

**(12) PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2015.06.30</b>	(73) Titular(es): <b>UNIVERSIDADE DO MINHO LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA</b>	<b>PT</b>
(30) Prioridade(s):		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2016.12.30</b>	(72) Inventor(es): FRANCISCO MIGUEL PORTELA DA GAMA ISABEL SOFIA MELO PEREIRA ALEXANDRA MARIA MACHADO NOGUEIRA MARTINS RODRIGUES ANA CATARINA MACHADO NOGUEIRA MARTINS RODRIGUES MANUELA MARIA CALDAS DE OLIVEIRA	<b>PT PT PT PT PT PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: /	(74) Mandatário: LUÍS HUMBERTO SILVESTRE DE ALMEIDA FERREIRA EDIFÍCIO NET, RUA DE SALAZARES 842 4149-002 PORTO	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÕES DE HIDROGEL DE DEXTRINO PARA A REGENERAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS E NÃO-UNIÕES DE FRATURAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO CONSISTE EM FORMULAÇÕES, À BASE DE HIDROGEL DE DEXTRINO, QUE SERVEM DE MATRIZ DE SUPORTE E VEÍCULO DE SUBSTITUTO ÓSSEOS GRANULARES PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA. ESPECIFICAMENTE, ESTA INVENÇÃO CONSISTE EM HIDROGÉIS INJETÁVEIS E BIORREABSORVÍVEIS, DE PREPARAÇÃO IN SITU, OS QUAIS ATUAM COMO UM SUPORTE TRIDIMENSIONAL (SCAFFOLD) PARA A COLONIZAÇÃO CELULAR. A REFERIDA FORMULAÇÃO CONTEM GRANULADOS BIOATIVOS OSTEOGÉNICOS (CERÂMICOS BIOATIVOS) À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO, HIDROXIAPATITE OU MISTURA DE AMBOS, QUE ATUAM COMO AGENTES OSTEOCONDUTORES, PERMITINDO ASSIM O CRESCIMENTO E REGENERAÇÃO TECIDUAL ÓSSEA, FUNCIONANDO A CONJUGAÇÃO HIDROGEL-CERÂMICO COMO UM SUBSTITUTO ÓSSEO INJETÁVEL.

## R E S U M O

### **Formulações de hidrogel de dextrino para a regeneração de defeitos ósseos e não-uniões de fraturas**

A presente invenção consiste em formulações, à base de hidrogel de dextrino, que servem de matriz de suporte e veículo de substituto ósseos granulares para regeneração óssea. Especificamente, esta invenção consiste em hidrogéis injetáveis e biorreabsorvíveis, de preparação *in situ*, os quais atuam como um suporte tridimensional (scaffold) para a colonização celular. A referida formulação contém granulados bioativos osteogênicos, mais especificamente cerâmicos bioativos à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou mistura de ambos, que atuam como agentes osteocondutores, permitindo assim o crescimento e regeneração tecidual óssea, funcionando a conjugação hidrogel-cerâmico como um substituto ósseo injetável.

## D E S C R I Ç Ã O

### Formulações de hidrogel de dextrino para a regeneração de defeitos ósseos e não-uniões de fraturas

#### Campo da invenção

[00011 A presente invenção refere-se a uma nova formulação de um hidrogel para a regeneração óssea. Mais especificamente, consiste numa matriz de hidrogel de dextrino que contem na sua composição substitutos ósseos granulares embebidos, para tratamento de defeitos ósseos e não-uniões de fraturas. Mais especificamente, os substitutos ósseos granulares são cerâmicas bioativas à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou mistura de ambos.

[00021 Esta solução insere-se e será usada na área da farmácia e medicina.

#### Antecedentes da invenção

[00031 O rápido desenvolvimento das tecnologias médicas tem conduzido ao aumento da esperança de vida a nível mundial. Por sua vez, o aumento da incidência de doenças degenerativas e o envelhecimento populacional acarreta um aumento exponencial das doenças ósseas, a perda de qualidade de vida e faz disparar os custos de saúde envolvidos no seu tratamento. Consequentemente, prevê-se um aumento exponencial dos procedimentos cirúrgicos, para recuperação funcional do tecido ósseo.

[00041 A prevalência de doenças ósseas afeta centenas de milhões de pessoas em todo o mundo, constituindo a principal causa de dor e incapacidade, com enorme impacto sobre indivíduos, famílias, sociedades e economias. Especificamente, a reparação de perda de massa óssea em defeitos críticos e não-uniões representa um problema clínico importante no sector ortopédico. Estas condições clínicas provocam importantes problemas sociais e psicológicos relacionados com a elevada taxa de incapacidade temporária ou permanente para trabalhar, causada pela dor crónica ou pelas consequências da imobilização que conduzem a uma redução significativa da qualidade de vida das pessoas afetadas (Jager et al, 2009; Arvidson et al, 2011).

