Riley, Am. Fam. Physician 24: 107 (1981). Embora deficiências em outras vitaminas e minerais também tenham sido associadas à diminuição do processo de cura de feridas (v.g., deficiência em vitaminas A, C e D; e em cálcio, magnésio, cobre e ferro), não existem evidências concretas que o aumento nos níveis no soro destas substâncias para um valor superior aos seus níveis normais melhorasse realmente o processo de cura de feridas. Assim, com a excepção de casos muitos limitados, a promoção do processo de cura de feridas com estes agentes obteve pouco sucesso.

Assim sendo, é ainda necessário meios seguros, eficazes e interactivos para aumentar o processo de cura de feridas extensas e/ou de difícil cura que possa ser utilizado sem se considerar o tipo de ferida ou a natureza da população do paciente.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito à utilização de factores angiogénicos ou outros factores de crescimento ou de citoquinas expressos por células humanas em preparações encapsuladas (misturadas ou combinadas com um material de matriz ou com substâncias sintéticas biocompatíveis), as quais irão ser temporariamente aplicadas em feridas ou em lesões na pele ou em outros tecidos para restaurar o tecido conjuntivo fornecedor de sangue, permitindo assim que as células específicas do órgão restabeleçam a integridade do órgão, bem como inibam a formação excessiva de cicatriz.

A invenção contempla uma composição para a regeneração de tecidos que compreende:

(a) um primeiro componente que compreende fibrinogénio, em que o primeiro componente se encontra sob a forma de uma pulverização e

(b) um segundo componente que compreende trombina e células alogeneicas mitoticamente inactivadas, em que o segundo componente se encontra sob a forma de uma pulverização e em que as células compreendem um ou vários queratinócitos e fibroblastos que segregam uma ou várias moléculas biologicamente activas seleccionadas entre o conjunto constituído por GM-CSF, VEGF, KGF, bFGF, TGF β , angiopoietina, EGF, IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF α e TNF α .

A invenção proporciona ainda um estojo que compreende a composição para regeneração de tecidos, que compreende:

(a) um primeiro componente que compreende fibrinogénio, em que o primeiro componente se encontra sob a forma de uma pulverização e

(b) um segundo componente que compreende trombina e células alogeneicas mitoticamente inactivadas, em que o segundo componente se encontra sob a forma de uma pulverização e em que as células compreendem um ou vários queratinócitos e fibroblastos que segregam uma ou várias moléculas biologicamente activas seleccionadas entre o conjunto constituído por GM-CSF, VEGF, KGF, bFGF, TGF β , angiopoietina, EGF, IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF α e TNF α .

A preparação de células útil para a regeneração de tecidos é descrita, *v.g.*, para utilização no tratamento de feridas da pele, que contenham um ou mais tipos de células que segreguem um ou mais substâncias biologicamente activas, misturas com ou aplicadas a uma matriz

extracelular ou um material de matriz, de um modo tal que a mistura forme uma preparação celular polimerizada e viscosa. Tal como aqui utilizado, o termo “mistura” abrange quaisquer métodos de combinação, mistura, homogeneização, união, etc., conhecidos pelos especialistas na matéria. Os tipos de células utilizados na preparação de células da invenção são fibroblastos e queratinócitos mitoticamente inactivados.

O tipo principal de células de tecido conjuntivo é o fibroblasto. Até recentemente, os fibroblastos têm sido considerados como populações de células não diferenciadas homogêneas. No entanto, o sistema de células de fibroblastos em muitas espécies, incluindo os seres humanos, é um sistema de células estaminais em que os fibroblastos se diferenciam terminalmente ao longo de sete etapas, três das quais que contêm células mitóticas e quatro que compreendem células pós-mitóticas. Veja-se Bayreuther *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5112-16 (1988); Bayreuther *et al.*, J. Cell. Sci. Suppl. 10: 115-30 (1988). A indução *in vitro* da diferenciação de fibroblastos pode ser efectuada por agentes químicos ou biológicos, tais como mitomicina C (Bienneisen *et al.*, Exp. Cell. Res. 211: 219-30 (1994)) ou por factores de crescimento ou citoquinas (Hakenjos *et al.*, Int. J. Radiat. Biol. 76: 503-09 (2000)), tais como TGF beta-1, IL-1, IL-6, interferão alfa. A indução *in vitro* também pode ser efectuada por irradiação, e.g., com raios γ ; raios X (Bumann *et al.*, Strahlenther. Onkol. 171: 35-41 (1995); luz UV (Rodemann *et al.*, Exp. Cell. Res. 180: 84-93 (1989); ou exposição física a campos electromagnéticos (Thumm *et al.*, Radiat. Environ. Biophys. 38: 195-99 (1999)). Além do mais, a indução da diferenciação

também pode ser efectuada por meio de condições de cultura, tais como jejum de soro, inibição por contacto ou adição de mitomicina C. Veja-se Palka et al., Folia Histochem. Cytobiol. 34: 121-27 (1996).

Ate à data, as propriedades de função/biológicas dos fibroblastos diferenciados foram ainda pouco estudadas. No entanto, o padrão da expressão de polipeptidos e a secreção varia desde etapas mitóticas até etapas pós-mitóticas. Os polipeptidos respectivos ainda estão a ser analisados. Veja-se, e.g., Francz, Eur. J. Cell. Biol. 60: 337-45 (1993).

A molécula biologicamente activa é pelo menos um factor angiogénico, pelo menos um factor de crescimento//citoquina ou uma combinação pelo menos de um factor angiogénico e pelo menos um factor de crescimento//citoquina. Como exemplos de moléculas biologicamente activas adequadas refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, factor de crescimento epidermal-família de factores de crescimento (EGF); factor alfa de crescimento transformante (TGF alfa); factor de crescimento de hepatócitos (HGF/SF); factor de crescimento epidermal de ligação a heparina (EGF); factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF); factor de crescimento de fibroblastos ácido (aFGF); outros factores de crescimento de fibroblastos (FGF); factor de crescimento de queratinócitos (KGF); factores de crescimento transformantes (TGF) $\beta 1$ e $\beta 2$; factor de crescimento transformante (TGF) $\beta 3$; factor de crescimento proveniente de plaquetas (PDGF); factor de crescimento endotelial vascular (VEGF); factor de necrose tumoral (TNF); interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6); outros

membros da família de interleucina/citoquina; factor I de crescimento de tipo insulina (IGF-1); factor 1 estimulador de colónias (CSF-1); e factor estimulador de colónias de granulócitos macrófagos (GM-CSF).

De acordo com variantes preferidas, a matriz extracelular ou o material de matriz é seleccionado entre o conjunto constituído por fibrina, cola de fibrina, fibrinogénio e esferas de fibrina.

De acordo com outra variante, os tipos de célula são mitoticamente inactivados, v.g., induzidos para diversas etapas de diferenciação. Por exemplo, esta inactivação mitótica pode ser efectuada por meio da administração de mitomicina C ou de outros inibidores mitóticos com base química, por irradiação com raios γ , por irradiação com raios X e/ou por irradiação com luz UV.

De acordo com outra variante, os tipos de célula são imortalizados utilizando pelo menos um gene/polipeptido seleccionado entre o conjunto constituído pelos produtos 12S e 13S de genes *E1A* de adenovírus, hTERT, antigénio T pequeno SV40, antigénio T grande SV40, vírus do papiloma E6 e E7, vírus de Epstein-Barr (EBV), antigénio-2 nuclear de Epstein-Barr (EBNA2), vírus-1 de leucemia de células T humanas (HTLV-1), HTLV-1-tax, *Herpesvirus saimiri* (HVS), mutante p53, *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc* e *Mdm2*.

Ainda de acordo com outras variantes, os tipos de célula são geneticamente manipulados para segregarem uma ou várias moléculas biologicamente activas, tais como pelo menos um factor angiogénico, pelo menos um factor de crescimento/citoquina ou uma combinação pelo menos de um factor angiogénico e pelo menos um factor de

crescimento/citoquina. Esta secreção pode ser constitutiva ou pode ser controlada por permuta de genes.

A invenção proporciona ainda a composição para a regeneração de tecidos, conforme definida nas reivindicações, para utilização na regeneração de tecidos, em que a composição para a regeneração de tecidos é administrada por via tópica a um local de ferida a um paciente que necessite de um tal tratamento.

De acordo com diversas variantes, a invenção também proporciona a composição para a regeneração de tecidos, conforme descrita nas reivindicações, para utilização no tratamento de feridas por meio da administração das preparações de células de acordo com a invenção a um local de ferida num paciente que necessite de tratamento de feridas. A preparação de células de acordo com a invenção pode ser administrada localmente num local de ferida num paciente para induzir temporariamente a regeneração de tecidos por interacção biológica com os tecidos envolventes. A preparação de células de acordo com a invenção deverá ser administrada por pulverização dos componentes no local de ferida do paciente para induzir temporariamente a regeneração de tecidos por interacção biológica com os tecidos envolventes. A preparação de células pulverizada pode causar a formação de uma matriz no local de ferida.

De acordo com diversas variantes, estes tipos de células são fibroblastos diferenciados e queratinócitos, e a molécula biologicamente activa é pelo menos um factor angiogénico, pelo menos um factor de crescimento/citoquina ou uma combinação pelo menos um factor angiogénico e pelo menos um factor de crescimento/citoquina. De acordo com

outras variantes, os tipos de célula podem ser mitoticamente inativados por meio da administração de mitomicina C ou de outros inibidores mitóticos com base química, por irradiação com raios γ , por irradiação com raios X ou por irradiação com luz UV.

De acordo com outras variantes, os tipos de célula são imortalizados utilizando pelo menos um gene/polipeptido seleccionado entre o conjunto constituído pelos produtos 12S e 13S de genes *E1A* de adenovírus, hTERT, antígeno T pequeno SV40, antígeno T grande SV40, vírus do papiloma E6 e E7, vírus de Epstein-Barr (EBV), antígeno-2- nuclear de Epstein-Barr (EBNA2), vírus 1 de leucemia de células T humanas (HTLV-1), HTLV-1-tax, *Herpesvirus saimiri* (HVS), mutante p53, *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc* e *Mdm2*.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção proporciona um estojo que compreende uma preparação de células para a regeneração de tecidos, conforme definida nas reivindicações 1 a 7.

A inactivação mitótica de células pode ser efectuada por administração de mitomicina C ou de outros inibidores mitóticos quimicamente associados, por irradiação com raios γ , por irradiação com raios X ou por irradiação com luz UV. De acordo com diversos aspectos, os tipos de célula são imortalizados utilizando pelo menos um dos seguintes: os produtos 12S e 13S de genes *E1A* de adenovírus, antígeno T pequeno de SV40, antígeno T grande de SV40, vírus do papiloma E6 e E7, vírus de Epstein-Barr (EBV), antígeno 2 nuclear de Epstein-Barr (EBNA2), vírus 1 de leucemia de células T humanas (HTLV-1), HTLV-1 tax, *Herpesvirus saimiri*

(HVS), mutante p53, *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc* e *Mdm2*.

Os tipos de célula podem segregar naturalmente uma ou várias moléculas biologicamente activas ou podem ser geneticamente manipulados para segregar um nível exógeno de uma ou várias moléculas biologicamente activas. A secreção pode ser controlada por permuta de genes ou pode ser constitutiva. De acordo com uma variante, o primeiro componente contém fibrinogénio. De acordo com outra variante, o primeiro componente contém fibrinogénio e o segundo componente contém entre cerca de 1×10^3 células/ μL e cerca de 50×10^3 células/ μL . o segundo componente também contém trombina e pode conter, facultativamente, um crioprotector, tal como uma solução de glicerol a 10%, uma solução de glicerol a 15% e uma solução de 15% de glicerol e 5% de albumina do soro humana.

De acordo com um outro aspecto, a invenção proporciona a composição para a regeneração de tecidos, conforme definida nas reivindicações, para utilização na regeneração de tecidos num local de uma ferida e num paciente que necessite de tratamento. Esta utilização compreende os passos que consistem em proporcionar um primeiro componente que contém uma matriz extracelular ou um material de matriz que contém fibrinogénio; proporcionar um segundo componente que contém entre cerca de 1×10^3 células/ μL e cerca de 50×10^3 células/ μL e trombina, em que as células que segregam uma ou várias moléculas biologicamente activas são alogeneicas, inactivadas e são queratinócitos e fibroblastos que combinam o primeiro e o segundo componentes para formar uma preparação de células adequada

para a regeneração de tecidos; e administrar a preparação de células ao local da ferida.

De acordo com uma variante, o primeiro e segundo componentes são aplicados por via tópica ao local da ferida. O primeiro componente pode ser aplicado ao local da ferida antes ou após a aplicação do segundo componente. De acordo com outra variante, o primeiro e segundo componentes são pulverizados sobre o local da ferida. De preferência, o primeiro componente é pulverizado sobre o local da ferida antes da pulverização do segundo componente sobre o local da ferida. O primeiro e segundo componentes podem ser combinados no local da ferida ou então podem ser combinados antes de atingir o local da ferida.

De acordo com uma variante, o segundo componente pode conter, facultativamente, um crioprotector, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, uma solução de glicerol a 10%, uma solução de glicerol a 15% e uma solução com 15% de glicerol e 5% de albumina do soro humana.

De acordo com outro aspecto, a invenção compreende uma preparação de células para regeneração de tecidos que contém uma matriz extracelular ou um material de matriz que contém fibrinogénio misturado com um segundo componente que contém entre cerca de 1×10^3 células/ μL e cerca de 50×10^3 células/ μL e trombina, em que as células que segregam uma ou várias moléculas biologicamente activas (tais como pelo menos um factor angiogénico, pelo menos um factor de crescimento/citoquina ou suas combinações) são alogeneicas e mitoticamente inactivadas e são seleccionadas entre o conjunto constituído por células de estroma, células epiteliais/específicas de órgãos e células provenientes do sangue.

Estes tipos de células podem ser fibroblastos diferenciados e queratinócitos. A preparação de células resultante pode encontrar-se sob a forma de uma pasta. De acordo com diversas variantes, a matriz extracelular ou material de matriz pode ser fibrina, cola de fibrina, fibrinogénio, esferas de fibrina.

A inactivação mitótica de células pode ser efectuada por meio de administração de mitomicina C ou de outros inibidores mitóticos quimicamente associados, por irradiação com raios γ , por irradiação com raios X ou por irradiação com luz UV. De acordo com diversas variantes, os tipos de células são imortalizados utilizando pelo menos um dos seguintes: os produtos 12S e 13S dos genes *E1A* genes de adenovírus, hTERT, antigénio T pequeno de SV40, antigénio T grande de SV40, vírus do papiloma E6 e E7, vírus de Epstein-Barr (EBV), antigénio 2 nuclear de Epstein-Barr (EBNA2), vírus 1 de leucemia de células T humanas (HTLV-1), HTLV-1 tax, *Herpesvirus saimiri* (HVS), mutante p53, *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc* e *Mdm2*.

Os tipos de células podem segregar naturalmente uma ou várias moléculas biologicamente activas ou então podem ser geneticamente manipulados para segregarem um nível exógeno de uma ou várias moléculas biologicamente activas. A secreção pode ser controlada por permuta de genes ou pode ser constitutiva. De acordo com uma variante, o segundo componente pode conter, facultativamente, um crioprotector, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, uma solução de glicerol a 10%, a uma solução de glicerol a 15% e uma solução de 15% de glicerol e 5% de albumina do soro humana.

A invenção também proporciona a utilização de tais preparações de células proporcionando o primeiro e o segundo componentes, combinando o primeiro e o segundo componentes e administrando a preparação de células resultante ao local da ferida. De acordo com diversas variantes, os componentes podem ser administrados por via tópica ao local da ferida no paciente ou então podem ser pulverizados sobre o local da ferida. No caso de se utilizar uma administração por pulverização, então o primeiro e o segundo componentes podem ser combinados sobre o local da ferida ou podem ser combinados antes de atingirem o local da ferida.

De acordo com outro aspecto, o primeiro e o segundo componentes dos estojos da invenção são crioconservados antes do seu envio e subsequentemente descongelados antes da sua utilização. cada componentes pode estar contido num recipiente separado que possui uma tampa de rosca removível, em que o recipiente é estéril e é preparado de um material resistente a temperaturas baixas e em que a tampa removível pode ser substituída com uma bomba de pulverização após o descongelamento do primeiro e do segundo componentes, antes da utilização. De acordo com outra variante, a bomba de pulverização administra um volume aproximadamente de 130 μ L por pulverização. Como materiais adequados resistentes a temperaturas baixas refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, vidro, polipropileno, polietileno e acetato de etileno-vinilo (EVA). De acordo com algumas variantes, cada recipiente pode possuir uma espessura de parede aproximadamente de 0,8 mL e pode suportar um volume de processamento aproximadamente de 2 mL do primeiro e do

segundo componentes. De acordo com outra variante, os recipientes são fechados estanquemente numa bolsa ou num contentor antes da crioconservação, em que a bolsa ou o contentor são fabricados num material capaz de suportar temperaturas compreendidas entre -80°C e -160°C e em que a bolsa ou contentor protege o primeiro e segundo componentes de contaminação durante a crioconservação, armazenamento e subsequentemente descongelamento. De preferência, a bolsa é à prova de água e possuir um elevado desempenho de barreira.

Salvo quando especificados de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados possuem as significações normalmente utilizadas, as quais são conhecidas pelos especialistas na matéria, à qual pertence a presente invenção. Embora possam ser utilizados métodos e materiais idênticos ou equivalentes aos aqui descritos na prática ou em testes da presente invenção, os métodos e materiais adequados são a seguir descritos.

Outras características e vantagens da invenção irão ser evidentes a partir da descrição minuciosa e reivindicações seguintes.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DAS FIGURAS

A fig. 1 representa um histograma que mostra os resultados de uma análise de proliferação de células BrdU de fibroblastos primários humanos após 15 e 30 dias em cultura e após irradiação gama.

A fig. 2 representa um histograma que mostra a aderência de fibroblastos primários humanos a um prato de petri, após tratamentos com radiação gama.

A fig. 3 representa um quadro que mostra os resultados dos testes de diluições óptimas de trombina e de fibrinogénio para a formulação de uma pulverização aplicada a uma matriz de cola de fibrina.

A fig. 4 representa um histograma que comparar a quantidade de factores de crescimento segregados pelas matrizes de células quando são pulverizadas diferentes doses de células em cavidades individuais de uma placa de cultura com 24 cavidades. A figura também mostra as quantidades de secreção de factor de crescimento quando a matriz de fibrina que contém as células é preparado por pipetação simples (administração não pulverizada) de fibrinogénio e trombina + suspensões de células em conjunto.

As figs. 5a e 5b representam histogramas que demonstram que a mistura de queratinócitos e fibroblastos pulverizados em diferentes proporções, mantendo constante o número total de células, proporciona características de secreção de factor de crescimento variáveis.

As figs. 6a e 6b representam fotografias dos novos recipientes utilizados para distribuir e administrar a preparação de células da invenção. A fig. 6a representa um corte transversal do recipiente. A fig. 6b representa um desenho a três dimensões do exterior do recipiente, o qual é concebido para suportar um volume de processamento de 2 mL do componente.

A fig. 7 representa um histograma que comparar a secreção de factor de crescimento de células armazenadas durante uma semana a -160°C versus células armazenadas a -80°C , utilizando uma solução de glicerol a 10% como crioprotector.

A fig. 8 representa um histograma que compara a secreção de factor de crescimento por células armazenadas durante uma semana a -80°C , em 10% de glicerol *versus* 15% de glicerol.

A fig. 9 representa um histograma que compara a secreção de factor de crescimento por células armazenadas durante uma semana a -80°C em 15% de glicerol *versus* 15% de glicerol + 5% de HSA.

A fig. 10 representa um histograma que mostra a secreção dos factores de crescimento GM-CSF e VEGF pelas preparações de células preparadas a produções diferentes após uma, quatro, oito ou doze semanas de armazenamento a -80°C . Nesta experiência, os componentes da preparação de células forma congelados utilizando uma solução de 15% de glicerol + 5% de albumina do soro humana como crioprotector.

