

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98.637

REQUERENTE: PFIZER HOSPITAL PRODUCTS GROUP, INC., nor-
te-americana, industrial, 235 East 42nd
Street, New York, U.S.A.

EPIGRAFE: "PROCESSO PARA A PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE
TECIDO UTILIZANDO PEROLAS DE DEXTRANO"

INVENTORES: Qi-Bin Bao, John H. Dumbleton e Paul A.
Higham

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América do Norte, 14 de Agosto 1990
No.567,424

PFIZER HOSPITAL PRODUCTS GROUP, INC.

"PROCESSO PARA A PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE TECIDO UTILIZANDO
PÉROLAS DE DEXTRANO"

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a promoção do crescimento de tecido. Um material implantável para a promoção do crescimento do osso tem uma estrutura microporosa que apresenta um tamanho médio de poro de pelo menos 30Å . O biomaterial poroso é capaz de reter macromoléculas tendo um peso molecular de pelo menos 15 000 e até 500 000.

Mais concretamente o referido processo consiste no revestimento do implante protético com um biomaterial tendo uma estrutura microporosa apresentando um tamanho de poro médio de pelo menos 30Å , sendo o referido biomaterial capaz de reter nos referidos poros moléculas tendo um peso molecular de pelo menos 15 000 e até 500 000; e implantação do referido implante protético no corpo adjacente ao tecido.

FUNDAMENTOS DO INVENTO

Campo do Invento

Este invento relaciona-se com a estimulação do crescimento do osso. Mais particularmente, o invento relaciona-se com a utilização de pérolas de dextrano tendo um tamanho de poro controlado para estimular o crescimento de osso e de tecido.

Descrição da Técnica Anterior

Nos últimos anos tem sido feito um substancial trabalho de pesquisa sobre a indução do crescimento ósseo e da osteogénese devido ao seu significado clínico. De entre todos os diferentes esforços, duas abordagens separadas mas relacionadas despertaram muita atenção quer devido ao seu sucesso na solução de problemas ortopédicos quer devido ao seu considerável interesse em biologia e na ciência aplicada da osteoindução. A primeira consiste em investigações clínicas sobre o efeito eléctrico sobre a indução de formação de osso novo. A segunda consiste em investigações bioquímicas sobre o crescimento do osso, acoplamento, factores da osteogenese e uma fracção proteica morfogenética.

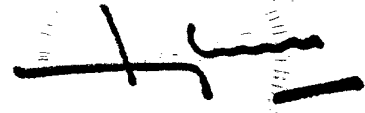
A primeira abordagem, que foi documentada pelo menos há um século, consiste em aplicar um campo eléctrico a fim de estimular e regular a osteogenese. Durante os últimos quarenta anos, mais relatórios revelaram que o cátodo estimula a actividade osteo-indutora tanto nos testes com animais como nos casos clínicos. Vários estudos revelaram que certos materiais, tais como neurónios, mioblastos, células da crista neural, células epiteliais, fibroblastos e osteoblastos migram para o cátodo no campo eléctrico. Pode ser um ou um grupo destes materiais, ou

alguns outros materiais não identificados, que desempenhem um papel importante no processo da regeneração óssea.

A segunda abordagem, que se iniciou num estadio mais tardio mas que tem sido recentemente alvo de considerável atenção, concentra-se sobre a identificação e isolamento de factores de osteoindução. A proteína morfogenética do osso e o factor do crescimento esquelético humano são as duas proteínas osteoindutoras que foram isoladas e caracterizadas. Ceros estudos revelaram que a implantação destas proteínas desencadeia formação de osso novo.

Mais recentemente, os investigadores aplicaram pérolas de dextrano carregadas para aumentar a formação de osso novo. As características únicas das pérolas carregadas com dextrano, a sua grande porosidade, grupos carregados diferentemente e a sua afinidade em relação a diferentes proteínas estiveram na origem de alguns resultados prometedores. Estes resultados foram referidos no 24º Meeting Anual da Sociedade de Pesquisa Ortopédica entre 1 e 4 de Fevereiro, 1988 e foram publicados no artigo "Charged Beads: Generation of Bone and Giant Cells" no Journal of Bone & Mineral Research, 1988.

