



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

(21) BR 102018016252-7 A2



(22) Data do Depósito: 08/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 03/03/2020

(54) **Título:** BLENDAS POLIMÉRICAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DA BLENDAS POLIMÉRICAS, USO DA BLENDAS POLIMÉRICAS

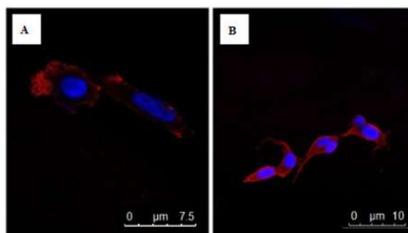
(51) **Int. Cl.:** A61K 9/16; A61K 31/00; A61K 31/765; C08C 19/06; C08F 2/06; (...).

(52) **CPC:** A61K 9/1647; A61K 31/00; A61K 31/765; C08C 19/06; C08F 2/06; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE.

(72) **Inventor(es):** NICOLE ANDRÉA CORBELLINI HENCKES; ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA; FERNANDA DOS SANTOS DE OLIVEIRA; LUIS ALBERTO LOUREIRO DOS SANTOS; NAYRIM BRIZUELA GUERRA; EDUARDO PANDOLFI PASSOS.

(57) **Resumo:** BLENDAS POLIMÉRICAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DA BLENDAS POLIMÉRICAS, USO DA BLENDAS POLIMÉRICAS A presente invenção descreve uma blenda polimérica compreendendo pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico e Poliisopreno epoxidado, a qual ao ser associada a células, frações celulares, fatores biologicamente ativos, aditivos ou fármacos, é utilizada na regeneração, reconstrução, aumento, substituição e/ou reparação de estruturas, órgãos e/ou tecidos. Mais especificamente, a presente invenção descreve uma blenda polimérica compreendendo Poli (ácido Lático-co-Glicólico) e poliisopreno epoxidado. A presente invenção se situa nos campos da Engenharia de tecidos, Farmácia e Medicina Regenerativa.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

BLENDA POLIMÉRICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DA BLENDA
POLIMÉRICA, USO DA BLENDA POLIMÉRICA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve uma blenda polimérica compreendendo pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico e Poliisopreno epoxidado, a qual ao ser associada a células, frações celulares, fatores biologicamente ativos, aditivos ou fármacos, é utilizada na regeneração, reconstrução, aumento, substituição e/ou reparação de estruturas, órgãos e/ou tecidos. Mais especificamente, a presente invenção descreve uma blenda polimérica compreendendo Poli (ácido Láctico-co-Glicólico) e poliisopreno epoxidado. A presente invenção se situa nos campos da Engenharia de tecidos, Farmácia e Medicina Regenerativa.

Antecedentes da Invenção

[0001] É conhecido pela técnica a engenharia de tecidos para reconstrução de órgãos e reparo de tecidos. A reconstrução vaginal em combinação à engenharia de tecidos tem apresentado resultados satisfatórios, porém, há uma escassez de informações sobre a reconstrução vaginal (Atala, Anthony, et al. U.S. Patent No. 7,806,937. 2010).

[0002] Em uma busca por novas matrizes (*scaffolds*) úteis na terapia celular, a fim de propor uma nova alternativa terapêutica a diversas enfermidades, Cima et al., (1991) realizaram uma pesquisa descrevendo novas matrizes para transplante de células utilizando polímeros bioreabsorvíveis. Foram utilizadas células de condrócitos, e estas foram cultivadas com o polímero que, por sua vez, foi implantado no paciente. Os implantes feitos de materiais reabsorvíveis são sugeridos para serem usados como substituições temporárias, em vez de substituições permanentes. O objetivo da substituição temporária é permitir que o processo de cicatrização substitua o material

reabsorvido.

[0003] Embora a aplicação de materiais existentes tenha desempenhado certo efeito terapêutico, sua atividade biológica, propriedades biomecânicas e o efeito terapêutico podem ser ainda melhorados (Atala, Anthony, and James J. Yoo. U.S. Patent No. 7,806,937. 2010).

[0004] O uso e desenvolvimento de novos *scaffolds* estão aumentando rapidamente e estes se tornam ilimitados quando destinados à medicina regenerativa (POKORSKI, et al., 2015). Assim dá-se a importância de criar um *scaffold* inovador o qual objetiva simular eventos moleculares que estejam envolvidos na produção, depuração e interação de moléculas a fim de regenerar e/ou reparar tecidos e órgãos (MARTINO, et al., 2012).

[0005] Diante da possibilidade de criar diferentes *scaffolds* frente à sua composição química, os metabolitos de degradação envolvidos nestes processos são determinados na maioria das vezes, como não tóxicos e podem ser eliminados pelo corpo. A maioria dos polímeros como, por exemplo, polímeros sintéticos, podem ser fabricados em larga escala, utilizando diferentes técnicas, e assim, as características como, resistência mecânica, taxa de degradação e microestrutura podem ser ajustadas durante a fabricação. A fabricação destas estruturas pode ser feita em diferentes formas a fim de facilitar a combinação com diferentes aditivos, a partir da sua modificação química. No entanto, é fundamental que os biomateriais (materiais utilizados em meio fisiológico) apresentem alguns requisitos abordados e regulamentados pela FDA (*Food and Drug Administration*, em inglês ou Administração de Alimentos e Remédios, em português), devendo resultar em citotoxicidade mínima, sensibilização, hemocompatibilidade, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (LAURENCE, et al., 2015).

[0006] Ainda, o biomaterial que é estruturalmente semelhante à matriz extracelular, biocompatível, e pode ser administrado de uma maneira minimamente invasiva (isto é, por implantação), pode ser utilizado. Assim, não

há limitações para que o número ou arranjo de substratos poliméricos sejam utilizados na formação de um biomaterial (GEROGE, et al., 2016).

[0007] O propósito de criar novos *scaffolds* é realizar uma modificação que permita uma mais adequada combinação com aditivos, células, entre outros. Modificar quimicamente a superfície é um método amplamente adotado, pois convêm melhorar a biofuncionalidade (cumprir a função desejada pelo tempo desejado), propriedades biológicas e biocompatibilidade da superfície do material. Em geral, os objetivos de modificar a superfície de biomateriais são superar adsorção de proteína não específica *in vivo*, desenvolver materiais com propriedades controladas e adaptadas para fármacos e células, e materiais biológicos que simulam processos naturais a fim de produzir padrões bem definidos para aplicabilidade na engenharia de tecidos (GEORGE, et al., 2016).

