

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

(22) Data de pedido: 2005.08.03	(73) Titular(es): SEWON CELLONTECH CO., LTD. 10, 11TH., GOODMORNING-SHINHAN TOWER 23-2, YOIDO-DONG YOUNGDEUNGPO-GU, SEOUL 150-712 KR
(30) Prioridade(s): 2005.06.13 KR 20050050450	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.02.27	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.03.30 111/2011	(72) Inventor(es): CHANG-KWON KO KR JAE-DEOG JANG KR CHEONG-HO CHANG KR HYUN-SHIN PARK KR SAE-BOM LEE KR
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO DE OSTEOLASTOS DE FIBRINA MISTA SEMISOLIDIFICADA PARA AGLUTINAÇÃO DE FRACTURA ÓSSEA E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO**

(57) Resumo:

É PRESENTEMENTE APRESENTADA UMA COMPOSIÇÃO SEMI-SÓLIDA DE OSTEOLASTOS QUE CONTÊM FIBRINA PARA A UNIÃO ÓSSEA E UM MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DA MESMA. O MÉTODO INCLUI O ISOLAMENTO DE OSTEOLASTOS DUM TECIDO ÓSSEO E MEIOS DE CULTURA/PROLIFERAÇÃO DOS OSTEOLASTOS ISOLADOS EM DMEM (DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM) OU MEM (MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM, ALPHA MODIFICATION) PARA PREPARAR UMA SUSPENSÃO DE OSTEOLASTOS; E MISTURAR A SUSPENSÃO DE OSTEOLASTOS RESULTANTE COM UM FACTOR COAGULANTE PARA PREPARAR UM AGENTE TERAPÊUTICO DE OSTEOLASTOS. DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO COM A ESTRUTURA ACIMA MENCIONADA, É POSSÍVEL CONSEGUIR ENXERTOS ÓSSEOS CAPAZES DE FAZER A UNIÃO ÓSSEA SEM QUALQUER TIPO DE REJEIÇÃO EM TERMOS DE ENXERTO CLÍNICO ASSIM COMO DISTRIBUIÇÃO UNIFORME DOS OSTEOLASTOS POR MEIO DE INJECCÃO DUMA MISTURA DE OSTEOLASTOS E FIBRINA NAS PARTES AFECTADAS PARA EFEITOS DE UNIÃO ÓSSEA, E UNIÃO ÓSSEA RÁPIDA E EFICAZ POR MEIO DE INJECCÃO CONSTANTE DE UMA COMPOSIÇÃO SEMI-SÓLIDA DE OSTEOLASTOS NAS PARTES AFECTADAS.

RESUMO**"COMPOSIÇÃO DE OSTEÓBLASTOS DE FIBRINA MISTA SEMI-SOLIDIFICADA PARA AGLUTINAÇÃO DE FRACTURA ÓSSEA E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO"**

É presentemente apresentada uma composição semi-sólida de osteoblastos que contém fibrina para a união óssea e um método para preparação da mesma. O método inclui o isolamento de osteoblastos dum tecido ósseo e meios de cultura/proliferação dos osteoblastos isolados em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ou α -MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modification) para preparar uma suspensão de osteoblastos; e misturar a suspensão de osteoblastos resultante com um factor coagulante para preparar um agente terapêutico de osteoblastos. De acordo com a presente invenção com a estrutura acima mencionada, é possível conseguir enxertos ósseos capazes de fazer a união óssea sem qualquer tipo de rejeição em termos de enxerto clínico assim como distribuição uniforme dos osteoblastos por meio de injeção dum mistura de osteoblastos e fibrina nas partes afectadas para efeitos de união óssea, e união óssea rápida e eficaz por meio de injeção constante de uma composição semi-sólida de osteoblastos nas partes afectadas.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÃO DE OSTEOLASTOS DE FIBRINA MISTA SEMI-SOLIDIFICADA PARA AGLUTINAÇÃO DE FRACTURA ÓSSEA E SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO"

Campo Técnico

A presente invenção refere-se a uma composição semi-sólida de osteoblastos que contém fibrina para a união óssea e um método para preparação da mesma. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a uma composição semi-sólida de osteoblastos que contém fibrina para união óssea, a qual faculta um agente terapêutico que contém uma mistura de osteoblastos e fibrina, com capacidade de ser injectada numa parte afectada para efeitos de união óssea no tratamento de fractura óssea grave; e um método para preparar a mesma.

