



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

(11) PI 0419111-0 B1

(22) Data do Depósito: 06/10/2004

(45) Data de Concessão: 02/08/2016



(54) Título: PARAFUSO DE IMPLANTE ÓSSEO, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO E USO DO ÁCIDO HIALURÔNICO

(51) Int.Cl.: A61L 31/10

(73) Titular(es): NOBIL BIO RECERCHE S.R.L.

(72) Inventor(es): GIANLUCA GAZZA

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PARAFUSO DE IMPLANTE ÓSSEO, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO E USO DO ÁCIDO HIALURÔNICO"**.

A presente invenção refere-se a um dispositivo de implante no
5 osso, particularmente para prótese dentária e prótese ortopédica na coluna vertebral, provendo uma osteointegração mais rápida do que os dispositivos da técnica anterior.

Antecedentes da invenção

O uso de dispositivos de metal permanentemente implantáveis
10 no tecido do osso é difundido em vários ramos da medicina. Por exemplo, a cirurgia de implante dentário provê o uso de parafusos, geralmente feitos de titânio, na mandíbula inferior ou ossos do maxilar para artificialmente substituir as raízes de osso perdidas ou não mais funcionais. Na ortopedia, vários dispositivos para fixação de fratura, redução da mobilidade vertebral, cirurgia
15 da coluna vertebral são geralmente implantados no tecido do osso.

Nessas aplicações, o dispositivo implantado é firmemente mantido no local do implante devido ao crescimento, até o contato direto com o dispositivo, de tecido no osso recentemente formado. Esse fenômeno, que é conhecido como a osteointegração, tem sido amplamente estudado e descrito na literatura técnico-científica do setor, particularmente quando se refere à cirurgia de implante no osso por meio de dispositivos de titânio. Contrariamente aos outros processos de implantação de material estranho nos tecidos, que acarretam a encapsulação em um material fibroso, isto é, a integração da fibra, o crescimento do tecido no osso diretamente em contato
20 com o dispositivo oferece um apoio firme, que torna o dispositivo adequado para suportar as cargas e executar tarefas estruturais.

Embora as disciplinas baseadas na osteointegração estejam recentemente tendo grande sucesso e aplicações cada vez mais crescentes, vários problemas ainda permanecem para serem resolvidos. Particularmente,
30 te, é importante acelerar o processo de osteointegração tanto quanto possível, dessa maneira reduzindo o tempo entre a inserção do implante e a carga real sobre ele. Por exemplo, na odontologia, o implante geralmente não é

"carregado", dessa maneira o paciente não pode executar a sua função de mastigação por meio desse implante, por um período de tempo variando de 1 a 4 meses depois da intervenção, de modo a permitir a cura do tecido do osso e induzir a osteointegração. Além do mais, embora os ossos normalmente curem bem com pessoas saudáveis e jovens, a cura é freqüentemente muito lenta com pessoas idosas e com osteoporose, isto é, esses mais prováveis de necessitar dessas intervenções e sendo uma porção significativa de pacientes que precisam de operações de implante para trauma ou fixação da mobilidade espinhal.

10 Como é geralmente conhecido que as propriedades de superfície dos dispositivos de implante exercem uma função básica na resposta do tecido ao implante, um grande número de pesquisas tem sido executado para melhorar o processo de osteointegração modificando a superfície dos dispositivos implantáveis. Um quadro detalhado dessas pesquisas é apresentado no "The bone-biomaterial interface" por Puleo e Nancy, Biomaterials 15 1999; 20:2311-2321, ou o livro Bone Engineering, Davies, publicado por EM SQUARED, Toronto, 2000. A partir do estudo desses livros e a avaliação dos dispositivos sendo comercializados, é entendido que o aperfeiçoamento das propriedades de superfície é freqüentemente procurado por meio do en-
20 crespamento de superfície, por exemplo, por meio de jatos de areia, depósito de pulverização com plasma ou tratamentos com ácidos. O depósito de camadas de materiais cerâmicos com alta afinidade com o osso, tal como a hidroxiapatita ou o assim chamado biovidro, também tem sido estudado e aplicado.

25 Além desses métodos, surgiu um grande interesse na introdução na superfície dos dispositivos de implante de moléculas biológicas capazes de estimular o crescimento do osso. Entre as moléculas mais estudadas, tem sido relatado que o colágeno, quando imobilizado na superfície de um parafuso de titânio do implante, pode aumentar a velocidade da osteointe-
30 gração. Peptídios particulares, isto é, pequenos fragmentos moleculares compondo moléculas proteínicas, que são capazes de interagir particularmente com células do osso, também provaram ser efetivos quando testados

in vivo. Para essa finalidade, o artigo acima mencionado por Puleo e Nancy estuda as várias moléculas usadas para a execução da modificação bioquímica das superfícies do implante.

Embora a modificação bioquímica das superfícies do implante
 5 seja um setor de grande interesse científico e especulativo, sua aplicação prática ainda tem problemas consideráveis. O colágeno, por exemplo, tem problemas de contaminação quando ele se origina de fontes animais duvidosas (particularmente, colágeno bovino) ou rejeição devido a possíveis reações de incompatibilidade entre espécies diferentes. Os peptídios acima
 10 mencionados são um tanto onerosos e fracamente estáveis de um ponto de vista químico, tal que recorrer para os procedimentos típicos do setor, por exemplo a esterilização, no tratamento das superfícies de implante é dificilmente praticável.

