



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

**(11) PI 1007940-8 B1**

**(22) Data do Depósito: 29/01/2010**

**(45) Data de Concessão: 03/07/2018**



---

**(54) Título:** MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE UM SUBSTRATO DE ESPUMA HEMOSTÁTICA

**(51) Int.Cl.:** A61L 15/26; A61L 15/32; A61L 15/42

**(30) Prioridade Unionista:** 30/01/2009 US 12/362,908

**(73) Titular(es):** ETHICON, INC

**(72) Inventor(es):** CHUNLIN YANG; THOMAS MATALENAS; THOPPIL MATHEW JOHN

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA FABRICAÇÃO DE UM SUBSTRATO DE ESPUMA HEMOSTÁTICA**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere a peptídeos relacionados ao colágeno (CRPs - collagen-related peptides) que possuem grupos de aminoácido hidrofóbicos nas terminações N e C e aos trímeros miméticos de colágeno e fibrilas dos mesmos e à síntese, aos métodos de uso e suas composições, assim como substratos de espuma hemostáticos, métodos de fabricação destes substratos, e métodos de estimulação de hemóstase.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O colágeno, a proteína mais abundante em mamíferos, é amplamente distribuído dentro do corpo e a rigidez de sua tripla hélice em forma de corda e fibrilas agregadas possibilita-o executar um papel estrutural essencial, ajudando a fornecer resistência mecânica aos tecidos. Os colágenos fibrilares mais abundantes, tipos I, II e III, ocorrem na pele, ossos, cartilagens, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos e no humor vítreo dos olhos. Os colágenos fibrilares mais complexos, como os tipos IV e VI, formam redes bi e tridimensionais, suportando os tecidos intersticiais do corpo e sendo o componente fundamental das membranas basais às quais as camadas de células epiteliais e endoteliais podem se ligar.

Em geral, os colágenos fibrilares contêm três cadeias de peptídeos separadas entrelaçadas uma em torno da outra para formar uma tripla hélice (Rich A e Crick FHC, *J. Mol. Biol.*, **1961**, 3, 483–506). Restrições geométricas e a estabilidade da tripla hélice de colágeno exigem que cada terceiro aminoácido seja a glicina (Gly ou G), resultando em uma sequência -GXY- repetitiva, sendo que X e Y cada uma representam frequentemente a prolina (Pro ou P) e hidroxiprolina (Hyp ou O). A tripla hélice de colágeno tem tipicamente mais de 300 nm de comprimento e acima de 1000 aminoácidos. As fibrilas resultantes do conjunto de tais triplas hélices de colágeno excedem a 1 µm de comprimento.

Em tecidos saudáveis e não danificados, o colágeno suporta a

parede de vasos sanguíneos e seus tecidos circundantes e está escondido pelas camadas de células endoteliais, e não pode entrar em contato com as plaquetas que circulam dentro da corrente sanguínea, as quais regulam o processo de coagulação. Entretanto, o dano à parede do vaso, que ocorre em consequência de trauma mecânico ou ruptura da placa aterosclerótica em paredes de vasos sanguíneos lesados, pode remover a camada de célula endotelial e permitir que o colágeno interaja com as plaquetas e outras proteínas do plasma sanguíneo, ativando assim a agregação e adesão das plaquetas. Esses processos são essenciais à reação da coagulação, e são bem entendidos no campo.

#### Configuração Triplo-Helicoidal

O colágeno tem fascinado os cientistas a longo tempo por causa de suas características estruturais extraordinárias e pela importância biológica dessas proteínas. O estudo da estrutura, estabilidade e função das triplas hélices de colágeno tem sido facilitado pelo uso de peptídeos relacionados ao colágeno sintético. (Feng Y, Melacini G, Taulane JP e Goodman M, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 10351–10358; Fields GB e Prockop DJ, *Biopolymers* **1996**, *40*, 345–357 e referências citadas nesses; Holmgren SK, Taylor KM, Bretscher LE e Raines RT, *Nature* **1998**, *392*, 666–667; Jenkins CL e Raines RT, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 49–59; e Shah NK, Ramshaw JAM, Kirkpatrick A, Shah C e Brodsky, B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10262–10268). Por exemplo, o uso de peptídeos triplo-helicoidais sintéticos que compreendem motivos de reconhecimento específicos permitiram que as propriedades de ligação ao receptor dos colágenos fossem investigadas em detalhes. Adicionalmente, a conformação triplo-helicoidal dos colágenos pode ser um pré-requisito para seu reconhecimento pelas plaquetas e outros receptores de colágeno. Certas sequências triplo-helicoidais, além disso, podem interagir diretamente com os receptores de plaquetas como o GpVI, incluindo a sequência de repetição de tripletos glicina-prolina-hidróxi prolina (GPO). Para peptídeos simples relacionados ao colágeno, a sequência (GPO)<sub>10</sub> forma triplas hélices termicamente estáveis, com uma temperatura de fusão de 58 a 70°C. Os aminoácidos hidroxiprolina estabilizam a estrutura

triplo-helicoidal facilitando a formação de pontes de hidrogênio mediadas por água e fornecendo efeitos estereoeletrônicos.

Além disso, a publicação internacional número WO07/052067 descreve uma série de peptídeos de colágeno triplo-helicoidais incluindo o domínio de colágeno tipo III e tendo uma atividade de adesão plaquetária baseada na afinidade pelo domínio A3 do fator plaquetário de von Willebrand. A publicação internacional WO07/017671 descreve peptídeos de trímeros contendo repetições GPO que, sem reticulação entre os peptídeos, são capazes de ativar plaquetas. A publicação internacional WO06/098326 descreve um filme de colágeno sintético preparado a partir de um polipeptídeo de POG e um composto de fosfato de cálcio. A publicação de patente japonesa 2005206542 descreve estruturas de tecido de colágeno contendo as sequências de polipeptídeo Pro-X-Gly e Y-Z-Gly (sendo que X e Z representam prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp) e Y representa um resíduo de aminoácido que tem um grupo carboxila). A publicação de patente japonesa 2005126360 descreve composições cosméticas e alimentícias contendo a sequência de polipeptídeo Pro-Y-Gly-Z-Ala-Gly (em que Y representa Gln, Asn, Leu, Ile, Val ou Ala; e, Z representa Ile ou Leu) preparado por síntese em fase sólida para inibir a colagenase. A publicação de patente americana 2003/162941 (equivalente ao documento JP 2003321500) descreve polipeptídeos colagenosos com uma sequência Pro-Y-Gly (sendo que Y representa Pro ou Hyp), que possuem uma estrutura tripla hélice. A patente americana 5.973.112 (equivalente ao documento WO99/10381) descreve miméticos de colágeno tripeptídicos da sequência Xaa-Xbb-Gly (sendo que Xaa representa um resíduo de aminoácido; e, Xbb representa 4(R)-flúor-L-prolina (Flp), 4(S)-flúor-L-prolina, 4,4-difluorprolina, ou uma hidroxiprolina modificada com acetila, mesila ou trifluorometila. O colágeno mimético (Pro-Flp-Gly)<sub>10</sub> mostrou estabilidade aumentada em relação às triplas hélices do colágeno Pro-Pro-Gly e Pro-Hyp-Gly.

### 30 Automontagem

Várias estratégias têm sido empregadas para induzir a formação da estrutura triplo-helicoidal em sequências ligando o colágeno isolado

(conforme discutido na patente US 6.096.863, equivalente à publicação internacional WO98/007752, e referências nessas). A formação da estrutura em tripla hélice em sequências de colágeno isoladas pode ser induzida pela adição de inúmeras repetições de Gly-Pro-Hyp em ambas as extremidades de uma sequências de colágeno. Entretanto, mesmo com mais de 50% da sequência de polipeptídeo consistindo em repetições de Gly-Pro-Hyp, as triplas hélices resultantes podem não ter estabilidade térmica suficiente para sobreviver a condições fisiológicas. Embora possa ser alcançada uma estabilização substancial na estrutura triplo-helicoidal com a introdução de ligações covalentes entre as regiões C-terminal das três cadeias de peptídeos, o grande tamanho (90 a 125 resíduos e aminoácidos) dos compostos de peptídeos triplo-helicoidais "ramificados" resultantes torna-os difícil de sintetizar e purificar (conforme discutido na patente US 6.096.863 e referências nessa). Apesar dos CRPs oligomerizados, via montagem de dendrímero ou reticulação covalente, poderem induzir efetivamente a agregação plaquetária sem serem imobilizados, falta essa propriedade nos CRPs menos organizados como aqueles que têm uma sequência (PGO)<sub>10</sub> de (Rao GHR, Fields CG, White JG e Fields GB, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13899–13903; Morton LF, Hargreaves PG, Farndale RW, Young RD e Barnes MJ, *Biochem. J.* **1995**, *306*, 337–344; Knight CG, Morton LF, Onley DJ, Peachey AR, Ichinohe T, Okuma M, Farndale RW e Barnes MJ. *Cardiovasc. Res.* **1999**, *41*, 450–457). A disponibilidade e utilidade dos CRPs capazes de automontagem têm dependido da facilidade de sua preparação, da simplicidade e estabilidade da estrutura da CRP e do potencial da atividade de agregação. Embora a síntese possa ser desafiadora e relativamente complexa, materiais baseados em CRP e em escala de micrômetros foram obtidos a partir da automontagem de entidades triplas torcidas, anexadas covalentemente pelo emprego de um nó de cisteína (Koide T, Homma DL, Asada S e Kitagawa K, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5230–5233; e Kotch F e Raines RT, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2006**, *103*, 3028–3033).

Portanto, ainda são necessárias abordagens simplificadas para construir um motivo estrutural similar ao colágeno para facilitar o alinhamen-

to de peptídeos e iniciação e propagação de fibrilas. Especificamente, são necessários CRPs relativamente curtos de única hélice que sejam facilmente sintetizados e capazes de automontagem não covalente em trímeros que têm propriedades de mimetizar o colágeno. Também há uma necessidade na técnica por substratos inovadores que tenham propriedades hemostáticas intensificadas ou atividade hemostática e que possam, conseqüentemente, estimular a hemóstase, e por métodos inovadores para estimular hemóstase.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere amplamente a um polipeptídeo relacionado ao colágeno (CRP - collagen-related peptides) capaz de automontagem não covalente em um trímero que tem propriedades de mimetizar o colágeno.

O CRP tem um aminoácido hidrofóbico natural ou sintético na região N-terminal e C-terminal em cada extremidade, em que os aminoácidos mencionados são capazes de iniciar a propagação de fibrilas para formar fibrilas similares ao colágeno.

A presente invenção também se refere a um CRP de fórmula (I):

B-(Z)<sub>m</sub>-X

em que

Z é um triplete selecionado do grupo consistindo em Gly-Pro-J, Pro-J-Gly e J-Gly-Pro;

J é, independentemente, selecionado do grupo que consiste em Hp, fPro, mPro e Pro para cada triplete Z;

m é um número inteiro selecionado a partir de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15;

por exemplo, se Z é Gly-Pro-J e m é 8, então cada um dos oito substituintes de J é, independentemente, selecionado do grupo que consiste em Hyp, fPro, mPro e Pro; e

B e X são independentemente selecionados do grupo que consiste em F<sub>5</sub>-Phe, Phe (opcionalmente mono ou dissubstituída na fenila com flúor, cloro, bromo, hidróxi, metila ou CF<sub>3</sub>), Tyr, 3,4-(OH)<sub>2</sub>-Phe, MeO-Tyr, fe-

nilglicina, 2-naftil-Ala, 1-naftil-Ala, Trp, Cha, Chg, Met, Leu, Ile e Val.

Os CRPs aqui descritos são úteis na construção de colágenos sintéticos que podem ser usados para iniciar a agregação plaquetária e para o tratamento de diagnóstico de transtornos hemorrágicos. Os CRPs da presente invenção são adicionalmente úteis em composições como um hemostato.

Outro aspecto da presente invenção é um substrato de espuma hemostática inovador e um método inovador de fabricação destes substratos de espuma, conforme descrito adicionalmente mais adiante neste documento. Ainda outro aspecto da presente invenção é um método de estimulação de hemóstase inovador com o uso dos substratos de espuma inovadores da presente invenção, conforme descrito mais adiante neste documento.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 é uma curva de resposta à dosagem ilustrando a atividade dos CRPs que têm SEQ ID 25, SEQ ID 26, SEQ ID 27, SEQ ID 28, SEQ ID 34 e SEQ ID 35 comparadas ao colágeno para estimulação da agregação plaquetária.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção se refere amplamente a um CRP capaz de automontagem não covalente em um trímero que tem propriedades de mimetizar o colágeno.

O CRP tem um aminoácido hidrofóbico natural ou sintético na região N-terminal e C-terminal em cada extremidade, sendo que os aminoácidos mencionados são capazes de iniciar a propagação de fibrilas para formar fibrilas similares ao colágeno.

A presente invenção também se refere a um CRP de fórmula (I):

B-(Z)m-X

em que

Z é um triplete selecionado do grupo consistindo em Gly-Pro-J, Pro-J-Gly e J-Gly-Pro;

J é, independentemente, selecionado do grupo que consiste

em Hp, fPro, mPro e Pro para cada triplete Z;

m é um número inteiro selecionado a partir de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15;

5 por exemplo, se Z é Gly-Pro-J e m é 8, então cada um dos oito substituintes de J é, independentemente, selecionado do grupo que consiste em Hyp, fPro, mPro e Pro; e

B e X são independentemente selecionados do grupo que consiste em F<sub>5</sub>-Phe, Phe (opcionalmente mono ou dissubstituída na fenila com flúor, cloro, bromo, hidróxi, metila ou CF<sub>3</sub>), Tyr, 3,4-(OH)<sub>2</sub>-Phe, MeO-Tyr, fe-  
10 nila-Gly, 2-naftil-Ala, 1-naftil-Ala, Trp, Cha, Chg, Met, Leu, Ile e Val.

Os CRPs da presente invenção são capazes de automontagem não covalente em um trímero. O trímero de CRP resultante é adicionalmente capaz de automontagem de ordem mais alta por interações hidrofóbicas or-  
denadas e de empilhamento aromático não covalente, em fibrilas similares  
15 ao colágeno.

Uma modalidade da presente invenção inclui uma substância fibrilar similar ao colágeno que compreende uma pluralidade de CRPs da presente invenção.

20 Modalidades da presente invenção incluem uma substância fibrilar similar ao colágeno que compreende uma pluralidade de CRPs da presente invenção, sendo que os CRPs estão presentes na substância fibrilar similar ao colágeno na forma de uma pluralidade de trímeros de CRP.

Em uma modalidade da invenção, o trímero de CRP é um homotrímero, sendo que os três CRPs são homólogos.

25 Em uma modalidade da invenção, o trímero de CRP é um heterotrímero, sendo que os três CRPs são heterólogos.

Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que Z é um triplete selecionado do grupo que consiste em Gly-Pro-J, Pro-J-Gly e J-Gly-Pro, em que J é Hyp em pelo menos quatro tripletos Z consecutivos.

30 Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que J é, independentemente, selecionado do grupo que consiste em Hyp, fPro e Pro para cada triplete Z.

Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que J é, independentemente, selecionado do grupo que consiste em Hyp e Pro para cada triplete Z.

5 Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que m é 10.

10 Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que B e X são independentemente selecionados do grupo que consiste em F<sub>5</sub>-Phe, Phe (opcionalmente mono ou dissubstituída na fenila com flúor, cloro, bromo, hidróxi, metila ou CF<sub>3</sub>), Tyr, 3,4-(OH)<sub>2</sub>-Phe, MeO-Tyr, fenilglicina, 2-naftil-Ala, 1-naftil-Ala, Trp, Cha, Chg, Met, Leu, Ile e Val.

Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que B e X são independentemente selecionados do grupo que consiste em F<sub>5</sub>-Phe, Phe e Leu.

15 Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que B é selecionado do grupo que consiste em F<sub>5</sub>-Phe, Phe (opcionalmente mono ou dissubstituída na fenila com flúor, hidróxi, metila ou CF<sub>3</sub>), Tyr, 3,4-(OH)<sub>2</sub>-Phe, MeO-Tyr, fenilglicina, 2-naftil-Ala, 1-naftil-Ala, Trp, Cha, Chg e Leu.

