

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

(21) **PI 0712088-5 A2**

(22) Data de Depósito: 30/05/2007
(43) Data da Publicação: 06/03/2012
(RPI 2148)



(51) *Int.Cl.:*
A61L 31/04

(54) Título: MÉTODOS PARA CRESCIMENTO CELULAR DIRECIONADO E REGENERAÇÃO DE TECIDO CONTROLADA PARA PREVENIR ADESÃO-CIRÚRGICA OU PÓS-TRAUMÁTICA E FORMAÇÃO DE FIBROSE NA SUPERFÍCIE DE UM TECIDO, E PARA TRATAMENTO DE UM DISTÚRBIO EM UM MAMÍFERO, E USO DE UMA COMPOSIÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 31/05/2006 US 60/809591

(73) Titular(es): Baxter Healthcare S.A, Baxter International INC

(72) Inventor(es): Johann Odar, Raymond Nistor-Gallo

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007004791 de 30/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/137839de 06/12/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA CRESCIMENTO CELULAR DIRECIONADO E REGENERAÇÃO DE TECIDO CONTROLADA PARA PREVENIR ADESÃO PÓS-CIRÚRGICA OU PÓS-TRAUMÁTICA E FORMAÇÃO DE FIBROSE NA SUPERFÍCIE DE UM TECIDO, E PARA TRATAMENTO DE UM DISTÚRBIO EM UM MAMÍFERO, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO. A presente invenção diz respeito a um método para crescimento celular direcionado e regeneração de tecido controlada para prevenir adesão pós-cirúrgica ou pós-traumática e formação de fibrose na superfície lesionada de um tecido selecionado do grupo que consiste em tecido da coluna vertebral, dura-máter e nervos espinhais em um mamífero, compreendendo a etapa de fornecer, revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas, não porosa, bioativa bifuncional, e a um método para tratar um defeito em um mamífero compreendendo a etapa de fornecer, revestir e separar o dito tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas, não porosa, bioativa bifuncional.

“MÉTODOS PARA CRESCIMENTO CELULAR DIRECIONADO E REGENERAÇÃO DE TECIDO CONTROLADA PARA PREVENIR ADESÃO PÓS-CIRÚRGICA OU PÓS-TRAUMÁTICA E FORMAÇÃO DE FIBROSE NA SUPERFÍCIE DE UM TECIDO, E PARA TRATAMENTO DE UM DISTÚRPIO EM UM MAMÍFERO, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um método para prevenir adesão celular pós-cirúrgica ou pós-traumática na superfície de um tecido selecionado de tecido da coluna vertebral, dura-máter e nervos espinhais compreendendo a etapa de revestir e separar o tecido com uma lâmina de biomatriz de colágeno bioativa e biofuncional de múltiplas camadas, e a um método de direcionar o crescimento celular e reparo de tecido e para tratar um distúrbio em um mamífero compreendendo a etapa de revestir e separar o dito tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas. Os métodos da presente invenção previnem adesão peridural e perineural e formação de tecido de cicatriz fornecendo uma matriz biofuncional para crescimento celular direcionado de células e regeneração de tecido controlada.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Cicatriz interna, fibroses e adesões peridural e perineural depois de cirurgia na coluna são efeitos colaterais bem conhecidos e indesejados da dita cirurgia. Estas condições levam a uma alta porcentagem de dor, dificuldades de movimento e freqüentemente à necessidade de cirurgia adicional. O uso de um gel compreendendo carboximetilcelulose e óxido de polietileno para a redução de adesões epidurais depois da cirurgia na coluna é descrito em Kim et al: “Reduction in leg pain and lower-extremity weakness with Oxiplex/SP Gel for 1 year after laminectomy, laminotomy, and discectomy. Neurosurg Focus” 17(1): Clinical Pearl 1: 1-6, 2004); Porchet et al: “Inhibition of epidural fibrose with ADCON-L: effect on clinical outcome one year following re-operation for recurrent lumbar radiculopathy.” Neurol

Res 21 (Suppl 1): 51-S60, (1999); e, Ross et al.”Association entre peridural scar and recurrent radicular pain after lumbar discectomy: magnetic resonance evaluation. ADCON-L European Study Grupo.” Neurosurgery 38:855-863, (1996). Nestes exemplos, um gel é distribuído de uma maneira controlada na

5 área de aplicação e, uma vez aplicado, a distribuição do gel não pode ser facilmente manipulada ou corrigida. Adicionalmente, estes géis antiadesão têm sucesso limitado como uma barreira e têm espessura de camada indefinida. Estes géis antiadesão têm baixas propriedades hemostáticas, se

10 presentes de algum modo, e não fornecem nenhuma função de suporte de cicatrização da ferida e não direcionam o crescimento celular nem a regeneração do tecido. Ainda existem registros de maiores taxas de vazamentos de CSF (fluido cérebro-espinhal) resultando na conjunção com o uso de ADCON-L (Hieb, L. D. & Stevens, D. L. (2001). O vazamento de fluido cerebrospinal pós-operatório espontâneo depois da aplicação de gel

15 de barreira antiadesão: registro e revisão do caso da literatura. Spine, 26(7), 748-751.; Kuhn, J., Hofmann, B., Knitelius, H. O., Coenen, H. H., & Bewermeyer, H. (2005). Bilateral subdural haematomata and lumbar pseudomeningocele due to um chronic leakage of liquor cerebrospinalis after a lumbar discectomy with the aplicação of ADCON-L gel. J Neurol

20 Neurosurg Psychiatry, 76(7), 1031-1033; Le, A. X., Rogers, D. E., Dawson, E. G., Kropf, M. A., De Grange, D. A., & Delamarter, R. B. (2001). Unrecognized durotomy after lumbar discectomy: a report of four cases associated with the uso de ADCON-L. Spine, 26(1), 115-7; discussion 118.)

Um produto antiadesão comercialmente disponível é

25 DURAGEN PLUS. A barreira de DURAGEN PLUS, que é de origem bovina, não tem uma forma muito estável, que significa que sua forma e posição são difíceis de corrigir depois da aplicação. Adicionalmente, a barreira de DURAGEN PLUS não tem um alto limite de resistência e elasticidade. E em virtude do fato que a barreira de DURAGEN PLUS é porosa ela é

conseqüentemente não rigorosamente fluida (impermeável aos fluidos) e desta maneira tem sucesso limitado como uma função de barreira. Também, DURAGEN PLUS absorve sangue que pode resultar em bandas de fibrina que exerce um papel principal na patogênese de formações de adesão e sua

5 estrutura porosa promove crescimento celular não direcionado que também pode contribuir para a formação de tecido fibrótico não controlada e para adesões.

Conseqüentemente existe uma grande necessidade de um sistema inédito para regeneração de tecido direta e controlada para prevenir

10 formação peridural e perineural de adesão pós-cirúrgica e pós-traumática no processo de cicatrização e regeneração do tecido depois de danos cirúrgicos e traumáticos que não absorvem sangue, que suporta o remodelamento, regeneração, e o processo de cura da ferida, que direciona o crescimento das células, e que age efetivamente como uma camada de separação bifuncional.

Assim, é um objetivo da presente invenção fornecer um método inédito para prevenir adesão e fibrose peridural e perineural pós-cirúrgica e pós-traumática, e direcionamento do crescimento celular e controle da regeneração do tecido usando uma matriz de lâmina de colágeno bifuncional para revestir e separar os tecidos da coluna vertebral.

20 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é direcionada a composições e métodos de prevenir a formação de adesão e fibrose peridural e perineural pós-cirúrgica e pós-traumática, direcionar o crescimento celular e controlar a regeneração do tecido depois de cirurgia ou trauma usando uma biomatriz de

25 lâmina de colágeno de múltiplas camadas para revestir e separar tecidos, tais como tecidos da coluna vertebral. Os tecidos da coluna vertebral incluem aqueles tais como tecidos do canal espinhal, dura-máter e nervos espinhais. Os métodos da presente invenção podem ser usados, por exemplo, durante cirurgia na coluna, em um mamífero, por exemplo, um ser humano,

compreendendo a etapa de revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas. Em um exemplo do método anterior, a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas atrai células selecionadas do grupo que consiste em células de reparo e células de regeneração. Em um outro exemplo do método anterior, a estrutura de múltiplas camadas da biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional direciona o crescimento celular para a superfície, e o crescimento de células, tais como células de reparo e células de regeneração e é remodelada para o tecido natural depois do dito crescimento e é reabsorvida. Adicionalmente, a presente invenção diz respeito a um método para tratar um distúrbio em um mamífero caracterizada por um defeito do tecido da coluna vertebral, compreendendo a etapa de revestir e separar o dito tecido e/ou um tecido circundante com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas de maneira a inibir formação de tecido descontrolada.

No uso de composições terapeuticamente a base de colágeno, composições a base de colágeno são normalmente percebidas como estranhas pelo hospedeiro e freqüentemente encapsuladas. Desta maneira, re-celularização e remodelamento para o respectivo tecido anatômico não ocorre ou é impossível, não existe nenhum crescimento celular direcionado e nenhum controle do processo de regeneração e são meramente tolerados como um implante "biocompatível". Ao contrário, a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas da presente invenção age como uma membrana (por exemplo, membrana espinhal) que funciona como uma camada de separação temporária bioativa que direciona o crescimento celular na biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas e na superfície da biomatriz de lâmina de colágeno. Em vez de agir somente como uma barreira contra o crescimento celular, como a maioria das composições antiadesão, a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas da presente invenção é extremamente bioativa e suporta o remodelamento dos tecidos. Por exemplo,

duas semanas depois da implantação, a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas da presente invenção já está bem integrada na estrutura anatômica restaurada dos tecidos peridurais. Adicionalmente, durante e depois de cirurgia, a estrutura de múltiplas camadas de fluido tenso (por exemplo, sangue) não porosa da membrana de colágeno da presente invenção é capaz de prevenir distribuição descontrolada de sangue (por exemplo, fibrinogênio/fibrina) e material necrótico das áreas da ferida peridural, que são responsáveis pelas condições de suporte da formação da adesão no período de tempo inicial depois de cirurgia (ao contrário das composições porosas). A biomatriz de colágeno da presente invenção também previne contato direto entre a dura-máter e a área da ferida peridural, a área primária da formação de cicatriz e fibrose. Isto também contribui para o remodelamento controlado das estruturas anatômicas com prevenção e minimização de adesão descontrolada e formação de cicatriz e fibrose peridural.

A presente invenção é direcionada, em parte, ao seguinte:

1. Um método para direcionar o crescimento celular e regeneração de tecido controlada e prevenir adesão pós-cirúrgica e pós-traumática e formação de fibrose na superfície de um tecido em um mamífero, compreendendo as etapas de fornecer, revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas não porosa.

2. O método, de acordo com o parágrafo 1, em que os tecidos são selecionados do grupo que consiste em tecido da coluna vertebral, dura-máter e nervos espinhais.

3. O método, de acordo com os parágrafos 1 ou 2, em que o crescimento celular é direcionado nos interstícios entre as camadas da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas.

4. O método, de acordo com os parágrafos 1, 2 ou 3, em que o

mamífero é um humano.

5. O método, de acordo com o parágrafo 2, em que a etapa de revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas não porosa é realizada durante cirurgia na coluna.

5 6. O método, de acordo com os parágrafos 1, 2, 3, 4 ou 5, em que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas atrai células selecionadas do grupo que consiste em células de reparo e células de regeneração.

10 7. O método, de acordo com os parágrafos 1, 2, 3, 4 ou 5, em que a estrutura de múltiplas camadas da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas direciona o crescimento de células de reparo e regeneração na superfície ou em cima dela, e na biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas.

15 8. O método, de acordo com o parágrafo 5, 6 ou 7, em que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é reabsorvida e remodelada ao tecido natural durante o crescimento das células em um período de duas a cerca de doze semanas depois da cirurgia.

20 9. O método, de acordo com os parágrafos 1 – 8, em que a lâmina de colágeno é derivada de uma das seguintes fontes selecionadas do grupo que consiste em colágeno bovino, porcino, eqüino ou humano e misturas destes e é anexada aos tecidos do mamífero usando um selante de fibrina.

25 10. Um método de prevenir adesões em mamíferos compreendendo as etapas de fornecer, revestir e separar tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas não porosa biofuncional em que a lâmina de colágeno de múltiplas camadas tem interstícios entre as camadas para direcionar o crescimento celular na biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas ou em cima dela.

11. O método, de acordo com o parágrafo 10, em que o

método previne adesões pós-cirúrgicas e adesões causadas por trauma.

12. O método, de acordo com os parágrafos 10 ou 11, em que o método previne a formação de fibrose na superfície de tecidos.

13. O método, de acordo com os parágrafos 10, 11 ou 12, em que o tecido é selecionado do grupo que consiste em tecido da coluna vertebral, dura-máter, e nervos espinhais.

14. O método, de acordo com o parágrafo 10, em que as camadas individuais de lâmina de colágeno são macias e substancialmente não porosas.

15. O método, de acordo com o parágrafo 14, em que as camadas individuais da lâmina de colágeno são completamente não porosas.

16. O método, de acordo com os parágrafos 10, 11 ou 12, em que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas direciona o crescimento celular nos interstícios entre as camadas da lâmina de colágeno de múltiplas camadas e as camadas da lâmina de colágeno são reabsorvidas e remodeladas nos tecidos naturais pelo hospedeiro.

17. O método, de acordo com os parágrafos 10, 11 ou 12, em que a lâmina de colágeno de múltiplas camadas age como uma membrana espinhal temporária que direciona o crescimento celular de novas células, prevenindo ao mesmo tempo adesão e fibrose depois de cirurgia ou trauma.

18. O método, de acordo com os parágrafos 10 – 17, em que a lâmina de colágeno é derivada de uma das seguintes fontes selecionadas do grupo que consiste em colágeno bovino, porcino, eqüino ou humano e misturas destes.

19. O método, de acordo com o parágrafo 18, em que a lâmina de colágeno é produzida recombinantemente.

20. Os métodos, de acordo com os parágrafos 1, 10, 11, 12, 17 ou 18, em que os tecidos são selecionados do grupo que consiste em tecidos abdominais, ovarianos, pulmonares, musculares e de tendão.

21. Os métodos, de acordo com os parágrafos 1, 9, 10, ou 18, adicionalmente compreendendo a etapa de adicionar agentes bioativos (por exemplo, ativadores de plasminogênio), fatores de crescimento, antibióticos, medicamentos citostáticos e combinações destes.

5 22. Os métodos, de acordo com o parágrafo 1, 9, 10 ou 18, em que o método previne o crescimento de adesões entre a superfície do osso e tendão.

10 23. Uma composição para uso na prevenção da adesão e prevenção da formação de fibrose compreendendo uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas em que a lâmina de colágeno de múltiplas camadas direciona o crescimento de células nos interstícios entre as camadas de colágeno e na superfície externa da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas.

15 24. A composição, de acordo com o parágrafo 23, em que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é derivada de materiais selecionados do grupo que consiste em colágeno bovino, porcino, eqüino ou humanos.

20 25. A composição, de acordo com o parágrafo 23, em que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é derivada de colágeno eqüino.

26. A composição, de acordo com os parágrafos 23 ou 25, em que as camadas individuais da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas são macias e não porosas.

25 27. A composição, de acordo com os parágrafos 23 ou 25, em que as camadas individuais da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas são macias e substancialmente não porosas.

28. A composição, de acordo com o parágrafo 23 ou 25, em que as camadas da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas são porosas e opcionalmente os poros são interconectados.

29. Uso de uma composição na fabricação de um medicamento para prevenção de adesões e prevenção da formação de fibrose em um mamífero em que a composição consiste em uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas em que a lâmina de colágeno de múltiplas camadas direciona o crescimento de células de reparo e/ou regeneração nos interstícios entre as camadas de colágeno em que o colágeno é selecionado do grupo que consiste em colágeno bovino, porcino, eqüino ou humano e misturas destes.

30. O uso, de acordo com o parágrafo 29, em que as adesões são adesões pós-operatórias ou adesões causadas por trauma, tais como adesões peridural ou perineural.

31. O uso, de acordo com o parágrafo 29, em que a composição direciona o crescimento celular entre os interstícios das camadas.

32. O uso, de acordo com o parágrafo 29, em que a lâmina de colágeno cria uma selagem ou barreira apertada de líquido ou de célula.

33. O uso, de acordo com os parágrafos 29, 30, 31 ou 32, em que a lâmina de colágeno é anexada aos tecidos pelo uso de um selante cirúrgico ou por suturas.

