

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.06.27	(73) Titular(es): SEWON CELLONTECH CO., LTD.	
(30) Prioridade(s): 2005.06.13 KR 20050050447	10, 11TH., GOODMORNING-SHINHAN TOWER	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.03.12	23-2, YOIDO-DONG YOUNGDEUNGPO-GU,	KR
(45) Data e BPI da concessão: 2011.03.23	(72) Inventor(es):	
104/2011	CHANG-KWON KO	KR
	JAE-DEOG JANG	KR
	CHEONG-HO CHANG	KR
	HYUN-SHIN PARK	KR
	SOO-JIN JUNG	KR
	(74) Mandatário:	
	MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA	PT
	AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO PARA A FORMAÇÃO DE OSSO CONSTITUÍDA POR UMA MISTURA DE OSTEÓBLASTOS E BIOMATRIZ E O SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA UMA COMPOSIÇÃO PARA A FORMAÇÃO DE OSSO, UTILIZANDO UMA MISTURA DE UM OSTEÓBLASTO E DE UMA BIOMATRIZ E UM MÉTODO PARA A SUA PREPARAÇÃO. O MÉTODO COMPREENDE O ISOLAMENTO DE OSTEÓBLASTOS A PARTIR DE TECIDO ÓSSEO E A CULTURA/PROLIFERAÇÃO DOS OSTEÓBLASTOS ISOLADOS EM DMEM (MEIO DE EAGLE MODIFICADO POR DULBECCO) OU EM MEM (MEIO MÍNIMO ESSENCIAL, MODIFICAÇÃO ALFA) PARA SE PREPARAR UMA SUSPENSÃO DE OSTEÓBLASTOS; E MISTURA DA SUSPENSÃO DE OSTEÓBLASTOS RESULTANTE COM UMA BIO-MATRIZ PARA SE PREPARAR UM AGENTE TERAPÊUTICO OSTEÓBLÁSTICO. DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO, É POSSÍVEL UTILIZAR UM MÉTODO DE FORMAÇÃO DE OSSO, SEM PROVOCAR UMA REJEIÇÃO CLÍNICA DO ENXERTO, POR MEIO DE INJEÇÃO DE UMA MISTURA DE OSTEÓBLASTO E BIO-MATRIZ PARA A FORMAÇÃO DE OSSO NUM LOCAL NO QUAL SE PRETENDE A FORMAÇÃO DE OSSO, SENDO CAPAZ DE ALCANÇAR UMA FORMAÇÃO DE OSSO EFICAZ E RÁPIDA POR MEIO DE INJEÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO QUE FOI MOLDADA ATÉ UM DETERMINADO GRAU, PARA ASSIM EVITAR PROBLEMAS ASSOCIADOS À PROBABILIDADE DE FORMAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO EM REGIÕES INDESEJADAS PROVENIENTES DA FUGA DE OSTEÓBLASTOS INJECTADOS DO LOCAL ALVO PARA A FORMAÇÃO DE OSSO E SUA PROPAGAÇÃO PARA OUTROS LOCAIS POR MEIO DA CORRENTE SANGUÍNEA, OS QUAIS SÃO PROVOCADOS PELA INJEÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE OSTEÓBLASTOS.

RESUMO**"COMPOSIÇÃO PARA A FORMAÇÃO DE OSSO CONSTITUÍDA POR UMA
MISTURA DE OSTEOLASTOS E BIOMATRIZ E O SEU MÉTODO DE
PREPARAÇÃO"**

A invenção proporciona uma composição para a formação de osso, utilizando uma mistura de um osteoblasto e de uma biomatriz e um método para a sua preparação. O método compreende o isolamento de osteoblastos a partir de tecido ósseo e a cultura/proliferação dos osteoblastos isolados em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) ou em α -MEM (meio mínimo essencial, modificação alfa) para se preparar uma suspensão de osteoblastos; e mistura da suspensão de osteoblastos resultante com uma bio-matriz para se preparar um agente terapêutico osteoblástico. De acordo com a presente invenção, é possível utilizar um método de formação de osso, sem provocar uma rejeição clínica do enxerto, por meio de injeção de uma mistura de osteoblasto e bio-matriz para a formação de osso num local no qual se pretende a formação de osso, sendo capaz de alcançar uma formação de osso eficaz e rápida por meio de injeção de uma composição que foi moldada até um determinado grau, para assim evitar problemas associados à probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões indesejadas provenientes da fuga de osteoblastos injectados do local alvo para a formação de osso e sua propagação para outros locais por meio da corrente sanguínea, os quais são provocados pela injeção de uma suspensão de osteoblastos.

DESCRIÇÃO**"COMPOSIÇÃO PARA A FORMAÇÃO DE OSSO CONSTITUÍDA POR UMA
MISTURA DE OSTEOLASTOS E BIOMATRIZ E O SEU MÉTODO DE
PREPARAÇÃO"**

[Campo técnico]

A presente invenção diz respeito a uma composição para a formação de osso, utilizando uma mistura de osteoblastos e uma bio-matriz, e a um método para a sua preparação. De um modo mais específico, a presente invenção diz respeito a uma composição para a formação de osso, utilizando uma mistura de osteoblastos e uma bio-matriz, a qual pode ser transplantada para a formação de osso durante o tratamento de defeitos ósseos ou numa região que necessite de tal tratamento, e a um método para a sua preparação.