20 Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que B é selecionado do grupo que consiste em F<sub>5</sub>-Phe, Phe (opcionalmente mono ou dissubstituída na fenila com fluoro, hidróxi, metila ou CF<sub>3</sub>) e Leu.

Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que B é selecionado do grupo que consiste em F<sub>5</sub>-Phe, Phe e Leu.

25 Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que X é selecionado de um grupo que consiste em Phe (opcionalmente mono ou dissubstituída na fenila com flúor, cloro, bromo, hidróxi, metila ou CF<sub>3</sub>), Tyr, 3,4-(OH)<sub>2</sub>-Phe, MeO-Tyr, fenilglicina, 2-naftil-Ala, 1-naftil-Ala, Trp, Cha, Chg, Met, Leu, Ile e Val.

30 Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I), em que X é Phe.

Uma modalidade da invenção é um CRP de fórmula (I) selecionado a partir de:

SEQ ID 1: B-(Gly-Pro-Hyp)<sub>4</sub>-(Gly-Pro-J)<sub>n</sub>-X, em que n é um número inteiro selecionado a partir de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11;

SEQ ID 2: B-(Gly-Pro-Hyp)<sub>8</sub>-(Gly-Pro-J)<sub>p</sub>-X, em que p é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

5 SEQ ID 3: B-(Gly-Pro-Hyp)<sub>12</sub>-(Gly-Pro-J)<sub>q</sub>-X, em que q é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 ou 3;

SEQ ID 4: B-(Pro-Hyp-Gly)<sub>4</sub>-(Pro-J-Gly)<sub>n</sub>-X, em que n é um número inteiro selecionado a partir de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11;

10 SEQ ID 5: B-(Pro-Hyp-Gly)<sub>8</sub>-(Pro-J-Gly)<sub>p</sub>-X, em que p é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

SEQ ID 6: B-(Pro-Hyp-Gly)<sub>12</sub>-(Pro-J-Gly)<sub>q</sub>-X, em que q é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 ou 3;

SEQ ID 7: B-(Hyp-Gly-Pro)<sub>4</sub>-(J-Gly-Pro)<sub>n</sub>-X, em que n é um número inteiro selecionado a partir de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11;

15 SEQ ID 8: B-(Hyp-Gly-Pro)<sub>8</sub>-(J-Gly-Pro)<sub>p</sub>-X, em que p é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7; ou

SEQ ID 9: B-(Hyp-Gly-Pro)<sub>12</sub>-(J-Gly-Pro)<sub>q</sub>-X, em que q é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 ou 3.

20 Em modalidades alternativas, o CRP de fórmula (I) é selecionado a partir de:

SEQ ID 10: B-(Gly-Pro-J)<sub>n</sub>-(Gly-Pro-Hyp)<sub>4</sub>-X, em que q é um número inteiro selecionado a partir de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11;

SEQ ID 11: B-(Gly-Pro-J)<sub>p</sub>-(Gly-Pro-Hyp)<sub>8</sub>-X, em que q é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

25 SEQ ID 12: B-(Gly-Pro-J)<sub>q</sub>-(Gly-Pro-Hyp)<sub>12</sub>-X, em que q sendo que q é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 ou 3;

SEQ ID 13: B-(Pro-J-Gly)<sub>n</sub>-(Pro-Hyp-Gly)<sub>4</sub>-X, em que n sendo que q é um número inteiro selecionado a partir de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11;

30 SEQ ID 14: B-(Pro-J-Gly)<sub>p</sub>-(Pro-Hyp-Gly)<sub>8</sub>-X, em que p sendo que q é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7;

SEQ ID 15: B-(Pro-J-Gly)<sub>q</sub>-(Pro-Hyp-Gly)<sub>12</sub>-X, em que q sendo que q é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 ou 3;

SEQ ID 16: B-(J-Gly-Pro) $n$ -(Hyp-Gly-Pro) $4$ -X, em que  $n$  sendo que  $q$  é um número inteiro selecionado a partir de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11;

SEQ ID 17: B-(J-Gly-Pro) $p$ -(Hyp-Gly-Pro) $8$ -X, em que  $p$  sendo que  $q$  é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7; ou

5 SEQ ID 18: B-(J-Gly-Pro) $q$ -(Hyp-Gly-Pro) $12$ -X, em que  $q$  é um número inteiro selecionado a partir de 0, 1, 2 ou 3.

Ainda em outras modalidades, o CRP de fórmula (I) é selecionado a partir de:

10 SEQ ID 19: B-(Gly-Pro-J) $r$ -(Gly-Pro-Hyp) $4$ -(Gly-Pro-J) $s$ -X, em que  $r$  e  $s$  são, cada, um número inteiro selecionado a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 e, em que a combinação de (Gly-Pro-J) $r$ , (Gly-Pro-J) $s$  e (Gly-Pro-Hyp) $4$  não excede (Z) $15$ ;

15 SEQ ID 20: B-(Gly-Pro-J) $t$ -(Gly-Pro-Hyp) $8$ -(Gly-Pro-J) $u$ -X, em que  $t$  e  $u$  são, cada, um número inteiro selecionado a partir de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 e, em que a combinação de (Gly-Pro-J) $t$ , (Gly-Pro-J) $u$  e (Gly-Pro-Hyp) $8$  não excede (Z) $15$ ;

20 SEQ ID 21: B-(Pro-J-Gly) $r$ -(Pro-Hyp-Gly) $4$ -(Pro-J-Gly) $s$ -X, em que  $r$  e  $s$  são, cada, um número inteiro selecionado a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 e, em que a combinação de (Pro-J-Gly) $r$ , (Pro-J-Gly) $s$  e (Gly-Pro-Hyp) $4$  não excede (Z) $15$ ;

SEQ ID 22: B-(Pro-J-Gly) $t$ -(Pro-Hyp-Gly) $8$ -(Pro-J-Gly) $u$ -X, em que  $t$  e  $u$  são, cada, um número inteiro selecionado a partir de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 e, em que a combinação de (Pro-J-Gly) $t$ , (Pro-J-Gly) $u$  e (Gly-Pro-Hyp) $8$  não excede (Z) $15$ ;

25 SEQ ID 23: B-(J-Gly-Pro) $r$ -(Hyp-Gly-Pro) $4$ -(J-Gly-Pro) $s$ -X, em que  $r$  e  $s$  são, cada, um número inteiro selecionado a partir de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 e, em que a combinação de (J-Gly-Pro) $r$ , (J-Gly-Pro) $s$  e (Gly-Pro-Hyp) $4$  não excede (Z) $15$ ; ou

30 SEQ ID 24: B-(J-Gly-Pro) $t$ -(Hyp-Gly-Pro) $8$ -(J-Gly-Pro) $u$ -X, em que  $t$  e  $u$  são, cada, um número inteiro selecionado a partir de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 e, em que a combinação de (J-Gly-Pro) $t$ , (J-Gly-Pro) $u$  e (Gly-Pro-Hyp) $8$  não excede (Z) $15$ .

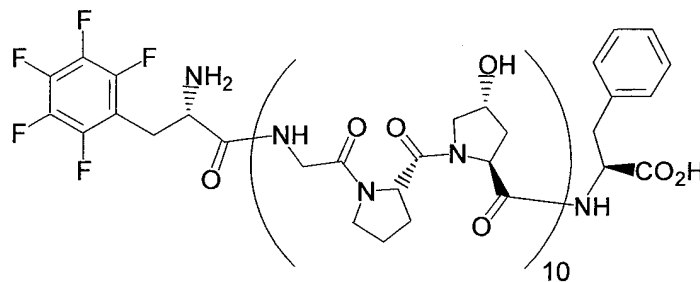
Em certas modalidades, o CRP de fórmula (I) é selecionado a partir de:

- 5 SEQ ID 25: F<sub>5</sub>Phe-(Gly-Pro-Hyp)10-Phe;  
 SEQ ID 26: Phe-(Gly-Pro-Hyp)10-Phe;  
 SEQ ID 27: Leu-(Gly-Pro-Hyp)10-Phe;  
 SEQ ID 31: F<sub>5</sub>Phe-(Gly-Pro-Hyp)9-Phe;  
 SEQ ID 32: Phe-(Gly-Pro-Hyp)9-Phe; e  
 SEQ ID 33: Leu-(Gly-Pro-Hyp)9-Phe.

10 Na discussão da presente invenção, outras sequências de polipeptídeos incluem:

- Comparador SEQ ID 28: Gly-(Gly-Pro-Hyp)10-Gly;  
 Comparador SEQ ID 29: Ac-(Gly-Pro-Hyp)10-Gly;  
 Referência SEQ ID 30: (Pro-Hyp-Gly)4-(Pro-Hyp-Ala)-(Pro-Hyp-Gly)5;  
 15 Referência SEQ ID 34: (Pro-Hyp-Gly)10; e  
 Comparador SEQ ID 35: F<sub>5</sub>Phe-(Gly-Pro-Hyp)5-Ph.

A título de exemplo, um CRP da fórmula (I) tendo uma SEQ ID 25 tem a seguinte estrutura:



20 A presente invenção se refere adicionalmente a um método de formação de uma substância fibrilar similar ao colágeno, compreendendo as etapas de seleção de uma pluralidade de CRPs de fórmula (I) e, mistura da pluralidade de CRPs sob condições aquosas favoráveis para iniciar e propagar a formação de uma pluralidade de trímeros, compósitos supramoleculares e fibrilas similares ao colágeno.

25 Em uma modalidade do método, a pluralidade de trímeros de CRP é selecionada a partir de um pluralidade de homotrímeros, heterotrímeros e misturas dos mesmos.

Em uma modalidade do método, a substância fibrilar similar ao colágeno é selecionada a partir de uma pluralidade de compósitos supramoleculares ou fibrilas similares ao colágeno.

5 Em uma modalidade do método, as condições aquosas favoráveis compreendem adicionalmente a mistura da pluralidade de peptídeos relacionados ao colágeno em água ou em uma solução salina aquosa a uma temperatura menor que cerca de 50°C.

10 Em uma modalidade do método, a solução salina aquosa é selecionada a partir de salina tamponada, solução tampão de fosfato, solução salina balanceada de Hank, solução salina tamponada com fosfato, solução salina tamponada com Tris, solução salina tamponada com Hepes e misturas das mesmas.

Em uma modalidade do método, a solução salina aquosa é PBS.

15 Definições

A respeito das modalidades da presente invenção, as seguintes definições e outras fornecidas por toda esta especificação não devem ser interpretadas, dentro conhecimento pelo elemento versado na técnica, como limitadoras do escopo da presente invenção.

20 O termo "tripleto" refere-se a um conjunto de três aminoácidos conforme definido pelo conjunto Gly-Pro-J tendo os três aminoácidos Gly, Pro e J, o conjunto Pro-J-Gly tendo os três aminoácidos Pro, J e Gly e, o conjunto J-Gly-Pro tendo os três aminoácidos J, Gly e Pro.

25 O termo "homotrímero" refere-se a uma tripla hélice formada por três CRPs idênticas de fórmula (I).

O termo "heterotrímero" refere-se a uma tripla hélice formada pelos CRPs fórmula (I).

O termo "trímero" refere-se a uma tripla hélice formada por três CRPs de fórmula (I).

30 O termo "compósitos supramoleculares" refere-se a trímeros de CRP montados de várias formas, incluindo fibrilas similares ao colágeno e estruturas fibrilares.

Os termos "Ala" ou "A" referem-se ao aminoácido alanina; "Cha" refere-se ao aminoácido mimético ciclohexil-alanina; "Chg" refere-se ao aminoácido mimético cicloexil-glicina; "F<sub>5</sub>-Phe" refere-se ao aminoácido mimético 1,2,3,4,5-F<sub>5</sub>-fenilalanina; "fPro" refere-se ao aminoácido mimético (4R)-fluoroprolina; "Gly" ou "G" refere-se ao aminoácido glicina; "Hyp" ou "O" refere-se ao aminoácido mimético (4R)-hidroxiprolina; "Met" refere-se ao aminoácido metionina; "mPro" refere-se ao aminoácido mimético (4S)-metilprolina; "Phe" ou "F" refere-se ao aminoácido fenilalanina; "Pro" ou "P" refere-se ao aminoácido prolina; e "Tyr" refere-se ao aminoácido tirosina.

#### 10 Discussão da Invenção

Certos monômeros de automontagem foram descritos, nos quais mostrou-se por raio X em estado sólido que monômeros de éster dietílico de ácido fenileno dioxâmico metassubstituído são capazes de automontagem em uma cadeia helicoidal por meio de ligação de hidrogênio (ponta-a-ponta), com as hélices adjacentes alinhadas lado-a-lado por  $\pi$ -empilhamento (Blay G, Fernandez I, Pedro JR, Ruiz-Garcia R, Munoz MC, Cano J e Carrasco R, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1627-1630). O design inicial pelos inventores da presente invenção para um trímero de CRP de automontagem envolveu a anexação de um grupo amida de éster fenil oxâmico nas terminações N e C de uma sequência (GPO)<sub>10</sub> para facilitar a montagem ponta-a-ponta por meio de ligação de hidrogênio.

Entretanto, devido à forte interação de empilhamento aromático não covalente entre o benzeno e o hexafluorobenzeno (Hunter CA e Sanders JKM, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525–5534; Gdaniec M, Jankowski W, Milewska MJ e Poloński T, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3903–3906 (também, Referências 9 e 10 citadas nesses); e Lozman OR, Bushby RJ e Vinter JG, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1446–1453), os inventores da presente invenção levantaram a hipótese de que o empilhamento aromático (ponta-a-ponta e lado-a-lado) e interações hidrofóbicas ordenadas tornariam os trímeros de CRP da presente invenção adicionalmente capazes de automontagem de alta ordem em fibrilas e fibras similares ao colágeno.

Como um resultado, o design de automontagem por ligação de

hidrogênio evoluiu para o design da presente invenção na qual as interações entre os grupos hidrofóbicos e aromáticos foram utilizadas para a montagem ponta-a-ponta por  $\pi$ -empilhamento e interações hidrofóbicas ordenadas. As sequências dos CRPs lineares da presente invenção são capazes de auto-

5 montar-se em trímeros e, subsequentemente, em compósitos e fibrilas supramoleculares através de meios não covalentes. Outros pesquisadores observaram que a sequência de colágeno inclui regiões de telopeptídeo contendo especificamente resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos como Tyr, Phe e Leu. A importância de tais resíduos de aminoácidos hidro-

10 fóbicos e aromáticos para a automontagem triplo-helicoidal tem sido indicada (Helseth DL, Jr. e Veis A, *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 7118-7128; Prockop DJ e Fertala A, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15598-15604; and, Traub W, *FEBS Letters* **1978**, 92, 114-120).

Como consequência, investigou-se o potencial para iniciar a

15 propagação de fibrila por um trímero de CRP da presente invenção, por exemplo, por um trímero de CRP tendo uma sequência SEQ ID 25: F<sub>5</sub>Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Phe. Conforme mostrado abaixo no exemplo 3, modelagem molecular computacional foi usada para avaliar a interface entre os dois trímeros de CRP cabeça-a-cauda que têm SEQ ID 25. Um campo de força

20 XED (distribuição de elétrons prolongada) foi usado para atrair as duas triplas hélices entre si. À medida que as triplas hélices se aproximavam uma da outra, os pares fenila/pentafluorofenila adotaram uma orientação face-a-face, resultando em uma energia de ligação de interface total de -231,0 kJ/mol (-55,2 kcal/mol). Quando os anéis aromáticos foram colocados em

25 uma orientação borda-a-face, a montagem reminimizada reverteu à orientação face-a-face.

