

(11) Número de Publicação: **PT 1803417 E**

(51) Classificação Internacional:
A61F 2/02 (2007.10) **A61K 38/39** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.06.21**

(30) Prioridade(s): **2001.07.17 US 908464**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.07.04**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.11.26**
254/2008

(73) Titular(es):

BAXTER INTERNATIONAL, INC
ONE BAXTER PARKWAY, DEERFIELD ILLINOIS
60015 **US**

BAXTER HEALTHCARE SA **CH**

(72) Inventor(es):

ZHEN QIAN **US**

EDWARD A. OSAWA **US**

CARY J. REICH **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES HEMOSTÁTICAS SECAS E PROCESSOS PARA A SUA
PREPARAÇÃO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Composições hemostáticas secas e processos para a sua preparação"

Antecedentes do invento

Campo do invento

O presente invento refere-se genericamente a composições de colagénio e derivadas de colagénio e a processos para a sua preparação. Em particular, o presente invento refere-se a um processo para a produção de gelatina reticulada seca ou outra composição de colagénio ou derivada de colagénio que seja capaz de absorver água a uma taxa incrementada.

A empresa Fusion Medical Technologies, Inc., cessionária do presente pedido, produz uma composição hemostática sob a designação comercial de FloSeal®. O produto FloSeal® encontra-se disponível numa embalagem contendo duas seringas. A primeira seringa está cheia com grânulos de gelatina de bovino reticulada, os quais são pré-hidratados com uma solução tampão. O hidrogel gelatinoso contém cerca de 85% (p/p) de água e encontra-se na forma de um hidrogel fluido. Imediatamente antes da utilização na sala de operações, a trombina em solução salina aquosa é misturada com o hidrogel gelatinoso. A trombina é preparada na solução salina e transferida para a segunda seringa, e as seringas encontram-se ligadas entre si permitindo a mistura da trombina com a gelatina.

Tem sido determinado que a mistura resultante dos grânulos de hidrogel gelatinoso com a trombina é um selante hemostático altamente eficaz quando aplicada a um local de hemorragia. Tipicamente, o selante será aplicado ao local de hemorragia através da seringa na qual foi misturado. O sangue fluirá através do leito de grânulos de hidrogel resultante, e a trombina irá reagir com o fibrinogénio do sangue para formar um coágulo fibrinoso à volta da gelatina para selar o local da hemorragia.

Apesar de altamente eficaz, o produto FloSeal[®] presente tem uma validade limitada. Crê-se que a estabilidade da gelatina é reduzida por hidrólise do hidrogel embalado. Para limitar qualquer degradação hidrolítica possível, o produto FloSeal[®] é geralmente expedido numa embalagem protegida relativamente à temperatura.

Por estas razões, seria desejável proporcionar composições selantes hemostáticas melhoradas do tipo que combina um colagénio, uma gelatina, ou outro hidrogel derivado de colagénio com uma solução aquosa contendo trombina. Em particular, seria desejável proporcionar tais composições numa forma que fosse resistente à degradação hidrolítica e as quais tivessem, portanto, uma validade mais prolongada. Seria particularmente desejável proporcionar composições melhoradas tendo tanto uma actividade hemostática comparável ao presente produto FloSeal[®] como também validades mais prolongadas. Tais composições seriam muito benéficas se pudessem ser rapidamente re-hidratadas para utilização subsequente, tipicamente de modo a que pudessem ser extrudidas através de uma seringa. Pelo menos alguns destes objectivos serão alcançados pelos inventos abaixo descritos.

Descrição da arte antecedente

O produto FloSeal[®] disponível através da Fusion Medical Technologies, Inc., é descrito em Hood *et al.*, *Efficacy of Topical Hemostat FloSeal[™] in Vascular Surgery*, um Resumo patrocinado pela Fusion Medical Technologies, Inc., o qual foi publicamente apresentado em Setembro de 1999. As Patentes que protegem o produto FloSeal[®] incluem as Patentes US N.ºs 6063061 e 6066325. Um sistema de duas seringas adequado para a mistura e administração de um colagénio, uma gelatina, ou outro componente derivado de colagénio com um componente de trombina do produto FloSeal[®] encontra-se descrito na Patente US N.º 5908054.

Breve resumo do invento

O presente invento proporciona composições selantes hemostáticas melhoradas, processos para a preparação de tais composições melhoradas, e conjuntos compreendendo as

composições melhoradas. Os processos e composições serão particularmente úteis para proporcionar hemostase em locais de hemorragia, incluindo locais de hemorragia cirúrgica, locais de hemorragia traumática e similares. Um exemplo da utilização das composições pode ser na selagem do tracto de tecido acima da penetração de um vaso sanguíneo criado para cateterização vascular.

As composições compreendem um pó gelatinoso reticulado seco o qual foi preparado para re-hidratar rapidamente. O pó gelatinoso compreende preferivelmente partículas relativamente grandes, também referidas como fragmentos ou subunidades, conforme descrito nas Patentes US N.^{os} 6063061 e 6066325. Um tamanho da partícula preferido encontrar-se-á na gama de 150 μm a 750 μm , mas tamanhos de partícula fora desta gama preferida podem encontrar utilização em muitas circunstâncias. As composições secas evidenciarão também uma "dilatação de equilíbrio" significativa quando expostas a um meio de re-hidratação aquoso. Preferivelmente, a dilatação encontrar-se-á na gama de 400% a 1000%, mas pode cair fora desta gama conforme apresentado nas patentes acima referenciadas. A "dilatação de equilíbrio" pode ser determinada subtraindo o peso seco do pó de hidrogel gelatinoso ao seu peso quando completamente hidratado e desta forma completamente dilatado. A diferença é então dividida pelo peso seco e multiplicada por 100 para dar a medida da dilatação. O peso seco deve ser medido após exposição do material a uma temperatura elevada durante um tempo suficiente para remover substancialmente qualquer humidade residual, por exemplo, duas horas a 120°C. A hidratação de equilíbrio do material pode ser alcançada imergindo o material seco num meio de re-hidratação adequado, tal como uma solução salina aquosa, durante um período de tempo suficiente para o teor de água se tornar constante, tipicamente durante 18 a 24 horas à temperatura ambiente.