34. O uso, de acordo com os parágrafos 29 – 33, em que a composição é disponível na forma de kit.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A figura 1 é uma fotografia SEM (microscópio eletrônico de varredura) que ilustra a superfície de uma biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional. Fibrilas de colágeno são claramente ilustradas. Não porosidade substancial da superfície é evidente a partir da figura;

As figuras 2A e 2B são fotografias tiradas em condições ESEM (microscopia eletrônica de varredura ambiental), que significa condições próximas do natural em uma atmosfera ligeiramente úmida, que ilustra a superfície superior, vista do lado de uma biomatriz de lâmina de

colágeno biofuncional. Não porosidade substancial é evidente a partir das fotografias;

As figuras 3A e 3B são fotografias tiradas em condições ESEM que ilustram a superfície inferior de uma biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional. Fibrilas de colágeno são ilustradas na figura 3A. Não
5 porosidade substancial da superfície é evidente a partir das figuras;

A figura 4 é uma fotografia SEM que ilustra a superfície de uma biomatriz hidratada de lâmina de colágeno biofuncional. Fibrilas de colágeno são claramente ilustradas na figura. 4. Não porosidade substancial
10 da superfície é evidente a partir da figura;

As figuras 5A, 5B, e 5C são fotografias tiradas em condições ESEM (atmosfera úmida) que ilustra a seção transversal de uma biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional. O material revela uma estrutura tipo uma pilha de lâminas empacotadas muito firmemente juntas. Interstícios entre as
15 camadas de colágeno são apresentados na figura;

As figuras 6A e 6B são fotografias SEM que ilustram a seção transversal de uma biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional seca. Múltiplas camadas de colágeno e interstícios entre as camadas de colágeno são ilustradas nas figuras;

20 A figura 7 é uma ilustração de uma modalidade da invenção, em que a biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional é colocada sobre as bordas de um defeito produzido cirurgicamente na vértebra, e no topo da dura-máter, de maneira a direcionar crescimento celular e controle da regeneração do tecido, prevenindo assim a adesão do tecido de ferida de
25 regeneração à dura-máter espinhal e nervos espinhais. Nesta modalidade, as bordas da biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional são presas à superfície da ferida externa lateral da vértebra;

A figura 8 é uma ilustração de uma outra modalidade da invenção, em que a biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional é colocada

em um defeito produzido cirurgicamente na vértebra, e no topo da dura-máter, de maneira a prevenir a adesão do tecido de ferida de regeneração na dura-máter espinhal e nervos espinhais. Nesta modalidade, as bordas da biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional são presas à superfície interna da vértebra, no canal espinhal;

A figura 9 é uma vista seccional da biomatriz de lâmina de colágeno uma semana pós operatoricamente. A estrutura da superfície é não porosa e forma uma barreira temporária. O sangue (eritrócitos) é separado e não penetra na biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas;

A figura 10 mostra a biomatriz de lâmina de colágeno uma semana depois da implantação. O paciente humano (idade: 18, sexo: feminino) foi operado no intervalo de 7 dias na estrutura de um tratamento cirúrgico de rotina (epilepsia). A biomatriz de lâmina de colágeno foi implantada epidural durante a primeira cirurgia (prevenção de vazamento de CSF). Durante a segunda cirurgia o implante de biomatriz de lâmina de colágeno foi removido rotineiramente antes da reabertura da dura. Depois de uma semana de implantação epidural a biomatriz de lâmina de colágeno ainda é mecanicamente estável e removível;

A figura 11 é uma vista seccional da orla da biomatriz de lâmina de colágeno uma semana depois da implantação. Fibroblastos invadiram a biomatriz a cerca de 25 μm do lado inferior e são espalhados em um crescimento longitudinal direcionado ao longo das estruturas de múltiplas camadas paralelas e crescem na biomatriz de lâmina de colágeno, direcionado para a estrutura de múltiplas camadas. A penetração na direção longitudinal é cerca de 220 a 320 μm . A velocidade do crescimento direcionado de células de reparo ao longo da estrutura de múltiplas camadas é cerca de 10 a 15 vezes maior na direção longitudinal comparado à direção transversal (“A figura 10”). Infiltração inflamatória mínima, que expressa o processo regenerativo em andamento;

A figura 12 mostra lâminas pós-operatórias de um coelho branco New Zealand (“NZW”) com amplificação x 20 com coloração HE, da forma preceituada no exemplo I. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é uma camada de separação entre a dura-máter e a área de ferida dorsal e fornece uma estrutura de múltiplas camadas bioativa que é não porosa e hermética a fluido para o sangue;

A figura 13 A mostra um coelho NZW 1 semana depois da operação; Amplificação: x 2,5; coloração HE. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas está fechando o defeito da laminectomia e separando o espaço epidural do início da formação de cicatriz dorsal rica em célula;

A figura 13 B mostra um coelho NZW 1 semana depois da operação; Amplificação: x20, coloração HE. A figura mostra a área de contato entre a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas e o osso na borda do defeito (a);

A figura 13 C mostra um coelho 1 semana depois da operação; Amplificação: x 20; Coloração HE. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas está no centro do defeito de laminectomia. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é integrada e está separando o espaço epidural ventral da formação de cicatriz dorsal;

A figura 13 D mostra um coelho NZW 1 semana depois da operação; Amplificação: x 2,5; Coloração HE. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas está fechando o defeito de laminectomia e separando a dura do início da formação de cicatriz dorsal rica em célula. Células não penetraram na superfície de na biomatriz de colágeno. Na borda da infiltração direcionada ao início da biomatriz de colágeno das células de reparo na estrutura (a) de múltiplas camadas;

A figura 13 E mostra um coelho NZW 1 semana depois da operação; Amplificação: x 2,5; Coloração HE. Uma esponja de colágeno

(DURAGEN) foi usada para revestir o defeito de laminectomia. Nenhuma camada de separação não porosa clara entre o espaço epidural e a área de ferida dorsal. A esponja é embebida com sangue;

5 A figura 14 A mostra um coelho duas semanas depois da operação; Amplificação: x 2,5; Coloração HE. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é completamente integrada. O reparo de tecido células infiltrou na biomatriz de colágeno e a dura-máter é separada por tecido frouxo com células de gordura da formação de cicatriz e a biomatriz de colágeno remodelada;

10 A figura 14 B mostra um coelho duas semanas depois da operação; Amplificação: x 4; Coloração HE; A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é completamente integrada. O reparo de tecido células infiltrou na estrutura da biomatriz de colágeno de múltiplas camadas. A dura-máter é separada pelo tecido frouxo com células de gordura da formação de cicatriz e a biomatriz de colágeno remodelada; e,

15 A figura 14 C mostra um coelho duas semanas depois da operação; Amplificação: x 10; Coloração HE; A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é completamente integrada. O reparo de tecido células infiltrou na estrutura da biomatriz de colágeno de múltiplas camadas (a). A dura-máter é separada pelo tecido frouxo com células de gordura da formação de cicatriz e a biomatriz de colágeno remodelada.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

20 Um aspecto da presente invenção diz respeito a um método para prevenir formação de adesão e fibrose peridural e perineural pós-cirúrgica e pós-traumática na superfície de tecido da coluna vertebral, incluindo tecidos selecionados do grupo que consiste em tecidos do canal espinhal, dura-máter, e nervos espinhais em um mamífero, compreendendo a

25 etapa de revestir o tecido e separar o tecido dos outros tecidos circundantes com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas

microscópicas.

A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas, de acordo com a presente invenção, é um biomatriz de múltiplas camadas microscopicamente reticulada nativa colagenosa consistindo em múltiplas camadas de uma lâmina substancialmente não porosa composta de fibrilas de colágeno em uma biomatriz que ocorre não naturalmente, por exemplo, da forma descrita no pedido de patente internacional WO 04/108179, cuja descrição está aqui incorporada pela referência na sua íntegra. A lâmina de colágeno usada, de acordo com a presente invenção, é barreira temporária biofuncional, bioativa, mecanicamente estável, elástica, não porosa e hermética a fluido, especialmente hermética ao sangue e célula, contra a distribuição descontrolada de sangue, fibrinogênio, material necrótico e tecidos danificados. Uma camada de separação bioativa definida entre os tecidos da coluna vertebral, assim, inicialmente protege o tecido da coluna vertebral e tecidos circundantes, um ou ambos dos quais podem ser abradados ou de outra forma danificados. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas age como agente hemostático e inibe a formação e distribuição de bandas de fibrina descontrolada, bem como hematomas, que são uma das principais causas de fibrose e formação da adesão, em áreas anatômicas que são localizadas ao lado ou próximas à dura-máter ou nervos espinhais.

Em um exemplo da presente invenção as células cuja adesão aos nervos espinhais e/ou à dura-máter é prevenida pelo método, de acordo com a presente invenção, são selecionadas de células do tecido conectivo. O mamífero pode se qualquer mamífero, tais como humanos, camundongos, ratos, gatos, cães, etc.

A etapa de revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional de múltiplas camadas pode ser realizada durante o tratamento de quaisquer lesões ou defeitos da dura-máter espinal

ou da coluna vertebral. Em um exemplo da presente invenção, a etapa de revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas pode ser realizada durante cirurgia na coluna. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas atrai células, tais como as células de reparo e células de regeneração e direciona seu crescimento através e na biomatriz de lâmina. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é reabsorvida e remodelada ao tecido natural pelo crescimento das células. A biomatriz de lâmina de colágeno age como um andaime bioativo e biofuncional para crescimento celular *in vivo* e é substituída por tecido de mamífero durante a regeneração e restauração. A biomatriz de lâmina de colágeno é ressorvível pelo mamífero em que ela é implantada. Esta propriedade pode ser melhorada pela biofuncionalidade das fibras de colágeno reticuladas nativas e estrutura de múltiplas camadas da biomatriz de lâmina de colágeno, da forma apresentada nas figuras 5 - 6.

O processo utilizado para produzir a biomatriz de lâmina de colágeno usada na invenção forma camadas empilhadas de fibrilas de colágeno. Entre cada uma das camadas estão interstícios nos quais as células e vasculatura do paciente podem migrar e formar novas estruturas de colágeno e tecido de conformação nativa. É uma propriedade benéfica do método, de acordo com a presente invenção, que as fibras de colágeno nativas biofuncionais e a estrutura da biomatriz de lâmina de colágeno em camadas não porosa promove o crescimento das células, vasculatura, e a formação de novas estruturas de colágeno através da biomatriz de lâmina de colágeno e nos interstícios que existem entre suas múltiplas camadas. Quando comparado ao crescimento celular aleatório, não guiado e descontrolado na ferida ou defeito, o crescimento direcionado e regeneração nos métodos da invenção previnem a formação de adesões e fibrose, mantendo a separação dos tecidos na estrutura anatômica da coluna vertebral. Assim, dor e complicações associados à adesões e fibrose peridural ou perineural são evitadas.

A frase “revestimento do tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas” significa, em geral, colocar o tecido em contato físico com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas. Em um exemplo da presente invenção, o contato do tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas resulta em uma implantação da dita lâmina. Exemplos do posicionamento da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas são ilustrados nas figuras 7 - 8.

A frase “biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas” ou “biomatriz de colágeno” ou “lâmina de colágeno” da forma aqui usada significa uma biomatriz (isto é uma matriz de material biocompatível e biofuncional) de fibrilas de colágeno nativas tratadas para remover componentes não colagenosos e para formar uma lâmina de fibrilas de colágeno com uma estrutura laminar de múltiplas camadas em um nível microscópico. A lâmina de colágeno de múltiplas camadas pode ser de qualquer fonte, tais como origem bovina, ovina, porcina, eqüina, ou humana tratada para remover componentes não colagenosos e para formar uma lâmina de fibrilas de colágeno, com as mesmas características físicas. A biomatriz de lâmina de colágeno da presente invenção é substancialmente não porosa, conforme determinável por microscopia eletrônica de varredura.

O termo “biofuncional” da forma aqui usada no contexto de uma biomatriz de lâmina de múltiplas camadas biofuncional significa que a biomatriz consiste em fibrilas de colágeno nativas que são reconhecidas e utilizadas pelas células de um animal de uma maneira similar às fibrilas de colágeno nativas no animal. Por exemplo, mas sem limitação, tais funções podem incluir migração de células de reparo e de regeneração ao longo das fibrilas de colágeno biofuncionais e a estrutura de múltiplas camadas, e a deposição de matriz extracelular nova pelas células incluindo, ou substituindo, as fibrilas de colágeno biofuncionais.

A frase “biomatriz que ocorre não naturalmente” da forma

aqui usada significa uma matriz ou arcabouço fabricado compreendendo fibrilas de colágeno nativas formadas de (i) um material existente na natureza (isto é, material natural) que foi tratado ou processado de uma maneira em que as fibrilas de colágeno contidas no material natural foram movidas ou reposicionadas de seu arranjo que ocorre naturalmente na estrutura do colágeno do material natural; ou (ii) um material não existente na natureza (isto é, um material não natural, artificial, tal como um material recombinante) tratado ou processado para manipular o arranjo das fibrilas de colágeno. Por exemplo, uma biomatriz que ocorre não naturalmente pode ser formada a partir de material de partida compreendendo colágeno que foi mecânica ou quimicamente processado (por exemplo, moído, picado, etc.). Uma biomatriz de colágeno que é formada a partir do tratamento ou processamento do material de partida de uma maneira que preserva a estrutura do arcabouço de colágeno que ocorre naturalmente não é uma biomatriz que ocorre não naturalmente (por exemplo, tecido epidérmico tratado para remove componentes celulares, preservando ao mesmo tempo a estrutura do colágeno que ocorre naturalmente).

Em uma modalidade da presente invenção, a biomatriz de lâmina de colágeno compreendeu proteínas do tecido conectivo consistindo em fibrilas de colágeno. Por exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno pode ser composta de proteínas do tecido conectivo consistindo em fibrilas de colágeno tipo I. Além de ser compostas de fibrilas de colágeno, a biomatriz de lâmina de colágeno pode adicionalmente compreender um excipiente, um conservante, um fator de crescimento, ou um aditivo que auxiliar na flexibilidade e elasticidade do produto final.

Cada camada de fibrilas de colágeno é substancialmente não porosa. A frase “substancialmente não porosa” da forma aqui usada significa que quaisquer poros que estão presentes em uma biomatriz de lâmina de colágeno como um resultado de precipitação de fibrilas de colágeno para

formar uma lâmina de colágeno são primariamente isolados um do outro. Os poros não são interconectados de uma maneira que atravessa a espessura da lâmina de colágeno. Perfurações mecânicas que criam furos na biomatriz de lâmina de colágeno não são poros. Em um exemplo da presente invenção, o material parece ser substancialmente livre de poros que seriam visíveis usando um microscópio eletrônico de varredura a 1.500x de amplificação. Fotos de microscópio eletrônico de varredura ilustram a natureza não porosa da biomatriz de lâmina de colágeno como nas figuras 1 - 4.

Em uma modalidade da presente invenção, a biomatriz de lâmina de colágeno utilizada na presente invenção é uma membrana de colágeno de múltiplas camadas que ocorre não naturalmente consistindo em camadas de inúmeras fibrilas de colágeno entrelaçadas multidirecionalmente. Assim, as fibrilas de colágeno são dispostas de uma maneira multidirecional em um plano, e estes planos formam lâminas, que criam uma estrutura de múltiplas camadas. Uma ilustração de uma biomatriz de lâmina de colágeno seca pode ser vista em uma fotomicrografia (SEM), que ilustra a superfície da biomatriz de lâmina de colágeno em que as fibrilas de colágeno são embebidas (Figura 1). As fibrilas de colágeno são visíveis na superfície das fotografias para a superfície superior da biomatriz de lâmina de colágeno em condições ESEM (Microscopia eletrônica de varredura ambiental), em que uma atmosfera ligeiramente úmida fornece condições próximas do natural. A superfície parece macia e substancialmente não porosa (Figura 2). Fotografias (ESEM) da superfície inferior de biomatriz de lâmina de colágeno ilustram a não porosidade substancial da biomatriz de lâmina de colágeno na figura 3.

A única orientação das fibras de colágeno em dimensões bidimensionais nas múltiplas camadas é principalmente responsável por uma hermeticidade a líquido, mesmo em alta pressão hidrostática, e fornece boa resistência com alta elasticidade. Em virtude das inúmeras camadas de fibrila de colágeno finas orientadas em paralelo da biomatriz de lâmina de colágeno,

este material é adequado para substituição temporária do tecido do próprio corpo no fechamento e separação do defeito depois do revestimento e fornece um arcabouço de biomatriz biofuncional para crescimento celular para formar um novo tecido. A estrutura de múltiplas camadas da presente invenção
5 melhora as características de ser hermética a líquido da biomatriz de lâmina de colágeno.