A fig. 11 representa um histograma que mostra a secreção de factor de crescimento por preparações congeladas de células, armazenadas deste modo durante uma semana a -80°C . São apresentados os resultados de diversas proporções entre queratinócitos:fibroblastos e também o número de células.

DESCRIÇÃO MINUCIOSA DA INVENÇÃO

A cura de feridas constitui um processo complexo que envolve mediadores solúveis, células sanguíneas, matriz extracelular e células parenquimais. A cura de feridas compreende três fases - a fase de inflamação, a fase de formação de tecido e a fase de remodelação de tecido. Estas fases podem estar sobrepostas ao longo do tempo.

De um modo geral, uma lesão no tecido provoca a ruptura dos vasos sanguíneos e dá origem a uma extravasão dos constituintes do sangue. A coagulação do sangue auxilia o restabelecimento de hemostase e proporciona uma matriz extracelular provisória para a migração de células para a ferida. No local da ferida, as plaquetas (trombócitos) facilitam a formação de uma camada hemostática e também segregam diversos mediadores do processo de cura de feridas. Estes mediadores compreendem, por exemplo, moléculas tais como factor de crescimento proveniente de plaquetas, que atraem e activam monócitos e fibroblastos.

Logo após a lesão, os neutrófilos infiltram-se na ferida e limpam a ferida de partículas e bactérias exógenas. Os neutrófilos são então extrudidos com as escaras ou sofrem fagocitose por macrófagos. Os monócitos também infiltram a ferida em resposta a quimioatractores específicos, tais como fragmentos de proteínas da matriz extracelular, factores β de crescimento transformante, da proteína 1 quimioatractora de monócitos, e subsequentemente tornam-se macrófagos activados. Estes macrófagos activados libertam factores de crescimento, tais como factor de crescimento proveniente de plaquetas e factor de crescimento endotelial vascular, os quais dão início à formação de tecido de granulação. Os macrófagos ligam-se por meio dos seus receptores de integrina a proteínas na matriz extracelular. Esta ligação estimula a fagocitose de quaisquer microrganismos, bem como de fragmentos de matriz extracelular.

Os monócitos, estimulados pela aderência à matriz extracelular, também sofrem metamorfose em macrófagos inflamatórios. Esta aderência à matriz extracelular induz a

expressão, pelos monócitos e macrófagos, do factor 1 estimulador de colónias, do factor β de necrose tumoral e do factor de crescimento proveniente de plaquetas. Outras citoquinas importantes expressas pelos monócitos e macrófagos são o factor α de crescimento transformante, interleucina-1, factores β 1-3 de crescimento transformantes e factor 1 de crescimento de tipo insulina. Crê-se que os factores de crescimento provenientes de monócitos e de macrófagos são necessários para o início e para a propagação da nova formação de tecido em feridas.

Horas após a lesão, tem início a re-epitelialização da ferida. Os queratinócitos provenientes das extremidades da ferida, bem como de apêndices de pele residuais, tais como folículos pilosos, sofrem alterações notórias nos fenótipos, incluindo re-atracção dos tonofilamentos intracelulares, dissolução da maior parte dos desmossomas intercelulares e formação de filamentos de actina citoplásmica periféricos. Além do mais, as ligações hemidesmossómicas entre os queratinócitos e a membrana da base epidermal são dissolvidas, permitindo o movimento dos queratinócitos.

Decorridos alguns dias após a lesão, os queratinócitos nas margens da ferida começam a proliferar para além das células migratórias. Quando esta re-epitelialização tem lugar, as proteínas da membrana de base surgem novamente numa sequência ordenada a partir da margem da ferida passiva. Os queratinócitos revertem então para o seu fenótipo normal e ligam-se à membrana de base restabelecida e à derme subjacente.

Decorridos cerca de quatro dias após a lesão, tem início a infiltração de novos estromas na ferida. Em

simultâneo, também se dá a infiltração de macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos na ferida. Os macrófagos proporcionam uma fonte de factores de crescimento que estimulam a fibroplasia e a angiogénese. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular que suporta o crescimento interno de células. Os novos vasos sanguíneos transportam oxigénio e nutrientes que mantêm as células.

Crê-se que os factores de crescimento, em particular o factor de crescimento proveniente de plaquetas e o factor $\beta 1$ de crescimento transformante, estimulam a proliferação dos fibroblastos dos tecidos à volta da ferida. De facto, o factor de crescimento proveniente de plaquetas demonstrou acelerar o processo de cura de escaras de pressão crónicas e de úlceras diabéticas. O factor de crescimento de fibroblastos básico também tem sido utilizado com algum sucesso para o tratamento de escaras de pressão crónicas.

No entanto, há muitos factores que podem provocar uma cura anormal de feridas. Um exemplo ocorre com úlceras diabéticas. Tipicamente, as úlceras diabéticas exibem patologias bioquímicas múltiplas que podem dar origem a uma cura deficiente. Estas úlceras ocorrem em pacientes que não consegue sentir ou aliviar a pressão cutânea devido a algum tipo de neuropatia diabética. Frequentemente, as úlceras diabéticas infectam devido a uma função granulocítica deficiente e quimiotaxia. Os pacientes com úlceras diabéticas também experienciam inflamação, neovascularização deficiente, síntese de colagénio diminuída, níveis aumentados de proteinases e função de macrófagos defeituosa.

Experiências clínicas globais utilizando factores de crescimento isolados, *v.g.*, recombinantes, e outros

mediadores para acelerar o processo de cura de feridas não alcançou um grande sucesso, talvez devido ao facto de a reparação de feridas ser resultado de um conjunto complexo de interacções entre factores solúveis, elementos sanguíneos formados, matriz extracelular e células. A combinação de diversos factores de crescimento em intervalos cuidadosamente controlados pode promover um processo de cura de feridas mais eficaz.

A presente invenção é descrita nas reivindicações 1 a 25.

De acordo com uma variante, as células podem distribuir factores angiogénicos endógenos ou outros factores de crescimento. De acordo com outra variante, as células podem ser geneticamente manipuladas para produzirem quantidades exógenas do factor desejado. De preferência, as células são alogeneicas.

Em particular, os fibroblastos e os queratinócitos têm demonstrado desempenhar um papel importante no processo de cura de feridas cutâneas. Estes papéis incluem a migração e proliferação de células estimuladoras, a estimulação da produção de matriz extracelular, a produção de factores de crescimento e de citoquinas, a estimulação de angiogénese e a libertação de proteases que dissolvem tecidos não viáveis e a barreira de fibrina.

O processo de cura de feridas pode ser promovido pela utilização de factores de crescimento e/ou angiogénicos. Por exemplo, uma preparação para a cura de feridas adequada compreende dois componentes crioconservados, isto é, fibrinogénio e fibroblastos e queratinócitos alogeneicos com crescimento interrompido em suspensão em trombina. Após o descongelamento, estes componentes são pulverizados

sequencialmente sobre a camada de ferida para formar uma matriz fina de fibrina que contém dois tipos de células vivas provenientes de pele, mas que não proliferam, as quais, durante diversos dias, produzem interactivamente factores de crescimento e angiogénicos relevantes para o processo de cura de feridas (v.g., VEGF, GM-CSF, bFGF, KGF).

As células podem ser imortalizadas ou podem ser culturas de células primárias. As células podem ser imortalizadas por qualquer método conhecido pelos especialistas na matéria. Uma abordagem comum para o alargamento do período de vida de células é a transferência de um vírus ou de um plasmídeo que contém um ou vários genes imortalizadores. A imortalização de células faz aumentar o período de vida de uma célula, sendo a linhagem de células resultante capaz de ser passada muito mais vezes do que as células originais. Os genes imortalizadores são bem conhecidos na especialidade. Veja-se, v.g., Katakura *et al.*, *Methods Cell Biol.* 57: 69-91 (1998). Como proteínas ou polipeptidos imortalizadores refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os produtos 12S e 13S de genes *E1A* de adenovírus genes, antigénios T pequenos ou grandes de SV40, vírus do papiloma E6 e E7, vírus de Epstein-Barr (EBV), antigénio 2 nuclear de Epstein-Barr (EBNA2), vírus 1 de leucemia de células T humanas (HTLV-1), HTLV-1 tax, *Herpesvirus Saimiri* (HVS), mutante p53 e as proteínas de oncogenes, tais como *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc* e *Mdm2*. Além disso, as células podem ficar espontaneamente imortalizadas. Uma estratégia de imortalização preferida consiste na transferência de um gene que codifica

telomerase-transcriptase inversa (TERT) na célula, de um modo tal que TERT seja expressa de um modo estável ou transiente dando assim origem à expressão da actividade de telomerase. A actividade de telomerase, quando expressa em células somáticas normais, pode dar origem ao alongamento das pontas ou das tampas protectoras de cromossomas, designadas por telómeros, dando assim origem à aptidão das células que expressam telomerase de se tornarem imortalizadas sem serem transformadas (veja-se Jiang, *et al.*, Nature Genetics 21: 111-14 (1999) e Morales, *et al.*, Nature Genetics 21: 115-18 (1999)).

Os telómeros são estruturas especializadas nas extremidades de cromossomas eucarióticos e que parecem actuar na estabilização, posicionamento e replicação de cromossomas. Veja-se Blackburn e Szostak, 53 Ann. Rev. Biochem. 163-194 (1984); Zakian, 23 Ann. Rev. Genetics 579-604 (1989); Blackburn, 350 Nature 569-573 (1991). Em todos os vertebrados, os telómeros são constituídos por centenas de repetições em fila da sequência 5'-TTAGGG-3' e de proteínas associadas. Veja-se Blackburn, 350 Nature 569-573 (1991); Moyzis *et al.*, 85 Proc. Natl. Acad. Sci. 6622-6626 (1988). A análise de 'Southern blot' de fragmentos de restrição do terminal de cromossomas (TRF) proporciona os comprimentos compósitos de todos os telómeros numa população de células. Veja-se Harley *et al.*, 3445 Nature 458-460 (1990); Allsopp *et al.*, 89 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10114-10118 (1992); Vaziri *et al.*, 52 Am. J. Human Genetics 661-667 (1993). Em todas as células somáticas normais examinadas até à data, a análise por TRF demonstrou que os cromossomas perdem cerca de 50 a 200 nucleótidos da sequência telomérica por divisão de célula, o que é

consistente com a inaptidão de polimerase de ADN para replicar ADN linear para as extremidades. Veja-se Watson, 239 *Nature New Biology* 197-201 (1972).

Este encurtamento dos telómeros foi proposto como o relógio mitótico pelo qual as células contam as suas divisões (veja-se Harley, 256 *Mut. Res.* 271-282 (1991)), e telómeros suficientemente curtos podem constituir o sinal para a senescência replicativa em células normais. Veja-se Hastie *et al.*, 346 *Nature* 866-868 (1990); Lindsey *et al.*, 256 *Mut. Res.* 45-48 (1991); Wright e Shay, 8 *Trends Genetics* 193-197 (1992). Pelo contrário, a maioria de células imortais examinadas até à data não apresentaram uma perda líquida no comprimento ou na sequência do telómero com as divisões de células, o que sugere que a manutenção dos telómeros é necessária para que as células escapem de senescência replicativa e proliferem indefinidamente. Veja-se Counter *et al.*, 11 *EMBO* 1921-1929 (1992); Counter *et al.*, 91 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2900-2940, 1994).

A telomerase, uma polimerase de ADN de ribonucleoproteína única, é a única enzima que se sabe que sintetiza ADN telomérico nas extremidades cromossómicas, utilizando como matriz uma sequência contida no componente ARN da enzima. Veja-se Greider & Blackburn, 43 *Cell* 405-413 (1985); Greider & Blackburn, 337 *Nature* 331-337 (1989); Yu *et al.*, 344 *Nature* 126-132 (1990); Blackburn, 61 *Ann. Rev. Biochem.* 113-129 (1992). No que diz respeito a células e tecidos humanos, a actividade de telomerase foi identificada em linhagens de células imortais e no carcinoma do ovário, mas não foi detectada em estirpes de células mortais ou em tecidos normais de linhagem não germinal. Veja-se Morin, 59 *Cell* 521-529, 1989. Em conjunto

com análise de TRF, estes resultados sugerem que a actividade de telomerase está directamente implicada na manutenção de telómeros, o qual liga esta enzima à imortalidade das células.

A expressão do componente catalítico de telomerase humana (hTERT) foi recentemente estudada em células somáticas. Veja-se Jiang, *et al.*, 21 Nature Genetics 111-114 (1999). A expressão de telomerase em células somáticas normais não parece induzir alterações associadas a um fenótipo maligno, tais como controlo anormal do crescimento ou transformação oncogénica. A ausência de alterações associadas ao cancro também foi descrita em fibroblastos humanos imortalizados com telomerase. Veja-se Morales, *et al.*, 21 Nature Genetics 115-118 (1999). Demonstrou-se que a introdução de telomerase em células somáticas humanas normais não provoca a transformação do crescimento, não contorna os postos de controlo induzidos pelo ciclo celular e não provoca instabilidade genómica destas células. Também foram já descritos métodos para detectar a actividade de telomerase, bem como para identificar compostos ou polipeptidos que regulam ou que afectam a actividade de telomerase, em conjunto com métodos para terapia ou diagnóstico de senescência celular e de imortalização por meio do controlo ou de medição do comprimento de telómero e a actividade de telomerase (veja-se o pedido de patente de invenção internacional PCT nº WO 93/23572). A identificação de compostos que afectem a actividade de telomerase proporciona benefícios importantes para os esforços no tratamento de doenças de seres humanos.

As células de acordo com a invenção também podem ser geneticamente manipuladas para produzir uma ou várias

moléculas biologicamente activas, de um modo tal que as moléculas sejam constitutivamente segregadas pelas células. A expressão “constitutivamente segregadas” designa que a molécula biologicamente activa desejada é continuamente expressa pelas células ou que o gene é continuamente expesso. Em alternativa, as células podem ser geneticamente manipuladas de um modo tal que a sua expressão seja controlada por permuta de genes.

Tal como aqui utilizadas, as expressões “permuta de genes” e “permutação de genes” designa métodos para regular a expressão de genes. Em particular, a expressão de uma proteína codificada por um gene é controlada pela interacção de determinadas proteínas reguladoras, designadas como proteínas de ligação ao ADN, com um região localizada a jusante do gene. Na região do promotor, estão localizados diversas regiões do operador que contêm uma sequência de oligonucleótido específico à qual estas proteínas de ligação ao ADN se ligam especificamente. Estas proteínas podem dar origem à activação ou à repressão da expressão de genes. Assim, estas controlam a expressão regulada de genes.

A proteína reguladora é codificada por um gene regulador localizado numa outra parte do cromossoma. A interacção entre o regulador e o operador é afectada pela presença ou pela ausência de factores químicos particulares (indutores). Assim, em circunstâncias normais o regulador é expesso, ligando desse modo o operador e inibindo a expressão do gene, até existir uma necessidade da proteína particular codificada pelo gene, indicada pelo surgimento no meio ambiente de um indutor específico que interactue

com o regulador para inibir a ligação ao operador, permitindo assim a expressão do gene.

Por exemplo, uma enzima que actue sobre uma molécula de açúcar não é necessária salvo quando o açúcar está presente e, assim sendo, na ausência do açúcar, o gene regulador que expressa a proteína reguladora, que liga o gene operador e inibe a expressão da enzima. O próprio açúcar actua como indutor, o qual interactua então com o regulador para evitar a sua ligação ao operador, permitindo assim a expressão da enzima. A digestão do açúcar pela enzima remove-o do ambiente, permitindo que o regulador volte ao seu modo normal e actue normalmente para inactivar a expressão da enzima.

Um tal mecanismo regulador pode ser considerado um arranjo de permuta, o qual permuta a expressão do gene entre ligada e não ligada conforme ditado pelo conteúdo químico do ambiente. Os sistemas de permuta de gene deste tipo são melhor descritos em bactérias e muitas das proteínas e dos seus locais de ligação a ADN alvo são conhecidos com detalhes consideráveis. As proteínas reguladoras ligam-se normalmente como dímeros aos operadores, que exibem uma simetria dupla. A especificidade da interacção entre regulador/promotor é determinada pela sequência de interacção específica de aminoácidos específicos do regulador com o operador ADN. Em alguns sistemas, as interacções foram submetidas a análises bioquímicas pormenorizadas, bem como a cristalografia de raio-X de elevada resolução. A classe melhor caracterizada de proteínas de ligação a ADN exhibe um motivo hélice-espiral-hélice comum com algum grau de homologia de sequência de aminoácidos. É claro que o domínio de ligação

a ADN crítico do regulador está contido na região hélice-espiral-hélice.

Em eucariotas, demonstrou-se que o controlo da expressão de genes também é regulado pela interacção de factores de proteínas específicos de ligação a sequências de ADN junto à região promotora dos genes. Foram isolados diversos factores a partir de leveduras e de células de mamíferos e demonstrou-se que estas interagem com motivos de sequências específicas de um modo específico da sequência idêntico ao observado em sistemas bacterianos. A caracterização de alguns destes factores revelou um novo motivo "dedo", o qual pode estar implicado na ligação específica de sequências de proteínas.

Além do mais, demonstrou-se que a expressão de genes eucarióticos pode ser controlada por meio da utilização de moléculas repressoras bacterianas em células eucarióticas. Nestas experiências, sequências de operador bacterianas foram inseridas junto aos promotores de genes de mamíferos. Foram criadas linhagens de células que expressam o repressor bacteriano. O controlo da expressão dos genes eucarióticos alvo com inserções de operador por moléculas repressoras foi demonstrado utilizando ensaios de expressão transiente. Nestas experiências não foi demonstrada apenas a repressão da expressão do gene pelo repressor lac mas também a indução da expressão do gene, isto é, alívio de repressão, utilizando IPTG (isopropil-tiogalactósido).

Assim sendo, o conhecimento detalhado e manipulação de ADN/interacções de proteínas bacterianas podem ser utilizados para controlar a expressão em culturas de células de mamíferos. As técnicas de permuta de genes

encontram-se descritas, por exemplo, na patente de invenção norte-americana nº 6,010,887.

Será evidente para os especialistas na matéria que há outros métodos de regulação da permuta de genes que também podem ser utilizados nos métodos e composições da invenção.

As células podem ser geneticamente manipuladas para segregarem uma ou várias moléculas biologicamente activas, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, uma ou várias citoquinas, factores de crescimento e/ou factores angiogénicos, ou uma sua combinação. Como exemplos de tais moléculas biologicamente activas refere-se as apresentadas no quadro 1.

