



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

(11) PI 0802298-4 B1

(22) Data do Depósito: 20/06/2008

(45) Data de Concessão: 19/06/2018



* B R P I 0 8 0 2 2 9 8 B 1 *

(54) Título: PROCESSO DE TRATAMENTO DE UM IMPLANTE

(51) Int.Cl.: A61L 27/22; A61L 27/24; A61L 27/50; A61L 27/00

(30) Prioridade Unionista: 20/06/2007 FR 07 55890

(73) Titular(es): CORMOVE

(72) Inventor(es): SHEN MING

“PROCESSO DE TRATAMENTO DE UM IMPLANTE”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a dispositivo médicos implantáveis (designados pelo termo genérico de “implante médico”). Mais precisamente, a presente presente invenção refere-se a implantes médicos à base de proteínas, mais particularmente à base de colágeno, que se tornaram biocompatíveis e resistentes à calcificação, e mais especificamente a um processo de preparação desses implantes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Existem diferentes tipos de implantes médicos, entre os quais os implantes à base de proteínas que se mostram particularmente interessantes. Esses implantes são em particular mais vantajosos que os implantes à base de materiais não biológicos, na medida que eles permitem evitar, entre outras coisas, trombozes quando são introduzidos em um organismo vivo, em particular no homem. Entretanto, para obter essa biocompatibilidade, os implantes à base de proteínas requerem um pré-tratamento.

[003] De fato, as proteínas presentes nos implantes à base de proteínas são geralmente proteínas fibrosas (tipicamente colágenos) que comportam funções aminas livres. Essas funções aminas livres são em parte responsáveis pela rejeição do implante em um corpo vivo, devido ao reconhecimento pelo sistema imunológico dessas funções aminas livres da proteína.

[004] Para evitar esse fenômeno de rejeição, costuma-se tratar o implante com um composto aldeído difuncional, tipicamente o glutaraldeído.

[005] Esse composto aldeído difuncional visa em particular mascarar as funções aminas. Nesse contexto, as funções aldeídios reagem com as funções aminas do implante formando funções iminas ($-C=N-$). Além disso, o

uso de um composto difuncional, que comporta duas funções aldeídos, permite realizar ligações entre as diferentes fibras de proteínas.

[006] Entretanto, os implantes à base de proteínas tratados com composto de tipo glutaraldeído levam em geral a uma calcificação bastante rápida do implante quando ele é colocado em um corpo vivo.

[007] A calcificação provoca um endurecimento do implante devido a um acúmulo de sais de cálcio no implante. Esse fenômeno prejudica as propriedades do implante, em particular no uso de próteses cardíacas ou vasculares, o que exige uma substituição periódica do implante por via cirúrgica. Para mais detalhes consultar o documento US 5.645.587.

[008] Foi proposto efetuar um pós-tratamento dos implantes tratados com glutaraldeído com diferentes composto, em particular com ácido oléico. Esses tipos de tratamento visam em particular principalmente eliminar a presença de subprodutos tóxicos e não permitem limitar suficientemente a calcificação.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[009] Uma finalidade da presente invenção é fornecer implantes biocompatíveis à base de proteínas, nos quais os fenômenos de calcificação são limitados em relação aos observados com implantes à base de proteínas tratados atualmente conhecidos, de preferência em uma medida suficiente para evitar a substituição periódica do implante.

[010] Para esse fim, de acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção tem por objeto um processo de tratamento de um implante que comporta um substrato à base de proteínas, processo esse que comporta as etapas em que:

(A) o substrato à base de proteínas é tratado com um composto portador de pelo menos um grupo aldeído, de preferência por um composto portador de pelo menos dois grupos aldeídos, e a seguir

(B) o substrato é tratado com um composto que compreende um

boroidreto, e a seguir

(C) o substrato proveniente da etapa (B) é tratado com um derivado portador de um grupo silano.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[011] Por “implante”, entende-se, no sentido da presente descrição, um dispositivo destinado a ser implantado em um corpo vivo que compreende ou é constituído por um substrato à base de proteínas. Tipicamente, o implante tratado de acordo com a presente invenção é um implante cardíaco, em particular um implante valvular cardíaco.

[012] Por “substrato à base de proteínas”, entende-se aqui um substrato que compreende uma ou mais proteínas, geralmente a título de componente majoritário, por exemplo, em um teor que varia de 50 a 100% em massa. Esse substrato à base de proteínas é constitutivo da totalidade ou de parte do implante. Na maior parte das vezes, o implante é inteiramente constituído por esse substrato à base de proteínas.

[013] O substrato pode também englobar outros materiais tais como próteses, condutos, aparelhos cirúrgicos em contato com o meio vivo.

[014] No processo da presente invenção, o substrato à base de proteínas do implante é submetido a um tratamento de modificação, que assegura principalmente sua biocompatibilidade. Pelo termo biocompatibilidade do implante, entende-se aqui que, quando o implante é colocado em um corpo vivo, e em particular em um ser humano, esse implante não é reconhecido pelo sistema imunológico, o que permite evitar fenômenos de rejeição dos implantes à base de proteínas.

[015] Os inventores mostraram agora que a sucessão das etapas (A), (B) e (C) permite conferir a um implante à base de proteínas uma biocompatibilidade elevada, limitando ao mesmo tempo o aparecimento do fenômeno da calcificação deste último.

[016] Em particular, os trabalhos dos inventores permitiram estabelecer que a combinação das etapas (B) e (C) permite reduzir fortemente os fenômenos de calcificação que são observados com os implantes atualmente conhecidos, que correspondem a implantes tratados somente de acordo com a etapa (A) da presente invenção.