Técnica anterior

Normalmente, uma fractura óssea simples pode ser suficientemente cicatrizada ao se engessar a fractura óssea durante algumas semanas, mas uma fractura óssea grave ou defeito ósseo requer enxerto ósseo.

Um método para enxerto ósseo, preferido por muitos médicos, é o auto-enxerto, o qual envolve a recolha de osso de uma parte do corpo do doente, particularmente da crista ilíaca, seguindo-se o enxerto para a parte afectada do doente. Este método pode apresentar excelentes resultados devido ao enxerto com o próprio osso do doente. No entanto,

este auto-enxerto é considerado uma técnica cirúrgica desvantajosa, uma vez que implica uma dor bastante forte e apresenta uma variedade de problemas potenciais associados à possível ocorrência de flacidez e perda sensorial numa região de colheita óssea, necessidade de intervenção cirúrgica adicional para enxerto ósseo e, deste modo, um longo tempo de hospitalização e recuperação o que leva a custos médicos elevados. Para além disso, não existe osso extra suficiente para enxerto no corpo e assim o auto-enxerto implica inúmeras dificuldades para fixar as partes dadoras para preparar o osso para a implantação óssea. No caso de cirurgia da coluna vertebral que necessite uma grande quantidade de enxerto ósseo, a incidência de complicações causada pelo auto-enxerto ósseo é registada como tão alta quanto aproximadamente 23%.

O aloenxerto, o qual tem sido utilizado para aliviar estas deficiências geradas pelo auto-enxerto, obtém principalmente ossos de cadáveres e torna-se assim um método vantajoso devido à não necessidade de uma cirurgia secundária adicional para enxerto ósseo. No entanto, este método implica desvantagens fatais tais como enfraquecimento da força óssea durante um processo de esterilização, ocorrência de rejeição ao enxerto e probabilidade de infecção com doenças contagiosas tais como hepatite e SIDA. Para além disso, o aloenxerto tem desvantagens tais como efeitos de formação óssea fraca, reacção imune, absorção óssea e refractura dos ossos correspondentes, limitando assim a sua aplicação a uma escala muito estreita. Consequentemente, a utilização desta técnica cirúrgica tem diminuído desde o final de 1993, data

a partir da qual a Food & Drug Administration reforçou o regulamento dos bancos de tecido ósseo devido a infecção.

Entretanto, a infecção da medula óssea é uma técnica baseada na afirmação, proposta por Huggins (1931), Friedenstein (1973), e Ashton (1980), em que as células osteoprogenitoras da medula óssea induzem e facilitam a formação óssea. A injeção na medula óssea é normalmente realizada isoladamente para cicatrização de fracturas ósseas, mas é igualmente realizada em combinação com enxerto ósseo. Ao contrário de outras técnicas de enxerto ósseo, esta injeção na medula óssea não envolve incisão cirúrgica na pele para as partes dadoras, tornando-se assim vantajosa devido à não existência de morbidade do local do dador e de complicações ou efeitos adversos.

Seguidamente, embora sejam publicados alguns resultados excelentes através de inúmeros casos de aplicação clínica, a injeção na medula óssea não é vantajosa devido à sua base teórica frágil, pelas razões que porções consideráveis de resultados obtidos são consistentes entre si, a quantidade de medula óssea possível de recolher de um local é limitada e mais, um número significativamente limitado de células osteoprogenitoras encontram-se na medula óssea.

Divulgação

Problema Técnico

Por conseguinte, a presente invenção foi preparada considerando os problemas acima referidos, e é objecto da presente invenção apresentar uma composição semi-sólida de osteoblastos que contenha fibrina para união óssea e um método para preparação da mesma, sem que se verifique rejeição clínica do enxerto por meio de injeção de uma

mistura de osteoblastos e fibrina num local em que se espera a união óssea, e capaz de obter uma união óssea rápida e eficaz através da injeção duma composição, a qual foi moldada para uma determinada dimensão, de modo a melhorar os problemas associados com a probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões indesejáveis resultantes da fuga de osteoblastos injectados do local para a união óssea e, em seguida, a propagação do mesmo para outros locais através da corrente sanguínea, o que poderia ser causado por injeção duma suspensão isolada de osteoblastos.

Outro objecto da presente invenção é apresentar uma composição semi-sólida de osteoblastos que contenha fibrina para união óssea e um método para preparação da mesma, o qual permita a realização duma intervenção cirúrgica com incisão mínima quando os osteoblastos e fibrina são injectados num local onde se espera que haja união óssea, e que permita a obtenção de união óssea através duma injeção única e eficaz duma mistura de osteoblastos e fibrina sem incisão das regiões danificadas correspondentes ao se utilizar a radiação.