Quadro 1

Citoquina	Fonte principal	Células alvo e/ou efeitos principais
Factor de crescimento epidermal (EGF)	Plaquetas	Motilidade e proliferação de células pleiotrópicas
Factor "alfa" de crescimento transformante (TGF α)	Macrófagos, células epidermais	Motilidade e proliferação de células pleiotrópicas
Factor de crescimento epidermal de ligação a heparina	Macrófagos	Motilidade e proliferação de células pleiotrópicas
Factor de crescimento de fibroblastos básico	Macrófagos, células endoteliais	Angiogénese e proliferação de fibroblastos

Citoquina	Fonte principal	Células alvo e/ou efeitos principais
Factor de crescimento de fibroblastos ácido	Macrófagos, células endoteliais	Angiogénese e proliferação de fibroblastos
Factor de crescimento de queratinócitos	Fibroblastos	Motilidade e proliferação de células epidermais
Família do factor β de crescimento transformante (TGF β)		Fibrose e resistência à tracção aumentada
Factores $\beta 1$ e $\beta 2$ de crescimento transformante (TGF $\beta 1$ e TGF $\beta 2$)	Plaquetas, macrófagos	Motilidade de células epidermais, quimiotaxia de macrófagos e fibroblastos, síntese e remodelação da matriz extracelular
Factor $\beta 3$ de crescimento transformante (TGF $\beta 3$)	Macrófagos	Efeitos anti-escaras
Factor de crescimento proveniente de plaquetas (PDGF)	Plaquetas, macrófagos, células epidermais	Proliferação e quimioatração de fibroblastos, quimioatração e activação de macrófagos
Factor de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Células epidermais, macrófagos; células endoteliais	Angiogénese e permeabilidade vascular aumentada

Citoquina	Fonte principal	Células alvo e/ou efeitos principais
VEGF A	Células endoteliais de vasos sanguíneos	Migração de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos
VEGF B	Células endoteliais de vasos sanguíneos	Migração de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos
VEGF C	Células endoteliais de vasos linfáticos	Migração de células endoteliais e formação de vasos linfáticos
VEGF D	Células endoteliais de vasos linfáticos	Migração de células endoteliais e formação de vasos linfáticos
Factor "alfa" de necrose tumoral (TNF α)	Neutrófilos	Expressão pleiotrópica de factores de crescimento
Interleucina-1 (IL-1)	Neutrófilos	Expressão pleiotrópica de factores de crescimento
Factor I de crescimento de tipo insulina	Fibroblastos, células epidermais	Re-epitelialização e formação de tecido de granulação
Factor 1 estimulador de colónias (CSF-1)	Células múltiplas	Activação de macrófagos e formação de tecido de granulação
Factor estimulador de colónias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF)	Células múltiplas	Activação de macrófagos e formação de tecido de granulação

Na coluna 1 do quadro 1 são apresentados os nomes de moléculas biologicamente activas adequadas. A coluna 2 mostra a fonte principal da molécula biologicamente activa

particular. Por último, a coluna 3 mostra as células alvo e/ou os efeitos principais da molécula biologicamente activa apresentada.

Os fibroblastos e queratinócitos segregam naturalmente um vasto conjunto de factores de crescimento e de citocinas. No quadro 2 é apresentado um resumo da secreção de diversas proteínas.

Quadro 2

Citoquinas	Queratinócitos	Fibroblastos
Angiopoietina	Sim	Sim
EGF	Sim	Sim
Endotelina	Sim	Não
FGF	Sim	Sim
FGF-7/KGF	Sim	Sim
IFN- α/β	Não	Sim
IGF-1	Não	Sim
IL-1 β	Sim	Sim
IL-6	Sim	Sim
IL-8	Sim	Sim
IL-18	Sim	Não
MCP-1	Não	Sim
MIP-1 α	Não	Sim
MIP-2	Não	Sim
PDGF	Não	Sim
SLPI	Sim	Não
TGF- α	Sim	Sim
TGF- β s	Sim	Sim
TNF- α	Sim	Sim
VEGF	Sim	Sim

(Veja-se Singer, A. e Clark, R. (1999) "Cutaneous Wound Healing", The New England Journal of Medicine 341: 738-746).

O controlo da distribuição da molécula biologicamente activa segregada pode ser alcançado por qualquer método conhecido pelos especialistas na matéria. Por exemplo, a expressão de múltiplos produtos génicos pode ser controlada por um sistema promotor individual. Em alternativa, a expressão de múltiplos produtos génicos pode ser controlada por sistemas de promotor múltiplos, em que cada sistema de promotor regula quer constitutivamente quer por permuta de gene, ou por alguma combinação de ambos. Além do mais, o controlo sobre a secreção de uma molécula biologicamente activa particular pode ser alcançado por aumento por externalização da expressão de genes de tipo selvagem.

Há diversos métodos de transfecção bem conhecidos para a introdução de material genético em células alvo. Estes compreendem a utilização de polycatiões, tais como DEAE-dextrano (veja-se McCutchan, *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 41: 351-57 (1968) e Kawai *et al.*, Mol. Cell. Biol. 4: 1172-74 (1984)); co-precipitação com fosfato de cálcio (veja-se Graham *et al.*, Virology 52: 456-67 (1973)); electroporação (veja-se Neumann *et al.*, EMBO J. 7: 841-45 (1982)); lipofecção (veja-se Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-17 (1987)); vectores de retrovírus (veja-se Cepko *et al.*, Cell 37: 1053-62 (1984)); e micro-injecção (veja-se Capecchi *et al.*, Cell 22:479-88 (1980)).

Além disso, será evidente para um especialista na matéria que qualquer outro método adequado para distribuir uma molécula biologicamente activa exógena nos tipos de célula também pode ser utilizado de acordo com a invenção.

Utilizando qualquer um dos métodos de transfecção supramencionados, é possível alcançar o controlo sobre a secreção de diversas moléculas biologicamente activas usando um qualquer número de tipos de célula que segreguem as diversas moléculas biologicamente activas.

Além do mais, os tipos de células da presente invenção também podem ser mitoticamente activas ou mitoticamente inactivas. A expressão "mitoticamente activa" é utilizada para descrever células que sofrem mitose activamente. Pelo contrário, a expressão "mitoticamente inactiva" é utilizada para descrever células que não sofrem mitose activamente. É possível interromper o crescimento de células mitoticamente inactivas por meio de quaisquer métodos conhecidos na especialidade. Como exemplo não limitativo, é possível interromper o crescimento de células por meios químicos, tais como, por exemplo, por administração de mitomicina C. além disso, é possível interromper o crescimento dos tipos de células por exposição a luz UV, raios X ou radiação gama (γ). De acordo com uma variante preferida, interrompe-se o crescimento dos tipos de células por exposição a radiação gama. É importante salientar que, *v.g.*, células de fibroblastos humanos mitoticamente inactivadas diferenciam de um modo terminal, alterando assim o padrão de expressão e secreção de polipeptido (Francz, Eur. J. Cell. Biol. 60: 337-45 (1993)). Como um outro exemplo, a diferenciação de queratinócitos depende normalmente das condições de cultura (incluindo, por exemplo, a composição do meio de cultura, a concentração em Ca^{2+} e do factor das células serem mantidas em cultura na interface ar-líquido), no entanto, os queratinócitos também é possível induzir a diferenciação, *v.g.*, por mitomicina C.

Os tipos de células de acordo com a invenção encontram-se descritos nas reivindicações.

As células estromais, por exemplo, os fibroblastos, podem ser isoladas por quaisquer métodos conhecidos pelos especialistas na matéria. Por exemplo, os fibroblastos podem ser obtidos a partir de órgãos, tais como a pele, o fígado e o pâncreas. Estes órgãos podem ser obtidos por biópsia (se adequado) ou por autópsia. Em particular, é possível obter quantidades suficientes de fibroblastos de um modo conveniente a partir de redução de mama, do prepúcio ou de qualquer outro órgão de cadáver adequado.

Os fibroblastos podem ser facilmente isolados por desagregação de uma fonte de órgão ou de tecido adequada. A expressão "fonte de órgão ou de tecido" designa o órgão ou o tecido a partir do qual são obtidas as células. A desagregação pode ser facilmente realizada por meio de técnicas conhecidas pelos especialistas na matéria. Como exemplos de tais técnicas refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, desagregação mecânica e/ou tratamento com enzimas de digestão e/ou agentes quelantes que enfraqueça, as ligações entre células vizinhas, tornando assim possível a dispersão do tecido numa suspensão de células individuais sem uma quebra apreciável de células. Em particular, a dissociação enzimática pode ser realizada picando o tecido e tratando o tecido picado com qualquer uma das várias enzimas de digestão, por si só ou em combinação. Como enzimas adequadas refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, tripsina, quimotripsina, collagenase, elastase, hialuronidase, ADNase, pronase e/ou dispase. A ruptura mecânica pode ser realizada por diversos métodos, incluindo, mas sem que isso constitua

qualquer limitação, a utilização de moinhos, misturadoras, crivos, homogeneizadores, células de pressão ou trituradoras. Veja-se Freshney, *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*, 2ª Ed., A.R. Liss, Inc., New York, 1987, Cap. 9, págs. 107-26.

Após a fonte de tecido ter sido reduzida a uma suspensão de células individuais, a suspensão deverá ser fraccionada em subpopulações a partir das quais é possível recuperar os fibroblastos e/ou outras células estromais e/ou elementos. O fraccionamento pode ser efectuado por meio de técnicas convencionais para a separação de células, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, clonagem e selecção de tipos específicos de células, destruição selectiva de células não pretendidas (selecção negativa), separação com base na aglutinabilidade de células diferenciais numa população mista, procedimentos de congelamento-descongelamento, propriedades de aderência diferenciais das células numa população mista, filtração, centrifugação convencional e zonal, elutriação centrífuga (centrifugação contra-fluxo), separação por gravidade, distribuição contracorrente, electroforese e distribuição de células activadas por fluorescência. Veja-se Freshney, *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques*, 2ª Ed., A.R. Liss, Inc., New York, 1987, Cap. 11 e 12, págs. 137-68. Será evidente para os especialistas na matéria que também é possível utilizar outras técnicas de fraccionamento de células adequadas.

De preferência, o isolamento de fibroblastos é acompanhado pela explantação de peças de pele de acordo com o método de Sly e Grubb. Veja-se Sly *et al.*, *Methods Enzymol.* 58: 444-50 (1979).

Os fibroblastos obtidos de diferentes fontes de órgãos ou tecidos (incluindo, *v.g.*, pele, fígado e pâncreas) podem ser utilizados nos métodos e nas composições da invenção. Além disso, será evidente para os especialistas na matéria que quaisquer desses fibroblastos podem ser geneticamente manipulados para segregarem quantidades diferentes de uma molécula biologicamente activa ou de moléculas.

Tal como aqui utilizada, a expressão "preparação de células" designa a mistura resultante da combinação de uma preparação de células que segrega uma ou várias moléculas biologicamente activas e uma preparação de matriz extracelular ou de outros materiais de matriz. Por exemplo, uma preparação de células de acordo com a invenção é obtida a partir da combinação de uma preparação de trombina/célula e de uma preparação de fibrinogénio. De acordo com algumas variantes, a mistura resultante pode provocar polimerização, produzindo assim uma matriz polimerizada. Em alternativa, a combinação resultante pode produzir uma matriz não polimerizada extremamente viscosa. A preparação de células resultante pode estar sob a forma de uma pasta. Será evidente para os especialistas na matéria que a expressão "preparação de células", tal como aqui utilizada, abrange o âmbito de misturas que vão desde uma mistura não polimerizada viscosa (isto é, uma pasta) até uma matriz polimerizada. As diferenças na concentração de cada preparação, bem como as condições de cultura, podem influenciar a viscosidade e/ou o grau de polimerização da preparação de células resultante. Por exemplo, de acordo com uma variante da invenção, a combinação de preparações de fibrinogénio e de trombina/célula são administradas por pulverização a um local de ferida para se formar uma matriz

celular polimerizada irreversível. No entanto, também será evidente para os especialistas na matéria que outras combinações podem resultar numa matriz não polimerizada viscosa.

A densidade e a concentração em células da matriz extracelular podem variar em função da aplicação clínica desejada. Por exemplo, há determinadas feridas que podem requerer preparações com densidades de células superiores ou inferiores e/ou com consistências diferentes. As preparações de células resultantes podem encontrar-se sob a forma de uma pasta de células ou sob a forma de uma matriz curada. A determinação da densidade e da concentração em células adequada da MEC faz parte das capacidades de um especialista na matéria. A suspensão de células pode ser proveniente de um tipo de células ou pode ser constituída por tipos diferentes de células. Por exemplo, a mistura de células pode compreender 50% de queratinócitos e 50% de fibroblastos. No entanto, a proporção entre queratinócitos e fibroblastos pode variar, *v.g.*, 1:1, 1:4, 1:9, 1:24, etc., sem prejudicar a formação ou a função da preparação de células. Em alternativa, a mistura de células pode conter apenas queratinócitos ou apenas fibroblastos (isto é, a proporção entre queratinócitos e fibroblastos ser 1:0 ou 0:1). Além do mais, a suspensão pode ser constituída por mais do que dois tipos diferentes de células. As percentagens de cada tipo de células na suspensão de células podem variar em função da utilização pretendida para a preparação de células. Os tipos de células também podem ser pré-induzidos ou mantidos em co-cultura *in vitro* para se otimizar a resposta de cura da ferida. Por exemplo, os fibroblastos podem ser pré-incubados com TGF-

beta (entre 0,1 e 30 ng/mL de meio), durante 1 a 21 dias antes da aplicação à ferida.

A preparação de células da invenção é preparada a partir de dois componentes. O primeiro, doravante aqui designado como "componente 1", é o componente de fibrinogénio. O segundo, doravante aqui designado como "componente 2", é o componente de células + trombina. O componente 2 pode conter, facultativamente, um crioprotector. A preparação de células da invenção é constituída pela coagulação de proteínas do plasma (incluindo fibrinogénio) na presença de trombina. Esta coagulação é principalmente devida à formação de uma rede de fibrina polimerizada, a qual imita a formação de um coágulo de sangue. A trombina converte a fibrina por clivagem enzimática. O cálcio acelera a actividade proteolítica da trombina. De facto, a combinação de fibrinogénio e de trombina resulta numa "reação de polimerização". Durante a mistura destes materiais, as células ficam presas na preparação de células resultantes, a qual pode ser uma pasta ou uma matriz curada, dependendo das concentrações de todos os componentes, do número de células, das condições de cultura, etc.. Além disso, em qualquer uma das preparações de células da invenção, qualquer um ou todos os componentes podem ainda conter proteínas ou produtos químicos suplementares, que não afectem a formação ou a função da preparação de células, tais como proteínas (isto é, albumina), inibidores de proteinase (isto é, aprotinina), polietileno-glicol (PEG), álcool polivinílico (PVA) e outras moléculas tipicamente utilizadas como estabilizadores para a preparação de células. De acordo com outras variantes da invenção, o

primeiro componente da preparação de células pode conter trombina e o segundo componente pode conter células mais fibrinogénio. Será evidente para os especialistas na matéria que, nesta variante, a combinação do componente 1 e do componente 2 irá também resultar numa preparação de células útil para a regeneração de tecidos.

Métodos de administração

De acordo com uma variante preferida, a invenção envolve uma combinação de linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos alogeneicos humanos misturados com materiais de MEC para formar uma pasta celular viscosa para aderir à ferida. De acordo com esta variante, as linhagens celulares são preferencialmente não geneticamente manipuladas. As linhagens celulares podem ser mitoticamente inactivadas por quaisquer meios conhecidos pelos especialistas na matéria. De preferência, a pasta resultante é biodegradável e biocompatível.

Conforme descrito antes, as linhagens celulares de fibroblastos e queratinócitos imortalizadas também constituem variantes preferidas. O método de imortalização preferido será através da adição directa do gene para TERT nas células de queratinócitos e fibroblastos humanas principais, de um modo tal que o gene TERT seja expresso constitutivamente. Além disso, uma imortalização transiente utilizando uma sequência de transporte de um domínio proteico (TAT, VP22, MTS, etc.) ligado à proteína TERT pode ser mais preferencialmente, uma vez que o gene não é inserido permanentemente na célula imortalizada, mas é em vez disso adicionado como proteína de fusão ao meio de crescimento. Deste modo, a linhagem celular pode ser

continuamente expandida, armazenada e pesquisada quanto a propriedades estáveis (taxa de crescimento, secreção de factor, etc.), sem existir a necessidade contínua de revalidação de novas fontes de células primárias. As linhagens celulares imortalizadas deste modo são preferencialmente mitoticamente inactivadas antes da aplicação à ferida ou ao local de reparação do tecido sob a forma de uma pasta, preparação de células, mistura de matriz biológica ou ligada ou adsorvida num revestimento para feridas.

A presente invenção possui aplicações clínicas humanas e veterinárias. As preparações de células da invenção podem ser utilizadas para o tratamento de seres humanos e de animais não humanos, incluindo, um primata não humano, murganhos, ratos, cães, gatos, porcos, ovelhas, vacas ou cavalos. A preparação de células de acordo com a invenção pode ser utilizada para a regeneração de tecidos, tais como, v.g., no tratamento de feridas na pele ou no tratamento de peritonite.

Tais composições podem compreender a preparação de células e um veículo suplementar aceitável. Tal como aqui utilizada, a expressão "veículo biologicamente aceitável" pretende abranger todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e agentes antifúngicos, e agentes isotónicos e agentes de retardamento de absorção, e semelhantes, que sejam compatíveis com a administração de produtos biológicos. Como veículos adequados refere-se os descritos na edição mais recente da obra Remington's Pharmaceutical Sciences, um texto de referência padrão na especialidade, o qual é aqui incorporado por referência. Como exemplos preferidos

de tais veículos ou diluentes refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, água; soluto salino; solução de dextrose; albumina do soro humana; HBSS e outras soluções tamponadas (incluindo as que possuem ou que não possuem Ca^{++} e Mg^{++}) conhecidas pelos especialistas na matéria relevante; e meio basal. Também é possível utilizar lipossomas e veículos não aquosos, tais como óleos fixos. A utilização de um tal meio e de agentes para substâncias farmacologicamente activas é bem conhecido na especialidade. Com a excepção de qualquer meio convencional ou agente incompatível com o composto activo, a sua utilização nas composições está contemplada.

As composições farmacêuticas podem ser incluídas num contentor, embalagem, estojo ou dispensador em conjunto com instruções para a sua administração.

O regime de dosagem é seleccionado de acordo com diversos factores, incluindo a espécie, a idade, o peso, o sexo e o estado clínico do paciente; do tipo e da gravidade da patologia que se pretende tratar; da via de administração e das células particulares utilizadas. Um médico ou veterinário especialista poderá facilmente determinar a prescrever a quantidade eficaz necessária para evitar, contrariar ou impedir o progresso da patologia.

A preparação de células da invenção pode ser administrada por via tópica à ferida que necessite de tratamento. O componente de trombina + célula (componente 2), sob a forma de uma pulverização, pode ser misturado com o componente de fibrinogénio (componente 1), sob a forma de uma pulverização, antes, durante ou após a aplicação à ferida.

A preparação de células da invenção é administrada por pulverização dos componentes da preparação sobre a área da ferida. como bombas de pulverização adequadas para utilização na administração da preparação de células da invenção refere-se as utilizadas para outras aplicações médicas, incluindo pulverizações nasais e para a garganta. Além disso, a preparação de células poderá ser aplicada utilizando uma pulverização gerada por gases inertes comprimidos em vez da utilização de uma bomba de pulverização. Por exemplo, é possível utilizar recipientes pequenos de gases inertes de qualidade médica, tais como ar e/ou azoto. A pressão do gás pode ser utilizada para empurrar os fluidos através de um orifício pequeno, gerando assim uma pulverização de uma neblina fina. A pressão pode actuar directamente sobre o fluido ou uma queda de pressão pode puxar o fluido para uma corrente de ar, a qual se irá tornar eventualmente numa pulverização.

De acordo com outra variante, a preparação de células da invenção pode ser administrada por pulverização como um produto de dois componentes que é aplicado a uma úlcera crónica num processo sequencial de dois passos. De acordo com esta variante, o primeiro componente é uma suspensão de fibrinogénio em HBSS (na ausência de Ca^{++} e Mg^{++}) e o segundo componente é uma mistura de células (incluindo fibroblastos e queratinócitos), trombina e crioprotectores em HBSS (na presença de Ca^{++} e Mg^{++}). De acordo com esta variante, os dois componentes da preparação de células são misturados em conjunto na área da ferida alvo. Ambos os componentes são aplicados à úlcera crónica ou à ferida utilizando um aplicador de pulverização, tal como uma bomba de pulverização. Por exemplo, é possível utilizar uma bomba

de pulverização para administrar doses precisas de ambos os componentes durante o tratamento de uma úlcera ou ferida. a concepção actual da bomba de pulverização pode variar, dependendo do fabricante. Como exemplos de bombas de pulverização adequadas refere-se, por exemplo, as pulverizações nasais e para a garganta. A bomba de pulverização é fabricada a partir de um material que possa ser esterilizado utilizando técnicas convencionais para evitar a contaminação de qualquer um dos componentes da preparação de células.