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano difundido em todos
 15 os tecidos de seres vivos, sem qualquer variação entre as espécies. Ele tem características bioquímicas e de hidratação muito interessantes e por essa razão ele é amplamente estudado e usado em várias especialidades dentro do campo biomédico. Um resumo completo da aplicação do último é apresentado, por exemplo, em alguns trabalhos contendo as minutas das conferências principais sobre ácido hialurônico: "The Biology of Hyaluronan", D.
 20 Evered e J. Whelan, Eds. Wiley, Chichester, 1989, "The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives", T. C Laurent, Ed., Portland Press Ltd, Londres, 1998, "Redefining Hyaluronan", G. Abatangelo e P. H. Weigel, (Eds.), Elsevier, Amsterdã, 2000, "Hyaluronan", J. F.
 25 Kennedy, G.O. Phillips, P.A. Williams, V. Hascall, Eds., Woddhead Publishing Limited, 2002.

O ácido hialurônico, como uma molécula na fase homogênea, exerce uma função ativa no processo de formação do osso, tal como descrito, por exemplo, por Bernard e outros no trabalho acima mencionado "Redefining Hyaluronan", G. Abatangelo e P. H. Weigel, (Eds.), Elsevier, Amsterdã,
 30 2000, p. 215.

Por essa razão, têm sido usados com sucesso os géis com base

em ácido hialurônico embebidos de proteínas morfogenéticas do osso ou fatores de crescimento, nos testes de estimulação do osso. Além do mais, foi demonstrado que as soluções de ácido hialurônico, opcionalmente unidas com o fármaco dexametasona tendo propriedades osteogênicas, exercem
5 um efeito positivo na especialização das células do osso das células estromal da medula, tal como descrito por Zou e outros, *Biomaterials*, 2004; 5375-5385, 25.

Entretanto, a potencialidade osteogênica interessante do ácido hialurônico, tanto como um gel quanto em solução, ou o ácido hialurônico
10 presente nos tecidos não pode ser imediatamente usado nos dispositivos de implantação de tecido no osso como descrito acima. Na realidade, o ácido hialurônico é muito solúvel em soluções aquosas e seu tempo de permanência *in situ* é muito curto. Técnicas químicas que favorecem a permanência do ácido hialurônico no local do implante, tais como reticulação, modificação
15 química ou imobilização de superfície, podem alterar a estrutura e a conformação molecular do ácido hialurônico e afetar negativamente as interações específicas de receptor-ligante, dessa maneira comprometendo o comportamento bioativo da molécula. Na realidade, as propriedades bioativas do ácido hialurônico derivam da sua capacidade de interagir com receptores
20 específicos localizados na parede da célula, tal como CD44 ou RHAMM. Tal como descrito por J. Lesley e outros, *J Biol Chem.* 1 de set de 2000; 275(35):26967-75, esse tipo de interação é altamente cooperativo e, de modo a ser efetivo, exige a interação simultânea de muitas repetições do ácido hialurônico com um único receptor. A natureza cooperativa da interação im-
25 plica na mobilidade típica das moléculas na solução, portanto a imobilização do ácido hialurônico nas superfícies do material, tal como descrito por Morra e Cassinelli, *Journal of Biomaterials Science*, Edição de Polímero, 1999; 10(10):1107-24, leva a superfícies que não permitem qualquer adesão da célula devido à incapacidade de estabelecer interações específicas sendo
30 suficientemente fortes. A adesão reduzida das células ou biomoléculas em superfícies com ácido hialurônico imobilizado é confirmada em vários artigos de literatura científica e é usada, como apresentado por Witt e outros, "Hya-

luronan", J. F. Kennedy, G. O. Phillips, P.A. Williams, V. Hascall, Eds., Wodhead Publishing Limited, 2002, volume 2, p. 27, para reduzir os fenômenos de adesão subseqüentes às operações cirúrgicas. A imobilização do ácido hialurônico em substratos de metal e dispositivos foi relatada por Pitt e outros, no artigo : "Attachment of hyaluronan to metallic surfaces", emitido no Journal of Biomedical Materials Research, vol. 68, p. 95, 2004. De acordo com o conhecimento geral, tal como descrito acima, no artigo citado as superfícies com o ácido hialurônico imobilizado sobre elas são projetadas como sendo "biopassivas" ou com fraca adesão de célula. Os autores do artigo evidenciam como a fraca adesão biológica concedida pela camada de ácido hialurônico imobilizado pode ser usada para prevenir a adesão não específica; e como, para obter um efeito de bioadesão específico, é necessário unir peptídios de adesão nessa matriz não-adesiva.

Essencialmente, é geralmente reconhecido que as camadas de ácido hialurônico imobilizadas nas superfícies sólidas têm características de resistência à adesão biológica, o que é contrário ao que alguém desejaria obter por meio da ação bioativa do ácido hialurônico imobilizado nos dispositivos de implantação, em que a adesão específica da célula do implante no tecido do osso é crucial para a osteointegração.

