



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

(11) PI 0805750-8 B1

(22) Data do Depósito: 23/09/2008

(45) Data de Concessão: 19/06/2018



(54) Título: MÉTODO DE CONFECÇÃO DE POLÍMERO BIODEGRADÁVEL INJETÁVEL

(51) Int.Cl.: A61L 31/04; A61L 31/14; C08L 67/04; C07D 313/04; C07C 55/20

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

(72) Inventor(es): CECÍLIA AMÉLIA CARVALHO ZAVAGLIA; CHRISTIANE LARANJO SALGADO;
ELISABETE MARIA SARAVAIA SANCHEZ; PEDRO LOPES GRANJA

MÉTODO DE CONFECÇÃO DE POLÍMERO BIODEGRADÁVEL INJETÁVEL

Campo da invenção

Refere-se a presente invenção a um método de confecção de um
5 polímero degradável passível de ser introduzido no organismo humano por
meio de uma seringa de injeção comum, capaz de guiar processos de
restauração da funcionalidade de tecidos ou órgãos perdidos ou danificados
por acidentes ou doenças debilitantes.

Descrição do estado da técnica

10 Atualmente, novos biomateriais capazes de guiar processos de
restauração da funcionalidade de tecidos afetados e não conduzir
processos inflamatórios e imunológicos que inviabilizem a regeneração em
termos morfológicos e a restauração da atividade tecidual, tem sido
crescentemente necessários para atenderem a novos padrões de sucesso
15 que estão diretamente relacionados com o envelhecimento da população e
a sua necessidade de uma qualidade de vida melhor. Conforme o tecido é
formado não há necessidade da presença do material que pode ser
removido ou degradado.

Esta idéia de conduzir o processo de regeneração do tecido levou ao
20 estabelecimento da Engenharia de Tecidos, que por sua vez, força o
estabelecimento de novas estratégias de criação de novos biomateriais.
Esta ciência de regeneração de tecidos tem sido desenvolvida para
substituir, reparar ou reconstruir tecido ou órgãos perdidos ou danificados
por acidentes ou doenças debilitantes. A complexidade deste processo
25 necessita de uma interação entre cientistas de diversas áreas, como a
engenharia, tanto quanto áreas técnicas e tecnológicas. Muitas terapias
atuais podem ser melhoradas com a Engenharia de Tecidos, com redução
de custo significativa. Têm sido pesquisados materiais para utilização como
implantes cirúrgicos e dispositivos médico-odontológicos. Devido às
30 limitações da utilização de enxerto ósseo autógeno vêm sido pesquisados
materiais sintéticos bioreabsorvíveis de suporte de crescimento tecidual
para essa aplicação como alternativa de tratamento de lesões em tecido

ósseo.

A primeira etapa da engenharia de tecidos inicia-se com o desenvolvimento, seleção e o processamento dos suportes para a cultura de células. Nesta matriz óssea artificial, o uso de polímeros bioreabsorvíveis vem tendo destaque. Os conceitos de *biodegradação*, *bioerosão*, *bioabsorção* e *bioreabsorção* têm definições distintas. O mecanismo da degradação e erosão *in vitro* dos polímeros bioreabsorvíveis tem sido avaliado desde a década de 1980 e demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material. A degradação/erosão é classificada em dois grupos, denominados de bioerosão superficial (*surface erosion*) e bioerosão interna (*bulk erosion*). Na busca por um modelo teórico para a degradação/erosão *in vitro*, o grupo de pesquisa em polímeros bioreabsorvíveis da Universidade de Regensburg, Alemanha, liderado pelo Prof. Achim Göpferich, descreve que o processo depende fundamentalmente da capacidade de difusão da água no material, da concentração de ligações ésteres hidrolisáveis, da velocidade de hidrólise e também da geometria e morfologia do material. A hidrólise das ligações ésteres produz terminais ácidos que podem, ou não, serem difundidos para o meio de degradação. Inicialmente o processo de degradação é considerado homogêneo, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Se a difusão e solubilização desses produtos forem efetivas, o material sofrerá, preferencialmente, uma erosão superficial (*surface erosion*). Se a taxa de difusão dos produtos e subprodutos ácidos presentes na matriz é baixa, há um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada no centro (*bulk erosion*). É o chamado efeito autocatalítico.

