



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0520049-0 B1



(22) Data do Depósito: 03/08/2005

(45) Data de Concessão: 22/12/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO SEMI-SÓLIDA DE OSTEOLASTOS CONTENDO FIBRINA PARA A UNIÃO ÓSSEA E MÉTODO PARA O PREPARO DA MESMA

(51) Int.Cl.: A61K 35/32.

(30) Prioridade Unionista: 13/06/2005 KR 102005-0050450.

(73) Titular(es): SEWON CELLONTECH CO., LTD..

(72) Inventor(es): HYUN-SHIN PARK; JAE-DEOG JANG; CHEONG-HO CHANG; SOO-JIN JUNG; SAE-BOM LEE; CHANG-KWON KO.

(86) Pedido PCT: PCT KR2005002531 de 03/08/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/135126 de 21/12/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/09/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO SEMI-SÓLIDA DE OSTEOLASTOS CONTENDO FIBRINA PARA A UNIÃO OSSEA E MÉTODO PARA O PREPARO DA MESMA. Cujo método compreende o isolamento dos osteoblastos de um tecido ósseo e o cultivo/proliferação dos osteoblastos isolados, no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ou ci - MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modification), para o preparo de uma suspensão de osteoblastos, e a mistura da suspensão de osteoblastos resultantes com um fator de coagulação, para o preparo de um agente terapêutico de osteoblastos. De acordo com a presente invenção, cuja construção é feita de acordo com a descrição acima mencionada, é possível realizar o enxerto ósseo e, conseqüentemente, a união óssea, sem apresentar nenhuma rejeição clínica ao enxerto, com distribuição uniforme dos osteoblastos, através da injeção de uma mistura constituída de osteoblastos e fibrina, nas partes afetadas, para a união óssea, sendo que a união óssea é obtida de forma rápida e eficaz, através da injeção constante de uma composição semi-sólida de osteoblastos, nas partes afetadas.

**“COMPOSIÇÃO SEMI-SÓLIDA DE OSTEOLASTOS CONTENDO FIBRINA
PARA A UNIÃO ÓSSEA E MÉTODO PARA O PREPARO DA MESMA”**

Campo Técnico

[001] Trata-se a presente invenção de uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, bem como de um método para o preparo da mesma. De forma mais específica, trata-se a presente invenção de uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, que oferece um agente terapêutico contendo uma mistura constituída de osteoblastos e fibrina, que pode ser injetado em uma parte afetada para a união óssea, em tratamentos de fraturas ósseas graves, bem como se trata de um método para o preparo da mesma.

Fundamentos da Invenção

[002] Geralmente, uma fratura óssea simples pode ser suficientemente cicatrizada, por meio da imobilização da fratura óssea por diversas semanas, no entanto, uma fratura óssea ou um defeito ósseo grave requer enxerto ósseo.

[003] Um método utilizado em enxertia óssea preferido pela maioria dos médicos consiste no auto-enxerto ósseo, que envolve a coleta do osso de uma parte do corpo do paciente, particularmente da crista ilíaca, seguida pelo enxerto ósseo da parte afetada do paciente. Este método de enxertia óssea pode proporcionar resultados excelentes pelo fato de o enxerto ósseo ser realizado com o osso do próprio paciente. Entretanto, tal método de auto-enxerto ósseo é uma técnica cirúrgica desvantajosa que acompanha dores muito intensas e apresenta uma variedade de possíveis problemas associados à provável ocorrência de dolorimento e perda de sensibilidade na região em que foi coletado o osso, além da necessidade de um procedimento cirúrgico adicional para o enxerto ósseo, e, conseqüentemente, implica em um longo período de hospitalização e de recuperação, acarretando, portanto, no aumento de custos com honorários médicos. Além disso, não há uma quantidade extra de ossos que seja suficiente para enxertos no corpo e, conseqüentemente, o auto-enxerto

ósseo é uma técnica que enfrenta uma grande dificuldade para garantir partes doadoras que possam doar o osso para a implantação óssea. No caso de uma cirurgia da coluna lombar, que necessita de uma grande quantidade de enxerto ósseo, há relatos que a incidência de complicações causadas pelo auto-enxerto ósseo chega a ser de aproximadamente 23%.

[004] A técnica de aloenxerto, que tem sido utilizada para reduzir estas desvantagens apresentadas pelo auto-enxerto, basicamente, obtém os ossos de cadáveres e é uma técnica vantajosa pelo fato de não ter a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico adicional para o enxerto ósseo, mas apresenta desvantagens fatais, como, por exemplo, enfraquecimento da força óssea durante um processo de esterilização, ocorrência de rejeição ao enxerto ósseo e a probabilidade de infecção, com doenças contagiosas, como, por exemplo, hepatite e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Além disso, a técnica de aloenxerto apresenta outras desvantagens como, por exemplo, efeitos de pouca formação óssea, reação imunológica, absorção óssea e nova fratura dos ossos correspondentes, conseqüentemente, assim a aplicação da técnica de aloenxerto fica limitada a uma escala muito restrita. Conseqüentemente, o uso desta técnica cirúrgica foi reduzido desde o final de 1993, quando o Departamento de Alimentos e Saúde dos Estados Unidos (FDA) estabeleceu regulamentos para os bancos de tecido ósseo contra infecções.