[0008] Estes aditivos utilizados em combinação a biomateriais, como por exemplo, células, não apenas respondem à composição química da matriz extracelular, mas também à estrutura superficial a qual é apresentada. Embora muitos biomateriais poliméricos e seus copolímeros tenham sido utilizados na tentativa de simular a matriz extracelular, suas características, no entanto, limitam seu uso para o crescimento celular. É desejável, em muitos casos, adaptar as superfícies dos biomateriais para que possam interagir favoravelmente com diferentes aditivos, para assim promover uma regeneração e/ou reparação de órgãos e tecidos (JIANWU, et al., 2016).

[0009] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0010] O documento PI 1100522, Marques, D.R. *et al.* revela um produto composto por dois polímeros, onde o poli(ácido Láctico-co-Glicólico) (PLGA) é combinado ao poliisopreno (PI) com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas do PLGA, conferindo-lhe assim maior capacidade de resistência a tensões antes da quebra. Além da variação das propriedades mecânicas, as propriedades de bioabsorção do material descrito por Marques, D.R. *et al.*

sofrerão alterações. Porém, mesmo com a mudança de concentrações dos polímeros presentes na blenda, sua resposta celular tende a ser favorável. A presente invenção difere do documento, entre outras razões técnicas, pelo poliisopreno a ser utilizado na blenda polimérica ser modificada quimicamente (epoxidação), conferindo características químicas e mecânicas superiores e bem diferenciada, como por exemplo, redução do número de ligações duplas e aumento da hidrofiliabilidade do Poliisopreno. O comportamento hidrofílico da blenda polimérica da presente invenção é um dos fatores relacionados ao maior potencial para combinação de diferentes tipos de linhagem celulares, e conseqüentemente possibilitou um maior crescimento celular quando comparado ao produto gerado no documento PI 1100522, Marques, D.R. *et al.*, como pode ser visto na figura 1, onde há a comparação do produto de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) combinado ao poliisopreno proposto pelo documento PI 1100522 e o produto da presente invenção.

[0011] O documento US7806937 B2 revela a utilização de dois polímeros bioabsorvíveis similares ao proposto na presente invenção, são eles: Poli(ácido láctico), PLA e Poli(ácido glicólico), PGA. Junto com seu copolímero Poli (ácido Láctico-co-Glicólico), PLGA, representaram um avanço no desenvolvimento de biomateriais para aplicações clínicas. Dependendo do processo de obtenção do biomaterial, a variação de parâmetros no processamento pode levar a diferentes tipos de estruturas, conforme a necessidade de cada linhagem celular. A presente invenção difere do documento, entre outras razões técnicas, uma vez que a blenda polimérica obtida apresenta características novas através da combinação do polímero sintético e bioabsorvível o PLGA e o Poliisopreno, principal componente polimérico do Látex da Borracha Natural, o qual é extraído das árvores *Hevea brasiliensis*. Como foi dito anteriormente, na presente invenção previamente à preparação da blenda, foi realizada uma modificação química na estrutura do poliisopreno característica esta que confere o principal diferencial em relação ao estado da técnica, além de acrescentar a hidrofiliabilidade da blenda polimérica proposta.

[0012] O documento US2011293685 A1 revela a utilização de diferentes fibras sintéticas que compreendem poliésteres alifáticos bioabsorvíveis representativos tais como Poli(ácido láctico) (PLA), Poli(ácido glicólico) (PGA), poli (D, L-láctido-co-glicólido) (PLGA), poli(caprolactona), poliéster alifático diol/diácido, poliéster-amida/poliéster-uretano, poli(valerolactona), poli(butirato de hidroxila), polibutileno tereftalato, poli-hidroxihexanoato, polibutileno succinato e poli(valerato de hidroxilo). A presente invenção também descreve o uso de um polimérico do tipo poliéster alifático e biodabsorvível, o PLGA. No entanto, a presente invenção, difere do documento, entre outras razões técnicas, pela propriedade hidrofílica exibida pela blenda do PLGA com o Poliisopreno epoxidado. Esta hidrofilicidade é produto da modificação química que é realizada no Poliisopreno. A capacidade hidrofílica presente na composição da invenção possibilita uma melhor associação com células, e, conseqüentemente, uma melhor interação no local onde será implantado o produto, a fim de restaurar órgão e tecidos.

[0013] Características e modificações nas superfícies, bem como na composição e estrutura de biomateriais são fundamentais para determinar o grau de interação, assim como a capacidade de reparo ou substituição de tecidos ou órgãos lesados. Para o uso de células cultivadas junto à engenharia de tecidos, não é apenas necessário que o biomaterial seja biocompatível e bioabsorvível, mas também é essencial que a superfície seja favorável à fixação e crescimento celular. Por conseguinte, é desejável poder ajustar as propriedades da superfície de acordo com a aplicação pretendida, sem alterar outras propriedades do biomaterial, tais como a sua resistência mecânica ou propriedades térmicas (Atala, Anthony. U.S. pedido de patente No. 10/258,771), ou ao menos não alterar estas de modo que prejudique sua utilização.

[0014] As propriedades mecânicas da matriz dependerão da massa molecular do polímero e do tipo/mistura do polímero, e também, no caso de material fibroso, da orientação das fibras, diâmetro e emaranhamento. A

estrutura do polímero também pode afetar suas propriedades mecânicas após o processo de fabricação. A blenda pode ser associada a células, e/ou tratada com aditivos ou fármacos antes da implantação (antes ou depois da blenda polimérica ser cultivada com células), por exemplo, para promover o reparo ou a formação de tecido novo após a implantação. Assim, fatores de crescimento, citocinas, componentes da matriz extracelular e outros materiais bioativos, que promovam uma resposta biológica, podem ser adicionados ao substrato para promover a cicatrização do enxerto e a formação de novos tecidos, por exemplo. Tais aditivos podem ser em geral selecionados de acordo com o tecido ou órgão que está sendo reconstruído, para incrementar o processo de formação do novo tecido (Atala, Anthony. U.S. Pedido de patente No. 11/083,853).

[0015] Alguns polímeros que já são utilizados na clínica médica como *scaffolds* possuem características limitantes, pois são difíceis de moldar e possuem capacidade hidrofóbica, o que resulta numa diminuição da adesão celular a sua superfície (Griffith-Cima, Linda, et al. U.S. Patente No. 5,709,854. 20 Jan. 1998).

[0016] A blenda polimérica também pode ser associada com células, ou com vários fatores e frações celulares, para auxiliar no reparo de tecidos de pacientes (Atala, Anthony. U.S. Pedido de patente No. 11/083,853).

[0017] Um dos problemas de saúde que acomete a população feminina (1:4.500) é a Síndrome de Mayer-Rokitansky Küster-Hauser (MRKH) (REZENDE, et al., 2013). A MRKH é caracterizada por agenesia completa ou parcial da vagina. Os tratamentos para estas pacientes hoje apresentam algumas limitações e trazem desconforto (NOGUEIRA, et al., 2007). Neste sentido, a oferta de alternativas terapêuticas mais eficientes e que minimizem os desconfortos das pacientes são necessários.

