



(51) Int Cl⁵:
C09J 189/00

(11) (21) **PI 9103724 A**

(22) Data de Depósito: 29/08/91

(43) Data de Publicação: **30/03/93** (RPI 1165)

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo
Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(54) Título: Cola de fibrina derivada de veneno de cobra e processo para sua preparação

(71) Depositante(s): Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP (BR/SP)

(72) Inventor(es): Fábio Cardoso Iuan; Izoete Aparecida Thomazini; Maria José Soares Mendes Giannini; Elaine Toscano; Fausto Viterbo de Oliveira Neto; Rosângela Aparecida Moraes; Benedito Barraviera

(57) Resumo: A presente invenção trata de um produto

denominado cola de fibrina, de grande eficácia, utilizada em várias indicações na área médica, bem como de um processo para sua preparação. A cola de fibrina derivada de veneno de cobra, segundo a presente invenção compreende uma SOLUÇÃO I e uma SOLUÇÃO II, consistindo a SOLUÇÃO I de uma fração de veneno de cobra liofilizado, diluída em água bidestilada até atingir concentração entre 80-80 microgramas/ml, sendo para cada parte desta diluição adicionados vinte partes de uma solução de um sal de cálcio a 400 microgramas/ml e, consistindo a SOLUÇÃO II em um crioprecipitado obtido a partir de plasma fresco congelado a -20°C, o qual deve conter, em média, 150-250mg de fibrogênio, 80-120 unidades do fator VIII, 20-30% do fator XIII, 40-70 unidades do fator "von Willibrand" e de 50-80mg de fibronectina.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção: "COLA DE FIBRINA DERIVADA DE VENENO DE COBRA E PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO".

A presente invenção trata de um produto denominado cola de fibrina, de grande eficácia, utilizada em várias indicações na área médica, bem como de um processo para sua preparação.

A cola de fibrina, também denominada cola biológica, é composta tradicionalmente pela trombina bovina e pela solução de fibrinogênio humano purificado. A trombina é extraída do plasma de bovinos e o fibrinogênio de um "pool" de plasma humano. O fenômeno da aderência ocorre quando a molécula de trombina atuando sobre determinada área da molécula de fibrinogênio, acaba por clivar esta última formando uma rede de fibrina. Esta rede de fibrina devidamente estabilizada tem a capacidade de aderir partes que foram colocadas previamente em contato.

A cola de fibrina existente atualmente no mercado, é produzida com a utilização de trombina bovina e solução de fibrinogênio purificada. Esta última é obtida a partir de um "pool" de plasma humano e estabilizada com drogas anti-fibrinolíticas na presença de cloreto de cálcio. Essa cola é comercializada na forma de um "kit" composto de dois frascos separados onde contém, respectivamente, os dois componentes. A preparação é realizada no momento da utilização, aplicando-se, no local escolhido, a solução de fibrinogênio e, posteriormente sobre esta, coloca-se a solução de trombina. A reação química que ocorre demora, em

9103724

média, três minutos e ela se estabilizará quando a rede de fibrina estiver formada. Esta rede é que fará a aderência entre as estruturas escolhidas.

Esta cola de fibrina existente, ver
5 ficamos, apresenta um alto custo de produção, em al
guns casos apresenta rejeição imunológica, riscos de
aquisição de doenças transmissíveis, além de baixa efi
cácia terapêutica.

Assim, torna-se o principal objetivo
10 da presente invenção prover uma cola de fibrina que
não apresente os inconvenientes acima citados.

Um outro objetivo da presente inven
ção é prover uma cola de fibrina com outras aplicações
na área médica.

15 Estes e outros objetivos são alcança
dos com a cola de fibrina segundo a presente invenção,
a qual apresenta como principal característica inovado
ra, a substituição da trombina bovina por uma fração
purificada de veneno de cobra. Além disso, a solução
20 de fibrinogênio purificada é substituída por um compo
nente hemoterápico humano denominado crioprecipitado,
extraído do próprio paciente.