Solução Técnica

De acordo com um aspecto da presente invenção, os objectos acima e outros objectos podem ser obtidos pela provisão de um método para preparar uma composição semi-sólida de osteoblastos que contenha fibrina para união óssea, que inclua:

o isolamento de osteoblastos de um tecido ósseo e meios de cultura/proliferação dos osteoblastos isolados em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ou α -MEM (Minimum

Essential Medium, Alpha Modification) para preparar uma suspensão de osteoblastos; e

a mistura da suspensão de osteoblastos resultante com um factor coagulante para preparação dum agente terapêutico de osteoblastos.

Presentemente, o factor de coagulação é uma mistura de trombina e fibrinogénio.

Presentemente, as fases de preparação do agente terapêutico incluem a dissolução de trombina liofilizada em DMEM líquido ou α -MEM e depois a mistura de 1 a 100 IU/mL da trombina dissolvida com a solução mista de osteoblastos; e a dissolução de fibrinogénio liofilizado em DMEM líquido ou α -MEM e depois a mistura de 20 to 100 mg/mL do fribrinogénio dissolvido com a solução mista de osteoblastos que contém trombina misturada na mesma.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, apresenta-se uma composição de osteoblastos preparada pelo método acima mencionado para preparação de uma composição semi-sólida de osteoblastos que contenha fibrina para união óssea.

Efeitos Vantajosos

De acordo com uma composição semi-sólida de osteoblastos que contenha fibrina para união óssea da presente invenção, e um método para preparação da mesma, com a construção acima descrita, é possível o enxerto ósseo sem que se verifique rejeição clínica do enxerto por meio de injeção de uma mistura de osteoblastos e fibrina num local em que se espera a união óssea, e capaz de obter uma união óssea rápida e eficaz através da injeção duma

composição, a qual foi moldada para uma determinada dimensão, de modo a melhorar os problemas associados com a probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões indesejáveis resultantes da fuga de osteoblastos injectados do local para a união óssea e, em seguida, a propagação do mesmo para outros locais através da corrente sanguínea, os quais são causados por injeção duma suspensão isolada de osteoblastos.

Para além disso, a presente invenção possibilita o enxerto ósseo, o qual permite a realização duma intervenção cirúrgica com incisão mínima num local onde a união óssea é esperada, e o qual permite igualmente a obtenção de união óssea através duma injeção única e eficaz duma composição mista de osteoblastos e fibrina das regiões danificadas correspondentes mediante utilização de radiação.

Descrição dos Desenhos

Os objectos acima e outros, características e outras vantagens da presente invenção serão mais claramente entendidos a partir da seguinte descrição detalhada em conjunto com os desenhos que acompanham a mesma, na qual:

Fig. 1 é uma vista que mostra uma cascata de polimerização de fibrina;

Fig. 2 é um diagrama esquemático que apresenta a polimerização de uma matriz de fibrina;

Fig. 3 é fluxograma que apresenta um processo de preparação duma composição semi-sólida de osteoblastos que contêm fibrina para união óssea de acordo com a presente invenção;

Fig. 4 é uma fotografia que apresenta a injeção dum mistura de fibrina e osteoblastos após introdução de uma fractura óssea com um tamanho de 15 mm num antebraço de um coelho;

Fig. 5 é uma radiografia tirada 6 semanas após injeção dum agente terapêutico de osteoblastos semi-sólidos que contém uma mistura de fibrina e osteoblastos após introdução de uma fractura óssea com um tamanho de 15 mm num antebraço de um coelho;

Fig. 6 é uma fotografia de uma secção de tecido sujeita a coloração com Hematoxilina-Eosina, tirada 6 semanas após injeção dum agente terapêutico de osteoblastos semi-sólidos que contém uma mistura de fibrina e osteoblastos após introdução de uma fractura óssea com um tamanho de 15 mm num antebraço de um coelho; e

Fig. 7 é uma fotografia de uma secção de tecido sujeita a coloração com tricrómio de Masson, tirada 6 semanas após injeção dum mistura de fibrina e osteoblastos após introdução de uma fractura óssea com um tamanho de 15 mm num antebraço de um coelho.