[017] A limitação do fenômeno da calcificação parece se explicar em parte pelo fato da sucessão das etapas (B) e (C) permitir reduzir as funções aldeídos livres introduzidas na etapa (A) em função álcoois (na etapa (B)), e essas funções álcoois estão protegidas em forma de funções siloxanos (na etapa (C)). Essas funções siloxanos apresentam a vantagem de serem funções estáveis, biocompatíveis e pouco propícias ao acúmulo de sais de cálcio.

[018] Paralelamente, constata-se ainda que a etapa (B) de redução conduz além do efeito precitado a uma redução de outras funções introduzidas na etapa (A). Mais precisamente, a etapa (B) conduz à redução de funções iminas provenientes do acoplamento das aminas livres do substrato do implante com aldeídos difuncionais da etapa (A). Essa reação das funções das funções iminas se mostra particularmente vantajosa uma vez que se constatou que essas funções iminas favorecem igualmente a calcificação. A etapa (B) permite, portanto, eliminar esses grupos iminas capazes de provocar a calcificação convertendo-os em funções aminas substituídas, que apresentam a vantagem de ser estáveis.

[019] Assim, o processo da presente invenção permite limitar o fenômeno de calcificação inibindo a presença de duas fontes responsáveis pela calcificação do implante. Conseqüentemente, o implante preparado de acordo com o processo da presente invenção apresenta a vantagem de ter uma baixa taxa de calcificação, o que permite, em certos casos, evitar a substituição do implante por meio de uma intervenção cirúrgica, ou pelo menos aumentar o intervalo de tempo entre as intervenções cirúrgicas necessárias à substituição

do implante.

[020] Na maior parte das vezes, o substrato à base de proteínas presente no implante tratado de acordo a presente invenção compreende ou é constituído de proteínas fibrosas. De preferência, o substrato é à base de colágeno, de elastina, de fibrina, de fibrinogênio e/ou de proteoglicano.

[021] O implante tratado de acordo com a presente invenção é tipicamente um implante valvular cardíaco, que inclui a totalidade ou parte de uma válvula aórtica e/ou de um pericárdio de origem bovina, porcina, ovina, equina, equina ou de avestruz.

[022] Devido à presença de proteínas, o substrato do implante compreende intrinsecamente funções aminas livres que seriam responsáveis, pelo menos parte, pelos fenômenos de rejeição se o substrato não tratado fosse implantado sem tratamento em um corpo vivo.

[023] Na etapa (A) do processo de acordo com a presente invenção, trata-se o substrato à base de proteínas constitutivo do implante por um composto portador de pelo menos um grupo aldeído. Por motivos de concisão, esse composto será designado a seguir pelo termo genérico de “composto aldeído”. O grupo aldeído da etapa (A) é suscetível de reagir com as funções aminas livres do substrato transformando essas funções em funções iminas. De modo geral, o composto portador de pelo menos uma função aldeído é um composto representado pela seguinte fórmula:

R-CHO (fórmula I)

em que R é uma cadeia hidrocarbonada que comporta tipicamente de 2 a 18 átomos de carbono, por exemplo de 3 a 8 átomos de carbono eventualmente substituídos por um heteroátomo tal como um átomo de cloro, de flúor, de bromo, de nitrogênio, de fósforo ou de enxofre. Esse grupo R pode eventualmente ser substituído por um ou outros grupos aldeído –CHO.

[024] Vantajosamente o composto aldeído da etapa (A) é

hidrossolúvel.

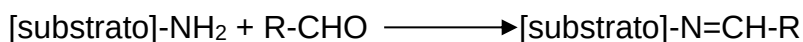
[025] De acordo com um modo de realização vantajoso, o composto aldeído empregado na etapa (A) é um composto portador de pelo menos dois grupos aldeídos -CHO , o que permite obter uma ligação entre certas fibras proteínicas do substrato do implante tratado de acordo com o processo da presente invenção. Nesse contexto, o composto aldeído da etapa (A) pode em particular ser de fórmula geral (II): $\text{HOC-R}^2\text{-CHO}$ em que R^2 é um cadeia hidrocarbonada que comporta tipicamente de 2 a 18 átomos de carbono, por exemplo de 3 a 8 átomos de carbono eventualmente substituídos por um heteroátomo tal como um átomo de cloro, de flúor, de bromo, de nitrogênio, de fósforo ou de enxofre. De preferência, o composto aldeído da etapa (A) é o glutaraldeído.

[026] De acordo com um modo interessante de realização da etapa a (A), o substrato do implante é imerso em uma solução (S_A), em particular aquosa, que contém o composto aldeído durante um período de pelo menos duas semanas, de preferência de pelo menos 1 mês. A solução (S_A) utilizada de acordo com esse modo de realização pode em particular ser preparada diluindo o composto em um tampão, e o pH da solução (S_A), de preferência, compreende entre 5 e 9. A título de exemplo, quando o composto aldeído for glutaraldeído, o pH da solução (S_A) é da ordem de 6 a 8. Pode-se em particular utilizar a título de tampão uma solução aquosa de fosfato de sódio ou de potássio de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfônico), a uma concentração compreendida, de preferência, entre 10 e 50 mmol.l^{-1} , por exemplo da ordem de 20 mmol.l^{-1} . A concentração de composto aldeído na solução (S_A) está tipicamente compreendida entre 0,1 e 1%, por exemplo da ordem de 0,6 a 0,7% em peso em relação ao volume total da solução (S_A). Além disso, será utilizada, de preferência, uma solução (S_A) que compreende o composto aldeído com uma osmolaridade (que corresponde ao número de mols de soluto por quilograma de

soluto) compreendida entre 200 e 400 mOsMol.l⁻¹, por exemplo da ordem de 300 mOsMol.l⁻¹.