[005] Entretanto, a injeção de medula óssea é uma técnica baseada em afirmações, que foi proposta por Huggins (1931), Friedenstein (1973) e Ashton (1980), na qual as células osteoprogenitoras provenientes da medula óssea induzem e facilitam a formação óssea. A injeção de medula óssea é geralmente realizada apenas para cicatrização de fraturas ósseas, mas também é realizada em combinação com enxerto ósseo. Ao contrário de outras técnicas de enxertia óssea, a dita injeção de medula óssea não envolve incisão cirúrgica da pele das partes doadoras e, conseqüentemente, é vantajoso pelo fato de não apresentar morbidade ao local doador, nenhuma complicação e nem mesmo efeitos colaterais adversos.

[006] Depois disso, mesmo que alguns excelentes

resultados tenham sido publicados através de uma grande quantidade de casos de aplicação clínica, a técnica de injeção de medula óssea é desvantajosa devido a sua base teórica infundada, uma vez que parcelas consideráveis dos resultados obtidos não são consistentes entre si, pois a quantidade de medula óssea que pode ser coletada de um local é limitada e, além disso, uma quantidade significativamente limitada de células osteoprogenitoras está presente na medula óssea.

Problema Técnico

[007] Conseqüentemente, a presente invenção foi fundamentada de forma a solucionar os problemas acima mencionados e um objeto da presente invenção consiste em apresentar uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, bem como um método para o preparo da mesma, sendo que a dita composição da presente invenção não apresenta rejeição clínica ao enxerto através da injeção da mistura constituída de osteoblastos e fibrina, em um local onde a união óssea é desejada, além de poder realizar a união óssea de forma rápida e eficaz, através da injeção de uma composição que, de certa forma, foi formada para aliviar os problemas associados à probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões não desejadas, em decorrência do escape dos osteoblastos injetados para a união óssea, que escapam do local, e, subseqüentemente, a propagação destes osteoblastos injetados para outros locais através da corrente sangüínea, que pode ser causada pela injeção de uma suspensão constituída apenas de osteoblastos.

[008] Um outro objeto da presente invenção consiste em apresentar uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, bem como um método para o preparo da mesma, sendo que o procedimento cirúrgico necessário requer uma incisão mínima quando os osteoblastos e a fibrina são injetados em um local onde a união óssea é desejada e a dita união óssea é executada através da injeção simples e eficaz de uma composição mista constituída de osteoblastos e fibrina, sem a incisão das regiões danificadas correspondentes, mediante o uso de radiação.

Solução Técnica

[009] De acordo com um aspecto da presente invenção, os objetos acima mencionados, bem como outros objetos podem ser alcançados por meio de um método de preparo de uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, que compreende as seguintes etapas:

- o isolamento dos osteoblastos de um tecido ósseo e o cultivo/proliferação dos osteoblastos isolados, no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ou α - MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modification), para o preparo de uma suspensão de osteoblastos, e;

- a mistura da suspensão de osteoblastos resultantes com um fator de coagulação, para o preparo de um agente terapêutico de osteoblastos.

[0010] No presente relatório descritivo, o fator de coagulação é uma mistura constituída de trombina e fibrinogênio.

[0011] No presente relatório descritivo, as etapas de preparação do agente terapêutico incluem:

- a dissolução da trombina liofilizada no meio de cultura DMEM líquido ou α - MEM e, subseqüentemente, a mistura de 1 UI/ml a 100 UI/ml da trombina dissolvida com a solução mista constituída de osteoblastos, e;

- a dissolução de fibrinogênio liofilizado no meio de cultura DMEM líquido ou α - MEM e, subseqüentemente, a mistura de 20 mg/ml a 100 mg/ml do fibrinogênio dissolvido com a solução mista constituída de osteoblastos contendo trombina misturada na mesma.

[0012] De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é apresentada uma composição de osteoblastos preparada pelo método acima mencionado, para o preparo de uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea.