No estudo da técnica anterior, foram usados sem pré-tratamento três tipos diferentes de pérolas de dextrano Sephadex produzidas por Pharmacia, Inc. Estas pérolas são feitas a partir de dextrano de poliglucose com ligação cruzada com epiclorohidrina. Os grupos carregados para a produção de carga negativa ou positiva são ligados a unidades de glucose na matriz por meio de ligações éter estáveis. As pérolas foram suspensas em solução de sal de Tyrode (tamponada a pH=7,3) e esterilizadas com UV. As propriedades químicas e físicas destas pérolas são indicadas no Qaudro 1. A "variação de fraccionamento" refere-se à capacidade



das pérolas para separarem proteínas tendo os pesos moleculares (PM) referidos.

QUADRO 1

<u>Pérola</u>	<u>Carga</u>		<u>Ião</u>	<u>Variação</u>
	<u>Pérola</u>	<u>Grupo Carga</u>	<u>Contra</u>	<u>Fraccionamento (PM)</u> <u>Proteínas Globulares</u>
G-25	Nenhuma	Neutro	Nenhum	1.000-5.000
DEA-A-25	Positiva	Base Fraca Dietilamino- etilo	Cl ⁻	<30.000
CM-C-25	Negativa	Ácido Fraco Carboximetilo	Na ⁺	<30.000

Neste estudo, apenas as pérolas CM-C-25 carregadas negativamente apresentaram um efeito osteoindutor. O estudo concluiu que a carga eléctrica negativa estimulava o crescimento ósseo.

A utilização de pérolas carregadas para promover a formação de osso novo pode derivar de um ou de ambos o efeito indutor do campo eléctrico e o efeito factor osteoindutor. Embora tenham sido feitos vários estudos para investigar o efeito da carga superficial dos biomateriais sobre a bioactividade, tem sido feito muito pouco esforço para o estudo do efeito de porosidade dos biomateriais sobre o processo de osteogénese.

Os biomateriais com actividade osteoindutora podem ser utilizados não apenas para promover a cicatrização de ossos defeituosos ou fracturados, mas também para melhorar a integração de um implante existente no tecido circundante se o implante existente for revestido com os materiais bioactivos. Para esta última aplicação, uma ligação interfacial do biomaterial com o

tecido adjacente constituirá a chave para o sucesso da implantação.


A fim de compreender o mecanismo da osteogênese induzida por biomaterial, é essencial uma breve consideração sobre a estrutura do osso. O osso é um tecido conjuntivo especializado compreendendo células e uma matriz extracelular (ECM). Um tipo de célula, o osteoblasto, é responsável pelo fabrico da ECM. A ECM compreende componentes orgânicos e inorgânicos. O componente orgânico que constitui cerca de 35% do peso total é composto predominantemente (95%) por colagénio do Tipo I. O restante (5%) é uma mistura complexa de proteínas não-colagenosas e de outras macromoléculas. De entre estas proteínas, várias, tais como Proteína Morfogenética do Osso (BMP), Factor do Crescimento do Esqueleto humano (hSGF) e alguns outros factores de crescimento, são conhecidos por aumentarem a replicação celular e têm efeitos importantes sobre a função celular diferenciada. Contudo, pouco se sabe sobre o modo exacto de acção destas macromoléculas. O componente inorgânico da ECM do osso é uma hidroxiapatite de cálcio complexa, mais complexa do que a fórmula estequiométrica para a hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sugeriria.

Devido ao papel importante que os osteoblastos e alguns factores osteoindutores desempenham no processo da osteogênese, tem-se a esperança de que quaisquer biomateriais aplicados irão ter a capacidade ou de colonizar e concentrar as macromoléculas osteoindutoras, ou de deixar os osteoblastos migrarem para a superfície desses biomateriais. As propriedades únicas das pérolas de dextrano fizeram delas um bom candidato para um material osteoindutor.