[027] O tratamento da etapa (A) é preferencialmente efetuado sob agitação. Além disso, a temperatura do meio reacional da etapa (A) está, de preferência, compreendida entre 10 e 70°C. Por exemplo, a etapa (A) pode ser levada à temperatura ambiente, tipicamente entre 20 e 30°C, em particular por volta de 25°C.

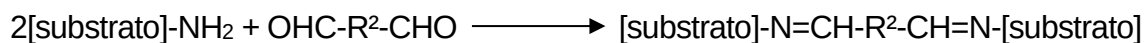
[028] O tratamento (A) leva na maior parte das vezes a uma reação entre as funções aminas livres e o composto aldeído, de acordo com a seguinte reação esquemática:



em que R tem o significado precitado.

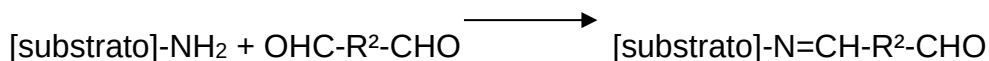
[029] Na maior parte das vezes, e quando são empregadas as soluções preferenciais, a etapa (A) leva a uma reação da maior parte e mesma da totalidade das funções aminas inicialmente presentes no substrato do implante.

[030] No caso do uso de um composto portador de pelo menos duas funções aldeídos, a etapa (A) leva ainda a reações que provocam uma ligação entre certas fibras do substrato, de acordo com a seguinte reação esquemática:



em que R² é tal como descrito acima.

[031] No caso dos compostos aldeídos difuncionais, alguns dos compostos aldeídos podem ter uma de suas funções aldeídos livre de acordo com a seguinte reação:



em que R² é tal como descrito acima.

[032] Assim, no final da etapa (A), restam grupos aldeídos -CHO

livres, que são suscetíveis de provocar fenômenos de calcificação. Além disso, o substrato é portador de funções iminas que são também fontes de calcificação.

[033] É esse tipo de reação que é observado quando implantes a base de colágeno são tratados com glutaraldeído de acordo com os processos conhecidos do estado da técnica.

[034] Uma finalidade das etapas (B) e (C) é eliminar sensivelmente todos esses grupos aldeídos $-CHO$ livres e as funções iminas introduzidas no final da etapa (A).

[035] Na etapa (B) do processo de acordo com a presente invenção, o substrato é tratado com um composto que compreende boroidreto, o que permite reduzir ao mesmo tempo as funções aldeídos em funções álcoois e as funções iminas em funções aminas de modo seletivo de modo a não modificar as funções amidas constitutivas das proteínas.

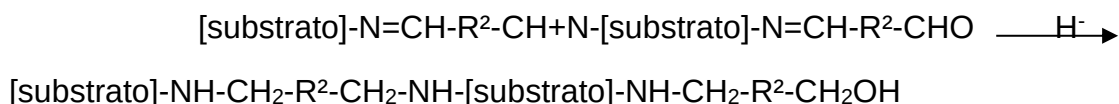
[036] O composto que compreende um boroidreto que é utilizado na etapa (B) é de preferência um derivado de um metal alcalino tal como sódio, o lítio, o potássio. De preferência, o composto que compreende um boroidreto é um cianoboroidreto metálico, tal como o cianoboroidreto de sódio, por exemplo.

[037] De acordo com um modo de realização interessante, a etapa (B), pode ser realizado, imergindo parcial ou totalmente o substrato proveniente da etapa (A) do processo de acordo com a presente invenção em uma solução (S_B) do composto que compreende um boroidreto durante um período tipicamente de pelo menos 1 hora, geralmente de pelo menos 5 horas, por exemplo durante 10 a 30 horas, tipicamente da ordem de 24 horas. A solução (S_B) utilizada de acordo com o modo de realização pode em particular ser obtida diluindo um composto que comporta um boroidreto em uma solução tampão. A solução (S_B) possui tipicamente um pH compreendido entre 5 e 11. Um tampão apropriado é em particular uma solução aquosa que comporta fosfato de sódio

dissódico cuja concentração está tipicamente compreendida entre 20 e 500 mmol.l⁻¹, por exemplo da ordem de 200 mmol.l⁻¹. A concentração do composto que compreende um boroidreto está em particular compreendida entre 10 e 160 mmol.l⁻¹, de preferência igual a aproximadamente 80 mmol.l⁻¹.

[038] O tratamento da etapa (B) é geralmente efetuado sob agitação, por exemplo da ordem de 50 rpm. A temperatura do meio reacional da etapa (B) está, de preferência, compreendida entre 10 e 70 °C. Por exemplo, a etapa (B) pode ser realizada à temperatura ambiente, por exemplo entre 20 e 30°C tipicamente por volta de 25°C.

[039] Tipicamente, a reação que ocorre na etapa (B) é a seguinte:



em que R² é tal como descrito acima.

[040] Assim, no final da etapa (B), o substrato comporta funções álcoois terminais que podem reagir com enzimas de fosforilação, o que é em particular suscetível de provocar uma degradação do implante. De fato, os grupos fosfatos dessas enzimas se ligam facilmente aos cátions do cálcio iniciando a calcificação do substrato. Com o tempo, essa degradação do implante, vai exigir também sua substituição por via cirúrgica.