Modo Mais Adequado

Doravante, a composição semi-sólida de osteoblastos que contém fibrina para união óssea, de acordo com a presente invenção, e um método para preparação da mesma serão descritos em maior detalhe com referência aos desenhos que acompanham a mesma.

De modo a ultrapassar as desvantagens apresentadas pelas terapias convencionais para tratar perturbações e doenças relacionadas com ossos, tais como, implantes e

enxerto ósseo, foi desenvolvida uma técnica de transplante de osteoblastos autólogos sem efeitos secundários adversos numa parte afectada, por meio de cultura de osteoblastos, como método de tratamento final, em conjunto com melhoramentos das terapias convencionais.

No entanto, para se conseguir uma união óssea mais precoce, é necessário misturar osteoblastos com uma matriz através da qual podem ser tratadas mais lesões diversas e, assim, é possível tratar mais doenças ósseas que não partilhem benefícios terapêuticos com a injeção duma suspensão líquida de osteoblastos que consiste apenas de osteoblastos.

Pode dizer-se que o agente terapêutico de osteoblastos semi-sólidos para união óssea, o qual é uma mistura de osteoblastos e fibrina, é um produto mais avançado de um método injectável de uma suspensão líquida de osteoblastos, a qual se baseia em terapia celular. O método injectável convencional de uma suspensão líquida de osteoblastos, a qual envolve o transplante de osteoblastos isoladamente pode apenas tratar tipos limitados de defeitos ósseos e pode sofrer de problemas associados como a profitabilidade da formação de tecido ósseo resultante da fuga de osteoblastos injectados dos locais de formação óssea e consequente propagação para outros locais através da corrente sanguínea. Por contraste, o agente terapêutico de osteoblastos semi-sólidos contém fibrina, de acordo com a presente invenção, é composto duma mistura de osteoblastos e fibrina e por conseguinte, pode igualmente tratar rápida e eficazmente uma série alargada de fracturas ósseas e doenças ósseas graves.

É referido que a cola de fibrina promove a neovascularização em modelos animais (Schlag G. Clinical Orthopedics, 1988), e que é muito eficaz para intensificar a aplicabilidade de métodos utilizados no enxerto de materiais de implante para substituição óssea, tala como, pó ósseo desmineralizado, vidro bioactivo, hidroxiapatita e grânulos corais, mediante realização de operação de enxerto cirúrgico de tais materiais.

Para além disso, a cola de fibrina serve como um condutor de entrega eficaz de bioactivadores para uma matriz óssea. Como exemplos de tais bioactivadores, pode ser feita menção a TGF- β -1 (Factor de crescimento transformador-beta-1) e BMP relacionado com TGF- β (Proteína morfogenética óssea relacionada com o Factor de crescimento transformador-beta). Recentemente tem sido dada grande particular atenção à cola de fibrina como um material constituinte da matriz que entrega eficazmente as células, nas aplicações de engenharia dos tecidos (Huang Q. Tissue Engineering 2002). As características acima mencionadas relativamente à cola de fibrina levam a um processo de união óssea rápido na presente composição, envolvendo a mistura de osteoblastos com cola de fibrina como material matriz, seguido da aplicação para união óssea.

Com referência aos desenhos, a Fig. 1 apresenta uma cascata de polimerização de fibrina, e a Fig. 2 apresenta esquematicamente a polimerização numa matriz de fibrina.

Para cicatrização de fractura óssea, deverá primeiro imobilizar-se as regiões fracturadas, proporcionar um abastecimento suficiente de sangue e deverá assegurar-se a aplicação de tensão apropriada nas regiões da fractura

óssea. Uma vez ocorrida uma fractura óssea, esta é normalmente acompanhada de danificação na pele, músculos, ligamentos, vasos sanguíneos, nervos e articulações circundantes.

Mediante revisão histológica, os processos de cicatrização de fractura óssea envolvem três fases, isto é, fase de inflamação, de reparação e de remodelação, mas estas fases não se encontram estritamente divididas, mas em contínuo progresso com sobreposições entre si.

A fase de inflamação é um estágio no qual as células na matriz óssea, vasos sanguíneos e também tecidos moles, tais como, perióstio e músculos à volta das regiões da fractura óssea são danificados devida ao trauma causado pela fractura, resultando na formação de hematoma na cavidade medular e sob do perióstio. Os derivados inflamatórios libertos das células necróticas danificadas geram vasodilatação e exudação do plasma sanguíneo, assim causando edema agudo. Após a fase de inflamação, a comutação para uma fase de reparação é seguida da iniciação de uma nova formação de matriz.