[00051 Os métodos tradicionais para a regeneração óssea envolvem a utilização de enxertos autólogos e alogénicos (aloenxertos) que consistem no transplante de um tecido similar do próprio corpo do paciente ou de outra pessoa, respetivamente (Khan et al, 2005; Giannoudis et al, 2005). No entanto, estes procedimentos apresentam algumas limitações, sendo que para o enxerto autólogo estas incluem: limitada disponibilidade do material; dificuldade no ajuste ao defeito ósseo; problemas associados ao processo de recuperação do doente, nomeadamente, relacionados com a morbilidade da zona dadora, ocorrência de infeção, dor residual e fraturas na zona dadora, a necessidade de realizar duas cirurgias e a maior duração do procedimento cirúrgico; para o aloenxerto destacam-se as seguintes desvantagens: o risco de rejeição pelo organismo e transmissão de doenças (Laurencin et al, 2003; Finkemeier et al, 2002; Stok et al, 2011). Os problemas associados aos procedimentos descritos anteriormente traduzem-se no condicionamento da qualidade de vida dos doentes, aumento de custos pós-cirúrgicos (eventual necessidade de maiores tempos de recuperação, necessidade de intervenções

cirúrgicas sucessivas e propensão para o aparecimento de infecções), estando esta última ainda relacionada com aumento dos custos na prestação de serviços clínicos.

[00061 Atendendo às limitações inerentes à utilização dos enxertos ósseos tradicionais (autólogo e aloenxerto) e ao número crescente de procedimentos cirúrgicos para reconstrução óssea, são várias as estratégias que têm vindo a ser desenvolvidas no campo da Engenharia de Tecidos (ET) para regeneração óssea. Entre estas, destaca-se o desenvolvimento de substitutos ósseos, incluindo a aplicação singular ou combinada de materiais sintéticos ou biológicos, de fatores bioativos. Os biomateriais desempenham um papel central nas novas tecnologias de ET. No entanto, apesar da rápida evolução neste domínio, a translação para a prática clínica tem sido um dos principais desafios. Por outro lado, a maioria dos substitutos ósseos existentes no mercado é administrada na forma de grânulos ou pó, que não apresentam capacidade de fixação e moldagem nos defeitos ósseos, refletindo-se desta forma em limitações no manuseamento por parte do profissional clínico. Esta incapacidade de moldagem e fixação no local da lesão traduz-se assim na migração de partículas granulares para outros locais não desejados e na perda de eficácia do processo regenerativo. Existe assim uma necessidade global para o desenvolvimento de novos produtos que possibilitem um maior aproveitamento clínico dos avanços em biomateriais para regeneração óssea, permitindo simultaneamente a redução dos seus custos. Esses materiais devem obedecer a exigentes requisitos, ao nível das propriedades físicas, facilidade de manuseamento durante a cirurgia, propriedades estruturais e biomecânicas que facilitem a osteointegração e a biocompatibilidade.

[00071 Um dos desafios atuais relaciona-se com o desenvolvimento de substitutos ósseos injetáveis. Estes oferecem importantes vantagens em comparação com os biomateriais pré-fabricados (no formato sólido), pois permitem procedimentos cirúrgicos menos invasivos e o preenchimento eficaz de defeitos/áreas de lesão, independentemente da sua topografia. São vários os polímeros que têm sido investigados como "agentes ligantes" para promover a coesão e fixação dos materiais granulares no local da lesão, bem como para melhorar as propriedades de manuseamento e de administração destes produtos durante o procedimento cirúrgico. Entre estes, os hidrogéis apresentam-se como uma classe muito promissora de biomateriais para as aplicações de regeneração óssea. Os hidrogéis como matrizes de regeneração de tecidos tem constituído uma área de intensa investigação, devido à possibilidade destes materiais reproduzirem as estruturas químicas biológicas, assistindo o processo de regeneração dos tecidos (Goncalves et al, 2007; Moreira et al, 2009). No entanto, entre as soluções existentes, destacam-se polímeros naturais como por exemplo o colagénio, quitosano e alginato, cujo desempenho não é satisfatório. Para estas limitações contribuem a bioatividade pró-inflamatória e a difícil eliminação dos materiais pelo organismo (consequência da sua não-degradabilidade). Alguns destes derivados naturais de polímeros (incluindo o dextrano) são imunogénicos (Carvalho et al, 2009; Hu et al, 2010). Por outro lado, muitos dos hidrogéis até à data conhecidos apresentam tempos de gelificação demasiado longos, tornando-os incompatíveis com uma série de aplicações. Acresce ainda a inviabilidade económica de utilização de alguns materiais considerados muito promissores. Adicionalmente, os scaffolds atualmente reportados denotam uma eficácia reduzida no processo regenerativo, devido à ausência de propriedades integradoras e de vascularização (Amini et al, 2012).

[00081 O documento de patente W02011/070529, refere um hidrogel à base de dextrino, que é produzido através de processos químicos simples e pouco dispendiosos, sem recorrer a iniciadores tóxicos ou catalisadores. A solução proposta ultrapassa as dificuldades associadas aos polímeros supracitados, através da utilização do dextrino como matéria-prima na produção de hidrogéis.