A cola de fibrina objeto da presente
invenção compreende duas soluções básicas, conforme
25 abaixo:

- SOLUÇÃO I - consiste de fração de veneno de cobra
liofilizado, diluído em água bidestilada, até atin
gir concentração variando entre 80 e 90 microgra
mas/ml, preferencialmente, em torno de 85 microgra
30 mas/ml, sendo para cada parte desta adicionadas vin
te partes de uma solução de um sal de cálcio a 400
microgramas/ml. Prefere-se como sal de cálcio, o clo
reto de cálcio.
- SOLUÇÃO II - consiste em um crioprecipitado, obtido
35 a partir do plasma fresco congelado a -20°C, do san
gue do próprio paciente, contendo em média 150-250mg

910372

de fibrinogênio, 80-120 unidades de fator VIII, 20-30% do fator XIII do plasma, 40-70 unidades de fator "von Willibrand" e de 50-60mg de fibronectina.

O processo de preparação da cola de fibrina derivada de veneno de cobra, de acordo com a presente invenção, compreende as seguintes etapas:

a - Isolamento e caracterização da fração de veneno de cobra:

. Cerca de 250mg de veneno de cobra é dissolvido em tampão adequado e mantido em geladeira a 4°C. A amostra é centrifugada previamente por 10 minutos a 13.000g e o sobrenadante aplicado em coluna de Sephadex 075 (70 x 2cm). A coluna é previamente calibrada com uma mistura de substâncias de diferentes pesos moleculares. As frações são coletadas e avaliadas em espectrofotômetro a 280nm. A atividade tipo "trombina" do veneno é avaliada e realizado "pool" das frações com esta característica. Ao "pool" é adicionado tampão Tris-HCL 500mM e NaCl 2.65M, pH 9.0. A solução final contém 50mM de Tris, 400mM de NaCl e 18mM de glicina em pH 9.0. Essa solução é, a seguir, aplicada em coluna de afinidade constituída de Sepharose 6B-benzamidina equilibrada com tampão Tris-HCL 50mM e NaCl 400mM, pH 9.0. A fração tipo "trombina" do veneno é eluída em tampão Tris 50mM, NaCl 250mM e benzamidina 150mM a pH 9.0. São realizados "pool" das frações, contendo a mais alta atividade e, a seguir, dializados e concentrados.

Após isolamento da fração, esta é analisada quanto à sua concentração proteica e submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Após a corrida eletroforética, os géis são corados para presença de proteínas e glicoproteínas. Também é realiza

9103724

da avaliação por "imunoblot", empregando soro antiveneno. São ensaiadas também as atividades esterolíticas, proteolíticas e de fosfolipase da fração obtida.

5 b - Obtenção da SOLUÇÃO I:

10 . 180 microgramas da fração de veneno de cobra liofilizado, obtido conforme descrição anterior, foi diluído em dois mililitros de água bidestilada, apresentando uma concentração de 85 microgramas/ml sendo que essa concentração pode variar entre 80 e 90 microgramas/ml. Solução de sal de cálcio, 400 micromoles/ml foi preparada. Para
15 composição da SOLUÇÃO I prepara-se uma parte da fração de veneno de cobra para vinte partes de solução de um sal de cálcio a 400 micromoles/ml, sendo, de preferência, o sal, o cloreto de cálcio. Essa solução tem como finalidade facilitar a formação da rede de fibrina, que tem por objetivo final, fazer a aderência entre as partes
20 colhidas.

c - Obtenção da SOLUÇÃO II (crioprecipitado):

25 . O crioprecipitado é um produto obtido a partir de plasma fresco congelado a -20°C. Para sua obtenção é necessário proceder um descongelamento lento. Nesse sentido, toma-se o plasma fresco congelado a -20°C e descongela-se lentamente a 4°C. Quando o plasma fresco atingir a temperatura de 4°C, submete-se a uma centrifugação refrigerada a fim de precipitar alguns fatores de coagulação, entre eles o fibrinogênio. O sobrenadante é retirado para outro recipiente e o precipitado, onde se encontra o fibrinogênio, é congelado a -20°C para estocagem. Esta SOLUÇÃO II é
30 obtida a partir de sangue do próprio paciente que será submetido ao produto (cola de fibrina), o que evita o risco da transmissão de doenças in

9103724

fecciosas e possíveis rejeições imunológicas.