É também reconhecido que o processo de neoformação do osso exige uma etapa de estimulação da mineralização pela união dos íons de cálcio na superfície. Como descrito por Bernard e outros no trabalho acima mencionado, o ácido hialurônico, por natureza, tem um efeito ativo nessa etapa, dessa maneira significativamente contribuindo para o processo de calcificação. Os grupos carboxilato do ácido hialurônico podem, na realidade, formar quelantes ou complexo dos íons de cálcio exercendo uma ação positiva no processo de mineralização. Entretanto, a imobilização do ácido hialurônico na superfície dos dispositivos de implante normalmente implica na união dos grupos carboxílicos de ácido hialurônico com funcionalidades amínicas ou de hidroxila presentes no substrato, com a perda conseqüente, no ácido hialurônico unido, dos grupos carboxílicos sendo disponíveis para quelação com os íons de cálcio. Dessa maneira, a imobilização do ácido hia-

lurônico na superfície desses dispositivos pelos métodos conhecidos não leva a qualquer aperfeiçoamento no processo de osteointegração.

Por outro lado, o presente requerente verificou surpreendentemente que o ácido hialurônico imobilizado em parafusos de implante, de acordo com o que é apresentado nas reivindicações anexas, tem um efeito ativo no processo de osteointegração *in vivo*, sem qualquer exigência de imobilização de peptídio adicional, e que as propriedades desses dispositivos sendo implantáveis pelo contato no tecido do osso tendo uma camada de ácido hialurônico imobilizado de acordo com a invenção são definitivamente aperfeiçoadas comparadas com os dispositivos convencionais.

Descrição da invenção

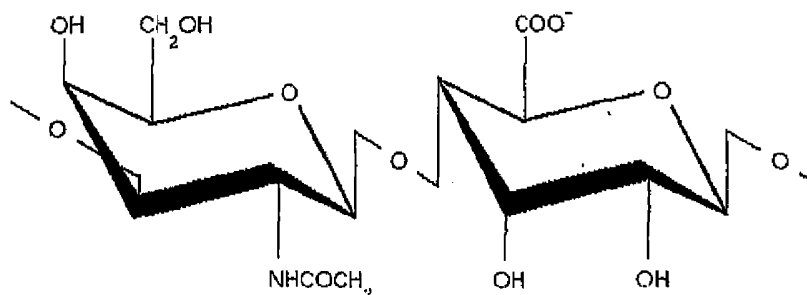
Na sua modalidade mais ampla, a presente invenção refere-se a um dispositivo de implante no tecido do osso (definido como o "dispositivo de implante" aqui abaixo), de natureza de metal ou polímero, uma camada de ácido hialurônico sendo quimicamente unida na sua superfície, tal como definido na reivindicação 1 anexa. Nenhuma limitação foi estabelecida quanto à forma ou natureza do dispositivo, com a condição que ele seja destinado a aplicações provendo o crescimento do tecido do osso em contato com ele ou, de forma geral, a estimulação do crescimento do tecido do osso.

Em uma modalidade particularmente vantajosa dessa invenção, o dispositivo consiste em um parafuso de implante dentário, de preferência feito de titânio ou ligas do mesmo, ou um parafuso, de preferência feito de titânio ou ligas do mesmo, para fixação na espinha ou esqueleto, ou de um disco intervertebral, de preferência feito de titânio, ligas do mesmo ou ligas de cobalto-cromo ou ligas de metal geralmente usadas com essas aplicações, ou uma gaiola, de preferência feita de titânio ou ligas do mesmo.

Uma camada fina de ácido hialurônico, de preferência de 0,5 a 10000 nm, mais preferivelmente 1 a 1000 nm, ainda mais preferivelmente 1,5 a 100 nm, é imobilizada na superfície dessas ligas.

O processo de imobilização do ácido hialurônico em um dispositivo de implante de acordo com a invenção provê a introdução de grupos funcionais amina na superfície do dispositivo e a ligação conseqüente do

ácido hialurônico nos ditos grupos amina por meio da funcionalização dos grupos hidroxila do ácido hialurônico. O ácido hialurônico é, na realidade, um mucopolissacarídeo de um peso molecular compreendido entre 50.000 e 8.000.000, em que estão presentes repetições da fórmula:



5 contendo grupos álcool primário que podem ser facilmente funcionalizados.

Dessa maneira, um objetivo da presente invenção é um dispositivo de implante compreendendo uma cobertura de substrato tendo grupos amina, em que o ácido hialurônico é unido no dito substrato pela funcionalização dos grupos hidroxila do dito ácido hialurônico.

10 O substrato contendo os grupos amina pode ser acomodado na superfície do dispositivo de implante de acordo com os métodos amplamente conhecidos no campo. A técnica provendo a introdução do substrato tendo grupos funcionais amina na superfície do dispositivo de implante por meio do depósito de plasma de moléculas contendo grupos amina é particularmente

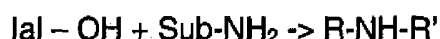
15 vantajosa. Exemplos típicos de moléculas sendo usados para a finalidade são alilamina, alquilamina tal como hexil- ou heptil-amina e, geralmente, as moléculas orgânicas com funcionalidade de amina tendo as características requeridas de volatilidade na fase do plasma. O depósito do plasma da amina é executado nas condições seguintes: pressão compreendida entre 80 e

20 300 mTorr, potência de entrada compreendida entre 5 e 200 W, tempo de depósito compreendido entre 1 ms e 300 s. O depósito do plasma pode também acontecer em condições de plasma pulsado, com ciclos de plasma ativo e inativo compreendidos entre 1 e 100 ms, para minimizar a fragmentação molecular e manter a maior densidade possível dos grupos amina. O trata-

25 mento do depósito de plasma da amina pode ser precedido por outros tratamentos por plasma, por exemplo, ar ou plasma de oxigênio para limpar a

superfície e aumentar a adesão no substrato.