[00091 O documento de patente US20140067082 refere uma estrutura de suporte tridimensional para regeneração óssea, utilizando grânulos de cerâmica. No entanto, esta solução aqui descrita não é destinada a solucionar defeitos críticos e não uniões de fraturas ósseas. Para solucionar os problemas aqui identificados, é necessário um equilíbrio entre os processos de injeção do biomaterial e sua fixação no defeito ósseo vs degradação e gradual remoção do biomaterial, à medida que ocorre o processo de regeneração e invasão do defeito pelas células, com formação de novo tecido ósseo. Este equilíbrio necessita, impreterivelmente de uma solução injetável que combina o hidrogel de dextrino com uma percentagem adequada de grânulos, sendo que essa percentagem de grânulos varia consoante a granulometria utilizada.

[0010]No que concerne ao procedimento de aplicação, os produtos ósseos injetáveis para o tratamento de defeitos ósseos apresentam-se na sua maioria no formato de pré-mistura. Apesar destas formulações apresentarem vantagens do ponto de vista da facilidade de aplicação, por não requererem etapas de mistura, apresentam limitações na prática clínica, incluindo a reduzida versatilidade, por apresentarem composição e quantidade da formulação já predefinidas. Para além destas características, consistem em "pastas viscosas" quebradiças, que impedem o ajuste da sua viscosidade aos procedimentos terapêuticos alvejados em cada condição clínica.

Conseqüentemente, estes produtos apenas poderão ser utilizados em condições clínicas muito restritas, tornando-os pouco viáveis no uso disseminado em casos diferentes que exigem ajuste dirigido da quantidade ou composição do substituto ósseo (Bohner (I), 2010). Por outro lado, estes produtos não apresentam a capacidade de incorporar na formulação outros agentes bioativos (adjuvantes no processo regenerativo).

[00111 A presente invenção consiste num hidrogel injetável que representa uma plataforma de veiculação e libertação de compostos bioativos, nomeadamente substitutos ósseos granulares.

### **Descrição Geral**

[00121 A presente invenção enquadra-se no campo dos biomateriais com aplicação em regeneração óssea, focando mais especificamente a aplicação do hidrogel de dextrino como matriz de suporte e veículo de substitutos ósseos granulares para o tratamento de condições clínicas no setor da regeneração óssea, especificamente defeitos ósseos que podem resultar de traumas, infeções ou tumores; bem como no tratamento de não-uniões de fraturas. A presente invenção pode ainda ser utilizada para o preenchimento de pequenos defeitos ósseos em cirurgia ortopédica, como por exemplo na cirurgia de mão, joelho e pé; após o procedimento de remoção de pequenos quistos ósseos, bem como defeitos resultantes de cirurgia maxilo-facial.

[00131 As formulações desenvolvidas na presente invenção são injetáveis e biodegradáveis, apresentando ainda a capacidade

para inclusão e transporte de outros agentes bioativos adjuvantes do processo regenerativo para as lesões alvejadas.

[00141 A presente invenção compreende um hidrogel de dextrino que é biocompatível, biodegradável, de origem natural e que constitui uma matriz de suporte e veículo de substitutos ósseos granulares. Os substitutos ósseos granulares de composição à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou mistura de ambos, podem ser embebidos in situ à formulação do hidrogel, dando origem a um substituo ósseo injetável capaz de estimular a regeneração e a formação óssea. Os fosfatos de cálcio caracterizam-se por serem semelhantes, quimicamente e estruturalmente, à parte mineral do tecido ósseo, sendo utilizados em regeneração óssea pelas suas propriedades osteocondutivas.

[00151 Os principais substitutos utilizados são:  $\beta$ - fosfato de tricálcio (P-TCP); Hidroxiapatite e P-TCP; Fosfato de cálcio e Hidroxiapatite e P-TCP

[00161 A composição desenvolvida compreende:

[00171 (i) Formulação de hidrogel de dextrino, formado preferencialmente por 30% (p/v) de dextrino oxidado e 3.76% (p/v) de agente reticulante - ADH (ácido adípico de di-hidrazida). O hidrogel é capaz de sofrer degradação por meio de processos hidrolíticos, ao nível das ligações intermoleculares e/ou enzimáticos através da ação de a - amilases presentes em tecidos humanos ou incluída nas formulações de hidrogel.

[00181 O dextrino é um polissacarídeo constituído por unidades de glicose-D, maioritariamente unidas por ligações glicosídicas a-1,4, contendo também algumas ramificações a-1,6 (~5%) Nesta invenção, utiliza-se o dextrino que é oxidado

por ácido periódico, sendo sujeito à clivagem específica da ligação C2-C3 dos anéis glicopiranosídicos, e originando dois grupos aldeído por unidade de glicose.

[00191 A gelificação dá-se através da reação da dihidrazida do ácido adípico com os grupos aldeído do dextrino oxidado, formando pontes hidrazona e originando uma matriz polimérica tridimensional de ligações covalentes - um hidrogel. Quando aquelas ligações são quebradas, o dextrino pode difundir nos tecidos humanos sendo eliminado por via renal devido ao seu baixo peso molecular que deverá variar entre 1200 a 8000Da; preferencialmente entre 1200 e 3000Da.

[00201 Além disso, o hidrogel é facilmente degradado *in vivo*: além das ligações glicosídicas, as ligações hidrazona proporcionam um nível adicional de controlo das propriedades mecânicas do hidrogel.