Embora a biomatriz de lâmina de colágeno seja substancialmente não porosa, existem interstícios entre as camadas de fibrilas de colágeno. A biomatriz de lâmina de colágeno é análoga a uma pilha de
10 páginas em que cada página é substancialmente macia e não porosa, com um espaço entre cada página. Quando na sua forma seca os interstícios são mais pronunciados. Os interstícios são reduzidos quando a biomatriz de lâmina de colágeno é observada em condições próximas do natural em uma atmosfera ligeiramente úmida. A redução dos interstícios da biomatriz de lâmina de
15 colágeno é ilustrada nas figuras das seções transversais da biomatriz de lâmina de colágeno em uma atmosfera úmida na figura 5. Além de promover uma propriedade hermética a líquido, as inúmeras camadas de fibrila de colágeno finas orientadas em paralelo da biomatriz de lâmina de colágeno simultaneamente servem como um arcabouço bifuncional bioequivalente para
20 crescimento celular para construção *de novo* do tecido do próprio corpo.

A mudança no volume da biomatriz de lâmina de colágeno usada, de acordo com a presente invenção, é pequena ou insignificante quando hidratada. Ao contrário dos produtos de substituição porosos, a biomatriz de lâmina de colágeno substancialmente retém seu tamanho e forma
25 na hidratação, tendo excelente estabilidade de forma mesmo depois da hidratação, e não causando nenhum problema de intumescimento ou encolhimento depois do contato com o tecido. Uma vez hidratada e implantada, a biomatriz de lâmina de colágeno não significativamente se expande ou contrai em área ou espessura até o ponto em que ela romperia

suturas cirúrgicas ou desuniria da fibrina ou outras selagens de cola biocompatível que mantém a biomatriz de lâmina de colágeno no tecido do paciente.

Em um exemplo da presente invenção, o encolhimento ou
5 intumescimento da área da biomatriz de lâmina de colágeno seca pode variar de cerca de -5 % a cerca de 20 % quando completamente hidratada. Em um outro exemplo, a área da biomatriz de lâmina de colágeno seca pode variar entre cerca de -5 % a cerca de 10 % quando completamente hidratada. Em um exemplo adicional, a área da biomatriz de lâmina de colágeno seca varia entre
10 cerca de -5 % a cerca de 5 % quando completamente hidratada. Por exemplo, a área da biomatriz de lâmina de colágeno seca aumenta não mais que cerca de 4 por cento quando completamente hidratada.

Em um exemplo da presente invenção, a biomatriz de lâmina de colágeno aumenta até cerca de 6 vezes sua espessura seca quando ela é
15 completamente hidratada. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno aumenta até cerca de 3 vezes sua espessura seca quando ela é completamente hidratada. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno aumenta até cerca de duas vezes sua espessura seca quando ela é completamente hidratada.

20 A espessura da biomatriz de lâmina de colágeno para uso na presente invenção pode variar conforme necessário por uma aplicação particular. A variação da quantidade de material de partida utilizada para produzir um tamanho particular de biomatriz de lâmina de colágeno pode controlar a espessura da biomatriz de lâmina de colágeno. Em um exemplo da
25 presente invenção, a biomatriz de lâmina de colágeno usada, de acordo com a presente invenção, quando na sua forma seca, tem uma espessura entre cerca de 0,01 mm a cerca de 3,0 mm. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno tem uma espessura entre cerca de 0,02 mm a cerca de 2,0 mm. Em um exemplo adicional, a biomatriz de lâmina de colágeno tem uma

espessura entre cerca de 0,03 mm a cerca de 1,5 mm. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno tem uma espessura entre cerca de 0,05 mm a cerca de 1 mm. Ainda um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno tem uma espessura de cerca de 1,0 mm ou menos.

5 O peso seco da biomatriz de lâmina de colágeno depende da sua espessura desejada. Em um exemplo, o peso seco da biomatriz de lâmina de colágeno é entre cerca de 1 mg/cm² a cerca de 50 mg/cm². Em um outro exemplo, o peso seco da biomatriz de lâmina de colágeno é entre cerca de 1,5 mg/cm² a cerca de 30 mg/cm². Ainda em um outro exemplo, o peso seco da biomatriz de lâmina de colágeno é entre cerca de 2 mg/cm² a cerca de 20 mg/cm². Em um exemplo adicional, o peso seco da biomatriz de lâmina de colágeno é entre cerca de 2,5 mg/cm² a cerca de 15 mg/cm². Por exemplo, o peso seco da biomatriz de lâmina de colágeno é entre cerca de 3 mg/cm² a cerca de 10 mg/cm².

15 Em um exemplo da presente invenção, o peso da biomatriz de lâmina de colágeno aumenta até cerca de 15 vezes seu peso seco mediante hidratação. Em um outro exemplo, o peso da biomatriz de lâmina de colágeno aumenta até cerca de 10 vezes seu peso seco mediante hidratação. Em um outro exemplo, o peso da biomatriz de lâmina de colágeno aumenta até cerca de 7 vezes seu peso seco mediante hidratação. Ainda em um outro exemplo, o peso da biomatriz de lâmina de colágeno aumenta até cerca de 5 vezes mediante hidratação de seu estado seco.

25 A biomatriz de lâmina de colágeno usada, de acordo com a presente invenção, benéficamente tem alto limite de resistência, que melhora e suporta o manuseio da biomatriz de lâmina de colágeno, por exemplo, durante sua aplicação cirúrgica e fornece uma maior estabilidade mecânica, por exemplo, depois de sua implantação. Adicionalmente, o aumento da espessura da biomatriz de lâmina de colágeno pode significativamente aumentar o limite de resistência.

A propensão da biomatriz de lâmina de colágeno material entrelaçar-se na pressão exercida pode ser medida como sua “carga limite final” ou “força limite final,” daqui em diante referido como “força limite final”. A força limite final de uma biomatriz de lâmina de colágeno pode ser determinada submetendo pressão a uma tira da biomatriz de lâmina de colágeno tendo uma largura especificada e determinando a quantidade de pressão aplicada que resulta em falha (por exemplo, entrelaçamento ou ruptura) da biomatriz de lâmina de colágeno. A força limite final pode ser quantificada usando a seguinte equação: “Força limite final” = força aplicada/largura da tira da biomatriz de lâmina de colágeno = Newtons/cm-tira.

Em um exemplo da presente invenção, a biomatriz de lâmina de colágeno tem uma força limite final entre cerca de 1 e cerca de 30 Newtons/cm-tira, por exemplo, entre cerca de 1,5 e cerca de 15 Newtons/cm-tira, por exemplo, entre cerca de 2 e cerca de 10 Newtons/cm-tira, por exemplo, entre cerca de 3 e cerca de 6 Newtons/cm-tira.

Embora a biomatriz de lâmina de colágeno usada, de acordo com a presente invenção, tenha um alto limite de resistência, ela permanece elástica e flexível quando hidratada. Esta característica permite que a biomatriz de lâmina de colágeno idealmente se adapte às condições anatômicas (por exemplo, curvas) presentes no lado de contato.

Quando no seu estado hidratado, a biomatriz de lâmina de colágeno pode ser facilmente deslocada, por exemplo, no local cirúrgico e idealmente modelada e adaptada à forma e posição do defeito, por exemplo, onde ela está sendo implantada. Uma vez implantado, o enxerto da biomatriz de lâmina de colágeno permanece macio e pode ser reposicionado, se necessário. Com o tempo, células e vasculatura migram direcionadas através das múltiplas camadas da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas, eventualmente substituindo a biomatriz de lâmina de colágeno de

múltiplas camadas com um novo tecido. As células migram e a vasculatura se forma nas camadas da biomatriz de lâmina de colágeno, o tecido toma a forma da biomatriz de lâmina de colágeno de uma maneira dirigida. Depois da organização celular da biomatriz de lâmina de colágeno com o tecido

5 conectivo recém formado, a formação da adesão na dura espinhal ou tecidos do nervo espinhal é minimizada.

O colágeno para uso na fabricação da biomatriz de lâmina de colágeno pode ser obtido a partir de qualquer fonte disponível. Por exemplo, mas sem limitação, colágeno pode ser de origem bovina, ovina, porcina ou

10 humana. O colágeno pode ser coletado de um tecido que ocorre naturalmente, tais como tendão, cório, ou outro tecido rico em colágeno ou pode ser produzido por meio genéticos recombinantes. Da forma descrita a seguir, uma modalidade exemplar da invenção utiliza colágeno eqüino derivado do tendão de Aquiles.

15 Durante o processo de fabricação, por exemplo, da forma descrita em WO 04/108179, as fibrilas de colágeno se tornam naturalmente reticuladas a medida em que as fibrilas precipitam da solução para formar uma lâmina de colágeno. Diferente da reticulação das fibrilas de colágeno com produtos químicos ou radiação (por exemplo, radiação ionizante ou

20 ultravioleta), que permite reticulação natural das fibrilas de colágeno garante sua biofuncionalidade, promove regeneração acelerada e menores tempos de ressorção, uma vez que a biomatriz de lâmina de colágeno é colocada em contato com o tecido. A reticulação das fibrilas de colágeno com produtos químicos ou radiação pode resultar em maiores tempos de ressorção, ou

25 mesmo não ressorção, encapsulação e formação de cicatriz. A reticulação natural das fibrilas na biomatriz de lâmina de colágeno utilizada na invenção ocorre por meios naturais, tipo fisiológicos. Principalmente, esta reticulação natural é por meio de interações não covalentes (por exemplo, interações de van der Waals ou dipolo-dipolo) ou pela formação de ligações de base de

Schiff facilmente dissociáveis as cadeias laterais de aminoácido da molécula de colágeno. A reticulação intermolecular do colágeno é responsável pela estabilidade física e química. A etapa chave na formação de reticulações de colágeno depende da conversão enzimática dos resíduos de lisina ou hidroxilisina e dá origem a aldeídos, alisina e hidroxialisina. Estes grupos aldeído espontaneamente reagem com grupos amino reativos resultando na formação de componentes da base de Schiff contendo produtos de aldolcondensação lábeis com ligações aldimina lábeis (tipo, por exemplo, -CH=N-). Assim, as fibrilas do produto da presente invenção podem ser dissociadas pelo tratamento com, por exemplo, um ácido fraco. A reticulação que surge do uso de agentes de reticulação química pode ser detectada da presença de frações de reticulação reticuladas covalentemente estáveis. Comumente, isto é realizado usando um reagente da base de Schiff (por exemplo, glutaraldeído) para formar produtos de reação da base de Schiff, e então estabilizando as ligações por meio tanto de um rearranjo de Amadori quanto ou condições de redução. Além do mais, colágeno pode ser reticulado por vários reagentes carbodiimida bifuncionais. A reticulação que surge do uso de radiação pode ser detectada pela presença de ligações covalentes estáveis entre as fibrilas de colágeno, causadas pela reação de frações de radical livre geradas durante a irradiação. As fibrilas no produto da presente invenção, por outro lado, são substancialmente não reticuladas sem nenhuma ligação covalente estável e não foram tratadas de uma maneira química ou radioativa. Assim, quaisquer associações entre as fibrilas no produto da invenção são substancialmente não covalentes ou prontamente reversíveis, e não são estavelmente reticuladas. Produtos químicos, tais como cianamida, glutaraldeído, formaldeído, acríamida, carbodiimidazonas, diimidatos, bisacrilamidas, e similares foram utilizados no passado para reticular quimicamente as fibrilas de colágeno. O uso de tais produtos químicos, entretanto, pode resultar em riscos de toxicidade associados ao tecido neural

negligentemente colocado em contato com produtos químicos residuais na biomatriz de lâmina de colágeno. O processo de precipitação, desta forma, evita os riscos de toxicidade de reticulação de produtos químicos e maiores tempos de ressecção associados à reticulação das fibrilas de colágeno com produtos químicos ou radiação.

A composição de colágeno precipitada, seca resultante forma uma biomatriz de lâmina de colágeno composta de uma membrana de colágeno em camadas de alto peso molecular consistindo em inúmeras camadas de fibrilas de colágeno entrelaçadas naturalmente multidirecionadas bidimensionais. A biomatriz de lâmina de colágeno principalmente contém colágeno tipo I intersticial. A biomatriz de lâmina de colágeno substancialmente não tem nenhum poro e é principalmente hermética a líquido. Testes de difusão imune podem ser conduzidos no produto para garantir a ausência de proteína estranha. A biomatriz de lâmina de colágeno pode ser esterilizada com gás com óxido de etileno (ETO) ou esterilização com gás similar ou por irradiação.

Um benefício significativo de usar uma biomatriz de lâmina de colágeno eqüina, de acordo com a presente invenção, é risco substancialmente baixo de transmitir uma doença a um paciente em contato com a dita lâmina. O processo de fabricação em que as fibrilas de colágeno são tratadas com ácidos (por exemplo, ácido clorídrico, ácido acético, e similares) e bases, tal como hidróxido de sódio, para produzir a lâmina de colágeno eqüina que benéficamente age para inativar ou reduzir os níveis infecciosos de bactérias, vírus e príons que podem estar presentes. O tratamento do biomaterial com ácido clorídrico, hidróxido de sódio, óxido de etileno (ETO), e similares foi reconhecido na tecnologia anterior como métodos aprovados nas regulamentações de medicamento e biomaterial para inativar príons e vírus. Tal tratamento pode, em algumas regulamentações, reduzir as necessidades regulatórias para testar a lâmina de colágeno eqüina em uma base lote a lote.

Assim, o tratamento das fibrilas de colágeno durante o processo de fabricação melhora a segurança do produto e reduz o risco de transmissão de doença a um paciente.

5 O material eqüino que foi submetido ao processo de fabricação descrito anteriormente não é conhecido como transmissor de nenhum patógeno aos pacientes. Assim, além do processo de fabricação, a utilização de colágeno de base eqüina adicionalmente evita o risco de transmitir encefalite espongiforme que foi previamente associada a materiais cadavéricos humanos. O uso de colágeno derivado de uma origem eqüina, tal
10 como colágeno derivado de tendões de Aquiles eqüinos evita o risco de transmitir possível encefalopatia espongiforme (TSE), que também é conhecida como encefalopatia espongiforme bovina (BSE) ou escrapie. A transmissão desta doença foi associada ao uso de material biológico obtido de fontes ruminantes (por exemplo, material biológico de gado, cabras, ovelha e
15 similares).

A biomatriz de lâmina de colágeno usada, de acordo com a presente invenção, em que o colágeno é derivado de uma origem eqüina e tratado (por exemplo, com enzimas) adicionalmente reduz o risco de elicitar uma resposta imune.

20 A biomatriz de lâmina de colágeno derivada de eqüino também resulta em uma menor resposta inflamatória. Quando comparado às lâminas que contêm colágeno derivado de fontes, tal como fáscia lata humana, o número de células inflamatórias resultante do contato com a biomatriz de lâmina de colágeno eqüina é significativamente menor.

25 Antes do uso, a biomatriz de lâmina de colágeno seca pode ser hidratada, por exemplo, em salina fisiológica. Em um exemplo, a salina fisiológica compreende um 0,9 % de solução de cloreto de sódio. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno é hidratada em soluções contendo excipientes ou medicamento. O tempo necessário para hidratar a

biomatriz de lâmina de colágeno é relacionado à espessura da lâmina. A biomatriz de lâmina de colágeno é hidratada até que ela seja consistente na espessura através de toda sua área. Em um exemplo a biomatriz de lâmina de colágeno é hidratada entre cerca de 0,5 segundo e cerca de 1 hora em salina fisiológica. Em um outro exemplo a biomatriz de lâmina de colágeno é hidratada entre cerca de 0,5 segundo e cerca de 30 minutos em salina fisiológica. Em um outro exemplo a biomatriz de lâmina de colágeno é hidratada entre cerca de 0,5 segundo e cerca de 20 minutos em salina fisiológica. Em um outro exemplo a biomatriz de lâmina de colágeno é hidratada entre cerca de 0,5 segundo e cerca de 10 minutos em salina fisiológica. Ainda em um outro exemplo a biomatriz de lâmina de colágeno é hidratada entre cerca de 0,5 segundo e cerca de 2 minutos em salina fisiológica. Em um outro exemplo a biomatriz de lâmina de colágeno é hidratada cerca de 0,5 segundo a dez segundos em salina fisiológica, por exemplo, imergindo a biomatriz de lâmina de colágeno em salina fisiológica. Em um outro exemplo a biomatriz de lâmina de colágeno não é hidratada antes de entrar em contato com o tecido.