Em vista da necessidade de desenvolvimento de novos materiais que irão aumentar a adesão e formação de novos tecidos, os polímeros têm se mostrado com grande potencial futuro na aplicação e regeneração de tecidos ósseos. Para avaliar o potencial de aplicação clínica desses materiais, foram feitos testes preliminares de biocompatibilidade, *in vitro* nos

quais, danos causados a culturas celulares são observados e classificados conforme procedimentos estabelecidos por organizações internacionais como a American Society for Testing Materials (ASTM, 1995) e a United States Pharmacopeia (USP, 1995). Esses testes integram as diretrizes metodológicas da International Standards Organization (ISO, 1992), que estabelecem os procedimentos adequados para a validação de novos materiais.

A solicitação da patente USP 20036514515 cita diversos polímeros bioabsorvíveis e biocompatíveis para aplicação em engenharia de tecidos. Entretanto, não prevê a combinação física de um polímero sintético com um polímero natural para melhoria de propriedades mecânicas e de degradação.

Objetivos da invenção

Em vista do exposto, constitui um primeiro objetivo da invenção o provimento de um novo tipo de polímero orgânico capaz de guiar processos de restauração da funcionalidade de tecidos ou órgãos perdidos ou danificados por acidentes ou doenças debilitantes.

Outro objetivo da invenção consiste em garantir que dito polímero orgânico possa ser introduzido no organismo humano por meio de uma seringa de injeção comum.

Constitui outro objetivo da invenção assegurar que dito polímero orgânico seja biodegradável.

Ainda outro objetivo da invenção consiste em assegurar que dito polímero orgânico seja capaz de não conduzir processos inflamatórios e imunológicos.

Ainda mais outro objetivo da invenção consiste em garantir que dito polímero orgânico seja capaz de viabilizar a regeneração de tecidos em termos morfológicos e a restauração da atividade tecidual.

Constitui ainda mais outro objetivo da invenção garantir que dito polímero orgânico seja bioreabsorvível evitando assim a necessidade de sua posterior remoção.

Descrição resumida da invenção

Os objetivos enunciados, bem como outros, são atingidos pela invenção mediante o provimento de uma blenda polimérica constituída por policaprolactona e ácido sebácico.

5 De acordo com outra característica da invenção, dita blenda polimérica é diluída em diclorometano formando um gel injetável.

De acordo com mais outra característica da invenção, dito gel é injetável no organismo humano através de uma seringa de injeção comum tornando desnecessária incisão ou cirurgia para a implantação do material.

10 De acordo com mais outra característica da invenção, dita blenda polimérica possui propriedades biodegradáveis.

Vantajosamente dita blenda polimérica apresenta ainda a propriedade de ser bioreabsorvível o que torna igualmente desnecessária uma cirurgia para sua posterior remoção.

15 De acordo com mais outra característica da invenção, a dita blenda possui biocompatibilidade com tecidos vivos moles e duros.

De acordo com ainda outra característica da invenção, a dita blenda possui a característica de permitir a liberação controlada de fármacos.

20 De acordo com ainda mais outra característica da invenção, a dita blenda possui a característica de funcionar como matriz de suporte de crescimento tecidual com aplicação na área de engenharia de tecidos.

De acordo com outra característica da invenção, dita blenda possui a característica de ser moldável.

25 De acordo com mais outra característica da invenção, dita blenda possui a característica de permitir executar o preenchimento de cavidades rígidas.

De acordo com ainda mais outra característica da invenção, dita blenda possui a característica de permitir executar o preenchimento de cavidades ósseas e osteoporóticas.

Descrição das figuras

30 Outros objetivos, características e vantagens da presente invenção serão mais bem avaliadas mediante descrições de concretizações preferidas da invenção, dadas a título de exemplo e não num sentido de

limitação, e das figuras que a elas se referem, nas quais:

A figura 1 ilustra o gráfico representativo da análise térmica dos polímeros puros, realizado em aparelho de calorimetria exploratória diferencial.