As interfaces dos trímeros de CRP análogos que têm sequências SEQ ID 26: Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Phe e SEQ ID 27: Leu-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Phe, também foram examinados. Comparativamente, no caso da

30 sequência SEQ ID 26, foi observada um energia de interface mais baixa (energia total de -205,9 kJ/mol (-49,2 kcal/mol)) sem interações face-a-face simétricas observadas. Uma queda adicional na energia de ligação ocorreu

para a SEQ ID 27 (energia/total -136,0 kJ/mol (-32,5 kcal/mol)). As fortes interações entre as extremidades opostas dos trímeros de CRP tendo SEQ ID 25 e as interações entre as extremidades opostas dos trímeros de CRP tendo SEQ ID 26 e SEQ ID 27 apóiam a hipótese do inventor de que o potencial dos trímeros de CRP da presente invenção inicia a propagação de fibrila devido ao empilhamento aromático e interações hidrofóbicas entre os trímeros de CRP.

Embora o trabalho de modelagem tenha examinado a interface ponta-a-ponta dos trímeros de CRP para iniciar a propagação de fibrila, o escopo da presente invenção pretende incluir outras interfaces possíveis como as interfaces desalinhas nas quais ocorrem interações hidrofóbicas em uma orientação ponta-a-ponta entre CRPs em diferentes locais dentro de um trímero de CRP e interações lado-a-lado com trímeros de CRP adjacentes onde for permitido pelas interações hidrofóbicas, como no casos do telopeptídeos de colágeno.

#### Configurações CRP

Em adição às modalidades não limitadoras anteriormente mencionadas, a presente invenção abrange também os CRPs e homotrímeros e heterotrímeros dos mesmos que consistem em sequências em qualquer combinação representativa da fórmula (I).

O comprimento geral de um CRP conforme descrito na presente invenção pode estar em uma faixa de 26 aminoácidos até 47 aminoácidos. Em uma modalidade da presente invenção, o comprimento geral de um CRP pode ser de até 32 aminoácidos.

Um CRP conforme descrito na presente invenção pode ser polimerizado ou ligado a um parceiro de acoplamento peptídeo ou não peptídeo por exemplo, mas não se limitando a, uma molécula efetora, um rótulo, um marcador, uma droga, uma toxina, um veículo ou molécula de transporte ou uma molécula alvo como um anticorpo ou fragmento de ligação desses ou outro ligante. Técnicas para acoplar um polipeptídeo de CRP aos parceiros de acoplamento peptídeos e não peptídeos são bem conhecidas na técnica.

Em algumas modalidades, um CRP conforme descrito na presente invenção pode ser revestido em uma superfície sólida ou suporte insolúvel. O suporte pode estar na forma particulada ou sólida, incluindo por exemplo uma placa, tubo de ensaio, cápsulas, esfera, um filtro, tecido, polímero ou uma membrana. Métodos para fixar um polipeptídeo de CRP a superfícies sólidas ou suportes insolúveis são conhecidos pelos versados na técnica.

Em algumas modalidades, o suporte pode ser uma proteína, por exemplo uma proteína do plasma ou uma proteína de tecido, como uma imunoglobulina ou fibronectina. Em outras modalidades, o suporte pode ser sintético e pode ser, por exemplo, um polímero biocompatível, biodegradável. Polímeros adequados incluem polietileno glicóis, poliglicolídeos, polilactídeos, polioésteres, polianidridos, polifosfazenos, e poliuretanos. Um outro aspecto da invenção fornece um conjugado incluindo um polipeptídeo, conforme descrito na presente invenção, anexado a um polímero inerte.

A inclusão de grupos reativos em uma das extremidades do CRP permite o acoplamento químico a carreadores inertes de modo que o produto resultante pode ser liberado a lesões patológicas como ferimentos crônicos ou lugares de ferimentos traumáticos agudos sem entrar na corrente sanguínea.

Os CRPs da presente invenção podem ser gerados total ou parcialmente por síntese química, por exemplo, de acordo com métodos de síntese de peptídeos bem estabelecidos, como líquido padrão ou, de preferência, em fase sólida, cujas descrições gerais são amplamente disponíveis (consultar, por exemplo, em J.M. Stewart e J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2a. Edição, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, EUA (1984); em M. Bodanzsky e A. Eodanzsky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, New York, EUA (1984); em J. H. Jones, *The Chemical Synthesis of Peptides*. Oxford University Press, Oxford 1991; em *Applied Biosystems 430A Users Manual*, ABI Inc., Foster City, Califórnia, em G. A. Grant, (Ed.) *Synthetic Peptides, A User's Guide*. W. H. Freeman & Co., New York 1992, EUA, E. Atherton e R.C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthe-*

sis, A Practical Approach. IRL Press 1989 e em G.E. Fields, (Ed.) Solid-Phase Peptide Synthesis (Methods in Enzymology Vol. 289). Academic Press, New York, EUA, e Londres 1997), ou podem ser preparados em solução, pelo método de fase líquida ou por qualquer combinação de fase sólida, fase líquida e química de solução.

#### Modificações Estruturais da CRP

O CRP conforme descrito na presente invenção pode ser quimicamente modificado, por exemplo, pela adição de uma ou mais moléculas de polietileno glicol, açúcares, fosfatos, e/ou outras moléculas, em que a molécula ou moléculas não são naturalmente anexadas a proteínas de colágeno de ocorrência natural. Modificações químicas adequadas de CRPs e métodos de preparo de CRPs por síntese química são bem conhecidos pelos versados na técnica e também são abrangidos pela presente invenção. O mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo grau ou em grau variado em vários locais no CRP. Além disso, as modificações podem ocorrer em qualquer lugar na sequência de CRP, incluindo na cadeia principal do CRP, em quaisquer cadeias laterais de aminoácidos e no terminal amino ou carboxila. Conseqüentemente, um dado CRP pode conter muitos tipos de modificações.

Como indicado acima, o CRP conforme descrito na presente invenção pode ser estruturalmente modificado. Um CRP estruturalmente modificado é substancialmente similar na forma tridimensional e na atividade biológica ao CRP aqui descrito e compreende, de preferência, uma disposição espacial de porções químicas reativas que se assemelha muito à disposição tridimensional dos grupos ativos na sequência do CRP. Modificações adicionais também podem ser feitas pela substituição de grupos químicos dos aminoácidos com outros grupos de estrutura similar.

Adicionalmente, os CRPs conforme descritos na presente invenção podem ser estruturalmente modificados para compreender um ou mais D-aminoácidos. Por exemplo, um CPR pode ser um enantiômero no qual um ou mais resíduos de L-aminoácido na sequência de aminoácidos do CRP são substituídos pelo resíduo de D-aminoácido correspondente ou um

polipeptídeo inverso-D, que é um polipeptídeo que consiste em D-aminoácidos dispostos em ordem inversa quando comparados à sequência de L-aminoácidos descrita acima (Smith CS, et al., Drug Development Res., **1988**, 15, pp. 371-379). Métodos de preparação de polipeptídeos estruturalmente modificados adequados são bem conhecidos na técnica.

#### Composições de CRP

Os CRPs da presente invenção podem ser isolados e/ou purificados e subsequentemente usados conforme desejado. Em uma modalidade da presente invenção, os CRPs podem ser usados em uma composição, como uma composição farmacêutica ou uma composição adequada ao uso como um dispositivo médico, que pode incluir um ou mais componentes opcionais incluindo, mas não se limitando a, um ou mais excipientes conhecidos na técnica. Em adição a essas modalidades não limitadoras, a presente invenção também abrange CRPs, assim como homotrímeros e heterotrímeros dos mesmos, que consistem em sequências em qualquer combinação representativa da fórmula (I) nessas composições.

Certos polipeptídeos foram descritos para uso em várias composições farmacêuticas, dispositivos médicos, e produtos combinados. Por exemplo, a publicação internacional WO07/044026 descreve um peptídeo mimético do colágeno com arcabouço de polietileno glicol hidrogel diacrilato para reparo de cartilagem danificada. A publicação de patente US US2006/073207 descreve uma composição de coacervato amorfo de heparinato de colágeno/elastina/sódio bovino para várias aplicações médicas. A publicação de patente US US2005/147690 descreve composições de um filme de poliuretano modificado que tem uma superfície incrustada de colágeno/elastina/heparina para uso em um enxerto vascular. A publicação de patente japonesa 2005060550 descreve composições para adesão a substratos contendo a sequência de polipeptídeo Pro-Y-Gly (sendo que Y representa Pro ou Hyp), que tem uma estrutura de tripla-hélice com um peso molecular de 100.000 a 600.000. A publicação de patente japonesa 2005060315 descreve composições farmacêuticas contendo uma sequência de polipeptídeos Pro-Y-Gly (sendo que Y representa Pro ou Hyp) tendo uma

estrutura de tripla-hélice com peso molecular de 100.000 a 600.000 e vitamina C. A publicação de patente japonesa 2005060314 descreve composições cosméticas contendo uma sequência de polipeptídeos Pro-Y-Gly (sendo que Y representa Pro ou Hyp) tendo uma estrutura de tripla-hélice com peso molecular de 100.000 a 600.000. A publicação de patente japonesa 2005058499 descreve uma composição de tecido não trançado impregnado com um polipeptídeo de sequência Pro-Y-Gly (sendo que Y representa Pro ou Hyp), tendo uma estrutura triplo-helicoidal com peso molecular de 100.000 a 600.000, que pode ser degradada pela colagenase. A publicação de patente japonesa 2005058106 descreve composições comestíveis contendo uma sequência de polipeptídeos Pro-Y-Gly (sendo que Y representa Pro ou Hyp), tendo uma estrutura triplo-helicoidal com peso molecular de 100.000 a 600.000, que pode ser degradada pela colagenase. A publicação de patente japonesa 2005053878 descreve polipeptídeos tendo as sequências Pro-X-Gly e Pro-Y-Gly-Z-Ala-Gly (sendo que X representa Pro ou Hyp; Y representa Gln, Asn, Leu, Ile, Val ou Ala; e Z representa Ile ou Leu), tendo uma estrutura triplo-helicoidal com peso molecular de 70.000 a 600.000, que pode ser degradada pela colagenase. A publicação internacional WO98/52620 descreve compostos de biopolímeros com uma sequência Gly-Pro-Nleu covalentemente ligada a uma superfície ou superfícies de um material a granel biocompatível para uso como uma prótese de implante. A patente US 6.096.863 descreve complexos peptídeo-amfifilo tendo uma porção lipofílica e uma porção de peptídeo tendo uma sequência similar ao colágeno  $R_2O_2C(CH_2)_2CH(CO_2R_1)NHCO(CH_2)_2CO(Gly-Pro-Hyp)_{0-4}$ -[peptídeo]-(Gly-Pro-Hyp) $_{0-4}$ , em que  $R_1$  e  $R_2$  são, cada um, independentemente, um a vinte grupos hidrocarbila preparados via síntese de fase sólida. As patentes US 6.096.710 e 6.329.506 descrevem derivados de colágeno sintético triplo-helicoidais tendo tripletos de aminoácidos de repetição Gly-Xp-Pro, Gly-Pro-Yp, Gly-Pro-Hyp e Gly-Pro-Pro, em que Xp e Yp são resíduos de peptídeo selecionados a partir de aminoácidos N-substituídos.

A presente invenção estende-se a vários aspectos, não apenas aos CRPs conforme descritos na presente invenção, opcionalmente acopla-

dos a outras moléculas, peptídeos, polipeptídeos e membros de ligação específicos, mas inclui, também, uma composição farmacêutica, medicamento, droga, dispositivo médico ou componentes dos mesmos, ou outras composições que compreendem tais CRPs. Tal composição farmacêutica, medicamento, droga, dispositivo médico ou componentes dos mesmos, ou outra  
5 composição pode ser usada para vários propósitos, incluindo, mas não se limitando a fins de diagnóstico, terapêutica e prevenção.

A presente invenção também se estende ao uso de tais CRPs no preparo dessas composições e a um método para fazer tais composições compreendendo a mistura de CRPs com os excipientes opcionais desejados  
10 e outros ingredientes opcionais. Exemplos de excipientes adequados incluem, mas não se limitam a, veículos, carreadores, tampões, estabilizadores, e similares que são bem conhecidos na técnica.

Nas modalidades em que a composição é uma composição farmacêutica, a composição pode conter, em adição a tais CRPs, um agente secundário farmacologicamente ativo, em que o produto da combinação resultante pode ser adicionalmente misturado com um excipiente como aqueles bem conhecidos como farmacologicamente aceitáveis na técnica. Exemplos de tais excipientes adequados são apresentados em, por exemplo,  
15 Handbook of Pharmaceutical Excipients, (Quinta Edição, Outubro de 2005, Pharmaceutical Press, Eds. Rowe RC, Sheskey PJ e Weller P). Tais materiais não devem ser tóxicos e não devem interferir com a eficácia de tais CRPs ou de agentes secundários farmacologicamente ativos. Tais composições da presente invenção podem ser administradas de maneira localizada  
20 no local desejado ou podem ser aplicadas de modo que o CRP ou agentes secundários farmacologicamente ativos tenham como alvo tecidos ou células particulares. Agentes secundários farmacologicamente ativos adequados incluem, mas não se limitam a, hemostáticos (como trombina, fibrinogênio, ADP, ATP, cálcio, magnésio, TXA<sub>2</sub>, serotonina, epinefrina, fator plaquetário  
25 4, fator V, fator XI, PAI-1, trombospondina e similares e combinações dos mesmos), anti-infecciosos (como anticorpos, antígenos, antibióticos, agentes antivirais e similares e combinações dos mesmos), analgésicos e combina-

ções de analgésicos ou, agentes antiinflamatórios (como anti-histamínicos e similares).

No amplo uso de tais composições, a composição pode ser aplicada topicamente no local do ferimento como um hemostato, como por exemplo, uma formulação farmacêutica, ou como um componente de um curativo de ferimento. A composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, de maneira substancialmente simultânea ou sequencial dependendo do problema de saúde a ser tratado. Tais CRPs, sozinhos ou em um artigo ou dispositivo que compreenda esses CRPs, incluindo um curativo para ferimentos, podem ser fornecidos em um kit, por exemplo, lacrado em um recipiente adequado que proteja o conteúdo do ambiente externo. Esse kit pode incluir instruções de uso.

Em uma modalidade, o CRP conforme descrito na presente invenção pode ser útil na simulação da hemóstase em trauma agudo, por exemplo, após um acidente de trânsito ou lesões de guerra, por meio da aplicação tópica aos ferimentos que de outro modo causariam perda sanguínea fatal. Um método de estimulação da hemóstase nesses locais de lesões pode compreender o contato do local com uma composição que compreende o CRP conforme descrito na presente invenção, em que a composição compreende um substrato de modo que o CRP esteja presente na superfície do substrato em uma quantidade suficiente para induzir e manter a hemóstase.

Em outra modalidade, o CRP conforme descrito na presente invenção pode ser útil na estimulação da hemóstase em lesões crônicas como úlceras. Sem se ater à teoria, em relação ao mecanismo proposto, acreditamos que o CRP pode agir primeiramente para aumentar a fixação celular, e então a liberação dos conteúdos ativados de grânulos de plaquetas pode estimular a migração de células da corrente sanguínea e dos tecidos próximos danificados que contribuem para o processo de cura. Um método de estimulação da hemóstase nesses locais de lesões crônicas em um indivíduo pode compreender o contato do local com uma composição que compreende o CRP conforme descrito na presente invenção, em que a composição compreende um substrato de modo que o CRP esteja presente na superfície do

substrato em uma quantidade suficiente para induzir a hemóstase.

Esses CRPs da presente invenção conforme descritos aqui podem ser amplamente úteis como reagentes preciosos em inúmeros testes de laboratório e clínicos, incluindo aqueles para diagnóstico de transtornos hemorrágicos. Por exemplo, tais CRPs conforme descritos na presente invenção podem ser úteis na construção de colágenos sintéticos que podem então ser usados para iniciar a agregação plaquetária. Em outro exemplo, tais CRPs podem ser úteis na investigação ou triagem de compostos de teste que inibem a agregação e ativação plaquetária e/ou coagulação sanguínea. Em um exemplo adicional, tais CRPs podem ser úteis como reagente para pesquisa sobre a ativação e/ou agregação de plaquetas. Um método de ativação e/ou agregação plaquetária pode compreender o tratamento de plaquetas com tais CRPs conforme descritos na presente invenção.