Em primeiro lugar, a carga das pérolas oferece um ambiente eléctrico no organismo quando implantadas, o mesmo

efeito que um electrodo pode oferecer. Em segundo lugar, o grupo com carga diferente e diferente porosidade das pérolas torna possível a sua ligação selectiva com certas proteínas com peso molecular e carga específicos. As pérolas carregadas foram utilizadas para separar proteínas tendo como base o seu peso molecular e afinidade diferentes. Esta característica, se se escolher a pérola correcta, torna possível a ligação da pérola e a concentração de certos factores osteoindutores próximo das pérolas.

A real osteogenese induzida por biomateriais constitui um processo complexo e regulado e o seu mecanismo exacto, de momento, não é bem compreendido. Foram propostas várias hipóteses tentando correlacionar os resultados in vivo/in-vitro com as propriedades do biomaterial, tais como a carga estérica, porosidade, tamanho da particula e a natureza dos materiais, etc. De entre todas estas hipóteses, a sua explicação inclina-se mais para a interacção entre os biomateriais e os factores osteoindutores, que incluem Proteína Morfogénica do Osso (BMP), Factor de Crescimento Esquelético humano (hSGF) e alguns outros factores do crescimento. A interacção pode na realidade resultar em colonização, concentração e finalmente activação dos factores osteoindutores envolvidos. É sabido que certas moléculas biológicas, BMP em particular, são responsáveis pela indução da formação de novo osso. Uma outra hipótese realça mais a interacção dos biomateriais e células ósseas, particularmente osteoblastos, que são responsáveis pela produção da ECM. Verificou-se in vitro que os osteoblastos migram para diferentes biomateriais com diferentes taxas e que a eles se ligam com diferentes morfologias dependendo da carga da superfície dos biomateriais. Contudo, a correlação entre a morfologia das células ósseas e a actividade osteoindutora não é ainda clara. Também não se compreende se a diferente morfologia celular constitui um efeito directo da carga



da superfície ou se o efeito é indirecto. Devido ao facto da taxa de migração celular para os biomateriais ser muito mais lenta do que a taxa de interacção química ou de carga estérica entre as macromoléculas ou outros agentes químicos orgânicos ou inorgânicos no meio fisiológico e os biomateriais, foi possível alterar a carga da superfície dos biomateriais antes das células migrarem e se ligarem aos biomateriais.

Na técnica anterior, a investigação concentrou-se apenas sobre o efeito de carga. Verificou-se realmente que a morfologia migratória do osteoblasto e a síntese da matriz celular são sensíveis à carga do biomaterial que é colonizado. Tem sido dada pouca atenção ao efeito da porosidade do biomaterial usado quer como implantes quer como revestimento dos implantes metálicos. Porque é sabido que os osteoblastos que colonizam um biomaterial são capazes de transpor as aberturas dos poros sobre a superfície de substratos bioactivos, macroporosos, e o facto da dimensão dos osteoblastos ser muito maior do que a da porosidade estudada nesta técnica, a porosidade das pérolas investigada nesta técnica terá provavelmente pouco efeito directo sobre a morfologia migratória do osteoblasto. Contudo, o efeito indirecto sobre a morfologia migratória do osteoblasto, que é causado pelo facto de várias macromoléculas terem diferente capacidade de ligação com as pérolas com diferentes tamanhos de poros, é ainda possível. Porque a maior parte das macromoléculas osteoindutoras tem um peso molecular que varia entre 15.000 e 30.000, a porosidade dos biomateriais usados nos implantes terá um efeito significativo sobre a capacidade de ligação destas macromoléculas osteoindutoras.

A porosidade das pérolas de dextrano depende do grau de ligação cruzada e da concentração dos grupos carregados a elas ligados. As pérolas de Sephadex do tipo A e C derivam de pérolas

do tipo G por introdução dos grupos carregados na matriz. Embora os números das pérolas A e C permaneçam iguais aos da pérola G (A-25 e C-25 são produzidas a partir de G-25, A-50 e C-50 são produzidas a partir de G-50), as porosidades das pérolas húmidas variam significativamente devido ao aumento da capacidade de tumefacção pela introdução de grupos carregados. Cada pérola de Sephadex tem uma variação do peso molecular diferente facto pelo qual as moléculas podem ser fraccionadas. Moléculas com peso molecular acima do limite superior desta variação, o limite de exclusão, são totalmente excluídas do gel. O Quadro 2 indica as variações do fraccionamento das diferentes pérolas de dextrano Sephadex.