Os pós gelatinosos reticulados secos do presente invento irão geralmente ter alguma humidade residual, mas estarão suficientemente secos para alcançar a estabilidade e a validade prolongada desejadas. Tipicamente, as composições secas irão ter um teor de humidade inferior a 20% em peso (p/p) ou menos, preferivelmente terão um teor de humidade na

gama de 5% em peso a 15% em peso. Para manter a secura, as composições serão tipicamente embaladas de modo adequado para evitar a penetração da humidade, conforme descrito com mais detalhe em relação aos conjuntos do presente invento.

Num aspecto particular do presente invento, as composições irão compreender pós gelatinosos reticulados contendo um teor de humidade de 20% (p/p) ou menos, em que o pó foi reticulado na presença de um adjuvante de re-hidratação de modo a que o pó tenha uma taxa de re-hidratação aquosa que seja pelo menos 5% superior à taxa de re-hidratação de um pó similar preparado sem o adjuvante de re-hidratação. A "taxa de re-hidratação" é aqui definida como sendo a quantidade de uma solução aquosa, tipicamente uma solução salina a 0,9% (p/p), que é absorvida por uma grama de pó (com base no peso seco) em trinta segundos, expressa em g/g. As técnicas particulares para medição desta taxa encontram-se descritas na secção Experimental abaixo. As composições preferidas do presente invento terão uma taxa de re-hidratação de pelo menos 3 g/g, preferivelmente pelo menos 3,5 g/g, e frequentemente 3,75 g/g ou mais. As taxas de re-hidratação de pós similares preparados sem os adjuvantes de re-hidratação são tipicamente inferiores a três, e um aumento da percentagem na taxa de re-hidratação será geralmente pelo menos 5%, sendo preferivelmente pelo menos 10%, e sendo mais preferivelmente pelo menos 25% ou mais.

Os pós gelatinosos reticulados secos do presente invento tendo taxas de re-hidratação melhoradas são preferivelmente obtidos preparando os pós na presença de certos adjuvantes de re-hidratação. Tais adjuvantes de re-hidratação estarão presentes durante a preparação dos pós, mas serão geralmente removidos dos produtos finais. Por exemplo, adjuvantes de re-hidratação que estejam presentes em cerca de 20% relativamente ao teor total de sólidos, serão tipicamente reduzidos abaixo de 1% no produto final, frequentemente abaixo de 0,5% em peso. Exemplos de adjuvantes de re-hidratação incluem polietilenoglicol (PEG), preferivelmente com um peso molecular de cerca de 1000; polivinilpirrolidona (PVP), tendo preferivelmente um peso molecular de cerca de 50000; e dextrano, tendo preferivelmente um peso molecular de cerca de 40000. É preferido empregar pelo menos dois destes adjuvantes

de re-hidratação na preparação das composições do presente invento, e é mais particularmente preferido empregar todos os três.

Os processos do presente invento compreendem assim proporcionar uma solução aquosa de uma gelatina não reticulada combinada com um adjuvante de re-hidratação. A gelatina não reticulada irá tipicamente estar presente numa solução aquosa de 5% (p/p) a 15% (p/p) e os adjuvantes de re-hidratação irão tipicamente estar presentes de 5% a 30% (p/p) com base no peso de gelatina na solução aquosa. Preferivelmente, o adjuvante de re-hidratação compreende PEG de 2,5% a 20% (p/p) com base no peso da gelatina, PVP de 1,25% a 20% (p/p), e dextrano de 1,25% a 20% (p/p).

A gelatina não reticulada juntamente com o adjuvante de reticulação é então reticulada de qualquer modo adequado para formar o hidrogel. Por exemplo, moléculas poliméricas podem ser reticuladas utilizando agentes de reticulação bi- ou poli-funcionais os quais se ligam de forma covalente a duas ou mais cadeias das moléculas de polímeros. Exemplos de agentes de reticulação bi-funcionais incluem aldeídos, epóxidos, succinimidas, carbodiimidas, maleimidas, azidas, carbonatos, isocianatos, divinilsulfona, álcoois, aminas, imidatos, anidridos, halogenetos, silanos, diazoacetato, aziridinas, e similares. Alternativamente, a reticulação pode ser alcançada utilizando oxidantes e outros agentes, tais como periodatos, os quais activam cadeias laterais ou fracções no polímero de modo a que possam reagir com outras cadeias laterais ou fracções para formarem as ligações de reticulação. Um processo adicional de reticulação compreende a exposição dos polímeros à radiação, tal como radiação gama, para activar as cadeias dos polímeros para permitir reacções de reticulação. Os processos de reticulação desidrotérmica podem também ser adequados. Os processos preferidos para a reticulação de moléculas de gelatina são descritos em seguida.

