

(11) Número de Publicação: **PT 1536845 E**

(51) Classificação Internacional:
A61L 15/44 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.09.10	(73) Titular(es): JOHNSON & JOHNSON MEDICAL, LIMITED ERSKINE HOUSE, 67-73 QUEEN STREET EDINBURG EH2 4NH GB
(30) Prioridade(s): 2002.09.11 GB 0221062 2002.09.30 US 414381 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.06.08	(72) Inventor(es): BREDA MARY CULLEN GB DEBORAH ADDISON GB DAVID GREENHALGH GB ALICIA ESSELER GB SARAH-JAYNE GREGORY GB
(45) Data e BPI da concessão: 2007.04.25 006/2007	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MATERIAIS DE PENSO COMPREENDENDO COMPLEXOS DE POLISSACARÍDEOS ANIÓNICOS COM PRATA**

(57) Resumo:

RESUMO

"MATERIAIS DE PENSO COMPREENDENDO COMPLEXOS DE POLISSACARÍDEOS ANIÓNICOS COM PRATA"

A invenção proporciona um material de penso compreendendo um complexo de um polissacarídeo aniônico com prata, em que o material compreende desde cerca de 0,1%, em peso, a cerca de 3%, em peso, de prata. São igualmente proporcionados pensos compreendendo tais materiais e a utilização de tais materiais em medicina.

DESCRIÇÃO

"MATERIAIS DE PENSO COMPREENDENDO COMPLEXOS DE POLISSACARÍDEOS ANIÓNICOS COM PRATA"

A presente invenção refere-se a materiais de penso compreendendo complexos formados entre polissacarídeos aniónicos, tal como celulose regenerada oxidada (ORC), e prata, e às suas utilizações para o tratamento de feridas.

Os polissacarídeos aniónicos, tais como alginatos, ácido hialurónico e seus sais, e celulosas oxidadas, tal como celulose regenerada oxidada (ORC), são conhecidos pela utilização como materiais de penso. Os alginatos e ORC são hemostáticos quando aplicados a uma ferida.

O documento EP-A-0437095 descreve a preparação de um tecido de ORC neutralizado pela reacção de ORC com uma solução tamponada de um sal de um ácido fraco, tal como acetato de sódio. Diz-se que a utilização de um reagente tamponado resulta em menor desagregação de tecidos de ORC. A ORC neutralizada pode suportar agentes hemostáticos sensíveis a ácidos adicionais, tais como trombina ou t-PA.

O documento WO98/00180 descreve a utilização de esponjas liofilizadas de colagénio misturado com celulose regenerada oxidada (ORC) para o tratamento de feridas crónicas. As esponjas mistas proporcionam cicatrização melhorada de feridas crónicas, tais como úlceras venosas, úlceras de decúbito e úlceras

diabéticas. A descrição menciona que a sulfadiazina de prata ou cloro-hexidina possa estar presente como aditivo anti-séptico.

O documento GB-A-748283 descreve complexos de polissacarídeos com diversos metais, incluindo a prata. O documento WO91/11206 descreve a utilização de sais de alginato de prata em pensos. O documento WO87/05517 descreve sais de prata do ácido hialurónico que podem ser utilizados como, ou em, pensos antimicrobianos.

O documento WO02/43743 descreve pensos compreendendo um sal de prata de um polissacarídeo aniónico e compreende adicionalmente, uma substância para melhorar a fotoestabilidade do sal de prata. A substância de estabilização pode incluir amónia, sais de amónio, tiosulfatos, cloretos e/ou peróxidos. Numa forma de realização preferida, o agente de estabilização é o cloreto de amónio aquoso.

O documento WO00/09173 descreve composições antimicrobianas compreendendo um complexo de prata com uma amina primária, secundária ou terciária, em que o complexo está associado a um ou mais polímeros hidrófilos. A concentração de prata na composição é, de um modo preferido, de 0,5 a 5%, em peso. Os polímeros hidrófilos podem incluir carboximetilcelulose sódica.

O documento WO96/13282 descreve pensos de alginato, em que o alginato pode incorporar alginato de prata. A quantidade de prata não é especificada.

Y. S. Choi *et al.* in Journal of Materials Science. Materials in Medicine, Chapman e Hall, Londres, Vol. 12 N° 1, 2001, páginas 67-73 descrevem esponjas de gelatina/alginato

contendo, opcionalmente, sulfadiazina de prata. A quantidade de sulfadiazina de prata não é especificada.

Y. S. Cho *et al.* in Journal of Materials Science. Materials in Medicine, Chapman e Hall, Londres, Vol. 13, N° 9, 2002, páginas 861-865 descrevem pensos de espuma de poliuretano incorporando ácido hialurónico e sulfadiazina de prata.

O documento W002/24240 descreve materiais de penso antimicrobianos compreendendo uma mistura de fibras complexadas com prata com fibras que não contêm prata. Um exemplo descreve uma mistura de prata-carboximetilcelulose (prata-CMC) com CMC simples, em que as misturas contêm prata a 0,5%, 1,0% e 2,0%, em peso. Um exemplo adicional descreve misturas de fibras de alginato de prata/alginato de cálcio contendo prata a um nível médio de 0,6%, em peso.

O documento W002/36866 descreve pensos compreendendo fibras de alginato e/ou de CMC, em que um composto de prata, por exemplo partículas de fosfato de zircónio de hidrogénio de sódio de prata, é aí disperso. A quantidade preferida de prata é de 0,5% a 2%, em peso.

O documento W001/24839 descreve materiais de penso contendo prata compreendendo uma rede polimérica de suporte, um polissacarídeo não gelificável, tal como goma de guar e um antimicrobiano de prata incorporado nesta.

A presente invenção proporciona um material de penso compreendendo um complexo de uma celulose oxidada com prata, em que o material compreende de 0,1% a 0,3%, em peso, de prata.

O termo "complexo" refere-se a uma mistura íntima à escala molecular, de um modo preferido com ligação iónica ou covalente, entre a prata e a celulose oxidada. O complexo compreende, de um modo preferido, um sal formado entre a celulose oxidada e Ag^+ , mas pode compreender igualmente aglomerados de prata e/ou metal de prata coloidal produzidos, por exemplo, por exposição do complexo à luz.

O termo "celulose oxidada" refere-se a qualquer material produzido pela oxidação de celulose, por exemplo com tetróxido de diazoto. Tal oxidação converte grupos álcool primário dos resíduos sacarídeos em grupos ácido carboxílico, formando resíduos de ácido urónico no interior da cadeia celulósica. Geralmente, a oxidação não prossegue com selectividade completa e, como resultado, os grupos hidroxilos nos carbonos 2 e 3 são, ocasionalmente, convertidos na forma ceto. As unidades ceto introduzem uma ligação alcalina instável que, a pH 7 ou superior, inicia a decomposição do polímero através da formação de uma lactona e clivagem do anel de açúcar. Como resultado, a celulose oxidada é biodegradável e bioabsorvível sob condições fisiológicas.