[Técnica anterior]

De acordo com relatórios publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de metade dos idosos com 65 anos ou mais sofrem de doenças ósseas crónicas, em que a incidência de fracturas ósseas associadas a osteoporose duplicou ao longo da última década. Estes dados correspondem aproximadamente a 40% de mulheres com 50 anos ou mais de idade.

Nos EUA, aproximadamente 5,60 milhões de pessoas sofrem fracturas ósseas por ano, das quais 3,10 milhões são submetidas a operações cirúrgicas. De acordo com um relatório estatístico do Medical Data International (MDI), em 1995, foram realizadas cerca de 426000 de cirurgias de enxertos ósseos. Os custos associados ao enxerto ósseo são

estimados aproximadamente em 800 milhões de dólares norte-americanos por ano em todo o mundo. Apenas para o ano de 1995, foram realizadas cirurgias de enxerto ósseo incluindo 58% de auto-enxertos, 34% de aloenxertos e 8% de transplante de material sintético.

De um modo geral, uma fractura óssea simples (fechada) pode ser suficientemente curada por meio do tratamento da fractura óssea com gesso durante diversas semanas, mas para fracturas ósseas graves ou defeitos ósseos são necessários enxertos ósseos.

No entanto, tais auto-enxertos podem, de um modo desvantajoso, provocar dores fortes na região de colheita de osso e necessitam de um período longo de tempo para recuperar após a operação cirúrgica para enxerto do osso, sendo também difícil encontrar partes seguras de doadores para o fornecimento de osso para o transplante ósseo.

Além disso, os aloenxertos também apresentam desvantagens graves, tais como o enfraquecimento da força do osso durante o processo de esterilização, a ocorrência de rejeição do enxerto e a possibilidade de transmissão de doenças contagiosas, tais como hepatite e SIDA.

Como outros métodos disponíveis para o enxerto ósseo, são amplamente utilizados metais revestidos com materiais cerâmicos biologicamente activos ou biologicamente como materiais de suporte em cirurgias ortopédicas, embora seja bastante difícil a utilização de metais como transplantes ósseos devido a problemas, tais como a corrosão dos metais, o desgaste da superfície cerâmica-metal e a formação grave de tecidos fibrosos nas superfícies dos ossos e dos transplantes.

Para factores de formação de ossos, embora tenham sido realizados diversos estudos sobre diversos factores após Urist e Mclean (1952) terem publicado um trabalho sobre os efeitos das proteínas de formação de ossos na formação óssea, o processo para a sua produção é muito complicado e dispendioso e apresenta uma eficácia baixa, resultando assim num rendimento reduzido e, em último lugar, limitando a sua aplicação para a utilização clínica prática.

Por outro lado, a injeção de medula óssea é uma técnica com base no facto, proposto por Huggins (1931), Friedenstein (1973) e Ashton (1980), de que as células osteoprogenitoras a partir de medula óssea induzem e facilitam a formação óssea. De um modo geral, a injeção de medula óssea é normalmente efectuada por si só para a cura de fracturas ósseas, mas também é utilizada em combinação com enxertos ósseos. Ao contrário das outras técnicas de enxertos de ossos, esta injeção de medula óssea não implica uma incisão cirúrgica na pele, sendo assim significativamente vantajosa devido à inexistência de problemas associados à segurança das partes dos dadores ou em relação a efeitos secundários adversos.

Posteriormente, embora tenham sido apresentados alguns resultados excelentes devido à aplicação clínica num grande número de casos, a injeção de medula óssea é desvantajosa devido à sua base teórica infundada, uma vez que existem números consideráveis de resultados obtidos que não são consistentes entre si, devido à quantidade de medula óssea recolhida a partir de um local ser limitada e ainda existir um número significativamente limitado de células osteoprogenitoras na medula óssea.

Assim sendo, crê-se que um novo método de formação óssea e de transplantação por meio de cultura e de amplificação de células osteoprogenitoras em números suficientes de células de osteoblastos, mistura de células em cultura com uma bio-matriz e injeção da mistura resultante numa região para a formação óssea seja um método eficaz, o qual apresenta efeitos vantajosos e benéficos significativos, em comparação com o auto-enxerto ou aloenxerto convencional e com a injeção de medula óssea, sendo por estes motivos um campo de engenharia de tecidos que está em foco nas terapias de regeneração de óssea.

[Descrição]

[Problemas técnicos]

Assim, a presente invenção foi realizada à luz dos problemas associados aos implantes e às técnicas de enxertos ósseos convencionais conforme descritas antes, e constitui um objecto da presente invenção proporcionar uma composição para a formação óssea utilizando uma mistura de osteoblastos e uma bio-matriz e um método para a preparação da mesma, o qual permita a inexistência de rejeição clínica do enxerto por da injeção de uma mistura de osteoblastos e de uma bio-matriz para a formação óssea num local que necessite da tal formação óssea, sendo também capaz de alcançar uma formação óssea rápida e eficaz por meio da injeção de uma composição, preparada até um determinado nível, para aliviar os problemas associados à provável formação óssea em locais indesejados resultantes da perda de osteoblastos injectados do local desejado para a formação óssea e a sua propagação para outros locais

através da corrente sanguínea, os quais podem ser provocados pela injeção de uma suspensão de osteoblastos.