Efeitos Vantajosos

[0013] De acordo com a presente invenção, a composição

semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea e o método para o preparo da mesma, de acordo com a presente invenção, cuja construção é feita de acordo com a descrição acima mencionada, permite a realização do enxerto ósseo, sem apresentar nenhuma rejeição clínica ao enxerto, através da injeção de uma mistura constituída de osteoblastos e fibrina, em um local onde a união óssea é desejada, além de poder realizar a união óssea de forma rápida e eficaz, através da injeção de uma composição que, de certa forma, foi formada para aliviar os problemas associados à probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões não desejadas, em decorrência do escape dos osteoblastos injetados para a união óssea, que escapam do local, e, subseqüentemente, a propagação destes para outros locais, através da corrente sangüínea, que é causada pela injeção de uma suspensão constituída apenas de osteoblastos.

[0014] Além disso, a presente invenção possibilita a enxertia óssea, sendo que o procedimento cirúrgico necessário requer uma incisão mínima, quando os osteoblastos e a fibrina são injetados em um local onde a união óssea é desejada, bem como também possibilita a realização da união óssea através da injeção simples e eficaz de uma composição mista constituída de osteoblastos e fibrina, sem a incisão das regiões danificadas correspondentes, mediante o uso de radiação.

Breve Descrição dos Desenhos

[0015] Os objetos acima mencionados, bem como outros objetos e outras características e vantagens da presente invenção serão mais bem compreendidos por intermédio da seguinte descrição detalhada, conjuntamente com os desenhos em anexo.

[0016] A Figura 1 é uma vista que mostra a cascata da polimerização da fibrina.

[0017] A Figura 2 é um diagrama esquemático que mostra a polimerização de uma matriz de fibrina.

[0018] A Figura 3 é um fluxograma que mostra um processo para o preparo de uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina

para a união óssea, de acordo com a presente invenção.

[0019] A Figura 4 é uma fotografia que mostra a injeção de uma mistura constituída de fibrina e osteoblastos, após a apresentação da fratura óssea de 15 mm em um antebraço de um coelho.

[0020] A Figura 5 é uma radiografia tirada seis semanas após a injeção de um agente terapêutico semi-sólido de osteoblastos contendo uma mistura constituída de fibrina e osteoblastos, após a apresentação da fratura óssea de 15 mm em um antebraço de um coelho.

[0021] A Figura 6 é uma fotografia de um corte histológico submetido à coloração com hematoxilina-eosina, que foi tirada seis semanas após a injeção de um agente terapêutico semi-sólido de osteoblastos contendo uma mistura constituída de fibrina e osteoblastos, após a apresentação da fratura óssea de 15 mm em um antebraço de um coelho.

[0022] A Figura 7 é uma fotografia de um corte histológico submetido à coloração com Tricrômio de Masson, que foi tirada seis semanas após a injeção de uma mistura constituída de fibrina e osteoblastos, após a apresentação da fratura óssea de 15 mm em um antebraço de um coelho.

Modo de Execução

[0023] Daqui por diante, a composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, de acordo com a presente invenção, e um método para o preparo da mesma, serão descritos de forma mais detalhada, em referência aos desenhos em anexo.

[0024] Com a finalidade de superar as desvantagens apresentadas pelas terapias convencionais para o tratamento de disfunções e doenças relacionadas aos ossos, como, por exemplo, implantes e enxertia óssea, uma técnica de transplante de osteoblasto autólogo, que não apresenta nenhum efeito colateral adverso a uma parte afetada, através do cultivo dos osteoblastos, como um método de tratamento determinante, foi desenvolvida em conjunto com o aprimoramento das terapias convencionais.

[0025] Entretanto, para a realização da união óssea precoce, é necessário misturar osteoblastos com uma matriz e, por meio disso, as mais diversas lesões podem ser tratadas e, conseqüentemente, é possível tratar mais doenças ósseas que não recebem benefícios terapêuticos com a injeção de uma suspensão líquida de osteoblastos constituída apenas de osteoblastos.

[0026] Pode-se dizer de que o agente terapêutico semi-sólido de osteoblastos para a união óssea, que é uma mistura constituída de fibrina e osteoblastos, é um produto mais avançado de um método de injeção de uma suspensão líquida de osteoblastos, que é baseada na terapia celular. O método convencional de injeção de uma suspensão líquida de osteoblastos, que envolve apenas o transplante de osteoblastos, somente pode tratar tipos limitados de defeitos ósseos e também pode ocasionar problemas associados à probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões não desejadas, em decorrência do escape dos osteoblastos injetados que escapam do local da formação óssea, e, subseqüentemente, a propagação destes para outros locais através da corrente sangüínea. Ao contrário disso, o agente terapêutico semi-sólido de osteoblastos contendo fibrina, de acordo com a presente invenção, é composto de uma mistura constituída de fibrina e osteoblastos e, conseqüentemente, também pode tratar, de forma mais rápida e eficaz, uma variedade mais ampla de fraturas ósseas e doenças ósseas graves.