A biomatriz de lâmina de colágeno pode ser anexada ao tecido do paciente por técnicas cirúrgicas estabelecidas, por exemplo, por selante de fibrina, cola de tecido, suturas cirúrgicas, ou por técnicas cirúrgicas de ajuste de pressão. Alternativamente, a atração natural entre a biomatriz de lâmina de colágeno e o tecido, ou o sangue na superfície do tecido, pode ser usada para anexar a biomatriz de lâmina de colágeno ao tecido sem o uso de nenhum selante, cola, suturas, ou técnicas de ajuste de pressão. Uma vez hidratada, a biomatriz de lâmina de colágeno pode ser cortada ligeiramente maior que, por exemplo, a abertura cirúrgica no tecido do paciente. A biomatriz de lâmina de colágeno, desta maneira, ligeiramente sobrepõe o tecido do paciente ao qual ela é anexada. Em um exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno hidratada é classificada para ter uma sobreposição de aproximadamente 0,5 cm a cerca

de 1 cm com o tecido. A quantidade de sobreposição pode variar dependendo das preferências do versado.

Em um exemplo, de acordo com a interação de colágeno com fibrinogênio e fibronectina bem conhecida, a biomatriz de lâmina de colágeno pode ser fixada no lugar com selante de fibrina. Exemplos de selante de fibrina aprovados para uso cirúrgico incluem selantes de fibrina TISSUCOL e TISSEEL (Baxter AG, Vienna, Austria). Alternativamente, uma cola de tecido que não inclui uma reação inflamatória extensiva e é aprovada para uso na cirurgia na coluna, também pode ser utilizada. O selante de fibrina ou cola de tecido pode ser aplicado em uma linha contínua em volta da porção da biomatriz de lâmina de colágeno que sobrepõe o tecido de maneira a formar um selante hermético a líquido. Uma fixação de selante hermético a líquido é vantajosa uma vez que ela evita complicações associadas ao contato dos tecidos adjacentes com hemorragias, por exemplo, indução da formação da adesão por fibrina. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno produz um selante hermético a líquido quando anexada ao tecido com uma linha contínua de selante de fibrina ou cola de tecido. Em um exemplo adicional, a biomatriz de lâmina de colágeno que sobrepõe o tecido pode ser pontilhada com selante de fibrina ou cola de tecido para anexá-la ao tecido. Ainda em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno é anexada por suturando cirurgicamente ao tecido, uma vez que ela foi posicionada ao sítio de contato desejado. Se a biomatriz de lâmina de colágeno for suturada, técnicas de sutura sem tensão devem ser usadas para prevenir o rompimento da lâmina. Recomenda-se selar as linhas de sutura, por exemplo, com um selante de fibrina. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno é posicionada e implantada de acordo com técnicas de ajuste de pressão conhecidas na tecnologia. Nesta técnica, a biomatriz de lâmina de colágeno é posicionada no sítio de implantação desejado e mantida no lugar pelos tecidos circundantes. Assim, o enxerto permanece no lugar sem o uso de suturas

cirúrgicas, selante de fibrina, ou cola de tecido. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno é posicionada e implantada sem o uso de nenhum selante, cola, suturas, ou técnicas de ajuste de pressão. Nesta técnica, a biomatriz de lâmina de colágeno é posicionada no sítio de implantação
5 desejado e mantida no lugar por atração ou adesão natural que ocorre entre a biomatriz de lâmina de colágeno e o tecido mamífero. Em um outro exemplo, a biomatriz de lâmina de colágeno pode ser aplicada a um tecido e afixada por qualquer um dos métodos anteriores, e então uma outra biomatriz de lâmina de colágeno pode ser aplicada a um tecido adjacente, e aplicada por qualquer
10 um dos métodos anteriores, resultando assim em lâminas adjacentes da biomatriz de lâmina de colágeno.

Opcionalmente, a biomatriz de lâmina de colágeno da presente invenção pode ser utilizada em conjunto com outros produtos. Por exemplo, depois de aplicar a biomatriz de lâmina de colágeno ao tecido e amarrar por
15 qualquer um dos meios descritos anteriormente, um produto antiadesão pode ser aplicado à superfície superior ou inferior da biomatriz de lâmina de colágeno, ou aos tecidos adjacentes. Em uma modalidade, um produto a base de PEG, tal como CoSeal® (disponível da Baxter Healthcare corporation) pode ser aplicado à superfície superior ou inferior da biomatriz de lâmina de
20 colágeno, ou aos tecidos adjacentes. Uma vez que a biomatriz de lâmina de colágeno da invenção previne adesão separando tecidos e direcionando a regeneração do tecido, em vez de criar uma superfície “escorregadia”, sua ação pode ser complementada utilizando produtos que temporariamente criam uma superfície “escorregadia” à qual as células não irão se aderir. Em uma
25 outra modalidade uma biomatriz de lâmina de colágeno pronta para uso, que já foi revestida com um produto a base de PEG em uma ou ambas as superfícies pode ser usada.

Adicionalmente, a presente invenção diz respeito ao uso de uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas na fabricação de

um medicamento, isto é, um material aplicável medicamente, para tratar um distúrbio tais como, por exemplo, lesões, cirurgias, ou doenças a base de patógeno, em um mamífero caracterizado por uma desconexão de um tecido selecionado do grupo que consiste em coluna vertebral e dura-máter, e o tecido circundante.

Exemplos: Adesão e formação de fibrose, objetivo básico e de estudo

A formação excessiva de tecido de cicatriz e adesão é um problema sério na cirurgia de coluna, freqüentemente causando dor radicular e piora física, por exemplo, cirurgia de disco lombar sem êxito ou síndrome pós discectomia. A incidência de lesão da dura-máter no caso de cirurgia de revisão é reportada entre 5 e 10 % na literatura.

Os parâmetros críticos mais importantes para o desenvolvimento pós-operatório e extensão da formação da adesão são:

- a situação pós-operatória da área cirúrgica (adesões/fibrose já existentes, inclusive uma predisposição genética do paciente);

- o desempenho intra-operatório da cirurgia (extensão da área ferida, evitação de lesões de tecidos e certas estruturas anatômicas (por exemplo membranas) , cuidado da hemostase, evitação da secagem de tecidos etc.); e,

- medições intra-operatórias para prevenção e minimização de adesões pós-operatórias, por exemplo, implantação de implantes antiadesivos tipo esponjas, lâminas ou gel.

Em virtude das múltiplas causas de lesões, medições cirúrgicas podem nunca alcançar 100 % de prevenção da adesão em todos os paciente, mas pré-condições dos parâmetros mencionados anteriormente podem ser influenciadas. O objetivo cirúrgico é a otimização da situação da ferida cirúrgica durante e no período pós-operatório. Sabe-se que as condições de ferida neste período são principalmente responsáveis pela formação de

qualquer adesão e formação de fibrose pós-operatória.

Considerando a patogênese das adesões/fibrose peridural, a investigação do comportamento de métodos e produtos de prevenção e minimização potencialmente da proteção e adesão da dura durante a formação de cicatriz fisiológica na área de ferida dorsal peridural é focada no primeiro período pós-operatório (aprox. uma a duas semanas pós cirurgia). Este é o período de tempo mais importante para determinar se uma composição particular preenche a função de proteger e separar a dura-máter da formação de cicatriz na área de defeito cirúrgico dorsal e evitar a distribuição pós-operatória descontrolada de sangue, fibrinogênio, fibrina e material necrótico, que são os principais fatores e causa fundamental para qualquer formação de cicatriz/adesão/fibrose descontrolada.

A situação em duas semanas pós-operatório permite a avaliação da integração do implante e conclusões do tipo e potencial da bioatividade, biofuncionalidade e compatibilidade do tecido dos implantes. Por exemplo, depois de duas semanas o implante está bem aceito, celularizado e integrado na anatomia dorsal ou, ao contrário, ele age como um corpo estranho a longo prazo e provoca encapsulações e formação de cicatriz. O objetivo dos seguintes exemplos é avaliar a biofuncionalidade como uma camada de separação temporária e como biomatriz para crescimento celular e regeneração do tecido de uma biomatriz de lâmina de colágeno biológica no período pós-operatório e o valor para a prevenção e minimização de adesão clinicamente relevante e formação de tecido de cicatriz descontrolada.

Exemplo I: Materiais e Métodos: Experimentos animais que mostram menores adesões na cirurgia na coluna usando a biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional

A) Materiais e Métodos apresentados nas As figuras 7-9:

Animais: coelho New Zealand White, ambos os sexos, peso de 4 kg. Origem: Charles River, Sulzfeld, Deutschland ou Harlan Winkelmann,

D-33178 Borchten.

Modelos e Grupos:

Uso de uma biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional: Laminectomia, exposição da raiz do nervo espinhal e aplicação da biomatriz de lâmina de colágeno. Cada grupo inclui 20 animais.

Grupo 1: Laminectomia, Fechamento da pele (Controle).

Grupo 2: Laminectomia, Revestimento com biomatriz de lâmina de colágeno.

Cirurgia:

Os animais foram posicionados na posição de bruços e amarrados com a área cirúrgica (espinha lombar) raspada. Em condições estéreis, depois de incisão mediana da pele, a musculatura para vertebral foi desanexada dos processos espinhais e a lâmina da coluna vertebral lombar exposta. Hemilaminectomia da 3^a e 4^a vértebra lombar foi conduzida. Exposição das duas raízes do nervo espinhal correspondentes e dos canais da raiz. Continuação da cirurgia de acordo com os diferentes grupos também é descrita.

Anestesia geral: Ketavet 60 mg/kg

Rompun 16 mg/kg s.c.

Tiopental i.v. através da veia do ouvido, com base no efeito de Narkosis, intubação, ventilação mecânica

Medicação para dor: 2 x dia. Temgesic 0,05mg/kg s.c. por 3-4 dias pós-operatório. Eutanasia: No geral, sobredosagem i.v. de barbiturato para anestesia

Avaliação e exame patológico:

Cada grupo de animais foi eutanizado como se segue: 10 animais depois de 10 dias, 10 animais depois de 4 semanas e 10 animais depois de 3 meses. Parâmetros de avaliação: Extensão das adesões e fibrose. Subseqüentemente, uma histologia extensiva foi realizada. Experimentos

mostraram menor formação da adesão no grupo que utiliza a biomatriz de lâmina de colágeno biofuncional.

Exemplo II: Biomatriz de lâmina de colágeno uma semana depois da implantação em paciente humano

5 O paciente humano (idade: 18, sexo: feminino) foi operado no intervalo de 7 dias no plano de um tratamento cirúrgico de rotina (epilepsia). A biomatriz de lâmina de colágeno foi implantada na epidural durante a primeira cirurgia (prevenção de vazamento de CSF). Durante a segunda
10 cirurgia, o implante de biomatriz de lâmina de colágeno foi removido rotineiramente antes da reabertura da dura. Depois de uma semana de implantação epidural a biomatriz de lâmina de colágeno ainda é mecanicamente estável e removível, da forma apresentada na figura 10.

A figura 11 é uma vista seccional da biomatriz de lâmina de colágeno da figura 10 uma semana depois da implantação. Conforme pode ser
15 visto, fibroblastos crescem na biomatriz de lâmina de colágeno, direcionada pela estrutura de múltiplas camadas. A penetração na direção longitudinal é cerca de 220 a 320 μm .

A velocidade do crescimento direcionado de células de reparo ao longo da estrutura de múltiplas camadas é cerca de 10 a 15 vezes maior na
20 direção longitudinal comparada à direção transversal (“figura 10”). Infiltração inflamatória mínima é mostrada, expressando o processo regenerativo em andamento.

**Exemplo III: Crescimento celular, regeneração do tecido e prevenção da adesão e fibrose peridural depois da implantação de uma biomatriz de
25 lâmina de colágeno na cirurgia na coluna**

Materiais:

Fibrilas eqüinas de colágeno nativo (principalmente colágeno tipo I) produzidas a partir de tendão de Aquiles picado purificado de cavalos são precipitadas a fibrilas. A biomatriz de forma estável flexível e elástica é

especialmente modificada por engenharia e tem uma estrutura de múltiplas camadas hermética a fluido não porosa. A espessura da lâmina de colágeno de múltiplas camadas membrana eqüina seca foi cerca de 0,1 mm. Na condição úmida a espessura da membrana aumentou até 0,3 mm.

5 Anestesia geral: Ketavet 60 mg/kg
 Rompun 16 mg/kg s.c.
 Tiopental i.v. através da veia do ouvido, com base no efeito de Narkosis, intubação, ventilação mecânica

 Medicação para dor: 2 x dia. Temgesic 0,05mg/kg s.c. por 3-4
 10 dias pós-operatório.

 Eutanasia: No geral, sobredosagem i.v. de barbiturato para anestesia

Modelo animal:

 O presente estudo foi realizado em coelhos New Zealand
 15 White (“NZW”) pesando em média 3 kg na hora da cirurgia e sua idade média foi 4 meses. Todos os coelhos foram fêmeas e aprovações para os estudos animais foram realizadas depois da aprovação formal pelas autoridades da cidade de Vienna, Áustria. O projeto da cirurgia neste modelo animal experimental em coelhos foi similar à maioria das intervenções operatórias
 20 comuns em humanos. Uma laminectomia e ressecção foram realizadas da junta da faceta na coluna lombar 4 a 5 (L4/5). Para realizar a completa extensão de uma cirurgia real, tal como uma cirurgia de Fusão Intercorporal Lombar Posterior (PLIF), o ligamento flavum foi ressecado. A dura anterior à medula espinhal permaneceu intacta. A área da laminectomia foi revestida por
 25 uma biomatriz de lâmina de colágeno biológica da presente invenção. O músculo paravertebral foi colocado de volta no lugar e a fásia foi fechada por suturas absorvíveis. A pele foi fechada usando suturas syntofil.

 Os coelhos receberam medicação para dor pós-operatória e infusão de fluido durante os primeiros três dias e receberam alimento

misturado. Os coelhos foram eutanizados por sobredose de tiopental e as áreas operadas da coluna foram removidas e isoladas para avaliação histológica.

Métodos histológicos:

5 A coluna vertebral foi excisada em blocos e submersa em solução de formalina 10 % para fixação. Depois da descalcificação, cada vértebra lombar foi cortada em pedaços, desidratada e embebida em parafina. Sete seções de 3 µm de espessura foram tomadas de cada amostra.

10 As seções foram coradas com Haematoxilina-Eosina para histologia geral manchando todas as células e componentes ósseos. Os pedaços foram examinados avaliando as estruturas anatômicas bem como a relação entre a dura-máter e a área de ferida cirúrgica dorsal peridural, crescimento celular na biomatriz de lâmina de colágeno e a ausência/presença e extensão da formação da adesão e formação de cicatriz fibrosa peridural.

Resultados/Descobertas histológicas:

15 As seções foram coradas com Hematoxilina-Eosina para histologia geral manchando todas as células e componentes ósseos. Os pedaços foram examinados avaliando as estruturas anatômicas bem como a relação entre a dura-máter e a área de ferida cirúrgica dorsal peridural. O crescimento celular na biomatriz de lâmina de colágeno e em cima dela e a
20 quantidade e qualidade da reação inflamatória na biomatriz e tecido circundante foram analisados. O processo de integração/incorporação e a ausência/presença e extensão da formação da adesão e organização do tecido conectivo peridural também foram analisados.

O estudo mostra as seguintes descobertas histológicas:

25 Imediatamente pós-operatório: a biomatriz de lâmina de colágeno é colocada entre a dura-máter e a área de defeito dorsal e forma uma camada de separação biológica entre a dura-máter e a área de ferida dorsal. Ela não é fixada ao tecido do defeito dorsal. O sangue (eritrócitos) adere em uma fina camada à superfície da biomatriz de lâmina de colágeno e prova sua

função como um hemostato. A estrutura da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscopicamente paralela, que é não porosa e hermética a fluido ao sangue, é claramente visível. A espessura da biomatriz de lâmina de colágeno é cerca de 0,3 mm. (A figura 12)

5 Uma semana depois da operação: A membrana é principalmente integrada nos tecidos circundantes. Existe infiltração das células sanguíneas, especialmente linfócitos (figura 13 A). Os espaços subdural não têm infiltração celular ou tecido de adesão. Na superfície dorsal, células são direcionadas ao longo da superfície e dificilmente penetraram na
10 superfície da biomatriz de lâmina de colágeno. Nas extremidades do defeito, a biomatriz de colágeno foi aplicada no osso. A área de contato (a) é uma área preferida da bioatividade (interação biomatriz/célula) e o início da infiltração celular direcionada ao longo da estrutura de múltiplas camadas. A área entre a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas e a dura-máter
15 consiste em tecido frouxo contendo células de gordura (b), comparáveis ao tecido do espaço epidural em áreas onde a anatomia não foi afetada pela cirurgia (c) da forma apresentada na figura 13 A.

A figura 13 A mostra a área de contato entre a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas e o osso na extremidade do defeito
20 (a). Interação intensiva de células e a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas. O remodelamento da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas começa com a infiltração direcionada das células (fibroblastos, granulócitos) na estrutura da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas paralela.

25 A figura 13 B mostra a área de contato entre a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas e o osso na extremidade do defeito (a).