[041] Uma finalidade da etapa (C) é evitar a presença das funções álcoois terminais introduzidas na etapa (B). Para esse fim, na etapa (C) do processo de acordo a presente invenção, o substrato proveniente da etapa (B) é tratado com um derivado portador de um grupo silano a fim de converter as funções álcoois em funções siloxanos. As funções siloxanos assim formadas são não reativas, e elas são ainda não definitivas, no sentido de que a reação de proteção das funções álcoois em funções siloxanos é irreversível (a desproteção implicaria uma destruição do substrato). Essa proteção definitiva das funções álcoois terminais permite evitar qualquer degradação do implante por compostos

ativos provenientes de um organismo vivo. Além disso, as funções siloxanos não são reconhecidas pelo sistema imunológico e elas não favorecem o fenômeno de calcificação.

[042] Via de regra, o derivado portador de um grupo silano empregado na etapa (C) comporta um grupo eletroatrator ligado diretamente ao átomo de silício. Esse grupo eletroatrator é tipicamente escolhido entre os halogênios, os grupos heteroarilas que comportam de 5 a 15 átomos de carbono e, eventualmente, 2 ou 3 heteroátomos tipicamente escolhidos entre o grupo constituídos pelos halogênios, tais como o flúor, o cloro, o bromo e o iodo, os pnictogênios que correspondem aos elementos da décima quinta coluna da classificação periódica dos elementos, tais como o nitrogênio e fósforo, e os calcogênios que correspondem aos elementos da décima sexta coluna da classificação periódica, tais como o oxigênio e o enxofre.

[043] De preferência, o grupo eletroatrator presente no derivado portador de um grupo silano utilizado na etapa (C) é um átomo de cloro, um átomo de bromo, um grupo imidazol.

[044] De acordo com uma variante, o grupo eletroatrator pode ser escolhido entre os precitados conhecidos pelo técnico no assunto.

[045] De modo preferencial, o derivado portador de um grupo silano utilizado na etapa (C) é um trialquilsililimidazol ou um halogenotrialquilsilano, por exemplo o trimetilsililimidazol ou o clorotrimetilsilano (também designado a seguir clorometilsilano).

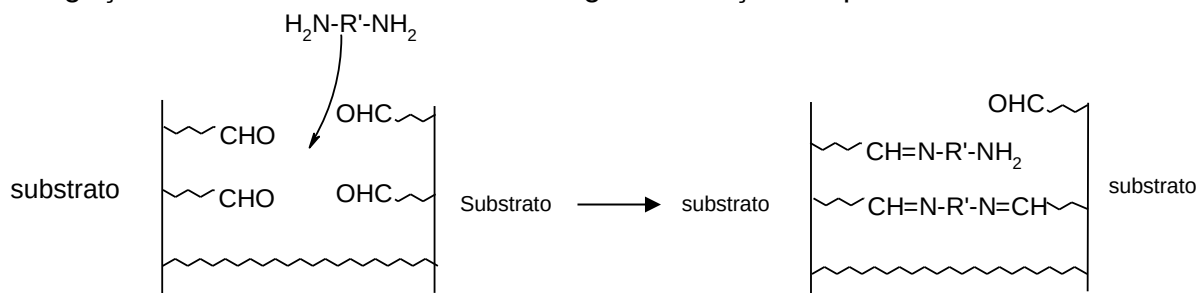
[046] De preferência, o derivado portador de um grupo silano empregado na etapa (C) é introduzido na forma de uma solução (Sc) na qual pelo menos um composto hidrossolúvel, não tóxico, escolhido no grupo constituído pelo tetraidrofurano, ou ainda o dioxano, o diglimo, o triglimo, a dimetilformamida, a dimetilacetamida, a N-metilpirolidona é utilizado como solvente. A título de exemplo, o derivado portador de um grupo silano pode ser

diluído no tetraidrofurano segundo um fator de diluição compreendido entre 1 e 20%, de preferência igual a aproximadamente 10%.

[047] Tipicamente, na etapa (C), trata-se o substrato proveniente da etapa (B) na solução (Sc) precipitada durante um período compreendido entre 1 e 30 minutos, por exemplo, durante 4 a 6 minutos, tipicamente por volta de 5 minutos. O tratamento da etapa (C) pode em particular ser efetuado sob agitação, porção por volta de 50 rpm. Além disso, a etapa (C), pode ser levada à temperatura ambiente, por exemplo, entre 20 e 30°C, tipicamente por volta de 25°C.

[048] De acordo com uma variante vantajosa, o processo de acordo com a presente invenção comporta, além das etapas (A), (B) e (C) precitadas, uma etapa (A1) intermediária, situada entre as etapas (A) e (B), em que o substrato tal como obtido no final da etapa (A) é tratado com um composto portador de pelo menos duas funções aminas antes da realização das etapas (B) e (C).

[049] De acordo com essa variante do processo de acordo com a presente invenção, uma parte das funções aldeídos livres formadas no final da etapa (A) reage com as funções aminas presentes nos compostos formadores de funções aminas utilizadas na etapa (A1) formando assim ligações iminas de acordo com a seguinte reação esquemática:



[050] Como ilustra o esquema acima, a etapa (A) leva, entre outras vantagens, a um aumento da ligação entre as cadeias proteínicas do substrato.