5 A figura 2 ilustra o gráfico representativo da análise térmica da blenda de policaprolactona e ácido sebácico, igualmente realizado em aparelho de calorimetria exploratória diferencial.

10 A figura 3 representa o gráfico da análise térmica de polímero de policaprolactona, realizado em aparelho de calorimetria exploratória diferencial.

Descrição detalhada da invenção

De acordo com a invenção foram desenvolvidas diversas composições com diferentes porcentagens de cada polímero. Conforme análises foi obtida uma porcentagem ótima de poly(ϵ -caprolactona) e de ácido sebácico de 95:05 (m/V%), respectivamente. Foi obtida também porcentagens de 30, 20 e 10% de ácido sebácico, porém a alta viscosidade do material dificultaria a sua introdução no corpo humano por meio de uma seringa comum.

20 Também através de desenvolvimento de amostras com diferentes composições foi avaliada a porcentagem de macromolécula linear de poly(ϵ -caprolactona) onde foi obtida uma concentração ótima entre 30 e 50%, diferente da patente USP20060210635 que cita como porcentagem preferível entre 1 e 30% (m/V).

25 A invenção reivindicada possui baixo grau de crosslinking em seu estado de gel, porém este crosslinking foi avaliado como sendo somente físico sendo detectada em Fourier (FTIR) a presença de radical hidroxila ($-OH$), presentes nos monômeros dióis.

30 Para melhores resultados biológicos o material pode ser utilizado como carreador de fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento endotelial (VEGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), dentre outros. Também podem ser carreados com o material, fármacos antiinflamatórios (esteróides ou não),

antibióticos, e metaloproteinases (BMP) sendo citado também pela patente USP20087326171 para matrizes extracelulares de medula óssea descelularizada.

5 O biomaterial é desenvolvido na forma de gel com o intuito de possibilitar a introdução ao organismo humano por meio de uma seringa de injeção comum. Para essa finalidade é realizado uma reticulação de policaprolactona de alta massa molecular com monômeros dióis do próprio material. Para acelerar a degradação in vivo é utilizado um polímero natural, ácido sebácico, derivado do óleo de rícino com baixa massa molecular. Para 10 iniciar a reticulação adiciona-se cálcio e todo o processo termina dentro do tecido vivo gerando uma matriz resistente mecanicamente com propriedades viscoelásticas esperadas.

A policaprolactona é um produto formado pela condensação de um grupo hidroxílico e um carboxílico dentro da mesma molécula. Esta 15 molécula é polimerizada pela abertura do anel adicionando carbonato de potássio à 150°C por 5 horas, sintetizando a primeira policaprolactona. Esta consiste em um poliéster alifático linear semicristalino e é reconhecido como um polímero bioabsorvível. Esta degradação ocorre em três etapas sucessivas. Na primeira fase o material sofre um processo de degradação 20 não enzimática que resulta na susceptibilidade da ligação éster à hidrólise. Na segunda etapa formam-se oligômeros de cadeia curta no material diminuindo a massa molar. Na última fase a policaprolactona de baixa massa molecular é fagocitada por macrófagos e rapidamente degradada em ϵ -hidroxicapróico que é metabolizado entrando no ciclo dos ácidos 25 tricarboxílicos e eliminado pela excreção renal.

O ácido sebácico é um pó branco cristalino, solúvel em etanol, éter e semi-solúvel em água. O seu nome vem do Latim *sebaceus* ou *sebum* em referência ao seu uso na fabricação de velas. O ácido sebácico é um dos 30 constituintes de um óleo vegetal chamado óleo de rícino. Este é mundialmente conhecido como "castor oil", é um óleo natural, obtido através de sementes da planta do rícino. Quimicamente, o óleo de rícino consiste em um triglicerídeo (derivado da molécula do glicerol) de ácidos gordos,

cuja composição é variável. No entanto cerca de 90% do conteúdo deste óleo é de ácido ricinoléico. O ácido sebácico é um ácido dicarboxílico de estrutura química $(\text{HOOC})(\text{CH}_2)_8(\text{COOH})$. O ácido sebácico ultimamente é utilizado como plastificante, lubrificante, fluidos hidráulicos, velas, etc.