A figura 13 C mostra a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas no centro do defeito de laminectomia. A biomatriz de

colágeno é integrada e é separada do espaço epidural ventral da formação de cicatriz dorsal. Células são direcionadas ao longo da superfície dorsal e não penetraram na superfície da biomatriz de colágeno. A área entre a biomatriz de colágeno e a dura-máter consiste em tecido frouxo contendo células de
5 gordura (a).

A figura 13 D mostra um coelho NZW 1 semana depois da operação. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas está fechando o defeito de laminectomia e separa a dura do início da formação de cicatriz dorsal rica em célula. Células não penetraram na superfície da
10 biomatriz de colágeno. Na extremidade da biomatriz de colágeno, o início da infiltração direcionada das células de reparo na estrutura de múltiplas camadas é visto.

A figura 13 E mostra um coelho NZW 1 semana depois da operação. Uma esponja de colágeno (DURAGEN) foi usada para revestir o
15 defeito de laminectomia. Ao contrário da presente invenção, não existe camada de separação clara não porosa entre o espaço epidural e a área de ferida dorsal. A esponja de colágeno é embebida com sangue.

Duas semanas de pós-operatório: A integração da membrana no tecido circundante é melhorada pelo crescimento de estruturas capilares. A
20 quantidade do linfócito, granulócito segmentado é maior. A estrutura da biomatriz de lâmina de colágeno pode ter a forma distinguida do tecido circundante. Existe uma reação inflamatória anterior à membrana com exudação do linfócito e granulócito. O espaço subdural não tem infiltração celular ou tecido de adesão.

As figuras 14 A - C mostram um coelho NZW duas semanas depois da operação. A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é completamente integrada. Células de reparo de tecido infiltraram na biomatriz de colágeno e são direcionadas ao longo da estrutura de múltiplas camadas. A dura-máter é separada pelo tecido frouxo com células de gordura

da formação de cicatriz e a biomatriz de colágeno remodelada.

Conclusões:

A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas não porosa da presente invenção mostrou ter uma função de separação e proteção imediata e excelente entre a dura-máter e o defeito cirúrgico dorsal, evitando a distribuição descontrolada de sangue, fibrina e materiais necróticos na área peridural e direcionando e separando o crescimento celular da cicatriz inicial anterior à superfície dorsal. A lâmina de colágeno biofuncional também direciona o crescimento celular na sua estrutura de múltiplas camadas. A velocidade de crescimento ao longo da estrutura de múltiplas camadas é maior que o crescimento das células na biomatriz da superfície dorsal. Não existe nenhum crescimento das células na primeira semana na superfície ventral da biomatriz de lâmina de colágeno. A diferente velocidade de crescimento celular ao longo ou através da estrutura de múltiplas camadas é em linha com uma observação clínica depois da implantação peridural da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas uma semana depois da operação (Ex. II).

Depois de duas semanas, a biomatriz de múltiplas camadas é infiltrada pelas células de reparo. Existe uma completa integração da biomatriz na formação de cicatriz fisiológica da área da ferida cirúrgica dorsal. A dura-máter é separada por um tecido de gordura frouxo que parece similar ao tecido de gordura, que fisiologicamente separa a dura-máter do canal espinhal. Existe uma alta bioatividade das células de reparo direcionadas ao longo da estrutura de múltiplas camadas que desaparece gradualmente da biomatriz rica em célula. A biomatriz é remodelada e integrada na estrutura anatômica normal.

A biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas da presente invenção mostrou ser uma proteção imediata efetiva, biocompatível e biofuncional e a camada de separação entre a dura-máter e a área de defeito

dorsal que direciona o crescimento celular na estrutura de múltiplas camadas e o crescimento celular anterior à superfície dorsal. Direcionando o crescimento celular, a biomatriz de lâmina de colágeno efetivamente controla o processo de remodelamento e regeneração do tecido e fornece condições ideais para a prevenção e minimização das adesões clinicamente relevantes.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para crescimento celular direcionado e regeneração de tecido controlada para prevenir adesão pós-cirúrgica ou pós-traumática e formação de fibrose na superfície de um tecido selecionado do grupo consistindo em tecido da coluna vertebral, dura-máter, e nervos espinhais em um mamífero, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de fornecer, revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas não porosa.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um ser humano.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas não porosa é realizada durante a cirurgia na coluna.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas atrai as células selecionadas do grupo que consiste em células de reparo e células de regeneração, induzindo assim crescimento de tecido inédito.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a estrutura de múltiplas camadas da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas direciona o crescimento de células na superfície, e o crescimento de células nos interstícios da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas em que as células são selecionadas do grupo que consiste em células de reparo e células de regeneração.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é reabsorvida e remodelada no tecido natural durante o crescimento das células selecionadas do grupo que consiste em células de reparo e células de regeneração.

7. Método para tratamento de um distúrbio em um mamífero distinguido por um defeito de um tecido selecionado do grupo consistindo em medula espinhal e dura-máter, e o tecido circundante, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de fornecer, revestir e separar o tecido selecionado do grupo consistindo em medula espinhal e dura-máter, com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas não porosa biofuncional que direciona o crescimento celular nos interstícios da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é derivada de uma das seguintes fontes selecionadas do grupo que consiste em colágeno bovino, porcino, eqüino, humano e misturas destes.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que as biomatrizes de lâmina de colágeno de múltiplas camadas são anexadas aos tecidos do mamífero usando um selante de fibrina.

10. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o crescimento celular é direcionado nos interstícios entre as camadas da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas e na superfície externa da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas.

11. Uso de uma composição, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para prevenção de adesões e prevenção da formação de fibrose em um mamífero em que a composição consiste em uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas em que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas direciona o crescimento de células nos interstícios entre as camadas de colágeno em que o colágeno é selecionado do grupo que consiste em colágeno bovino, porcino, eqüino ou humano e misturas destes.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que as adesões são adesões pós-operatórias ou adesões causadas por

trauma, tais como adesões peridural ou perineural.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas direciona o crescimento celular entre os interstícios das camadas e na superfície da biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas cria uma selagem hermética a líquido primária e camada de separação.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é macia e substancialmente não porosa.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é macia e não porosa.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas é reabsorvida e remodelada em tecidos naturais.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a biomatriz de lâmina de múltiplas camadas é reabsorvida e remodelada em tecidos naturais em 14 dias.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a lâmina de colágeno é derivada de colágeno eqüino.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a composição é disponível na forma de kit.

FIG. 1

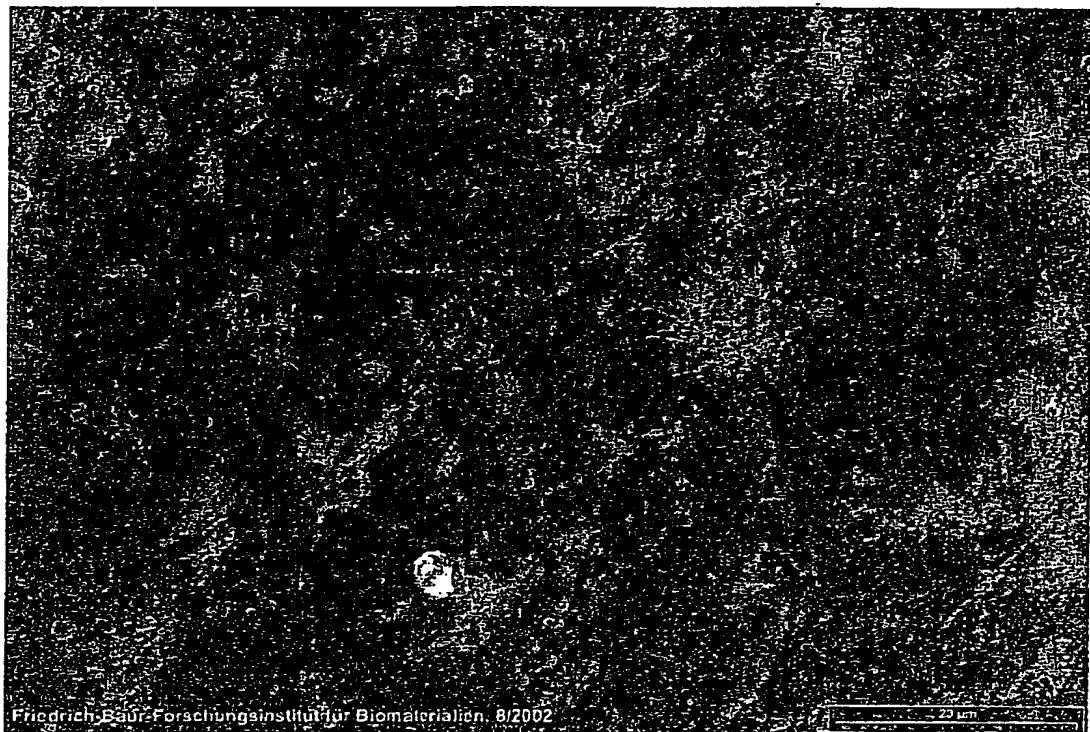


FIG. 2A

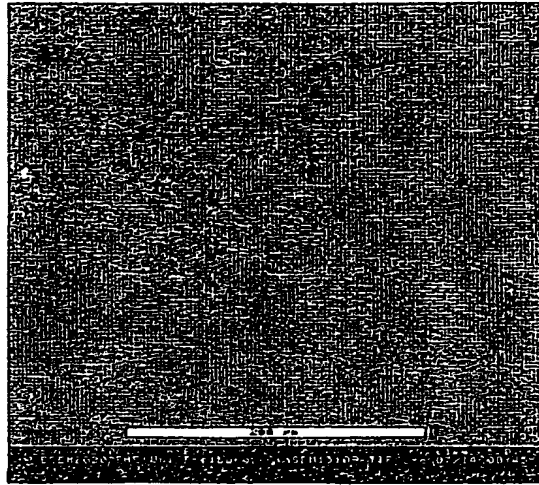


FIG. 2B

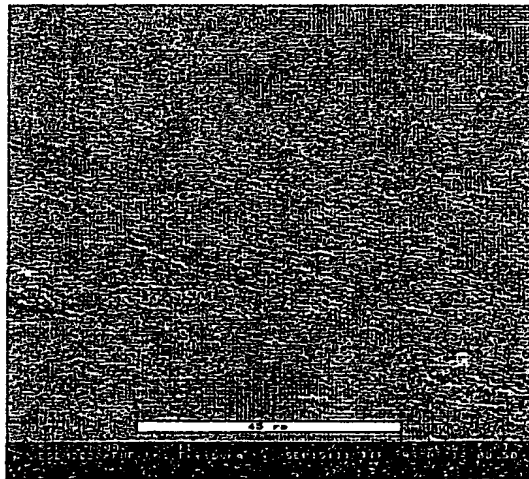


FIG. 3A

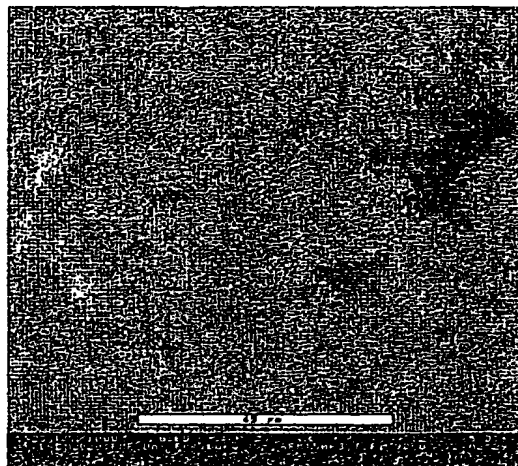


FIG. 3B

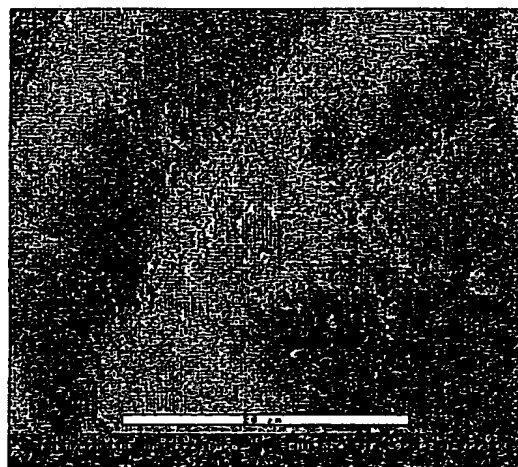


FIG. 4



FIG. 5A

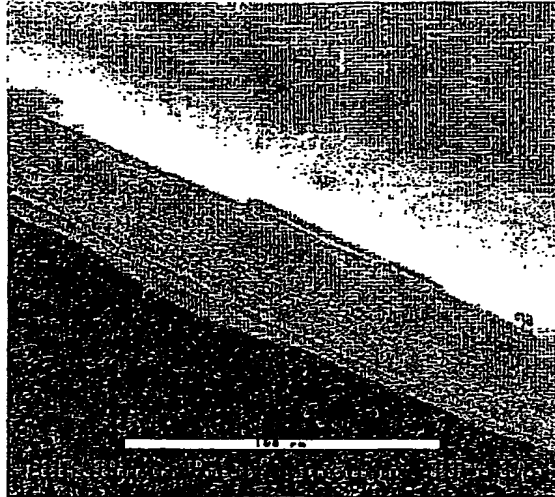


FIG. 5B

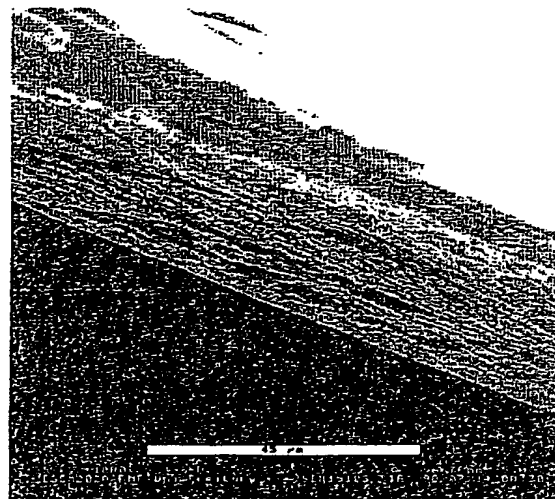


FIG. 5C

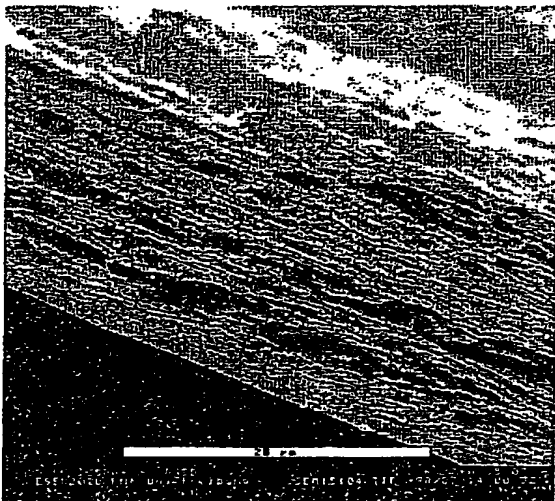


FIG. 6A

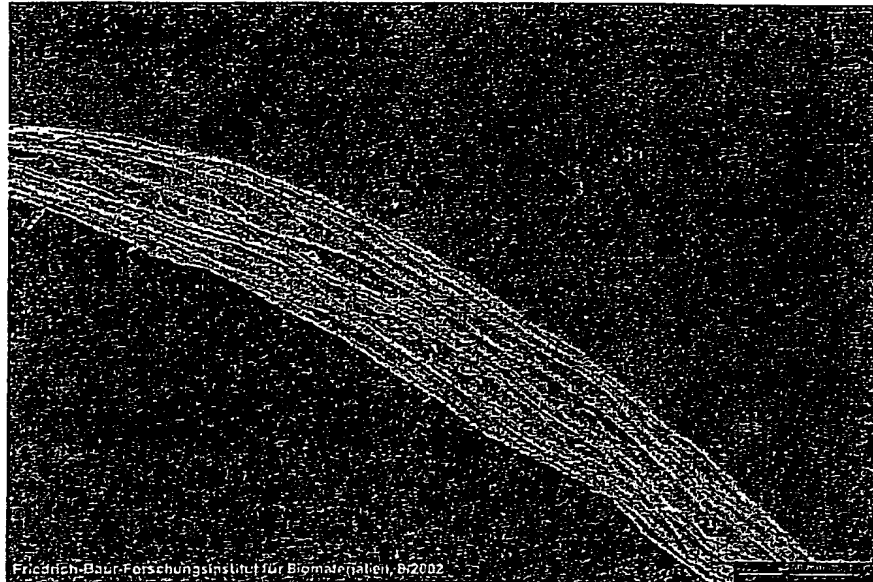


FIG. 6B



Hemilaminectomia lombar esquerda (procedimento espinal)