[0027] Sabe-se que a cola de fibrina promove a neovascularização em modelos animais (Schlag G. Clinical Orthopedics, 1988), bem como é muito eficaz para aumentar a aplicabilidade dos métodos utilizados em enxertos de materiais de implante, para a substituição óssea, como, por exemplo, pó de osso desmineralizado, vidro bioativo, grânulos de hidroxiapatita coralina, ao realizar o procedimento de cirúrgico para o enxerto de tais materiais.

[0028] Além disso, a cola de fibrina serve como um eficaz veículo de liberação de bioativadores para uma matriz óssea. Como exemplos de tais bioativadores, pode-se mencionar TGF- β -1 (fator transformador de crescimento beta 1) e BMP relacionada ao TGF- β (proteína morfogenética óssea relacionada ao fator transformador de crescimento beta). Recentemente, a cola

de fibrina recebeu maior atenção como um material componente da matriz que libera células de forma eficaz, em aplicações de engenharia de tecidos (Huang Q. Tissue Engineering, 2002). As características acima mencionadas da cola de fibrina resultam em um processo rápido de união óssea na composição da presente invenção, que envolve a mistura constituída de osteoblastos com a cola de fibrina, como um material componente da matriz, seguida pela aplicação, para a união óssea.

[0029] Em referência aos desenhos, a Figura 1 mostra a cascata da polimerização da fibrina e a Figura 2 mostra, esquematicamente, a polimerização de uma matriz de fibrina.

[0030] Para a cicatrização da fratura óssea, deve-se, primeiramente, fazer a imobilização das regiões da fratura e garantir o fornecimento suficiente de sangue e aplicação de tensão apropriada às regiões da fratura óssea. Quando ocorre a fratura óssea, geralmente a fratura é acompanhada de lesões na pele, nos músculos, nos ligamentos, nos vasos sanguíneos, nos nervos e nas articulações circunvizinhas à fratura óssea.

[0031] Sob o ponto de vista histológico, os processos de cicatrização da fratura óssea envolvem três etapas, isto é, as etapas de inflamação, restauração e remodelagem, e estes estágios não são rigidamente divididos, mas progridem continuamente e ocorrem concomitantemente.

[0032] A etapa de inflamação é um estágio em que as células, na matriz óssea, nos vasos sanguíneos e também nos tecidos moles, como, por exemplo, no periósteo, e nos músculos em torno das regiões da fratura óssea, são danificadas devido ao trauma causador da fratura, tendo por resultado a formação de hematoma em uma cavidade medular e abaixo do periósteo. Os derivados inflamatórios liberados das células necróticas danificadas conduzem à dilatação dos vasos sanguíneos e à exsudação do plasma sanguíneo, causando, conseqüentemente, edema agudo. Após a etapa de inflamação, a mudança para uma etapa de restauração é acompanhada pela iniciação da formação da nova matriz.

[0033] A etapa de restauração é iniciada com a organização do hematoma formado nos locais fraturados. O hematoma cria um arcabouço de fibrina que, então, recebe as células restauradoras. Subseqüentemente, os fatores de crescimento ou outras proteínas formadas por estas células restauradoras induzem a migração e a proliferação celular, bem como a formação de uma matriz de restauração, que são a primeira etapa de restauração da fratura óssea. A maioria das células que forma os tecidos ósseos durante a cicatrização da fratura óssea aparece no local da fratura juntamente com os tecidos de granulação e forma calos, que são compostos de tecidos fibrosos, cartilagem e ossos não-lamelares, em torno do local da fratura. A mineralização do calo é iniciada por ações seqüenciais das células osteogênicas. A matriz, que é sintetizada por estas células osteogênicas, contém uma grande quantidade de fibras de colágeno do tipo I espaçadas regularmente, que oferecem condições para a deposição dos complexos de fosfato de cálcio nestes espaços. Entretanto, esta etapa de restauração não é um estágio em que a união óssea é finalizada e, conseqüentemente, os calos de fratura imaturos resultantes têm uma força óssea mais fraca do que a dos tecidos ósseos normais. Conseqüentemente, durante o estágio de remodelagem, tais calos de fratura adquirem força semelhante àquela exibida pelos tecidos ósseos normais.

[0034] No que diz respeito ao estágio de remodelagem, os ossos não-lamelares dentro dos calos são substituídos pelos ossos lamelares maduros e os calos desnecessários e supérfluos são gradualmente absorvidos. Com base nos resultados do exame com marcação com isótopo radioativo, pode-se verificar que a atividade aumentada do isótopo radioativo é mantida no local da fratura por um período de tempo prolongado, mesmo depois de a união óssea ter sido concluída e a recuperação das funções do local da fratura voltarem ao estado normal, como mostrado na radiografia. Conseqüentemente, o estágio de remodelagem continua ainda por diversos anos, depois que ocorreu a união clínica da fratura óssea.