[00211 (ii) cerâmicos bioativos - presentes numa quantidade compreendida entre 0,5% e 50% (v/v), preferivelmente entre 1,0% e 40,0% (v/v), para uma gama de granulometria compreendida entre 250-1000  $\mu$ m e preferivelmente entre 1,0% e 20,0% (v/v) para uma gama de granulometria superior a 1000  $\mu$ m.

[00221 A função do hidrogel enquanto veículo e matriz de agregação do cerâmico granular é muito importante, uma vez que, como descrito anteriormente, a aplicação singular dos cerâmicos granulares tem como desvantagem a não fixação das partículas granulares no local de lesão e consequente migração das mesmas para tecidos adjacentes. Esta dispersão dos grânulos do cerâmico poderá provocar efeitos adversos noutros tecidos e ao mesmo tempo poderá comprometer o processo de regeneração. Daí, ser necessário que se encontrem embebidos no hidrogel para chegarem ao alvo a atingir.

[00231 Para assegurar um nível de coesão ótimo entre o hidrogel e o cerâmico para aplicações em defeitos ósseos, para uma granulometria de 250-500 pm, a proporção deve ser de 60 % (v/v) de matriz polimérica para 40% (v/v) de cerâmico.

[00241 As características da formulação final poderão ser ajustadas em função da viscosidade, a qual pode ser modulada pela composição da formulação do hidrogel de dextrino, variando-se as percentagens em peso dos componentes, e pela fase inorgânica, ou seja, a quantidade de cerâmica presente na formulação. A combinação de materiais com uma granulometria maior obriga ao ajuste da concentração de grânulos, para que a gelificação e consequente injetabilidade ocorram e seja possível o preenchimento total dos canais entre a matriz polimérica e os grânulos do cerâmico.

[00251 A viscosidade do substituto ósseo injetável é dependente da aplicação, isto é, da disfunção óssea a ser tratada (defeitos críticos e/ou não uniões de fraturas). Sendo assim, no caso da condição clínica de não uniões de fraturas, tratando-se de lesões de maior difícil acesso, um substituto ósseo injetável menos viscoso será preferível para a penetração da formulação neste tipo de lesão. Por outro lado, para defeitos ósseos mais contidos, uma solução injetável mais viscosa pode facilitar a sua moldagem e consolidação final, de forma mais rápida, no local da lesão. Assim, a viscosidade da formulação apresentará essencialmente efeitos no procedimento de aplicação, e poderá ser ajustada dependendo da condição clínica a alvejar.

[00261 Além disso, outras propriedades são também essenciais e igualmente dependentes da composição desta invenção, como a estabilidade mecânica e o tempo de biorreabsorção.

[00271 Os ensaios pré-clínicos realizados com a formulação combinada do hidrogel de dextrino com um substituto ósseo granular permitiram fornecer uma garantia de segurança e comprovar a eficácia do hidrogel de dextrino para o uso pretendido. Adicionalmente, foi possível reunir um conjunto de evidências técnicas e terapêuticas que a formulação final executa no âmbito do processo de regeneração do tecido ósseo (ver exemplo 3) .

100281 A composição desenvolvida e descrita no presente pedido de patente oferece importantes vantagens em comparação com as soluções atualmente existentes. Com a combinação hidrogel-cerâmico garante-se a estabilidade e fixação *in situ* dos grânulos no local da lesão, uma vez que esta combinação permite tornar a formulação granular cerâmica, que é rígida e quebradiça, numa formulação de fácil manuseamento e moldável ao defeito do tecido ósseo. Adicionalmente, é possível ajustar a concentração dos componentes, de acordo com os requisitos da condição clínica a alvejar.

[00291 Com esta combinação o hidrogel permite assistir o processo de regeneração. Numa primeira fase, o hidrogel serve de suporte estrutural e tridimensional para a retenção de células, fatores de crescimento e proteínas essenciais à formação do tecido ósseo, permitindo obter de forma mais rápida uma vascularização necessária à remodelação do tecido. Tal situação deve-se ao facto do hidrogel apresentar características semelhantes à matriz extracelular, o que permite criar o ambiente favorável para a migração celular, assim como como a permuta de moléculas de sinalização (para a quimiotaxia de células estaminais e respetiva diferenciação celular).

[00301 Posteriormente, os iões presentes nos cerâmicas vão criar um efeito positivo no comportamento do biomaterial,

promovendo a osteointegração e a osteocondutividade para a indução de formação de novo osso, através da ativação de células ósseas. Todas estas funcionalidades reunidas no mesmo sistema vão permitir obter um processo de regeneração óssea eficaz.

[00311 O aumento rápido da porosidade, acompanhando o processo de degradação, permite com que o hidrogel seja rapidamente invadido por células, depois de injetado. Face a estas características, trata-se de uma matriz que vai sendo reabsorvida, à medida que ocorre a regeneração e remodelação do tecido.

[00321 À medida que ocorre o processo de regeneração óssea, o cerâmico granular também vai sendo reabsorvido de forma lenta e controlada, contribuindo para a remodelação natural do osso.