FIG. 7

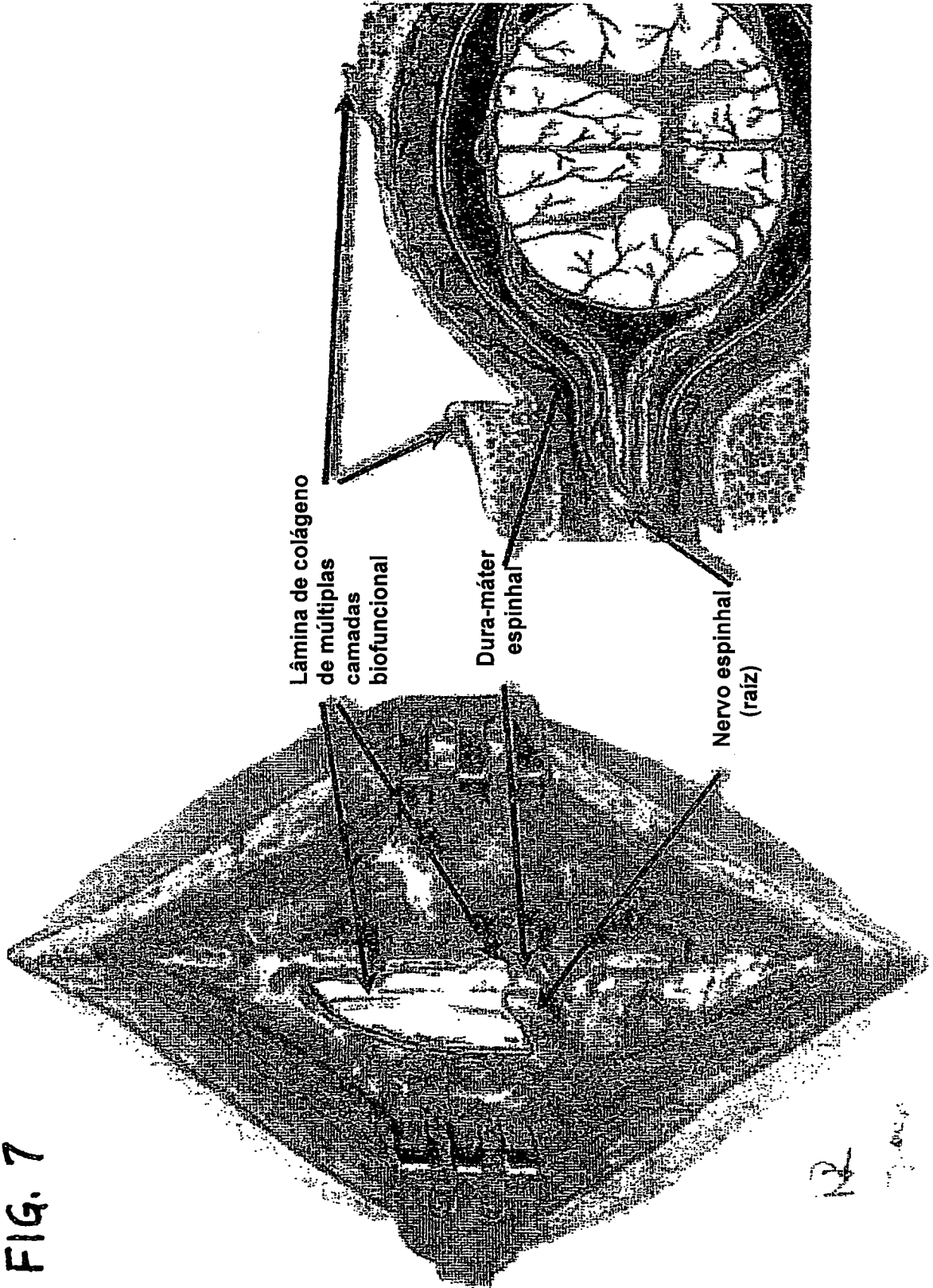


FIG. 8

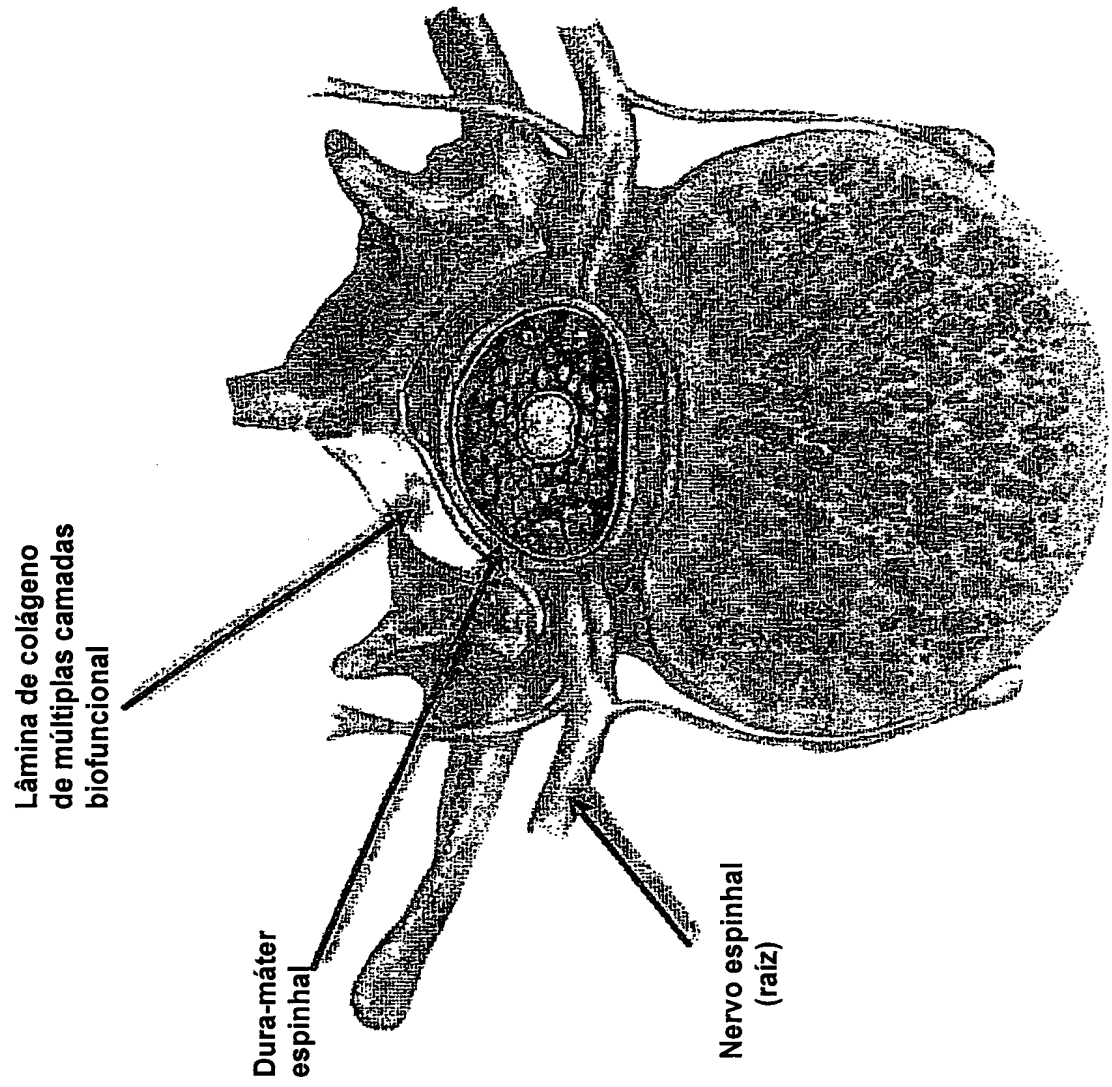
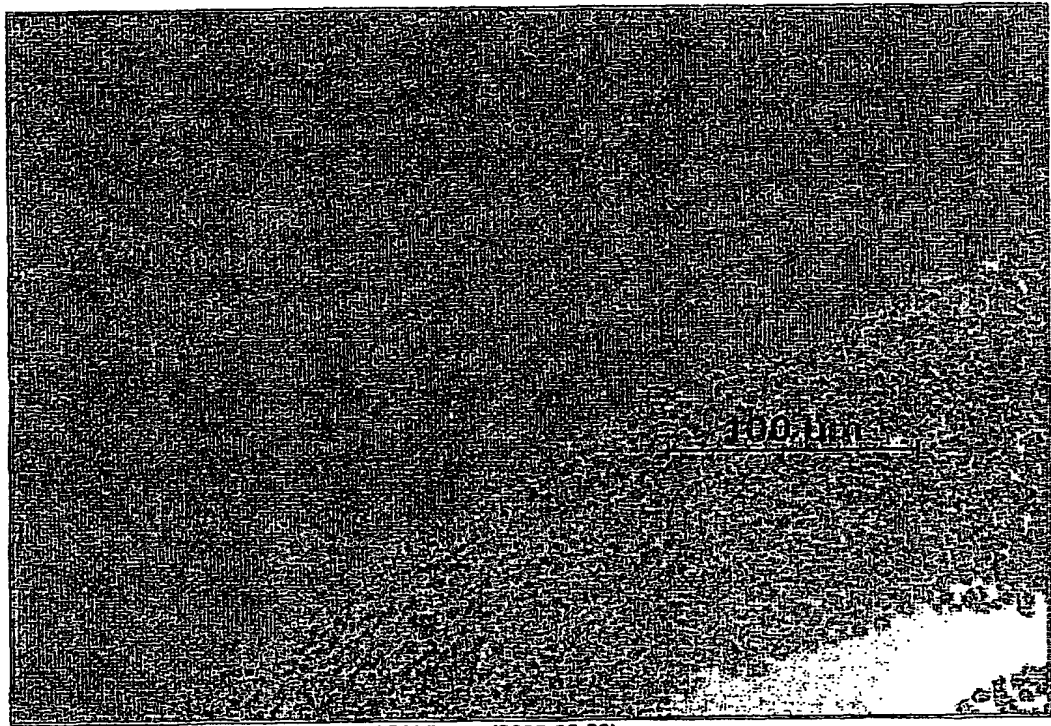
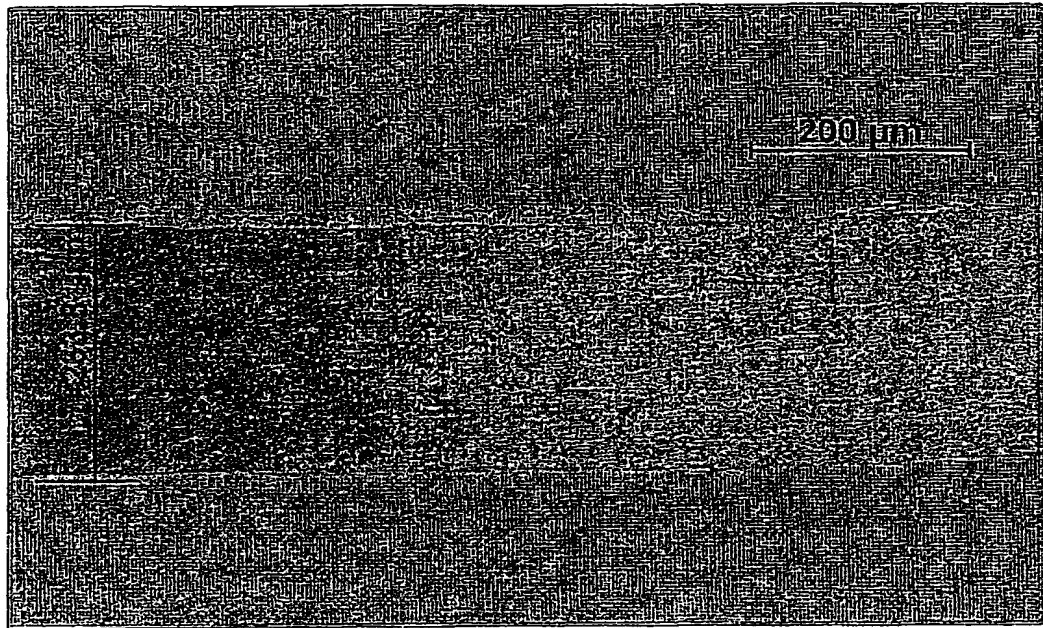


FIG. 9



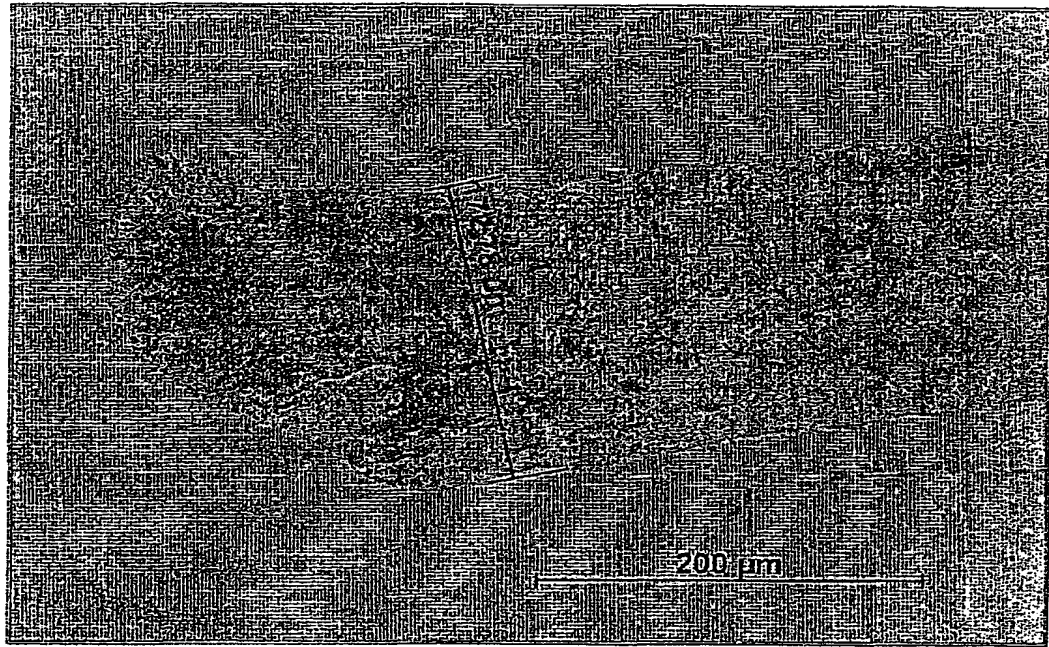
© Rainer Mittermayr, LBI Vienna (2006-05-23)

FIG. 10



© Rainer Mittermayr, LBI Vienna (2006-05-23)

FIG. 11



© Rainer Mittermayr, LBI Vienna (2006-05-23)

