



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014011436-0 A2

(22) Data do Depósito: 12/05/2014

(43) Data da Publicação: 23/02/2016

(RPI 2355)



(54) **Título:** SELANTE DE FIBRINA PARA USO TÓPICO, MÉTODO DE FORMAÇÃO DO MESMO E SEU USO

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/58; A61P 7/04

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** RUI SEABRA FERREIRA JUNIOR, BENEDITO BARRAVIEIRA, SILVIA REGINA SARTORI BARRAVIEIRA

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** Resumo SELANTE DE FIBRINA PARA USO TÓPICO, MÉTODO DE FORMAÇÃO DO MESMO E SEU USO A presente invenção descreve um selante de fibrina, o qual compreende uma serinoprotease extraída a partir de veneno de serpente, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos e o diluente cloreto de cálcio. A invenção ainda ensina o método de formação do selante, cujos componentes são providos separadamente e polimerizam-se in situ após mistura, bem como seu uso. O selante de fibrina descrito apresenta inúmeras aplicações médicas tópicas e não há o risco de transmitir doenças infecciosas.

**SELANTE DE FIBRINA PARA USO TÓPICO, MÉTODO DE FORMAÇÃO DO  
MESMO E SEU USO**

**Campo da invenção:**

[1] A presente invenção se insere no campo médico, mais precisamente no que diz respeito à reparação tecidual, e descreve um selante de fibrina.

[2] O selante de fibrina ora descrito compreende uma serinoprotease, a qual é extraída a partir do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos e o diluente cloreto de cálcio.

[3] A invenção ainda ensina o método de formação do selante, cujos componentes são providos separadamente e polimerizam-se *in situ* após a mistura, bem como seu uso.

[4] O selante de fibrina descrito apresenta inúmeras aplicações médicas tópicas e não há o risco de transmitir doenças infecciosas.

**Fundamentos da invenção:**

[5] A tentativa de utilizar agentes hemostáticos e adesivos tópicos em procedimentos cirúrgicos e em feridas crônicas é prática comum há muitos anos.

[6] Assim, a busca por uma substância adesiva com excelente efeito hemostático e que proporcionasse aderência firme entre os tecidos, além de não alterar o processo de reparação tecidual e não desencadear efeitos colaterais e ação carcinogênica é uma constante.

[7] As primeiras pesquisas datam da Segunda Guerra Mundial, quando foi proposta pela primeira vez a cola de fibrina. Naquela época, utilizavam-se o fibrinogênio e a trombina humanos, os quais eram misturados no local de aplicação durante o procedimento.

[8] Por volta de 1940, avaliou-se uma cola produzida a partir de plasma enriquecido com fibrinogênio heterólogo. Em 1944, utilizou-se plasma enriquecido com fibrinogênio

homólogo. Estes experimentos não tiveram sucesso.

[9] Em 1970, voltou-se a reavaliar a proposta da cola de fibrina e, nessa época, já se conheciam os princípios básicos de extração do crioprecipitado, um composto rico em fibrinogênio e fator XIII, bem como outros fatores de coagulação.

[10] Além disso, a purificação da trombina proveniente do sangue de animais também já estava padronizada. Assim, a proposta deste novo adesivo era misturar o crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de seres humanos com trombina bovina.

[11] Posteriormente, com o conhecimento da transmissão de doenças infecciosas por intermédio de produtos derivados do sangue humano, verificou-se a transmissão dos vírus das hepatites pelo adesivo e, em 1978, o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) suspendeu a comercialização deste em território americano, vindo a ser liberado apenas em 1998.

[12] Hoje se comercializa um produto extraído a partir de plasma e fatores de coagulação humanos acrescido ou não de agente antifibrinolítico. Este produto é indicado para procedimentos cirúrgicos como cirurgias cardiovasculares, pulmonares, abdominais e neurológicas, além de curativos tópicos para feridas crônicas.