O ácido hialurônico pode ser unido na camada de amina por solução solvente aquosa ou adequada tal como dimetilsulfóxido ou mistura desse com água, dimetilformamida ou mistura dessa com água, N-metil pirrolidona ou mistura dessa com água, pelos métodos conhecidos na técnica para a funcionalização dos grupos hidroxila e particularmente para a substituição de um grupo de hidroxila com uma ligação do tipo de amina:



em que Ial é o resíduo do ácido hialurônico e Sub é o resíduo do substrato tendo funcionalidades de amina. Do que foi declarado acima, é entendido que o processo da invenção pode prover a funcionalização de todos os grupos de hidroxila reativos do ácido hialurônico bem como somente alguns deles, de acordo com a reação sendo utilizada e as condições de reação sendo aplicadas de caso a caso. Entretanto, é necessário e suficiente que a reação de funcionalização dos grupos hidroxila do ácido hialurônico leve à formação de uma camada de ácido hialurônico sendo unida com uma cobertura fracionária, isto é, a porção de superfície coberta pelo ácido hialurônico, maior do que 0,6, quando avaliado por meio da espectroscopia fotoeletrônica de raio X, conhecida pelo acrônimo XPS ou ESCA. O método de teste é relatado no artigo por Marco Morra e Clara Cassinelli: "Simple model for the XPS analysis of polysaccharide-coated surfaces", emitido na revista Surface and Interface Analysis, 26, 742-746 (1998).

A reação de funcionalização dos grupos hidroxila do ácido hialurônico com a amina do substrato pode ser executada de acordo com vários métodos conhecidos para aqueles versados na técnica, tais como os seguintes (sendo listados por meio de exemplos não-exaustivos):

- ativação do grupo hidroxila pela formação de mesilatos, tosila-
tos ou grupos de saída similares, por exemplo, pela reação do ácido hialurônico com cloreto de mesila ou tosila, e a reação subsequente dos grupos de hidroxila ativados com a amina;

- substituição do grupo hidroxila com um halo, tal como cloro, bromo ou iodo, por exemplo, pela reação do ácido hialurônico com cloreto de

tionila ou tetrabrometo de carbono e trifenilfosfina e uma reação subsequente do ácido hialurônico halogenado com a amina;

- reação Mitsunobu do ácido hialurônico com amina, na presença de dietilazadicarboxilato e trifenilfosfina;

- 5 - oxidação dos grupos hidroxila primários para aldeídos e amina-
ção redutora subsequente.

Entre os métodos citados acima, a trajetória sintética provendo a oxidação dos grupos hidroxila do ácido hialurônico para aldeído e a amina-
ção redutora subsequente do assim formado aldeído deve ser preferida.

- 10 A reação de oxidação do grupo álcool primário para aldeído po-
de ser executada usando qualquer agente de oxidação seletivo de um grupo
álcool, tal como trióxido de cromo ou periodato de sódio ou potássio. Perio-
dato de sódio é o reagente preferido nessa reação.

- Os grupos aldeído assim formados reagem com os grupos ami-
na da alquil- ou alil-amina pela aminação redutora na presença de um agen-
te de redução adequado, tal como por meio de exemplo não-limitador: hidro-
gênio na presença de um catalisador adequado tal como níquel Raney ou
PtO₂; alumínio, amálgama de alumínio ou Al/HgCl₂; boranos tais como de-
caborano; cianoboroidreto de sódio ou um boroidreto imobilizado na resina
20 para síntese da fase sólida, tal como MP-cianoboroidreto, MP-
triacetoxiboroidreto na presença de um purificador adequado tal como por
exemplo PS-isocianato, PS-benzaldeído ou MP-TsOH.

Um reagente preferido para a aminação redutora é cianoboroi-
dreto de sódio.

- 25 As condições de reação utilizadas para a oxidação do grupo hi-
droxila para aldeído e para a aminação redutora do aldeído são essas nor-
malmente utilizadas nesses tipos de reação, tais como exemplificados na
seção experimental abaixo.

- A vantagem de funcionalizar os grupos hidroxila do ácido hialu-
rônico ao invés dos grupos carboxila é que esse método permite deixar os
30 grupos carboxila totalmente disponíveis para a interação com os íons de cálcio,
dessa maneira maximizando a atividade do ácido hialurônico da estimu-

lação da mineralização do osso.

De acordo com uma modalidade preferida da invenção, além da camada de ácido hialurônico unida, o dispositivo de implante pode compreender fármacos liberáveis ou agentes bioativos que são capazes de estimular o crescimento do tecido do osso. Nessa modalidade, o dispositivo será em primeiro lugar revestido, de preferência, com um polímero ou camada de cerâmica que é capaz de abranger, absorver ou adsorver ao fármaco ou ingrediente bioativo, em cuja camada o ácido hialurônico será então imobilizado de acordo com as técnicas descritas acima.