- 5 Também pode ter um uso intermediário como aromatizante, anti-sépticos e materiais para pintura.

Suportes de polímeros bioreabsorvíveis são preparados utilizando-se ácido sebácico (M_w 30.000 g/mol) e policaprolactona (PCL) (M_w 80.000 g/mol). A síntese do ácido sebácico é realizada através de sua diluição em 10 ácido acético PA na proporção de 10 g em 10 mL por 30 min em 140°C. Após a obtenção de um líquido claro de pouco volume, acrescenta-se o mesmo volume de diclorometano resultando na precipitação de um pó de cor branca. Adiciona-se o mesmo volume de éter e éter petróleo em uma proporção de 1:1, para lavar e purificar o polímero. Após a mistura e 15 suspensão do pó, a mistura é filtrada em papel celulose deixando-se secar por 24 h. Depois o pó é pesado e armazenado em tubos de polietileno. O gel é sintetizado dissolvendo 1,5 g de macromolécula de PCL em 5 mL de diclorometano sob agitação magnética. Em outro frasco dissolve-se 400 ou 800 mg de AS em 2,5 mL de PCL diol em uma temperatura de 140°C. Após 20 ambos os frascos conterem líquidos viscosos, são misturados sob agitação magnética até estarem homogêneos e adicionando-se 20 mL de solução de CaCl_2 (0,9 g para 1 mL de água destilada) e agitando-se por mais 10 min a uma temperatura de 60°C. Remove-se o líquido em suspensão e adiciona-se 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 10 min. Adiciona-se ainda 200 mL 25 de solução de PBS aquecida (60°C) efetuando-se a troca da solução por quatro vezes de 30 em 30 min. Depois adiciona-se 50 mL de meio de cultura celular e coloca-se em agitação em luz UV por 20 min para esterilização.

Nas análises químicas e mecânicas do biomaterial, tanto a 30 policaprolactona (PCL) quanto o ácido sebácico (AS) foram avaliados separadamente e em misturas nas seguintes porcentagens 95:05; 90:10; 80:20; 70:30 (w/w %). Foram detectadas diferenças nas propriedades com o

aumento da porcentagem de ácido sebáico. Por ser um polímero, mais cristalino e com a temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_m) mais altas que a policaprolactona, observou-se tanto por calorimetria diferencial exploratória, DSC, quanto por análise dinâmico mecânica, DMA, um aumento das temperaturas das propriedades de transição de acordo com o aumento da porcentagem do AS.

Como vantagens da invenção reivindicada podemos destacar o fato do material ser injetado através de uma seringa comum sendo desnecessária uma incisão ou cirurgia de implantação, além de ser bioabsorvível o que dispensa também uma cirurgia de remoção após a cicatrização ou formação do tecido perdido ou defeituoso. Este, em última análise é um conforto a mais para o paciente que não precisa retornar para remoção de suturas, além de não ser necessária a prescrição de medicamento antiinflamatórios, antibióticos ou analgésicos necessários quando se faz algum tipo de incisão invasiva.

Outra vantagem da invenção é o fato de ser moldável pelo médico, além de poder ser utilizada no preenchimento de cavidades rígidas, por exemplo, cavidades ósseas osteoporóticas.

Referindo-se agora especificamente ao gráfico da figura 1 que representa a análise térmica dos polímeros puros policaprolactona (PCL), ácido sebáico (AS) e gel de blenda de PCL/AS 95:05 (w/w%) realizado em aparelho de calorimetria exploratória diferencial (ou Differential Scanning Calorimetry – DSC). A curva de traço contínuo representa a análise da policaprolactona onde foi feito um varrimento de 20°C a 180°C. O pico observado em aproximadamente 60°C corresponde à temperatura de fusão do polímero. O tamanho do pico está relacionado à quantidade de energia que o material necessita para mudar de fase, no caso por ser um polímero semicristalino com baixo grau de cristalinidade foi necessária pouca energia para sua fusão. A linha tracejada corresponde à análise do ácido sebáico. Para esse polímero foi realizado um varrimento de 20°C a 250°C. O pico observado em aproximadamente 130°C corresponde também à temperatura de fusão. No caso deste material cristalino com alta taxa de cristalinidade