[051] Além disso, a etapa (A1) mascara uma parte das funções

aldeídos –CHO deixadas livres no final da etapa (A). Como indica o esquema. Esse mascaramento pode provocar a formação de cadeias enxertadas portadoras de funções aminas terminais livres. A presença dessas funções aminas terminais livres não é, porém, prejudicial, para a biocompatibilidade do implante. De fato, essas funções não são reconhecidas pelo sistema imunológico e não provocam rejeição.

[052] De preferência, o composto portador de pelo menos duas funções aminas utilizado na etapa (A1) é uma diamina de fórmula em que A é uma cadeia hidrocarbonada linear ou ramificada que comporta de 1 a 20 átomos de carbono eventualmente substituídos por um ou mais heteroátomos escolhidos entre o grupo constituído pelos halogênios, tais como o flúor, o cloro, o bromo e o iodo, os pnictogênios que correspondem aos elementos da coluna Vb da classificação periódica dos elementos, tais como o nitrogênio e o fósforo, e os calcogênios que correspondem aos elementos da coluna VIb da classificação periódica, tais como o oxigênio e o enxofre. De modo ainda mais preferencial, o composto portador de pelo menos duas funções aminas é o poli(propilenoglicol)bis(2-aminopropiléter), a lisina, a espermina ou a putrescina.

[053] De acordo com um modo de realização, a etapa (A1) pode ser realizada imergindo parcial ou totalmente o implante proveniente da etapa (A) do processo de acordo com a presente invenção em uma solução aquosa (S_{A1}) que compreende o composto portador de uma função amina, tipicamente a uma concentração compreendida entre 10 e 200 mmol.l⁻¹, mais preferencialmente ainda entre 40 e 80 mmol.l⁻¹, por exemplo a uma concentração da ordem de 60 mmol.l⁻¹. Tipicamente, a etapa (A1) é efetuada imergindo parcial ou totalmente o implante na solução (S_{A1}) durante um período tipicamente compreendido entre 10 e 100 minutos, por exemplo durante aproximadamente 60 minutos.

[054] O tratamento da etapa (A1) pode tipicamente ser efetuado

sob agitação, por exemplo por volta de 50 rpm. A temperatura do meio reacional da etapa (A) está de preferência compreendida de 10 a 70°C. Por exemplo, a etapa (A1) pode ser realizada à temperatura ambiente, por exemplo entre 20 e 30°C, tipicamente por volta de 25°C.

[055] De acordo com um modo de realização particular, após a etapa (A) e a eventual etapa (A1) e antes da etapa (B), o processo da presente invenção pode compreender ainda uma etapa de modificação de pH, para levar o meio reacional a um pH em particular compreendido entre 5 e 9, de preferência entre 5,5 e 6,5, por exemplo igual a aproximadamente 6, o que favorece a redução ulterior da etapa (B). Essa etapa pode em particular ser realizada tratando o meio proveniente da etapa (A) e da eventual etapa (A1) com ácido morfoniloetanossulfônico (MES) por um período de tempo compreendido entre 10 e 50 horas, de preferência 20 e 30 horas, por exemplo durante aproximadamente 24 horas.

[056] De acordo com um modo de realização, antes e depois de cada etapa de um processo de acordo com a presente invenção, o implante pode ser lavado com água, tipicamente com água ultra pura. Por “água ultra pura”, entende-se aqui que a resistividade da água é igual a aproximadamente 18,2 MΩ.cm a aproximadamente 25°C. A lavagem com água, em particular com água ultra pura, permite eliminar o excesso de reagentes presentes em cada uma das etapas do processo, o que permite tornar o implante isento de qualquer composto que possa interagir com o organismo do corpo vivo. A título de exemplo, o implante pode ser enxaguado pelo menos duas vezes, de preferência três vezes com água ultra pura antes e depois de cada uma das etapas (A), (B) e (C) (e (A1), se for o caso).

[057] De acordo com um modo de realização, o meio da etapa (A) pode ser isolado a fim de conservar o implante para a realização ulterior das etapas (B) e (C) ou das etapas (A1), (B) e (C).

[058] De acordo com um modo de realização, o implante tratado de acordo com as etapas (A), eventualmente (A1), (B) e (C) pode ser submetido a outro tratamento após a etapa (C). Esse tratamento adicional pode se destinar a melhorar ainda mais a resistência do implante à calcificação. A título de exemplo, o implante proveniente da etapa (C) pode ser tratado por soluções anticalcificantes atualmente conhecidas, tais como o “sterilent” (22% de etanol, 4% de formaldeído e 1,2% de Tween 80 (polissorbato 80) no resto de água, e as porcentagens são dadas em volume em relação ao volume total da solução.

[059] Qualquer que seja o modo de realização do processo da presente invenção, obtém-se no final desse processo um implante que não é sensivelmente portador de funções próprias a provocar uma calcificação.

[060] De acordo com um segundo aspecto, a presente invenção tem também por objeto o implante à base de proteínas tratado suscetível de ser obtido no final do processo de acordo com a presente invenção.

[061] Um implante tratado de acordo com a presente invenção é em geral sensivelmente isento de funções aldeídos –CHO livres e de funções iminas.

[062] Além disso, o implante tratado de acordo com a presente invenção é portador de função siloxanos terminais.

[063] Por funções siloxanos terminais, entende-se cadeias hidrocarbonadas que comportam heteroátomos, tais como um átomo de nitrogênio, de oxigênio, de cloro, de bromo, de iodo, de fósforo, interrompidas por um átomo de silício na superfície do implante.

[064] Assim, o implante de acordo com a presente invenção apresenta a vantagem de ter uma calcificação baixa.