[Solução técnica]

De acordo com um aspecto da presente invenção, este e outros objectos podem ser atingidos por meio da utilização de um método para a preparação de uma composição para a formação óssea, o qual compreende:

isolar osteoblastos e as suas células precursoras a partir de um tecido ósseo e desenvolver em cultura/ /proliferar os osteoblastos e suas células precursoras isoladas em DMEM (meio de Eagle modificado de Dulbecco) ou α -MEM (meio essencial mínimo, modificação alfa) para a preparação de uma suspensão de osteoblastos e

misturar a suspensão resultante de osteoblastos com uma bio-matriz para a preparação de um agente terapêutico de osteoblastos.

Aqui, o passo de preparação do agente terapêutico compreende ainda misturar a solução mista de osteoblastos, no qual a bio-matriz foi misturada na suspensão de osteoblastos, com um coagulante.

Aqui, o passo de mistura compreende a juntar a solução mista de osteoblastos com 10 a 100 UI/mL de trombina, enquanto coagulante, e mistura a solução resultante mista que contém a trombina aí misturada, com 20 a 100 mg/mL de fibrinogénio, enquanto coagulante.

Aqui, a bio-matriz é colagénio, hidroxiapatite ou uma sua mistura.

Aqui, o colagénio pode ser adicionado numa quantidade compreendida entre 67 μ g/mL e 20 mg/mL à suspensão de osteoblastos e a hidroxiapatite podem ser adicionada numa

quantidade compreendida entre 30 $\mu\text{g/mL}$ e 3,4 mg/mL à suspensão de osteoblastos.

O colagénio é neutralizado até um pH neutro por meio da adição de uma solução de neutralização antes da sua mistura com a suspensão de osteoblastos.

Antes de se adicionar à solução mista de osteoblastos e bio-matriz, dissolve-se trombina liofilizada, enquanto fonte trombina, em DMEM ou α -MEM líquido, à qual se adiciona iões fosfato (PO_4^{3-}) como componente mineral ósseo, adicionando-se uma quantidade que é o dobro da quantidade de trombina no meio de cultura, ao qual se acrescentam os iões fosfato (PO_4^{3-}). Depois, antes de se adicionar à solução resultante mista de osteoblastos, dissolve-se fibrinogénio liofilizado, como fibrinogénio, em DMEM ou α -MEM líquido, aos quais se acrescentou iões de cálcio (Ca^{+2}) como componente mineral ósseo, adicionando-se uma quantidade que é o dobro da quantidade de fibrinogénio contida no meio de cultura, ao qual se adicionou os iões de cálcio (Ca^{+2}).

De acordo com outro aspecto, a presente invenção proporciona uma composição para a formação óssea preparada em conformidade com o método anterior para a preparação de uma composição para formação óssea, utilizando uma mistura de um osteoblasto e uma bio-matriz.

[Efeitos benéficos]

De acordo com uma composição para a formação óssea utilizando uma mistura de um osteoblasto e uma bio-matriz, e com um método para a preparação da mesma, com a construção descrita antes, é possível alcançar formação óssea, com inexistência de rejeição clínica de enxertos por

meio da injeção de uma mistura de osteoblasto e de bio-matriz para a formação óssea num local para o qual se pretende utilizar formação óssea, sendo tal capaz de alcançar uma formação óssea rápida e eficaz por meio de injeção de uma composição, moldada até um determinado grau, para evitar os problemas associados a probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões indesejadas, provocada pela fuga de osteoblastos injectados do local desejado para a formação óssea e a sua propagação para outros locais através da corrente sanguínea, provocada pela injeção de uma suspensão de osteoblastos.

[Descrição dos desenhos]

Os objectos, características e outras vantagens da presente invenção anteriores e outros, irão ser mais facilmente entendidos a partir da descrição minuciosa em conjunto com os desenhos anexos, nos quais:

a fig. 1 é um gráfico de barras que mostra a proporção da composição do osso;

a fig. 2 é um fluxograma do processo que ilustra um método para a preparação de uma composição para formação de osso, utilizando uma mistura de um osteoblasto e uma bio-matriz, em conformidade com a presente invenção;

a fig. 3 é uma fotografia que ilustra a injeção subcutânea de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, num murganho imunodeficiente;

a fig. 4 é uma fotografia de um murganho imunodeficiente tirada 4 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz;

a fig. 5 é uma fotografia de um transplante tirada 4 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, num murganho imunodeficiente;

a fig. 6 é uma autoradiografia de um murganho imunodeficiente tirada 4 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz;

a figura 7 é uma fotografia de uma secção de um tecido manchada com hematoxilina-eosina, que é capaz de confirmar a formação de osso, tirada 8 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, num murganho imunodeficiente e

a figura 8 é uma fotografia de uma secção de um tecido manchada com tricromo de Masson, tirada 8 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, num murganho imunodeficiente.

[Melhor forma de realização]

A seguir, será aqui descrito mais minuciosamente, com referência aos desenhos anexos, um método para a preparação de uma composição para a formação de osso, utilizando uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, de acordo com a presente invenção.