pode-se observar uma grande energia consumida para ser realizada a transição de fase. A linha pontilhada corresponde ao varrimento da blenda de PCL/AS de 20°C a 200°C, onde observamos o pico na mesma temperatura do polímero de PCL puro, porém foi necessária menor energia para ocorrer a fusão do material. Comparando os três materiais, observou-se que o ácido sebácico tem uma maior estabilidade térmica, porém uma alta temperatura de fusão, mas a policaprolactona tendo uma menor temperatura de fusão facilita o processamento deste material em laboratório. Na análise do gel observou-se pouca influência do ácido sebácico na blenda devido a sua baixa concentração.

O gráfico da figura 2 representa a análise térmica de blenda de PCL/AS 95:05 (w/w %) também realizado em aparelho de calorimetria exploratória diferencial (ou Differential Scanning Calorimetry – DSC) em diferentes tempos de degradação em solução salina tampão (PBS). As curvas mostram a análise da blenda de policaprolactona e ácido sebácico, onde foi feito um varrimento de 20°C a 180°C, porém o gráfico representou somente a região de temperatura de fusão dos materiais (30°C a 100°C). O pico observado em aproximadamente 60°C corresponde à temperatura de fusão dos polímeros. A linha contínua representa o material sem sofrer degradação e as linhas tracejadas representam o gel em diferentes dias. Neste ensaio de degradação o que fica demonstrado é a diminuição da energia necessária na transição de fase do material devido à quebra das cadeias poliméricas por hidrólise. Outro fato interessante é a perda rápida da fase amorfa do material evidenciado por um ligeiro aumento na temperatura de fusão devido à maior porcentagem de cristalinidade da blenda observado também pelo aspecto mais esbranquiçado e rígido das amostras analisadas com maior tempo de degradação (não mostrado no trabalho).

Vemos na tabela 1 abaixo o resultado da avaliação por DSC de diversas porcentagens de gel de PCL/AS com o cálculo da temperatura de fusão.

Tabela 1 - Cálculo da média de análise de 3 amostras pesando +/- 4mg

Material	AS (%)	Temp. de fusão (°C)
PCL	0	65,6
PCL	5	56,9
PCL	10	60,8
PCL	20	64,4
PCL	30	58,4
AS	100	136,7

Para avaliar a influência da porcentagem do ácido sebácico na blenda de policaprolactona e ácido sebácico (PCL/AS), foram avaliadas diferentes composições e suas propriedades térmicas em aparelho de calorimetria exploratória diferencial (ou Differential Scanning Calorimetry – DSC) de 20°C a 200°C. Na tabela temos a média de temperatura dos materiais. Com estes dados podemos ver que é somente acima de 50% de ácido sebácico que o material tem dois picos de fusão sendo que o da policaprolactona (+60°C) possui maior pico de energia endotérmica, o pico menor situou-se na temperatura de fusão do ácido sebácico (+130°C). Estes resultados sugerem uma pequena influencia do ácido sebácico quando sua porcentagem na blenda foi baixa, possivelmente porque estes polímeros são imiscíveis.

Na figura 3, o gráfico representa a análise térmica do polímero de policaprolactona igualmente realizado em aparelho de calorimetria exploratória diferencial (ou Differential Scanning Calorimetry – DSC) de 20°C a 200°C. O tamanho do pico está relacionado à quantidade de energia que o material necessita para mudar de fase, no caso por ser um polímero semicristalino com baixo grau de cristalinidade foi necessária pouca energia para sua fusão.

Dentre as aplicações clínicas do material desenvolvido salientamos o preenchimento de defeitos de tecidos rígidos e moles, além de sua utilização como matriz extracelular para aplicação em engenharia de tecidos. Importante assinalar também sua aplicação como implante subcutâneo para a liberação controlada de medicamentos.