[0035] A Figura 3 mostra um fluxograma que ilustra um processo para o preparo de uma composição semi-sólida de osteoblastos

contendo fibrina para a união óssea, de acordo com a presente invenção.

[0036] Em referência agora à Figura 3, um método de preparo de uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, de acordo com a presente invenção, compreende:

- o isolamento de osteoblastos de um tecido ósseo e o cultivo/proliferação dos osteoblastos isolados no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ou α - MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modification), para o preparo de uma suspensão de osteoblastos (S100), e;
- a mistura da suspensão resultante de osteoblastos com um fator de coagulação para o preparo de um agente terapêutico de osteoblastos (S200).

[0037] No presente relatório descritivo, o fator de coagulação é uma mistura constituída de trombina e fibrinogênio.

[0038] No presente relatório descritivo, as etapas de preparação do agente terapêutico incluem:

- a dissolução da trombina liofilizada no meio de cultura DMEM líquido ou α - MEM e depois a mistura de 1 UI/ml a 100 UI/ml da trombina dissolvida com a solução mista constituída de osteoblastos (S210), e;
- a dissolução de fibrinogênio liofilizado no meio de cultura DMEM líquido ou α - MEM e depois misturar de 20 a 100 mg/ml do fibrinogênio dissolvido com a solução mista constituída de osteoblastos contendo trombina misturada na mesma (S220).

[0039] Entretanto, uma concentração de trombina determina o tempo de polimerização da fibrina. Conseqüentemente, o tempo de polimerização da fibrina pode ser reduzido dentro de um intervalo de tempo que varia entre aproximadamente 4 horas e 3 segundos, dependendo da concentração de trombina. A trombina é aplicada à concentração, de tal maneira que a composição da presente invenção foi desenvolvida para impedir que os osteoblastos e os fatores de coagulação escapem dos locais da lesão quando

injetados em um local para a união da fratura óssea, sendo que a injeção da composição no local afetado ocasiona a rápida formação de uma matriz, bem como uma ótima matriz porosa de fibrina para a formação óssea por osteoblastos é formada.

Modalidade da Invenção

[0040] Daqui por diante, os efeitos de uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, de acordo com um exemplo da presente invenção, serão descritos de forma mais detalhada, em referência aos desenhos em anexo.

[0041] Em primeiro lugar, os osteoblastos foram isolados dos tecidos correspondentes e cultivados no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ou α - MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modification) durante quatro semanas, para a proliferação de quantidades suficientes de osteoblastos. Depois disso, os osteoblastos resultantes foram suspensos no meio de cultura DMEM ou α - MEM, para o preparo de uma suspensão de osteoblastos.

[0042] Após o preparo de uma cola de fibrina de grau médico ajustada à temperatura ambiente, o fibrinogênio foi dissolvido por meio da adição de uma quantidade apropriada de DMEM líquido ou α - MEM em um frasco contendo fibrinogênio liofilizado.

[0043] Além disso, a trombina também foi dissolvida por meio da adição de uma quantidade apropriada de DMEM líquido ou α - MEM, em um frasco contendo trombina liofilizada.

[0044] Depois disso, a trombina dissolvida foi adicionada (volume de 1/5) à suspensão líquida de osteoblastos e bem misturada.

[0045] Uma suspensão de osteoblastos misturada com trombina foi misturada com uma quantidade igual de fibrinogênio para o preparo de 500 μ l de uma composição de osteoblastos.

[0046] Trinta coelhos brancos da Nova Zelândia, pesando

aproximadamente 3 kg, independentemente do sexo, foram divididos em um grupo de controle para o enxerto ósseo e em um grupo experimental para o enxerto de uma composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea, sendo que cada um dos grupos compreendia 15 coelhos.

[0047] De acordo com a abordagem de Henry, foi feita uma incisão longitudinal no antebraço dos coelhos, expondo, assim, o eixo do raio, e então o defeito ósseo de 15 mm foi feito por meio do uso de uma serra e, em seguida, foi feita a remoção completa do periósteo da área do defeito ósseo.

[0048] No grupo de controle, o osso esponjoso foi previamente coletado do osso longo e o enxerto ósseo foi realizado na área do defeito ósseo e, em seguida, foi feita a sutura da pele e dos tecidos subcutâneos.

[0049] No grupo experimental, a pele e os tecidos subcutâneos foram cuidadosamente suturados, de tal maneira que a área do defeito ósseo se transformou em um espaço livre e a composição de osteoblastos foi injetada três semanas mais tarde, conforme ilustração na Figura 4.

[0050] Depois de feitas as radiografias nas semanas 3, 6 e 9, a partir do início da experiência, a união óssea foi avaliada por meio de atribuição de ponto(s) correspondente(s) às áreas da osteotomia proximal e distal e à área do defeito ósseo, respectivamente, dependendo do grau da união óssea das mesmas, e a soma dos pontos obtidos.