Para se ultrapassar as desvantagens exibidas pelas terapias convencionais para o tratamento de distúrbios e de doenças associadas aos ossos, tais como implantes e enxertos ósseos, foi desenvolvida, em conjunto com uma melhoria nas terapêuticas convencionais, uma técnica de

transplante de osteoblastos autólogos que não apresenta efeitos secundários adversos para a parte afectada, o qual é efectuado por meio da cultura de osteoblastos, como método final de tratamento.

No entanto, para se alcançar uma formação de osso mais rápida, é necessário misturar osteoblastos com uma matriz, através da qual é possível tratar lesões mais distintas, sendo por tal motivo possível tratar mais doenças ósseas, as quais não obtinham benefícios terapêuticos por meio da injeção de uma suspensão líquida de osteoblastos, constituída apenas por osteoblastos.

É possível afirmar que o agente terapêutico de osteoblastos, que é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, constitui uma versão mais avançada de um método por injeção de uma suspensão líquida de osteoblastos, a qual tem por base a terapia celular. O método convencional de injeção de uma suspensão líquida de osteoblastos, o qual implica o transplante de osteoblastos por si sós, pode tratar apenas tipos limitados de defeitos ósseos e também sofre de problemas associados a probabilidade de formação de tecido ósseo em locais indesejados devido à fuga de osteoblastos injectados dos locais desejados de formação óssea e sua propagação para outros locais através da corrente sanguínea. Pelo contrário, o agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, de acordo com a presente invenção, é preparado a partir de uma mistura de osteoblastos e de bio-matriz e, por tal motivo, pode tratar de um modo mais rápido e eficaz um espectro mais largo de defeitos ósseos e doenças ósseas graves.

Os ossos são constituídos por células ósseas e quantidades grandes de matrizes ósseas que estão presentes entre as células. A maior parte das matrizes ósseas são constituídas por componentes orgânicos (35%) constituídos por fibras de colagénio e de componentes inorgânicos (65%) constituídos por cálcio e fosfato.

Os ossos, conforme ilustrado na fig. 1, são substâncias bio-sintéticas e são constituídos por minerais, colagénio, humidade, proteínas não colagénicas, lípidos, componentes vasculares e células, numa ordem decrescente em termos da proporção de composição.

A matéria inorgânica que constitui as porções maiores da composição óssea é um análogo de hidroxiapatite (HÁ) que é um mineral geológico.

De um modo geral, a apatite óssea é deficiente em cálcio e grupos hidroxilo, os quais são substituídos por diversas impurezas, incluindo carbonato e outros, magnésio, potássio, boro, fosfato e citrato, sendo o mais abundante o carbonato.

O teor em carbonato nos minerais dos ossos aumenta com a maturação dos ossos. O carbonato substitui os grupos hidroxilo ou fosfato ou pode ser adsorvido sobre a superfície da apatite óssea.

O segundo constituinte mais abundante dos ossos é o colagénio, principalmente o colagénio de tipo I. O colagénio confere elasticidade e flexibilidade aos ossos e proporciona uma direcção para a constituição da matriz.

De acordo com uma variante da presente invenção, os osteoblastos são misturados com a bio-matriz e a mistura resultante deverá ser injectada em regiões que sofram de doenças ósseas, e o colagénio e hidroxiapatite, os quais

são componentes ósseos, são misturados e injectados nas lesões. Assim sendo, é possível garantir as propriedades físicas dos ossos à partida, obtendo-se assim uma formação óssea mais rápida e ossos adequadamente mineralizados.

Um dos factores mais cruciais na mistura dos osteoblastos, um componente principal da matriz do osso, com a bio-matriz, é a estabilidade. Para se garantir a existência de células em números suficientes dentro da matriz, deverá ser potenciada a taxa de sobrevivência das células. Além disso, também é importante aumentar a taxa de enxertagem das células, após a realização do seu transplante.

A fig. 2 mostra um diagrama de fluxo de um processo que ilustra um método para a preparação de uma composição para a formação de osso, utilizando uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, em conformidade com a presente invenção.

Relativamente à fig. 2, o método para a preparação de uma composição para a formação de osso, de acordo com a presente invenção, compreende os passos de isolar osteoblastos a partir de tecido ósseo e cultura/proliferação dos osteoblastos isolados DMEM (meio de Eagle modificado de Dulbecco) ou α -MEM (meio essencial mínimo, modificação alfa) para se preparar uma suspensão de osteoblastos (S100); e mistura da suspensão resultante de osteoblastos com uma bio-matriz para se preparar um agente terapêutico de osteoblastos (S200).

Aqui, o número de osteoblastos na suspensão de osteoblastos pode variar significativamente em função dos tamanhos e dos locais das lesões relevantes. Tipicamente, o número de osteoblastos está preferencialmente compreendido

entre 10^6 e $1,2 \times 10^7$ células, embora possa ser utilizado um número superior.

Aqui, o passo de preparação (S200) do agente terapêutico de osteoblastos compreende ainda a mistura da solução mista de osteoblastos/bio-matriz, em que a bio-matriz foi misturada na suspensão de osteoblastos, com um coagulante.

Aqui, o passo de mistura compreende a mistura da solução mista de osteoblastos/bio-matriz com 10 a 100 UI/mL de trombina, como coagulante (S220), e a mistura da solução mista resultante que contém trombina aí misturada com 20 a 100 mg/mL de hidroxapatite.