Se bem que a invenção tenha sido descrita com base em concretizações exemplificativas, os técnicos no assunto poderão introduzir modificações dentro do conceito inventivo básico.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE CONFECÇÃO DE POLÍMERO BIODEGRADÁVEL INJETÁVEL passível de ser introduzido no organismo humano, **caracterizado** pelo fato de ser constituído por uma blenda polimérica.

5 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de dita blenda polimérica consistir numa mistura imiscível.

 3. Método, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pelo fato de dita blenda polimérica ser composta de poly (ϵ -caprolactona) linear e ácido sebácico.

10 4. Método, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo fato de dita blenda polimérica ser biologicamente ativa quando adicionados fatores de crescimento, citocinas, interleucinas e proteínas que favorecem o crescimento tecidual desejado.

 5. Método, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado
15 pelo fato de dita blenda polimérica ser utilizada como liberador controlado de fármacos.

 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado** pelo fato de dita blenda polimérica possuir propriedades biodegradáveis.

 7. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado**
20 pelo fato de dita blenda ser bioreabsorvível.

 8. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado** pelo fato de dita blenda ser diluída em diclorometano formando um gel injetável.

 9. Método, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 6,
25 **caracterizado** pelo fato de dito gel ser injetável no organismo humano através de uma seringa de injeção comum.

 10. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado** pelo fato de dita blenda possuir biocompatibilidade com células de tecidos vivos moles e duros.

30 11. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado** pelo fato de dita blenda funcionar como matriz de suporte de crescimento tecidual.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado** pelo fato de dita blenda ter aplicação na área de engenharia de tecidos.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizado** pelo fato de dita blenda não conduzir processos inflamatórios e
5 imunológicos que inviabilizem a regeneração em termos morfológicos e a restauração da atividade tecidual.