[13] A partir dos anos 90, estudos para padronizar um novo tipo de selante foram iniciados. O selante deveria ser de procedência animal, evitando-se assim, a transmissão das doenças infecciosas veiculadas pelo sangue humano.

[14] Sendo assim, esta invenção propõe um selante de fibrina, o qual mimetiza a etapa final da cascata da coagulação.

[15] Para tal fim, utiliza-se um crioprecipitado rico em fibrinogênio de origem animal e uma enzima trombina símile, também conhecida como serinoprotease (SPase),

extraída do veneno de uma serpente.

[16] O crioprecipitado consiste na fração insolúvel, precipitada a frio, do plasma fresco congelado. Contém fibrinogênio, fator VIII (F VIII), fator de von Willebrand (F vW), fator XIII (F XIII) e fibronectina. As principais indicações do crioprecipitado são para repor fibrinogênio em pacientes com hemorragias e déficits isolados congênitos ou adquiridos de fibrinogênio, repor fibrinogênio em pacientes em coagulação intravascular disseminada e com graves hipofibrinogenemias, repor fatores XIII e de von Willebrand quando não se dispuser do concentrado industrial e, por fim, compor a fórmula do selante de fibrina autólogo ou heterólogo para uso tópico.

[17] As SPases atuam sobre o sistema hemostático, clivando a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina. Na presença do cálcio, estas se polimerizam e adquirem uma capacidade selante e adesiva pela formação de um coágulo estável.

[18] A partir do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* é extraído e processado a fração de interesse de acordo com a dosagem proteica, seguido de liofilização.

[19] Posteriormente, o veneno é submetido às técnicas de fracionamento por intermédio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e, por fim, é avaliada a pureza da serinoprotease de interesse por técnicas de sequenciamento e espectrometria de massas, a fim de se obter uma serinoprotease pura, segura e isenta de substâncias indesejáveis para o organismo humano.

[20] A composição do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* é complexa e constituída de enzimas, toxinas e peptídeos.

[21] O fracionamento em coluna de resina revela as enzimas 5-nucleotidases, fosfodiesterases, enzima tipo trombina, l-aminoxidases, enzimas com atividade calicreina

tecidual e hidrolase do NAD.

[22] As demais frações presentes são: crotamina, crotapotina, fosfolipase A2, convulxina e giroxina. Esta última pertence ao grupo das enzimas trombina símile e, também, a um grupo maior de enzimas serinoproteases, que se caracterizam por apresentar um sítio catalítico comum por meio de um mecanismo que envolve um aminoácido ativo serina altamente reativo e presente na posição 195.

[23] No seu sítio ativo, existe uma tríade catalítica semelhante aquela presente na tripsina, a qual é formada pelo agrupamento dos aminoácidos Ser 195, His 57 e Asp 102.

[24] A modelagem teórica da serinoprotease de *Crotalus durissus terrificus* é mostrada na Figura 1. A estrutura globular monomérica apresenta duas estruturas alfa-hélice (em vermelho), contendo os resíduos 146-152 e 215-227; duas estruturas  $\beta$ -barris formada por seis folhas antiparalelas (em amarelo) e loops (em verde); cinco pontes dissulfeto (em azul) e a tríade catalítica (em laranja).

[25] Esta molécula é uma proteína de cadeia única, com massa molecular estimada em 34 kDa. A sua estabilidade depende do pH, sendo máxima no pH 8,0. Possui atividade máxima em pH 4.0.

[26] Não é alterada por congelamento e descongelamento ou tratamento térmico a 40 °C durante 15 minutos. Devido a sua atividade enzimática semelhante à trombina, atua sobre o fibrinogênio humano e animal clivando a cadeia alfa próxima ao N-terminal.

[27] Os monômeros de fibrina resultantes polimerizam-se em uma rede intensa e estável, que difere da produzida tradicionalmente pela trombina.