Como bio-matriz é possível utilizar colagénio, hidroxapatite ou uma sua mistura. No caso de se utilizar uma mistura de colagénio e hidroxapatite como bio-matriz, mistura-se 67 µg/mL e 20 mg/mL de colagénio com 30 µg/mL a 3,4 mg/mL de hidroxapatite.

Entretanto, verificou-se que uma concentração mínima de colagénio era a concentração óptima em cultura que induzia a diferenciação e proliferação celulares, no caso de se utilizar colagénio como material de revestimento para revestir um vaso de cultura para o desenvolvimento em cultura de osteoblastos. Quando a concentração de colagénio utilizada neste ponto era aplicada como componente da matriz, foi possível confirmar que durante a injeção da composição, na qual os osteoblastos e a bio-matriz foram misturados entre si, os componentes de colagénio, que tinham sido injectados antes dos osteoblastos expressarem colagénio, formavam uma rede matricial básica, verificando-se uma diferenciação celular e uma mineralização rápida, as quais proporcionaram consequentemente uma formação rápida

de osso com uma quantidade mínima de colagénio. Entretanto, no caso de se utilizar colagénio como matriz única, uma concentração de colagénio igual ou superior a 3 mg/mL (0,3%) proporcionava gelação sob condições predeterminadas, formando assim uma matriz. Pelo contrário, uma concentração máxima de 20 mg/mL de colagénio resulta numa diminuição acentuada da sua fluidez, pelo que os osteoblastos não são dispersados homogeneamente na matriz de colagénio, dificultando assim a aplicação de colagénio como matriz celular.

Além do mais, a hidroxiapatite deverá ser adicionada numa concentração tal que a hidroxiapatite promova a mineralização numa mistura de matriz. No caso de existir um excesso de hidroxiapatite, tal poderá inibir a diferenciação celular devido à restrição espacial que ocorre devido á ocupação de hidroxiapatite na mistura de matriz celular. Assim sendo, de acordo com a presente invenção, aplicou-se hidroxiapatite numa concentração mínima para a qual a hidroxiapatite pode actuar enquanto núcleo para mineralização no componente da matriz e numa concentração óptima para a promoção de mineralização.

Por outro lado, o colagénio é neutralizado até um pH neutro por meio da adição de uma solução de neutralização, antes de se misturar com a suspensão de osteoblastos.

Além do mais, antes de se adicionar à solução mista de osteoblastos e bio-matriz, dissolve-se trombina liofilizada, como trombina, em DMEM ou α -MEM líquido, à qual se adiciona iões fosfato (PO_4^{3-}), adicionando-se uma quantidade que é o dobro da quantidade de trombina no meio de cultura, ao qual se acrescentam os iões fosfato (PO_4^{3-}). Depois, antes de se adicionar à solução resultante mista de

osteoblastos, dissolve-se fibrinogénio liofilizado, como fibrinogénio, em DMEM ou α -MEM líquido, aos quais se acrescentou iões de cálcio (Ca^{+2}) como componente mineral ósseo, adicionando-se uma quantidade que é o dobro da quantidade de fibrinogénio contida no meio de cultura, ao qual se adicionou os iões de cálcio (Ca^{+2}). Aqui, os iões fosfato e os iões cálcio não exibem efeitos citotóxicos sobre os osteoblastos e complementam os componentes ósseos minerais.

Mistura trombina, enquanto coagulante, numa quantidade compreendida entre 10 e 100 UI/mL na solução mista, e mistura-se fibrinogénio, como coagulante, numa quantidade compreendida entre 20 mg/mL e 100 mg/mL, com a mistura resultante, a qual contém a trombina misturada.

Assim, a concentração de trombina determina o tempo de polimerização da fibrina. Assim sendo, o tempo de polimerização de fibrina pode ser reduzido num intervalo compreendido entre 4 horas e 3 segundos, em função da concentração de trombina. Aplicou-se trombina numa concentração tal que a composição da presente invenção é moldada para prevenir que uma composição mista de osteoblastos e bio-matriz se afastem dos locais lesionados relevantes, quando injectada num local para a formação de osso; a injeção da composição no local afectado proporciona uma polimerização rápida e forma-se uma matriz porosa de fibrina óptima para a formação do osso através de osteoblastos.

[Forma de realização da invenção]

EXEMPLOS

Aqui, serão descritos mais minuciosamente, com referência aos desenhos anexos, os efeitos de uma composição para a formação de osso, utilizando uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, de acordo com um exemplo da presente invenção.

Exemplo 1

Em primeiro lugar, isolou-se osteoblastos e as suas células precursoras a partir dos tecidos correspondentes e desenvolveu-se em cultura e proliferou-se em DMEM ou α -MEM durante 4 semanas, preparando-se assim uma suspensão de osteoblastos em DMEM ou α -MEM. Preparou-se colagénio como a bio-matriz que iria ser misturada.

Depois, misturou-se a suspensão resultante de osteoblastos com colagénio, para se preparar um total de 1 mL de uma composição para a formação de osso.

Exemplo 2

Isolou-se osteoblastos e as suas células precursoras a partir dos tecidos correspondentes, e desenvolveu-se em cultura e proliferou-se em DMEM ou α -MEM durante 4 semanas, preparando-se assim uma suspensão de osteoblastos em DMEM ou α -MEM. Como bio-matrizes preparou-se colagénio e hidroxiapatite. Como bio-matriz para mistura, preparou-se 2/5 volumes de colagénio.