Tabela 1

[0051] Método de determinação da união da fratura óssea para lesões:

pponto	Área da osteotomia proximal	Área da osteotomia distal	Pporção leve do defeito
T3	Uunião	Uunião	Uunião
22	Pponte moderada (> 50%)	Pponte moderada (> 50%)	Pponte moderada (> 50%)
11	Pponte suave (< 50%)	Pponte suave (< 50%)	Pponte suave (< 50%)
00	Ssem união	Ssem união	Ssem união

Tabela 2

[0052] Resultados após nove semanas do enxerto ósseo nos grupos de controle e experimental

	Grupo de controle	Grupo experimental
Excelente (8-9)	14	13
Bom (6-7)	1	2
Satisfatório (4-5)	-	-
Insatisfatório (2-3)	-	-
Sem efeito (0-1)	--	-

[0053] A Figura 5 mostra uma radiografia tirada seis semanas após a injeção de um agente terapêutico semi-sólido de osteoblastos contendo uma mistura constituída de osteoblastos e fibrina, após a apresentação da fratura óssea de 15 mm no antebraço de um coelho. Pode-se observar que a união completa da fratura óssea foi alcançada.

[0054] A Figura 6 mostra uma fotografia corte histológico submetido à coloração com hematoxilina-eosina, que foi tirada seis semanas após a injeção de um agente terapêutico semi-sólido de osteoblastos contendo uma mistura constituída de fibrina e osteoblastos, após a apresentação da fratura óssea de 15 mm em um antebraço de um coelho. Observou-se a formação de apenas uma ilhota óssea.

[0055] A Figura 7 mostra uma fotografia de um corte histológico submetido à coloração com Tricrômio de Masson, que foi tirada seis semanas após a injeção de uma mistura constituída de fibrina e osteoblastos, após a apresentação da fratura óssea de 15 mm em um antebraço de um coelho. Pode-se confirmar que o colágeno foi produzido segundo padrões predeterminados, representando, assim, o progresso da formação óssea e da formação de vasos sanguíneos de sangue entre os mesmos (representado por

uma linha pontilhada elíptica vermelha).

[0056] Conseqüentemente, de acordo com a presente invenção, é possível realizar o enxerto ósseo, sem a presença de rejeição imunológica, por meio da mistura de osteoblastos com fibrina e da injeção da dita mistura nas partes afetadas para a união óssea, quando a união óssea não progride pelo fato de a fratura óssea ser grave, exibindo efeitos eficazes e rápidos da união óssea, através da injeção de uma composição que, de certa forma, foi formada.

Aplicabilidade Industrial

[0057] Constata-se que, pelo acima mencionado, a composição semi-sólida de osteoblastos contendo fibrina para a união óssea e o método para o preparo da mesma, de acordo com a presente invenção, cuja construção é feita de acordo com a descrição acima mencionada, permite a junção da fratura óssea, sem apresentar nenhuma rejeição clínica ao enxerto, através da injeção de uma mistura constituída de osteoblastos e fibrina, em um local onde a união óssea é desejada, além de poder realizar a união óssea, de forma rápida e eficaz, através da injeção de uma composição que, de certa forma, foi formada para aliviar os problemas associados à probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões não desejadas, em decorrência do escape dos osteoblastos injetados para a união óssea, que escapam do local, e, subseqüentemente, a propagação destes para outros locais, através da corrente sanguínea, que é causada pela injeção de uma suspensão constituída apenas de osteoblastos.

[0058] Além disso, a presente invenção permite a junção da fratura óssea, sendo que o procedimento cirúrgico necessário requer uma incisão mínima, quando os osteoblastos e a fibrina são injetados em um local onde a união óssea é desejada, bem como também possibilita a realização da união óssea através da injeção simples e eficaz de uma composição mista constituída de osteoblastos e fibrina, sem a incisão das regiões danificadas correspondentes, mediante o uso do sistema de radiação, como, por exemplo, raios-X.