Exemplos de processos para a produção de gelatinas reticuladas são apresentados em seguida. A gelatina é obtida e suspensa numa solução aquosa para formar um hidrogel não reticulado, tipicamente contendo um teor de sólidos de 1% a

70% em peso, geralmente de 3% a 10% em peso. A gelatina é reticulada, tipicamente por exposição quer a glutaraldeído (por exemplo, 0,01% a 0,05% p/p, durante a noite de 0°C a 15°C em tampão aquoso), periodato de sódio (por exemplo, 0,05M, mantido de 0°C a 15°C durante 48 horas) ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ("EDC") (por exemplo, 0,5% a 1,5% p/p durante a noite à temperatura ambiente), ou por exposição a cerca de 0,3 a 3 megarads de radiação gama ou feixe de electrões. Em alternativa, as partículas de gelatina podem ser suspensas num álcool, preferivelmente álcool metílico ou álcool etílico, com um teor de sólidos de 1% a 70% em peso, geralmente 3% a 10% em peso, e reticuladas por exposição a um agente de reticulação, tipicamente glutaraldeído (por exemplo, 0,01% a 0,1% p/p, durante a noite à temperatura ambiente). No caso de aldeídos, o pH deve ser mantido de cerca de 6 a 11, preferivelmente de 7 a 10. Na reticulação com glutaraldeído, os retículos são formados por meio de bases de Schiff, os quais podem ser estabilizados por redução subsequente, por exemplo, por tratamento com boro-hidreto de sódio. Após reticulação, os grânulos resultantes podem ser lavados em água e opcionalmente enxaguados com um álcool, e secos. Os pós secos resultantes podem então ser introduzidos nos aplicadores do presente invento, conforme descrito adiante com maior detalhe.

Após a reticulação, pelo menos 50% (p/p) do adjuvante de re-hidratação será removido do hidrogel resultante. Geralmente, o adjuvante de re-hidratação é removido por filtração do hidrogel seguida de lavagem do bolo de filtração resultante. Tais passos de filtração/lavagem podem ser repetidos uma ou mais vezes adicionais de modo a limpar o produto até um nível desejado e para remover pelo menos 50% do adjuvante de re-hidratação, removendo preferivelmente pelo menos 90% (p/p) do adjuvante de re-hidratação originalmente presente.

Após a filtração, a gelatina é seca, tipicamente por secagem do bolo de filtração final que foi produzido. O bolo de filtração seco pode então ser fragmentado ou moído para produzir o pó reticulado com um tamanho da partícula nas gamas desejadas apresentadas acima.

Conjuntos de acordo com o presente invento compreenderão um primeiro recipiente contendo o pó gelatinoso reticulado seco do presente invento, como acima descrito. Os conjuntos compreenderão ainda um segundo recipiente contendo um meio de re-hidratação aquoso, tipicamente uma solução salina ou outra solução aquosa compreendendo trombina a qual deve ser misturada com a gelatina enquanto a gelatina é re-hidratada. Os recipientes podem ter qualquer forma, mas terão preferivelmente a forma de seringas a qual permite a mistura da gelatina seca com o meio de re-hidratação.

Breve descrição da Figura

A Figura 1 ilustra um conjunto construído de acordo com os princípios do presente invento.

Descrição das concretizações específicas

Os Exemplos seguintes são oferecidos em modo de ilustração.

Exemplo 1: Preparação do pó gelatinoso

Foram suspensas tiras de cório bovino numa solução de hidróxido de sódio de concentração 1M a 2M durante 1 hora à temperatura ambiente, neutralizadas com ácido fosfórico, e enxaguadas. As tiras tratadas foram então ressuspensas em água desionizada, o pH ajustado a 7-8, e aquecidas a 70°C. Foi utilizado um homogeneizador para reduzir ainda mais o tamanho das tiras. Após 1 hora a 70°C, o cório foi extensivamente solubilizado até formar gelatina. A quantidade de cório foi escolhida de modo a que o teor de sólidos da solução gelatinosa resultante fosse aproximadamente 3-10% (p/p), tipicamente 7-10%. A solução foi espalhada em camadas finas em tabuleiros metálicos revestidos com Teflon®, seca e moída para formar o pó gelatinoso.

Exemplo 2: Preparação do "pó gelatinoso modificado"

Foram dissolvidos adjuvantes de re-hidratação (Tabela 1) em 500 ml de água desionizada a 50°C e então uma quantidade de pó gelatinoso de origem bovina, preparado como no Exemplo

1, foi adicionado à solução. A concentração final de gelatina na solução foi escolhida para ser aproximadamente 8% (p/p, com base no pó gelatinoso a granel), e a quantidade total de adjuvantes de re-hidratação na solução foi escolhida como nos Exemplos 9-44 (Tabelas 1 e 2). Após a dissolução da gelatina, a solução foi vertida em tabuleiros metálicos revestidos com Teflon® e seca. A folha de gelatina seca é moída para formar "pó gelatinoso modificado".