[28] Como aplicação médica, o selante ora proposto não apresenta risco de transmissão de doenças infecciosas. No âmbito da mutagenicidade, por sua vez, os testes realizados indicaram ausência de atividade mutagênica.

**Estado da técnica:**

[29] Documentos disponíveis no estado da técnica descrevem diferentes selantes de fibrina, os quais são utilizados em procedimentos cirúrgicos e feridas crônicas.

[30] No documento EP 0.592.242 B1, faz-se referência a uma composição de fibrina compreendendo qualquer forma de monômero de fibrina que possa ser convertida em polímero. Ainda, o monômero não deve se polimerizar por pelo menos 1,5 minutos após o preparo da composição.

[31] O documento europeu EP 2.010.238 A2 descreve um selante de fibrina, cujo objetivo é acelerar o processo de regeneração tecidual. A composição líquida compreende monômeros ou polímeros de fibrina, um agente ligante de fibrinogênio e um material a base de poliglicosamina.

[32] No documento US5739288A descreve diferentes composições de selantes de fibrina. Mais especificamente, a invenção relaciona-se com a utilização de um selante de fibrina, no qual uma composição que compreende monômero de fibrina ou de fibrina não reticulada utilizado como agentes homeostáticos.

[33] Nenhum dos documentos citados propõe um selante de fibrina tal como o descrito na presente invenção. Ainda, o selante de fibrina descrito apresenta inúmeras aplicações médicas e não há o risco de transmitir doenças infecciosas.

**Breve descrição da invenção:**

[34] Esta invenção descreve um selante de fibrina, o qual compreende uma serinoprotease extraída a partir do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos e o diluente cloreto de cálcio.

[35] A invenção ainda ensina o método de formação do selante e seu uso, no qual os componentes são providos separadamente e polimerizam-se *in situ* após mistura, sendo aplicados sobre a ferida cutânea proporcionando uma ação

adjuvante na sua cicatrização.

**Breve descrição das figuras:**

[36] A Figura 1 representa a estrutura teórica da serinoprotease proveniente do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

[37] A Figura 2 mostra o selante de fibrina aplicado topicamente sobre uma úlcera dérmica crônica.

**Descrição detalhada da invenção:**

[38] Esta invenção descreve um selante de fibrina, o qual compreende uma serinoprotease, um crioprecipitado rico em fibrinogênio e um diluente, na proporção para utilização tópica de 0,4:1:0,6. O selante é formado *in situ*, pela polimerização dos três componentes após mistura.

[39] Além disso, a invenção ensina a formação do selante. Os três componentes são providos individualmente, em frascos separados, e congelados a -20 °C até o seu uso. Os frascos deverão ser retirados do freezer e mantidos a temperatura ambiente (entre 15 e 25 °C) durante 10 a 20 minutos para descongelamento.

[40] A serinoprotease é extraída a partir do veneno de uma serpente e está presente em uma concentração que varia entre 4,3 e 5,3 mg/mL. Em uma modalidade preferida da invenção, a serpente é a *Crotalus durissus terrificus*.

[41] O crioprecipitado é extraído do sangue (plasma) de grandes animais, preferencialmente bubalinos.

[42] O crioprecipitado desta invenção compreende:

- fibrinogênio em concentração entre 0,7 e 1,4 dg/mL;
- fator V em concentração entre 70 e 200 UI/dL;
- fator VIII em concentração entre 100 e 700 UI/dL; e
- fator de von Willebrand em concentração entre 50 e 500 UI/dL.

[43] O diluente utilizado é o cloreto de cálcio em concentração entre 20 e 30 mM, preferencialmente 25 mM.

[44] O conteúdo do diluente é injetado no frasco

contendo a serinoprotease, agitado e reservado em seguida.

[45] Com outra seringa e agulha, todo o conteúdo do crioprecipitado é aspirado e, concomitantemente, realiza-se a aplicação tópica com as duas seringas em paralelo e biseis dirigidos para o local de interesse.