[0059] Apesar de as modalidades preferidas da presente invenção terem sido apresentadas a título de ilustração, ficará evidente aos especialistas versados na técnica que são possíveis diversas modificações, acréscimos e substituições, sem que se desvie do escopo e espírito da presente invenção, conforme descrição nas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO SEMI-SÓLIDA DE OSTEOLASTOS CONTENDO FIBRINA PARA A UNIÃO ÓSSEA, *caracterizado pelo fato de* compreender as seguintes etapas:

- o isolamento dos osteoblastos de um tecido ósseo e o cultivo/proliferação dos osteoblastos isolados, no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ou α - MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modification), para o preparo de uma suspensão de osteoblastos, e

- a mistura da suspensão de osteoblastos resultantes com um fator de coagulação, para o preparo de um agente terapêutico de osteoblastos, sendo o fator de coagulação uma mistura constituída de trombina e fibrinogênio;

as etapas de preparação do agente terapêutico incluindo:

- a dissolução da trombina liofilizada no meio de cultura DMEM líquido ou α - MEM e, subsequentemente, a mistura de 1UI/ml a 100 UI/ml da trombina dissolvida com a solução mista constituída de osteoblastos, e

- a dissolução de fibrinogênio liofilizado no meio de cultura DMEM líquido ou α - MEM e, subsequentemente, a mistura de 20 mg/ml a 100 mg/ml do fibrinogênio dissolvido com a solução mista constituída de osteoblastos contendo trombina misturada na mesma.

2. COMPOSIÇÃO SEMI-SÓLIDA DE OSTEOLASTOS, obtida conforme o método de preparo definido na reivindicação 1, ***caracterizada pelo fato de*** conter 1 UI/ml a 100 UI/ml de trombina liofilizada e 20 mg/ml a 100 mg/ml de fibrinogênio liofilizado.