Entre os fármacos ou princípios bioativos sendo utilizados de acordo com a presente invenção, particularmente favorecidos são esses exercendo uma função como estimuladores de crescimento do osso. Entre eles, o fármaco dexametasona, o fosfato de dexametasona ou forma solúvel do acetato do mesmo, a vitamina D nas suas várias formas, fatores de crescimento, a família de proteínas conhecidas como as proteínas morfogenéticas do osso, moléculas do tipo polissacarídeo tais como eparina, sulfato de condroitina e ácido hialurônico são particularmente preferidas.

Além da ausência da toxicidade inerente, não existe limite químico quanto à natureza da camada englobando o fármaco ou ingrediente bioativo, a sua composição pode ser adaptada às características do fármaco ou princípio bioativo e a liberação cinética desejada. Exemplos não exaustivos são polímeros de silicone, olefina, tipo acrílico tal como polimetildissiloxano, polimetilmetacrilato de polibutadieno, polietilmetacrilato, polibutilmetacrilato, poliuretanos, polímeros fluorados, poliésteres, acrilatos hidrofílicos tais como polihidroxietilmetacrilato ou polihidroxibutilmetacrilato; a camada de cerâmica opcional pode consistir em cerâmicas inertes com base em alumina ou silicato ou silico-aluminato, ou cerâmicas bioativas tais como fosfatos de cálcio ou hidroxiapatita. Essa camada pode ser na forma compacta ou porosa, de acordo com o que é exigido pelo controle cinético da liberação.

As camadas de polímero ou cerâmica podem ser depositadas de acordo com as técnicas convencionais, por imersão, pulverização, tanto por

pistola de pulverização convencional quanto pulverização ultra-sônica, pelo depósito da fase de vapor ou plasma. No caso das camadas de cerâmica, a técnica de sol-gel pode também ser usada.

O fármaco ou o ingrediente ativo será depositado, englobado, absorvido ou adsorvido na camada de suporte de acordo com técnicas convencionais, tais como pulverização de soluções comuns, suspensões, emulsões ou por processos comuns de imersão em solução, suspensões, emulsões.

Dentro do espírito da presente invenção, a camada englobando o fármaco ou o ingrediente ativo será, por sua vez, modificada pelo depósito de um substrato transportando grupos amina e ligação covalente subsequente do ácido hialurônico no dito substrato, de acordo com o esquema descrito acima. Por exemplo, depois de ter aplicada a camada englobando o fármaco ou ingrediente ativo, é executado um processo de depósito do plasma de alilamina ou alquilamina, ácido hialurônico na solução aquosa sendo então ligada nele. A liberação opcional e a perda do fármaco nessa etapa serão equilibradas por uma overdose medida inicial, englobando um excesso de fármaco ou ingrediente bioativo na matriz de polímero ou cerâmica. Esse excesso será geralmente até 30% da quantidade estequiométrica, mais preferivelmente até 10% da quantidade estequiométrica.

Como será entendido a partir dos testes experimentais relatados aqui abaixo, foi verificado surpreendentemente que, contrário ao que teria sido esperado de acordo com os dados de literatura, o ácido hialurônico imobilizado em um dispositivo de implante implantado no osso executa uma ação osteointegrativa marcante. Portanto, é um objetivo adicional da presente invenção usar o ácido hialurônico para preparar um dispositivo de implante em contato com o osso, em que o dito ácido hialurônico é imobilizado na superfície do dito dispositivo de implante, tal como o agente de estimulação da osteointegração.

30 SEÇÃO EXPERIMENTAL

Exemplo 1

Amostras de titânio com uma camada de ácido hialurônico imo-

bilizado

Três amostras de titânio a 99,7% (Sigma-Aldrich), na forma de quadrados de 1 cm de lado, são submetidas a um processo de depósito com plasma de alilamina, pelo uso de um reator Gambetti Kenologia para o tratamento com plasma. Particularmente, o processo de depósito é executado pelo plasma pulsado, usando ciclos de 10 ms, na pressão de 100 mTorr. A potência de entrada é 50 W, o tempo de tratamento é 30 s. No fim do tratamento, o parafuso é imerso em uma solução de ácido hialurônico pré-tratada, em 0,5% de concentração de água. O ácido hialurônico é fabricado por Lifecore Biomedical, Chaska, Minnesota, USA e é identificado pelo lote nº B22157. A solução aquosa do ácido hialurônico tinha sido pré-tratada por 16 horas em tampão de fosfato com periodato de sódio ($16 \text{ mg}/100 \text{ cm}^3$) e misturada, com a reação, com um volume igual de tampão acético contendo $1 \text{ mg}/\text{cm}^3$ de cianoboroidreto de sódio. As amostras são mantidas na solução durante a noite, a seguir lavadas com água e secas sob uma capela de fluxo laminar.

Exemplo

Avaliação da não-adesividade da célula das amostras

As três amostras do exemplo 1, junto com três amostras similarmente dimensionadas de titânio não modificado são submetidas a testes de adesão de célula com células do tipo osteoblásticas (MG-63), sendo supridas por Brescia Institute de Zooprophyllaxis. As células, sendo cultivadas de acordo com os métodos tradicionais, são semeadas em duas amostras modificadas com ácido hialurônico e dois controles consistindo de titânio não modificado. Depois de uma cultura de 3 dias, as amostras são delicadamente lavadas com tampão de fosfato, as células aderidas são removidas com tripsina e contadas com um hemocítômetro. Os resultados seguintes são obtidos:

Amostra	Nº de células (desvio médio e padrão)
Controle	$3,4 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^5$
Revestida com HA	$1,1 \times 10^3 \pm 0,8 \times 10^3$

Os dados confirmam a redução considerável do número de células

las presentes na superfície sendo modificada pelo ácido hialurônico, de acordo com os dados de literatura sendo citados acima.