As doses pulverizadas podem estar compreendidas entre cerca de 50 μL e cerca de 150 μL por pulverização, de preferência entre cerca de 100 μL e cerca de 150 μL por pulverização e mais preferencialmente cerca de 130 μL por pulverização. Para permitir uma aplicação concentrada e para uma administração mais precisa do produto, a bomba de pulverização deverá possuir um mecanismo do actuador de pulverização que produza um diâmetro de pulverização estreito em vez de um diâmetro de pulverização largo. O mecanismo do actuador de pulverização constitui a "arma" que orienta e que gera a pulverização através do tamanho do orifício. A área da úlcera crónica ou a área da superfície da ferida coberta por cada pulverização depende directamente da distância do actuador do alvo. Por exemplo, quanto mais perto estiver o mecanismo do actuador de pulverização da área alvo, mais pequena será a área de superfície coberta por pulverização. De igual modo, quando mais longe estiver a área alvo do mecanismo do actuador da pulverização, maior será a área de superfície coberta por pulverização.

De preferência, a área superficial coberta está compreendida entre cerca de 11 cm² e cerca de 14 cm². De acordo com uma variante preferida, a distância entre o ejetor de pulverização e o alvo é aproximadamente de 6 cm. A esta distância, utilizando um mecanismo de actuador de pulverização com um diâmetro estreito, uma pulverização irá cobrir uma superfície de ferida aproximadamente de 12,6 cm².

O número de células que caem sobre a área alvo do paciente (isto é, o número de células por cm² do paciente) irá variar em função da concentração de cada um dos componentes e das proporções entre queratinócitos e fibroblastos utilizada no componente 2. Será evidente para os especialistas na matéria que a concentração de células no segundo componente da preparação de células pode variar entre cerca de 1×10^3 células/ μ L e cerca de 50×10^3 células/ μ L. Por exemplo, de acordo com algumas variantes, o número de células/ μ L do componente 2 na preparação de células pode variar entre cerca de 5×10^3 células/ μ L e cerca de 20×10^3 células/ μ L. Assim, no caso de serem administradas duas pulverizações aproximadamente de 130 μ L/pulverização a um paciente, então serão administradas aproximadamente entre cerca de $1,3 \times 10^6$ e cerca de $5,2 \times 10^6$ células ao paciente.

Tipicamente, o primeiro componente (fibrinogénio) é pulverizado sobre o alvo seguindo-se a pulverização do segundo componente (trombina + células). A ordem de pulverização dos componentes pode ser invertida. No entanto, é preferível aplicar em primeiro lugar o componente de fibrinogénio e subsequentemente aplicar o componente de trombina + células, o qual pode conter, facultativamente, um crioprotector. Após a pulverização do

componente de células + trombina sobre o componente de fibrinogénio, os dois componentes irão começar a transformar-se em gel, curar ou polimerizar praticamente nesse instante, permitindo uma distribuição igual de células sobre a área alvo. No caso de se aplicar em primeiro lugar o componente de células + trombina seguido pelo componente de fibrinogénio, o tempo de intervalo resultante permite que as células migrem do local da ferida, devido ao efeito da gravidade, o que pode causar que o componente de células + trombina “escorra” ou “pingue” após aplicação, dependendo do volume aplicado. Por sua vez, tal poderá potencialmente causar uma distribuição desigual de células durante a aplicação do componente de fibrinogénio. Uma vez que a aplicação subsequente do componente de fibrinogénio causa a polimerização, tal poderá provocar a formação de uma preparação de células desigual.

De acordo com outra variante, os componentes da preparação de células podem ser administrados sob a forma de uma pulverização que é misturada no ar antes de atingir a área alvo. De acordo com tal variante, os dois componentes podem ser pulverizados ao mesmo tempo, utilizando um ou dois mecanismos de actuador de pulverização. As pulverização de neblina de cada componente iriam então ser combinadas no ar, iniciando assim a polimerização antes da preparação de células atingir a área alvo (isto é, o local da ferida). Esta variante iria fazer com que a preparação de células da invenção fosse mais fácil de aplicar, uma vez que é necessária uma aplicação única para aplicar as células e para se dar início à polimerização de fibrina.

Crioconservação

De acordo com algumas variantes, as células do componente 2 podem ser crioconservadas antes da sua utilização na preparação de células da invenção. De acordo com tais variantes, o componente 2 contém células + trombina + um crioprotector. Será evidente para os especialistas na matéria que os termos "crioprotector" e "crioconservante" são utilizados interpermutavelmente e abrangem agentes utilizados para se alcançar a crioconservação. Como crioprotectores adequados refere-se, v.g., glicerol, etileno-glicol e sulfóxido de dimetilo ("DMSO"). De acordo com diversas variantes, o crioprotector compreende, mas sem que isso constitua qualquer limitação, uma solução de glicerol a 10%, uma solução de glicerol a 15% e uma solução de 15% de glicerol e 5% de albumina do soro humana (HSA). Será evidente para os especialistas na matéria que também é possível utilizar outros crioprotectores e concentrações de crioprotectores conhecidos na especialidade.

Os crioprotectores utilizados na presente invenção podem ser incluídos nos tampões que contêm o componente 2 da preparação de células. De acordo com este protocolo, não há necessidade de adicionar proteínas extra. De igual modo, as células não são congeladas em meio biológico. Seleccionando um crioprotector com uma toxicidade reduzida ou mesmo não tóxico, não há necessidade de lavar ou de remover o crioprotector a partir das células antes da utilização. Tal permite a aplicação directa da preparação de células após descongelamento.

A crioconservação facilita o envio e o armazenamento de longo prazo dos componentes da preparação de células da invenção. As células crioconservadas (no componente 2) são armazenadas a uma temperatura compreendida entre cerca de -70°C e cerca de -196°C (no caso de se utilizar azoto líquido). Por exemplo, as células crioconservadas podem ser armazenadas a -80°C num congelador ou na fase de vapor de azoto líquido a -160°C .

De acordo com um protocolo de crioconservação preferido, fecha-se um recipiente que contém a mistura de células + trombina + crioprotector (componente 2) com uma tampa de rosca, de um modo estéril. O recipiente fechado é então embalado (selado hermeticamente) dentro de uma bolsa fabricada a partir de um material que possa resistir a temperaturas compreendidas entre -70°C e -196°C , que é a temperatura encontrada na fase de vapor de azoto líquido. Outras temperaturas de armazenamento, compreendidas entre -120°C e -160°C , também podem ser encontradas na fase de vapor de azoto líquido. Os recipientes ou bolsas que contêm os recipientes são então colocados dentro de um congelador com taxa controlada utilizado para o congelamento de células e tecidos biológicos numa prateleira especial concebida para ser inserida dentro do congelador de taxa controlada. Tipicamente, os recipientes ou bolsas são armazenados numa posição vertical e alinhados em diversas filas, de um modo tal que exista espaço entre cada fila. As filas são alinhadas em paralelo em relação ao fluxo de azoto líquido em fase de vapor que passa através da câmara para arrefecer as amostras. A utilização de tais bolsas ajuda a prevenir a contaminação dos componentes durante o congelamento e o descongelamento do componente 2.

Após carregar as amostras na câmara, tem início um ciclo de congelação, o qual compreende os passos seguintes.

1. Início à temperatura ambiente ou a 20°C, arrefece-se a câmara a uma taxa de -2°C por minuto até 4°C.

2. Mantém-se então a câmara a 4°C durante 52 minutos para estabilizar todas as amostras a 4°C.

3. Arrefece-se então a câmara à taxa de -1°C por minuto até -5°C.

4. Arrefece-se então a câmara à taxa de -3°C por minuto até -12°C.

5. Arrefece-se então a câmara à taxa de -7,5°C por minuto até -20°C.

6. Mantém-se então a câmara a -20°C durante 15 minutos.

7. Arrefece-se então a câmara à taxa de -1°C por minuto até -80°C.

8. Mantém-se então a câmara a -80°C durante 60 minutos.

Remove-se então as bolsas do congelador e armazena-se a -160°C ou a -80°C até à sua utilização.

Será evidente para os especialistas na matéria que o método exacto utilizado no ciclo de arrefecimento poderá ser alterado ou melhorado consoante necessário. De um modo geral, sabe-se que as células ou tecidos deverão ser arrefecidos a uma taxa compreendida entre cerca de -0,2°C/minuto e cerca de -5°C/minuto. Além do mais, uma taxa de arrefecimento compreendida entre cerca de -0,5°C/minuto e cerca de -2°C/minuto é óptima para a maior parte dos casos.

A taxa de arrefecimento é particularmente crítica à medida que a temperatura é reduzida até ao ponto de congelamento para a solução de crioprotector utilizada. De acordo com a variante preferida aqui descrita, o arrefecimento é acelerado para valores próximos do ponto de

congelamento da solução. Esta queda rápida global na temperatura da câmara é pretendida para induzir a mudança de fase, gerando uma instabilidade térmica que induziria a formação de cristais de gelo. É desejável controlar a formação de cristais do processo de transição de fase para se dar início à transição de todas as amostras ao mesmo tempo. A formação de cristais do processo de transição de fase pode ser controlada por diversos métodos, incluindo: a criação de uma instabilidade térmica pontual (1) por contacto da amostra com uma sonda metálica arrefecida em azoto líquido ou (2) expelindo um líquido arrefecido (*v.g.*, azoto líquido) para a amostra. (Veja-se as patentes de invenção norte-americanas n^{os} 6 347 525; 6 167 710 e 5 981 617).

Será evidente para os especialistas na matéria que também é possível utilizar outros meios para controlar a transição de fase. Por exemplo, é possível utilizar qualquer técnica disponível que crie uma instabilidade na solução superarrefecida, tal como estimulação mecânica (*v.g.*, uma vibração pulsada).

De acordo com algumas variantes, a preparação de células da invenção pode ser administrada sob a forma de um estojo colocado numa embalagem individual preparada a partir de uma bolsa de laminado de folha de alumínio, a qual resiste a temperaturas reduzidas. Dentro desta bolsa exterior existem duas bolsas mais pequenas, a primeira com um recipiente que contém o componente 1 (fibrinogénio) e a segunda com um recipiente que contém o componente 2 (células + trombina + crioprotector). Em alternativa, os recipientes para os componentes 1 e 2 podem ser embalados em conjunto numa bolsa ou caixa individual. Estas bolsas

interiores também são preparadas a partir de um material resistente a temperatura. Como exemplos de materiais adequados para estas bolsas refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, uma bolsa de laminado de folha de alumínio, papel revestido, LDPE, Surlyn® e uma bolsa de laminado de Kapton™ (Steripack, Ireland). Será evidente para os especialistas na matéria que também é possível utilizar quaisquer outros materiais adequados para preparar estas bolsas. O material utilizado para preparar a bolsa deverá possuir uma temperatura reduzida de início de selagem, um desempenho elevado de barreira e uma boa resistência química. Além do mais, deverá ser adequado para esterilização por irradiação para se evitar a contaminação dos componentes da preparação de células. Nos quadros 3 e 4 são apresentados exemplos da composição e das propriedades típicas de uma bolsa adequada.

Quadro 3

ESTRUTURA	Espessura (mícron)	Peso (gm/m²)
Papel	-	50
Polietileno	13	12
Papel de alumínio	9	25
Surlyn®	-	23

Quadro 4

PROPRIEDADE	UNIDADES	Valor (típico)
Resistência à tracção (MD)	KN/m ²	>50,0
Resistência à tracção (CD)	KN/m ²	>20,0
Alongamento (MD)	%	>1,0
Alongamento (CD)	%	>2,0
Força de laminação	T:140°C, P:4 bar, t: 0,3 seg.	>5,0
Taxa de transmissão de vapor de água	g/ m ² .d @ 38°C, 90% H.R.	<0,5
Taxa de transferência de oxigénio (O ₂)	cc/ m ² .d.atm@ 23°C, 50% H.R.	<2,0

Os parâmetros de selagem para uma bola adequada irão depender do equipamento de selagem particular utilizado e da sua compatibilidade com a camada de selante do substrato secundário. No entanto, como parâmetros típicos para a selagem refere-se: temperatura = 100°C-140°C; tempo de paragem = 0,30-0,75 segundos e pressão = 60-80 psi.

De acordo com outra variante, os recipientes podem ser selados num contentor transparente rígido, fabricado por meio da utilização de um polímero resistente a temperaturas inferiores a -70°C até temperaturas tão reduzidas quanto -196°C. É possível utilizar diversos tipos diferentes de recipientes para os componentes 1 e 2 de congelamento. De acordo com uma variante preferida, utiliza-se um novo recipiente (5), tal como ilustrado na fig. 6a e na fig. 6b. este recipiente é utilizado para congelar os componentes da

preparação de células da invenção. Após o descongelamento, a rolha roscada (4) que fecha o recipiente pode ser substituída por um aplicador de bomba de pulverização. De acordo com uma variante, o recipiente pode ser preparado a partir de polipropileno, que é resistente às temperaturas reduzidas utilizadas no protocolo de crioconservação. A espessura da parede deste recipiente (1) deverá ser aproximadamente 0,8 mm para facilitar a transferência de calor/frio ao longo da parede, factor este que é importante nos processos de congelamento e de descongelamento. Além disso, o recipiente pode ser concebido para se manter numa posição vertical após a colocação da bomba de pulverização e o fundo do recipiente (2) é cónico (3) para facilitar o esvaziamento do seu conteúdo.

Uma bomba de pulverização concebida para utilização com este tipo de recipiente é fabricada pela empresa Valois. Cada pulverização administra um volume de 130 µL de produto. O actuador da pulverização, que constitui a "arma" que orienta e gera a pulverização através do tamanho do orifício, pode ser modificado de um modo tal que a "arma" possa ser orientada noutras direcções para além da posição horizontal, para auxiliar a administração tópica, permitindo a aplicação da pulverização numa superfície horizontal sem inverter o recipiente. De acordo com outra variante, é possível utilizar outras concepções de bomba de pulverização que actuem quando o recipiente está invertido.

Os componentes crioconservados da preparação de células da invenção podem ser enviados, armazenados e/ou utilizados do modo seguinte. Os componentes podem ser enviados sob a forma de um estojo congelado em gelo anidro a uma temperatura compreendida entre cerca de -70°C e cerca

de -80°C . A bomba pode ser enviada à temperatura ambiente. Depois de chegar, o estojo deverá ser armazenado a -80°C num congelador ou a -160°C até à sua utilização. Para se utilizar, abre-se a bolsa exterior do estojo e remove-se as duas bolsas mais pequenas que contêm o componente 1 (fibrinogénio) e o componente 2 (células + trombina + crioprotector) e descongela-se num banho de água que é aquecido até uma temperatura máxima de 37°C . Será evidente para os especialistas na matéria que as bolsas servem para evitar que a água do banho de água contamine os componentes da preparação de células. Depois de se descongelar o conteúdo dos recipientes, é possível remover as bolsas do banho de água, desinfetar (se desejado) e abrir. O topo roscado de cada recipiente é então removido e substituído por um aplicador de pulverização roscado, encontrando-se assim os componentes da preparação de células preparados para aplicação ao paciente.

A invenção será descrita mais minuciosamente nos exemplos seguintes, os quais não limitam o âmbito da invenção descrita nas reivindicações.

EXEMPLO 1: isolamento de queratinócitos e fibroblastos

Os queratinócitos e os fibroblastos podem ser isolados após o corte da epiderme a partir da derme utilizando uma enzima, tal como dispase ou termolisina. A epiderme isolada pode ser mantida a incubar com tripsina para se obter uma suspensão individual de células de queratinócitos, a qual pode então ser colocada em placas de cultura e amplificada para se criar um banco de queratinócitos primários. A derme isolada pode ser mantida a incubar com uma enzima de dissociação, tal como collagenase, para se obter suspensões

individuais de células de fibroblastos, preparadas para serem colocadas em placas e amplificadas ou picadas, e colocadas em placas de cultura e mantidas em cultura até que os fibroblastos migrem a partir do tecido. Estas células podem então ser recolhidas após tratamento com tripsina e novamente amplificadas para se estabelecer um abanico de células de fibroblastos. Os queratinócitos e fibroblastos humanos primários isolados deste modo podem ser utilizados para a preparação de células e misturas com fibrina.

O isolamento de fibroblastos também pode ser efectuado do modo seguinte: lava-se minuciosamente amostras de tecido frescas e pica-se numa solução de sal equilibrada com Hank (HBSS) para se remover o soro. Mantém-se o tecido picado a incubar durante 1 a 12 horas numa solução preparada no momento de uma enzima de dissociação, tal como tripsina. Após tal incubação, as células dissociadas são colocadas em suspensão, granuladas por centrifugação e colocadas em placas de cultura. Todos os fibroblastos irão ligar-se antes das outras células, pelo que é possível isolar selectivamente as células estromais adequadas e deixadas desenvolver. Os fibroblastos isolados podem então ser deixados desenvolver até à confluência e desenvolvidos em cultura em série ou armazenados por congelamento em azoto líquido (veja-se, Naughton *et al.*, 1987, J. Med. 18(3&4): 219-250). Os fibroblastos ou subpopulações de fibroblastos, tais como células de papila dérmica ou miofibroblastos podem ser isolados a partir de culturas de sobrecrecimento explantadas. Após o isolamento, as células estromais estão preparadas para a mistura com uma pasta de matriz extracelular (*v.g.*, fibrina).

EXEMPLO 2: composição dos componentes da preparação de células da invenção

Componente 1

Este componente pode ser preparado efectuando uma diluição quádrupla da solução de proteína de selagem no selante de fibrina 'Tisseel VH' (Baxter). Após a diluição, a concentração dos componentes na solução de proteína selante é a seguinte:

Fibrinogénio	18,75 mg/ml - 28,75 mg/ml
inibidor de fibrinólise (aprotinina)	750 KIU/ml
Polissorbato	0,05 mg/ml - 0,1 mg/ml
Cloreto de sódio	0,5 mg/ml - 1,0 mg/ml
Citrato trissódico	1,0 mg/ml - 2,0 mg/ml
Glicina	3,75 mg/ml - 8,75 mg/ml

Diluiu-se a solução de proteína selante numa solução de soluto salino tamponada com Hank (HBSS) na ausência de Ca^{2+} ou Mg^{2+} . A presença destes dois iões induziu a formação de precipitados durante os processos de congelamento e descongelamento.

Será evidente para os especialistas na matéria que o selante Tisseel pode ser suplementado com outras preparações de fibrinogénio e aprotinina comercialmente disponíveis para se obter resultados semelhantes. Além disso, também é possível diluir o fibrinogénio para outras concentrações, dependendo da via de administração, para aumentar as características de polimerização.

Componente 2

Este componente crioprottegido pode ser preparado por mistura dos compostos seguintes

Componentes	Concentração final
Trombina (Baxter Tisseel)	10% em volume
Glicerol	15% em volume
Albumina do soro humana	5% em volume
HBSS (com Ca^{2+} e Mg^{2+})	utilizado para colocar novamente em suspensão estes componentes

Após a diluição, a solução de trombina obtida a partir da Baxter contribui a seguinte solução crioprottegida

Trombina	50 IU/ml
Proteína total	4,5 - 5,5 mg/ml
Cloreto de sódio	0,8 - 1,2 mg/ml
Glicina	0,24 - 0,36 mg/ml
CaCl_2	4 μmol

Escolheu-se como diluente HBSS com Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Colocou-se novamente em suspensão a mistura de células (proporção) e concentração desejadas na solução crioprottegida para se obter o componente 2. Foram consideradas diversas proporções entre queratinócitos: fibroblastos, incluindo 1:1, 1:3, 1:4, 1:9, até um valor tão elevado como 1:50. Além do mais, as diversas concentrações finais em células no componente 2 consideradas foram de 1 milhão, 2,5 milhões, 5 milhões, 10 milhões, 20 milhões e 50 milhões de células/mL (concentração final).