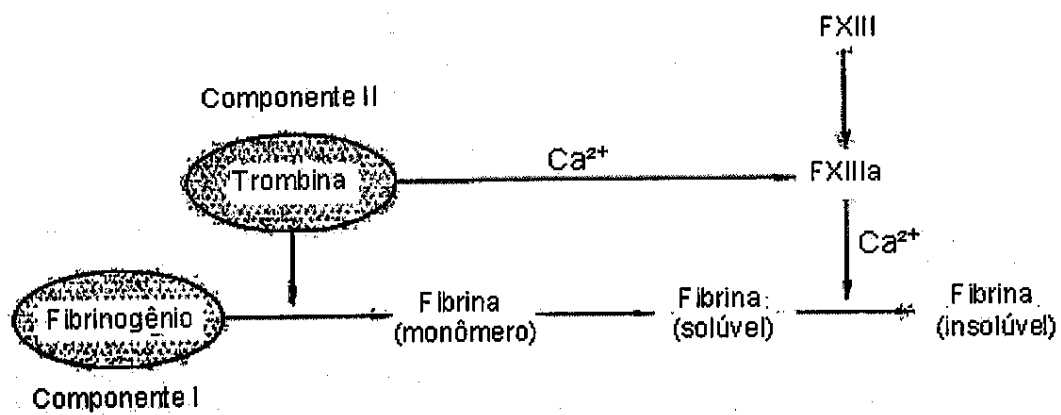


FIGURA 1

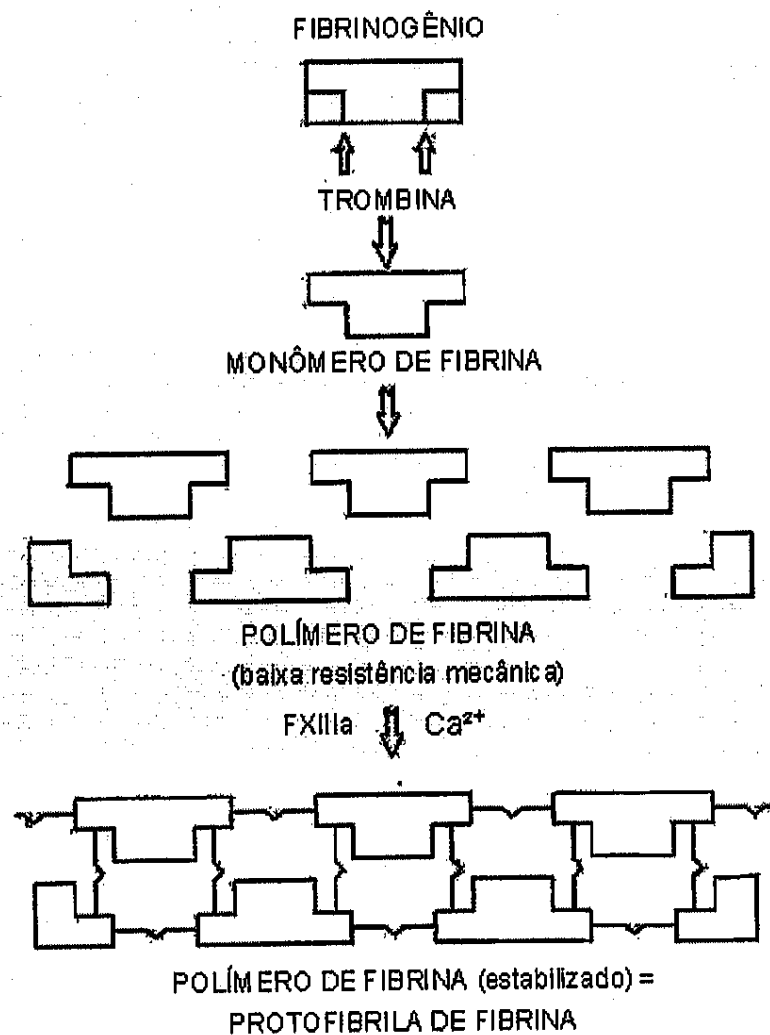


FIGURA 2

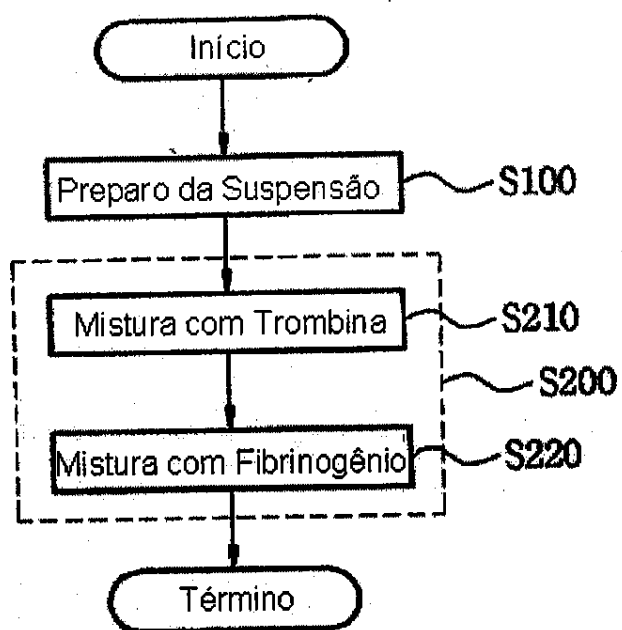


FIGURA 3

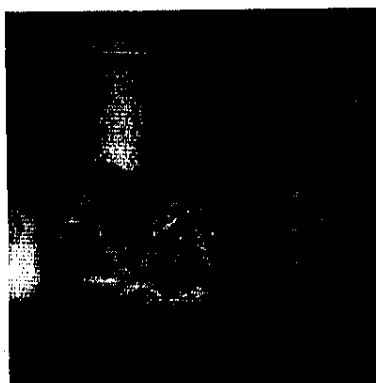


FIGURA 4

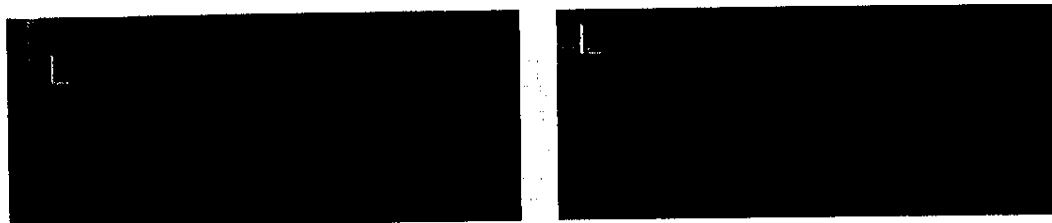
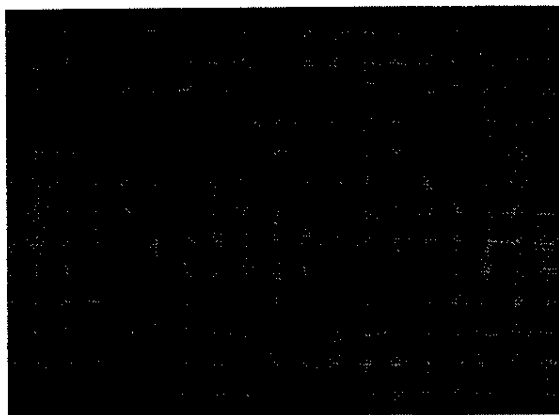
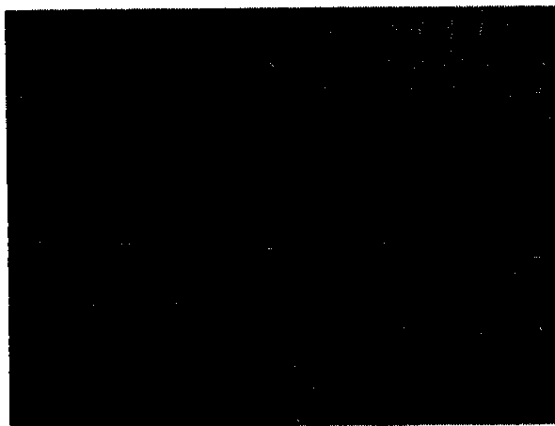


FIGURA 5

**FIGURA 6****FIGURA 7**