A celulose oxidada preferida para utilização na presente invenção é celulose regenerada oxidada (ORC) preparada por oxidação de uma celulose regenerada, tal como *rayon*. Sabe-se, há já algum tempo, que a ORC possui propriedades hemostáticas. A ORC tem estado disponível como tecido hemostático denominado SURGICEL (Marca Registada de Johnson & Johnson Medical, Inc.) desde 1950. Este produto é produzido pela oxidação de uma malha de material de *rayon*.

De um modo preferido, a celulose oxidada é substancialmente insolúvel em água a pH 7. De um modo preferido, a celulose oxidada possui um peso molecular maior que cerca de 20000, de um modo mais preferido maior que cerca de 50000. De um modo preferido, a celulose oxidada assume a forma de um filme, ou fibras tendo comprimento maior que 1 mm.

De um modo preferido, a quantidade de prata no complexo é de 0,1% a 50%, em peso, com base no peso da celulose oxidada, de um modo mais preferido de 1% a 40%, de um modo ainda mais preferido de 2% a 30%, em peso, e de um modo muito preferido de 5% a 25%.

Verificou-se que os complexos que contêm prata são adequados para utilização na preparação de materiais de penso antimicrobianos. A prata confere propriedades antimicrobianas ao penso. Mais surpreendentemente, a baixas concentrações de 0,1% a 0,3%, em peso, a prata no complexo exibe um efeito proliferativo em células de cicatrização e, por conseguinte, espera-se que promova a cicatrização, mesmo quando os complexos de acordo com a invenção são aplicados directamente a uma ferida. O efeito oligodinâmico da prata nas células em cultura é conhecido - este é geralmente considerado como afectando o crescimento tanto das bactérias como das células. É, por conseguinte, surpreendente verificar que a prata nos pensos da presente invenção pode ter o efeito oposto em determinadas células de importância para a cicatrização.

Foi igualmente verificado, surpreendentemente, que materiais de penso contendo os baixos níveis de prata acima definidos exibem uma surpreendente capacidade para inibirem a produção de TNF- α e IL-1. Espera-se, assim, que resulte em

propriedades anti-inflamatórias benéficas dos materiais de penso.

Os materiais de penso de acordo com a presente invenção podem assumir qualquer forma conveniente, tal como um pó, microsferas, flocos, um tecido ou um filme.

Em determinadas formas de realização, o material de penso de acordo com a presente invenção assume a forma de uma pomada semi-sólida ou gel para aplicação tópica.

Em determinadas formas de realização, o material de penso de acordo com a presente invenção assume a forma de uma esponja bioabsorvível liofilizada, ou seca por solvente, para aplicação a uma ferida crónica. De um modo preferido, o tamanho médio de poro da esponja situa-se na região dos 10-500 μm , de um modo mais preferido cerca de 100-300 μm .

Noutras formas de realização ainda, o material de penso de acordo com a presente invenção assume a forma de um filme flexível, que pode ser contínuo ou interrompido (e. g., perfurado). O filme flexível compreende, de um modo preferido, um plastificante para o tornar flexível, tal como glicerol.

De um modo preferido, o material de penso assume a forma de uma folha, por exemplo uma folha de espessura substancialmente uniforme. A área da folha é, tipicamente, desde 1 cm^2 a 400 cm^2 e a espessura tipicamente desde 1 mm a 10 mm. A folha pode, por exemplo, ser uma esponja liofilizada, ou uma folha fibrosa de malha, entrelaçada ou não entrelaçada, ou uma folha de gel. De um modo preferido, a folha compreende menos de 15%, em peso, de água.

De um modo preferido, o material de penso compreende desde 0,1% a 10%, em peso, do complexo que contém prata, de um modo mais preferido desde 0,1% a 5%, em peso, por exemplo desde 0,2% a 2%, em peso. A quantidade de prata no material de penso é desde 0,1% a 0,3%, em peso, de um modo preferido de mais desde 0,1% a 0,3%, em peso e, por exemplo, desde 0,2% a 0,3%, em peso. Quantidades menores de prata poderiam conferir um insuficiente efeito antimicrobiano. Quantidades maiores de prata poderiam dar origem a efeitos antiproliferativos em células de cicatrização.

Os materiais de penso de acordo com a presente invenção podem compreender, adicionalmente, um ou mais polissacarídeos que não foram complexados com prata. Estes polissacarídeos podem incluir um ou vários polissacarídeos aniônicos seleccionados a partir de alginatos, hialuronatos, pectinas, carrageninas, gomas de xantano, dextranos sulfatados, derivados de celulose tais como carboximetilceluloses e celuloses oxidadas. Os polissacarídeos adicionais podem compreender, adicionalmente ou alternativamente, quaisquer outros polissacarídeos medicamente aceitáveis, tais como, por exemplo, celulose, celuloses regeneradas, tais como rayon, derivados de celulose não aniônicos, tal como hidroxietilcelulose, e derivados de amido.

Os materiais de penso de acordo com a presente invenção podem compreender, adicionalmente, polissacarídeos aniônicos que foram complexados com iões metálicos terapeuticamente eficazes que não a prata, por exemplo bismuto, cobre, níquel, zinco, manganésio, magnésio, ouro, ou suas misturas. De um modo preferido, as quantidades de tais polissacarídeos complexados com outros metais são desde 0,001 a 10%, em peso, do penso, de um modo mais preferido desde 0,01 a 1%, em peso, do penso. De um modo preferido, as quantidades dos outros materiais referidos

são desde 10 a 10000 ppm, de um modo mais preferido desde 50 a 1000 ppm no penso.

Os materiais de penso de acordo com a presente invenção podem compreender, adicionalmente, outros materiais medicamente aceitáveis além de polissacarídeos, incluindo fibras têxteis, tais como fibras descontínuas de nylon e poliéster, fibras não têxteis, tais como fibras de nylon obtidas por pulverização do polímero fundido e fibras bioreabsorvíveis, tais como fibras de polilactida/poliglicolida. As outras fibras podem proporcionar reforço e diluição do polissacarídeo. As outras fibras estão presentes, de um modo preferido, numa quantidade até cerca de 90%, em peso, de um modo mais preferido desde 25% a 75%, em peso, dos materiais de penso.

Para além do complexo de prata de uma celulose oxidada, os materiais de penso de acordo com a invenção compreendem adicionalmente, de um modo preferido, colagénio. De um modo preferido, a quantidade de colagénio no penso é desde 10% a 90%, em peso, com base no peso seco dos materiais de penso, de um modo mais preferido desde 25% a 75%.

O colagénio pode ser seleccionado a partir de colagénios nativos, tais como colagénios nativos de Tipo I, II ou III, colagénio atelopectídico, colagénio regenerado e gelatina.

Em determinadas formas de realização, o penso de acordo com a presente invenção é totalmente reabsorvível. De um modo preferido, os materiais de penso de acordo com a presente invenção são adequados para aplicação directamente a uma superfície de ferida.