Exemplo 3

Parafusos de titânio com camada de ácido hialurônico imobilizado

- 5 O experimento do exemplo 1 é repetido em um parafuso de implante de titânio fabricado por Agliati s.r.l. O parafuso é testado pela espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS), uma técnica de teste de superfície capaz de prover a composição química de uma camada de superfície do material até aproximadamente 8 nm de profundidade. Os resultados seguintes são obtidos (os dados são expressos em % atômica):

C	O	N	Outros < 1%
70,5	18,1	10,1	Si, S, P

A estequiometria observada, particularmente a presença de nitrogênio e as razões de C/O e C/N, é consistente com a presença de uma camada de superfície fina do ácido hialurônico, tal como esperado pela tipologia da reação de ligação e de acordo com os dados de literatura.

15 Exemplo 4

Confirmação *in vivo* das características de osteointegração aperfeiçoadas

- Para avaliar as características *in vivo* dos dispositivos implantáveis de titânio obtidos de acordo com a invenção, vários testes em coelhos são executados. Particularmente, parafusos de 2 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento são implantados no osso cortical do diáfise femoral de 10 coelhos adultos, para um total de 10 parafusos revestidos e 10 controles não revestidos. Os animais são sacrificados depois de quatro semanas e os fêmures são preparados para exame histológico e testes mecânicos. Particularmente, os parâmetros medidos são:

- 25 - o índice de afinidade, isto é, a razão de comprimento do osso diretamente oposto à interface, sem a intervenção do tecido fibroso, e o comprimento total da interface, multiplicado por 100.

- o crescimento do osso, isto é, a razão de porcentagem da área cheia com osso e a área total envolvida entre o parafuso e os vértices de um pináculo, tal como observado na seção de exame histológico.
- 30

Além do mais, por meio de uma máquina de teste de retirada, a força máxima requerida para extrair o parafuso do osso é medida (força de retirada).

Os resultados seguintes são obtidos:

Parâmetro		Parafuso	
		Não-revestido	Revestido com ácido hialurônico
índice de afinidade (%)	Desvio médio	55,0	69,7
	Padrão	5,2	2,9
	(Min-Máx)	(42,7 – 66,9)	(62,3 – 80,3)
crescimento do osso (%)	Desvio SEM médio	84,5	91,0
	Padrão	3,3	0,7
	(Min-Máx)	(70,1 – 88,8)	(89,7 – 93,7)
força de retirada (N)	Desvio médio	185,3	232,2
	Padrão	10,7	18,4
	(Min-Máx)	(130,6 – 185,6)	(197,3 – 299,5)

- 5 Ambos os dados histomorfométricos e os testes mecânicos indicam claramente que os parafusos revestidos com o ácido hialurônico, implantado no osso, não exercem o efeito biopassivo e antiadesivo como teria sido esperado de acordo com o conhecimento atual sobre ácido hialurônico imobilizado, mas eles definitivamente melhoraram, de maneira surpreendente, as características de osteointegração comparadas com os parafusos não-revestidos.
- 10

Exemplo 5

Parafuso de titânio com uma camada para liberação de fármaco e imobilização do ácido hialurônico sobre ele

- 15 Vários parafusos de titânio são inicialmente submetidos a um processo de depósito com plasma de propeno, pelo uso do reator descrito no exemplo 1. Subseqüentemente, os parafusos são revestidos com uma camada de polímero fina e com dexametasona, usando uma pistola de pul-

verização (Conrad-Bartoli), carregada com a seguinte solução:

0,5% de polibutímetacrilato e 0,1% de dexametasona (ambos supridos por Sigma Aldrich) em uma mistura de 50-50 de acetona e álcool metílico.

- 5 Os parafusos assim obtidos são submetidos ao processo descrito nos exemplos 1 e 3, dessa maneira provendo um parafuso de titânio combinando as características de liberação de um fármaco de estimulação de crescimento do osso e tendo uma superfície bioativa revestida com ácido hialurônico.

10 Exemplo 6

Liberação de dexametasona de um dispositivo de titânio com uma camada imobilizada de ácido hialurônico

- Um parafuso obtido tal como descrito no exemplo 5 é mergulhado em 2 cm³ de solução salina e mantido em uma incubadora em 37°C. Em dados momentos, a solução é retirada e o espectro de absorvência de UV-Vis é medido em 242,4 nm, que é o comprimento de onda de absorvência máximo da dexametasona. A curva de liberação é obtida como uma função do tempo, como mostrado na figura 1.

- O dispositivo de implante no tecido do osso assim obtido é então capaz de reunir a liberação de um fármaco afetando o processo de formação do osso na bioatividade da superfície revestida com ácido hialurônico sendo descrita acima.