A cola de fibrina derivada de veneno de cobra, objeto da presente invenção, apresenta diversas indicações na área médica. Assim é que ela pode ser utilizada como hemostático durante o ato cirúrgico, com finalidade de estancar hemorragias; na reparação de nervos periféricos e tendões musculares rotos; como coadjuvante na cicatrização de úlceras de córnea e enxertos de pele; e por fim, no fechamento de fístulas linquóricas e pulmonares.

A apresentação da cola de fibrina constará de dois frascos, sendo que um deles conterá a SOLUÇÃO I e, o outro, a SOLUÇÃO II. A cola deverá ser preparada no momento da utilização. Após escolhida a área a ser colada, deve-se aplicar sobre esta a SOLUÇÃO II, denominada crioprecipitado. A seguir, adiciona-se sobre a área onde se aplicou a SOLUÇÃO II, a SOLUÇÃO I, denominada fração de veneno de cobra mais cloreto de cálcio, mantendo-se a proporção de uma parte para uma parte (1:1). Após a aplicação das duas soluções, mantém-se o local sob pressão por três minutos, ocorrendo por fim a aderência das mesmas.

REIVINDICAÇÕES

1 - COLA DE FIBRINA DERIVADA DE VENE
NO DE COBRA, caracterizada por compreender uma SOLUÇÃO
I e uma SOLUÇÃO II, consistindo a SOLUÇÃO I de uma fra
5 ção de veneno de cobra liofilizado, diluída em água bi
destilada até atingir concentração entre 80-90 micro
gramas/ml, sendo para cada parte desta diluição adicio
nados vinte partes de uma solução de um sal de cálcio
a 400 microgramas/ml e, consistindo a SOLUÇÃO II em um
10 crioprecipitado obtido a partir de plasma fresco conge
lado a -20°C, o qual deve conter, em média, 150-250mg
de fibrogênio, 80-120 unidades do fator VIII, 20-30%
do fator XIII, 40-70 unidades do fator "von Willibrand"
e de 50-60mg de fibronectina.

15 2 - COLA DE FIBRINA DERIVADA DE VENE
NO DE COBRA, de acordo com a reivindicação 1, caracte
rizada por ser a concentração da diluição do veneno de
cobra liofilizado em torno de 85 microgramas/ml.

3 - COLA DE FIBRINA DERIVADA DE VENE
20 NO DE COBRA, de acordo com a reivindicação 1, caracte
rizada por ser o sal de cálcio, o cloreto de cálcio.

4 - PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COLA DE
FIBRINA DERIVADA DE VENENO DE COBRA, conforme reivindi
cação 1, caracterizado por compreender as seguintes e
25 tapas:

- a - Isolamento e caracterização da fração de veneno de cobra;
- b - diluição deste veneno de cobra em água bidestilada até atingir concentrações variando entre 80-90 mi
30 crogramas/ml;

9103724

- c - preparação de solução a 400 micromoles/ml de sal de cálcio;
- d - mistura de uma parte da diluição da "etapa b" em vinte partes da solução da "etapa c" (SOLUÇÃO I);
- 5 e - descongelamento lento de plasma fresco congelado a -20°C até atingir 4°C;
- f - centrifugação refrigerada do plasma fresco a 4°C; e
- g - separação e precipitação do sobrenadante (SOLUÇÃO II).

9103724

RESUMO

Patente de Invenção: "COLA DE FIBRINA DERIVADA DE VENE
NO DE COBRA E PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO".

A presente invenção trata de um produ
5 to denominado cola de fibrina, de grande eficácia, uti
lizada em várias indicações na área médica, bem como
de um processo para sua preparação.

A cola de fibrina derivada de veneno
de cobra, segundo a presente invenção compreende uma
10 SOLUÇÃO I e uma SOLUÇÃO II, consistindo a SOLUÇÃO I de
uma fração de veneno de cobra liofilizado, diluída em
água bidestilada até atingir concentração entre 80-90
microgramas/ml, sendo para cada parte desta diluição
adicionados vinte partes de uma solução de um sal de
15 cálcio a 400 microgramas/ml e, consistindo a SOLUÇÃO
II em um crioprecipitado obtido a partir de plasma
fresco congelado a -20°C, o qual deve conter, em média,
150-250mg de fibrogênio, 80-120 unidades do fator VIII,
20-30% do fator XIII, 40-70 unidades do fator "von
20 Willibrand" e de 50-60mg de fibronectina.