

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

(22) Data de pedido: 2015.06.30	(73) Titular(es): UNIVERSIDADE DO MINHO LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA	PT
(30) Prioridade(s):		
(43) Data de publicação do pedido: 2016.12.30	(72) Inventor(es): FRANCISCO MIGUEL PORTELA DA GAMA ISABEL SOFIA MELO PEREIRA ALEXANDRA MARIA MACHADO NOGUEIRA MARTINS RODRIGUES	PT PT PT
(45) Data e BPI da concessão: /	ANA CATARINA MACHADO NOGUEIRA MARTINS RODRIGUES MANUELA MARIA CALDAS DE OLIVEIRA	PT PT
	(74) Mandatário: MARCO ALEXANDRE GOMES DA SILVA PIRES DE SOUSA RUA QUINTA DO MONTE, 96 - 1º DTº 4805-151 CALDAS DAS TAIPAS	PT

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÃO COM PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PARA O TRATAMENTO DE INFEÇÕES E REGENERAÇÃO ÓSSEA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO CONSISTE NUMA FORMULAÇÃO DE LIBERTAÇÃO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PARA APLICAÇÃO EM INFEÇÕES ÓSSEAS E REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO. A FORMULAÇÃO É COMPOSTA POR HIDROGEL DE DEXTRINO QUE COMPREENDE NANOGÉIS DE POLISSACARÍDEOS HIDROFOBIZADOS, POR EXEMPLO DEXTRINO OU ÁCIDO HIALURÓNICO, QUE INCORPORAM UM PÉPTIDO ANTIMICROBIANO. O PÉPTIDO UTILIZADO É O LLKKK18 QUE COMPREENDE PELO MENOS UMA SEQUÊNCIA DE 95%, 96%, 97%, 98%, 99% OU 100% DE HOMOLOGIA COM ID SEQ 1 ¿ KEFKRIVKRIKKFLRKLKLV. A REFERIDA FORMULAÇÃO CONTEM AINDA GRANULADOS BIOATIVOS OSTEOGÉNICOS (CERÂMICOS BIOATIVOS) À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO, HIDROXIAPATITE OU MISTURA DE AMBOS, QUE ATUAM COMO AGENTES OSTEOCONDUTORES.

R E S U M O

Formulação com péptidos antimicrobianos para o tratamento de infecções e regeneração óssea

A presente invenção consiste numa formulação de libertação de péptidos antimicrobianos para aplicação em infecções ósseas e regeneração de tecido ósseo.

A formulação é composta por hidrogel de dextrino que compreende nanogéis de polissacarídeos hidrofobizados, por exemplo dextrino ou ácido hialurónico, que incorporam um péptido antimicrobiano. O péptido utilizado é o LLKKK18 que compreende pelo menos uma sequência de 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de homologia com ID SEQ 1 - KEFKRIVKRIKKFLRKLIV. A referida formulação contém ainda granulados bioativos osteogénicos (cerâmicos bioativos) à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou mistura de ambos, que atuam como agentes osteocondutores.

D E S C R I Ç Ã O

Formulação com péptidos antimicrobianos para o tratamento de infecções e regeneração óssea

Domínio da invenção

[0001] A presente invenção relaciona-se com uma nova formulação para libertação controlada de péptidos antimicrobianos. Mais especificamente, consiste num péptido conjugado com nanogéis de polissacarídeos hidrofobizados que se encontram misturados num hidrogel de dextrino, e cerâmicos bioativos. Esta solução pode ser utilizada nas áreas de farmácia e medicina.

Antecedentes da invenção

[0002] Nos últimos 60 anos, os antibióticos têm sido cruciais no combate contra doenças infecciosas causadas por microrganismos. No entanto, a resistência crescente destes microrganismos aos antibióticos tornou-se um sério problema de saúde pública e futuramente este fenómeno conduzirá a uma falta de respostas eficazes contra infeções, originadas por diversos agentes patogénicos, com graves consequências para a saúde pública.