[0018] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e

atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0019] Resta claro que há uma necessidade no estado da técnica de alternativas terapêuticas para diversas enfermidades, como por exemplo, mas não se restringindo a este, Síndrome de Mayer-Rokitansky Küster-Hauser (MRKH), através de blendas poliméricas com características técnicas superiores, a fim de restaurar e/ou reparar órgãos e tecidos lesados, além de novas técnicas de processamento a fim de apresentar uma nova alternativa para tal aplicação.

Sumário da Invenção

[0002] Dessa forma, a presente invenção resolve os problemas constantes no estado da técnica a partir de uma blenda polimérica compreendendo pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico e Poliisopreno epoxidado, a qual ao ser associada a células, frações celulares, fatores biologicamente ativos, aditivos ou fármacos, é utilizada na regeneração, reconstrução, aumento, substituição e/ou reparação de estruturas, órgãos e/ou tecidos. Mais especificamente. A presente invenção se situa nos campos da Engenharia de tecidos, Farmácia e Medicina Regenerativa.

[0020] A presente invenção emprega métodos de engenharia de tecidos, envolvendo técnicas de cultura celular, tais como isolamento, obtenção, expansão e manutenção de células, associadas com biomatrizes (matriz de biomaterial) para implantação e reparo de tecidos *in vivo*. O desafio da obtenção do biomaterial para *scaffold* foi tornar a mistura dos polímeros (blenda) mais miscível e mais hidrofílico, com propriedades mecânicas adequadas permitindo uma resposta celular melhor do que os *scaffolds* que já existem no mercado. Esta característica que possibilitou uma maior interação com células é o principal diferencial, mas não se restringindo a este, da presente invenção.

[0021] A presente invenção apresenta como vantagens um aumento na qualidade do produto, sendo que uma das principais vantagens é um ambiente

satisfatório para a proliferação celular, facilidade de manuseio do biomaterial para aplicação de aditivos, bioabsorvível, hidrofílico, biocompatível, flexível, elástico e pode ser obtido em membranas finas, além de passível de ser processado pelos métodos de processamento de polímeros (injeção, fiação, colagem por solvente, eletrofiação, separação de fases induzida termicamente, entre outras).

[0022] Outra vantagem está relacionada ao fato do produto poder ser utilizado em diversos tratamentos que visam à recuperação ou restauração de órgãos e tecidos lesados, uma vez que este demonstrou, em estudos *in vitro*, ser capaz de suportar, por exemplo, a proliferação celular. Este produto possui aplicabilidade estendida a diversas enfermidades, como por exemplo, a redesignação sexual, Síndrome de Mayer-Rokitansky Küster-Hauser (MRKH), reestruturação ou construção de novas estruturas teciduais; o reparo de uretra, de peritônio, órgãos em geral, além de segmentos de órgãos; servindo também como curativo biológico, para tratamento de queimados ou feridas crônicas e agudas; além de poder ser utilizado para revestir diferentes órgãos e cavidades; podendo servir como suporte para liberação de medicamentos, nanopartículas ou substâncias bioativas; bem como este pode ser componente para a produção de órgãos artificiais ou próteses e órteses.

[0023] Em um primeiro objeto, a presente invenção descreve uma blenda polimérica compreendendo:

- pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico;
- Poliisopreno epoxidado.

[0024] Em um segundo objeto, a presente invenção descreve um processo de preparação da dita blenda polimérica compreendendo as seguintes etapas:

- (a) Purificação do Poliisopreno
- (b) Reação de epoxidação do poliisopreno obtido pela etapa (a)
- (c) Dissolução em solvente do Poliisopreno epoxidado e da etapa (b) e pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico.

[0025] Em um terceiro objeto, a presente invenção descreve o uso do dito biomaterial por ser na preparação de estrutura de base para restauração, reparação ou construção de órgãos, tecidos e parte destes, construção de um tecido humano *in vitro*, tratamento de enfermidades selecionadas do grupo consistindo de: redesignação sexual, Síndrome de Mayer-Rokitansky Küster-Hauser (MRKH), curativo biológico, suporte para liberação de medicamentos, nanopartículas ou substâncias bioativas, produção de órgãos artificiais ou próteses e órteses.

[0026] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0027] São apresentadas as seguintes figuras:

[0028] A figura 1 mostra um gráfico comparando o crescimento celular em diferentes produtos, biomateriais Cellprene® (PLGA/PI - poli(ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno), BioFill (composto de acetato de celulose, semipermeável e semitransparente) e Membracel® (membrana de celulose cristalina sintetizada pela bactéria *Acetobacter xylinum*, constituída de microfibrilas de celulose entrelaçadas entre si, com comprimentos indefinidos, textura fina e estrutura uniforme) com o produto obtido pela presente invenção, indicado como “Produto A”.

[0029] A figura 2 mostra a caracterização por coloração histológica de PAS: (A) morfologia celular HMV-II, (B) morfologia MSC, cultivadas na blenda polimérica PLGA/PI epoxidada, através de microscopia ótica (Nikon Eclipse TE2000-U, EUA). As setas indicam a ocorrência de produção de muco.

[0030] A figura 3 mostra a interação da blenda polimérica PLGA/PI epoxidada com a linhagem celular de mucosa vaginal HMV-II (A) e com a célula-tronco mesenquimal (B) por microscopia confocal (TCS SP5-Leica). Em vermelho segue a expressão de citoqueratina, e em azul o núcleo celular que

demonstra estar intacto.

[0031] A figura 4 mostra a microscopia eletrônica de varredura mostrando as células epiteliais, linhagem celular de mucosa vaginal HMV-II (A) e célula-tronco mesenquimal (B), no biomaterial PLGA/PI epoxidado. Pode-se visualizar a interação que está ocorrendo entre células e biomaterial.

[0032] A figura 5 mostra os dados de viabilidade celular do poliisopreno epoxidado e PLGA/PIepox aos diferentes tempos de ensaio, 24 e 72 horas.

Descrição Detalhada da Invenção

[0033] A presente invenção revela uma blenda polimérica composta por pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológicos, mais especificamente Poli (ácido Lático-co-Glicólico) e Poliisopreno epoxidado, a qual ao ser associada a células, aditivos ou fármacos, é utilizada na regeneração, reconstrução, aumento, substituição e/ou reparação de estruturas, órgãos e/ou tecidos.

[0034] A presente invenção emprega métodos de engenharia de tecidos, envolvendo técnicas básicas de cultura celular, tais como isolamento, obtenção, expansão e manutenção de células, associadas com biomatrizes para implantação e reparo de tecidos *in vivo*.