[00331 Deste modo, destacam-se importantes benefícios da aplicação desta composição de hidrogel no tratamento de defeitos ósseos críticos e não-uniões:

[00341 - Procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos, reduzindo a dor do paciente;

100351 - Redução do tempo de cirurgia e prevenção de perda de material;

[00361 - Os defeitos de difícil acesso poderão ser preenchidos de forma fácil;

[00371 - Os grânulos biocerâmicos permanecerão no defeito ósseo mesmo durante a irrigação;

[00381 - Preenchimento total do defeito, mesmo aqueles com formato mais irregular;

[00391 - Possibilidade de controlo de viscosidade, dependendo da região a ser aplicada.

[00401 - O hidrogel permite constituir uma ponte de ligação ótima entre o cerâmico bioativo e o tecido ósseo.

### Breve descrição das figuras

[00411 As seguintes figuras referem-se a realizações preferenciais para a ilustração da descrição e não devem ser consideradas como limitativas do âmbito de proteção.

[00421 **Figura 1:** Resultados obtidos da análise Micro-CT dos ensaios *in vivo* realizados no modelo animal cabra - análise qualitativa.

[00431 **Figura 2:** Resultados obtidos da análise Micro-CT dos ensaios *in vivo* realizados no modelo animal cabra, semanas. Apresentação quantitativa do volume de osso e volume de grânulos.

[00441 **Figura 3:** Resultados obtidos da análise Micro-CT dos ensaios *in vivo* realizados no modelo animal cabra após 12 semanas.

## Descrição Detalhada

L00451 Seguidamente, a presente invenção é descrita com maior detalhe e especificamente com referência aos Exemplos, os quais, no entanto, não visam limitar a presente invenção.

### **Exemplo 1: Preparação do hidrogel de dextrino**

[00461 A preparação do hidrogel de dextrino envolve as seguintes etapas:

[00471 a) Oxidação do dextrino com ácido periódico. Esta etapa consiste na clivagem específica da ligação C2-C3 dos anéis glicopiranosídicos, originando dois grupos aldeído por unidade de glicose. Os frascos contendo a solução deverão ser isolados com folha de alumínio; a reação de oxidação decorrerá durante 20h em agitação a 15-20°C.

[00481 b) Remoção do periodato que não reagiu, através da adição de uma quantidade equimolar de dietileno glicol. A solução resultante é posteriormente filtrada através do processo de ultrafiltração (Unidade Ultrafiltração Millipore), no qual se utiliza uma membrana com dimensão de poros  $\approx$ 1kDa.

[00491 c) Desidratação da solução obtida através do processo de liofilização.

[00501 d) Após a etapa da liofilização, o dextrino oxidado é dissolvido em tampão fosfato (30%p/v) à temperatura ambiente, e armazenado em viais a 4°C.

Para a preparação do Hidrogel e mistura do cerâmico são realizados as seguintes etapas:

[00511 a) Para a preparação de 1 mL de hidrogel é adicionado 0,3 mL de solução de ADH de 3,76% p/v, previamente filtrada, a 0,7 mL de solução de dextrino oxidado (30% p/v).

[00521 b) É importante assegurar uma rápida homogeneização destes componentes, antes de impregnar o cerâmico com o hidrogel.

[00531 c) adicionam-se os grânulos de cerâmica, a temperatura ambiente.

[00541 Na perspectiva de aplicação clínica, o seguinte procedimento deverá ser realizado da seguinte forma: - Unir a dual seringa (que contem as soluções constituintes do hidrogel - dextrino oxidado e o ADH) à seringa que contem os grânulos do cerâmico;

- Separar a seringa com a formulação final;
- Aguardar cerca de 6-8 minutos para a gelificação da formulação final ocorrer;
- Proceder à injeção da formulação final no defeito ósseo a preencher.

[00551 Note-se que a mistura do hidrogel-cerâmico é sempre efetuada in situ, imediatamente antes do procedimento cirúrgico. Esta tipologia de formulação permite ultrapassar as limitações descritas anteriormente, nomeadamente em relação às formulações pré-misturadas, uma vez que através da mistura in situ, é possível o controlo da viscosidade e composição das formulações.

## Exemplo 2: Análise estrutural do dextrino oxidado e irradiado

[00561 Nesta análise foram usados dextrino não irradiado, irradiado a 10 e 20 kGy (2 kGy/h) dextrino oxidado (ODEX) não irradiado e irradiado a 20 kGy (2 kGy/h). Os açúcares neutros foram determinados como acetatos de alditol com base no descrito em Nunes et al. (2012). As amostras (2-3 mg) começaram por ser hidrolisadas em 200 pL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%, à temperatura ambiente durante 3 h. De seguida foi adicionado 1,0 mL de água destilada e as amostras foram incubadas a 120 oC, durante 1h. A 0,5 mL do hidrolisado foram adicionados 0,2 mL de padrão interno (2-desoxiglicose) e 200 pL de NH<sub>3</sub> a 25%. As amostras foram reduzidas com 100 pL de NaBH<sub>4</sub> (15% m/v em NH<sub>3</sub> 3 M), durante 1 h, a 30°C e o excesso de BH<sub>4</sub><sup>-</sup> foi eliminado com 100 pL de ácido acético glacial. Para a acetilação das amostras, foi adicionado 450 pL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético a 300 pL de amostra reduzida. Estas foram incubadas a 30°C durante 30 min. De seguida foram adicionados 3,0 mL de água destilada, para decompor o excesso de anidrido acético, e 2,5 mL de diclorometano para extrair os acetatos de alditol. As duas fases foram separadas por centrifugação e fase aquosa descartada e o diclorometano evaporado. Os derivados de acetato de alditol foram analisados por GC-FID (gas chromatography - flame ionisation detector) (Pekin Elmer, Clarus 400). O GC foi equipado com uma coluna capilar DB-225 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) com dimensões 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro e 0.15 µm de espessura). Para a análise foi usado o seguinte programa de temperaturas: temperatura inicial de 200°C e sobe até 220°C a uma taxa de 20oC/min e manteve-se nessa temperatura durante 1 min. A temperatura de injeção e de deteção foi de 220 3 230 oC, respetivamente. A taxa de fluxo do H<sub>2</sub> (fase móvel) foi de 1,7 mL/min. Neste ensaio foram usadas 2 réplicas de cada amostra.