[0003] No campo das infeções ósseas, a osteomielite representa uma condição clínica premente no setor ortopédico. A osteomielite é um processo inflamatório do tecido ósseo de origem infecciosa, caracterizado pelo quadro inflamatório e necrose do tecido. A prevalência da osteomielite aumenta com a incidência de fatores predisponentes, como é o caso da doença de diabetes mellitus e doenças vasculares periféricas (Tice et al., 2003; Cierny, 2003). Pode surgir em qualquer idade,

afetar qualquer osso e tornar-se uma doença crónica com morbidade persistente e pode mesmo potencialmente conduzir à amputação ou mesmo à morte (Chihara, 2010, Eid, 2012). A taxa de morbidade é muito significativa nesta condição patológica e pode incluir a disseminação para tecidos moles e ligações associadas (McNally, 2010; Chihara, 2010). A osteomielite continua a ser um problema grave a nível mundial, sendo responsável por inúmeras admissões hospitalares e custos consideráveis (Frank et al., 2011).

[0004] O tratamento da osteomielite inclui a administração de doses elevadas de antibióticos por via endovenosa e oral, durante um período de pelo menos 6 semanas. No entanto, estes sistemas de administração apresentam limitações bem conhecidas, como a toxicidade e efeitos adversos que incluem a lesão de órgãos vitais, bem como o facto de não proporcionarem uma concentração fisiologicamente ativa dos fármacos por longos períodos de tempo, desta forma resultando num efeito terapêutico reduzido (Haidar, 2010; Gomes et al, 2013).

[0005] Os sistemas de entrega local de fármacos, utilizando materiais não biodegradáveis e osteoativos como os cimentos ósseos de ortofosfatos de cálcio e vidro bioativo, surgiram como uma alternativa promissora para o tratamento da osteomielite. Entre os biomateriais constituintes destes sistemas destaca-se o poli (metil metacrilato) (PMMA) comercial, que tem sido usado na forma de esferas ou cimento ósseo incorporando o antibiótico gentamicina. Este sistema é aprovado para o tratamento de osteomielite na Europa, desde década de 1970, sob o nome comercial de Septopal®. No entanto este produto ainda não se encontra aceite pela agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA (Walenkamp, 2009). Atualmente, a principal preocupação relacionada com a utilização de sistemas de transporte local

de antibiótico baseado em PMMA refere-se ao risco de indução de resistência a antibióticos, pois o material constituinte destes sistemas poderá ser suscetível à formação de biofilmes microbianos, o que contribuirá para a seleção de estirpes resistentes (Campoccia et al., 2010). Adicionalmente verificam-se outras limitações associadas a estes sistemas, pois sendo o PMMA um material não biodegradável, uma cirurgia adicional é necessária para a sua remoção, o que torna o processo dispendioso e doloroso para o paciente; por outro lado, a libertação do antibiótico a partir dos sistemas de PMMA é incompleta (Whittlesey et al, 2004; Nandi et al, 2009).

[0006] Perante este cenário, o tratamento da osteomielite permanece ainda um desafio e torna-se complexo, em particular quando associado ao surgimento de estirpes resistentes aos antibióticos convencionais, especialmente *Staphylococcus aureus* multirresistente (MRSA, de Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*).

[0007] Deste modo, o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos é crucial para o tratamento da osteomielite e consequentes avanços futuros.

[0008] Neste contexto, intensa investigação tem sido desenvolvida para produzir novos tipos de antibióticos. Os péptidos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides* - AMPs) fazem parte da primeira linha de defesa do sistema imunitário e apresentam um largo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos (Ajesh, 2009) e vírus (Hancock, 2000). Os AMPs são encontrados ubiquamente na Natureza, desde seres procariontes a mamíferos, plantas ou insetos, sendo geralmente definidos como péptidos com menos de 50 aminoácidos, com carga positiva devido à presença de múltiplas lisinas e argininas e com mais de 50% de aminoácidos hidrofóbicos (Powers, 2003). Os AMPs têm gerado grande

interesse pela capacidade de ultrapassarem os mecanismos de resistência a antibióticos (Reddy et al, 2004). Neste contexto, a atividade antimicrobiana dos AMP, aliada ao facto de atuarem a baixas concentrações, faz com que estes péptidos sejam considerados candidatos promissores a agentes terapêuticos no tratamento de infeções, em especial em situações de resistência à antibioterapia clássica.