Misturou-se a suspensão de osteoblastos com colagénio para se preparar um total de 1 mL de uma composição para a formação de ossos.

Exemplo 3

Isolou-se osteoblastos e as suas células precursoras a partir dos tecidos correspondentes, e desenvolveu-se em cultura e proliferou-se em DMEM ou α -MEM durante 4 semanas, preparando-se assim uma suspensão de osteoblastos em DMEM ou α -MEM. Como bio-matrizes preparou-se colagénio e hidroxiapatite. Adicionou-se 2/5 volumes de colagénio e 1/10 volume de hidroxiapatite à suspensão de osteoblastos e misturou-se bem, formando assim um agente terapêutico de osteoblastos misturado com bio-matrizes.

Após a preparação de uma cola de fibrina de qualidade médica à temperatura ambiente, dissolveu-se fibrinogénio por meio da adição de uma quantidade adequada de DMEM ou α -MEM líquido a um recipiente adequado que continha o fibrinogénio liofilizado. Além disso, dissolveu-se também trombina por meio da adição de uma quantidade adequada de DMEM ou α -MEM líquido a um recipiente adequado que continha a trombina liofilizada.

Depois, adicionou-se 1/10 volume de trombina dissolvida à suspensão líquida de osteoblastos, nos quais se tinham misturado as bio-matrizes, e misturou-se bem a mistura resultante.

Misturou-se a suspensão de osteoblastos misturada com trombina e com as bio-matrizes com uma quantidade igual de fibrinogénio dissolvido para se preparar um total de 1 mL de uma composição para a formação de ossos.

Exemplo 4

Isolou-se osteoblastos e as suas células precursoras a partir dos tecidos correspondentes, e desenvolveu-se em cultura e proliferou-se em DMEM ou α -MEM durante 4 semanas,

preparando-se assim uma suspensão de osteoblastos em DMEM ou α -MEM. Como bio-matrizes preparou-se colagénio e hidroxiapatite. Adicionou-se 2/5 volumes de colagénio e 1/10 volume de hidroxiapatite à suspensão de osteoblastos e misturou-se bem, formando assim um agente terapêutico de osteoblastos misturado com bio-matrizes.

Após a preparação de uma cola de fibrina de qualidade médica à temperatura ambiente, dissolveu-se fibrinogénio por meio da adição de uma quantidade adequada de DMEM ou α -MEM líquido a um recipiente adequado que continha o fibrinogénio liofilizado. Além disso, dissolveu-se também trombina por meio da adição de uma quantidade adequada de DMEM ou α -MEM líquido a um recipiente adequado que continha a trombina liofilizada.

Neste momento, utilizou-se DMEM ou α -MEM líquido, ao qual se tinha adicionado iões fosfato (PO_4^{3-}) numa concentração de 2 mg/mL. Além disso, adicionou-se uma quantidade adequada de DMEM ou α -MEM líquido a um recipiente que continha a trombina liofilizada, dissolvendo assim a trombina. Neste momento, utilizou-se DMEM ou α -MEM líquido ao qual se tinham adicionado iões cálcio (Ca^{2+}) numa concentração de 4 mg/mL. As quantidades de iões fosfato (PO_4^{3-}) e de iões cálcio (Ca^{2+}) aqui utilizadas são quantidades óptimas, as quais não exibem efeitos citotóxicos sobre os osteoblastos e servem como aditivos para a solução de cultura para complementares os componentes ósseos minerais.

Depois, adicionou-se a trombina dissolvida num 1/10 volume à suspensão líquida de osteoblastos misturada com bio-matrizes e misturou-se bem.

Misturou-se a suspensão de osteoblastos, que continha trombina e bio-matrizes aí misturadas, com uma quantidade igual de fibrinogénio dissolvido para se preparar um total de 1 mL de uma composição para a formação de ossos.

Resultados

Dividiu-se 15 murganhos imunodeficientes em 6 grupos (ensaio triplo). Depois, preparou-se um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, e injectou-se na omoplata de murganhos rapados através de uma injeção por via subcutânea. Injectou-se 1 mL do agente terapêutico de osteoblastos na hipoderme de cada murganho imunodeficiente. Os resultados foram confirmados 4 semanas e 8 semanas após a injeção.

Quadro 1

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Número de células (células)	1×10^6 células	6×10^6 células	$1,2 \times 10^7$ células
Volume de injeção (cm ³)	1 mL	1 mL	1 mL

O quadro 1 mostra os agentes terapêuticos de osteoblastos respectivos que possuem a mesma composição de bio-matriz, mas diferente número de osteoblastos, os quais são misturas de osteoblastos e bio-matrizes, transplantados em murganhos imunodeficientes.

Quadro 2

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Tamanho em volume (cm ³)	0,26	0,24	0,25
Formação de osso	Boa	Boa	Boa

Aqui, o grau de formação de osso é classificado em termos de excelente/boa/média/fraca.

Oito semanas após o transplante dos agentes terapêuticos de osteoblastos, conforme descritos no quadro 1, obteve-se os resultados para a formação de osso apresentados no quadro 2.