[00571 Para a análise de ácidos urônicos, as amostras (2-3 mg) foram hidrolisadas em 200 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%, à temperatura ambiente durante 3 h. De seguida foi adicionado 2,2 mL de água destilada (concentração final de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) e as amostras foram incubadas a 100 °C, durante 1 h. 0,5 mL do hidrolisado foi diluído em 3 mL de água destilada. A 0,5 mL de amostras diluídas foram adicionados 3 mL de borato de sódio 50 mM preparado em ácido sulfúrico concentrado e depois de agitadas foram incubadas num banho de água a ferver, durante 10 min. Depois de arrefecidas as amostras, foi adicionado, no escuro, 100 µL de MFF (m-fenilfenol 0,15 % m/v em 0,5 % m/v NaOH). Estas permaneceram protegidas da luz durante 30 min e por fim lida a absorvância a 520 nm. Neste ensaio foram usadas 2 réplicas de cada amostra.

[00581 A ligação dos monómeros de açúcares foi analisada através da metilação destes como descrito em Ciucanu and Kerek (1984), com ligeiras alterações. Sumariamente, as amostras de dextrino (1-2 mg) foram dissolvidas em 1 mL de DMSO. Cerca de 40 mg de pallets de NaOH foram triturados em atmosfera de azoto e adicionados à solução. As amostras foram metiladas com 80 µL de CH<sub>3</sub>I, durante 20 minutos com agitação vigorosa (passo repetido 2x). As amostras foram dissolvidas em 3 mL de cloroformio:metanol (1:1, v/v) e dialisadas contra uma solução de etanol:água 1:1, v/v). Foram usadas membranas com cut-off de 1 kDa. Após a diálise, as amostras foram concentradas até à secura, re-dissolvidas em 1 mL de DMSO e repetidos todos os passos supramencionados. As frações metiladas foram também reduzidas no terminal carboxílico através de uma modificação do método descrito por Nunes et al. (2012). Os oligossacarídeos metilados foram hidrolisados com 500 µL de TFA (ácido trifluoroacético), durante 1 h, a 121°C e por fim foram reduzidos e acetilados tal como descrito na análise de açúcares neutros. Os acetatos de alditol parcialmente

metilados foram separados e analisados por GC acoplado a espectroscopia de massa (MS). O GC foi equipado com uma coluna capilar DB-1 (J&W Scientific, Folsom, CAI USA) com dimensões 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro e 0.15 µm de espessura.

Tabela 2: Efeito da oxidação e irradiação gama na percentagem de açúcares neutros e ácidos urónicos.

Amostra		%Açúcares neutros	%Ácidos urónicos
Dextrino irradiado	não	76,8 ± 1,2	2/67 ± 0,21
Dextrino	10 kGy	75,0 ± 5,1	2/33 ± 0,56
Dextrino	20 kGy	74,0 ± 5,0	1/86 ± 1,11
ODEX irradiado	não	42,7 ± 1,9	1,98 ± 1,37
ODEX	20 kGy	41,3 ± 7,1	2/04 ± 0,63

[00591 A irradiação de materiais poliméricos com irradiação ionizante leva à formação de intermediários reativos, de radicais livres, de iões e de átomos no estado excitado. Estas espécies químicas desencadeiam uma série de reações que culminam na abstração de hidrogénios, rearranjos e/ou formação de novas ligações intra- e inter-moleculares provocando alterações no peso moléculas do polímero. O grau de transformações depende da estrutura do polímero, bem como das condições de irradiação (Gaeppi, 2010). A irradiação de soluções poliméricas produz ainda radicais livres resultantes da radiólise da água, cuja sua permanência poderá levar a

alterações estruturais do polímero a longo prazo (Kanjickal, 2008). Por observação da Tabela XV, verifica-se que a irradiação gama não afeta a percentagem de resíduos de glicose, de ácidos urónicos, nem o grau de oxidação do ODEX.

**Exemplo 3: Demonstração do desempenho *in vivo* da formulação combinada hidrogel-cerâmico**

[00601 A eficácia *in vivo* foi avaliada recorrendo ao modelo animal da cabra, que cria um ambiente funcional junto dos implantes comparável com o que acontece nos humanos. Sendo assim, foi testada a combinação do hidrogel de dextrino com o cerâmico granular constituído por hidroxiapatite e trifosfato de cálcio para as condições clínicas correspondentes a defeitos ósseos críticos e não-uniões de fraturas.