Os materiais de penso preferidos de acordo com a presente invenção são versões contendo prata dos pensos de acordo com os documentos WO98/00180 ou EP-A-1153622. Resumidamente, estes pensos são esponjas liofilizadas que compreendem uma mistura de colagénio e ORC e que consistem, de um modo preferido, essencialmente de uma tal mistura. De um modo preferido, a razão, em peso, de colagénio para ORC é 40:60 até 60:40. Nas esponjas de acordo com a presente invenção, uma parte da ORC é substituída por um complexo de prata/ORC.

São materiais de penso especialmente adequados esponjas liofilizadas compreendendo desde 35% a 60%, em peso, de ORC, desde 60% a 35%, em peso, de um colagénio, e desde 0,5% a 2%, em peso, de um complexo de ORC/prata, em que o complexo compreende desde 10% a 40%, em peso, de prata, com base no peso seco do complexo. Em formas de realização preferidas, os materiais consistem essencialmente de colagénio, ORC e complexo de ORC/prata.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona um penso compreendendo um material de penso de acordo com a invenção. O penso pode consistir de, ou consistir essencialmente de material de penso de acordo com a invenção.

O penso assume, de um modo preferido, a forma de folha e compreende uma camada activa do material de penso de acordo com a invenção. A camada activa seria normalmente a camada contactando com a ferida em utilização mas, em algumas formas de realização, poderia estar separada da ferida através de uma folha superior permeável a líquidos. De um modo preferido, a área da camada activa é desde 1 cm² a 400 cm², de um modo mais preferido desde 4 cm² a 100 cm².

De um modo preferido, a peça compreende, adicionalmente, uma folha de suporte estendendo-se sobre a camada activa oposta ao lado virado para a ferida da camada activa. De um modo preferido, a folha de suporte é maior que a camada activa de modo a que uma região marginal de 1 mm a 50 mm de largura, de um modo preferido 5 mm a 20 mm, se estenda em torno da camada activa para formar um designado penso ilha. Em tais casos, a folha de suporte é revestida, de um modo preferido, com um adesivo autocolante de classe médica, pelo menos, na sua região marginal.

De um modo preferido, a folha de suporte é substancialmente impermeável a líquidos. A folha de suporte é, de um modo preferido, semipermeável. Ou seja, a folha de suporte é, de um modo preferido, permeável ao vapor de água, mas não é permeável à água líquida ou exsudado de ferida. De um modo preferido, a folha de suporte é igualmente impermeável a microrganismos. Folhas de suporte semelhantes contínuas adequadas terão, de um modo preferido, uma taxa de transmissão de vapor de humidade (MVTR) apenas da folha de suporte de 300 a 5000 g/m²/24 h, de um modo preferido 500 a 2000 g/m²/24 h a 37,5 °C com diferença de humidade relativa de 100% a 10%. A espessura da folha de suporte situa-se, de um modo preferido, na gama de 10 a 1000 micrómetros, de um modo mais preferido de 100 a 500 micrómetros.

A MVTR do penso de acordo com a presente invenção, como um todo, é menor do que apenas aquela da folha de suporte, porque a folha com orifícios obstrui parcialmente a transferência de humidade através do penso. De um modo preferido, a MVTR do penso (medida na parte da ilha do penso) é desde 20% a 80% da MVTR apenas da folha de suporte, de um modo mais preferido desde 20%

a 60% desta e, de um modo muito preferido cerca de 40% desta. Verificou-se que tais taxas de transmissão de vapor de humidade permitem que a ferida debaixo do penso cicatrize sob condições de humidade sem provocar a maceração da pele circundante da ferida.

Polímeros adequados para formação da folha de suporte incluem poliuretanos e acrilatos de polialcoxialquilo e metacrilatos, tais como aqueles divulgados no documento GB-A-1280631. De um modo preferido, a folha de suporte compreende uma camada contínua de uma espuma de poliuretano bloqueado de alta densidade, predominantemente de células fechadas. Um material de folha de suporte adequado é o filme de poliuretano disponível sob a Marca Registada ESTANE 5714F.

A camada adesiva (quando presente) deve ser transmissora de vapor de humidade e/ou com relevo, para aí permitir a passagem de vapor de água. A camada adesiva é, de um modo preferido, uma camada adesiva autocolante contínua, transmissora de vapor de humidade, do tipo convencionalmente utilizado em pensos de tipo ilha, por exemplo, um adesivo autocolante baseado em copolímeros de éster de acrilato, éter etílico e polivinílico e poliuretano como descrito, por exemplo, no documento GB-A-1280631. O peso base da camada adesiva é, de um modo preferido, 20 a 250 g/m² e, de um modo mais preferido, 50 a 150 g/m². São preferidos os adesivos autocolantes baseados em poliuretano

Camadas adicionais de uma peça absorvente multicamada podem ser construídas entre a camada activa e a folha protectora. Por exemplo, estas camadas podem compreender um filme plástico com orifícios para proporcionar apoio para a camada activa em utilização, caso em que os orifícios no filme são alinhados de

um modo preferido em relação aos orifícios na camada de hidrogel.

O penso pode compreender, adicionalmente, uma camada absorvente entre a camada activa e a folha protectora, especialmente se o penso for para utilizar em feridas com exsudação. A camada absorvente opcional pode ser qualquer uma das camadas convencionalmente utilizadas na absorção de fluidos de feridas, soro ou sangue na técnica da cicatrização, incluindo gazes, tecidos não urdidos, superabsorventes, hidrogéis e misturas destes. De um modo preferido, a camada absorvente compreende uma camada de espuma absorvente, tal como uma espuma de poliuretano hidrófilo de células abertas preparada em conformidade com o documento EP-A-0541391. Em outras formas de realização, a camada absorvente pode ser uma teia fibrosa não urdida, por exemplo uma teia cardada de fibras descontínuas de viscosa. O peso base da camada absorvente pode situar-se na gama de 50-500 g/m², tal como 100-400 g/m². A espessura não comprimida da camada absorvente pode situar-se na gama de 0,5 mm a 10 mm, tal como 1 mm a 4 mm. A absorvência do líquido livre (não comprimido) medida para solução salina fisiologia pode situar-se na gama de 5 a 30 g/g a 25°. De um modo preferido, a camada ou camadas absorventes são substancialmente co-extensivas com a camada de quitosano/ORC.

A superfície virada para a ferida do penso é protegida, de um modo preferido, por intermédio de uma folha de revestimento amovível. A folha de revestimento é formada normalmente a partir de material termoplástico flexível. Materiais adequados incluem poliésteres e poliolefinas. De um modo preferido, a superfície virada para o adesivo da folha de revestimento é uma superfície de libertação. Ou seja, uma superfície que é apenas

mediocrementemente aderente à camada activa e ao adesivo na folha de suporte para ajudar a descolar a camada de hidrogel da folha de revestimento. Por exemplo, a folha de revestimento pode ser formada a partir de um plástico não aderente, tal como um fluoropolímero, ou pode ser provida com um revestimento de libertação, tal como um revestimento de libertação de silicone ou fluoropolímero.

De um modo preferido, os materiais de penso e/ou os pensos de acordo com a presente invenção são esterilizados. De um modo preferido, são embalados num recipiente impermeável a microrganismos. De um modo preferido, o nível de garantia de esterilidade é superior a 10^{-6} . De um modo preferido, o penso foi esterilizado por irradiação gama.