Quadro 3

	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Número de células (células)	6 x 10 ⁶ células	6 x 10 ⁶ células	6 x 10 ⁶ células
Vol. De colagénio	1/5	2/5	1
Volume de injeção (cm ³)	1 mL	1 mL	1 mL

O quadro 3 mostra agentes terapêuticos de osteoblastos respectivos que possuem diferentes quantidades de bio-matriz adicionadas, os quais são misturas de osteoblastos e de bio-matrizes, transplantados em murganhos imunodeficientes.

Quadro 4

	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Tamanho em volume (cm ³)	0,24	0,52	0,50
Formação de osso	Boa	Excelente	Excelente

Aqui, o grau de formação de osso é classificado em termos de excelente/boa/média/fraca.

Oito semanas após o transplante dos agentes terapêuticos de osteoblastos, conforme descritos no quadro 3, obteve-se os resultados para a formação de osso apresentados no quadro 4.

A fig. 3 é uma fotografia que ilustra a injeção subcutânea de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, num murgancho imunodeficiente. A fig. 4 é uma fotografia da formação de osso (observada como a porção saliente circunscrita por uma linha a tracejado) num murgancho imunodeficiente, tirada 4 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz.

A fig. 5 é uma fotografia de um transplante para a formação de osso tirada 4 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, num murgancho imunodeficiente, confirmando assim que a formação de vasos sanguíneos foi induzida à volta do transplante. A fig. 6 é uma autoradiografia de um murgancho imunodeficiente, tirada 4 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, e observou-se que o novo osso foi formado na estrutura principal, conforme circunscrito por um círculo a linha a tracejado.

A fig. 7 é uma fotografia de uma secção de tecido manchada com hematotoxilina-eosina, que é capaz de confirmar a formação de osso, tirada 8 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, num murgancho imunodeficiente. Conforme pode ser observado,

verifica-se um osteóide (representado por uma seta preta) e também é possível confirmar que os osteoblastos estão distribuídos na lacuna (representada por uma seta branca).

A fig. 8 é uma fotografia de uma secção de tecido manchada com tricromo de Masson, tirada 8 semanas após o transplante de um agente terapêutico de osteoblastos, o qual é uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, num murganho imunodeficiente, e é possível confirmar que ocorreu a formação de osso em conjunto com colagénio segundo padrões predeterminados, mostrando assim a penetração de vasos sanguíneos entre as matrizes.

Assim, de acordo com a presente invenção, esta proporciona um método para a formação de osso, através do qual não se verifica a rejeição clínica de enxertos por meio de injeção de uma mistura de osteoblastos e de uma bio-matriz num local no qual se pretende a formação de osso, sendo possível alcançar uma formação de osso rápida e eficaz por meio de injeção de uma composição, que foi moldada até um determinado grau.

[Aplicabilidade industrial]

De acordo com a presente invenção, uma composição para a formação de osso, utilizando uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, e um método para a preparação da mesma, que possui a construção descrita antes, permite efectuar a formação de osso, através da qual não se verifica rejeição clínica do enxerto por meio de injeção de uma mistura de osteoblastos e de uma bio-matriz para a formação de osso num local no qual se pretende a formação de osso, sendo possível alcançar uma formação de osso rápida e eficaz por meio de injeção de uma

composição, que foi moldada até um determinado grau, para evitar problemas associados à probabilidade de formação de tecido ósseo em regiões indesejadas provenientes da fuga de osteoblastos injectados do local alvo para a formação de osso e sua propagação para outros locais por meio da corrente sanguínea, os quais são provocados pela injeção de uma suspensão de osteoblastos.

Embora as variantes preferidas da presente invenção tenham sido apresentadas com fins ilustrativos, será evidente para os especialistas na matéria que são possíveis diversas modificações, adições e substituições.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para a formação de osso, preparada através de um método para a preparação de uma composição para a formação de osso utilizando uma mistura de um osteoblasto e de uma bio-matriz, o qual compreende:

desenvolvimento em cultura/proliferação de osteoblastos ou das suas células precursoras isolados em α -MEM (meio mínimo essencial, modificação alfa a partir de um tecido ósseo) para a preparação de uma suspensão de osteoblastos e

mistura da suspensão resultante de osteoblastos com uma bio-matriz para a preparação de um agente terapêutico de osteoblastos,

em que a bio-matriz é uma mistura de colagénio e hidroxiapatite,

em que o colagénio é adicionado numa quantidade compreendida entre 67 $\mu\text{g/mL}$ e 20 mg/mL à suspensão de osteoblastos e a hidroxiapatite é adicionada numa quantidade compreendida entre 30 $\mu\text{g/mL}$ e 3,4 mg/mL à suspensão de osteoblastos.

2. Composição para a formação de osso de acordo com a reivindicação 1, em que o passo de preparação do agente terapêutico compreende ainda a mistura da solução mista de osteoblastos, em que a bio-matriz foi misturada com a suspensão de osteoblastos, com um coagulante.

3. Composição para a formação de osso de acordo com a reivindicação 2, em que o passo de mistura compreende:

misturar a solução mista de osteoblastos com 10 a 100 UI/mL de trombina como coagulante e

misturar a solução resultante mista, que contém trombina misturada, com 20 a 100 mg/mL de fibrinogénio, como coagulante.