EXEMPLO 3: teste da dose eficaz de mitomicina C

Trabalhos anteriores demonstraram que as concentrações eficientes de mitomicina C (MMC) para interromper o crescimento de fibroblastos 3T3 de murganhos eram 2 µg/mL (Rheinwald and Green, Cell 6: 331-43 (1975)) e para interromper o crescimento de fibroblastos dermais humanos eram de 8 µg/mL (Limat et al., J. Invest. Dermatol. 92: 758-62 (1989)).

Interrompeu-se o crescimento da linhagem celular de fibroblastos de ratos (CRL 1213), da linhagem celular de fibroblastos de ratos transfectados com FGF1 (1175/CRL 1213), da linhagem de fibroblastos imortalizados com telomerase humana (MDX12) e de fibroblastos humanos primários (EDX1), utilizando o método seguinte. Deixou-se crescer fibroblastos em DMEM + 10% de FCS, Hepes 25 mM, piruvato 1 mM, L-Gln 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/ml em frascos T75. Na confluência, separou-se as células e colocou-se em placas com uma densidade de 10^5 células/cm², manteve-se novamente a incubar durante 48 horas, depois tratou-se com mitomicina C (MMC) a 0, 2, 4, 8, 12 µg/mL durante 5 horas. Enxaguou-se então as células com PBS e separou-se com 0,05% de tripsina/0,02% de EDTA. Colocou-se em placas as células restantes a densidades de 100 a 5000 células/cm² em frascos T25, respectivamente (10 frascos para cada densidade). Manteve-se estas células a incubar a 37°C com 2 mudanças de meio por semana.

Determinou-se a eficácia da interrupção do crescimento por contagem semanal das células (utilizando um hemacitômetro), mantidas em cultura nos frascos colocados em placas numa densidade de 5000 células/cm² e por

inspecção das novas colónias nos frascos colocados em placas numa densidade de 100 células/cm². As alterações na morfologia celular também foram examinadas. Uma concentração de 8 µg/mL de MMC foi suficiente para interromper o crescimento de fibroblastos humanos primários (EDX1) e da linhagem de fibroblastos imortalizados com hTERT (MDX12), o que está em concordância com os dados anteriores (Limat et al., J. Invest. Dermatol. 92: 758-62 (1989)). A linhagem de fibroblastos de rato (CRL 1213) apresentou uma toxicidade para concentrações em MMC superiores a 4 µg/mL, ao passo que 2 µg/mL de MMC demonstrou ser a concentração óptima para interromper o crescimento destas células. Deu-se a interrupção do crescimento da linhagem celular de fibroblastos de ratos (1175/CRL 1213) transfectadas com o gene FGF1, a uma concentração de 1 µg/mL de MMC. As concentrações inferiores a 1 µg/mL não foram eficazes e concentrações mais elevadas de MMC foram progressivamente tóxicas. Os fibroblastos tratados com mitomicina C (com a dose de mitomicina C adequada), recuperados do armazenamento criogénico por descongelamento, apresentaram uma recuperação celular pelo menos de 50% (em conformidade com Limat et al., In Vitro Cell Dev. Biol. 26: 709-12 (1990)).

EXEMPLO 4: teste da dose eficaz de irradiação gama em fibroblastos e queratinócitos

Para se medir o efeito de radiação gama (γ) sobre a actividade mitótica de fibroblastos tratados, utilizou-se um ensaio de proliferação de células BrdU, o qual é realizado num formato de 96 cavidades (Oncogene Research Products). Tratou-se células de fibroblastos primários

humanas, não imortalizadas, com irradiação γ a várias doses, incluindo 0, 60, 70 e 80 Gray. Colocou-se então as células em placas numa densidade de 5000 células por cavidade numa placa com 96 cavidades. Manteve-se os controlos irradiados e não irradiados em cultura durante períodos de 15 e 30 dias. Em cada um destes instantes, mediu-se a actividade mitótica utilizando um ensaio de incorporação de BrdU, no qual se testa imuniquimicamente a incorporação de BrdU no ADN e se mede por meio da sua absorvância a 450 nm.

Na fig. 1, utilizou-se células não irradiadas tratadas com BrdU como controlo positivo para cada experiência. Utilizou-se as células não irradiadas que não foram tratadas com BrdU como absorvância de fundo, valor este que foi subtraído à absorvância a 450 nm de cada amostra (0, 60, 70 e 80 Gray) e normalizou-se os dados finais ajustando o valor do controlo positivo para 100% em relação à incorporação de BrdU. Na fig. 1, é evidente que o tratamento com irradiação γ a níveis de 60 Gray e superiores induz os fibroblastos primários para um estado pós-mitótico. Considerou-se um total de 3 amostras para cada condição. Os dados são apresentados sob a forma de média $\pm$ MDP.

Na fig. 2, avaliou-se a viabilidade das células após tratamento por irradiação gama (γ) determinado a adesão das células a superfícies normais de culturas de células. Colocou-se as células em placas de cultura com 6 cavidades numa concentração de 9500 células/cm² ou de 95000 células por cavidade. Quatro horas após a colocação em placas, substituiu-se o meio com meio fresco que continha 50 μ g/ml de Vermelho neutro e manteve-se as células a incubar

durante 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. Enxaguou-se duas vezes as cavidades com NaCl 0,9% e secou-se de um dia para o outro. No dia seguinte, dissolveu-se o corante utilizando uma mistura a 1:1 de ácido acético (2%) e etanol (95%). Manteve-se cada cavidade a incubar em 1 mL desta solução à temperatura ambiente durante 15 minutos e depois determinou-se o teor em corante de 200 uL da mistura a 540 nm. Não foi observada uma diferença significativa entre a adesão de células tratadas versus não tratadas, o que indica que a irradiação gama (γ) não afecta a viabilidade das células e que as células podem ligar-se a uma superfície de cultura após irradiação gama (γ). Cada instante de dados é uma medição média de três amostras separadas de 6 cavidades. Os dados são apresentados sob a forma de média $\pm$ DP.

A irradiação gama (γ) a 80 Gy também foi avaliada quanto à sua aptidão para induzir a diferenciação de queratinócitos humanos primários para um estado pós-mitótico. Colocou-se em placas queratinócitos irradiados sobre uma camada de células alimentadoras de fibroblastos de crescimento interrompido (irradiadas com gama (γ) a 70 Gy). Colocou-se em placas as células alimentadoras numa densidade de 5000 células/cm² e de queratinócitos de 12500 células/cm². Monitorizou-se o crescimento de queratinócitos e o fenótipo durante 3 semanas por observação utilizando um microscópio invertido. Durante este período, observou-se que os queratinócitos adoptaram um fenótipo diferenciado, com as células aumentando o seu tamanho e área de ligação. Os queratinócitos desenvolvidos em cultura deste modo não foram capazes de se dividir e cobrir a superfície de cultura, pelo contrário permaneceram isolados ou em

pequenos grupos, o que indica que a irradiação induziu as células para um estado pós-mitótico.

EXEMPLO 5: teste das densidades celulares com pasta de fibrina: secreção de factores de crescimento e de citocinas por misturas de queratinócitos e fibroblastos numa matriz de fibrina

Interrompeu-se o crescimento de queratinócitos e fibroblastos primários humanos por irradiação gama (γ) a 80 Gy, antes da sua formulação. Misturou-se preparações frescas de queratinócitos e fibroblastos primários humanos numa proporção de 1:9 e a concentrações finais de 2,5, 5, 10, 20 e 40 milhões de células/mL numa suspensão que contém, 10% de trombina (Tisseel, Baxter) + 15% de glicerol + 5% de albumina do soro humana. Num segundo recipiente, preparou-se uma solução de 25% de fibrinogénio (Tisseel, Baxter). Preparou-se uma “pasta” de células e fibrina em cavidades individuais de uma placa com 24 cavidades por pulverização conjunta de uma pulverização I (130 μ L) da suspensão de células + trombina e 1 pulverização (130 μ L) da suspensão de fibrinogénio. Determinou-se a secreção de diversos factores de crescimento e de citocinas por estas células para o meio durante o dia 2, após a preparação das células na matriz de fibrina. Os dados apresentados no quadro 5 representam uma média de 5 dados individuais (amostras) para cada uma das condições testadas.

Quadro 5

Concentração em células	GM-CSF (pg)		VEGF (pg)		KGF (pg)		HGF (pg)		IL-1 beta (pg)	
	Média	MEP	Média	MEP	Média	MEP	Média	MEP	Média	MEP
2,5 milhões/ml	9	5	1002	80	90	6	1869	144	29	4
5 milhões/ml	42	14	3528	385	207	9	3533	417	58	6
10 milhões/ml	373	55	11739	822	332	15	5726	213	119	8
20 milhões/ml	963	110	12637	1064	214	34	4956	563	276	51
40 milhões/ml	602	82	4432	733	98	11	2140	197	927	45

O quadro 5 ilustra a variedade de factores de crescimento diferentes que são activamente segregados a partir dos queratinócitos e dos fibroblastos contidos na matriz de fibrina. Também se sabe na especialidade que o bFGF produzido por estas células pode ser encontrado na matriz de fibrina. Observou-se que os níveis absolutos de factores de crescimento produzidos dependem da natureza particular do factor de crescimento em questão. Uma vez que a potência biológica e o período de semi-vida é dependente da molécula, os níveis de pg actuais dos factores de crescimento independentes não constitui o interesse principal. Pelo contrário, crê-se que a acção biológica do cocktail de moléculas segregadas a partir destas células proporciona em conjunto uma via única de alvejar diversos circuitos biológicos em simultâneo. É importante salientar que estão a ser produzidas quantidades fisiológicas dos factores de crescimento e das citoquinas.

No quadro 5, a secreção de 5 moléculas diferentes parecer ser dependente da dose de acordo com a concentração de células utilizada. Tal mantém-se verdadeiro à medida em que a concentração em células aumenta desde 2,5 até 10 milhões de células/mL. Para a maior parte dos factores, com excepção de KGF e HGF, são observados níveis de secreção

ainda mais elevados a 20 milhões de células/mL. No entanto, quando o número de células aumenta até 40 milhões de células/mL, observa-se uma queda na produção de proteínas para todas as moléculas com a exceção de IL-1 beta. Tal sugere que é provável que exista uma concentração óptima de células e que, conforme ilustrado, cada concentração de células irá proporcionar a produção de um perfil de proteínas diferente, conforme pode ser observado no quadro 6 seguinte. O quadro 6 foi criado por normalização da secreção de VEGF, KGF, HGF e IL-1 beta com a secreção de GM-CSF. Tal ilustra que, para concentrações diferentes de células, existe um perfil de proteínas diferente, sendo as moléculas produzidas em proporções diferentes em função da concentração em células sob avaliação.

Quadro 6

	GM-CSF	VEGF	KGF	HGF	IL-1 beta
2,5 milhões/ml	1	111,3	10	207,6	3,2
5 milhões/ml	1	84	4,9	84,1	1,4
10 milhões/ml	1	31,5	0,9	15,3	0,3
20 milhões/ml	1	13,1	0,2	5,1	0,3
40 milhões/ml	1	7,4	0,2	3,6	1,5

EXEMPLO 6: ensaio clínico c2001 de allox de fase I

Descrição do produto

O tratamento com base em células alogeneicas (designado por Allox) sob investigação é um produto de dois componentes que pode ser aplicado topicamente a úlceras crônicas utilizando um aplicador de pulverização. Após a pulverização dos dois componentes no local da ferida, cria-

se uma matriz de fibrina que prende as células aplicadas na região da úlcera, permitindo a libertação local de factores trópicos por parte destas células.

O conteúdo dos 2 componentes foi:

componente 1 - uma suspensão líquida de fibrinogénio;
(1 pulverização = 50 µL)

componente 2 - uma suspensão líquida de queratinócitos e fibroblastos (proporção 1:1, 15×10^6 células/mL) misturados com trombina; (1 pulverização = 50 µL).

Objectivo

O objectivo deste estudo foi avaliar os efeitos de Allox no processo de cura de feridas de úlceras crónicas, para avaliar a sua segurança e tolerabilidade numa população de pacientes e para determinar o efeito do produto sobre a incidência do fecho completo da ferida de úlceras crónicas na perna em pacientes com insuficiência venosa ou arteriovenosa.

Metodologia

Recrutou-se pacientes com mais de 18 anos de idade e pelo menos com uma úlcera venosa ou uma úlcera combinada arterio-venosa entre o tornozelo e o joelho, que satisfaçam os critérios de elegibilidade do protocolo, para receber Allox no estudo C2001. No dia do estudo (SD) -14, os pacientes foram considerados elegíveis e foram recrutados para receber o tratamento com Allox. No SD1, os pacientes receberam a primeira aplicação do tratamento de estudo, o qual foi repetido numa base semanal até 8 semanas ou até ao fecho da úlcera, consoante o que surgir primeiro. Foi

marcada uma visita de acompanhamento 4 semanas após a última aplicação do tratamento.

Número de pacientes

Foram inicialmente inscritos um total de 13 pacientes, um dos quais se determinou, mais tarde, que não era elegível para o protocolo.

Diagnóstico e critério principal de inclusão

Pacientes com idade superior a 18 anos com uma ou várias úlceras venosas ou úlceras combinadas arterio-venosas entre o tornozelo e o joelho, cuja etiologia foi confirmada pelo índice de pressão braquial do tornozelo, por pressão no dedo grande e/ou tornozelo e por ultra-sons duplex, foram considerados elegíveis para este estudo. Ao SD-14, os pacientes tinham de apresentar uma úlcera com mais de 1 mês de duração e com uma área superficial superior a 1 cm². Foi necessário que os pacientes fossem capazes de comunicar e de cooperar com os investigadores e com o pessoal auxiliar e tinham de assinar um consentimento por escrito. Os pacientes do sexo feminino deveriam estar no estado pós-menopausa ou cirurgicamente esterilizados.

Tratamento de teste e via de administração

Aplicação por pulverização sequencial das soluções provenientes do estojo de dois recipientes. Aplicou-se alternadamente um total de 0,4 mL de produto: 2 pulverizações de componente 1 (fibrinogénio seguidas por 2 pulverizações de componente 2 (células + trombina). Repetiu-se este procedimento duas vezes. Tal aplicação

cobriu 12 cm² da área da úlcera e cada cm² de ferida tratada recebeu um total de 0,25 x 10⁶ células.

Duração do tratamento

Ao SD1, os pacientes receberam a primeira aplicação, a qual foi repetida numa base semanal até 8 semanas ou até ao fecho da úlcera, conforme o que surgir primeiro. Foi marcada uma visita de acompanhamento para 4 semanas após a última aplicação. O período de duração do estudo foi de 14 semanas, as quais consistem de um período de 2 semanas de preparação, um período de 8 semanas de tratamento e um período de acompanhamento de 4 semanas.

Critério de avaliação

Avaliou-se a eficácia por meio da observação do fecho completo da úlcera; da área superficial da úlcera na S8 e S12 em comparação com o SD1; o efeito nas extremidades e os sintomas da úlcera.

Monitorizou-se a segurança acompanhando a frequência e a gravidade de eventos adversos até à semana 12. Também foram registados testes de laboratório convencionais, exames físicos e medições dos sinais vitais.

Métodos estatísticos

Dado o número reduzido de pacientes tratados, não foi realizada a análise estatística. Pelo contrário, os resultados são aqui apresentados sob uma forma descritiva.

Resultados

Quadro 7: redução da superfície da úlcera em pacientes tratados com Allox

ID do paciente	Centro	Área de superfície da úlcera (cm ²) a SD1	Área de superfície da úlcera (cm ²) a SD57	Área de superfície da úlcera (cm ²) ao fim de 4 semanas de acompanhamento	% de redução de área SD1-SD57	% de redução de área SD1-acompanhamento
200111	1	50,4	52,0	55,2	-3	-10
200113	1	14,0	15,4	12,5	-10	10
200114	1	44,0	50,9	62,8	-16	-43
200124	2	21,5	20,4	19,9	5	7
200125	2	11,8	10,2	9,8	14	16
200126	2	7,7	16,2	16,2	-110	-110
200127	2	10,6	6,5	5,8	38	45
200129	2	64,5	72,6	73,5	-13	-14
200141	4	10,3	5,5	0,5	47	95
200142	4	20,0	14,0	10,3	30	48
200143	4	0,8	0,0	0,0	100	100
200144	4	1,8	0,1	0,0	92	100

Foi observado um fecho total para uma úlcera ao SD57 e para duas úlceras nas 4 semanas de acompanhamento. Para 5 pacientes, observou-se uma melhoria definida com uma diminuição superior a 30% na área superficial. O tratamento falhado, o qual foi definido como nenhuma redução no tamanho da úlcera ou um aumento do tamanho na úlcera durante o período do estudo, foi observado em 4 pacientes tratados com Allox.

Conclusão do estudo clínico

Os tratamentos semanais com Allox ao longo de um período de 8 semanas foram considerados seguros e não tóxicos para os pacientes com úlceras crónicas na perna. As duas infecções na úlcera que poderiam estar associadas ao tratamento ficaram resolvidas antes do fim do estudo. As

infecções moderadas de úlceras são relativamente comuns no caso de não se respeitar uma higiene correcta.

Cinco pacientes mostraram uma redução superior a 30% da área no final do período de acompanhamento, tendo 2 pacientes apresentado um fecho completo da úlcera. A partir deste pequeno estudo, observou-se uma tendência de resposta para úlceras “jovens” (< 6 meses).

EXEMPLO 7: teste das diluições óptimas de Tisseel VH (cola de fibrina) e de plasma humano convencional

A fibrina constitui um polímero biológico potencial que pode ser utilizado para colocar em suspensão e prender misturas de células para fins terapêuticos. A fibrina polimerizada é criada por mistura de fibrinogénio e trombina nas concentrações adequadas. Na matriz apresentada na fig. 3, foram testadas diversas diluições de fibrinogénio (Tisseel, Baxter) e de trombina (Tisseel, Baxter) quando ao seu efeito sobre o processo de polimerização e quanto a criação do produto final fibrina. As diluições consideradas estavam compreendidas entre 1/4 e 1/80 dos componentes de fibrinogénio e de trombina originais fornecidos no estojo TissuCol. No estojo Tisseel original, o fibrinogénio possuía uma concentração compreendida entre 75 e 115 mg/mL, ao passo que a trombina possuía uma concentração de 500 IU/mL. Para este estudo, diluiu-se o fibrinogénio em HBSS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} e diluiu-se a trombina em HBSS com Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Como características de fibrina consideradas refere-se o tempo de polimerização (segundos), a consistência e a força mecânica. Criou-se o polímero de fibrina utilizando uma técnica de pulverização, na qual se combina uma

pulverização de fibrina com uma pulverização de trombina numa única cavidade de uma placa de cultura com 24 cavidades. As condições foram repetidas em triplicado. O volume de pulverização utilizado foi de 130 µL por pulverização.

Todas as diluições consideradas permitiram a formação de um polímero de fibrina, embora as propriedades do polímero de fibrina tenham variado bastante em função das diluições utilizadas. A consistência e a força mecânica da fibrina foram classificadas utilizando a escala (-, +, ++, +++) em que o símbolo - foi considerado fraco e o símbolo +++ foi considerado excelente. Classificações de ++ ou de +++ foram consideradas aceitáveis para utilização potencial para suspender células para aplicações terapêuticas. As condições de diluição máxima de fibrinogénio foram de 1/20 de fibrinogénio e 1/8 de trombina, ao passo que as condições de diluição máxima de trombina foram de 1/4 de fibrinogénio e 1/40 de trombina.

Além disso, também foi utilizado plasma normal como material de matriz para a produção de uma cola biológica para prender as células ao local de aplicação numa ferida. as misturas preparadas por pipetação de plasma humano normal não diluído em conjunto com trombina numa diluição de 1/50 permitiu a formação de um coágulo ou polímero de fibrina. Este polímero de fibrina mostrou características de manuseamento semelhantes às de colas de fibrina comercialmente disponíveis, o que sugere que pode servir como substituto para Tisseel VH ou Tissucol da Baxter e produtos à base de fibrina concentrados da Haemacure APR.

EXEMPLO 8: comparação da libertação de factor de crescimento em células pulverizadas versus não pulverizadas.