Num aspecto adicional, a presente invenção proporciona a utilização de um complexo de uma celulose oxidada com prata para a preparação de um material compreendendo desde 0,1% a 0,3%, em peso, de prata para utilização no tratamento de feridas, especialmente feridas crónicas, tais como úlceras venosas, úlceras de decúbito ou úlceras diabéticas. De um modo preferido, o tratamento compreende a aplicação do material de penso directamente na superfície da ferida.

Verificou-se igualmente que os materiais de acordo com a presente invenção são surpreendentemente eficazes a inibir a libertação de TNF- α a partir de macrófagos. Espera-se que esta propriedade torne os materiais eficazes no tratamento da inflamação. Consequentemente, num aspecto adicional, a presente invenção proporciona a utilização de um complexo de uma celulose oxidada com prata para a preparação de um material compreendendo

desde 0,1% a 0,3%, em peso, de prata para utilização no tratamento da inflamação.

O complexo de uma celulose oxidada e prata contido nos materiais da presente invenção pode ser preparado por um método compreendendo a etapa de tratamento de uma celulose oxidada com uma solução de um sal de prata. De um modo preferido, a solução é uma solução aquosa.

De um modo preferido, a celulose oxidada é substancialmente insolúvel em água a pH 7 e o tratamento é, por conseguinte, efectuado sobre o polissacarídeo no estado sólido. Por exemplo, o polissacarídeo pode assumir a forma de fibras sólidas, folha, esponja ou tecido. Em determinadas formas de realização, a celulose oxidada é um sal e o tratamento pode, por conseguinte, ser considerado como uma troca iónica. Em outras formas de realização, a celulose oxidada está, pelo menos parcialmente, na forma de ácido livre, caso em que o sal de prata é, de um modo preferido, um sal de um ácido fraco, por exemplo acetato de prata, pelo que a celulose oxidada é, pelo menos parcialmente, neutralizada pelo sal de prata. Processos semelhantes são descritos no documento EP-A-0437095.

A reacção de neutralização pode ser efectuada apenas em água ou álcool mas é efectuada, de um modo preferido, em misturas de água e álcoois. A utilização de uma mistura de água e álcool proporciona boa solubilidade para os sais do ácido fraco por meio da água, e o álcool impede a celulose oxidada de uma dilatação, distorção e enfraquecimento excessivos durante a neutralização. Deste modo, as propriedades físicas do material ficam retidas. O metanol é o álcool preferido porque muitos dos sais acima mencionados possuem uma boa solubilidade neste álcool

em conjunto com a água. De um modo preferido, a razão álcool para água situa-se numa gama de cerca de 4:1 a 1:4. Se a solução se tornar demasiado rica em álcool, alguns sais podem deixar de ser solúveis, particularmente se o álcool não for o metanol. Se a solução se tornar demasiado rica em água, ocorrerá alguma dilatação do polissacarídeo à medida que se realiza a neutralização e deverá existir alguma perda nas propriedades físicas, tal como na resistência à tracção do polissacarídeo. Outros álcoois úteis incluem, por exemplo, álcool etílico, álcool propílico e álcool isopropílico.

A utilização de um agente de neutralização moderado, tal como acetato de prata, permite o controlo do grau de neutralização. A utilização de quantidades estequiometricamente e quimicamente equivalentes de agente neutralizante e de ácido carboxílico na celulose oxidada não produz um polissacarídeo 100% neutralizado como seria produzido com reacções fortemente irreversíveis com bases, tais como hidróxido de sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e hidróxido de amónio.

As celulosas oxidadas comportam-se como um permutador iónico e retirarão de solução o catião de prata de qualquer sal de prata que seja passado sobre elas. O subproduto desta troca é um ácido do sal e, pela utilização de um sal de um ácido orgânico fraco, é produzido um ácido fraco, tal como ácido acético, que não causa nenhum dano ao polissacarídeo. A utilização de sais de ácidos fortes, tais como cloreto de sódio ou sulfato de sódio produz os subprodutos ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, respectivamente, e estes ácidos fortes podem causar dano, tal como a despolimerização da celulose oxidada.

Quando se utilizam sais de prata de ácidos fracos, o ião de prata é trocado por um protão na celulose oxidada e parte do sal é convertido em ácido fraco. A mistura de ácido e sal na solução resulta numa solução tamponada que mantém um pH razoavelmente constante e controla o grau de neutralização. É estabelecido um equilíbrio de reacção pelo que os iões de prata estão ligados à parte ácida da celulose oxidada e também às moléculas do sal. Este particionamento dos iões de prata impede que a neutralização da celulose oxidada prossiga até à conclusão.

Utilizando uma quantidade estequiométrica de, por exemplo, acetato de prata produz um grau de neutralização de cerca de 65-75% dos grupos de ácido carboxílico num polímero de celulose oxidada. Este controlo de pH, pela criação de uma solução tamponada auto gerada e a utilização de metanol para controlar a dilatação do material, conduz a um material parcialmente neutralizado em que são preservadas as propriedades físicas, e. g., resistência à tracção e forma da celulose oxidada.

A quantidade de sal de prata utilizada é, geralmente, igual ou até cerca do dobro da quantidade estequiométrica do conteúdo em ácido carboxílico da celulose oxidada. Alternativamente, pode ser utilizada uma segunda carga de uma quantidade estequiométrica de sal de prata se a reacção for recarregada com solvente fresco e sal depois da primeira carga atingir um pH constante. O material com pH elevado é então lavado para remover o excesso de sal de prata e iões deste.

Será entendido que os complexos obteníveis pelos métodos acima descritos podem ser utilizados nos produtos e métodos de acordo com qualquer aspecto da invenção. Mais geralmente, qualquer característica ou combinação de características que

sejam descritas como preferidas com respeito a qualquer um dos aspectos da invenção ou com respeito aos métodos acima descritos são igualmente preferidas com respeito a todos os outros aspectos da invenção. Além disso, qualquer combinação das características específicas ou preferidas aqui divulgadas está igualmente abrangida pelo âmbito da divulgação.

Uma forma de realização específica do processo e produto de acordo com a presente invenção será agora descrita adicionalmente, a título de exemplo, com referência para os desenhos que a acompanham, em que:

A Figura 1 mostra o efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus Aureus*, representado graficamente como zona de inibição em mm em 2 dias, para uma primeira gama de materiais para material de penso;

A Figura 2 mostra o efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus Aureus*, representado graficamente como zona de inibição em mm em 24 e 48 horas, para uma segunda gama de materiais para material de penso;

A Figura 3 mostra o efeito antimicrobiano contra *Pseudomonas Aeruginosa*, representado graficamente como zona de inibição em mm em 24 e 48 horas, para a segunda gama de materiais para material de penso;

A Figura 4 mostra o efeito sobre proliferação celular de extractos de uma terceira gama de materiais para material de penso; e

A Figura 5 mostra um gráfico da concentração de TNF- α contra o tempo para os seguintes materiais de penso incubados com lipopolissacarídeos e macrófagos monocitários: (A) um material de penso de acordo com a invenção, (B) solução de acetato de Prata a 0,01 M, (C) um penso liofilizado de colagénio/ORC sem prata, e (D) uma gaze de penso convencional.