Alternativamente, foram suspensas tiras de cório bovino numa solução de hidróxido de sódio de concentração 1M a 2M durante 1 hora à temperatura ambiente, neutralizadas com ácido fosfórico, e enxaguadas. As tiras tratadas foram então ressuspensas em água desionizada, o pH ajustado a 7-8, e aquecidas a 70°C. Foi utilizado um homogeneizador para reduzir ainda mais o tamanho das tiras. Após 1 hora a 70°C, o cório foi extensivamente solubilizado até formar gelatina. A quantidade de cório foi escolhida de modo a que o teor de sólidos da solução gelatinosa resultante fosse cerca de 3-10% (p/p), tipicamente 7-10%. Quantidades de adjuvantes de re-hidratação foram escolhidas como nos Exemplos 9-44 (Tabelas 1 e 2) e foram então adicionadas à solução gelatinosa, quer na forma sólida quer dissolvidas num pequeno volume de água. A solução foi espalhada em camadas finas em tabuleiros metálicos revestidos com Teflon®, seca e moída para formar o "pó gelatinoso modificado". Exemplos de várias formulações para gelatina modificada são dados nas Tabelas 1 e 2.

Exemplo 3: Preparação de pó gelatinoso reticulado a partir do "pó gelatinoso modificado"

Foram arrefecidos 600 ml de tampão fosfato 0,2M (pH 9,2±0,2) a uma temperatura abaixo de 12°C. Foram adicionados 0,32 ml de glutaraldeído (25%) à solução tampão e foram então adicionadas 20 g de pó gelatinoso modificado, resultando numa concentração em glutaraldeído de 4000 ppm (glutaraldeído para gelatina modificada, com base no peso bruto). A gelatina foi suspensa na solução de glutaraldeído com uma vareta de agitação. O pH de cada uma das suspensões foi ajustado a uma gama de 9,2±0,2 e então mantidas a uma temperatura de 9 a 12°C e o pH de 9,2±0,2 durante 19 horas.

A suspensão foi filtrada e o bolo de filtração foi lavado três vezes com água desionizada cobrindo completamente o bolo de filtração com a água desionizada e então permitindo que o vácuo retirasse a água de enxaguamento através do bolo. O bolo de filtração foi deixado no funil durante cada enxaguamento.

Foram dissolvidas num copo graduado 0,2 g de NaBH_4 em 600 ml de tampão fosfato 25 mM, pH $7,4 \pm 0,2$. O bolo de filtração acima foi suspenso na solução de NaBH_4 à temperatura ambiente (cerca de 22°C) durante 3 horas, e então filtrado para remover o líquido.

O bolo de filtração foi em seguida suspenso em 600 ml de solução tampão à temperatura ambiente (cerca de 22°C) durante 30 minutos e filtrado outra vez. O tampão era composto por fosfato de sódio (anidro dibásico e mono-hidrato monobásico) e ascorbato de sódio. O procedimento acima foi repetido duas vezes para assegurar que estava presente a proporção adequada de sais para gelatina para formar a composição tampão desejada aquando da reconstituição. O bolo de filtração foi seco, e então moído com um misturador Waring, resultando em "pó gelatinoso reticulado".

Este processo foi também utilizado para preparar pó gelatinoso reticulado a partir de pó gelatinoso não modificado; isto é, gelatina à qual não foram adicionados adjuvantes de re-hidratação durante a sua preparação.

Exemplo 4: Preparação do produto irradiado a partir do "pó gelatinoso reticulado"

Foram colocados cerca de 800 mg (peso bruto) do pó gelatinoso reticulado, preparado como no Exemplo 2, dentro de cada uma de várias seringas de 5 cc. As seringas contendo pó foram esterilizadas com exposição a radiação gama à temperatura ambiente.

Exemplo 5: Utilização do produto como agente hemostático

Uma seringa de produto contendo aproximadamente 0,8 g de pó gelatinoso reticulado irradiado foi preparada com pó

gelatinoso modificado. O pó gelatinoso modificado foi preparado como no Exemplo 2. A gelatina modificada foi ainda reticulada e irradiada como nos Exemplos 3 e 4. O produto foi misturado com 4 ml de uma solução salina contendo cerca de 1000 Unidades de trombina de bovino por mililitro. A mistura foi conseguida pela passagem de um lado para o outro entre duas seringas ligadas com um adaptador do tipo Luer-lock fêmea-fêmea. O pó na seringa foi hidratado enquanto se misturava com a solução de trombina, formando grânulos de hidrogel.

Uma lesão quadrada, com aproximadamente 1 cm×1 cm×0,2 cm de profundidade, foi criada no fígado de um porco de quinta. O porco tinha sido anticoagulado com heparina de modo a que o seu tempo de coagulação activado (ACT) era três a cinco vezes o seu valor de linha de base, e a lesão sangrou livremente antes do tratamento. Após cerca de 30 segundos do início da mistura, foram extrudidos da seringa para a lesão aproximadamente 2 ml do pó hidratado e mantidos no local com compressão durante dois minutos. Após a remoção da compressão, a lesão tratada foi observada quanto à hemorragia aos 3 minutos, 10 minutos, e 50 minutos após a aplicação. Não se observou qualquer hemorragia na lesão tratada nas observações aos 3 minutos e aos 10 minutos. Após a observação aos 10 minutos, a lesão tratada foi irrigada com solução salina. Enquanto era removido o excesso de material, não se observou nova hemorragia. Aos 50 minutos após a aplicação, a lesão foi de novo observada e não foi detectada qualquer hemorragia.