QUADRO 2

PROPRIEDADES DO SEPHADEX

Variação Fraccionamento (PM)

Tipo <u>Sephadex</u>	Peptídeos e Proteínas <u>Globulares</u>	<u>Dextranos</u>	Volume Pérola ml/g <u>Sephadex seco</u>
G-25	1.000-5.000	100-5.000	4-6
G-50	1.500-30.000	500-10.000	9-11
G-75	3.000-80.000	1.000-50.000	12-15
G-100	4.000-150.000	1.000-100.000	15-20
A-25, C-25	<30.000		7-10
A-50, C-50	30.000-150.000		varia com pH

Embora tenham sido discutidas pérolas de dextrano, podem ser usados outros polímeros tendo propriedades semelhantes às indicadas anteriormente. Por exemplo, um implante ortopédico inteiro pode ser feito desses polímeros (com as propriedades anteriormente referidas) ou um implante ortopédico existente pode ser revestido com esses polímeros a fim de neles formar uma superfície osteoindutora.

RESUMO DO INVENTO

Constitui um objectivo deste invento proporcionar um material implantável para promover o crescimento ósseo.

Constitui um outro objectivo deste invento proporcionar um material implantável que tenha uma estrutura porosa com um tamanho de poro capaz de nele reter moléculas de proteínas osteoindutoras.

Estes e outros objectivos são conseguidos por meio de um biomaterial implantável tendo uma superfície porosa apresentando um tamanho de poro médio de pelo menos 30 Å. Este tamanho de poro é capaz de reter moléculas tendo um peso molecular de pelo menos 15.000 até 500.000. No limite mais elevado da variação do peso molecular, o tamanho médio do poro é de cerca de 500 Å. As pérolas de dextrano apresentam esta porosidade e podem ser usadas como biomaterial. Evidentemente, podem ser usados outros polímeros tendo tamanhos de poros semelhantes e capazes de reter moléculas com a variação referida anteriormente.

Este biomaterial tendo superfície porosa é usado para determinar as características osteoindutoras de materiais visto se relacionarem com a capacidade do material para ligar macromoléculas osteoindutoras. Os materiais são ou não carregados, negativamente carregados ou positivamente carregados.

Este biomaterial pode ser constituído por pérolas de dextrano do tipo Sephadex tal como foi indicado anteriormente. Todas as pérolas tendo um tamanho de poro capaz de se ligar com macromoléculas com um peso molecular superior a 5.000 revelaram capacidades osteoindutoras. Isto mostrou ser verdadeiro independentemente da carga.

O biomaterial pode ser modificado para conduzir factores osteoindutores por impregnação do biomaterial com factores osteoindutores colocando-o numa solução ou pasta contendo estes factores antes da implantação. Alternativamente, o biomaterial pode ser directamente implantado num sítio ósseo onde o material poroso se irá ligar e inerentemente actuar de modo a concentrar os factores osteoindutores.

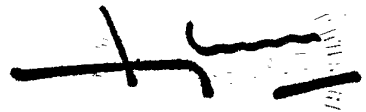
O biomaterial poroso que actua para promover o crescimento ósseo pode ser formado para e usado como um dispositivo implantável. O biomaterial pode também ser usado como um material de revestimento para um dispositivo implantável existente sem alterar as propriedades de massa do dispositivo original. A característica osteoindutora do biomaterial poroso não só pode promover a cicatrização do osso defeituoso ou fracturado como pode também melhorar a fixação de um implante existente ao ser usada como um revestimento sobre o mesmo.

DESCRIÇÃO DA APRESENTAÇÃO PREFERIDA

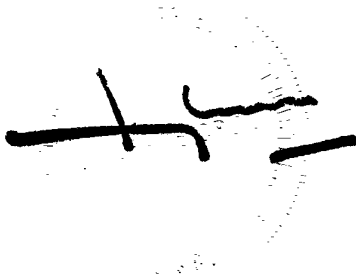
O invento será agora descrito com maior detalhe sendo feita referência ao exemplo que se segue. Deve ser reconhecido, contudo, que o exemplo é dado com fins ilustrativos do presente invento não pretendendo definir ou limitar o seu espírito e âmbito.