[0035] Em uma concretização, a reconstrução de órgãos reprodutivos femininos artificiais é um exemplo da aplicação da nova tecnologia apresentada. Para tanto, testes *in vitro* foram realizados. Inicialmente, foi comparada a eficácia de associação de diferentes biomateriais com células, tais como: BioFill, Cellprene®, Membracel (figura 1). Estes experimentos foram realizados com a linhagem celular, obtida de melanoma maligno vaginal humano (HMV II). Os resultados demonstraram que as células interagiram melhor com o produto da presente invenção, Produto A. Com isto, esta combinação, Produto A com células, gerou o Produto A-Célula, que foi adotado para os experimentos seguintes. Na sequência, mostramos que o Produto A pode ser associado com mais de um tipo celular. Neste caso, mostramos que o

Produto A pode também ser associado com células-tronco mesenquimais, obtidas de amostras de tecido adiposo humano. Ainda, foi possível demonstrar que esta associação não é tóxica para as células, permitindo que estas sigam mantendo seu ritmo de multiplicação celular, mantendo a expressão de proteínas estruturais típicas, bem como a expressão e secreção de proteínas específicas foi mantida pelas células associadas ao Produto A e que compõem o Produto A-Célula.

[0036] Em um primeiro objeto, a presente invenção descreve uma blenda polimérica compreendendo:

- pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico;
- Poliisopreno epoxidado.

Em uma concretização da blenda polimérica, o polímero absorvível em meio fisiológico e poliisopreno epoxidado estão em uma proporção de 3:2.

[0037] Em uma concretização da blenda polimérica, o polímero absorvível em meio fisiológico selecionado do grupo consistindo em poli(α -hidróxi ácidos), como o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), e seus copolímeros. Além do poli(etileno glicol) (PEG), polihidroxibutirato (PHB) e dos cianocrilatos. O polímero absorvível em meio fisiológico pode ser de origem natural tais como ácido hialurônico, fibroína da seda, alginato, quitosana, colágeno, celulosa entre outros.

[0038] Em uma concretização, polímero absorvível em meio fisiológico é o Poli (ácido Láctico-co-Glicólico).

[0039] Em uma concretização, a blenda polimérica possui elemento de associação aderido em sua estrutura, em que o elemento de associação é selecionado do grupo consistindo de: aditivos, células, frações celulares, fatores biologicamente ativos e fármacos.

[0040] Em uma concretização, as células são células epiteliais, mais especificamente, mas não restrita a, selecionadas do grupo consistindo de células-tronco mesenquimais e células de mucosa vaginal HMV-II.

[0041] Em uma concretização, o elemento de associação está em uma

quantidade entre 2×10^4 a 2×10^6 cm^{-2} da blenda polimérica.

[0042] Em uma concretização, o elemento de associação está em uma quantidade de 2×10^5 cm^{-2} do biomaterial.

[0043] Em um segundo objeto, a presente invenção descreve um processo de preparação da dita blenda polimérica compreendendo as seguintes etapas:

(a) Purificação do Poliisopreno

(b) Reação de epoxidação do poliisopreno obtido pela etapa (a)

(c) Dissolução em solvente do Poliisopreno epoxidado e da etapa (b) e pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico.

[0044] Em uma concretização do processo, compreende a etapa (d) adesão do elemento de associação a estrutura da blenda polimérica; em que o elemento de associação é selecionado do grupo consistindo de: aditivos, células, frações celulares, fatores biologicamente ativos e fármacos.

[0045] Em um terceiro objeto, a presente invenção descreve o uso do dito biomaterial por ser na preparação de estrutura de base para restauração, reparação ou construção de órgãos, tecidos e parte destes, construção de um tecido humano *in vitro*, tratamento de enfermidades selecionadas do grupo consistindo de: redesignação sexual, Síndrome de Mayer-Rokitansky Küster-Hauser (MRKH), curativo biológico, suporte para liberação de medicamentos, nanopartículas ou substâncias bioativas, produção de órgãos artificiais ou próteses e órteses.

[0046] O termo “biomaterial”, “matriz biocompatível”, “polímero biocompatível”, referem-se a um material apropriado para a implantação *in vivo*, em que aditivos possam ser agregados. Um material biocompatível não causa efeitos tóxicos ou prejudiciais locais ou sistêmicos, e apresenta uma superfície que pode ser moldada no órgão desejado que requeira a substituição. Este biomaterial serve de suporte aos aditivos.

[0047] O termo “polímero absorvível em meio fisiológico” tal como aqui utilizado refere-se a materiais poliméricos que após certo período de tempo em

contato com fluidos corpóreos e tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo, gerando produtos não tóxicos. Dentre os polímeros sintéticos absorvíveis mais utilizados, destacam-se os poli(α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e seus copolímeros, como o Poli (ácido Láctico-co-Glicólico). Existem também outros polímeros que não pertencem à família dos poliésteres, mas são considerados como polímeros absorvíveis tais como poli(etileno glicol) (PEG), polihidroxibutirato (PHB) e os cianoacrilato. Podem-se citar alguns polímeros naturais absorvíveis como ácido hialurônico, alginato, quitosana, colágeno, celulosa entre outros.

[0048] Os termos "expandir" e "expansão", tal como aqui utilizados, referem-se à manutenção nutritiva de células e, que resulta no crescimento celular, isto é, ao aumento de uma população de células.

[0049] O termo "células-tronco mesenquimais", tal como aqui utilizado, refere-se às células aderentes, com fenótipo fibroblastóide e que realizam divisão assimétrica, o que caracteriza as células-tronco mesenquimais, conferindo a típica plasticidade a estas. Assim, as células-tronco mesenquimais podem dar origem a um ou mais tipos celulares, oriundos do mesoderma, bem como a tipos celulares que não sejam originários do mesoderma embrionário (por exemplo, células neurais), dependendo dos fatores bioativos e condições de cultura, utilizados para o processo de indução de diferenciação destas.

[0050] O termo "linhagem celular", tal como aqui utilizado, refere-se a um tipo de célula, que é neoplásica, oriundas de uma única célula, transformada por agentes químicos, físicos ou genéticos, que resultam em células que tem o controle de replicação celular diminuído ou abolido, diminuição da expressão de moléculas e receptores de matriz extracelular, e alteração de expressão de alguma proteína específica, resultando em um grupo de células idênticas entre si e que podem ser expandidas indefinidamente e denominadas de células neoplásicas.

[0051] A expressão "células aderentes", tal como aqui utilizada, refere-se a uma população homogênea ou heterogênea de células que dependem da ancoragem, isto é, requerem ligação a uma superfície para serem expandidas e mantidas vivas.