[00611 Alguns dos animais utilizados apresentaram defeitos ósseos no osso frontal com uma dimensão de 14mm de diâmetro externo. Os defeitos foram preenchidos com as formulações combinadas hidrogel-cerâmica, de forma a testar a sua eficácia. Será realizado um acompanhamento, monitorização e avaliação geral dos animais diariamente, tendo particular atenção aos sinais de dor e infeção. Será realizada, por rotina, uma medicação analgésica por 2-4 dias e uma antibioterapia por 7-10 dias após o procedimento cirúrgico.

L00621 Os resultados quantitativos obtidos encontram-se apresentados nas Figuras 1 e 2.

[00631 Durante o procedimento cirúrgico, a formulação combinada do hidrogel-cerâmico foi injetada nos defeitos ósseos, preenchendo eficazmente os mesmos. Verificou-se ainda que o hidrogel apresentou uma adaptação e moldagem eficazes no

defeito, permitindo o preenchimento completo no defeito, bem como uma eficiente coesão dos grânulos no local do defeito, evitando assim a ocorrência de dispersão destes para os tecidos adjacentes. Durante os ensaios foi realizada a comparação com a utilização do substituto ósseo granular, sem a associação do Hidrogel, isto é, os grânulos foram aplicados apenas com sangue. Nessa situação, e uma vez que os grânulos apenas se encontravam humedecidos com sangue verificou-se a difusão dos mesmos para locais adjacentes ao local da lesão, sendo difícil o seu manuseamento e conseqüente preenchimento dos defeitos. Neste sentido, confirmou-se que a presença do hidrogel constitui uma plataforma eficaz e adequada para o manuseamento de substitutos ósseos granulares. Durante a avaliação pós-cirúrgica não foram observados quaisquer sinais de inflamação ou reações adversas do tecido (necrose), permitindo validar a biocompatibilidade da formulação aplicada.

[0064] A Figura 1 apresenta os resultados obtidos da análise Micro-CT dos ensaios **in vivo** realizados no modelo animal cabra - análise qualitativa; sendo que em A) visualiza-se o controle após 6 semanas; B) o Hidrogel após 6 semanas; C) o Hidrogel + substituto ósseo granular após 6 semanas; D) o controle após 12 semanas; E) o Hidrogel após 12 semanas e F) o Hidrogel + substituto ósseo granular (após 12 semanas).

[0065] Após 6 semanas, a combinação específica da matriz-Hidrogel com o substituto granular resultou num aumento significativo de novo osso em relação ao controle, conforme se pode ver qualitativamente na Figura 2, e quantitativamente na Figura 3 - aumento do osso formado de 25mm<sup>3</sup> para cerca de 195mm<sup>3</sup>.

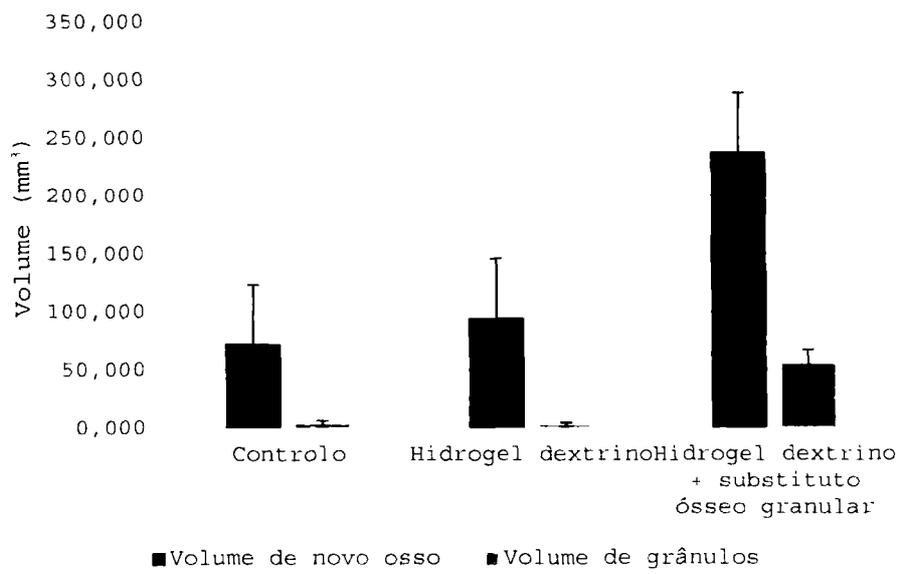
Guimarães, 28 de Junho de 2016

## R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1. Formulação para uso no tratamento de regeneração Óssea caracterizada por compreender:
  - a. Hidrogel de dextrino oxidizado com dihidrazida do ácido adípico, de peso molecular entre 1200 a 8000Da;
  - b. Cerâmicos bioativos granulados à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou mistura de ambos, embebidos no referido hidrogel, em que a granulometria é igual ou superior a 250 pm.
2. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por os cerâmicos bioativos granulados estarem numa quantidade entre 0,5 a 50% (v/v) ■
3. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a quantidade dos cerâmicos bioativos estar entre 1,0% a 40% (v/v) para granulometria entre 250 a 1000 I.im
4. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a quantidade dos cerâmicos bioativos ser, preferencialmente 40% (v/v) para granulometria entre 250 a 500 pm.
5. Formulação, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizada por percentagem de hidrogel ser, preferencialmente 60% (v/v) quando a granulometria dos cerâmicos bioativos varia entre 250-500 um.
6. Formulação, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada por a quantidade de cerâmicos bioativos estar entre 1,0% a 20% (v/v) para granulometria superior a 1000 Fim.