A fig. 4 mostra a secreção de factores de crescimento a partir de células presas a uma matriz de fibrina, de acordo com os métodos da presente invenção. Avaliou-se a secreção de VEGF e GM-CSF a partir de meio condicionado durante 24 horas, durante o segundo dia após a produção da matriz celular de fibrina. Mediu-se a secreção de bFGF em extractos obtidos a partir da matriz celular 48 horas após a produção. Para impedir o crescimento de células, tratou-se os fibroblastos e os queratinócitos humanos primários com 8 ug/mL de mitomicina durante cinco horas. Enxaguou-se as células com HBSS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , antes de tripsinização.

Aplicou-se as células utilizando uma bomba de pulverização que distribui 50 μL por pulverização.

Proporção entre queratinócitos:fibroblastos = 1:4

2 pulverizações ($1,5 \times 10^6$ células): 100 μL (15 milhões de células/mL) do componente (células + trombina) + 100 μL do componente fibrinogénio.

4 pulverizações (3×10^6 células): 200 μL (15 milhões de células/mL) do componente (células + trombina) + 200 μL do componente fibrinogénio.

Não pulverizada ($1,5 \times 10^6$ células): 100 μL (15 milhões de células/mL) do componente (células + trombina) + 100 μL do componente fibrinogénio.

Proporção entre queratinócitos:fibroblastos = 1:1

Não pulverizada (2×10^6 células): 250 μL (8 milhões de células/mL) do componente (células + trombina) + 250 μL do componente fibrinogénio.

A fig. 4 compara a quantidade de factores de crescimento segregados produzidos pelas preparações de células e fibrina após a pulverização de doses diferentes de células em cavidades individuais de uma placa de cultura com 24 cavidades. A figura também mostra as quantidades de secreção de factor de crescimento quando as preparações de células e fibrina são preparada por simples pipetação (não pulverizadas). Uma comparação entre preparações pulverizadas e não pulverizadas indica que à uma diminuição na secreção de VEGF medida, ao passo que os níveis de secreção de GM-CSF e de bFGF são comparáveis. Além disso, um aumento de 2 para 4 pulverizações dá origem a níveis de secreção mais elevados de factores de crescimento pelas células, o que sublinha a possibilidade de dosagem dos factores de crescimento alterando o número de células. GM-CSF e VEGF segregados foram doseados em meio de cultura, ao passo que bFGF foi doseado na matriz de fibrina. Os dados são apresentados como média + MDP (n=4, pulverização; n=3, não pulverizado).

EXEMPLO 9: comparação da produção de factor de crescimento por proporções diferentes entre células de queratinócitos: fibroblastos

Na fig. 5a e na fig. 5b, é efectuada uma comparação entre os factores de crescimento libertados a partir de células presas numa matriz de fibrina. A matriz celular de fibrina é formada por meio da pulverização de uma ou de duas pulverizações do componente 2 (células + trombina) com uma ou duas pulverizações do componente 1 (fibrinogénio). Utilizou-se uma concentração de 15×10^6 células/mL no componente 2 e a bomba de pulverização utilizada distribuiu

um volume de 70 μL por pulverização. Para interromper o crescimento de células, tratou-se os fibroblastos e os queratinócitos humanos primários com 8 $\mu\text{g/mL}$ de mitomicina durante 5 horas. Enxaguou-se as células com HBSS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , antes de tripsinização.

Na fig. 5a, uma pulverização ($1,05 \times 10^6$ células) = 1 pulverização de células + trombina (70 μL) e 1 pulverização de fibrinogénio (70 μL). Na fig. 7b, duas pulverizações ($2,1 \times 10^6$ células) = 2 pulverizações de células + trombina (140 μL) e 2 pulverizações de fibrinogénio (140 μL).

As figs. 5a e 5b demonstram que a mistura de queratinócitos e fibroblastos em proporções diferentes, mantendo constante o número total de células, proporciona características variáveis de secreção de factor de crescimento. Adiciona-se os queratinócitos aos fibroblastos, observando-se um aumento na secreção de GM-CSF. Para uma pulverização, em proporções entre queratinócitos:fibroblastos de 1:24 a 1:8 atinge-se um patamar para a produção de GM-CSF. Uma nova adição de queratinócitos ao segundo componente da preparação de células da invenção não parece proporcionar uma vantagem em termos da secreção de GM-CSF.

Considerando as preparações de duas pulverizações, em proporções entre queratinócitos:fibroblastos de 1:49 a 1:1 a secreção de GM-CSF ultrapassa 5000 pg/dia. Ao passo que a secreção de GM-CSF é a mais elevada para proporções entre queratinócitos:fibroblastos de 1:4, é aparente que o aumento mais elevado na secreção de GM-CSF é obtido quando se passa de uma proporção de 1:99 para 1:49.

Além disso, também é evidente que a produção de VEGF é extremamente dependente da proporção entre queratinócitos e

fibroblastos no componente 2. Nas experiências ilustradas nas figs. 5a e 5b, parece existir uma secreção óptima de VEGF próximo de uma proporção entre queratinócitos:fibroblastos de 1:8, uma vez que um novo aumento de número de queratinócitos dá origem a uma diminuição na quantidade de VEGF segregada.

Em diferentes proporções entre células, a aplicação de um número superior de pulverizações também dá origem a um aumento nos níveis de secreção de factor de crescimento. Os dados são apresentados como média $\pm$ MDP (n=4, 1 pulverização; n=3, 2 pulverizações).

EXEMPLO 10: comparação entre o armazenamento a -160°C e a -80°C durante uma semana

A fig. 7 ilustra uma comparação da secreção de factor de crescimento por células crioconservadas armazenadas a -160°C versus a -80°C durante um período de uma semana. O crioprotector utilizado nesta experiência foi uma solução de glicerol a 10% com 10% de trombina (Tisseel, Baxter) e a proporção entre queratinócitos:fibroblastos utilizada foi de 1:1. Antes da crioconservação, separou-se as células das suas superfícies de cultura utilizando tripsina e depois irradiou-se utilizando irradiação gama (γ) a 80 Gy. Utilizou-se um congelador com taxa controlada para arrefecer gradualmente as preparações de células até -80°C. Depois de se descongelar uma semana mais tarde, misturou-se por pulverização uma pulverização (130 μ L) da preparação de células (1,3 milhões de células a 10 milhões de células/mL) com uma pulverização (130 μ L) de fibrinogénio em cavidades individuais de uma placa de petri com 24 cavidades. Os resultados mostram a secreção durante o dia 2 para três

amostras armazenadas durante uma semana a -160°C e quatro amostras armazenadas durante uma semana a -80°C , em comparação com uma amostra fresca de controlo (não congelada) que contém o mesmo crioprotector. Preparou-se uma dose GM-CSF e VEGF segregado em meio de cultura, ao passo que se preparou uma dose de bFGF na matriz de fibrina. Os dados de secreção indicam que as temperaturas de -80°C e de -160°C são adequadas para armazenamento, embora a temperatura de -160°C possa ser preferível quando se utiliza uma solução de glicerol a 10%. Os dados são apresentados como média $\pm$ MEP ($n=4$).

EXEMPLO 11: comparação da secreção após armazenamento de uma semana a -80°C em 10% de glicerol versus 15% de Glicerol.

A fig. 8 mostra uma comparação da secreção de GM-CSF, VEGF e bFGF por células criopreservadas a -80°C em 10% de glicerol versus em 15% de glicerol, durante um período de uma semana. A proporção entre queratinócitos:fibroblastos utilizada neste exemplo foi de 1:1, misturados com 10% de trombina (Tisseel, Baxter) e com um crioprotector. Antes da criopreservação, separou-se as células das suas superfícies de cultura utilizando tripsina e depois irradiou-se utilizando irradiação gama (γ) a 80 Gy. Utilizou-se um congelador de taxa controlada para arrefecer gradualmente as preparações de células até -80°C . Depois de se descongelar uma semana mais tarde, misturou-se por pulverização uma pulverização (130 μL) da preparação de células (1,3 milhões de células a 10 milhões de células/mL) com uma pulverização (130 μL) de fibrinogénio em cavidades individuais de uma placa de petri com 24 cavidades.

Os resultados mostram a secreção de GM-CSF, VEGF e bFGF durante o dia 2 para quatro amostras armazenadas durante uma semana a -80°C , utilizando 10% de glicerol, e quatro amostras armazenadas durante uma semana a -80°C , utilizando 15% de glicerol, em comparação com amostras frescas de controlo (não congeladas) que contêm as mesmas concentrações de crioprotector. Observa-se uma tendência para uma secreção de proteínas mais elevada nas amostras armazenadas em 15% de glicerol *versus* as mantidas em 10% de glicerol. Preparou-se uma dose de GM-CSF e VEGF segregados em meio de cultura, ao passo que se preparou uma dose de bFGF na matriz de fibrina. Os dados são apresentados como média $\pm$ MEP (n=4).

EXEMPLO 12: comparação da secreção após uma semana de armazenamento a -80°C em 15% de glicerol *versus* 15% de glicerol + 5% de HSA

A fig. 9 mostra uma comparação da secreção de factor de crescimento por células crioconservadas a -80°C em 15% de glicerol *versus* 15% de glicerol + 5% de albumina do soro humana (HSA) (Griffols), durante um período de uma semana. A proporção entre queratinócitos:fibroblastos utilizada neste exemplo foi de 1:3, misturados com 10% de trombina (Tisseel, Baxter) e com um crioprotector. Antes da crioconservação, separou-se as células das suas superfícies de cultura utilizando tripsina e depois irradiou-se utilizando irradiação gama (γ) a 80 Gy. Utilizou-se um congelador de taxa controlada para arrefecer gradualmente as preparações de células até -80°C . Depois de se descongelar uma semana mais tarde, misturou-se por pulverização uma pulverização (130 μL) da preparação de

células (1,3 milhões de células a 10 milhões de células/mL) com uma pulverização (130 µL) de fibrinogénio em cavidades individuais de uma placa de petri com 24 cavidades. Os resultados mostram a secreção de GM-CSF, VEGF e bFGF durante o dia 2 para três amostras armazenadas durante uma semana -80°C utilizando 15% de glicerol e três amostras armazenadas durante uma semana -80°C utilizando 15% de glicerol + 5% de HSA (Griffols), em comparação com amostras frescas de controlo (não congeladas) que contêm os mesmos crioprotectores. Os dados de secreção indicam que a adição de albumina do soro humana melhora a formulação de produto congelado, permitindo níveis superiores de secreção de proteínas. Os dados são apresentados como média $\pm$ MEP (n=4).

EXEMPLO 13: bioactividade de misturas de queratinócitos e fibroblastos após armazenamento de longa duração a -80°C

A fig. 10 ilustra a secreção de GM-CSF e VEGF de proteínas humanas pelas preparações de células, após o armazenamento a uma temperatura de -80°C, durante períodos prolongados. São apresentados dados provenientes de três lotes de produção clínica em separado. Os lotes que contêm uma proporção entre fibroblastos e queratinócitos humanos primários de 1:1 numa concentração final de 10×10^6 células/mL foram irradiados utilizando irradiação gama (γ) a 80 Gy e congelados numa solução que contém trombina, 15% de glicerol e 5% de albumina do soro humana. Descongelou-se amostras provenientes de cada lote de produção após 1, 4, 8 e 12 semanas de armazenamento a -80°C. As amostras descongeladas foram subsequentemente pulverizadas em placas com 24 cavidades para testes. Nas cavidades individuais,

mistura-se uma pulverização única (130 μ L) de células + trombina + crioprotector com uma pulverização única (130 μ L) de fibrinogénio. A mistura destas duas pulverizações cria uma matriz de polímero de fibrina que contém fibroblastos e queratinócitos vivos. A secreção de proteínas pelas células presas na matriz de fibrina é determinada durante o dia 2 (o período restante entre 24 horas e 48 horas após descongelamento).

A secreção de GM-CSF e VEGF para o meio por preparações de células descongeladas permanece relativamente estável ao longo de um período de armazenamento de 3 meses a -80°C . Foram observadas variações ligeiras na secreção de GM-CSF de lote para lote, embora a secreção no mesmo lote pareça estável, em média, tanto em termos de uma perspectiva de lote para lote como em termos do mesmo lote de produção individual. Estes dados indicam que, no que diz respeito à secreção de GM-CSF e VEGF, o produto é estável num estado criogénico a -80°C para períodos até pelo menos 12 semanas. Os dados são apresentados como média $\pm$ MEP.

EXEMPLO 14: comparação da secreção após uma semana de armazenamento a -80°C para proporções diferentes entre queratinócitos:fibroblastos

A fig. 11 mostra a secreção de factores de crescimento a partir de formulações de preparações de células crioconservadas após uma semana de armazenamento a -80°C . O gráfico mostra as diferenças na secreção para diversas proporções entre queratinócitos:fibroblastos humanos primários, incluindo 1:0, 1:1 e 1:9, bem como as diferenças associadas às concentrações totais de células 5, 10 e 20

milhões de células/mL. Antes da crioconservação, separou-se as células das suas superfícies de cultura utilizando tripsina e depois irradiou-se utilizando irradiação gama (γ) a 80 Gy. Utilizou-se um congelador de taxa controlada para arrefecer gradualmente as preparações de células até -80°C . Depois de se descongelar uma semana mais tarde, misturou-se por pulverização uma pulverização (130 μL) da preparação de células (5, 10 e 20 milhões de células/mL) com uma pulverização (130 μL) de fibrinogénio em cavidades individuais de uma placa de petri com 24 cavidades.

Uma comparação entre os dados de secreção para a proporção de 1:0 e a proporção de 1:1 mostrou a importância da adição de fibroblastos aos queratinócitos em termos de produção de GM-CSF e VEGF. Em todos os casos, observou-se uma relação dependente de célula-dose com a secreção dos factores de crescimento durante o segundo dia após o descongelamento. Os dados também demonstram que a redução do número de queratinócitos (isto é, a redução da proporção entre queratinócitos:fibroblastos para 1:9) não deu origem a uma redução na secreção global de factor de crescimento. Estes resultados estão em conformidade com os dados obtidos para preparações de células "frescas" (não congeladas) (veja-se o exemplo 9, *supra*) e sugerem que apenas são necessárias quantidades mínimas de queratinócitos para produzir o efeito sinérgico alcançado pela mistura de queratinócitos e fibroblastos. Este estudo também demonstra que os fibroblastos desempenham um papel importante na produção de VEGF por preparações de células.

EXEMPLO 15: comparação da secreção do factor de crescimento em amostras frescas e crioconservadas armazenadas a -80°C

Antes da crioconservação, separou-se as células das suas superfícies de cultura utilizando tripsina e depois irradiou-se utilizando irradiação gama (γ) a 80 Gy. As concentrações de células testadas incluem 5, 10 e 20 milhões de células/mL (com uma proporção entre queratinócitos:fibroblastos de 1:1), cada uma delas misturada com 10% de trombina (Tisseel, Baxter) e com o crioprotector. Utilizou-se um congelador de taxa controlada para arrefecer gradualmente as preparações de células até -80°C. Depois de se descongelar uma semana mais tarde, misturou-se por pulverização uma pulverização (130 μ L) da preparação de células (5, 10 e 20 milhões de células/mL) com uma pulverização (130 μ L) de fibrinogénio em cavidades individuais de uma placa de petri com 24 cavidades. Para se avaliar a alteração em amostras congeladas (crioconservadas), efectuou-se a crioconservação de 3 tubos em separado durante uma semana -80°C. Após o descongelamento, foram preparadas cinco amostras por tubo. Os dados apresentados no quadro 8 são a média das 15 amostras disponíveis para cada condição. Os dados de secreção reprodutíveis observados nos três tubos congelados e descongelados por condições atestam a qualidade do método de crioconservação. Para as preparações frescas, foram preparadas 3 ou 4 amostras. Observou-se que a secreção de GM-CSF e VEGF por preparações frescas tripsinizadas e preparações de células congeladas aumenta à medida em que a densidade de células na matriz de fibrina aumenta de 2,5 para 5 para 10 milhões de células/mL (correspondendo a 5, 10 e 20 milhões de células/mL encontradas nas preparações

congeladas originais). Tal facto ilustra ainda o potencial dos efeitos terapêuticos da dose por tratamentos com base em células.

Quadro 8

Nome da amostra	Nº da amostra	GM-CSF (pg)			VEGF (pg)		
		Média	MEP	% fresco	Média	MEP	% fresco
5 milhões/ml, fresco	4	40	14	100	1433	289	100
10 milhões/ml, fresco	4	270	128	100	3418	1293	100
20 milhões/ml, fresco	3	751	16	100	5628	1150	100
5 milhões/ml, 1 semana a -80°C	15	81	11	202,5	986	96	68,8
10 milhões/ml, 1 semana a -80°C	15	254	21	94,1	2135	254	62,5
20 milhões/ml, 1 semana a -80°C	15	554	51	73,8	3462	335	61,5

EXEMPLO 16: avaliação da segurança da preparação de células congelada da invenção

Avaliou-se a segurança da preparação de células congelada para o processo de cura de feridas da invenção num estudo de fase I aberto, multicentro. A preparação de células era constituída por um estojo que continha os dois componentes. O componente 1 era uma suspensão de fibrinogénio e componente 2 era uma suspensão de queratinócitos e fibroblastos misturados em trombina e num crioprotector. As preparações de células foram congeladas -80°C, enviadas para os locais clínicos a -80°C e

armazenadas a -80°C no local, até à sua utilização. Imediatamente antes da utilização, descongelou-se a preparação de células num banho de água aquecido. Após o descongelamento, os dois componentes (fibrinogénio) e (células + trombina +crioprotectores) forma sequencialmente aplicados por pulverização sobre o local da ferida, formando uma matriz de fibrina fina que contém queratinócitos e fibroblastos vivos. Catorze pacientes com úlceras venosas crónicas na perna que não respondem ao tratamento convencional com coberturas e compressão pelo menos durante 4 semanas (fase de desenvolvimento) foram inscritos em 5 centros na Holanda e nas Antilhas Alemãs. Os tamanhos das úlceras no nível de base estavam compreendidos entre 0,3 e 20,4 cm² (média de 5,8). Em simultâneo com o tratamento convencional, aplicou-se então a preparação de células uma vez por semana durante 12 semanas ou até o fecho completo, conforme o que tiver lugar em primeiro lugar.

Não foram registados eventos adversos em relação a esta preparação de células. Desconfiou-se que quatro eventos moderados a graves pudessem ser atribuídos à preparação de células (3x dor da úlcera, 1x aumento do tamanho da úlcera). Além disso, não foram observados sinais clínicos de infecção da ferida. Observou-se o fecho completo na semana 12 em 10 pacientes, 7 dos quais até às 4 semanas e 3 no intervalo entre as 4 e as 12 semanas de tratamento. O tempo médio de fecho foi de 5,4 semanas.

Concluindo, a preparação de células da invenção é segura e é bem tolerada para o tratamento de úlceras venosas crónicas na perna.

EXEMPLO 17: aplicação de pulverização de queratinócitos e fibroblastos vivos como revestimento de feridas biologicamente activo

Os fibroblastos e queratinócitos primários que residem na pele, segregam naturalmente um conjunto de factores de crescimento e de citoquinas que actuam para estimular uma resposta para a cura de feridas, após a interrupção da barreira cutânea. Para imitar este processo natural, desenvolveu-se um revestimento para feridas com base em células vivas para o tratamento de úlceras venosas crónicas. Este é constituído por dois componentes: 1) uma solução de fibrinogénio e 2) uma suspensão de queratinócitos e fibroblastos em trombina e num crioprotector. O produto é armazenado num estado congelado a -80°C até ao momento da sua utilização, momento esse em que é descongelado, sendo os dois componentes aplicados sequencialmente sobre a superfície da ferida utilizando um aplicador por pulverização. Deste modo, a polimerização da fibrina tem lugar na ferida, em que as células administradas ficam presas numa cama fina de fibrina no local da úlcera.