[0052] O termo "substrato", tal como aqui utilizado, refere-se a um biomaterial ou matriz 3D, sobre o qual as células podem ser cultivadas (isto é, sobreviver e, de preferência, proliferar durante um período de tempo).

[0053] O termo "aditivo", tal como aqui utilizado, refere-se aos elementos, que podem ser associados com a blenda polimérica epoxidada, tais como células, fatores bioativos ou frações celulares.

[0054] A invenção descrita no presente relatório é o fruto da associação da blenda polimérica de Poli (ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno epoxidado com diferentes aditivos, que é aqui denominado Produto A. O Produto A receberá aqui diferentes denominações, quando combinado com diferentes aditivos, conforme descritos a seguir:

[0055] Produto A-Célula é o produto da associação da blenda polimérica de Poli (ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno epoxidado com células;

[0056] Produto A-Fator é o produto da associação da blenda polimérica de Poli (ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno epoxidado com fatores bioativos;

[0057] Produto A-Fração é o produto da associação da blenda polimérica de Poli (ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno epoxidado com frações celulares;

[0058] Produto A-Nano é o produto da associação do da blenda polimérica de Poli (ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno epoxidado com fatores bioativos ou frações celulares associados na forma de nanopartículas.

[0059] O termo "*scaffolds*", tal como aqui utilizado refere-se a uma estrutura de base ou suporte adequado para hospedar componentes biológicos ou químicos, assegurando sua permanência no local da lesão e auxiliando a sua restauração.

[0060] O termo “enfermidades”, tal como aqui utilizado refere-se as demais patologias ocorrentes em seres humanos, nas quais pode ser aplicada a presente invenção.

[0061] A presente invenção apresenta como vantagens um aumento na qualidade do produto, sendo que uma das principais vantagens é um ambiente satisfatório para a proliferação celular, facilidade de manuseio do biomaterial para aplicação de aditivos, bioabsorvível, hidrofílico, biocompatível, flexível, elástico e pode ser obtido em membranas finas, além de passível de ser processado pelos métodos de processamento de polímeros (injeção, fiação, colagem por solvente, eletrofiação, separação de fases induzida termicamente, entre outras).

[0062] Outra vantagem está relacionada ao fato do produto poder ser utilizado em diversos tratamentos que visam a recuperação ou restauração de órgãos e tecidos lesados, uma vez que este demonstrou, em estudos *in vitro*, ser capaz de suportar, por exemplo, a proliferação celular. Este produto possui aplicabilidade estendida a diversas enfermidades, como por exemplo, a redesignação sexual, Síndrome de Mayer-Rokitansky Küster-Hauser (MRKH), reestruturação ou construção de novas estruturas teciduais; o reparo de uretra, de peritônio, órgãos em geral, além de segmentos de órgãos; servindo também como curativo biológico, para tratamento de queimados ou feridas crônicas e agudas; além de poder ser utilizado para revestir diferentes órgãos e cavidades; podendo servir como suporte para liberação de medicamentos, nanopartículas ou substâncias bioativas; bem como este pode ser componente para a produção de órgãos artificiais ou próteses e órteses.

Exemplo 1. Concretizações

[0063] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Polímero Biocompatível

[0064] Em um aspecto da invenção, a criação ou reconstrução artificial de órgãos ou tecidos, é realizada junto a uma estrutura de suporte tal como uma estrutura polimérica, uma matriz biocompatível.

Estrutura do Polímero

[0065] A blenda polimérica foi obtida a partir do Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) PLGA e Poliisopreno PI epoxidado. O PLGA (Purac Biomaterials – Holand) é um copolímero sintético apresentando 85 mol% de comonômero L-láctido e 15 mol% de comonômero glicólico. Com pH 7,2, o material foi utilizado como recebido, sem necessidade de purificação. O PI, procedente do Látex (MAFER– Brasil), foi submetido à secagem completa em estufa a 40°C por 24 horas. Foi aplicado, um processo de purificação por reprecipitação, usando clorofórmio (CHCl₃) (Synth – Brazil) como solvente, com solução precipitada em álcool metílico (CH₃OH) (Synth – Brazil). Após a precipitação, o PI foi dissolvido novamente em clorofórmio e depois da dissolução total foram adicionados volumes de surfactante, polietilenoglicol-sorbitan-monolaurato (Tween 20) (Sigma–Brasil) e o volume de ácido fórmico (Dinâmica–Brasil), mantendo agitação da solução. Logo depois de atingir a temperatura da reação 60 C°, começou-se gotejamento lento do peróxido de hidrogênio (Vetec–Brasil). Ao final da reação a solução da borracha foi neutralizada com solução de Hidróxido de Amônio (Sigma–Brasil). A fase orgânica foi separada da fase aquosa, e foram realizados vários lavados com água destilada para remover os resíduos decorrentes da neutralização e o peróxido de hidrogênio. Após a fase orgânica foi precipitada em metanol e a borracha epoxidada foi colocada em estufa a 40°C por 24 horas. Para obter a blenda polimérica, o PLGA e o Poliisopreno epoxidado (PI epoxidado) seco foram dissolvidos em clorofórmio com uma proporção mássica de 60:40 (PLGA/PI epoxidado), sendo a blenda nomeada nesta invenção como Produto A.

Cultivo celular

[0066] A engenharia de tecidos combinada ao cultivo de células pode

oferecer uma solução para os casos desafiadores onde existe uma falta de uma estrutura de tecido ou a necessidade de suporte para o reparo de órgãos e tecidos. A criação bem sucedida de órgãos pré-fabricados em laboratório a partir da combinação de *scaffolds* com aditivos podem resultar em desenvolvimento funcional normal (Atala, Anthony, et al., U.S. Patent No. 7,806,937. 2010). A eficácia do produto apresentado aqui pode ser demonstrada em ensaios que comprovaram a eficácia da combinação da blenda polimérica de PLGA e Poliisopreno epoxidada com diferentes tipos celulares, para compor o Produto A, que está sendo proposto para tratar, inicialmente, pacientes acometidas pela síndrome MRKH.

