



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

(11) BR 112012018970-0 B1



(22) Data do Depósito: 27/01/2011

(45) Data de Concessão: 30/10/2018

(54) Título: PRODUTO COMPREENDENDO FIBRINOGÊNIO, THROMBINA E FORMULAÇÃO DE SELANTE DE FIBRINA LÍQUIDA, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO E KIT

(51) Int.Cl.: A61L 24/00; A61L 24/10.

(30) Prioridade Unionista: 28/01/2010 US 61/299,127.

(73) Titular(es): OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD..

(72) Inventor(es): EREZ ILAN; ISRAEL NUR; KFIR REGEV.

(86) Pedido PCT: PCT IL2011000092 de 27/01/2011

(87) Publicação PCT: WO 2011/092694 de 04/08/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/07/2012

(57) Resumo: MÉTODO PARA SELAGEM APRIMORADA COM FIBRINA. A presente invenção refere-se a uma matriz de fibrina, sua preparação e uso para efetivamente selar um defeito em uma mucosa ou em outro tecido úmido.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PRODUTO COMPREENDENDO FIBRINOGÊNIO, THROMBINA E FORMULAÇÃO DE SELANTE DE FIBRINA LÍQUIDA, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO E KIT".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a uma matriz de fibrina com propriedades selantes aprimoradas, bem como a sua preparação e uso.

Antecedentes da Invenção

O selante de fibrina é tipicamente um produto sanguíneo obtido de fontes comerciais ou de alguns centros de transfusão de sangue regionais.

10 Os componentes que são comumente usados na preparação de selantes de fibrina são, predominantemente, fibrinogênio suplementado com várias quantidades de Fator VIII, Fator XIII, fibronectina, vitronectina e Fator de von Willebrand (vWF). O componente de fibrinogênio é tipicamente ativado pela última protease da cascata de coagulação, a trombina.

15 O selante de fibrina é formado por uma reação enzimática que envolve, entre outros, fibrinogênio, trombina e Fator XIII. A trombina converte o fibrinogênio em fibrina por meio de ação enzimática a uma velocidade determinada pela concentração de trombina. O Fator XIII está tipicamente presente no componente de fibrinogênio do selante, sendo uma enzima do sistema de coagulação do sangue, que reticula e estabiliza o coágulo de fibrina. Esse processo ignora a maioria das etapas da coagulação normal, e imita sua última fase. Alguns fabricantes adicionam agentes antiproteolíticos à formulação do selante de fibrina (conforme descrito em WO 93/05822) ou, especificamente, removem o plasminogênio de modo a interromper ou 20 retardar a fibrinólise (conforme descrito em US 5.792.835 e US 7.125.569).

25 A patente US nº 4.427.650 apresenta um adesivo tecidual que pode ser aplicado sob a forma de uma mistura seca semelhante a pó, imediatamente e diretamente sobre a ferida ou na área da operação. O adesivo consiste em constituintes biologicamente ativos sólidos, semelhantes a pó, e contém de 60 a 96%, em peso, de fibrinogênio, o qual é em grande parte liberado a partir de globulina crioinsolúvel, de 0,05 a 5%, em peso, de inibidor de fibrinólise, e de 0,1 a 15%, em peso, de trombina e/ou protrombina.

A patente US nº 5.962.405 apresenta uma preparação de fibrinogênio liofilizado destinada ao pregar de uma solução de fibrinogênio para uso como adesivo tecidual. A preparação de fibrinogênio contém uma substância otimizadora de solubilidade.

5 Sabe-se a algum tempo que o selante de fibrina pode ser aplicado a feridas, como as feridas abertas de uma pessoa, para fechar a ferida, cessar o sangramento e impedir que outras substâncias, como agentes infecciosos, entrem na ferida.

10 O efeito do selante de fibrina na selagem de defeitos em tecidos que estão sob constante movimento, por exemplo tecido gastrointestinal e tecido pulmonar, foi relatado. Entretanto, há discrepâncias nesses relatos.

15 Uma abordagem relatada, direcionada a diminuir a ocorrência de defeitos pós-operatórios como vazamentos na linha de grampeamento ou sutura (grampo/sutura) após ressecção gastrointestinal, consiste no uso de reforços na linha de grampeamento/sutura. Diferentes produtos para reforço da linha de grampeamento/sutura estão disponíveis comercialmente. Por exemplo, médicos testaram produtos não absorvíveis ou semiabsorvíveis para reforço da linha de grampeamento, como Seamguard®, Peristrips Dry®
20 e Surgisis®. Entretanto, nos estudos experimentais e clínicos iniciais, um material absorvível para reforço da linha de grampeamento parece ter vantagens consideráveis sobre materiais não absorvíveis ou semi-absorvíveis para reforço da linha de grampeamento (Yo e outros "Buttressing of the staple line in gastrointestinal anastomoses: overview of new technology designed to reduce perioperative complications". Dig Surg. 2006;23:283-291). Relatos recentes com o uso de fibrina como reforço absorvível da linha de grampeamento para prevenção de vazamentos gastrointestinais pós-operatório (Fullum e outros "Decreasing anastomotic and staple line leaks after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass". Surg
25 Endosc. 2009;23:1403-1408, Efthimiou e outros "Fibrin sealant associated with increased body temperature and leukocytosis after laparoscopic gastric bypass". Surg Obes Relat Dis. 2009 Mar 17) sugerem que as atuais
30

formulações de selante de fibrina não são adequadas para reforço da linha de grampeamento/sutura.

A patente US nº 5.690.675 apresenta o fechamento de feridas no tecido pulmonar por um método em duas etapas, consistindo 5 essencialmente na aplicação de prendedores (por exemplo grampos, clipes, pinos, ganchos) a uma região adjacente à ferida, na qual os prendedores podem causar penetrações. Os prendedores estão presentes em uma camada pré-formada de colágeno, fibrina, fibrinogênio, elastina, albumina ou uma combinação dos mesmos, sendo aplicada energia à região para fundir o 10 material ao tecido e selar as perfurações no dito tecido.

A patente US nº 5.883.078 apresenta um adesivo tecidual estável que comprehende fibrinogênio e um ativador ou pró-ativador da protrombina. O adesivo pode estar presente como uma preparação líquida ou seca. Em uma modalidade, um adesivo tecidual sólido e com adesão 15 pelos dois lados é feito mediante a aplicação do adesivo seco sob forma sólida a uma superfície da ferida, sendo a segunda superfície da ferida (a segunda parte do tecido) subsequentemente adaptada e imediatamente pressionada contra a outra. A preparação se dissolve imediatamente por meio do sangue e/ou da secreção presentes na ferida e, subsequentemente, 20 se solidifica com o início da coagulação, de modo que é obtido o efeito adesivo e hemostático. O adesivo tecidual sólido e com adesão pelos dois lados é especialmente adequado para união de partes de tecidos moles, como fígado ou baço.

Lillemoe e outros [(2004) J Gastrointest Surg., Volume 8, nº 7 25 páginas 766-774, um artigo em periódico intitulado "Does Fibrin Glue Sealant Decrease the Rate of Pancreatic Fistula After Pancreaticoduodenectomy? Results of a Prospective Randomized Trial"] mostrou que a aplicação tópica de selante à base de cola de fibrina à superfície da anastomose pancreática não reduziu a incidência de fistula 30 pancreática ou o total de complicações em pacientes após pancreaticoduodenectomia e conclui que parece não haver benefício em relação ao uso dessa substância nesse tipo de cenário.

Um outro estudo ("The sealing effect of fibrin glue against alveolar air leakage evaluated up to 48h, comparison between different methods of application" Kawamura e outros (2005) Eur J of Cardiothorac Surg. 28(1):39-42) apresenta o efeito selante da cola de fibrina contra vazamento de ar alveolar em um modelo animal, e avalia diferentes métodos de aplicação. Foram usadas uma solução A, que consiste em um concentrado de proteína compreendendo fibrinogênio, e uma solução B, que compreende trombina. No método de fricção e aspersão, a solução A foi gotejada e delicadamente friccionada sobre a área com vazamento de ar.

Então, ambas as soluções foram aspergidas simultaneamente sob a forma de um aerossol misto. Em outro método, foi preparada uma dupla camada mediante o gotejamento da solução A sobre a superfície com vazamento de ar, após o que foi gotejada a solução B. Em outro método, uma lá de colágeno revestida com fibrinogênio e trombina secos em um lado (TachoComb) foi usada em modelos animais (cão) e verificada após 24 horas. De acordo com os autores, o efeito selante da cola de fibrina é relativamente instável até 12 horas após sua aplicação. Além disso, os autores concluíram que o método de fricção e aspersão pode ajudar a selagem de fibrina a atingir mais rapidamente sua resistência total, em comparação aos outros dois métodos.

Um outro estudo por Yo e outros (2006) (Dig Surg 23: 283-291) apresenta esforços para reduzir as complicações anastomóticas como sangramento ou vazamento na linha de grampeamento, quando são realizadas ressecções gastrointestinais. Yo indicou que, em modelos animais anastomose colônica em ratos, a aplicação de cola de fibrina para selar e evitar vazamentos parece não ser uma técnica exequível. É revelado que, na ressecção gástrica, a aplicação de cola de fibrina para sustentar e selar a linha de grampeamento pareceu obter mais sucesso.

A patente US nº 7.196.054 apresenta um método para tratamento de tecidos feridos em um paciente, compreendendo aplicar ao tecido ferido uma composição sob a forma de um pó seco que compreende fibrinogênio em uma quantidade que forma uma matriz de fibrina na

presença de trombina, Fator XIII, Ca²⁺ e solução aquosa, e fornecer à composição trombina, Fator XIII, Ca²⁺ e solução aquosa em quantidades que formam uma matriz de fibrina na presença de fibrinogênio.

Fullum e outros (2009) revela que vazamentos anastomóticos e da linha de grampeamento (ASL) ocorrem após derivação gástrica em Y de Roux (LRYGB) feita por laparoscopia em pacientes obesos. O selante de fibrina foi disposto ao longo da linha de grampeamento gástrico. Os autores concluíram que a técnica cirúrgica, que inclui gramos com tamanho adequado, reforço da linha de grampeamento, fechamento da otomia por sutura feita à mão, suturas de suporte, teste de vazamento durante a cirurgia, e uso de selantes de fibrina, foi instrumental na diminuição da incidência de ASL após LRYGB. Os autores não foram capazes de determinar se qualquer componente isolado foi mais crucial na prevenção de ASL.

Ao contrário, Efthimiou e outros, 2009, revela que o uso de selante de fibrina não teve qualquer efeito sobre a taxa de vazamento anastomótico ou da linha de grampeamento em LRYGB.

Há uma necessidade não atendida por uma formulação de selante de fibrina com qualidade superior para selagem de defeitos em tecidos que estão em constante movimento, como tecido gastrointestinal e tecido pulmonar.

Sumário da Invenção

O principal uso dos selantes de fibrina, atualmente, é na hemostase, sendo que essa ação pode ser aprimorada por fatores de coagulação autólogos, por exemplo fibrinogênio, presentes no sangue que recobre a área ferida.

Um outro uso do selante de fibrina é a selagem de vazamentos teciduais, como vazamentos de ar e/ou líquidos, por exemplo fluidos urinários, fluidos intestinais e seroma. Tipicamente, nesses vazamentos teciduais, os fatores de coagulação autólogos estão ausentes. A maioria dos selantes, inclusive selantes sintéticos, não são eficazes para selagem de vazamentos teciduais. Sem se ater ao mecanismo, o ar/líquido pode agir como uma barreira entre o selante e o tecido e, dessa forma, impedir um

contato íntimo entre o selante e o tecido.