Em uma modalidade, as plaquetas podem ser tratadas *in vitro* na presença de plasma sanguíneo. A atividade das plaquetas tratadas, isto é, plaquetas após o contato com tais CRPs, conforme descritos na presente invenção, pode ser medida ou determinada, por exemplo, na presença ou ausência de um fator ou agente, composição de teste ou substância de interesse, empregando experimentos de controle adequados conforme esperado na técnica. O efeito de um fator sobre a ativação plaquetária e/ou agregação pode ser determinado por um método que compreende tratar as plaquetas com tais CRPs conforme descritos na presente invenção e determinar o efeito do fator sobre a ativação e/ou agregação plaquetária. A ativação e/ou agregação plaquetária pode ser determinada na presença ou ausência do fator ou com o fator em diferentes concentrações.

Em outra modalidade da presente invenção, tais CRPs também podem ser úteis no diagnóstico de transtornos plaquetários, como no diagnóstico que usa rotineiramente fibrilas de colágeno extraídas de tecidos animais como reagente em agregometria plaquetária, ou preparações de colágeno imobilizado como no Analisador de Função Plaquetária e outros instrumentos. Por exemplo, tais CRPs podem ser usados para investigar a atividade ou função plaquetária ou para diagnosticar uma disfunção na atividade

de plaquetária pela determinação da ativação e/ou agregação plaquetária em uma amostra tratada com CRPs, conforme descritos na presente invenção. Por exemplo, tais CRPs, conforme descritos na presente invenção, podem ser colocados em contato com uma amostra sanguínea obtida de um indivíduo, então a agregação das plaquetas pode ser determinada de acordo com métodos bem conhecidos na técnica.

Em outra modalidade da presente invenção, tais CRPs podem ser úteis como um revestimento de superfície bioativa que age para assegurar a adesão celular diretamente, bem como agregar e ativar as plaquetas localmente, como pela da contribuição para a produção e liberação de outras moléculas bioativas. Um método pode, por exemplo, compreender o contato das plaquetas com tais CRPs, conforme descrito na presente invenção, as quais podem ser imobilizadas sobre um suporte sólido ou semi-sólido, na presença de plasma sanguíneo, para agregar ou ativar as plaquetas no suporte ou próximo ao dito suporte.

Os CRPs da presente invenção também podem ser amplamente usados no tratamento de transtornos hemorrágicos.

Em uma modalidade, como os CRPs, conforme descritos na presente invenção, são adsorvidos ou de outro modo contidos no ou sobre um suporte sólido ou semi-sólido, como em um suporte de polímero inerte, o suporte resultante pode ser útil para servir como um composto auxiliar ou alternativo para a transfusão de plaquetas em casos de insuficiência plaquetária, o que pode resultar em trombocitopenia autoimune ou ablação terapêutica da medula óssea como na terapia de câncer, bem como em transtornos hemorrágicos a partir de outras causas, como a doença de Glanzmann. Nessa modalidade, os CRPs que são adsorvidos sobre ou de outro modo contidos dentro ou sobre um suporte sólido ou semi-sólido, podem ser administrados a um indivíduo que precise do mesmo, como, por exemplo, indivíduos que podem ter insuficiência plaquetária e/ou podem ter uma condição médica conforme especificado acima.

Tais CRPs conforme descritos na presente invenção, que são adsorvidos ou de outro modo contidos dentro ou sobre um suporte sólido ou

semi-sólido, podem ser úteis na indução de formação de trombo no aneurisma aórtico. Por exemplo, tais CRPs podem ser revestidos sobre o lado externo de uma espiral embólica para segurar o tecido e/ou evitar a dilatação de uma artéria distendida. Nessa modalidade, a formação de trombo no tecido vascular danificado de um indivíduo pode ser induzido por meio do contato do tecido vascular com tais CRPs conforme descritos na presente invenção, que são adsorvidos ou de outro modo contidos no ou sobre um suporte sólido ou semi-sólido, como em um suporte de polímero inerte. Exemplos de suportes de polímeros inertes aceitáveis incluem, mas não se limitam a, stents, espirais embólicas, e similares. Tal indivíduo pode sofrer de problemas médicos como, por exemplo, artéria ou outros vasos sanguíneos distendidos e/ou aneurisma aórtico. Em uma modalidade, o suporte pode ser um suporte polimérico inerte que compreende proteínas, polietileno glicol, ou lipossomas, que é revestido como um CRP instantâneo que adsorve ao suporte.

Tais CRPs da presente invenção, conforme descritos aqui, podem ser adicionalmente úteis em uma composição que compreende uma matriz de polímero tridimensional quimicamente definido suplementado com os ditos peptídeos relacionados ao colágeno para a diferenciação direcionada de células-tronco embrionárias. A publicação internacional WO07/075807, aqui incorporada inteiramente por referência para todos os propósitos, descreve uma composição que compreende uma matriz de polímero tridimensional quimicamente definido suplementado com um polipeptídeo IV de colágeno que suporta a diferenciação direcionada de células-tronco embrionárias.

Ainda outra modalidade da presente invenção é direcionada a um método de tratamento de uma condição hemostática em um indivíduo que necessite do mesmo, compreendendo a administração de uma composição que compreende um CRP da presente invenção, em que a composição pode incluir, mas não se limitar a tais CRPs conforme descritos pela presente invenção. Uma composição de polipeptídeo pode opcionalmente incluir um substrato durante a administração. Tal composição pode ser tipi-

camente administrada de acordo com um regime suficiente para mostrar benefício ao indivíduo. A quantidade real administrada e a taxa e curso do tempo da administração, dependerão de vários fatores como, por exemplo, a natureza e severidade da doença ou problema de saúde sendo tratado. A  
5 composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com terapias adjuntivas de outros tratamentos, de modo simultâneo ou sequencial, dependendo da doença ou problema de saúde tratado.

De acordo com esse método para tratamento de um problema hemostático, a composição de CRP, conforme descrita pela presente inven-  
10 ção, pode ser usada sozinha ou em combinação com um excipiente e outros ingredientes opcionais para fornecer hemóstase. Em outra modalidade, tais CRPs podem ser combinados com um substrato adequado para uso como um hemostato. O hemostato da composição de CRP pode estar em variadas formas, que incluem, mas não se limitam a, um pó, uma fibra, um filme ou  
15 uma espuma.

As espumas contendo CRP podem ser preparadas por processos como, por exemplo, liofilização ou formação de espuma com solvente supercrítico. Detalhes desses processos são bem conhecidos na técnica e apresentados em, por exemplo, S. Matsuda, *Polymer J.*, **1991**, 23(5), 435-  
20 444 (liofilização) e pedido de patente europeia EP 464.163 B1 (formação de espuma com solvente supercrítico). Em geral, uma espuma liofilizada contendo CRP da presente invenção pode ser preparada primeiramente pela dissolução do CRP, e qualquer ingrediente opcional conhecido na técnica como, por exemplo, plastificantes, em um solvente adequado sob temperatu-  
25 ras suficientes para essa dissolução, e então derramando a solução contendo CRP dentro de um molde. O CRP pode estar presente na solução que o contém em uma quantidade, baseada no peso total da solução contendo CRP, em uma faixa de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 10 mg/mL, ou em uma faixa de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 1 mg/mL, ou cerca de 0,3  
30 mg/mL. Plastificantes adequados incluem, mas não se limitam a, glicerol, polietileno glicol, glicerina, propileno glicol, monoacetato de glicerol, diacetato de glicerol, triacetato de glicerol e misturas dos mesmos, e podem ser usa-

dos em uma quantidade, baseada no peso seco final da espuma contendo CRP, em uma faixa de cerca de 0,5 por cento a cerca de 15 por cento, ou em uma faixa de 1 por cento a cerca de 5 por cento. Para minimizar possíveis efeitos deletérios ao CRP, a temperatura de dissolução não deve exceder  
5 cerca de 50°C. A dissolução pode ser realizada sob condições aquosas favoráveis que incluem, mas não se limitam a, em água ou em soluções salinas aquosas, como a salina tamponada, solução tampão de fosfato, solução salina balanceada de Hank, solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução salina tamponada com Tris, solução salina tamponada com Hepes,  
10 e misturas das mesmas.

Em uma modalidade, os solventes podem ser tamponados para uma faixa de pH de cerca de 6 a cerca de 8. Depois do molde ser preenchido com a quantidade desejada de solução, o molde é então transferido para um liofilizador, que o congelará e então secará a vácuo a solução para re-  
15 mover o solvente da espuma resultante. Embora a espessura da espuma resultante possa variar dependendo de, por exemplo, a quantidade de solução dentro do molde, a concentração de CRP na solução, e similares, a espuma resultante tipicamente pode ter uma espessura em uma faixa de cerca de 0,5 mm a cerca de 10 mm, ou em uma faixa de cerca de 1 mm a cerca de  
20 5 mm, e um tamanho de poro em uma faixa de cerca de 1 micrón a cerca de 500 microns. As espumas podem ser feitas em uma variedade de tamanhos que podem ser adequados ao uso para enfrentar desafios hemostáticos em locais hemorrágicos.

Filmes contendo CRP podem ser preparados por processos  
25 como, por exemplo, fundição do filme a partir de um solvente adequado. Detalhes deste processo são bem conhecidos na técnica e foram apresentados em, por exemplo, Bagrodia S e Wilkes GL, "Effects of Solvent Casting Copolymer Materials As Related to Mechanical Properties", J Biomed Mater Res., 1976 (Jan), 10(1), 101-11. De acordo com esta modalidade, o CRP da  
30 presente invenção, juntamente com qualquer ingrediente opcional conhecido na técnica como por exemplo, plastificantes, pode ser dissolvido em uma quantidade suficiente de solvente aquoso. O CRP pode estar presente na

solução em uma quantidade, baseada no peso total da solução, em uma faixa de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 10 mg/mL, ou em uma faixa de 0,1 mg/mL a cerca de 1 mg/mL, ou cerca de 0,3 mg/mL. Plastificantes adequados incluem, mas não se limitam a glicerol, polietileno glicol, glicerina, propileno glicol, monoacetato de glicerol, diacetato de glicerol, triacetato de glicerol e misturas dos mesmos, e podem ser usados em uma quantidade, com base no peso seco final do filme contendo CRP, em uma faixa de cerca de 0,5 por cento a cerca de 15 por cento, ou em uma faixa de cerca de 1 por cento a cerca de 5 por cento.

Exemplos de solventes aquosos adequados incluem, mas não se limitam a, água, solventes orgânicos miscíveis, alcoóis e misturas dos mesmos. Exemplos de solvente orgânicos miscíveis adequados e alcoóis incluem, mas não se limitam a, acetona, etanol, isopropanol, propanol, metanol e similares e misturas dos mesmos. Para minimizar possíveis efeitos deletérios ao CRP, a temperatura de dissolução não deve exceder cerca de 50°C. A solução contendo CRP pode então ser adicionada, por exemplo, por gotejamento ou de outro modo, derramando uma quantidade adequada para cobrir uma área da superfície desejada em um substrato de fundição.

Exemplos de substratos de fundição adequados incluem aqueles que compreendem um material que liberará facilmente o filme contendo CRP, e podem incluir, mas não são limitados a, aqueles feitos de vidro, metal, recipientes revestidos por Teflon e similares. O tamanho e formato de tais substratos podem variar de acordo com as necessidades da composição. O solvente pode então ser removido da solução contendo CRP por evaporação ou por secagem a ar, então o filme resultante pode ser opcionalmente submetido a secagem por vários métodos, como através de secagem a vácuo, para remover qualquer solvente residual. Se um filme mais espesso for desejado, o processo pode ser repetido pela fundição de uma ou mais camadas da solução contendo CRP no topo da superfície superior do filme previamente fundido. Embora a espessura do filme resultante possa variar dependendo de, por exemplo, a quantidade de solução derramada sobre o substrato de fundição, a concentração dos CRPs na solução e similares, tipi-

camente a espessura de cada camada de filme pode estar numa faixa de cerca de 50 microns a cerca de 150 microns. Conforme especificado acima a respeito da espuma, os filmes podem também ser preparados em uma variedade de tamanhos.

5 Os pós contendo CRP podem ser obtidos por trituração, manualmente ou mecanicamente, ou pulverização de fibras, filmes, ou espumas compreendidas pelo CRP da presente invenção usando processos bem conhecidos na técnica. Técnicas exemplificadoras para trituração ou pulverização de fibras, filmes ou espumas em pós incluem, mas não se limitam a, aquelas que usam pilão e almofariz, lâmina giratória, ou esmeril de impacto, como um moinho de esferas. Esses e outros meios para a trituração dos CRP em um pó podem ser realizados à temperatura ambiente ou por processos de trituração criogênica, em temperaturas abaixo do ponto de congelamento do CRP. O pó resultante contendo CRP pode ser opcionalmente peneirado para obter um pó que tem tamanho de partícula na faixa de cerca de 1 micron a cerca de 2000 microns, ou em uma faixa de cerca de 10 microns a cerca de 500 microns.

Os pós, filmes e/ou espumas contendo CRP podem ser aplicados diretamente no local da hemorragia como um hemostato para acentuar ou causar hemóstase. Alternativamente, o CRP descrito na presente invenção pode ser aplicado em combinação com um componente do substrato, e em tais modalidades, o CRP é, deste ponto em diante no presente documento, referido como componente CRP-hemostato. O substrato pode ser um substrato adequado para a implantação em um indivíduo, ou pode ser um substrato não implantável.

Exemplos de substratos implantáveis adequados incluem, mas não se limitam a, dispositivos médicos, como âncoras de sutura, grampos, tachas cirúrgicas, cliques, parafusos, e filmes; arcabouços para engenharia tecidual, como feltros não trançados, tecidos ou redes trançadas; espumas; e pós. Esses substratos implantáveis podem compreender qualquer material adequado para a implantação no corpo e incluem, mas não se limitam a, polímeros biocompatíveis, bioabsorvíveis como poliésteres alifáticos, po-

li(aminoácidos) como a poli(L-lisina e poli(ácido glutâmico), copoli(éter-ésteres), oxalatos de polialquileno como aqueles que têm um comprimento do grupo alquila de um a dez átomos de carbono, polioxa-amidas, policarbonatos derivados de tirosina, poli(iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxa-ésteres, poliesteramidas, polioxaésteres contendo grupos amina, poli(anidridos), polifosfazenos, biomoléculas (incluindo biopolímeros como o colágeno, elastina, e gelatina, e polissacarídeos, como amidos, alginato, pectina, carbóxi metilcelulose, sais de carbóxi metilcelulose, celulose regenerada oxidada, e similares), e copolímeros e combinações dos mesmos, bem como materiais não absorvíveis incluindo, mas não se limitando a, algodão, linho, seda, nylon, como nylon 6-6 e poliamidas aromáticas, como aquelas comercialmente disponíveis junto à E. I. du Pont de Nemours e Companhia sob os nomes comerciais "KEVLAR" ou NOMEX, poliésteres, como poli(etileno tereftalato), fluoropolímeros, como o politetrafluoroetileno, poli(etileno-propileno) fluorados (FEP) e polivinilideno fluorado (PFA), poliolefinas, como polietileno e polipropileno, poliuretanos e combinações dos mesmos.

Para uso na presente invenção, "bioabsorvível" deverá referir-se a materiais que se degradam prontamente via reações enzimáticas ou hidrolíticas após exposição a tecido corporal por um período de tempo relativamente curto". "Degradar" deverá significar que o material se fragmenta em pequenos segmentos que podem ser substancialmente metabolizados ou eliminados pelo corpo. A bioabsorção completa deve ocorrer dentro de cerca de vinte meses, embora a bioabsorção possa ser completada por exemplo, dentro de cerca de nove meses, dentro de cerca de seis meses, ou dentro de cerca de três meses ou menos.