7. Formulação, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por os cerâmicas bioativos granulados à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou mistura de ambos serem, preferencialmente,  $\beta$ - fosfato de tricálcio (p-TCP); Hidroxiapatite e P-TCP; Fosfato de cálcio e Hidroxiapatite e P-TCP.
8. Formulação, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por o peso molecular do hidrogel variar, preferencialmente entre 1200 a 3000 Da.
9. Formulação, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por ser injetável.
10. Formulação, de acordo com as reivindicações 1 a 9, caracterizada para ser usada in-situ para o tratamento de defeitos ósseos e não uniões de fraturas.

Guimarães, 28 de Junho de 2016



**Figura 3**

F I G U R A S

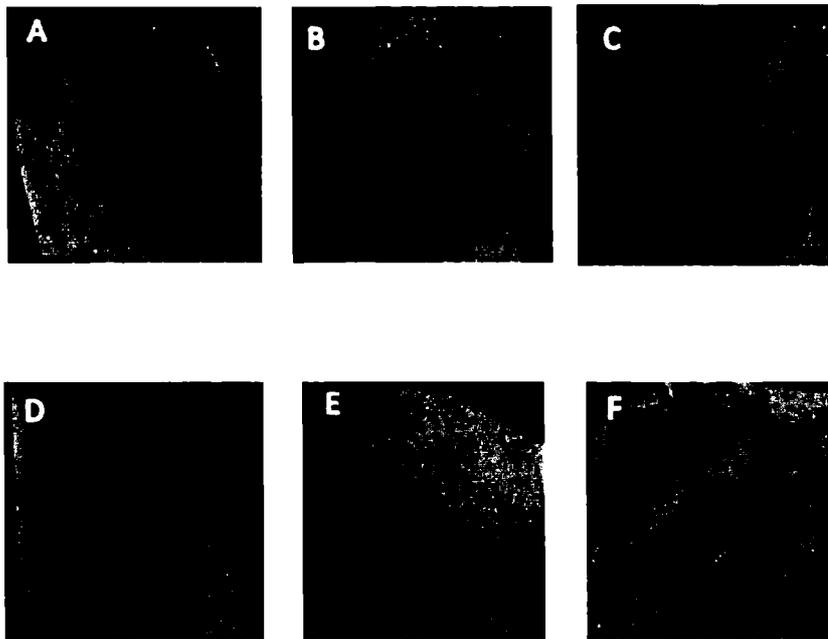
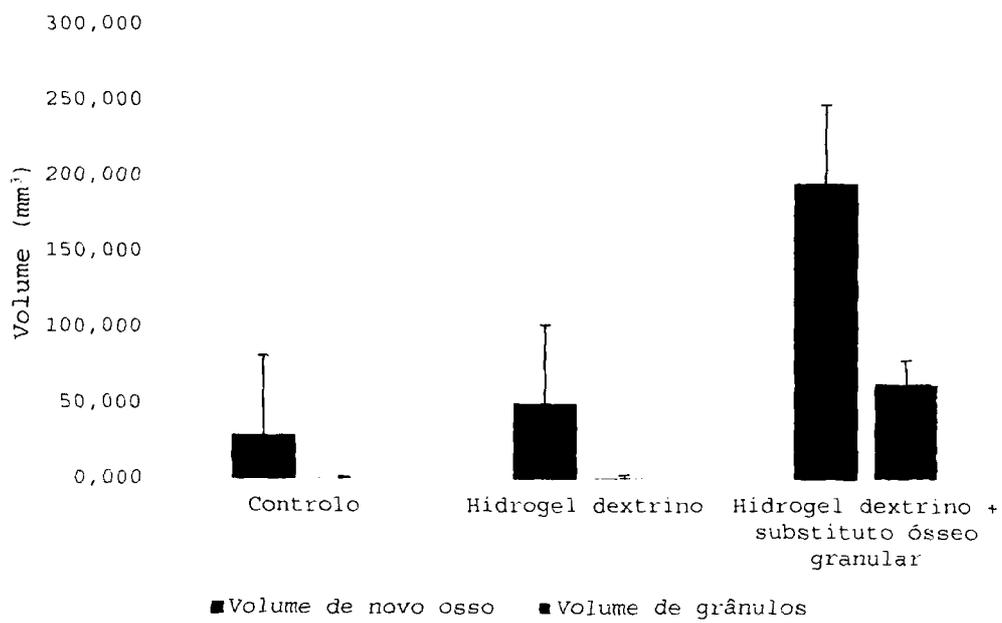


Figura 1



**Figura 2**