Tipos celulares

[0067] Para obtenção do Produto A-Célula é preciso combinar células epiteliais ao biomaterial de PLGA e Poliisopreno epoxidado. Desta forma, foram utilizadas células-tronco mesenquimais e células de mucosa vaginal HMV-II. Assim, para suportar o crescimento celular, as células-tronco mesenquimais (MSC) foram cultivadas na presença do meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, USA), e a linhagem celular de mucosa vaginal HMV-II na presença de meio de cultivo RPMI Medium 1640 (GIBCO, USA). Estes meios são soluções que permitem a sobrevivência celular. Estes são compostos por, por exemplo, sais, açúcares, aminoácidos e minerais nas concentrações apropriadas. Ambos meios de cultura são suplementados com antibiótico 1% Penicilina/Estreptomicina (GIBCO, USA), fatores de crescimento, aminoácidos específicos (por exemplo, L-glutamin). Será considerado o meio de cultura suplementado com 20% (DMEM) e 10% (RPMI) de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO USA). Para manutenção das culturas de células, estas foram mantidas em estufas à 37°C, com umidade e atmosfera contendo 5% de CO₂. Trocas de meio ocorreram a cada 48 horas até que as células atingissem confluência adequada. Células com confluência de 80-90% foram subdivididas em novos frascos de cultura, com o uso de solução de tripsina e EDTA, ou então estas foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

Isolamento e expansão das MSC

[0068] As células aderentes derivadas do tecido adiposo, como é o caso das células-tronco mesenquimais, utilizadas na presente invenção, podem ser isoladas por uma variedade de métodos conhecidos. O tecido adiposo pode ser derivado de diversos locais, e em humanos, é tipicamente obtido por lipoaspiração. Com a finalidade de recuperar órgãos e tecidos a partir a combinação de biomaterial e células, estes podem ser criados usando populações de células homólogas, derivadas do próprio doador. Assim, como também, as células utilizadas para a criação do órgão ou tecido artificial podem ser heterólogas, onde as populações de células são derivadas de outro indivíduo, que não o doador. É importante recriar, em cultura, o microambiente celular encontrado *in vivo* para o tecido particular que está sendo produzido. A utilização de uma matriz similar à estrutura de tecido *in vivo*, compõe um dos requisitos para a criação do ambiente ideal, para que ocorram interações célula-célula, desenvolvimento e diferenciação de populações celulares mimetizando o microambiente encontrado *in vivo* (Atala, Anthony. U.S. Pedido de Patente No. 11/083,853).

[0069] Para obtenção das células-tronco mesenquimais, utilizadas nos experimentos para os ensaios de estabelecimento do Produto A, amostras de tecido adiposo humano, obtidas por lipoaspiração de pacientes doadores, foram submetidas à digestão enzimática com uma solução de meio RPMI-1640 (Life Technologies, DE) contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) e 300 u/mL de colagenase do tipo I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As células obtidas foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle médium - DMEM (Life Technologies, DE) com 10% de SFB em estufa com temperatura e umidade controladas (37°C, 5% CO₂). Para confirmar que as células obtidas dos lipoaspirados eram células-tronco mesenquimais, ensaios de indução de diferenciação *in vitro* foram realizados utilizando meios de indução de diferenciação celular, segundo as normas da *Internacional Society for Cell Transplantation*, que preconiza que as MSC devem ser capazes de se

diferenciar em, obrigatoriamente, duas das três linhagens osteócito, adipócito e condrócito.

[0070] A natureza mesenquimal das células obtidas das amostras de lipoaspirados foi confirmada através dos ensaios de indução de diferenciação destas para osteócitos e adipócitos, conforme técnicas descritas a seguir. Para diferenciação das células em osteócitos, adicionou-se 10 Mm β - glicerolfosfato, 10^{-8} M de dexametasona e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico fosfatado ao meio de cultura e a detecção da diferenciação realizou-se por coloração com Alizarin Red S, que cora os depósitos de cálcio, presentes na matriz extracelular dos osteócitos. Para diferenciação em adipócitos, adicionou-se ao meio de cultivo 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulina, 5 μM Indometacina, 5 μM rosiglitazona dissolvido em DMSO e 10^{-7} M de dexametasona. A coloração foi feita com *Oil Red*, que cora os vacúolos com depósitos de gordura, tipicamente encontrados nos adipócitos. Para dar prosseguimento aos experimentos desta invenção, as células-tronco mesenquimais foram descongeladas e expandidas para a realização dos ensaios.

[0071] Condições de associação da blenda polimérica compreendendo PLGA e Poliisopreno epoxidado com células.

[0072] Para testar a concentração ideal de células por centímetro quadrado de blenda polimérica compreendendo PLGA e Poliisopreno epoxidado, foram testadas as seguintes concentrações: 2×10^4 ; 2×10^5 e 2×10^6 células por centímetro quadrado do biomaterial, sendo que a concentração intermediária mostrou ser a mais adequada. Além disso, foi verificado o melhor tempo de cultivo entre o biomaterial e as células, para definir as condições ótimas de cultivo antes da realização dos transplantes. Neste sentido, foram avaliadas culturas que foram mantidas por 48 e 72 horas. As culturas mantidas nos dois intervalos de tempo mostraram-se satisfatórias, sendo que foi encontrada uma maior concentração de células no tempo de 72 horas. Visto que o tempo de cultivo reduzido é mais desejável para a translação, adotamos o tempo de cultivo de 48 horas. Em paralelo a isto, verificou-se, se a hidratação

prévia da blenda polimérica compreendendo PLGA e Poliisopreno epoxidado, aumentaria ou não o crescimento celular. A hidratação ocorreu por meio da imersão do biomaterial em PBS (*phosphate buffered saline*), em um tempo mínimo de 24 horas antes da realização do cultivo celular. Nesta análise, foi possível demonstrar que a hidratação prévia do biomaterial, oferece uma melhor condição para o crescimento celular. Assim ficou determinado que as condições ideais para a construção do Produto A-Célula são 2×10^5 células por centímetro quadrado de blenda polimérica compreendendo PLGA e Poliisopreno epoxidado, pré-hidratado e cultivado por 48h antes do transplante ou congelamento.

Análises de imunocitoquímica e de ultraestrutura

[0073] Sabendo-se que ambos os tipos celulares são de natureza epitelial, para tanto, utilizamos a ferramenta de Imunofluorescência para melhor visualizar a estrutura de interação que ocorre entre *scaffold* e células. Esta análise ocorreu após as células estarem aderidas a blenda polimérica compreendendo PLGA e Poliisopreno epoxidado, seguido por uma fixação com paraformaldeído 4% (Medquímica, Brasil), durante 10 minutos. Na sequência as amostras de biomaterial com célula-tronco mesenquimal e biomaterial com a linhagem HMV II, foram submetidas ao bloqueio com 3% de albumina de soro bovino (BSA; Fisher, EUA), e em seguida as amostras foram incubadas com anticorpo primário anti-pan citoqueratina (1:50, AE1 /AE3 - ABCAM) overnight a 4°C. Após percorrido o tempo de incubação, o material com as células aderidas, foi lavado com PBS-TWEEN e incubadas com anticorpo secundário IgG conjugado anti-rabbit PE-Cys (1: 4000, Santa Cruz). No dia seguinte passaram por um processo de lavagem, onde estas foram realizadas 3 vezes utilizando PBS -TWEEN, e então, foi adicionado a solução de DAPI (Sigma, EUA) a fim de contra-corar as células aderidas ao *scaffold*. Para a realização da leitura das lâminas, foi utilizado microscópio confocal (TCS SP5, Leica) (figura 3). Em continuidade às análises, foi realizada avaliação por microscopia eletrônica de varredura (figura 4), com a finalidade de realizar uma avaliação

ultra estrutural da interação que estava ocorrendo entre blenda polimérica compreendendo PLGA e Poliisopreno epoxidado com as células. As amostras da blenda polimérica compreendendo PLGA e Poliisopreno epoxidado contendo ambos os tipos celulares (HMV-II e MSC) foram fixadas em 4% paraformaldeído (Medquímica, Brasil) durante 4 horas, seguido pela desidratação com etanol na seguinte sequência: 60%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% por 10 minutos cada. As amostras foram submetidas ao processo de secagem à temperatura ambiente e analisadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 6060).

[0074] Em uma análise adicional, foi realizada análise histológica das amostras de biomaterial com as células (HMV-II e MSC) (figura 2), a fim de evidenciar que ambas estavam conseguindo realizar a produção de muco, características destes tipos celulares, que garante proteção e lubrificação dos tecidos. Ambas as células (HMV-II e MSC), que estavam aderidas a blenda polimérica compreendendo PLGA e Poliisopreno epoxidado, foram coradas com PAS (Periodic acid-Schiff) e contra coradas com hematoxilina, a fim de detectar a secreção celular e presença de elementos de matriz extracelular. Na sequência as amostras foram lavadas em água destilada, fixadas em paraformaldeído a 1% (Medquímica, Brasil), tratadas com 0,5% de ácido periódico solução durante 5 minutos e lavadas com água. As células foram então coradas com reagente PAS durante 15 minutos, e na sequência, lavaram-se as amostras com água destilada durante 10 minutos, e na sequência, foram contra coradas com hematoxilina por 1 minuto. Após percorrido este tempo, as amostras foram lavadas com água destilada por 5 minutos, e então montaram-se as lâminas para serem analisadas em microscopia óptica (Nikon Eclipse TE2000-U, EUA).

Exemplo 2

[0075] A resistência à tração foi determinada a fim de avaliar as propriedades mecânicas da blenda polimérica (Tabela 1). Os valores de tensão

máxima para a blenda epoxidada foram aproximadamente 50% inferiores aos da PLGA/PI, porém a deformação obtida até atingir este valor foi 10 vezes superior no PLGA/PIepox. O que indica uma maior propagação da deformação máxima aparece em materiais com propriedades uniformes, como, por exemplo, homogeneidade de distribuição de componentes da blenda e distribuição de regiões cristalinas. Os valores obtidos para o PLGA/PIepox não são do nível dos ossos humanos, mas poderia ter utilização em outras zonas do corpo, como, por exemplo, para substituição de pele, cartilagem, músculos.

Tabela 1: Propriedades mecânicas de tração do PLGA/PI e da blenda PLGA/PIepox.

Propriedades	PLGA/PI	PLGA/PIepox
Tensão máxima (MPa)	7,65	3,6 ± 0,2
Deformação na tensão máxima (%)	7,20	71,85 ± 6,90
Módulo de Young (MPa)	137,8	2,97 ± 0,45

Exemplo 3

[0076] A citotoxicidade indireta das membranas obtidas de Poliisopreno epoxidado e PLGA/PIepox para células de hepatocarcinoma humano (HepG2) foi avaliada utilizando ensaio MTT. Este método é derivado da capacidade de células viáveis para reduzir o sal de tetrazólio de MTT em formazan que é então monitorizado colorimetricamente. Os dados de viabilidade celular aos diferentes tempos do ensaio, 24 e 72 horas (figura 5). Nem o Poliisopreno epoxidado nem a blenda apresentaram efeito citotóxico para as células HepG2 nos tempos de ensaio. O formazan desenvolvido no ensaio é diretamente proporcional ao número de células ativas mitocondrialmente, portanto, um aumento da viabilidade celular no tempo, se traduz em um aumento da atividade metabólica o qual é um resultado favorável em relação à biocompatibilidade, a qual foi mantida entre 67,1 e 106,6 % para os dias de incubação.

[0077] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Blenda polimérica **caracterizada por** compreender:

- pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico; e
- poliisopreno epoxidado.

2. Blenda polimérica de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** polímero absorvível em meio fisiológico e poliisopreno epoxidado estarem em uma proporção de 3:2.

3. Blenda polimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado pelo** polímero absorvível em meio fisiológico ser Poli (ácido Láctico-co-Glicólico).

4. Blenda polimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada por** possuir elemento de associação aderido em sua estrutura, em que o elemento de associação é selecionado do grupo consistindo de: aditivos, células, frações celulares, fatores biologicamente ativos e fármacos.

5. Processo de preparação da blenda polimérica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

(a) Purificação do Poliisopreno

(b) Reação de epoxidação do poliisopreno obtido pela etapa (a)

(c) Dissolução em solvente de Poliisopreno epoxidado da etapa (b) e pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico.

6. Processo de preparação da blenda polimérica conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** por compreender adicionalmente a etapa (d) adesão do elemento de associação à estrutura da blenda polimérica; em que o elemento de associação é selecionado do grupo consistindo de: aditivos, células, frações celulares, fatores biologicamente ativos e fármacos.

7. Uso da blenda polimérica conforme definida em qualquer uma das

reivindicações 1 a 4, **caracterizado** por ser na preparação de estrutura de base para restauração, reparação ou construção de órgãos, tecidos e parte destes, construção de um tecido humano *in vitro*, tratamento de enfermidades selecionadas do grupo consistindo de: redesignação sexual, Síndrome de Mayer-Rokitansky Küster-Hauser (MRKH), curativo biológico, suporte para liberação de medicamentos, nanopartículas ou substâncias bioativas, produção de órgãos artificiais ou próteses e órteses.