- Entre as variações possíveis que podem ser providas para o dispositivo de implante sem se afastar do escopo da presente invenção, existem dispositivos de implante feitos de materiais diferentes de titânio, suas ligas ou cobalto-cromo, tais como por exemplo aço inoxidável comum. Isso é permitido pelo efeito osteointegrador particular obtido com os dispositivos da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Parafuso de implante ósseo de uma natureza de metal ou polímero, caracterizado pelo fato de que compreende uma cobertura de um substrato tendo grupos amina, e uma camada de ácido hialurônico, onde o
5 ácido hialurônico é unido no dito substrato pela funcionalização dos grupos hidroxila do dito ácido hialurônico.

2. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito parafuso é um parafuso de implante dentário ou um parafuso de fixação na espinha ou esqueleto..

10 3. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os ditos parafusos são feitos de titânio ou ligas dos mesmos.

4. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito substrato tendo grupos amina compre-
15 ende unidades de alilamina ou de alquilamina, de preferência selecionadas de hexil- ou heptil-amina.

5. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 1 ou 4, caracterizado pelo fato de que a camada do dito ácido hialurônico tem uma espessura compreendida entre 0,5 e 10000 nm.

20 6. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 1 ou 4, caracterizado pelo fato de que a camada do dito ácido hialurônico tem uma espessura compreendida entre 1 e 1000 nm.

7. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 1 ou 4, caracterizado pelo fato de que a camada do dito ácido hialurônico tem
25 uma espessura compreendida entre 1,5 e 100 nm.

8. Parafuso de implante ósseo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a camada do dito ácido hialurônico tem uma cobertura fracionária maior do que 0,6, avaliada por meio da técnica de espectroscopia fotoeletrônica de raios X.

30 9. Parafuso de implante ósseo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o dito parafuso também compreende fármacos liberáveis ou agentes bioativos que são capazes de

estimular o crescimento do tecido no osso.

10. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os ditos fármacos ou agentes bioativos são englobados, adsorvidos ou absorvidos em uma camada biodegradável ou solúvel em água.

11. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita camada biodegradável é feita de ácido hialurônico, ácido hialurônico reticulado ou derivados de ácido hialurônico, tais como ésteres de ácido hialurônico totais.

12. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que os referidos fármacos ou agentes bioativos são englobados, absorvidos ou adsorvidos em uma camada de polímero ou cerâmica.

13. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito substrato no qual o ácido hialurônico é imobilizado é depositado na dita camada de polímero ou cerâmica na qual o dito fármaco ou ingrediente bioativo é englobado, absorvido ou adsorvido.

14. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o dito fármaco ou fármaco bioativo é selecionado de dexametasona, o fosfato de dexametasona ou formas solúveis de acetato do mesmo, a vitamina D nas suas várias formas, fatores de crescimento, a família de proteínas conhecidas como as proteínas morfogenéticas do osso, moléculas do tipo polissacarídeo tais como heparina, sulfato de condroitina e ácido hialurônico.

15. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito substrato de polímero compreende polímeros de silicone, do tipo de olefina ou acrílico, que são preferivelmente selecionados de polimetildissiloxano, polibutadieno, polimetilmetacrilato, polietilmetacrilato, polibutilmetacrilato, poliuretanos, polímeros fluorados, poliésteres, poliacrilatos hidrofílicos preferivelmente selecionados de polihidroxietilmetacrilato ou polihidroxibutilmetacrilato.

16. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a dita camada de cerâmica compreende cerâmicas inertes com base em alumina, silicato ou silico-aluminato ou cerâmicas bioativas tais como fosfatos de cálcio ou hidroxiapatita.

5 17. Parafuso de implante ósseo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a dita camada de cerâmica está na forma compacta ou porosa.

18. Processo para a preparação de um parafuso de implante ósseo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracteri-
10 zado pelo fato de que compreende as etapas de:

- prover um parafuso de implante ósseo de metal ou polímero;
- revestir a superfície do dito parafuso de implante ósseo com um substrato tendo grupos amina;
- unir o ácido hialurônico nos grupos amina do dito substrato pe-
15 la funcionalização dos grupos hidroxila do dito ácido hialurônico.

19. Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de revestir a superfície do dito parafuso de im-
plante ósseo com um substrato tendo grupos amina compreende as etapas
de:

- 20 - selecionar uma amina tendo características de volatilidade na fase do plasma;
- depositar a dita amina na fase do plasma na superfície do dito parafuso de implante ósseo tal como para criar uma camada de substrato contendo grupos amina que podem ser funcionalizados.

25 20. Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito depósito com plasma da amina é executado nas condições seguintes: pressão compreendida entre 80 e 300 mTorr, potência de entrada compreendida entre 5 e 200 W, tempo de depósito compreendido entre 1 ms e 300 s.

30 21. Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o dito depósito com plasma da amina é executado em condições de plasma pulsado, com ciclos de plasma ativo e inativo compreendi-

dos entre 1 e 100 ms.

22. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento de depósito com plasma da amina é precedido pelo tratamento com ar ou plasma de oxigênio para limpar a superfície e aumentar a adesão no substrato.

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, caracterizado pelo fato de que a dita amina é selecionada de alilamina, hexilamina e heptilamina.

24. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de ligar o ácido hialurônico nos grupos amina do dito substrato pela funcionalização dos grupos hidroxila do dito ácido hialurônico compreende as etapas de:

- seletivamente oxidar grupos álcool ácido hialurônico nos grupos aldeído;
- unir os ditos grupos aldeído do ácido hialurônico nos ditos grupos amina do substrato pela aminação redutora.

25. Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de oxidação seletiva dos grupos hidroxila nos grupos aldeído é executada na presença de periodato de sódio.