A fase de reparação é iniciada com organização do hematoma formado nos locais fracturados. O hematoma cria um suporte de fibrina, o qual recebe depois as células reparadas. Depois, os factores de crescimento ou outras proteínas formadas por estas células reparadas induzem à migração e proliferação celular e dormação duma matriz de reparação, a qual é a primeira fase da restauração da fractura óssea. A maioria das células que cria os tecidos ósseos durante a cicatrização da fractura óssea aparece no local da fractura conjuntamente com os tecidos granulados e

forma casulos, os quais são feitos de tecidos fibrosos, cartilagem e tecidos ósseos à volta do local fracturado. A mineralização de calos é iniciada por acções em série de células osteogénicas. A matriz, a qual é sintetizada por estas células osteogénicas, contém um grande número de fibras colagénicas do tipo I espaçadas de forma regular, as quais proporcionam condições para deposição de complexos de fosfato de cálcio nestes espaços. No entanto, esta fase de reparação não é um estágio no qual a união óssea é concluída e, deste modo, os casulos da fractura imatura resultantes possuem uma força óssea menor comparativamente aos tecidos ósseos normais. Deste modo, durante a fase de remodelação, estes casulos de fractura adquirem a força tal como verificado em tecidos ósseos normais.

No que se refere à fase de remodelação, os tecidos ósseos dentro dos casulos são substituídos por ossos lamerales maduros e os casulos supérfluos e desnecessários dão gradualmente absorvidos. Com base nos resultados de exames com radioisótopos, pode observar-se que a actividade aumentada de radioisótopos é mantida no local da fractura durante um período de tempo prolongado, mesmo após conclusão da união óssea e recuperação de funções do local fracturado para estado normal, tal como mostrado na radiografia. Por conseguinte, a fase de remodelação continua durante alguns anos após ocorrência da união clínica da fractura óssea.

Fig. 3 apresenta um fluxograma que ilustra um processo de preparação duma composição semi-sólida de osteoblastos que contém fibrina para união óssea de acordo com a presente invenção.

Com referência à Fig. 3, um método para preparar uma composição semi-sólida de osteoblastos que contenham fibrina para união óssea de acordo com a presente invenção inclui o isolamento de osteoblastos dum tecido ósseo e meios de cultura/proliferação dos osteoblastos em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ou α -MEM (Minimum Essential Medium, Alpha Modification) para preparar uma suspensão de osteoblastos (S100); e a mistura da suspensão de osteoblastos resultante com um factor coagulante para preparar um agente terapêutico de osteoblastos (S200).

Presentemente, o factor de coagulação é uma mistura de trombina e fibrinogénio.

Presentemente, as fases de preparação do agente terapêutico incluem a dissolução de trombina liofilizada em DMEM líquido ou α -MEM e depois a mistura de 1 a 100 IU/mL da trombina dissolvida com a solução mista de osteoblastos (S210); e a dissolução de fibrinogénio liofilizado em DMEM líquido ou α -MEM e depois a mistura de 20 to 100 mg/mL do fibrinogénio dissolvido com a solução mista de osteoblastos que contém trombina misturada na mesma (S220).

Entretanto, uma concentração de trombina determina um tempo de polimerização de fibrina. Por conseguinte, o tempo de polimerização da fibrina pode ser reduzido entre 4 horas a 3 segundos, dependendo da concentração de trombina. A trombina foi aplicada à concentração de modo a que a composição da presente invenção seja moldada para prevenir os osteoblastos e os factores de coagulação de verterem dos locais da lesão quando injectados num local para união da fractura óssea, sendo que injeção da composição no local afectado leva à formação rápida de uma matriz e formando-

se, assim, uma matriz de poros de fibrina ideal para formação óssea por osteoblastos.

Modo para a Invenção

Doravante, os efeitos duma composição semi-sólida de osteoblastos que contêm fibrina para união óssea, de acordo com um exemplo da presente invenção, irão ser descritos em maior detalhe com referência aos desenhos que acompanham os mesmos.

Primeiro, os osteoblastos foram isolados dos tecidos correspondentes e colocados em cultura em DMEM ou α -MEM durante 4 semanas para proliferar números suficientes de osteoblastos. Depois, os osteoblastos resultantes foram suspensos em DMEM ou α -MEM para preparar uma suspensão de osteoblastos.