FIGURAS

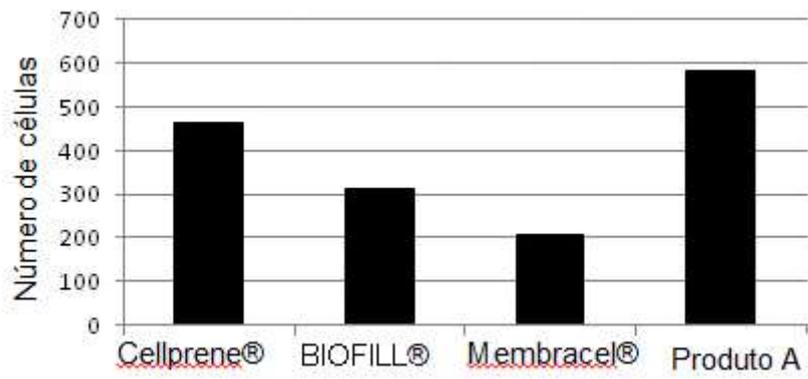


Figura 1

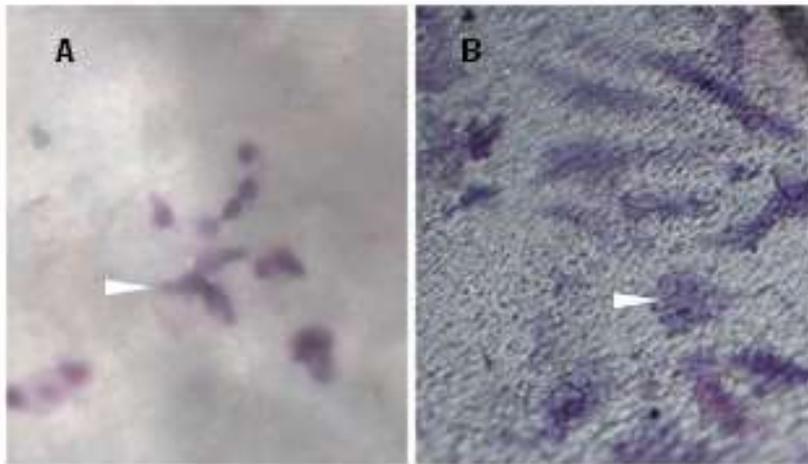


Figura 2

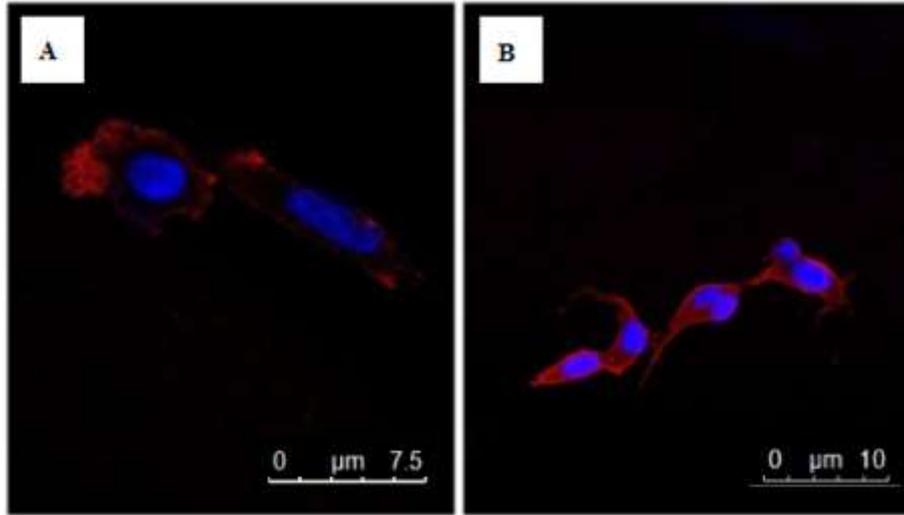


Figura 3

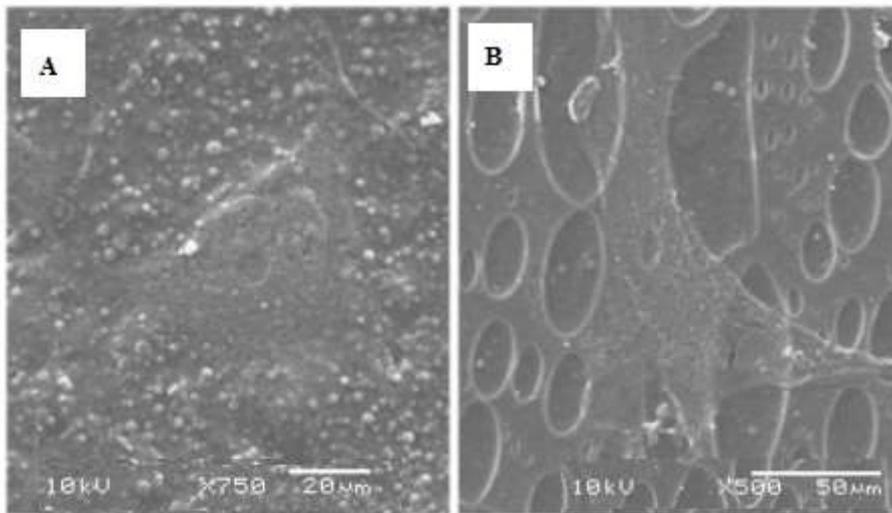


Figura 4

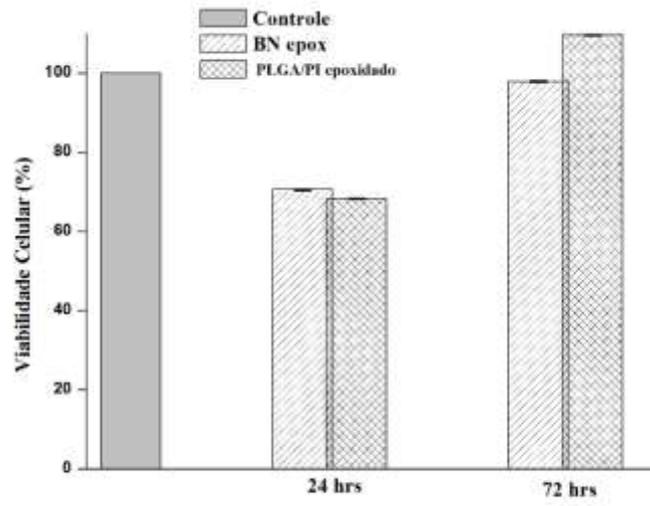


Figura 5

Resumo**BLENDA POLIMÉRICA, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DA BLENDA
POLIMÉRICA, USO DA BLENDA POLIMÉRICA**

A presente invenção descreve uma blenda polimérica compreendendo pelo menos um polímero absorvível em meio fisiológico e Poliisopreno epoxidado, a qual ao ser associada a células, frações celulares, fatores biologicamente ativos, aditivos ou fármacos, é utilizada na regeneração, reconstrução, aumento, substituição e/ou reparação de estruturas, órgãos e/ou tecidos. Mais especificamente, a presente invenção descreve uma blenda polimérica compreendendo. Poli (ácido Láctico-co-Glicólico) e poliisopreno epoxidado. A presente invenção se situa nos campos da Engenharia de tecidos, Farmácia e Medicina Regenerativa.