Exemplo de Referência 1

Um complexo de ORC com prata foi preparado como se segue.

Um tecido SURGICEL® (Johnson & Johnson Medical, Arlington) foi triturado utilizando um cortador de lâmina rotativo através de uma chapa perfurada, mantendo a temperatura abaixo de 60 °C, para proporcionar um pó de ORC fibroso.

Pó de acetato de prata (4,08 g) foi dissolvido em 800 mL de água desionizada. Após todo o pó ter dissolvido para formar uma solução límpida incolor, as fibras (5 g) trituradas de ORC foram adicionadas a esta solução. A ORC foi, em seguida, deixada reagir durante sessenta minutos, ou menos se desejado. A solução foi depois filtrada e as fibras foram recolhidas e lavadas com água desionizada ou álcool. O complexo de prata de ORC foi então deixado secar a 37 °C de um dia para o outro ou até que as fibras estivessem secas. A fim de reduzir o escurecimento do produto final, a solução e fibras reagidas foram protegidas da luz durante toda a reacção.

Exemplos de Referência 2-5, Exemplo 6 e Exemplo de Referência 7

Esponjas liofilizadas de colagénio/ORC adequadas para utilização como materiais de penso foram preparadas como se segue.

Primeiro, o componente de colagénio foi preparado a partir de derme bovina como se segue. A derme bovina foi separada do couro bovino, raspada e embebida em solução de hipocloreto de sódio (0,03% p/v) para inibir a actividade microbiana aguardando processamento adicional.

A derme foi depois lavada com água e tratada com uma solução contendo hidróxido de sódio (0,2% p/v) e peróxido de hidrogénio (0,02% p/v) para dilatar e esterilizar a derme a temperatura ambiente.

As tiras da derme sofreram em seguida uma etapa de tratamento alcalino numa solução contendo hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio e bicarbonato de sódio (0,4% p/v, 0,6% p/v e 0,05% p/v, respectivamente) a pH superior a 12,2, temperatura ambiente e durante um período de 10-14 dias, com rotação, até ser alcançado um nível de azoto de amido menor que 0,24 mmol/g.

As tiras da derme sofreram em seguida uma etapa de tratamento ácido com ácido clorídrico a 1% a temperatura ambiente e pH 0,8-1,2. O tratamento continuou com rotação até que as tiras da derme absorveram ácido suficiente para atingir um pH menor que 2,5. As tiras foram depois lavadas com água até que o valor de pH das tiras da derme atingiu 3,0-3,4.

As tiras da derme foram em seguida cominuídas com gelo num cortador com reservatório, primeiro com uma afinação para cominuição grosseira e a seguir com uma cominuição fina. A pasta resultante, que foi preparada numa razão de 650 g de tiras da derme para 100 g de água, enquanto gelo, foi congelada e armazenada antes de utilização na etapa seguinte do processo. Contudo, o colagénio não foi liofilizado antes da mistura com a ORC na etapa seguinte.

O complexo prata-ORC, pó de ORC triturada não modificada, e o peso requerido (de acordo com conteúdo em sólidos) de pasta de colagénio congelada foram adicionados, em seguida, a uma quantidade suficiente de água acidificada com ácido acético para obter um valor de pH de 3,0 e um conteúdo de sólidos totais de 1,0%-2,0%, nas seguintes proporções em peso:

Exemplo de Referência 2: 45% de Prata-ORC / 55% de Colagénio

Exemplo de Referência 3: 20% de Prata-ORC + 15% de ORC / 55% de Colagénio

Exemplo de Referência 4: 10% de Prata-ORC + 35% de ORC / 55% de Colagénio

Exemplo de Referência 5: 2% de Prata-ORC + 43% de ORC / 55% de Colagénio

Exemplo 6: 1% de Prata-ORC + 44% de ORC / 55% de Colagénio

Exemplo de Referência 7: 0,2% de Prata-ORC + 44,8%
de ORC / 55% de Colagénio

A mistura foi homogeneizada através de um homogeneizador MZ130D da Fryma, diminuindo progressivamente as definições para formar uma pasta fluida homogénea. O pH da pasta fluida foi mantido a 2,9-3,1. A temperatura da pasta fluida foi mantida abaixo de 20 °C e o conteúdo em sólidos foi mantido a 1% ± 0,07.

A pasta fluida resultante foi bombeada para um recipiente de desgaseificação. O vácuo foi iniciado durante um mínimo de 30 minutos, com agitação intermitente, para desgaseificar a pasta fluida. A pasta fluida foi, então, bombeada para dentro de tabuleiros de liofilização até uma profundidade de 25 mm. Os tabuleiros foram colocados em prateleiras de arca congeladora onde a temperatura foi programada para -40 °C. O programa de liofilização foi, depois, iniciado para secar e desidrotermicamente reticular o colagénio e ORC, para formar almofadas de esponja espessas.

Após conclusão do ciclo, o vácuo foi libertado, os blocos liofilizados foram removidos e foram, em seguida, separados para remover as camadas superficiais de cima e de baixo e para dividir o resto dos blocos em almofadas de 3 mm de espessura. A etapa de divisão dos blocos liofilizados em almofadas foi efectuada com uma máquina de corte K1 da Fecken Kirfel.

Finalmente, as almofadas foram cortadas em molde com o tamanho e forma desejadas num cortador-molde, embaladas e esterilizadas com 18-29 KGy de irradiação gama de cobalto 60. Surpreendentemente, esta irradiação não causa desnaturação significativa do colagénio, que parece ser estabilizado pela

presença de ORC. As almofadas de ORC de colagénio liofilizadas resultantes possuíam uma aparência aveludada branca uniforme.

Processo 1

A actividade bactericida das esponjas preparadas nos Exemplos 2 a 7 foi testada em *pseudomonas Aeruginosa* e *staphylococcus Aureus* pela observação da zona de inibição.

Seis quadrados de 2 cm x 2 cm de cada amostra foram cortados em condições de esterilização. No dia um da experiência, culturas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foram incubadas aerobiamente a 37 °C durante 24 horas em Diagnostic Sensitivity Agar (DSA). Após 24 horas, cada uma das amostras de teste foi colocada numa placa de DSA e foram imediatamente humedecidas com 0,5 mL de uma solução tampão. Três quadrados de amostra foram colocados em placas inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa* e três foram colocados em placas inoculadas com *Staphylococcus aureus*. As placas foram depois incubadas a 37 °C durante 24 horas. A zona de crescimento inibido em torno da amostra foi, então, medida utilizando paquímetros e a amostra de teste foi colocada numa nova placa de DSA inoculada. Foi efectuado um teste de esfregaço na área debaixo da amostra a fim de determinar se a amostra era bacteriostática, se não for bactericida, esfregando a zaragatoa sobre a placa de DSA e incubando-a durante 24 horas e em seguida examinando o crescimento. As amostras foram transferidas para placas inoculadas de fresco, com o processo supracitado efectuado de 24 em 24 horas durante 72 horas desde que as amostras permanecessem intactas.