Exemplo

Foram usadas duas pérolas de dextrano neutras (G-25 e G-27) com diferentes tamanhos de poros fornecidas por Pharmacia. As pérolas foram lavadas com NaOH 0,1N a fim de remover quaisquer impurezas sendo então equilibradas com tampão do pH. A esterilização teve lugar por autoclave das pérolas a 120°C durante 30



minutos. As propriedades químicas e físicas destas duas pérolas juntamente com as duas pérolas carregadas, são indicadas no Quadro 3.



Quadro 3

<u>Pérola</u>	<u>Carga</u> <u>Pérola</u>	<u>Grupo Carga</u>	<u>Ião</u> <u>Contra</u>	<u>Varição</u> <u>Fraccionamento (PM)</u> <u>Proteinas Globulares</u>
G-25	Nenhuma	Neutro	Nenhum	1.000-5.000
G-75	Nenhuma	Neutro	Nenhum	3.000-80.000
DEA-A-25	Positiva	Base Fraca Dietilamino- etilo	Cl ⁻	<30.000
CM-C-25	Negativa	Ácido Fraco Carboximetilo	Na ⁺	<30.000

Foi perfurado um orifício com 6,0 mm na epífise femoral distal de dezoito coelhos. O orifício foi perfurado a partir da superfície central para, mas não se estendendo através, a superfície lateral. A pata direita de cada animal foi usada como um controlo e o defeito foi preenchido com pérolas de dextrano (G-25) com carga neutra. O orifício da perfuração esquerda foi preenchido com pérolas neutras com um tamanho de poro maior, G-75.

Os materiais foram implantados durante quatro semanas, e nessa altura os animais foram sacrificados. Os condilos de cada pata foram cortados em metades laterais e centrais. As metades centrais e laterais de cada fémur foram descalcificadas e introduzidas em metacrilato de metilo. Foi realizado um exame histológico e os resultados são indicados no Quadro 4.

QUADRO 4

RESULTADOS HISTOLÓGICOS

<u>Pérolas Injectadas</u>	Crescimento Interno de <u>Tecido*</u>	Número de Cortes <u>Examinados</u>
G-25, Não carregadas	-	6
G-75, Não Carregadas com Tamanho de Poro Grande	+	2

* -, apenas crescimento inteno de tecido mole
+, crescimento interno de osso bom a excelente

A partir dos dados da técnica anterior, é muito fácil concluir que é necessário ter um grupo carregado eléctricamente nas pérolas para a actividade osteoindutora. Contudo, se as propriedades físicas das diferentes pérolas forem examinadas tendo em vista os resultados do Exemplo 1, verifica-se que esta conclusão é provavelmente incorrecta. É muito fácil assumir que as pérolas G-25 teriam um tamanho de poro igual aos das pérolas A-25 e C-25 visto todas as pérolas A-25 e C-25 derivarem de pérolas G-25 a elas ligando os grupos carregados e porque têm a mesma densidade de ligação cruzada. Contudo, o tamanho real dos poros das pérolas G-25 húmidas é completamente diferente do das pérolas A-25 e C-25, como se pode deduzir do Quadro 2, visto a ligação dos grupos carregados ao polímero aumentar a capacidade de tumefacção das pérolas. A variação do fraccionamento para G-25 é de apenas 1.000 a 5.000, enquanto que a variação do

fraccionamento para tanto A-25 como C-25 é superior a 30.000. É assim impróprio, utilizar pérolas G-25 como controlo para as comparar com pérolas A-25 e C-25 para o efeito de carga eléctrica visto existir algo (porosidade) diferente da carga eléctrica que é também muito diferente de pérolas para pérolas. Não é surpreendente que as pérolas G-25 não tenham qualquer actividade osteoindutora na técnica anterior visto a maior parte, senão todas, as proteínas osteoindutoras terem um peso molecular superior a 5.000.