Após preparação dum conjunto de cola de fibrina de grau médico à temperatura ambiente, o fibrinogénio foi dissolvido pela adição de uma quantidade adequada de DMEM líquido ou α -MEM para um frasco contendo fibrinogénio liofilizado.

Para além disso, a trombina foi igualmente dissolvida ao se adicionar uma quantidade adequada de DMEM líquido ou α -MEM para um frasco contendo trombina liofilizada.

Depois, a trombina dissolvida foi adicionada num volume 1/5 para a suspensão líquida de osteoblastos e bem mexida.

Uma suspensão de osteoblastos misturada com trombina foi misturada com uma quantidade igual de fibrinogénio para se preparar 500 μ l de uma composição de osteoblastos.

30 coelhos brancos da Nova Zelândia, com aproximadamente 3 kg de peso, independentemente do sexo,

foram divididos num grupo controlo para enxerto ósseo e um grupo experimental para enxerto numa composição semi-sólida de osteoblastos que continham fibrina para união óssea, sendo que cada grupo consistia de 15 coelhos.

De acordo com uma abordagem de Henry, foi feita uma incisão longitudinal no antebraço dos coelhos, expondo assim o eixo do rádio e depois foi produzido o defeito ósseo de 15 mm de tamanho utilizando uma serra, seguindo-se a remoção completa do perióstio da área do defeito ósseo.

No grupo controlo, o osso esponjoso foi previamente recolhido a partir de ossos longos e o enxerto ósseo foi realizado na área do defeito ósseo, seguido de sutura da pele e tecidos subcutâneos.

No grupo experimental, a pele e tecidos subcutâneos foram cuidadosamente suturados de modo a que a área de defeito ósseo se tornasse num espaço livre e a composição de osteoblastos foi injectada três semanas depois, tal como mostrado na Fig.4.

Após terem sido tiradas radiografias numa semana 3, 6 e 9 a contar do início da experiência, a união óssea foi avaliada por atribuição do(s) ponto(s) correspondente(s) para áreas de osteotomia proximal e distal e área de defeito ósseo, respectivamente, dependendo do grau de união óssea da mesma, e a soma dos pontos assim adquiridos.

Quadro 1

Método para determinar a união de fractura óssea para lesões		
Ponto	Área de osteotomia proximal	Área de osteotomia distal
		Porção ligeira de defeito

3	União	União	União
2	Ponte moderada (>50%)	Ponte moderada (>50%)	Ponte moderada (>50%)
1	Ponte ligeira (<50%)	Ponte ligeira (<50%)	Ponte ligeira (<50%)
0	Não união	Não união	Não união

Quadro 2

Resultados após nove semanas de enxerto ósseo em grupos controlo e experimentais		
	Grupo de controlo	Grupo experimental
Excelente (8-9)	14	13
Bom (6-7)	1	2
Suficiente (4-5)	-	-
Fraco (2-3)	-	-
Sem efeito (0-1)	--	-

Fig. 5 apresenta uma radiografia tirada 6 semanas após injeção dum agente terapêutico de osteoblastos semi-sólidos que contém uma mistura de fibrina e osteoblastos após introdução de uma fractura óssea com um tamanho de 15 mm no antebraço de um coelho e pode ser observado que a união completa da fractura óssea foi conseguida.

Fig. 6 apresenta uma fotografia de uma secção de tecido sujeita a coloração com Hematoxilina-Eosina, tirada 6 semanas após injeção dum agente terapêutico de

osteoblastos semi-sólidos que contêm uma mistura de fibrina e osteoblastos após introdução de uma fractura óssea com um tamanho de 15 mm no antebraço de um coelho e foi observada a formação duma ilha óssea isolada.

A Fig. 7 apresenta uma fotografia de uma secção de tecido sujeita a coloração com tricrómio de Masson, tirada 6 semanas após injeção duma mistura de fibrina e osteoblastos após introdução de uma fractura óssea com um tamanho de 15 mm no antebraço de um coelho e pode confirmar-se que o colagénio foi produzido de acordo com padrões pré determinados, representando assim um progresso de formação óssea e formação de vasos sanguíneos entre a mesma (uma linha elíptica vermelha a ponteados).

Deste modo, de acordo com a presente invenção, é apresentado enxerto ósseo sem rejeição imunológica ao se misturar os osteoblastos com fibrina e injectar a mistura nas partes afectadas para união óssea, quando a união óssea não progride devido a fractura óssea grave e exibir efeitos de união óssea rápida e eficaz através da injeção duma composição, a qual foi, de certa forma, adaptada.

Aplicabilidade Industrial

Tal como constante no acima descrito, de acordo com uma composição semi-sólida de osteoblastos que contenha fibrina para união óssea da presente invenção, e um método para preparação da mesma, com a formulação acima descrita, é possível a reunião de fractura óssea, sem que se verifique rejeição clínica do enxerto por meio de injeção de uma mistura de osteoblastos e fibrina num local em que se espera a união óssea, e capaz de obter uma união óssea rápida e eficaz através da injeção duma composição, a qual

foi, de certo modo, moldada por forma a melhorar os problemas associados à probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões indesejáveis resultantes da fuga de osteoblastos injectados do local para a união óssea e, em seguida, a propagação do mesmo para outros locais através da corrente sanguínea, os quais podem ser causados por injeção dum suspensão isolada de osteoblastos.

Para além disso, a presente invenção possibilita o a junção da fractura óssea, a qual permite a realização dum intervenção cirurgica com incisão mínima num local onde a união óssea é esperada, e o qual permite igualmente a obtenção de união óssea através dum injeção única e eficaz dum composição mista de osteoblastos e fibrina das regiões danificadas correspondentes mediante utilização dum sistema de radiação tal como o raio-X.

Embora as realizações preferidas da presente invenção tenham sido divulgadas para efeitos ilustrativos, os especialistas na técnica irão apreciar a possibilidade de aplicação de várias modificações e adições.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista das referências citadas pelo requerente serve apenas para conveniência do leitor e não faz parte do documento da patente europeia. Apesar da compilação cuidadosa das referências, os erros ou as omissões não podem ser excluídos e o EPO rejeita toda a responsabilidade a este respeito.

Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição

- Schlag G. Clinical Orthopedics, 1988 [0020]
- Huang Q. Tissue Engineering, 2002 [0021]

REIVINDICAÇÕES

1. Fibrina que contém uma composição semi-sólida de osteoblastos para curar a fractura óssea, em que a composição é preparada por meio dum método que inclui: meio de cultura/proliferação dum tecido ósseo em Minimum Essential Medium Alpha Modification (alfa-MEM) para preparar uma suspensão de osteoblastos, e mistura da suspensão de osteoblastos resultante com o factor de coagulação para preparar um agente terapêutico de osteoblastos, em que o referido factor de coagulação é uma mistura de trombina e fibrinogénio, em que as fases de preparação do agente terapêutico incluem:
a dissolução de trombina liofilizada em alfa-MEM líquido e depois misturar 1 a 100 IU/mL da trombina dissolvida com a solução misturada de osteoblastos, e a dissolução de fribinogénio liofilizado em alfa-MEM líquido e depois misturar 20 a 100 IU/mL do fibrinogénio dissolvido com a solução misturada de osteoblastos que contém trombina misturada na mesma.