4. Composição para a formação de osso de acordo com a reivindicação 1, em que o colagénio é neutralizado até pH neutro por meio da adição de uma solução de neutralização antes da mistura com a suspensão de osteoblastos.

5. Composição para a formação de osso de acordo com a reivindicação 3, em que

antes de se adicionar à mistura de osteoblastos e biomatriz, dissolve-se trombina liofilizada, enquanto trombina, em α -MEM líquido, à qual se adicionou iões fosfato (PO_4^{3-}) como componente mineral ósseo, adicionando-se uma quantidade que é o dobro da quantidade de trombina no meio de cultura, ao qual se acrescentou os iões fosfato (PO_4^{3-}) e

antes de se adicionar à solução resultante mista de osteoblastos, dissolve-se fibrinogénio liofilizado, como fibrinogénio, em α -MEM líquido, ao qual se acrescentou iões de cálcio (Ca^{+2}) como componente mineral ósseo, adicionando-se uma quantidade que é o dobro da quantidade de fibrinogénio contida no meio de cultura, ao qual se adicionou os iões de cálcio (Ca^{+2}).

Fig. 1

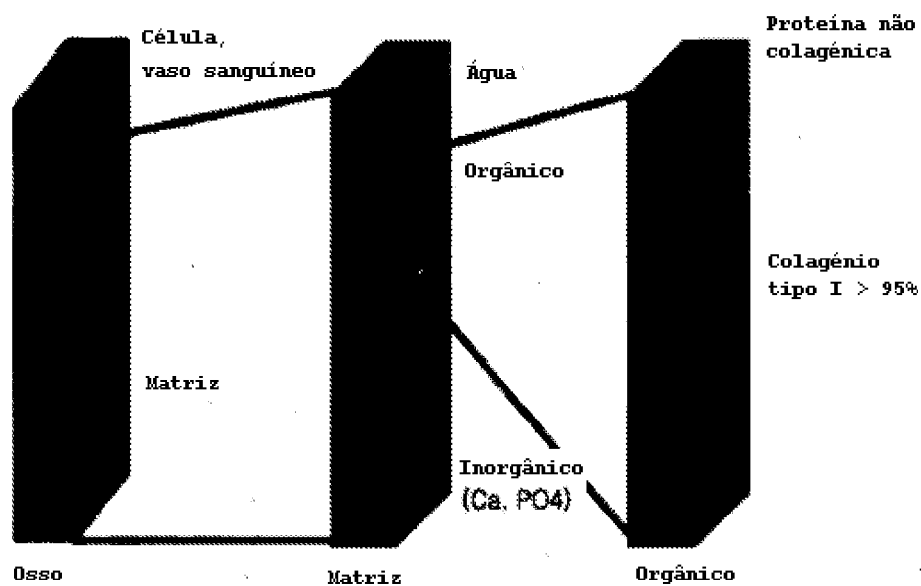


Fig. 2

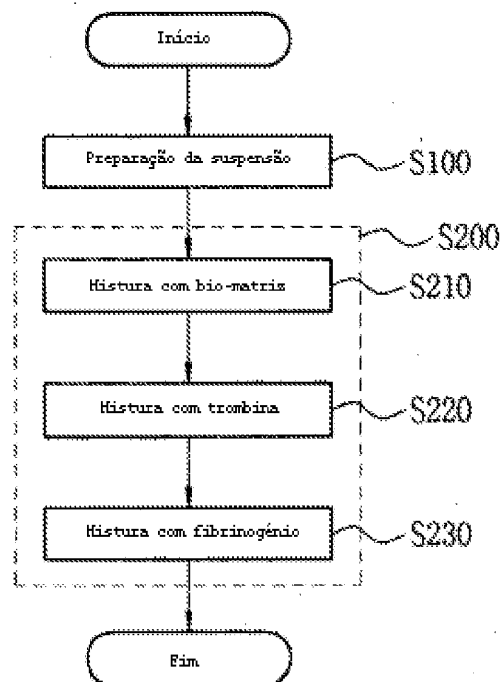


Fig. 3

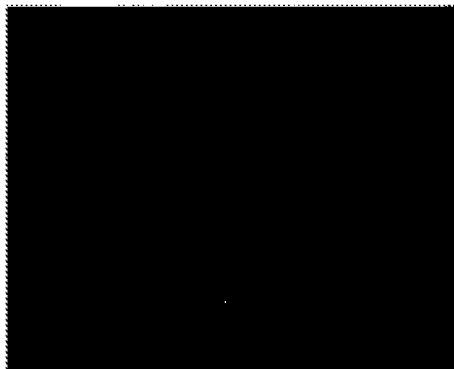


Fig. 4

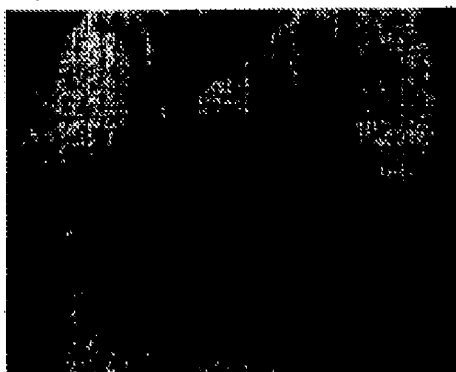


Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8