[0009] O péptido antimicrobiano LL37 pertence à família das catelicidinas e é expresso em diferentes tipos de células. Para além da sua forte atividade antimicrobiana, o péptido LL37 e análogos desempenham um papel central ao nível da resposta imunitária inata e processos de inflamação. Especificamente, este AMP está envolvido na migração e quimioatração de células (monócitos, linfócitos T e neutrófilos (Yang et al, 2000)), produção de citocinas e atua como adjuvante do sistema imunitário. Tendo como base estas funções biológicas, o péptido LL37 tem vindo a ser investigado em várias aplicações e a sua função e potencial terapêutico em processos cruciais do organismo foi demonstrada, como seja ao nível de cicatrização de feridas (Heilborn et al, 2003), angiogénese (Koczulla et al, 2003) e neovascularização de tecidos lesados (De Yang et al, 2000; Heilborn et al, 2003).

[0010] É amplamente aceite que a promoção da neovascularização é indispensável no processo de regeneração do osso, uma vez que os vasos recém-formados irão fornecer o oxigénio, os nutrientes, e as células progenitoras para a região do defeito ósseo lesado. O recrutamento de células mesenquimais (MSCs) da medula óssea, as quais têm a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, é eficaz para acelerar o processo de regeneração óssea (Otsuru et al, 2007; Colnot, 2009). Adicionalmente, o processo de angiogénese revela-se crucial para o desenvolvimento do esqueleto e reparação de fraturas ósseas

(Kanczler, 2008). Recentemente, Kittaka et al demonstrou em ratinhos o potencial do péptido LL37 na regeneração óssea, através do seu efeito no processo de angiogénese e recrutamento de células estaminais (Kittaka et al, 2013).

[0011] Por outro lado, têm sido desenvolvidas terapias de libertação de fatores de crescimento para a promoção da angiogénese e neovascularização, para estimular ativamente a regeneração do tecido ósseo. A este nível têm sido estudados sistemas de libertação baseados em matrizes poliméricas, para promover uma libertação controlada e localizada destes fatores bioativos. Alguns dos produtos nesta área incluem sistemas de libertação da proteína BMP2 para estimular a diferenciação, migração e proliferação celular. No entanto, existem várias limitações destas formulações, como sejam a sua fraca retenção após a implantação, a qual dita uma reduzida bioatividade; a ocorrência de efeitos adversos, face à dosagem libertada destes fatores; e os elevados custos (Li et al, 2001).

[0012] O documento de patente WO2012035310 descreve uma estratégia para libertação de péptidos (antimicrobianos ou não), baseada na conjugação química dos péptidos com dextrino. Essa estratégia consiste na ligação covalente das duas moléculas, o que implica a ativação química do dextrino. Os conjugados dextrino-péptido possuem baixo peso molecular. Deste modo, é previsível que os conjugados possam difundir-se rapidamente através do hidrogel, existindo uma rápida libertação. Acrescenta-se ainda que, para que os conjugados sejam funcionais (antimicrobianos) segundo esta invenção, é necessário que as enzimas amílases atuem sobre o dextrino, hidrolisando-o e libertando o péptido. Pode ainda acrescentar-se que esta invenção pretende produzir péptidos antimicrobianos, que atuam interagindo com a membrana das bactérias, sendo para isso necessária uma modificação química.

A invenção que se pretende agora proteger, direcionada para regeneração óssea, apresenta um péptido que atua não só como antimicrobiano, mas também com recetores celulares de diferentes células, promovendo a regeneração dos tecidos.

[0013] Toppazzini et al, 2011, descreve um sistema de libertação de LL37 baseado na utilização de alginato. Este polissacarídeo dissolve-se in vivo à medida que os complexos iónicos formados com cálcio se vão transformando em complexos com iões sódio, solúveis, traduzindo-se numa transição GEL-SOL. Este processo é de difícil controlo e, não sendo alvo de ação de enzimas que actuem especificamente sobre este polímero, a sua degradação in vivo é lenta.

[0014] Em WO2011070529 é descrito um hidrogel de dextrino bem como a sua potencial utilização para várias finalidades, entre elas a libertação de péptidos bioativos, incluindo a sua encapsulação, usando nanogeis. No entanto, a libertação controlada de cada péptido em particular implica requisitos muito específicos, e o documento não refere nem sugere qual o fármaco nem a formulação adequada para proporcionar perfis de libertação e controlo do sistema compatíveis com a aplicação desejada, evitando assim uma rápida libertação.