[065] De preferência, o implante tratado de acordo com a presente invenção é um implante valvular cardíaco.

[066] Diferentes aspectos e vantagens da presente invenção

aparecerão com a leitura dos exemplos não limitativos que serão apresentados a seguir.

EXEMPLOS

SUBSTRATO UTILIZADO

[067] Para a preparação do implante, foi utilizado a título de substrato um pedaço de pericárdio bovino.

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

[068] Nos exemplos a seguir, a água pura utilizada é uma solução aquosa que possui uma resistividade igual a aproximadamente 18,2 MΩ a aproximadamente 25°C.

SOLUÇÃO (S1) DE GLUTARALDEÍDO

[069] Cerca de 6,25 g de glutaraldeído foram diluídos em aproximadamente 1 l de uma solução tampão que comporta fosfato de sódio e fosfato de potássio a aproximadamente 20 mmol.l⁻¹. Obteve-se assim uma concentração final de glutaraldeído de aproximadamente 0,625% em peso em relação ao volume total da solução (S1).

[070] A osmolaridade da solução era igual a aproximadamente 300 mOsmol.l⁻¹ adicionando-se aproximadamente 5,3 g de cloreto de sódio na solução (S1).

[071] O pH da solução (S1) foi de aproximadamente 7,4.

SOLUÇÃO (S2) DE POLI(PROPILENOLICOL)BIS(2-AMINOPROPILÉTER) (JEFFAMINE)

[072] Aproximadamente 1,437 ml de poli(propilenoglicol)bis(2-aminopropiléter) foram diluídos em aproximadamente 98,563 ml de água ultra pura.

[073] A concentração de poli(propilenoglicol)bis(2-aminopropiléter) na solução (S2) era igual a aproximadamente 60 mmol.l⁻¹.

SOLUÇÃO (S3) DE CIANOBOROIDRETO DE SÓDIO (NACNBH₃)

[074] Aproximadamente 0,5 g de cianoboroidreto de sódio foi

dissolvido em aproximadamente 10 ml de água ultra pura durante uma noite. A solução obtida foi diluída a seguir em aproximadamente 90ml de uma outra solução comportando 200 mmol.l⁻¹ de Na₂HPO₄.

[075] A concentração final de cianoboroidreto de sódio na solução (S3) foi de aproximadamente 80 mmol.l⁻¹.

SOLUÇÃO (S4) DE CLOROMETILSILANO (CLOROTRIMETILSILANO)

[076] Aproximadamente 10 ml de clorometilsilano foram diluídos aproximadamente 90 ml de tetraidrofurano.

SOLUÇÃO (S5) DE TRIMETILSILILIMIDAZOL

[077] Aproximadamente 10 ml de trimetilsililimidazol foram diluídos em aproximadamente 90 ml de tetraidrofurano.

SOLUÇÃO (S6) DE “STERILENT”

[078] Aproximadamente 220 ml de etanol absoluto, 108 ml de formaldeído a 37% e 12 ml de Tween 80 foram diluídos em aproximadamente 660 ml de tampão de fosfato de sódio e de potássio. A concentração final de fosfato foi de aproximadamente 20 mmol.l⁻¹ e o pH da solução foi de aproximadamente 7,4.

EXEMPLO 1

TRATAMENTO DE SUBSTRATO DE ACORDO COM AS ETAPAS (A), (B) E (C) DO

PROCESSO DA PRESENTE INVENÇÃO

● TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S1) DE GLUTARALDEÍDO

[079] O substrato foi tratado pela solução (S1) pelo menos um mês à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

[080] No final desse tratamento, o substrato tratado foi cortado em quadrados de cerca de 7 mm de lado.

[081] As amostras provenientes do substrato assim tratado foram enxaguadas três vezes com água ultra pura.

- **TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S3) DE CIANOBORETO DE SÓDIO**

[082] Essas amostras enxaguadas foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150ml contendo aproximadamente 100ml da solução (S3). O meio reacional foi a seguir deixado sob agitação a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 24 horas.

[083] As amostras assim tratadas foram enxaguadas três vezes com água ultra pura.

- **TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S4) DE CLOROMETILSILOANO**

[084] As amostras assim enxaguadas foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo 100 ml da solução de clorometilsilano (S4). O meio reacional foi a seguir deixado sob uma agitação igual a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 5 minutos.

[085] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

EXEMPLO 2

TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM AS ETAPAS (A), (A1), (B) E (C) DO PROCESSO DA PRESENTE INVENÇÃO

- **TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S1) DE GLUTARALDEÍDO**

[086] O substrato foi tratado pela solução (S1) pelo menos 1 mês à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

[087] No final desse tratamento, o substrato tratado foi cortado em quadrados de aproximadamente 7 mm de lado.

[088] As amostras provenientes substrato assim tratado foram enxaguadas três vezes com água pura.

- **TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S2) DE POLI(PROPILENOGLICOL)BIS(2-AMINOPROPILÉTER) (JEFFAMINES)**

[089] As amostras assim enxaguadas foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150ml contendo 100ml da solução (S2). A garrafa foi colocada sob agitação a aproximadamente 50 rpm durante aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

[090] Aproximadamente 5,76 g de ácido morfolinoetanossulfônico (MES) foram adicionados ao meio reacional. O meio reacional foi deixado sob agitação a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 23 horas.

[091] O pH final do meio reacional foi de aproximadamente 6.