Fig. 1

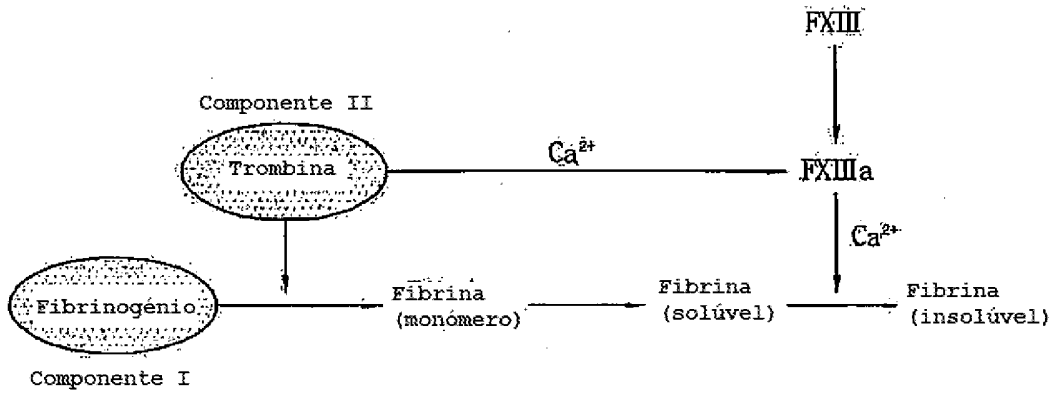


Fig. 2

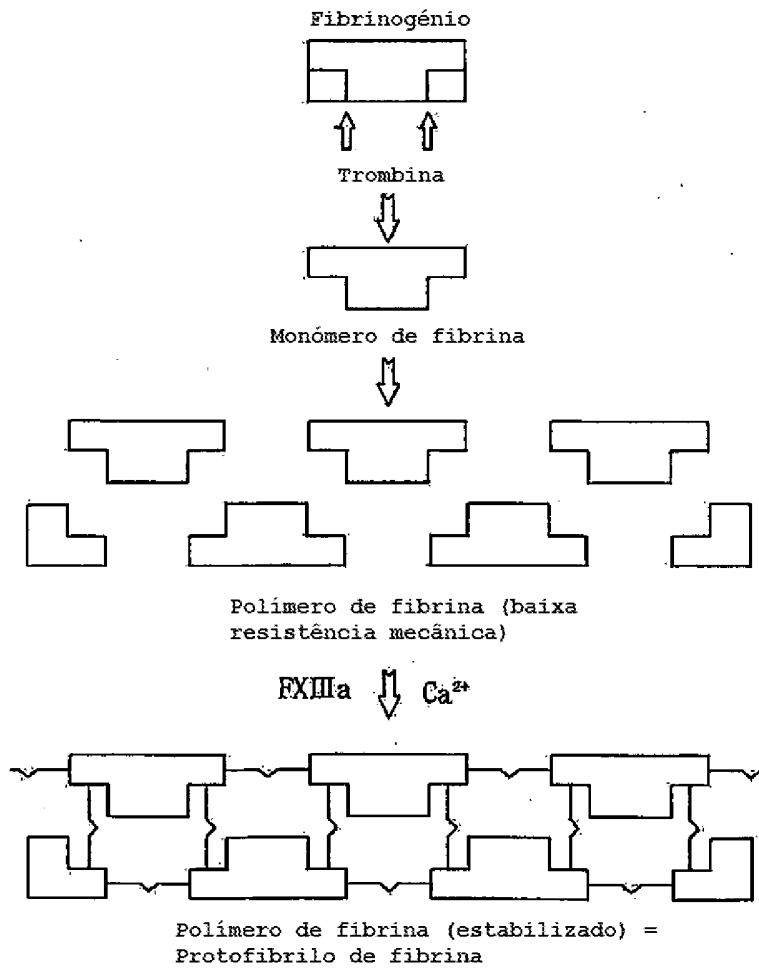


Fig. 3

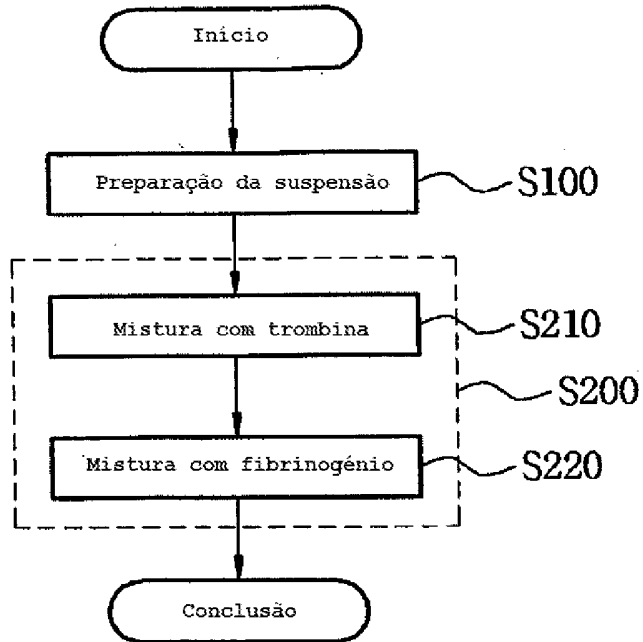


Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6

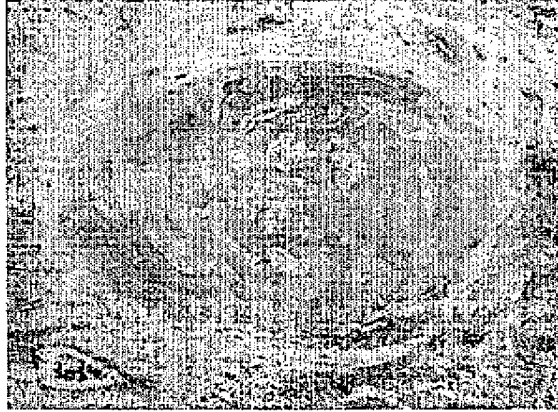


Fig. 7