[46] Segundos depois, observa-se a formação de um coágulo translúcido, que corresponde ao selante de fibrina (vide figura 2).

[47] O selante de fibrina pode ser desnaturado após contato com soluções contendo álcool, iodo ou metais pesados (tais como uma solução antisséptica). Logo, estas devem ser removidas antes da aplicação do produto.

#### Crioprecipitado:

[48] Para assegurar de que o crioprecipitado é seguro e isento de qualquer substância estranha ou indesejável ao organismo humano, faz-se necessário selecionar e certificar a sanidade dos animais doadores.

[49] Logo, o manejo sanitário (vacinas e vermifugação, testes sorológicos diagnósticos e de tuberculinização, além de exames clínicos) deve ser realizado com frequência.

[50] Após extraído, o crioprecipitado foi analisado por eletroforese bidimensional (2D), ferramenta responsável por isolar e identificar proteínas por meio das suas massas moleculares e pontos isoelétricos em gel de poliacrilamida.

[51] O perfil protéico do crioprecipitado extraído de bubalinos apresenta as diferentes formas de fibrinogênio, proteína responsável pela formação do coágulo estável de fibrina.

[52] Existem três classes de fibrinogênio denominadas fibrinogênio de cadeia beta, de cadeia alfa e formas parciais do fibrinogênio de cadeia alfa, totalizando 40 diferentes formas da molécula.

#### Toxicologia e mutagenicidade:

[53] Para analisar a viabilidade do selante de fibrina



da invenção, foram realizados testes de toxicidade, bem como testes de mutagenicidade.

- Toxicologia:

[54] Para analisar a toxicologia do selante de fibrina desta invenção, foram realizados os testes de determinação da DL<sub>50</sub> oral em ratos com a serinoprotease e determinação da sensibilidade dérmica em cobaias com a serinoprotease e o crioprecipitado.

[55] Para ambos os experimentos realizados, não houve sensibilização a levar ao quadro de choque nos animais experimentados.

- Mutagenicidade:

[56] Para avaliar a mutagenicidade do selante aqui descrito, foi realizado o teste de AMES *et al.*, que utiliza linhagens de *Salmonella typhimurium* capazes de detectar produtos químicos que causam mutações gênicas por deslocamento do quadro de leitura ou por substituição dos pares de base de DNA.

[57] Para isto, foram usadas linhagens de *Salmonella* deficientes em histidina, além de mutações que aumentam a sensibilidade em detectar mutágenos, tais como mutação rfa, deleção uvrB e plasmídio pkM101.

[58] Os resultados mostraram que a frequência normal de mutações reversas, típica da linhagem de *Salmonella*, não sofreu alterações quando em presença da serinoprotease, nem em presença do crioprecipitado, um indicativo de que os componentes do selante de fibrina não apresentam atividade mutagênica.

[59] Os resultados obtidos mostram que o selante de fibrina da presente invenção é seguro e eficaz, favorece sobremaneira a hemostasia, tem bom desempenho como adesivo, é biocompatível e bioabsorvível, é menos alergênico que a sutura convencional e não altera a reparação tecidual, bem como não ocasionou eventos adversos decorrentes do uso, nem

toxicidade local ou sistêmica.

## REIVINDICAÇÕES

1. Selante de fibrina para uso tópico **caracterizado** por compreender uma serinoprotease, um crioprecipitado rico em fibrinogênio e um diluente, na proporção de 0,4:1:0,6.

2. Selante de fibrina, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a serinoprotease ser extraída a partir do veneno de uma serpente e estar presente em uma concentração que varia entre 4,3 e 5,3 mg/mL.

3. Selante de fibrina, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato da serpente ser a *Crotalus durissus terrificus*.

4. Selante de fibrina, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o crioprecipitado ser extraído do sangue de grandes animais, preferencialmente bubalinos.