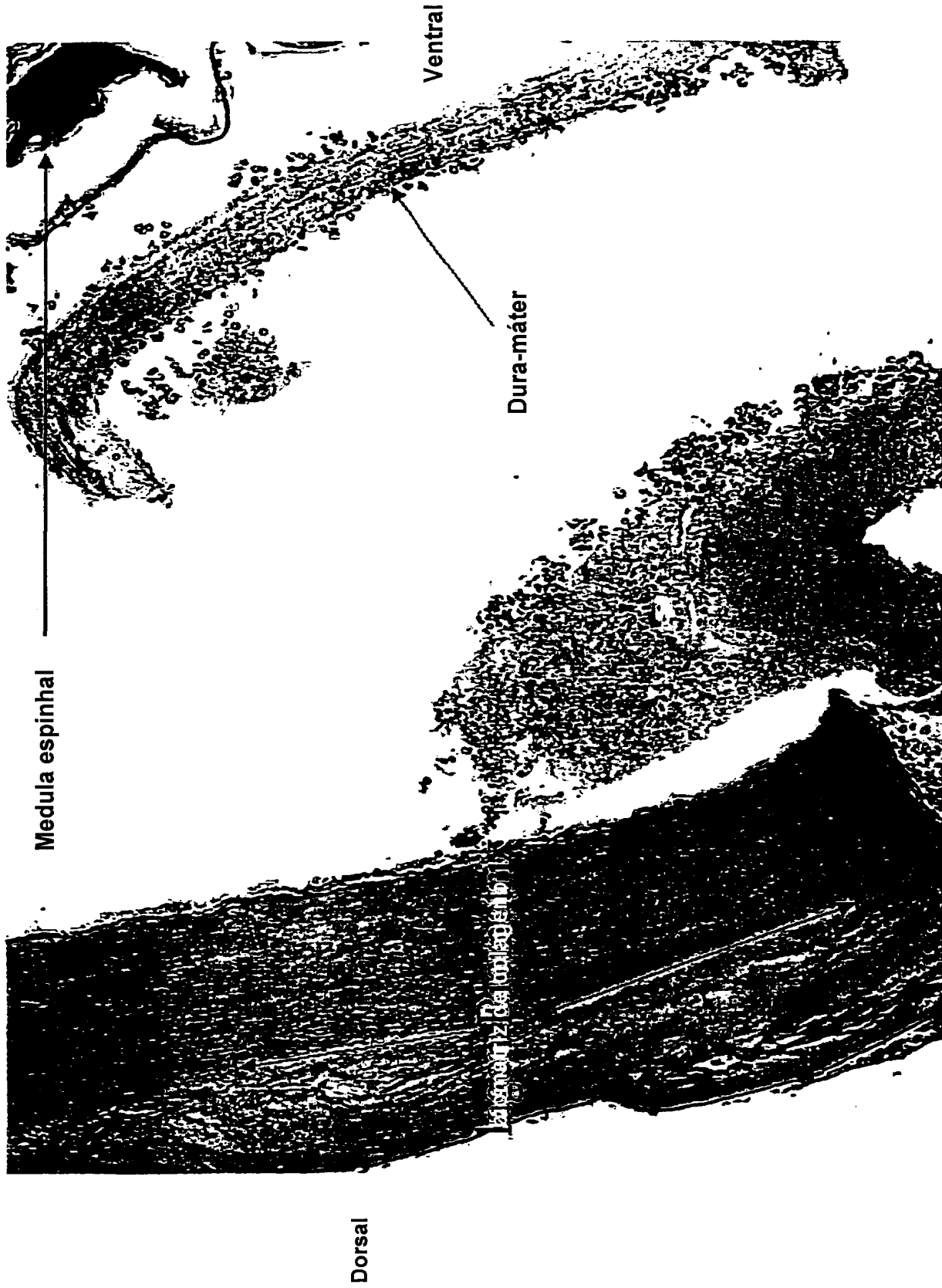


FIG. 12

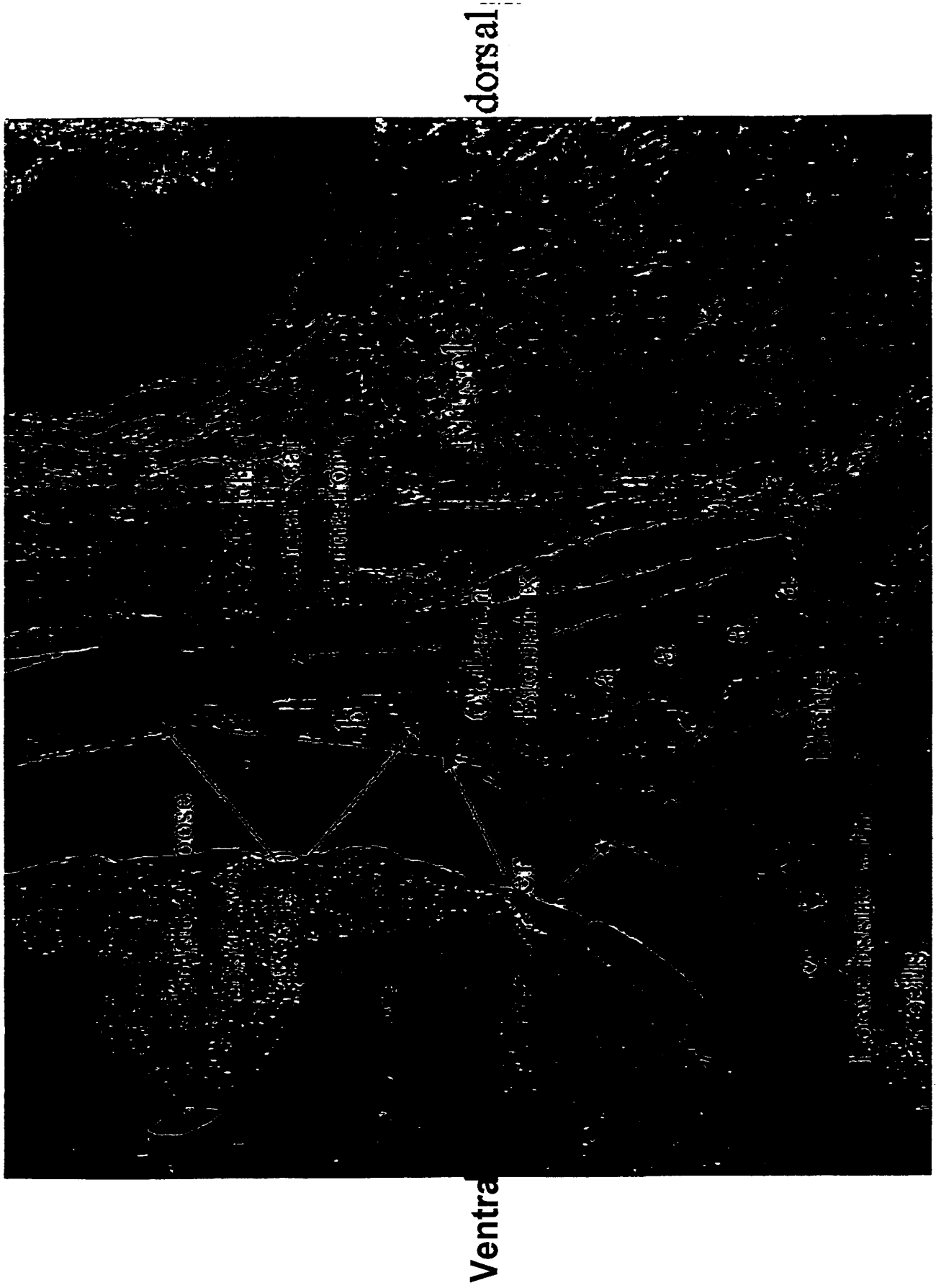
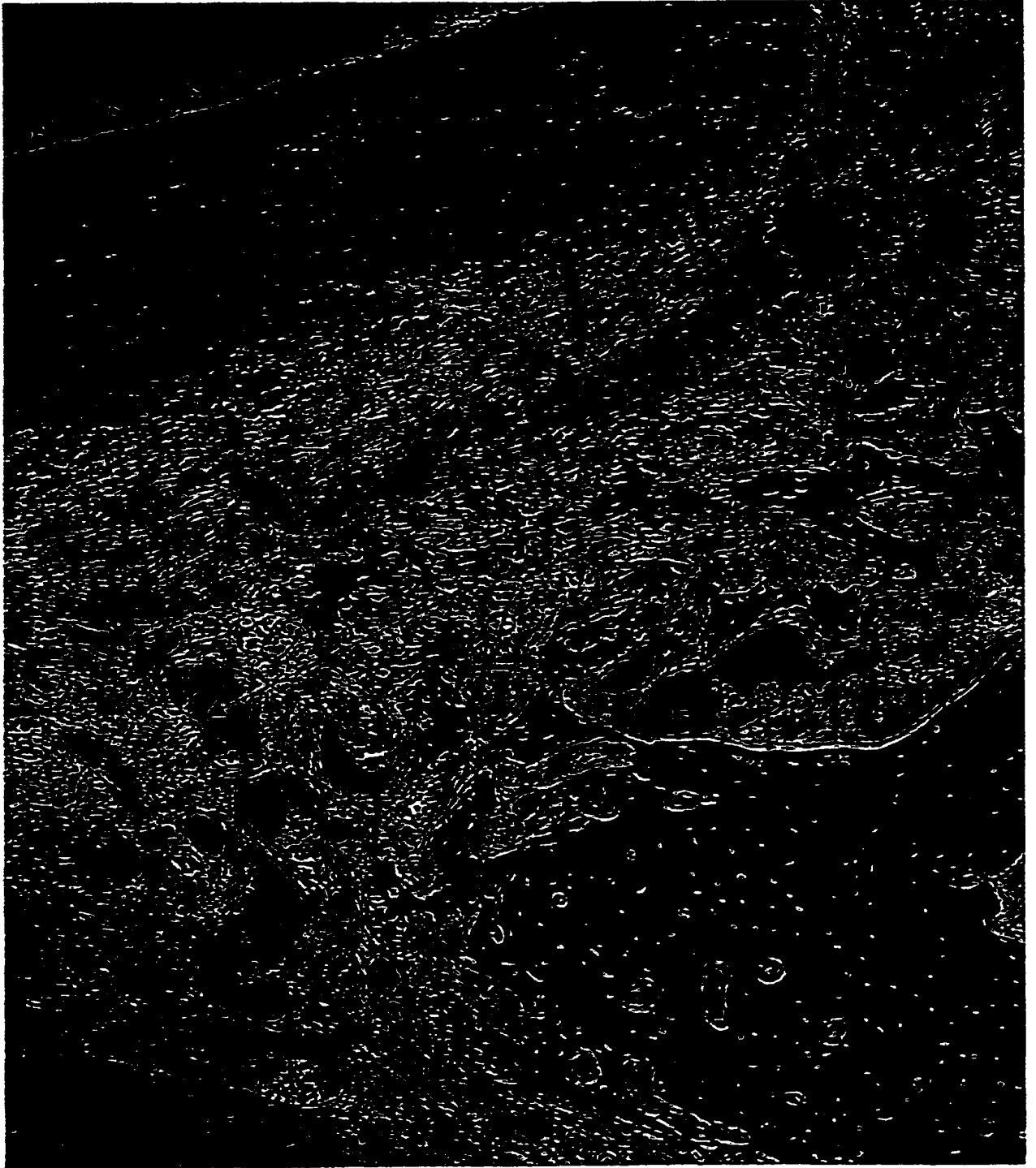
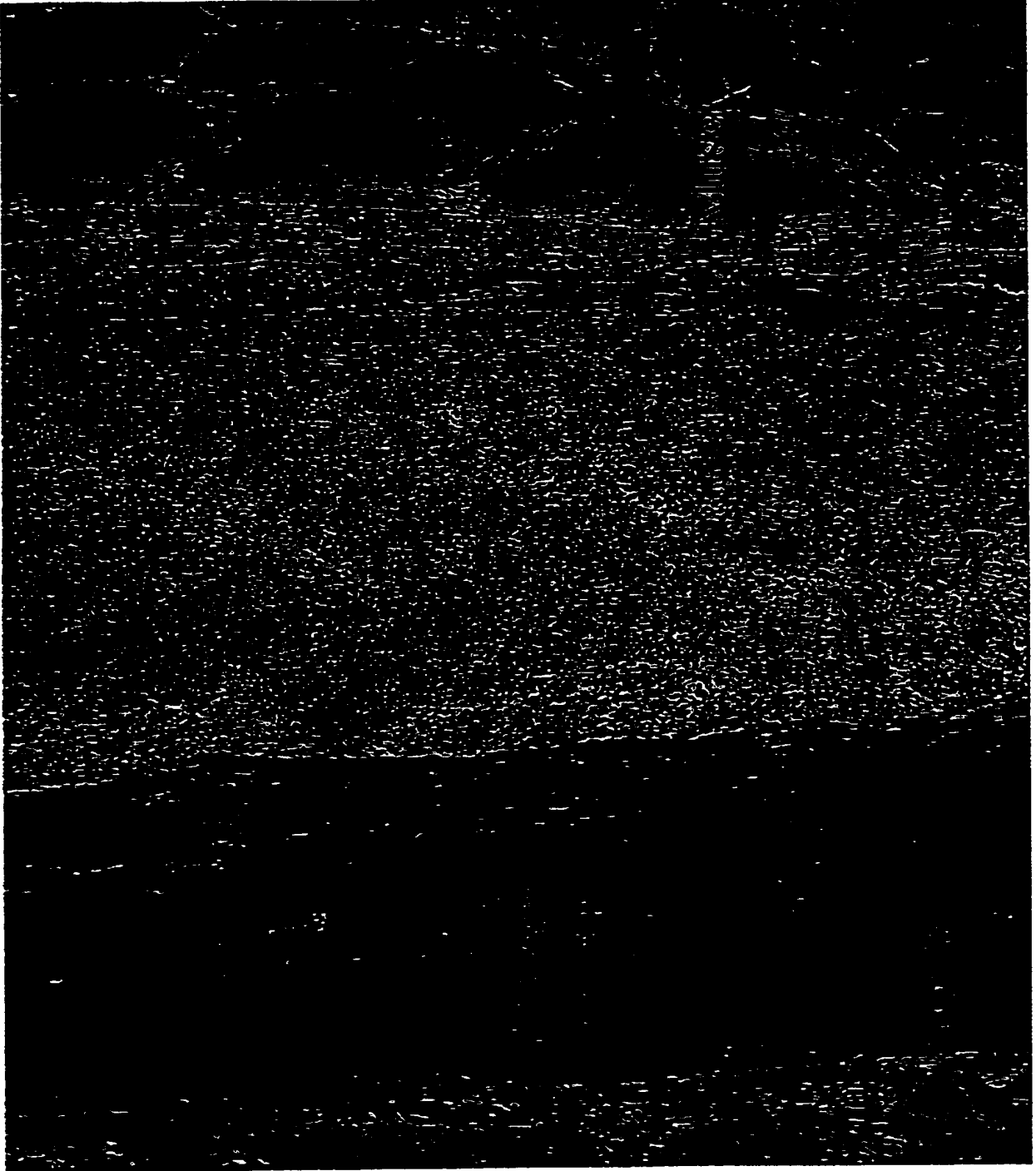