De modo geral, os cirurgiões frequentemente secam o tecido ferido e com vazamentos, tanto quanto possível, antes da aplicação do selante. Frequentemente, a secagem é realizada manualmente com o uso de uma esponja/gaze e um aspersor de gás (Hidas e outros "Sutureless nephron-sparing surgery: use of albumin glutaraldehyde tissue adhesive (BioGlue)". Urology, 2006;67:697-700). Esses procedimentos de secagem aumentam o risco de desenvolvimento de adesão tecidual (Kamel RM. "Prevention of postoperative peritoneal adhesions". Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010;150(2):111-118).

Além disso, esses procedimentos de secagem são também problemáticos em regiões que são inacessíveis ao cirurgião, por exemplo durante a realização de um processo laparoscópico.

A presente invenção apresenta uma matriz de fibrina que é eficaz para selagem de vazamentos teciduais.

Em um aspecto, a invenção apresenta um método para aplicação de matriz de fibrina sobre um tecido úmido, sendo que o dito método compreende: aplicar uma quantidade eficaz de uma mistura de selante de fibrina sólida sobre o tecido úmido, e aplicar, sobre pelo menos uma porção da mistura de selante de fibrina sólida aplicada, uma quantidade eficaz de uma formulação de selante de fibrina líquida, sendo que as quantidades eficazes para mistura de selante de fibrina sólida e formulação de selante de fibrina líquida são suficientes para produzir uma matriz de fibrina sobre o tecido úmido, tendo resistência de selagem aprimorada em relação à aplicação de uma quantidade eficaz ou da formulação de selante de fibrina líquida, ou da mistura de selante de fibrina sólida.

Em uma modalidade da presente invenção, a resistência de selagem é aprimorada em pelo menos 1,2 vezes em relação à aplicação da formulação de selante de fibrina líquida.

Em uma outra modalidade da presente invenção, a resistência de selagem é aprimorada em cerca de 1,7 vezes em relação à aplicação da formulação de selante de fibrina líquida.

Em uma outra modalidade adicional da presente invenção, a pedido é sobre um tecido que não está enriquecido com, tem uma pequena quantidade de, está privado de ou é desprovido de vasos sanguíneos e/ou tecidos que estão com exsudação ou sem sangramento.

5 Em uma modalidade da presente invenção, a mistura de selante de fibrina sólida compreende um componente sólido compreendendo fibrinogênio e um componente sólido compreendendo um componente de enzima proteolítica que é capaz de formar fibrina quando reage com o fibrinogênio.

10 Em uma outra modalidade adicional da invenção, o componente compreendendo fibrinogênio da mistura de selante de fibrina sólida é preparado por uma etapa de secagem de uma solução contendo fibrinogênio, a qual tem uma concentração de fibrinogênio menor que 25 mg/ml.

15 Em uma modalidade da invenção, a concentração de fibrinogênio é de cerca de 20 mg/ml.

Em ainda outra modalidade da invenção, a enzima proteolítica é trombina.

20 Em ainda uma outra modalidade adicional da invenção, a aplicação é sobre um defeito tecidual.

Em ainda outra modalidade da invenção, a aplicação é sobre pelo menos uma parte de uma linha de grampeamento ou sutura presente no tecido.

25 Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para preparar uma matriz de fibrina sobre uma superfície molhada, compreendendo as etapas de: obter um componente sólido compreendendo fibrinogênio, obter um componente sólido compreendendo uma enzima proteolítica que é capaz de formar fibrina quando reage com o fibrinogênio, obter uma formulação de selante de fibrina líquida, aplicar uma quantidade eficaz dos componentes sólidos sobre pelo menos uma parte da superfície molhada, e aplicar sobre pelo menos uma porção dos componentes sólidos aplicados uma quantidade eficaz da formulação de selante de fibrina líquida.

Em uma modalidade da invenção, a superfície molhada é isenta de fibrinogênio.

Em outra modalidade da invenção, a formulação de selante de fibrina líquida é fornecida em forma sólida, sendo reconstituída antes de sua 5 aplicação.

Em uma outra modalidade adicional da invenção, a formulação de selante de fibrina líquida é fornecida em forma congelada, sendo descongelada antes de sua aplicação.

Em ainda outra modalidade da invenção, o componente sólido 10 é fornecido em forma líquida, sendo seco antes de sua aplicação.

Em ainda outra modalidade da invenção, o componente sólido é fornecido em forma congelada, sendo seco antes de sua aplicação.

Em ainda uma outra modalidade adicional da invenção, os componentes sólidos são aplicados simultaneamente ou um após o outro. 15

Em outra modalidade da presente invenção, os componentes líquidos são aplicados simultaneamente ou um após o outro.

Em uma outra modalidade adicional da presente invenção, os componentes sólidos são fornecidos em uma mistura.

Em uma modalidade da presente invenção, a superfície é um 20 tecido.

Em uma modalidade da presente invenção, o tecido não está enriquecido com, tem uma pequena quantidade de, está privado de ou é desprovido de vasos sanguíneos e/ou é um tecido com exsudação ou sem sangramento.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma matriz de 25 fibrina obtêniavel de acordo com a presente invenção.

Em ainda outro aspecto, a invenção apresenta um método para tratamento ou prevenção de um defeito em um tecido úmido de um indivíduo necessitando desse tratamento, compreendendo as etapas de:

30 a) obter um componente compreendendo fibrinogênio sólido, obter um componente compreendendo uma enzima proteolítica sólida que é capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio, e obter uma

formulação de selante de fibrina líquida,

b) aplicar uma quantidade eficaz dos componentes sólidos de

a) sobre pelo menos uma parte do tecido úmido, e

c) aplicar sobre pelo menos uma porção dos componentes

5 sólidos aplicados uma quantidade eficaz da formulação de selante de fibrina líquida de a).

Em uma modalidade da presente invenção, o tecido úmido não está enriquecido com, tem uma pequena quantidade de, está privado de ou é desprovido de vasos sanguíneos e/ou é um tecido com exsudação ou sem sangramento.

10 Em outra modalidade da presente invenção, o defeito é um vazamento no tecido.

Em uma outra modalidade adicional da presente invenção, a substância vazando não está enriquecida com, tem uma pequena quantidade de, está privada de ou é desprovida de componentes de plasma 15 ou sangue.

Em uma modalidade da presente invenção, a formulação de selante de fibrina líquida é fornecida em forma sólida, sendo reconstituída antes de sua aplicação.

20 Em uma outra modalidade adicional da invenção, a formulação de selante de fibrina líquida é fornecida em forma congelada, sendo descongelada antes de sua aplicação.

Em uma modalidade da invenção, o componente sólido é fornecido em forma líquida, sendo seco antes de sua aplicação.

25 Em ainda outra modalidade da invenção, o componente sólido é fornecido em forma congelada, sendo seco antes de sua aplicação.

Em ainda uma outra modalidade adicional da invenção, os componentes sólidos são aplicados simultaneamente ou um após o outro.

30 Em uma modalidade da invenção, os componentes líquidos são aplicados simultaneamente ou um após o outro.

Em outra modalidade da invenção, os componentes sólidos são fornecidos em uma mistura.

Em uma outra modalidade adicional da invenção, o defeito é um grampo ou uma sutura.

Em um aspecto, a invenção apresenta um kit que compreende:

5 (i) recipiente(s) compreendendo componentes sólidos, que compreendem (a)- um componente de fibrinogênio, e (b)- um componente de enzima proteolítica que é capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio, sendo que os componentes (a) e (b) estão em recipientes separados ou no mesmo recipiente, sob a forma de uma mistura, e

10 (ii) pelo menos dois recipientes separados, sendo que pelo menos um recipiente separado compreende um componente de fibrinogênio líquido, congelado ou sólido, e o pelo menos segundo recipiente separado compreende um componente de enzima proteolítica líquido, congelado ou sólido que é capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio sendo que, quando os pelo menos dois recipientes separados de (ii) compreendem 15 componentes sólidos, então os componentes (a) e (b) estão no mesmo recipiente, sob a forma de uma mistura.

Em uma modalidade da presente invenção, a enzima proteolítica é trombina.

20 Em outra modalidade da presente invenção, o kit é usado para aplicação sobre uma superfície molhada.

25 Em uma outra modalidade adicional da presente invenção, o kit é usado para selar vazamentos em tecidos que não estão enriquecidos com, têm uma pequena quantidade de, estão privados de ou são desprovidos de vasos sanguíneos e/ou tecidos que estão com exsudação ou sem sangramento.

A matriz de fibrina ou o kit de acordo com a presente invenção podem ser usados for para tratamento ou prevenção de um defeito em um tecido úmido.

Breve Descrição dos Desenhos

30 A Figura 1 mostra a força necessária para separar duas camadas de tecido intestinal de íleo (força de descolamento) que foram unidas uma à outra com o uso de duas diferentes formulações de selante de

fibrina: uma mistura de fibrinogênio e trombina liofilizados versus uma formulação de selante de fibrina líquida com dois componentes.

A Figura 2 mostra a resistência de selagem (medida pelo teste de ruptura) de uma mistura de fibrinogênio e trombina liofilizados, uma 5 formulação de selante de fibrina líquida com dois componentes e uma matriz de fibrina formada por uma aplicação sequencial de fibrinogênio e trombina liofilizados e um selante de fibrina líquida com dois componentes.

A Figura 3 mostra a resistência de selagem (medida pelo teste de ruptura) de uma fibrina formada pela aplicação de trombina liofilizada 10 seguida de aspersão de um selante de fibrina líquida, uma fibrina formada pela aplicação de fibrinogênio liofilizado seguida de aspersão de um selante de fibrina líquida, uma fibrina formada pela aplicação de uma mistura de fibrinogênio e trombina liofilizados seguida de aspersão de um selante de fibrina líquida, e uma formulação de fibrina formada pela aplicação de 15 albumina em pó seguida de aspersão de um selante de fibrina líquida.

Descrição Detalhada das Modalidades da Invenção

A invenção refere-se a um método para aplicação de matriz de fibrina sobre uma mucosa ou outro tecido úmido, sendo que o método compreende a aplicação sequencial de uma mistura de selante de fibrina sólida sobre a superfície do tecido, seguida pela aplicação de uma formulação de selante de fibrina líquida sobre pelo menos uma porção da superfície. A invenção refere-se também à selagem eficaz de um defeito em 20 uma mucosa ou em outro tecido úmido, pela aplicação sequencial primeiro de uma mistura de selante de fibrina sólida seguida de uma formulação de selante de fibrina líquida.

A Invenção Tem Por Base as Seguintes Descobertas:

A força adesiva (ou força de descolamento) das diferentes formulações de fibrina testadas foi submetida ao teste de descolamento. O teste mede a intensidade de ligação da cola de fibrina entre camadas de 30 submucosa de intestino delgado porcino. Em uma modalidade, a formulação adesiva testada foi aplicada sobre o lado seroso do íleo de porco. Em seguida à aplicação da formulação de selante de fibrina testada,

o tecido de íleo foi dobrado sobre si mesmo (serosa com serosa) e a formulação de selante de fibrina foi deixada polimerizar. A força necessária para separar uma da outra as duas camadas aderidas de tecido de íleo (força de descolamento) foi medida com o uso de uma máquina universal para testes de tração LFPLUS, da Lloyd Instruments. Tipicamente, quanto mais alta a força de descolamento medida, maior a força adesiva da formulação testada.