Para o propósito desta invenção, entende-se que os poli(iminocarbonatos) incluem os polímeros conforme descritos por Kemnitzer e Kohn, no *Handbook of Biodegradable Polymers*, editado por Domb, et. al., Hardwood Academic Press, pp. 251-272 (1997). Para o propósito desta invenção, entende-se que os copoli(éter-ésteres) incluem os copoliéster-éteres conforme descritos no *Journal of Biomaterials Research*, Vol. 22, pp. 993-

1009, 1988 por Cohn e Younes, e em *Polymer Preprints* (ACS Division of Polymer Chemistry), Vol. 30(1), página 498, 1989 por Cohn (por exemplo, PEO/PLA). Oxalatos de polialquileno, para o propósito desta invenção, incluem os descritos nas patentes U.S. 4.208.511, 4.141.087, 4.130.639, 5 4.140.678, 4.105.034 e 4.205.399. Para o propósito desta invenção, entende-se que policarbonatos derivados de tirosina incluem os polímeros conforme descritos por Pulapura et al., *Biopolymers*, Vol. 32, número 4, pp. 411-417, e Ertel et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1994**, 28, 919-930. Para o propósito desta invenção, entende-se que os polifosfazenos, polímeros à base de 10 monômero misto de co-, ter- e de ordem mais alta feitos a partir de L-lactídeo, D, L-lactídeo, ácido láctico, glicolídeo, ácido glicólico para-dioxanona, carbonato de trimetileno e épsilon-caprolactona incluem aqueles descritos por Allcock na *The Encyclopedia of Polymer Science*, Volume 13, pp. 31-41, Wiley Intersciences, John Wiley & Sons, 1988 e por Vandorpe, et al no *Handbook of Biodegradable Polymers*, editado por Domb, et al, Hardwood Academic Press, pp. 161-182 (1997). Para o propósito desta invenção, 15 entende-se que as poliésteramidas incluem os polímeros conforme descritos no pedido de patente US 20060188547, e na patente US 5.919.893. Os poli-anidridos incluem os derivados a partir de diácidos da forma HOOC-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH, na qual m é um número inteiro na faixa de 2 a 8, e copolímeros dos mesmos com alfa-omega diácidos alifáticos de até 12 átomos de carbono. Polioxaésteres, polioxa-amidas e polioxaésteres contendo 20 grupos amina e/ou amido são descritos em uma ou mais das seguintes patentes US 5.464.929, 5.595.751, 5.597.579, 5.607.687, 5.618.552, 25 5.620.698, 5.645. 850, 5.648.088, 5.698.213, 5.700.583 e 5.859.150. Para o propósito desta invenção, entende-se que os poliortoésteres incluem os polímeros conforme descritos por Heller no *Handbook of Biodegradable Polymers*, editado por Domb, et al, Hardwood Academic Press, pp. 99-118 (1997). Entende-se que os poliuretanos, para o propósito desta invenção, 30 incluem aqueles polímeros conforme descritos nas patentes US 6.326.410, 6019996, 5571529 e 4.960.594.

Entende-se que os poliésteres alifáticos, para o propósito desta invenção, incluem, mas não se limitam a, homopolímeros e copolímeros de lactídeo (que inclui ácido láctico D-, L- e meso lactídeo), glicolídeo (incluindo ácido glicólico), épsilon-caprolactona, p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona), carbonato de trimetileno (1,3-dioxan-2-ona), derivados alquila de carbonato de trimetileno, conforme descrito na patente US 5.412.068, delta-valerolactona, beta-butirolactona, gama-butirolactona, épsilon-decalactona, hidroxibutirato, hidroxivalerato, 1,4-dioxepan-2-ona (incluindo seu dímero 1,5,8,12-tetraoxaciclotetradecano-7,14-diona), 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-1,4-dioxan-2-ona e combinações dos mesmos.

Em uma modalidade, o poliéster alifático é um copolímero elastomérico. "Copolímeros elastoméricos" são definidos com um material que à temperatura ambiente pode ser estendido repetidamente a pelo menos cerca de duas vezes seu comprimento original e na liberação imediata do estresse, retornará aproximadamente ao seu tamanho original. Elastômeros biocompatíveis bioabsorvíveis incluem, mas não se limitam a, aqueles selecionados a partir do grupo que consiste em copolímeros elastoméricos de épsilon-caprolactona e glicolídeo (como aqueles que têm uma razão molar de épsilon-caprolactona para glicolídeo em uma faixa de cerca 30:70 a cerca de 70:30, ou em uma faixa de cerca de 35:65 a cerca de 65:35, ou em uma faixa de cerca de 45:55 a 35:65); copolímeros elastoméricos de épsilon-caprolactona e lactídeo, incluindo L-lactídeo, D-lactídeo, combinações dos mesmos ou copolímeros de ácido láctico (como aqueles que têm uma razão molar de épsilon-caprolactona para lactídeo em uma faixa de cerca 35:65 a cerca de 65:35, ou em uma faixa de cerca de 45:55 a 30:70) copolímeros elastoméricos de p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona) e lactídeo incluindo L-lactídeo, D-lactídeo e ácido láctico (como aqueles que têm uma razão molar de p-dioxanona para lactídeo em uma faixa de cerca de 40:60 a cerca de 60:40); copolímeros elastoméricos de épsilon-caprolactona e p-dioxanona (como aqueles que têm uma razão molar de épsilon-caprolactona para p-dioxanona em uma faixa de cerca de 30:70 a cerca de 70:30); copolímeros elastoméricos de p-dioxanona e carbonato de trimetileno (como aqueles que

têm uma razão molar de p-dioxanona para carbonato de trimetileno em uma faixa de cerca de 30:70 a cerca de 70:30); copolímeros elastoméricos de carbonato de trimetileno e glicolídeo (como aqueles que têm uma razão molar de carbonato de trimetileno para glicolídeo em uma faixa de cerca de 30:70 a cerca de 70:30); copolímeros elastoméricos de carbonato de trimetileno e lactídeo incluindo L-lactídeo, D-lactídeo, misturas dos mesmos ou copolímeros de ácido láctico (como aqueles que têm uma razão molar de carbonato de trimetileno para lactídeo em uma faixa de cerca de 30:70 a cerca de 70:30) e misturas do mesmos. Em outra modalidade, o copolímero elastomérico é epsilon-caprolactona e glicolídeo que tem uma razão molar entre epsilon-caprolactona e glicolídeo na faixa de cerca de 35:65 a cerca de 65:35. Em ainda outra modalidade, o copolímero elastomérico é epsilon-caprolactona e glicolídeo que tem uma razão molar de cerca de 35:65.

Exemplos de substratos não implantáveis adequados incluem, mas não se limitam a, bandagens e curativos para ferimentos. Para uso na presente invenção, uma "bandagem" deverá significar um pedaço de pano ou outro material usado para atar ou envolver uma parte do corpo doente ou ferida. As bandagens são colocadas diretamente sobre o ferimento ou usadas para atar um curativo ao ferimento. Para uso na presente invenção, um "curativo para ferimento" deverá significar um pedaço de pano ou outro material que é colocado diretamente sobre o ferimento e serve ao propósito de proteger o ferimento, promover a cura e/ou fornecer, reter, ou remover a umidade, e é opcionalmente mantido no lugar pelo uso de uma bandagem.

Substratos não implantáveis podem ser de várias formas incluindo, mas não se limitando a, tecidos, espumas, gazes, filmes, bandagens adesiva, hidrocoloides, géis e combinações dos mesmos. Esses substratos não implantáveis podem compreender qualquer material adequado para aplicação (sem implantação) ao corpo e incluem, mas não se limitam a, polímeros biocompatíveis e bioabsorvíveis como poliésteres alifáticos, poli(aminoácidos), como poli(L-lisina) e poli(ácido glutâmico), copoli(ésteres), oxalatos de polialquilenos como aqueles com grupos alquila tendo um a dez átomos de carbono, polioxa-amidas, policarbonatos derivados de

tirosina, poli(iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxaésteres, poliesteramidas, polioxaésteres contendo grupos amina, poli(anidridos), polifosfazenos, biomoléculas (incluindo biopolímeros como colágeno, elastina, e gelatina, e polissacarídeos, como amidos, alginato, pectina, carbóxi metilcelulose, sais de carbóxi metilcelulose, celulose regenerada oxidada e similares) e copolímeros e combinações dos mesmos, bem como materiais não bioabsorvíveis incluindo algodão, linho, seda, nylon, como nylon 6-6 e poliamidas aromáticas, como aquelas comercialmente disponíveis junto à E. I. du Pont de Nemours and Company sob os nomes comerciais "KEVLAR" ou "NOMEX", poliésteres, como poli(etileno tereftalato), fluoropolímeros como politerafluoroetileno, poli(etileno-propileno fluorado (FEP) e fluoreto de polivinilidino (PFA), poliolefinas como polietileno e polipropileno, poliuretanos e combinações dos mesmos Esses materiais são definidos conforme descrito acima.

O componente CRP-hemostato pode ser aplicado na superfície de tais substratos por meio de técnicas de revestimento convencionais, como revestimento por imersão, revestimento por aspensão, revestimento por liofilização, e técnicas de revestimento eletrostático. Detalhes destes métodos de revestimento são bem conhecidos na técnica e apresentados, por exemplo, na patente US 6.669.980; Yun JH, et al., 40(3) ASAIO J.M, 401-5 (Jul.-Set. 1994); e, Krogars K, et al, *Eur J Pharm Sci.*, **2002** (Oct.), 17 (1-2), 23-30. Em geral, uma solução contendo a quantidade desejada do componente CRP-hemostato pode ser preparada e aplicada à superfície do substrato desejado por meio da técnica de revestimento selecionada. O substrato pode então ser submetido a secagem por meio de processos de secagem convencionais incluindo, mas não se limitando a, secagem a ar, secagem a vácuo e em forno a vácuo, ou secagem a liofilização. O CRP deve ser usado em uma quantidade necessária para alcançar as propriedades hemostáticas desejadas, como coagulação sanguínea, agregação plaquetária, e similares, mas geralmente o CRP está presente com o propósito de substrato de revestimento em uma quantidade em uma faixa de cerca de 0,01 mg/cm<sup>2</sup> a cerca de 1 mg/cm<sup>2</sup> de substrato, ou em uma faixa de cerca de 0,1 mg/cm<sup>2</sup> a cerca de 0,5 mg/cm<sup>2</sup>, ou em uma faixa de cerca de 0,4 mg/cm<sup>2</sup>.

Em outra modalidade na qual o substrato é um gel injetável ou aspersível ou líquido formador de gel, o componente CRP-hemostato, que pode estar na forma de um pó ou substância fibrilar similar ao colágeno, pode ser combinado com um gel ou líquido injetável ou aspersível por meio de técnicas de mistura convencionais conhecidos na técnica. O gel injetável ou aspersível ou líquido formador de gel pode compreender uma solução salina aquosa e um material gelificante.

Exemplos adequados de solução salina aquosa incluem, mas não se limitam a, solução tampão fisiológica, solução salina, água, solução salina tamponada, solução tampão de fosfato, solução salina balanceada de Hank, PBS, solução salina tamponada com Tris, solução salina tamponada com HEPES, e misturas das mesmas. Em uma modalidade, a solução salina aquosa por ser uma solução tampão de fosfato ou PBS.

Exemplos de materiais gelificantes adequados incluem, mas não se limitam a proteínas como colágeno, elastina, trombina, fibronectina, gelatina, fibrina, tropoelastina, polipeptídeos, laminina, proteoglicanos, cola de fibrina, coágulo de fibrina, coágulo de plasma rico em plaquetas (PRP), coágulo de plasma pobre em plaquetas (PPP), hidrogéis de peptídeo de automontagem, e atelocolágeno; polissacarídeos como, amido, pectina, celulose, celulose alquila (por exemplo, metilcelulose), celulose alquila hidroxialquila (por exemplo, celulose etil hidroxietil), celulose hidroxialquila (por exemplo, celulose hidroxietil), sulfato de celulose, sais de carbóxi metilcelulose, carbóxi metilcelulose, carbóxi etil celulose, quitina, carbóxi metil quitina, ácido hialurônico, sais de ácido hialurônico, alginato, ácido algínico alginato de ligação cruzada, propileno glicol alginato, glicogênio, dextrana, sulfato de dextrana, curdlana, pectina, pululana, xantana, condroitina, sulfatos de condroitina, carbóxi metil dextrana, carbóxi metil quitosana, quitosana, heparina, sulfato de heparina, heparana, sulfato de heparana, sulfato de dermatana, sulfato de queratana, carragenanas, quitosana, amido, amilose, amilopectina, poli-N-glucosamina, ácido polimanurônico, ácido poliglucurônico (ácido poliglucurônico), e derivados; polinucleotídeos como, ácidos ribonucléicos, ácidos desoxirribonucléicos, e outros como, poli(N-isopropil acrilamida), po-

li(oxialquileno), copolímeros de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno), poli(vinil álcool), poliacrilato, polímeros de monostearoil glicerol co-succinato/polietileno glicol (MGSA/PEG) e copolímeros e combinações dos mesmos.

5 Na definição dos materiais de celulose aqui descritos, o termo "alquila" refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto que pode ser uma cadeia reta ou ramificada contendo cerca de 1 a cerca de 7 átomos de carbono, exceto quando indicado de outra forma para uma modalidade particular, por exemplo metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, terc-butila, pentila,  
10 isopentila, neopentila, hexila, 2,3-dimetilbutila, neohexila, ou heptila.

Em uma modalidade, o material gelificante compreende polisacarídeos. Em outra modalidade, o material gelificante compreende carbóxi metilcelulose de sódio.

O gel ou líquido injetável ou aspersionável pode ser preparado pela  
15 dissolução de uma quantidade efetiva de material gelificante em uma solução salina aquosa para formar um gel inicial.

Uma "quantidade efetiva" de material gelificante é definida como a quantidade de material gelificante suficientemente necessária para permitir que o gel ou líquido injetável ou aspersionável seja injetado ou aspergi-  
20 do sobre a área afetada e permanecer substancialmente no local após a aplicação. Embora a quantidade efetiva de material gelificante varie dependendo de, por exemplo, o material gelificante selecionado, a quantidade de CRP desejada, e similares, o versado na técnica pode determinar facilmente uma quantidade efetiva de material gelificante sem demasiada experimenta-  
25 ção. Em uma modalidade, em que o material gelificante é carbóxi metilcelulose, o material gelificante pode estar presente em uma quantidade, com base no peso total da solução, em uma faixa de cerca de 0,1 por cento a cerca de 5 por cento, ou em uma faixa de cerca de 0,5 por cento a cerca de 3 por cento.

30 O componente CRP-hemostato pode então ser combinado com o gel inicial por quaisquer técnicas de mistura convencionais conhecidas na técnica incluindo, mas não se limitando a, mistura manual com uma espátu-

la, agitação magnética, ou mistura mecânica usando um motor a e uma pá ou lâmina rotativa. Para minimizar possíveis efeitos deletérios ao CRP, a temperatura de mistura não deve exceder a cerca de 50°C. O CRP-hemostato está presente no gel resultante em uma quantidade efetiva para  
5 induzir a hemóstase quando aplicado ao local da hemorragia, e está tipicamente em uma faixa de, com base no peso total do gel final, cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 10 mg/mL, ou em uma faixa de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 1 mg/mL, ou cerca de 0,3 mg/mL. Em uma modalidade, o gel ou líquido injetável ou aspersionável pode estar na forma de gel antes da injeção, em-  
10 bora em uma modalidade alternativa, o gel ou líquido injetável ou aspersionável pode estar na forma líquida antes da injeção, mas em uma forma de gel e capaz de permanecer substancialmente no lugar no momento da administração no local desejado.

Nas modalidades em que o componente CRP-hemostato está  
15 na forma de pó, o CRP pode estar combinado com qualquer veículo de pó adequado conhecido na técnica. Em uma modalidade, o veículo pode ser um líquido pulverizador revestindo partículas de pó usando métodos apresentados em, por exemplo, Maa YF, et al., *SJ Curr Pharm Biotechnol.*, **2000** (Nov.), 1(3), 283-302. O componente CRP-hemostato pode estar presente  
20 em uma quantidade, com base no peso total do pó, em uma faixa de cerca de 0,5 por cento a cerca de 100 por cento, ou em uma faixa de cerca de 2 por cento a cerca de 10 por cento.