26. Processo de acordo com a reivindicação 24 ou 25, caracterizado pelo fato de que a dita reação de aminação redutora é executada na presença de cianoboroidreto de sódio.

27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, caracterizado pelo fato de que o dito ácido hialurônico é unido por uma solução aquosa ou solução de solvente adequada tal como dimetilsulfóxido ou misturas desse com água, dimetilformamida ou mistura dessa com água, N-metil pirrolidona ou misturas dessa com água.

28. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 27, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- prover um parafuso de implante ósseo de metal ou de polímero;
- revestir a superfície do dito parafuso de implante ósseo com

uma camada de polímero ou de cerâmica;

- englobar, absorver ou adsorver na dita camada de polímero ou de cerâmica, um fármaco liberável ou ingrediente bioativo que é capaz de estimular o crescimento do tecido no osso;

5 - depositar um substrato tendo grupos amina na dita camada de polímero ou de cerâmica na qual o dito fármaco ou composto bioativo é englobado, absorvido ou adsorvido;

- unir o ácido hialurônico nos grupos amina do dito substrato pela funcionalização dos grupos hidroxila do dito ácido hialurônico.

10 29. Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de revestir a superfície do dito parafuso de implante ósseo com uma camada de polímero ou de cerâmica é executada por imersão, pulverização por ambas pistola de pulverização convencional e pulverização ultra-sônica, depósito da fase de vapor ou plasma, ou, no caso de
15 camadas de cerâmica, de acordo com a técnica de sol-gel.

30. Processo de acordo com a reivindicação 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que o dito fármaco ou princípio bioativo é englobado, absorvido ou adsorvido na dita camada de polímero ou de cerâmica pela pulverização de soluções comuns, suspensões, emulsões ou por meio de processos de imersão em soluções comuns, suspensões, emulsões.
20

31. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 30, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de englobar, absorver ou adsorver um fármaco ou ingrediente bioativo na dita camada de polímero ou de cerâmica é executada na presença de um excesso de fármaco ou ingrediente bioativo até 30% da quantidade estequiométrica, de preferência até
25 10% da quantidade estequiométrica.

32. Parafuso de implante ósseo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que é obtível por meio do processo como definido em qualquer uma das reivindicações 18 a
30 31.

33. Uso do ácido hialurônico para a preparação de um parafuso de implante ósseo capaz de estimular a osteointegração, caracterizado pelo

fato de que o dito ácido hialurônico é imobilizado no dito parafuso de implante ósseo pela funcionalização dos grupos hidroxila do dito ácido hialurônico, e unindo o dito ácido hialurônico funcionalizado aos grupos amina de um substrato depositado na superfície do dito parafuso.

- 5 34. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito parafuso é como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

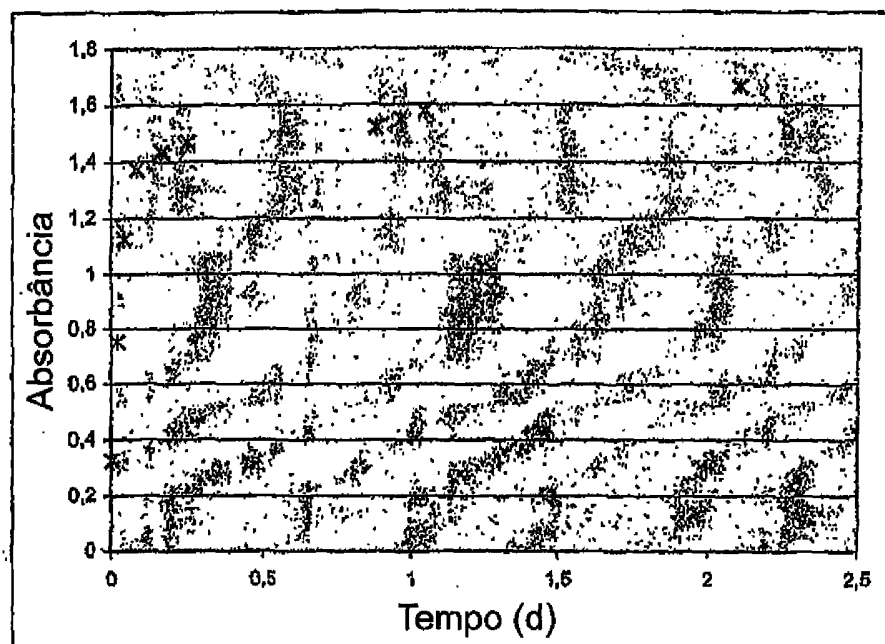


FIG 1

RESUMO

Patente de Invenção: **"PARAFUSO DE IMPLANTE ÓSSEO, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO MESMO E USO DO ÁCIDO HIALURÔNICO"**.

5 A presente invenção refere-se a um dispositivo de implante no osso, particularmente para prótese dentária e ortopédica na coluna vertebral, tendo uma osteointegração mais rápida comparada com os dispositivos da técnica anterior. Particularmente, a presente invenção refere-se a um dispositivo de implante, de natureza de metal ou polímero, uma camada de ácido hialurônico sendo quimicamente unida na sua superfície, para uso em apli-
10 cações em contato com o osso, com atividade de estimulação de crescimento do tecido no osso, bem como um processo para a preparação do mesmo.