Descobriu-se, de acordo com a presente invenção, que a força adesiva é significativamente aprimorada quando se usa uma formulação de selante de fibrina liofilizada, em comparação ao uso de uma formulação de selante de fibrina líquida. Descobriu-se que a força adesiva da formulação de selante de fibrina liofilizada foi cerca de 2,7 vezes maior, em comparação à força adesiva da formulação de selante de fibrina líquida.

As propriedades selantes de diferentes formulações de fibrina foram medidas pelo teste de ruptura. O teste de ruptura pode determinar e avaliar a capacidade de um selante para evitar vazamentos. Em resumo, um tubo de alumínio que está conectado a uma fonte de água e contém orifícios é introduzido em um segmento tubular de íleo de porco e o segmento tubular é selado e apertado em ambas as extremidades do tubo. Ao se deixar que o fluxo de água entre no tubo de alumínio, a água entra no espaço vazio entre o íleo e o tubo de alumínio, através dos orifícios, de um modo que evita que a água torne a fluir para dentro do tubo de alumínio. Antes de permitir o fluxo de água, uma incisão de 10 mm é formada perpendicularmente ao comprimento do intestino, sendo a incisão primeiramente suturada em sua linha média para, então, aplicar-se a formulação de selante de fibrina testada sobre a área de incisão, por meio de uma moldura em parafilme com 6 cm^2 que é colocada em torno da área de incisão. Após a aplicação da formulação testada, a fibrina é deixada curar (ou polimerizar) durante 10 minutos, sendo o intestino preenchido com água para testar sua capacidade de suportar a pressão. Quando a água começa a fluir para dentro do espaço vazio entre o íleo e o tubo, a pressão da água aumenta até que a selagem da incisão se abra, e seja observada

uma queda brusca na pressão. O nível de pressão é monitorado mediante o uso de um calibrador de pressão (D-logmate 590 MRC Israel) que é conectado à linha de fluxo de líquidos. A pressão observada antes da queda é anotada, sendo considerada como a pressão de ruptura.

- 5 Tipicamente, a observação de uma pressão de ruptura mais alta indica maior propriedade de selagem da formulação testada.

Descobriu-se também, de acordo com a presente invenção, que o selante de fibrina liofilizada, que mostrou ter forças adesivas melhores que aquelas do selante de fibrina líquida, foi ineficaz para a selagem. Ao
10 contrário, a formulação de selante de fibrina líquida tinha um melhor efeito selante que o selante de fibrina liofilizada.

Além disso foi surpreendentemente descoberto que uma aplicação sequencial de um selante de fibrina liofilizada e uma formulação de selante de fibrina líquida mostrou um aumento sinérgico na propriedade
15 de selagem. Foi observado um aumento de cerca de 1,7 vezes na resistência de selagem, em comparação à resistência de selagem da formulação de selante de fibrina líquida. Entretanto, um aumento sinérgico nas propriedades selantes não foi encontrado com o uso da aplicação sequencial de fibrinogênio liofilizado ou trombina liofilizada seguida de
20 administração de uma formulação de selante de fibrina líquida.

Descobriu-se, também, que a secagem da mucosa antes da aplicação da formulação de selante de fibrina líquida (por exemplo mediante a aplicação de uma proteína em pó, como albumina em pó, sobre a camada mucosa) não aumentou o desempenho de selagem da formulação de
25 selante de fibrina líquida.

Essas descobertas encorajaram o desenvolvimento de um método aprimorado para produção de uma matriz de fibrina com maior resistência de selagem sobre uma mucosa ou outro tecido úmido. A matriz de fibrina gerada de acordo com a presente invenção pode ser usada para
30 selar defeitos em mucosas ou outros tecidos úmidos, por exemplo em tecidos que estão em constante movimento, por exemplo tecido gastrointestinal e tecido pulmonar.

O termo "tecido" se refere a uma associação de células e/ou componentes celulares unidos para desempenhar uma função específica. As células no tecido podem ser todas de um tipo ou de mais de um tipo.

5 O tecido pode ser um tecido artificial no qual as células são cultivadas para funcionar de maneira similar a um tecido em um organismo vivo. O tecido pode ser um tecido do corpo humano ou um tecido animal.

O termo "matriz de fibrina" se refere a uma fibrina obtida pela aplicação sequencial de mistura de selante de fibrina sólida e a formulação de selante de fibrina líquida.

10 O termo "quantidade eficaz de uma mistura de selante de fibrina sólida" se refere a uma quantidade de um componente sólido compreendendo fibrinogênio e uma quantidade de um componente sólido que compreende uma enzima proteolítica capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio e que, após hidratação sobre um tecido úmido, forma

15 um coágulo de fibrina.

O termo "quantidade eficaz de uma formulação de selante de fibrina líquida" se refere a uma quantidade de um componente líquido compreendendo fibrinogênio e uma quantidade de um componente líquido que compreende uma enzima proteolítica (que é capaz de formar fibrina

20 quando reage com fibrinogênio) que permite a formação do coágulo de fibrina após a mistura dos componentes líquidos.

Sem se ater ao mecanismo, parece que uma vez aplicada sobre o tecido úmido, a mistura de selante sólido é hidratada. A mistura de selante sólido hidratado prepara o tecido mediante a solidificação do líquido presente no tecido úmido, e a formação de uma camada de fibrina em proximidade íntima com o tecido. A formulação de selante de fibrina líquida é, então, aplicada sobre esse tecido preparado, resultando consequentemente em resistência de selagem e durabilidade aprimoradas.

Vantajosamente, a solidificação da umidade sobre a superfície

30 sem a necessidade de usar uma esponja ou gaze pode diminuir o risco de formação de adesão pós-operatória.

O termo "adesão" se refere a uma conexão anormal entre

tecidos e/ou órgãos. Tipicamente, as adesões ocorrem após procedimentos cirúrgicos, como em seguida à manipulação brusca dos tecidos, em seguida à secagem da superfície dos tecidos, e/ou devido à presença de corpos estranhos reativos (por exemplo materiais de sutura, pó de talco ou resíduos de fiapos) na área operada.

O termo "mucosa" ou "tecido mucoso" se refere a um tecido úmido que cobre alguns órgãos e cavidades do corpo. Tipicamente, o tecido mucoso secreta o material mucoso. Exemplos de tecido mucoso incluem, mas não se limitam a, mucosa oral, por exemplo bucal e sublingual, mucosa nasal, mucosa ocular, mucosa genital, mucosa retal, mucosa aural, mucosa pulmonar, mucosa bronquial, mucosa gástrica, mucosa intestinal, mucosa olfativa, mucosa uterina, e mucosa esofágica. O termo "mucoso" se refere a um material molhado/úmido e viscoso, como uma substância rica em mucinas, glicoproteínas, albumina, e/ou quaisquer outros componentes que contribuam para a viscosidade.

O termo "outros tecidos úmidos" se refere a um tecido molhado. O tecido pode estar molhado por fluidos corpóreos como soro, infiltrado de soro, sangue e fluidos de inflamação, e/ou por outros fluidos/líquidos como solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em uma modalidade da invenção, o fluido não contém fatores de coagulação (por exemplo, não contém fibrinogênio).

Para uso na presente invenção, o termo "defeito" se refere a um rasgo, abertura, punção, fissura, furo, orifício, rachadura, fresta, fenda, vão, perfuração, fratura, ruptura ou vazamento, por exemplo, em um tecido. Por exemplo, o defeito pode ser formado em seguida a um procedimento de anastomose. O defeito pode ser congênito, por exemplo hérnia, uma condição resultante de patologia relacionada ao corpo, por exemplo seroma, hérnia, infecção, inflamação, formado após cirurgia, sutura e/ou grampeamento, ou uma condição resultante de um fator não corporal, por exemplo acidentes e lesões.

O termo "vazamento" se refere ao escape ou passagem de uma substância, por exemplo um fluido, material viscoso e/ou ar, por

exemplo através de um rasgo, abertura, punção, fissura, furo, orifício, rachadura, fresta, fenda, vão, perfuração, fratura, ou ruptura em um tecido.

O termo "anastomose" tipicamente se refere a um procedimento cirúrgico que é usado para reconectar duas ou mais seções de 5 um órgão ou tecido. O procedimento pode ser usado em seguida ao seccionamento do trato urinário (uretra), garganta (esôfago), ou em cirurgia intestinal. O procedimento pode também ser usado em seguida à excisão de um tecido doente (como um tecido inflamado, canceroso ou, de outro modo, patológico, por exemplo em doença ulcerativa).

10 A invenção refere-se também a um kit que compreende:

(i) um ou mais recipientes compreendendo componentes sólidos, que compreendem (a)- um componente de fibrinogênio, e (b)- um componente de enzima proteolítica que é capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio, e

15 (ii) pelo menos dois recipientes separados, sendo que pelo menos um recipiente separado compreende um componente de fibrinogênio líquido, congelado ou sólido, e pelo menos o segundo recipiente separado compreende um componente de enzima proteolítica líquido, congelado ou sólido que é capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio.

20 Os componentes (a) e (b) do elemento (i) podem estar em recipientes separados ou no mesmo recipiente, sob a forma de uma mistura. Em uma modalidade, quando os pelo menos dois recipientes separados de (ii) compreendem componentes sólidos, então os componentes (a) e (b) estão no mesmo recipiente, sob a forma de uma mistura. Em outra modalidade, quando os pelo menos dois recipientes separados de (ii) 25 compreendem componentes sólidos, está incluído pelo menos um recipiente compreendendo uma solução aquosa para sua hidratação.

Ao contrário dos kits de fibrina comercialmente disponíveis, que se destinam especialmente à hemostase, o kit da invenção é também 30 adequado para selagem de vazamentos em tecidos que não estão enriquecidos com, têm uma pequena quantidade de, estão privados de ou são desprovidos de vasos sanguíneos.

Alguns exemplos não-limitadores de tecidos que não estão enriquecidos com, têm uma pequena quantidade de, estão privados de ou são desprovidos de vasos sanguíneos são dura-máter, bexiga, olhos, pulmões e vesícula biliar.

5 Em uma modalidade da invenção, o kit se destina a selagem de vazamentos em tecidos que não estão enriquecidos com, têm uma pequena quantidade de, estão privados de ou são desprovidos de vasos sanguíneos.

O termo "hemostase" se refere à capacidade de um agente para cessar o sangramento proveniente de um vaso sanguíneo ferido e/ou 10 contribuir para manter o sangue contido no interior do vaso sanguíneo.

Além disso, ao contrário dos kits de fibrina comercialmente disponíveis, que se destinam especialmente a cessar o sangramento proveniente de um vaso sanguíneo ferido e/ou contribuir para manter o sangue contido no interior do vaso sanguíneo, o kit da invenção também é 15 adequado para selar vazamentos de substâncias diferentes de sangue ou plasma, por exemplo líquido cefalorraquidiano (CSF), ar, conteúdo intestinal, bílis, fluido linfático e humor vítreo.

Em uma modalidade, a matriz de fibrina ou o kit da invenção se destina a selar vazamentos e tecidos que estão com exsudação ou sem 20 sangramento. O termo exsudação refere-se, por exemplo, a pequenos sangramentos. O termo exsudação inclui casos de sangramento onde um volume relativamente baixo de sangue é perdido a uma velocidade relativamente pequena.

O kit pode também conter instruções de uso. O kit pode 25 compreender, também, meios para cortar e/ou grampear ou suturar um tecido ou órgão, como dispositivos para corte e grampeamento mecânico ou manual. O recipiente pode ser um frasco, uma seringa pré-preenchida, uma pequena garrafa, um tubo ou qualquer outro recipiente adequado que contenha os componentes sólidos ou líquidos. O recipiente pode ter 30 tamanhos diferentes e conter diferentes volumes/pesos das composições, por exemplo, cada componente líquido pode ter um volume igual a ou menor que cerca de 10 ml, e cada componente sólido pode ter um peso de pó igual

a ou menor que cerca de 3 g. Opcionalmente, um aplicador para a administração dos componentes sólidos e líquidos pode também estar incluído no kit.