Exemplos de carreadores de pó adequados incluem, mas não se limitam a, polissacarídeos, como amido, pectina, celulose, alquila celulose  
25 (por exemplo metilcelulose), alquil-hidroalquil celulose (por exemplo, etil-hidroxi-til celulose), hidroalquil celulose (por exemplo, hidroxi-til celulose), sulfato de celulose, sais de carbóxi metilcelulose, carbóxi metilcelulose, carbóxi etil celulose, quitina, carbóxi metil quitina, ácido hialurônico, sais de ácido hialurônico, alginato, ácido alginico alginato de ligação cruzada, alginato  
30 de propileno glicol, glicogênio, dextrana, sulfato de dextrana, curdlana, pectina, pululana, xantana, condroitina, sulfatos de condroitina, carbóxi metil dextrana, carbóxi metil quitosana, quitosana, heparina, sulfato de heparina, he-

parana, sulfato de heparana, sulfato de dermatana, sulfato de queratana, carragenas, quitosana, amido, amilose, amilopectina, poli-N-glucosamina, ácido polimanurônico, ácido poliglucurônico, manitol, lava porosa, poliésteres, e copolímeros e misturas dos mesmos.

## 5 Síntese Geral de CRP

Os CRPs da presente invenção podem ser feitos por uma variedade de técnicas em solução ou em fase sólida. Por exemplo, embora os CRPs possam ser preparados por outros métodos (por exemplo, métodos de solução) e então anexados a um material de suporte para acoplamento subsequente, é preferível que sejam usadas técnicas padrão de síntese orgânica em fase sólida, como técnicas de síntese de polipeptídeos em fase sólida (SPPS). Isto é, um CRP da presente invenção pode ser sintetizado, subsequentemente anexado a um material de suporte, acoplado com vários reagentes, e então removido do suporte material usando uma variedade de técnicas. De preferência, entretanto, o CRP é sintetizado sobre um material de suporte, acoplado com reagentes, e então removido de um material de suporte usando uma variedade de técnicas.

Para a preparação de CRPs (oligopeptídeos, polipeptídeos, ou proteínas), a síntese de peptídeo em fase sólida envolve uma etapa de ligação covalente (isto é, ancoragem) que liga a cadeia de CRP nascente ao material de suporte (tipicamente, um suporte polimérico insolúvel) contendo grupos funcionais apropriados para anexação. Subsequentemente, o CRP ancorado é estendido por uma série de ciclos de adição (desproteção/acoplamento) que envolvem a adição gradual de aminoácidos N-protetidos e protetores de cadeia lateral na direção C a N. Uma vez que a montagem da cadeia tenha sido realizada, os grupos protetores são removidos e o CRP é clivado a partir do suporte. Em alguns casos, outros grupos são adicionados ao CRP antes dos grupos protetores serem removidos.

Tipicamente, o SPPS começa pelo uso de um cabo para anexar um resíduo de aminoácido inicial a um material de suporte funcionalizado. Um cabo (isto é, conector) é um espaçador bifuncional que, em uma extremidade, incorpora características de um grupo protetor uniformemente cli-

vado, e na outra extremidade, um grupo funcional, geralmente um grupo carboxila, que pode ser ativado para permitir o acoplamento ao material de suporte funcionalizado. Cabos conhecidos incluem os cabos de ácido lábil p-alcóxibenzila (PAB), cabos de ésteres de o-nitrobenzila fotolábeis, e cabos como aqueles descritos por Albericio et al., J. Org. Chem., 55, 3730-3743 (1990) e referências citadas nesse, e nas patentes US 5.117.009 (Barany) e 5.196.566 (Barany et al.).

Por exemplo, se o material de suporte é preparado com monômeros amino-funcionais, tipicamente, os cabos apropriados são acoplados quantitativamente em uma etapa única nos suportes amino-funcionalizados para fornecer um ponto de partida geral de estruturas bem definidas para a montagem da cadeia de polipeptídeos. O grupo protetor do cabo é removido e o resíduo C-terminal do primeiro aminoácido N'-protegido é acoplado quantitativamente ao cabo. Uma vez que o cabo estiver acoplado ao material de suporte e o aminoácido inicial estiver anexado ao cabo, o ciclo de síntese geral prossegue. O ciclo da síntese geralmente consiste na desproteção do grupo amino N-protegido do aminoácido no material de suporte, lavagem, e, se necessário, uma etapa de neutralização, seguida por reação com uma forma carboxil ativada do próximo aminoácido N-protegido. O ciclo é repetido para formar o CRP de interesse. Os métodos de síntese de peptídeo em fase sólida usando materiais de suporte insolúveis funcionalizados são bem conhecidos.

Quando as técnicas de SPPS são usadas para sintetizar CRPs sobre o material de suporte, metodologias Fmoc envolvem o uso de técnicas ortogonais moderadas com o uso do grupo protetor de base lábil 9-fluorenilmetilóxicarbonila (Fmoc). Aminoácidos Fmoc podem ser preparados com o uso de fluorenilmetil succinimidil carbonato (Fmoc-OSu), cloreto de Fmoc, ou [4-(9-fluorenil metilóxi carbonilóxi)feniladimetilsulfônio metil sulfato (Fmoc-ODSP). O grupo Fmoc pode ser removido com o uso de piperidina em dimetilformamida (DMF) ou N-metilpirrolidona, ou com o uso de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) em DMF. Após a remoção de Fmoc, a N<sup>1</sup>-amina liberada da resina suportada está livre e pronta para anexação i-

mediata do lipídeo sem uma etapa de neutralização interveniente. O análogo hidrofóbico imobilizado do CRP desejado pode ser então removido, por exemplo, com o uso de ácido trifluoroacético (TFA) à temperatura ambiente. Tais metodologias de síntese de polipeptídeo em fase sólida Fmoc são bem conhecidas aos elementos versados na técnica.

Uma variedade de materiais de suporte para a preparação dos complexos da presente invenção pode ser usada. Eles podem ser de materiais inorgânicos ou orgânicos e podem estar em uma variedade de formas (como membranas, partículas, cápsulas esféricas, fibras, géis, vidros, etc). Exemplos incluem vidro poroso, sílica, poliestireno, polietileno tereftalato, polidimetilacrilamidas, algodão, papel, e similares. Poliestirenos funcionalizados, como resinas de poliestireno aminofuncionalizado, poliestireno aminometila, poliestireno aminoacila, poliestireno p-metilbenzidrilamina ou polietileno glicol-poliestireno também podem ser usadas para esse propósito.

#### 15 Síntese Específica de CRP

Acredita-se que o versado na técnica possa, com base na descrição aqui contida, usar a presente invenção em sua mais completa extensão. As modalidades específicas a seguir devem ser construídas como meramente ilustrativas, e não como limitativas do restante da descrição em qualquer maneira que seja.

Materiais e Métodos: aminoácidos Fmoc, HBTU/HOBT, DIEA, NMP e DCM foram adquiridos junto à Applied Biosystems, Inc. A piperidina foi adquirida junto à Sigma-Aldrich. A resina Fmoc-Gly-Wang foi adquirida junto à Bachem e a resina Fmoc-Phe-Wang junto à Novabiochem. A espectrometria de massa MALDI-TOF foi realizada na M-Scan Inc. com o uso de uma estação de trabalho de Biospectrometria Voyager-DE PRO de Applied Biosystems acoplada com um espectrômetro de massa com dessorção a laser de Extração Atrasada com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. A análise de aminoácido foi realizada na Molecular Structural Facility de U.C. Davis com o uso de um analisador de aminoácido Beckman 6300 Li-baseado. Os CRPs obtidos eram de pureza maior de >90% e o conteúdo do polipeptídeo foi considerado para preparar as soluções para cada experi-

mento. Adicionalmente, a concentração do CRP foi confirmada medindo a absorção em 214 ( $\epsilon = 6,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em PBS) ou 215 nm ( $\epsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em água). Todas as filtrações de polipeptídeos para experimentos de microscopia eletrônica foram realizadas com o uso de filtro Nuclepore (0,4  $\mu\text{m}$ ; membrana de policarbonato) de Whatman, o resto das filtrações foi  
5  
feito com o uso de filtros de seringa Acrodisc (0,45  $\mu\text{m}$ ; membrana de polite-  
trafluoroetileno) de Pall.

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados na presente invenção têm o mesmo significado, confor-  
10  
me comumente compreendido pelo versado na técnica à qual a invenção  
pertence. As abreviações usadas na especificação instantânea são as se-  
guintes:

<b>Abreviação</b>	<b>Significado</b>
DCM	diclorometano
Ac	acetila
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DMF	dimetilformamida
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonila
Fmoc-Osu	fluorenilmetil succinimidil carbonato
Fmoc-ODSP	[4-(9-fluorenil-metilóxicarbonilóxi)fenil]-dimetilsulfônio metil sulfato
HBTU	2-[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluoro- fosfato
HOBT	hidroxibenzotriazol
NMP	<i>N</i> -metil-pirrolidona
PBS	solução salina tamponada de fosfato
TFA	ácido trifluoroacético
$T_m$	temperatura de fusão

Exemplo 1

SEQ ID 25: (F<sub>5</sub>)-Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Phe

Comparador SEQ ID 29: Ac-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Gly

Comparador SEQ ID 35: F<sub>5</sub>Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>5</sub>-Phe

5 O CRP tendo SEQ ID 25 e polipeptídeos comparadores com SEQ ID 29 e SEQ ID 35 foram sintetizados por química FastMoc padrão, purificados por HPLC de fase reversa e caracterizados.

O CRP tendo SEQ ID 25 foi sintetizado em um sintetizador ABI 431 usando química FastMoc (escala de 0,1 mmol) e resina de Fmoc-Phe-  
10 Wang (0,74 mmol/g, rede de 100-200). O CRP foi clivado a partir da resina com TFA/trisopropilsilano/água (95:2.5:2.5) por 2 horas. A purificação por HPLC foi realizada em uma coluna de fase reversa Phenomenex C-18 (25 x 5 cm), com o uso de um gradiente linear de 10 a 95% B (A: 0,2% TFA/H<sub>2</sub>O; B: 0,16% TFA/MeCN) durante de 60 minutos a uma taxa de fluxo de 50  
15 mL/min. O CRP foi obtido como um pó branco em 32% de rendimento total. Para SEQ ID 25: (F<sub>5</sub>)-Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Phe: MALDI-TOF-MS (M+Na)<sup>+</sup> calculado para C<sub>138</sub>H<sub>185</sub>F<sub>5</sub>N<sub>32</sub>O<sub>43</sub>, 3096,3; encontrado, 30968. O polipeptídeo comparador que tem a SEQ ID 35: F<sub>5</sub>Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>5</sub>-Phe foi sintetizado De maneira similar ao CRP que tem a SEQ ID 25: (F<sub>5</sub>)-Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-  
20 Phe.

O polipeptídeo comparador que tem a SEQ ID 29: Ac-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Gly foi sintetizado em um sintetizador ABI 433A com o uso de química FastMoc (escala de 0,1 mmol) e Fmoc-Gly-Wang (0,7 mmol/g, rede de 100-200). O polipeptídeo comparador foi clivado a partir da resina com 95%  
25 TFA por 2 horas. A purificação por HPLC foi realizada em duas colunas de fase reversa C-18 (25 x 2,5 cm), com o uso de um gradiente de etapa de 0-100% B em torno de 90 minutos (A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O; B: 80% MeCN/H<sub>2</sub>O contendo TFA a 0,1%) em uma taxa de fluxo de 6 mL/min. O polipeptídeo comparador foi obtido como um pó branco em 34% de rendimento total. Para a  
30 SEQ ID 29: Ac-(Gly-Pro-Hyp)<sub>10</sub>-Gly: MALDI-TOF-MS (M+Na)<sup>+</sup> calculado para C<sub>124</sub>H<sub>177</sub>N<sub>31</sub>O<sub>43</sub>, 2811,3; encontrado, 2812,2.

### Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

As soluções de CRP tendo a SEQ ID 25, e polipeptídeos comparadores tendo SEQ ID 29 e SEQ ID 35 (0,25 mM e 0,013 mM em água) foram armazenados a 4°C por 24 horas e monitorados quanto à formação de

5 trímero. Os espectros de CD foram medidos 25°C em um instrumento Jasco J-710 com o uso de células de comprimento de trajetória de 0,1 cm por sinal em uma média de 10 ou 20 varreduras a uma velocidade de varredura a 100 nm/min. Verificou-se que o CRP com a SEQ ID 25 e o polipeptídeo comparador com a SEQ ID 29 adotam estruturas de tripla hélice por espectroscopia

10 CD ( $\theta_{\text{máx}} = 225 \text{ nm}$ ). As curvas de fusão CD foram obtidas em um espectrômetro Aviv 215 equipado com um sistema de controle de temperatura. A elipticidade a 225 nm foi monitorada partir de 20 a 100°C, a uma taxa de 1°C/min, com incrementos de 3°C, tempo de equilíbrio de 5 minutos e comprimento de trajetória de 0,1-cm.

15 Verificou-se que homotrímero de CRP tendo SEQ ID 25 tinha  $T_m$  de cerca de 57°C. O resultado para o trímero CRP com a SEQ ID 25 foi confirmado por um estudo  $^1\text{H}$  RMN dependente de temperatura, no qual a desproteção acentuada característica para a  $\delta\text{-H}$  de prolina (originalmente  $\delta$  3,0–3,5 ppm) ocorreu de cerca de 55°C a cerca de 65°C (com equilíbrio).

20 Portanto, o trímero de CRP tendo SEQ ID 25 era estável à temperatura ambiente. Comparativamente, a estabilidade térmica para o trímero de CRP tendo SEQ ID 25 foi levemente mais alta do que aquela para um composto mimético de colágeno recentemente descrito ( $T_m = 47^\circ\text{C}$ ) com três cadeias de peptídeos ligadas covalentemente por um par de ligações dissulfeto.

25 (Kotch F e Raines RT, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2006**, *103*, 3028–3033). A temperatura de fusão mais baixa para o trímero de CRP tendo SEQ ID 25 comparado ao trímero do polipeptídeo de referência tendo SEQ ID 29 ( $T_m$  70°C) pode ser atribuível a algumas rachaduras estruturais ("desgaste") nas extremidades do trímero de CRP tendo SEQ ID 25 pelos grupos fenil e pen-

30 tafluorofenil.

### Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)

As medidas de DLS foram feitas em um instrumento Malvern

Zetasizer Zen 1600 equipado com um laser de 633-nm (He-Ne, 4,0 mW) e detecção de retroespalhamento a 173°. Soluções de CRP tendo SEQ ID 25 e o polipeptídeo de referência tendo SEQ ID 29 (0,5 mg/mL em água) foram aquecidas a 70°C por 10 minutos, filtradas a quente através de um filtro de 0,45 µm e medidas em cubetas plásticas (1,0 cm) quando as soluções alcançavam a temperatura ambiente (no tempo = 0) e após 24 horas.

As medições de DLS foram tomadas para determinar o tamanho dos compósitos supramoleculares formados pelo CRP tendo SEQ ID 25 e polipeptídeo comparador tendo SEQ ID 29 em água a 25°C. Uma solução fresca de CRP tendo SEQ ID 25 continha duas espécies, dimensionadas em 3 nm e 190 nm, as quais após 24 horas, convergiram em um material agregado com um tamanho aproximado de 1000 nm. Em contraste, o polipeptídeo comparador tendo SEQ ID 29 mostrou duas espécies com tamanhos de cerca de 4 e 100 nm, que não aumentaram durante o mesmo período de tempo. Esses resultados sugerem que o mecanismo de empilhamento fenil-pentafluorofenila aromática hipotetizado estava facilitando a formação do CRP tendo SEQ ID 25 em um compósito supramolecular.

#### Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

O tamanho e a morfologia do compósito supramolecular do CRP que tem SEQ ID 25 também foram avaliados por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) feitas com um microscópio eletrônico de transmissão (MET) Philips EM 300. Soluções aquosas do CRP com a SEQ ID 25 (0,05 mg/mL) foram filtradas através de um filtro de 0,4 µm e depositados sobre grades de cobre revestidas com filmes de carbono. As soluções foram submetidas a secagem a 40°C e imagens foram registradas a 80 kV. Artérias de ratos foram tingidas com glutaraldeído a 2% e colocadas dentro de blocos de epóxi para TEM. Seções finas das artérias dentro de blocos de epóxi (cerca de 200–500 nm de tamanho) foram cortadas com o uso de uma ferramenta de seção de diamante. As seções foram montadas sobre grades de cobre e imagens registradas a 60 kV. Em cada experimento, comprimento de µm, foram observadas as fibrilas de compósito, (diâmetro médio: 0,26 µm), lembrando fibrilas de colágeno encontradas no tecido

aórtico murino (diâmetro médio: 0,05  $\mu\text{m}$ ). As dimensões de fibrilas tendo SEQ ID 25 exigiram uma montagem ponta-a-ponta (linear) e lado-a-lado (lateral) de pelo menos 100 CRP trímeros tendo SEQ ID 25 em cada direção.

#### Espectroscopia RMN de Prótons

5 O espectro RMN de prótons de CRP tendo SEQ ID 25 (1 mM em  $\text{D}_2\text{O}$  incubados a  $4^\circ\text{C}$  por 24 horas) foi coletado em um espectrômetro de RMN DMX-600 (Bruker Biospin, Inc., Billerica, MA 01821-3991) equipado com uma ressonância tripla ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), eixo triplo, ponta de prova de gradiente. Um NOESY unidimensional, com pré-saturação durante o tempo de  
10 repetição e tempo de mistura, foi usado para coletar os dados. A temperatura foi elevada em incrementos de  $10^\circ\text{C}$  e os espectros foram medidos após equilíbrio de 15 min.

#### Exemplo 2

SEQ ID 25:  $\text{F}_5\text{Phe}-(\text{Gly-Pro-Hyp})_{10}\text{-Phe}$   
15 SEQ ID 26:  $\text{Phe}-(\text{Gly-Pro-Hyp})_{10}\text{-Phe}$   
SEQ ID 27:  $\text{Leu}-(\text{Gly-Pro-Hyp})_{10}\text{-Phe}$   
SEQ ID 28:  $\text{Gly}-(\text{Gly-Pro-Hyp})_{10}\text{-Gly}$ .

Os CRPs tendo SEQ ID 25, SEQ ID 26, e SEQ ID 27 e o polipeptídeo comparador tendo SEQ ID 28 foram sintetizados por química  
20 FastMoc padrão, purificados em HPLC de fase reversa, e caracterizados.

#### Síntese de Peptídeo

Os CRPs tendo SEQ ID 25, SEQ ID 26 e SEQ ID 27 e o polipeptídeo comparador tendo SEQ ID 28 foram sintetizados em um sintetizador ABI 431 com o uso de química FastMoc (escala de 0,1 mmol) e resina  
25 Fmoc-Phe-Wang (0,74 mmol/g, rede de 100-200) ou resina Fmoc-Gly-Wang (0,66 mmol/g, rede de 100-200). Os CRPs e o polipeptídeo foram clivados a partir da resina com TFA/triisopropilsilano/água (95:2.5:2.5) por 2 horas. A purificação foi realizada por RP-HPLC (Zorbax 300 SB-C18, 21,2 x 150 mm, a  $60^\circ\text{C}$ ) com o uso de um gradiente linear de 5 a 95% B (A: 0,05% de  
30 TFA/água; B: 0,05% de TFA/MeCN) durante 15 minutos a uma taxa de fluxo de 20 mL/min. As frações foram analisadas por LC/MS em um equipamento Agilent 1100 acoplado com detector Finnigan LCQ com o uso de uma coluna

Zorbax 300 SB-C18 (3,5  $\mu\text{m}$  4,6 x 150 mm) a 60°C e um gradiente linear de 5-95% B (A: 0,02% de ácido fórmico/água; B: 0,02% de fórmico/MeCN) durante 20 minutos a uma taxa de fluxo de 1 mL/min.

Conforme mostrado na tabela 1, as frações contendo material (>90%) puro foram combinadas e liofilizadas para render os peptídeos como pós brancos. O conteúdo do peptídeo foi determinado pela medição da absorção a 215 nm e usando o coeficiente de extinção de ( $\epsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) determinado para o peptídeo de referência de SEQ ID 34: (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> (fornecedor: Peptides International). Os valores MS calculados e encontrados foram determinados com o uso de MALDI-TOF-MS (M+Na)<sup>+</sup>.

Tabela 1

SEQ ID	Fórmula	MS calculado	MS encontrado	% de rendimento	Conteúdo do peptídeo
25	C <sub>138</sub> H <sub>185</sub> F <sub>5</sub> N <sub>32</sub> O <sub>43</sub>	3096,3	3096,7	31	95
26	C <sub>138</sub> H <sub>190</sub> N <sub>32</sub> O <sub>43</sub>	3006,4	3007,0	26	95
27	C <sub>135</sub> H <sub>192</sub> N <sub>32</sub> O <sub>43</sub>	2972,4	2973,0	35	96
28	C <sub>124</sub> H <sub>178</sub> N <sub>32</sub> O <sub>43</sub>	2826,3	2826,9	32	90

#### Análise de CRP

Espectroscopia de CD: Soluções de CRP tendo SEQ ID 25, SEQ ID 26 e SEQ ID 27 e o peptídeo comparador tendo SEQ ID 28 (0,25 mM e 0,013 mM em água) foram armazenadas a 4°C por 24 horas e monitoradas para formação de tripla hélice. Os espectros de CD foram medidos 25°C em um instrumento Jasco J-710 com o uso de células de comprimento de trajetória de 0,1 cm por sinal em uma média de 10 ou 20 varreduras a uma velocidade de varredura a 100 nm/min. As curvas de fusão CD foram obtidas em um espectrômetro Aviv 215 equipado com um sistema de controle de temperatura. A elipticidade a 225 nm foi monitorada partir de 20 a 100°C, a uma taxa de 1°C/min, com incrementos de 3°C, tempo de equilíbrio de 5 minutos e comprimento de trajetória de 0,1-cm.

Os espectros de CD de três CRPs (0,25 mM em água) a 25°C mostraram uma banda de 225 nm ( $\theta_{\text{máx}}$ ) característica de uma tripla hélice

de colágeno. A estabilidade térmica das triplas hélices formadas pelos CRPs tendo SEQ ID 25, SEQ ID 26 e SEQ ID 27 também foram estudadas comparativamente pelo monitoramento da elipticidade a 225 nm a partir de 20-100°C, com incrementos de 3°C e tempo de equilíbrio de 5 minutos. As temperaturas de fusão dos três CRPs foram muito similares (na faixa de 56 a 59°C) indicando que, independentemente das diferenças estruturais nas suas terminações N, todos eles formaram trímeros estáveis.

### Exemplo 3

SEQ ID 31: F<sub>5</sub>Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>9</sub>-Phe  
SEQ ID 32: Phe-(Gly-Pro-Hyp)<sub>9</sub>-Phe  
SEQ ID 33: Leu-(Gly-Pro-Hyp)<sub>9</sub>-Phe

Conforme será descrito a seguir com mais detalhe, a estrutura do modelo de um trímero de CRP da presente invenção foi interpretada a partir da estrutura de raio X do trímero de polipeptídeo similar ao colágeno tendo SEQ ID 30: (Pro-Hyp-Gly)<sub>4</sub>-(Pro-Hyp-Ala)-(Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> (Bella J, Eaton M, Brodsky B e Berman HM, *Science* **1994**, 266, 75–81). O trímero de polipeptídeo similar ao colágeno tendo SEQ ID 30 foi mutado para incorporar F<sub>5</sub>Phe no N-terminal (posição-Pro) e Phe na terminação C (posição-Gly) para fornecer um CRP tendo SEQ ID 31 (similar à SEQ ID 25, mas sem repetição de GPO). Os polipeptídeos tendo SEQ ID 32 e SEQ ID 33 foram preparados de modo similar com o uso de Phe e Leu, respectivamente.

### Química Computacional

A estrutura de cristal do polipeptídeo similar ao colágeno tendo SEQ ID 30 foi usada como ponto de partida para a modelagem. Visto que essa estrutura continha um resíduo de alanina central, o resíduo foi primeiramente mutado para glicina. Uma de cada unidade B e X do CRP com a fórmula (I) foi então adicionada à terminação N e à terminação C de cada cadeia da tripla hélice tendo SEQ ID 30. Na terminação C, o resíduo de Gly da SEQ ID 30 foi substituído por Phe (para SEQ ID 31, SEQ ID 32 e SEQ ID 33). Na terminação N, os segmentos Pro-Hyp foram substituídos com um único F<sub>5</sub>Phe (SEQ ID 31), Phe (SEQ ID 32) e Leu (SEQ ID 33).

Devido à natureza da sequência, cada um dos CRPs tendo

SEQ ID 31, SEQ ID 32 e SEQ ID 33 continha uma repetição de motivo GPO a menos (comparado a SEQ ID 25, SEQ ID 26 e SEQ ID 27), mas foram adequados para a modelagem molecular de SEQ ID 25, SEQ ID 26 e SEQ ID 27. Cada trímero de CRP foi minimizado com o uso de uma cadeia principal  
5 constricta, campo de força OPLS-AA (Jorgensen WL e Tirado-Rives J, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657–1666), GB/água SA (Qui D, Shenkin PS, Hollinger FP e Still CW, *J. Phys. Chem. A.*, **1997**, *101*, 3005–3014) com o uso de MacroModel 9.0 (MacroModel 9.0, 2005, Schrödinger, Inc., 1500 SW First Ave., Suite 1180, Portland, OR 97201, EUA) para relaxar qualquer tensão  
10 causada pelas modificações. Cada trímero de CRP foi então emparelhado com um trímero CRP de mesma sequência por alinhamento de duas das unidades de trimeros ao longo do eixo central do trímero. Nessa etapa, tomou-se cuidado para fornecer um alinhamento robusto das unidades hidrofóbicas de reconhecimento.

15 Cada um dos pares de trímero CRP alinhados tendo SEQ ID 31, SEQ ID 32 ou SEQ ID 33 foram avaliados para automontagem e propagação fibrilar com o uso de campo de força XED em que cada par de trímero alinhado foi minimizado a  $<0,01$  rms (gradiente conjugado sem restrições; Hunter CA, Sanders JKM, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5525–5534; Vinter JG, *J. Comp.-Aid. Mol. Design*, **1994**, *8*, 653–668; Vinter JG, *J. Comp.-Aid. Mol. Design*, **1996**, *10*, 417–426; e Chessari G, Hunter CA, Low CMR, Packer MJ, Vinter JG e Zonta C, *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 2860–2867). Todos os íons de amônio e carboxilados foram carregados a 1/8 da carga total para responder aos efeitos de solvatação parcial. Após a minimização, a energia  
20 de interação (IE) entre as duas unidade de tripla hélice foi calculada e consistiu nos componentes de Coulomb e de van der Waals. Essa energia incluiu termos intermoleculares entre cada unidade de tripla hélice. Os termos e energias intramoleculares entre as cadeias no mesmo feixe de tripla hélice não foram incluídos. Os resultados de várias combinações de elementos de  
25 reconhecimento estão resumidos na tabela 2.

30 A energia de interface modelada para o par de trímero de CRP alinhado tendo SEQ ID 31 é mostrada na (tabela 2, entrada 1). Três pares

de anéis aromáticos adotaram orientações face-a-face e uma ponte de hidrogênio foi observada na interface. A estrutura foi testada para reorientar os aromáticos em uma disposição borda-a-borda e então reminimização (tabela 2, entrada 2). A estrutura da interface resultante reverteu as interações face-a-face com energia de interface similar. A interface do par de trímero de CRP tendo SEQ ID 32 exibiu interações borda-a-face (tabela 2, entrada 3) ou face-a-face com ângulo deslocado. As energias totais de interface do par de trímero de CRP tendo SEQ ID 33 foram mais baixas (tabela 2, entrada 4).

#### Tabela 2

#### 10 Energias de interação calculadas para pares de trímeros (kJ/mol (kcal/mol))

Entrada	SEQ ID	EI Total	Coulomb	van der Waals
1	<sup>1</sup> SEQ ID 31	-231,0 (-55,2)	-62,8 (-15,0)	-168,2 (-40,2)
2	<sup>2</sup> SEQ ID 31	-236,0 (-56,4)	-63,6 (-15,2)	-172,4 (-41,2)
3	<sup>3</sup> SEQ ID 32	-205,8 (-49,2)	-29,3 (-7,0)	-176,6 (-42,2)
4	SEQ ID 33	-136,0 (-32,5)	-23,4 (-5,6)	-154,4 (-36,9)

<sup>1</sup> Modelo phe-pentafluorofenilalanina (iniciando com orientação face-a-face) de SEQ ID 31;

<sup>2</sup> Modelo phe-pentafluorofenilalanina (iniciando com orientação em forma de T) de SEQ ID 31, Minimiza para trás de orientações face-a-face;

15 <sup>3</sup> Minimiza em direção a orientações borda-a-face.

Conforme mostrado na tabela 2, os polipeptídeos tendo SEQ ID 31, SEQ ID 32 e SEQ ID 33 têm as exigências estruturais para montagem ponta-a-ponta em graus variados. Analogamente, os polipeptídeos tendo SEQ ID 25, SEQ ID 26 e SEQ ID 27 também teriam exigências estruturais para montagem ponta-a-ponta de modo similar.

#### Exemplo 4

#### Estudos de Agregação Plaquetária

A capacidade do CRP tendo SEQ ID 25 para mimetizar a função biológica do colágeno foi avaliada em um ensaio de agregação de plaquetas humanas. Um concentrado de plasma rico em plaquetas (PRP) humanas de voluntários saudáveis foi adquirido junto à Biological Specialties, Inc. (Colmar, PA, EUA). O PRP não tinha mais de 5 h, uma vez que PRP

com 24 h forneceu respostas consideravelmente atenuadas ao colágeno e um CRP tendo SEQ ID 25. O PRP foi centrifugado a 730 g durante 15 minutos. O pélete de plaquetas resultante foi lavado duas vezes em tampão CGS (citrato de sódio a 13 mM, glicose a 30 mM, NaCl a 120 mM, pH 6,5) con-

5 tendo 1 U/mL de apirase (grau V, Sigma-Aldrich) e ressuspenso em tampão de Tyrode (NaCl a 140 mM, KCl a 2,7 mM, NaHCO<sub>3</sub> a 12 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,76 mM, dextrose a 5,5 mM, Hepes a 5,0 mM, 0,2% de BSA, pH 7,4). As plaquetas "lavadas" foram diluídas 3 x 10<sup>8</sup> plaquetas/mL e mantidas >45 minutos a 37°C antes do uso.

10 Para o ensaio, 105 µL de plaquetas lavadas, 2 mM de CaCl<sub>2</sub> e 2,5 mM de fibrinogênio foram adicionados a uma placa de microtitulação com 96 poços. A agregação plaquetária foi iniciada pela adição de concentrações seriais de fibrilas de colágeno nativas (tipo I equino; 92% de identidade com a sequência de colágeno humana; Chrono-log Corp., Havertown,

15 PA, EUA) ou peptídeos de teste. O tampão foi adicionado a um conjunto de poços para controle. A placa do ensaio foi agitada constantemente e colocada de forma intermitente em um leitor de microplaca (Softmax, Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) para ler a densidade ótica (650 nm) no tempo 0 e 5 minutos após a adição das soluções do composto. A agregação foi

20 calculada como a diminuição na densidade ótica entre as medições no tempo-0 e 5-minutos e expressas como percentagem da agregação.

As condições para a preparação do peptídeo para os estudos de agregação plaquetária são mostradas na tabela 3. Os peptídeos foram dissolvidos em PBS (pH 7) ou água (pH final 5) até uma concentração de

25 2 mg/mL. Algumas amostras foram aquecidas em banho-maria (70°C) por 10 minutos, filtradas através de um filtro de 0,45 µm e incubadas por 24 horas ou 7 dias a 4°C. As medições de UV a 215 nm antes e após a filtração não indicaram perda de peptídeos. Algumas soluções de teste de CRP com SEQ ID 25 em PBS (pH 7) ou água foram incubadas por 24 horas ou 7 dias

30 (4°C), e outras amostras foram desnaturadas (H+F) e reaneladas a 4°C.

Tabela 3

Condições para Preparação de Peptídeo e Resultados para Estudos de Agregação Plaquetária

Peptídeo	Solvente	Condições*	pH	Tempo Incubação	de EC <sub>50</sub> ± DPM (µg/mL)
Colágeno	---	---	---	---	0,25 ± 0,02
SEQ ID 25	PBS	---	7	7 dias	0,37 ± 0,06
SEQ ID 25	PBS	H + F	7	7 dias	2,7 ± 0,20
SEQ ID 25	PBS	H + F	7	24 h	9,2 ± 0,82
SEQ ID 25	Água	---	5	24 h	1,4 ± 0,27
SEQ ID 34	PBS	H + F	7	24 h	Não ativo

\* H+F representa aquecido a 70°C por 10 minutos e filtrado através de um filtro de 0,45 µm.

As soluções diferentes de CRP tendo SEQ ID 25 induziram a agregação plaquetária, mas incubações mais curtas e amostras "H+F" mostraram uma potência diminuída. O CRP tendo SEQ ID 25 (não tratado, envelhecido por 7 dias em PBS; EC<sub>50</sub> = 0,37 µg/mL) foi aproximadamente equipotente ao colágeno Tipo I equino (EC<sub>50</sub> = 0,25 µg/mL), considerando que o polipeptídeo de referência de 30-mer com a SEQ ID 34 (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> não foi capaz de agregar plaquetas. O peptídeo de SEQ ID 34 (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> foi adquirido junto à Peptides International, Inc.

Esses resultados indicam que o trímero de CRP que tem SEQ ID 25 pode automontar-se ao longo do tempo em agregados de comprimento e conformação apropriados para satisfazer as exigências estruturais para o reconhecimento de plaquetas (presumivelmente em receptores de colágeno plaquetário). Além disso, foi observada a automontagem de um CRP curto (8-nm) tendo SEQ ID 25 por meios não covalentes em trímeros de CRP e então em fibrilas similares ao colágeno com propriedades de mimetizar o colágeno. De modo notável, fibrilas de compósito, com comprimento de micrômetros, e contendo tripla hélice foram formados, conforme determinado por dados de CD, DLS, e TEM. Também, o trímero de CRP tendo SEQ ID 25 agiu como um material funcional similar a proteína, com capacidade para in-

duzir a agregação plaquetária de modo análogo ao colágeno. Os motivos de reconhecimento aromático–aromático e hidrofóbico-hidrofóbico para um CRP de fórmula (I) oferecem uma abordagem objetiva para automontagem de peptídeos que mimetizam o colágeno e fornecem trímeros de CRP capazes de montagem em estruturas fibrilares biologicamente funcionais.

#### Exemplo 5

A inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno ou trímero de CRP que tem SEQ ID 25 foi obtida com o uso do antagonista GPIIb/IIIa integrina elarofiban (Hoekstra WJ, et al. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5254–5265). A agregação plaquetária induzida por trímero CRP tendo SEQ ID 25 e colágeno foi inibida pelo elarofiban, um inibidor de GPIIb/IIIa.

Plaquetas lavadas foram incubadas com várias doses de elarofiban (10, 100 e 1000 nM) por 5 minutos antes da adição do trímero de CRP tendo SEQ ID 25 e colágeno. A inibição dose-dependente de agregação plaquetária foi observada. Esses dados sugerem que o colágeno bem como o trímero de CRP tendo SEQ ID 25 ativaram a agregação plaquetária através do engatilhamento da sinalização de GPIIb/IIIa.

#### Exemplo 6

A agregação plaquetária induzida por colágeno ou o trímero de CRP tendo SEQ ID 25, SEQ ID 26, SEQ ID 27, SEQ ID 28 e SEQ ID 34 foi feita pelos métodos descritos no exemplo 4. De acordo com as modalidades da presente invenção, a figura 1 mostra que os trímeros de CRP tendo SEQ ID 25, SEQ ID 26 e SEQ ID 27 estimularam a agregação plaquetária em graus variados, com o trímero de CRP tendo SEQ ID 25 e o trímero CRP tendo SEQ ID 26 sendo mais potentes. Os polipeptídeos de referência tendo SEQ ID 28, SEQ ID 34 e SEQ ID 35 não foram efetivos na estimulação da agregação plaquetária. A tabela 4 mostra os valores médios de  $EC_{50}(\pm DPM)$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) da figura 1 obtidos para o colágeno e os trímeros de CRP tendo SEQ ID 25, SEQ ID 26 e SEQ ID 27.

Tabela 4Valores de EC<sub>50</sub> (± DPM) (µg/mL)

<b>Peptídeo</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>
<b>Colágeno</b>	0,56 ± 0,09
<b>SEQ ID 25</b>	2,44 ± 0,20
<b>SEQ ID 26</b>	13,06 ± 1,28
<b>SEQ ID 27</b>	> 30

Exemplo 7

CRP Revestido e Espuma PCL/PGA Revestida de Controle PBS em Modelo de Ferimento de Baço

5

Etapa A. Suspensão de CRP

Uma suspensão teste foi preparada pela dissolução do CRP tendo SEQ ID 25 em solução salina tamponada com fosfato ("PBS") tendo pH 7,4 a uma concentração de 0,33 mg de CRP/mL de PBS, e então pela incubação da suspensão por 7 dias a 4°C.

10

Etapa B. Preparação de Espuma de Substrato PCL/PGA

Um poli(épsilon-caprolactona-co-glicolídeo) ("espuma PCL/PGA") de 3 mm de espessura foi preparado pela liofilização de 50 gramas de uma solução com 3 por cento em peso de PCL/PGA 35/65 (mol/mol) em 1,4-dioxano em um molde de alumínio de 11,4 cm x 11,4 cm (4,5" x 4,5") sob condições de temperatura de cerca 5 a cerca de -5°C por cerca de 3 horas em um secador de congelamento (FTS Systems, Modelo TD3B2T5100). A espuma de PCL/PGA resultante foi removida do molde e, então, cortada em vários quadrados de 5,1 cm x 5,1 cm (2" x 2").

15

Etapa C. Preparação de Espuma Revestida de Polipeptídeo

Um quadrado de espuma PCL/PGA preparado de acordo com o procedimento apresentado na etapa B acima foi colocado em um molde de alumínio de 5,1 cm x 5,1 cm (2" x 2"). Após a mistura da suspensão de CRP preparada de acordo com procedimento apresentado na etapa A acima até parecer homogênea, 7 mLs da suspensão foram então derramados dentro do molde para cobrir substancialmente a superfície superior da espuma. O molde foi então colocado dentro de um secador de baixa temperatura (FTS

25

Systems, modelo TD3B2T5100), pré-resfriado a  $-50^{\circ}\text{C}$ , e liofilizado a  $-25^{\circ}\text{C}$  por cerca de 44 horas.

#### Etapa D. Preparação de Espuma de Controle Revestida com PBS

5 Espumas revestidas com PBS foram preparadas pela adição de 7 mL de PBS a um molde de 5,1 cm x 5,1 cm (2" x 2") contendo uma espuma PCL/PGA com espessura de 3 mm preparada de acordo com o procedimento apresentado na etapa B acima para cobrir substancialmente a superfície superior da espuma. O molde foi colocado dentro de um secador de baixa temperatura (FTS Systems, modelo TD3B2T5100), pré-resfriado a  $-50^{\circ}\text{C}$ , e liofilizado a  $-25^{\circ}\text{C}$  por cerca de 44 horas.

A espuma revestida de CRP e o controle revestido de PBS foram então cortados em vários pedaços de 2 cm X 3 cm para teste subsequente.

#### Modelo de Lesão de Baço

15 Duas lacerações lineares (cada uma das quais tinha 1 cm de extensão e 0,3 cm de profundidade) foram feitas em um baço de suíno. Após a sangria dos ferimentos por cerca de 3 a 5 segundos, um pedaço de espuma revestido por CRP produzido de acordo com a etapa C foi aplicado a mão à superfície de um ferimento (grupo de teste 1), e um pedaço de espuma revestido de PBS preparado de acordo com a etapa D foi aplicado a mão à superfície do outro ferimento (grupo de teste 2). Uma pressão similar para baixo foi então aplicada aos locais do teste por 30 segundos. Após a remoção do pedaço de espuma revestido, cada respectivo ferimento foi avaliado visualmente para determinar se a hemóstase foi alcançada. Se necessário, 20 foi reaplicada pressão sobre cada ferimento, respectivamente, com um pedaço de espuma revestido e limpo de um tipo similar em intervalos de 30 segundos. O tempo para alcançar a hemóstase, a parada do sangramento, para cada ferimento é mostrado abaixo na tabela 5.

Tabela 5Tempo para a Hemóstase (segundos)

	<u>Grupo de teste 1</u>	<u>Grupo de teste 2</u>
Pedaços aplicados	2	2
Tempo	95 +/- 65	170 +/-70

Os resultados indicam que a espuma revestida de CRP foi útil no alcance da hemóstase em menos tempo que a espuma controle.

5 Exemplo 8Preparação de espuma de PCL/PGA 35/65

Uma de poli(epsilon-caprolactona-co-glicolídeo) (PCL/PGA) com aproximadamente 3 mm de espessura foi preparada. Uma solução a 3 por cento, em peso, de 35/65 (mol/mol) PCL/PGA em 1,4-dioxano foi preparada pela dissolução de 21 gramas de polímero em 679 gramas de 1,4-dioxano a 70°C com agitação magnética durante 4 horas. A solução foi filtrada com o uso de um funil com frita de vidro antes de ser vertida no molde. A espuma foi então preparada pela liofilização de 60 ml da solução a 3 por cento, em peso, de 35/65 (mol/mol) PCL/PGA em 1,4-dioxano em um molde de alumínio de 11,4 cm x 11,4 cm (4,5" x 4,5"). O molde foi colocado em um liofilizador (FTS Systems, modelo TD3B2T5100, Stone Ridge, NY, EUA), e pré-resfriado para -41°C e então liofilizado sob condições de temperatura de cerca de 5 a -5°C durante cerca de 23 horas. A espuma de PCL/PGA resultante foi então embebida com 60 ml de água no mesmo molde à temperatura ambiente e, então, colocada no liofilizador (FTS Systems, modelo TD3B2T5100, Stone Ridge, NY, EUA), pré-resfriado para -50°C, e liofilizada a -25°C durante cerca de 44 horas.

Exemplo 925 Atividade hemostática de PCL/PGA 35/65 em modelo de sangramento de ressecção de fígado suíno.

A atividade hemostática da espuma de PCL/PGA 35/65 foi testada com o uso de um modelo de sangramento de ressecção de fígado suíno. O porco foi administrado com uma injeção intramuscular de Telazol (5 mg/kg IM), xilazina (5 mg/kg IM), e glicopirrolato (0,011 mg/kg, IM). Quan-

do o animal atingiu um level suficiente de anestesia, um cateter intravenoso foi colocado na veia marginal da orelha. Um tubo endotraqueal foi inserido e fixado a uma máquina de anestesia veterinária. A anestesia para o restante da preparação e do procedimento cirúrgico foi mantida por uma inalação em

5 circuito semifechado de isoflurano e taxa de fluxo de oxigênio de 1 a 2 litros/minuto. A ventilação assistida foi feita com um ventilador mecânico ajustado para 8 a 12 respirações/minuto e um volume tidal de aproximadamente 10 mL/kg de peso corporal. Um plano estável de anestesia foi mantido com os parâmetros de ventilação e anestésicos ajustados para atingir os seguintes

10 alvos fisiológicos: temperatura de núcleo de 37,0 a 39,0°C e PCO<sub>2</sub> 38 a 5,60 kPa (42 mmHg). A profundidade da anestesia foi verificada por avaliação do tônus do maxilar e do reflexo ao beliscão do dedo. Uma pomada oftálmica foi aplicada a ambos os olhos do animal anestesiado. Dobutamina (10 a 12,5 µg/kg/min) foi administrada para suportar o débito cardíaco e, assim, manter MAP (8,00 kPa (60 mm Hg)).

15

Uma incisão na linha média ventral foi feita a partir do processo xifoide até um ponto imediatamente cranial à sínfise púbica. Clampeamento e cauterização elétrica de rotina foram empregados para controlar a hemorragia cutânea. Entrou-se na cavidade abdominal através da linha média e os

20 órgãos abdominais foram inspecionados quanto a evidências de processos de doença passados ou presentes ou outras anomalias. O intestino delgado foi embrulhado em toalhas e retraído.

O fígado foi localizado e mantido úmido com gaze embebida com solução salina e/ou esponjas de laparotomia. Uma ressecção marginal, de aproximadamente 1 a 10 cm, dependendo do órgão alvo, foi feita com o

25 uso de uma lâmina de bisturi, instrumento cirúrgico, e cauterização. A espuma de PCL/PGA preparada no exemplo 8 foi aplicada e avaliada quanto a hemóstase. Um pedaço de gaze dobrado de 4x4, 8 camadas (HENRY SCHEIN Inc., Melville, NY 11747, EUA) e hemostato de celulose regenerada oxidada disponível para comercialização foram usado como controles. A atividade hemostática foi medida pelo tempo que levou até parar o sangramento

30 após a aplicação do artigo de teste. Os artigos de teste eram grandes de-

mais para sobrepor o sítio de sangramento. Foram testadas seis amostras de espuma de PCL/PGA, três hemostatos de celulose regenerada oxidada, e 1 amostra de gaze. O tempo médio necessário para atingir a hemóstase para a espuma de PCL/PGA foi de 45 segundos. Levou mais de 10 minutos para a gaze e 4,5 minutos para o hemostato de celulose regenerada oxidada pararem completamente o sangramento. Estes resultados indicam que a espuma de PCL/PGA é útil em atingir hemóstase.

#### Exemplo 10

#### Efeitos hemostáticos de PCL/PGA 35/65 em modelo de sangramento de ressecção de rim suíno.

O mesmo porco descrito no exemplo 9 foi usado para testar a atividade hemostática após nefrectomia parcial. Os rins foram liberados do retroperitônio através de dissecação cega. Este procedimento foi feito sem oclusão das veias renais. Hemi-nefrectomia foi feita e o artigo de teste foi aplicado aos locais feridos recentemente criados seguido de uma pressão digital oclusiva e gaze. A espuma de PCL/PGA preparada no exemplo 8 foi aplicada e avaliada quanto a hemóstase. Hemostato de celulose regenerada oxidada disponível para comercialização foi usado como controle. Duas amostras de espuma de PCL/PGA e dois hemostatos de celulose regenerada oxidada foram testados. O tempo médio necessário para atingir a hemóstase para a espuma de PCL/PGA foi de 1 minuto. O tempo médio para atingir hemóstase para a amostra de controle foi de 4,2 minutos para parar completamente o sangramento. Estes resultados indicam que a espuma de PCL/PGA é útil em atingir hemóstase.

Os substratos hemostáticos de espuma inovadores, os métodos de fabricação inovadores e os métodos de estimulação de hemóstase inovadores da presente invenção são descritos nos exemplos anteriormente mencionados e na descrição detalhada supracitada

Embora o relatório descritivo anteriormente mencionado ensine os princípios da presente invenção, com os exemplos fornecidos com o propósito de ilustração, ficará compreendido que a prática da invenção abrange todas as variações, adaptações e/ou modificações usuais de acordo com o

escopo das reivindicações a seguir e seus equivalentes. Da mesma forma, todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências apresentadas no relatório descritivo acima estão aqui incorporadas, por referência na sua totalidade e para todos os propósitos.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para fabricação de um substrato de espuma hemostática, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:
  - preparar uma solução a 3% em peso de PCL/PGA 35/65
  - 5 (mol/mol) em 1,4-dioxano;
    - verter a solução em um molde;
    - liofilizar a solução no molde;
    - adicionar uma solução aquosa à espuma no molde;
    - embeber a espuma na solução aquosa à temperatura ambiente
  - 10 por um período de tempo suficientemente eficaz; e
  - liofilizar a espuma na solução aquosa.