5. Selante de fibrina, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de o crioprecipitado compreender:

- fibrinogênio em concentração entre 0,7 e 1,4 dg/mL;
- fator V em concentração entre 70 e 200 UI/dL;
- fator VIII em concentração entre 100 e 700 UI/dL; e
- fator de von Willebrand em concentração entre 50 e 500 UI/dL.

6. Selante de fibrina, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o diluente ser o cloreto de cálcio em concentração entre 20 e 30 mM, preferencialmente 25 mM.

7. Selante de fibrina, de acordo com as reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de os componentes serem providos individualmente e polimerizarem-se *in situ* após mistura.

8. Método de formação do selante de fibrina conforme definido nas reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por compreender as etapas de:

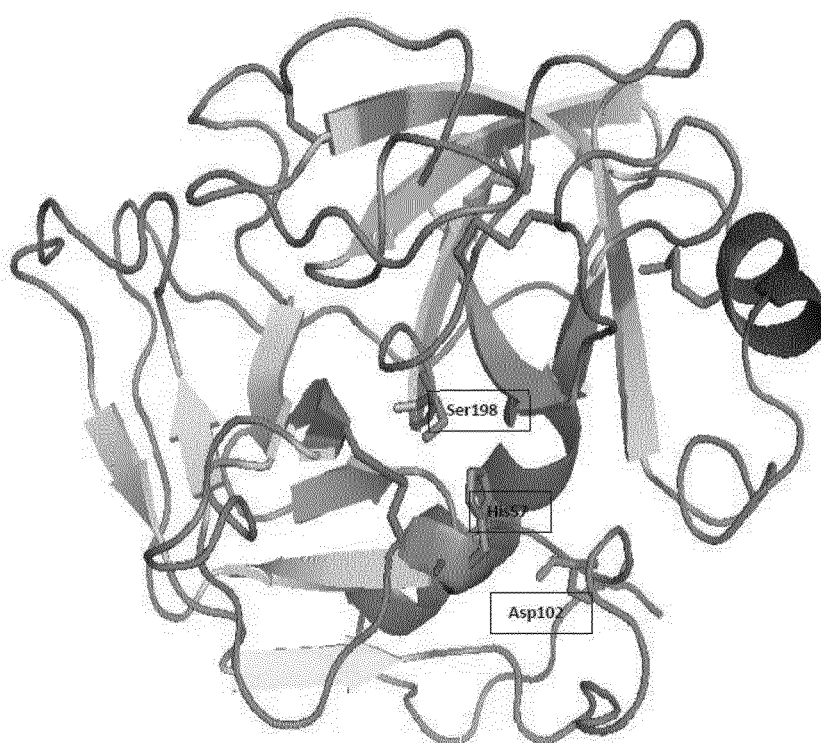
a) descongelamento dos componentes em temperatura entre 15 e 25 °C durante 10 a 20 minutos;

b) injeção do diluente na serinoprotease, seguida de agitação e reserva;

c) aplicação concomitante e em paralelo da mistura de diluente e serinoprotease com o crioprecipitado; e

d) formação do coágulo translúcido.

9. Uso do selante de fibrina conforme definido nas reivindicações 1 a 7, **caracterizado** por ser no preparo de um coágulo translúcido para ser aplicado topicamente em lesões em necessidade de reparação tecidual.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**

Resumo**SELANTE DE FIBRINA PARA USO TÓPICO, MÉTODO DE FORMAÇÃO DO  
MESMO E SEU USO**

A presente invenção descreve um selante de fibrina, o qual compreende uma serinoprotease extraída a partir de veneno de serpente, um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos e o diluente cloreto de cálcio. A invenção ainda ensina o método de formação do selante, cujos componentes são providos separadamente e polimerizam-se *in situ* após mistura, bem como seu uso. O selante de fibrina descrito apresenta inúmeras aplicações médicas tópicas e não há o risco de transmitir doenças infecciosas.