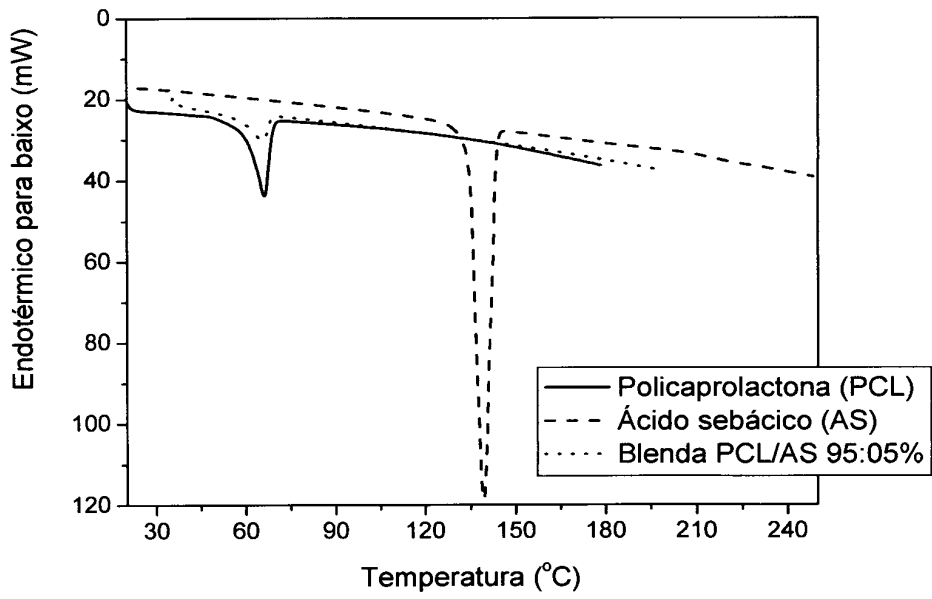


Fig. 1

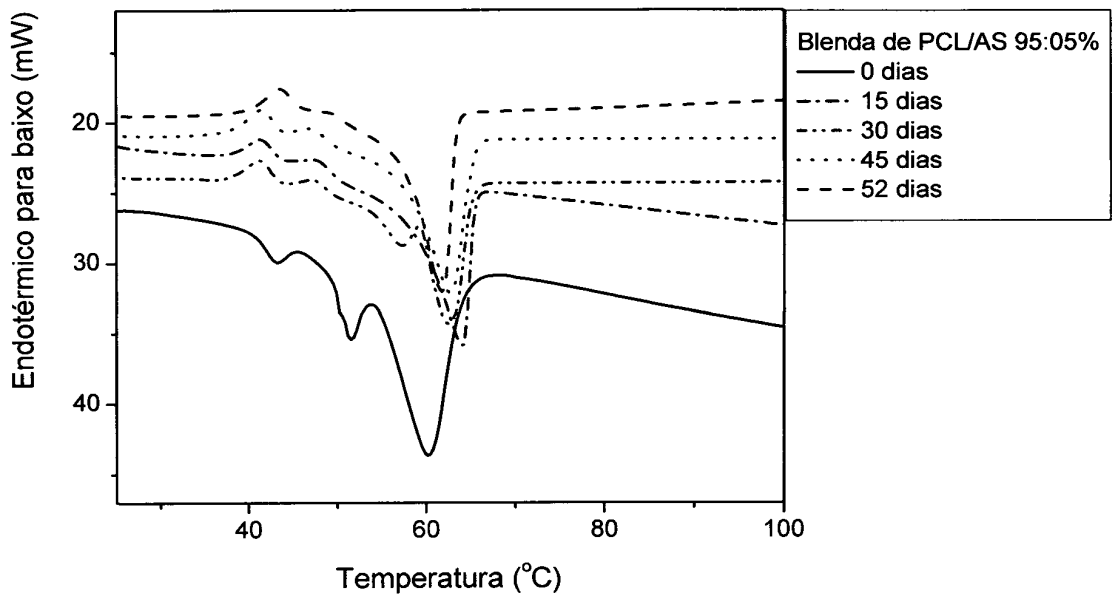


Fig. 2

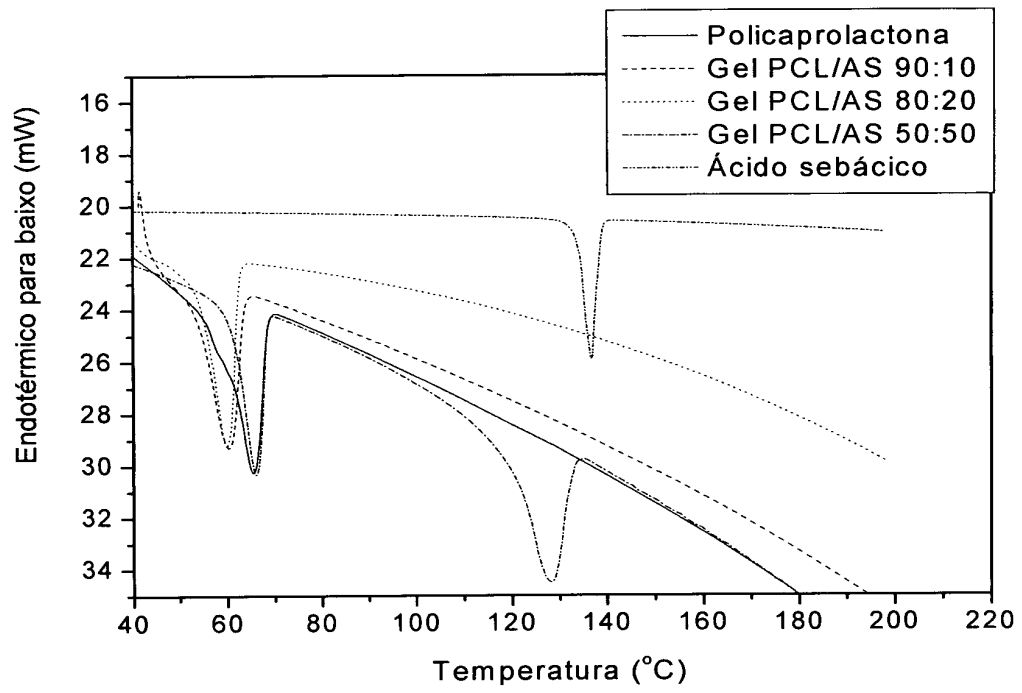


Fig: 3