[0015] Análogos do péptido LL37 têm vindo a ser estudados para melhorar as propriedades antimicrobianas e diminuir a toxicidade e a capacidade de ligação a proteínas do plasma. Um deles é o péptido LLKKK18, que apresenta uma estrutura semelhante ao péptido LL37, mas é composto apenas por 18 aminoácidos. No LLKKK18, os aminoácidos glutamina, asparagina e ácido aspártico encontram-se substituídos por aminoácidos de lisina. Por outro lado este péptido é mais catiónico e mais hidrofóbico que o LL37, propriedades que lhe permitem atingir maior atividade antimicrobiana e quimioatração relativamente ao seu análogo. Além disso, o seu tamanho mais pequeno

constitui uma vantagem, pois não só permite facilitar o transporte através das membranas celular, como permite reduzir custos ao nível da sua síntese.

[0016] Neste contexto, a presente invenção pretende ultrapassar as limitações anteriormente descritas, através do desenvolvimento de um sistema de libertação de péptidos antimicrobianos, o qual permitirá conjugar o efeito antimicrobiano e os efeitos de angiogénese e neovascularização.

Descrição Geral

[0017] A invenção consiste no desenvolvimento de um sistema de libertação de péptidos antimicrobianos para aplicação em osteomielites e regeneração de tecido ósseo.

[0018] A formulação consiste num hidrogel de dextrino que compreende nanogéis de polissacarídeos hidrofobizados, por exemplo de dextrino ou de ácido hialurónico, que incorporam o péptido antimicrobiano.

[0019] A formulação compreende ainda grânulos cerâmicos com propriedades osteocondutoras, os quais serão veiculados através do hidrogel de dextrino.

[0020] O sistema de encapsulação/incorporação é formado por formulações de nanogéis de ácido hialurónico (HA), as quais irão permitir a incorporação do péptido LLKKK18 (uma versão com apenas 18 aminoácidos da catelicidina humana que preserva a sua bioactividade), bem como a sua proteção e a sua libertação durante o processo de degradação do hidrogel de

dextrino, *in vivo*. Especificamente, a incorporação do péptido nos nanogeis irá permitir a estabilização do péptido, ao mesmo tempo que assegura a sua proteção contra a ação de proteases presentes no plasma sanguíneo. Adicionalmente, a encapsulação poderá permitir o controlo da libertação do péptido, limitando a sua difusividade na matriz do hidrogel.

[0021] A incorporação dos nanogeis no hidrogel é realizada misturando o nanogel com o péptido encapsulado na solução com o dextrino oxidado, antes da adição da dihidrazida do ácido adípico (agente reticulante para a formação do hidrogel).

[0022] O hidrogel de dextrino constitui o veículo de libertação controlada do sistema de encapsulação do péptido antimicrobiano LLKKK18 (análogo ao péptido LL37) e matriz de suporte para a migração e proliferação celular. O hidrogel de dextrino é injetável e apresenta elevada biocompatibilidade, características indispensáveis para utilização em medicina regenerativa e como sistema de libertação controlada de agentes bioativos. Acresce ainda a vantagem de esta matriz ser biodegradável, dispensando a realização de cirurgias para remoção do dispositivo de libertação de fármacos.

[0023] O processo de libertação ocorre de forma gradual, durante o processo de degradação do hidrogel, *in vivo*. Efetivamente, o nanogel com o péptido encapsulado apresenta uma mobilidade reduzida na matriz do hidrogel, pelo que a sua libertação (e a libertação concomitante do péptido) deverá ser controlada pela erosão do hidrogel, que *in vivo* demora cerca de 1 a 3 semanas.

[0024] O péptido em estudo apresenta uma atividade antimicrobiana e um papel multifuncional ao nível de diversos processos biológicos, tais como, inflamação, quimioatração, cicatrização e angiogénese. O péptido LLKKK18 exhibe

propriedades antimicrobianas melhoradas e menor citotoxicidade e ligação a proteínas do plasma em relação à LL37. Na LLKKK18 a glutamina, asparagina e ácido aspártico encontram-se substituídos por aminoácidos catiónicos, exibindo maior hidrofobicidade que a LL37 (Ciornei et al, 2005), e atividade superior. Deve salientar-se que a atividade antimicrobiana da catelicidina, em particular, se deve não apenas a uma ação direta nos microorganismos, associada à permeabilização da membrana celular, mas também a um efeito imunomodulatório, que tem sido demonstrado em vários modelos de infecção (Haisma et al, 2014). O desenvolvimento do péptido LLKKK18 foi efetuado com o propósito de melhorar as propriedades antimicrobianas do péptido original, a LL37, com base no conhecimento que existe do modo de ação antimicrobiana dos péptidos catiónicos, que de modo genérico depende do seu caráter catiónico e anfifílico. Contudo, ao fazer estas alterações, existe o risco de comprometer a interação com recetores membranares que estão associados aos efeitos regenerativos também associados à LL37. Contudo, consegue-se com que o péptido LLKKK18 preserve nomeadamente o seu caráter angiogénico. Apesar da LL37 ser descrita como um péptido com elevada capacidade antimicrobiana, isso não implica maior atividade em termos de regeneração óssea. Se esse efeito se dever a outra função do péptido (como por exemplo, à atividade imunomodulatória) não se torna óbvio ter maior efeito com a LLkkk18, visto que a eliminação de aminoácidos e a substituição de outros poderia causar alteração das funções do péptido. É com base neste potencial terapêutico do péptido LLKKK18, que se pretende alvejar a sua aplicação em infeções ósseas, nomeadamente na condição clínica de osteomielites e ao nível do processo regenerativo do tecido ósseo.

[0025] A formulação desenvolvida compreende:

- nanogéis de polissacarídeos hidrofobizados, por exemplo dextrino ou ácido hialurónico, presentes numa gama entre 0,1 e 5% relativamente à matriz do hidrogel;

- hidrogel de dextrino;

- um péptido antimicrobiano que compreende pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de homologia com a seguinte sequência: ID SEQ 1 - KEFKRIVKRIKKFLRKLV;

- cerâmicos bioativos à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou mistura de ambos, exibindo propriedades osteocondutoras.

[0026] A composição da presente invenção compreende a concentração do péptido antimicrobiano entre 1 a 20 μ M, em particular 10 a 12 μ M, proporcionando as propriedades imunomoduladoras, antimicrobianas e pro-angiogénicas adequadas.

[0027] A composição da presente invenção pode ainda compreender um polímero dextrino, apresentando um peso molecular entre 1,000-20,000 g / mol, de preferência o polímero de dextrino tem um peso molecular entre 1,000-5,000 g / mol.

[0028] A composição da presente invenção compreende nanogéis de polissacarídeos, por exemplo de dextrino ou ácido hialurónico, modificados por hidrofobização, com diâmetro compreendido entre 20 - 300nm, preferencialmente entre 50-150nm .

[0029] A presente invenção compreende ainda cerâmico bioativo à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou mistura de ambos, presente 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 μm , e entre 1,0% e 20,0% (v/v) para uma gama de granulometria superior a 1000 μm . Deste modo, são conferidas à formulação propriedades de osteocondutividade, necessárias à regeneração óssea.

[0030] O processo de preparação do sistema envolve de uma forma genérica as seguintes etapas:

- Preparação do sistema de encapsulação formado pelo nanogel de ácido hialurónico - Exemplo 1;
- Encapsulação do péptido antimicrobiano no nanogel;
- Mistura do sistema de encapsulação na formulação do hidrogel de dextrino.

Descrição Detalhada

[0031] Seguidamente, a presente invenção é descrita com maior detalhe e especificamente com referência a um exemplo, o qual, no entanto, não visa limitar a presente invenção.

Exemplo:

Síntese e caracterização do nanogel de ácido hialurónico (Pedrosa et al, 2014)

[0032] O hialuronato de sódio (gama de peso molecular 5-15 kDa) foi quimicamente enxertado com uma cadeia alquilo longa (tal como cloridrato de 11-amino-1-undecanetiol e hexadecilamina) através da formação da ligação amida para produzir um conjugado anfifílico. Para tornar o hialuronato de sódio

solúvel em DMSO, os iões de hialuronato de sódio (HyA) foram permutados com o ião lipofílico tetrabutilamónio (TBA). A permuta iónica foi realizada utilizando uma resina de permuta catiónica AG 50W-X8. A resina de AG 50W (1 g) foi incubada com um excesso de TBA-F (3,5 g) em água ultrapura durante 1 h à temperatura ambiente e agitação ligeira. A resina foi elutriada, lavada e transferida para um 1% (w / v) de solução de HyA em água ultrapura. A troca dos iões TBA na resina e os iões de HyA foi realizada à temperatura ambiente com agitação, durante 2 h. A remoção da resina foi obtida por centrifugação durante 2 min a 5000 rpm (SIGMA 113 centrífuga). A solução HyA-TBA resultante foi liofilizada e o material branco "macio" foi armazenado à temperatura ambiente. A Espectroscopia de RMN de 1h foi realizada para confirmar a troca de iões de Na⁺ com TBA-F.

[0033] A cadeia alquilo longa foi quimicamente conjugada com a cadeia de HyA-TBA modificada na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e de N-hidroxisuccinimida (NHS). O conjugado de HyA-TBA (260 mg) foi dissolvido em DMSO anidro a 1% (w / v) e os reagentes de EDC (100 mg) e NHS (50 mg) foram adicionados. Finalmente, a cadeia longa de alquilo, também dissolvido em DMSO anidro foi adicionada à mistura de reação, a fim de se obter um grau de substituição compreendido entre 10 - 40%, sendo que a mistura foi agitada durante 24 h à temperatura ambiente. A solução resultante foi dialisada (Molecular Weight CutOff = 1 000 Da) em primeiro lugar numa uma solução de NaCl a 150 mM durante 3 dias (para permutar novamente os iões de TBA para os iões de sódio), e posteriormente numa solução de água destilada durante 2 dias. No final a solução obtida foi desidratada e um material "macio" branco foi obtido, o que corresponde ao conjugado de ácido hialurónico. O grau de substituição das moléculas de alquilo na cadeia HyA foi confirmado por

espectroscopia RMN de 1h. As amostras foram dispersas em água destilada a uma concentração de 1.0mg/mL e filtradas através de uma membrana com tamanho de poro de 0,22 micrómetros.

[0034] O nanogel obtido foi caracterizado quanto à sua distribuição de tamanho (diâmetro) e seu potencial zeta por análise de DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) a 25 °C. A dispersão do Nanogel (1,0 mL) foi analisada numa célula de poliestireno ou numa célula capilar, para o tamanho e distribuição do volume ou medições do potencial zeta, respetivamente, usando um laser de gás de He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) e um detetor de ângulo de 1738.

Encapsulação do péptido LLKKK18

[0035] O péptido LLKKK18, solubilizado em solução tampão fosfato-salino (PBS), foi encapsulado em 1,0 mg / mL de dispersões nanogel de cadeia alquilo-HyA, a uma concentração final de 0,1 mg / mL. Também foi realizado um controlo negativo de encapsulação do péptido com o mesmo volume e com a mesma concentração final de nanogel, utilizando a solução PBS. As amostras foram incubadas durante a noite a temperatura ambiente num sistema circular giratório. Os nanogéis encapsulados com o péptido foram posteriormente separados das fracções de péptido livre através de centrifugação num Centricon de 10.000 Da a 4.000 g durante 15 min. A solução da fração superior do centricon (contendo os nanogéis) e a solução da fração que atravessa a membrana do centricon (contendo o peptídeo livre) foram recolhidas em diferentes tubos eppendorf e recarregadas até perfazer o volume da solução original, com o objetivo de manter as concentrações originais. A quantidade de péptido em ambas as fracções foi quantificada pelo método Wadell num sistema JASCO V560, de acordo com a seguinte fórmula: $[LLKKK18] = (A_{215nm} - A_{225nm}) * 0,144$, em que A_{215nm} e A_{225nm} correspondem aos valores de

absorvância medida a 215 e 225 nm, respectivamente. A percentagem de péptido encapsulado foi determinada como a quantidade de péptido presente na fração superior (péptido encapsulado) em relação à quantidade total de péptido em ambas as frações.

Determinação da atividade antimicrobiana do péptido LLKKK18

[0036] A atividade antibacteriana do péptido LLKKK18 foi quantificada em placas de 96 poços de polipropileno, de acordo com o procedimento descrito por Vogt et al, com algumas modificações. O cultivo da estirpe de E. coli K12 foi realizado a 37°C em meio LB até meio da fase logarítmica (OD600 = 0,5). As células foram ressuspensas em meio Luria-Bertani (LB) a uma concentração de 1×10^6 e 1×10^5 células/ml; 100 µl de péptidos, a diferentes concentrações, inoculadas com 50 µl de suspensão bacteriana, e a incubação ocorreu durante a noite a 37°C, sendo que o crescimento bacteriano foi avaliado posteriormente pela medição da densidade ótica a 620 nm. Os resultados foram confirmados por plaqueamento de alíquotas de 25 µl da mistura de cada poço em placas de LB, com uma incubação de 16 h a 37°C, seguido do procedimento de contagem de colónias. Cada ensaio foi realizado três vezes e os controlos foram feitos por adição de água desionizada esterilizada. A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada como a menor concentração de péptido que inibe o crescimento bacteriano.

Avaliação da eficácia in vivo do sistema Hidrogel + Nanogel HA + Péptidos antimicrobianos + cerâmico granular em defeitos ósseos

Esta tarefa foi realizada recorrendo a um modelo animal que cria um ambiente funcional junto dos implantes comparável com o que acontece nos humanos, a cabra. Para a execução desta

tarefa foram utilizados 24 animais. Os animais utilizados apresentaram defeitos ósseos no osso frontal com uma dimensão de 14mm de diâmetro externo. Os defeitos foram preenchidos com as formulações definidas, de forma a testar a sua eficácia. Foi realizado um acompanhamento, monitorização e avaliação geral dos animais diariamente, tendo particular atenção aos sinais de dor e infeção. Também foi realizada, por rotina, uma medicação analgésica por 2-4 dias e uma antibioterapia por 7-10 dias após o procedimento cirúrgico. Os animais foram eutanasiados às 3, 6 e 12 semanas após a colocação dos implantes, recorrendo à administração de pentobarbital sódico e os defeitos ósseos foram avaliados através de radiografias, de seguida foi colhido e preservado o material ósseo e enviado para laboratórios especializados em preparação de lâminas de tecido ósseo mineralizado e análise por microCT, para monitorizar e caracterizar a formação de osso novo e o seu envolvimento com as estruturas adjacentes. Este procedimento foi realizado contratando os serviços a entidades externas acreditadas para o efeito. Paralelamente foi realizada a caracterização das amostras.

Guimarães, 29 de junho de 2016

entre 1,0% a 20% (v/v) para granulometria superior a 1000 μm .

16. Formulação, de acordo com as reivindicações 1 a 15, caracterizada por ser injetável.

Guimarães, 29 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 infecções e regeneração óssea caracterizada por compreender:
 - a. Hidrogel de dextrino;
 - b. Nanogel de polissacarídeos hidrofobizados embebidos no referido hidrogel e que incorporam um péptido antimicrobiano que compreende uma sequência, pelo menos 95% idêntica à SEQ. ID 1 - - KEFKRIVKRIKKFLRKLV;
 - c. Cerâmicos bioativos à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatite ou sua mistura.
2. Formulação, de acordo com a reivindicação, caracterizada por os nanogéis estarem presentes numa gama entre 0,1 e 5% (v/v) relativamente à matriz do hidrogel.
3. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por os nanogéis terem um diâmetro compreendido entre 20 - 300nm.
4. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por o diâmetro ser preferencialmente entre 50-150nm.
5. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por os nanogéis serem de dextrino ou ácido hialurónico.
6. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por ser preferencialmente de ácido hialurónico.

7. Formulação, de acordo com as reivindicações anteriores caracterizada por a concentração do péptido antimicrobiano variar entre 1 a 20 μM .
8. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a concentração ser, preferencialmente, entre 10 a 12 μM .
9. Formulação de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por o hidrogel de dextrino apresentar um peso molecular entre 1,000 a 20,000 g / mol.
10. Formulação de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por o hidrogel de dextrino apresentar um peso molecular entre 1,000-5,000 g / mol.
11. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por a granulometria dos cerâmicos bioativos ser superior a 250 μm .
12. Formulação, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizada por a quantidade dos cerâmicos bioativos estar entre 0.5-50% (v/v).
13. Formulação, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por a quantidade dos cerâmicos bioativos estar entre 1,0% a 40% (v/v) para granulometria entre 250 a 1000 μm .
14. Formulação, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por a quantidade dos cerâmicos bioativos ser preferencialmente 40% (v/v) para granulometria entre 250 a 500 μm .
15. Formulação, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizada por a quantidade de cerâmicos bioativos estar