Exemplo 6: Determinação da taxa de re-hidratação de um pó

A "taxa de re-hidratação" de um pó foi medida como se segue. O pó, embalado numa seringa de 5 cc, foi misturado com uma seringa contendo um volume de solução aquosa através da passagem entre as duas seringas ligadas com um adaptador do tipo Luer-lock durante 30 segundos. O volume de solução aquosa foi escolhido para estar em excesso em relação ao que se esperava ser absorvido em 30 segundos. Tipicamente, foram misturadas 0,8 g de pó (peso bruto) com 3 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%. A mistura resultante foi então imediatamente filtrada para remover qualquer líquido não

absorvido. O material filtrado húmido foi pesado, e então seco num forno a 120°C durante duas horas e de novo pesado. Esta medição deu a quantidade total de água removida do material húmido e o peso do pó seco. A quantidade de água que tinha sido absorvida pelo pó foi então calculada após ter sido feita uma pequena correcção para a humidade residual que estava originalmente presente no pó. A "taxa de re-hidratação" foi dada como a massa de solução salina absorvida por grama de peso seco do pó nesse intervalo de 30 segundos.

No cálculo abaixo, a fracção de sólidos do pó a granel ("S") foi medida independentemente secando o pó a granel a 120°C durante 2 horas e pesando o pó antes e após a secagem. O valor de S é dado pelo seguinte:

$$S = \frac{\text{Peso após secagem a } 120^{\circ}\text{C, 2 horas}}{\text{Peso antes da secagem}}$$

Cálculo da taxa de re-hidratação:

- A: peso inicial do tabuleiro e papel de filtro
- B: peso do tabuleiro, papel de filtro e pó hidratado
- C: peso do tabuleiro, papel de filtro e amostra após secagem no forno
- S: fracção de sólidos do pó a granel originalmente na seringa
- M: gramas de solução salina absorvida por grama de pó (peso seco) durante a mistura ("taxa de absorção")

$$M = \frac{(B-A) - (C-A)/S}{(C-A)}$$

Exemplo 7: Determinação da taxa de re-hidratação e das propriedades físicas para vários lotes de produto em pó

As Tabelas 1 e 2 descrevem os resultados das medições da taxa de re-hidratação realizadas em de um a vários lotes de produto em pó (Exemplos 9-23). Estas foram feitas utilizando processos como nos Exemplos 1, 2, 3 e 4. Excepto nos Exemplos 9 e 17, estes foram preparados a partir de gelatinas modificadas que foram feitas com várias proporções de gelatina e dos seguintes adjuvantes de re-hidratação: polietilenoglicol (PEG), peso molecular médio 1000; polivinilpirrolidona (PVP), designação "k-30", correspondendo a um peso molecular médio de cerca de 50000; e dextrano, peso molecular médio 40000.

Pode verificar-se que a utilização de diferentes combinações de gelatina e adjuvantes de re-hidratação pode resultar num produto em pó que absorve mais solução salina aquosa em 30 segundos por grama de pó do que o produto em pó feito a partir de gelatina à qual não foram adicionados quaisquer adjuvantes de re-hidratação. Pode também verificar-se que a combinação de gelatina, PEG, PVP e dextrano numa proporção ponderal bruta de 80:10:5:5 na gelatina modificada (Exemplo 10) produz um produto em pó que absorve cerca de 33% mais solução salina por grama em 30 segundos do que o produto em pó feito a partir de gelatina não modificada.

A Tabela 1 também apresenta valores para outras propriedades físicas determinadas para os lotes de produto em pó. A “percentagem de sólidos” foi determinada pesando o pó antes e depois da secagem a 120°C durante duas horas para eliminar a humidade residual. A “temperatura máxima DSC” refere-se à temperatura à qual é exibido um pico no termograma de uma medição de calorimetria de varrimento diferencial conduzida de 1°C a 70°C. A “dilatação de equilíbrio” foi determinada suspendendo o pó num excesso de solução salina durante pelo menos 18 horas à temperatura ambiente. O pó hidratado foi pesado para determinar o seu “peso húmido de equilíbrio” e seco a 120°C durante duas horas e de novo pesado para determinar o seu “peso seco”. A dilatação de equilíbrio é dada por

$$\text{Dilatação de Equilíbrio (\%)} = 100\% \times \frac{\text{peso húmido de equilíbrio} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}}$$

Os valores para o “tamanho médio de partícula” foram medidos por difusão de luz com um analisador de tamanho da partícula Coulter LS.

A partir dos dados apresentados na Tabela 1, parece que a utilização apropriada dos adjuvantes de re-hidratação podem alterar a taxa de re-hidratação do produto em pó sem alterar significativamente as outras propriedades físicas.

Exemplo 8: Medição dos níveis de polietilenoglicol, polivinilpirrolidona e dextrano no pó gelatinoso modificado e no pó reticulado

Aproximadamente 50 mg de gelatina modificada ou 250 mg de produto em pó reticulado irradiado foram suspensos em 10 ml de água desionizada e aquecidos durante 3 horas a 65°C. As amostras foram então centrifugadas durante 15 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante resultante foi filtrado através de um filtro Gelman Acrodisc de 0,45 µm, sendo rejeitados os primeiros ml. A amostra resultante foi então analisada recorrendo a três processos diferentes de cromatografia líquida de alta resolução para quantificar o polietileno-glicol (PEG), a polivinilpirrolidona (PVP) e o dextrano na amostra. Para o PEG, foram injectados 100 µl da amostra numa coluna Waters Ultrahydrogel 120, 7,8×300 mm, com coluna de protecção e filtro prévio, utilizando água desionizada como fase móvel. Foi utilizado um detector de índice de refração para monitorizar o efluente. Para a PVP, foram injectados 100 µl numa coluna Phenomenex Kingsorb C18 5 µm, 4,6×150 mm, com coluna de protecção e filtro prévio, utilizando um gradiente de metanol e fosfato de sódio aquoso como fase móvel. Foi utilizado um detector de absorção no ultravioleta para monitorizar o efluente. Para o dextrano, foram injectados 100 µl da amostra numa coluna Waters Ultrahydrogel Linear, 7,8×300 mm, com coluna de protecção e filtro prévio, utilizando fosfato de sódio 0,1 M, pH 7, e acetonitrilo numa proporção de 90:10 como fase móvel. Foi utilizado um detector de índice de refração para monitorizar o efluente. Todas as colunas foram aquecidas a 40°C para as análises. O limite de quantificação era de cerca de 0,1% (p/p amostra) para o PEG e a PVP, e 0,2% (p/p amostra) para o dextrano.

Foi preparada gelatina modificada como no Exemplo 2. A gelatina modificada foi analisada relativamente a PEG, PVP e dextrano do modo acima descrito. Os resultados indicaram que PEG, PVP e dextrano estavam presentes a 16%, 8% e 3% (p/p bruto) respectivamente. A gelatina modificada foi sujeita subsequentemente a reticulação, tratamento com boro-hidreto de sódio, e enxaguamento como no Exemplo 3 para formar pó gelatinoso modificado reticulado. Quando este pó foi analisado relativamente a PEG, PVP e dextrano por HPLC do modo acima descrito, detectou-se que o teor de cada um destes adjuvantes de re-hidratação era inferior ao limite de quantificação.

Exemplo 9: Produto em pó feito sem adjuvantes de re-hidratação

Foi preparada gelatina não modificada - isto é, gelatina à qual não foram adicionados quaisquer adjuvantes de processamento - a partir de tiras de cório bovino como no Exemplo 1 e reticulada como no Exemplo 3. A gelatina não modificada reticulada foi então embalada em seringas e exposta a radiação gama como no Exemplo 4. As propriedades físicas do produto resultante foram medidas como nos Exemplos 6 e 7 e são dadas na Tabela 1.

Exemplos 10-23: Produto em pó feito com adjuvantes de re-hidratação

Foram preparados lotes de gelatina modificada como no Exemplo 2 a partir de pó gelatinoso ou tiras de cório e de um, dois, ou três adjuvantes de re-hidratação. A Tabela 1 dá as proporções de gelatina a granel e adjuvantes de re-hidratação utilizados. A gelatina modificada foi então reticulada como no Exemplo 3. Excepto no Exemplo 17, os adjuvantes de re-hidratação utilizados pertenciam à seguinte lista: polietilenoglicol (PEG) com um peso molecular médio de cerca de 1000; polivinilpirrolidona (PVP), designação "k-30", com um peso molecular médio de cerca de 50000; e dextrano, com um peso molecular médio de cerca de 40000. No Exemplo 17, foi utilizado PEG com um peso molecular médio de cerca de 400. A gelatina modificada reticulada foi então embalada em seringas e exposta a radiação gama como no Exemplo 4. As propriedades físicas do produto em pó resultante de cada uma destas preparações foram medidas como nos Exemplos 6 e 7 e são dadas na Tabela 1. Os dados fornecidos com a formulação para o Exemplo 10 são a média e o desvio padrão para nove lotes preparados de acordo com essa formulação.

Exemplos 24-44: Produto em pó feito com vários adjuvantes de re-hidratação

Foram preparados lotes de gelatina modificada como no Exemplo 2 a partir de pó gelatinoso ou tiras de cório e de um entre vários adjuvantes de re-hidratação. A Tabela 2 apresenta a identidade e concentração do adjuvante de re-

hidratação utilizado em cada lote como uma proporção do peso bruto de gelatina para o adjuvante de re-hidratação e como uma percentagem do soluto a granel total utilizado para preparar a gelatina modificada. A gelatina modificada foi então reticulada como no Exemplo 3. A gelatina modificada reticulada foi então embalada em seringas e exposta a radiação gama tal como no Exemplo 4. As propriedades físicas do produto em pó resultante de cada uma destas preparações foram medidas como nos Exemplos 6 e 7 e são dadas na Tabela 2. Os dados para a formulação do Exemplo 9 são proporcionados na Tabela 2 para comparação.

(seguem Tabelas 1 e 2)

Tabela 2

	Lote	Adjuvante de Re-Hidratação			Propriedades físicas			
		Tipo	PM ou outra designação	Peso bruto gelatina: adjuvante	Concentr. de adjuvante de processamento na gelatina modificada (% peso bruto)	% Sólidos	Temp. Máx. DSC (°C)	Taxa de Re-Hidratação *
Exemplo 9	208-32			Sem adjuvantes de re-hidratação				
Exemplo 24	214-11-1	Glicerol	n/a	4	20%	88,6	41,3	2,85
Exemplo 25	214-11-2	Glicerol	n/a	8	11%	85,5	43,4	2,19
Exemplo 26	214-11-3	Glicerol	n/a	16	6%	86,4	43,4	2,62
Exemplo 27	214-44-1	Dextrano	148000 D	4	20%	86,5	43,0	2,35
Exemplo 28	214-44-2	Dextrano	148000 D	8	11%	85,5	nr	2,62
Exemplo 29	214-44-3	Dextrano	148000 D	16	6%	85,4	nr	2,57
Exemplo 30	214-44-4	Dextrano	148000 D	32	3%	85,5	nr	2,33
Exemplo 31	228-35-4	Dextrano	40000 D	32	3%	85,7	nr	2,37
Exemplo 32	214-50-1	PVP	k-90	4	20%	84,5	41,4	2,59
Exemplo 33	214-50-2	PVP	k-90	8	11%	85,3	44,0	2,41
Exemplo 34	214-50-3	PVP	k-90	16	6%	85,6	44,3	2,71
Exemplo 35	214-50-4	PVP	k-90	32	3%	85,6	44,1	2,78
Exemplo 36	214-53-4	PVP	k-30	32	3%	86,1	43,0	2,76
Exemplo 37	214-59-1	PEG	400	4	20%	87,3	41,1	2,72
Exemplo 38	214-66-1	PEG	400	6	14%	86,7	42,0	2,18
Exemplo 39	212-39-1	PEG	400	16	6%	86,5	40,8	2,63
Exemplo 40	212-39-2	PEG	1000	16	6%	86,2	43,8	2,11
Exemplo 41	214-59-3	PEG	8000	4	20%	86,2	44,4	2,68
Exemplo 42	214-66-3	PEG	8000	6	14%	87,4	41,5	2,87
Exemplo 43	214-62-3	PEG	8000	8	11%	86,9	41,4	3,80
Exemplo 44	212-39-3	PEG	8000	16	6%	86,8	42,0	2,78
nr = não reportado								
* Taxa de re-hidratação definida como gramas de solução salina absorvidas por grama de produto em pó (peso seco) em 30 segundos								

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de um pó de gelatina reticulada substancialmente seco, compreendendo o referido processo:

- proporcionar uma solução de uma gelatina não reticulada;
- reticular a gelatina não reticulada enquanto em solução na presença de um adjuvante de re-hidratação;
- lavar a gelatina reticulada para remover pelo menos 50% p/p do adjuvante de re-hidratação; e
- secar a gelatina reticulada e triturar o sólido seco para produzir o pó de gelatina reticulada.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o adjuvante de re-hidratação compreende um ou mais materiais seleccionados a partir do grupo constituído por polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) e dextrano.

3. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, em que o adjuvante de re-hidratação está presente a uma concentração na gama de 5% a 30% em peso com base no peso da gelatina presente na solução aquosa.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que o adjuvante de re-hidratação compreende PEG de 2,5 a 20% em peso, PVP de 1,25% a 20% em peso, e dextrano de 1,25% a 20% em peso.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o passo de reticulação compreende a adição de um agente de reticulação à solução de gelatina.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que o agente de reticulação compreende glutaraldeído.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a gelatina reticulada é filtrada para produzir um bolo de filtração que é posteriormente lavado para remover o adjuvante de re-hidratação.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que a lavagem do bolo de filtração remove pelo menos 90% (p/p) do adjuvante de re-hidratação originalmente presente na gelatina.

9. Processo de acordo com as reivindicações 7 ou 8, em que o passo de secagem compreende a secagem do bolo de filtração após a lavagem.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o pó de gelatina reticulada é seco para ter um teor de humidade inferior a 20% (p/p).

11. Composição que compreende um pó de gelatina reticulada, em que o pó foi reticulado na presença de um adjuvante de re-hidratação, de modo que o pó possua uma taxa de re-hidratação aquosa de pelo menos 3,0 g/g.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que o pó tem uma taxa de re-hidratação aquosa de pelo menos 3,5 g/g.

13. Composição de acordo com a reivindicação 11 ou 12, em que o pó possui uma dilatação de equilíbrio na gama de 400% a 1000%.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, em que o pó possui um tamanho médio de partícula na gama de 150 μm a 750 μm .

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, em que o pó possui um teor de humidade de 20% (p/p) ou menos.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, em que o adjuvante de re-hidratação compreende um ou mais materiais seleccionados a partir do grupo constituído por polietilenoglicol (PEG), polivinil-pirrolidona (PVP) e dextrano.

17. Conjunto que compreende:

- um primeiro recipiente contendo uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16; e
- um segundo recipiente contendo um meio de re-hidratação aquoso.

18. Conjunto de acordo com a reivindicação 17, em que um ou ambos primeiro e segundo recipientes são seringas.

19. Conjunto de acordo com a reivindicação 18, em que o primeiro e segundo recipientes são seringas que permitem a mistura da composição com o meio de re-hidratação.

20. Conjunto de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, em que o meio de re-hidratação aquoso compreende trombina.

21. Conjunto de acordo com a reivindicação 20, em que o meio de re-hidratação aquoso é uma solução salina que compreende trombina.

22. Conjunto de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 21, que compreende adicionalmente uma embalagem que contém o primeiro e segundo recipientes.

23. Conjunto de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 22, em que a composição mantida no primeiro recipiente é embalada para evitar a incursão de humidade.

24. Conjunto de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 23, que compreende adicionalmente instruções para utilização apresentando um processo para combinação do pó de gelatina reticulada com o meio de re-hidratação, para produzir um hidrogel de gelatina fragmentado contendo trombina, e aplicação do hidrogel ao local de uma ferida.

Lisboa, 2008-12-18

RESUMO**"Composições hemostáticas secas e processos para a sua preparação"**

É descrito um processo para preparação de um pó de gelatina reticuladas seca. O processo compreende proporcionar uma solução de uma gelatina não reticulada e em seguida reticular a gelatina não reticulada em solução na presença de um adjuvante de re-hidratação. A gelatina reticulada é depois lavada para remover pelo menos 50% p/p do adjuvante de re-hidratação, seca e o sólido seco é triturado para produzir um pó de gelatina reticulada possuindo uma teor de humidade inferior a 20% p/p. Também é descrita uma composição que compreende um pó de gelatina reticulada que foi reticulada na presença de um adjuvante de re-hidratação. O pó possui uma taxa de re-hidratação aquosa de pelo menos 3,0 g/g.

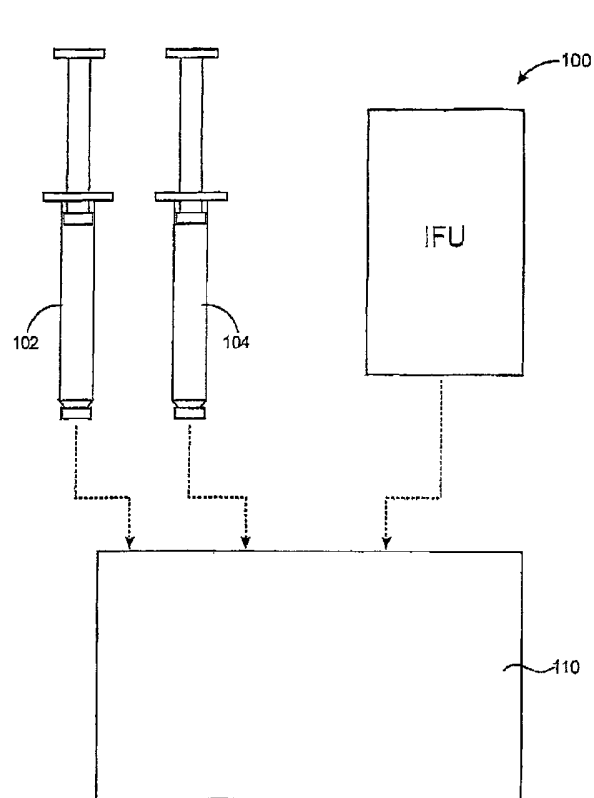


FIG. 1

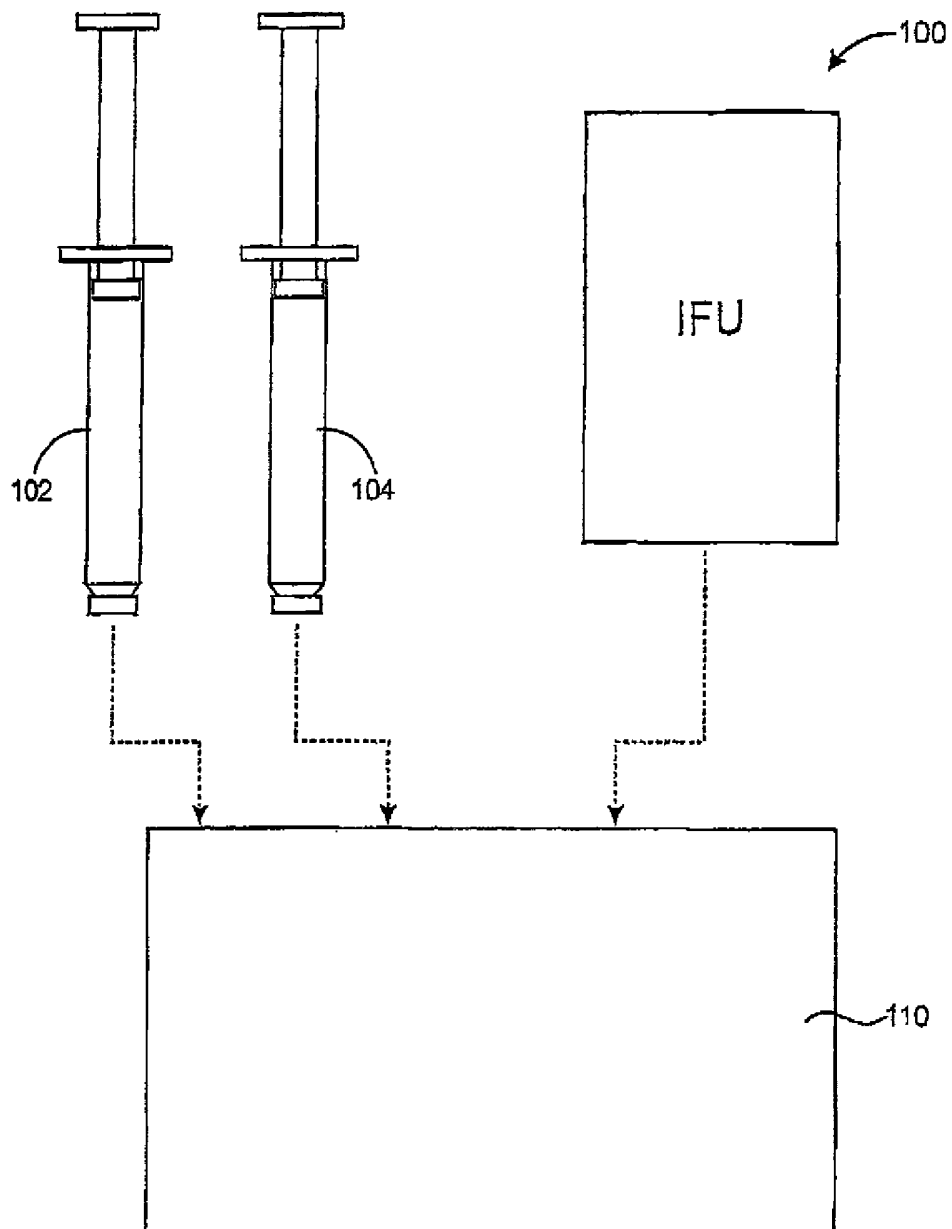


FIG. 1