[092] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S3) DE CIANOBOROIDRETO DE SÓDIO

[093] Essas amostras enxaguadas foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo aproximadamente 100 ml da solução (S3). O meio reacional foi deixado a seguir sob agitação a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 24 horas.

[094] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S4) DE CLOROMETILSILANO

[095] As amostras assim enxaguadas foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo 100 ml da solução de clorometilsilano (S4). O meio reacional foi deixado a seguir sob uma agitação igual a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 5 minutos.

[096] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com

água pura.

EXEMPLO 3

TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM AS ETAPAS (A), (A1), (B) E (C) DO PROCESSO DA PRESENTE INVENÇÃO

[097] Repetiu-se o mesmo protocolo operatório com a diferença que na última etapa (C) utilizou-se a solução de trimetilsililimidazol (S5) em vez da solução de clorometilsilano (S4).

EXEMPLO 4

TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM AS ETAPAS (A), (A1), (B) E DEPOIS (C) DO PROCESSO DA INVENÇÃO SEGUIDA DE UMA ETAPA ULTERIOR DE TRATAMENTO POR UMA SOLUÇÃO ANTICALCIFICANTE (STERILENT)

[098] Repetiu-se o protocolo operatório do exemplo 3, após do qual foi realizada a etapa seguinte.

[099] As amostras assim tratadas foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo 100 ml da solução (S6). O meio reacional foi deixado a seguir sob uma agitação igual a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 24 horas.

[0100] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

EXEMPLOS COMPARATIVOS

EXEMPLO COMPARATIVO 1

TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM A ETAPA (A) APENAS

[0101] O substrato foi tratado pela solução (S1) de glutaraldeído pelo menos um mês à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

[0102] No final desse tratamento, o substrato tratado foi cortado em quadrados de 7 mm de lado.

[0103] As amostras provenientes do substrato assim foram

enxaguadas 3 vezes com água pura e conservadas a seguir na solução (S1) até implantação em ratos.

EXEMPLO COMPARATIVO 1

TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM A ETAPA (A) SEGUIDA DE UMA ETAPA DE TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S6) DE STERILENTE

[0104] Repetiu-se o mesmo protocolo operatório que no exemplo comparativo 1, após o qual foi realizada a etapa seguinte.

[0105] As amostras assim tratadas pela solução (S1) de glutaraldeído foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo uma solução aquosa (S6) de 100 ml. O meio reacional foi deixado a seguir sob uma agitação igual a aproximadamente 50 rpm a aproximadamente 32°C durante aproximadamente 9 horas.

[0106] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

EXEMPLO COMPARATIVO 3

TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM A ETAPA (A) SEGUIDA E UMA ETAPA DE TRATAMENTO POR TETRAIDROFURANO

[0107] Repetiu-se o mesmo protocolo que exemplo comparativo 1, após o qual foi realizada a etapa seguinte.

[0108] As amostras assim tratadas pela solução (S1) de glutaraldeído foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo 100 ml de tetraidrofurano. O meio reacional foi deixado a seguir sob uma agitação igual a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 24 horas.

[0109] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

EXEMPLO COMPARATIVO 4**TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM A ETAPA (A) SEGUIDA DA ETAPA (C)****UTILIZANDO A SOLUÇÃO (S4)**

[0110] Repetiu-se o mesmo protocolo que exemplo comparativo 1, após o qual foi realizada a etapa seguinte.

[0111] As amostras assim tratadas pela solução (S1) de glutaraldeído foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo 100 ml da solução de clorometilsilano (S4). O meio reacional foi deixado a seguir sob uma agitação igual a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 5 minutos.

[0112] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

EXEMPLO COMPARATIVO 5**TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM A ETAPA (A) SEGUIDA DA ETAPA (C)****UTILIZANDO A SOLUÇÃO (S5)**

[0113] Repetiu-se o protocolo operatório do exemplo comparativo 4 substituindo a solução (S4) de clorometilsilano pela solução (S5) de trimetilsililimidazol.

EXEMPLO COMPARATIVO 6**TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM AS ETAPAS (A) E A SEGUIR (C)****UTILIZANDO A SOLUÇÃO (S5) SEGUIDA DE UMA ETAPA DE TRATAMENTO PELA****SOLUÇÃO (S6) DE STERILENTE.**

[0114] Repetiu-se o protocolo do exemplo comparativo 5, após o qual se realizou a etapa pura.

[0115] As amostras assim tratadas pela solução (S1) de glutaraldeído foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo 100 ml da solução (S6). O meio reacional foi deixado a seguir

sob uma agitação igual a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 24 horas.

[0116] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

EXEMPLO COMPARATIVO 7

TRATAMENTO DO SUBSTRATO DE ACORDO COM AS ETAPAS (A), (A1) E A SEGUIR (C)

UTILIZANDO A SOLUÇÃO (S4)

[0117] Repetiu-se o protocolo operatório do exemplo comparativo, após o qual passou às etapas seguintes.

- **TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S2) DE POLI(PROPILENOGLICOL)BIS(2-AMINOPROPILÉTER)**

[0118] As amostras assim tratadas foram introduzidos em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo 100 ml da solução (S2). A garrafa foi colocada sob agitação a aproximadamente 50 rpm durante aproximadamente 1 hora à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

[0119] Aproximadamente 5,76 g de ácido morfolinoetanossulfônico (MES) foram adicionados ao meio reacional. O meio reacional foi deixado sob agitação a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 23 horas.

[0120] O pH final do meio reacional foi de aproximadamente 6.

[0121] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

TRATAMENTO PELA SOLUÇÃO (S4) DE CLOROMETILSILANO

[0122] As amostras assim enxaguadas foram introduzidas em uma garrafa de seção retangular de 150 ml contendo 100 ml da solução de clorometilsilano (S4). O meio reacional foi deixado a seguir sob uma agitação igual a aproximadamente 50 rpm à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 5 minutos.

[0123] As amostras assim tratadas foram enxaguadas 3 vezes com água pura.

ESTUDO DA CALCIFICAÇÃO NO RATO

[0124] As amostras não tratadas ou tratadas provenientes dos exemplos descritos acima foram implantadas subcutaneamente em ratos recém-nascidos de 12 dias de idade.

[0125] Os ratos foram desmamados 9 dias após a implantação e submetidos a um regime composto de grânulos contendo aproximadamente 332 mg de cálcio, aproximadamente 236 mg de fósforo, aproximadamente 9,6 mg de ferro, aproximadamente 60 UI de Vitamina D3 por quilo de rato e um aporte hídrico livre.

[0126] Dez meses após a implantação, os ratos foram sacrificados e as amostras foram explantadas para ser analisadas.

[0127] As amostras foram depois lavadas com água pura, liofilizadas e pesadas (em peso seco em miligramas). As amostras liofilizadas foram digeridas em aproximadamente 1 ml de ácido nítrico a 70 % a aproximadamente 95°C durante aproximadamente 15 minutos. O volume do meio foi completado a seguir a aproximadamente 5 ml de água ultra pura em um balão volumétrico de 5 ml.

[0128] A dosagem de cálcio dessas amostras foi efetuada pelo espectrofotômetro atômico de emissão de chama. O cálcio assim dosado provém essencialmente do fenômeno de calcificação do implante.

[0129] Os resultados da dosagem de cálcio proveniente das amostras que foram submetidos ou não aos diferentes tratamentos estão resumidos na tabela a seguir.

Disco tratado com	Porcentagem de cálcio em relação ao peso total do disco
nenhum tratamento	9,75%

Exemplo 1	0,67%
Exemplo 2	0,07%
Exemplo 3	0,56%
Exemplo 4	0,49%
Exemplo comparativo 1	20,82%
Exemplo comparativo 2	1,67%
Exemplo comparativo 3	9,10%
Exemplo comparativo 4	1,09%
Exemplo comparativo 5	1,15%
Exemplo comparativo 6	1,33%
Exemplo comparativo 7	1,14%

Glut.=glutaraldeído

[0130] De acordo com os resultados indicados na tabela acima, o substrato tratado pelo cianoboroidreto de sódio seguido pelo tratamento por um derivado portador de um grupo silano, em particular o clorometilsilano ou o trimetilsililimidazol, diminui nitidamente o fenômeno de calcificação em relação tratamento com a solução comercial, op sterilent.

[0131] Além disso, se o implante for ainda tratado com um composto portador de pelo menos duas funções aminas, o poli(propilenoglicol)bis(2-aminopropiléter), então o fenômeno de calcificação é ainda menor.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE TRATAMENTO DE UM IMPLANTE, que comporta um substrato à base de proteínas, caracterizado por compreender as etapas em que:

(A) o substrato à base de proteínas é tratado com um composto portador de pelo menos um grupo aldeído, e a seguir

(B) o substrato é tratado com um composto que compreende um boroidreto, e a seguir

(C) o substrato proveniente da etapa (B) é tratado com um derivado portador de um grupo silano.

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo substrato à base de proteínas ser à base de colágeno, de elastina, de fibrina, de fibrinogênio e/ou de proteoglicano.

3. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo implante ser um implante valvular cardíaco, que inclui a totalidade ou parte de uma válvula aórtica e/ou de um pericárdio de origem bovina, porcina ou ovina.

4. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por se utilizar na etapa (A) um composto portador de pelo menos 2 grupos aldeídos.

5. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo composto que compreende um boroidreto utilizado na etapa (B) ser um derivado de um metal alcalino.

6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo composto que compreende um boroidreto empregado na etapa (B) ser o cianoboroidreto de sódio.

7. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo derivado portador de um grupo silano

utilizado na etapa (C) comportar um grupo eletroatrator ligado diretamente ao átomo de silício e escolhido entre os halogênios, os grupos heteroarilas que comportam de 5 a 15 átomos de carbono e 2 ou 3 heteroátomos escolhidos entre o grupo constituído pelos halogênios, os pnictogênios e os calcogênios.

8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo grupo eletroatrator presente no derivado portador de um grupo silano empregado na etapa (C) ser um átomo de cloro, um átomo de bromo ou um grupo imidazol.

9. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo derivado portador de um grupo silano utilizado na etapa (C) ser o trimetilsililimidazol ou o clorotrimetilsilano.

10. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por comportar uma etapa (A1) intermediária, situada entre as etapas (A) e (B), em que o substrato tal como obtido no final da etapa (A) é tratado com um composto portador de pelo menos 2 funções aminas antes da realização das etapas (B) e (C).

11. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo composto portador de pelo menos 2 funções aminas ser uma diamina de fórmula $\text{NH}_2\text{-A-NH}_2$ em que A representa uma cadeia hidrocarbonada linear ou ramificada que comporta de 1 a 20 átomos de carbono, eventualmente substituídos por um ou mais heteroátomos escolhidos no grupo constituído pelos halogênios, os pnictogênios e os calcogênios.

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo composto portador de pelo menos 2 funções aminas ser o poli(propilenoglicol)bis(2-aminopropiléter), a lisina, a espermina ou a putrescina.