A matriz de fibrina ou kit de acordo com a presente invenção 5 pode ser usada com qualquer propósito terapêutico. O termo "qualquer propósito terapêutico" se refere a qualquer tratamento curativo ou preventivo em um indivíduo. Os exemplos de propósitos terapêuticos incluem, mas não se limitam a, selagem de um orifício formado em um tecido ou órgão, por exemplo um osso, anastomose em vasos sanguíneos, união de partes de 10 tecido, por exemplo partes de tecidos moles, tratamento ou prevenção de defeitos na dura-máter, por exemplo rasgos e vazamentos em seguida a injeções, fissuras ou rachaduras durais, tratamento ou prevenção de sangramento, tratamento ou prevenção de vazamentos de ar como em seguida a ressecção pulmonar, tratamento ou prevenção de defeitos em 15 seguida a perfuração intestinal, tratamento ou prevenção de defeitos em seguida a procedimento de anastomose realizado em qualquer tecido, por exemplo útero, esôfago, estômago, pâncreas, duto pancreático, vesícula biliar, duto biliar, intestino (inclusive o intestino delgado e o intestino grosso) e reto, tratamento ou prevenção de vazamentos pós-operatórios em 20 qualquer tecido por exemplo útero, esôfago, estômago, pâncreas, duto pancreático, vesícula biliar, duto biliar, intestino (que inclui o intestino delgado e o intestino grosso) e reto, impedimento ou diminuição da ocorrência de vazamentos pós-operatórios na linha de grampeamento ou sutura, por exemplo mediante aplicação da matriz de fibrina de acordo com a 25 presente invenção sobre pelo menos uma parte de um defeito como uma linha de grampeamento/sutura, fixação mais firme de próteses, por exemplo durante uma cirurgia de hérnia, reforço da linha de grampeamento/sutura, impedimento ou diminuição de vazamento de ar alveolar, tratamento ou prevenção de defeitos renais, tratamento ou prevenção de fistulas, 30 tratamento ou prevenção de defeitos no coração, por exemplo em ferimentos penetrantes no coração, reforço de uma prótese de enxerto vascular, e tratamento ou prevenção de vazamento do líquido cefalorraquidiano.

Em uma modalidade da invenção, o uso terapêutico se destina a selagem de vazamentos em tecidos que não estão enriquecidos com vasos sanguíneos, ou que são desprovidos de vasos sanguíneos.

5 Em outra modalidade da invenção, o uso terapêutico se destina ao reforço da linha de grampeamento/sutura.

A matriz de fibrina da invenção pode ser usada para selagem de defeitos sem a necessidade de grampos ou suturas.

O termo "grampo ou sutura" inclui qualquer prendedor usado para fechamento de uma ferida por exemplo, mas não se limitando a, 10 grampo, clipe, pino, gancho, sutura e similares.

O termo "pelo menos uma parte de um defeito", para uso na presente invenção, se refere a uma área que é menor, igual, ou maior que o defeito. Por exemplo a área pode ser de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100%, inclusive qualquer intervalo entre as porcentagens apresentadas, 15 do defeito, ou mais. Em uma modalidade da invenção, a matriz de fibrina ou kit de acordo com a presente invenção é usado para reforço da linha de grampeamento/sutura. Por exemplo, uma incisão de 10 mm formada em um indivíduo durante uma cirurgia é primeiro suturada ou grampeada. Para reforço, 100 mg de mistura de selante de fibrina sólida (1.000 IU de trombina 20 por 70 mg de fibrinogênio) é aplicada sobre a linha de grampeamento/sutura, seguida de aspersão de uma formulação de selante de fibrina líquida. A fibrina líquida é aplicada mediante aspersão em um volume total de 2 ml (razão de 1:1 entre os dois componentes) de 1.000 IU/ml de trombina e 70 mg/ml de fibrinogênio.

25 O termo "indivíduo", para uso na presente invenção, inclui animais de origem mamífera, inclusive seres humanos. Em uma modalidade, o indivíduo é um paciente.

Em um aspecto, a invenção apresenta um método para aplicação de matriz de fibrina sobre um tecido úmido. O método inclui as 30 seguintes etapas: a) aplicar uma quantidade eficaz de uma mistura de selante de fibrina sólida sobre o tecido úmido, e aplicar sobre pelo menos uma porção da mistura de selante de fibrina sólida uma quantidade eficaz de

uma formulação de selante de fibrina líquida, sendo que as quantidades eficazes de mistura de selante de fibrina sólida e formulação de selante de fibrina líquida são suficientes para produzir uma matriz de fibrina sobre o tecido úmido tendo resistência de selagem aprimorada em relação à aplicação de uma quantidade eficaz ou da formulação de selante de fibrina líquida, ou da mistura de selante de fibrina sólida. Vantajosamente, a aplicação do selante de fibrina sólida antes do selante de fibrina líquida aprimora a resistência de selagem do selante de fibrina líquida.

O termo "tecido úmido" refere-se a um tecido molhado e inclui, por exemplo, mucosa, tecido mucoso e outros tecidos úmidos. Em outra modalidade da invenção, o tecido está umedecido por um fluido que é isento de fibrinogênio. O termo "isento de fibrinogênio" refere-se, por exemplo, a uma concentração de fibrinogênio menor que 1,5 g/L.

O termo "sobre pelo menos uma porção da mistura de selante de fibrina sólida", para uso na presente invenção, refere-se a uma área que varia de uma área superficial menor até uma área superficial maior, em comparação à área onde foram aplicados os um ou mais componentes de selante de fibrina sólida. Por exemplo, a formulação de selante de fibrina líquida pode ser aplicada a 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100%, inclusive qualquer intervalo entre as porcentagens apresentadas, da área superficial onde foram aplicados os um ou mais componentes sólidos. Alternativamente, a formulação de selante de fibrina líquida pode ser aplicada a uma maior área superficial que aquela onde foram aplicados os um ou mais componentes sólidos, por exemplo a totalidade do tecido úmido ou órgão.

O termo "formulação de selante de fibrina líquida" refere-se, para os propósitos do presente pedido, a pelo menos dois componentes líquidos separados, necessários para a formação do selante de fibrina. O pelo menos um componente separado compreende fibrinogênio, e o pelo menos segundo componente separado compreende uma enzima proteolítica que é capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio (ou com uma formulação contendo fibrinogênio). Quando os pelo menos dois

componentes separados são administrados, por exemplo injetados no sítio-alvo, os componentes líquidos entram em contato, imitando os estágios finais do processo em cascata da coagulação do sangue, de modo a formar o bem-conhecido coágulo, fibrina.

5 O termo "tecidos moles" tipicamente se refere a estruturas do corpo que conectam, sustentam, envolvem e/ou circundam outras estruturas e órgãos. Os tecidos moles podem ser um tecido conjuntivo ou um tecido não conjuntivo. Exemplos de tecidos moles incluem, mas não se limitam a, tendões, ligamentos, tecidos fibrosos, membrana sinovial, fascia, músculos, 10 parede muscular, nervos, intestino, tecido gorduroso, fígado, pele, baço e vasos sanguíneos.

O termo "mistura de selante de fibrina sólida" refere-se, para propósitos do presente pedido, a uma composição sólida que compreende os precursores para a formação de um selante de fibrina. A composição 15 compreende uma enzima proteolítica sólida que é capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio (ou com uma formulação contendo fibrinogênio) e fibrinogênio sólido. A mistura sólida pode compreender também outros componentes, como albumina. A enzima proteolítica pode ser trombina e/ou uma substância obtinível a partir de veneno de cobra. 20 Em uma modalidade da invenção, a composição sólida compreende componentes de fibrinogênio e trombina em sua forma liofilizada. Em outra modalidade, as soluções contendo trombina e fibrinogênio estão separadamente secas, por exemplo por liofilização, para produzir seus respectivos componentes sólidos no total da mistura de selante de fibrina 25 sólida. Em outra modalidade da invenção, os materiais sólidos resultantes são reduzidos a pó por Trituração, mediante o uso de um moinho de superfícos ou um moinho de lâmina resfriada, ou manualmente mediante a passagem do material sólido através de uma peneira, por exemplo com o uso de uma espátula. Em uma modalidade da invenção, o material foi 30 triturado com uma espátula através de uma peneira de 200 µm. Em outra modalidade da invenção, os materiais sólidos são reduzidos a pó por Trituração, mediante o uso de um método conforme descrito em WO

2008/053475, que está aqui incorporado, a título de referência.

O tamanho de partícula do material sólido em seguida à moagem pode ser menor que 1.000 µm. Em uma modalidade da invenção, o tamanho de partícula do material sólido em seguida à moagem é igual a ou 5 menor que 200 µm. A distribuição de tamanhos de partícula pode estar na faixa de 10 a 100 µm, ou na faixa de 10 a 60 µm. A enzima proteolítica sólida e o fibrinogênio sólido podem ser fornecidos juntos. Também é possível que os precursores sólidos sejam fornecidos separadamente e aplicados simultaneamente, ou um após o outro, sobre a superfície 10 desejada. Em uma modalidade da invenção, a enzima proteolítica sólida e o fibrinogênio sólido são fornecidos sob a forma de uma mistura.

A invenção também apresenta um método para preparar uma matriz de fibrina sobre uma superfície molhada. O método compreende as etapas de: obter um componente sólido compreendendo fibrinogênio, obter 15 um componente sólido compreendendo uma enzima proteolítica que é capaz de formar fibrina quando reage com o fibrinogênio, obter uma formulação de selante de fibrina líquida, aplicar uma quantidade eficaz dos componentes sólidos sobre pelo menos uma parte da superfície molhada, e aplicar sobre pelo menos uma porção dos componentes sólidos uma quantidade eficaz da 20 formulação de selante de fibrina líquida.

O termo "superfície molhada" se refere a uma superfície úmida. A superfície pode ser uma mucosa, um tecido mucoso e/ou outro tecido úmido. A superfície pode estar molhada por fluidos corpóreos, como infiltrado de soro, sangue e fluidos de inflamação, e/ou por fluidos não corporais como PBS.

A superfície molhada pode ser uma superfície de uma parte do corpo de um paciente, por exemplo qualquer tecido que contenha líquidos ou ar. O termo "superfície" inclui, mas não se limita a, a área genital, incluindo útero, vagina e ovários, os pulmões, o ânus, o baço, o fígado, a dura-máter, 30 os rins, o esôfago, o estômago, o pâncreas, o duto pancreático, a vesícula biliar, o duto biliar, os intestinos (inclusive o intestino delgado e o intestino grosso), e o músculo cardíaco. A superfície pode ser um sítio com

sangramento ou sem sangramento. Em uma modalidade da invenção, a superfície é um sítio sem sangramento. Em outra modalidade da invenção, a superfície está molhada por um fluido que é isento de fator de coagulação (por exemplo, isento de fibrinogênio). A superfície pode também ser 5 qualquer superfície, por exemplo uma superfície de trabalho, uma superfície de um dispositivo protético.

O termo "pelo menos uma parte da superfície molhada", para uso na presente invenção, se refere a uma área que é menor, igual ou maior que a superfície molhada. Por exemplo a área pode ser de 1, 10, 20, 30, 40, 10 50, 60, 70, 80, 90 ou 100%, inclusive qualquer intervalo entre as porcentagens apresentadas, da superfície, ou mais.