Observou-se que misturas de queratinócitos e fibroblastos primários, com crescimento interrompido, alogeneicos segregam níveis diferentes de proteínas terapêuticas (VEGF, HGF, GM-CSF, bFGF e KGF), dependendo das proporções utilizadas. A secreção de GM-CSF depende da sinergia proveniente da presença mútua de fibroblastos e queratinócitos. O aumento da concentração em células no revestimento final para feridas desde $1,25 \times 10^6$ células/mL até 5×10^6 células/mL proporcionou uma secreção elevada de factores de crescimento e de citoquinas. Estudos

preliminares demonstraram que as preparações de células permanecem biologicamente activas pelo menos durante 2 meses quando armazenadas a -80°C .

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o EPO não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 9323572 A [0057]
- US 6010887 A [0065]
- US 6347525 B [0103]
- US 6167710 B [0103]
- US 5981617 A [0103]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- Coagulation and macrophage stimulation of angiogenesis and wound healing. **HUNT, T- K et al.** The surgical wound. Lea & Febiger, 1981, 1-18 [0002]
- **HUNT et al.** Current Surgical Diagnosis & Treatment. Way; Appleton & Lange, 1988, 86-98 [0005]
- **RICHEY et al.** Annals of Plastic Surgery. 1989, vol. 23, 159-65 [0006]
- **WINTER.** Nature, 1962, vol. 193, 293-94 [0007]
- **KENNON et al.** Dermatol. Surg., 1995, vol. 21, 583-590 [0007]
- **DAVIES.** Bums, 1983, vol. 10, 94 [0007]
- **RILEY.** Am. Fam. Physician, 1981, vol. 24, 107 [0008]

- **BAYREUTHER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5112-16 [0014]
- **BAYREUTHER et al.** *J. Cell. Sci.*, 1988, vol. 10, 115-30 [0014]
- **BIENNEISEN et al.** *Exp. Cell. Res.*, 1994, vol. 211, 219-30 [0014]
- **HAKENJOS et al.** *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000, vol. 76, 503-09 [0014]
- **BUMANN et al.** *Strahlenther. Onkol.*, 1995, vol. 171, 35-41 [0014]
- **RODEMANN et al.** *Exp. Cell. Res.*, 1989, vol. 180, 84-93 [0014]
- **THUMM et al.** *Radiat. Environ. Biophys.*, 1999, vol. 38, 195-99 [0014]
- **PALKA et al.** *Folia Histochem. Cytobiol.*, 1996, vol. 34, 121-27 [0014]
- **FRANCZ.** *Eur. J. Cell. Biol.*, 1993, vol. 60, 337-45 [0015]
[0072]
- **KATAKURA et al.** *Methods Cell Biol.*, 1998, vol. 57, 69-91 [0054]
- **JIANG et al.** *Nature Genetics*, 1999, vol. 21, 111-14 [0054]
- **MORALES et al.** *Nature Genetics*, 1999, vol. 21, 115-18 [0054]
- **BLACKBURN; SZOSTAK.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 163-194 [0054]
- **ZAKIAN.** *Ann. Rev. Genetics*, 1989, vol. 23, 579-604 [0054]
- **BLACKBURN.** *Nature*, 1991, vol. 350, 569-573 [0054]
- **MOYZIS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, vol. 85, 6622-6626 [0054]
- **HARLEY et al.** *Nature*, 1990, vol. 3445, 458-460 [0054]

- **ALLSOPP et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 10114-10118 [0054]
- **VAZIRI et al.** *Am. J. Human Genetics*, 1993, vol. 52, 661-667 [0054]
- **WATSON.** *Nature New Biology*, 1972, vol. 239, 197-201 [0054]
- **HARLEY.** *Mut. Res.*, 1991, vol. 256, 271-282 [0055]
- **HASTIE et al.** *Nature*, 1990, vol. 346, 866-868 [0055]
- **LINDSEY et al.** *Mut. Res.*, 1991, vol. 256, 45-48 [0055]
- **WRIGHT; SHAY.** *Trends Genetics*, 1992, vol. 8, 193-197 [0055]
- **COUNTER et al.** *EMBO*, 1992, vol. 11, 1921-1929 [0055]
- **COUNTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 2900-2940 [0055]
- **GREIDER; BLACKBURN.** *Cell*, 1985, vol. 43, 405-413 [0056]
- **GREIDER; BLACKBURN.** *Nature*, 1989, vol. 337, 331-337 [0056]
- **YU et al.** *Nature*, 1990, vol. 344, 126-132 [0056]
- **BLACKBURN.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, 113-129 [0056]
- **MORIN.** *Cell*, 1989, vol. 59, 521-529 [0056]
- **JIANG et al.** *Nature Genetics*, 1999, vol. 21, 111-114 [0057]
- **MORALES et al.** *Nature Genetics*, 1999, vol. 21, 115-118 [0057]
- **SINGER, A.; CLARK, R.** *Cutaneous Wound Healing. The New England Journal of Medicine*, 1999, vol. 341, 738-746 [0067]
- **MCCUTCHAN et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1968, vol. 41, 351-57 [0069]
- **KAWAI et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1984, vol. 4, 1172-74 [0069]

- **GRAHAM et al.** *Virology*, 1973, vol. 52, 456-67 [0069]
- **NEUMANN et al.** *EMBO J.*, 1982, vol. 7, 841-45 [0069]
- **FELGNER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7413-17 [0069]
- **CEPKO et al.** *Cell*, 1984, vol. 37, 1053-62 [0069]
- **CAPECCHI et al.** *Cell*, 1980, vol. 22, 479-88 [0069]
- **FRESHNEY.** *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique.* A.R. Liss, Inc, 1987, 107-26 [0075]
- **FRESHNEY.** *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques.* A.R. Liss, Inc, 1987, 137-68 [0076]
- **SLY et al.** *Methods Enzymol.*, 1979, vol. 58, 444-50 [0077]
- **NAUGHTON et al.** *J. Med.*, 1987, vol. 18 (3, 4), 219-250 [0112]
- **RHEINWALD; GREEN.** *Cell*, 1975, vol. 6, 331-43 [0119]
- **LIMAT et al.** *J. Invest. Dermatol.*, 1989, vol. 92, 758-62 [0119] [0121]
- **LIMAT et al.** *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 1990, vol. 26, 709-12 [0121]

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para a regeneração de tecidos que compreende:

(a) um primeiro componente que compreende fibrinogénio, em que o primeiro componente está sob a forma de uma pulverização e

(b) um segundo componente que compreende trombina e células alogeneicas mitoticamente inactivadas, em que o segundo componente está sob forma de uma pulverização e em que as células compreendem um ou vários queratinócitos e fibroblastos que segregam uma ou várias moléculas biologicamente activas seleccionadas entre o conjunto constituído por GM-CSF, VEGF, KGF, bFGF, TGF β , angiopoietina, EGF, IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF α e TNF α .

2. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 1, em que um ou vários queratinócitos e fibroblastos são fibroblastos e queratinócitos diferenciados.

3. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 1, em que um ou vários queratinócitos e fibroblastos são mitoticamente inactivados por meio da administração de mitomicina C ou de outros inibidores mitóticos quimicamente associados, por irradiação com raios γ , por irradiação com raios X ou por irradiação com luz UV.

4. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro componente compreende ainda colagénio, alginato, plasma sanguíneo ou quitosano.

5. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 1, em que o segundo componente compreende ainda um crioprotector.

6. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 5, em que o crioprotector é seleccionado entre o conjunto constituído por uma solução de glicerol a 10%, uma solução de glicerol a 15% e uma solução de 15% de glicerol e 5% de albumina do soro humana.

7. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 5, em que o crioprotector é glicerol.

8. Estojo que compreende a composição para a regeneração de tecidos de acordo com uma das reivindicações 1 a 7.

9. Estojo de acordo com a reivindicação 8, em que o primeiro componente e o segundo componente são criopreservados antes do envio e subsequentemente descongelados antes da sua utilização.

10. Estojo de acordo com a reivindicação 9, em que o primeiro componente e o segundo componente estão contidos num recipiente separado que possui uma tampa rosca removível, em que o recipiente é estéril e é preparado de um material resistente a temperaturas reduzidas e em que a tampa removível pode ser substituída por uma bomba de pulverização após o descongelamento do primeiro e do segundo componentes antes da utilização.

11. Estojo de acordo com a reivindicação 10, em que a bomba de pulverização distribui um volume aproximadamente de 130 μL por pulverização.

12. Estojo de acordo com a reivindicação 10, em que o material resistente a temperaturas reduzidas é seleccionado entre o conjunto constituído por vidro, polipropileno, polietileno e acetato de etileno-vinilo (EVA).

13. Estojo de acordo com a reivindicação 10, em que os recipientes são selados numa bolsa ou contentor antes da criopreservação, em que a bolsa ou o contentor é fabricado num material que é capaz de suportar temperaturas compreendidas entre -80°C e -196°C e em que a bolsa ou o contentor protege o primeiro e o segundo componentes de contaminação durante a criopreservação e subsequente descongelamento.

14. Estojo de acordo com a reivindicação 13, em que a bolsa ou o contentor é à prova de água e possui um elevado desempenho de barreira.

15. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 1, em que o segundo componente compreende entre cerca de 1×10^3 células/ μL e cerca de 50×10^3 células/ μL de células alogénicas mitoticamente inactivas.

16. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 3, em que um ou vários queratinócitos e

fibroblastos são mitoticamente inactivados com mitomicina C.

17. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 3, em que um ou vários queratinócitos e fibroblastos são mitoticamente inactivados por irradiação com raios γ .

18. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 3, em que um ou vários queratinócitos e fibroblastos são mitoticamente inactivados por irradiação com raios X.

19. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 3, em que um ou vários queratinócitos e fibroblastos são mitoticamente inactivados por irradiação com luz UV.

20. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com a reivindicação 5, em que o crioprotector é uma solução de 15% de glicerol e 5% de albumina do soro humana.

21. Composição para a regeneração de tecidos de acordo com uma das reivindicações 1 a 7 e 15 a 20, para utilização na regeneração de tecidos, em que a composição para a regeneração de tecidos é administrada por via tópica a um local de ferida de um paciente que necessite de tratamento.

22. Composição para a regeneração de tecidos para utilização de acordo com a reivindicação 21, em que os

referidos primeiro e segundo componentes são administrados por via tópica ao local da ferida no paciente.

23. Composição para a regeneração de tecidos para utilização de acordo com a reivindicação 21, em que os referidos primeiro e segundo componentes são combinados no local da ferida.

24. Composição para a regeneração de tecidos para utilização de acordo com a reivindicação 21, em que os referidos primeiro e segundo componentes são combinados em ar antes de atingirem o local da ferida.

25. Composição para a regeneração de tecidos para utilização de acordo com a reivindicação 22, em que o referido primeiro componente é aplicado ao local da ferida antes do referido segundo componente ser aplicado ao local da ferida.

FIG. 1

ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS BrdU DE FIBROBLASTOS
PRIMÁRIOS HUMANOS APÓS 15 E 30 DIAS EM CULTURA E APÓS
TRATAMENTO POR IRRADIAÇÃO GAMA

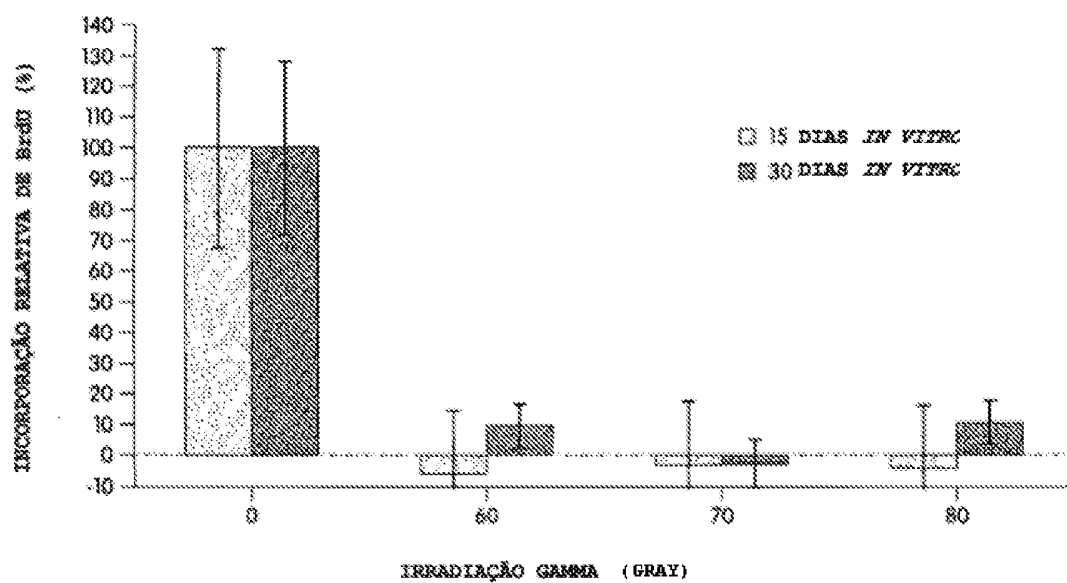


FIG. 2

ADERÊNCIA DE FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS HUMANOS A UM PRATO DE
PETRI APÓS TRATAMENTOS POR IRRADIAÇÃO GAMA
(MEDIÇÃO POR VERMELHO NEUTRO)

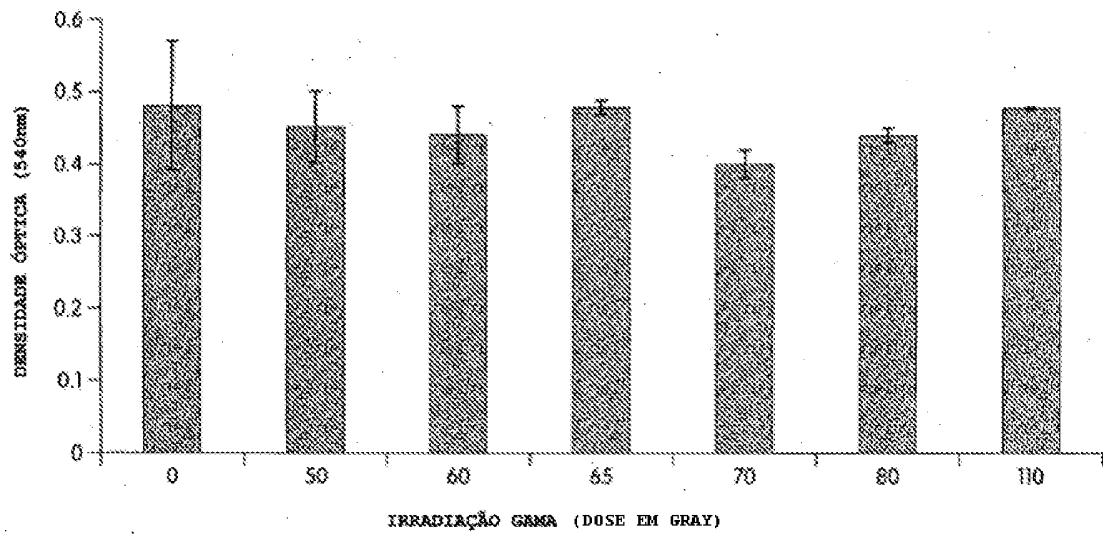


FIG. 3

	TROMBINA 1/4			TROMBINA 1/8			TROMBINA 1/10			TROMBINA 1/20			TROMBINA 1/40			TROMBINA 1/80		
FIBRINOGENO 1/4	2	+++	++	2	+++	++	2	++	++	1	++	++	10	++	++	15	++	+
FIBRINOGENO 1/8	2	+++	++	2	+++	++	2	++	++	1	++	++	15	+	+	20	++	-
FIBRINOGENO 1/10	2	++	++	2	++	++	2	++	++	5	++	+	15	+	+	20	+	-
FIBRINOGENO 1/20	5	++	++	5	++	++	5	++	+	5	+	+	15	+	+	20	+	-
FIBRINOGENO 1/40	10	++	+	20	++	+	20	+	+	20	-	-	20	-	-	30	-	-
FIBRINOGENO 1/80	30	+	-	30	+	-	30	-	-	30	-	-	30	-	-	30	-	-
	TEMPO DE POLIMERIZAÇÃO (SEGUNDOS)			TEMPO DE POLIMERIZAÇÃO (SEGUNDOS)			TEMPO DE POLIMERIZAÇÃO (SEGUNDOS)			TEMPO DE POLIMERIZAÇÃO (SEGUNDOS)			TEMPO DE POLIMERIZAÇÃO (SEGUNDOS)			TEMPO DE POLIMERIZAÇÃO (SEGUNDOS)		
	CONSISTÊNCIA			CONSISTÊNCIA			CONSISTÊNCIA			CONSISTÊNCIA			CONSISTÊNCIA			CONSISTÊNCIA		
	FORÇA			FORÇA			FORÇA			FORÇA			FORÇA			FORÇA		

FIG. 4

COMPARAÇÃO DO FACTOR DE CRESCIMENTO LIBERTADO A PARTIR DE
CÉLULAS PULVERIZADAS E NÃO PULVERIZADAS

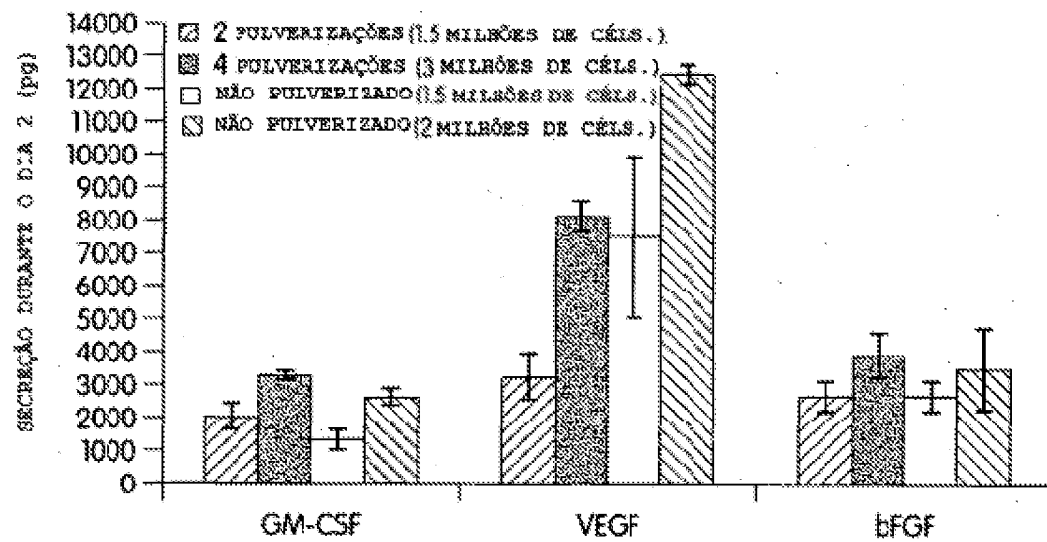


FIG. 5A

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO POR
DIFERENTES PROPORÇÕES ENTRE QUERATINÓCITOS:
FIBROBLASTOS - 1 PULVERIZAÇÃO