Como controlo negativo, foi testada uma esponja liofilizada de 45% de ORC/55% de colagénio sem qualquer prata. Um penso antimicrobiano contendo prata disponível comercialmente (ACTICOAT, marca registada de Smith & Nephew) e solução de nitrato de prata (0,5%) foram utilizados como controlos positivos e foram observadas as zonas de inibição para ambos durante o período de teste.

Com referência às Figuras 1 e 2, pode constatar-se que foram observados efeitos bactericidas significativos contra *Staphylococcus aureus* para os materiais que contêm prata-ORC igual ou superior a 1%. O desempenho foi comparável àquele do penso ACTICOAT.

Com referência à Figura 3, pode constatar-se que foram observados efeitos bactericidas significativos contra *Pseudomonas Aeruginosa* para os materiais que contêm prata-ORC igual ou superior a 10%. O desempenho às 24 horas foi superior àquele do penso ACTICOAT.

Processo 2

Os efeitos antiproliferativos dos pensos dos Exemplos supracitados foram avaliados como se segue.

Extractos protótipo foram preparados como se segue - 1 mg de cada material de penso a testar foi colocado em 1 mL de meio isento de soro e foi incubado durante 24 horas a 37 °C sob condições de esterilização.

Fibroblastos dérmicos de humanos adultos foram cultivados e mantidos em DMEM 10% FBS (meio de cultura padrão; meio mínimo essencial da Dulbecco; soro bovino fetal). Estas células foram subcultivadas rotineiramente e utilizadas em testes experimentais quando 95% confluentes. Fibroblastos dérmicos de humanos adultos foram recolhidos a 95% de confluência e re-inoculados numa placa de microtitulação de 96 poços (100 µL/poço) em DMEM + 10% de FBS a uma densidade celular de $2,5 \times 10^4$ células/mL. As células foram deixadas a aderir à superfície da placa durante 24 horas numa incubadora humidificada a 37 °C, 5% de CO₂. O meio foi em seguida removido por aspiração e a monocamada celular lavada com DMEM isento de soro. Amostras de teste (extractos de cada protótipo) foram depois adicionadas à monocamada celular (100 µL/poço) e 6 replicados de cada concentração testados. Como controlo positivo foi utilizado meio de crescimento contendo soro (10% de FBS em DMEM) e meio isento de soro foi utilizado como controlo negativo. Todas as amostras foram incubadas com as células durante 48 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Após este período de incubação o meio condicionado foi removido por aspiração e substituído por uma solução de marcação de um kit de proliferação celular comercial (XTT, Cell Proliferation kit II, Cat. N° 1 465 015, obtido de Boehringer Mannheim). Após a adição desta solução, foi obtida uma leitura inicial de absorvência a 450 nm, após a qual se incubou a placa de microtitulação a 37 °C, 5% de CO₂ e a absorvência foi monitorizada durante 4 horas. O efeito proliferativo de cada protótipo foi avaliado pela comparação das leituras de absorvência medidas contra os controlos positivos e negativos.

Como controlo positivo, foi testada uma esponja liofilizada de 45% de ORC/55% de colagénio sem qualquer prata, visto que já se sabia que esta promove a proliferação de fibroblastos.

Foi utilizado ACTICOAT como controlo negativo, visto que é geralmente sabido que o efeito de prata sobre células em cultura é tóxico, ocorrendo morte celular a concentrações elevadas.

Os resultados apresentados na Figura 4 foram muito surpreendentes. Pode constatar-se que as amostras que contêm 0,2% e 1% do complexo prata-ORC promovem fortemente a proliferação de fibroblastos. Este efeito é, pelo menos, o dobro daquele observado apenas com colagénio/ORC, que previamente demonstrou estimular a proliferação celular. Este efeito estimulatório estava aparentemente limitado a concentrações mais baixas de prata-ORC, já que concentrações iguais ou superiores a 2% foram prejudiciais ao crescimento celular. Nesta experiência, o controlo ACTICOAT apresenta o efeito negativo esperado sobre a proliferação de fibroblastos.

Processo 3

O potencial anti-inflamatório dos materiais de penso de acordo com a invenção foi estudado como se segue.

Demonstrou-se que os lipopolissacarídeos (LPS) induzem a produção de TNF- α e IL-1 em células de macrófagos monocitários. Esta resposta pode ser utilizada para avaliar o potencial anti-inflamatório de pensos, visto que se sabe que o TNF- α e IL-1 potenciam o processo de inflamação.

A fim de avaliar as propriedades anti-inflamatórias dos materiais de penso, incubaram-se amostras na presença e na ausência de lipopolissacarídeos (E.Coli 055.B5, Sigma Chemical Co.) com macrófagos monocitários (células THP-1 provenientes da European Collection of Cell Cultures). Como controlos positivos e negativos, foram igualmente incubados diversos materiais de penso de referência e concentrações variáveis de acetato de prata com células THP-1 na presença e na ausência de LPS. As concentrações de acetato de prata variaram desde 0,01 M e 0,001 mM. Sabe-se que o acetato de prata é citotóxico nas concentrações mais elevadas nesta gama, não possuindo toxicidade no limite inferior. Os níveis tanto de TNF- α como de IL-1 produzidos pelas células THP-1 foram medidos durante um período de tempo de 24 horas após adição de LPS.

Foram testados os seguintes materiais de penso:

(A) Um material de penso de esponja liofilizada de acordo com a presente invenção contendo 1%, em peso, de um complexo de prata/ORC, preparado como acima descrito no Exemplo 6;

(B) Uma esponja liofilizada consistindo de 55%, em peso, de colagénio e de 45% de ORC preparada como descrito no documento EP-A-1153622 e disponível sob a Marca Registada PROMOGRAN proveniente de Johnson & Johnson Wound Care (Exemplo de Controlo); e

(C) Uma gaze médica disponível sob a Marca Registada SOFWICK proveniente de Johnson & Johnson Wound Care (Exemplo de Controlo).

O processo experimental decorreu como se segue.

As células THP-1 foram mantidas em 10% de FBS LPS baixo. As células foram depois centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos e ressuspendidas para dar uma concentração de 10000 células por mL. Foi em seguida adicionado PMA (12-miristato 13-acetato de Forbol, Sigma Chemical Co.) à suspensão celular para dar uma concentração final de $2,4 \times 10^{-7}$ M. Esta suspensão celular foi depois utilizada para inocular placas de microtitulação de 24 poços com 10000 células/poço. As placas foram, em seguida, incubadas a 36 °C, 5% de CO₂ durante 72 horas para permitir a aderência das células ao plástico da cultura de tecidos.

Foi depois preparado meio RPMI contendo 1 mg/mL de LPS. (O LPS foi reconstituído a 1 mg/mL em solução salina esterilizada tamponada com fosfatos). Após incubação, o meio PMA nas placas de microtitulação de 24 poços foi removido por meio de aspiração e substituído por RPMI + LPS ou apenas meio RPMI. Amostras puncionadas de 6 mm provenientes dos materiais a testar foram removidas e embebidas em PBS durante não mais de 2 minutos. Dois espécimes de cada tipo de material de penso foram amostrados quatro vezes para dar um total de oito amostras para cada tipo de penso. Foram preparadas soluções de acetato de prata em meios RPMI para dar concentrações de 0,1 M, 10 mM, 1 mM e 0,1 mM.

As biopsias de penso pré-embebidas e diferentes concentrações de acetato de prata foram depois adicionadas à placa de microtitulação. 10 µL de cada solução de acetato de prata foram adicionados a todos os poços de teste dando concentrações de teste de 0,01 M, 1 mM, 0,1 mM e 0,01 mM.

As placas de microtitulação foram depois incubadas a 37 °C, 5% de CO₂. Após 4, 6 e 24 horas de incubação, alíquotas de 20 µL de meios condicionados foram removidas de cada poço. As mostras foram transferidas para tubos *bullet* e armazenadas a -70 °C até análise de ELISA.

Antes da análise de ELISA as amostras de meios foram divididas em alíquotas de 10 µL e diluídas 1:2 com diluente calibrador (a utilização de diluente calibrador dependeu do ELISA a realizar). Esta diluição inseriu as amostras na gama da curva padrão. Foram seguidas as instruções do fabricante para os kits de ELISA. Os kits de ELISA foram fornecidos por R&D Systems Limited.

As curvas padrão tanto para TNF-α como IL-1β foram representadas graficamente e as equações geradas foram utilizadas para converter absorvências de amostra em concentrações equivalentes de citocina. As concentrações médias tanto para TNF-α como IL-1β foram calculadas para cada estado de amostra a cada intervalo de tempo. Estes resultados foram depois utilizados para comparar diferenças entre condições de teste ao longo do tempo.

A níveis citotóxicos (0,01 M) o acetato de prata induziu a morte celular e, por conseguinte, não foi produzido nenhum TNF-α. A níveis sub-citotóxicos (0,1 mM e 0,001 mM) as células THP-1 permaneceram viáveis (como determinado por exame ao microscópio) e induziram uma dose-resposta na quantidade de TNF-α produzido. 0,01 mM de acetato de prata demonstrou uma capacidade para inibir a quantidade de TNF-α produzido, enquanto as concentrações mais baixas de acetato de prata estudadas não

tiveram nenhum efeito sobre a quantidade de nenhum TNF- α produzido após estimulação com LPS.

Com referência à Fig. 5, pode constatar-se que os diversos pensos testados demonstraram capacidades diferentes para influenciar a quantidade de TNF-alfa produzida por células THP-1. A gaze (Amostra C) teve pouco efeito e, na presença deste penso, as células produziram o mesmo nível de TNF- α que o observado no controlo positivo (apenas LPS).

Na presença de um penso de esponja de colagénio/ORC isento de prata (Amostra B) as células produziram níveis mais baixos da citocina inflamatória do que o observado apenas com LPS.

Contudo, quando estava presente no poço de ensaio um material de penso de esponja de colagénio/ORC contendo prata de acordo com a presente invenção (Amostra A), as células THP-1 não produziram virtualmente nenhum TNF- α . A inibição pelo material de acordo com a presente invenção foi, surpreendentemente, ainda melhor que aquela alcançada com concentrações de acetato de prata (0,01 mM) equivalentes àsquelas presentes no material.

Resultados para IL-1 β (dados não apresentados) foram semelhantes àqueles apresentados para TNF- α .

Os resultados indicam uma capacidade do material de acordo com a presente invenção para inibir a produção de importantes citocinas inflamatórias por macrófagos monocitários THP-1. Demonstrou-se que este efeito foi mantido durante as 24 horas do período de teste e sugere que o material da presente invenção possui uma capacidade para influenciar a produção de citocina durante um prolongado período. A actividade anti-inflamatória do

material de acordo com a presente invenção não poderia ser prevista apenas a partir dos dois componentes.

Os Exemplos foram descritos apenas para efeitos de ilustração. Muitas outras composições e métodos que integram o âmbito das reivindicações acompanhantes serão evidentes ao leitor especialista.

Lisboa, 23 de Maio de 2007

REIVINDICAÇÕES

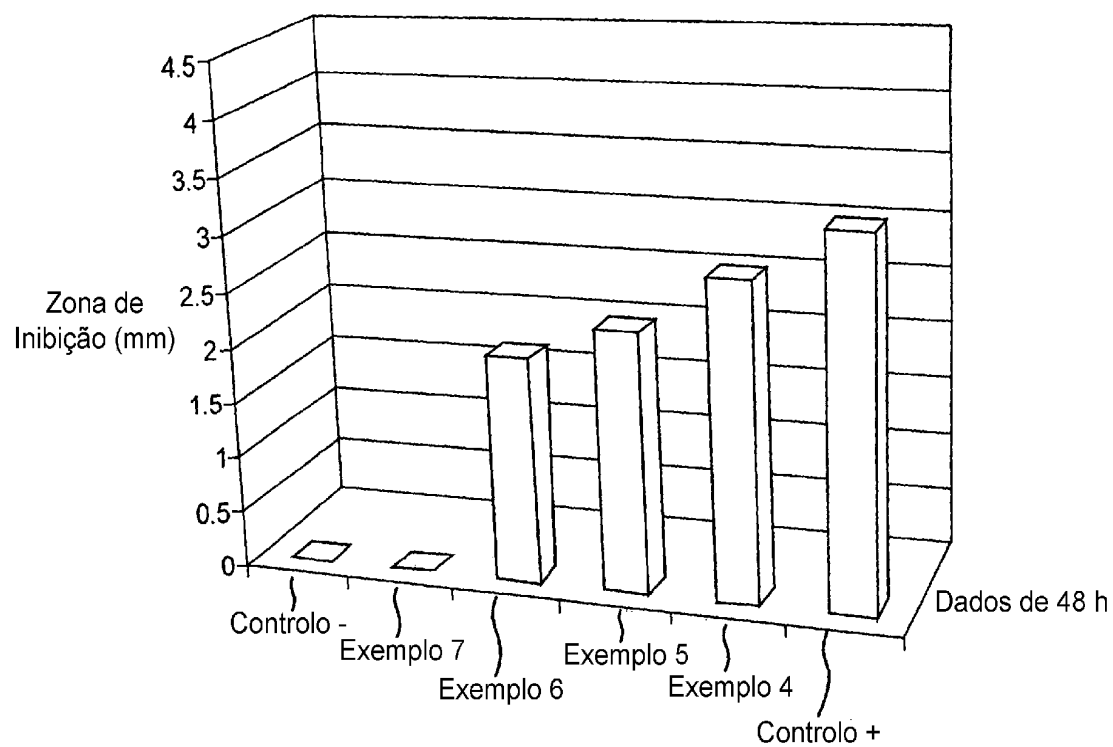
1. Material de penso compreendendo um complexo de uma celulose oxidada com prata, em que o material compreende desde 0,1% a 0,3%, em peso, de prata.
2. Material de penso de acordo com a reivindicação 1, em que o complexo compreende um sal formado entre a celulose oxidada e Ag^+ .
3. Material de penso de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que a quantidade de prata no complexo é desde 1 a 50%, em peso, com base no peso da celulose oxidada.
4. Material de penso de acordo com a reivindicação 1, na forma de uma folha compreendendo menos de 15%, em peso, de água.
5. Material de penso de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o material de penso compreende desde 0,1% a 10%, em peso, do complexo.
6. Material de penso de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que a quantidade de prata no material de penso é desde 0,2% a 0,3%, em peso.
7. Material de penso de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que a celulose oxidada é uma celulose regenerada oxidada (ORC).