O termo "sobre pelo menos uma porção dos um ou mais componentes sólidos" refere-se a uma área que varia de uma área superficial menor até uma área superficial maior, em comparação à área onde foram 15 aplicados os um ou mais componentes de selante de fibrina sólida. Por exemplo, a formulação de selante de fibrina líquida pode ser aplicada a 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100%, inclusive qualquer intervalo entre as porcentagens apresentadas, da área superficial onde foram aplicados os 20 um ou mais componentes sólidos. Alternativamente, a formulação de selante de fibrina líquida pode ser aplicada a uma maior área superficial que aquela onde foram aplicados os um ou mais componentes sólidos, por exemplo toda a superfície.

Os componentes sólidos na mistura de fibrina sólida reagem 25 uma vez hidratados, por exemplo ao entrar em contato com o tecido úmido, para formar um selante de fibrina. Tipicamente, as preparações de fibrinogênio têm solubilidade relativamente baixa e o tecido mucoso exibe um teor de líquido relativamente baixo. Vantajosamente, o componente de fibrinogênio da mistura de selante de fibrina sólida usada pode ser rapidamente dissolvido e/ou hidratado mediante a aplicação sobre o tecido.

30 Descobriu-se, de acordo com a presente invenção, que um fibrinogênio sólido preparado por uma etapa de liofilização de uma solução contendo fibrinogênio com uma concentração de fibrinogênio de 20 mg/ml foi

reconstituído em uma solução aquosa à temperatura ambiente em um período de tempo menor que 10 minutos. Em uma modalidade da invenção, o componente de fibrinogênio da mistura de selante de fibrina sólida é preparado a partir de uma solução contendo fibrinogênio que tem uma 5 concentração de fibrinogênio igual a ou menor que 150, como igual a ou menor que 85, 25 mg/ml ou menor que 20 mg/ml.

A mistura de selante de fibrina sólida pode ser preparada mediante a secagem de uma formulação de selante de fibrina líquida. Qualquer procedimento de secagem conhecido na técnica pode ser usado 10 incluindo, mas não se limitando a, procedimentos de liofilização (secagem por congelamento) ou secagem por atomização. A secagem pode ser realizada a diferentes temperaturas, mediante o uso de vários equipamentos de secagem, como câmara com umidade controlada, forno de secagem, túnel de secagem, secadora por vácuo, ou qualquer outro método adequado 15 que não afete a formação de coágulo.

O termo "sólido", para uso neste relatório descritivo, se refere a uma composição que compreende um teor de líquido menor que 5%, como menor que 4, 3, 2, 1%, em peso, ou menos, com base no peso total da composição seca. O termo "sólido" é intercambiável com o termo "seco" ou 20 "pó".

O selante de fibrina sólida pode ser aplicado sobre o tecido por um dispensador. Exemplos de dispensadores são mostrados na patente US n° 1.776, 489 e na patente US n° 7.455.248, as quais estão aqui incorporadas a título de referência.

25 O termo "resistência de selagem aprimorada" refere-se, por exemplo, a uma resistência de selagem que é ao menos cerca de 1,2 vezes maior, em comparação à resistência de selagem obtida pelo selante líquido por si só. Em uma modalidade da invenção, a resistência de selagem é cerca de 1,7 vezes maior em relação à aplicação da formulação de selante 30 de fibrina líquida. A resistência de selagem pode ser medida, por exemplo, pelo teste de ruptura descrito acima.

O termo "resistência de selagem aprimorada 1,2 vezes maior"

se refere a uma resistência de selagem que é 20% mais alta que a resistência de selagem obtida pela aplicação de uma formulação de selante de fibrina líquida. O termo "resistência de selagem aprimorada 1,7 vezes maior" se refere a uma resistência de selagem que é 70% mais alta que a 5 resistência de selagem obtida pela aplicação de uma formulação de selante de fibrina líquida.

A enzima proteolítica pode ser trombina e/ou uma substância obtenível a partir de veneno de cobra. Os componentes líquidos podem ser congelados até o uso (por exemplo a uma temperatura de -18°C ou mais 10 baixa) ou secos, por exemplo por liofilização, para armazenamento prolongado. Os componentes secos podem ser reconstituídos mediante a adição de vários volumes de veículo farmaceuticamente aceitável, antes do uso. O termo "veículo farmaceuticamente aceitável" se refere a qualquer diluente ou veículo que seja adequado ao uso por seres humanos ou outros 15 animais. O veículo pode ser selecionado a partir de quaisquer dentre os veículos conhecidos na técnica, por exemplo, mas não se limitando a, solução tamponada com fosfato (PBS), solução salina, solução de cloreto de sódio, solução de cloreto de cálcio, solução de ringer com lactato (LR), 5% de dextrose em solução salina normal, e água para injeção. O fibrinogênio 20 liofilizado pode ser reconstituído com água estéril antes do uso. A trombina liofilizada pode ser reconstituída com solução de cloreto de cálcio estéril ou água, como água destilada, antes do uso. O fibrinogênio e a trombina liofilizados reconstituídos podem ser usados na formulação de selante de fibrina líquida, que pode, então, ser combinada para formar a fibrina. Os dois 25 componentes podem ser aplicados sobre o sítio desejado simultaneamente ou um após o outro.

Em uma modalidade da invenção, o componente compreendendo fibrinogênio é composto por um componente biologicamente ativo (CBA) que é uma solução de proteínas derivadas de 30 plasma sanguíneo. Esse componente pode compreender, ainda, ácido tranexâmico e arginina ou lisina, ou misturas de arginina e lisina, ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

O CBA pode ser derivado do crioprecipitado, como crioprecipitado concentrado. O termo "crioprecipitado" refere-se a um componente sanguíneo que é obtido a partir de plasma congelado preparado a partir de sangue integral. Um crioprecipitado pode ser obtido quando o plasma congelado é descongelado a frio, tipicamente a uma temperatura de 0 a 4°C, resultando na formação de um precipitado sobrenadante que contém fibrinogênio e Fator XIII. O precipitado pode ser coletado, por exemplo, por centrifugação. Tipicamente, o CBA compreende Fator VIII, fibronectina, Fator de von Willebrand (vWF), vitronectina, etc. por exemplo conforme descrito na patente US nº 6.121.232 e no pedido publicado PCT WO 98/33533 correspondente, cada um dos quais está aqui incorporado a título de referência.

O CBA pode compreender estabilizantes como cloridrato de arginina. Tipicamente, a quantidade de fibrinogênio no CBA está na faixa de cerca de 40 a cerca de 60 mg/ml. A quantidade de ácido tranexâmico na solução de CBA pode ser de cerca de 80 a cerca de 110 mg/ml. A quantidade de cloridrato de arginina pode ser de cerca de 15 a cerca de 25 mg/ml.

Opcionalmente, a solução é tamponada a um valor de pH fisiologicamente compatível. O tampão pode ser composto de glicina, citrato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio e água para injeção como veículo. A glicina pode estar presente na composição na quantidade de cerca de 6 a cerca de 10 mg/ml, o citrato de sódio pode estar na faixa de cerca de 1 a cerca de 5 mg/ml, o cloreto de sódio pode estar na faixa de cerca de 5 a cerca de 9 mg/ml e o cloreto de cálcio pode estar na concentração de cerca de 0,1 a 0,2 mg/ml.

Em outra modalidade, a concentração de plasminogênio e plasmina na composição do CBA é rebaixada para ser igual a ou menor que 15 µg/ml, como por exemplo 5 µg/ml ou menos de plasminogênio, por exemplo mediante o uso de um método conforme descrito na patente US nº 7.125.569 e no pedido publicado PCT WO 02/095019 correspondente, cada um dos quais está aqui incorporado a título de referência.

Também é possível que a formulação de selante de fibrina compreenda componentes que encorajam a formação do coágulo, como Ca²⁺, Fator VIII, fibronectina, vitronectina e Fator de von Willebrand (vWF), os quais podem ser fornecidos como um componente separado ou 5 formulados com os componentes líquidos.

A formulação de selante de fibrina líquida pode ser aplicada sobre o tecido mediante o uso de um dispensador que ejeta o selante diretamente sobre o tecido ou outro substrato ou superfície de trabalho, com ou sem aspersão de ar, por exemplo por gotejamento. Em uma modalidade 10 da invenção, o selante é aspergido a uma pressão de ar de 103,4 kPa (15 PSI). Os exemplos de dispensadores para selante tecidual são mostrados nas patentes US n° 4.631.055, 4.846.405, 5.116.315, 5.582.596, 5.665.067, 5.989.215, 6.461.361 e 6.585.696, 6.620.125 e 6.802.822, e na publicação PCT n° WO 96/39212, WO 2007/059801, e WO 2010/095128, 15 todos os quais estão aqui incorporados, a título de referência.

Uma formulação de selante de fibrina líquida compreende pelo menos dois componentes antes da aplicação em cirurgias. Em uma modalidade, a formulação de selante de fibrina líquida compreende dois componentes líquidos, um componente compreende fibrinogênio e, após 20 exposição a um segundo componente que compreende uma enzima proteolítica como trombina humana, um coágulo de fibrina é formado. Durante cirurgias, os componentes líquidos separados, por exemplo dois componentes líquidos, são aplicado, por exemplo, por duas seringas que são esvaziadas simultaneamente ou uma após a outra, resultando na 25 misturação dos dois componentes e na formação de fibrina.

Em uma modalidade da invenção, a enzima proteolítica é trombina humana tendo uma atividade de cerca de 2 a cerca de 4.000 IU/ml. A atividade de coagulação da trombina pode ser medida diretamente, por exemplo, de acordo com o procedimento de teste da Farmacopéia Européia 30 (0903/1997) e/ou indiretamente, como mediante a medição do comprimento da migração sobre uma superfície inclinada (o "teste de gota" conforme descrito no pedido de patente publicado US n° 2010/0203033), ou por

qualquer outro método conhecido na técnica. Deve ser compreendido pelo versado na técnica que uma cola de fibrina pode ser definida por seu teor de proteína coagulável em vez da definição baseada em fibrinogênio coagulável.

5 Em outra modalidade da invenção, os componentes de fibrinogênio e enzima proteolítica são aplicados de maneira tal que volumes iguais dos dois componentes são misturados e aplicados sobre o paciente no local da respectiva ferida. É claro que se deve compreender que a matriz de fibrina da invenção pode ser usada durante cirurgias e também em outras 10 situações nas quais um sangramento precise ser interrompido.

A mistura de selante de fibrina sólida pode ser preparada mediante a misturação de fibrinogênio sólido e trombina sólida em qualquer faixa de razões desejada. Por exemplo, quando o componente de fibrinogênio sólido foi preparado a partir de uma solução contendo 15 fibrinogênio com uma concentração de fibrinogênio de 40 a 85 mg/ml, e o componente de trombina sólida foi preparado a partir de uma solução contendo trombina com uma concentração de trombina de cerca de 800 a 1.200 IU/ml, os dois componentes sólidos podem ser misturados a uma razão de 1:1, 3,2:1, 6,4:1, respectivamente, e assim por diante. A mistura 20 pode ser realizada em uma área com umidade controlada (umidade relativa de 25%, temperatura de 37°C). O pó misturado pode ser mantido em uma câmara fechada até o uso.

A solução contendo fibrinogênio pode ser diluída, por exemplo para conter 25 mg/ml ou 20 mg/ml de fibrinogênio, antes da etapa de 25 secagem. A misturação dos dois componentes pode ser realizada antes da aplicação da mistura de selante de fibrina sólida sobre o tecido, ou ser aplicada na razão desejada imediatamente sobre o tecido.

Durante a aplicação da formulação de selante de fibrina líquida sobre o tecido, o componente contendo fibrinogênio e o componente 30 contendo trombina podem ser aplicados em qualquer faixa de razões desejada. Por exemplo, quando a concentração do componente de fibrinogênio é de 40 a 85 mg/ml e a concentração de trombina é de cerca de

800 a 1.200 IU/ml os dois componentes podem ser misturados a uma razão de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, respectivamente, e assim por diante. Em uma modalidade da invenção, os componentes do selante de fibrina líquida são aplicados a uma razão de 1:1.

5 A matriz de fibrina da invenção pode ser aplicada em uma quantidade terapeuticamente eficaz. O termo "uma quantidade terapeuticamente eficaz" se refere à dose necessária para evitar ou tratar uma doença, um transtorno ou um problema de saúde. A dose eficaz pode ser alterada, dependendo da idade e do peso do indivíduo, da doença e de
10 sua severidade (por exemplo do tamanho da incisão) e outros fatores que podem ser reconhecidos pelo versado na técnica. Por exemplo, a mistura de selante de fibrina sólida pode ser aplicada a um peso na faixa de 0,1 a 100 mg por cm², como a um peso de 0,5, 1, 4, 8, 16, 30, 60 ou 100 mg por cm². A formulação de selante de fibrina líquida pode ser aplicada a um volume na
15 faixa de cerca de 0,01 a cerca de 1 ml por cm², como a um volume de 0,01, 0,05, 0,5 ou 1 ml por cm².

Em uma modalidade, para uma incisão de 10 mm, a aplicação sequencial é realizada sobre uma área de 6 cm² mediante a dispersão de 100 mg de mistura de selante de fibrina sólida (1.000 IU de trombina por
20 70 mg de fibrinogênio), seguida de aspersão de uma formulação de selante de fibrina líquida. A formulação líquida é aplicada mediante aspersão em um volume total de 2 ml (razão de 1:1 entre os dois componentes) de 1.000 IU/ml de trombina e 70 mg/ml de fibrinogênio.

A formulação de selante de fibrina líquida pode ser fornecida
25 nos métodos da invenção em forma sólida, sendo reconstituída antes de sua aplicação. A reconstituição pode ser realizada mediante a adição de vários volumes de um veículo farmaceuticamente aceitável. O termo "reconstituição" se refere a um processo no qual um sólido é convertido em uma forma líquida. Um produto reconstituído pode ser um produto líquido
30 feito pela adição de líquido aquoso a sólidos secos dos quais o líquido foi previamente removido.

Alternativamente, a formulação de selante de fibrina líquida

pode ser fornecida sob forma congelada, por exemplo a uma temperatura de -18°C ou mais baixa, sendo descongelada antes de sua aplicação. O descongelamento pode ser realizado mediante incubação dos recipientes que compreendem os componentes líquidos à temperatura ambiente (de 5 20°C a 25°C), a uma temperatura de 2 a 8°C ou a uma temperatura de 37°C. Em outra modalidade, os componentes líquidos são aplicados simultaneamente. Ainda em uma outra modalidade adicional, os componentes líquidos são aplicados um após o outro.

O componente sólido pode ser fornecido em forma líquida, 10 sendo seco antes de sua aplicação, por exemplo mediante procedimentos de liofilização (secagem por congelamento) ou secagem por atomização. Alternativamente, o componente sólido pode ser fornecido sob forma congelada, sendo seco antes de sua aplicação. Os componentes congelados podem ser descongelados e, então, secos ou podem ser 15 convertidos diretamente de congelados a sólidos, por exemplo mediante sublimação.

O componente sólido pode ser fornecido em suspensão, por exemplo em qualquer solvente adequado, inclusive um líquido não-aquoso, como hidrofluorocarboneto (HFE) ou qualquer outro fluido carreador no qual 20 o componente sólido não se dissolva, como alcoóis, éteres ou outros fluidos orgânicos. Os componentes sólidos e/ou os componentes líquidos podem ser aplicados nos métodos da invenção simultaneamente ou um após o outro. Em uma modalidade, os componentes sólidos são fornecidos em uma mistura, e são aplicados simultaneamente. Em outra modalidade, os 25 componentes sólidos são fornecidos em recipientes separados e são aplicados simultaneamente. Em uma outra modalidade adicional, os componentes sólidos são fornecidos em recipientes separados e são aplicados um após o outro.

A matriz de fibrina da invenção pode ser aplicada por quaisquer 30 meios usados por cirurgiões para tratamento ou prevenção de defeitos incluindo, mas não se limitando a, cirurgia aberta e procedimento minimamente invasivo (MIS), como em um procedimento laparoscópico. Em

uma modalidade da invenção, uma incisão é feita no local da cirurgia, e a matriz de fibrina é aplicada sobre o defeito. Em outra modalidade, uma incisão é feita no local da cirurgia, e a incisão é grampeada ou suturada e a matriz de fibrina é aplicada sobre a linha de grampeamento ou sutura.

- 5 O paciente pode receber anestesia local, regional ou geral.

O termo "cirurgia aberta" refere-se a cirurgia na qual o cirurgião tem acesso direto ao sítio cirúrgico por meio de uma incisão relativamente grande.

- Para uso na presente invenção, o termo "procedimento minimamente invasivo" refere-se a uma cirurgia na qual o cirurgião tem acesso ao sítio cirúrgico por meio de pequenas incisões ou através de uma cavidade corporal ou abertura anatômica, por exemplo via laparoscopia. Técnicas especializadas podem ser usadas para visualizar a área operada, como câmeras em miniatura com microscópios, pequenas lanternas de fibra óptica e monitores de alta definição. Os instrumentos que têm "atuadores de extremidade", como fórceps, cortadores, suportes de agulha, cauterizadores e similares podem ser introduzidos no sítio cirúrgico.

- Os componentes contendo fibrinogênio e trombina estão disponíveis junto a fabricantes como OMRIX, por exemplo EVICEL®, QUIXIL®, ADHEXIL™ e EVITHROM®, Baxter, por exemplo TISEEL®, CSL, por exemplo Beriplast®, e similares. Em uma modalidade, os componentes de selante de fibrina líquida são fabricados a partir de plasma de fontes humanas reunidas, e fornecidos como um kit de uso único consistindo em dois frascos: um frasco contém um Componente ativo biológico 2 (BAC2) e outro frasco contém trombina. O kit pode incluir, também, um dispositivo de aplicação estéril e instruções de uso.

- Em uma modalidade, o componente BAC2 é uma solução estéril com pH 6,7 a 7,2, que consiste principalmente em um concentrado de fibrinogênio humano. O fibrinogênio é uma proteína derivada de sangue humano que forma um coágulo quando combinada com trombina. A formulação de selante de fibrina líquida, como a solução de BAC2, pode conter: concentrado de fibrinogênio humano (55 a 85 mg/ml), cloridrato de

arginina, glicina, cloreto de sódio, citrato de sódio, cloreto de cálcio, e água para injeção (WFI).

Em uma modalidade, o componente de trombina é uma solução estéril, com pH 6,8 a 7,2, que contém trombina humana altamente purificada, a qual ativa a coagulação do produto final combinado. A trombina é uma protease altamente específica que transforma em fibrina o fibrinogênio contido no BAC2. A solução de trombina pode conter: trombina humana (800 a 1.200 IU/ml), cloreto de cálcio, albumina humana, manitol, acetato de sódio e água para injeção.

Tanto o crioprecipitado, que pode ser o material de partida para BAC2, como o plasma crioempobrecido, que pode ser o material de partida para a produção de trombina, podem ser produzidos a partir de plasma de fontes humanas reunidas. As etapas para produção de crioprecipitado e plasma crio-empobrecido são bem conhecidas. Em uma modalidade, a trombina é produzida pela purificação cromatográfica de protrombina a partir de plasma crio-empobrecido, seguida de ativação com cloreto de cálcio, por exemplo conforme descrito na patente US nº 5.143.838, que está aqui incorporada, a título de referência. Em outra modalidade, o componente de fibrinogênio é derivado de crioprecipitado, em particular crioprecipitado concentrado.

Os componentes de fibrinogênio e trombina usados acima como uma das partes dos dois componentes do selante de fibrina líquida ou do componente liofilizado podem ser preparados a partir de plasma de seres humanos ou mamíferos. Entretanto, também é possível que os componentes sejam preparados por métodos recombinantes. Os componentes de fibrinogênio podem ser preparados de acordo com os processos descritos na patente US nº 6.121.232 e no pedido publicado PCT WO 98/33533, no qual o plasmin(ogênio) é removido, conforme descrito no pedido publicado EP 1.390.485, e ácido tranexâmico não é adicionado.

Os componentes do selante de fibrina, seja como parte do selante de fibrina líquida com dois componentes ou da mistura de selante de fibrina sólida, derivados de sangue ou frações sangue, são tipicamente

submetidos a pelo menos duas etapas distintas de inativação/remoção de vírus. Os processo de inativação e remoção de vírus podem ser realizados, por exemplo, pelos seguintes métodos: nanofiltração, solvente/detergente, tratamento por baixo pH, irradiação UV, tratamento por tiocianato de sódio 5 e/ou por qualquer outro método conhecido na técnica.

O termo "etapa de inativação de vírus" refere-se a uma situação na qual vírus são mantidos na solução porém são tornados não-viáveis, por exemplo mediante dissolução de seu revestimento de lipídio. O termo "etapa de remoção de vírus" refere-se a uma situação na qual vírus 10 são fisicamente removidos da solução, por exemplo por técnicas de exclusão de tamanho.

O termo "pelo menos duas etapas distintas de inativação/remoção de vírus" envolve a realização de pelo menos dois tratamentos diferentes e independentes para inativar ou remover vírus. Uma 15 combinação de dois ou mais dos seguintes exemplos não limitadores pode ser usada: pasteurização, solvente/detergente (S/D), nanofiltração, tratamento por baixo pH, irradiação UV e tratamento por tiocianato de sódio.

O uso de um CBA derivado de crioprecipitado concentrado é vantajoso, já que esse tipo de fração também contém, além de fibrinogênio, 20 valiosos componentes sanguíneos que desempenham um papel importante para coagulação do sangue quando uma enzima proteolítica como trombina humana é colocada em contato com uma solução de CBA. Os componentes valiosos são, por exemplo, Fator VIII, Fator XIII, fibronectina, vitronectina, Fator de von Willebrand (vWF), etc.

A aplicação da composição de mistura de selante de fibrina sólida seguida da composição selante de fibrina líquida gera uma matriz de fibrina sobre o tecido, com uma superioridade de selagem que não é obtida pela aplicação de qualquer das composições selantes por si só. A matriz de fibrina gerada de acordo com a presente invenção é especialmente 30 adequada para selagem de defeitos em tecidos mucosos e outros tecidos enterais ou úmidos que estão em constante movimento, por exemplo tecido gastrointestinal. Por exemplo, a fibrina da invenção pode ser usada para

impedir complicações de vazamento que ocorrem em ressecção ou anastomose grampeada em cirurgia gastrointestinal. Além disso, a fibrina da invenção pode ser vantajosamente usada para fixar próteses fortemente durante uma operação de hérnia.

- 5 As descrições dos pedidos, patentes e publicações citados acima ou abaixo estão aqui incorporadas, por referência.

A presente invenção é descrita com mais detalhes por referência aos seguintes exemplos não limitadores.

Exemplos

10 Materiais e Métodos

Liofilização.

A liofilização foi realizada de acordo com o seguinte ciclo:

Etapa	Fase	Tempo (h:m)	Temperatu ra (°C)	Vácuo (mBar))
1	Valores iniciais	--:--	4	OFF
2	Congelamento	1:00	-30	OFF
3	Congelamento	1:00	-50	OFF
4	Congelamento	5:40	-50	OFF
5	Preparação	0:20	-45	OFF
6	Sublimação	0:15	-42	20 (0,2)
7	Sublimação	0:15	-25	20 (0,2)
8	Sublimação	25:00	-25	20 (0,2)
9	Sublimação	1:00	-15	20 (0,2)
10	Sublimação	12:00	-15	20 (0,2)
11	Sublimação	2:00	20	20 (0,2)
12	Sublimação	5:00	20	20 (0,2)
13	Segunda secagem	0:30	25	12 (0,12)
14	Segunda secagem	18:00	25	12 (0,12)

Fibrinogênio e trombina líquidos.

- Nos experimentos abaixo, os dois componentes líquidos do selante de fibrina EVICEL® (BAC2 e trombina, Omrix Biopharmaceuticals

Ltd.) foram usados como o selante de fibrina líquida com dois componentes. O componente de fibrinogênio (compreendendo 70 mg de fibrinogênio/ml) foi usado tal como é e, exceto onde indicado em contrário, o componente de trombina foi usado tal como é (1000 IU/ml) ou diluído 10 vezes com um 5 tampão de diluição [0,04 M de CaCl₂ em água destilada desionizada (DDW)]. Em todos os experimentos, o selante de fibrina líquida foi aspergido sob pressão de ar de 103,4 kPa (15 PSI).

Preparação da mistura de fibrinogênio e trombina liofilizados.

As composições das soluções usadas para preparar os pós 10 liofilizados foram como os dois componentes líquidos de EVICEL®. Cada um dos componentes foi liofilizado separadamente de acordo com o ciclo de liofilização descrito acima. O componente de fibrinogênio foi diluído com DDW a uma concentração de 20 mg/ml de fibrinogênio antes do procedimento de liofilização.

15 Em seguida à liofilização, os pós foram triturados por uma espátula através de uma peneira de 200 µm. Os pós triturados de fibrinogênio e trombina foram misturados em uma razão de peso de 3,2:1 (igual a uma razão de 1.000 IU de trombina para 70 mg de fibrinogênio como em EVICEL) ou 6,4:1 (igual a uma razão de 500 IU de trombina para 70 mg 20 de fibrinogênio), respectivamente. A misturação foi realizada em uma área com controle de umidade (umidade relativa de 25%, temperatura de 37°C). O pó misturado foi mantido em uma câmara fechada até o uso. Uma mistura de pó sem uso prévio foi preparada para cada experimento.

25 Exemplo 1 - A força adesiva das formulações de selante de fibrina liofilizada e selante de fibrina líquida.

No experimento a seguir, foram medidas as forças adesivas de formulações de selante de fibrina liofilizada e selante de fibrina líquida.

A avaliação foi realizada pelo teste de força de descolamento, essencialmente conforme descrito em Nicoson ZR, Buckley CA. "Bond 30 strength of fibrin glue between layers of porcine small intestine submucosa (SIS)". Biomed Sci Instrum. 2002;38:179-184. Em resumo, a formulação de adesivo testado foi aplicada sobre o lado seroso de um íleo de porco (um

segmento de 4 x 10 cm) dentro de uma moldura de parafilme com 4 x 4 cm (16 cm²) (consulte o modo de aplicação abaixo).

- Em seguida à aplicação das diferentes formulações de selante de fibrina, a moldura de parafilme foi removida, e o tecido de íleo foi dobrado sobre si mesmo (serosa com serosa) e deixado para polimerização durante 10 min à temperatura ambiente (cerca de 20 a 25°C). Para obter quatro réplicas, o segmento foi recortado em tiras de 1 x 10 cm e a força necessária para separar uma da outra as duas camadas de tecido de íleo aderidas (conhecida como força de descolamento) foi medida mediante o uso de uma máquina universal para testes de tração - Lloyd Instruments LFPLUS.

As formulações testadas foram aplicadas do seguinte modo:

- Os componentes de fibrinogênio e trombina líquidos foram aplicados mediante aspersão em volumes iguais de fibrinogênio e trombina, e um volume total de 2 ml. A trombina foi aplicada a duas diferentes concentrações, 100 ou 1.000 IU/ml, e o fibrinogênio a 70 mg/ml, e
 - 400 mg de cada mistura liofilizada (uma mistura contendo 500 ou 1.000 IU de trombina por 70 mg de fibrinogênio, preparada conforme especificado na seção de materiais e métodos) foram aplicados dentro da moldura de parafilme de 16 cm² (100 mg foram aplicados a cada réplica).
- Então, para impedir que o tecido secasse, PBS foi aspergido sobre o pó até que o dito pó parecesse molhado.

As forças adesivas das diferentes formulações testadas são mostradas na Figura 1.

- Foi observado que uma força maior foi necessária para descolar as duas camadas de tecido intestinal quando a fibrina foi formada pela composição liofilizada, em comparação à força necessária quando foi usada a composição de selante de fibrina líquida (compare a força de descolamento da formulação liofilizada e da formulação líquida quando aplicadas na mesma concentração de 1.000 IU de trombina para 70 mg de fibrinogênio).

Descobriu-se, portanto, que a força adesiva entre duas amostras é significativamente aprimorada quando se usa uma formulação liofilizada.

- Além disso, foi observado que um fibrinogênio sólido preparado por uma etapa de liofilização de uma solução contendo fibrinogênio com uma concentração de fibrinogênio de 20 mg/ml foi reconstituído em uma solução aquosa à temperatura ambiente em um período de tempo menor
- 5 que 10 minutos. A concentração de fibrinogênio mais baixa produz uma torta liofilizada mais porosa e partículas mais porosas após a moagem da torta. Acredita-se que o aumento na porosidade permita que o líquido penetre mais facilmente nas partículas, resultando em um tempo de reidratação mais curto.
- 10 Exemplo 2 - A propriedade de selagem de diferentes formulações de selante de fibrina.

O exemplo anterior mostra que o uso de uma formulação liofilizada aumenta a força adesiva. Neste experimento, foram testadas as propriedades selantes de três diferentes formulações de selante de fibrina:

15 uma mistura de fibrinogênio e trombina liofilizados, uma formulação de selante de fibrina líquida, e um selante de fibrina formado pela aplicação sequencial de uma mistura de fibrinogênio e trombina liofilizados seguida de uma aplicação de uma formulação de selante de fibrina líquida. O teste de ruptura [essencialmente conforme descrito em Vilela e outros, "What Is Important For

20 Continent Catheterizable Stomas: Angulations or Extension? Int Braz J Urol. 2007, Vol. 33(2): 254-263] foi realizado para determinar e avaliar a capacidade de um selante para efetivamente selar e suportar a pressão.

A pressão de ruptura neste modelo indica a capacidade de uma formulação testada para aderir ao tecido e manter sua integridade mecânica

25 até o ponto de pressão no qual ocorre um rompimento da selagem, resultando na imediata perda de pressão e visível vazamento de água.

Conforme descrito acima, um tubo de alumínio especialmente projetado (comprimento de 27 cm) contendo orifícios foi inserido no a segmento tubular de íleo de porco no comprimento de 25 a 30 cm.

30 O segmento tubular foi selado ao tubo em ambas as extremidades por meio de discos plásticos, e apertado mediante o uso de parafusos metálicos. O tubo de alumínio foi conectado a uma fonte de água. Ao ser permitido o

fluxo de água para dentro do tubo de alumínio, a água entrou no espaço vazio entre o íleo e o tubo de alumínio, através dos orifícios presentes em torno do dito tubo, de um modo que impedia que a água tornasse a fluir para o tubo de alumínio.

5 Antes de permitir o fluxo de água, uma incisão de 10 mm foi formada perpendicularmente ao comprimento do intestino, mediante o uso de uma lâmina afiada. Para melhor simular condições clínicas, a incisão foi primeiro suturada em sua linha média (usando-se uma sutura de 3x0, ETHICON, cat. n° ss684) e, então, a formulação de selante de fibrina testada
10 foi aplicada sobre a área de incisão através de uma moldura de parafilme (20x30 mm, 6 cm²) que foi colocada em redor da área de incisão. Após a aplicação da formulação testada (consulte a aplicação abaixo) a fibrina foi deixada curar durante 10 min, o intestino foi preenchido com água e sua capacidade para suportar pressão foi testada. Quando a água começa a fluir
15 para dentro do espaço vazio entre o íleo e o tubo, a pressão da água aumenta até que a selagem da incisão se abra, e seja observada uma queda brusca na pressão. O nível de pressão observado foi monitorado com o uso de um calibrador de pressão (D-logmate 590 MRC Israel) que foi conectado à linha de fluxo de líquidos até que fosse observada uma queda brusca na
20 curva de pressão. A pressão antes da queda foi anotada, sendo considerada como a pressão de ruptura.

As formulações testadas foram aplicadas conforme exposto a seguir:

- A fibrina líquida foi aplicada por aspersão em um total de 2 ml
25 (razão de 1:1 entre os dois componentes). Somente uma concentração de trombina foi testada neste experimento: 1.000 IU por 70 mg de fibrinogênio.

- 100 mg da mistura liofilizada foram dispersos dentro da moldura de 6 cm². Somente uma mistura foi testada: uma mistura contendo 1.000 IU de trombina por 70 mg (um componente de fibrinogênio e trombina
30 liofilizados misturado a uma razão de 3,2:1 e preparado conforme descrito na seção de materiais e métodos). Para impedir que o tecido secasse, PBS foi aspergido em seguida à dispersão da formulação liofilizada.

- A aplicação sequencial foi realizada mediante a dispersão de 100 mg de fibrinogênio e trombina liofilizados (1.000 IU de trombina por 70 mg), seguida pela aspersão de componentes de fibrinogênio e trombina líquidos (2 ml total). Se o pó liofilizado não estava completamente molhado 5 pela mucosa circundando o intestino, foi aspergido PBS em seguida à dispersão da formulação liofilizada.

Foi observado que o selante de fibrina liofilizada, que tinha forças adesivas melhores que aquelas do selante de fibrina líquida (vide Figura 1), foi ineficaz na selagem (foi obtido um baixo valor de pressão de 10 ruptura, Figura 2).

O selante de fibrina líquida mostrou melhor efeito selante que o selante de fibrina liofilizada. Surpreendentemente, a aplicação sequencial de selante de fibrina liofilizada antes da aspersão de selante de fibrina líquida mostrou um aumento maior que a combinação meramente aditiva na 15 propriedade selante. Descobriu-se, portanto, que a propriedade selante de uma aplicação sequencial de selantes em pó e líquidos foi superior em comparação às propriedades selantes de cada formulação separadamente.

Sem se ater ao mecanismo, parece que os pós de fibrinogênio e trombina liofilizados são dissolvidos no muco que circunda o tecido 20 intestinal, formando assim uma camada de fibrina em proximidade íntima com o tecido seroso. Quando o selante de fibrina líquida é aspergido após os pós liofilizados, é observado um aprimoramento sinérgico na selagem tecidual, conforme descrito acima (Figura 2).

Exemplo 3 - O efeito selante superior de uma formulação de fibrina formada 25 pela aplicação de mistura de selante de fibrina sólida seguida de uma formulação de selante de fibrina líquida.

Nos exemplos anteriores foi mostrado que o selante de fibrina formado por uma aplicação sequencial de mistura de fibrinogênio e trombina liofilizados seguida pela aspersão de selante de fibrina líquida tem uma 30 propriedade selante superior.

O exemplo apresentado a seguir examina o desempenho de selagem da aplicação individual de somente um dos componentes

liofilizados (ou fibrinogênio, ou trombina), seguida pela aplicação do selante de fibrina líquida mediante o uso do método do teste de ruptura. O exemplo apresentado a seguir também examina se a aplicação de albumina à incisão que seca o muco circundando o intestino pode ajudar o selante de fibrina a 5 aderir melhor ao tecido e, assim, aumentar o desempenho de selagem do selante.

Para esse propósito, foi realizado o teste de ruptura acima descrito (Exemplo 2) e foi avaliada a propriedade selante dos seguintes selantes de fibrina: uma fibrina formada pela aplicação de 25 mg de trombina 10 liofilizada (preparada a partir de uma solução que compreende 1.000 IU/ml de trombina como o componente de trombina líquida de EVICEL, 625 µl de solução foram liofilizados) seguida pela aspersão de 2 ml de selante de fibrina líquida, uma fibrina formada pela aplicação de 75 mg de fibrinogênio liofilizado (preparado a partir de uma solução que compreende 20 mg/ml de 15 fibrinogênio conforme descrito acima) seguida pela aspersão de 2 ml de selante de fibrina líquida, uma fibrina formada pela aplicação de 100 mg de uma mistura de fibrinogênio e trombina liofilizados (a uma razão entre pesos de 3,2:1, preparada conforme descrito acima) seguida pela aspersão de 2 ml de selante de fibrina líquida, e uma formulação de fibrina formada pela 20 aplicação de 100 mg de albumina em pó (Sigma, cat. n° 078k1503) seguida pela aspersão de 2 ml de selante de fibrina líquida. Todos os pós (inclusive a albumina em pó) foram triturados por uma espátula através de uma peneira de 200 µm, antes do uso.

Os resultados são apresentados na figura 3. As estatísticas 25 foram realizadas por um teste de Tukey-Kramer ANOVA unidirecional. Letras iguais representam valores médios que não são significativamente diferentes ($p>0,05$) e uma letra diferente representa um valor médio que é significativamente diferente ($p\leq0,05$). Foi observado que a aplicação sequencial de um selante de fibrina sólida seguida por uma formulação de 30 selante de fibrina líquida gera uma matriz de fibrina com uma propriedade selante superior em comparação a uma matriz de fibrina formada pela aplicação individual de somente um dos componentes liofilizados (ou

fibrinogênio, ou trombina) seguida pela aplicação da formulação líquida. Descobriu-se, também, que a aplicação de uma proteína em pó (por exemplo albumina) que seca a mucosa não aumenta o desempenho de selagem da formulação de selante de fibrina líquida.

REIVINDICAÇÕES

1. Produto, caracterizado pelo fato de que compreende (a) um componente sólido contendo fibrinogênio, (b) um componente sólido compreendendo thrombina e (c) uma formulação de selante de fibrina líquida,
5 para uso na selagem de tecido úmido através das etapas de aplicar uma quantidade eficaz dos componentes sólidos sobre pelo menos parte do tecido úmido; seguido pela aplicação sobre pelo menos uma porção dos componentes sólidos aplicados de uma quantidade eficaz da formulação de selante de fibrina líquida.
- 10 2. Produto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os componentes ólidos (a) e (b) estão presentes no referido produto como uma mistura.
- 15 3. Método para preparar um produto como definido na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende preparar o fibrinogênio do referido componente sólido através da etapa de secagem de uma solução contendo fibrinogênio apresentando uma concentração de fibrinogênio de menos que 25 mg/ml.
- 20 4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a concentração de fibrinogênio presente na referida solução é de 20mg/ml.
- 25 5. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende: (i) recipiente (s) compreendendo componentes sólidos, que compreendem (a) um componente de fibrinogênio, e (b) um componente de trombina, em que os componentes (a) e (b) estão em recipientes separados ou no mesmo recipiente, sob a forma de uma mistura, e (ii) pelo menos dois recipientes separados, sendo que o pelo menos um recipiente separado compreende um componente de fibrinogênio líquido ou congelado, e o pelo menos segundo recipiente separado compreende um componente de trombina líquido ou congelado que é capaz de formar fibrina quando reage com fibrinogênio.
- 30 6. Kit de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o pelo menos primeiro recipiente separado contém o referido componente de fibrinogênio na forma congelada para degelo antes de sua

aplicação, e o pelo menos segundo recipiente separado contém o referido componente de trombina na forma congelada para degelo antes de sua aplicação.

7. Kit de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo
5 fato de que é para a preparação de um produto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

1/2

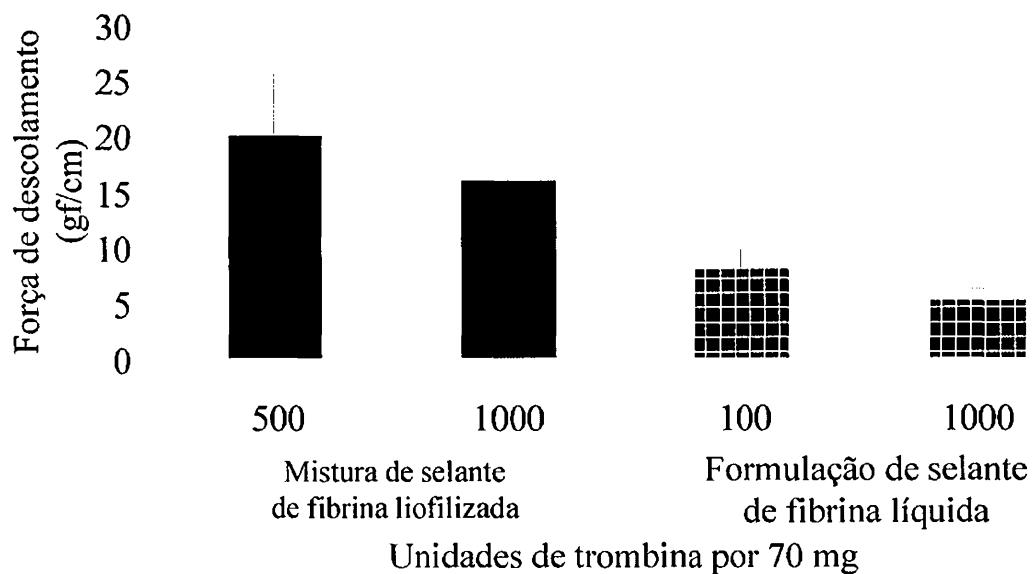


Fig. 1

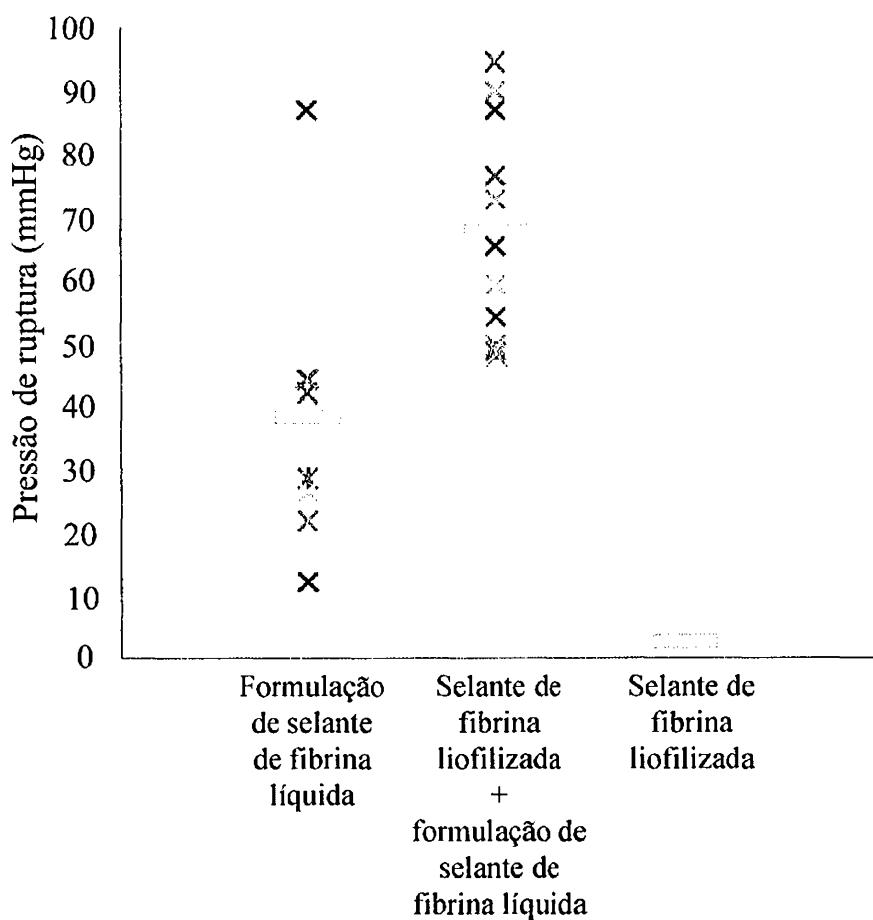


Fig. 2

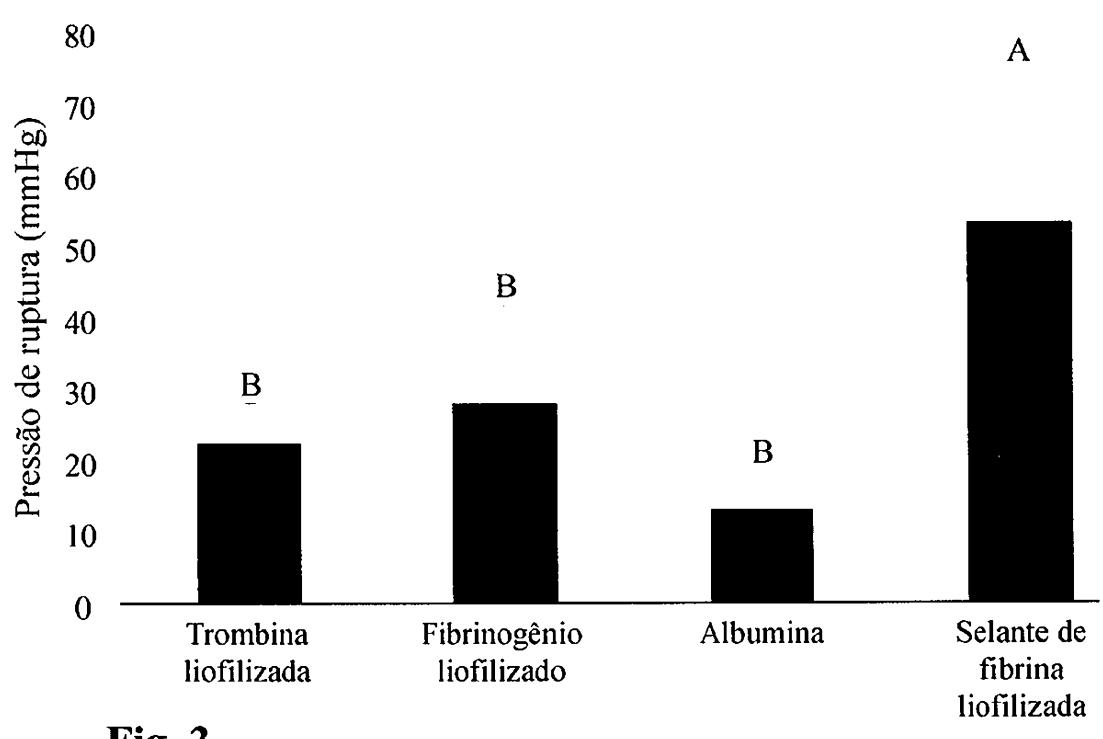


Fig. 3