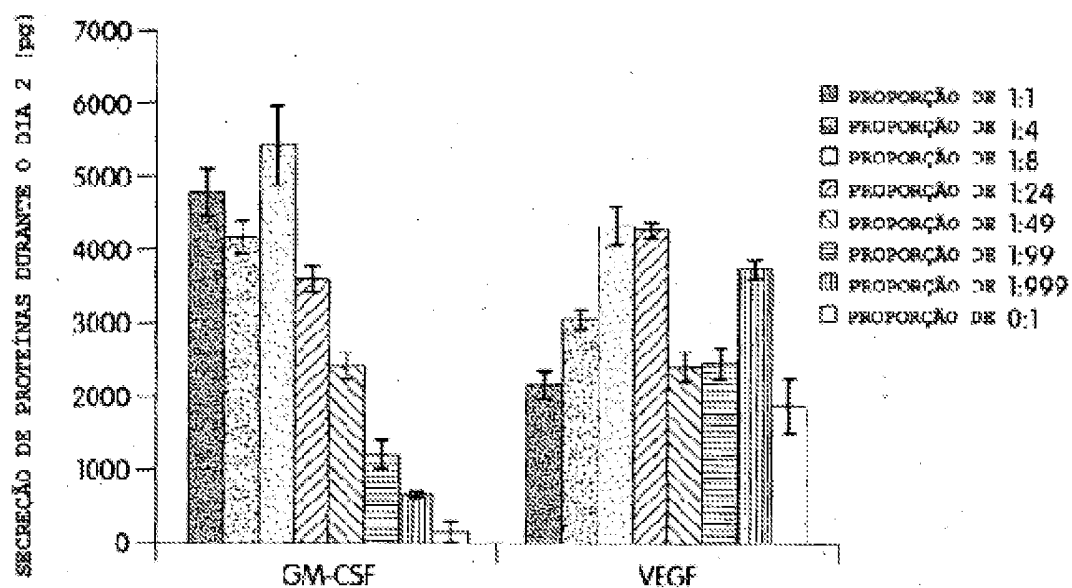


FIG. 5B

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO POR
DIFERENTES PROPORÇÕES ENTRE QUERATINÓCITOS:
FIBROBLASTOS - 2 PULVERIZAÇÕES

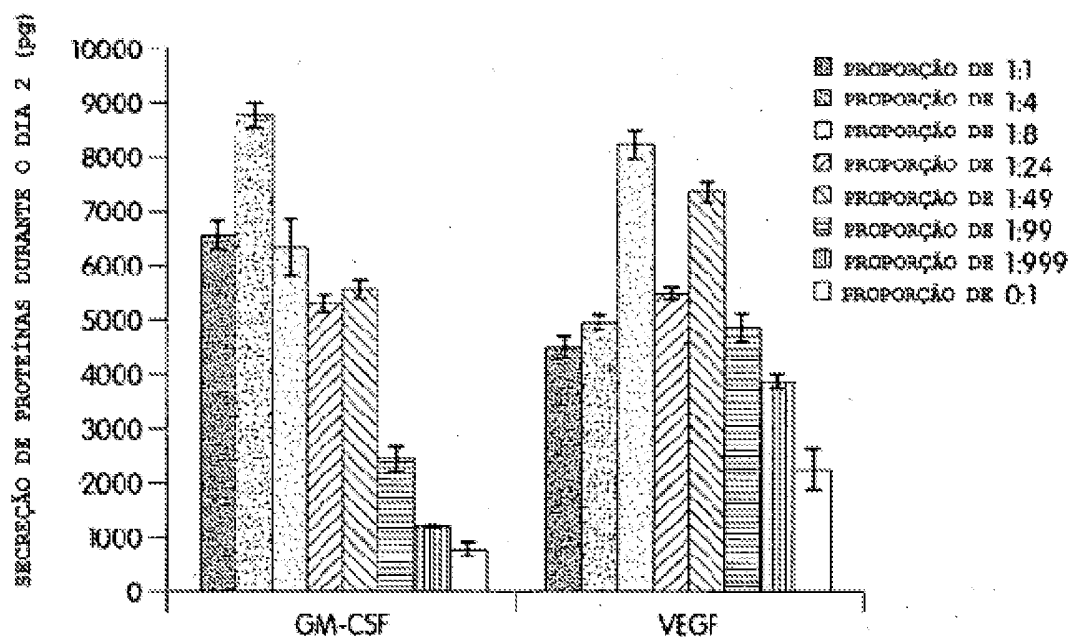


FIG. 6A

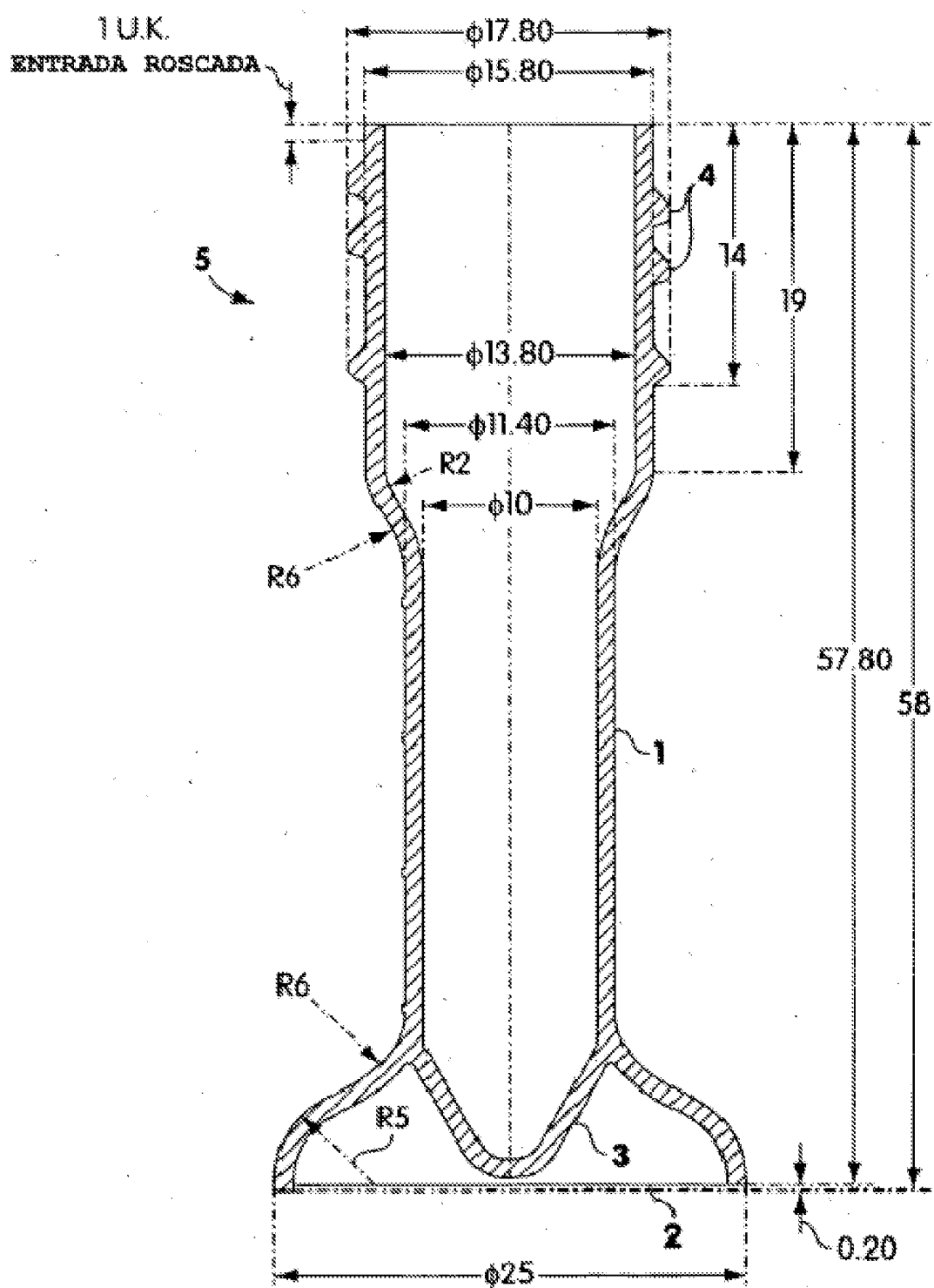


FIG. 6B

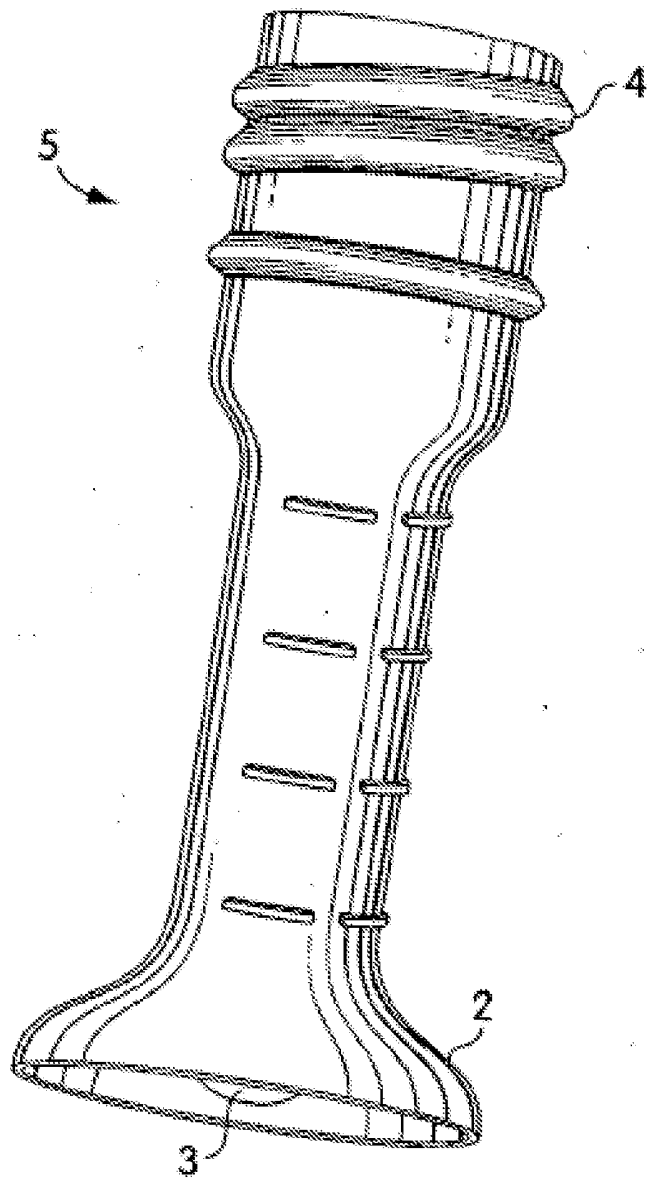


FIG. 7

COMPARAÇÃO ENTRE O ARMAZENAMENTO A -160°C E A -80°C ,
DURANTE 1 SEMANA
PROPORÇÃO ENTRE GLICEROL A 10% - QUERATINÓCITOS:
FIBROCLASTOS (1:1), 10 MILHÕES DE CÉLULAS/ml, 1
PULVERIZAÇÃO (130 ul), 24 CAVIDADES

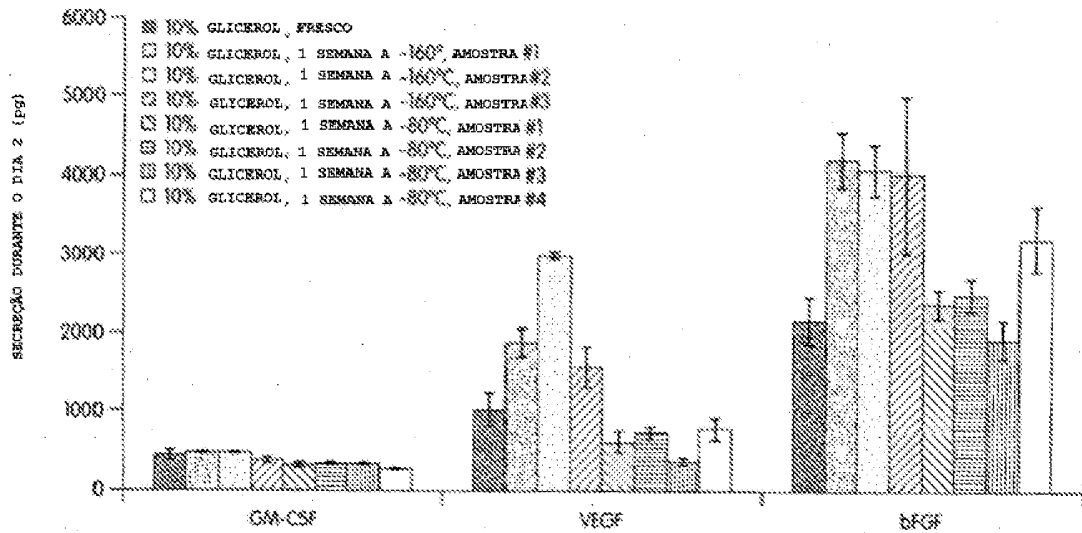


FIG. 8

COMPARAÇÃO DA SECREÇÃO, APÓS ARMAZENAMENTO DURANTE 1 SEMANA
A -80°C , ENTRE 10% DE GLICEROL E 15% DE GLICEROL; 10
MILHÕES DE CÉLULAS/ml
PROPORÇÃO ENTRE QUERATINÓCITOS: FIBROBLASTOS (1:1), 1
PULVERIZAÇÃO (130 ul)

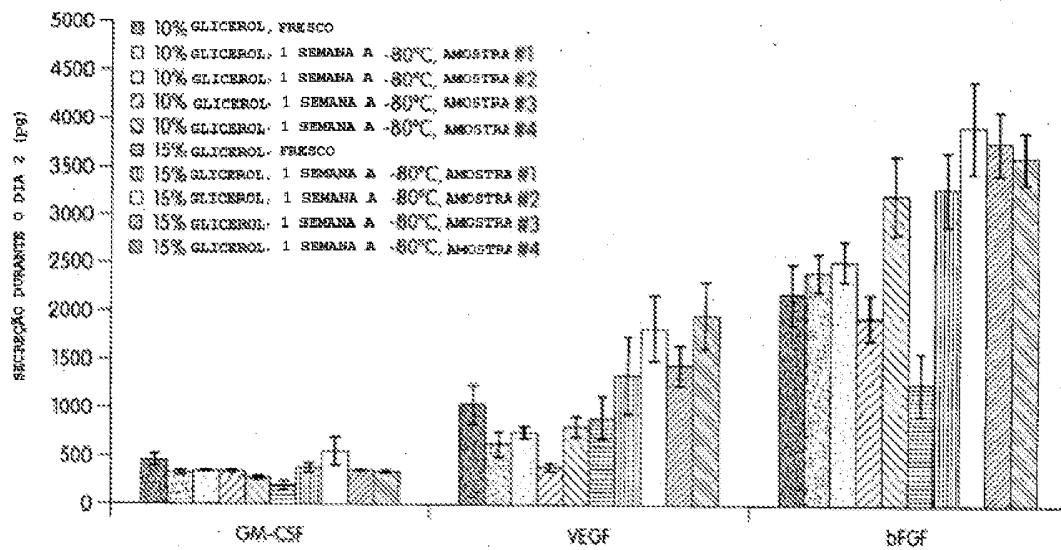


FIG. 9

CRIOCONSERVAÇÃO E 1 SEMANA DE ARMAZENAMENTO DE PREPARAÇÕES DE CÉLULAS A -80°C , 15% DE GLICEROL VS. 15% DE GLICEROL + 5% DE HSA (GRIFFOLS); 10 MILHÕES DE CÉLULAS/ml, PROPORÇÃO ENTRE Q:F (1:3), 130 μl , 1 PULVERIZAÇÃO

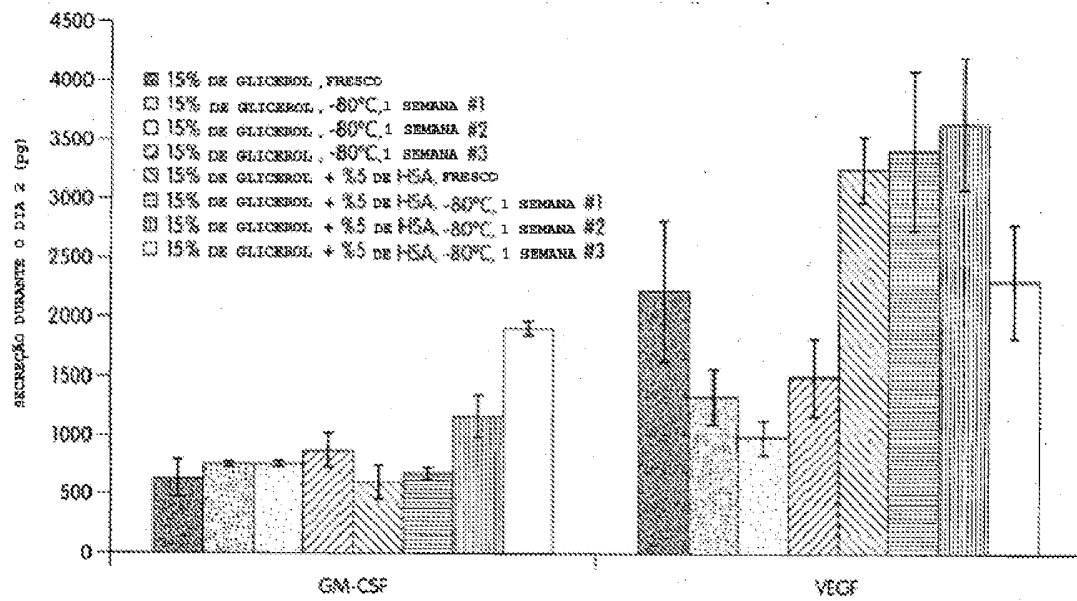


FIG. 10

**EFEITO DO ARMAZENAMENTO DE LONGA DURAÇÃO A -80°C SOBRE A
SECREÇÃO DE FACTOR DE CRESCIMENTO A PARTIR DE
QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS NUMA MATRIZ DE FIBRINA**

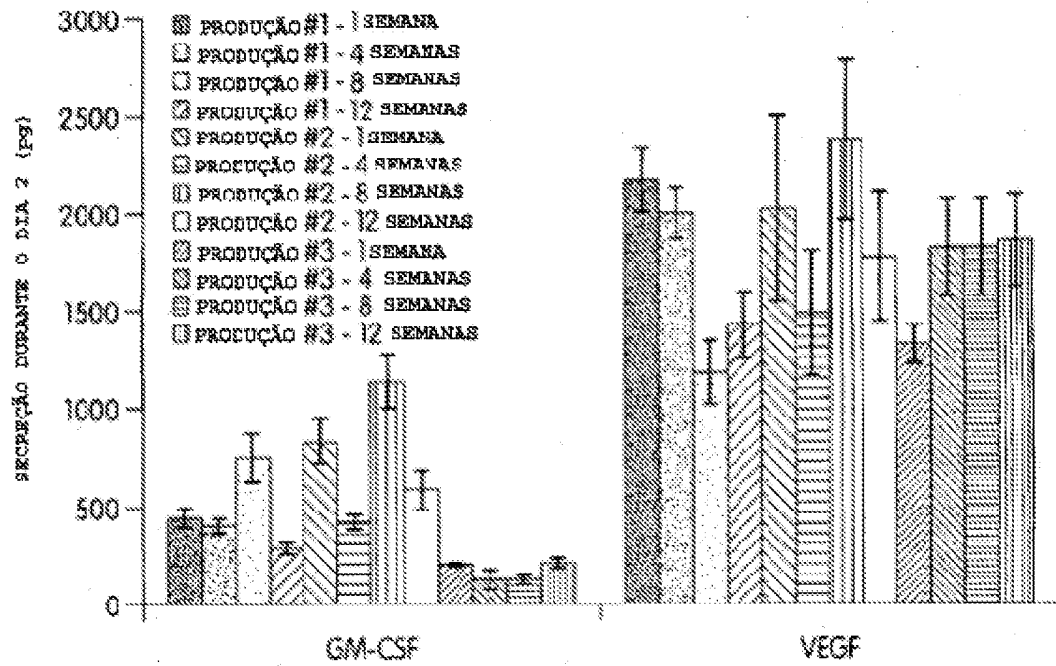


FIG. 11

SECREÇÃO POR PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DESCONGELADAS QUE FORAM CONGELADAS E ARMAZENADAS DURANTE 1 SEMANA A -80°C ; PROPORÇÕES ENTRE QUERATINÓCITOS: FIBROBLASTOS (1:0, 1:1 E 1:9), A 5, 10 E 20 MILHÕES DE CÉLULAS/ml, 1 PULVERIZAÇÃO (130 μl), 24 CAVIDADES (n=15)