FIG. 13A



dorsal



ventral

FIG. 13C

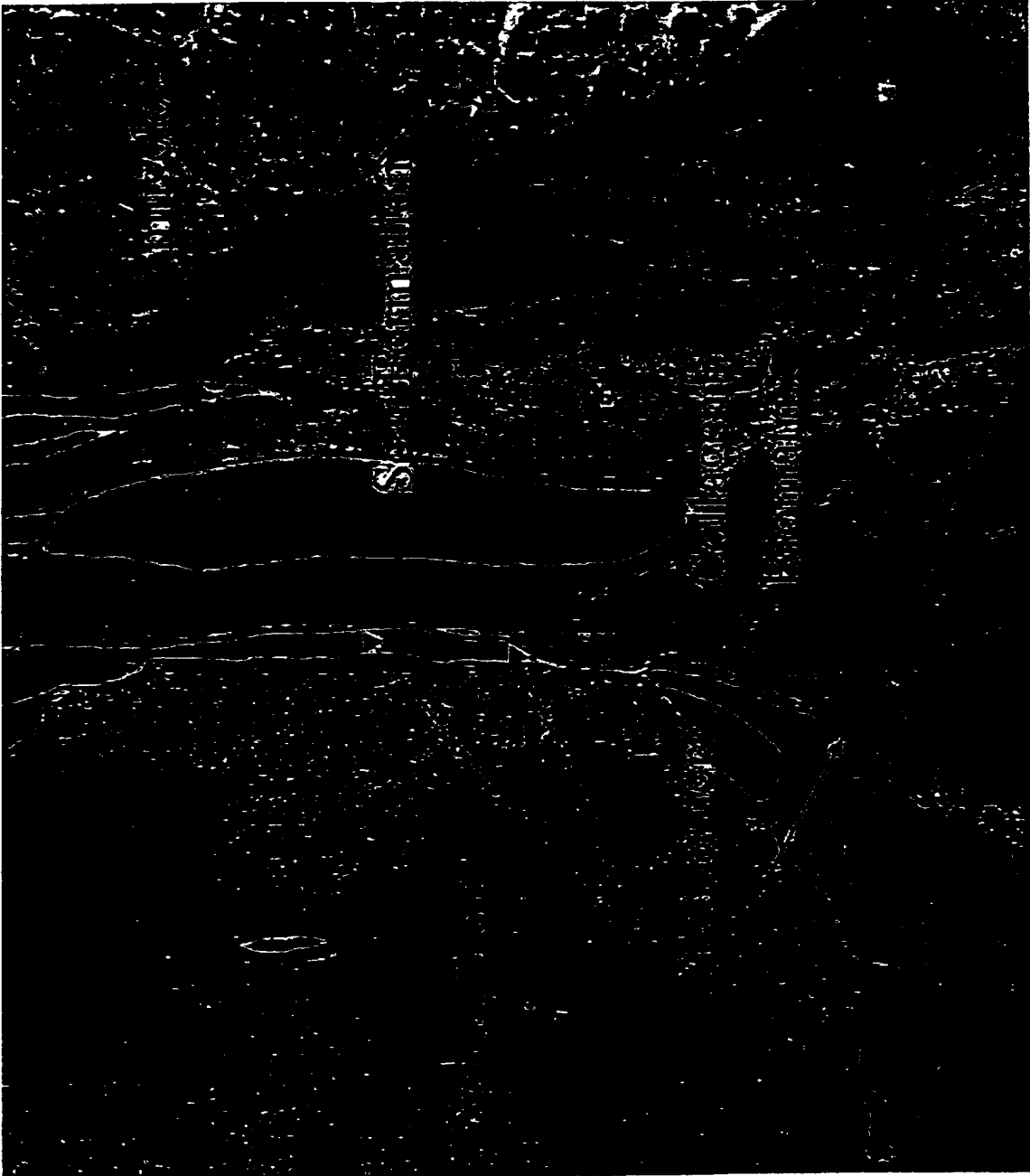


FIG. 13D

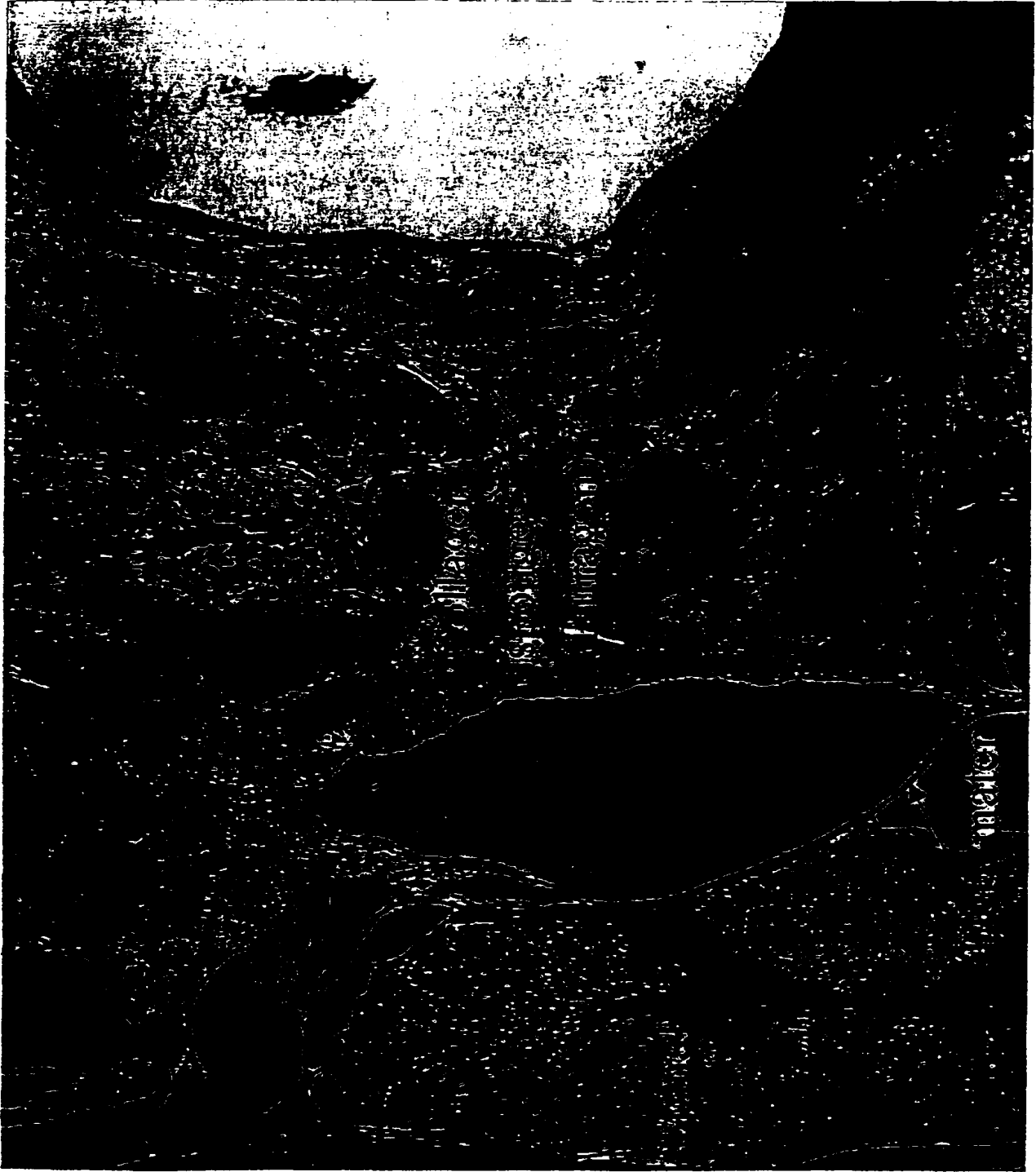


FIG. 13E

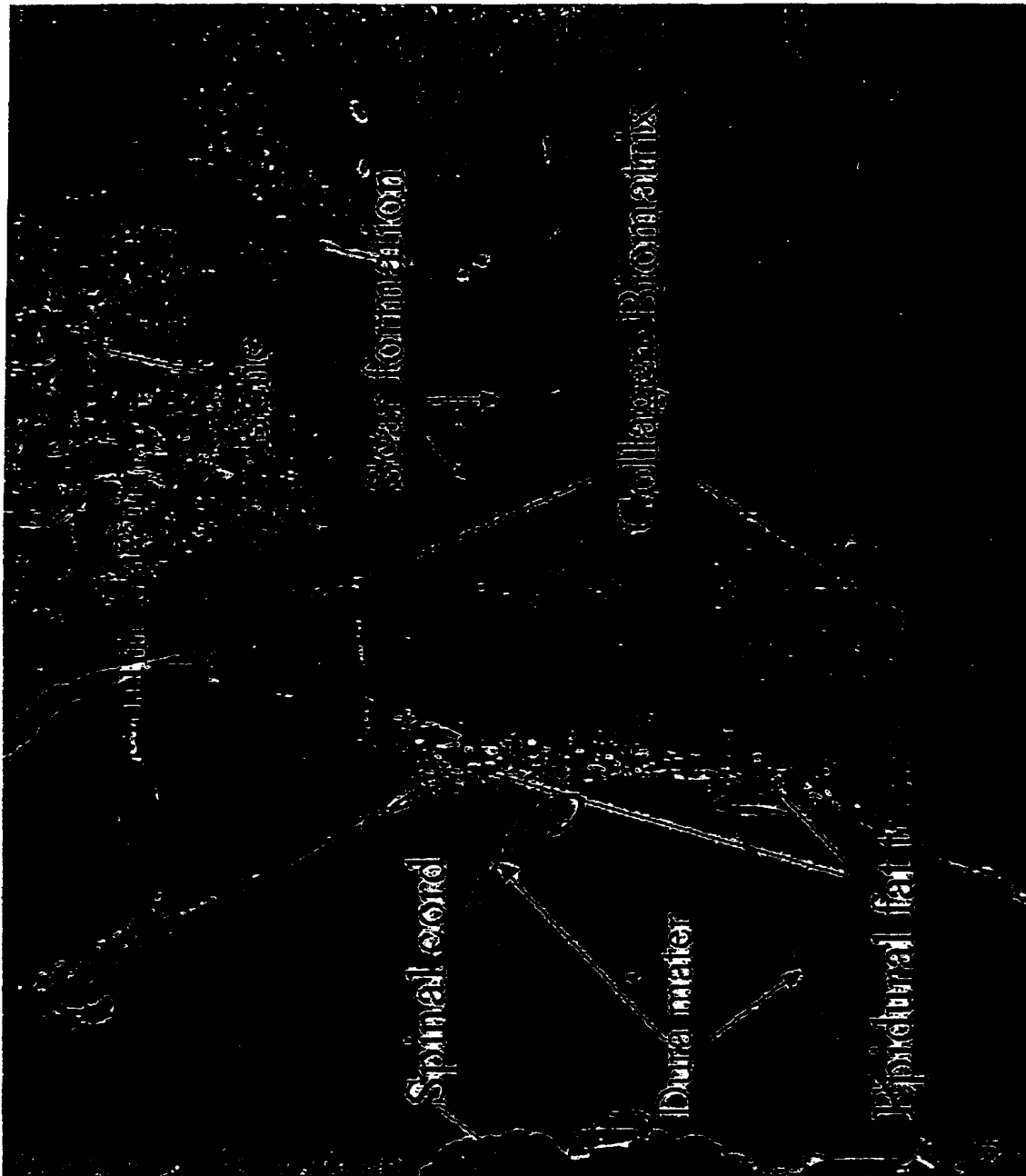


FIG. 14A

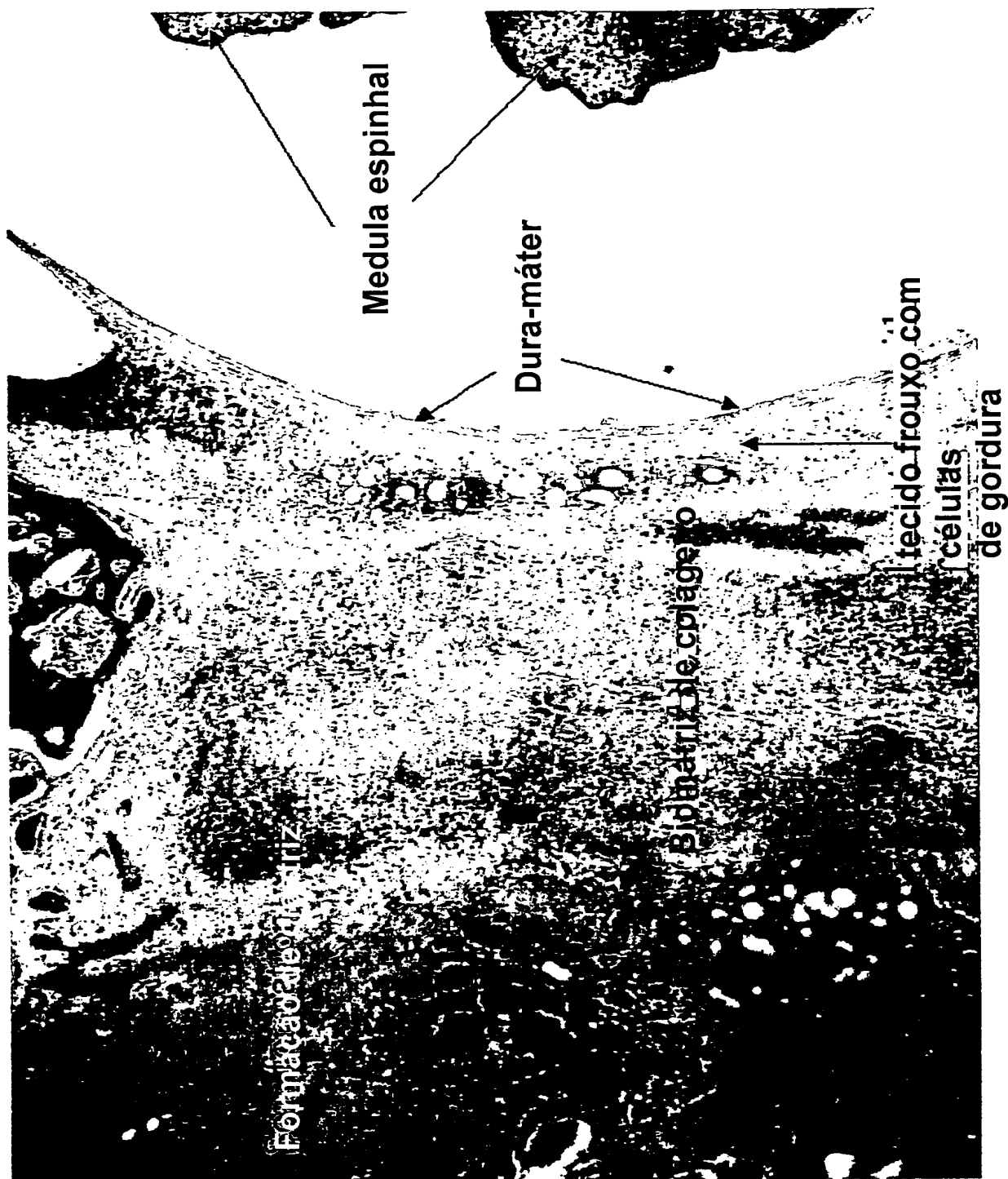


FIG. 14B

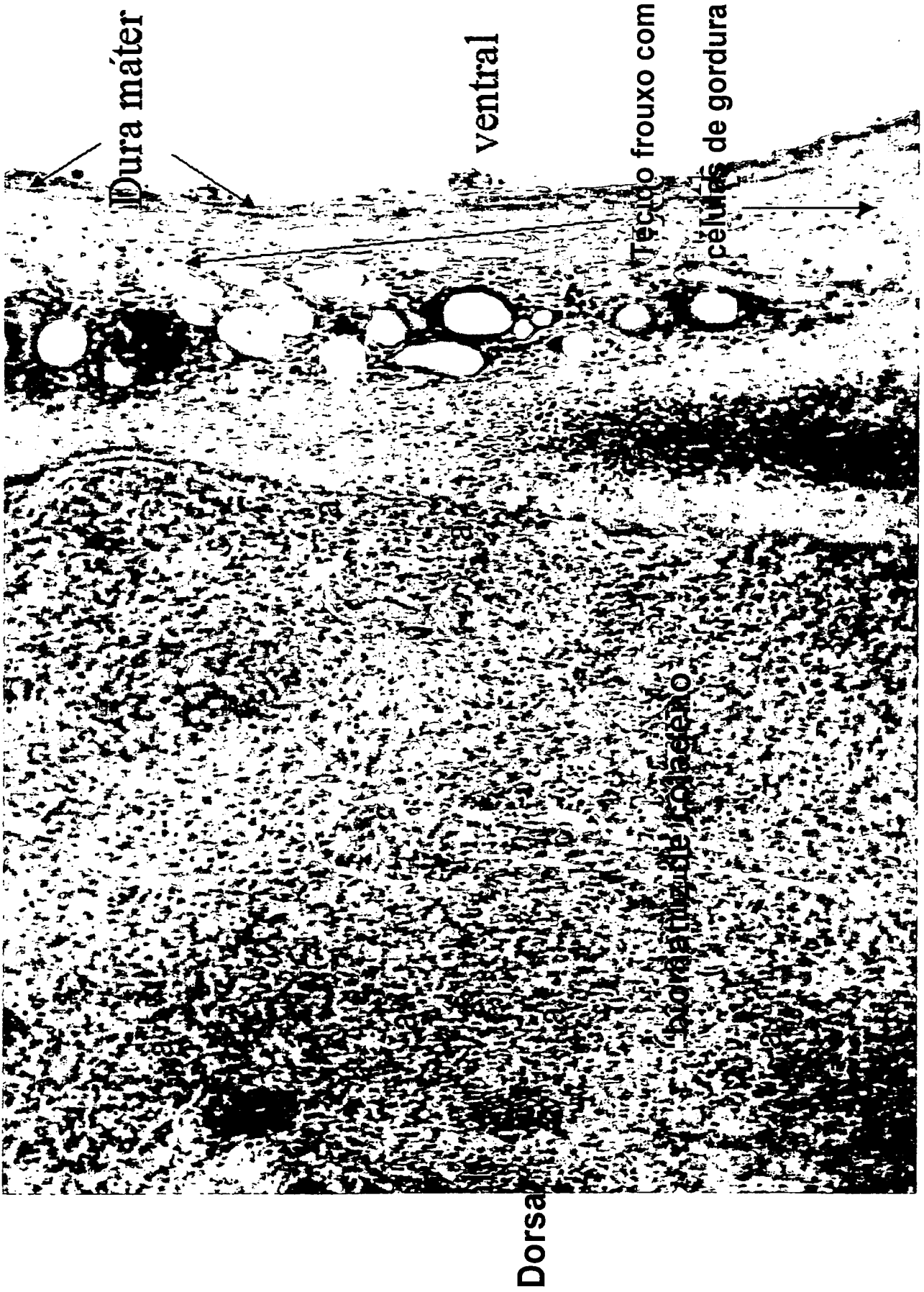


FIG. 14C

RESUMO

“MÉTODOS PARA CRESCIMENTO CELULAR DIRECIONADO E REGENERAÇÃO DE TECIDO CONTROLADA PARA PREVENIR ADESÃO PÓS-CIRÚRGICA OU PÓS-TRAUMÁTICA E FORMAÇÃO DE FIBROSE NA SUPERFÍCIE DE UM TECIDO, E PARA TRATAMENTO DE UM DISTÚRBIO EM UM MAMÍFERO, E, USO DE UMA COMPOSIÇÃO”

A presente invenção diz respeito a um método para crescimento celular direcionado e regeneração de tecido controlada para prevenir adesão pós-cirúrgica ou pós-traumática e formação de fibrose na superfície lesionada de um tecido selecionado do grupo que consiste em tecido da coluna vertebral, dura-máter e nervos espinhais em um mamífero, compreendendo a etapa de fornecer, revestir e separar o tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas, não porosa, bioativa bifuncional, e a um método para tratar um defeito em um mamífero compreendendo a etapa de fornecer, revestir e separar o dito tecido com uma biomatriz de lâmina de colágeno de múltiplas camadas microscópicas, não porosa, bioativa bifuncional.