Devido à significativa diferença de porosidade entre estas pérolas -25, carregadas e não carregadas, pérolas G-75, que têm o mesmo grau de tamanho do poro que as pérolas A-25 e C-25, foram escolhidas para se ver quão significativamente a porosidade contribui para o processo osteoindutor. Neste caso, podemos diferenciar o efeito do tamanho do poro do efeito de carga eléctrica. Porque as pérolas G-25 e G-75 são feitas do mesmo polímero, qualquer diferença observada na actividade osteoindutora deverá ser atribuída ao efeito de tamanho do poro. Ao mesmo tempo, o resultado das pérolas G-75 pode também ser usado para comparar com o das pérolas usadas na técnica anterior para se ver como as diferentes cargas das pérolas afectam a osteogénese.

O presente estudo demonstrou que foi observada significativa formação de osso novo associada às pérolas com as pérolas G-75 não carregadas, enquanto não houve evidência de formação de novo osso associada a pérolas G-25 não carregadas. Isto indica que a microporosidade desempenha um papel muito importante no processo de osteogénese induzida por biomaterial. Este invento, contudo, não pretende indicar que a microporosidade é o único requerimento da actividade osteoindutora para um biomaterial. A capacidade de interacção entre biomaterial e as moléculas e as células vivas é ainda muito importante. É muito difícil utilizar

o efeito da carga estérica para explicar a ligação entre as pérolas de dextrano neutras ou carregadas positivamente e os factores osteoindutores carregados. Contudo, outras forças intermoleculares, ligações de hidrogénio e ligações hidrofóbicas continuam a estar disponíveis para a interacção entre os biomateriais e os factores osteoindutores e as células vivas. O presente estudo indica que a microporosidade apropriada de um biomaterial, quer usado isoladamente quer usado como revestimento, pode promover actividade osteoindutora do material.

Porque a maior parte das macromoléculas biologicamente activas conhecidas na ECM têm um peso molecular variando entre 15.000 e 30.000, com excepção de hSGF com um peso molecular de cerca de 80.000, espera-se que a microporosidade média mínima seja suficientemente grande para acomodar essas macromoléculas. O limite superior da microporosidade teria uma restrição menor do que o limite inferior para a ligação destas moléculas. Embora só se tenha usado uma pérola de dextrano de grande porosidade (G-75), tendo como base o conhecimento da bioquímica e biologia básicas, pode ser extrapolada uma conclusão de que o tamanho de poro apropriado para um material bioactivo nas aplicações osteogénicas deve ter uma variação de fraccionamento molecular de PM 15.000 a 500.000, o que corresponde aproximadamente a um tamanho entre 30 Å e 500 Å.

Embora tenham sido descritos várias apresentações e exemplos do presente invento, é óbvio que se podem fazer muitas alterações e modificações para esse fim, sem afastamento do espírito e âmbito do invento.

REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a promoção do crescimento de tecido em redor de um implante protético, caracterizado por compreender:

o revestimento do implante protético com um biomaterial tendo uma estrutura microporosa apresentando um tamanho de poro médio de pelo menos 30Å , sendo o referido biomaterial capaz de reter nos referidos poros moléculas tendo um peso molecular de pelo menos 15 000 e até 500 000; e

a implantação do referido implante protético no corpo adjacente ao tecido.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o biomaterial ser uma pérola de dextrano humidificada.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por em que o tamanho médio do poro ser inferior a 500Å .

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as moléculas conterem factores osteoindutores.

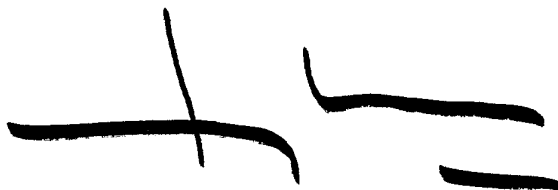
5ª. - Processo para a promoção do crescimento de tecido, caracterizado por compreender:

a formação de um implante protético a partir de uma série de pérolas de dextrano não carregadas tendo, no estado húmido, uma estrutura microporosa apresentando um tamanho médio de poro de pelo menos 30Å , sendo as referidas pérolas capazes de reter nos

referidos poros moléculas tendo um peso molecular variando entre 15 000 e 500 000; e

a implantação do referido implante protético no corpo adjacente ao tecido.

Lisboa, 12 de Agosto de 1991



J. PEREIRA DA CRUZ

Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA