

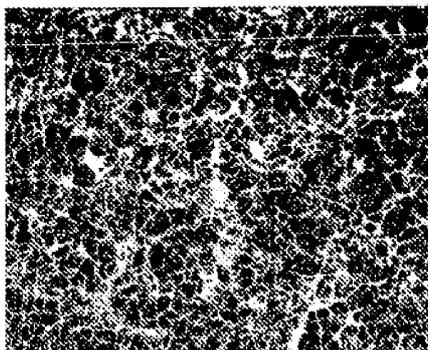
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2008.02.11	(73) Titular(es): THE ROYAL COLLEGE OF SURGEONS IN IRELAND 123 ST. STEPHENS GREEN DUBLIN 2 IE
(30) Prioridade(s): 2007.02.09 EP 07394001	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.11.18	(72) Inventor(es): FERGAL O'BRIEN IE JOHN GLESSON IE NIAMH PLUNKETT IE
(45) Data e BPI da concessão: 2013.08.14 222/2013	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UMA ESTRUTURA DE BASE DE COMPÓSITO DE COLAGÉNIO/HIDROXIAPATITE E PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO**

(57) Resumo:

UM PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA ESTRUTURA DE BASE DE COMPÓSITO DE COLAGÉNIO/HIDROXIAPATITE (HA) COMPREENDE OS PASSOS DE FORMAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO HOMOGÉNEA DE COLAGÉNIO E HA NUMA SOLUÇÃO ÁCIDA, LIOFILIZAÇÃO DA SUSPENSÃO ATÉ UMA TEMPERATURA DE CONGELAÇÃO FINAL DESEJADA SER ALCANÇADA PARA PRODUZIR A ESTRUTURA DE BASE DE COMPÓSITO E, FACULTATIVAMENTE, A LIGAÇÃO CRUZADA DA ESTRUTURA DE BASE DE COMPÓSITO, EM QUE A PROPORÇÃO DE HA PARA COLAGÉNIO É PELO MENOS 1:10 (M/M). É TAMBÉM PROPORCIONADA UMA ESTRUTURA DE BASE DE COMPÓSITO DE COLAGÉNIO/HIDROXIAPATITE (HA) COMPREENDENDO UMA DISTRIBUIÇÃO HOMOGÉNEA DE HIDROXIAPATITE NO INTERIOR DE UMA MATRIZ DE COLAGÉNIO, POROSA, DE LIGAÇÃO CRUZADA, EM QUE A PROPORÇÃO DE HA PARA COLAGÉNIO É PELO MENOS 1:10 (M/M). ADEQUADAMENTE, A ESTRUTURA DE BASE DE COMPÓSITO TEM UMA POROSIDADE DE PELO MENOS 99% (V/V) E UMA RIGIDEZ COMPRESSIVA DE PELO MENOS 0,3 KPA. AS ESTRUTURAS DE BASE DE COMPÓSITO DA INVENÇÃO PODEM SER USADAS PARA PROPORCIONAREM IMPLANTES DE OSSO OSTEOCONDUTORES E IMPLANTES DE ENGENHARIA DE TECIDOS.

RESUMO**"UMA ESTRUTURA DE BASE DE COMPÓSITO DE COLAGÉNIO/HIDROXIAPATITE E PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO****Fig 6:**

Um processo para a produção de uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) compreende os passos de formação de uma suspensão homogénea de colagénio e HA numa solução ácida, liofilização da suspensão até uma temperatura de congelação final desejada ser alcançada para produzir a estrutura de base de compósito e, facultativamente, a ligação cruzada da estrutura de base de compósito, em que a proporção de HA para colagénio é pelo menos 1:10 (*m/m*). É também proporcionada uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) compreendendo uma distribuição homogénea de hidroxiapatite no interior de uma matriz de colagénio, porosa, de ligação cruzada, em que a proporção de HA para colagénio é pelo menos 1:10 (*m/m*). Adequadamente, a estrutura de base de compósito tem uma porosidade de pelo menos 99% (*v/v*) e uma rigidez compressiva de pelo menos 0,3 kPa. As estruturas de base de compósito da invenção podem ser usadas para proporcionarem implantes de osso osteocondutores e implantes de engenharia de tecidos.

DESCRIÇÃO**"UMA ESTRUTURA DE BASE DE COMPÓSITO DE COLAGÉNIO/HIDROXIAPATITE E PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO"****CAMPO TÉCNICO**

A invenção diz respeito a um processo para a produção de uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA), e estruturas de base de compósito de colagénio/HA obteníveis pelo processo da invenção. Tais estruturas de base podem ser utilizadas na regeneração de osso e aplicações de engenharia de tecidos.

TÉCNICA ANTECEDENTE

Os enxertos ósseos estão em segundo lugar apenas precedidos pelas transfusões de sangue na lista de materiais transplantados em todo o mundo. Além disso, o mercado mundial estimado para material de enxerto ósseo é de cerca de € 650 milhões por ano. Todos os anos, até 4 milhões de procedimentos de substituição óssea são realizados em todo o mundo, o que exige o uso de um enxerto ósseo ou estrutura de base. O tratamento clínico mais comum é um autoenxerto por meio do qual é tirado osso do corpo do próprio paciente e reimplantado. Contudo, há uma quantidade limitada de osso que pode ser removido a partir de um sítio dador particular e é necessária cirurgia invasiva adicional

para a reimplantação. Uma outra opção é a utilização de um aloenxerto por meio do qual o osso é removido de um dador de órgãos. Problemas com esta abordagem derivam da origem do osso de um dador separado. Um maior risco de transmissão de doenças infecciosas está associado com tal material. Além disso, menos fatores de crescimento estão presentes em tal osso do dador porque ele não contém células vivas. Estes fatores de crescimento auxiliam o crescimento de osso novo. Uma estrutura de base implantável ideal que iria promover a formação de osso, enquanto facilita o carregamento da carga, reduziria a necessidade de aloenxertos ou autoenxertos. Contudo, presentemente estas abordagens tradicionais constituem mais de 90% de todos os procedimentos de enxerto ósseo. A razão para esta diferença, apesar dos problemas acima descritos, é que uma estrutura de base osteocondutora, mecanicamente competente, vascularizada que poderia ser usada para produzir osso *in vitro* ou causar completa osteogênese *in vivo*, persiste em ser desenvolvida. Um tal produto deverá ter um potencial comercial significativo.

Várias tentativas têm sido feitas utilizando numerosos materiais sintéticos para produzir estruturas de base viáveis para enxerto ósseo. Os exemplos incluem polistireno, titânio, ácido polilático (PLLA), ácido poliglicólico (PGA) e ácido polilaticoglicólico (PLGA). Contudo, todos estes materiais têm associados problemas e desvantagens, incluindo o risco de infecção e dificuldades que permitem a reabsorção adequada para promover a

vascularização e o crescimento para dentro de osso novo. Materiais biológicos tais como colagénio, gelatina, quitosano, agarose e glicosaminoglicano (GAG) à base de substrato, também têm sido utilizados. No entanto, estes materiais não possuem propriedades mecânicas suficientes para permitir o suporte de carga após o implante. WO 2006 095154 descreve compósitos de fosfato de cálcio colagénio que são produzidos usando mistura mecânica ou por precipitação *in situ* de uma fase do tipo HA.

AFIRMAÇÕES DA INVENÇÃO

De acordo com a invenção, é proporcionado um processo para a produção de uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) de acordo com as Reivindicações 1 a 9.

Tipicamente, a solução ácida ter uma molaridade de pelo menos 0,05 M. Numa forma de realização preferida da invenção, a proporção de HA para colagénio na suspensão é superior a 1:10 (*m/m*), e em que a molaridade da solução ácida é superior a 0,05 M. Tipicamente, a proporção de HA para colagénio na suspensão é pelo menos 02:10 (*m/m*), 3:10 (*m/m*), 4:10 (*m/m*), 5:10 (*m/m*). Numa forma de realização preferida da invenção, a proporção de HA para colagénio é desde 1:10 (*m/m*) até 50:10 (*m/m*), adequadamente desde 5:10 (*m/m*) até 30:10 (*m/m*). Adequadamente, a molaridade da solução ácida é de pelo menos 0,06 M, 0,07 M, 0,08 M, 0,09 M, 0,10 M, 0,20 M, 0,30 M, 0,40 M ou 0,50 M. Idealmente, a molaridade da solução ácida está entre 0,4 M e 0,6 M.

Numa forma de realização preferida da invenção, a proporção de HA para colagénio na suspensão é de pelo menos 5:10 (m/m), e em que a molaridade da solução ácida é de pelo menos 0,10 M. Tipicamente, a molaridade da solução ácida é de pelo menos 0,50 M.

Numa forma de realização preferida da invenção, a proporção de HA para colagénio na suspensão é de pelo menos 6:10 (m/m), 7:10 (m/m), 8:10 (m/m), 9:10 (m/m) ou 1:1 (m/m). Numa forma de realização da invenção, a proporção de HA para colagénio na suspensão é superior a 1:1 (m/m). Geralmente, quando tais níveis de HA são empregues na suspensão, a molaridade da solução ácida será de pelo menos 0,5.

Numa forma de realização preferida, a quantidade de colagénio na suspensão pode variar entre 4,0 g/L e 6,0 g/L.

Tipicamente, a solução ácida compreende uma solução de ácido acético. Contudo, outros ácidos orgânicos podem ser empregues para formar a solução ácida.

Adequadamente, a suspensão homogénea de colagénio/HA é formada em condições adequadas para minimizar a gelatinização do colagénio. Um método para assegurar a gelatinização mínima do colagénio durante a produção da suspensão homogénea é manter a suspensão a uma temperatura suficientemente baixa, geralmente entre 1 °C e 5 °C, adequadamente a cerca de 4 °C.

A liofilização é levada a cabo a uma velocidade de arrefecimento constante. Isto significa que a velocidade de arrefecimento durante a liofilização não vai variar mais do que +/-10% da velocidade de arrefecimento alvo, isto é, se a desejada velocidade de arrefecimento for de 1,0 °C/min e a velocidade atual de arrefecimento variar entre 0,9 °C/min e 1,1 °C/min, esta deverá não obstante ser ainda considerada uma velocidade de arrefecimento constante. Tipicamente, a velocidade de arrefecimento constante está entre 0,1 °C/min e 10 °C/min. Preferivelmente, a liofilização é realizada a uma velocidade de arrefecimento constante entre 0,5 °C/min e 1,5 °C/min. Mais preferivelmente, a liofilização é realizada a uma velocidade de arrefecimento constante entre 0,8 °C/min a 1,1 °C/min. Tipicamente, a liofilização é realizada a uma velocidade de arrefecimento constante de cerca de 0,9 °C/min. A temperatura da câmara de liofilização no início do processo de liofilização (ou seja, quando a pasta é colocada na câmara) é usualmente superior a 0 °C, preferivelmente cerca da temperatura ambiente.

A temperatura de congelação final desejada está entre -10 °C e -70 °C. Adequadamente, a temperatura de congelação final desejada está entre -30 °C e -50 °C. Normalmente, a temperatura de congelação final desejada está entre -35 °C e -45 °C, idealmente cerca de -40 °C.

O processo de liofilização inclui uma etapa de

secagem, o qual é realizado depois da temperatura de congelação final ser atingida. Este passo envolve o aquecimento da câmara de liofilização até uma temperatura de sublimação (geralmente de cerca de 0 °C), preferivelmente a uma velocidade de aquecimento constante. O processo inclui tipicamente um passo de sublimação final, onde uma fase de gelo na estrutura de base formada é sublimada sob vácuo durante um período de tempo adequado.

Numa outra forma de realização da invenção, o processo de liofilização compreende um passo de recozimento. Tipicamente, este passo envolve o aumento da temperatura na câmara de liofilização depois da temperatura final de congelação ser alcançada, e tipicamente mantendo a temperatura aumentada durante um período de tempo antes de se iniciar a fase de secagem. Por exemplo, se a temperatura de congelação final é de -20 °C, o passo de recozimento pode ser efetuado elevando em rampa a temperatura até -10 °C, e mantendo a essa temperatura durante um tempo suficiente para permitir que os cristais de gelo existentes cresçam, antes de finalmente ocorrer a secagem da estrutura de base. O tempo de recozimento pode ser variado de acordo com as características de poro desejadas, contudo tempos de recozimento entre 15 minutos e 120 horas são preferidos.

Geralmente, a HA empregue na presente invenção está na forma de pó. Adequadamente, o pó de HA é selecionado de entre o grupo compreendendo: pó de HA sinterizado, e pó de HA não sinterizado. Exemplos de pós de

HA sinterizados e não sinterizado adequados que são adequados para a presente invenção serão conhecidos dos peritos na técnica e são fornecidos abaixo.

Tipicamente, o pó de HA tem um tamanho de partícula entre 10 nm e 100 µm.

Adequadamente, o colagénio empregue na presente invenção compreende fibras de colagénio. Preferivelmente, as fibras de colagénio compreendem colagénio microfibrilar, preferivelmente colagénio de tendão de bovino microfibrilar.

Adequadamente, a suspensão de colagénio é misturada por centrifugação, em que o HA é adicionado no vórtice da suspensão durante a mistura centrífuga.

Tipicamente, o HA é adicionado em alíquotas. Adequadamente, as alíquotas são adicionadas à suspensão de colagénio em intervalos entre 30 e 240 minutos. Preferivelmente, a HA é adicionada à suspensão de colagénio em entre 2 e 5 alíquotas.

Numa forma de realização da invenção, a estrutura de base de compósito é reticulada ou de ligação cruzada. Tipicamente, a ligação cruzada da estrutura de base de compósito é feita por meios selecionados a partir do grupo compreendendo: reticulação ou ligação cruzada desidrotérmica e ligação cruzada química. Os agentes e

métodos químicos de ligação cruzada adequados serão bem conhecidos dos peritos na técnica e incluem hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodi-imida (EDAC). Quando a ligação cruzada desidrotérmica é empregue, a temperatura de reticulação situa-se entre 105 °C e 180 °C. Adequadamente, o processo de ligação cruzada ou reticulação é realizado durante pelo menos 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas ou 120 horas. Quando é empregue ligação cruzada com EDAC, a molaridade da solução de EDAC é 6 mmol por grama de compósito de colagénio/HA.

A invenção também diz respeito a uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) que pode ser obtido pelo método da invenção.

A invenção também diz respeito a uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) de acordo com as Reivindicações 10 a 13.

Preferivelmente, a estrutura de base de compósito da invenção tem uma porosidade de pelo menos 99% (v/v), 99,1% (v/v), 99,2% (v/v), 99,3% (v/v). Adequadamente, a estrutura de base de compósito da invenção tem uma porosidade de desde 98 até 99,5% (v/v), e mais preferivelmente desde 98,5 até 99,5% (v/v). O método de determinação da porosidade em % é descrito abaixo.

Adequadamente, a estrutura de base de compósito da invenção tem uma rigidez compressiva de pelo menos

0,5 kPa, 0,6 kPa. Adequadamente, a estrutura de base de compósito da invenção tem uma rigidez compressiva de desde 1 a 5 kPa, preferivelmente desde 1 a 4 kPa. As estruturas de base de compósito de ligação cruzada de EDAC têm uma rigidez compressiva de pelo menos 1 kPa, 1,5 kPa, 2 kPa, 2,5 kPa, 3 kPa, 3,5 kPa, 4 kPa. O método para determinar a rigidez compressiva é descrito abaixo.

Tipicamente, a proporção de HA para colagénio na estrutura de base de compósito é desde 1:10 até 50:10 (m/m), e preferivelmente pelo menos 2:10 (m/m), 3:10 (m/m), 4:10 (m/m), 5:10 (m/m), 6:10 (m/m), 7:10 (m/m), 8:10 (m/m), 9:10 (m/m) ou 1:1 (m/m). Numa forma de realização particularmente preferida da invenção, a proporção de HA para colagénio na estrutura de base de compósito é desde 5:10 até 30:10 (m/m).

A bioatividade *in vitro* da estrutura de base de compósito da invenção pode ser caracterizada por monitorização da atividade de osteoblastos MC3T3 na estrutura de base após incubação de 1 dia (para monitorizar o grau de fixação celular inicial), 7 dias, 21 dias e 28 dias (para monitorizar a proliferação celular). Numa forma de realização da invenção, a estrutura de base de compósito da invenção é caracterizada por um nível de proliferação de osteoblastos MC3T3 na estrutura de base após 7 dias de incubação de mais do que o número inicial de células semeadas na estrutura de base. Tipicamente, isto é pelo menos 1×10^6 células por 500 mm^3 de volume de estrutura de

base. Numa forma de realização preferida da invenção, a estrutura de base de compósito é caracterizada por um nível de proliferação de osteoblastos MC3T3 na estrutura de base em 28 dias de incubação menos o nível aos 7 dias de pelo menos $0,5 \times 10^6$ células, e adequadamente desde $0,5 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^6$ células. Um método para a determinação do nível de proliferação dos osteoblastos MC3T3 é como segue: Uma amostra cilíndrica de estrutura de base de compósito de 12,7 mm de diâmetro é semeada com 2×10^6 células MC3T3. Após 7 dias de incubação, o número de células presentes por estrutura de base é monitorizado utilizando o ensaio de ADN Hoechst 33258. Isto dá uma avaliação da adesão celular inicial. Após 14, 21 e 28 dias de incubação, o número de células presentes por estrutura de base é monitorizado utilizando o ensaio de ADN Hoechst 33258. A mudança no número de células presentes por estrutura de base ao longo do tempo (número de células no dia 28 menos o número de células no dia 7) é usada para avaliar a proliferação celular.

Numa forma de realização, a estrutura de base de compósito da invenção é caracterizada por ter uma condutividade de fluxo sob pressão através da estrutura de base de pelo menos $1 \times 10^{-10} \text{ m}^4/\text{Ns}$, adequadamente de $6 \times 10^{-10} \text{ m}^4/\text{Ns}$ até $1,4 \times 10^{-9} \text{ m}^4/\text{Ns}$, preferivelmente de $8 \times 10^{-10} \text{ m}^4/\text{Ns}$ até $1,2 \times 10^{-9} \text{ m}^4/\text{Ns}$. Tipicamente, a condutividade do fluxo sob pressão através do estrutura de base é pelo menos $10 \times 10^{-10} \text{ m}^4/\text{Ns}$.

Idealmente, a estrutura de base de compósito da invenção tem um elevado grau de interconectividade dos poros. Preferivelmente, a estrutura de base tem uma distribuição homogénea dos poros. Tipicamente, a estrutura de base tem um tamanho de poro homogéneo. Numa forma de realização, o estrutura de base é produzida sob a forma de uma folha. Tipicamente, a folha tem uma espessura média de pelo menos 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm e 10 mm.

A invenção também diz respeito a uma estrutura de base de compósito da invenção, ou obténivel por um método da invenção, que é semeada com células. Tipicamente, as células são células estaminais que são indiferenciadas, parcialmente diferenciadas ou completamente diferenciadas. Numa forma de realização, as células são selecionadas a partir do grupo constituído por: osteoblastos, e células estaminais mesenquimais.

A invenção também diz respeito a um implante de osso osteocondutor compreendendo uma estrutura de base de compósito de acordo com a invenção.

A invenção também diz respeito a um implante de engenharia de tecido compreendendo uma estrutura de base de compósito de acordo com a invenção. Assim, a estrutura de base da invenção pode formar uma base sobre a qual o tecido pode ser objeto de engenharia. Várias formas de tecido são previstas para esta aplicação incluindo, mas sem constituir limitação, cartilagem, ligamentos, músculos e órgãos.

A invenção também diz respeito a um substituto de enxerto ósseo maxilofacial compreendendo uma estrutura de base de compósito de acordo com a invenção.

A invenção também diz respeito a um substituto de enxerto ósseo dental compreendendo uma estrutura de base de compósito de acordo com a invenção.

A invenção também diz respeito a um implante de reparação de defeito de cartilagem compreendendo uma estrutura de base de compósito de acordo com a invenção.

A invenção também diz respeito a um implante de reparação do defeito osteocondral compreendendo uma estrutura de base de compósito de acordo com a invenção.

A invenção proposta é produzida a partir de dois constituintes primários do osso, nomeadamente a fase mineral, hidroxiapatite (HA), e a fase orgânica, colagénio. Como tal, é um substrato mais natural do que qualquer dos materiais anteriormente descritos que promovem a formação de osso. Além disso, através da combinação da elevada rigidez mecânica da HA com a biocompatibilidade, biodegradabilidade e arquitetura dos poros de uma estrutura de base de colagénio fabricada usando o processo específico da invenção, foi desenvolvido um produto que satisfaz todos os critérios requeridos para utilização como uma estrutura de base osteocondutora, incluindo excelente rigidez compres-

siva (para facilitar o manuseamento e a carga *in vivo*), e um elevado grau de porosidade, interconectividade dos poros e permeabilidade.

A hidroxiapatite é um material cerâmico. Os materiais cerâmicos são compostos inorgânicos, não metálicos, que formam ligações iônicas e covalentes. Eles são caracterizados por uma elevada rigidez mecânica, muito baixa elasticidade e uma superfície dura e quebradiça. Em tecidos vivos, a HA combina-se com colagénio para formar os principais constituintes do osso. Como material ela também exibe uma semelhança não só química mas também cristalina ao mineral ósseo. Contudo, os construtos de HA pura não são atrativos por numerosas razões, principalmente a rigidez, a natureza quebradiça e a fraca reabsorvabilidade do material [1]. Consequentemente, a estabilidade e controlo da velocidade de degradação do construto é problemática [2], inibindo severamente a reabsorção ótima, o subsequente crescimento interno de tecido e a restauração da integridade mecânica do sítio do defeito, todos os quais são determinantes significativos do implante com sucesso.

Em contraste com a HA, o segundo constituinte da presente invenção, o colagénio, já preenche todos os determinantes biológicos requeridos para o sucesso da implantação. É um polímero natural presente em numerosos tecidos do corpo humano, exibindo por conseguinte excelente biocompatibilidade. Como resultado o colagénio promove a adesão celular, a proliferação e a formação da matriz

extracelular (ECM). A sua velocidade de degradação pode ser controlada *in vivo*, através da variação da densidade de ligação cruzada. As ligações cruzadas são ligações químicas entre moléculas de colagénio. Elas proporcionam a resistência mecânica do colagénio e estabilizam as fibras de colagénio, impedindo as longas moléculas de colagénio semelhantes a bastões ou varetas de deslizar umas sobre as outras sob tensão [3]. A ligação cruzada é também um meio eficaz de controlar a velocidade de degradação de estruturas de base de colagénio, visto que as ligações cruzadas têm de ser quebradas antes da estrutura de base poder ser degradada. Existem vários métodos para aumentar o nível de ligações cruzadas em estruturas de base de colagénio. Um outro atributo significativo é a recente aprovação pela FDA e o sucesso clínico de estruturas de base à base de colagénio utilizadas para a regeneração de pele e nervos [4]. A principal desvantagem associada com o colagénio como uma estrutura de base é a sua falta de resistência mecânica inerente. Consequentemente, esta invenção combina ambos colagénio e HA para formarem um construto tridimensional compósito com as vantagens de ambos os constituintes e nenhuma das desvantagens.

Além dos próprios materiais constituintes atuais, o processo de fabrico da estrutura de base e subsequente morfologia do construto é vital para a determinação do sucesso do implante da estrutura de base *in vivo*. O fabrico da presente invenção envolve a utilização de uma técnica de fabrico de estrutura de base de colagénio especializada que tipicamente inclui a liofilização/secagem por congelação.

Tradicionalmente, o fabrico de estruturas de base porosas utilizando a liofilização envolve a rápida congelação ou arrefecimento brusco dos materiais constituintes do estrutura de base misturados em conjunto numa pasta. Isto resulta numa distribuição de poros extremamente irregular e elevado grau de variação de tamanho de poro. Além disso, o arrefecimento rápido altera a proporção do aspeto dos poros criados, conduzindo a formatos de poros não equiaxiais em toda a parte. O processo de fabrico de secagem por congelação da presente invenção facilita o controlo global de todas as principais determinantes morfológicas de viabilidade da estrutura de base. Faz isso precisamente pelo controlo da temperatura e pressão no interior da câmara de secagem por congelação durante as fases não só de congelação mas também de secagem do processo. A congelação ou secagem descontroladas em qualquer ponto durante o processo de fabrico tem sido mostrado a conduzir a distribuições, formas e tamanhos de poro heterogéneas, todas as quais são determinantes vitais da viabilidade das células semeadas. Usando um processo de secagem por congelação controlado, estruturas de base à base de colagénio porosas, reprodutíveis e homogéneas podem ser repetidamente fabricadas com altas interconectividade, porosidade e área de superfície de poro, todas as quais são vitais para o transporte de massa bem sucedido de células no interior da estrutura de base e em torno do tecido hospedeiro e proporcionar espaço para a vascularização e crescimento para dentro de tecido novo. Além disso, o

método da invenção permite o controlo extensivo do tamanho de poro do construto, facilitando a funcionalidade específica da célula. A presente revelação descreve o fabrico de uma estrutura de base de compósito, através da utilização do processo da invenção que resulta numa estrutura de base porosa tridimensional tendo alta porosidade, alta interconectividade dos poros e uma distribuição homogénea de HA no interior da matriz de colagénio.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1: Rigidez compressiva da estrutura de base de ligação cruzada sem EDAC em função do tipo de estrutura de base. (colagénio = estrutura de base de controlo de colagénio misturada em ácido acético 0,05 M, HA 10% (m/m) = colagénio + HA 10% (m/m) misturados em ácido acético 0,05 M, HA (L) 50% (m/m) = colagénio + HA 50% (m/m) misturados em ácido acético 0,1 M, HA 50% (m/m) = colagénio + HA 50% (m/m) misturados em ácido acético 0,5 M).

FIG 2: Rigidez compressiva da estrutura de base de ligação cruzada com EDAC em função do tipo de estrutura de base. (colagénio = estrutura de base de controlo de colagénio de ligação cruzada com EDAC misturada em ácido acético 0,5 M, HA 50 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 50% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 100 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 100% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 200 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 200% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M).

FIG. 3: Porosidade da estrutura de base como função do tipo de estrutura de base. (Colagénio = estrutura de base de controlo de colagénio de estrutura de base de ligação cruzada sem EDAC misturada em ácido acético 0,5 M, HA 50 = colagénio de estrutura de base de ligação cruzada sem EDAC + HA 50% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 100 = colagénio de estrutura de base de ligação cruzada sem EDAC + HA 100% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 200 = colagénio de estrutura de base de ligação cruzada sem EDAC + HA 200% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M).

FIG 4: Bioatividade *in vitro* como uma função do tipo de estrutura de base (t = 7, 14, 21, 28 dias). Densidade de sementeira inicial de 2 milhões de células utilizada em todas as estruturas de base (colagénio = estrutura de base de controlo de ligação cruzada com EDAC misturada em ácido acético 0,5 M, HA 50 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 50% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 100 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 100% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 200 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 200% (m/m) misturada em ácido acético 0,5 M).

FIG. 5: Bioatividade *in vitro* como função do tipo de estrutura de base (t = 28 dias - 7 dias). Nova bioatividade de estruturas de base entre dia 7 e dia 28 (colagénio = estrutura de base de controlo de colagénio de ligação cruzada com EDAC misturada em ácido acético 0,5 M, HA 50 =

colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 50% (*m/m*) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 100 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 100% (*m/m*) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 200 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 200% (*m/m*) misturada em ácido acético 0,5 M).

FIG. 6: Micro-TC da estrutura de base de compósito de acordo com a invenção.

FIG. 7: Secção da estrutura de base da Figura 6.

FIG. 8: Imagem de SEM (ou MEV) de estrutura de base de HA 50% (*m/m*) destacando a estrutura porosa homogénea e interconectada.

FIG. 9: Distribuição das partículas de mineral da região de interesse definida na Fig. 8.

FIG. 10 e 11: Imagens de SEM de uma estrutura de base de compósito de HA 50% (*m/m*) de ligação cruzada sem EDAC em concordância com ampliação de 10 vezes e 100 vezes, respetivamente.

FIG. 12: Permeabilidade da estrutura de base como função do tipo de estrutura de base. (colagénio = estrutura de base de controlo de colagénio de ligação cruzada com EDAC misturada em ácido acético 0,5 M, HA 50 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 50% (*m/m*) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 100 = colagénio de ligação cruzada com

EDAC + HA 100% (*m/m*) misturada em ácido acético 0,5 M, HA 200 = colagénio de ligação cruzada com EDAC + HA 200% (*m/m*) misturada em ácido acético 0,5 M).

FIG. 13: Raios X de um osso da parte de cima do crânio do rato e esquema acompanhante mostrando a posição do defeito e as posições das secções tomadas para as imagens de tomografia computadorizada (TC).

FIG. 14: Imagens digitalizadas de micro-TC de secções de um osso da calvária ou calva de rato com um defeito vazio.

FIG. 15 e 16: Imagens de varrimento por micro-TC de secções de um osso de calvária de rato tendo um defeito preenchido com uma estrutura de base de compósito de HA 50% (*m/m*) de ligação cruzada com EDAC da invenção semeada com células CEM de ratos.

FIG. 17 e 18: Imagens de varrimento por micro-TC de secções de um osso de calvária de rato tendo um defeito preenchido com uma estrutura de base de compósito de HA 200% (*m/m*) de ligação cruzada com EDAC da invenção semeada com células CEM de ratos.

FIG. 19 e 20: Imagens de varrimento por micro-TC de secções de um osso de calvária de rato tendo um defeito preenchido com uma estrutura de base de compósito de HA 50% (*m/m*) de ligação cruzada com EDAC da invenção (não semeada).

FIG. 21 e 22: Imagens de varrimento por TC de secções de um osso de calvária de rato tendo um defeito preenchido com uma estrutura de base de compósito de HA 200% (m/m) de ligação cruzada com EDAC da invenção (não semeada).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O fabrico de estruturas de base de controlo de colagénio da invenção e estruturas de base de HA 10% (m/m) foi feito utilizando o protocolo descrito na Forma de Realização 1, especificamente usando uma concentração inicial de ácido acético de 0,05 M. À medida que a proporção de HA foi aumentada até HA 50% (m/m), a mistura homogénea dos dois constituintes principais (colagénio e HA) tornou-se mais problemática. Um aumento na concentração inicial de ácido acético foi encontrada a aliviar este problema. O efeito desta concentração de ácido acético aumentada, foi investigada usando dois aumentos distintos na concentração de ácido acético, especificamente 0,1 M e 0,5 M. Estas formas de realização são descritas nos Exemplos 2 e 3, respetivamente. O fabrico de estruturas de base de controlo de colagénio de ligação cruzada com EDAC e estruturas de base de compósito tendo HA 50% (m/m), HA 100% (m/m) e HA 200% (m/m), são descritos no Exemplo 4.

EXEMPLO 1

400 mL de uma solução de ácido acético 0,05 M (pH 3,05) foi preparada usando água destilada e desionizada

(1,16 mL de ácido acético glacial foram adicionados a 398,84 mL de água destilada, desionizada).

Um sistema de arrefecimento de água WK1250 (Lauda, Westbury, NY, EUA) foi utilizado para refrigerar um recipiente de reação de vidro até uma temperatura constante de 4 °C durante uma hora. Este recipiente de reação foi utilizado para misturar os constituintes da estrutura de base, enquanto se manteve a pasta a uma temperatura constante de 4 °C. Isto impediu a desnaturação das fibras de colagénio como resultado da geração de calor durante o processo de mistura.

1,8 g de colagénio de tendão bovino microfibrilar (Collagen Matrix Inc., NJ, EUA) foram adicionados a 320 mL da solução de ácido acético 0,05 M. Esta suspensão foi misturada usando um misturador suspenso IKA Ultra Turrax T18 (IKA Works Inc., Wilmington, NC) a 15 000 rpm durante 90 minutos a 4 °C. 40 mL da solução de ácido acético foram misturados com hidroxiapatite (HA) em pó (Biotal, UK), especificamente 10% numa base ponderal de colagénio (0,18 g de HA). Uma alíquota de 10 mL desta solução de ácido acético/HA foi adicionada à pasta de colagénio/ácido acético no recipiente de reação arrefecido em 90 minutos. O método de entrega de suspensão de HA envolveu uma agitação vigorosa da suspensão imediatamente antes da injeção (assegurando uma suspensão homogénea das partículas minerais) no centro do vórtice do misturador através de uma seringa. Um tubo de borracha flexível foi unido ao bocal da

seringa para facilitar a injeção diretamente no centro do vórtice do misturador. Aliquotas de 10 mL (três no total) foram adicionadas subsequentemente à pasta a cada hora. Após a alíquota final da solução de HA em ácido acético ter sido adicionada, a pasta foi misturada durante 60 minutos subsequentes, conduzindo a um tempo total de mistura de 330 minutos (cinco horas e meia).

Uma vez que a fase de mistura foi completada, a pasta foi transferida para um copo de boca larga limpo, e desgaseado por vácuo a uma pressão de aproximadamente 4000 mTorr durante mais 60 minutos. Esta fase removeu quaisquer bolhas de ar não desejadas no interior da pasta, pois isso teria um efeito prejudicial sobre o processo de secagem por congelação subsequente. A estrutura de base foi produzida usando um processo de liofilização (secagem por congelação). Uma alíquota de 67,5 mL da pasta de colágeno/HA foi colocada num tabuleiro de amostras do secador por congelação murado fornecido pelo fabricante do secador por congelação (VirTis Co., Gardiner, Nova Iorque, EUA) e feito de aço inoxidável de grau 304. As dimensões internas do tabuleiro de amostras, eram de 127 mm de largura x 127 mm de comprimento x 38 mm de altura. A espessura da placa de base do tabuleiro é de 3 mm. O tabuleiro de amostras foi colocado na câmara do secador por congelação e colocado na prateleira de arrefecimento do secador por congelação a uma temperatura de 20 °C.

O processo de secagem por congelação envolveu o

arrefecimento da câmara do secador por congelação e o arrefecimento da prateleira a uma velocidade de arrefecimento constante (0,9 °C/min), com base num estudo prévio, até à temperatura final de congelação (40 °C). O principal determinante da morfologia do cristal de gelo durante o processo de secagem por congelação é a temperatura final de congelação. A temperatura da prateleira e da câmara foi em seguida mantida constante à temperatura final de congelação durante 60 minutos para completar o processo de congelação. A temperatura da prateleira foi em seguida aumentada em rampa até 0 °C ao longo de 160 minutos. A fase de gelo foi em seguida sublimada sob um vácuo de aproximadamente 200 mTorr a 0 °C durante 17 horas para produzir a estrutura de base porosa de colagénio/HA.

O construto poroso de colagénio/HA foi em seguida colocado num forno de vácuo (Fisher IsoTemp 201, Fisher Scientific, Boston, MA) para efetuar a ligação cruzada no colagénio via um processo de ligação cruzada desidrotérmico. AS estruturas de base foram colocadas no forno a vácuo a uma temperatura de 120 °C sob um vácuo de 50 mTorr durante 24 horas.

EXEMPLO 2

400 mL de uma solução de ácido acético 0,1 M (pH 2,9) foi preparada usando água destilada e desionizada (2,32 mL de ácido acético glacial foram adicionados a 397,68 mL de água destilada, desionizada). Um sistema de

arrefecimento de água WK1250 (Lauda, Westbury, NY, EUA) foi utilizado para arrefecer um recipiente de reação de vidro até uma temperatura constante de 4 °C durante uma hora. 1,8 g de colagénio de tendão bovino microfibrilar (Collagen Matrix Inc., NJ, EUA) foram adicionados a 320 mL da solução de ácido acético 0,1 M. Esta suspensão foi misturada utilizando um misturador suspenso IKA Ultra Turrax T18 sobrecarga (IKA Works Inc., Wilmington, NC) a 15 000 rpm durante 90 minutos a 4 °C.

40 mL de solução de ácido acético foram misturados com hidroxiapatite (HA) em pó (Biotal, UK), especificamente 50% numa base ponderal de colagénio (0,9 g de HA). Uma alíquota de 10 mL desta solução de ácido acético/HA foi adicionada à pasta de colagénio/ácido acético no recipiente de reação arrefecido em 90 minutos. Alíquotas de 10 mL (três no total) foram subsequentemente adicionados à pasta a cada hora. Após a alíquota final da solução de ácido acético/HA ser adicionada, a pasta foi misturada durante os 60 minutos subsequentes, conduzindo a um tempo de mistura total de 330 minutos (cinco horas e meia). Uma vez que a fase de mistura ser completada, a pasta foi transferida para um copo de boca larga limpo e desga-seificado em vácuo a uma pressão de aproximadamente 4000 mTorr durante mais 60 minutos.

A estrutura de base foi produzida usando um processo de liofilização (secagem por congelação). Uma alíquota de 67,5 mL da pasta de colagénio/HA foi colocada

num tabuleiro de amostras de secador por congelação murado fornecido pelo fabricante do secador por congelação (VirTis Co., Gardiner, Nova Iorque, EUA) e feito de aço inoxidável de grau 304. As dimensões internas da tabuleiro de amostras eram de 127 mm de largura x 127 mm de comprimento x 38 mm de altura. A espessura da placa de base do tabuleiro é de 3 mm. O tabuleiro de amostras foi colocado na câmara do secador por congelação e colocado na prateleira de arrefecimento do secador por congelação a uma temperatura de 20 °C.

O processo de secagem por congelação envolveu o arrefecimento da câmara do secador por congelação e o arrefecimento da prateleira a uma velocidade de arrefecimento constante (0,9 °C/min) até à temperatura final de congelação (40 °C). A temperatura da prateleira e da câmara foi em seguida mantida constante à temperatura final de congelação durante 60 minutos. A temperatura da prateleira foi em seguida aumentada em rampa até 0 °C ao longo de 160 minutos. A fase de gelo foi em seguida sublimada sob um vácuo de aproximadamente 200 mTorr a 0 °C durante 17 horas.

O construto de colagénio/HA poroso foi em seguida colocado num forno de vácuo (Fisher IsoTemp 201, Fisher Scientific, Boston, MA) para efetuar a ligação cruzada no colagénio via um processo de ligação cruzada desidrotérmico. AS estruturas de base foram colocadas no forno a vácuo a uma temperatura de 120 °C sob um vácuo de 50 mTorr durante 24 horas.

EXEMPLO 3

400 mL de uma solução de ácido acético 0,5 M (pH 2,55) foi preparada usando água destilada e desionizada (11,6 mL de ácido acético glacial foram adicionados a 388,4 mL de água destilada e desionizada). Um sistema de arrefecimento de água WK1250 (Lauda, Westbury, NY, EUA) foi utilizado para arrefecer um recipiente de reação de vidro até uma temperatura constante de 4 °C durante uma hora. 1,8 g de colagénio de tendão bovino microfibrilar (Collagen Matrix Inc., NJ, EUA) foram adicionados a 320 mL da solução de ácido acético 0,5 M. Esta suspensão foi misturada utilizando um misturador suspenso IKA Ultra Turrax T18 (IKA Works Inc., Wilmington, NC) a 15 000 rpm durante 90 minutos a 4 °C.

40 mL da solução de ácido acético foram misturados com hidroxiapatite (HA) em pó (Biotal, Reino Unido), especificamente 50%, 100% e 200%, numa base ponderal, de colagénio (0,9, 1,8 e 3,6 g de HA). Uma alíquota de 10 mL desta solução de ácido acético/HA foi adicionada à pasta de colagénio/ácido acético no recipiente de reação arrefecido em 90 minutos. Alíquotas de 10 mL (três no total) foram subsequentemente adicionadas à pasta a cada hora. Após a alíquota final da solução de ácido acético/HA ter sido adicionada, a pasta foi misturada durante os 60 minutos subsequentes, conduzindo a um tempo total de mistura de 330 minutos (cinco horas e meia). Uma vez que a

fase de mistura foi completada, a pasta foi transferida para um copo de boca larga limpo e desgaseada por vácuo a uma pressão de aproximadamente 4000 mTorr durante mais 60 minutos.

A estrutura de base foi produzida usando um processo de liofilização (secagem por congelação). Uma alíquota de 67,5 mL da pasta de colagénio/HA foi colocado num tabuleiro de amostras de secador por congelação murado fornecido pelo fabricante do secador por congelação (VirTis Co., Gardiner, Nova Iorque, EUA) e feito de aço inoxidável de grau 304. As dimensões internas da tabuleiro de amostras foram de 127 mm de largura x 127 mm de comprimento x 28 mm de altura. A espessura da placa de base do tabuleiro é de 3 mm. O tabuleiro da amostra foi colocado numa câmara do secador por congelação e colocado na prateleira de arrefecimento do secador por congelação a uma temperatura de 20 °C.

O processo de secagem por congelação envolveu o arrefecimento da câmara do secador por congelação o arrefecimento da prateleira a uma velocidade de arrefecimento constante (0,9 °C/min) até à temperatura final de congelação (40 °C). A temperatura da prateleira e da câmara foi em seguida mantida constante à temperatura final de congelação durante 60 minutos. A temperatura da prateleira foi em seguida aumentada em rampa para 0 °C ao longo de 160 minutos. A fase de gelo foi em seguida sublimada sob um vácuo de aproximadamente 200 mTorr, a 0 °C, durante 17

horas para produzir a estrutura de base porosa de colagénio/HA.

O construto de colagénio/HA poroso foi em seguida colocado num forno de vácuo (Fisher IsoTemp 201, Fisher Scientific, Boston, MA) para efetuar a ligação cruzada no colagénio via um processo de ligação cruzada desidrotérmico. AS estruturas de base foram colocadas no forno a vácuo a uma temperatura de 120 °C sob um vácuo de 50 mTorr durante 24 horas.

EXEMPLO 4

400 mL de uma solução de ácido acético 0,5 M (pH 2,55) foi preparada usando água destilada e desionizada (11,6 mL de ácido acético glacial foram adicionados a 388,4 mL de água destilada e desionizada). Um Sistema de arrefecimento de água WK1250 (Lauda, Westbury, Nova Iorque, EUA) foi utilizado para arrefecer um recipiente de reação de vidro até uma temperatura constante de 4 °C durante uma hora. 1,8 g de colagénio de tendão bovino microfibrilar (Collagen Matrix Inc., NJ, EUA) foram adicionados a 320 mL de uma solução de ácido acético 0,5 M. Esta suspensão foi misturada utilizando um misturador suspenso IKA Ultra Turrax T18 (IKA Works Inc., Wilmington, NC) a 15 000 rpm durante 90 minutos a 4 °C.

40 mL da solução de ácido acético foram misturados com hidroxiapatite (HA) em pó (Biotal, Reino

Unido), especificamente 50%, 100% e 200%, numa base ponderal, de colagénio (0,9, 1,8 e 3,6 g de HA). Uma alíquota de 10 mL desta solução de ácido/HA acético foi adicionada à pasta de colagénio/ácido acético no recipiente de reação arrefecido em 90 minutos. Alíquotas de 10 mL (três no total) foram subsequentemente adicionados à pasta a cada hora. Após a alíquota final da solução de HA em ácido acético ter sido adicionada, a pasta foi misturada durante os 60 minutos subsequentes, conduzindo a um tempo de mistura total de 330 minutos (cinco horas e meia). Uma vez que a fase de mistura esteja completa, a pasta foi transferida para um copo de boca larga limpo e desgaseada por vácuo a uma pressão de aproximadamente 4000 mTorr durante um adicional de 60 minutos.

A estrutura de base foi produzida usando um processo de liofilização (secagem por congelação). Uma alíquota de 67,5 mL da pasta de colagénio/HA foi colocada num tabuleiro de amostras de secador por congelação murado fornecido pelo fabricante do secador por congelação (VirTis Co., Gardiner, Nova Iorque, EUA) e feito de aço inoxidável de grau 304. As dimensões internas do tabuleiro de amostras, foram de 127 mm de largura x 127 mm de comprimento x 38 mm de altura. A espessura da placa de base do tabuleiro é de 3 mm. O tabuleiro da amostra foi colocado numa câmara do secador por congelação e colocado na prateleira de arrefecimento do secador por congelação a uma temperatura de 20 °C.

O processo de secagem por congelação envolveu o arrefecimento da câmara do secador por congelação e da prateleira de arrefecimento a uma velocidade de arrefecimento constante (0,9 °C/min) até à temperatura final de congelação (40 °C). A temperatura da prateleira e da câmara foi em seguida mantida constante à temperatura final de congelação durante 60 minutos. A temperatura da prateleira foi em seguida aumentada em rampa até 0 °C ao longo de 160 minutos. A fase de gelo foi em seguida sublimada sob um vácuo de aproximadamente 200 mTorr a 0 °C durante 17 horas para produzir a estrutura de base porosa de colagénio/HA.

O construto de colagénio/HA poroso foi em seguida colocado num forno de vácuo (Fisher IsoTemp 201, Fisher Scientific, Boston, MA) para efetuar a ligação cruzada no colagénio via um processo de ligação cruzada desidrotérmico. As estruturas de base foram colocadas no forno a vácuo a uma temperatura de 120 °C sob um vácuo de 50 mTorr durante 24 horas.

A seguir ao procedimento de ligação cruzada DHT, as estruturas de base foram quimicamente reticuladas utilizando hidrocloreto de etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodi-imida (EDAC) como agente de ligação cruzada. EDAC numa concentração de 6 mmol de EDAC por grama de estrutura de base foi misturada numa proporção molar de 5:2 com N-hidroxissuccinimida (EDAC:NHS = 5:2). As estruturas de base foram imersas nesta solução de EDAC/NHS e incubadas durante

2 horas à temperatura ambiente. As estruturas de base foram subsequentemente lavadas duas vezes usando salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas em PBS durante duas horas utilizando um agitador orbital para agitar a PBS.

Caraterização de Estruturas de base de Compósitos

Para o propósito deste estudo, todas as estruturas de base de colagénio/HA fabricadas foram comparados com uma estrutura de base de controlo feita de colagénio, fabricada usando o protocolo padrão utilizado neste laboratório de investigação, especificamente em solução de ácido acético 0,5 M e liofilizada a uma velocidade de arrefecimento constante até uma temperatura de congelação final de 40 °C.

1. Rigidez Mecânica

Para assegurar a sobrevivência uma vez implantado num defeito ósseo, um substituto de enxerto de osso deve possuir resistência intrínseca suficiente para poder resistir às forças a que está sujeito a carga completa em carga no interior do sítio do defeito afetado. A capacidade do utilizador fabricar um substituto de enxerto ósseo osteocondutor com força intrínseca suficiente para permitir a implantação num defeito que carrega uma carga foi o objetivo principal deste estudo. Através da utilização de tecnologia de compósito, um construto baseada em colagénio extremamente biocompatível é combinado com a hidroxiapatite cerâmica mais forte para desenvolver um substituto de

enxerto de osso com todas as vantagens de ambos os materiais e nenhuma das suas desvantagens. Todos os testes foram conduzidos sobre estruturas de base hidratadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). A testagem de compressão das amostras de estrutura de base foi levada a cabo usando uma máquina de testagem mecânica Zwick equipada com uma célula de carga de 5 N. Amostras de 8 mm de diâmetro (4 mm de altura) foram cortados das folhas usando um punção de couro afiada por um fio de metal redondo. As amostras foram em seguida pré-hidratadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) uma hora antes do teste numa placa de cultura de 24 poços. O protocolo de teste consistiu de dois ciclos: um ciclo pré-condição e um ciclo de teste. Para ambos os ciclos uma pré-carga de 0,15 mN foi aplicada e a posição foi mantida durante um minuto. Esta força foi selecionada na medida em que era suficientemente baixa (0,5% da carga em 10% de deformação) para assegurar o contacto com a amostra sem compressão da amostra antes do teste. A posição do rolo superior nesta pré-carga foi usada para medir a altura da estrutura de base. As estruturas de base hidratadas foram colocadas num rolo seco que foi em seguida submerso antes do abaixamento do rolo superior. Foi tomado cuidado para assegurar que nenhuma bolha ficaram presas entre o rolo superior e a estrutura de base. Para o pré-condicionamento, as amostras foram carregadas a 5%. Para o teste, as estruturas de base foram carregadas a 10% e descarregadas. Foi utilizada uma velocidade de deformação de 10% por minuto. Depois da testagem o diâmetro das amostras foi medido em três locais separados usando

craveiras com nónio. O módulo foi definido como o declive de um ajuste linear da curva de stress-deformação sobre 2-5% de deformação

A Figura 1 mostra o efeito da adição de HA à estrutura de base de ligação cruzada sem EDAC em rigidez compressiva. A adição de HA a 50% numa base ponderal foi encontrada a aumentar significativamente a rigidez compressiva medida por testes mecânicos em compressão não confinada. Um aumento da rigidez compressiva de cerca de 300% foi observada em relação aos controlos de produtos de estrutura de base de colagénio. De interesse particular foi o efeito da concentração de ácido acético sobre a eficiência da incorporação de HA no interior do construto. Acredita-se que isto explica o aumento relativamente pequeno na rigidez incorporando 10% de HA numa base ponderal na pasta de colagénio padrão sem aumentar a concentração do ácido acético em conformidade. Em conclusão, com tão pouco quanto 50% de HA numa base ponderal adicionado, um aumento superior a três vezes na rigidez é alcançado e por pequenos ajustamentos à concentração de ácido acético, ganhos máximos na rigidez do construto podem ser conseguidos com a adição de quantidades relativamente pequenas de HA. Por conseguinte, isto irá permitir aumentos significativos na proporção de HA adicionada pela alteração da concentração inicial de ácido acético de acordo com estudos futuros.

A Figura 2 mostra o efeito da adição de HA à

estrutura de base de ligação cruzada com EDAC sobre a rigidez compressiva. A estrutura de base, colagénio, da linha de base aumenta na rigidez de 0,2 kPa na Figura 1 até cerca de 1,5 kPa na Figura 2. A adição de HA ainda aumenta a rigidez das estruturas de base conforme pretendido, mas em quantidades mais baixas de HA, tais como 50% numa base ponderal de HA, o efeito da reticulação com EDAC ofusca isto. Contudo, a 200% de HA numa base ponderal, um aumento significativo na rigidez é visto como antes. A adição de todas as quantidades de HA foi mostrado melhorar significativamente aspetos de biocompatibilidade das estruturas de base de ligação cruzada e estes são discutidos nas secções 5 e 7 abaixo.

2. Porosidade da Invenção

A porosidade de um estrutura de base porosa é uma medida da proporção do volume de estrutura de base composto de espaço aberto, poroso, expresso como uma percentagem. Em termos mais simples, é a percentagem do volume de poros de um construto poroso. Um alta porosidade da estrutura de base é necessária para a difusão de materiais nutrientes/residuais para/a partir de células não só *in vitro* mas também *in vivo*. Um dos principais constrangimentos no desenvolvimento de estruturas de base de engenharia de tecidos tem sido a questão da degradação do núcleo, resultante da falta de fornecimento de nutrientes e da remoção de resíduos a partir do centro do construto. Como resultado, os construtos frequentemente falham uma vez

implantados devido a necrose avascular no centro da estrutura de base. Uma das grandes vantagens das estruturas de base à base de colagénio da presente invenção é a sua elevada porosidade. A porosidade da estrutura de base foi determinada pela medição precisa de uma amostra de estrutura de base de 8 mm seca de 4 mm de profundidade usando um balanço de massa. Usando a fórmula para o volume de um cilindro, $\pi r^2 h$, a densidade de cada amostra foi calculada dividindo a massa pelo volume. A porosidade foi calculada usando a fórmula

$$100 - [100 (\rho_{\text{estrutura de base}}/\rho_{\text{material}})]$$

onde $\rho_{\text{estrutura de base}}$ representa a densidade de uma dada amostra e ρ_{material} representa a densidade ponderada dos constituintes da estrutura de base (ou seja, $\rho_{\text{estrutura de base HA 10\% (m/m)}} = [m_{\text{colagénio}} + m_{\text{HA 10\% (m/m)}}] / [m_{\text{colagénio}}/\rho_{\text{colagénio}} + m_{\text{HA 10\% (m/m)}}/\rho_{\text{HA 10\% (m/m)}}]$).

A adição de HA aos construtos resultou numa diminuição da porosidade da estrutura de base, mas esta foi negligenciável em termos absolutos, como pode ser visto na Figura 3. Por conseguinte, as estruturas de base da invenção incorporam HA no construto enquanto mantêm uma porosidade muito alta para melhorar a migração celular para o centro da estrutura de base, para estimular a subsequente proliferação celular. Isto foi demonstrado ser verdade nos dados do estudo com animais *in vivo* mostrados abaixo.

Especificamente, a nossa gama de porosidades no interior das estruturas de base presentemente produziu

gammas desde 99,5% para colagénio puro até 99% para as estruturas de base de HA 200% (*m/m*).

3. Estrutura Mineral

A distribuição das partículas de mineral por toda a estrutura de base é um parâmetro/atributo difícil de quantificar. É um atributo que é muito mais fácil de visualizar e por conseguinte é difícil de definir um intervalo de valores a proteger. Foi visualizada utilizando dois métodos diferentes. O primeiro foi micro-TC que é mostrado na Figura 6, abaixo. O scanner de micro-TC utilizado nesta análise usa raios X para detetar tecido mineralizado. Por consequência, a Figura 6 mostra apenas as partículas minerais no interior duma estrutura de base de HA 100% (*m/m*). Sabendo que o colagénio não é visível, pode-se ver que as partículas minerais estão completamente e uniformemente distribuídos por toda a estrutura de base. Dado que a estrutura de base é de 99% de vazio, esta imagem mostra evidências conclusivas de que a HA está intimamente associada com as fibras de colagénio. A Figura 7 mostra uma fatia ou corte a 2 dimensões da mesma estrutura de base que ilustra a distribuição a partir de outro ponto de vista.

As Figuras 8 e 9 ilustram a distribuição de partículas minerais ao longo de uma estrutura de base de HA 50% (*m/m*) usando uma ferramenta de imagiologia distinta, Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV ou SEM). Ambas as imagens mostram a mesma região de interesse no interior da

estrutura de base de HA 50% (m/m). A Figura 8 mostra ambas as fases de colagénio e de HA. As partículas minerais são indistinguíveis a olho nu. Contudo, utilizando análise por Energia Dispersiva de Raio-X, a partícula de mineral pode ser detetada para a região de interesse (RDI) idêntica. Isto é mostrado na Figura 9 como pixéis brancos, representando partículas minerais. Em conjunto com os dados de micro-TC, estas imagens provam conclusivamente que as partículas minerais estão uniformemente e homogeneamente distribuídas por toda a estrutura de base e estão intimamente associadas com os suportes de colagénio.

4. Interconectividade dos poros

A interconectividade dos poros é outro atributo importante da estrutura de base que é muito difícil de definir quantitativamente em estruturas de base compostas principalmente por material biológico. No entanto, a interconectividade dos poros está fortemente relacionada com a permeabilidade da estrutura de base. A permeabilidade é discutida abaixo, mas a condutividade do fluxo está dependente da porosidade, tamanho dos poros e interconectividade dos poros em conjunto. Por consequência, a permeabilidade dá uma indicação da interconectividade dos poros quando o tamanho de poro e a porosidade são definidos.

As imagens de MEV de estruturas de base da invenção são proporcionadas para ilustrar os níveis extremamente

elevados de interconectividade dos poros que podem ser facilmente observados. A Figura 10 mostra um estrutura de base HA 50% (*m/m*) com ampliação de 10 vezes e a estrutura de poros obviamente interconectados à superfície. Isto tem sido mostrado como sendo idêntico usando secções finas tomadas a partir de tais amostras. A Figura 11 mostra a mesma estrutura de base HA 50% (*m/m*) com ampliação de 100 vezes. Esta imagem mostra a interconectividade dos poros. A esta ampliação, a estrutura dos poros está interconectada de forma conclusiva.

5. Bioatividade In Vitro

O efeito da adição de HA à estrutura de base de colagénio foi avaliado pela quantificação da proliferação de osteoblastos MC3T3E1 nas estruturas de base após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação. Foi observado que a adição de HA às estruturas de base não tem qualquer efeito prejudicial sobre a atividade celular. Na verdade, foi verificado que o oposto é verdade aos 28 dias após a sementeira. Aumentando a proporção de HA para HA 200% (*m/m*) verificou-se a estimulação da proliferação celular mesmo mais do que com a estrutura de base de colagénio puro de controlo. A Figura 4 mostra o número absoluto de células retidas nas estruturas de base.

Como pode ser visto, as estruturas de base de HA 50% (*m/m*) retiveram um número significativamente mais baixo de células devido a restrições empíricas. Consequen-

temente, a Figura 4 não dá a melhor indicação da bioatividade. Conseqüentemente, a Figura 5 ilustra o número médio de células líquido deixadas no interior dos tipos de estrutura de base aos 28 dias. A redução líquida de 0,5 milhões na proliferação das células é visto nos construtos de colagénio puro (aproximadamente 20% de redução), o que não é surpreendente, dado que o construto de colagénio puro é favorável mas não otimizado para células osteoblastos. No entanto, a adição de HA 50% (m/m), 100% (m/m) e 200% (m/m) resulta num aumento da proliferação celular de aproximadamente 500%, 50% e 30%, respetivamente (Figura 4).

6. Permeabilidade da Invenção

A permeabilidade de uma estrutura de base porosa é essencialmente a condutividade do fluxo sob pressão através daquele meio poroso. A alta permeabilidade da estrutura de base é essencial para a viabilidade a longo prazo da estrutura de base *in vivo*, uma vez que permite que as células migrem para o centro da estrutura de base e facilita a vascularização *in vivo*. As estruturas de base de HA 50% (m/m), 100% (m/m) e 200% (m/m) exibiram uma permeabilidade dos tecidos média significativamente aumentada relativamente às estruturas de base de colagénio de controlo. Isto foi uma descoberta surpreendente mas positiva deste estudo uma vez que mostra que a adição de HA auxilia de facto o fluxo de fluido através da estrutura de base. Acredita-se que este aumento na condutividade do fluxo através da estrutura de base porosa é devido ao aumento da

rigidez da estrutura de base. O protocolo empírico utilizado para quantificar a permeabilidade da estrutura de base é descrito em detalhe na referência [5] (O'Brien *et al.*, 2007, Secção 2.2, páginas 7-10).

7. Teste em Animal In Vivo

Um ensaio em animal pequeno foi realizado para determinar o potencial da presente invenção para estimular a osteogénese e mineralização de um defeito de tamanho crítico no osso. Nove ratos Wistar foram utilizados durante o ensaio. Um defeito de tamanho crítico foi criado na calvária dos ratos. Um animal foi deixado com um defeito vazio como controlo. Os outros oito animais foram divididos em grupos. Especificamente, quatro dos defeitos foram preenchidos com estruturas de base de HA 50% (*m/m*), duas das quais foram semeadas com células estaminais mesenquimatosas (CEM) de rato e duas das quais foram deixadas não semeadas. Isto foi para investigar o potencial da engenharia de tecidos *versus* tipos de estrutura de base fora de prateleira. Os restantes quatro defeitos em amostras foram preenchidos com estruturas de base de HA 200% (*m/m*) e, uma vez mais, estes quatro foram divididos igualmente entre estruturas de base semeadas e não semeadas. Após 28 dias nas calvárias dos ratos, os animais foram sacrificados e os ossos das calvárias foram removidos. Estes foram processados e analisados usando micro-TC para investigar a presença de estrutura de base no interior do defeito e para observar o efeito dos tipos de estrutura

de base sobre o processo de cicatrização, osteogênese e produção de matriz mineralizada. Os números das secções a seguir mostram fatias 2-dimensionais retiradas do rato com defeito vazio. As fatias foram secções coronais através do osso da calvária. Os defeitos foram de 5 mm de diâmetro e perfeitamente circulares. As secções mostradas nos dados da micro-TC são representadas no esquema abaixo na Figura 13.

Defeito vazio (Fig. 14)

Os dados obtidos em animais de defeitos vazios mostraram o defeito foi preenchido com tecido fibroso macio como parte do processo de cura. Isso era esperado e tem sido visto em testes com animais realizados anteriormente no nosso grupo de engenharia de tecidos. Em alguns pontos ao longo do defeito após o julgamento do dia 28, pequenas partículas de material denso foram observadas dentro do defeito vazio, mas estas foram raramente observadas e não são suficientemente densas para indicar a cura significativa na amostra de defeito vazio. Exemplos disto são mostrados nas imagens de raios X de micro-TC mostradas abaixo.

50% (m/m)-Semeada 1 (Fig. 15)

As estruturas de base de HA 50% (m/m) semeadas com células apresentaram resultados mais promissores. Estas estruturas de base foram semeadas com células estaminais mesenquimatosas de rato antes da implantação. Como pode ser visto a partir das imagens de raios-X de micro-TC representativas abaixo, pequenas bolsas heterogêneas de

material ligeiramente mineralizado foram vistas não apenas na periferia da interface defeito-osso, mas também no centro das estruturas de base. Houve um número significativamente mais alto de casos destas bolsas de mineralização vistas relativamente aos dados de defeito vazio e pareciam ser mais brilhantes na sua intensidade relativamente aos casos observados no defeito vazio.

50% (m/m)–Semeada 2 (Fig. 16)

A nossa segunda estrutura de base de HA 50% (m/m) semeada com células mostrou resultados muito melhorados relativamente à primeira estrutura de base de HA 50% (m/m) semeada com células e conseqüentemente o defeito vazio. Casos significativos de tecido fortemente mineralizado foram vistos em pontos ao longo do defeito preenchido com estrutura de base. Isto foi especialmente evidente na periferia da interface estrutura de base-osso. O grau de mineralização não foi tão alto como o visto no osso circundante, mas foi muito semelhante. Isto pode ser visto como os níveis de intensidade quase idênticos do tecido mineralizado visto no interior do defeito preenchido com estrutura de base e o do osso circundante.

200% (m/m)–Semeada 1 (Fig. 17)

A primeira estrutura de base de HA 200% (m/m) semeada com células mostrou resultados significativamente melhorados em comparação com as estruturas de base de HA 50% (m/m). Em quase todos os pontos examinados ao longo

de todo o defeito, foram vistos níveis significativos de mineralização a partir da periferia do defeito em todo o caminho para o centro do defeito preenchido com estrutura de base. Nesta amostra, o nível de mineralização não foi tão elevado quanto o do tecido ósseo envolvente indicado pela diferença relativa na intensidade da imagem das partículas mineralizadas no interior do defeito preenchido com estrutura de base.

200% (m/m) – Semeada 2 (Fig. 18)

A segunda estrutura de base de HA 200% (m/m) semeada com células mostrou resultados significativamente melhorados em comparação com todas as estruturas de base anteriores. Num número significativo de áreas examinadas ao longo de todo o defeito, foram vistos níveis significativos de mineralização a partir da periferia do defeito em todo o caminho para o centro do defeito preenchido com estrutura de base. Ao contrário da primeira estrutura de base de HA 200% (m/m) semeada com células, o tecido mineralizado formado não foi de natureza particulada, mas foi contínuo através de todo o defeito preenchido com estrutura de base. O mais interessante, esta mineralização contínuo foi vista na parte mais larga do defeito. Nesta amostra, o nível de mineralização foi aproximadamente idêntico ao do tecido ósseo circundante indicado pela intensidade de imagem semelhante do material mineralizado no interior do defeito preenchido com estrutura de base.

50% (m/m)–Não Semeada 1 (Fig. 19)

Os resultados de defeitos preenchido com estrutura de base livre de células para as estruturas de base de HA 50% (m/m) foram muito semelhantes às das estruturas de base de HA 50% (m/m) semeadas com células. Tecido significativamente mineralizado foi visto por toda a parte dos defeitos preenchidos com estrutura de base, mas não era de natureza contínua. No entanto, a intensidade do tecido mineralizado foi marginalmente maior do que a vista nas amostras semeadas com células. Isto foi visto em todas as amostras não semeadas com células que se seguem e indicou que um construto livre de células pode ter um melhor desempenho *in vivo*.

50% (m/m)–Não Semeada 2 (Fig. 20)

Esta amostra não semeada com células de HA 50% (m/m) mostrou resultados semelhantes a todas as outras amostras de HA 50% (m/m). Depois de 28 dias de ensaio, foi observada evidência do início da mineralização da estrutura de base não só na periferia mas também no centro do defeito preenchido com estrutura de base, mas o tecido mineralizado não era contínuo. Contudo, a intensidade das partículas mineralizadas indicaram uma mineralização semelhante à do osso circundante.

200% (m/m)–Não Semeada 1 (Fig. 21)

Conforme visto nas amostras semeadas com células da HA 200% (m/m), a amostra da HA 200% (m/m) não semeada

mostrou níveis significativos de mineralização na periferia e no centro do defeito preenchido com estrutura de base num número significativo de áreas através de todo o defeito. Este tecido mineralizado foi de natureza contínua diferente daquele visto nas amostras de HA 50% (m/m).

200% (m/m) – Não Semeada 2 (Fig. 22)

Conforme visto na amostra não semeada com células da HA 200% (m/m), esta amostra de HA 200% (m/m) não semeada mostrou níveis significativos de mineralização na periferia e no centro do defeito preenchido com estrutura de base num número significativo de áreas através de todo o defeito. Este tecido mineralizado foi de natureza contínua diferente daquele visto nas amostras de HA 50% (m/m).

A invenção não está limitada às formas de realização aqui descritas. Como tal, as três formas de realização da invenção aqui descritas representam uma pequena proporção do número total de variantes de estruturas de base possíveis, utilizando o mesmo protocolo de fabrico do núcleo. Quer os próprios constituintes quer as fases ou passos de processo da forma de realização específica podem ser variados para produzirem uma gama variada de construtos, otimizados para a utilização específica da aplicação. As variações possíveis incluem:

Concentração de ácido acético: A concentração do ácido acético na pasta de colagénio inicial pode ser

alterada para satisfazer aplicações específicas. Aumentando a concentração encoraja-se uma integração mais rápida e homogénea das partículas de HA no interior da pasta da mistura. Além disso, esta concentração também possui um efeito significativo sobre não só as propriedades mecânicas mas também a biocompatibilidade da estrutura de base. Estes efeitos são discutidos em detalhe na Secção "Caraterização da Invenção" acima. Adequadamente, a concentração de ácido acético pode ser variada entre 0,05 M e 5 M.

Quantidade de Colagénio: A quantidade de colagénio pode ser variada dentro da pasta inicial do colagénio. O aumento da quantidade de colagénio resulta num aumento da rigidez mecânica da estrutura de base resultante. Isto também tem um efeito significativo sobre a biocompatibilidade da estrutura de base. Adequadamente, a quantidade de colagénio pode variar desde 0,5 g/L até 50 g/L de solução de ácido acético (1/10 e 10 vezes a concentração de colagénio padrão, respetivamente).

Quantidade de Hidroxiapatite: A quantidade de HA pode ser variada dentro de um intervalo especificado em relação à proporção de colagénio no interior da pasta de estrutura de base antes do fabrico. Especificamente, a quantidade de HA pode adequadamente variar desde 10 a 1000 por cento numa base ponderal da quantidade de colagénio utilizada. Verificou-se que aumentando o conteúdo de HA se aumenta significativamente a rigidez mecânica da estrutura de base fabricada.

Tipo de Hidroxiapatite: A presente invenção pode ser fabricado usando ambas as formas sinterizadas, não sinterizadas, e outras formas do pó de HA.

Adição de Hidroxiapatite: Ambos o volume da alíquota de HA e o intervalo de injeção podem ser variados para facilitar a mistura dos dois constituintes primários da pasta. Geralmente, o intervalo de injeção pode ser variada, desde 30 minutos até 240 minutos. Além disso, o volume da alíquota pode ser adequadamente variado desde 1 mL até 100 mL. Tal liberdade facilita a otimização de qualquer forma de realização da invenção particular.

Tamanho de Partícula da Hidroxiapatite: Tipicamente, o tamanho de partícula da HA pode ser variado desde 10 nm até 100 μm para adaptar a aplicações específicas.

Temperatura de Congelação Final: A temperatura de congelação final alcançada durante o processo de secagem por congelação determina o tamanho médio dos poros no interior das estruturas de base fabricadas. Esta temperatura final de congelação pode ser variada para produzir estruturas de base com vários tamanhos de poro médios específicos para uma aplicação específica ou tipo de célula. Adequadamente, a temperatura final de congelação pode ser variada desde $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Interface de Congelação: A interface de conge-

lação colocada entre a pasta da forma de realização e a prateleira de arrefecimento do secador por congelação pode ser variada. O tipo de interface de congelação afeta a transmissão de energia por calor de/para a pasta/estrutura de base e pode alterar a estrutura dos poros da estrutura de base final. Quatro opções principais estão disponíveis, especificamente um recipiente com paredes de interface definida feito de ou metal (1), plástico (2), uma membrana polimérica fina (3) ou nenhuma interface (4).

Velocidade de congelação: A velocidade de congelação determina a velocidade de nucleação de cristais de gelo no interior da pasta de colagénio/HA durante o processo de secagem por congelação e controla a homogeneidade do processo de formação de poros. A velocidade de arrefecimento é variada para otimizar o processo de congelação para os vários tipos de interfaces disponíveis entre a pasta e a prateleira de arrefecimento do secador por congelação (por exemplo, metal, plástico, nenhuma). Tipicamente, a velocidade de congelação pode ser variada desde 0,01 °C/min até 10 °C/min.

Recozimento: Uma fase de recozimento pode ser empregue durante o processo de secagem por congelação e permite a criação de poros com um diâmetro médio significativamente maior do que os tamanhos de poro atingíveis através da variação da temperatura final de congelação sozinha. O tempo de recozimento pode ser variado desde 15 minutos até 36 horas. Quanto maior o tempo de recozimento, maior será o tamanho médio de poro final.

Método de Ligação Cruzada da Estrutura de base:
O método de ligação cruzada ou reticulação pode ser um de numerosas possíveis técnicas, de natureza quer desidrotérmica quer química. Além disso, ambas as técnicas podem ser empregues de forma consecutiva. Opções de ligação cruzada específicas incluem glutaraldeído, carbodi-imidas (EDAC), transglutaminase microbiana (mTgase), ligação cruzada desidrotérmica (DHT) e radiação ultravioleta (UV).

Temperatura/Concentração da Ligação Cruzada da Estrutura de base: O colagénio da estrutura de base seca por congelação pode ser sujeito a ligação cruzada por via desidrotérmica para aumentar a rigidez mecânica da estrutura de base. A temperatura da ligação cruzada pode ser variada desde 105 °C até 180 °C, com um correspondente aumento na rigidez da forma de realização. Além disso, quando são usados métodos de ligação cruzada químicos, a concentração da solução de ligação cruzada pode ser variada para alterar a extensão da ligação cruzada química.

Duração da Ligação Cruzada da Estrutura de base: O tempo de exposição a ligação cruzada pode também ser variado para alterar a extensão do processo de ligação cruzada através de toda a estrutura de base. Isto pode ser variado entre 24 e 120 horas para alterar a especificação mecânica final da estrutura de base.

REFERÊNCIAS

- [1] Tancred D. C., Carr A. J. e McCormack B. A., "Development of a new synthetic bone graft" in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **9(12)** (1998) 819-823.
- [2] Dong J. K., Luthy H., Wohlwend A. e Scharer P., "Heat-pressed ceramics: technology and strength" in *International Journal of Prosthodontics*, **5(1)** (1992) 9-16.
- [3] Bailey A. J., Light N. D. e Atkins E. D. T., "Chemical crosslinking restrictions on models for the molecular organisation of the collagen fibre" in *Nature*, **288** (1980) 408-410.
- [4] Yannas I. V., *Tissue and Organ Regeneration in Adults*, Springer, Nova Iorque, 2001.
- [5] O'Brien F. J., Harley B. A., Yannas I. V. e Gibson L. J., "The effect of pore size on cell adhesion in collagen gag scaffolds" in *Biomaterials*, **26** (2005) 433-441.
- [6] O'Brien F. J., Harley B. A., Waller M. A., Yannas I. V., Gibson L. J. e Prendergast P. J., "The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering" in *Technology and Healthcare Invited Article*, **15** (2007) 3-17.

REIVINDICAÇÕES

1. Um processo para a produção de uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA), compreendendo o passo de formação de uma suspensão homogénea de colagénio e HA numa solução ácida, liofilização da suspensão a uma velocidade de arrefecimento constante até uma temperatura de congelação final de entre $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ser atingida, e o aquecimento da câmara de liofilização até uma temperatura de sublimação onde uma fase de gelo na estrutura de base formada ser sublimado sob vácuo durante um período de tempo adequado para produzir a estrutura de base de compósito, em que a proporção de HA para o colagénio na suspensão é pelo menos 1:10 (m/m), e a quantidade de colagénio na suspensão é desde 3 g/L até 8 g/L (m/m), em que a suspensão homogénea de colagénio/HA é formada pelos passos de formação de uma suspensão homogénea ácida de colagénio, e subsequentemente a adição da HA à suspensão de colagénio sob condições de mistura para assegurar uma distribuição homogénea da HA no interior da suspensão de colagénio, em que a HA é adicionada na forma duma suspensão de HA ácida.

2. Um processo de acordo com a Reivindicação 1, no qual em que a suspensão ácida de HA é adicionada em alíquotas.

3. Um processo de acordo com a Reivindicação 2,

no qual as alíquotas são adicionadas à suspensão de colagénio em intervalos de entre 30 e 240 minutos.

4. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, no qual a solução ácida tem uma molaridade de pelo menos 0,1 M.

5. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, no qual a proporção de HA para colagénio na suspensão é desde 1:10 (m/m) até 50:10 (m/m).

6. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, no qual a liofilização é realizada a uma velocidade de arrefecimento constante entre 0,5 °C/min e 1,5 °C/min.

7. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, no qual a temperatura de congelação final desejada está entre -30 °C e -50 °C.

8. Um processo de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes compreendendo ainda um passo de recozimento que compreende o aumento da temperatura na câmara de liofilização após a temperatura final de congelação ter sido alcançada, e que mantém a temperatura aumentada durante um período de tempo antes de se iniciar o passo de secagem.

9. Um processo de acordo com qualquer uma das

Reivindicações precedentes, no qual a estrutura de base de compósito é sujeita a ligação cruzada por um meio selecionado do grupo constituído por: ligação cruzada desidrotérmica e ligação cruzada química.

10. Uma estrutura de base de compósito de colagénio/-hidroxiapatite (HA) compreendendo uma distribuição homogénea de pó de hidroxiapatite no interior de uma matriz de colagénio porosa, em que a proporção de HA para colagénio é pelo menos cerca de 1:10 (*m/m*), e em que a estrutura de base de compósito tem uma porosidade de pelo menos 98% (*v/v*) e uma rigidez compressiva de pelo menos 0,4 kPa.

11. Uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) de acordo com a Reivindicação 10 tendo um tamanho de poro homogéneo.

12. Uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) de acordo com a Reivindicação 10 ou 11, a qual é sujeita a ligação cruzada desidrotermicamente e com EDAC e tem uma rigidez compressiva de pelo menos 1,0 kPa.

13. Uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) de acordo com qualquer das Reivindicações 10 a 12 na qual a estrutura de base de compósito é caracterizada por ter uma condutividade de fluxo sob pressão através da estrutura de base de pelo menos $1 \times 10^{-10} \text{ m}^4/\text{Ns}$.

14. Uma estrutura de base de compósito de colagénio/hidroxiapatite (HA) de acordo com qualquer das Reivindicações 10 a 13 para utilização como um implante de osso osteocondutor, um implante de engenharia de tecidos, um substituto de enxerto de osso maxilofacial, um substituto de enxerto de osso dental, um implante de reparação de defeito de cartilagem ou um implante de reparação de defeito osteocondral.

Lisboa, 12 de novembro de 2013

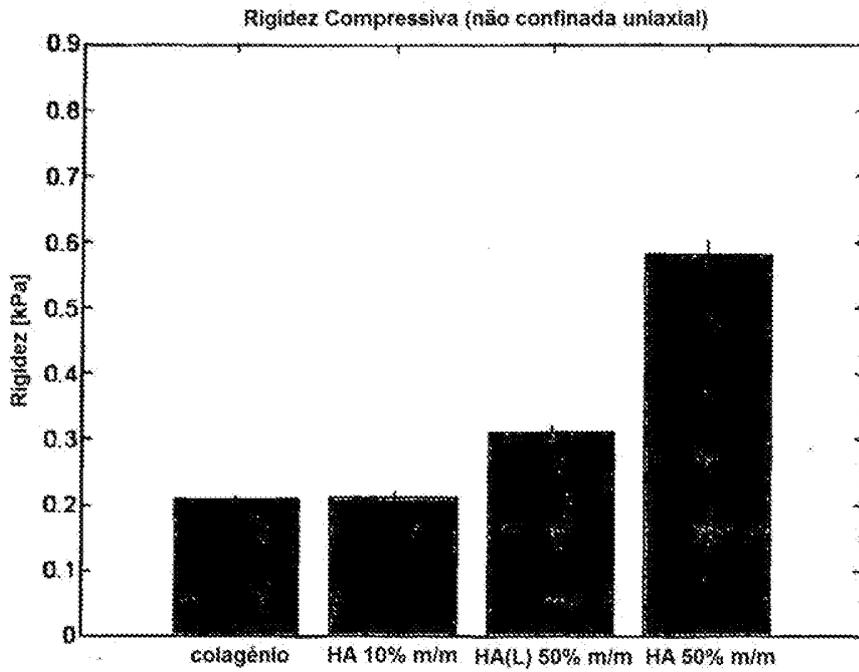


Fig. 1

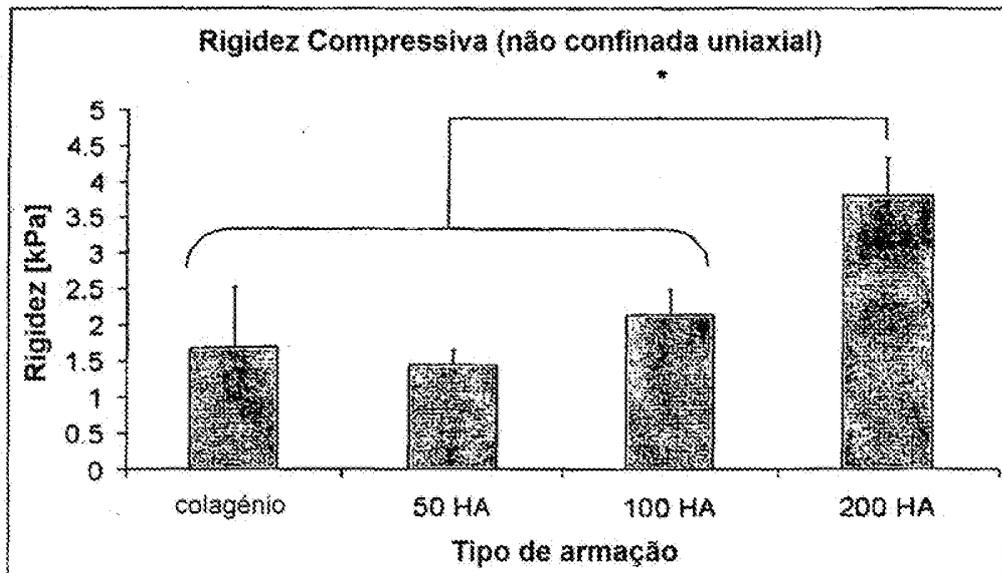


Fig. 2

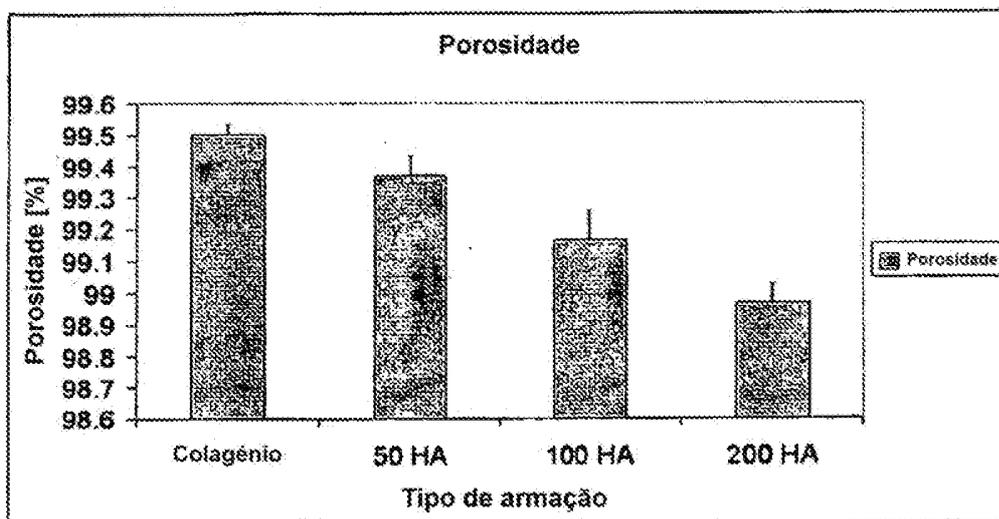


Fig. 3

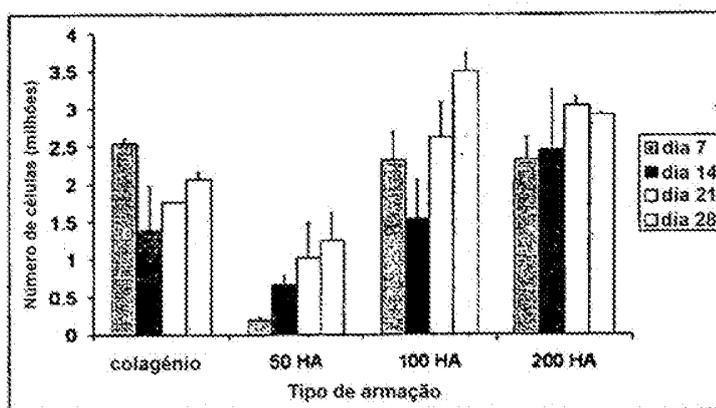


Fig. 4

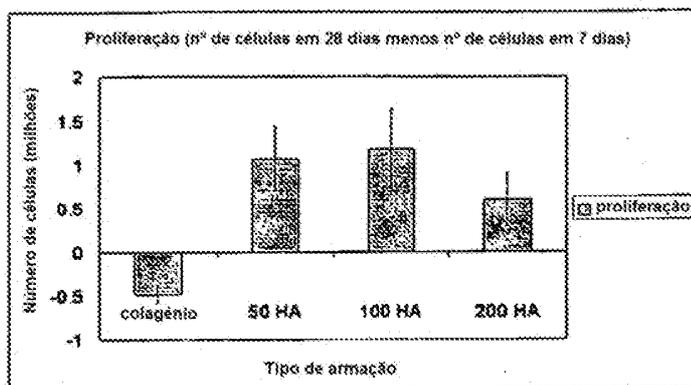


Fig. 5

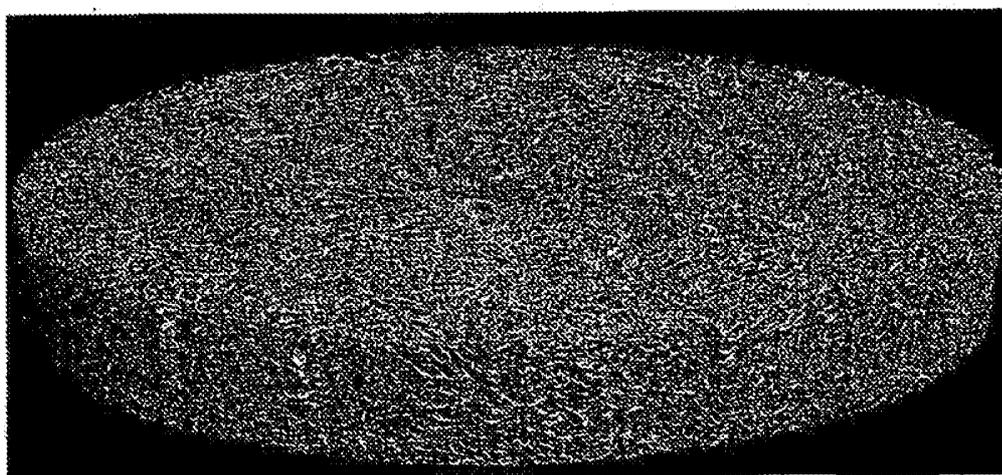


Fig. 6

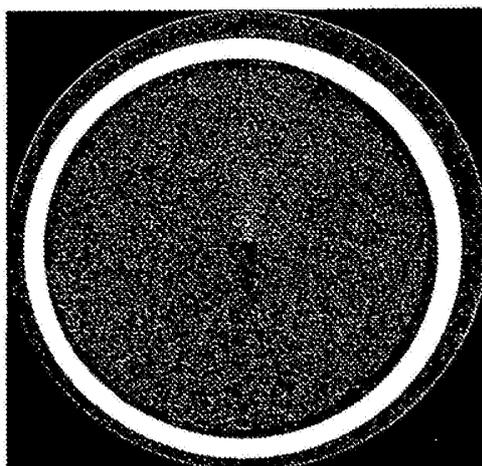


Fig. 7

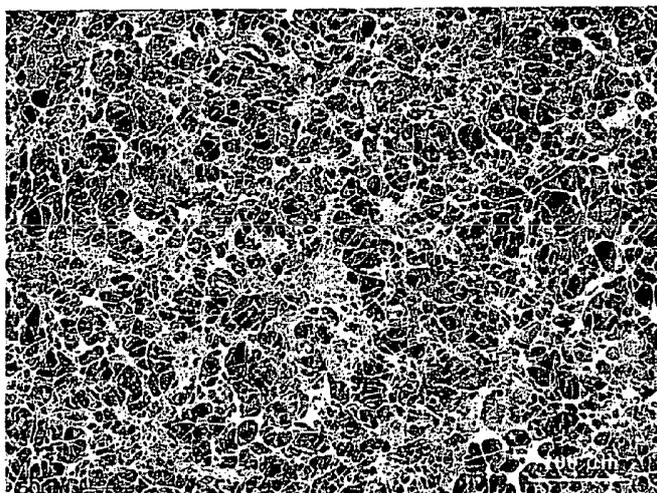


Fig. 8

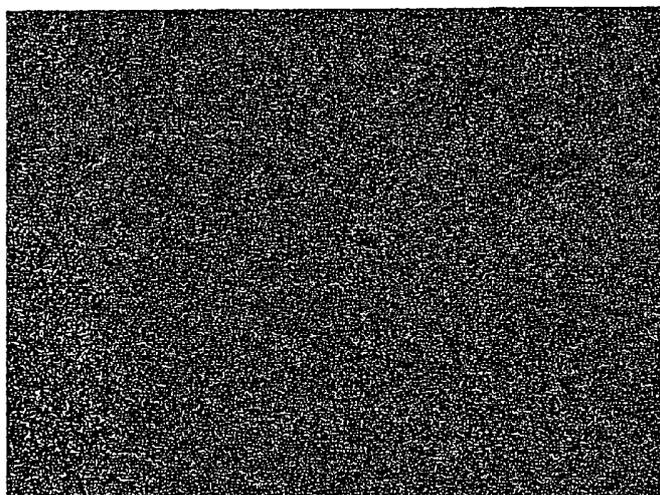


Fig. 9

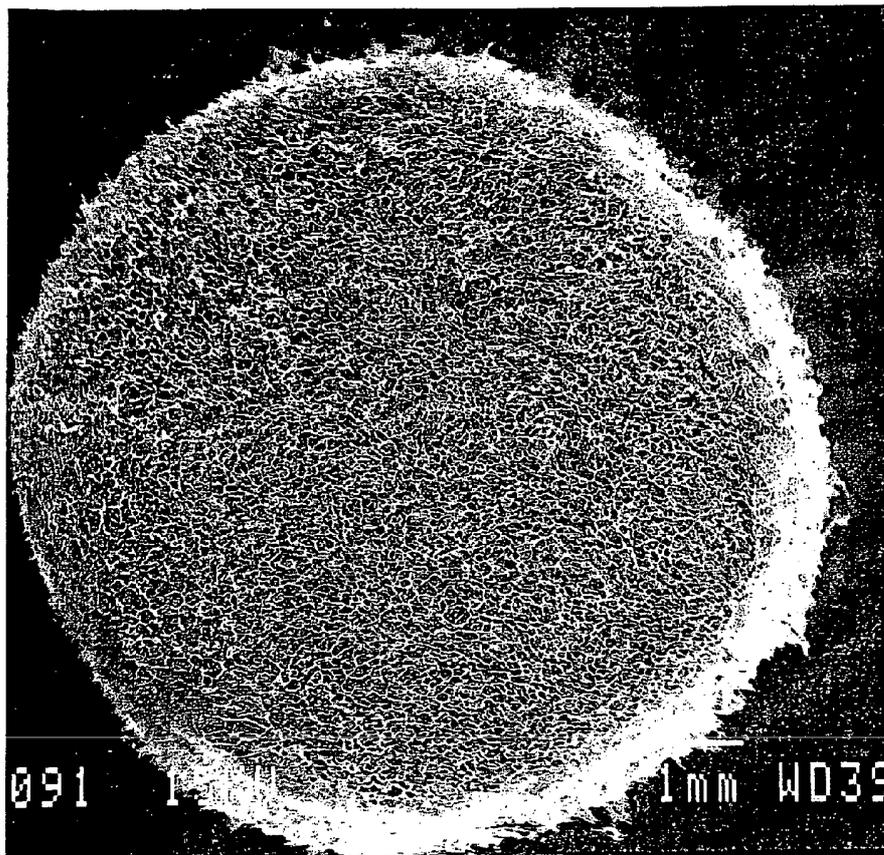


Fig. 10

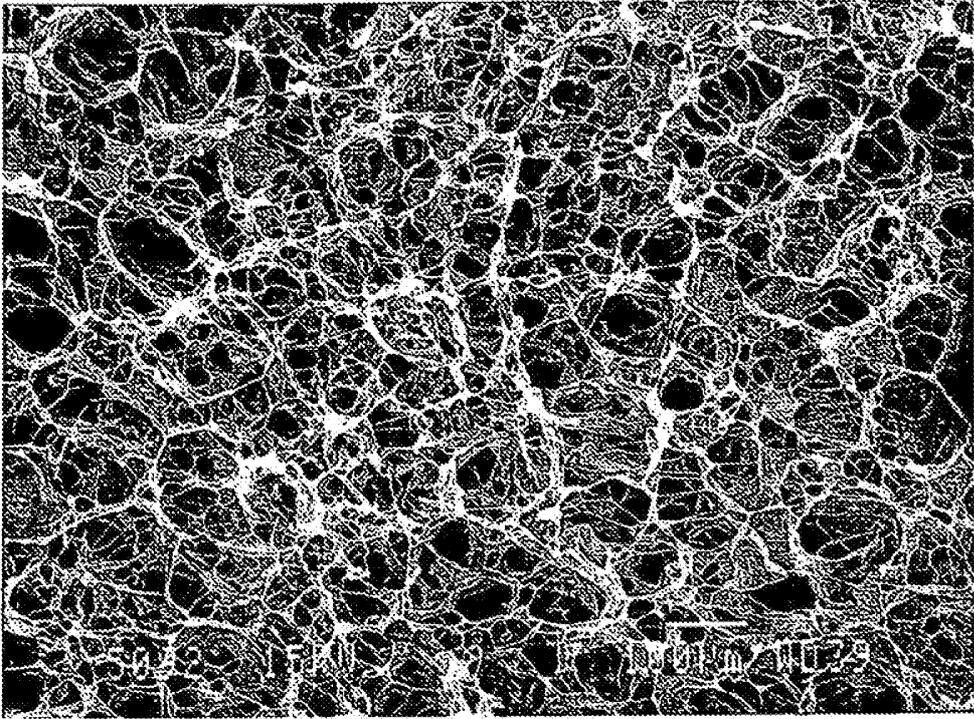
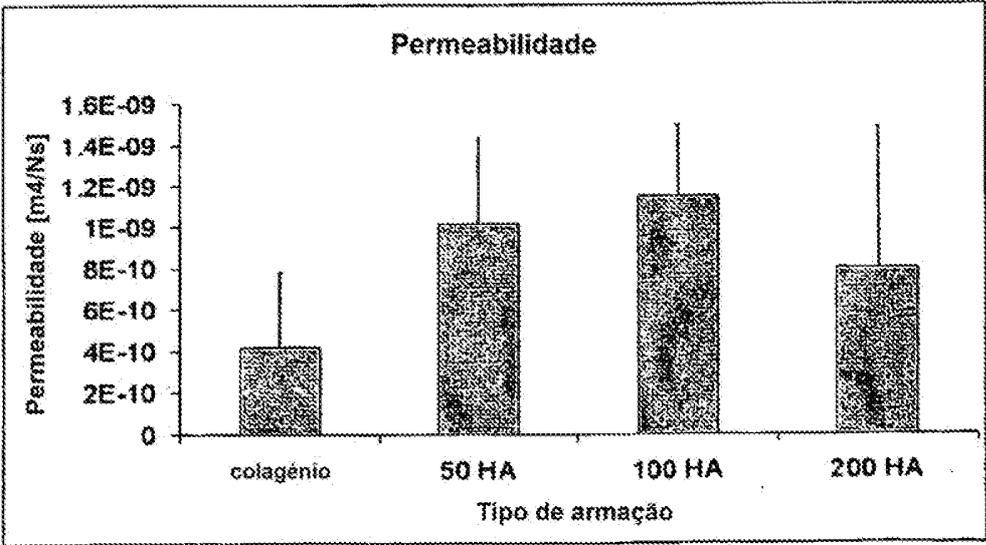


Fig. 11

Fig. 12



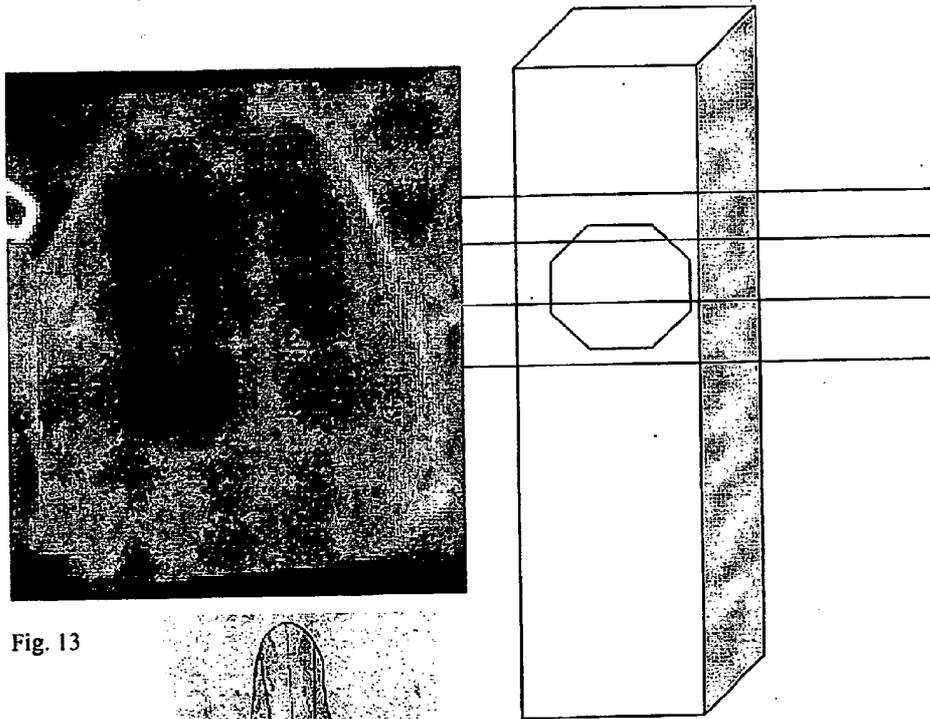


Fig. 13

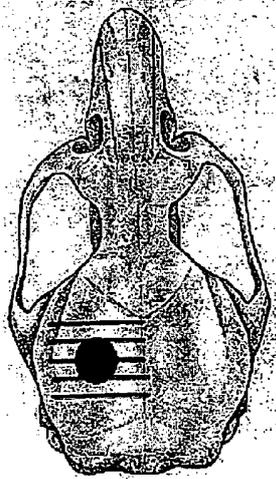


Fig. 14

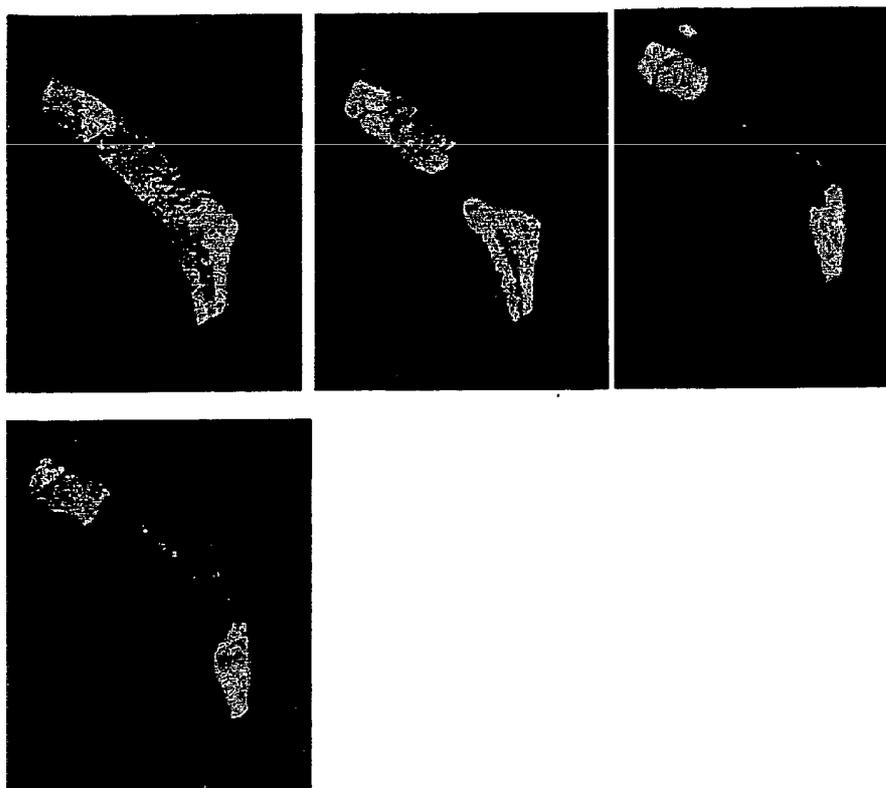


Fig. 15

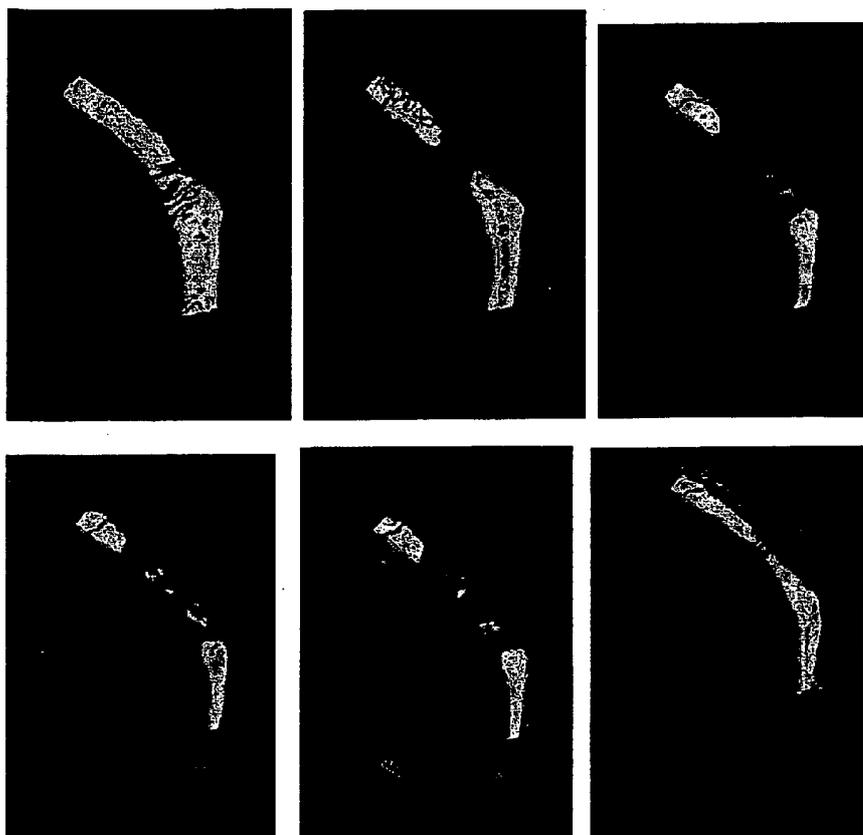


Fig. 16

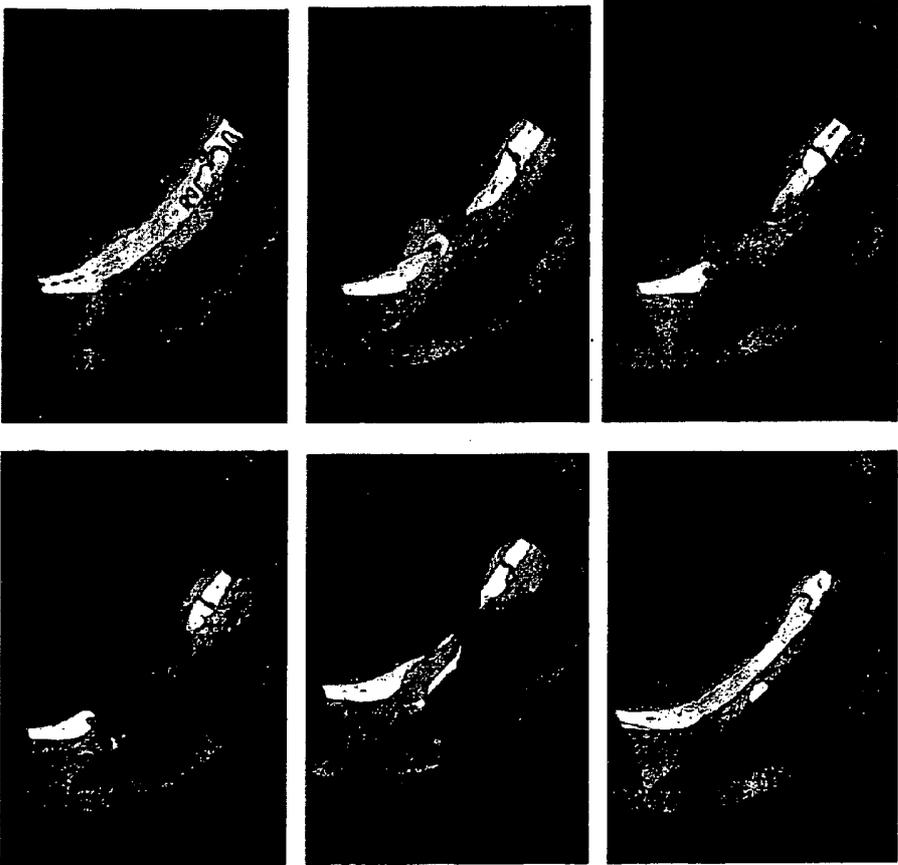


Fig. 17

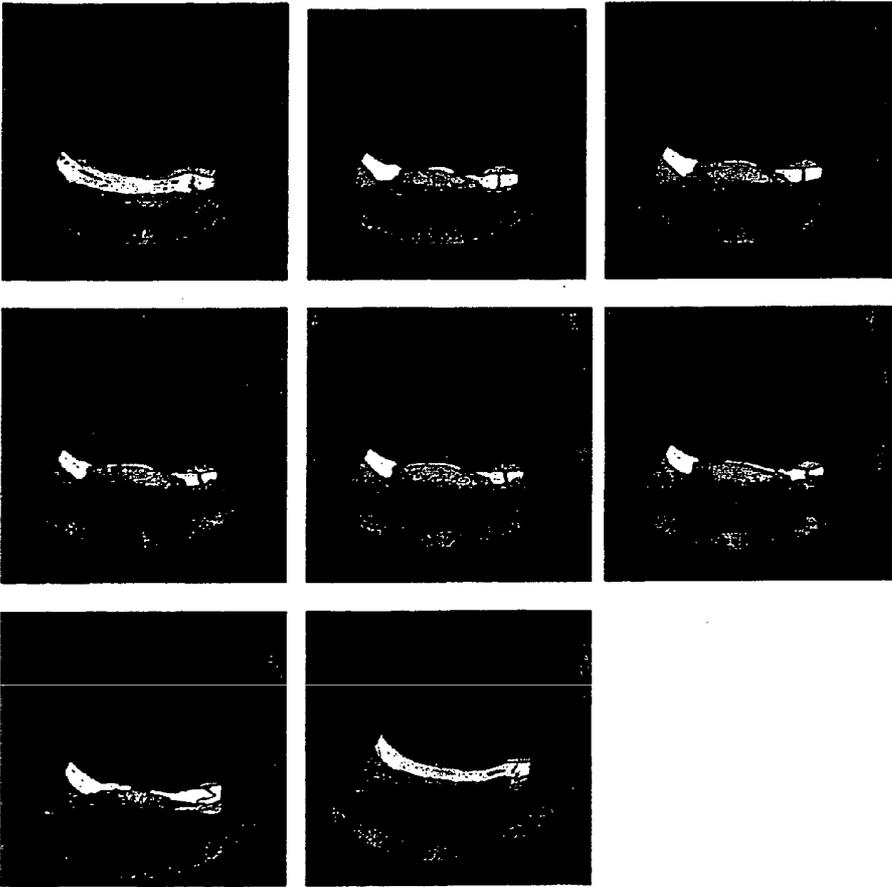
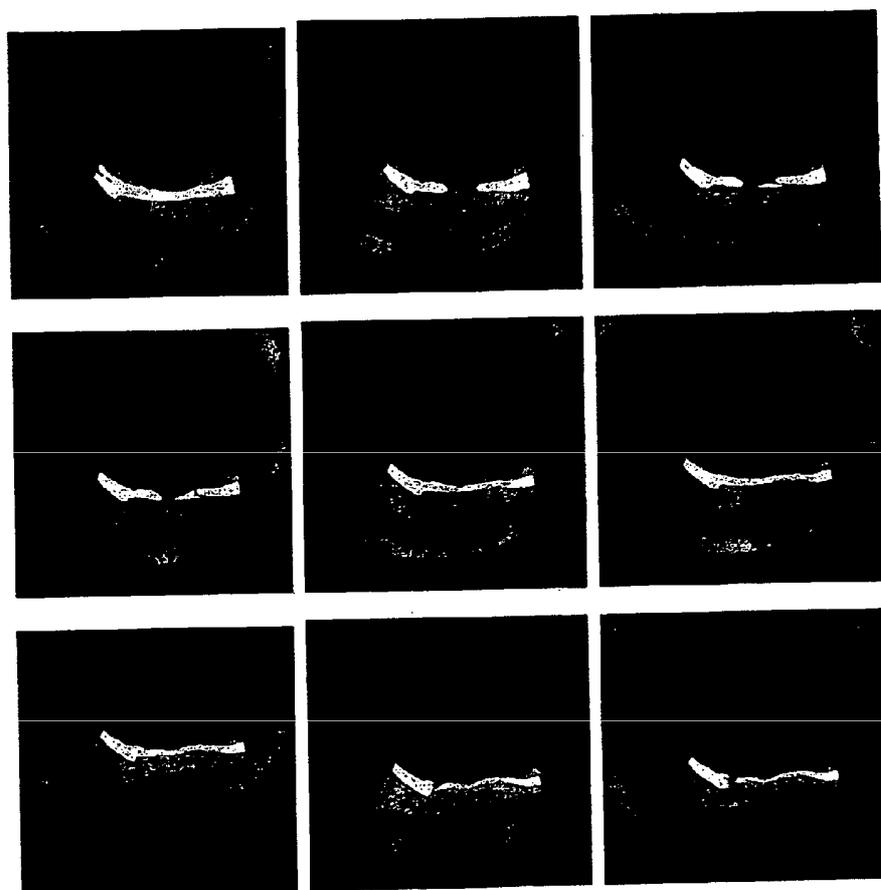


Fig. 18



PE2117617

14/21

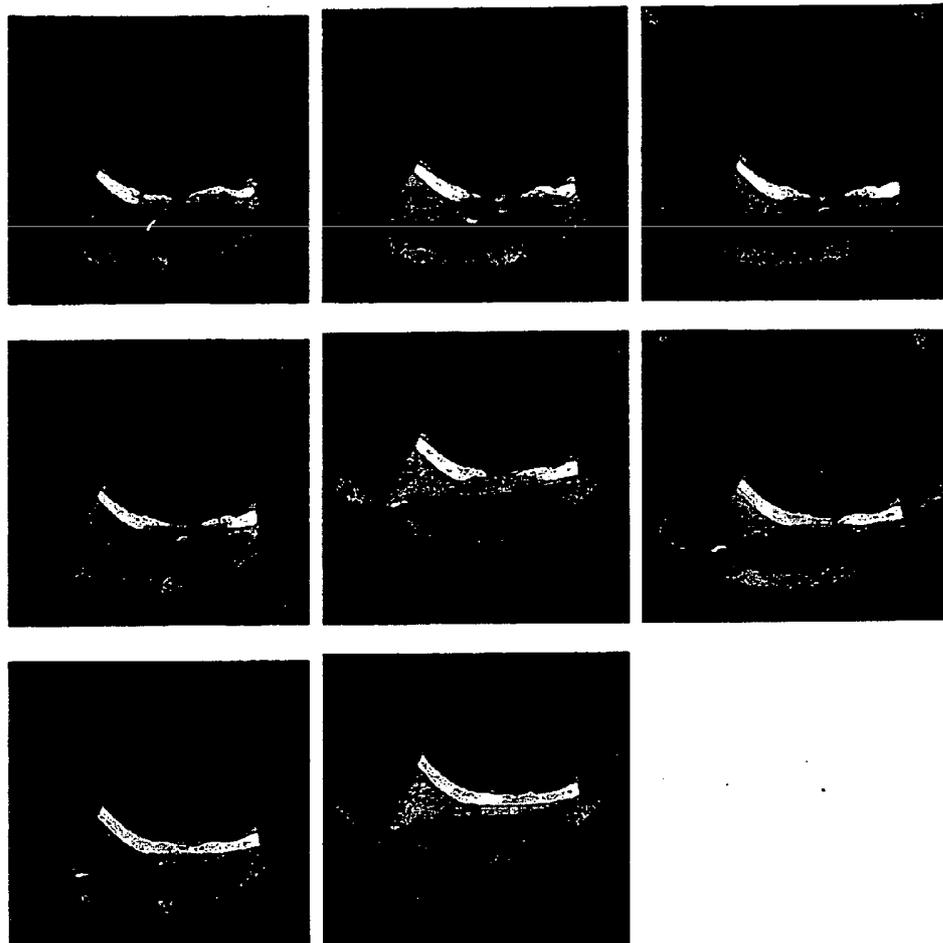
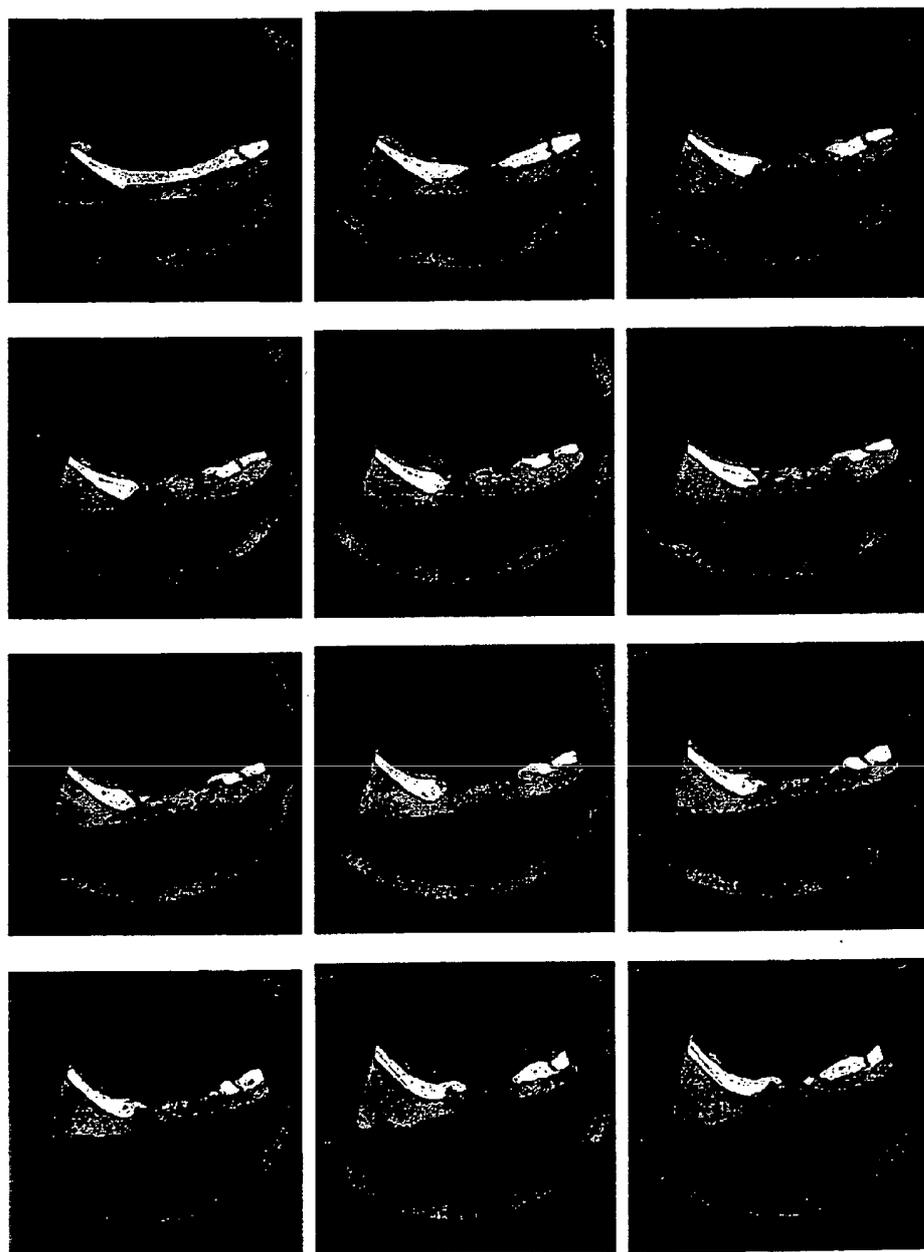


Fig. 19



PE2117617

16/21

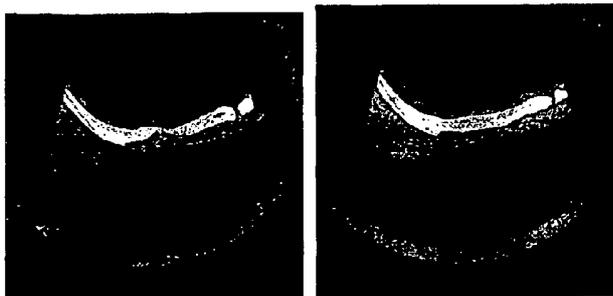


Fig. 20

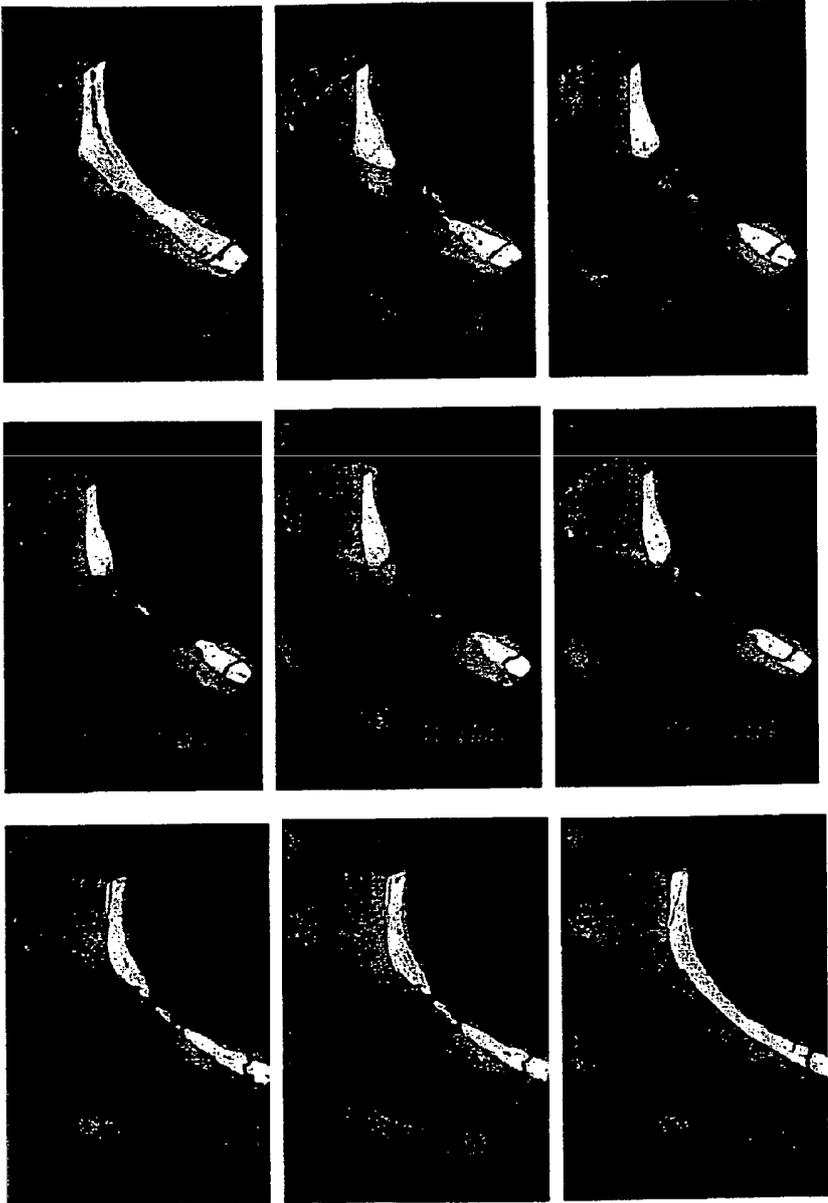
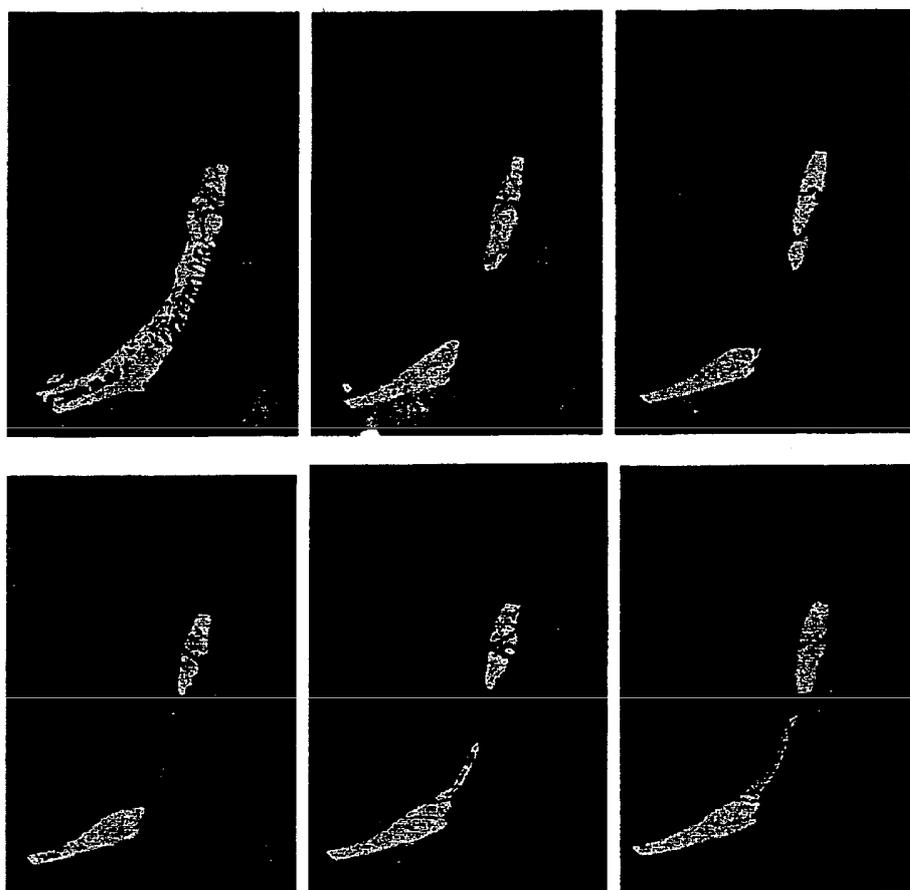


Fig. 21



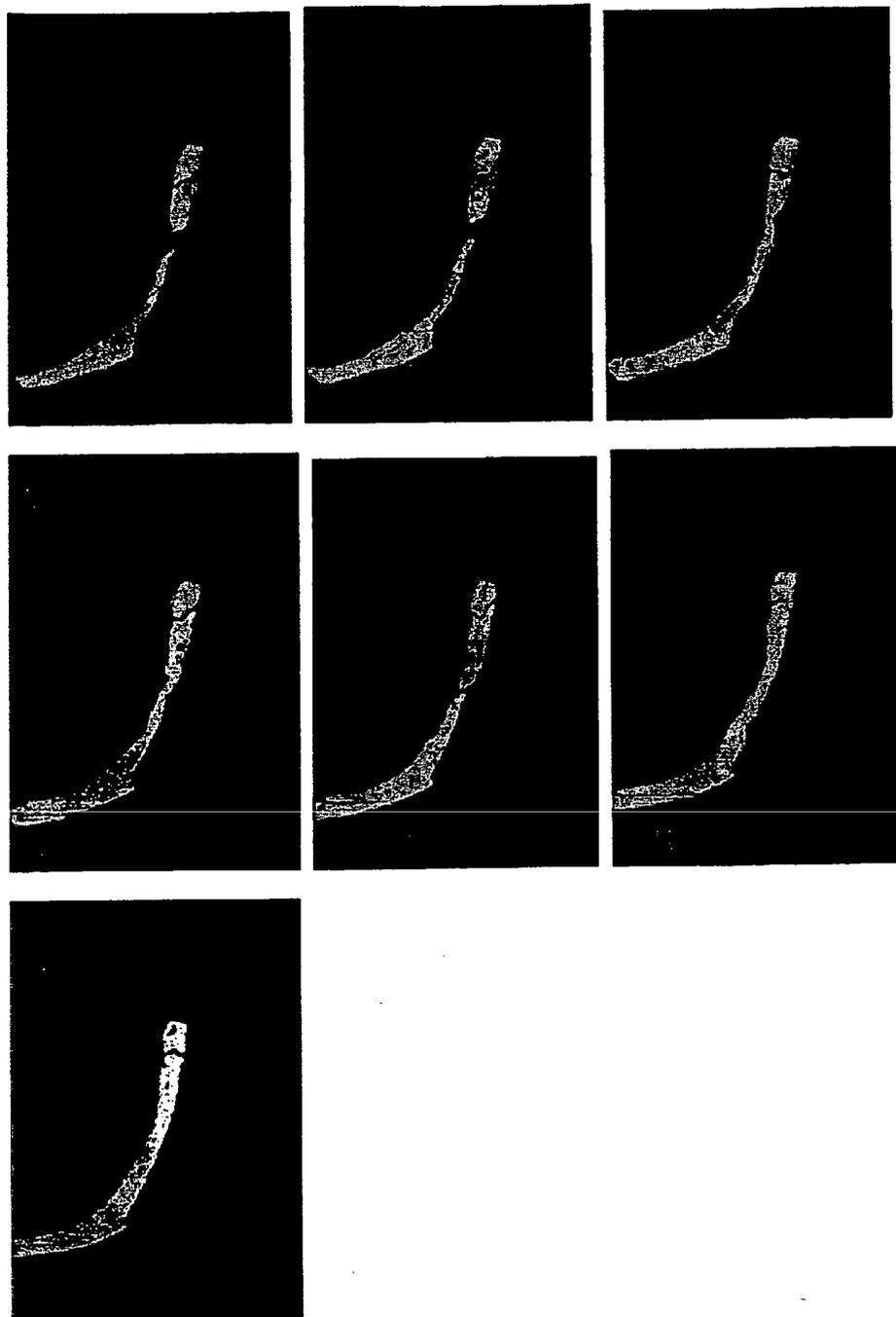
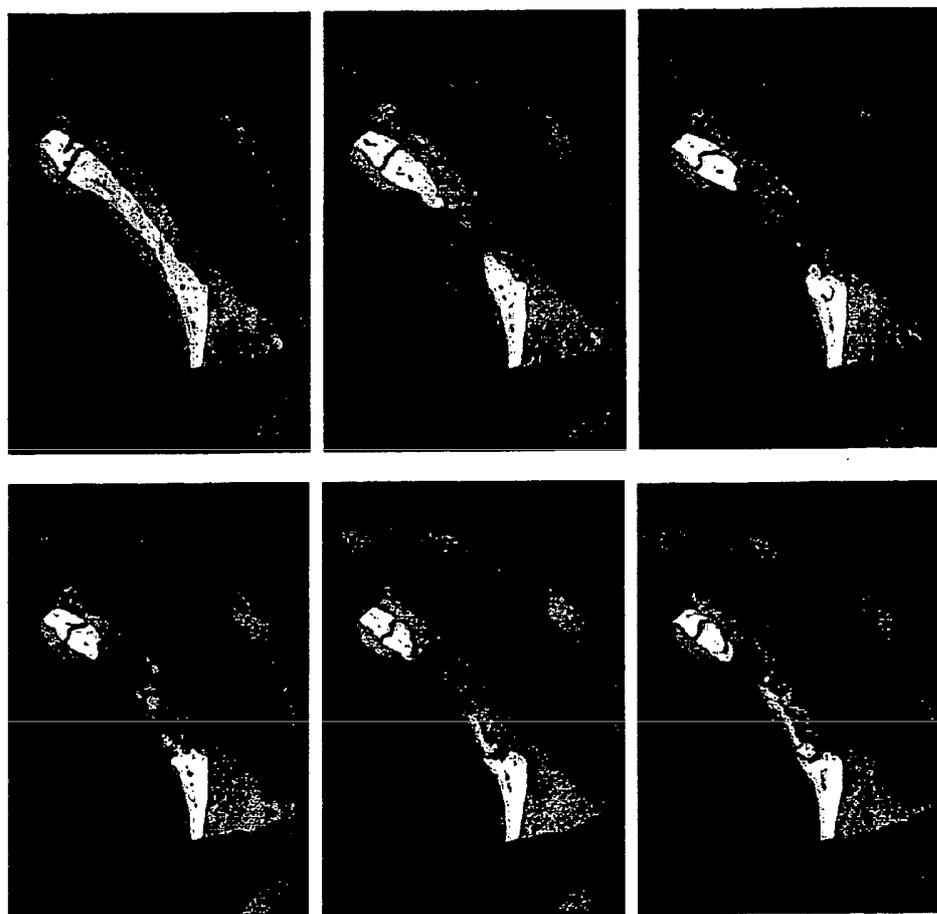
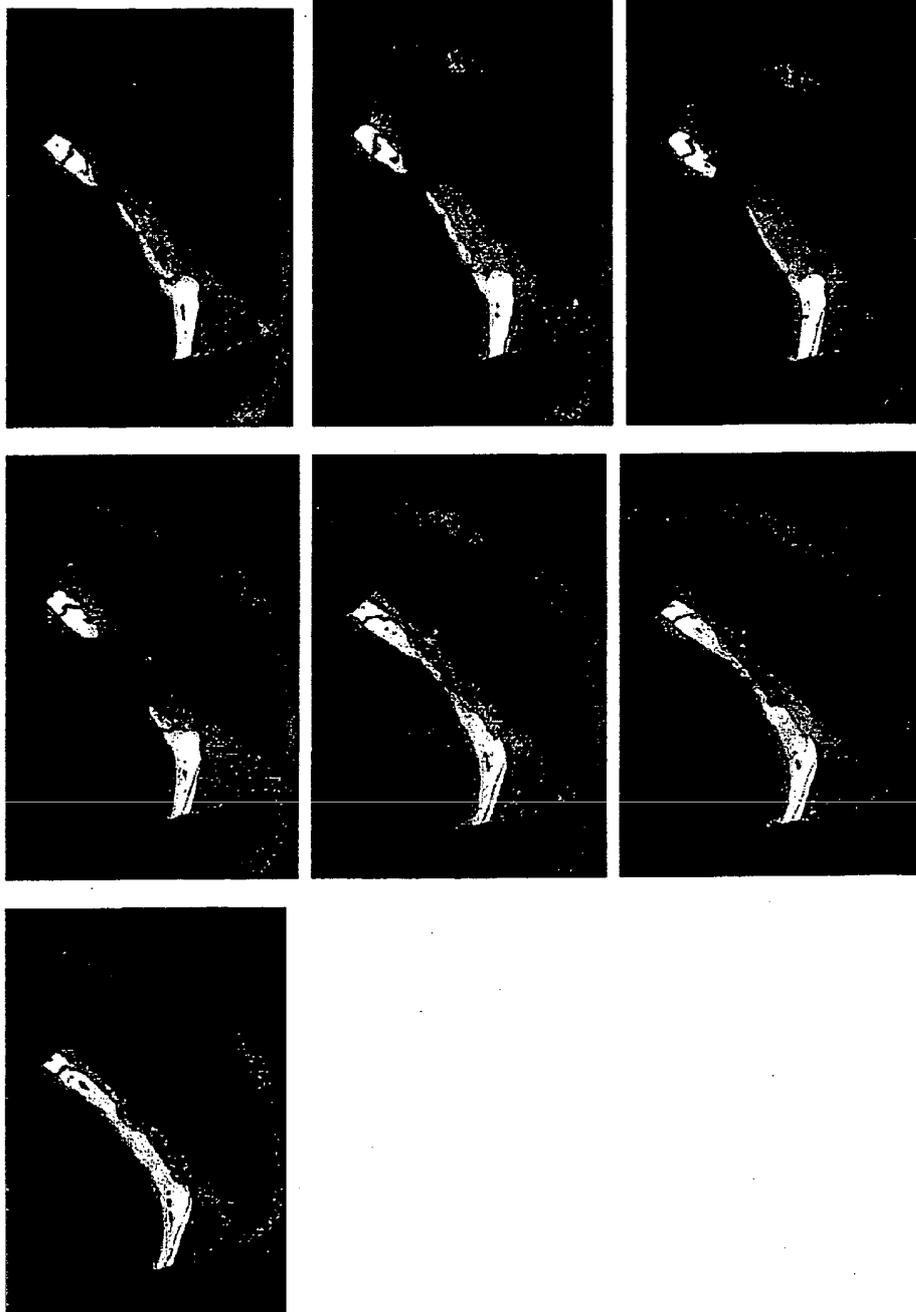


Fig. 22





REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2006095154 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- **TANCRED D.C. ; CARR A.J. ; MCCORMACK B.A.** Development of a new synthetic bone graft. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1996, vol. 9 (12), 819-823
- **DONG J.K. ; LUTHY H. ; WOHLWEND A. ; SCHARER P.** Heatpressed ceramics: technology and strength. *International Journal of Prosthodontics*, 1992, vol. 5 (1), 9-16
- **BAILEY A.J. ; LIGHT N.D. ; ATKINS E.D.T.** Chemical crosslinking restrictions on models for the molecular organisation of the collagen fibre. *Nature*, 1980, vol. 288, 408-410
- **YANNAS I.V.** Tissue and Organ Regeneration in Adults. Springer, 2001
- **O'BRIEN F.J. ; HARLEY B.A. ; YANNAS I.V. ; GIBSON L.J.** The effect of pore size on cell adhesion in collagen gag scaffolds. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, 433-441
- **O'BRIEN, F.J. ; HARLEY, B.A. ; WALLER, M.A. ; YANNAS, I.V. ; GIBSON, L.J. ; PRENDERGAST, P.J.** The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. *Technology and Healthcare invited Article*, 2007, 3-17