8. Material de penso de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o material de penso compreende colagénio e celulose regenerada oxidada (ORC) complexada com prata.
9. Penso de acordo com a reivindicação 8, em que o material de penso é uma esponja liofilizada compreendendo desde 35% a 60%, em peso, de colagénio, desde 60% a 35%, em peso, de uma celulose regenerada oxidada (ORC) e desde 0,5% a 2%, em peso, de um complexo de ORC/prata, em que o complexo compreende desde 10% a 40%, em peso, de prata.
10. Penso compreendendo um material de penso de acordo com qualquer reivindicação anterior.
11. Penso de acordo com a reivindicação 10, em que o penso é esterilizado e embalado num recipiente impermeável a microrganismos.
12. Utilização de um complexo de uma celulose oxidada com prata para a preparação de um material compreendendo desde 0,1% a 0,3%, em peso, de prata para utilização no tratamento de feridas.
13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que as referidas feridas são feridas crónicas, tais como úlceras venosas, úlceras de decúbito ou úlceras diabéticas.
14. Utilização de acordo com a reivindicação 12 ou 13, em que o referido tratamento compreende a aplicação do referido material de penso directamente na superfície da ferida.

15. Utilização de um complexo de uma celulose oxidada com prata para a preparação de um material compreendendo desde 0,1% a 0,3%, em peso, de prata para utilização no tratamento da inflamação.

Lisboa, 23 de Maio de 2007

FIG. 1



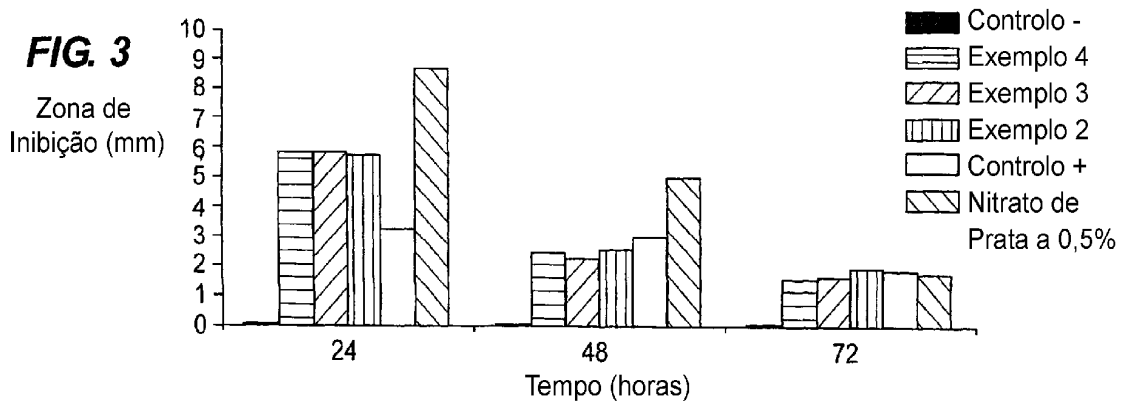
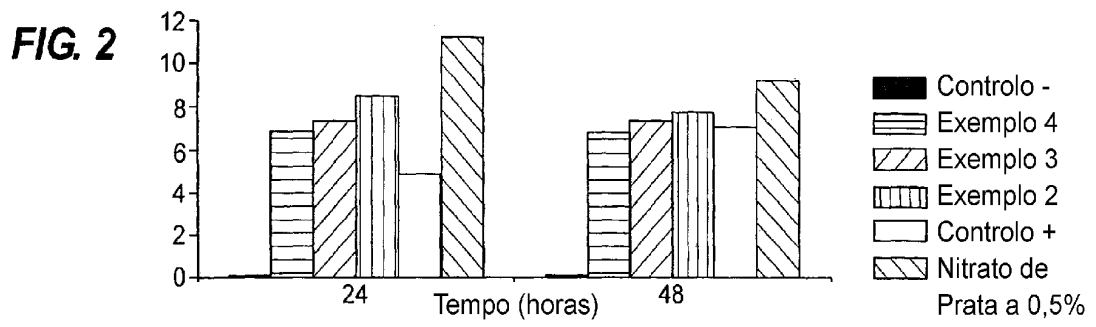


FIG. 4

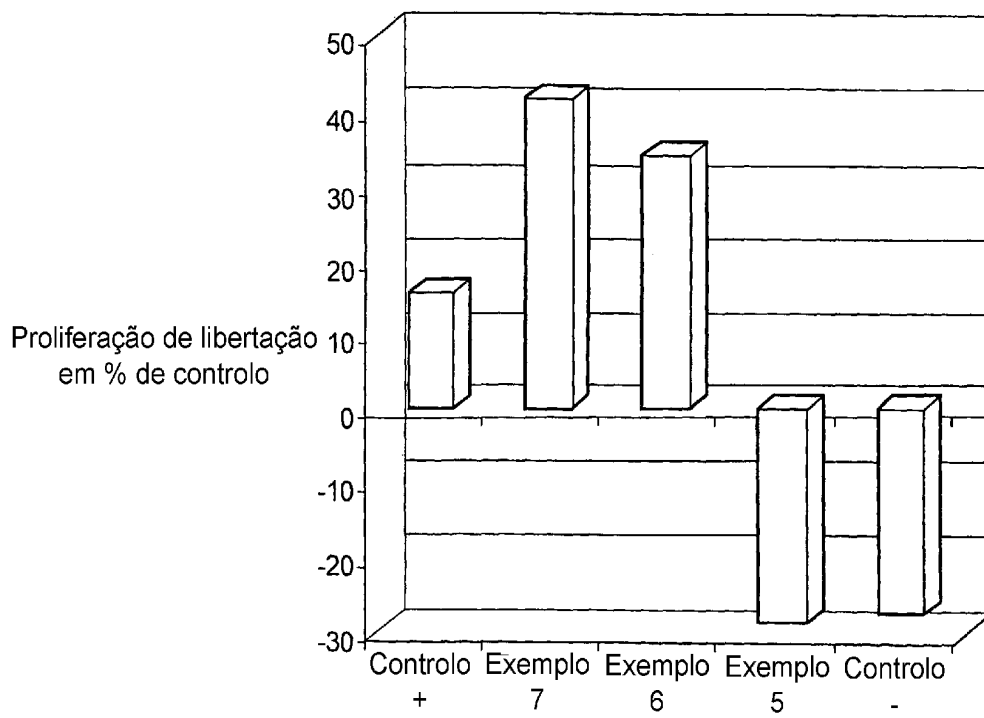


FIG. 5